

• 论 著 •

胎儿脐带血血红蛋白分析在珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断中的应用价值*

何天文^{1,2}, 王奕霞^{1,2#}, 郭浩^{1,2}, 袁腾龙^{1,2}, 骆明勇^{1,2}, 杜丽^{1,2}, 尹爱华^{1,2△}

(1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心, 广东广州 511442;

2. 广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东广州 511442)

摘要:目的 探讨胎儿脐带血血红蛋白分析在珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血)产前诊断中的应用价值。方法 收集夫妻双方均为相同基因类型地中海贫血携带者 113 对,且女性处于妊娠期,孕 24~30 周,进行产前诊断。应用全自动毛细管电泳技术分析胎儿脐带血血红蛋白成分,同时检测胎儿地中海贫血基因。结果 113 对夫妻所孕育的 113 例胎儿中,11 例重型 α 地中海贫血胎儿脐带血 HbBart's 水平为 85.0%~95.5%,9 例中间型 α 地中海贫血胎儿脐带血 HbBart's 达 22.0%~39.5%;6 例重型 β 地中海贫血胎儿脐带血 HbA 水平为 0%~0.4%,17 例轻型 β 地中海贫血胎儿脐带血 HbA 水平为 2.1%~12.5%。结论 胎儿脐带血血红蛋白分析能快速产前诊断重型 α 、重型 β 和中间型 α 地中海贫血,可作为地中海贫血产前诊断的辅助方法。

关键词:脐带血; 血红蛋白分析; 珠蛋白生成障碍性贫血; 产前诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0297-03

Application value of fetal umbilical cord blood hemoglobin analysis in prenatal diagnosis of thalassemia*

He Tianwen^{1,2}, Wang Yixia^{1,2#}, Guo Hao^{1,2}, Yuan Tenglong^{1,2}, Luo Mingyong^{1,2}, Du Li^{1,2}, Yin Aihua^{1,2△}

(1. Medical Genetics Center, Guangdong Provincial Women and Children Health Care Hospital,

Guangzhou, Guangdong 511442, China; 2. Maternal and Children Metabolic-Genetic Key

Laboratory of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 511442, China)

Abstract: Objective To investigate the application value of fetal umbilical cord blood hemoglobin analysis in the prenatal diagnosis of thalassemia. **Methods** 113 couples were the carriers of the same gene type of thalassemia, moreover the females were in the pregnant period of 24-30 pregnant weeks and performed the prenatal diagnosis. The fetal umbilical cord blood hemoglobin components were analyzed by the full automatic capillary electrophoresis technique, meanwhile the fetal thalassemia gene was detected. **Results** Among 113 fetuses, the umbilical cord blood HbBart's level in 11 cases of severe α thalassemia was 85.0%—95.5%, which in 9 cases of intermediate type α thalassemia was 22.0%—39.5%; the umbilical cord blood HbA level in 6 cases of severe β thalassemia was 0%—0.4%, which in 17 cases of light type β thalassemia was 2.1%—12.5%. **Conclusion** The fetal umbilical cord blood hemoglobin analysis could be used for rapid prenatal diagnosis of severe α , β and intermediate type α thalassemia, which can serve as a supplementary method for the prenatal diagnosis of thalassemia.

Key words: umbilical cord blood; hemoglobin analysis; thalassemia; prenatal diagnosis

珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血,以下简称“地贫”)是一种由于珠蛋白合成障碍导致的遗传性溶血疾病,主要分为 α 地中海贫血(以下简称“ α 地贫”)和 β 地中海贫血(以下简称“ β 地贫”)两种类型^[1]。地贫是全球分布最广、累积患病人数最多的一种单基因遗传病,中国主要分布在广东、广西和海南等南方地区,广东地区育龄人群地贫基因携带率约为 16.8%^[2]。而重型 α 地贫一般在妊娠后期发生胎儿水肿,胎死宫内,或在出生的 48 h 之内死亡^[3];中重型 β 地贫和部分中间型 α 地贫在出生后 3~6 个月出现贫血症状,并进行性加重,严重者必须依靠输血维持生命,且多在童年夭折,给家庭和社会带来了沉重负担^[4]。目前地贫尚无有效的治疗方法,主要通过携带相同类型地贫基因夫妻进行产前诊断防止重型地贫患儿出生。由于不同基因类型的地贫胎儿脐带血血红蛋白成分和量不同,通过分析胎儿脐带血血红蛋白成分和量可以辅助地贫产前诊断。本文旨在探讨胎儿脐带血血红蛋白分析在地贫产前诊断中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 5 月至 2015 年 5 月于广东省妇幼保健院医学遗传中心进行遗传咨询的 113 对夫妻,夫妻双方均为相同基因类型地贫携带者,且女性处于妊娠期,孕 24~30 周。

1.2 仪器与试剂 主要仪器有法国 Sebia 公司 Capillarys2 全自动毛细管电泳仪、Eppendorf5810 台式离心机和厦门致善生物有限公司 Lab-Aid 820 核酸提取仪;血红蛋白分析检测试剂盒及其质控品由法国 Sebia 公司提供。DNA 提取试剂盒由厦门致善生物有限公司提供。地贫基因检测试剂盒由深圳亚能生物科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 在超声波实时监测下进行胎儿脐静脉穿刺术,抽取柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)抗凝脐静脉血 1 mL,尽快送检。

1.3.2 脐带血血红蛋白毛细管电泳分析 采用法国 Sebia 公司生产 Capillarys2 全自动毛细管电泳仪及其配套血红蛋白电

* 基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212246)。作者简介:何天文,男,主管技师,主要从事生化遗传研究。# 共同第一作者。

△ 通讯作者, E-mail: yinaiwa@vip.126.com。

泳试剂盒,操作完全按说明书进行。

1.3.3 胎儿地贫基因检测 采用 Lab-Aid 820 核酸提取仪提取脐带血 DNA。 α 地贫基因检测:缺失型 α 地贫采用裂口 PCR 方法(Gap-PCR)检测,点突变型 α 地贫和 β 地贫采用反向斑点杂交 PCR(PCR-RDB)方法检测。采用 Gap-PCR 法检测 3 种缺失型:东南亚缺失(--SEA)、3.7 及 4.2 缺失(- α 3.7、- α 4.2);利用反向点杂交(RDB)技术检测 3 种非缺失点突变:CS、QS 和 WS 点突变($\alpha\alpha$ CS、 $\alpha\alpha$ QS、 $\alpha\alpha$ WS)和 17 种 β 地贫:CD41-42(-TTCT)、IVS-II-654(C>T)、-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)、-32(C>A)、-29(A>G)、-30(T>C)、CD14-15(+G)、Cap+40-43(-AAAC)、起始密码子突变 Initiation condon(T>G)和 IVS-I-5(G>C)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 胎儿地贫基因诊断结果 113 例胎儿按地贫基因诊断结果分为以下几类:未检测到地贫基因(正常)26 例;重型 α 地贫 11 例,中间型 α 地贫 9 例,轻型 α 地贫 33 例,静止型 α 地贫 9 例;重型 β 地贫 6 例,轻型 β 地贫 17 例,轻型 α 合并 β 地贫及轻型 α 合并重型 β 地贫各 1 例,见表 1。

表 1 胎儿地贫基因诊断结果

地贫类型	α 地贫基因	β 地贫基因	例数 (n)
正常	—	—	26
重型 α 地贫	巴氏水肿胎(--/--)	—	11
中间型 α 地贫	缺失型 HbH 病(--/- α)	—	6
	-SEA/ $\alpha\alpha$ 复合 HBA1c.	—	2
	178 G/C 变异为 C/-	—	1
	(-SEA/ $\alpha\alpha$ WS)	—	1
轻型 α 地贫	-SEA/HK $\alpha\alpha$	—	2
	- α 3.7/- α 3.7	—	1
	α CS/ α CS	—	1
	-SEA/ $\alpha\alpha$	—	29
静止型 α 地贫	- α 4.2/ $\alpha\alpha$	—	3
	- α 3.7/ $\alpha\alpha$	—	5
	- α WS/ $\alpha\alpha$	—	1
重型 β 地贫	—	β CD41-42/ β 654	1
	—	β 28/ β CD27-28	1
	—	β 17/ β IVS-II-654	2
	—	β CD41-42/G γ +(A γ) β 30	1
	—	β CD17/ β CD41-42	1
轻型 β 地贫	—	β 654/ β N	3
	—	β CD41-42/ β N	4
	—	β IVS-1-1/?	2
	—	β 28/ β N	5
	—	β 29/ β N	1
	—	β CD71-72/ β N	1
	—	β 26/ β N(E)	1
轻型 α 合并 β 地贫	-SEA/ $\alpha\alpha$	β 28/ β N	1
轻型 α 合并重型 β 地贫	-SEA/ $\alpha\alpha$	β IVS-II-654/ β 28	1

—:无数据。

2.2 胎儿脐带血血红蛋白分析 正常和 β 地贫均以 HbA 和 HbF 为主,除了 2 例轻型 α 地贫和 4 例静止型 α 地贫无 HbBart's 之外, α 地贫及 α 地贫合并 β 地贫胎儿脐带血均有 HbBart's。见表 2。

表 2 胎儿脐带血血红蛋白分析($\bar{x} \pm s$,mg/g)

地贫类型	n	血红蛋白成分			
		HbA	HbF	HbBart's	Hbpro
正常	26	7.60 \pm 5.31	92.40 \pm 5.30	—	—
重型 α 地贫	11	—	—	90.09 \pm 3.04	9.91 \pm 3.04
中间型 α 地贫	9	13.18 \pm 2.95	63.38 \pm 15.33	25.74 \pm 9.83	—
轻型 α 地贫	33	10.63 \pm 4.84	85.30 \pm 5.81	4.52 \pm 2.35	—
静止型 α 地贫	9	7.38 \pm 2.34	91.46 \pm 2.66	1.58 \pm 2.14	—
重型 β 地贫	6	0.07 \pm 0.16	99.10 \pm 1.65	2.50 \pm 2.40	—
轻型 β 地贫	17	4.12 \pm 2.53	95.77 \pm 2.49	—	—
α 合并 β 地贫	2	2.35 \pm 2.47	95.75 \pm 1.77	1.9 \pm 0.71	—

—:无数据。

2.3 α 地贫胎儿脐带血血红蛋白分析 胎儿脐带血 HbBart's 水平随受累 α 珠蛋白基因个数增多而升高,11 例重型 α 地贫胎儿脐带血 HbBart's 为 85.0%~95.5%;除 1 例基因型为 -SEA/ $\alpha\alpha$ WS 胎儿脐带血 HbBart's 为 7.5% 之外,其余 8 例中间型 α 地贫胎儿脐带血 HbBart's 达 22.0%~39.5%;除了 2 例轻型 α 地贫无 HbBart's 之外,其余 31 例轻型 α 地贫胎儿脐带血 HbBart's 达 1.4%~23.8%;除了 4 例静止型 α 地贫无 HbBart's 之外,其余 5 例静止型 α 地贫胎儿脐带血 Bart's 达 0%~1.3%;正常胎儿脐带血中没检测出 HbBart's。

2.4 β 地贫胎儿脐带血血红蛋白分析 β 地贫均以 HbA 和 HbF 为主, β 地贫胎儿脐带血 HbA 水平随受累 β 珠蛋白基因个数的增加而降低,6 例重型 β 地贫胎儿脐带血 HbA 为 0%~0.4%,17 例轻型 β 地贫胎儿脐带血 HbA 水平为 2.1%~12.5%。

3 讨 论

人类珠蛋白基因的表达具有时空顺序性, α 珠蛋白基因簇和 β 珠蛋白基因簇的表达各具特点。 α 珠蛋白基因簇中的 ζ 和 ϵ 珠蛋白基因在胚胎卵黄囊中表达,妊娠 10 周前完全关闭, α 珠蛋白基因从妊娠第 5 周开始表达,并持续至终生; β 珠蛋白基因簇中的 γ 珠蛋白基因也从妊娠第 5 周开始表达,但在出生前后开始关闭, β 珠蛋白基因在胎儿期处于低表达状态,出生前后表达逐渐增多并持续至终生^[5]。不同发育阶段的人血红蛋白有其特有的组成,出现各种异常血红蛋白则可提示其特有的疾病。HbBart's 是由于胎儿时期 α 珠蛋白和 γ 珠蛋白合成不平衡, α 珠蛋白合成障碍或不足,过剩 γ 珠蛋白自行结合为 γ_4 的异常血红蛋白。胎儿期 HbBart's 的出现,提示胎儿存在 α 地贫,胎儿脐带血 HbBart's 水平随受累 α 珠蛋白基因个数增多而升高,当 HbBart's \geq 60% 时,提示为巴氏水肿儿即重型 α 地贫^[6]。本研究中 11 例重型 α 地贫胎儿脐带血 HbBart's 水平为 85.0%~95.5%;8 例中间型 α 地贫组胎儿脐带血 HbBart's 达 22.0%~39.5%;31 例轻型 α 地贫胎儿脐带血 HbBart's 达 1.4%~23.8%;5 例静止型 α 地贫胎儿脐带血 HbBart's 达 0%~1.3%。从本研究结果看出胎儿脐带血 HbBart's 的定量分析可以在产前快速诊断重型和中间型 α 地贫。胎儿脐带血 HbBart's 的定量分析相对检测胎儿地贫基(下转第 302 页)

分布高低阶段, 3/4 例未婚, 本研究通过成熟的追踪回访机制, 科学完成 HIV 窗口期的确认及献血者资料信息获得, 充分体现本中心的 NAT 筛查手段与手工核酸扩增技术的重要作用, 为降低血液潜在风险起到不可或缺作用, 保障了输血安全。

表 2 分析了 193 例确认感染 HIV 的献血者在不同特征信息上的分布情况, 可发现男性、18~<39 岁、已婚及初次献血者组的 HIV 感染率高于其对立组 ($P < 0.05$), 这为献血前咨询预防 HIV 高危献血者提供基础依据。本研究主要价值在于, 一是获得长达 12 年来的献血者 HIV 感染趋势, 2014 年献血者 HIV 感染率是 2003 年的 26.61 倍, 有关部门应高度重视 HIV 传播问题, 本数据对深圳地区人群 HIV 防控具有重要意义; 二是建立手工扩增 HIV RNA 的高灵敏度 Rt-PCR 方法, 同时展示了 4 例抗-HIV 阴性/NAT 阳性献血者的窗口期确认过程, 为血液筛查中 HCV、HBV 窗口期的确证提供借鉴方法; 另外, 窗口期样品检出为后期输血风险评估提供支撑数据, 充分肯定了 NAT 技术在血筛中保障输血安全的贡献。

参考文献

[1] Makroo RN, Chowdhry M, Bhatia A, et al. Evaluation of the Procleix Ultrio Plus ID NAT assay for detection of HIV 1, HBV and HCV in blood donors[J]. *Asian J Transfus Sci*, 2015, 9(1): 29-30.
 [2] Shang G, Seed CR, Wang F, et al. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Shenzhen, China[J]. *Transfusion*, 2007, 47(8): 529-539.
 [3] Shyamala V. Factors in enhancing blood safety by nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus, hepatitis C virus and hepatitis B virus[J]. *Asian J Transfus Sci*, 2014, 8(1): 13-18.
 [4] Kupek E, Petry A. Changes in the prevalence, incidence and residual risk for HIV and hepatitis C virus in Southern Brazilian blood

donors since the implementation of NAT screening[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2014, 47(4): 418-425.
 [5] 陈尚良, 郑欣, 曾月婷, 等. 第四代 HIV 抗原抗体检测试剂在血液筛查中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 15(1): 30-32.
 [6] 吴蕾, 何成涛, 马贵明, 等. 南京市无偿献血者 HIV 感染的调查分析[J]. *医药前沿*, 2015, 15(7): 37-38.
 [7] 黄志健. 2010~2013 年广州地区无偿献血者 HIV 病毒检测结果分析[J]. *中国民族民间医药*, 2015, 24(4): 121-122.
 [8] 夏红英, 任芙蓉, 龚晓燕, 等. 2003-2012 年北京市血液中心无偿献血人群 HIV 感染状况分析[J]. *北京医学*, 2014, 18(4): 321-322.
 [9] 古醒辉, 熊文, 曾雪珍, 等. 深圳地区无偿献血人群 HIV 感染构成现状分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(4): 446-448.
 [10] 杨永平, 李晓霞, 刘渠, 等. 2010 年深圳市龙岗区新确认 HIV/AIDS 流行病学分析[J]. *中国热带医学*, 2012, 12(9): 1127-1128.
 [11] 严焱, 姜世强, 温群文. 深圳市南山区 1998-2012 年 HIV/AIDS 流行情况分析[J]. *传染病信息*, 2013, 26(4): 215-217.
 [12] 蔡于茂, 刘惠, 宋亚娟, 等. 深圳市男男性行为献血者 HIV 和梅毒感染影响因素分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2014, 48(2): 128-132.
 [13] Teixeira M, Henggeler F, Castro R, et al. Detection of HCV window period infection by NAT donor testing[J]. *Vox Sanguinis*, 2010, 99(5): 299-303.
 [14] Kim MJ, Park Q, Min HK, et al. Residual risk of transfusion-transmitted infection with human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Korea from 2000 through 2010[J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 20(12): 160-164.
 [15] O'Brien SF, Yi QL, Fan W, et al. Current incidence and residual risk of HIV, HBV and HCV at Canadian Blood Services[J]. *Vox Sang*, 2012, 103(1): 83-86.

(收稿日期: 2015-10-20)

(上接第 298 页)

因有着简便、经济、省时和易于推广等优点, 结合家族史可实现对妊娠中晚期胎儿 α 地贫的诊断^[7]。

孕周 24~28 周的胎儿脐带血中除了有较高水平的 HbF, 也可检测到 HbA, 分析胎儿脐带血血红蛋白电泳的 HbA 值, 可辅助诊断胎儿 β 地贫^[8]。本研究数据显示, β 地贫胎儿脐带血 HbA 水平随受累 β -珠蛋白基因个数的增加而降低, 6 例重型 β 地贫胎儿脐带血 HbA 水平为 0.0%~0.4%, 与正常胎儿的 HbA 水平差异明显。虽然轻型 β 地贫胎儿与正常胎儿的 HbA 水平差异明显, 但是两者 HbA 水平有重叠, 且交叉 2.1%~12.5%。因此胎儿脐带血 HbA 水平可以较准确地诊断出胎儿重型 β 地贫, 但不能有效地检测出胎儿轻型 β 地贫。本研究采用全自动毛细管电泳技术对胎儿血红蛋白进行分析, 全自动毛细管电泳技术具有精确度高、操作简便、时间短、经济实惠及自动化程度高等优点^[9]。HbBart's 的定量分析能快速准确诊断出重型和中间型 α 地贫, HbA 定量分析能快速准确诊断出重型 β 地贫, 对胎儿脐带血血红蛋白分析可以作为地贫产前诊断的一种辅助方法, 提高胎儿地贫产前诊断的准确性。

参考文献

[1] Weatherall DJ. Thalassaemia: the long road from bedside to genome[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(8): 615-625.

[2] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89855.
 [3] Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2010, 5(13): 13-33.
 [4] 赵馨, 王逾男, 何天文, 等. 广东省地贫基线调查中影响地贫高风险夫妇进一步干预的因素分析[J]. *中国妇幼卫生杂志*, 2015, 6(2): 20-22.
 [5] 王德刚, 唐海深, 江陵, 等. 脐血毛细管电泳在产前诊断重型地中海贫血中的应用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2014, 22(7): 27-29.
 [6] 田矛, 覃婷, 张继红, 等. 脐血血红蛋白电泳在产前诊断中的价值[J]. *广西医学*, 2013, 35(9): 1174-1175.
 [7] 杨金玲, 蔡稔, 韦小妮, 等. 胎儿巴特(氏)血红蛋白定量分析在产前诊断 α -地中海贫血中的价值[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(12): 1227-1229.
 [8] 郭浩, 郭莉, 唐斌, 等. 脐血血红蛋白电泳 HbA 值辅助诊断胎儿 β -地中海贫血及鉴定母血污染的价值[J]. *现代医院*, 2014, 14(8): 71-72.
 [9] 陈星, 初德强, 梁开艳, 等. 全自动毛细管电泳技术在筛查地中海贫血中的临床诊断价值[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(4): 635-638.

(收稿日期: 2015-09-26)