

罕见 α -地中海贫血的新生儿筛查与诊断

唐海深¹ 江陵¹ 陆林苑¹ 熊怡¹ 李东至²

(1. 南方医科大学附属中山市博爱医院 产前诊断中心, 广东 中山 528400;

2. 广州市妇女儿童医疗中心 产前诊断中心, 广东 广州 510623)

【摘要】 目的 探讨罕见 α -地中海贫血的新生儿筛查与诊断。方法 应用全自动毛细管电泳技术对 6525 例新生儿脐血进行血红蛋白定量分析, 有 Hb Bart's 区带的样本进行常规基因诊断 (gap-PCR 和 PCR-RDB), 对于未检出异常的样本, 用多重 PCR 技术检测 4 种罕见 α -基因缺失 ($--^{THAI}$ 、 $--^{FIL}$ 、 $--^{MED}$ 、 $-(\alpha)^{20.5}$), 用 PCR 产物直接测序法检测罕见非缺失型 α -地贫。结果 6525 例新生儿脐血样本中, 检出 Hb Bart's 阳性样本 377 例, 其中基因确诊 375 例; 包括 14 种基因型、383 个 α -地贫等位基因; 发现罕见 α -地贫 7 例, 包括 2 例 $--^{THAI}/\alpha\alpha$ 及 5 例罕见非缺失型 α -地贫; 发现 1 例 α_2 -基因突变至与 Hb Bart's 区带峰同区域的异常血红蛋白 (Hb J-Wenchang-Wuming)。结论 毛细管电泳技术定量分析血红蛋白, 准确、高效, 应作为 α -地贫高发地区的新生儿疾病筛查常规项目; 在 α -地贫高发地区应注意罕见 α -地贫的筛查与诊断, 防止漏诊导致重型地贫儿出生。

【关键词】 α -地中海贫血; 罕见; Hb Bart's; 基因

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 **Objective** To explore the methods and significance for neonatal screening and diagnosis about rare α -thalassemia. **Method** Automatic capillary electrophoresis (CE) was used to determinate Hb Bart's amount in cord blood of 6525 newborns. Samples with the presence of Hb Bart's were confirmed by routine molecular analysis (gap-PCR and PCR-RDB). For samples of unknown genotype after gap-PCR and PCR-RDB, use a Multiplex PCR to detect four kinds of deletional α -thalassemia ($--^{THAI}$, $--^{FIL}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$), then do gene sequencing for the whole α_1 -globin gene and α_2 -globin gene. **Results** Totally, 377 samples were found positive for Hb Bart's, and 375 samples were confirmed by DNA testing, including 14 genotypes with 383 α -thalassemia alleles. 7 rare α -thalassemia genes were detected, including 2 $--^{THAI}/\alpha\alpha$ and 5 rare nondeletion type of α -thalassemia. At the same time, 1 sample with Hb J-Wenchang-Wuming, witch was appear at the same position with Hb Bart's, was detected. **Conclusions** To screen for α -thalassemia, CE was proved to be an effective and accurate method. To prevent birth defects about hydrops fetalis or babies with transfusion-dependent α -thalassemia, rare α -thalassemia genotypes should be taken for suspected cases in high prevalence areas.

【Key words】 α -thalassemia; rare; Hb Bart's; gene

α -地中海贫血 (α -thalassemia, α -地贫) 是人类最常见且危害最大的单基因遗传病之一, 它是由于 α -珠蛋白基因缺失或非缺失突变使 α -珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血。正常人有 4 个 α 基因, 若 4 个 α -基因都缺失, 则完全没有 α -珠蛋白链的合成, 临床上称为血红蛋白

Bart's 胎儿水肿综合征, 胎儿一般在妊娠 23~38 周或出生后数小时死亡。另外, 一些非缺失型 HbH 病和非缺失型 α -地贫纯合子患儿贫血严重, 甚至需要输血治疗。因此在 α -地贫高危地区筛查 $--/\alpha\alpha$ 基因和非缺失型 α -地贫基因携带者尤为必要, 是识别高危人群, 预防重型地贫患儿出生的重要手段。目

前各分子实验室常规应用 gap-PCR 技术检测 3 种常见缺失型 α -地贫基因($-\alpha^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$),采用反向点杂交(RDB)技术检测 3 种常见非缺失型 α -地贫基因(α^{CS} 、 α^{QS} 及 α^{WS}),但仍可能漏诊罕见的 α -地贫,导致重型地贫儿的出生。本文探讨罕见 α -地贫的新生儿筛查与诊断。

1 资料和方法

1.1 研究对象 2010年5月至2011年7月在广州市妇女儿童医疗中心产科分娩的6525例新生儿。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 新生儿分娩断脐后,从胎盘端脐带抽取 2 ml 脐带血,EDTA-K2 抗凝,用于血红蛋白电泳及地贫基因检测。

1.2.2 毛细管电泳 Hb Bart's 定量 脐血样品先 3000 转离心 3 分钟,取 18 μ l 血细胞溶于 90 μ l 的溶血素中充分混匀后上机检测。采用法国 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪及配套试剂,在 9.8 kV 电压、pH9.4 的碱性缓冲液条件下,在石英毛细管内进行血红蛋白电泳,用 415 nm 波长检测各种血红蛋白的百分比,从而定量 Hb Bart's。电泳图谱分成 15 个区:不同的血红蛋白峰出现在特定的区域内:Hb A2=Z3, Hb F=Z7, Hb A=Z9, Hb Bart's=Z12, Hb H=Z15^[1,2]。

1.2.3 常规基因诊断 收集 Hb Bart's 阳性样本并编号,用富士 quick gene-mini80DNA 提取仪,按 DNA 提取试剂盒使用说明,提取新生儿脐血中白细胞的全基因组 DNA。采用 gap-PCR 技术检测 3 种常见缺失型 α -地贫基因($-\alpha^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$)^[3];若 gap-PCR 检测阴性,用反向点杂交(RDB)技术检测 3 种非缺失型地贫基因(Hb CS、Hb QS 和 Hb WS)^[4]。

1.2.4 罕见 α -地贫基因检测

1.2.4.1 4 种罕见的缺失型 α -地贫基因检测 对于 gap-PCR 及 PCR-RDB 方法均未检出异常的 Hb Bart's 阳性样本,参照文献设计引物(详见表 1)^[5],用一种快速可靠的多重 PCR 检测 4 种中国人群罕见的缺失型 α -地贫基因($-\alpha^{THAI}$ 、 $-\alpha^{FIL}$ 、 $-\alpha^{MED}$ 、 $-(\alpha)^{20.5}$)。PCR 反应总体积为 10 μ l,包括:5 μ l 2 \times GC buffer I、250 μ M dNTP、正反向引物各 0.16 μ M、Taq

DNA 聚合酶 0.5U、15~25 ng 基因组 DNA 模板。PCR 反应条件:96 $^{\circ}$ C 预变性 15 分钟;随后 98 $^{\circ}$ C 变性 45 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 90 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 135 秒,共 30 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟;最后 4 $^{\circ}$ C 保存。随后配置 2% 琼脂糖凝胶板,对 PCR 产物进行电泳并分析结果。

表 1 检测 4 种罕见缺失型 α -地贫基因($-\alpha^{THAI}$ 、 $-\alpha^{FIL}$ 、 $-\alpha^{MED}$ 、 $-(\alpha)^{20.5}$)的引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度
THAI-F	GACCATTCCCTCAGCGTGGGTG	1 153 bp
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	546 bp
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	807 bp
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	1 007 bp
20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	

1.2.4.2 罕见非缺失型 α -地贫基因检测 挑出通过以上方法仍未知基因型的 Hb Bart's 阳性样本。从 UCSC 数据库(<http://genome.ucsc.edu>)中获取 α -珠蛋白基因(α_1 -和 α_2 -基因)的 DNA 序列。应用 LightScanner Primer Design 软件设计两对引物,分别扩增 α_1 -和 α_2 -珠蛋白基因(包含 3 个外显子及部分上游和下游序列),引物序列详见表 2,引物委托华大基因合成。PCR 扩增: α_1 -和 α_2 -基因的 PCR 反应体系相同,总体积为 50 μ l(包括:25 μ l 2 \times GC buffer I、750 μ M dNTP、正反向引物各 6.4 pM、Taq DNA 聚合酶 2.0U、100ng 基因组 DNA 模板)。扩增 α_1 -基因的 PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟;随后 95 $^{\circ}$ C 变性 40 秒,62.5 $^{\circ}$ C 退火 40 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 100 秒,共 35 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟;最后 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增 α_2 -基因的 PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟;随后 95 $^{\circ}$ C 变性 40 秒,65 $^{\circ}$ C 退火 40 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 100 秒,共 35 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟;最后 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增完成后,先取 2~3 μ l 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,确定成功扩增并获得特异性片段后,将剩余 PCR 产物送华大基因用 PCR 产物直接测序法检测 α -基因(α_1 -和 α_2 -基因)全长。用 chromas 及 clustalx 软件分析 DNA 测序结果。

表 2 α-珠蛋白基因全长测序所用的引物

α-基因	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度
alpha1	AF	TGGAGGGTGGAGACGTCCTG	1 089 bp
	A ₁ R	GCCTGGCACGTTTGCTGAG	
alpha2	AF	GCCTGGCACGTTTGCTGAG	1 085 bp
	A ₂ R	CCATTGTTGGCACATTCGG	

1.2.5 统计 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。

2 结 果

2.1 Hb Bart's 阳性率及 α-地贫的人群携带率在 6525 例新生儿脐带血样本中,检出 Hb Bart's 阳性样本 377 例(Hb Bart's 含量为 0.1%~22.5%),阳性检出率为 5.78%。377 例 Hb Bart's 阳性样本中,共检出 14 种 α-地贫基因型 375 例,α-地贫的人群携带率为 5.75%(375/6525)。375 例确诊的 α-地贫携带者中包括双重杂合子 8 例,即 α-地贫等位基因为 383 个,α-地贫基因携带率为 5.87% (383/6525)。

2.2 Hb Bart's 含量与常见 α-地贫基因型的关系 α⁺-地贫(1 个 α-基因缺陷)的 Hb Bart's 的含量为 0.55%±0.29%,其中-α^{3.7}/αα、-α^{4.2}/αα、α^{CS}α/αα、α^{QS}α/αα 的 Hb Bart's 含量分别为 0.39%±0.21% (0.10%~0.90%)、0.50±0.16 (0.20~0.90)、1.59%±0.32% (1.00%~2.30%)、0.48%±0.18% (0.20%~0.70%);α⁰-地贫(2 个 α-基因缺陷)的 Hb Bart's 的含量为 3.54%±0.79%(1.0~8.6);HbH 病(3 个 α-基因缺陷)的 Hb Bart's 的含量为 20.27%±1.72%(17.5~22.5)。

2.3 罕见 α-地贫基因型及 Hb Bart's 含量 全部 377 例 Hb Bart's 阳性样本经 gap-PCR 及 RDB 技术检测以后,检出 368 例常见 α-地贫基因型,剩余 9 例样本未检出异常,另外有 1 例检测基因型为-α^{4.2}/αα 的样本 Hb Bart's 含量为 4.6%。将上述 10 例样本全部挑出,用多重 PCR 检测 4 种中国人罕见的缺失型 α-地贫基因(--^{THAI},--^{FIL},--^{MED},-(α)^{20.5}),检出 2 例--^{THAI}/αα。对于剩余 8 例样本用

PCR 产物直接测序法检测 α₁-和 α₂-珠蛋白基因的全长,共检出 5 例 4 种罕见 α-基因突变:[α₁ CD62 Val→Ala, GTG>GCG]、[α₂ CD8 (-C)]、[α₁ CD117/CD118(+ATC)]、[α₂ CD31 Arg→Lys, AGG>AAG]。Hb Bart's 含量 4.6% 通过 gap-PCR、PCR-RDB 及多重 PCR 技术检测基因型为-α^{4.2}/αα 的样本,进行了 α-基因全长测序,检出 α₂-基因突变(α₂ CD11 AAG>CAG)至与 Hb Bart's 区带峰同区域的异常血红蛋白(HB J-Wenchang-Wuming),详见表 3。

表 3 罕见 α-地贫基因型及其 Hb Bart's 含量

基因型	例数	% Hb Bart's
-- ^{THAI} /αα	2	4.7;4.6
α ₁ CD62 GTG>GCG	1	0.3
α ₂ CD8 (-C)	1	0.4
α ₁ CD117/CD118(+ATC)	2	0.4;0.9
α ₂ CD31 AGG>AAG	1	0.9
-α ^{4.2} /α ₂ CD11 AAG>CAG	1	4.6
αα/αα*	2	0.3;0.6

* 血红蛋白电泳符合 α⁺-地贫,但是基因检测未见异常。

2.4 α-地贫等位基因的组成 在 383 个 α-地贫等位基因中,包括东南亚缺失型(--^{SEA}) 263 例、-α^{3.7} 69 例、-α^{4.2} 22 例、α^{CS}α12 例、α^{QS}α10 例,罕见 α-地贫 7 例,详见表 4。

表 4 383 个 α-地贫等位基因的组成

等位基因	例数	频率(%)
-- ^{SEA}	263	68.67
-α ^{3.7}	69	18.02
-α ^{4.2}	22	5.74
α ^{CS} α	12	3.13
α ^{QS} α	10	2.61
-- ^{THAI}	2	0.52
α ^T α(αα ^T)	5	1.31
	383	100

3 讨 论

由于人类珠蛋白基因的表达具有时空顺序性,人在不同发育时期血红蛋白组成不同,成人期血红蛋白组成为:HbA(α₂β₂):96.5%~97.5%,HbA₂(α₂δ₂):2.5%~3.5%,HbF(α₂γ₂):0~1.0%;正常新生儿的血红蛋白组成大约为:HbF(α₂γ₂):70%~

80%, HbA($\alpha_2\beta_2$):20%~30%。若 α -珠蛋白链减少或缺乏会导致 γ -珠蛋白链的相对增多,未与 α -链结合的 γ -链聚合成Hb Bart's(γ_4)。自1958年Ager等发现脐血中存在Hb Bart's以来,此成分与 α -珠蛋白基因缺陷间的关系引起了许多学者的关注。由于Hb Bart's于出生3~6个月后即消失,理论上 α -地贫的筛查最适合于新生儿期进行。

本研究应用法国Sebia公司Capillarys 2全自动毛细管电泳仪对新生儿脐血进行血红蛋白电泳Hb Bart's定量,377例Hb Bart's阳性样本中(Hb Bart's含量为0.1%~22.5%),有375例经基因分析确诊为 α -地贫。经分析Hb Bart's的含量随着 α -基因缺陷(缺失或突变)个数的增加而升高:HbH病的Hb Bart's含量均大于10%; α^0 -地贫的Hb Bart's的含量均大于1%且小于10%; α^+ -地贫中, $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$ 的Hb Bart's含量均大于1%,其他类型的 α^+ -地贫携带者Hb Bart's含量均小于1%。因此,以脐血Hb Bart's阳性为指标,对新生儿进行 α -地贫筛查,灵敏度高;同时,全自动毛细管电泳技术分离定量Hb Bart's具有简便、高效、准确的特点,在 α -地贫高发地区,该技术应常规应用于新生儿 α -地贫筛查,以减少出生缺陷,提高人口素质。

2010年Munkongdee T等^[1]对587例泰国新生儿脐血进行毛细管电泳电泳Hb Bart's定量筛查 α -地贫。研究显示,缺失1、2、3个 α -基因的 α -地贫携带者,其脐血Hb Bart's含量分别为0.5%±0.2%、4.6%±0.5%、20.1%;该研究还显示,以Hb Bart's含量0.2%为界,区分正常人与 α^+ -地贫携带者的效率最高。本研究结果中Hb Bart's的含量与基因缺陷个数的关系与Munkongdee T的研究相符,但是,本研究以Hb Bart's含量0.1%为界区分正常人与 α -地贫携带者,Hb Bart's阳性样本377例,即有375例经基因分析确诊为 α -地贫。2例Hb Bart's阳性的样品未知基因型(Hb Bart's含量分别为0.60%、0.30%),还可能存在 $-\alpha^{3.7}$ 及 $-\alpha^{4.2}$ 以外的其他罕见缺失型 α^+ -地贫未检测到^[9],或存在直接测序法检测 α_1 -和 α_2 -基因全长无法检测到的,影

响 α -基因表达的上游突变所致的非缺失型 α^+ -地贫或Z12区段异常血红蛋白。此外,其中4例Hb Bart's含量为0.1%样本基因检测均为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 。因此,新生儿脐血毛细管电泳Hb Bart's含量0.1%应作为区分正常人与 α -地贫携带者的指标。

本研究检出的383个 α -地贫等位基因中,3种常见的缺失型 α -地贫($-\alpha^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$)共354例,3种常见的非缺失型 α -地贫($\alpha^{CS}\alpha$ 、 $\alpha^{QS}\alpha$ 、 $\alpha^{WS}\alpha$)共22例。用多重PCR检出2例 $-\alpha^{THAI}/\alpha\alpha$ 。通过用PCR产物直接测序法检测 α_1 -和 α_2 -珠蛋白基因的全长,共检出5例4种罕见非缺失型 α -地贫。可见广州地区罕见 α -地贫(包括罕见非缺失型 α -地贫与4种罕见缺失型)的发病率为0.1%(7/6525)。联合应用gap-PCR技术和反向点杂交技术能检测出约98%(376/383)的 α -地贫,仍有2%(7/383)左右的罕见 α -地贫漏诊,因此日常临床应注意罕见 α -地贫的筛查与诊断,防止重型地贫儿的出生。

在研究进行过程中,1例血红蛋白电泳显示Hb Bart's区带峰的血红蛋白含量为4.6%的样本通过gap-PCR、PCR-RDB及多重PCR技术检测基因型为 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$,回顾查看其父母的血常规:双方Hb、MCV、MCH均在正常范围。随后便对此例样本进行了 α -基因全长测序,发现 α_2 -基因突变(CD11 Lys→Gln, AAG>CAG),导致产生异常血红蛋白(Hb J-Wenchang-Wuming),此血红蛋白在毛细管电泳时与Hb Bart's区带峰区域相同。可见,脐血Hb Bart's是新生儿 α -地贫筛查的敏感指标,但临床上应将血常规、血红蛋白电泳与基因诊断相结合,同时应注意Hb Bart's区带峰同区域的异常血红蛋白,以降低假阳性带来的不良影响。

参 考 文 献

- [1] Munkongdee T, Pichanun D, Butthep P, et al. Quantitative analysis of Hb Bart's in cord blood by capillary electrophoresis system[J]. Ann Hematol, 2011, 90(7):741-746.
- [2] 李志玖, 郑芳, 燕平, 等. 跨越断裂位点 PCR 检测 α -地中海贫血基因缺失[J]. 郧阳医学院学报, 2009, 28(5): 451-452.

456.

[3] 郭广洲, 陈延娥, 廖生贇, 等. 应用反向点杂交法检测 α -地中海贫血点突变[J]. 热带医学杂志, 2008(8):785-787.

[4] Tan AS, Quah TC, Low PS, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia[J]. Blood, 2001, 98(1):250-251.

[5] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong province: implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5):517-522.

[6] Liao C, Li J, Li DZ. Fetal anemia and hydrops associated with homozygosity for hemoglobin Quong Sze[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(9):862-864.

[7] Li DZ, Liao C, Li J, et al. Hemoglobin H hydrops fetalis syndrome resulting from the association of the α -SEA deletion and the alpha Quong Sze alpha mutation in a Chinese woman [J]. Eur J Haematol, 2005, 75(3):259-261.

[8] 张俊武, 龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2003:212-215.

编辑: 邹刚
(收稿日期: 2013-12-05)

读者 · 作者 · 编者

本刊对于稿件规范用语的要求

1. 摘要 论著性文章需附中、英文摘要, 均为 500 字(词)以上。摘要必须包括目的、方法、结果(列出主要数据)、结论 4 部分, 各部分冠以相应的标题。英文摘要应包括文题、文中所有作者姓名(汉语拼音)、单位名称、所在城市及邮政编码, 其后加列国名。

2. 关键词 论著需分别在中、英文摘要后标引 2~5 个中、英文关键词。请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中医学主题词表(MeSH)内所列的词。如果无相应的词, 可按下列方法处理: ① 可选用直接相关的几个主题词进行组配; ② 可根据树状结构表选用最直接的上位主题词; ③ 必要时, 可采用习用的自由词并列于最后。关键词中的缩写词应按 MeSH 表还原为全称, 如“HbsAg”应标引为“乙型肝炎表面抗原”。关键词之间用“;”分隔, 每个英文关键词首字母大写。

3. 医学名词和药物名称: 医学名词以 1989 年及其以后由全国自然科学名词审定委员会审定并公布、科学出版社出版的《医学名词》和相关学科的名词为准, 尚未公布者以人民卫生出版社所编《英汉医学词汇》为准。中文药物名称应使用化学工业出版社 1995 年出版的《中华人民共和国药典》或卫生部药典委员会编写的《中国药品通用名称》中的名称, 英文药物名称则采用国际非专利药名, 不用商品名。

4. 缩略语文中尽量少用。必须使用时于首次出现处先列出其全称, 然后括号注出中文缩略语或英文全称及其缩略语, 后两者间用“,”分开。

5. 计量单位执行国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》, 并以单位符号表示, 具体使用参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用(第 3 版)》一书。首次出现不常用法定计量单位时在括号内注明与旧制单位的换算关系。量的符号一律用斜体字母, 如吸光度(旧称光密度)的符号为 A。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部