

地中海型貧血之遺傳學

成大醫院婦產部優生保健科 郭保麟醫師

在人類所有的遺傳疾病當中，地中海型貧血（thalassemia）可能是分佈最普遍，同時也是被研究得最透徹的疾病。以下分成四部份來介紹地中海型貧血。

一、單基因疾病與分子遺傳學

自從 Watson 和 Crick 在 1953 年發現去氧核糖核酸的雙股鏈構造以來，分子生物學的進步如一日千里。現在分子生物學（或遺傳工程）的技術，已經可以定出不同基因在各個染色體上面的位置，並且將染色體上的基因加以解碼，而找出每個基因之內核 酸（nucleic acid）的排列次序。據估計人類每個細胞之內，大約有 3×10^9 核 酸，大都是分佈在 46 個染色體上面。祇有少數的核 酸，是位於細胞質的細腺體（mitochondria）上面。

人類的遺傳疾病可以分成幾個大類：一是單基因疾病，就是個別基因有缺陷，而且會遺傳給下一代的疾病。二是染色體異常，包括染色體數目上和結構上的異常。三是先天性異常和許多與遺傳有關係的常見疾病，例如高血壓，高血脂。一般認為這些疾病的表現涉及多個基因和環境因素之間的互動。四是粒腺體基因的病變。五是體細胞突變，例如癌症。目前已知癌症起因於後天的，多發性的體細胞突變。以下所要討論的地中海型貧血即是標準的單基因疾病。

單基因疾病總共有多少？根據 Mckusick 教授的統計，有 2208 種業經證實，另外 2136 種可能是單基因缺陷引起的表現型，總共是 4344 種（1988 年）。在 2208 種確定的單基因疾病中，1433 種是自體

顯性遺傳，626 種是自體隱性遺傳，139 種是性連遺傳。然而，相同的遺傳疾病在不同種族之間，其發生率及基因型（genotype）和表現型（phenotype）也不盡相同。

二、地中海型貧血的分子遺傳學及遺傳學及臨床表現

血紅素是由四條胜鏈 (peptide chain) 所組成的分子，負責氧氣的輸送。其中兩條多胜鏈屬於 α 鏈，另外兩條屬於 β 類。 α 類胜鏈包括 α_1 鏈和 α_2 鏈，它們的基因位於第十六號染色體的短臂上，一般正常人有一個 α_1 基因和兩個 α_2 基因($\alpha_1 \alpha_2$) 在同一個染色體上面，所以一共有兩個 α 和四個 β 基因。 β 胜鏈包含 β_0 、 β_{A} 、 β_{B} ，它們的基因位於第十一號色體的短臂，一般正常人有二個 β_0 、 β_{A} 和 β_{B} 基因。在胚胎早期， β_0 基因及 β_{A} 基因即表現出來，然後逐漸由 β_0 鏈及 β_{A} 鏈所取代。故在胎兒時期最主要的血紅素為 $\alpha_2 \beta_2$ 。出生之後， β_0 鏈的合成逐漸減少，由 β_{A} 鏈取代，到了六個月大之後，體內血紅素主要成份為 $\alpha_2 \beta_2$ (HbA)，另外有少量的 $\alpha_2 \beta_{\text{A}2}$ (HbA₂)。

地中海型貧血 (thalassemia) 有許多種，最主要的還是 α 及 β 地中海型貧血。所謂 α 地中海型貧血為 α 胜鏈的合成減少或異常。照嚴重程度來分，可以分成(1)單基因缺損。(2)二基因缺損。(3)三基因缺損。(4)四基因缺損。基因臨床表現如下：單因缺損在臨床上沒有什麼症狀，血液學檢查也無法與正常人區分，祇能用分子生物學的方法鑑定出來。二基因缺損的病例，即是一般所指的 α 地中海型貧血帶因者，在臨床上也通常沒有症狀，惟一的表現是紅血球體積 (MCV: mean corpuscular volume) 過小。三基因缺損的病例即血紅素 H 症。由於 α 胜鏈的合成因 β 鏈之減少而相對增多，許多 β 鏈結合成 β_4 (HbH)。這類病人一般有相當明顯的貧血，有時候因為脾臟腫大需要作脾臟切除術。四基因缺乏的病例，在胎兒時期便會出現全身性水腫，這是因為完全沒有 α 鏈的製造，長期缺氧，心臟衰竭，造成胎兒水腫 (hydrops fetalis)。由於完全沒有 α 胜鏈，造成 β 胜鏈過剩，形成許多 β_4 (Hb Bart's)，因此又稱為 Hb Bart's hydrops fetalis。 α 地中海型貧血，絕大多數是因為基因的缺失 (deletion) 所造成。而在

不同的種族之間，造成地中海型貧血的基因缺失形態也有所不同。

地中海型貧血則是因為珠蛋白鏈合成減少或異常，由於人類體內有兩個基因，單基因缺損的病例即帶因者，如果兩個基因缺損，即是重度地中海型貧血（ β -thalassemia major）。地中海型貧血帶因者的臨床表現與地中海型貧血的二基因缺失型類似，遺傳形態也相同。每兩個地中海型貧血的帶因者結合，每次懷孕有 1/4 機會產下重度的地中海型貧血。與重度地中海型貧血不同的是，由於在胚胎時間沒有珠蛋白鏈的合成，出生之後三到六個月，當大部分的珠蛋白鏈由珠蛋白鏈取代時，才會開始出現貧血。治療方法，祇有骨髓移植或長期輸血。

地中海型貧血也是隱性遺傳，但與 β 型不同的是它的基因缺陷絕大多數的核糖核酸的點突變所引起的。在不同的種族裡，常見的點突變形態也不同，但是幾種特定的突變一般會構成該族群主要的基因缺陷，亦即有種族特異性，此點與地中海型貧血以及其他種單基因疾病相同。在中國人裡面，至少有 17 種以上的血紅素基因突變型曾經被報告過，而其中有 4 種突變最常發生，占所有突變發生機率的 90% 以上。另外有一個特殊的現象是基因不同位置的突變將造成不同程度的臨床表現。所以地中海型貧血的表現變化多端，從比較輕度的 β^+ 地中海型貧血到需完全依賴輸血的 β^0 地中海型貧血都有。

三、地中海型貧血的流行病學與篩檢

地中海型貧血是全世界分佈最廣泛，發生率最高的遺傳疾病。它的發生率以泰國、義大利、希臘、賽普路斯、薩丁尼亞等地為最高。在這些地區，帶因率據估計以百分之七到二十，而每一百個小孩當中，就可能有一個是重度的地中海型貧血患者。在台灣及大陸東南各省，地中海型貧血的帶因率是 1% - 3%，而地中海型貧血為 2%

15%。成大醫院所得結果顯示 地中海型貧血的帶因率接近 5%，而 型的帶因率在 1%到 2%之間。由於台灣是地中海型貧血的盛行地區，婚前或孕前的篩檢極為重要。以靜脈血即可很容易找出絕大多數臨床上有意義的帶因者。及 型的帶因者其平均血球容積均小於 80，然而在 型的帶因者，其 $HbA^{2+} > 4$ ，另外有部份病例 HbF 會升高。如果夫妻同為 或 地中海型貧血的帶因者，則每次懷孕有 1/4 的機會生下異常的小孩，而婚前或孕前的管檢，可以找出帶因者，將來懷孕早期，可以作產前診斷，以避免悲劇的發生，而達到優生保健的目的。

四、地中海型貧血的產前診斷

產前診斷地中海型貧血有兩種方法，一種是在懷孕早期（16 週之前），使用絨毛膜切片或羊膜穿術，拿羊水細胞或絨毛細胞，作分子生物學診斷，另外可以在妊娠 17 週之後，在超音波導引之下，作胎兒臍帶血穿刺術，以臍血作電泳或高效能液相層析，可以分析 、 、 三種胜 鏈合成的比例。如果臍血中，大部份是 Hb bart's 或 鏈，則為重度 地中海型貧血。如果 鏈合成太低，則為中度 地中海型貧血。由於分子生物學的進步，我們可以在妊娠早期，就精確定出夫妻及胚胎的基因型，故需作臍帶血鑑定的病例，為數極少。及早診斷可以減少病人的痛苦，但是先決條件，仍需要婚前或孕前的篩檢，以找出沒有症狀的帶因者。所以產前檢查項目，應包含血紅素及血球容積，以期在早期妊娠，找出帶因者，並作必要的處置。

結語：由於科技的進步，使得我們對於單因疾病的原因，有更進一步的了解。我目前已經在提供地中海型貧血的產前診斷，希望能夠減少家庭悲劇的發生。

地中海貧血篩檢及診斷所常常遇到的一些問題

郭保麟

6-24-2002

成大醫學中心從八十一年開放地中海貧血的基因診斷服務，到現在為止，已經累積一千例以上的經驗。個人從事地中海貧血的診斷，受限於客觀環境，雖然時斷時續，但是幾年下來，多少累積了一些心得，在此與同仁及同學共同分享。

一、地中海型貧血的分子病理學

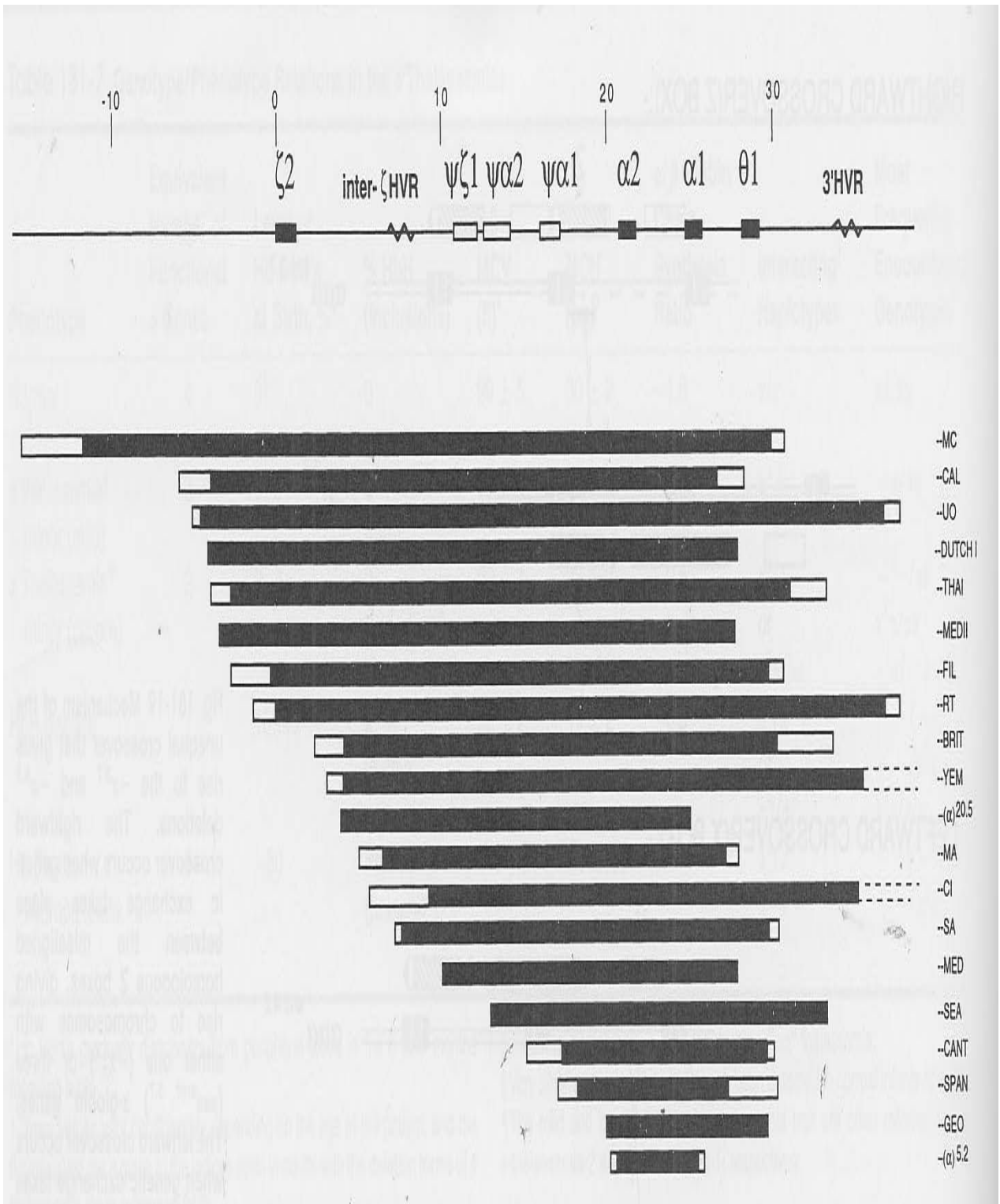
α -thalassemia 是因為 α -globin 基因缺損所造成， α -globin 基因位在第十六號染色體短臂的末端，每個染色體上有兩個 α -globin 基因，每個正常人身上應有四個 α -globin 基因。 α -globin 單一基因突變稱為 α -thalassemia-2，在同一個染色體上的兩個 α -globin 基因同時缺損稱為 α -thalassemia-1。如果有三個基因同時缺損，稱為 HbH 病，這是因為缺乏 α -globin，多餘的 β -globin 結合成不穩定的 tetramer(β_4)，也就是 HbH。如果有四個基因同時缺損，就是 α -thalassemia major，在胎兒末期或新生兒期就會死亡。造成 α -thalassemia 基因缺損的主要原因是基因缺失

(deletion)，在 α -thalassemia-2，便至少有五種基因缺失型，分別是 - 3.7, - 4.2, - 2.7, - 5.3, - 3.5，另外也有非缺失型突變，例如 HbCS，Hb 廣西。造成二基因缺損的原因，有可能是 α -thalassemia-1 突變($\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$)，也有可能是同合子型的(homozygous) α -thalassemia-2 突變($\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$)。在臺灣，因為主要的突變型為 $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$ ，如果夫妻同為帶因者，就有可能會生下 α -thalassemia major 的小孩($\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$)。至於 HbH 病，基因型有可能是 $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$ 或是 $\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$ 。

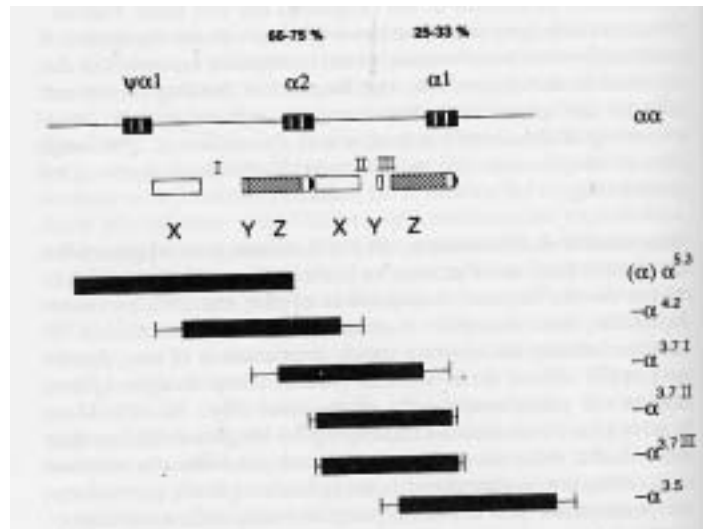
與 α -thalassemia 相反， β -thalassemia 是因為 β -globin 基因缺損所造成。 β -globin 基因位在 11 號染色體的短臂上，每個染色體上祇有一個 β -globin 基因，所以每個正常人的細胞之內，有兩個 β -globin 基因。造成 β -globin 基因缺損的主要原因是點突變，如果只有一個 β -globin 缺損，便是帶因者，其臨床表現與 $\beta\beta$ / $\beta\beta$ 或 $\beta\beta$ / $\beta\beta$ 類似。如果兩個 β -globin 基因都發生缺損，便是 β -thalassemia major。但是與 β -thalassemia major 不同的是 β -globin 基因在胚胎及胎兒時期並沒有顯著的表現，所以 β -thalassemia major 患者在新生兒時期是正常的，要出生 3~6 個月才會表現出來貧血的症狀。

二、地中海型貧血在臺灣的分子流行病學

臺灣 α -thalassemia-2 的發生率大約是 1~3% , α -thalassemia-1 的發生率大約是 5%。在 α -thalassemia-2 的突變之中 , 最常見的還是 -4.2, -3.5 及 HbCS。 α -thalassemia-1 之中 , 最主要的突變型在漢人百分之九十五以上都是東南亞型突變---SEA , 這是一段 17kb , 涵蓋 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 基因的突變。在原住民之中 , 有些帶有菲律賓型---PHIL , 或泰國型---THAI 突變 , 這兩種突變基因缺失的範圍比---SEA 更廣 , 除了 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 基因之外 , 也涵蓋 α 基因 , 這是胚胎時期負責製造 α -類血紅素的基因。在 HbH 病之中 , 大約一半基因型是---/--- , 另外一半是 --- / T , 而造成 T 的突變型 , 絕大部分是 HbCS。在 α -thalassemia major , 絕大部分仍是---SEA/---SEA , 祇有少數夾雜菲律賓或泰國型突變。(圖一)



圖一：造成 α -thalassemia-1 的缺失型突變



圖二：造成 α -thalassemia-2 的缺失型突變

α -thalassemia 的帶因率為 1~2%，幾乎都是點突變造成的。在中國人曾經被報告過的就有十七種突變型，但是其中四種突變型占了絕大多數 (>90%)： α -28(A → G), codon 17(AAG → TAG), codon 41/42(- TCTT), IVS-2 nt 654(C → T)。其他較少見的突變型是 α -32(C → A), α -30(T → A), α -29(A → G), α -AAAC(+ 40 to + 43 from cap), initial codon (ATG → AGG), codon 14/15 (+ G), codon 27/28 (+ C), IVS-1 nt 1 (G → T), IVS-1 nt 5 (G → C), IVS-1 3' end (TAG → GAG), codon 43 (GAG → TAG), codon 71(+ T), codon 71/72 (+ A)。其中 α -32, α -30, α -29, α -28 等突變在 promoter，影響到基因的表現，其他大部分的突變發生在 exon，但也有部分突變發生在 intron，例如 IVS-1 nt1, IVS-1 nt5, IVS-1 3' end, IVS-2 nt 654 (IVS 為 intervening sequence, 即 intron)，影響 mRNA 的 splicing。

三、地中海型貧血的篩檢

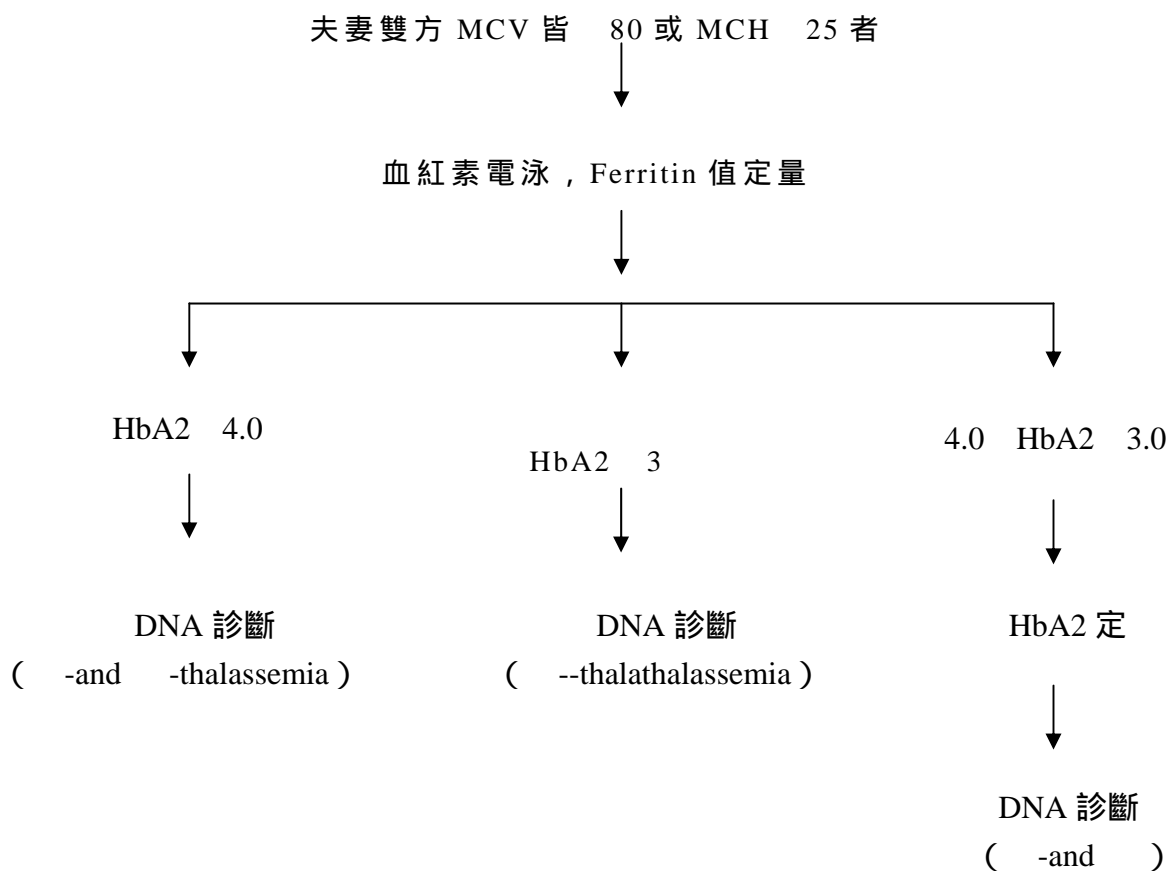
由於臺灣的帶回率相當高，以 CBC 篩檢 α -及 β -thalassemia 的帶因者已經成為產前例行檢查的一部份，在 α -及 β -thalassemia 的帶因者，其 MCV 或 MCH 會有降低的情形 (MCV < 80 或 MCH < 25)，但是 α -thalassemia 帶因者，HbA₂ 或 HbF 會升高 (HbA₂ > 4.0 或 HbF > 2.0)，如此可以和 β -thalassemia 帶因者區分開來，如果夫妻兩人都屬於同型的帶因者，那麼胎兒就有可能是重型地中海型貧血患者，需要接受產前診斷。儘管篩檢過程看來相當容易，但是仍然有一些困難存在，往往還是必須分析基因型才能確定。

1. 缺鐵性貧血患者的 MCV, MCH 都會降低，因此往往不易與地中海型貧血

- 區分。另外地中海型貧血帶因者也往往同時合併有缺鐵性貧血。
2. 以上傳統的血紅素電泳定量 HbA2 及 HbF 值，可能不夠精確。特別是如果 HbA2 介於 3~4 之間，在 α -及 β -thalassemia 帶回者的區分上便有所困難。另外 HbE 及一些 Hb variants 往往與 HbA2 或其他成份不易區分。
 3. 在 HbA2 或 HbF 昇高的病例，除了是 β -thalassemia 帶因者之外，理論上有 5% 的機會，同時也是 α -thalassemia 的帶因者，必須分析基因型。
 4. 同時合併 α -thalassemia 及 β -thalassemia 的病例，MCV 及 MCH 可能會正常。
 5. 如果實驗室品管不佳，CBC 檢查也會出現偽陰性的情況。

圖三是目前我們篩檢的流程，可以使用 HPLC 來取代血紅素電泳，可以使篩檢工作更加精確。

圖三：帶因者篩檢流程



四、地中海型貧血的基因診斷

α -thalassemia 主要是基因缺失所引起，可以使用 Southern blot 或 PCR 診斷。以 PCR 診斷基因缺失有兩個原則，一是放大缺失的基因，如果該基因沒有被放大出來，表示該基因有 homozygous deletion。另外一個原則是放大 deletion junction 的 DNA 序列，這樣就可以診斷該特定的基因缺失型。目前我們是兩個方法都用，以便作 double check-up。至於以 Southern blot 診斷，我們目前有的探針，可以診斷所有缺失型的 α -thalassemia-2 及東南亞型 α -thalassemia-1 突變。 β -thalassemia 由於是點突變，而且大部份突變有區域特性，有很多種方法可以用來確定診斷。我們過去嘗試過的方法包括 ASO (Allele-Specific Oligonucleotide), ARMS (Amplification Refractory Mutation System), 及 PCR 產物的直接 sequencing。目前則採取 ACRS (Amplification Created Restriction Sites), 至少可以診斷常見的十餘種突變，如果還無法解決，再作 sequencing。

五、產前基因診斷的一些問題

在作 α -thalassemia 的產前診斷時，很多人常會有的疑問是有無必要性作診斷 HbH 病的診斷。我們目前的策略是並不考慮，以免引起患者的混亂。因為 HbH 病絕大多數都可以活得不錯，最多是偶爾要輸血。而事實上我們又無法從 genotype 來完全預測患者的 phenotype，在此情況之下，診斷胎兒的 genotype 可能反而造成困擾。文獻上確實也有極少數(個位數)的病例因為 HbH 病造成胎兒水腫(α -thalassemia major 的表現)，但這些極少數病例其基因型都是罕見的非缺失型突變，並無法以例行性的方式診斷出來。即使這些情況發生也不致於引起太多的問題，因為新生兒在初生之後就無法存活。

α -thalassemia 的診斷比較困難的是所謂的 α -thalassemia intermedia，這些患者臨床上的嚴重程度比 α -thalassemia major 輕，大約與部分 HbH 病接近。造成 α -thalassemia intermedia 的原因可能有二：一是兩個 α -globin 基因都發生突變，但是一個突變造成 α -globin 完全沒有功能，另一個突變造成基因還保留有部分的功能(α^0/α^-)。二是祇有單基因突變，但是因為同時合併其他血液上的病變，例如 HbH 病($\alpha\alpha^-/\alpha^-$)，造成比較嚴重的臨床表現。到目前為止，有關中國人的 α -thalassemia intermedia 還沒有很好的研究。 β -thalassemia intermedia 與 HbH 病類似，都可能造成診斷上的盲點，所幸這些病例相當少見。

六、實驗室品管

我們目前實驗室的品管控制得相當嚴格，胎兒檢體除了一定與父母

親檢體同時分析之外，每個檢體至少分析三次(未培養檢體二次，經培養檢體一次)，才發報告，另外最重要的是，每次實驗都包含 normal control, homozygous mutation control, heterozygous mutation control 及 blank control。發報告時間則嚴格控制在一至三個星期之內。