

· 短篇论著 ·

东莞地区地中海贫血产前筛查及产前诊断的研究

何怡 娄季武 唐莉 刘彦慧 隗伏冰

【摘要】 目的 探讨广东省东莞地区开展地中海贫血筛查及产前诊断的意义。**方法** 2012年1~12月,选择7家医院接受正规产检的夫妇共20 083名,首先以血常规、血红蛋白电泳进行地中海贫血筛查,筛查阳性者采用跨越断裂点的PCR(gap-PCR)、反向斑点杂交(reverse dot blotting, RDB)技术进行地中海贫血基因分析,对夫妇双方携带同类型地中海贫血基因的孕妇进行产前诊断。**结果** 检出 α -地中海贫血基因携带者862例(4.29%),其中广东省户籍473例(8.41%),外省户籍389例(2.69%); β -地中海贫血基因携带者352例(1.75%),其中广东省户籍141例(2.51%),外省户籍211例(1.46%)。夫妇双方均为同类地中海贫血基因携带者93对,其中 α -地中海贫血70对, β -地中海贫血23对,接受介入性产前诊断89对,检出中重型 α -地中海贫血19例和重型 β -地中海贫血5例,共24例。**结论** 广东省东莞地区是各省人口聚集地,地中海贫血发生率较高,广泛地开展地中海贫血的筛查及产前诊断对降低新生儿出生缺陷率,提高人口素质具有重要意义。

【关键词】 地中海贫血; 遗传筛查; 产前诊断

地中海贫血是一组世界上最常见及发病率最高的严重威胁人类健康的致死、致残的遗传性血液病,重度地中海贫血患儿目前无理想的治疗方法,常导致早产、死胎(胎儿水肿综合征)或幼儿早年死亡,孕妇本人也常合并严重并发症^[1]。给家庭和社会带来沉重的经济负担及精神负担。东莞是珠三角经济最发达地区之一,人口聚多而复杂,本课题联合7家医院开展地中海贫血筛查、诊断和产前诊断,以期获得本地区地中海贫血发病特点,为降低出生缺陷积累资料。

一、资料与方法

1. 病例来源:2012年1~12月,收集在医院进行正规产检的夫妇20 083例,这些病例来源于东莞市妇幼保健院、东莞市人民医院、东莞市东华医院、东莞市石龙人民医院、东莞市厚街医院、东莞市大朗医院和东莞市长安医院。

2. 主要设备和试剂:日本,XT-2000i全自动血球分析仪;法国,Sebia Capillarys2血红蛋白电泳仪;美国ABI9700PCR仪。地中海贫血基因检测试剂由深圳亚能生物有限公司提供;血红蛋白分析试剂由法国Sebia公司提供。

3. 地中海贫血的筛查方法:所有孕妇及配偶行血常规和血红蛋白电泳分析,如MCV<80 fl和(或)MCH<27 pg, HbA2<2.5%,或出现异常血红蛋白带(HbH, HbBarts),判断为 α -地中海贫血表型阳性;如MCV<80 fl和(或)MCH<27 pg, HbA2>3.5%,则判断为 β -地中海贫血表型阳性。

4. 基因诊断方法:对筛查为阳性的病例进一步行基因诊断,对地中海贫血基因鉴定采用跨越断裂点的PCR(gap-PCR)方法检测中国人群常见的3种缺失型 α -地中海贫血基因($-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 与 $-\alpha^{4.2}$)。采用反向点杂交(reverse dot blotting, RDB)技

术检测非缺失型 α 地中海贫血突变(Hb WS、Hb CS与Hb QS)与17种 β 地中海贫血点突变,包括-28M, -29M, 14-15M, 17M, 41-42M, 43M, β -EM, 27/28M, IVS1-1M, IVS1-5M, IntM, 30M, 31M, 32M, CAP, 71/71M, 654M。以上检测均采用深圳亚能公司生产的地中海贫血基因检测试剂盒,按照说明书进行操作。我们根据Gap-PCR技术原理对由基因缺失突变导致的 $\delta\beta$ -地中海贫血[Chinese中国型 $\text{G}_\gamma^+(\text{A}_\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血]根据文献^[2]进行引物设计。PCR引物具体为: $\text{G}_\gamma^+(\text{A}_\gamma\delta\beta)^0$ 缺失公用上游引物(F):CCAGCCTCATGGTAGCAGAATC; $\text{G}_\gamma^+(\text{A}_\gamma\delta\beta)^0$ 缺失突变下游引物(RM):TGGTATCTGCAGCAGTTGCC; $\text{G}_\gamma^+(\text{A}_\gamma\delta\beta)^0$ 缺失正常内对照下游引物(RW):GTGATTGTTGAGTTGCAA GATCG,缺失扩增目的片段:211 bp,缺失正常内对照扩增目的片段:298 bp。PCR扩增体系为25 μl :12.4 μl 灭菌双蒸水,2.5 μl 10 \times PCR缓冲液,2.0 μl 2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μl 10 pmol/ μl F,0.8 μl 10 pmol/ μl RM,1.5 μl 10 pmol/ μl RW,1.0 μl 2 U/ μl Taq酶,再加入4.0 μl 基因组DNA。扩增循环参数为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性5 min后进入循环反应,94 $^\circ\text{C}$ 45 s \rightarrow 60 $^\circ\text{C}$ 30 s \rightarrow 72 $^\circ\text{C}$ 30 s,35个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸7 min。取5 μl PCR产物加1 μl 6 \times 上样缓冲液,标准DNA分子量标记,于1.0%琼脂糖凝胶,5 V/cm电压电泳60~90 min后,将琼脂糖凝胶放入凝胶成像系统上观察结果。

5. 介入性产前诊断:孕早期(孕11~13⁺6周)行绒毛穿刺获取绒毛组织、孕中期(孕15~22周)行羊膜腔穿刺获取羊水,然后对绒毛组织或羊水细胞进行地中海贫血基因检测;孕周超过22周可通过超声下脐静脉穿刺抽取胎血进行血液学及基因诊断。

二、结果

20 083名受检者中广东省户籍5627人,占总人数28.02%,外省户籍14 456人,占总人数71.98%;检出 α -地中海贫血基因携带者862例,检出率4.29%(广东省户籍473例,检出率8.41%,外省户籍389例,检出率2.69%),其中 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ 610

例, 占 α -地中海贫血所有突变类型的 70.77%, 是东莞地区 α -地中海贫血主要类型, 基因型分布见表 1; β -地中海贫血携带者 352 例, 检出率 1.75% (广东省 141 例, 检出率 2.51%, 外省户籍 211 例, 检出率 1.46%), 其中 $\beta^{CD41-42(-TTCT)}/\beta$ 148 例、 $\beta^{IVS-II-654(C \rightarrow T)}/\beta$ 89 例、 $\beta^{CD17(A \rightarrow T)}/\beta$ 51 例、 $\beta^{28(A \rightarrow G)}/\beta$ 29 例、 $\beta^{CD71-72(+A)}/\beta$ 8 例, 共 325 例, 占有所有 β -地中海贫血突变类型的 92.33%, 其中一例为 $\delta\beta$ 地中海贫血 [Chinese G_{γ}^+ ($A_{\gamma}\delta\beta$)⁰ 缺失], 基因型分布见表 2。夫妇双方均为同类地中海贫血基因携带者的 93 对 (同为 α -地中海贫血 70 对, 包括 3 例 β 合并 α -地中海贫血双重杂合子; 同为 β -地中海贫血 23 对), 89 对接受介入性产前诊断, 3 对拒绝介入性诊断而选择动态追踪胎儿彩色多普勒超声检查, 其中 2 例分别于孕 20 周及孕 24 周时超声诊断为胎儿水肿综合征而终止妊娠, 引产后脐血地中海贫血基因分析证实为重度 α -地中海贫血, 另一例出生后证实为 α -地中海贫血基因携带

者。89 例接受介入性产前诊断的样本中检出中重型 α -地中海贫血 19 例 (其中 Bart's 水肿胎 16 例, $--^{SEA}/\alpha^{QS}\alpha$ 2 例, $--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$ 1 例) 和重型 β -地中海贫血 5 例, 共 24 例, 见表 3, 孕妇及家属在知情同意原则均选择终止妊娠。

表 3 α 及 β -地中海贫血产前诊断结果[例, (%)]

类型	正常	轻型地中海贫血基因携带者	重型地中海贫血胎儿	合计
α -地中海贫血	20(28.99)	30(43.48)	19(27.54)	69(100)
β -地中海贫血	6(26.09)	12(52.17)	5(21.74)	23(100)

三、讨论

地中海贫血主要是由于珠蛋白基因的缺失或点突变使珠蛋白基因的表达受到抑制, 引起相应的珠蛋白链合成减少甚至完全不能合成, 导致血红蛋白合成缺陷, 红细胞易破裂从而引发溶血性贫血^[1]。我国长江以南各省是地中海贫血的高发区, 而广东、广西、海南、台湾、香港等地区该病发生率尤其高, 受累人口超过 2 亿, 是全球最大的单基因遗传病^[2-5], 目前对重型地中海贫血尚缺乏有效的治疗方法, 重型 α -地中海贫血大多数孕中晚期胎儿宫内死亡, 重型 β -地中海贫血只能依靠规范长期输血和应用铁螯合剂治疗, 给家庭和社会带来沉重的负担, 除非找到合适的供体进行造血干细胞移植才有彻底治愈的希望, 但目前找到合适的供体非常难, 难以成为常规治疗手段, 所以应用 DNA 分析技术对该病进行早期产前诊断并选择性终止妊娠防止重型地中海贫血患儿的出生, 是目前国际上公认的首选办法, 有着重要的优生学意义^[2-3]。此类计划已在地中海地区 (意大利、希腊、塞浦路斯和撒丁尼亚岛等) 进行了成功的实践, 并取得了显著社会效益^[1], 中国南方各地区也逐步关注地中海贫血的产前筛查和诊断研究工作^[6], 各地区在研究中获得宝贵经验, 这对大规模开展地中海贫血防治工作具有重要意义。

流行病学资料显示, 广东人群 α -地中海贫血和 β -地中海贫血基因携带率分别为 8.53% 和 2.54%^[4], 东莞地区居住人群以流动人口为主, 通过对 20 083 名孕妇进行检测, 发现 α -地中海贫血杂合子和 β -地中海贫血基因携带者的总检出率分别为 4.29% 和 1.75%, 低于广东流行病学调查结果, 若剔除外省病例的重新计算则检出率分别 8.41% 和 2.51%, 与广东流行病学调查结果基本一致。

文献显示, 中国人最常见的 α^0 -缺失型地中海贫血基因型为 $--^{SEA}/\alpha\alpha$, 最常见的 α^+ -缺失型地中海贫血基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$; 本研究中检出 $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 610 例, 占 α -地中海贫血所有突变类型的 70.77%, 是东莞地区 α -地中海贫血的主要类型, 检出 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 94 例, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 39 例, 分别占 α -地中海贫血所有突变类型的 10.90% 及 5.22%, 与流行病学统计资料相符; 同时检出 17 种 β -地中海贫血基因突变类型及 1 种 β -地中海贫血基因缺失类型 ($\delta\beta$ 地中海贫血), 检出 $\beta^{CD41-42(-TTCT)}/\beta$ 148 例、 $\beta^{IVS-II-654(C \rightarrow T)}/\beta$ 89 例、 $\beta^{CD17(A \rightarrow T)}/\beta$ 51 例、 $\beta^{28(A \rightarrow G)}/\beta$ 29 例、 $\beta^{CD71-72(+A)}/\beta$ 8 例, 共 325 例, 占有所有 β -地中海贫血突变类型的 92.33%, 与流行病学统计资料接近^[4]。

β -地中海贫血主要是由 β -珠蛋白基因突变所引起, 少部分由 β -珠蛋白基因缺失所引起, 我国目前已报道了 5 种缺失型 β -

表 1 α -地中海贫血各基因突变类型及频率

基因型	突变例数	突变频率(%)
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	610	70.77
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	94	10.90
$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	45	5.22
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	39	4.52
$\alpha^{WS}\alpha/\alpha\alpha$	23	2.67
$\alpha^{QS}\alpha/\alpha\alpha$	14	1.62
$--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$	12	1.39
$--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$	8	0.93
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	5	0.58
$--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$	3	0.35
$--^{SEA}/\alpha^{WS}\alpha$	3	0.35
$-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$	2	0.23
$--^{SEA}/\alpha^{QS}\alpha$	1	0.12
$--^{SEA}/-\alpha$	1	0.12
$\alpha^{QS}\alpha/\alpha^{QS}\alpha$	1	0.12
$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	1	0.12
合计	862	100

表 2 β -地中海贫血各基因突变类型及频率

基因型	突变例数	突变频率(%)
$\beta^{CD41-42(-TTCT)}/\beta$	148	42.05
$\beta^{IVS-II-654(C \rightarrow T)}/\beta$	89	25.28
$\beta^{CD17(A \rightarrow T)}/\beta$	51	14.49
$\beta^{28(A \rightarrow G)}/\beta$	29	8.24
$\beta^{CD71-72(+A)}/\beta$	8	2.27
$\beta^{E(G \rightarrow A)}/\beta$	7	1.99
$\beta^{CD43(G \rightarrow T)}/\beta$	6	1.70
$\beta^{29(A \rightarrow G)}/\beta$	4	1.14
$\beta^{IVS-I-1(G \rightarrow T)}/\beta$	3	0.85
$\delta\beta$ 地中海贫血(chinese 缺失)	1	0.28
β^{csp}/β	1	0.28
$\beta^{CD14-15(+G)}/\beta$	1	0.28
$\beta^{CD27-28(+C)}/\beta$	1	0.28
$\beta^{CAP}/\beta^{CD41-42(-TTCT)}$	1	0.28
$\beta^{28(A \rightarrow G)}/\beta^{E(G \rightarrow A)}$	1	0.28
$\beta^{28(A \rightarrow G)}/\beta^{28(A \rightarrow G)}$	1	0.28
合计	352	100

地中海贫血,均为大片段缺失^[2],缺失型 β -地中海贫血用反向点杂交法(RDB)无法检出,如果没有结合生育史和家系、临床分析容易漏诊,本研究中检出一例 $\delta\beta$ 地中海贫血[Chinese^G γ^+ ($\Delta\gamma\delta\beta$)⁰缺失],配偶同为 β -地中海贫血[基因型为 $\beta^{\text{CD17(A}\rightarrow\text{T})}/\beta$],行羊膜腔穿刺抽取羊水进行胎儿地中海贫血基因检测证实为 $\beta^{\text{CD17(A}\rightarrow\text{T})}/\beta^{\text{Chinese}}$ 双重杂合子,于孕21周时终止妊娠,有效避免了重型 β -地中海贫血患儿的出生。

HbH病的产前诊断和选择性流产尚未被公认,所以其医学实践需慎重考虑。鉴于一些严重类型的HbH病患者(如 $-\text{SEA}/\alpha^{\text{QS}}\alpha$ 、 $-\text{SEA}/\alpha^{\text{CS}}\alpha$),需依赖输血和去铁治疗,生存质量明显下降^[7],且有文献报道部分的 $-\text{SEA}/\alpha^{\text{T}}\alpha$ (突变型的HbH病)表型很重,可于孕晚期表现为胎儿水肿综合征^[8-9],当夫妇面临其胎儿有这种疾病风险,要求产前诊断且同意接受对HbH病胎儿终止妊娠操作时,其选择应得到尊重^[10-12]。本研究中对按照遗传学规律可能出现严重类型的HbH病的孕妇及家属在产前诊断前均详细交代此类患儿表型重,需长期输血治疗及服用铁螯合剂治疗,生存质量明显下降,孕妇及家属均要求产前诊断及终止严重类型的HbH病患者妊娠,本课题通过介入性诊断确诊2例 $-\text{SEA}/\alpha^{\text{QS}}\alpha$ 和1例 $-\text{SEA}/\alpha^{\text{CS}}\alpha$,孕妇及家属均要求终止妊娠。

本研究中夫妻双方为同型地中海贫血的93对,理论上此类配偶生育重型地中海贫血的风险率为25%,有89对高风险夫妇自愿接受产前诊断,检出Bart's水肿胎16例,重型 β -地中海贫血5例,共21例,占23.6%较理论值稍低,被检出的重型地中海贫血胎儿均终止妊娠,有效地避免了重型地中海贫血儿的出生。

对人口大国来讲,通过产前筛查和遗传咨询,对高风险夫妇进行产前诊断,应该是更适合我国国情的地中海贫血防治方案,因为婚前筛查及跟踪随访等需要更多的资源配置。所以广泛地开展地中海贫血的产前筛查及产前诊断对降低新生儿出生缺陷率,提高人口素质具有重要意义。本研究联合东莞市6家医院,对到院正规产检的夫妇进行常规地中海贫血筛查,对地中海贫血筛查阳性的高危人群通过网络转诊到具备产前诊断资质的东莞市妇幼保健院进行基因检测,对夫妻双方携带同类型

地中海贫血孕妇进行产前诊断,实践证实充分利用三级妇幼保健网络,加大地中海贫血知识的普及及宣传工作力度,构建更完善的孕妇产前筛查与产前诊断的地中海贫血干预模式对减少重度地中海贫血儿的出生是适合我国国情的重要措施,值得推广。

参 考 文 献

- [1] Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*, 2008, 8: 592-599.
- [2] 周玉球,周万军. 地中海贫血的实验室诊断//徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南.北京:人民军医出版社,2011:111-115.
- [3] Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*, 2008, 86: 480-487.
- [4] 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 Clin Pathol*, 2004, 57: 517-522.
- [5] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China. *Clin Genet*, 2010, 78: 139-148.
- [6] 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. *热带医学杂志*, 2005, 6: 783-785.
- [7] Lal A, Goldrich ML, Haines DA, et al. Heterogeneity of Hemoglobin H Disease in Childhood. *N Engl J Med*, 2011, 364: 710-718.
- [8] Li DZ, Liao C. A case of transfusion-dependent nondeletional Hb H disease undiagnosed during prenatal screening for thalassaemia. *Prenat Diagn*, 2008, 28: 165-166.
- [9] Li D, Liao C, Li J. Misdiagnosis of Hb constant spring (alpha142, Term \rightarrow Gln, TAA \rightarrow CAA in alpha2) in a Hb H (beta4) disease child. *Hemoglobin*, 2007, 31: 105-108.
- [10] 徐湘民,蔡望伟,孙竞. 血液系统疾病遗传咨询//陆国辉,徐湘民. 临床遗传咨询. 北京:北京大学医学出版社,2007:237-244.
- [11] 贾冰,林志芳,纪新梅,等. 常用筛查方法在地中海贫血诊断中的临床应用. *检验医学与临床*, 2010, 7: 1339-1340.
- [12] 欧阳辉,邓杨富. 脐血血红蛋白电泳在地中海贫血诊断中的应用. *检验医学与临床*, 2009, 6: 729-730.

(收稿日期: 2013-06-27)

(本文编辑: 戚红丹)