

• 调查报告 •

4 657 例深圳市盐田区户籍人口珠蛋白生成障碍性贫血基因分析

施培瑶, 张 松, 邹汉良, 梁汉彰, 赵 毅, 金 娟

(深圳盐田区人民医院, 广东深圳 518081)

摘要:目的 通过研究深圳市盐田区户籍人口珠蛋白生成障碍性贫血基因型及人群携带率, 为开展深圳盐田区地中海贫血的遗传咨询、产前诊断和预防计划提供科学依据。方法 抽取 3 mL EDTA-K₂ 抗凝血进行全血细胞分析, 以平均红细胞体积(MCV) < 80 fL 作为初筛试验, 初筛后可疑病例进行 DNA 提取后用于基因检测。其中 α -地中海贫血基因检测使用 4 对 PCR 引物, 在同一反应体系进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 根据条带分析结果。 β -地中海贫血基因型检测, 采用 PCR 产物测序进行分析。结果 初筛后可疑病例 4 657 例全部进行基因检测, 检出地中海贫血基因携带者 510 例, 地中海贫血基因携带率 10.95%; 其中 α -地中海贫血基因携带者 389 例, 携带率 8.35%, 以 α -3.7、 α -4.2、 α -SEA, 为主; β -地中海贫血基因携带者 121 例, 携带率 2.59%, 以 CD41/42、LVS-II-654、box-28、CD17、CD71 为主。结论 盐田区户籍人口珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率与省内其他地区基本接近, 检测出的 8 种地中海贫血基因类型均为常见类型。

关键词: 珠蛋白生成障碍性贫血; 基因型; 携带率

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1736-03

Analysis on thalassemia gene of 4 657 household people in Yantian district of Shenzhen city

Shi Peiyao, Zhang Song, Zou Hanliang, Liang Hanzhang, Zhao Yi, Jin Xian

(Yantian District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518081, China)

Abstract: **Objective** To investigate the carrying rate and genotype of thalassemia in the household population of Yantian district in Shenzhen city so as to provide the scientific basis for Thalassemia genetic counseling, prenatal diagnosis and prevention plan. **Methods** 3 mL of anticoagulation blood by EDTA-K₂ was extract for conducting the whole blood cells analysis. With the mean corpuscular volume(MCV) < 80 fL as the preliminary screening test, then the suspected cases were performed the DNA extraction for conducting the gene test. In the α -thalassemia detection, 4 pairs of PCR primer were used to amplify in the same reaction system and the results were analyzed according to the band after the agarose gel electrophoresis. In the β -thalassemia detection, the PCR product sequencing was adopted. **Results** After the preliminary screening, 4 657 suspected cases all were performed the gene detection. 510 carriers with thalassemia gene were detected out with the thalassemia gene carrying rate of 10.95%, including 389 cases carrying α -thalassemia gene with the carrying rate of 8.35%, which was dominated by α -3.7, α -4.2 and α -SEA, and 121 cases carrying β -thalassemia gene with the carrying rate of 2.59%, which was dominated by CD41.42, LVS-II-654, CD17 and CD71. **Conclusion** The carrying rate of thalassemia gene in the household population of Yantian district was 10.95%, which is closed to that in other districts within Guangdong province, all of the 8 detected genotypes of thalassemia are the common types.

Key words: thalassemia; genotype; carry rate

珠蛋白生成障碍性贫血(地中海贫血)是一组全球最常见、对人类健康影响最大的遗传性疾病之一,因最早发现于地中海沿岸国家而得名。其致病机制主要是由于珠蛋白基因的缺陷,使组成血红蛋白的珠蛋白有一种或几种合成减少或缺乏,而引起血红蛋白的组成成分比例失衡,进而导致血红蛋白不稳定、红细胞破坏,表现为临床症状轻重不等的慢性进行性溶血性贫血。根据珠蛋白肽链缺陷不同,主要分为 α -地中海贫血和 β -地中海贫血两种类型。本文就深圳市盐田区户籍人口珠蛋白生成障碍性贫血基因类型和携带率作以下报道。

1 材料与方法

1.1 标本来源 深圳市盐田区 35 岁以下 4 657 例体检户籍居民,通过全血细胞分析进行筛查,以 MCV < 80 fL 作为初筛阳性^[1],共获得 623 份标本。

1.2 方法

1.2.1 样品基因组 DNA 提取 使用 KingFisher DNA 自动提取仪(美国 Thermo 公司)及配套试剂从抗凝全血中提取基因组 DNA,按使用说明操作。每台仪器每次提取一板(96 孔板)样本。取 6 个 Kingfisher 自动提取仪配套的深孔板及 1

个浅孔板,根据说明书分别加入一定量配套的试剂并做好标记;将要提取 DNA 的抗凝血样本 200 μ L 加到指定 96 孔板;将所有已加好试剂或样品的 96 孔板按要求置于仪器相应的位置,选定程序“Bioeasy_200 μ L Blood DNA_KF.ms2”程序,按下“star”执行该程序进行核酸提取。程序结束后收集 plate E-lution 中的 100 μ L 左右的洗脱产物即为提取的 DNA。

1.2.2 α -地中海贫血基因检测 取 DNA 2~8 μ L 加入反应管中。PCR 反应条件:97 $^{\circ}$ C 15 min, 98 $^{\circ}$ C 40 s $\rightarrow$ 64 $^{\circ}$ C, 120 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 90 s 经 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,取 5 μ L 的 PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,观察基因图谱为 1 800 bp、2 000 bp、1 600 bp、1 300 bp 的条带,分别为 α 珠蛋白正常基因、 α -3.7 缺失型、 α -4.2 缺失型、 α -SEA 的扩增产物。

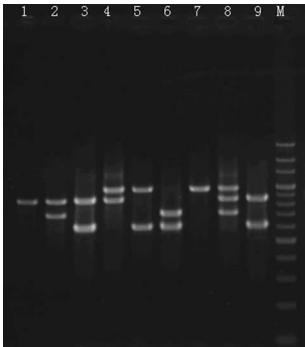
1.2.3 β -地中海贫血基因检测 取 DNA 2 μ L 加入反应管中,PCR 条件:50 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min,然后 94 $^{\circ}$ C 60 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C, 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 30 s 经 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 DNA 测序仪进行检测,分析携带者的序列。

1.2.4 测定仪器 美国贝克曼库尔特 LH750 全自动血球分析仪、美国 ABI 3730XL DNA 测序仪、美国伯乐 Sub-Cell GT

Cell 水平凝胶电泳。

2 结 果

2.1 α-地中海贫血 α-地中海贫血基因检出 389 例,携带率 8.35%,基因缺陷主要以东南亚缺失型(-SEA)、右侧缺失型(-3.7)和左侧缺失型(-4.2)这 3 种基因型为主,PCR 阳性产物分析见图 1。



1. αα/αα(正常);2. αα/-α4.2(一条染色体左侧 α 基因缺失,另外一条染色体正常);3. αα/-SEA(一条染色体缺失两个 α 基因,另外一条染色体正常);4. αα/-α3.7(一条染色体右侧 α 基因缺失,另外一条染色体正常);5. -α3.7/-SEA(一条染色体右侧 α 基因缺失,另外一条染色体缺失两个 α 基因);6. -α4.2/-SEA(一条染色体左侧 α 基因缺失,另外一条染色体缺失两个 α 基因);7. -α3.7/-α3.7(一条染色体左侧 α 基因缺失,另外一条染色体右侧 α 基因缺失);8. 可能存在 4 个以上 α 珠蛋白基因;9. αα/-SEA(一条染色体缺失两个 α 基因,另外一条染色体正常);M 为 DNA 分子量标记。

图 1 α-地中海贫血基因阳性结果图示

表 2 地中海贫血基因型与血常规检查中 MCV 值关系分析^[2]

项目	α-3.7	α-4.2	α-SEA	CD4142	IVS-II-654	Box-28	CD17	CD71
MCV(fL)	77.8±7.0	75.8±8.2	65.7±5.0	61.9±9.8	62.7±5.8	69.2±6.4	59.5±3.3	62.8±4.3
人数(n)	135	34	224	52	36	22	10	1
比率(%)	26.1	6.6	43.6	10.1	7.0	4.3	1.9	0.2

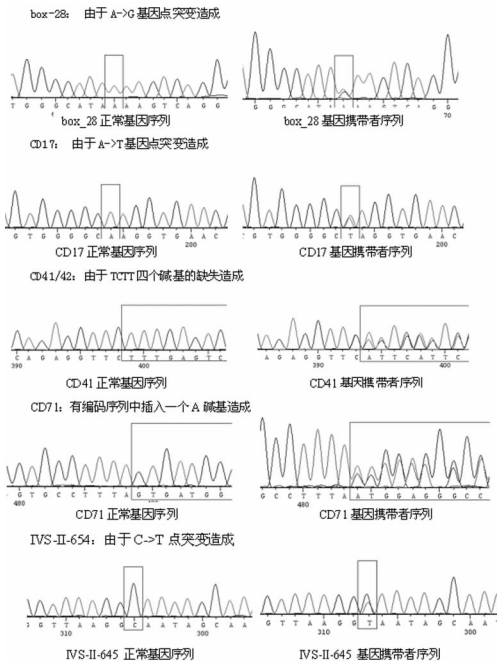


图 2 β-地中海贫血基因突变测序图

2.2 β-地中海贫血 β-地中海贫血基因检出 121 例,携带率 2.59%,携带基因以 box-28、CD17、IVS-II-654、CD41/42 和 CD71 5 种基因为主,研究者对这 5 种类型的基因改变进行了基因测序分析,各基因突变型测序结果见图 2。

2.3 地中海贫血基因类型 该数据根据以 35 岁以下体检者数据统计。见表 1。

表 1 5 10 例基因类型和携带率

地贫类型	人数(n)	百分比(%)
α-地中海贫血		
-α 3.7	131	2.57
-α 4.2	34	0.73
-α SEA	224	4.81
β-地中海贫血		
-β CD4142	52	1.14
-β IVS-II-654	36	0.77
-β box-28	22	0.48
-β CD17	10	0.22
-β CD71	1	0.02

2.4 地中海贫血基因型与血常规检查中 MCV 值的关系分析 见表 2。

3 讨 论

据世界卫生组织估计,世界中约有 4.5% 的人群携带此类地中海贫血基因,每年出生的各类重症地中海贫血(包括其他血红蛋白病的复合型)患儿数至少有 20 万。我国长江以南各省是高发区,据现有流行病学调查资料显示,广东、广西、海南、台湾和香港地区人群中 α-地中海贫血发生率高达 4%~15%^[2-3];β-地中海贫血发生率约为 1%~6%。其中广东、广西两省携带地中海贫血基因者分别达 11% 和 13%^[4],深圳市内的一些调查结果也与这些数据类似。但是这些调查人群往往是以在医院就诊的患者为主,因而并不能完全真实地反映实际情况。

地中海贫血是广东省发病率高、危害性大的出生缺陷之一,被列为广东省出生缺陷重点干预病种。由于大部分携带者没有任何症状和体征,在人群中进行地中海贫血的基因检测,有助于及早发现携带者,为其优生优育提供帮助。

盐田区 4 657 例户籍人口珠蛋白生成障碍性贫血基因检出携带者 510 例,地中海贫血基因携带率为 10.95%,其中 α-地中海贫血基因 389 例,携带率为 8.35%;β-地中海贫血基因 121 例,携带率为 2.59%。与广东省其他地区基本接近,检出 8 种类型均为常见类型。根据已经发表的报道,研究者对将这次检查的结果与广东省其他地区的地中海贫(下转第 1739 页)

表 2 1 745 例疑似病患者支原体感染情况[n(%)]				
性别	Uu	Mh	Uu+Mh	合计(感染率%)
女性	595	15	121	731(41. 89)
男性	100	2	63	165(9. 46)
合计	841(48. 19)	17(0. 97)	92(5. 25)	896(51. 35)

2.3 支原体药敏结果 896 例支原体阳性药敏试验结果显示,支原体感染患者对强力霉素、交沙霉素和米诺环素较敏感,敏感率皆高于 95%,对红霉素、罗红霉素、阿奇霉素和氧氟沙星的耐药率在 20. 42~42. 52%,对诺氟沙星和林可霉素的耐药率则高达 75%以上。具体药敏情况见表 3。

表 3 896 例支原体药敏试验结果[%(n/n)]		
抗菌药物	敏感率	耐药率
红霉素	57. 48(515/896)	42. 52(381/896)
罗红霉素	57. 92(519/896)	42. 08(377/896)
阿奇霉素	58. 04(520/896)	41. 96(376/896)
交沙霉素	96. 99(869/896)	3. 01(27/896)
强力霉素	95. 42(855/896)	4. 58(41/896)
米诺环素	96. 21(862/896)	3. 79(34/896)
林可霉素	6. 70(60/896)	93. 30(836/896)
氧氟沙星	79. 58(713/896)	20. 42(183/896)
诺氟沙星	24. 55(220/896)	75. 45(676/896)

3 讨 论

近年来支原体的感染率不断升高,由于支原体感染易引起并发症和后遗症,因此治疗、控制支原体感染的发生与发展显得尤为重要。从该院 2012 年 1~12 月期间统计的支原体感染情况来看,1 745 例标本中共检出支原体 896 例,总检出率为 51. 35%,低于杨卫萍^[2]报道的 72. 98%,高于周炜等^[3]报道的 33. 3%。表明不同地区人们生活、卫生习惯的不同,监测结果有很大的不同。生殖道支原体感染以 Uu 感染为主,占 48. 19%;Uu 合并 Mh 次之,占 5. 27%;Mh 感染最少,占 0. 97%。表明该地区生殖道支原体感染的主要病原体是 Uu,同时也提示 Mh 可能主要以复合感染形式存在,与尹雪莉等^[4]的报道相似。从感染的性别看,男性阳性率为 9. 46%,女性阳性率为 41. 89%,女性阳性率明显高于男性,与梁培松等^[5]报道基本一致,这可能与男、女性生殖道的解剖结构不同有关。鉴于 Uu 属于女性生殖道正常寄居菌,因此,临床在判断女性

Uu 感染的时候,应结合临床症状再作判断。

本研究显示,支原体感染患者对强力霉素、交沙霉素和米诺环素较敏感,敏感率皆高于 95%,可作为支原体感染的首选治疗药物。由于支原体无细胞壁,临床多用于干扰蛋白质合成的抗菌药物(如四环素类、大环内酯类)以及阻止 DNA 复制的抗菌药物(如氟喹诺酮类)进行治疗。但随着 NGU 的发病率日益增高,广谱抗菌药物的滥用及不规范治疗,Uu 和 Mh 的耐药率不断上升。药敏试验表明支原体对红霉素、罗红霉素、阿奇霉素和氧氟沙星的耐药率在 20. 42%~42. 52%,支原体对大环内酯类药物极易产生耐药,然而同属大环内酯类抗菌药物的交沙霉素的耐药率却较低,这可能与药物的化学结构及临床应用相对较少有关,提醒临床应重视病原学检查,根据药敏情况选择用药。该院支原体对诺氟沙星和林可霉素的耐药率高达 75%以上,说明其已经不适合作为支原体感染的备选治疗药物。同属氟喹诺酮类的氧氟沙星和诺氟沙星的耐药率存在很大差异,可能与该地区用药习惯有关,是否由于诺氟沙星的广泛使用,使位于支原体染色体上 DNA 旋转酶基因发生突变,有待进一步研究。

由于支原体感染症状较轻或无症状,患者往往不重视,未能及时治疗或治疗不彻底而引起不育、不孕、早产等严重后果。因此,对支原体进行培养及耐药性检测,对支原体感染的准确诊断和指导临床合理选用有效抗菌药物进行治疗具有重要意义。

参考文献

[1] Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, et al. Association of Ureaplasma urealyticum(biovar 2) with nongonococcal urethritis[J]. Sex Transm Dis, 2004, 31(3):192-195.

[2] 杨卫萍. 553 例生殖道支原体的体外耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12):1448-1449.

[3] 周炜, 邓群. 泌尿生殖道分泌物支原体培养临床分析[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(4):100-102.

[4] 尹雪莉, 李松. 泌尿生殖道支原体感染状况及药敏分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 7(23):2599-2601.

[5] 梁培松, 王结珍. 某地区泌尿生殖道支原体培养及药敏分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13):1615-1617.

(收稿日期:2014-01-23)

(上接第 1737 页)

血的发病结果进行比较^[5],此次检测的人数最多,且参加者随机性较好,具有代表性,与其他城市相比盐田地区的地中海贫血基因携带率处于中间水平,可能代表了广东省的整体情况。因此,这次得到的数据对于广东省地中海贫血的防治工作具有普遍意义。

本次开展的地中海贫血基因检测的第一次得到了盐田区地中海贫血基因分布的详细数据,为政府和医疗机构制定准确的地中海贫血防治计划提供了依据,这将对盐田区的医疗卫生工作带来极大的促进,并为参检者个人提供了具体参考意见。地中海贫血的预防工作极为重要,尤其要防止重症地中海贫血患儿出生,这将极大减轻政府和家庭的医疗负担。

参考文献

[1] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:科学出版社,

1998:51-56.

[2] 何雅军, 杨小华, 马福广, 等. 红细胞平均体积和脆性及血红蛋白电泳检测在地中海贫血诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 3(2):244-246.

[3] 张松, 邹汉良, 谭萍, 等. 深圳东部地区地中海贫血发病率的调查研究[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(2):201-202.

[4] 陈赤. 2279 例地中海贫血基因诊断的分析与研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(1):25-26.

[5] 黄烁丹, 张惠琴, 何坚胜. 梅州地区“客家人”地中海贫血的研究现状与展望[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(1):3-4.

(收稿日期:2014-01-08)