

S20[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.

[13] WANG J, WANG M, HUANG Y, et al. Colonization pressure adjusted by degree of environmental contamination: a better indicator for predicting methicillin-resistant

staphylococcus aureus acquisition [J]. Am J Infect Control, 2011, 39(9): 763-769.

(收稿日期: 2019-11-29 修回日期: 2020-02-20)

• 短篇论著 •

多种分子检测方法在精确诊断 2 例罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用*

姚翠泽, 王继成, 秦丹卿, 杜丽, 刘玲, 袁腾龙, 梁杰, 黄华洁[△]

(广东省妇幼保健院医学遗传中心, 广东广州 511442)

摘要:目的 分析多种分子检测方法在精确诊断罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用, 探讨其对预防珠蛋白生成障碍性贫血出生缺陷的重要性。方法 对 2 例外周血标本进行血红蛋白毛细管电泳和红细胞参数的分析, 再应用跨越断裂点 PCR、PCR 结合反向点杂交、多重连接依赖性探针扩增、珠蛋白基因测序及染色体微阵列等多种方法鉴定此病例的 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因突变类型。结果 检测到 2 例病例均为罕见的缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血。1 例为 α -珠蛋白基因簇调控位点 HS-40 区域至 ζ 珠蛋白基因上游区域杂合缺失, 导致 2 个 α -珠蛋白基因无法正常表达; 另 1 例缺失大小为 27.6 kb 合并常见的东南亚型的双重缺失突变。结论 此类罕见缺失型的 α -珠蛋白生成障碍性贫血合并最常见东南亚缺失类型时, 可引起中重型 α -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。对罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血的精确分子诊断可为遗传咨询和产前诊断提供重要的指导意义, 对预防中重型珠蛋白生成障碍性贫血出生缺陷至关重要。

关键词: 罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血; 分子诊断; 精确诊断; 预防出生缺陷

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.026

中图法分类号: R556.6

文章编号: 1673-4130(2020)10-1253-04

文献标识码: B

珠蛋白生成障碍性贫血常见于我国南方地区, 是一类因珠蛋白合成障碍所致的遗传性溶血性疾病, 主要分为 α -珠蛋白生成障碍性贫血和 β -珠蛋白生成障碍性贫血两类。 α -珠蛋白生成障碍性贫血的分子基础是 $\alpha 2$ 或 $\alpha 1$ 珠蛋白基因发生缺失或点突变致使 α -珠蛋白产量下降, 其中缺失型约占 80%~90%^[1-2]。其缺失范围从几 kb 到整个 α -珠蛋白基因簇及上游调控区域的缺失。中国人群中的缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血主要为 —^{SEA}、— $\alpha^{3.7}$ 、— $\alpha^{4.2}$ 三种常见类型^[3]。目前, 常见的珠蛋白生成障碍性贫血缺失类型出生缺陷防控工作效果显著, 但值得注意的是, 近年来, 我国陆续有多种罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血的研究报道^[4-5]。这些罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血如果合并其他常见的 α -珠蛋白基因突变可导致中重型 α -珠蛋白生成障碍性贫血, 所以在珠蛋白生成障碍性贫血高危地区人群中, 重视此类罕见珠蛋白生成障碍性贫血的筛查和检测对更全面地预防珠蛋白生成障碍性贫血出生缺陷工作尤为重要。目前国内临床实验室使用跨越断裂点 PCR 技术的商业

化试剂盒只能检测上述中国人 3 种常见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血, 对于罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血的基因检测还需要多种分子检测方法的应用。本研究通过对 2 例不同类型的罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血病例的基因检测, 为多种分子检测方法在精确诊断罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用提供新的思路, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2 例均就诊于本院产前诊断科。病例 1: 男, 24 岁, 血液学表现异常, 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测未见异常。其配偶孕 21⁺ 周, 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测为 —^{SEA}/ $\alpha\alpha$, 胎儿超声诊断为胎儿水肿综合征。病例 2: 女, 28 岁, 孕 29⁺ 周, 孕期顺利, 无输血史。常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测为 —^{SEA} 纯合突变, 与血液学表现不一致。

1.2 方法

1.2.1 血液学表型分析 乙二胺四乙酸抗凝管采集所有病例外周血 2 mL, 使用迈瑞 2000 全自动血液分

* 基金项目: 广东省医学科研基金项目(B2019150)。

[△] 通信作者, E-mail: elva_hhj811@163.com。

析仪进行红细胞参数分析,包括血红蛋白(Hb)、平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、红细胞体积分布变异系数(RDW)等,采用快速电泳分析系统 Sebia capillary 进行各种 Hb 组分分析,主要包括 HbA 和 HbA2。

1.2.2 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测 采用磁珠法提取患者外周血基因组 DNA(试剂盒购自中国厦门致善生物公司);应用跨越断裂点 PCR 法检测常见的 3 种 α -珠蛋白生成障碍性贫血大片段缺失($-\alpha^{3.7}/$ 、 $-\alpha^{4.2}/$ 、 $-\alpha^{SEA}/$),以及反向斑点杂交法检测 3 种 α -珠蛋白生成障碍性贫血点突变($\alpha^{QS}\alpha/$ 、 $\alpha^{CS}\alpha/$ 、 $\alpha^{WS}\alpha/$)及 17 种 β -珠蛋白生成障碍性贫血点突变(CD41-42、IVS-II-654、-29、-28、CD71-72、CD17、CD43、CD26、CD27-28、CD31、-32、-30、CD14-15、IVS-I-1、IVS-I-5、Int、Cap),根据电泳条带大小和膜条检测位点出现信号有无来确定缺失类型或点突变类型(试剂盒购自中国深圳亚能生物技术有限公司)。

1.2.3 罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测 将提取好的患者 DNA 使用试剂盒提供的引物进行扩增,扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳,检测 $-\alpha^{THAI}/$ 、

$-\alpha^{27.6}/$ 、 $-\alpha^{21.9}$ 3 种缺失型突变;多重连接依赖性探针扩增(MLPA)用于检测患者珠蛋白生成障碍性贫血 α 基因簇的拷贝数变化,并应用 Coffalyser 软件进行数据分析;将患者 DNA 进行酶切、连接、扩增、纯化、片段化、标记及芯片杂交,使用染色体微阵列(CMA) Affymetrix CytoScan 750K 技术分析 α 基因簇所在的 16 号染色体短臂区域的 DNA 拷贝数目的变化; α -珠蛋白基因测序用于检测 α -珠蛋白基因上其他的点突变,设计引物分别扩增 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 珠蛋白基因,PCR 产物送中国上海生工生物有限公司进行双向测序。引物序列如下:HBA1 5'-TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG-3'和 5'-TCC ATC CCC TCC TCC CGC CCT GCC TTT TC-3';HBA2 5'-GAT GGG CGG GAG TGG AGT-3'和 5'-GGA CAG GGG ATG GTT CAG C-3',扩增产物大小分别为 1 181 bp 和 1 241 bp。

2 结 果

2.1 血液学结果 2 例病例均为小细胞低色素性贫血,Hb 电泳提示 HbA2 的比例均不同程度的降低,符合 α -珠蛋白生成障碍性贫血的血液学表现,见表 1。

表 1 2 例血液学参数和常规 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因结果

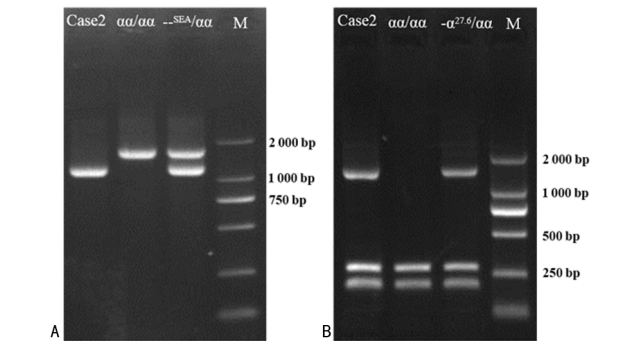
序号	性别	年龄(岁)	MCV(fL)	MCH (pg)	Hb(g/L)	RDW(%)	HbA2(%)	HbA(%)	常规基因检测结果
病例 1	男	24	68.9	20.9	138	14.9	2.5	97.5	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
病例 2	女	28	54.2	16.8	79	20.7	1.4	98.6	$-\alpha^{SEA}/-\alpha^{SEA}$

注:参数参考值 MCV 82~100 fL;MCH 27~34 pg;Hb 130~175 g/L(男),115~150 g/L(女);RDW 11.5%~14.5%;HbA2 2.7%~3.5%;HbA 94.50%~97.35%。

2.2 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测结果 病例 1 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测未检出异常突变。病例 2 常规 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测的琼脂糖电泳只见一条 $-\alpha^{SEA}$ 条带,无正常对照条带且未检测到 $\alpha^{QS}\alpha/$ 、 $\alpha^{CS}\alpha/$ 、 $\alpha^{WS}\alpha/$ 这 3 种突变点及其正常对照点。2 例病例均未检测到 17 种 β -珠蛋白生成障碍性贫血点突变。见图 1A。

2.3 罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测结果 使用 $-\alpha^{THAI}/$ 、 $-\alpha^{27.6}/$ 、 $-\alpha^{21.9}$ 试剂盒检测罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血,病例 1 结果为阴性;病例 2 为 $-\alpha^{27.6}/$ 缺失,再结合常规基因检测显示的 $-\alpha^{SEA}/$,其初步确认其基因型应为 $-\alpha^{SEA}/-\alpha^{27.6}$ 。基因的测序显示病例 1 的 HBA1 结果正常;而病例 2 的 HBA1 基因测序结果正常,但无法扩增出 HBA2 基因目的片段,提示 HBA2 缺失或引物区域存在突变。MLPA 结果显示病例 1 在探针 POLR3K exon3、HBA-HS40 178、HBA-HS40 382、HBZ region up 364、HBZ region up 信号均降低约 50%,即拷贝数为 1,提示区域从 HBZ 上游 3.5 kb 至 α -珠蛋白基因簇

上游的 POLR3K 基因至少有 102.3 kb 的杂合缺失。而病例 2 的 MLPA 结果显示为 HBM 区域上游至 HBA1 up337 拷贝数为零,即纯合缺失,而 HBZ 上游至 HBZP1 下游及 HBA1up 226 至 HBQ1 基因处拷贝数为 1,即杂合缺失。由于 $-\alpha^{SEA}/$ 的缺失区域为 HBM 区域上游至 HBQ1 基因处,因此推测另一染色体缺失区域为 26.4~32.4 kb。见图 1B。

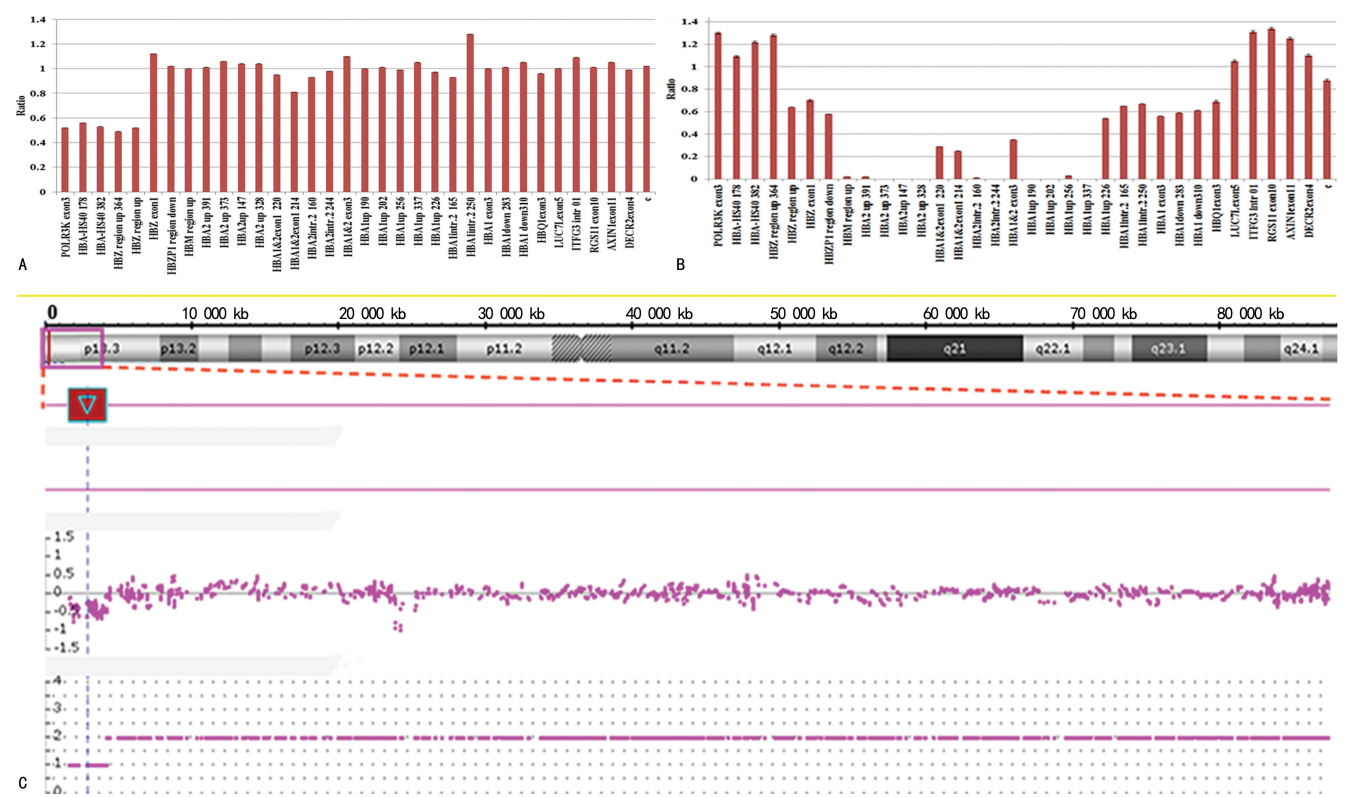


注:图 A 表示病例 2 常规缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血电泳图;图 B 表示罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血电泳图; $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 表示正常对照;M 表示 DNA 标准带。

图 1 跨越断裂点 PCR 法电泳图

因探针数量的限制,MLPA 不能确定病例 1 的缺失范围,故进行 CMA 的检测。结果显示病例 1 为 16p13.3(85880-197064)×1,即长度约为 111 kb 的杂合缺失,缺失区域包含的基因包括 POLR3K、

SNRNP25、RHBDF1、MPG、NPRL3,与 MLPA 结果大体一致,同样包含了 α-珠蛋白基因簇的调控区域 HS40 等。见图 2。



注:A 表示病例 1MLPA 结果分析图;B 表示病例 2MLPA 结果分析图;C 表示病例 1CMA 结果分析图。
图 2 两病例 MLPA 结果和病例 1CMA 结果分析图

3 讨 论

本研究 2 病例珠蛋白生成障碍性贫血筛查 Hb 电泳结果均提示为 α-珠蛋白生成障碍性贫血,病例 1 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测未检出异常,病例 2 则检测到基因型与血液学表型不符,均怀疑存在其他罕见缺失,因此在常规基因检测的基础上采用多种分子检测方法进一步精确诊断。应用实验室已有的罕见缺失型 α-珠蛋白生成障碍性贫血试剂盒(检测——THAI、—α^{27.6}、—α^{21.9})和基因测序的方法检测病例 1,检测结果均未发现异常,于是采用 MLPA 检测整个 α-珠蛋白基因簇及其上下游调控序列的拷贝数的变化,结果显示 α-珠蛋白基因簇上游的 POLR3K 基因至 ζ 基因上游区域杂合缺失,缺失片段至少为 102.3 kb。因 MLPA 探针数量较少,为了明确具体缺失范围,同时结合 CMA 技术进一步验证,结果与 MLPA 相符,同样为包含 HS-40 的 POLR3K 基因至 ζ 基因的上游区域缺失。目前已有研究证明,调控区域 HS-40 的缺失会使 α-珠蛋白基因表达水平低于正常表达水平的 3%,导致 α⁰-珠蛋白生成障碍性贫血,与东南亚型缺失(——SEA/)的血液学表型相同^[6-9]。

病例 2 常规跨越断裂点 PCR 法显示仅有 1 条 SEA 条带而没有正常条带(α2),同时基因测序结果显示 HBA1 测序无异常,而 HBA2 片段无法扩增获得,考虑到常规珠蛋白生成障碍性贫血显示患者携有(——SEA/)缺失采用 MLPA 确定缺失的大致范围时,MLPA 结果在计算(——SEA/)缺失的信号后推测出另一染色体缺失大小为 26.4~32.4 kb,该结果与后续使用罕见缺失型 α-珠蛋白生成障碍性贫血试剂盒验证检出的(—α^{27.6}/)基因型一致,结合常规和罕见 α-珠蛋白生成障碍性贫血的检测结果,可诊断病例 2 的基因型为(——SEA/—α^{27.6})。罕见缺失(—α^{27.6}/)的主要缺失范围包括 ζ-Ψζ-Ψα2-Ψα1-α2(NG_000006.1;g.9079_36718del27640),仅有 1 个 α1 基因发挥功能,为 α⁺-珠蛋白生成障碍性贫血,其杂合子表现正常的 Hb 水平,MCV、MCH 等参数也多接近正常范围的最低值^[10-11],其人群携带率仍未有相关报道,但基于其杂合子无临床症状,有理由怀疑这种缺失的携带率比笔者认为的要高。

目前已报道的 α-珠蛋白基因簇(NG_000006.1)缺失大约有 50 种(<http://globin.bx.psu.edu/>),在

中国南方,携带率最高为($-\alpha^{SEA}/$),占人群 4.1%~8.7%^[12-13]。本研究中的 2 例罕见缺失为包含 HS-40 的 POLR3K 基因至 ζ 基因的上游区域缺失和($-\alpha^{27.6}/$)缺失,这些罕见型珠蛋白生成障碍性贫血如果使用珠蛋白生成障碍性贫血基因的常规方法检测必然导致其漏诊,且 HS-40 区域缺失若合并中国南方携带率最高的($-\alpha^{SEA}/$)缺失时,其后代有 25% 的概率成为 Hb Bart's 水肿胎,同时也可发生孕妇早产、羊水过多、子痫等严重并发症^[14]。而罕见缺失($-\alpha^{27.6}/$)如果合并($-\alpha^{SEA}/$)则可导致中间型 α -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生,同时笔者也注意到这种基因型的 Hb 电泳未见 H 带,容易造成漏检。对此 LING 等^[15]推测是过剩的 β -珠蛋白链发生了不同程度的降解导致。因此,采用多种方法精确诊断罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血非常重要。

由于临床上对中重型珠蛋白生成障碍性贫血的治疗主要依靠终身输血和除铁治疗及造血干细胞的移植,其治疗费用昂贵,家庭经济负担沉重,对儿童生长发育影响巨大,珠蛋白生成障碍性贫血患儿出生缺陷“重在预防”。因此,在临床产前遗传咨询中,对于常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测的基因型与血液学表型结果不相符的患者,强烈建议进一步采用多种方法进行精确诊断突变类型,避免夫妇罕见珠蛋白生成障碍性贫血引起中重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。

罕见珠蛋白生成障碍性贫血基因型的精确诊断有助于更加全面、有效地预防中重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生,对遗传咨询和产前诊断具有重要指导作用。本研究将为罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血的精确诊断提供新思路,为预防出生缺陷工作提供有效的临床诊断基础。

参考文献

[1] XU X M, ZHOU Y Q, LUO G X, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassaemia in guangdong province; implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.

[2] PIEL F B, WEATHERALL D J. The α -thalassemias[J]. New Engl J Med, 2014, 371(20): 1908-1911.

[3] 徐湘明. 珠蛋白生成障碍性贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2016: 16-20.

[4] LONG J, PANG W, SUN L, et al. Diagnosis of a family with the novel- $\alpha^{21.9}$ thalassemia deletion[J]. Hemoglobin, 2015, 39(6): 419-422.

[5] PANG W, LONG J, WENG X, et al. Identification of three types of α -thalassemia deletion, $-\alpha^{21.9}$, $-\alpha^{2.4}$, and $-\alpha^{THAI}$, and their frequencies, in one family in the population of southern guangxi zhuang autonomous region, people's republic of china[J]. Hemoglobin, 2018, 42(1): 37-42.

[6] ANNE J, CONNOR-CARDIO J C, ORG R, et al. Orphanet journal of rare diseases[J]. Orph J Rare Dis, 2006, 20(10): 2301-2304.

[7] MOTA N O, KIMURA E M, FERREIRA R D, et al. Rare α^0 -thalassemia deletions detected by mlpa in five unrelated brazilian patients[J]. Genetics Mol Biol, 2017, 40(4): 768-773.

[8] BERBET A, SABATIER S, PICKETTS D J, et al. Targeted inactivation of the major positive regulatory element (hs-40) of the human alpha-globin gene locus[J]. Blood, 1995, 86(3): 1202-1011.

[9] COELHO A, PICANÇO I, SEUANES F, et al. Novel large deletions in the human alpha-globin gene cluster: clarifying the HS-40 long-range regulatory role in the native chromosome environment[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(2): 147-153.

[10] WANG X Y, LIN M X, LIN M. A novel 6.3 kb deletion and the rare 27.6 kb deletion causing α^+ -thalassemia in two chinese patients[J]. Hemoglobin, 2016, 40(5): 4-7.

[11] WEI X F, SHANG X, HE D Q, et al. Molecular characterization of a novel 27.6-kb deletion causing α^+ thalassemia in a chinese family[J]. Annals Hematol, 2011, 90(1): 17-22.

[12] YIN A H, LI B, LUO M Y, 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.

[13] WANG Y, LIU C, ZHANG L, et al. Identification of a novel 44.6 kb deletion causing α^0 -thalassemia in southern china[J]. Int J Lab Hematol, 2017, 39(4): 94-97.

[14] 李影, 韩平. 非免疫性胎儿水肿研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(2): 189-193.

[15] LING L Q, CHEN H, YU S L, et al. A phenotypically unusual hemoglobin h disease resulting from a rare α -globin genotype ($-\alpha^{SEA}/-\alpha^{27.6}$) [J]. Annals Clin Lab Sci, 2018, 48(6): 782-784.

(收稿日期: 2019-11-25 修回日期: 2020-02-18)