

长沙地区 21 618 例地中海贫血基因检测分析

彭灿 贺骏 周世豪 曾果 李红玉 王卫红 徐珍 胡兰萍*

(长沙市妇幼保健院 产前诊断中心, 湖南 长沙 410007)

【摘要】目的 回顾性分析长沙市妇幼保健院地中海贫血基因检测阳性率、变异类型及分布特征。**方法** 对2013年10月至2021年6月就诊的21 618例样本进行地贫基因检测,其中2013年10月至2018年12月样本采用Gap-PCR法和PCR-反向斑点杂交法检测,对2018年1月至2021年6月样本采用PCR+导流杂交法进行检测,罕见地中海贫血基因变异采用电泳和测序进行检测。**结果** 在21 618例样本中,共检出8631例地贫携带者,总检出率为39.9%。其中 α 地贫、 β 地贫、 α 合并 β 地贫分别检出4239、4182、210例,最常见的类型为:--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$; $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ 、 β^{D41-42}/β^N 、 β^{D17}/β^N ; β^{D41-42}/β^N 合并 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (14.8%)、 $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ 合并 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (11.4%)、 $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ 合并--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ (9.5%)、 β^{D41-42}/β^N 合并--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ (9.5%)。此外发现7个罕见 α 地贫基因变异,15个罕见 β 地贫基因变异和4个新变异,新变异分别为HBA1:c.*51-53(-CCT)、HBB:c.92+4_92+15delggtatcaaggtt、HBA1:c.96-58C>T、HBA2:c.305T>G。**结论** 长沙地区是地贫高发地区,本回顾性研究为长沙地区地贫遗传咨询提供参考。

【关键词】 α 地中海贫血; β 地中海贫血; 基因变异谱**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

Analysis of 21618 cases thalassemia gene detection results in Changsha area

Peng Can, He Jun, Zhou Shihao, Zeng Guo, Li Hongyu, Wang Weihong, Xu Zhen, Hu Lanping*
Department of genetics and eugenics, Changsha hospital for maternal and child health care, Changsha, Hunan, 410007, China

* Corresponding Author: Hu Lan-Ping, Senior physician. E-mail: 452060906@qq.com

【Abstract】 Objective To retrospectively analyze the positive rate, variants types and distribution characteristics of thalassemia gene detection in Changsha Maternal and Child Health Hospital. **Methods** Thalassaemia gene detection was performed on 21,618 samples from October 2013 to June 2021, of which Gap-PCR and PCR-reverse dot blot hybridization (RDB) were used for samples from October 2013 to December 2018. The samples from January 2018 to June 2021 are detected by PCR and flow-through hybridization, and rare thalassemia gene variants are detected by electrophoresis and sequencing. **Results** Among the 21618 samples, a total of 8,631 cases of thalassaemia were detected, with a total detection rate of 39.9%. Among them, 4239 cases were α -thalassaemia in which the most common types are: --^{SEA}/ $\alpha\alpha$ (69.7%), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (18.3%), $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ (3.8%). There were 4182 cases of β -thalassemia where the most common types were $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ (38.2%), β^{D41-42}/β^N (26.8%), β^{D17}/β^N (14.3%). 210 cases of α -thalassemia combined with β -thalassemia in which the most common types are β^{D41-42}/β^N combined $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (14.8%), $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ combined $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (11.4%), $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ combined --^{SEA}/ $\alpha\alpha$ (9.5%), β^{D41-42}/β^N combined --^{SEA}/ $\alpha\alpha$ (9.5%). It contains seven rare α -thalassemia gene variants, fifteen rare β -thalassemia gene mutations and four new variants whose names were HBA1:c.*51-53(-CCT), HBB:c.

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.03.004

* 通信作者: 胡兰萍, Email: 452060906@qq.com

92+4₉₂+15delggtatcaaggtt, HBA1: c.96-58C>T, HBA2: c.305T>G. **Conclusion** Changsha is an area with a high incidence of thalassemia. The retrospective analysis of this study provides a reference for the genetic counseling of thalassaemia in Changsha.

【Key words】 α -thalassaemia; β -thalassaemia; Gene variants spectrum

地中海贫血(简称地贫)是最常见的常染色体隐性遗传性疾病,是由于基因的变异或缺失导致血红蛋白中一种或一种以上珠蛋白肽链合成缺失或不足导致血红蛋白数量含量下降,甚至引起全身其他的组织器官缺血、缺氧,所导致的贫血或病理状态,常见的类型为 α 地贫和 β 地贫。本病广泛分布于世界许多地区,东南亚即为高发区之一。中国广西、广东、海南是地贫高发地区,湖南省与广西、广东相邻,发病率也较高。同型地贫携带者将有1/4的概率生育中重型地贫患儿。重型 α 地贫的胎儿通常在子宫内或出生后数小时内死亡,重型 β 地贫患儿出生若不进行定期输血治疗,常于2岁内死亡,目前尚无根治方法,只有定期输血和螯合铁对症支持治疗,给家庭和社会带来了沉重的经济和精神负担。故地贫是我国南方地区重点防控的出生缺陷,其中婚孕前、产前和新生儿是地贫防控三个重要关口,研究长沙地区内人群中地贫分布规律,为临床咨询提供参考,对进一步加强该地区中重型地贫防控具有重要意义。

1 资料和方法

1.1 病例资料 收集2013年10月至2021年6月来长沙市妇幼保健院进行地贫基因诊断的人群,纳入标准为MCV<80 fl、MCH<27 pg、HbA2≤2.5%、HbA2≥3.5%、HbF>5%、异常血红蛋白,以上任一结果异常;地中海贫血家族史;生育过地贫患儿;配偶确诊为地贫携带者,符合以上任一项即可纳入本次研究。总共有21 618例样本纳入本次研究,其中女性16 686例,男性4932例。以上入组人群均已签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 全血基因组DNA提取和地中海贫血基因检测采用深圳益生堂生物企业有限公司和广东凯普生物科技股份有限公司提供的核酸提取试剂盒和基因检测试剂盒。PCR扩增采用美国赛默飞世尔科技公司的PCR扩增仪(型号:Veriti™

Dx96 Well Thermal Cycler), sanger测序使用仪器是ABI 3730XL。

1.3 检测方法 2013年10月至2018年12月样本采用Gap-PCR法检测(深圳益生堂生物企业有限公司地贫基因检测试剂盒)3种缺失型 α 基因变异(—^{SEA}、— $\alpha^{3.7}$ 、— $\alpha^{4.2}$)和PCR-反向斑点杂交法检测3种非缺失型 α 基因变异(α^{CS} α 、 α^{QS} α 、 α^{WS} α)和17种 β 基因变异(CD41-42、IVS-II-654、-28、CD71-72、CD17、CD26、CD31、CD27/28、IVS-I-1、CD43、-32、-29、-30、CD14-15、Cap+40-43、Int和IVS-I-5)。

2019年1月至2021年6月样本采用PCR+导流杂交法(广东凯普生物科技股份有限公司地贫基因检测试剂盒)检测6种常见 α 变异(—^{SEA}、— $\alpha^{3.7}$ 、— $\alpha^{4.2}$ 、 α^{CS} α 、 α^{QS} α 、 α^{WS} α)和 β 地贫19种变异(CD41-42、IVS-II-654、-28、CD71-72、CD17、CD26、CD31、CD27/28、IVS-I-1、CD43、-32、-29、-30、CD14-15、Int和IVS-I-5、Cap+40-43、 βE 、Cap+1)。

针对血常规指标中MCV(和)或MCH降低,常规地贫基因检测阴性,高度疑似地贫携带者进行罕见型和新的地贫变异检测: α 缺失型电泳(检测类型包括THAI缺失、FIL缺失、— $\alpha^{27.6}$ 缺失);三联体电泳(检测类型包括 $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ 、 $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$); $\alpha 1$ 基因、 $\alpha 2$ 基因、 β 基因Sanger测序技术以检测罕见和新的变异。

2 结果

21 618例样本总共检出8631例地贫携带者,总检出率39.9%。其中包含 α 地贫4239例,检出率为19.6%; β 地贫4282例,检出率为19.8%, α 地贫复合 β 地贫210例,检出率为0.97%。

2.1 α 地中海贫血基因类型 8631例阳性样本中,共有4239例 α 地贫携带者,占比约49.1%。其中静止型 α 地贫基因携带者1134例;轻型 α 地贫基因

携带者 2999 例;中间型 α 地贫 95 例,基因型分别为 $--SEA/-\alpha^{3.7}$ (63/95)、 $--SEA/-\alpha^{4.2}$ (19/95)、 $\alpha^{WS}/\alpha/--SEA$ (7/95)、 $\alpha^{CS}/--SEA$ (4/95)、 $\alpha^{QS}/\alpha/--SEA$

(1/95)、 $--SEA/-\alpha^{27.6}$ (1/95); 香港型 7 例, $\alpha\alpha^{anti4.2}$ 三联体 4 例,具体构成比详见图 1A,同时检出 3 个 α 地贫基因新变异(变异及血液学指标详见表 1)。

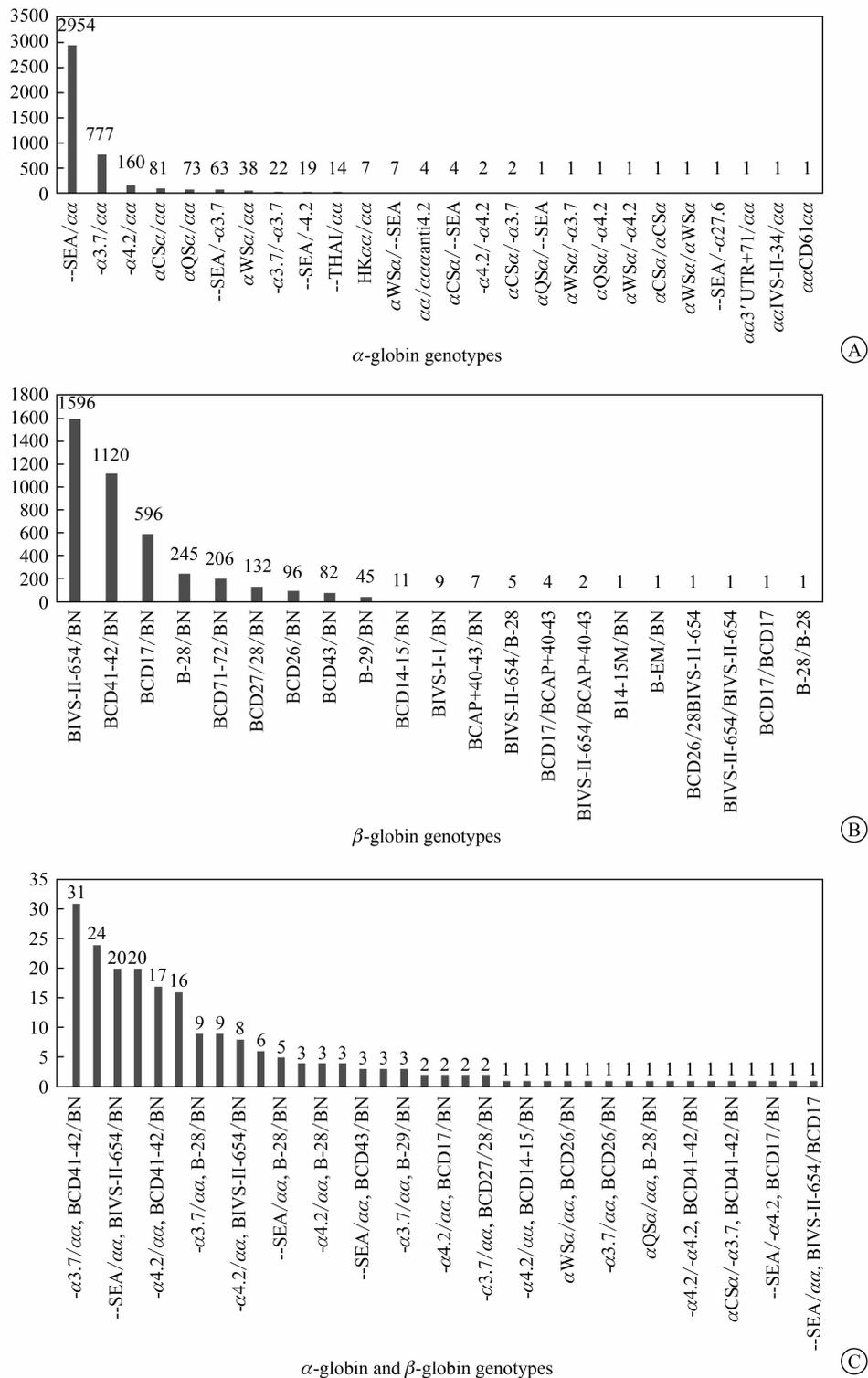


图 1 长沙地区 α 、 β 地中海贫血基因型分布柱状图

A: 长沙地区 α 地中海贫血基因型分布; B: 长沙市地区 β 地中海贫血基因型分布; C: 长沙地区 α 复合 β 地中海贫血基因型分布

表1 新变异及血液学指标

变异	MCV (fl)	MCH (pg)	Hb (g/L)	HbA2 (%)
HBA1:c. * 51-53(-CCT)	67.9	21.8	101	2.3
HBB:c. 92+4_92+15del ggtatcaaggtt	52.4	16.2	102	4.3
HBA1:c. 96-58 C>T	72.8	25.2	88	2.4
HBA2:c. 305T>G(p. L102R)	76.4	24.8	117	2.3

注:MCV:平均红细胞容积(mean corpuscular volume); MCH:平均红细胞血红蛋白量(mean corpuscular haemoglobin)。

2.2 β 地中海贫血基因类型 8631例阳性样本中,共有4182例 β 地贫携带者,占比约48.5%。其中检出常见 β 地贫携带者4162例、罕见 β 地贫携带者19例(共15个突变),分别为c. 316-45G>C、c. 81A>C、c. -138C>T等(变异及血液学指标详见表2)、 β 地贫基因新变异c. 92+4_92+15del ggtatcaaggtt携带者1例(血液学指标详见表1)。4182例 β 地贫中,4167例(99.6%)为轻型 β 地贫基因携带者,以 $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ (1596例)、 $\beta^{CD41-42}/\beta^N$ (1120例)、 β^{CD17}/β^N (596例)为主要基因型;15例(0.4%)为中重型 β 地贫,具体构成比详见图1B。

表2 罕见变异及血液学指标

病例	变异	MCV (fl)	MCH (pg)	Hb (g/L)	HbA2 (%)
1	c. 316-45G>C	85.9	29.9	117	4.2
2		90.2	30.8	119	4
3	c. 43delC	73.1	23.6	87	3.88
4		71	24.1	107	4.7
5	c. 81A>C	75	23.2	106	4.9
6		74.2	23.7	121	4.4
7	c. 287_288insA	70	21.6	86	4.9
8		78	25	108	5.5
9	c. -138C>T	74.3	24.5	115	4.9
10	c. 68A>G	80	24.6	110	3.2
11		58.2	17.1	95	4
12	c. -140 C>T	80.4	24.9	101	4.2
13		78.5	24.8	138	3.6
14	c. -78 A>C	72.2	22.7	110	5.2
15		73	23.7	85	5.4
16	c. * 111A>G	72.9	24.7	133	3.7
17		73.7	24.2	123	4.3
18	c. 92+1G>C	76.6	25.9	110	5.6
19		80	26	112	2.3

注:MCV:平均红细胞容积(mean corpuscular volume); MCH:平均红细胞血红蛋白量(mean corpuscular haemoglobin)。

2.3 α 地中海贫血复合 β 地中海贫血基因类型 8631例阳性样本中,共有210例 α 地贫复合 β 地贫

携带者,占比约2.4%,以 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ 复合 $\beta^{CD41-42}/\beta^N$ (31/210)、 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ 复合 $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ (24/210)、 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ 复合 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ (20/210)为主要基因型。具体构成比详见图1C。

3 讨论

地贫是最常见遗传性溶血性贫血,最常见的类型为 α 和 β 地贫。 α 地贫分为静止型、轻型、中间型和重型, β 地贫分为轻型、中间型和重型。而中重度地贫可造成严重的出生缺陷,治疗包括规范性长期输血和去铁治疗以及造血干细胞移植,医疗及后续费用巨大,目前尚无根治办法。文献报道,长江以南为高发地区,尤其是广西、广东、海南,湖南长沙作为相邻地区,发病率也不低。2015年湖南省率先在全国出台《湖南省出生缺陷防治办法》,统筹推进包含“地贫”筛查在内的“八免两救助”出生缺陷防治工作。本研究大规模调查了长沙地区 α 地贫和 β 地贫基因变异类型及分布规律,为地中海贫血的预防和控制提供了参考依据。

本研究回顾性分析了长沙地区21618例地贫基因检测结果,结果突变样本8631例,阳性率为39.9%,与已经报告的湖南地区疑似地贫患者中地贫基因突变检出率31.7%^[1]有差异,可能与湖南各州市地贫携带率不一致有关。贺骏等研究者对7500例样本进行流行病学调查研究,综合分析数据显示长沙地区 α 和 β 地贫杂携带率约为4.54%^[2],其中单纯 α 地贫4239例,单纯 β 地贫4182例, α 地贫复合 β 地贫210例。本研究中,常见的 α 地贫基因型 $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$ (69.7%)、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (18.3%)和 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ (3.8%),非缺失型 α 突变中, $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$ 检出率最高,与湖南各州市已报告的常见 α 地贫基因型一致,但频率有所差异^[2-5],而广州地区非缺失型 α 地贫突变中 $\alpha^{QS}\alpha/\alpha\alpha$ 检出率最高^[6],广西地区非缺失型 α 地贫突变为 $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$ ^[7]。4182例单纯 β 地贫中, $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ (38.2%)、 $\beta^{CD41-42}/\beta^N$ (26.8%)、 β^{CD17}/β^N (14.3%),与湖南省已报告的情况相同,但湛江市^[8]最常见的 β 地贫基因型为 $\beta^{CD41-42}/\beta^N$,其次为 $\beta^{IVS-II-654}/\beta^N$ 、 β^{CD17}/β^N 。以上研究表明,中国不同省

份之间地贫基因遗传存在差异,同一省份不同地区之间,基因型分布频率也不同,一方面与人口流动频繁有关,一方面可能与不同研究纳入病例数量及就医人群依从性不一致有关。

中间型 α 地贫有三个 α 珠蛋白基因受累,具有表型异质性,从轻微的贫血到需要规律输血,严重程度与 α 和 β 珠蛋白肽链失衡程度相关^[9],然而也存在相同基因型的情况下,临床表型具有差异,这可能与遗传表观修饰和环境因素相关^[10]。在本研究中,总共检出中间型 α 地贫95例,87.4%(83/95)为缺失型基因型,12.6%(12/95)为非缺失型基因型,其中, $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ (74.9%)为最常见的缺失型基因型,这个结果与桂西地区、香港特别行政区、中国台湾的研究一致^[11-13],而本研究中 $\alpha^{\text{WS}}\alpha/-\text{SEA}$ 为最常见的非缺失型基因型,与桂西地区、香港特别行政区、中国台湾 $\alpha^{\text{CS}}\alpha/-\text{SEA}$ 略有差异,可能与不同地区热点突变不同等相关。

本研究中共发现19例罕见 α 变异(7个基因型),分别为 $-\text{THAI}/\alpha\alpha$ (14例)、香港型(7例)、 $\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ 三联体4例、 $\alpha\alpha^{3\text{UTR}+71}/\alpha\alpha$ (1例)、 $\alpha\alpha^{\text{IVS-11-34}}/\alpha\alpha$ (1例)、 $\alpha\alpha^{\text{CD61}}/\alpha\alpha$ (1例)、 $-\text{SEA}/-\alpha^{27.6}$ (1例);19例罕见 β 变异(15个基因型)。其中3岁儿童样本,血液学指标(MCV:47.4 fl;MCH:13.9 pg;Hb:86 g/L;HbA2:1.3%)高度提示 α 地贫,常规试剂盒检测结果为 $-\text{SEA}/-\text{SEA}$,基因型为重型 α 地贫,与临床表型不符合,怀疑罕见 α 地贫缺失,完善 α 基因罕见缺失型电泳,出现27.6kb缺失型阳性条带, $-\alpha^{27.6}$ 缺失片段并未覆盖整个 α 珠蛋白基因,仍有 $\alpha 1$ 基因可以表达,所以基因型为 $-\text{SEA}/-\alpha^{27.6}$ 的临床表型为中间型地贫,与已经报告的病例表型符合^[14],最后确定该患儿基因型为 $-\text{SEA}/-\alpha^{27.6}$ 。故地贫罕见突变的诊断需要在常规地贫诊断流程(经血常规分析HB、MCV和MCH,并结合Hb电泳)的基础上进一步做基因检查得到确诊。本研究只对部分临床高度疑似地贫携带者进行了罕见变异地贫的检测,并未对所有传统地贫检测阴性的就诊者进行进一步检测,也未进行随访跟踪,具有一定的局限性。此外,2013年10月至2018年12月和

2019年1月至2021年6月两个时间段采用的地贫基因检测方法不同,但是对于 α 地贫变异检测内容一样, β 地贫变异,PCR+导流杂交法可检出19种变异,比PCR-反向斑点杂交法多检出 βE 、Cap+1两种变异,21618名样本中只检出1例 βE ,两个不同时间用两种不同方法对统计数据无影响。

本研究发现了4个新变异,在地贫和异常血红蛋白数据库(<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>)和ithanet数据库(<https://www.ithanet.eu/db/ithagenes>)未见报道,丰富了地贫基因变异谱。四个病例的血常规均显示小细胞低色素贫血。其中HBA2:c.305T>G该突变为 $\alpha 2$ 基因编码序列的305号碱基T突变为G,导致对应的编码氨基酸由亮氨酸改变为精氨酸,与已知致病变异HBA2:c.305T>C发生在同一氨基酸位置,但引起氨基酸变化不一致,该变异在正常人群中未发现且多个计算软件预测该变异致病,根据ACMG判读指南判读为可能致病变异;另外三个变异分别位于HBA1基因3'UTR和深度内含子区域,HBB基因非经典剪切位点区域,根据ACMG判读为致病意义未明变异,需动态追踪随访血常规指标,必要时完善家系其他成员基因及血常规检测,进一步评估其致病性。

综上,这是长沙地区一次大规模回顾性地贫基因诊断结果分析,结果表明,长沙地区地贫基因变异具有高度的复杂性和多样性,为长沙地区地贫遗传咨询和干预方案的选择提供参考。

参 考 文 献

- [1] 刘沁,贾政军,席惠,等. 湖南地区5018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.
- [2] HE J, ZENG H, ZHU L, et al. Prevalence and spectrum of thalassaemia in Changsha, Hunan province, China: discussion of an innovative screening strategy[J]. J Genet, 2017, 96(2):327-332.
- [3] 王静,周玉珍,黄京希. 湘潭地区8986例孕妇地中海贫血检测结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(2):84-85.
- [4] 李彩云,侯帅,张昊晴,等. 湖南郴州地区 α 、 β 地中海贫血发生率调查及突变类型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36

- (12):1779-1780.
- [5] 唐笑,刘岱璿,周梅华. 湖南地区地中海贫血基因检测结果及突变类型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(4):32-33+44.
- [6] ZHUANG J, JIANG Y, WANG Y, et al. Molecular analysis of α -thalassemia and β -thalassemia in Quanzhou region Southeast China[J]. J Clin Pathol, 2020, 73(5):278-282.
- [7] HE S, LI J, LI DM, et al. Molecular characterization of α - and β -thalassemia in the Yulin region of Southern China[J]. Gene, 2018, 20(655):61-64.
- [8] 李宁,官全生,李文杰,等. 湛江地区 3157 例地中海贫血基因诊断结果分析[J]. 广东医科大学学报, 2018, 36(5):501-504.
- [9] FARASHI S, HARTEVELD CL. Molecular basis of α -thalassemia[J]. Blood Cells Mol Dis, 2018, 70:43-53.
- [10] PIEL FB, WEATHERALL DJ. The α -thalassemias[J]. N Engl J Med, 2014, 13, 371(20):1908-1916.
- [11] CHAN AY, SO CC, MA ES, et al. A laboratory strategy for genotyping haemoglobin H disease in the Chinese[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(8):931-934.
- [12] CHAO YH, WU KH, WU HP, et al. Clinical features and molecular analysis of Hb H disease in Taiwan[J]. Biomed Res Int, 2014(2014):271070.
- [13] 农雪娟,许桂丹,李佳,等. 桂西地区遗传性血红蛋白 H 病基因变异类型及其血液学特征的研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(12):1326-1330.
- [14] WANG XY, LIN MX, LIN M. A novel 6.3kb deletion and the Rare 27.6kb Deletion Causing α^+ -Thalassemia in two Chinese Patients[J]. Hemoglobin, 2016, 40(5):365-368.

(收稿日期:2022-05-04)

编辑:陈建平

· 消息 ·

本刊在京东和天猫同时开通期刊订购服务啦!

为了方便广大读者订购本杂志已发行的过往期刊,现委托“贝叶图书专营店”在京东及天猫商城提供特许服务。读者们可以搜索“产前诊断杂志”获得订购链接,下单购买时请明确注明需要哪一年出版的第几期杂志。

如需征订年度新刊也可以联系客服,并将订购信息邮件至编辑部备查,谢谢!(EMAIL: chinjpd@vip.163.com, 邮件名“新刊征订”)。