



Gap-PCR作为临床一线 α -地中海贫血携带者筛查技术的应用评价

α -地中海贫血(简称 α -地贫)是由于 α -珠蛋白基因的缺陷致 α -珠蛋白肽链缺如或合成不足所引起的遗传性血液病。其基因突变具有高度的异质性,主要为 α -珠蛋白基因大片断缺失(缺失型),少数为碱基替代、几个核苷酸缺失或插入(非缺失型)[1]。目前世界上已报道了至少50种不同种族人群中的缺失型 α -地贫基因,中国人中有7种[2],其中--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ 为中国人最常见的 α -地贫突变类型。--SEA基因自身或与 $-\alpha^{3.7}$ (或 $-\alpha^{4.2}$)基因相互组合可分别产生致死性的Hb Bart's水肿胎和严重影响生存质量的HbH病[2]。鉴于我国南方人群中 α -地贫基因有很高的携带率[3],且此病尚无理想的根治方法,通过人群筛查和遗传咨询,对那些携有 α -地贫基因的高风险家族实施产前诊断,是当前条件下控制 α -地贫重症患儿出生的首选途径。传统的 α -地贫血液学筛查法,是基于红细胞指数和血红蛋白电泳等多指标的综合分析法,虽可检出标准型 α -地贫携带者,但却存在漏检在人群中占相当比重的静止型 α -地贫的缺陷;而经典的诊断缺失型 α -地贫的Southern blotting技术虽然准确、可靠,但也存在操作复杂、耗时、需使用同位素等诸多弊端,使其难以用于临床实验室的筛查工作。本室基于跨越断裂点扩增策略[4]而建立的gap-PCR方法,可简便快速检测中国人常见的3种缺失型 α -地贫突变(--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$)基因[5][6]。本文尝试将在特异性和可操作性上较血液学分析法具有优势的这一技术,用于临床一线筛查 α -地贫个体,以期为 α -地贫的人群筛查提供新的技术选择。

1 材料和方法

1.1 研究对象

受检者为在院行例行婚检的珠海市户籍待婚青年,共随机采集样本382例,其中男性167例,女性215例。

1.2 方法

1.2.1 α -地贫的筛查策略 采用血液学筛查法和gap-PCR法对样品分别进行表型筛查和基因型分析,以双盲法进行。

1.2.2 α -地贫的表型筛查 诊断 α -地贫主要依据红细胞指数和HbA₂定量测定,辅以血清铁和血清铁蛋白检查以排除缺铁性贫血。红细胞指数测定采用全自动血细胞计数仪(MAX-M-Coulter,意大利);HbA₂定量采用微柱法(美国Helena Laboratories公司)。血清铁测定采用比色法;铁蛋白的测定采用化学发光法检测试剂盒(Automatic Chemiluminescence System, Chiron Diagnosis Corp.,美国)进行。

α -地贫表型阳性样品的诊断指标为:MCV<82 fl和/或MCH<27 pg;HbA₂和抗碱血红蛋白正常(分别<3.0%和 \leq 2.0%);血清铁 \geq 10.7 μ mol/L和铁蛋白 \geq 14 μ g/L。在上述MCV和/或MCH指标阳性时,若HbA₂ \geq 3.5%,则诊断为 β -地贫表型阳性。缺铁性贫血的诊断标准见文献[7]。

1.2.3 DNA样品抽提和基因型分析 用酚-氯仿法抽提外周血白细胞中的DNA。--SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ 三种基因型的检测则按第一军医大学细胞生我和医学遗传学教研室建立的gap-PCR方法进行[5][6]。RDB技术[8]用于 β -地贫疑诊病例的基因分型。

1.2.4 Southern blot 分析 从gap-PCR确定为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 、--SEA/ $\alpha\alpha$ 和 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 及 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 基因型的DNA

2 结果

2.1 α -地贫表型阳性检出率

在382份珠海市户籍的婚检样品中,经血液学分析检出 α -地贫表型阳性样品23例,此外还检出 β -地贫阳性病例11例。缺铁性贫血7例(7例均为女性),由此得出 α -地贫、 β -地贫和缺铁性贫血的检出率分别为6.02%、2.88%和1.83%。

2.2 gap-PCR检测结果

在上述样品中,用gap-PCR技术分别检出21、7和3例基因型为 $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 及 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 的 α -地贫样品,由此计算出该市户籍人口中此3种 α -地贫的基因携带率分别为5.50%、1.83%和0.79%,人群中总的 α -地贫基因携带率为8.12%。值得一提的是,有10例缺失型 α -地贫样品分别发现自表型正常(7例)和缺铁性贫血样品(3例)中。余351份样品(包括11例 β -地贫表型阳性的样品)未检出这3种 α -地贫基因。血液学筛查和分子筛查两法所得的结果见表1。

表 1 α 地贫血液学筛查和分子筛查结果
Tab.1 Results of phenotypic analysis and molecular detection of α -thalassemia

Phenotypic analysis		Molecular detection			
Diagnosis	n	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$--^{SEA}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$
Normal	341	334	2*	4	1
α -thalassemia	23	2**	18	1	2
Iron deficiency anemia	7	4	1	2	0
β -thalassemia	11	11	0	0	0
Total	382	351	21	7	3

*The genotypes of these 2 samples were found to be codon (CD) 41-42(-CTTT) / normal and IVS-2-654 (C-T) / normal, respectively; **Other α -thalassemia defects except for the above 3 deletions were not involved

2.3 Southern blot分析结果

20份随机抽取的不同基因型DNA样品经Southern blot分析,所得结果与gap-PCR法完全一致(结果未列出)。

3 讨论

我们采取双盲法,对例行婚前医学检查的珠海户籍人群中的382份随机血样分别进行了 α -地贫携带者的血液学表型和gap-PCR分子筛查。结果显示,珠海市户籍人群中 α -地贫表型阳性检出率为6.02%,而gap-PCR分子

筛查的阳性率为8.12%。这与最近我们完成的1 548份该市户籍新生儿脐血连续样品 α -地贫的分子流行病学调查结果(8.91%)完全吻合。在检出的138例 α -地贫基因中, $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 及 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 这三种常见 α -地贫占90.6%(结果待发表)。这说明本研究所取的样品具有较好的代表性,同时也提示本文将上述3种 α -地贫基因作为 α -地贫的分子筛查对象是有临床意义的。

经基因分析确诊的31例 α -地贫阳性的样品中,血液学分析只筛查出21例(2例暂未确定基因型的样品未计),假阴性10例,其假阴性率高达32.3%(10/31)。由此可看出,血液学筛查法最大的缺陷是漏诊,在本文分析的382例临床样品中,血液学方法共漏检了10例 α -地贫基因携带者,故用传统血液学分析法筛查 α -地贫的总漏检率为2.62%(10/382)。此外,在23例 α -地贫表型阳性的样品中尚有2例未能检出这三种常见的 α -地贫缺失突变,是否为其他类型的 α -地贫突变或某些造血干细胞疾病如骨髓增生不良症或铁幼粒性细胞贫血,还有待进一步阐明。

正如所预期的,上述漏检样品中,主要是表型为静止型 α -地贫样品的贡献所致(占7/10)。众所周知,成人静止型 α -地贫用传统血液学筛查法难以诊断,故本法所具有的 α -地贫高特异性和灵敏性的诊断价值,主要体现在对静止型 α -地贫的诊断上。由于 $--^{SEA}$ 与 $-\alpha^{3.7}$ 或 $-\alpha^{4.2}$ 基因组合可能产生有严重临床后果的Hb H病,为防止在以优生为目的的人群筛查中由于漏检而发生不良后果,作者建议在有条件的地区或单位,可将gap-PCR分子筛查法直接用于临床一线 α -地贫的筛查。而以血液学筛查法作为主要技术手段检测 α -地贫时,要特别谨慎。此外,缺铁性贫血也属于小细胞低色素贫血,当 α -地贫合并缺铁性贫血时血液学指标易造成错误诊断,而 α -地贫的分子筛查可对此作出准确的诊断。为了防患于未然,建议在地贫高发区对缺铁这一常见的孕妇病症,需关注其合并地贫存在的问题,必要时需进行 α -地贫的分子诊断。本文在表型正常的样本中检出2例 $--^{SEA}$ 基因携带者,均属南方地区也较常见的 α -地贫复合 β -地贫病例,这一结果提示, α 和 β 复合型地贫可由于 α 和 β 珠蛋白肽链的合成趋于平衡而减轻异常表型,故用gap-PCR在表型正常的样品中筛查发现这类病例是有价值的。

鉴于 α -地贫不象 β -地贫那样有典型的血液学表型指征,需靠多项指标才能作出综合判断,且存在漏诊的问题,故本文介绍的方法在特异性和准确性上具有明显的技术优势,且证明在临床实验室作为一线筛查方法是可行的。但其推广应用尚有待进一步简化DNA模板的制备和建立能同时筛查多种 α -地贫基因的一管多重gap-PCR的技术。

参考文献:

- [1] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, et al. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster[J]. Blood, 1989, 73(4): 1081-104.
- [2] 肖维威, 徐湘民, 徐 铃. 中国人缺失型 α 地中海贫血的分子基础及产前基因诊断[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(1): 68-72.
Xiao WW, Xu XM, Xu Q. Molecular basis and prenatal diagnosis of deletional α -thalassemia in Chinese [J]. J First Mil Med Univ. 1998, 18(1): 68-72.
- [3] 曾瑞萍, 胡 彬, 金龙金. 广东地区血红蛋白H病基因型分析及高危胎儿基因诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(5): 266-8.
Zeng RP, Hu B, Jin LJ. Genotype analysis and prenatal gene diagnosis of fetal hemoglobin H disease in Guangdong area[J]. Chin J Med Genet, 1996, 13(5): 266-8.
- [4] Chang JG, Lee LS, Lin CP, et al. Rapid diagnosis of α -thalassemia-1 of Southern Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction[J]. Blood, 1991, 78(3): 853-4.
- [5] 肖维威, 徐湘民, 刘忠英. 东南亚缺失型 α -地中海贫血的聚合酶链反应快速诊断技术及其产前诊断[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(4): 192-4.
Xiao WW, Xu XM, Liu ZY. Rapid detection of α -thalassemia of Southeast Asian deletion by polymerase chain reaction and its application to prenatal diagnosis[J]. Chin J Hematol, 2000, 21(4): 192-4.
- [6] 赵永忠, 钟 梅, 刘忠英, 等. PCR技术快速检测常见缺失型 α -地中海贫血-2基因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(3): 216-8.
Zhao YZ, Zhong M, Liu ZY, et al. Rapid detection of the common α -thalassemia-2

determinants by PCR assay[J]. Chin J Med Genet, 2001, 18(3): 216-8.

张之南. 血液病诊断标准[M]. 天津科学技术出版社, 1991. 9-14.

[8] Zhang LZ, Xu XM, Ma WF, et al. A Rapid reverse dot blot assay for all 18 β -thalassemia in Chinese population[J]. J Med Coll PLA, 1993, 8(3): 213-5.

Zhao W, Zhang J, Wang NS, et al. The relationship between Hb Bart's levels in cord blood and deletions of α -globin genes[J]. Hemoglobin, 1988, 12(5, 6): 519-27.

Skogerboe KJ, West SF, Smith C, et al. Screening for α -thalassemia correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype[J]. Arch Pathol Lab Med, 1992, 116(8): 1012-8.

Dumars K, Borinne B, Eckman JR, et al. Practical guide to the diagnosis of thalassemia[J]. Am J Med Genet, 1996, 62(1): 29-37.

Williams TN, Maitland K, Ganczakkowski M, et al. Red blood cell phenotypes in the α -thalassemias[J]. Br J Haematol, 1996, 95(2): 266-72.

Yong KN, Wadsworth LD, Langlois S, et al. Thalassemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of Chinese descent[J]. Clin Genet, 1999, 55(1): 20-5.

参考文献:

[1] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, et al. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster[J]. Blood, 1989, 73(4): 1081-104.

[2] 肖维威, 徐湘民, 徐 铃. 中国人缺失型 α 地中海贫血的分子基础及产前基因诊断[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(1): 68-72.

Xiao WW, Xu XM, Xu Q. Molecular basis and prenatal diagnosis of deletional α -thalassemia in Chinese [J]. J First Mil Med Univ. 1998, 18(1): 68-72.

[3] 曾瑞萍, 胡 彬, 金龙金. 广东地区血红蛋白H病基因型分析及高危胎儿基因诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(5): 266-8.

Zeng RP, Hu B, Jin LJ. Genotype analysis and prenatal gene diagnosis of fetal hemoglobin H disease in Guangdong area[J]. Chin J Med Genet, 1996, 13(5): 266-8.

[4] Chang JG, Lee LS, Lin CP, et al. Rapid diagnosis of α -thalassemia-1 of Southern Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction[J]. Blood, 1991, 78(3): 853-54.

[5] 肖维威, 徐湘民, 刘忠英. 东南亚缺失型 α -地中海贫血的聚合酶链反应快速诊断技术及其产前诊断[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(4): 192-4.

Xiao WW, Xu XM, Liu ZY. Rapid detection of α -thalassemia of Southeast Asian deletion by polymerase chain reaction and its application to prenatal diagnosis[J]. Chin J Hematol, 2000, 21(4): 192-4.

[6] 赵永忠, 钟 梅, 刘忠英, 等. PCR技术快速检测常见缺失型 α -地中海贫血-2基因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(3): 216-8.

Zhao YZ, Zhong M, Liu ZY, et al. Rapid detection of the common α -thalassemia-2 determinants by PCR assay[J]. Chin J Med Genet, 2001, 18(3): 216-8.

张之南. 血液病诊断标准[M]. 天津科学技术出版社, 1991. 9-14.

[8] Zhang LZ, Xu XM, Ma WF, et al. A Rapid reverse dot blot assay for all 18 β -thalassemia in Chinese population[J]. J Med Coll PLA, 1993, 8(3): 213-5.

Zhao W, Zhang J, Wang NS, et al. The relationship between Hb Bart's levels in cord blood and deletions of α -globin genes[J]. Hemoglobin, 1988, 12(5, 6): 519-27.

Skogerboe KJ, West SF, Smith C, et al. Screening for α -thalassemia correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype[J]. Arch Pathol Lab Med, 1992, 116(8): 1012-8.

Dumars K, Borinne B, Eckman JR, et al. Practical guide to the diagnosis of thalassemia[J]. Am J Med Genet, 1996, 62(1): 29-37.

Williams TN, Maitland K, Ganczakkowski M, et al. Red blood cell phenotypes in the α -thalassemias[J]. Br J Haematol, 1996, 95(2): 266-72.

Yong KN, Wadsworth LD, Langlois S, et al. Thalassemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of Chinese descent[J]. Clin Genet, 1999, 55(1): 20-5.

[回结果列表](#)