

· 论 著 ·

广东顺德地区 180 例 β - 地中海贫血患儿基因诊断分析

梁瑞珍, 梁玉全, 阮淑韵

摘要:目的 了解分析广东省顺德地区儿童 β - 地中海贫血的检出率、基因突变类型及其基因分布, 为开展相关研究与治疗提供依据。方法 采用 PCR 反向斑点杂交技术(RDB)检测 14 种 β - 地中海贫血基因类型。结果 在 516 例儿童对象中检出 10 种 β - 地贫基因突变类型, 其中确诊携带 β - 地中海贫血突变基因有 180 例, 检出率为 34.88%, 全为杂合子, 未见纯合子。按其发生频率高低依次为: CD41-42 占 46.66%, IVS-654 占 16.66%, CD17 占 15.0%, TATA box-28 占 8.33%, CD71-72 占 5.0%, CD43 β E 各占 1.67%。其中双重杂合子有 9 例, 占确诊患儿 5.0%。分别为 $\text{CD41-42}/\beta$ E, $\text{CD41-42}/\text{CD17}$, $\text{CD41-42}/\text{TATA box-28}$, 各占 1.67%。结论 本研究初步揭示了顺德地区 β - 地中海贫血的检出率、基因类型及基因频率, β - 地中海贫血基因突变类型分布存在区域差异, 为进行遗传咨询、临床治疗和婚育指导提供了有价值的基础资料。

关键词: β - 地中海贫血; 基因突变类型; 反向斑点杂交技术; 区域性
中图分类号: R556.6⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)5-612-03

Analysis on types of gene mutation in 180 cases of children with β - thalassemia in Shunde Area of Guangdong. LIANG Rui-zhen, LIANG Yu-quan, RUAN Shu-yun. (Department of Clinical Laboratory, Shunde First People's Hospital, Shunde, 528300)

Abstract: Objective To analyze the types of gene mutation and gene frequency of in β - thalassemia in children in Shunde. Methods The type of gene mutation and gene frequency of β - Thalassemia was analyzed by PCR-RDB. Result 180 cases out of 516 were diagnosed as β - thalassemia gene mutation. 10 kinds of mutation were detected, involving 180 mutation sites, and the detectable rate was 34.88%. and the descending rate were in the order of: S-654 (16.66%), CD17 (15.0%), TATA box-28 (8.33%), CD71-72 (5.0%), CD (43.1.67%), β E (1.67%), CD41-42 (46.66%), CD41-42/ β E (1.67%), CD41-42/CD17 (1.67%), CD41-42/TATA box-28 (1.67%). Conclusion The type of gene mutation and frequency of β thalassemia were detected in Shunde. The type of gene mutation of β - thalassemia is distributed by regional difference, which provides a basis for hereditary consultation, clinical therapy and procreative guidance.

Key words: β - thalassemia; Gene mutation; RDB; Regional.

β - 地中海贫血(简称 β - 地贫)是世界上发生率最高的一种单基因遗传病,其主要特征为珠蛋白肽链合成不足(β^+)或缺如(β^0),引起遗传性溶血性贫血。目前已发现的 β - 珠蛋白基因突变有 300 多种,在中国人群中已发现 29 种 β - 珠蛋白基因突变^[1]。在不同人群和地区中存在不同的突变热点。在中国人群中主要有三种热点突变,它们分别是外显子 1 上的 $\text{CD41/42}(-\text{TCTT})$ 突变,占 44.2%;外显子 1 上的 $\text{CD17}(\text{A}\rightarrow\text{T})$ 突变,占 19.2%;启动子中 $-28(\text{A}\rightarrow\text{G})$ 突变,占 19.2%。由于 β - 地中海贫血是高度异质性的单基因遗传病,致使该病呈现出临床表现的高度异质性以及明显的种族和地域差异。而且不同的基因突变可导致不同的临床表现。2008 年谢健敏等^[2]对顺德地区 1110 名婚检人群携带地中海贫血基因状况进行调查,并发现该地 β - 地贫基因携带率达 3.91%。为了进一步分析顺德地区近年来的 β - 地中海贫血突变基因类型及其发生频率,本研究对 516 例儿童进行地贫基因检测,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 2010 年 10 月~2011 年 5 月于顺德第一人民医院门诊和住院部检测地中海贫血基因的儿童 516 例,年龄 0~14 岁。用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2ml,注入含 EDTA 或枸橼酸钠抗凝剂的试管中,立即轻轻颠倒试管使全血充分混匀。

1.1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪是 2720 型定量 PCR 扩增仪,由美国 ABI 公司提供。 β - 地中海贫血基因诊断试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取 300 μ l 抗凝血,经灭菌双蒸水 2 次洗涤弃上清,再用生理盐水洗涤,彻底弃上清后得到白色沉淀物,分别加入 5 μ l DNA 提取液和 50 μ l DNA 提取液,打匀,放 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱孵育 10min。加入 50 μ l DNA 提取液,充分混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 20min,10000rpm 离心 5min,上清即可用于 PCR 反

作者单位:南方医科大学附属佛山市顺德第一人民医院检验科 广东 顺德 528300

作者简介:梁瑞珍(1975~),女,汉族,本科,主管技师,主要从事临床检验工作。

应, 20℃保存。

1.2.2 PCR 扩增 取 PCR 反应管, 加入提取好的标本 5μl, 由 2720 型定量 PCR 仪进行扩增, 反应条件为 93℃ 3min 预变性后, 置 93℃ 45s, 57℃ 45s, 72℃ 60s, 共 35 个循环, 最后置 72℃ 延伸 5min。完成后, 扩增产物即可用于反向斑点杂交。

1.2.3 反向斑点杂交 取已结合 β - 地贫基因突变的等位基因特异性寡核苷酸(ASO)探针的尼龙膜条, 浸入杂交液中, 加入两管扩增产物并混匀, 100℃煮沸 10min 变性后, 置 42℃水浴箱杂交过夜, 后经杂交液、和溶液洗膜后, 按说明书剂量分别用溶液、溶液、溶液配制显色液, 膜条转至显色液中避光显色 10min, 再转移膜条至 30ml 25℃溶液, 震荡 5min 后观察结果, 膜条有蓝色杂交斑点为阳性结果。

1.2.4 显色结果 观察结果: 若在突变检测探针处, 出现显色强度与相应的野生型探针相近的蓝色斑点, 则该位点为野生与突变的杂合子, 若在突变检测探针处出现蓝色斑点, 而相应的野生型探针处并未出现蓝

色斑点, 则该位点为突变纯合子, 若仅在野生型探针处出现蓝色斑点, 则待检样品没有上述 14 种突变。

2 结果

通过 PCR 反向斑点杂交法(RDB)检测就诊儿童的 14 种 β - 地贫基因, 确诊为 β - 地中海贫血的共有 180 例, 检出率为 34.88%。共检出 10 种 β - 地贫基因突变类型, 全部为杂合子, 未发现纯合子。其中 CD41-42 突变频率最高 84 例, 占 46.66%; 其次为 IVS- -654 30 例, 占 16.66%; 其他基因突变类型依次排序为 CD17, 占 15.0%; TATA box-28, 占 8.33%; CD71-72, 占 5.0%; CD43、β E 各占 1.67%。结果中, 地贫基因突变双重杂合子占 9 例, 占检出率 5.0%, 分别为 CD41-42/β E, CD41-42/CD17, CD41-42/TATA box-28, 各占 1.67%。β - 地贫基因突变类型及频率分布结果见表 1。

3 讨论

β - 地中海贫血是我国南方常见的一种单基因遗传病。该病具有高度异质性, 分子遗传流行病学资

表 1 广东顺德地区 β - 地中海贫血基因突变类型和频率及与其他地区比较(%)

Table1 Beta-thalassemia gene mutation type and frequency of Shunde, Guangdong and compared with other regions (%)

突变类型 Mutation type	例数 Cases	顺德频率 Shunde frequency	深圳频率 ^[3] Shenzhen frequency	广东频率 ^[4] Guangdong frequency	湖南频率 ^[5] Hunan frequency	中国频率 ^[4] China frequency
CD41-42	84	46.66	38.1	47.0	40.77	41.6
IVS- -654	30	16.66	26.7	22.7	22.81	21.8
CD17	27	15.0	9.52	15.0	7.76	18.0
TATA box -28	15	8.33	2.85	8.9	7.28	8.0
CD71-72	9	5.0	1.90	2.5	2.43	3.9
CD43	3	1.67	3.81	-	-	-
β E	3	1.67	0.90	-	-	-
CD41-42 /β E	3	1.67	0.90	-	-	-
CD41-42 /CD17	3	1.67	0.90	-	0.97	-
CD41-42/TATA box -28	3	1.67	0.90	-	0.49	-
合计 Total	180	100	-	-	-	-

料显示, 目前全世界约有 1.5 亿以上人口携带地中海贫血基因^[6]。β - 地中海贫血的分子基础多见点突变, β - 珠蛋白基因簇位于第 11 号染色体上, 当其中某个碱基发生替代或缺失, 插入、转录就受到阻碍, 不能产生 β 链 mRNA 或 mRNA 生成异常, 从而导致 β - 珠蛋白的合成障碍。β - 地中海贫血分子基础及遗传方式较明确, 也是世界上少数几种通过人群干预可以预防的常见人类单基因遗传病之一。所以, 预防为主干预 β - 地中海贫血患儿的出生显得尤为重要。

本次研究运用 PCR 反向斑点杂交技术(RDB), 完成了前来该医院进行 β - 地中海贫血基因分析的儿童, 确诊有 180 例儿童携带 β - 地中海贫血突变基因, 共检测到 10 种 β - 地中海贫血突变基因类型。全部为杂合子, 未发现纯合子, 也未发现其他基因突变

类型, 这提示了顺德地区 β - 地中海贫血基因遗传异质相对较小。统计结果表明顺德地区儿童 β - 地中海贫血突变基因发生频率主要为 CD41-42, IVS- -654, CD17, TATA box-28, CD71-72 这几种, 共占 91.66%。从表 1 可以看出, CD41-42, IVS- -654, CD17 这 3 种基因突变类型在顺德地区儿童人群中最常见。通过比较发现, 顺德地区儿童 β - 地中海贫血突变基因类型发生频率与其他地区存在一定的差异, 证明了 β - 地中海贫血基因突变类型的存在区域性差异^[7]。本研究结果初步明确了顺德地区最常见的 β - 地中海贫血基因突变类型, 这为以后在该地区开展 β - 地中海贫血基因分析及产前诊断提供了有益的资料, 可在临床诊断中被广泛使用。

重型 β - 地中海贫血是由于 β 基因的缺陷使体内

β 链合成减少或消失,导致 α β 链出现不平衡,正常合成的 α 链无相应的 β 链与之结合成 $\alpha_2\beta_2$ (HbA)四聚体,而游离于红细胞内形成 α_4 四聚体,进而形成 α 包涵体,此包涵体附着于红细胞膜上,即影响红细胞的分化成熟,又可使红细胞膜受损,造成红细胞无效生成和严重的溶血,这是造成重型 β 地贫临床表现的分子病理生理学基础^[8]。该病初表现为严重溶血性贫血外还有黄疸、肝脾肿大、骨变形、生长迟缓等特征,通常在青春期前死亡^[9,10]。目前尚无良好的根治办法,当患者严重贫血时,只能依赖长期输血和合理的除铁方法维持生命,给家庭和社会造成严重的负担。近年来,随着社会经济的发展,我国人口的迁徙与流动更加活跃,广东省人口密集并为地中海贫血高发区,顺德位于广东的中心地区。两个同型地中海贫血的人结婚的机会很多。基因突变类型复杂,而且不同地区其 β - 地贫基因突变类型及发生频率亦不尽相同。故在顺德地区有针对性地进行基因诊断及产前诊断,对防止重型患儿的出生很有必要。

可见,了解顺德地区人群中地中海贫血的基因背景是控制该病的重要前提。因此,临床医生特别是从事妇幼保健工作的医务人员对此应有进一步的认识。从本组地贫患儿的祖籍来源分布情况来看,符合我国地贫的地域分布特征。因此,建议对来自我国南方地贫高发区的人群除做好婚前该方面的检查外,对孕妇应常规进行血常规、血红蛋白电泳及红细胞脆性试验(地贫筛查)检查,必要时进行地贫基因检测,以尽可能地减少地贫的漏诊,搞好优生工作,提高后代生存质量。预防和减少地贫患儿的出生是一项艰巨而长期的任务,重型地贫的筛查诊断一直是遗传医学工作者的研究重点,对于已经确诊的地贫基因携带者,建议进一步做好婚前检查、基因诊断、产前诊断等婚育保健工作。有效地早期防治地贫,有利于提高人群健康素质。

参考文献:

- [1] Wu DL, Zhang Y. Beta-thalassemia research progress and birth intervention [J]. Chin J Birth Health and Heredity 2004, 12(3): 153-154. (In Chinese)
(武大林, 张彦. β -地中海贫血研究进展与出生干预[J]. 中国优生与遗传杂志 2004, 12(3): 153-154.)
- [2] Xie JM, Liang YQ. Epidemiological investigation of β -thalassemia in Shunde Area of Guangdong [J]. China tropical medicine, 2008, 8(10): 1687-1688. (In Chinese)
(谢健敏, 梁玉全. 广东顺德地区 β -地中海贫血流行病学调查[J]. 中国热带医学 2008, 8(10): 1687-1688.)
- [3] Hua J, Li M. The gene diagnosis of 175 children with thalassemia [J]. International medicine and health guidance news, 2005, 11(14): 9-10. (In Chinese)
(华静, 李明. 175 例儿童地中海贫血的基因诊断分析[J]. 国际医药卫生报道 2005, 11(14): 9-10.)
- [4] Zhou YQ, Xu XM. The molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia of Chinese [J]. Foreign Medical-Genetics Volume, 1995, 18(3): 132-137. (In Chinese)
(周玉球, 徐湘民. 中国人 β 地中海贫血的分子基础及产前诊断[J]. 国外医学遗传学分册, 1995, 18(3): 132-137.)
- [5] Li WL, Zhou AJ. Analysis of beta-thalassemia gene mutations of 206 cases of children in Hunan Province [J]. J Pediatrics of Tcm 2009, 5(3): 38-42. (In Chinese)
(李婉丽, 邹爱军. 湖南地区 206 例儿童 β -地中海贫血基因突变类型分析[J]. 中医儿科杂志 2009, 5(3): 38-42.)
- [6] Cao A, Galanello R, Rosatelli CM. Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies [J]. Baillieres Clin Hematol, 1998, 11(1): 215-238.
- [7] Ou XB, Zhang L. Diagnosis of thalassemia by genechips [J]. Chin J Pediatr 2005, 43(1): 31-34. (In Chinese)
(区小冰, 张力. 基因芯片诊断地中海贫血的研究[J]. 中华儿科杂志 2005, 43(1): 31-34.)
- [8] Pensri, Pornpan S, Surai H et al. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia [J]. Blood 2000, 96: 2606-2612.
- [9] Weatherall D. The molecular basis for phenotypic variability of the common thalassemias [J]. Mol Med Today, 1995, 1(1): 15-20.
- [10] Cai S P, Wall J, Kan Y W et al. Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutation in Asians and American blacks [J]. Hum Mutat, 1994, 3(1): 59-63.

收稿日期: 2011-11-17 编辑: 吴中菲

(上接第 608 页)

- [3] Zhang ZS. Hypertension caused by Polycystic kidney disease [J]. People's military medical 2003, 46(8): 478-479. (In Chinese)
(张志寿. 多囊肾所致的高血压[J]. 人民军医 2003, 46(8): 478-479.)
- [4] Wang FJ, Yun LJ, Zhang ZP, et al. Clinical research of Kanglaite Injection in treatment of lung cancer [J]. Modern Chinese Medicine, 2006, 14(1): 36-37. (In Chinese)
(王方杰, 俞立军, 张志培, 等. 康莱特治疗原发性肺癌的临床研究[J]. 现代肿瘤医学 2006, 14(1): 36-37.)
- [5] Xie WL, Guo Y, Yang WH, et al. Influence of immune function before and after Kanglaite combined with Shenmai injection in NSCLC patients chemotherapy [J]. Zhejiang Journal of integrated traditional and Western Medicine 2010, 20(4): 220-221. (In Chinese)
(谢炜丽, 郭勇, 杨维泓, 等. 康莱特联合参麦注射液对 NSCLC 患者化疗前后免疫功能的影响[J]. 浙江中西医结合杂志 2010, 20(4): 220-221.)
- [6] Zhang L, Wang YF. Study on Kanglaite improve quality of life in patients with advanced malignant tumor [J]. Traffic medicine, 2010, 24(6): 676-677. (In Chinese)
(张亮, 王亚飞. 康莱特提高晚期恶性肿瘤患者生活质量的临床观察[J]. 交通医学 2010, 24(6): 676-677.)

收稿日期: 2012-03-28 编辑: 谢永慧