

# 广西地区 $\beta$ 地中海贫血杂合子 $\beta$ -LCR-HS 多态性序列分析

## Analysis of Polymorphic Sequence in $\beta$ -LCR-HS of $\beta$ -thalassemia Heterozygous in Guangxi

陈剑锋<sup>1</sup> 龙桂芳<sup>2</sup>Chen Jianfeng<sup>1</sup> Long Guifang<sup>2</sup>

(1. 广西医科大学第二附属医院儿科 南宁市大学路 32号 530007;

2 广西医科大学第一附属医院儿科 南宁市滨湖路 530021)

(1. Dept. of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital, Guangxi Medical Univ. , 32 Daxuelu, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Dept. of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical Univ. , Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要** 分别应用 PCR产物直接测序法和 PCR限制性内切酶 *Xmn*I 酶切法分析 17例广西地区  $\beta$  地中海贫血杂合子的 34条染色单体上  $\beta$ -LCR-HS核心区 AT重复序列  $(AT)_x N_y (AT)_z$  多态性类型及 8580 8598 9114位点碱基改变、 $\gamma$  珠蛋白基因启动子 -158位点 ( $\gamma$ -158)单核苷酸多态性 (SNP),并观察它们与高 HbF  $\beta$  地中海贫血杂合子的关系。结果共检出 9种  $(AT)_x N_y (AT)_z$  类型:  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{11}$ 、 $(AT)_8 N_{12} (AT)_{11}$ 、 $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$ 、 $(AT)_{10} N_{12} (AT)_{11}$ 、 $(AT)_9 N_{13} (AT)_{11}$ 、 $(AT)_9 N_{14} (AT)_9$ 、 $(AT)_{10} N_{12} (AT)_{10}$ 、 $(AT)_8 N_{12} (AT)_{14}$ 和  $(AT)_9 N_{14} (AT)_{10}$ , 其中前 3种类型检出最多 (73.5%)。  $\beta$ -LCR-HS的 8580 8598 9114位点均未发现突变。HbF > 3% 的 12例受检者有 6例  $\gamma$ -158基因型为 C/T, 6例为 C/C; 作为对照的 5例 HbF正常 (< 2%)者均为  $\gamma$ -158(C/C)。  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  主要在 6例 HbF > 3% 且  $\gamma$ -158(C/T)的个体中检出 (5/6)。提示  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  与 HbF升高有一定关系,而且与  $\gamma$ -158(C  $\rightarrow$  T)突变存在不平衡连锁倾向。

**关键词**  $\beta$  地中海贫血 位点控制区  $\gamma$  珠蛋白 基因 多态性 胎儿血红蛋白

中图法分类号 R725.5

**Abstract** 34 chromosomes of 17  $\beta$ -thalassemia heterozygous in Guangxi were studied. DNA sequence in the core region of  $\beta$ -LCR-HS including AT repeats [ $(AT)_x N_y (AT)_z$ ] and three single nucleotide polymorphisms (SNPs) at 8580, 8598 and 9114 sites were detected by PCR-direct nucleotide sequencing and, SNP at -158 site of  $\gamma$  gene promoter ( $\gamma$ -158) was detected by *Xmn*I restriction enzyme digesting after PCR amplification. The relationship between these polymorphisms and the elevation of fetal hemoglobin (HbF) are determined. 9 kinds of  $(AT)_x N_y (AT)_z$  motif were detected in 34 chromosomes, namely  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{11}$ ,  $(AT)_8 N_{12} (AT)_{11}$ ,  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$ ,  $(AT)_{10} N_{12} (AT)_{11}$ ,  $(AT)_9 N_{13} (AT)_{11}$ ,  $(AT)_9 N_{14} (AT)_9$ ,  $(AT)_{10} N_{12} (AT)_{10}$ ,  $(AT)_8 N_{12} (AT)_{14}$  and  $(AT)_9 N_{14} (AT)_{10}$ .  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{11}$ ,  $(AT)_8 N_{12} (AT)_{11}$  and  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  were the most three patterns (73.5%). No mutation was found at 8580, 8598 and 9114 sites of  $\beta$ -LCR-HS. Among 12 cases with HbF > 3%, 6 carried genotypes of  $\gamma$ -158 (C/T), while the others carried  $\gamma$ -158 (C/C). In control group, the genotypes of  $\gamma$ -158 of all 5 cases with normal HbF levels (< 2%) were C/C. In 6 patients characterized by HbF > 3% and  $\gamma$ -158 (C/T), most of them carried  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  motifs (5/6). Our study had implied that  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  motif was linked to the elevation of HbF in  $\beta$ -thalassemia heterozygous from Guangxi, and had linkage disequilibrium with  $\gamma$ -158 (C  $\rightarrow$  T) mutation.

**Key words**  $\beta$ -thalassemia, locus control region,  $\gamma$ -globin, gene, polymorphism, fetal hemoglobin

$\beta$  地中海贫血是一种因  $\beta$  珠蛋白基因缺陷使  $\beta$  珠

蛋白链合成减少或缺乏所导致的遗传性慢性溶血性疾病。临床上可分为重型、中间型和轻型 3 种类型<sup>[1]</sup>。

国外有学者在研究重型、中间型  $\beta$  地中海贫血 ( $\beta$

地中海贫血基因纯合子或双重杂合子)或镰状细胞贫血基因型与表现型关系时发现,β类珠蛋白基因簇调控序列上某些短串联重复序列(short tandem repeat, STR)多态性和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与γ珠蛋白基因不同表达水平有关。一般认为,这些DNA多态性的某些特定形式在贫血时使γ珠蛋白基因表达增强,引起胎儿血红蛋白(HbF)升高,其中以β类珠蛋白基因簇位点控制区(locus control region, LCR) DNase I 酶高敏位点基序 2(hypersensitive site motif 2, HS<sub>2</sub>)核心区 DNA多态性与 HbF水平关系的研究较多<sup>[2-4]</sup>。β地中海贫血基因杂合子的表现型多为轻型β地中海贫血,其临床特点是无贫血或只有轻度贫血, Hb A<sub>2</sub>增高, HbF多数正常,部分升高<sup>[1]</sup>。本文旨在分析广西地区β地中海贫血杂合子β-LCR-HS<sub>2</sub>核心区的 AT重复序列 [(AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub>, x, y, z代表碱基数目, N为 AT之间的碱基]的多态性类型及此重复序列周围 8580-8598-9114位点(GenBank的 HUM HBB序列碱基号码,下同)的碱基变化,并观察它们与高 Hbβ地中海贫血杂合子的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象来源及 DNA样本收集

17例β地中海贫血杂合子个体均经β地中海贫血基因检测确定,并予血液常规、Hb常规检查,均来自广西医科大学血红蛋白研究室和遗传病门诊,相互间无血缘关系。所有受检者经 Hb电泳检测均无 Hb Bart's。研究对象分 2个组:高 HbF组 12例, HbF均大于 3%,男 5例,女 7例,年龄 3~35岁,中位年龄 28岁;对照组 5例,随机抽取 2001年 8月至 2002年 2月来我室进行β地贫产前诊断。HbF水平正常(< 2%,本室正常参考值,抗碱比色法),且<sup>6</sup>γ珠蛋白基因启动子区域-158位点(<sup>6</sup>γ-158)基因型为 C/C的 5个轻型β地中海贫血病例,男 3例,女 2例,21~31岁,中位年龄 28岁。受检者的 DNA样本均用经典的饱和酚-氯仿法提取。

### 1.2 β-LCR-HS<sub>2</sub>核心区 PCR扩增及扩增产物序列测定

β-LCR-HS<sub>2</sub>核心区 PCR扩增反应所用引物 HS-A1(5'-TTA CAA GCT CAG CTC CCT CTA TC-3')和 HS-A2(5'-CAT GTG TCC TCT AAC AGC ACA G-3')的设计参照文献[6],扩增的目标序列起自 8457,止于 9180,PCR产物长度为 769 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。50μl的

PCR反应体系组成如下: 10mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 每种 dNTP 0.2 mM, 每种引物 0.1μM, 基因组 DNA 200 ng, 1.5 u Taq DNA聚合酶。PCR扩增条件: 94℃预变性 5 min, 变性 94℃ 40 s, 退火 58℃ 40 s, 延伸 72℃ 90 s, 共 30个循环, 最后一个循环延伸 72℃ 5 min。PCR产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 溴乙锭染色, 紫外线灯下观察扩增效果。PCR产物序列用 ABI PRISM 377-96直接测定, 测序试剂为 Big Dye terminator V2.0。测序引物为 PCR扩增的上、下游引物, 进行正向(以 GenBank的 HUM HBB序列 5'→3'方向为正方向)或反向测定, 如果单向测序无法完整读出 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub>结构, 则正反双向测定。结合 HUM HBB标准序列对 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub>进行分析, 以 AT重复序列之间的碱基序列 N(ACACATATACGT)(见 GenBank的 HUM HBB序列及文献[2, 6, 7])作为基准, 计算出其两端的 (AT)个数。8580-8598-9114位点的碱基在测序图上直接读取。

### 1.3 <sup>6</sup>γ-158位点 SNP检测

<sup>6</sup>γ-158具有 SNP特性, 即 C或 T碱基变化。本研究参考 Peri等<sup>[5]</sup>的实验, 采用 PCR限制性内切酶 Xmn I 分析方法进行检测(限制性内切酶 Xmn I 为 Promega公司产品)。

## 2 结果

### 2.1 β-LCR-HS<sub>2</sub>核心区 DNA多态性

每个受检对象的β-LCR-HS<sub>2</sub>(AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub>基因型见表 1。在 17个研究对象的 34条染色单体上, 共检出 9种不同的 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub>多态性序列(见表 2), 其中以 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub>最多, 共有 12条, 其次为 (AT)<sub>8</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub>, 共 7条, 再次是 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>10</sub>, 为 6条, 其它类型各 1~2条, 分别为 (AT)<sub>10</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub>, (AT)<sub>9</sub>N<sub>13</sub>(AT)<sub>11</sub>, (AT)<sub>9</sub>N<sub>14</sub>(AT)<sub>9</sub>, (AT)<sub>10</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>10</sub>, (AT)<sub>8</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>14</sub>和 (AT)<sub>9</sub>N<sub>14</sub>(AT)<sub>10</sub>。携带 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub>, (AT)<sub>8</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub>以及 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>10</sub>的染色单体数占全部的 73.5%。

34条染色单体上未发现 HS<sub>2</sub>的 8580(T), 8598(A), 9114(A)碱基发生突变。

### 2.2 <sup>6</sup>γ-158位点基因型

在 12个 HbF> 3%β地中海贫血杂合子中, 共检出 6例<sup>6</sup>γ-158(C→T)杂合子, 即<sup>6</sup>γ-158位点基因型为 C/T的个体, 6例为<sup>6</sup>γ-158基因型 C/C纯合子。对照组 5例全部为<sup>6</sup>γ-158(C/C)。见表 1。

表 1 高 HbF组及对照组杂合子个体血液学、β地中海贫血基因型、 $\gamma$ -158基因型和 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub>检测结果

Table 1 Hematological data and genotypes of β-thalassemia,  $\gamma$ -158 and (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub> of β-thalassemia heterozygous with raised HbF levels and controls

组别	编号 No.	性别 Sex	年龄 Age (Year)	Hb (g/L)	MCV (fl)	HbF (%)	HbA <sub>2</sub> (%)	β地中海贫血 基因型 β-thalassemia genotype	$\gamma$ -158基因型 $\gamma$ -158 genotype	(AT) <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (AT) <sub>z</sub> 基因型 (AT) <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (AT) <sub>z</sub> genotype
高 HbF组 Patients with raised HbF levels	1	女 Female	31	108	63.1	19.30	5.10	CD41-42/A*	C/T	(AT) <sub>8/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	2	女 Female	25	101	74.6	10.44	5.18	CD17/A	C/T	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/11</sub>
	3	女 Female	29	105	66.9	5.14	4.43	CD41-42/A	C/T	(AT) <sub>8/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	4	女 Female	25	92	63.5	3.94	5.40	CD41-42/A	C/T	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>10/11</sub>
	5	男 Male	30	121	68.0	3.85	5.87	CD17/A	C/T	(AT) <sub>8/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	6	女 Female	25	103	73.6	3.50	6.12	CD41-42/A	C/T	(AT) <sub>8/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	7	男 Male	3	96	68.4	15.96	6.82	CD41-42/A	C/C	(AT) <sub>9/10</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	8	女 Female	29	NA*	NA	11.90	6.40	CD17/A	C/C	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>13/13</sub> (AT) <sub>11/11</sub>
	9	男 Male	12	125	93.6	7.90	3.80	nt-28/A	C/C	(AT) <sub>8/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	10	女 Female	34	133	99.0	7.70	4.70	IVS-II-654/A	C/C	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>12/14</sub> (AT) <sub>11/10</sub>
	11	男 Male	35	129	67.0	4.80	5.71	CD17/A	C/C	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/11</sub>
	12	男 Male	27	115	61.8	3.90	4.76	CD17/A	C/C	(AT) <sub>8/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/11</sub>
对照组 Controls	1	男 Male	28	156	74.3	1.90	4.68	CD41-42/A	C/C	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>12/14</sub> (AT) <sub>10/9</sub>
	2	女 Female	21	98	54.6	1.01	4.55	IVS-II-654/A	C/C	(AT) <sub>9/9</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/11</sub>
	3	男 Male	29	133	65.9	0.81	4.06	CD17/A	C/C	(AT) <sub>9/10</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/11</sub>
	4	男 Male	31	141	65.1	0.36	5.06	CD41-42/A	C/C	(AT) <sub>8/10</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>14/11</sub>
	5	女 Female	27	116	NA	0.96	5.90	CD41-42/A	C/C	(AT) <sub>9/10</sub> N <sub>12/12</sub> (AT) <sub>11/10</sub>

\* A 为正常的 β 珠蛋白基因, \*\* NA 为资料缺 \* A is normal β-globin gene \*\* NA is not available

表 2 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub> 类型及其在不同实验对象中的分布 (例)

Table 2 Patterns of (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub> and their distribution in different groups(case)

(AT) <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (AT) <sub>z</sub> 类型 (AT) <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (AT) <sub>z</sub> pattern	高 HbF(> 3%)+ $\gamma$ -158(C/T) High HbF(> 3%)+ $\gamma$ -158(C/T) (n= 6)	高 HbF(> 3%)+ $\gamma$ -158(C/C) High HbF(> 3%)+ $\gamma$ -158(C/C) (n= 6)	低 HbF(< 2%)+ $\gamma$ -158(C/C) Low HbF(< 2%)+ $\gamma$ -158(C/C) (n= 5)	合计 Total
(AT) <sub>9</sub> N <sub>12</sub> (AT) <sub>11</sub>	3	5	4	12
(AT) <sub>8</sub> N <sub>12</sub> (AT) <sub>11</sub>	4	2	1	7
(AT) <sub>9</sub> N <sub>12</sub> (AT) <sub>10</sub>	5	1	0	6
(AT) <sub>10</sub> N <sub>12</sub> (AT) <sub>11</sub>	0	0	2	2
(AT) <sub>9</sub> N <sub>13</sub> (AT) <sub>11</sub>	0	2	0	2
(AT) <sub>9</sub> N <sub>14</sub> (AT) <sub>9</sub>	0	0	1	1
(AT) <sub>10</sub> N <sub>12</sub> (AT) <sub>10</sub>	0	1	1	2
(AT) <sub>8</sub> N <sub>12</sub> (AT) <sub>14</sub>	0	0	1	1
(AT) <sub>9</sub> N <sub>14</sub> (AT) <sub>10</sub>	0	1	0	1
合计 Total	12	12	10	34

### 2.3 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub> 多态性类型在不同 HbF 水平及 $\gamma$ -158 基因型个体中的分布

表 2 显示, HbF > 3% 且  $\gamma$ -158(C/T) 的 6 例受检者中 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>10</sub> 序列检出最多, 共 5 例携带有此序列; 在 HbF > 3% 但  $\gamma$ -158(C/C) 的 6 例实验对象中, 以 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub> 检出最多, 1 例是 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub> 纯合子, 4 例为携带 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub> 的杂合子; 对照组的 5 例低 HbF 且  $\gamma$ -158(C/C) 个体的 (AT)<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(AT)<sub>z</sub> 类型比较分散, 共检出 6 种不同的类型, 但仍以 (AT)<sub>9</sub>N<sub>12</sub>(AT)<sub>11</sub> 为多, 其中 1 例是纯合子, 2 例为杂合子。

### 3 讨论

β-LCR 是 β 类珠蛋白基因的远侧端调控元件, 此元件不但能促进 β 类珠蛋白基因在红系造血细胞中高水平表达, 而且在其时空顺序性表达调控方面亦起着非常重要的作用。在人类 ε 基因 5' 端上游的 β-LCR 内, 至少有 5 个 DNase I 酶高敏点 HS<sub>1</sub>、HS<sub>2</sub>、HS<sub>3</sub>、HS<sub>4</sub>、HS<sub>5</sub> 基序, 其中 HS<sub>2</sub> 具有典型的增强子功能, 其活性占整个 LCR 活性的 40% ~ 50%, 主要对 β 和 γ 基因起转录增强作用<sup>[8,9]</sup>。HS<sub>2</sub> 核心区的 AT 重复序列具有多态性, 不同的多态性形式对 HS<sub>2</sub> 的增强子活性有不同的影响<sup>[10]</sup>。早年 Oner 等<sup>[2]</sup> 研究土耳其人

镰状细胞贫血  $\beta$ -LCR- $HS_2$  上碱基变化与单体型的关系时发现,不同的  $(AT)_x N_y (AT)_z$  结构与不同的单体型有相对稳定的连锁关系:  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  与高 HbF 的 Senegal 单体型相连锁;而  $(AT)_8 N_{12} GT (AT)_7$  则与低 HbF 的 Benin 单体型连锁。并且上游为 Senegal 型,下游为 Benin 型的混合单体型病人也有较高的 HbF 水平,因而推测  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  这一特殊序列在红系造血压下,通过与某些蛋白因子相互作用,促使  $\gamma$  基因持续地表达而引起 HbF 升高<sup>[2,9]</sup>。但 Merghoub 等<sup>[3]</sup>观察到,即使无红系造血压力, $\beta$ -LCR- $HS_2 (AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  序列与 HbF 和 F 细胞升高仍有密切的相关关系。在  $\beta$  地中海贫血和遗传性持续性胎儿血红蛋白综合征 (hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH) 病人中,也先后发现了  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  序列与高 HbF 有关<sup>[6,12]</sup>。以上研究还同时发现  $\beta$ -LCR- $HS_2 (AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  与  $\gamma$ -158 (G $\rightarrow$ T) 存在着不平衡连锁关系。 $\gamma$ -158 (G $\rightarrow$ T) 突变是一种与 HbF 升高的密切相关的  $\beta$  珠蛋白基因簇上的 SNP<sup>[1]</sup>。Merghoub 等<sup>[7]</sup>比较这两种 DNA 序列变化与高 F 细胞水平的相关程度,发现  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  的相关性更高,由此认为与  $\gamma$ -158 (G $\rightarrow$ T) 突变有关的高 HbF 其实很可能是由于连锁了  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  所致。

我们在广西地区 17 例  $\beta$  地中海贫血杂合子个体 34 条染色单体上共检出 9 种  $\beta$ -LCR- $HS_2 (AT)_x N_y (AT)_z$  多态性类型,其中最主要的 3 种  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{11}$ 、 $(AT)_8 N_{12} (AT)_{11}$  及  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  亦常见于其他人<sup>[3,6,7,12]</sup>。同时也观察到  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  序列主要集中于高 HbF 的  $\beta$  地中海贫血杂合子个体中,初步验证该地区  $\beta$  地中海贫血杂合子的 HbF 升高与  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  也有一定的相关关系,且后者与  $\gamma$ -158 (G $\rightarrow$ T) 存在着不平衡连锁的倾向。Samakoglu 等<sup>[4]</sup>在高 HbF 的土耳其重型和中间型  $\beta$  地中海贫血患者中发现另一种  $HS_2$  的 AT 重复序列  $(AT)_8 N_{14} (AT)_7$  检出最多,提示不止一种  $(AT)_x N_y (AT)_z$  与 HbF 升高有关。本研究虽然观察到  $(AT)_9 N_{12} (AT)_{11}$  在高 HbF 但  $\gamma$ -158 (C/C) 的受检者中所占比例最高,但其在高 HbF  $\gamma$ -158 (C/T) 和低 HbF  $\gamma$ -158 (C/C) 的受检者中检出也不少,因此,推测其与高 HbF 水平无关联,而可能是广西地区人群中一种常见的  $(AT)_x N_y (AT)_z$  多态性类型。由于本次实验例数较少,此结论尚需以后增加实验例数来加以证实。

$\beta$ -LCR- $HS_2 (AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  序列以往更多地被视为是一种与高 HbF 相关的基因标志<sup>[1]</sup>。但

Merghoub 等<sup>[7]</sup>注意到  $\beta$ -LCR- $HS_2$  的 AT 重复序列与  $\beta$  基因启动子区域的 AT 重复序列类似,后者有一转录调控蛋白 Bp1 的结合位点, Bp1 可对不同的序列变化有不同的亲和力,并由此来调节不同转录效率。实验中他们发现  $\beta$ -LCR- $HS_2$  的 AT 重复序列和  $\beta$  基因启动子区域的 AT 重复序列对一种蛋白因子竞争性结合,并推测此因子很可能就是 Bp1,因此并不能排除 LCR- $HS_2$  的  $(AT)_x N_y (AT)_z$  序列对  $\gamma$  基因表达有直接调控作用。至于存在着不平衡连锁关系的  $\gamma$ -158 (G $\rightarrow$ T) 及  $\beta$ -LCR- $HS_2 (AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$  在调控  $\gamma$  基因表达机制中的相互关系和作用如何,目前尚无研究就此加以阐明。

位于  $(AT)_x N_y (AT)_z$  两端的 3 个碱基 8580 (T)、8598 (A) 和 9114 (A) 各自所在的 DNA 局部片段与 Friend's murine/Moloney 白血病病毒的增强子序列有高度的同源性,分别是蛋白因子 Sp1、TEF-2 的结合位置<sup>[2,7]</sup>。这 3 个碱基的突变 8580 (T $\rightarrow$ G)、8598 (A $\rightarrow$ G)、9114 (A $\rightarrow$ T) 曾被认为与低 HbF 有关<sup>[2]</sup>。本研究在高 HbF 和低 HbF  $\beta$  地中海贫血杂合子中均未发现这 3 个碱基发生突变,并不支持此观点,与多数研究者的观察结果一致<sup>[7,13]</sup>。最近 Kukreti 等<sup>[14]</sup>在 16 例表现型为  $\beta$  地中海贫血但  $\beta$  珠蛋白基因上未检出任何突变的印度人中,仅发现  $\beta$ -LCR- $HS_2$  的回文结构上一种 SNP (A/G) 与这些病人的发病密切相关,而此 A/G 多态性又分别与  $HS_2$  的  $(AT)_x N_y (AT)_z$  多态性存在不平衡连锁关系。另外,由于  $HS_2$  的不同 DNA 多态性与其增强子活性高低有关<sup>[10]</sup>,在构建  $\beta$  珠蛋白基因表达载体用于  $\beta$  地中海贫血基因治疗研究时应充分考虑此特性。因此,了解  $\beta$ -LCR- $HS_2$  AT 重复序列的多态性类型,对特殊类型  $\beta$  地中海贫血的基因诊断和  $\beta$  地中海贫血基因治疗研究有重要意义和应用价值。

## 参考文献

- 1 Weatherall D J, Clegg J B. The thalassaemia syndromes 4th ed. Oxford Blackwell Science Ltd, 2001. 1~ 170.
- 2 Oner C, Dimovski A J, Altay C, et al. Sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region of  $\beta$  s chromosomes are associated with different levels of fetal globin in hemoglobin S homozygotes. Blood, 1992, 79(3): 813~ 819.
- 3 Merghoub T, Perichon B, Maier-Redelsperger M, et al. Variation of fetal hemoglobin and F-cell number with the LCR- $HS_2$  polymorphism in Nonanemic individuals. Blood, 1996, 87(6): 2607~ 2608.

(下转第 133 页 Continue on page 133)

细胞浸润明显。但经木芙蓉叶有效组分治疗后肾功能改善明显, 肾组织病理损伤减轻, 说明木芙蓉叶有效组分能防止肾脏缺血再灌注损伤。同时实验还证实肾 IRI 后血中 IL-1 的水平升高, 再灌注 1 h 后血中 IL-1 水平比再灌注 3 h 高, 这与 Kelly K J 等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。经木芙蓉叶有效组分治疗后, 再灌注 1 h 和 3 h 时血中 IL-1 水平都下降明显, 与对照组相比具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。由此我们推测, MFR 对肾缺血再灌注损伤的保护作用是其抗非特异性炎症的结果, 其可能的机制是通过减轻炎症反应, 降低 IL-1 等炎性细胞因子的表达及活性来实现的。

### 参考文献

- 1 江苏新医学院. 中药大词典(上). 上海: 人民卫生出版社, 1997. 371~ 372.
- 2 符诗聪, 张凤华, 史炜镇, 等. 木芙蓉有效组分的抗炎实验研究初步报道. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(1): 14~

- 16.
- 3 姚莉韵, 王国艳, 王丽平. 木芙蓉叶提取工艺研究. 中成药, 2000, 22(2): 827~ 829.
- 4 Fady Chamoun, Melissa Burne, Michael O'Donnell, et al. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. Front Biosci, 2000, 5(1): E103 ~ E109.
- 5 Azuma H, Nadeau K, Takada M, et al. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. Transplantation, 1997, 64(2): 190~ 197.
- 6 Kelly K J, Williams W W, Colvin R B, et al. Interleukin-1-deficient mice are protected against ischemia renal injury. J Clin Invest, 1996, 97(4): 1056~ 1063.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 130 页 Continue from page 130)

- 4 Samakoglu S, Philipsen S, Grosveld F, et al. Nucleotide changes in the  $\gamma$ -globin promoter and the  $(AT)_x(N)_y(AT)_z$  polymorphic sequence of  $\beta$  LCR HS<sub>2</sub> region associated with altered levels of HbF. European Journal of Human Genetics, 1999, 7(3): 345~ 356.
- 5 Peri K G, Gagnon J, Gagnon C, et al. Association of -158(C  $\rightarrow$  T) (Xmn I) DNA polymorphism in  $\gamma$ -globin promoter with delayed switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis. Pediatric Research, 1997, 41(2): 214 ~ 217.
- 6 Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P, et al. Nondeletional type of hereditary persistence of fetal haemoglobin molecular characterization of three unrelated Thai HPFH. British Journal of Haematology, 1994, 87(4): 797~ 804.
- 7 Merghoub T, Penichon B, Maier-Redelsperger M, et al. Dissection of the association status of two polymorphisms in the  $\beta$ -globin gene cluster with variations in F-cell number in non-anemic individuals. American Journal of Hematology, 1997, 56(4): 230~ 243.
- 8 Hardison R, Slightom J L, Gumucio D L, et al. Locus control regions of mammalian  $\beta$ -globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. Gene, 1997, 205(1~ 2): 73~ 94.
- 9 贾春平, 黄淑娟, 曾溢滔. 基因座控制区元件 HS<sub>2</sub>, HS<sub>3</sub> 对  $\beta$  珠蛋白基因表达的调控. 遗传学报, 2002, 29(7): 565~

570.

- 10 Ofori-Acquah S F, Lalloz M R, Layton D M. Nucleotide variation regulates the level of enhancement by hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region. Blood Cells Mol Dis, 2001, 27(5): 803~ 811.
- 11 Adekile A D, Kitundu M N, Gu L H, et al. Haplotypes in SS patients from Nigeria, characterization of one atypical beta S haplotype no. 19 (Benin) associated with elevated HbF and high G gamma levels. Ann Haematol, 1992, 65(1): 41~ 45.
- 12 Beris P, Kitundu M N, Baysal E, et al. Black beta-thalassemia homozygotes with specific sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region have high levels of fetal hemoglobin. Am J Hematol, 1992, 41(2): 97~ 101.
- 13 Adekile A D, Dimovski A J, Oner C, et al. Haplotype-specific sequence variations in the locus control region (5' hypersensitive sites 2, 3, 4) of  $\beta$ s chromosomes. Hemoglobin, 1993, 17(5): 475~ 478.
- 14 Kukreti R, B-Rao C, Das S K, et al. Study of the single nucleotide polymorphism (SNP) at the palindromic sequence of hypersensitive site (HS)4 of the human beta-globin locus control region (LCR) in Indian population. Am J Hematol, 2002, 69(1): 77~ 79.

(责任编辑: 邓大玉)