·现场调查·

广西三城市7岁以下儿童β地中海贫血发生率及其基因突变类型的研究

仇小强 陈萍 张凝 曾小云 黄才千 陈文强 林伟雄 李树全

【摘要】 **目的** 对广西南宁、柳州、百色地区7岁以下儿童进行β地中海贫血发生率及基因突变类型分析。**方法** 按分层整群随机抽样方法，抽取南宁、柳州和百色地区7岁以下儿童共2261名，进行血常规检测、血红蛋白(Hb)分析和β珠蛋白基因分析。**结果** 2261名儿童中，Hb分析显示125名HbA_2升高，经基因分析诊断为β地中海贫血杂合子。β地中海贫血的发生率为5.53%。共检出CD41-42基因突变59例，CD17基因突变33例，TATA box nt-28基因突变18例，IVS-Ⅱ-654基因突变7例，CD43基因突变3例，HbE基因突变3例，CD71-72基因突变1例，及TATAbox nt-29基因突变1例。基因型频率依次为：CD41-42为47.20%、CD17为26.40%、TATAbox nt-28为14.40%、IVS-Ⅱ-654为5.60%、CD43为2.40%、HbE为2.40%、CD71-72为0.80%和TATAbox nt-29为0.80%。**结论** 研究显示调查的3个地区地中海贫血发生率较高；7岁以下儿童中存在β地中海贫血基因突变携带者。

【关键词】 β地中海贫血；基因型；发生率；儿童

Study on the incidence of β-Thalassemia and genotypes among children under 7 year-olds in Nanning, Liuzhou and Baise areas, Guangxi province *QIU Xiao-qiang, CHEN Ping, ZHANG Ning, ZENG Xiao-yun, HUANG Cai-qian, CHEN Wen-qiang, LIN Wei-xiong, LI Shu-quan. Department of Epidemiology, College of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning* 530021, China

【**Abstract**】 **Objective** To conduct research of β-Thalassemia incidence and genotypes on children below 7 years of age in Nanning, Liuzhou and Baise areas, Guangxi province. **Methods** A total of 2261 children aged below 7 in Nanning, Liuzhou and Baise areas were studied. Venous blood was detected by routine blood test, hemoglobin analysis and β-Thalassemia genotyping. **Results** Among 2261 samples, 125 showed high level of HbA_2 and were diagnosed as β-Thalassemia (5.53%). Genotypes of the patients were classified as: 59 cases with β-globin gene condon(CD) 41-42 mutation, 33 cases CD17 mutation, 18 cases with TA TA box nt-28 mutation, 7 with IVS-Ⅱ-654 mutation, 3 with CD43 mutation, 3 with HbE mutation, one with CD71-72 and TATA box nt-29 mutation, respectively. The genotyping frequencies of β-Thalassemia were as follows: 47.20% for CD41-42 mutation, 26.40% for CD17 mutation, 14.40% for TATAbox nt-28 mutation, 5.60% for IVS-Ⅱ-654 mutation, 2.40% for CD43 mutation, 2.40% for HbE mutation, 0.80% for CD71-72 mutation and TATAbox nt-29 mutation respectively. **Conclusion** This study on children in the area with high incidence of β-Thalassemia reflected the incidence and characteristics of genotypes in this area. Our data also provided evidence for the development of a program on genetic counseling and prevention for thalassemia.

【**Key words**】 β-Thalassemia; Genotypes; Incidence rate; Children

地中海贫血是遗传性溶血性疾病，以α和β地中海贫血最为常见。其基因携带者无临床症状，生长发育正常，很难被发现，但如果夫妇均携带地中海贫血基因，则可能生育重型地中海贫血患儿。因此，在地中海贫血高发区进行筛查、遗传咨询及基因诊断等，是预防地中海贫血患儿出生的惟一有效途径。广西是地中海贫血的高发区[1]。本研究对广西部分城乡地区7岁以下儿童进行了地中海贫血发生率和基因型调查。

对象与方法

1. 研究对象：按分层整群随机抽样方法，于

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.010.009
基金项目：广西壮族自治区科技厅科学研究与技术开发计划(桂科能05112001-4E)
作者单位：530021 南宁，广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室(仇小强、曾小云、黄才千)，儿科血红蛋白研究室(陈萍、张凝、陈文强、林伟雄、李树全)

2006年7月至2007年1月在南宁、柳州、百色地区3个城市中随机抽取3个或4个城区，在每个城区随机抽取1所幼儿园，对所抽到幼儿园的全部儿童进行调查，共抽取2261名3～6.5岁儿童为研究对象。对选取儿童的家庭进行问卷调查，包括年龄、性别、民族等。并抽取静脉血样本2 ml抗凝做血常规及血红蛋白(Hb)分析、基因型分析等检测。本研究经医院伦理委员会同意，所有受试者父母均知情同意。

2. 检测分析：样本血常规检测用血细胞自动分析仪(ACT 5DF，美国Beckman公司)。血红蛋白电泳：血红蛋白液20 μl加样于醋酸纤维薄膜条，置pH值8.0的缓冲液电泳40 min，丽春红染色。高效液相色谱法(HPLC)：用血红蛋白自动分析仪检测HbA、HbF、HbA_2等(Hb Variatan，Bio-Rad公司)。正常值：HbA_2 2.3%～3.5%，HbF 0%～3.5%。如Hb A_2升高(3.5%～6%)，诊断为轻型β地中海贫血(携带者)；如HbF升高(40%～90%)，诊断为中间型或重型β地中海贫血。

3. β地中海贫血基因型分析：DNA提取采用酚-氯仿抽提法从外周血白细胞中提取DNA。荧光PCR方法检测β地中海贫血基因型，对经血红蛋白分析诊断为轻型β地中海贫血的125例进行基因分析。设计系列引物，以Carboxy fluorescein(FAM)和Hexachloro fluorescein(HEX)标记，显蓝色荧光或绿色荧光，分别检测CD41-42(-TTCT)、CD17(A→T)、TATAbox nt-28 (A→G)、TATAbox nt-29 (A→G)、IVS-Ⅱ-654 (C→T)、CD43 (G→T)、CD71-72 (+A)和HbE(G→A)正常和突变基因。引物由上海生物工程有限公司合成。引物序列及扩增片段长度见表1。

PCR反应：每份样本分别用正常和突变引物扩增。PCR体系含10×PCR缓冲液，2 mmol/L dNTPs，15 pmol各引物及DNA 2～5 μl。PCR反应条件：96℃预变性5 min，然后94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，共35次循环。反应在多通道PCR仪(PTC-220，美国MJ公司)上进行。PCR扩增产物稀释后，以Gene Scan™ 500 ROX™ Size standard(美国ABI Prism)标记，在DNA全自动测序仪(美国ABI Prism 3100)上进行毛细管电泳，用Genescan 3.7软件(美国ABI Prism 3100)分析，读出PCR扩增产物特定的荧光信号和片段，检测β珠蛋白基因型。

4. 统计学分析：用SPSS 13.0软件分析血常规检测各参数及血红蛋白分析数据。

结　果

1. 一般资料：对象为3～6.5岁的儿童2261名，包括951名汉族，1159名壮族，27名瑶族，6名苗族及118名其他少数民族。

2. 血红蛋白分析：2261名儿童的血红蛋白分析结果显示有125例HbA_2升高，其HbA_2的$\bar{x}\pm s$结果为(5.16 ± 0.97)%，HbF的$\bar{x}\pm s$结果为(2.63 ± 2.03)%。这125例均诊断为轻型β地中海贫血(即β地中海贫血携带者)。2261名儿童中未检出中间型或重型β地中海贫血患者。

3. 血常规检测：125例轻型β地中海贫血血常规检测显示，男女性儿童红细胞各参数(RBC、Hb、HCT、MCV、MCH、MCHC)的($\bar{x}\pm s$)值均低于正常参考值，以MCV下降最为显著(表2)。

4. 荧光PCR方法检测：125例轻型β地中海贫血均扩增出相应的正常和突变基因，显示为β地中海贫

表1　荧光PCR引物

引物	5′～3′序列	扩增片段长度(bp)
CD41-42 M	GACTCTCTCTgCCTATTggT	CD41-42M+D:184
CD41-42 N	GACTCTCTCTgCCTATTggT	CD41-42N+D:188
D	GGTTGTCCAGGTGAGCCA	
CD17 M-F	GCCGTTACTGCCCTGTGGGGCT	CD17M-F+17R:171
CD17 N-F	GCCGTTACTGCCCTGTGGGGCA	CD17N-F+17R:171
17R	ACC AAT AGG CAG AGA GAG TC	
nt-28 M	GAGCCAGGGCTGGGCATAG	nt-28(-29)M+17R:296
nt-28 N	GAGCCAGGGCTGGGCATAA	nt-28(-29)N+17R:296
nt-29 M	AGCCAGGGCTGGGCATAAG	
nt-29 N	AGCCAGGGCTGGGCATAAA	
17R	ACCAATAGGCAGAGAGAGTC	
CD43 M	TACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTT	CD43M-F+D:135
CD43 N	TACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTG	CD43N-F+D:135
D	GGTTGTCCAGGTGAGCCA	
CD71-72 M	gAAAgTgCTCggTgCCTTTAA	CD71-72M+D:92
CD71-72 N	gAAAgTgCTCggTgCCTTTA	CD71-72N+D:92
D	GGTTGTCCAGGTGAGCCA	
IVS-Ⅱ-654 M	TGATAATTTCTGGGTTAAGGT	IVS-Ⅱ-654M+CD:243
IVS-Ⅱ-654 N	TGATAATTTCTGGGTTAAGGC	IVS-Ⅱ-654N+CD:243
CD	AGCACACAGACCAGCACGTTGCC	
HbE M	AACgTggATgAAgTTggTggTA	HbEM+17R:145
HbE N	AACgTggATgAAgTTggTggTg	HbEN+17R:145
17R	ACCAATAGGCAGAGAGAGTC	

血的杂合子。

表2 125例轻型β地中海贫血血常规检测结果($\bar{x}\pm s$)

指标	男性(n=70)	女性(n=55)	正常参考值
RBC($\times10^{12}$/L)	5.62±0.74	5.64±0.73	4.0~5.5
Hb(g/L)	114.41±12.57	114.32±9.69	120~160
HCT(%)	0.35±0.04	0.35±0.04	0.4~0.5
MCV(fl)	64.08±10.76	61.85±9.25	82~95
MCH(pg)	21.46±4.36	20.83±3.62	27~31
MCHC(g/L)	328.95±34.69	327.70±35.67	320~360

5. 各基因型分布情况：125例β地中海贫血杂合子共检出β珠蛋白基因CD41-42、CD17、TATAbox nt-28、TATAbox nt-29、IVS-Ⅱ-654、CD43、CD71-72、HbE等8种β地中海贫血基因突变类型。其中，CD41-42突变59例占47.20%，CD17突变33例占26.40%，TATAbox nt-28突变18例占14.40%，IVS-Ⅱ-654突变7例占5.60%，CD43突变3例占2.40%，HbE突变3例占2.40%，CD71-72和TATAbox nt-29突变各1例，各占0.80%。β地中海贫血基因型以CD41-42、CD17、TATAbox nt-28和IVS-Ⅱ-654为主。检出汉族儿童β地中海贫血杂合子基因型：CD41-42、CD17、TATAbox nt-28、IVS-Ⅱ-654、CD43和TATAbox nt-29；检出壮族儿童β地中海贫血杂合子基因型：CD41-42、CD17、TATAbox nt-28、IVS-Ⅱ-654、CD43和CD71-72(表3)。

表3 125例β地中海贫血基因突变例数及基因突变频率

基因类型	汉族	壮族	其他少数民族	合计	基因频率(%)
CD41-42	17	31	11	59	47.20
CD17	10	21	2	33	26.40
TATAbox nt-28	3	6	9	18	14.40
IVS-Ⅱ-654	3	4	0	7	5.60
CD43	1	2	0	3	2.40
HbE	0	0	3	3	2.40
CD71-72	0	1	0	1	0.80
TATAbox nt-29	1	0	0	1	0.80
合计	35	65	25	125	100.00

6. 汉族、壮族β地中海贫血的发生率及基因型：2261名儿童中，仅统计研究对象中占主体的汉、壮族儿童人群的发生率及基因型。汉族儿童β地中海贫血携带者的发生率为3.68%，壮族儿童的发生率为5.52%，经χ^2检验，两个民族β地中海贫血的发生率差异有统计学意义，壮族儿童发生率高(表4)。瑶族、苗族及其他少数民族儿童人数及β地中海贫血的例数较少(未做统计)。

7. β地中海贫血携带者发生率地区分布：南宁市武鸣地区共检出β地中海贫血31例，柳州地区检出53例，百色地区检出41例。其β地中海贫血携带者的发生率依次为5.85%、5.48%、5.37%，经χ^2检验，3个城市β地中海贫血的发生率差异无统计学意义。3个城市的民族分布差异无统计学意义(结果未列出)。

表4 汉族、壮族β地中海贫血的发生率比较

民族	阳性例数	阴性人数	合计	发生率(%)
汉族	35	916	951	3.68
壮族	64	1095	1159	5.52
合计	99	2011	2110	4.69

注：χ^2=3.96，P=0.046

讨 论

不同国家间地中海贫血存在差异，西亚地区土耳其成年人β地中海贫血携带者的发生率为2.1%[2]；地中海沿岸的西西里岛为6.0%[3]。我国β地中海贫血高发地区携带者的发生率也各有差异。广东地区成年人β地中海贫血携带者的发生率3.36%[4]，海南地区为5.32%[5]，台湾地区为1.21%[6]，香港地区为3.4%[7]。广西地区为5.0%[1]。儿童β地中海贫血报道显示，巴勒斯坦西岸儿童发生率为3.5%[8]，南斯拉夫儿童发生率为1.2%[9]。国内广州地区儿童发生率为11.26%[10]。

但多项研究显示，同一地区成年人与儿童β地中海贫血发生率的不同，这与调查的特定对象的数量和地区有关[1,10]；仅能说明调查局部地区的β地中海贫血发生率。本研究显示，3个地区7岁以下儿童β地中海贫血携带者的发生率为5.53%，与广西地区的报道相似。3个地区相比较，南宁武鸣地区的β地中海贫血携带者发生率最高，为5.85%。其中汉族儿童发生率为3.68%，壮族儿童发生率为5.52%，经χ^2检验，两个民族β地中海贫血的发生率差异有统计学意义；壮族儿童的发生率高可能与研究对象中壮族人群占主体有关。既往的研究报道亦显示，广西地区壮族人群β地中海贫血携带者发生率高于汉族人群[11]。

国外研究显示，β地中海贫血高发地区的主要基因型有地域特点，如西西里岛的主要基因型有CD39、IVS-Ⅰ-110和IVS-Ⅰ-6[12]。希腊4种常见类型为IVS-Ⅰ-110、CD39、IVS-Ⅰ-1和IVS-Ⅰ-6[13]。西亚地区土耳其常见类型为IVS-Ⅰ-110、IVS-Ⅰ-6和CD8[2]。泰国北部以CD41-42、CD17、IVS-Ⅰ-1、CD71/72常见，中南部以IVS-Ⅰ-5、IVS-Ⅱ-654常见[14]。与我国报道主要6种β地中海贫血突变基因

非常相似[15]；CD41-42基因突变在广东、广西、台湾、四川、海南省占首位[16]；IVS-Ⅱ-654基因突变在香港占首位；而在广东、台湾、四川、海南等位居CD41-42突变之后。CD17基因突变在广西仅次于CD41-42突变。TATAbox nt-28突变在以上几省中亦较常见。广西地区β地中海贫血主要基因型以CD41-42、CD17、TATAbox nt-28为主，是南方β地中海贫血高发地区报道中的常见类型[15]。

本研究125例β地中海贫血杂合子基因型及基因频率依次为：CD41-42（47.20%）、CD17（26.40%）、TATAbox nt-28（14.40%）、IVS-Ⅱ-654（5.60%）、CD43（2.40%）、HbE（2.40%）、CD71-72（0.80%）及TATAbox nt-29（0.80%）。在3个地区中，汉、壮两个民族儿童群体中β地中海贫血杂合子的基因突变类型基本相同，均以CD41-42、CD17、TATAbox nt-28为主，此研究结果与既往文献报道相似[15,17]。

参考文献

[1] 全国血红蛋白病研究协作组. 20省、市、自治区60万人血红蛋白病调查. 中华医学杂志，1983，63(6)：382-385.

[2] Basak AN. The molecular pathology of beta-thalassemia in Turkey: the Bogazici university experience. Hemoglobin, 2007, 31(2): 233-241.

[3] Chamayou S, Guglielmino A, Giambona A, et al. Attitude of potential users in Sicily towards preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassaemia and aneuploidies. Hum Reprod, 1998, 13(7): 1936-1944.

[4] 陆国辉. 产前遗传学诊断. 广州：广东科技出版社，2002：373-376.

[5] 区采莹，蒙晶，杨健，等. 海南地区β地中海贫血基因突变类型的研究. 中国优生与遗传杂志，2002，10(6)：17-18.

[6] Chern JP, Lin KH, Su YN, et al. Impact of a national beta-thalassemia carrier screening program on the birth rate of thalassemia major. Pediatr Blood Cancer, 2006, 46(1): 72-76.

[7] 张俊武，龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病. 南宁：广西科学技术出版社，2003：156.

[8] Darwish HM, El-Khatib FF, Ayesh S. Spectrum of beta-globin gene mutations among thalassemia patients in the West Bank region of Palestine. Hemoglobin, 2005, 29(2): 119-132.

[9] Efremov GD. Hemoglobinopathies in Yugoslavia: an update. Hemoglobin, 1992, 16(6): 531-544.

[10] 黄钰君，区小冰，张力，等. 广州地区儿童β地中海贫血的发生率及基因检测结果分析. 中国优生与遗传杂志，2007，15(6)：355-361.

[11] 何印蕾，覃志坚，农乐根，等. 百色地区壮族及汉族β地中海贫血患者CR1基因组密度多态性研究. 广东医学，2007，28(1)：68-69.

[12] Di Marzo R, Dowling CE, Wong C, et al. The spectrum of beta-thalassemia mutations in Sicily. Br J Haematol, 1988, 69(3): 93-97.

[13] Kakavas KV, Noulas A, Chalkias C, et al. Identification of the four most common beta-globin gene mutations in Greek beta-thalassemia patients and carriers by PCR-SSCP: advantages and limitations of the method. J Clin Lab Anal, 2006, 20(1): 1-7.

[14] Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermsri T. Analysis of beta-thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. Hemoglobin, 2003, 27(2): 89-95.

[15] 曾溢滔. 人类血红蛋白. 北京：科学出版社，2002：122，163-164.

[16] 饶兆英，周红平，曾毓华，等. 江西地区β地中海贫血基因突变类型的分析. 中国优生与遗传杂志，2002，10(3)：20-21.

[17] 谢丹尼，黄莉，曾桂春，等. 广西部分地区地中海贫血的筛查与监测网的建立. 中国优生与遗传杂志，2002，10(4)：112-113.

（收稿日期：2009-02-10）

（本文编辑：尹廉）