

深圳地区 6 313 例疑似地中海贫血基因检测分析

张 民^{1,2}, 文飞球², 麦惠容², 袁秀丽², 刘四喜², 陈小文^{1,2*} (1. 深圳市儿童医院儿科研究所, 广东深圳 518038; 2 深圳市儿童医院血液肿瘤科, 广东深圳 518038)

摘 要: **目的** 了解深圳地区地中海贫血(简称“地贫”)患儿基因型的分布情况, 为该疾病基因诊断及遗传咨询提供参考。**方法** 选取来我院就诊的 6 313 例疑似地贫患儿, 采用跨越断裂点 PCR (Gap-PCR) 检测缺失型 α 地中海贫血基因, 反向点杂交 (RDB) 技术检测 3 种 α 基因突变类型和 17 种 β 基因突变类型。**结果** 6 313 例患儿样本中检测出地贫基因携带者为 4 121 例(阳性率为 65.28%), 其中 α 地贫患者及其携带者占 55.23%, 18 种突变基因型, 以 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 基因型最为常见(占 72.32%); β 地贫患者及其携带者为 44.77%, 37 种突变基因型, 主要为 β^{41-42}/β^N 、 β^{654}/β^N 、 β^{17}/β^N 、 β^{28}/β^N 、 β^{71-72}/β^N 基因型, 共占 87.98%; $\alpha\beta$ 复合型地贫占 3.11%, 主要基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$ 、 $-\text{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$ 、 $-\text{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{654}/\beta^N$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{654}/\beta^N$ 。**结论** 深圳患儿存在较高比例的缺失型 α 地贫基因 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$, 以及一定数量的 $\alpha\beta$ 复合重型地贫患儿, 必须引起重视。

关键词: 地中海贫血; 深圳地区; 基因检测分析; 儿童

中图分类号: R556.61

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 03-0279-04

Analysis on gene detection results of 6313 cases of suspected thalassemia in Shenzhen

ZHANG Min^{1,2}, WEN Fei-qiu², MAI Hui-rong², YUAN Xiu-li², LIU Si-xi², CHEN Xiao-wen^{1,2*} (1. Institute of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China; 2. Department of Hematology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of genotypes in the children with thalassemia in Shenzhen to provide reference for genetic diagnosis and counseling of thalassemia. **Methods** A total of 6 313 children with suspected thalassemia who sought medical treatment in our hospital were selected as research objects. Gap-PCR method was used to detect deletion alpha thalassemia gene. PCR- Reverse Dot Blot (RDB) method was used to detect 3 kinds of α -globin mutant genotypes and 17 β -globin mutant genotypes. **Results** Among the 6 313 children, 4 121 (positive rate of 65.28%) were detected as thalassemia gene carriers, among which α -thalassemia patients and their carriers accounted for 55.23%, and there were 18 mutant genotypes, of which $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ genotype was the most common (72.32%); β -thalassemia patients and their carriers accounted for 44.77%, and there were 37 mutant genotypes, mainly β^{41-42}/β^N , β^{654}/β^N , β^{17}/β^N , β^{28}/β^N , and β^{71-72}/β^N , accounting for 87.98%; $\alpha\beta$ -thalassemia patients and their carriers accounted for 3.11%, the main genotypes were $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$, $-\text{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$, $-\text{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{654}/\beta^N$ and $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{654}/\beta^N$. **Conclusion** There is a high proportion of deletion α -thalassemia gene $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ and a certain number of children with $\alpha\beta$ -thalassemia among children in Shenzhen, which must be paid attention.

Key words: thalassemia; Shenzhen; genetic testing; children

地中海贫血(简称“地贫”)在我国高发地区携带率存在明显地区差异性, 根据 2012–2013 年广东省地贫防控项目进行的基线调查显示, 广东省育龄人群地贫携带率为 11.0%。深圳市是我国地贫高发区域, 育龄人群基因阳性携带率 7.0% 左右^[1-3], 同时又是一个新兴移民城市, 育龄人群的遗传背景复杂, 对于确诊人群

的研究及报道较少, 尤其是对基因型分类较为少见。重型地贫的治疗目前国内外尚无理想的治愈方法, 往往需要进行规律输血除铁治疗, 并进行配型等待骨髓移植, 费用高昂。因此针对地贫的防治更多地集中于优生优育的选择上, 通过大规模人群的遗传筛查、基因分型检测、遗传咨询和产前诊断等手段加以预防, 从而

收稿日期: 2022-08-31

基金项目: 深圳市科技计划资助项目 (SGDX20201103095404018), 广东省医学科学技术研究基金资助项目 (A20200101)

作者简介: 张 民 (1985–), 男, 本科, 主管技师, E-mail: zhangmin832@163.com

通信作者: 陈小文, 硕士, 副研究员, E-mail: 13510333196@139.com

降低重型地贫患儿的出生率^[4]。为了解评估深圳地区现有人群的 α 和 β 地贫的分布情况,本文对2016–2019年在深圳市儿童医院门诊及住院进行地贫基因检测的6 313例疑似地贫患儿 α 和 β 地贫的基因突变类型及其分布特征进行回顾性分析。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集2016年1月–2019年12月深圳市儿童医院门诊及住院进行地贫基因检测的患儿6 313例,年龄1个月~16岁,平均 (2.3 ± 2.2) 岁。受检儿童主要为实验室检测血液学指标异常^[5](平均红细胞体积 $MCV < 80$ fL和/或平均红细胞血红蛋白含量 $MCH < 27$ pg和/或血红蛋白电泳结果为 $HbA_2 < 2.5\%$ 或 $HbA_2 > 3.5\%$)或者家族中有地贫的患者、地贫基因携带者以及疑似地贫的人群等。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 采用乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA-K2)抗凝真空管抽取受检儿童静脉血2 mL。采用基因组DNA快速提取试剂盒(深圳益生堂生物企业有限公司提供)进行样品DNA提取。

1.2.2 缺失型 α 地贫 采用Gap-PCR检测 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 和 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 3种基因缺失。PCR总反应体积为25 μ L,包括PCR反应液21 μ L, DNA模板4 μ L。PCR扩增条件:96 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 45 s, 65 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 10个循环; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C保存。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳,根据电泳条带大小判断基因型。

1.2.3 α 和 β 非缺失型基因检测 采用PCR-RDB检测3种基因突变类型(α WS、 α QS、 α CS)和17种 β 基因突变类型[CD41-42 (-TCTT)、IVS-2-654 (C $\rightarrow$ T)、CD17 (A $\rightarrow$ T)、-28 (A $\rightarrow$ G)、CD26 (G $\rightarrow$ A)、CD71-72 (+A)、CD43 (G $\rightarrow$ T)、-29 (A $\rightarrow$ G)、起始密码子ATG $\rightarrow$ AGG、CD14-15 (+G)、CD27-28 (+C)、-32 (C $\rightarrow$ A)、-30 (T $\rightarrow$ C)、IVS-1-1 (G $\rightarrow$ T)、IVS-

1-5 (G $\rightarrow$ C)、CD31 (-C)、CAP+40-+43 (-AAAC)]。PCR总反应体积为25 μ L,包括PCR反应液23 μ L, DNA模板2 μ L。PCR扩增条件为50 $^{\circ}$ C 15 min, 94 $^{\circ}$ C 10 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增后将产物与试剂盒配制的含探针的膜条进行反向点杂交与显色,可肉眼观察与判断结果。

此研究中使用的 α 地贫与 β 地贫检测试剂均由深圳益生堂生物企业有限公司提供,实验操作严格按说明书进行。

2 结果

6 313例患者中共检测出地贫基因携带者为4 121例,阳性率为65.28%,其中 α 地贫患者及其基因携带者占55.23%(2 276/4 121), β 地贫患者及其基因携带者为44.77%(1 845/4 121), $\alpha\beta$ 复合型地贫占3.11%(128/4 121)。

2.1 α 地贫基因检测结果

α 地贫患者共检出18种 α 地贫基因突变基因型,以 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 基因型最为常见,占72.32%(1 646/2 276),见表1。

2.2 β 地贫基因检测结果

β 地贫患者及其基因携带者中检出37种 β 地贫突变基因型,基因型主要为 β^{41-42}/β^N 、 β^{654}/β^N 、 β^{17}/β^N 、 β^{-28}/β^N 、 β^{71-72}/β^N ,共占比为87.98%(1 623/1 845),见表2。

2.3 $\alpha\beta$ 复合型地贫基因检测结果

$\alpha\beta$ 复合型地贫基因型主要为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$ 、 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$ 、 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{654}/\beta^N$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{654}/\beta^N$,见表3。

3 讨论

地贫由一个或多个血红蛋白链合成中的缺陷引起的一组遗传性血液系统疾病,地贫的发生与遗传因素具有较大关联,且呈现明显的地域性分布特征,是人类最常见的单基因遗传病之一。该疾病为珠蛋白生成障碍性贫血疾病,因基因缺陷的复杂性及多样性特征,

表1 α 地贫基因型及频率

基因型	检出数	构成比/%	基因型频率/%	基因型	检出数	构成比/%	基因型频率/%
$-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	1 646	72.30	26.07	$\alpha^{WS}/\alpha\alpha$	23	1.01	0.36
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	237	10.40	3.75	$-\alpha^{SEA}/\alpha^{QS}\alpha$	11	0.48	0.17
$-\alpha^{SEA}/-\alpha^{3.7}$	114	5.01	1.81	$-\alpha^{SEA}/\alpha^{WS}\alpha$	6	0.26	0.10
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	77	3.38	1.22	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	6	0.26	0.10
$\alpha^{QS}\alpha/\alpha\alpha$	44	1.93	0.70	$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	4	0.18	0.06
$-\alpha^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$	40	1.76	0.63	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	3	0.13	0.05
$-\alpha^{SEA}/-\alpha^{4.2}$	37	1.63	0.59	$-\alpha^{3.7}/\alpha^{QS}\alpha$	1	0.04	0.02
$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	24	1.05	0.38	$-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$	1	0.04	0.02

表 2 β 地贫基因型及频率

基因型	检出数	构成比/%	基因型频率/%	基因型	检出数	构成比/%	基因型频率/%
β^{41-42}/β^N	608	32.95	9.63	β^{-28}/β^{17}	5	0.27	0.08
β^{654}/β^N	591	32.03	9.36	$\beta^{IVS1-1-5}/\beta^N$	4	0.22	0.06
β^{17}/β^N	247	13.39	3.91	$\beta^{41-42}/\beta^{27-28}$	3	0.16	0.05
β^{-28}/β^N	129	6.99	2.04	β^{654}/β^{17}	3	0.16	0.05
β^{71-72}/β^N	48	2.60	0.76	$\beta^{654}/\beta^{71-72}$	2	0.11	0.03
β^{27-28}/β^N	24	1.30	0.38	β^{654}/β^{26}	2	0.11	0.03
β^{26}/β^N	20	1.08	0.32	β^{Int}/β^N	2	0.11	0.03
$\beta^{41-42}/\beta^{654}$	19	1.03	0.30	β^{-28}/β^{-29}	2	0.11	0.03
β^{43}/β^N	19	1.03	0.30	β^{Cap}/β^N	1	0.05	0.02
$\beta^{41-42}/\beta^{41-42}$	18	0.98	0.29	β^{-28}/β^{-28}	1	0.05	0.02
β^{654}/β^{654}	18	0.98	0.29	$\beta^{41-42}/\beta^{Cap}$	1	0.05	0.02
$\beta^{41-42}/\beta^{-28}$	12	0.65	0.19	$\beta^{654}/\beta^{14-15}$	1	0.05	0.02
β^{41-42}/β^{17}	11	0.60	0.17	β^{654}/β^E	1	0.05	0.02
β^{-29}/β^N	11	0.60	0.17	β^{654}/β^{-29}	1	0.05	0.02
β^{14-15}/β^N	9	0.49	0.14	$\beta^{654}/\beta^{27-28}$	1	0.05	0.02
$\beta^{IVS1-1-1}/\beta^N$	9	0.49	0.14	β^{17}/β^{26}	1	0.05	0.02
β^{654}/β^{-28}	7	0.38	0.11	β^{17}/β^{71-72}	1	0.05	0.02
β^{17}/β^{17}	6	0.33	0.10	β^{17}/β^{43}	1	0.05	0.02
β^{41-42}/β^{26}	6	0.33	0.10				

表 3 $\alpha\beta$ 复合型地贫基因型分布

基因型	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$--SEA/\alpha\alpha$	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	$\alpha^{WS}/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	$\alpha^{OS}/\alpha\alpha$	$--SEA/-\alpha^{3.7}$	$--SEA/\alpha^{OS}\alpha$	$\alpha^{WS}/\alpha^{WS}\alpha$	$--SEA/\alpha^{CS}\alpha$	合计
β^{41-42}/β^N	18	16	2	2	1	1	0	0	0	0	40
β^{654}/β^N	10	15	1	1	1	0	0	1	1	1	31
β^{Cap}/β^N	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
β^{-28}/β^N	3	5	0	0	2	0	0	0	0	0	10
β^{17}/β^N	3	5	2	1	0	0	0	0	0	0	11
β^{71-72}/β^N	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
$\beta^{41-42}/\beta^{654}$	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
β^{14-15}/β^N	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
$\beta^{41-42}/\beta^{41-42}$	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4
β^{41-42}/β^{17}	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
β^{27-28}/β^N	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
β^{26}/β^N	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3
β^{654}/β^{654}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
$\beta^{654}/\beta^{71-72}$	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
β^{-28}/β^{Cap}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
β^{43}/β^N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
β^E/β^N	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
β^{17}/β^{17}	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
$\beta^{41-42}/\beta^{-29}$	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
β^{41-42}/β^{26}	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
β^{-29}/β^N	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
合计	49	56	6	5	5	3	1	1	1	1	128

导致缺乏的珠蛋白链类型及患者临床症状存在较大差异性,故临床多以珠蛋白链种类、缺乏程度进行表型区分^[6]。因地中海贫血疾病具有母体遗传性,且严重影响儿童身心健康及生长发育,故做好该类疾病的早期筛查及诊断,具有重要的社会意义。

地贫患者主要分布在地中海沿岸国家和亚洲地

区,我国南方地区为地贫高发区,并且以广东、广西、海南等省份地贫携带率较高^[7]。而对于确诊人群的研究及报道较少,尤其是对基因型分类较为少见。本次选取我院就诊的 6 313 例疑似地贫患儿,该类人群为地中海贫血的高发人群。多项临床报道证实,孕龄期妇女发生地中海贫血后存在一定遗传的可能性,增加了

新生儿畸形、发育迟缓风险,严重影响儿童生长发育及身体健康^[8]。本调查的6313例疑似患者中,共检出地贫基因携带者4121例,检出率为65.28%,国内报道疑似地贫患儿地贫基因检出率为31.92%~88.84%^[9-11],本组病例的检出率在此范围之内。

本次调查 α 地贫基因高于 β 地贫,说明本地区 α 地中海贫血仍是主要类型。在基因型方面, α 地贫基因比较常见的基因类型为 $--^{SEA}/\alpha\alpha$,其次为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$,这与国内报道相似^[12-14]。本研究共检测 β 地贫患者及其基因携带者为1845例,检出37种 β 地贫突变基因型,主要为 β^{41-42}/β^N 、 β^{654}/β^N 、 β^{17}/β^N 、 β^{-28}/β^N 、 β^{71-72}/β^N ,占有基因类型的87.98%,这与以往深圳地区较小样本数报道的常见基因型基本一致^[15-16],但个别基因型呈现增高趋势,值得关注。 $\alpha\beta$ 复合型地贫患者及其基因携带者为128例,占有地贫基因阳性的3.11%,基本包含中国常见的基因类型,比较常见的基因类型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$;其次为 $--^{SEA}/\alpha\alpha+\beta^{41-42}/\beta^N$,与广东省其他地区以往报道的地贫基因型有所差异^[17-20]。这些数据进一步表明地中海贫血地域性分布差异,各基因型构成在不同地区存在差异,这可能与深圳市是一个新兴的移民城市有关,外来人口的大量涌入,不同的人群因为通婚使得原有的遗传因素发生了变化,因此深圳地贫基因型除了拥有广东省的共性,同时也存在自身的特点。

综上所述,深圳地区儿童人群的地贫基因型除了拥有本地区的共性,还具有独特性。近年来我国地贫防治工作虽然取得长足的进步,重型地贫患儿出生数量逐年下降,但深圳地区存在较高比例的缺失型 α 地贫基因因为 $--^{SEA}/\alpha\alpha$,以及一定数量的 $\alpha\beta$ 复合重型地贫患儿,因此有必要了解深圳市儿童地贫的发生率及基因检测结果,为地贫的防治工作提供参考,更有利于对患儿生长、发育进行针对性监测,能够及时治疗,并可以在患儿成年后提供合理婚配指导,防止异常基因向下一代蔓延,对提高人口质量有重大的经济效益^[21-22]。

参考文献:

- [1] 吴文钦,熊戊霞,蔡梦珊.深圳市龙华区地中海贫血基因分型情况分析[J].医学信息,2021,34(14):142-144.
- [2] 周文峰,金朝红,梁琳珂.深圳市宝安区地中海贫血基因检测结果分析[J].中国实用医药,2021,16(15):167-169.
- [3] XU X M, ZHOU Y Q, LUO G X, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong province: Implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.
- [4] 徐湘民.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011:55-60.
- [5] 曾沛斌,张振洪,黎贺年.血常规参数在地中海贫血基因携带患儿筛查中的价值[J].临床与病理杂志,2022,42(8):1875-1884.
- [6] VIPRAKASIT V, EKWATTANAKIT S. Clinical classification, screening and diagnosis for thalassemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(2): 193-211.
- [7] 杨阳,张杰.中国南方地区地中海贫血研究进展[J].中国实验血液学杂志,2017,25(1):276-280.
- [8] 蒋玉欢,李增宝,王英,等.婚前婚配群体的地中海贫血携带者筛查与基因检测分析[J].中国妇幼保健,2004,19(21):103-104.
- [9] 李东明,李继慧,何升.广西玉林地区3540例14岁以下儿童地中海贫血基因突变类型分析[J].现代预防医学,2018,45(14):2542-2546,2550.
- [10] HUANG T L, ZHANG T Y, SONG C Y, et al. Gene mutation spectrum of thalassemia among children in Yunnan province[J]. Front Pediatr, 2020, 8: 159.
- [11] 邓向群,黄姿.惠州市惠城区学龄前儿童 α -和 β -地中海贫血的分子流行病学研究[J].中国现代药物用,2019,13(7):227-228.
- [12] 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.
- [13] 李东明,何升.30417例儿童地中海贫血基因类型分析[J].中国当代儿科杂志,2021,23(8):841-847.
- [14] 黄世杰,陈文莉,庄建龙,等.中国福建泉州地区儿童 α 和 β 地中海贫血基因分析[J].中国实验血液学杂志,2021,29(4):1266-1270.
- [15] 张霞,徐刚,陈虹宇,等.深圳地区1442例儿童疑似地中海贫血的基因检测分析[J].热带医学杂志,2016,16(10):1260-1263.
- [16] 任振敏,蔡德丰,肖伟伟,等.深圳地区小儿 α 和 β 地中海贫血基因类型分析[J].临床检验杂志,2017,35(8):605-608,636.
- [17] 陈海雷,沈妙娜,黄燕,等.广东地区地中海贫血基因筛查结果分析[J].国际医药卫生导报,2019(5):724-726.
- [18] 钟玉杭,叶立新,蔡小娟,等.东莞地区新生儿地中海贫血基因特征及变化趋势[J].中国当代儿科杂志,2020,22(5):454-459.
- [19] 李佩芳,庞文正.珠海地区635例地中海贫血基因检测结果分析[J].中国实用医药,2015(25):17-19.
- [20] 邹林,陈尚花,谢伟贤,等.广东佛山地区少见地中海贫血基因型与表型分析[J].中华地方病学杂志,2020,39(11):791-795.
- [21] 许吕宏,方建培.《重型 β 地中海贫血的诊断和治疗指南(2017年版)》解读[J].中国实用儿科杂志,2018,33(12):940-943.
- [22] 何志旭,金姣.地中海贫血的规范化管理[J].中华实用儿科临床杂志,2017,32(3):168-172.