

云南少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型研究欧阳红梅¹,高玉红¹,杨必清²,陆兴热³,蒋雅先¹,杨同华⁴ Δ

(1. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院检验科,昆明 650032;2. 云南省德宏傣族景颇族自治州人民医院检验科,云南芒市 678400;3. 云南省文山壮族苗族自治州人民医院检验科,云南文山 663000;4. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院血液科,昆明 650032)

【摘要】 目的 了解云南少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率及基因型,为云南 α -珠蛋白生成障碍性贫血三级预防提供依据。**方法** 以毛细管电泳检测新生儿干血斑及抗凝血标本血红蛋白(Hb)Bart's 水平,以跨越裂隙 PCR(gap-PCR)、荧光定量 PCR 熔解曲线法检测常见缺失($-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)及突变($\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ 和 $\alpha^{\text{WS}}\alpha$),对 HbBart's $\geq 0.1\%$ 的样本再行多重 PCR 检测罕见缺失($-\text{THAI}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{MED}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$)及 DNA 测序分析。**结果** 文山州 210 例新生儿标本中,检出 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 19 例(9.0%),其中 $\alpha 2$ -珠蛋白基因罕见突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 6 例(31.6%), $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失 5 例(26.3%), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失 4 例(21.05%), $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失 4 例(21.05%);德宏州 198 例新生儿标本中 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 16 例(8.1%),其中 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失 7 例(43.7%), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失 5 例(31.3%), $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 突变 2 例(12.5%), $\alpha 2$ -珠蛋白基因罕见突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 2 例(12.5%);文山州及德宏州两少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率分别为 9.0%、8.1%,基因型 5 种($-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 缺失、 $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 及罕见突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$),以 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失及 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 罕见突变为。 **结论** 云南文山及德宏两少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型构比与国内相关报道明显不同;云南少数民族地区 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因筛查应涵盖罕见 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失和罕见突变检测。

【关键词】 α 地中海贫血;聚合酶链反应;寡核苷酸序列分析**【中图分类号】** R446.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8348(2018)30-3899-05Research of the genotype α -thalassemia in newborn of Yunnan minority nationality*OUYANG Hongmei¹,GAO Yuhong¹,YANG Biqing²,LU Xingre³,JIANG Yaxian¹,YANG Tonghua⁴ Δ

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yunnan province/the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Dehong Dai and Jinpo Autonomou Prefecture People's Hospital, Mangshi, Yunnan 678400, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Wenshan Zhuang and Miao Autonomou Prefecture People's Hospital, Wenshan, Yunnan 663000, China; 4. Department of Clinical Hematology, the First People's Hospital of Yunnan province/the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China)

【Abstract】 Objective To explore the genecarrying rate and the genotype of α -thalassemia in the newborns of different ethnic groups in Yunnan minority nationality, and to provide scientific basis for the "three-step-prevention" of α -thalassemia in Yunnan province. **Methods** The HbBart's contents of newborn's dried blood stains and anticoagulant specimens were analyzed by capillary electrophoresis, three types of deletion ($-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) and three types of mutation ($\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ and $\alpha^{\text{WS}}\alpha$) were detected by using Gap-PCR and the melting curve of the fluoresce quantitative PCR, multiplex-PCR were used to samples with HbBart's content above 0.1% for four types of rare deletion ($-\text{THAI}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{MED}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$), while DNA sequencing was also applied. **Results** Nineteen cases of α -thalassemia(9.0%) were detected from 210 newborns in Wenshan state, including 6 cases of rare mutation of $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ with $\alpha 2$ -bulbin-protein gene (31.6%), 5 cases of deletion $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ (26.3%), 4 cases of deletion $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (21.05%), and 4 cases of deletion $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ deletion (21.05%); 16 cases of α -thalassemia (8.1%) were detected from 198 newborns in Dehong state, including 7 cases of deletion $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ (43.7%), 5 cases of $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (31.30%), 2 cases of mutation $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ (21.05%), 2 cases

of rare mutation $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ with $\alpha 2$ -bulbin—protein gene (12.5%). The gene frequency of α -thalassemia in the newborns from the ethnic groups in Wenshan and Dehong Prefecture were 9.0% and 8.1% respectively with five genotypes ($-\text{FIL}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ deletion, $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ and rare mutation $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$). **Conclusion** The genotypes of α -thalassemia in the newborns from the ethnic groups in Wenshan and Dehong were distinctively different from other reported in China; The screening of α -thalassemia in ethnic groups in Yunnan should cover the rare deletion of $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ and rare mutations mentioned above in the future.

[Key words] α -thalassemia; polymerase chain reaction; oligonucleotide array sequence analysis

珠蛋白生成障碍性贫血是人类最常见且危害最大的单基因遗传病之一。2006 年资料显示,云南省珠蛋白生成障碍性贫血发病率居全球之首^[1],以边境少数民族为高发人群。2011—2013 年调查显示云南边境地区珠蛋白生成障碍性贫血检出率相对更高占 20.9%,尤以德宏州居首(人群检出率 43.1%)^[2-3],所以目前珠蛋白生成障碍性贫血仍是云南省特别是边境少数民族地区危害较重的地方病。 α -珠蛋白生成障碍性贫血是由于 α -珠蛋白基因缺失或非缺失突变使 α -珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血。由于珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率存在明显的地域差异,本研究旨在初步了解云南少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带特征,为云南 α -珠蛋白生成障碍性贫血三级预防提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机收集文山壮族苗族自治州(简称文山州)、德宏傣族景颇族自治州(简称德宏州)2016 年 11 月至 2017 年 3 月出生的新生儿(年龄 1~28 d)足跟血的干血斑 210 例(其中非汉族 131 例、汉族 79 例;乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝血 198 例,其中非汉族 121 例,汉族 77 例。孕周为 35~40 周,2~8 °C 冷藏保存,7~15 d 内冷藏运输至云南省第一人民医院完成检测。家属签署知情同意书,登记受检者姓名、编号、年龄、性别,民族、孕周及其父母的相关信息。民族分布情况见表 1。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 全自动毛细管电泳仪(法国 Sebia Capillarys Neonat Fast 及 Capillarys Flex Piercing),PCR 仪 T100 Thermal Cycler、水平电泳仪 Mini-Sub Cell GT、凝胶成像仪 GelDoc EZ、荧光定量 PCR 仪 CFX96 Touch、熔解曲线突变分析软件 CFX Manager 3.1(美国 Bio-rad),X1R 台式冷冻离心机(美国 Thermo Fisher),ND-1000 型紫外分光光度计(Nano-Drop 公司)。

1.2.2 试剂 毛细管电泳仪质控品及所用检测试剂均为 Sebia 公司配套的珠蛋白生成障碍性贫血检测试剂盒。磁珠法 DNA 提取试剂盒(UPure Blood DNA Extraction 试剂盒 2.0、UPure Swab DNA 试剂盒,成都新百基),常见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂盒(广州达安基因有限公司),常见非缺失

型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂盒(厦门致善生物科技有限公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 毛细管血红蛋白(Hb)电泳 按照仪器操作规程完成质控标本、新生儿干血斑及抗凝血标本毛细管 Hb 电泳检测,记录 HbBart's 水平。

1.3.2 分子生物学

1.3.2.1 DNA 提取及测定 使用成都新百基 UPure Blood DNA Extraction 试剂盒 2.0 及 UPure Swab DNA 试剂盒磁珠法提取新生儿抗凝全血、干血斑中 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,DNA 样本的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 应在 1.6~2.0 范围之间,且 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} \geq 2.0$ (若 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} < 2.0$,需要使用试剂盒中提供的 DNA 溶解液将 DNA 标本进行适度稀释,但需保证样本浓度大于 1 ng/ μL)。DNA 记录浓度后放置在一 20 °C 冰箱备用。

1.3.2.2 跨越裂隙 PCR(gap-PCR) 检测 3 种常见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因($-\text{SEA}-\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}-\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}-\alpha\alpha$),严格按照试剂盒说明书进行检测和结果判读。PCR 反应条件:94 °C 3 min;随后 94 °C 45 s,62 °C 90 s,72 °C 2 min,共 5 个循环;然后 94 °C 30 s,62 °C 1 min,72 °C 2 min,共 30 个循环;最后 72 °C 7 min。阴性质控应无任何扩增产物,正常个体及正常质控仅在 1.8 kb 处有 1 个扩增产物、阳性质控在 1.8、1.3 kb 处有扩增产物。

1.3.2.3 荧光定量 PCR 熔解曲线法 检测 3 种常见非缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因($\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ 和 $\alpha^{\text{WS}}\alpha$)。PCR 反应条件:50 °C UNG 酶处理 2 min,95 °C 10 min;随后 95 °C 15 s,65 °C 15 s(每个循环下降 1 °C),76 °C 20 s,共 10 个循环;95 °C 15 s,55 °C 15 s,76 °C 20 s,共 50 个循环;最后,95 °C 1 min,35 °C 3 min。设置溶解曲线分析程序:40~80 °C,此阶段每 0.4 °C 采集 1 次 FAM、HEX 和 ROX 通道荧光信号。

1.3.2.4 罕见突变检测 对 Hb 电泳 HbBart's $\geq 0.1\%$ 且未检出常见 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因缺失及非缺失标本,再行 4 种罕见缺失型 $-\text{THAI}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{MED}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$ 多重 PCR 检测。参照文献[4]设计引物,引物序列见表 2。PCR 反应体系包括:5 μL 2 \times GC buffer I、250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、正反向引物各 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.5 U、15~25 ng

表 1 文山及德宏两地区民族构成分布情况[n(%)]

| 组别 | n | 傣族 | 景颇族 | 苗族 | 彝族 | 壮族 | 其他民族 | 父母均非汉族 | 汉族 |
|----|-----|----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
| 文山 | 210 | 5(2.3) | 0 | 13(6.2) | 41(19.5) | 59(28.1) | 13(6.2) | 41(19.5) | 79(37.6) |
| 德宏 | 198 | 66(33.3) | 27(13.6) | 0 | 6(3.0) | 0 | 22(9.1) | — | 77(38.8) |

—:此项无数据

基因组 DNA 模板。PCR 反应条件:96 °C 15 min; 随后 98 °C 45 s, 60 °C 90 s, 保存或立即用 2% 琼脂糖凝胶电泳。对以上罕见缺失检测阴性的样本进行 α1-珠蛋白基因和 α2-珠蛋白基因的 PCR 扩增产物测序。从 UCSC 数据库 (<http://genome.ucsc.edu>) 中获取 α-珠蛋白基因(α1-和 α2-基因)的 DNA 序列。引物参照文献[5], 分别扩增 α1-和 α2-珠蛋白基因(包含 3 个外显子及部分上游和下游序列), 引物委托生工生物工程(上海)有限公司合成。引物序列见表 3。PCR 扩增:α1-和 α2-珠蛋白基因的 PCR 反应体系相同, 总体积为 50 μL (包括: 25 μL 2 × GC buffer I、750 μmol/L dNTP、正反向引物各 6.4 pmol/L、Taq DNA 聚合酶 2.0 U、100 ng 基因组 DNA 模板)。扩增 α1-珠蛋白基因的 PCR 反应条件:95 °C 5 min; 随后 95 °C 40 s, 62.5 °C 40s, 72 °C 100 s, 共 35 个循环; 然后 72 °C 3 min; 4 °C 保存。扩增 α2-珠蛋白基因的 PCR 反应条件:95 °C 5 min; 随后 95 °C 40 s, 65 °C 40 s, 72 °C 100 s, 共 35 个循环; 然后 72 °C 3 min; 4 °C 保存。PCR 扩增完成后, 先取 2~3 μL 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 确定成功扩增并获得特异性片段, 将剩余 PCR 产物用于 DNA 测序。测序过程委托生工生物工程(上海)有限公司完成。用 chromas 及 clustalx 软件分析 DNA 测序结果。

表 2 罕见缺失型 --THAI/αα, --FIL/αα, --MED/αα, --α^{20.5}/αα 引物序列

| 基因名称 | 方向 | 引物序列(5'→3') | 扩增片段长度(bp) |
|------|----|--------------------------|------------|
| THAI | 正向 | GACCATTCCTCAGCGTGGGTG | 1 153 |
| THAI | 反向 | CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG | |
| FIL | 正向 | TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG | 546 |
| FIL | 反向 | ATAACCTTATCTGCCACATGTAGC | |
| MED | 正向 | TACCCTTTGCAAGCACACGTAC | 807 |
| MED | 反向 | TCAATCTCCGACAGCTCCGAC | |
| 20.5 | 正向 | GCCCAACATCCGGAGTACATG | 1 007 |
| 20.5 | 反向 | AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG | |

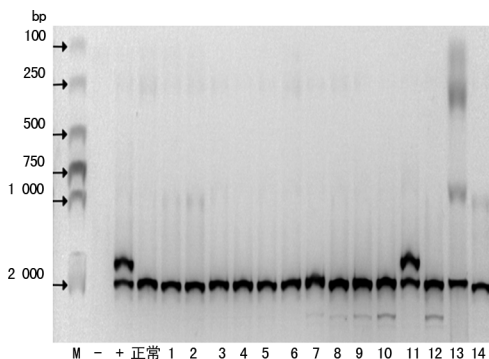
表 3 α1-和 α2-珠蛋白基因引物序列

| 基因名称 | 方向 | 引物序列(5'→3') | 扩增片段长度(bp) |
|--------|----|-----------------------|------------|
| α1 珠蛋白 | 正向 | TGGAGGGTGGAGACGTCCTG | 1 089 |
| | 反向 | GCCTGGCACGTTTGTCTGAG | |
| α2 珠蛋白 | 正向 | TGGAGGGTGGAGACGTCCT | 1 085 |
| | 反向 | CCATTGTTGGCACATT CCGG | |

2 结 果

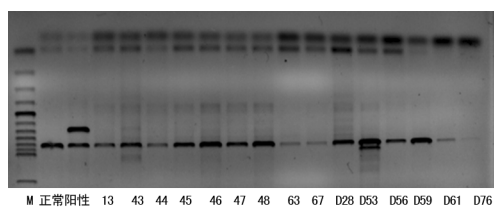
2.1 常见 α-珠蛋白生成障碍性贫血基因检测 对文

山州 210 例、德宏州 198 例新生儿标本行 gap-PCR、荧光定量 PCR 熔解曲线法检测 3 种常见缺失型和非缺失型 α-珠蛋白生成障碍性贫血基因(--SEA/αα, -α^{3.7}/αα, -α^{4.2}/αα, α^{CS}α/αα, α^{QS}α/αα 和 α^{WS}α/αα), 文山州检出 8 例, 其中 --SEA/αα 缺失 4 例(图 1), -α^{3.7}/αα 缺失 4 例; 德宏州检出 7 例, 其中 -α^{3.7}/αα 缺失 5 例(图 2), α^{CS}α/突变 2 例(图 3)。



M:DNA 分子标记物; -: 阴性对照; +: 阳性质控品; 11: --SEA/αα 缺失

图 1 gap- PCR 基因扩增产物电泳图



M:DNA 分子标记物; D53: -α^{3.7}/αα 缺失

图 2 gap- PCR 基因扩增产物电泳图

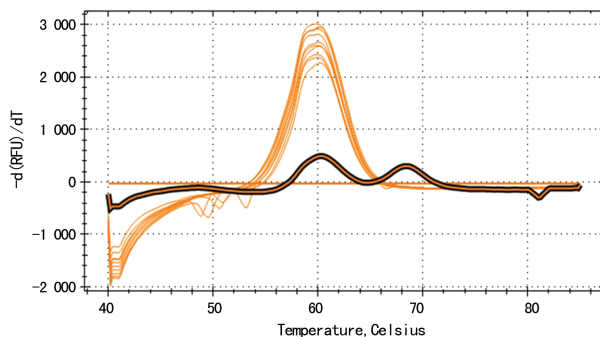
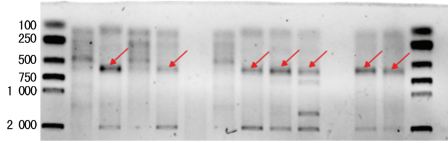


图 3 荧光定量 PCR 熔解曲线法检测 α^{CS}α/突变(阳性)

2.2 罕见 α-珠蛋白生成障碍性贫血基因检测 文山州新生儿标本中检出 Hb Bart's 带 17 例, 德宏州检出 HbBart's 带 14 例, 其中 11 例检出常见缺失型和非缺失型 α-珠蛋白生成障碍性贫血基因, 对其余 20 例标本行罕见缺失型 α-珠蛋白生成障碍性贫血基因(--THAI/αα, --FIL/αα, --MED/αα, -α^{20.5}/αα) 检测。文山州

检出 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失 5 例,德宏州 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失 7 例,见图 4。对罕见缺失检测阴性的 8 例标本行 PCR 产物直接测序分析 $\alpha 1$ -和 $\alpha 2$ -珠蛋白基因的全长,其 $\alpha 1$ -珠蛋白基因测序均为正常基因,而 $\alpha 2$ -珠蛋白基因均发现在 5'UTR 区位于基因第 8 个氨基酸,第 24 个碱基存在由 G>C 的同译突变。文山州罕见非缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 6 例,德宏州 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 罕见突变 2 例。



红色箭头所指为 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 罕见缺失

图 4 多重 PCR 扩增产物电泳结果

2.3 两少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血的携带率及基因型

2.3.1 文山州

文山州 210 例新生儿标本中,检出 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 19 例, α -珠蛋白生成障碍性贫血携带率占 9.0%(19/210),基因型 4 种,其中罕见非缺失突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 6 例,构成比 31.6%(6/19),携带率 2.85%(6/210),罕见缺失 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 5 例,构成比 26.3%(5/19),携带率 2.38%(5/210),两种常见缺失 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 及 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 均为 4 例,构成比 21.05%(4/19),携带率 1.90(4/210),未检出常见 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 缺失及 3 种常见突变。见表 4、5。

表 4 云南少数民族地区 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率[n(%)]

| 地区 | n | HbBart's 阳性率 | α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率 |
|----|-----|--------------|---------------------------|
| 德宏 | 198 | 14(7.1) | 16(8.1) |
| 文山 | 210 | 17(8.1) | 19(9.0) |

2.3.2 德宏州

德宏州 198 例新生儿标本中,检出 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 16 例, α -珠蛋白生成障碍性贫血的携带率 8.1%(16/198),基因型 4 种,其中罕见缺失 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失 7 例,构成比 43.7%(7/16),携带率 3.54%(7/198),常见 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失 5 例,构成比 31.3%(5/16),携带率 2.53%(5/198),常见 $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$ 突变及罕见非缺失突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 均 2 例,构成比 12.5%(2/16),携带率 1.01%(2/198),未检出常见 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 及 $\alpha\alpha/-\text{SEA}$ 缺失。见表 4、5。

表 5 云南少数民族地区 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型构成比[n(%)]

| 地区 | $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ | $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ | $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$ | $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ | $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ | 合计 |
|----|------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|-------------------------------|----|
| 德宏 | 5(31.3) | — | 2(12.5) | 7(43.7) | 2(12.5) | 16 |
| 文山 | 4(21.1) | 4(21.1) | — | 5(26.3) | 6(31.6) | 19 |
| 合计 | 9(25.7) | 4(11.4) | 2(5.7) | 12(34.3) | 8(22.9) | 35 |

—:此项无数据

3 讨论

α -珠蛋白生成障碍性贫血基因位于染色体 16p13,每条染色体上有两个连锁的 α -珠蛋白基因 $\alpha 1$ -和 $\alpha 2$ -,分别长约 1 kb,共 4 个,正常人以 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 表示。 α -珠蛋白生成障碍性贫血可分为缺失型和非缺失型。缺失型是由于缺失染色体上 1 个($-\alpha$)或 2 个($--$) α -珠蛋白基因;非缺失型是由于染色体上 $\alpha 1$ 珠蛋白基因($\alpha\alpha^T$)或 $\alpha 2$ 珠蛋白基因($\alpha^T\alpha$)发生突变。

全球已报道的缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血超过 20 种,世界上不同种族其 α -珠蛋白基因缺失谱不同。报道的中国人缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血有 14 种,其中常见的缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血是东南亚缺失型($-\text{SEA}/\alpha\alpha$)、右侧缺失型($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)、左侧缺失型($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)^[6-7]。罕见缺失型分别是泰国缺失型($-\text{THAI}/\alpha\alpha$)、菲律宾缺失型($-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{HW}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{FZ}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{11.1}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha 2.7$ 、 $-\alpha 2.4$ 、 $-\alpha 2.8$ 、 $-\alpha 21.9$ 、 $-\alpha 27.6$ 、 $-\alpha 28.5$)^[8-12]。目前中国报道的非缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血有 13 种,较常见的有 HbConstant Spring (Hb CS, CD142 TAA → CAA)、Hb Quong Sze (Hb QS, CD125 CTG → CGG)、Hb Westmead (Hb WS, CD122CAC → CAG)。临床工作中,检测 3 种常见缺失型基因($-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)及 3 种常见非缺失型基因($\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha/\alpha\alpha$ 及 $\alpha^{\text{WS}}\alpha/\alpha\alpha$),就能检出约 98% α -珠蛋白生成障碍性贫血基因。

本研究采用 gap-PCR、荧光定量 PCR 熔解曲线法对文山州 210 例、德宏州 198 例新生儿标本检测 3 种常见缺失型和非缺失型 $\alpha\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因 ($-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 、 $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$ 、 $\alpha^{\text{QS}}\alpha/\alpha\alpha$ 和 $\alpha^{\text{WS}}\alpha/\alpha\alpha$),检出 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 15 例,其中文山州 8 例、德宏州 7 例;有 4 例(3 例 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$,1 例 $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$) α -珠蛋白生成障碍性贫血阳性标本在毛细管电泳仪上无 HbBart's 带检出,提示采用毛细管电泳法检测 HbBart's 带用于筛查新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血存在漏检静止型 α -珠蛋白生成障碍性贫血。

两地区共检测出 HbBart's 带阳性(HbBart's 带大于或等于 0.1%)标本 31 例,其中检出常见缺失及突变基因型为 11 例,其余 20 例标本再行罕见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 ($-\text{THAI}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 、 $-\text{MED}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$)检测及珠蛋白基因测序分析。结果显示检出罕见 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失 12 例,罕见缺失均阴性的 8 例,并对 8 例 PCR 产物检测 $\alpha 1$ -和 $\alpha 2$ -珠蛋白基因的全长, $\alpha 2$ -珠蛋白基因均为正常基因, $\alpha 2$ -珠蛋白基因均发现在基因的 5'UTR 区位于基因第 8 个氨基酸,第 24 个碱基存在由 G>C 的同译突变。该突变属于已知突变,在 NCBI 数据库中编号为 rs71382271,该突变不位于蛋白编码区,但可能影响该基因的表达。即检出罕见 $\alpha 2$ -珠蛋白基因突变 $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$ 8 例。

本研究显示文山州 210 例新生儿标本中,壮族 59 例,占 28.1%,彝族 41 例,占 19.5%,为该研究群体

中比例较高前两位,其 α -珠蛋白生成障碍性贫血的携带率为 9.0%。德宏州 198 例新生儿标本中,傣族 66 例,占 33.3%,景颇族 27 例,占 13.6%,为该研究群体中比例较高前两位,其 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率 8.1%,表明云南两少数民族新生儿群 α -地贫基因携带率与 2015 年 HUANG 等^[13]报道的云南 α -珠蛋白生成障碍性贫血的携带率 9.7%相近。目前研究显示国内 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型是以 $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 及 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 为前两位,并以地域差异两者位次有所不同^[14]。本研究显示两少数民族新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型构成比文山以罕见突变 α/α^T 、 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失(构成比分别为 31.6%、26.3%)、德宏州以 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 和 $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 缺失(构成比分别为 43.7%、31.3%)为前两位。提示云南两少数民族地区 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型有其独特构成比。

$-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血是 1988 年由 FISCHER 等^[15]发现,迄今为止,仅在中国台湾、菲律宾人群中检出 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ ^[16-17],中国大陆仅 2017 年黎永鉴等^[18]报道在广西壮族自治区梧州市检出 1 例 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失。本次研究发现多例罕见 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失,且以较高比例存在于云南两少数民族新生儿群体中,与 2017 年杨阳等^[19]报道云南省 α -珠蛋白生成障碍性贫血等位基因构成比及其他文献^[20]报道中国南方各个地区等位基因构成比均存在明显差别。

综上所述,本研究显示云南省文山州及德宏州两少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率与文献报道相符,约 10%;首次在中国大陆检出多例罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因 $-\text{FIL}/\alpha\alpha$ 缺失型,并以较高构成比存在于云南省文山州及德宏州两少数民族地区新生儿群体中,提示云南少数民族地区 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型有其独特构成比,为下一步制订云南少数民族地区 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因筛查及三级预防措施提供了科学依据。

参考文献

- [1] REN A G, To have released areport of the global On birth defects in America Foundation [J]. Chin Reproductive Health, 2006, 17(2): 121-222.
- [2] 赵钟鸣,姚莉琴,范雨梅,等. 云南省两边疆州六民族 0~7 岁儿童地中海贫血流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(4): 352-356.
- [3] 姚莉琴,邹团标,刘锦桃,等. 云南省 15 个特有少数民族 7 岁以下儿童地中海贫血的调查研究报告[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2013, 9(3): 837-848.
- [4] TAN A S, QUAH T C, LOW P S, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia [J]. Blood, 2001, 98(1): 250-251.
- [5] 唐海深,江陵,陆林苑,等. 罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血的新生儿筛查与诊断[J]. 中国产前诊断杂志 2014, 6(1):

13-17.

- [6] 王林铄,唐南洪,黄海龙,等. 福建地区血红蛋白 H 病基因突变的研究[J]. 中国妇幼保健, 2015, (19): 3264-3266.
- [7] DEHBOZORGIAN J, MOGHADAM M, DARYANOUSH S, et al. Distribution of alpha thalassemia mutations in Iranian population [J]. Hematology, 2015, 20(6): 359-362.
- [8] LIN M, ZHONG T Y, CHEN Y G, et al. Molecular epidemiological characterization and health burden of thalassemia in Jiangxi Province, P R. China [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101505.
- [9] YAO H, CHEN X, LIN L, et al. The spectrum of α - and β -thalassemia mutations of the Li people in Hainan Province of China [J]. Blood Cells Mol Dis, 2014, 53(1/2): 16-20.
- [10] YAO X Y, YU J, CHEN S P, et al. Prevalence and genetic analysis of α -thalassemia and β -thalassemia in Chongqing area of China [J]. Gene, 2013, 532(1): 120-124.
- [11] YIN A H, LI B, LUO M Y, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14332 families of Guangdong province, China [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.
- [12] ZHENG C G, LIU M, DU J, et al. Molecular spectrum of α and β globin gene mutations detected in the population of Guangxi Zhuang Autonomous Region, People's Republic of China [J]. Hemoglobin, 2011, 35(1): 28-39.
- [13] HUANG S W, XU Y, LIU X M, et al. The Prevalence and Spectrum of alpha-Thalassemia in Guizhou Province of South China [J]. Hemoglobin, 2015, 39(4): 260-263.
- [14] 张强,范歆,何升,等. 广西地区缺失型 α -地中海贫血基因分布特征[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(10): 941-943.
- [15] FISCHERGHODSIAN N, VICKERS M A, SEIP M, et al. Characterization of two deletions that remove the entire human zeta-alpha globin gene complex ($-\text{THAI}$ and $-\text{FIL}$) [J]. Br J Haematol, 1988, 70(2): 233-238.
- [16] PENG C T, LIU S C, PENG Y C, et al. Distribution of thalassemias and associated hemoglobinopathies identified by prenatal diagnosis in Taiwan [J]. Blood Cells Mol Dis, 2013, 51(3): 138-141.
- [17] 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.
- [18] 黎永鉴,闫丽琼,陈唯,等. 梧州市 1 365 对地中海贫血筛查双阳夫妇泰国缺失型 α 地中海贫血基因诊断及产前诊断结果分析[J]. 吉林医学, 2017, 38(2): 317-319.
- [19] 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.
- [20] 刘朔婕,孙鸣,黄宇,等. 闽南地区罕见 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 13(6): 311-316.