

HKα 和 anti-HKα 基因型珠蛋白生成障碍性贫血的基因检测分析

刘沃满, 唐玉芬, 李祝坤[△], 谭满胜, 聂俊玮

广东省茂名市妇幼保健院遗传优生优育中心, 广东茂名 525000

摘要:目的 对 HKα 和 anti-HKα 基因型珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)病例进行基因检测, 分析 HKα 和 anti-HKα 基因型病例的临床表型, 为产前诊断和遗传咨询提供指导。方法 对 36 031 例样本进行常规地贫基因检测, 应用巢式 PCR 技术对 17 例跨越断裂点 PCR(gap-PCR)电泳同时出现 α₂、-α^{3.7}/-α^{4.2} 和 --^{SEA}, 4 例 -α^{3.7} 条带比 α₂ 条带细弱及 1 例 -α^{4.2} 条带比 α₂ 条带细弱的样本进行 HKα 和 anti-HKα 基因型检测。结果 在 36 031 例样本中, 共检测到 20 例 HKα 和 2 例 anti-HKα 基因型病例, 其中 3 例 HKα/α, 1 例 HKα/α 同时复合 IVS-II-654 杂合子, 3 例 HKα/-α^{4.2}, 12 例 HKα/--^{SEA}, 1 例 HKα/--^{SEA} 同时复合 CD41-42 杂合子, 1 例 anti-HKα/α, 1 例 anti-HKα/--^{SEA}。HKα 与 anti-HKα 检出率分别为 0.056% 和 0.005%, 且存在 1 个 HKα/--^{SEA} 家系和 1 个 anti-HKα/--^{SEA} 家系。结论 HKα 或 anti-HKα 基因型地贫的准确诊断对罕见 α-地贫基因的筛查和产前遗传咨询具有非常重要的意义, 避免了不必要的创伤性产前诊断。

关键词: 珠蛋白生成障碍性贫血; HKα; anti-HKα

中图分类号: R556.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)20-2992-03

Gene detection analysis of HKα and anti-HKα genotypes thalassemia

LIU Womany, TANG Yufen, LI Zhukun[△], TAN Mansheng, Nie Junwei

Center for Genetic Eugenics, Maoming Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Maoming, Guangdong 525000, China

Abstract: Objective To conduct the gene detection in the cases of HKα and anti-HKα genotype thalassemia, and to analyze the clinical phenotype of HKα and anti-HKα genotype cases so as to provide the guidance for clinical prenatal diagnosis and genetic counseling. **Methods** A total of 36 031 samples were conducted the routine thalassemia gene detection. The nest PCR technique was used to conduct the genotype detection on 17 samples simultaneously appearing α₂, -α^{3.7}/-α^{4.2} and --^{SEA} by crossing the break point PCR (gap-PCR) electrophoresis, 4 samples with -α^{3.7} band thinner than α₂ band and 1 sample with -α^{4.2} band thinner than α₂ band. **Results** In 36 031 samples, 20 cases of HKα genotype and 2 cases of anti-HKα genotype were detected, including 3 cases of HKα/α, 1 case of simultaneous compound IVS-II-654 heterozygote of HKα/α, 3 cases of HKα/-α^{4.2}, 12 cases of HKα/--^{SEA}, 1 case of simultaneous compound CD41-42 heterozygote of HKα/--^{SEA}, 1 case of anti-HKα/α, and 1 case of anti-HKα/--^{SEA}. The detection rates of HKα and anti-HKα were 0.056% and 0.005% respectively, moreover there were one family of HKα/--^{SEA} and one family of anti-HKα/--^{SEA}. **Conclusion** The accurate diagnosis of HKα or anti-HKα genotype thalassemia has the very important significance for screening rare α thalassemia genes and prenatal genetic counseling, which avoids unnecessary invasive prenatal diagnosis.

Key words: thalassemia; HKα; anti-HKα

珠蛋白生成障碍性贫血又称地中海贫血(以下简称地贫),是由于珠蛋白基因发生缺陷,致使珠蛋白链合成减少或缺失,使形成血红蛋白的 α-链/非 α-链比例失衡,而导致的一组遗传性溶血性疾病,轻者可无临床表现,重者以进行性溶血性贫血为主要特征。在临床上地贫主要分为 α-地贫和 β-地贫。α-地贫主要分为缺失型和非缺失型。缺失型主要由东南亚缺失(-^{SEA})、右缺失(-α^{3.7})和左缺失(-α^{4.2})引起^[1]。HKα 和 anti-HKα 基因型是罕见的 α-地贫基因型。HKα 是 α 球蛋白基因通过非平衡交换,形成同时包含 -α^{3.7} 和

anti4.2 片段的重组基因^[2],而 anti-HKα 是 HKα 的衍生产物,是包含了 -α^{4.2} 和 anti3.7 片段的重组基因。由于目前我国常规的 α-地贫基因检测只能检测 -^{SEA}、-α^{3.7} 和 -α^{4.2} 缺失,而不能检测 anti4.2 和 anti3.7 片段,从而可能导致 HKα 和 anti-HKα 基因型被误诊为 -α^{3.7} 和 -α^{4.2} 基因型。本文对 36 031 例样本中检测到的 HKα 和 anti-HKα 基因型进行了总结和分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 6 月至 2018 年 12 月于

本院进行常规地贫基因检测的样本 36 031 例,应用巢式 PCR 技术对跨越断裂点 PCR(gap-PCR)电泳同时出现正常条带 α_2 、右缺失($-\alpha^{3.7}$)或左缺失($-\alpha^{4.2}$)和东南亚缺失($-\text{SEA}$), $-\alpha^{3.7}$ 条带比 α_2 条带细弱和 $-\alpha^{4.2}$ 条带比 α_2 条带细弱的样本进行 HK $\alpha\alpha$ 和 anti-HK $\alpha\alpha$ 基因型检测。患者或监护人均签署知情同意书,本研究经本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用厦门致善 Lab-Aid 820 核酸提取 Mini 试剂进行外周血或脐血的 DNA 提取;羊水或绒毛样本 DNA 采用深圳亚能生物技术有限公司生产的提取试剂盒,按试剂盒说明书提取步骤进行 DNA 的提取。

1.2.2 缺失型 α -地贫基因检测 采用 gap-PCR 进行 3 种常见缺失型 α -地贫基因 ($-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)的检测,严格按照试剂盒说明书进行。采用深圳亚能生物技术有限公司生产的基因诊断试剂盒进行检测。

1.2.3 非缺失型 α -地贫点突变和 β -地贫点突变基因检测 采用反向斑点杂交法(RDB)检测 3 种 α -地贫基因点突变($\alpha^{\text{CS}}\alpha$ 、 $\alpha^{\text{WS}}\alpha$ 和 $\alpha^{\text{QS}}\alpha$)和 17 种 β -地贫基因点突变(-28,-29,-30,-32,CD14-15,CD17, βE 、CD27-28,CD31,CD41-42,CD43,CD71-72,IVS-I-1,IVS-I-5,IVS-II-654,CAP+1,initiation eodon),严格按照试剂盒说明书进行。采用深圳亚能生物技术有

限公司生产的基因诊断试剂盒进行检测。

1.2.4 HK $\alpha\alpha$ 和 anti-HK $\alpha\alpha$ 基因型分析 将同时出现正常条带 α_2 、右缺失($-\alpha^{3.7}$)或左缺失($-\alpha^{4.2}$)和东南亚缺失($-\text{SEA}$)的样本, $-\alpha^{3.7}$ 条带比 α_2 条带细弱的样本和 $-\alpha^{4.2}$ 条带比 α_2 条带细弱的样本送往深圳亚能生物技术有限公司,采用巢式 PCR 法进行 HK $\alpha\alpha$ 或 anti-HK $\alpha\alpha$ 基因型检测,检测结果结合常见 α -地贫基因检测结果及家系诊断结果综合分析、判断样本的基因型。

2 结果

2.1 缺失型 α -地贫基因诊断结果 在 36 031 例样本中出现 22 例阳性结果,其中 17 例 gap-PCR 电泳同时出现正常条带 α_2 、右缺失($-\alpha^{3.7}$)或左缺失($-\alpha^{4.2}$)和东南亚缺失($-\text{SEA}$),4 例 $-\alpha^{3.7}$ 条带比 α_2 条带细弱,1 例 $-\alpha^{4.2}$ 条带比 α_2 条带细弱。

2.2 巢式 PCR 基因检测结果 共检测到 20 例 HK $\alpha\alpha$ 和 2 例 anti-HK $\alpha\alpha$ 病例,其中 HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 4 例(含 1 例复合 IVS-II-654 杂合子),HK $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ 3 例, HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$ 13 例(含 1 例复合 CD41-42 杂合子),anti-HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 1 例,anti-HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$ 1 例。HK $\alpha\alpha$ 与 anti-HK $\alpha\alpha$ 检出率分别为 0.056%和 0.005%。

2.3 HK $\alpha\alpha$ 基因型中非缺失型 α -地贫及 β -地贫点突变基因诊断结果 20 例 HK $\alpha\alpha$ 病例中,检出 1 例 HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 同时复合 IVS-II-654 杂合子,1 例 HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$ 同时复合 IVS-II-654 杂合子,1 例 HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$ 同时复合 CD41-42 杂合子,见表 1。

表 1 22 例 HK $\alpha\alpha$ 和 anti-HK $\alpha\alpha$ 基因型地贫基因检测结果及血液学指标分析($\bar{x}\pm s$)

基因型		n	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA ₂ (%)
α	β					
HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{N}}/\beta^{\text{N}}$	3	114.3 \pm 23.4	87.1 \pm 5.6	27.9 \pm 1.4	2.6 \pm 0.1
HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{IVS-II-654}}/\beta^{\text{N}}$	1	95.0 \pm 0.0	66.9 \pm 0.0	20.7 \pm 0.0	4.6 \pm 0.0
HK $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$	$\beta^{\text{N}}/\beta^{\text{N}}$	3	106.0 \pm 9.9	88.2 \pm 7.3	28.2 \pm 2.4	2.4 \pm 0.1
HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$	$\beta^{\text{H1-42}}/\beta^{\text{N}}$	1	105.0 \pm 0.0	63.8 \pm 0.0	21.1 \pm 0.0	5.2 \pm 0.0
HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$	$\beta^{\text{IVS-II-654}}/\beta^{\text{N}}$	1	97.0 \pm 0.0	62.8 \pm 0.0	20.3 \pm 0.0	4.6 \pm 0.0
HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$	$\beta^{\text{N}}/\beta^{\text{N}}$	11	115.9 \pm 16.7	68.7 \pm 5.3	21.5 \pm 1.7	2.2 \pm 0.2
anti-HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$	$\beta^{\text{N}}/\beta^{\text{N}}$	1	135.0 \pm 0.0	79.1 \pm 0.0	25.7 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0
anti-HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^{\text{N}}/\beta^{\text{N}}$	1	162.0 \pm 0.0	89.6 \pm 0.0	29.4 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0

注:Hb 为血红蛋白;MCV 为平均红细胞体积;MCH 为平均红细胞血红蛋白量;HbA₂ 为血红蛋白 A₂。

表 2 2 个家系成员地贫基因检测结果及血液学指标分析

家系	受检者	性别	年龄	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA ₂ (%)	基因型
家系 1	母亲	女	32 岁	112	63.1	20.4	2.2	$\alpha\alpha/-\text{SEA}$
	父亲	男	31 岁	162	89.6	29.4	2.8	anti-HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$
	小孩	女	1 月龄	135	79.1	25.7	1.9	anti-HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$
家系 2	母亲	女	25 岁	110	81.8	26.3	2.7	HK $\alpha\alpha/\alpha\alpha$
	父亲	男	26 岁	137	69.4	21.9	2.1	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$
	胎儿	—	—	—	—	—	—	HK $\alpha\alpha/-\text{SEA}$

注:Hb 为血红蛋白;MCV 为平均红细胞体积;MCH 为平均红细胞血红蛋白量;HbA₂ 为血红蛋白 A₂;—为无数据。

2.4 家系结果 本研究对 2 个家系进行了分析,其中家系 2 进行了产前诊断。家系 2 中母亲的地贫基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$,父亲的地贫基因型为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$,胎儿缺失型 α -地贫检测发现 gap-PCR 电泳同时出现正常条带 α_2 、右缺失($-\alpha^{3.7}$)和东南亚缺失($-\text{SEA}$)3 个条带,怀疑为 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$,遂将母亲及胎儿的样本送往深圳亚能生物技术有限公司,采用巢式 PCR 法进行 $\text{HK}\alpha\alpha$ 基因检测,经检测分析,母亲基因型纠正为 $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$,胎儿基因型为 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 。经过遗传咨询,夫妇选择继续妊娠。见表 2。

3 讨论

α -地贫是我国南方各省地贫基因携带率最高、影响最大的遗传病,广东省育龄人群 α -地贫基因的携带率达 13%^[3]。 $-\alpha^{3.7}/$ 和 $-\alpha^{4.2}/$ 主要是由于 α 珠蛋白基因簇同源序列不等交换的结果,一条 16 号染色体缺失了 3.7 kb($-\alpha^{3.7}/$)或 4.2 kb($-\alpha^{4.2}/$),另一条染色体则形成 α 三联体($\alpha\alpha\alpha\text{anti}3.7/$)或 α 三联体($\alpha\alpha\alpha\text{anti}4.2/$)^[4]。 $\text{HK}\alpha\alpha$ 和 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 基因型是罕见的 α -地贫基因型。 $\text{HK}\alpha\alpha$ 是同时含有 $-\alpha^{3.7}$ 缺失和 $\alpha\alpha\alpha\text{anti}4.2$ 重复的交叉连接片段, $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 则是同时含有 $-\alpha^{4.2}$ 缺失和 $\alpha\alpha\alpha\text{anti}3.7$ 重复的交叉连接片段。WANG 等^[2]于 2005 年在中国香港鉴定并以“香港”(HK)命名了 $\text{HK}\alpha\alpha$ 基因型。SHANG 等^[5]报道了广西地区 $\text{HK}\alpha\alpha$ 和 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 基因型携带率分别为 0.07%和 0.02%。在本研究中,从茂名地区 36 031 例可疑地贫病例筛查中,共检测到 20 例 $\text{HK}\alpha\alpha$ 和 2 例 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 病例,携带率分别为 0.056%和 0.005%,该结果与广西地区报道相近。

我国目前以 gap-PCR 技术检测常见缺失型 α -地贫($-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$)^[6],但该技术不能检测 $\alpha\alpha\alpha\text{anti}4.2$ 和 $\alpha\alpha\alpha\text{anti}3.7$ 片段,导致 $\text{HK}\alpha\alpha$ 和 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 被误诊为 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$,造成漏诊、误诊^[7]。在本研究中,4 例 gap-PCR 电泳结果显示 $-\alpha^{3.7}$ 条带比 α_2 条带细弱,经巢式 PCR 确定为 $\text{HK}\alpha\alpha$,1 例 gap-PCR 电泳结果显示为 $-\alpha^{4.2}$ 条带比 α_2 条带细弱,经巢式 PCR 确定为 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 。因此,对 gap-PCR 电泳结果显示为 $-\alpha^{3.7}$ 或 $-\alpha^{4.2}$ 条带细弱而 α_2 条带浓粗的病例,要考虑为罕见的 α -地贫基因型的可能,进一步采用巢式 PCR 法进行检测,这样可以减少不必要的有创性产前诊断。

目前的研究发现, $\text{HK}\alpha\alpha$ 和 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 基因型都可表达两个正常的 α -珠蛋白基因功能,具有正常的临床及血液学表现^[8]。当夫妇双方之一携带 $\text{HK}\alpha\alpha$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 基因型,而另一方携带 α_0 -地贫基因时,他们就有 1/4 的机会生育 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 的孩子。当 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 被误诊为 Hb H 病($-\alpha^{3.7}/--\text{SEA}$ 或 $-\alpha^{4.2}/--\text{SEA}$)时^[9],会导致医生在产前诊断、遗传咨询中给出错误的建议,给夫妇双方造成较大的精神压力。在本研究家系 2 中,因母亲的地贫基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$,父亲的地贫基因型为

$-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 而进行产前诊断,胎儿缺失型 α -地贫检测发现 gap-PCR 电泳同时出现 2.0 kb、1.7 kb 和 1.2 kb 的 3 个条带。胎儿检测的基因型结果与遗传规律可能不一致,无法做出准确的判断。进一步检测,母亲基因型为 $\text{HK}\alpha\alpha/\alpha\alpha$,胎儿基因型为 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$,经过遗传咨询,夫妻选择继续妊娠,胎儿出生后表现为标准型 α -地贫。因此,当 gap-PCR 电泳同时出现 α_2 、 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ 和 $-\text{SEA}$ 3 个条带时,要高度怀疑为 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$,进一步使用巢式 PCR 法确认,避免将 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 误诊为 Hb H 病。

综上所述,巢式 PCR 法是确诊 $\text{HK}\alpha\alpha$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 基因型的重要方法^[10]。 $\text{HK}\alpha\alpha$ 或 $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ 基因型地贫的准确诊断对罕见 α -地贫基因的筛查和产前遗传咨询具有非常重要的意义,避免了不必要的创伤性产前诊断。

参考文献

- [1] 杜丽,王继成,秦丹卿,等. $\text{HK}\alpha\alpha$ 地中海贫血的基因诊断及临床表型分析[J/CD]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2017,9(3):20-22.
- [2] WANG W, CHAN A Y, CHAN L C, et al. Unusual rearrangement of the α -Globin gene cluster containing both the $-\alpha^{3.7}$ and $\alpha\alpha\alpha\text{anti}4.2$ crossover junctions: clinical diagnostic implications and possible mechanisms[J]. Clin Chem, 2005, 51(11): 2167-2170.
- [3] 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.
- [4] 徐湘民,张新华,陈荔丽. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社,2011:16-17.
- [5] SHANG X, LI Q, CAI R, et al. Molecular characterization and clinical presentation of $\text{HK}\alpha\alpha$ and $\text{anti-HK}\alpha\alpha$ alleles in southern Chinese subjects[J]. Clin Genet, 2013, 83(5): 472-476.
- [6] 刘胡捷,孙鸣,黄宇,等. 闽南地区罕见 α 地中海贫血基因型分析[J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 13(6): 311-316.
- [7] 张敏,黄海龙,陈梅环,等. 福建人群香港型地中海贫血的基因变异检测[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(4): 297-300.
- [8] 姚亚超,李磊,李泽泳,等. HK 型 α 珠蛋白生成障碍基因诊断及家系分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(12): 1672-1675.
- [9] 钟良英,汪芳,陈培松,等. $\text{HK}\alpha\alpha$ 合并东南亚型缺失地中海贫血的基因型与血液学分析[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(2): 117-121.
- [10] 李玉珠,史敦云,高素青,等. α 地中海贫血 $\text{HK}\alpha\alpha/--\text{SEA}$ 基因型家系分析[J]. 国际遗传学杂志, 2016, 39(3): 133-137.