文章编号:1000-5404(2008)05-0453-03

论著

地中海贫血的产前筛查和基因诊断

包碧惠[1],胡 华[1],姚 宏[1],张晓莉[2],常 青[1] (第三军医大学西南医院:[1]妇产科,[2]检验科,重庆 400038)

摘 要:目的 分析孕妇血液学指标与地中海贫血(简称地贫)各基因型的关系,探讨地贫产前筛查的可靠依据。方法 在本院所有产前检查人群中广泛开展地贫的血液学筛查,进行阳性病例基因检测,确诊后筛查配偶,夫妇患同型地贫者进行产前诊断 疑似 β 地贫夫妇行 β 基因突变热点测序、比对,探查未知突变。结果 疑似地贫孕妇 115 例,确诊 73 例,夫妇同患 α 地贫 1 对、β 地贫 3 对,产前诊断重型地贫患儿 3 例。Hb、MCV、RBC、RDW、HbA_2 在 α、β、α/β 与 β/β 间差异有统计学意义($P<0.01$)。疑似 β 地贫的样本大多呈 2~5 个 SNP 杂合状态。结论 重庆为 β 地贫的高发区,红细胞参数和定量血红蛋白电泳是筛查地贫的重要指标,gap-PCR、PCR-RDB、基因测序可明确诊断,切实干预地贫的出生缺陷。

关键词:地中海贫血;产前筛查;基因诊断
中图法分类号:R446.9;R556.61;R714.55 文献标识码:A

Prenatal screening and genetic diagnosis of thalassemia

BAO Bi-hui[1], HU Hua[1], YAO Hong[1], ZHANG Xiao-li[2], CHANG Qing[1] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, [2]Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore reliable evidences for thalassemic prenatal screening by investigating the corresponding relationship of hematologic indexes and thalassemic genotypes in pregnant women. Methods Generally hematologic detection for thalassemia was carried out on the peripheral venous blood samples of all prenatal checked-up expectant mother. Those suspectable thalassemic sufferers were further identified by gene diagnosis, and then the husband was detected when his wife was thalassemic patient. For the couple with same thalassemia genetype, prenatal diagnosis was conducted. Genes of suspectable β-thalassemic couples were sequenced, and mutational hot spots of β-globin were studied by BLAST to explore unknown mutation. Results Totally 115 pregnant women were suspectable thalassemia, and 73 cases among them were final diagnosed. There was 1 couple of simultaneous α-thalassemia, and 3 couples of β-thalassemia. Prenatal diagnosis found 3 fetuses with serious thalassemia. Hb, MCV, RBC, RDW and HbA_2 had statistical significance between α, β, α/β and β/β ($P<0.01$). There were about 2 to 5 SNP in the suspectable β-thalassemia. Conclusion Thalassemia is quite common in Chongqing. Red cell parameters and quantitative hemoglobin electrophoresis are important in all screening indexes. Gap-PCR, PCR-RDB and genetic sequences analysis should be used to diagnose exactly so as to prevent thalassemic birth defect.

Key words: thalassemia; prenatal screening; gene diagnosis

地中海贫血(简称地贫)严重影响人类健康和出生质量,全球约 18 亿人为无明显症状的携带者,每年出生的 100 万缺陷患儿中,各类呈进行性溶血性贫血的重症地贫患儿至少 20 万[1]。我国长江以南为地贫高发区。为提高重庆市围生期保健质量,探讨以预防为主的防治方案,实现地贫携带者优生,我们将本院近 1 年确诊地贫的妊娠夫妇及胎儿的血液筛查资料进行总结,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 对象

2006 年 9 月至 2007 年 6 月在本科门诊行产前检查的孕妇共 2 310 例,红细胞指标异常并排除缺铁及其他贫血疾病,纳入疑似地贫 115 例。确诊地贫孕妇的丈夫 73 例;同型地贫夫妇的胎儿 4 例;地贫母亲的新生儿 69 例。

1.2 方法

1.2.1 筛查方法 血细胞自动分析仪平行筛查血红蛋白

作者简介:包碧惠,女,四川省广安市人,硕士,主治医师,主要从事单基因遗传疾病产前诊断方面的研究。电话:(023)68771670,E-mail:baobihui163com@163.com
通信作者:常 青,电话:(023)68765399
收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-10-08

(Hb)、平均血红蛋白(MCH)、红细胞数(RBC)、平均红细胞体积(MCV)、红细胞体积分布宽度(RDW),测定血清铁蛋白、血红蛋白 A_2(HbA_2)及抗碱血红蛋白(HbF)的含量。Hb < 110 g/L、MCH < 25 pg、MCV < 80 fl、RBC/MCV > 6、RBC/Hb > 27.7、RDW > 15.0%,血清铁蛋白正常,示地中海贫血筛查阳性。血红蛋白电泳 HbA_2 < 2.5%,示 α 地贫表型阳性;$HbA_2 \geq 3.5\%$ 或/和 HbF > 2%,示 β 地贫表型阳性;2.5% < HbA_2 < 3.5%,可疑为 α 复合 β 地贫杂合子[2];脐血电泳见 HbBart's 或 H 带,Bart's 水肿胎或 HbH 病的可能性大。

1.2.2 DNA 提取 Promega 或 TIANGEN 试剂盒提取血液筛查阳性者的 EDTA-K_2 抗凝外周静脉血、高风险胎儿的脐血或羊水、携带者分娩后的脐带血 DNA。

1.2.3 基因诊断 疑似地贫经孕妇及家属签字同意,深圳益生堂生物企业有限公司提供 α、β-地贫基因诊断试剂盒,按说明检测正常 α 基因和 $--^{SEA}$、$-\alpha^{3.7}$、$-\alpha^{4.2}$3 种常见缺失型 α 地贫和 Hb^{CS}、Hb^{QS}、Hb^{WS}、$\alpha^{\triangle CD30}$、$\alpha^{\triangle CD31}$ 和 $\alpha^{\triangle CD59}$6 种非缺失型 α 地贫以及 17 种 β 地贫:CD41-42(-TCTT)、IVS-2-654(C→T)、TATAbox-28(A→G)、CD71-72(+A)、CD17(A→T)、CD26(G→A)、CD31(-C)、CD27-28(+C)、IVS-Ⅰ-1(G→T)、CD43(G→T)、TATAbox-32(C→A)、TATAbox-30(T→C)、CD14-15(+G)、CAP+40~+43(-AACC)、TATAbox-29(A→G)、起始密码子 Int(T→G)、IVS-Ⅰ-5(G→C);试剂盒未诊断的筛查指标疑似 β-地贫的病例,进行 β 基因的突变热点测序,设计引物 Beg-F1:5′-CAGGTACGGCTGTCATCA-3′;IV654-R1:5′-AGCGAGCTTAGTGATACTTGTG-3′,按 96 ℃ 3 min→(96 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min)×30 循环→72 ℃ 10 min 扩增 β 基因的 3 个外显子和 2 个内含子共 1 613 bp,送上海英骏公司进行正、反向测序,Accelrys License Pack 进行核酸序列比对。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 血液筛查结果

115 例疑似地贫孕妇中,确诊 73 例,筛查阳性确诊率 63.5%。孕妇的丈夫患地贫 5 例、胎婴儿 34 例。

MCH 在各基因型之间差异无统计学意义($P > 0.05$);Hb、MCV、RBC 在 α、α/β(α 地贫复合 β 地贫杂合子)、β 三者两两之间差异无统计学意义($P > 0.05$),但三者与 β/β(β 地贫双重杂合子)差异均有统计学意义($P < 0.01$);RDW、HbA_2 在 α、α/β、β 三者与 β/β 差异均有统计学意义($P < 0.01$),且 RDW 在 α、α/β 与 β 间有统计学意义($P < 0.05$),HbA_2 在 α 与 β 之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 产前基因诊断结果

孕妇确诊 α 地贫 11 例、β 地贫 58 例、α/β 杂合子 3 例、β/β 杂合子 1 例,α 地贫发生率 0.61%(11+3/2310),β 地贫发生率 2.68%(58+3+1/2310);夫妇分别患 α、β 地贫 1 对,同患 α 地贫 1 对、β 地贫 3 对;重型地贫患儿 3 例,引产后再次行脐血基因诊断,符合率为 100%。

β 地贫以 CD41/42(-CTTT)、IVS-Ⅱ-654(C→T)、CD17(A→T)、CD26(G→A)最常见,其次为 CD71/72(+A)、CD27-28(+C);α 地贫多见 $--^{SEA}/\alpha\alpha$,非缺失型 $\alpha\alpha^{CS}$、$\alpha\alpha^{QS}$ 也不少。见表 2。

表 1 地贫孕妇、丈夫及患儿血液筛查指标的分布情况

分类	Hb	MCH	RBC	MCV	RDW	HbA_2
α 地贫	89.40±4.67[a]	21.70±0.94	4.40±0.64[a]	75.70±3.72[a]	17.30±1.27[ac]	3.16±0.49[ac]
β 地贫	87.10±16.56[a]	22.80±10.14	4.34±0.96[a]	69.20±5.21[a]	24.90±8.47[ab]	8.85±1.84[ab]
α/β	93.70±5.59[a]	21.50±1.31	4.45±0.80[a]	70.10±1.64[a]	16.70±1.24[ac]	5.58±1.05[a]
β/β	42.10±9.50[bcd]	20.30±2.56	2.27±0.49[bcd]	76.90±18.40[bcd]	40.20±2.60[bcd]	63.60±13.40[bcd]

a:$P < 0.01$,与 β/β 比较;b:$P < 0.01$,与 α 地贫比较;c:$P < 0.05$,与 β 地贫比较;d:$P < 0.01$,与 α/β 比较

表 2 确诊的 α、β 地贫的基因类型及人群分布

基因类型	孕妇例数	丈夫例数	胎儿例数	各基因构成比
α 杂合子				
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	7	1	3	9.9%
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	1	0	1	1.8%
$\alpha\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	2	0	1	2.7%
$\alpha\alpha^{QS}/\alpha\alpha$	1	0	0	0.9%
α/β 复合杂合子				
$\alpha\alpha^{QS}$/CD41-42	1	0	0	0.9%
$\alpha\alpha^{CS}$/CD17	1	0	0	0.9%
$\alpha\alpha^{CS}$/CD26	1	0	1	1.8%
α-纯合子($--^{SEA}/--^{SEA}$)	0	0	1	0.9%
β-杂合子				
CD41-42	17	1	9	24.3%
IVS-Ⅱ-654	14	1	4	17.1%
CD17	12	0	5	15.3%
CD26	8	2	4	12.6%
CD71-72	3	0	1	3.6%
CD27-28	2	0	1	2.7%
IntM	1	0	1	1.8%
CD43	1	0	0	0.9%
β 双重杂合子				
CD41-42/CD26	1	0	1	1.8%
CD17/CD26	0	0	1	0.9%
合计	73	5	34	100.0%

2.3 β 基因测序结果

疑似 β 地贫的 15 个样本中,11 个出现 2~5 个多态性位点(SNP):191(rs8236):CD2,CAT→CAC,T = 0.162,C = 0.838;643(rs8688):IVS-Ⅱ-16,C = 0.158,G = 0.842;701(rs8746):IVS-Ⅱ-74,A = 0.75,C = 0.25;1281(rs9236):IVS-Ⅱ-654,C、T 频率未知;1293(rs9338):IVS-Ⅱ-666,A = 0.836,G = 0.164。IVS-Ⅱ-654 C→T 的 SNP,查 HGMD,也能引起剪切突变型 β 地贫,4 个样本再次 PCR-RDB,突变探针均显色,补充诊断为 IVS-Ⅱ-654 杂合子。

3 讨论

地中海贫血按受累血红蛋白链的位置分 α 和 β 型,筛查指标 RBC、MCV、RDW、HbA_2 能反映基因型与表型之间的关系。MCV < 80 fl,80% 为缺铁性贫血与地中海贫血,是筛查中间型、轻型地贫的首选指标[3],地贫中 MCV < 80 fl 者占 76.09%[4],没有贫血表现的静止型可 MCV > 80 fl,但地贫杂合子易合并铁缺乏[5],20% 为自身免疫性疾病、慢性感染、转移性肿瘤

如 Hodgkin 淋巴瘤、特发性骨髓外化生等导致的小细胞性贫血[6]；RDW 从量化上反映红细胞形态、体积的异质性,当血红蛋白合成减少、网织红细胞增多、红细胞异形性增加、破坏增多、碎片增加均引起 RDW 升高,α 和 β 地贫的溶血程度与 RDW 值平行。

有研究表明,MCV、MCH 下降,RDW 明显升高,首先考虑重型地中海贫血；RDW 轻度升高,MCV 降低,常见于轻型 α 或 α/β 地中海贫血和缺铁性贫血；静止型 α 地贫只缺失 1 个 α 基因,尤其新生儿,含新鲜红细胞多,RDW 正常、MCV 下降；β 杂合子 RDW 轻、中度升高[7]。成人 HbA_2（$\alpha_2\delta_2$）2.3% ~3.3%,HbF（$\alpha_2\gamma_2$）1.1% ~3.1%,当 β 基因缺陷时 HbA（$\alpha_2\beta_2$）下降,δ、$^{G}\gamma$ 基因代偿性表达,HbA_2 升高,对 β 地贫的敏感性和特异性好[8],重型 β 地贫 HbA_2 增加明显、HbF 可达 30% ~90%[9]；荧光标记 HbF 的单克隆抗体检测 F 红细胞灵敏度达 0.001%,进行流式细胞术可快速、准确地大量筛查 β 地贫[10]；较低值的 HbA_2 则提示 α 地贫和缺铁性贫血[11],HbH 病 HbA_2 较 α 地贫携带者更低。当 α 复合 β 地贫时,体内 α 和 β 肽链互补,表现 HbA_2、HbF 升高等 β 地贫特征,α 地贫征被掩盖[12],故我们常将 $3.5\% < HbA_2 < 7.0\%$ 的样本补充 α 地贫基因检测,留意 β 地贫是否复合 α 地贫,避免了 1 例 HbA_2 3.8% 的 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 漏诊；HbH 病复合 β 地贫时,仍 HbA_2 升高,检不出 HbH（β_4）,因 β 链也减少[13],但本研究表明 HbA_2 在 α/β 与 α 和 β 间没显著性差异,平行各筛查指标可避免漏检。

轻型 α 地贫血红蛋白电泳可完全正常,正常新生儿 HbA_2 极少或无,HbA 仅 12 ~40%,而 HbF 可达 70 ~93%,故静止型、标准型 α 地贫及 6 个月以内婴幼儿的 β 地贫唯基因诊断能确诊；中、重型 α 地贫——HbH 病出现 5% ~40% 异常快泳 HbH 带、Hb Bart's 胎儿 80% ~90% 为 HbBart's（γ_4）及少量 HbPortland（$\zeta_2\gamma_2$）[14]；ζ 链是 $--^{SEA}$ 缺失型的标志性蛋白,改良式聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）可筛出。HbH、HbBart's、HbA、HbF、HbA_2、HbCS 泳速渐下降,当 HbA_2 量大于 10% 时,HbE（CD26）的可能性极大,可基因确诊。

gap-PCR、PCR-RDB 技术针对中国人最常见的 9 种 α 地贫、17 种 β 地贫突变型,实现了广泛的地贫基因诊断,大大提高了地贫高风险胎儿的诊断率。

β 基因突变致病位点 472 个,致 β 地贫达 300 多种,有高度异质性、明显的种族特征和地域差异,非正态分布,我国 34 种；β 基因家族的 SNP 达 70 kb/100 个。我们测序 15 个疑似 β 地贫样本,检出 4 个 IVS-Ⅱ-654 杂合子,明确了诊断,另 7 个样本呈 CD2、IVS-Ⅱ-16、IVS-Ⅱ-74、IVS-Ⅱ-666SNP 杂合状态,与贫血有无相关性？有待筛查阳性样本量、正常对照以及 RT-PCR 分析 β 肽链构象[15],或延伸扩增序列,避开引物测序峰,再灵敏地进行基因检测、分析。

我国人口基数大,残疾儿发生率高,重型地贫 Bart's 水肿胎、β^0 纯合子或双重杂合子为致死性异常,HbH 病、β^0 杂合 β^+ 是症状严重的存活型地贫,虽大部分能适应基本社会生活,但由于长期慢性溶血性贫血,导致患者肝脾肿大,生活质量极差。我们通过夫妇筛查→产前诊断→终止妊娠监控中、重型地贫患儿出生,流程简便,在围生期可操作性强,确保了出生人口质量,并避免了产科并发症和沉重的治疗负担,还让携带地贫新生儿获得必要的健康咨询和成人后的婚育指导。

参考文献：

[1] 童顺桃,雷慧中,周秀琴,等. 清远地区 10 年间胎儿、新生儿地中海贫血筛查诊断研究[J]. 现代预防医学,2006,33(6):891 -892.

[2] 吴建红,徐剑峰,李霞. 血红蛋白电泳在地中海贫血筛查中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志,2005,13(8):14,17.

[3] 张庆华. 地中海贫血的实验室诊断技术进展[J]. 广西医学,2002,24(4):487 -490.

[4] 崔　娓,周玉球,肖奇志,等. 珠海市城区 3 ~6 岁儿童常见血液病发生率的调查[J]. 中国儿童保健杂志,2006,14(4):392 -394.

[5] 陈华琼,邓　兵,游亚萍. 不同基因型地中海贫血患儿铁负荷情况的分析[J]. 第三军医大学学报,2005,27(20):2080 -2082.

[6] Tefferi A, Dingli D, Li C Y, *et al*. Microcytosis in agnogenic myeloid metaplasia: prevalence and clinical correlates[J]. Leuk Res, 2006, 30(6):677 -680.

[7] 林淑仪,区小冰,余一平. MCV、RDW 参数在筛查新生儿 α 地中海贫血中的意义[J]. 现代临床医学生物工程学杂志,2004,10(1):65.

[8] 汤丽霞,李仲笑,张　晶,等. 血红蛋白 A2 在地中海贫血筛查中的应用价值[J]. 中国循证医学杂志,2005,5(1):47 -50.

[9] 伍曼仪. 小儿贫血的实验室基础检查(三)[J]. 中国小儿血液,2005,10(6):277 -279.

[10] Barragan E, Bolufer P, Perez M L, *et al*. Molecular detection of Spanish deltabeta-thalassemia associated with beta-thalassemia identified during prenatal diagnosis[J]. Clin Chim Acta, 2006, 368(1 -2):195 -198.

[11] 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 Hb A_2[J]. 中华医学遗传学杂志,2003,20(5):421 -424.

[12] 李　坚,廖　灿,钟惠珠,等. 大人群地中海贫血产前筛查及产前诊断结果[J]. 热带医学杂志,2005,5(6):783 -785,794.

[13] 周玉球,肖奇志,黄丽娟,等. HbH 病患儿临床表现与基因型相关性的研究[J]. 中华儿科杂志,2004,42(9):693 -696.

[14] 蒙　冰,王碧玉,刘　斌. 40 例 α 地中海贫血的实验诊断及基因型[J]. 中国优生与遗传杂志,2005,13(12):25 -26.

[15] Wada T, Sakakibara M, Fukushima Y, *et al*. A novel splicing mutation of the ATRX gene in ATR-X syndrome[J]. Brain Dev, 2006, 28(5):322 -325.

（编辑　王小寒）