

湖南地区地中海贫血基因检出情况分析

吴颖, 谢艳, 李思, 张莉, 彭荣
长沙迪安医学检验所, 湖南 长沙 410000

摘要: **目的** 了解湖南地区地中海贫血的发病情况及基因分型的特点, 为优生优育、提高人口素质提供科学依据。 **方法** 采用 PCR 琼脂糖凝胶电泳法和反向点杂交法检测技术对 2018 年 10 月—2020 年 11 月湖南地区送检的抗凝全血标本进行地中海贫血基因分型检测, 统计地中海贫血检出情况及基因分型特点。 **结果** 送检的 5 642 例患者标本中, 检出地中海贫血 1 477 例, 检出率为 26.18%, 其中 α 地中海贫血、 β 地中海贫血及 α 和 β 双重检出率分别为 12.62% (712 例)、13.13% (741 例) 和 0.43% (24 例)。男性地中海贫血检出率为 29.58%, 女性为 25.41%, 不同性别检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.598, P = 0.006$)。年龄中以 <17 岁检出率最高, 为 45.90%, 不同年龄间检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 226.281, P < 0.001$)。在基因分型方面, α 地贫中以 SEA 缺失型占比最高 (65.08%), β 地贫中以 IVS-II-654 (C \rightarrow T) 占比最高 (36.86%)。 **结论** 湖南地区地中海贫血检出率较高, α 地贫和 β 地贫分别以 SEA 缺失型和 IVS-II-654 (C \rightarrow T) 为主, 具有地域性特征, 应加强地中海贫血的检测及做好遗传咨询和产前诊断, 以降低地中海贫血儿的出生率。

关键词: 地中海贫血; PCR 琼脂糖凝胶电泳法; 反向点杂交法检测技术

中图分类号: R556 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2021)11-1363-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2021.11.022

地中海贫血 (地贫) 是指珠蛋白基因缺陷 (缺失或/和点突变) 导致珠蛋白肽链合成减少或不能合成, 致使血红蛋白组分发生改变而引起的常染色体单基因。地贫可将致病基因遗传给后代, 常见有两种类型, 即 α 地贫和 β 地贫。中国人群中常见的 α -珠蛋白基因的突变类型主要为 $-\alpha$ SEA、 $-\alpha 3.7$ 、 $-\alpha 4.2$ 三种缺失型。 β 地贫常见的突变位点有 IVS-II-654、CD41-42、CD17-28、CD71-72 等。其发病具有明显的民族和地域特点, 在我国长江以南地区的发病率较高, 好发于广西、广东、福建、海南和云南等省份, 是我国南方最常见的血液病遗传病之一^[1]。重型地贫可致死, 中型地贫可致残, 给家庭和社会带来沉重的负担。由此可见, 地中海贫血的检测尤为重要, 做好遗传咨询和产前诊断, 有助于减少地贫儿的出生, 提高人口素质。本文对 2018 年 10 月—2020 年 11 月湖南地区送检长沙迪安医学检验所进行地中海贫血检测的 5 642 例患者的抗凝全血标本采用 PCR 琼脂糖凝胶电泳法和反向点杂交法检测技术进行地中海贫血基因分型检测, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 标本来源于 2018 年 10 月—2020 年 11 月湖南地区送长沙迪安医学检验所进行地中海贫血基因分型检测的 5 642 例患者的抗凝全血标本。

作者简介: 吴颖 (1971-), 女, 湖南岳阳人, 本科, 副主任检验师, 主要从事分子生物学临床检验工作。

1.2 试剂与仪器 核酸提取试剂盒 (亚能生物技术有限公司)、 α -地中海贫血基因检测试剂盒 (gap-PCR 法) (亚能生物技术有限公司, 试剂批号 A201810003/A201905003/A201912001/A202003005/A202008005) 和 β -地中海贫血基因检测试剂盒 (反向点杂交法) (亚能生物技术有限公司, 试剂批号 BT201810008/BT201905004/BX201911006/BX202003005/BX202009003), 东胜 ETC811 核酸扩增仪、EPS-300 电泳仪 (上海天能科技有限公司)、JS-680D 凝胶成像分析仪 (亚能生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 全血用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 ml, 注入含 EDTA (乙二胺四乙酸二钠) 或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管, 立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次, 使抗凝剂与静脉血充分混匀, 密闭送检。

1.3.2 标本提取 往编好号的 1.5 ml 离心管内加入 500 μ l 裂解液, 加入 200 μ l 抗凝全血, 剧烈旋涡混匀短暂离心, 加入 100 μ l 沉淀液, 剧烈旋涡混匀, 13 000 rpm 离心 5 min, 转移上清液至结合柱凹槽下方, 13 000 rpm 离心 30 s, 弃滤液, 加 500 μ l W1 洗液到收集管, 13 000 rpm 离心 30 s, 弃滤液, 加 500 μ l W2 洗液到收集管, 13 000 rpm 离心 30 s, 弃滤液, 13 000 rpm 离心 2 min, 取下结合柱套进干净 1.5 ml 离心管, 加 100 μ l 洗脱液至膜中心, 室温放置 1 min, 13 000 rpm 离心 1 min, 弃结合柱, 1.5 ml 离心管内液体即为 PCR 模板, 保存备用。

1.3.3 PCR 扩增 分别向 PCR 反应管中加入提取的待测样品 DNA 2 μl (β 地贫) 和 4 μl (α 地贫), 低速离心数秒后, α 地贫按以下参数进行 PCR 反应: 96 $^{\circ}\text{C}$: 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$: 45 s; 65 $^{\circ}\text{C}$: 90 s; 72 $^{\circ}\text{C}$: 3 min; 10 个循环; 98 $^{\circ}\text{C}$: 30 s; 65 $^{\circ}\text{C}$: 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$: 3 min; 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$: 10 min; β 地贫按以下参数进行 PCR 反应: 50 $^{\circ}\text{C}$: 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$: 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$: 60 s; 55 $^{\circ}\text{C}$: 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$: 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$: 5 min。

1.3.4 扩增产物分析 α 地贫: 称 1.0 g 琼脂糖 + 100 ml 已稀释 TBE 缓冲液 (为全板凝胶) 制胶, 待琼脂凝固后, 轻轻拔掉孔梳, 加 1 μl PCR 产物进行 DNA 点样, 电泳检测, 在 160 V 电压下电泳约 3 min 后, 再在 120 V 电压下电泳约 50 min, 电泳结束后, 将琼脂糖凝胶放入凝胶成像分析系统观察结果。把图像结果用电脑软件拍照存档。 β 地贫: 将反应膜条放入 15 ml 离心管, 加入 A 液 6 ml 和所有 PCR 产物, 沸水浴中加热 10 min 后, 放入杂交箱 43 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1.5 ~ 4 h, 同时将 45 ml B 液于杂交箱预热 43 $^{\circ}\text{C}$, 杂交后取出膜条, 移至装有预热 B 液的 50 ml 管中, 于 43 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇洗涤 15 min, 将膜条加入孵育液 (A 液: POD = 2 000 : 1) 30 min, 用 A 液室温轻摇洗两次, 每次 5 min, 用 C 液室温洗膜 1 ~ 2 min, 将膜条浸泡于现配显色液中避光显色 5 ~ 10 min 后, 转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 计数资料采用例数 (%) 表示, 不同年龄性别地贫检出情况差异比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 地贫检出情况及基因分型情况 5 642 例送检患者标本中, 检出地贫 1 477 例, 检出率为 26.18%, 其中 α 地贫、 β 地贫及 α 和 β 双重检出率分别为 12.62% (712 例)、13.13% (741 例) 和 0.43% (24 例), 见表 1。

表 1 5 642 例患者标本地贫基因检出情况

地贫基因分型	检出数	检出率 (%)
α 地贫	712	12.62
β 地贫	741	13.13
α 和 β 双重地贫	24	0.43

2.2 不同性别地贫检出情况 5 642 例标本中, 男性送检标本 1 038 例, 检出 307 例, 检出率为 29.58%; 女性送检标本 4 604 例, 检出 1 170 例, 检出率为 25.41%。不同性别检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.598, P = 0.006$), 见表 2。

表 2 不同性别地贫检出情况

性别	检测数	检出数	检出率 (%)
男	1 038	307	29.58
女	4 604	1 170	25.41
合计	5 642	1 477	26.18

2.3 不同年龄段地贫检出情况 5 642 例标本中, 送检年龄为 0 ~ 89 岁, 将其分为 3 个年龄段, 其中地贫检出数所占百分比最高的是 17 ~ 60 岁, 占 69.67% (1 029/1 477), 该年龄阶段样本送检数最多, 占 82.38% (4 648/5 642)。不同年龄段地贫检出率依次是 <17 岁、>60 岁、17 ~ 60 岁, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 226.281, P < 0.001$), 见表 3。

表 3 不同年龄段地贫检出情况

年龄 (岁)	送检数	检出数	检出率 (%)	检出数构成比 (%)
<17	902	414	45.90	28.03
17-60	4 648	1 029	22.14	69.67
>60	92	34	36.96	2.30
合计	5 642	1 477	26.18	100.00

2.4 α 和 β 地贫基因分型情况 α 地贫检测三种缺失型 (SEA、3.7、4.2), β 地贫检测 17 个点突变 (41-42M、654M、-28M、71-72M、17M、 β EM、31M、27/28M、IVS1-1M、IVS1-5M、43M、-32M、-29M、-30M、14-15M、C α P、IntM)。1 477 例地贫标本中, α 地贫中以 SEA 缺失型占比最高 (65.08%), β 地贫中以 IVS-II-654 (C \rightarrow T) 占比最高 (36.86%), 见表 4。

表 4 1 477 例地贫标本基因分型情况

α 地贫基因分型	检出数	构成比 (%)	β 地贫基因分型	检出数	构成比 (%)
SEA 缺失	479	65.08	IVS-II-654 (C \rightarrow T)	282	36.86
3.7 缺失	196	26.63	CD41-42 (-TTCT)	260	33.99
4.2 缺失	61	8.29	CD17 (α \rightarrow T)	144	18.82
			其他	79	10.33

2.5 地贫基因单一型和复合型分型情况 1 477 例地贫标本中, 单一杂合型有 1 424 例, 占地贫标本数 96.41%, 其中 α 单一杂合 690 例, β 单一杂合 734 例; 双重杂合或纯合基因型有 53 例, 占 3.59%, 其中 α + β 双重杂合 24 例, α 纯合子 6 例, α 双重杂合子 14 例, α 稀有型基因 2 例, β 纯合子 3 例, β 双重杂合子 4 例, 见表 5。

表 5 1 477 例地贫标本基因单一型和复合型分型情况

地贫基因分型	例数	占地贫标本数百分比 (%)	占总标本数百分比 (%)
α 单一杂合	690	46.72	12.23
β 单一杂合	734	49.70	13.01
α + β 双重杂合	24	1.62	0.43
α 纯合子	6	0.41	0.11
α 双重杂合子	14	0.95	0.25
α 稀有型基因	2	0.13	0.03
β 纯合子	3	0.20	0.05
β 双重杂合子	4	0.27	0.07

3 讨论

α -地中海贫血是一种由于 16 号染色体 16p13.3 位点的 α -珠蛋白基因突变导致肽链表达失衡而产生的单基因遗传血液病,多由于 α -珠蛋白基因的缺失突变所致,在我国人群中常见的 α -珠蛋白基因的突变类型主要为 $-\alpha$ SEA、 $-\alpha 3.7$ 、 $-\alpha 4.2$ 三种缺失型。 β -地中海贫血是一种由于 β -珠蛋白基因突变导致肽链表达失衡而产生的单基因遗传血液病,多由 β -珠蛋白基因点突变所致,在我国人群中常见的突变位点有 IVS- II - 654、CD41-42、CD17、-28、CD71-72 等^[1]。

从地贫基因检测分型结果来看,地贫基因发病以单一杂合基因型为主,其次为双重杂合子,纯合基因极少见。其中检出 α 地贫稀有型基因 2 例(0.14%),一例扩增出 $-\alpha 3.7$ 条带(弱条带)及 $\alpha\alpha$ 条带及 $-\alpha$ SEA 条带,血常规指标红细胞压积和红细胞平均体积均降低,采用 Gap-PCR 方法,特异引物检测 X1/ χ^2 融合片段(HK $\alpha\alpha$ 或 $\alpha\alpha\alpha$ anti4.2 的特异片段),结果显示阳性,科研性检测表明该标本可能为 HK $\alpha\alpha$ /--SEA 稀有基因型;另一例扩增出 $-\alpha 3.7$ 条带(弱条带)及 $\alpha\alpha$ 条带,血常规指标红细胞压积和红细胞平均体积均降低,采用 Gap-PCR 方法,特异引物检测 X1/ χ^2 融合片段(HK $\alpha\alpha$ 或 $\alpha\alpha\alpha$ anti4.2 的特异片段),结果显示阳性,采用 Gap-PCR 方法,特异引物检测 $\alpha\alpha\alpha$ anti4.2 的片段,结果显示阴性,科研性检测表明该标本可能为 HK $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$ 或 HK $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha-3.7$ 稀有基因型。张敏等^[2]的研究显示,在福建地区 507 例 $-\alpha 3.7$ 杂合子中检出 25 例 HK $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$ (4.93%)、5 例 HK $\alpha\alpha$ / $-\alpha 3.7$ (0.99%) 和 5 例 HK $\alpha\alpha$ 合并 β -地贫(0.99%)。用目前常规的 α 地贫检测试剂盒无法检出 HK $\alpha\alpha$,当同时又是 $-\alpha 3.7$ / $\alpha\alpha$ 型时,极易误认为右缺失型或左缺失型后而不再深究造成漏诊^[3]。临床工作中应注意少见基因型地贫的出现,结合表型与基因型诊断疑难病例,必要时用基因测序和 Gap-PCR 等技术检测,据报道,在广东、广西、海南等地区人群中, α 地中海贫血发生率为 4%~15%, β 地中海贫血约为 1%~6%^[5]。与南方大部分地区相同的是,湖南地区 α 地贫也是以 SEA 杂合缺失型为最常见的基因突变类型, β 地贫也是以 IVS- II - 654(C \rightarrow T)、CD41-42(-TTCT)和 CD17($\alpha\rightarrow$ T)三种突变为主,占 89.67%,其他位点共占 10.33%^[6,7]。常见的三种突变中,IVS- II - 654(C \rightarrow T)发生频率高于 CD41-42(-TTCT),这种情况与本地区以往报道情况一致,与广东、广西相反,而与湖南另外两个相邻的省江西、湖北较为相似^[8-11]。这些特点表明地贫突变类型有明显的地域特点。

从不同年龄阶段来看,17~60 岁的年龄阶段地贫检出数所占百分比最高,占 69.67%,从其送检特性来看,多为育龄期妇女进行产前筛查,与广西玉林地区育龄人群检出比例基本一致^[12]。 <17 岁的年龄组送检数较少但其检出高达 45.90%,从其送检特性来看,多为幼儿和新生儿。男性送检人数远少于女性,但男性检出率高于女性,可见婚前检查中男性也应该引起重视,加大婚前检查力度。

地中海贫血是危害较为严重的遗传性疾病,目前对地贫人群暂无有效的治疗手段。重症 α 地中海贫血可导致死产、死胎并影响产妇健康,发生妊娠、产后大出血等病症;重型 β 地中海贫血临床表现为严重溶血性贫血、肝脾肿大,往往需要靠输血来维持生命,但常因贫血、心力衰竭未到成年即已夭折。因此婚前检查和产前诊断是预防地贫的最有效的手段,对疑似患者进行地贫的基因检测,可大大降低幼儿地贫的发生率,并减轻医疗机构、家庭及社会的负担和压力,对我国的优生优育、提高人口素质具有重要意义。

参考文献

- [1] Lai K, Huang G, Su L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 920.
- [2] 张敏, 黄海龙, 陈梅环, 等. 福建人群香港型地中海贫血的基因变异检测[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(4): 297-300.
- [3] 丁燕玲, 黄际卫. 地中海贫血罕见突变的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(2): 4-5.
- [4] 徐韞健, 廖颖茵, 高俊, 等. 广东地区地中海贫血筛查者的基因检测和类型分析[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(2): 285-290.
- [5] 杨阳, 张杰. 中国南方地区地中海贫血研究进展[J]. 中国实验学杂志, 2017, 25(1): 276-280.
- [6] 刘沁, 贾政军, 席惠, 等. 湖南地区 5 018 例地中海贫血基因突变类型的分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6): 1938-1942.
- [7] 金朝, 王涛. 自贡市 3 040 例育龄夫妇地中海贫血基因检测结果分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(2): 197-199.
- [8] He S, Li J, Li DM, et al. Molecular characterization of α and β thalassemia in Yulin region of southern China [J]. Gene, 2018, 655: 61-64.
- [9] 严苗, 但永杰, 彭晓菊, 等. 湖北夷陵区地区 1 872 例孕妇地中海贫血产前筛查结果分析[J]. 应用预防医学, 2019, 25(5): 352-355.
- [10] 徐韞健, 廖颖茵, 高俊, 等. 广东地区地中海贫血筛查者的基因检测和类型分析[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(2): 285-289, 293.
- [11] 陈敏芳, 王家健, 汪焱, 等. 江西省部分地区 1 630 例地中海贫血基因突变类型分布研究[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2019, 7(2): 96-99.
- [12] 李东明, 李继慧, 陈德敏, 等. 中国广西玉林地区育龄人群中地中海贫血基因突变类型的分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(6): 2011-2016.

收稿日期: 2021-01-21