

一种小片段缺失型 β 地中海贫血的血液学特征分析和产前诊断

王继成 姚翠泽 秦丹卿 黄华洁 袁腾龙 杜丽*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心、广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 分析一种因 β 珠蛋白基因小片段缺失所致的 β 地中海贫血患者的血液学特征,并对3个家系实行地中海贫血的产前诊断。**方法** 应用血红蛋白电泳和血常规检测对所有采集的外周血标本进行血液学指标分析,使用PCR-流式荧光杂交法和sanger测序的方法进行地中海贫血的基因诊断和产前诊断。**结果** 基因检测一共发现7例HBB: c.268_281delAGTGAGCTGCACTG (CD89-93-14bp)杂合突变的 β 地中海贫血携带者,表现为与常见 β^0 地中海贫血相似的小细胞低色素性贫血。3个家系的产前诊断结果显示2例为这种小片段缺失突变的携带者,1例未遗传到父母的突变基因型。**结论** 上述小片段缺失是一种导致 β^0 地中海贫血的移码突变,这种突变不包含在临床上常见的17种 β 地中海贫血突变基因检测范围内。当其复合其他 β 珠蛋白突变时可引起中重型 β 地中海贫血,所以精确诊断此种突变对产前诊断和遗传咨询具有重要价值。

【关键词】 β 地中海贫血; 小片段缺失突变; 产前诊断

【中图分类号】 R714.56 **【文献标识码】** A

Hematological analysis and prenatal diagnosis of β -thalassemia caused by a rare small deletion

Wang Jicheng, Yao Cuize, Qin Danqing, Huang Huajie, Yuan Tenglong, Du Li*

* Corresponding author; Du Li, E-mail: lier28@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the hematological characteristics of β -thalassemia patients caused by a rare small deletion of β globin gene, and carry out prenatal diagnosis of thalassemia in three families. **Methods** Hemoglobin electrophoresis and blood routine test were used to analyze the hematological indexes of all peripheral blood samples. PCR- Flow fluorescent hybridization and Sanger sequencing were performed to gene diagnosis and prenatal diagnosis of thalassemia. **Results** 7 carriers with HBB: c.268_281delAGTGAGCTGCACTG (CD89_93-14bp) heterozygous mutation of β -thalassemia were found by gene detection. All the carriers showed small cell hypopigmentation anemia, which was similar to that of the common β^0 -thalassemia. The prenatal diagnosis of three families showed that two cases were carriers of this small deletion mutation and one case was not inherited from his parents' mutants. **Conclusion** Above rare small deletion is a frameshift mutation that causes β^0 -thalassemia. This mutation is not included in the range of 17 common β -globin mutation genes detected in clinic. When it is compound with other β -globin mutations, it can cause moderate and severe β -thalassemia, so accurate diagnosis of this mutation is useful in prenatal diagnosis and genetic consultation.

【Key words】 β -thalassemia; Small deletional mutation; Prenatal diagnosis

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.04.007

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2019150)

* 通讯作者:杜丽, E-mail: lier28@163.com

地中海贫血(简称地贫)是一组常见于我国南方地区的遗传性血液病,主要分为 α 地贫和 β 地贫两类。 β 地贫是由于 β 珠蛋白基因(*HBB*)突变导致 β 珠蛋白肽链合成缺如或减少,致使 α/β 珠蛋白肽链比例失衡而引起的溶血性贫血。与缺失型多见的 α 地贫不同, β 地贫主要是由*HBB*基因点突变所致。迄今为止,全球已发现200余种*HBB*基因致病突变,其中CD41-42(-TCTT)、IVS-II-654(C>T)、CD17(A>T)、CD26(GAG>AAG)、-28(A>T)和CD71-72(+A)等6种突变,共占我国南方地区全部突变类型的90%以上^[1,2]。目前临床上通常运用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)结合反向点杂交(reverse dot blot, RDB)的方法或液相芯片技术,检测中国人最常见的17种 β 珠蛋白基因突变^[3],而对于其他类型的突变,需要使用其他检测技术才能发现。我们对通过基因测序发现的7例*HBB*: c. 268_281delAGTGAGCTGCACTG (CD89_93-14bp)杂合突变的 β 地贫患者进行血液学特征分析,并对其中3个家系实行了产前诊断,报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2012~2019年就诊于广东省妇幼保健院,经珠蛋白基因检测确诊为 β 地贫(CD89_93-14bp)的7例患者。其中6名患者为广东籍,1名患者为江西籍居民。年龄为19~35岁,包括成年的4名男性和3名女性。采集所有患者外周血用作血常规和血红蛋白电泳分析,提取外周血基因组DNA用于珠蛋白基因检测。于孕16~20周,对3个家系的孕妇行羊水穿刺进行地贫的产前诊断。

1.2 研究方法

1.2.1 血液学参数分析 运用Sysmex XS. 1000i全自动血细胞分析仪(日本希森美康株式会社)对外周血进行包括血红蛋白量及平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)等红细胞参数分析。使用快速电泳分析系统(法国 sebia capillary2)对外周血进行血红蛋白组分分析。

1.2.2 珠蛋白基因诊断 采用QIAmp DNA Blood Mini Kit试剂盒提取外周血和羊水细胞的基

因组DNA。应用由中山大学达安基因股份有限公司提供试剂的液相芯片技术检测3种常见缺失型和3种点突变型 α 地贫及17种 β 地贫突变。设计引物对*HBB*基因分成3个片段进行扩增和Sanger基因测序。PCR引物序列见表1。PCR扩增体系为30 μ l: 15 μ l的PremixLA, 10 pmol/ μ l的引物各2 μ l, 4 μ l基因组DNA。反应条件为95℃预变性5min, 95℃ 30s→60℃ 45s→72℃ 45s, 共35个循环, 72℃延伸。1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。将PCR扩增产物送广州生工生物有限公司使用美国ABI3100 DNA测序仪进行双向测序。

表1 *HBB*基因测序引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)
HBBE1F	CCAATCTACTCCAGGAGCAG	503
HBBE1R	TGAGGTTGTCCAGGTGAGC	
HBBE2F	GATCTGTCCACTCTGATGC	923
HBBE2R	GGTAGCTGGATTGTAGCTGC	
HBBE3F	TTCTGGGTAAAGCAATAGCAA	649
HBBE3R	AGGGGCTGTTGCCAATGTGC	

2 结果

2.1 分子诊断和产前诊断结果 常规地贫基因检测未发现7例患者有突变,基因测序结果表明7例患者均为 β 珠蛋白基因小片段缺失(*HBB*: c. 268_281delAGTGAGCTGCACTG)杂合突变,突变的测序结果见图1。7例患者中,有3例患者的配偶经常规地贫基因检测显示为常见的 β^0 或 β^+ 地贫, β 地贫产前分子诊断结果显示2个胎儿遗传了父母一方的此种小片段缺失突变,1个胎儿 β 地贫未见异常突变。结果见表2。

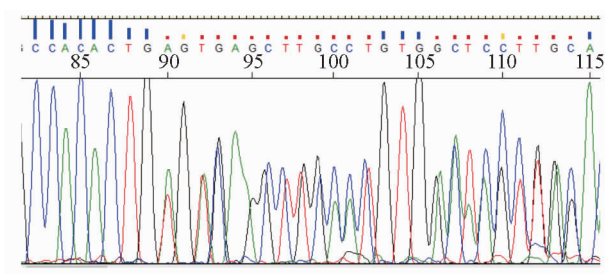


图1 *HBB*: c. 268_281delAGTGAGCTGCACTG 测序图

2.2 血液学参数结果 7名患者的血液学参数与常见的 β^0 地贫相似, Hb、MCV和MCH有明显的

降低,均表现为小细胞低色素性轻度贫血。血红蛋白电泳组分分析可见轻度升高的 Hb F 和 Hb A₂, 这些都显示 *HBB*: c. 268_281delAGTGAGCTGCACTG 这种小片段缺失突变会导致 β^0 地贫。所有患者详细的血液学参数结果见表 3。

表 2 3 个家系 β 地贫产前诊断结果

家系编号	父亲基因型	母亲(孕妇)基因型	胎儿基因型
1	β^{-28}/β^N	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
2	β^{CD17}/β^N	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$	β^N/β^N
3	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$	β^{-28}/β^N	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$

表 3 7 名患者血液学参数结果

病例号	性别	年龄(岁)	MCV(fL)	MCH(pg)	Hb(g/L)	Hb A(%)	Hb A ₂ (%)	Hb F(%)	基因检测结果
1	男	19	63.0	20.3	126	90.4	5.5	4.1	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
2	男	27	59.2	18.6	119	93.6	5.5	0.9	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
3	女	25	56.8	18.2	89	93.1	5.5	1.4	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
4	女	25	68.3	22.1	90	93.1	5.2	1.7	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
5	女	26	67.8	22.5	97	91.3	5.0	3.7	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
6	男	35	61.0	18.3	124	92.8	5.9	1.3	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$
7	女	31	61.2	20.0	98	94.0	5.3	0.7	$\beta^{CD89-93}/\beta^N$

注: $\beta^{CD89-93}$ 是指 *HBB*: c. 268_281delAGTGAGCTGCACTG (CD89_93-14bp)

3 讨论

β 地贫具有高度的遗传异质性,在不同的种族人群中也有不同的基因突变谱。在我国南方地区已报道的近 50 种 β 珠蛋白基因突变中,多数是 *HBB* 基因上的点突变。此外也有少数 β 地贫是由包括 *HBB* 基因在内的 β 珠蛋白基因簇大片段缺失导致的^[4,5]。而在 *HBB* 基因上也发现几种小片段缺失突变,其中以 CD41-42(-TCTT)最为常见,其次是 5'UTR; +40-43(-AAAC)较为多见^[6]。这 2 种突变都在临床上 17 种 β 地贫突变检测范围内,通常都能检测出。然而包括 CD89-93 在内的小片段缺失突变如果不进行基因测序,就很难发现。

Shang 等^[7]于 2011 年中首先报道了 CD89-93 突变,此后这种突变的病例被零星地报道^[8,9]。非 3 个核苷酸整倍数的缺失或插入会引起移码突变,其结果多数会造成终止密码子的提前或推后出现,从而导致编码的肽链的缩短或延长。CD89-93 间的 14 个核苷酸(AGTGAGCTGCACTG)的缺失就会在 CD89 上提前出现终止密码子 TGA,结果就是生成比正常 β 珠蛋白链明显缩短的截短蛋白。这样的

蛋白或者不稳定容易降解,或对正常的 β 珠蛋白发生竞争性抑制,从而引起 β^0 地贫^[10]。临床上通常对血液学参数异常(MCV<80 fL、MCH<27 pg)和血红蛋白电泳 HbA₂>3.5%的病例就考虑是 β 地贫的可能。本研究中 7 名患者的 MCV、MCH 和 HbA₂ 的结果都符合 β^0 地贫的表现,与曾劲伟等^[11]报道的病例相似,而常规地贫基因检测并未发现异常突变,这时就需要应用其他检测技术进一步基因诊断。所以常规地贫基因检测结果需要与筛查结果结合临床表现综合分析。

由于 β^+/ β^0 和 β^0/ β^0 会引起中重度地贫,对于夫妻一方有检测出 β^+ 或 β^0 地贫,更需要明确地贫筛查结果异常病例的突变类型,从而避免中重度 β 地贫患儿的出生。本研究中对 3 个明确地贫突变类型的家系进行了产前诊断,幸运的是其中 2 个胎儿只遗传了 CD89-93 一种突变,另 1 胎儿完全未遗传父母的突变基因。我国广东、广西和海南等南方地区是地贫的高发区域^[12],虽然罕见地贫基因型尤其是小片段缺失型 β 地贫在人群中所占的比例不高,但是进行此类罕见突变的检测和研究仍很有必要,因为只有精确诊断突变类型,才能给产前诊断和遗传咨询提供重要的参考意义。总之,随着对地贫基因突变谱的认识的加深,联合使用包括 GAP-PCR、MLPA、CMA 和基因测序在内的多种分子诊断技术,就会发现更多的大片段或小片段缺失型 β 地贫。

参考文献

- [1] COUSENS NE, GAFF CL, METCALFE SA, et al. Carrier screening for beta-thalassemia: a review of international practice[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(10):1077-1083.
- [2] YIN A, LI B, LUO M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.
- [3] ASADOV C, ALIMIRZOEVA Z, MAMMADOVA T, et al. β -Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches[J]. Int J Hematol, 2018, 108(1):5-21.
- [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, 2011:111-115.
- [5] CAI W J, LI J, XIE X M, et al. Screening for common β -globin gene cluster deletions in Chinese individuals with

- increased hemoglobin F[J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37(6):752-757.
- [6] LI DZ, LIAO C, LI J, XIE XM, et al.. The 4-bp deletion (-AAAC) in the 5' untranslated region of the beta-globin gene: a simple polymorphism? [J]. Ann Hematol, 2009, 88(7):709-710.
- [7] SHANG X, RAO Z, LOU J, et al. Compound heterozygosity for a rare small deletion and a common point mutation in the beta-globin gene: report of two Chinese families[J]. Int J Lab Hematol, 2011, 33(1):79-84.
- [8] 林芬,杨立业,林敏,等. 华南人群地中海贫血的罕见基因突变[J]. 中华医学遗传学杂志,2017,34(6):796.
- [9] 曾劲伟,方颖迪,崔金环,等. 育龄人群稀有 β 地中海贫血基因突变分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15):2235-2237.
- [10] CHENG C, PENG Q, LI S, et al. Coinheritance of α - and β -Thalassemia with a Novel Mutation (HBB: c. 268 _ 281delAGTGAGCTGCACTG) in a Chinese Family [J]. Hemoglobin, 2017, 41(4-6):288-290.
- [11] 曾劲伟,方颖迪. 中国罕见的移码突变型 β 珠蛋白生成障碍性贫血家系调查[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(2):64-66,69.
- [12] HUANG H, XU L, CHEN M, et al. Molecular characterization of thalassemia and hemoglobinopathy in Southeastern China[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):3493.

(收稿日期:2020-09-25)

编辑:宋文颖