

· 现场调查 ·

广西南宁市农村育龄人群地中海贫血筛查及基因型和血液学参数分析

张新华 周英杰 李平萍 罗瑞贵 阮丽明 王荣新 吴志奎 李敏 黄有文

【摘要】 目的 调查南宁市农村育龄人群地中海贫血(地贫)基因携带率和基因型,分析地贫血液学参数变化特点。方法 以血红蛋白(Hb)自动分析仪-VARIANT(HPLC)和 Cell Dyn 1700 全自动血细胞分析仪检测育龄青年 2044 例,其中 430 例(地贫筛查中随机选择的 75 对夫妇以及血细胞分析提示夫妇双方或一方为地贫表型阳性的育龄夫妇 140 对)同步进行地贫基因分析。结果 检出 β 地贫 163 例, β 地贫基因携带率 7.97%,检出 HbH 病 13 例,Hb Manitoba 2 例,HbJ 2 例,HbQ 1 例。 α 地贫 2 基因型以 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{CS}/\alpha\alpha$ 和 $-\alpha^{WS}/\alpha\alpha$ 居多, α 地贫 1 以 $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 为主, β 地贫杂合子以 41-42 为主, α 、 β 复合型地贫有较高的检出率。所有 HbH 病和 β 地贫平均红细胞体积(MCV)和平均红细胞 Hb 含量(MCH)均降低,86 例 α 地贫 1 中除 1 例 MCH 正常外均降低,而 66 例 α 地贫 2 中 17 例 MCV 和 MCH 均正常,69 例 β 地贫杂合子中有 32 例 HbF 增高,但没有一例只有 HbF 增高而 HbA₂ 不增高, α 、 β 复合型地贫主要呈现 β 地贫血液学特点。结论 南宁市农村育龄人群地贫基因携带率高, $-\alpha^{WS}/\alpha\alpha$ 和 $-\alpha^{CS}/\alpha\alpha$ 基因型 α 地贫 2 较多,高发区 MCV 和 MCH 降低应疑为地贫。

【关键词】 地中海贫血;平均红细胞体积;平均红细胞血红蛋白含量;基因型

Study on the screening program of thalassemia and the genotype and hematologic parameter among people of productive age in a village, Nanning Guangxi ZHANG Xin-hua^{*}, ZHOU Ying-jie, LI Ping-ping, LUO Rui-gui, RUAN Li-ming, WANG Rong-xin, WU Zhi-kui, LI Min, HUANG You-wen.
^{*}Department of Hematology, The 303 Hospital of People's Liberation Army, Nanning 530021, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the carrier ratio and the genotype of thalassemia in the rural people of reproductive age in Nanning, and to analyze the characteristics of hematologic parameter in thalassemia carriers. **Methods** 2044 cases of productive age youths were detected with hemoglobin autoanalyse-Variant (HPLC) and Cell Dyn 1700 automatic hemocyte analysator. Among them, 430 cases (75 couples randomly selected in thalassemia screening, 140 couples who were told that one or both of them were positive for thalassemia phenotype through hemocyte analysis) carried out thalassemia gene detection in synchronism. **Results** 163 cases were detected β -thalassemia and the thus β -thalassemia carrier ratio was 7.97%. 13 cases were detected HbH disease, and 2 cases Hb Manitoba, 2 cases HbJ, and 1 case HbQ. As for genotypes, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{CS}/\alpha\alpha$ and $-\alpha^{WS}/\alpha\alpha$ were common ones with in α -thalassemia-2, $--^{SEA}/\alpha\alpha$ the most common one in α -thalassemia-1, and 41-42 were the most common ones in β -thalassemia heterozygotes. The detection ratio of α , β combination thalassemia was also relatively high. Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) were low in all cases of HbH disease and β -thalassemia, also low in 86 cases of α -thalassemia-1 with the exception of normal MCH in 1 case, yet normal in 17 cases out of 66 cases of α -thalassemia-2. HbF raised in 32 cases out of 69 cases of β -thalassemia heterozygote, no case showed raised HbF without the raise of HbA₂. Hematologic characteristic of α , β combination thalassemia was mainly caused by β -thalassemia. **Conclusion** Carrier ratio of thalassemia in rural productive age youths in Nanning was high while α -thalassemia-2 with the genotype $-\alpha^{WS}/\alpha\alpha$ and $-\alpha^{CS}/\alpha\alpha$ were common. To those with low MCV and MCH in high-risk region, thalassemia should be suspected.

【Key words】 Thalassemia; Mean corpuscular volume; Mean corpuscular hemoglobin; Genotype

基金项目:国家自然科学基金资助项目(90409003);广西壮族自治区自然科学基金资助项目(0447104)

作者单位:530021 南宁,解放军第三〇三医院血液科(张新华、李平萍、罗瑞贵、王荣新、黄有文);南宁市计划生育服务中心(周英杰、阮丽明);中国中医科学院广安门医院分子生物学研究室(吴志奎、李敏)

地中海贫血(地贫)是广西地区发病率最高、危害最大的遗传病,该病目前尚无确切有效的治疗方法,给家庭和社会带来沉重的负担,2005 年南宁市政府出资为农村育龄夫妇做地贫筛查,并由计划生育部门对筛查出的双方均为地贫的夫妇进行全程跟踪指导,直到通过产前诊断确认并顺利分娩出健康胎儿,最大限度避免重型和中间型地贫儿出生。为提高筛查的准确性并为以后的工作提供参考,以血红蛋白(Hb)自动分析仪-VARIANT(高效液相色谱法,HPLC)和 Cell Dyn 1700 全自动血细胞分析仪检测 2044 例,同时对地贫筛查中随机选择的 75 对以及血细胞分析提示夫妇双方或一方(另一方已确认为 β 地贫或 HbH 病)为地贫表型阳性的 140 对夫妇进行地贫基因分析,结果报告如下。

对象与方法

1. 对象:南宁市邕宁、青秀、江南、良庆 4 区及所辖横县、武鸣、宾阳、上林和隆安 5 县农村育龄夫妇 1022 对(所有参与检测的夫妇均由南宁市人口与计生委统一布署,根据各县区人口统一分配和安排),年龄 25~46 岁,其中壮族 1654 人,汉族 378 人,瑶族 12 人;广西籍 2042 人,广东籍 2 人。

2. 方法:

(1)基本策略:当地有关机构组织受检育龄夫妇到当地卫生部门,现场详细登记并抽取静脉血 4 ml,以 EDTA 抗凝,进行血细胞分析、HbF 和 HbA₂ 检测,发现异常波型标本再进行 Hb 电泳并对异常区带进行定量,可疑 HbCS 波型标本进行联苯胺染色确认,随机选择的 75 对夫妇(2005 年 6 月 2 日检测的 100 对中的单数对夫妇及 6 月 10 日检测的 50 对中的双数对夫妇,应选夫妇若有明确诊断的慢性疾病者改为后一双数或单数对夫妇)及夫妇双方或一方血细胞分析显示为地贫表型阳性[平均红细胞体积(MCV) < 79 fl 和/或平均红细胞 Hb 含量(MCH) < 27 pg]的标本另进行缺失型 α 地贫基因、非缺失型 α 地贫基因和 β 地贫基因分析^[1]。

(2)血液学指标检测:采用美国产 Cell Dyn 1700 全自动血细胞分析仪进行血细胞分析。以美国 BIO-RAD 公司生产的 Hb 自动分析仪-VARIANT(β Thalassamia Short Program)及专用试剂,按操作说明直接用抗凝血加溶血素混合后测定,直接打出检测结果。以地贫基因分析确定的健康人和 β 地贫杂合子检测结果绘制受试者工作曲线(receiver operating

characteristics, ROC)确定诊断 β 地贫 HbA₂ 截断值, Hb 电泳采用法国 Sebia 全自动电泳仪及配套扫描系统按说明书操作。地贫基因分析阳性标本每批抽样送上海英峻生物技术有限公司测序确认。

(3)地贫基因分析:3 种常见缺失型 α 地贫基因(-α^{3.7}/,-α^{4.2}/,-α^{SEA}/)分析采用 Gap-PCR 技术,5 种非缺失型 α 地贫基因[Hb Constant Spring(HbCS)、Hb Quong Sze(HbQS)、Hb Westmead(HbWS)、αα^{CD30}、αα^{CD59}]和 17 种 β 地贫基因(41-42、71-72、17、-28、β^E、IVS- II -654、IVS- I -1、IVS- I -5、43、31、27/28、-32、-29、30、14-15、CAP、Int)分析采用反向斑点杂交技术,由深圳益生堂生物企业有限公司使用该公司生产的全血基因组提取试剂盒和基因诊断试剂盒分 4 批进行检测^[2,3],HbWS 阳性标本均送上海英峻生物技术有限公司测序确认。

(4)诊断标准:按《血液病诊断及疗效标准》重型和中间型 β 地贫临床诊断主要根据 HbF 和 Hb 来确定^[4],轻型和静止型基因携带者主要根据 HbA₂ 和 HbF 来确定,以 430 例地贫基因分析确定的健康人[男女组间 HbA₂ 数据方差齐($F = 2.928, P = 0.089 > 0.05$),差异无统计学意义($t = 0.983, P = 0.327 > 0.05$)]和 β 地贫杂合子检测结果绘制 ROC 确定诊断 β 地贫 HbA₂ 截断值为 ≥ 4.35% (BID-RAD 公司推荐使用的截断值为 > 4%),HbF 截断值为 ≥ 1.05% (HbF 只作为诊断参考)。中间型 α 地贫(HbH 病)和其他异常血红蛋白病主要根据 HPLC 中的异常波型和出峰时间以及 Hb 电泳区带确定,α 地贫 1 和 α 地贫 2 在本筛查检测项目中无法诊断,MCV 和/或 MCH 低于正常者为可疑 α 地贫,另行地贫基因分析。

3. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件对实验数据进行分析,性别间差异进行两样本间 *t* 检验。

结 果

1. 地贫检出率:在 2044 名育龄青年中检出轻型 β 地贫和静止型 β 地贫基因携带者 163 例(含 HbE 7 例),β 地贫基因携带率为 7.97%。检出 HbH 病 13 例, Hb Manitoba 2 例, HbJ 2 例, HbQ 1 例,检出率分别为 0.64%、0.098%、0.098% 和 0.049%。随机选择的 75 对夫妇经地贫基因分析检出 β 地贫杂合子 13 例,检出率为 8.67%; α 地贫 2 15 例, α 地贫 1 10 例, HbH 病 1 例, α 地贫检出率为 17.33%。

2. 地贫基因分析:430 例基因分析未发现常见 3

种 α 地贫基因缺失和 5 种 α 地贫基因突变及 17 种 β 地贫基因突变、Hb 量正常的健康成年人 173 例,未发现上述 3 类基因异常的不明原因贫血 9 例; α 地贫 2 66 例, α 地贫 2 复合 β 地贫杂合子 9 例, α 地贫 1 有 86 例, α 地贫 1 复合 β 地贫杂合子 9 例, α 地贫 1 复合 β 地贫双重杂合子 1 例,HbH 病 8 例, β 地贫杂合子 69 例(含 HbE 4 例)。 α 地贫 2 基因型以 $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$ 和 $\alpha^{WS}/\alpha\alpha$ 居多, α 地贫 1 以 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 为主, β 地贫杂合子以 41-42 居多, α 地贫复合 β 地贫有较高的检出率。地贫基因型及分布特点见表 1。

表1 南宁市农村育龄人群 229 例 α 和 β 地贫基因型及分布特点

基因型	例数	构成(%)
α 地贫 2	66	
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	27	40.9
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	5	7.6
$-\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	22	33.3
$-\alpha^{QS}/\alpha\alpha$	2	3.0
$-\alpha^{WS}/\alpha\alpha$	10	15.2
α 地贫 1	86	
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	5	5.8
$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	1	1.2
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1	1.2
$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	79	91.8
HbH 病	8	
$-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$	3	37.5
$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$	3	37.5
$-\text{SEA}/-\alpha^{WS}$	2	25.0
β 地贫杂合子	69	
43	2	2.9
IVS- I -1	3	4.3
IVS- II -654	4	5.8
β^E	4	5.8
71-72	6	8.7
-28	7	10.1
17	12	17.4
41-42	31	44.9

3. 地贫与 MCV、MCH、HbA₂ 和 HbF 关系:8 例 HbH 病和 69 例 β 地贫杂合子 MCV 和 MCH 均低于正常,86 例 α 地贫 1 中除 1 例 MCH 正常外均降低,但 66 例 α 地贫 2 中有 17 例 MCV 和 MCH 均正常,因此以 MCV 和 MCH 降低作为地贫表型阳性的

指标会有部分 α 地贫 2 遗漏。69 例 β 地贫杂合子中有 68 例 HbA₂ \geq 4.35%,其中 34 例 HbF \geq 1.05%,但没有一例只有 HbF 增高而 HbA₂ 不增高的。HbH 病和 α 地贫 1 HbA₂ 多偏低,而 α 地贫 2 差别不明显,以 333 例样本(173 名健康成年人,66 例 α 地贫 2,86 例 α 地贫 1 和 8 例 HbH 病)HbA₂ 值绘制 ROC 确定 HbA₂ 诊断 α 地贫价值,结果显示 HbA₂ 对 α 地贫有一定诊断意义,但 ROC 确定的截断值 HbA₂ \leq 2.75% 的敏感度为 81.9%,特异度只有 38.2%,以此值诊断 HbH 病、 α 地贫 1 和 α 地贫 2 分别漏诊 2 例(25%,均为 HbWS-HbH 病)、7 例(8.1%)和 19 例(28.8%),健康成年人误诊 65 例(37.6%)。

4. α 地贫复合 β 地贫的血液学参数变化:所有 α 地贫 1 复合 β 地贫杂合子和 α 地贫 2 复合 β 地贫杂合子都表现出 β 地贫杂合子的特点,即 MCV 和 MCH 低于正常,HbA₂ 增高,并不因为复合 α 地贫而有所改变,1 例 α 地贫 1 复合 β 地贫双重杂合子也表现为 β 地贫杂合子特点,此患者基因型为 $-\text{SEA}/17/IVS-II-654$,而 $17/IVS-II-654$ 为 β^0 纯合子,临床上应为重型,但复合 α 地贫 1 后仅表现为轻度贫血,HbF 并不增高。 α 、 β 复合型地贫 MCV、MCH、HbA₂ 和 HbF 特点见表 2。

讨 论

以往的调查表明,广西壮族自治区 β 地贫检出率为 5.8%~6.78%^[5,6],均为应用碱性电泳法定量检测外周血 HbA₂ 和 HbF 进行诊断,然而该法诊断 β 地贫杂合子的准确性依所用设备不同有较大的差别,其中 pH 8.6 醋酸纤维膜法检测误漏诊较多,近年来国际地贫协会已广泛推荐使用 HPLC 做 β 地贫筛查^[1],我们的检测结果为 7.97%,高于过去检测的结果,可能与所用检测方法不同有关。 α 地贫调

表2 南宁农村育龄人群 19 例 α 、 β 复合型地贫血液参数变化特点

类 型	例数	HbA ₂ (%)	HbF(%)	Hb(g/L)	MCV(fl)	MCH(pg)
α 地贫 2 复合 β 地贫						
$-\alpha^{3.7}/\beta$ 地贫杂合子	3	5.9~6.7	0.4~0.7	103~129	56.4~61.2	19.2~21.1
$-\alpha^{4.2}/\beta$ 地贫杂合子	2	5.9	0.5	114~127	65.3~65.9	20.4~21.4
$-\alpha^{CS}/\beta$ 地贫杂合子	3	4.5~5.6	0~2.2	107~143	57.3~63.3	18.0~22.7
$-\alpha^{QS}/\beta$ 地贫杂合子	1	6.1	0.9	112	58.5	19.3
α 地贫 1 复合 β 地贫						
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}/\beta$ 地贫杂合子	1	6.0	0	160	71.6	25.1
$-\text{SEA}/\beta$ 地贫杂合子	8	5.7~6.5	0~2.9	100~136	60.5~70.0	20.0~24.8
α 地贫 1 复合 β 地贫双重杂合子						
$-\text{SEA}/\beta$ 地贫双重杂合子	1	5.7	0.7	113	60.2	21.6

查均为脐带血 HbBart's 定量检测,广西壮族自治区 α 地贫检出率为 11.19%~15.20%^[5,6],以外周血做 α 地贫筛查是比较困难的, HbH 病诊断较容易, pH 8.6 醋酸纤维膜法即可正确诊断,但 α 地贫 2 和 α 地贫 1 的诊断只能通过基因分析才能准确诊断,此次筛查未能明确 α 地贫检出率,只查出 HbH 病为 0.64%,由于 HbH 病患者有不同程度贫血,对生长发育有一定影响,有相当部分无劳动能力难以成婚,而这部分人没有参与筛查,使得 HbH 病检出率较低。随机 150 例小样本地贫基因分析显示, α 地贫检出率为 17.33%,有一定的参考意义。

产前诊断避免地贫儿出生是地贫预防的首选对策,而婚前或孕前明确诊断才能指导孕妇进行产前诊断^[7], β 地贫分为重型、中间型、轻型和静止型基因携带者 4 个等级,相对应的 α 地贫也分为重型、HbH 病(中间型)、 α 地贫 1(轻型)和 α 地贫 2(静止型基因携带者)^[4],仅轻度贫血或无贫血的轻型和静止型基因携带者是主要的检测对象,检测结果显示所有中间型地贫和 β 地贫杂合子(轻型 β 地贫或静止型 β 地贫基因携带者)和 85/86 例 α 地贫 1 MCV 和 MCH 均符合国际地贫协会推荐的地贫表型阳性标准^[1],但 α 地贫 2 只有部分符合,与文献报道的一致,因此在地贫高发区 MCV 和 MCH 低于正常,而 HbA₂ 相对较低者要注意 α 地贫,应进行 α 地贫基因分析,避免漏诊。有报道认为 HbA₂ 可用于 α 地贫的诊断^[8],本组资料显示对 HbH 病和 α 地贫 1 有一定诊断价值,但对 α 地贫 2 诊断价值欠佳,我国地贫高发区 α 地贫 2 较多,且 MCV 和 MCH 常无明显降低,地贫筛查中可将 MCV 和 MCH 与 HbA₂ 结合起来分析。HbF 也是诊断 β 地贫杂合子的依据之一,但由于影响的因素较多,单独 HbF 增高不能诊断 β 地贫杂合子,若 HbF 高于 15% 而 Hb 正常提示为遗传性胎儿血红蛋白持续存在综合征或 ($\delta\beta$)⁻ 地贫^[4]。

地贫基因分析结果显示南宁市 β 地贫基因型分布特点与过去报道的相似,仍以 41-42 居多,其次为 17-28、71-72、 β^E 、IVS-II-654、IVS-I-1 和 43^[9]。与以往检测结果相似, α 地贫 2 以 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 最多, α 地贫 1 以 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 最多,但检出较多的非缺失型 α 地贫 HbCS 和 HbWS 杂合子,可能与检测手段的发展有关,地贫筛查还应重视 HbCS 和 HbWS 的基因突变^[10,11]。

在地贫高发区 α 地贫复合 β 地贫有较高的检出率^[6,12,13], α 地贫复合 β 地贫后血液学指标可能会有

所改变^[13], 检出的 18 例 MCV 和 MCH 均降低, HbA₂ 均增高, 4 例 HbF $\geq 1.05\%$, 1 例 α 地贫 1 复合 β 地贫双重杂合子 ($-\text{SEA}/\text{IVS-II-654}/17$) MCV 和 MCH 降低,但仅有轻度贫血和 HbA₂ 增高,而 HbF 正常,该患者为 α 地贫 1 复合 β^E 纯合子,其血液学指标变化较大但临床上仅表现为轻度贫血,应引起临床重视。

南宁市人群地贫基因携带率较高,通过外周血检测诊断 β 地贫较为容易和准确,但常规方法不能诊断 α 地贫 1 和 α 地贫 2,该病高发区人群 MCV 和 MCH 降低应疑为地贫,夫妇一方确定为 α 地贫 1 另一方应进行地贫基因分析,以避免 HbH 病胎儿出生。产前诊断应同时进行 α 和 β 地贫基因检测,避免误诊。

(参加本项工作的还有魏萍、兰小英、黄梦沙、周天红、尹晓林、何宛容、宁梅、左运丽;少见异常血红蛋白病的诊断得到 Professor Dr. Elizabeth George Unit Head of Hematology, Department of Clinical Laboratory Sciences, Medical Faculty and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia 指导,谨此致谢)

参 考 文 献

- 1 Old J, Traeger-Synodinos J, Galanello R, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders. Vol 2. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2005. 1-39.
- 2 李泽松, 李建新, 张文, 等. 多重聚合酶链反应在 α 地中海贫血诊断中的应用. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 247-250.
- 3 周枚芬, 陈立炎, 罗小珍, 等. β 地中海贫血基因检测膜条制备及其临床评价. 生物技术通讯, 2005, 16: 134-137.
- 4 黄有文. 珠蛋白生成障碍性贫血. 见: 张之南, 主编. 血液病诊断及疗效标准. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 49-58.
- 5 张俊武, 龙桂芳, 主编. 血红蛋白与血红蛋白病. 第 1 版. 南宁: 广西科学技术出版社, 2003. 151-235.
- 6 蔡稔, 李莉艳, 梁昕, 等. 柳州市城镇人群 α 和 β 地中海贫血发生率调查和基因型鉴定. 中华流行病学杂志, 2002, 23: 281-285.
- 7 Yong KN, Wadsworth D, Langlois S, et al. Thalassaemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of Chinese descent. Clin Genet, 1999, 55: 20-25.
- 8 华亮, 李坚, 刘忠英, 等. 毛细管等电聚焦电泳定量分析健康成人及地中海贫血携带者的 HbA₂. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20: 421-424.
- 9 Liang R, Liang S, Jiang NH, et al. Alpha and beta thalassaemia among Chinese children in Guangxi province, P. R. China: molecular and haematological characterization. Br J Haematol, 1994, 86: 351-354.
- 10 陈萍, 龙桂芳, 林伟雄. 广西地区纯合子血红蛋白 Constant Spring 的研究. 中华血液学杂志, 2004, 25: 205-208.
- 11 陈萍, 林伟雄, 李树全. 三例 Hb Westmead 复合东南亚缺失型 α 地中海贫血 1 的分析. 中华血液学杂志, 2005, 26: 619-621.
- 12 张力, 区小冰, 俞一平. 广东地区 α β 复合型地中海贫血的检出率及临床表现. 中国小儿血液, 2004, 9: 71-75.
- 13 Lam YH, Ghosh A, Tang MH, et al. The risk of alpha-thalassaemia in offspring of beta-thalassaemia carriers in Hong Kong, 1997, 17: 733-736.

(收稿日期: 2006-03-03)

(本文编辑: 张林东)