

## · 论 著 ·

# 清远地区新生儿珠蛋白生成障碍性贫血筛查结果分析

刘冬霞, 许伟华, 汤美芬, 欧阳慧

(广东省清远市妇幼保健院优生与遗传实验诊断中心 511515)

**摘要:**目的 分析清远地区新生儿珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫)筛查和基因诊断情况,为早期治疗和遗传咨询等干预措施及地贫防治政策的制定提供依据。方法 应用法国 Sebia Capillarys 全自动毛细管电泳仪对 2015 年 5 月至 2016 年 3 月清远地区出生的新生儿进行滤纸干血斑血红蛋白成分分析,初筛阳性者召回抽静脉血应用裂口-聚合酶链式反应(Gap-PCR)和聚合酶链反应(PCR)结合反向点杂交技术进行地贫基因确诊。结果 1 056 例初筛阳性者标本中共检出地贫 908 例,符合率为 85.90%。 $\alpha$ -地贫确诊符合率为 95.05%(691/727), $\beta$  地贫确诊符合率为 65.00%(208/320), $\alpha$ -地贫筛查符合率显著高于 $\beta$  地贫,筛查为 HbE 的 13 例新生儿中共召回 9 例,全部确诊为 HbE 杂合子,筛查符合率 100.00%。确诊为 $\alpha$ -地贫 650 例,检出率为 61.60%,其中静止型 210 例(19.90%)、标准型 408 例(38.60%)、血红蛋白 H 病 32 例(3.00%);检出 $\beta$  地贫 204 例,检出率为 19.30%; $\alpha$ -地贫复合 $\beta$  地贫 41 例(3.90%),重型 $\beta$  地贫 4 例(0.35%),异常血红蛋白 9 例(0.85%)。结论 通过新生儿滤纸干血斑进行血红蛋白成分分析可有效筛查出地贫患儿,值得推广应用,清远地区属于地贫高发区,在该地区开展新生儿地贫筛查很有必要,从而提高出生人口素质。

**关键词:**地中海贫血; 新生儿筛查; 毛细管电泳; 血红蛋白成分分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0353-03

## Analysis on neonatal thalassaemia screening results in Qingyuan area

LIU Dongxia, XU Weihua, TANG Meifen, OUYANG Hui

(Eugenics and Genetic Experimental Diagnosis Center, Qingyuan Municipal Maternity and Child Health Care Hospital, Qingyuan, Guangdong 511515, China)

**Abstract: Objective** To analyze the situation of neonatal thalassemia screening and gene diagnosis in Qingyuan area to provide a basis for formulating the interventional measures of thalassemia prevention and early treatment and genetic counseling, and thalassemia prevention and treatment policies. **Methods** The French Sebia Capillarys automatic capillary electrophoresis apparatus was applied to conduct the dry filter paper blood hemoglobin component analysis in newborns of Qingyuan area from May 2015 to March 2016. The newborns with early screening positive were recalled and venous blood was collected for conducting the thalassemia definite diagnosis by the split-polymerase chain reaction (Gap-PCR) and PCR combined with reverse dot hybridization technique. **Results** Among 1 056 cases of early screening positive, 908 cases of thalassemia were detected out with coincidence rate of 85.90%. Alpha thalassemia diagnosis coincidence rate was 95.05%(691/727), beta thalassemia coincidence rate was 65.00%(208/320), the coincidence rate of alpha thalassemia screening was significantly higher than that of beta thalassemia screening, among 13 newborns screened as HbE, 9 cases were recalled and all definitely diagnosed as HbE Hb heterozygote, the screening coincidence rate was 100.00%. Six hundreds and fifty cases were definitely diagnosed as alpha thalassemia, the detection rate was 61.60%, including 210 cases (19.90%) of static type, 408 cases (38.60%) of standard type and 32 cases (3.00%) of hemoglobin H disease; 204 cases of beta thalassemia were detected out, the detection rate was 19.30%; 41 cases (3.90%) were alpha thalassemia combined beta thalassemia, 4 cases (0.35%) were severe beta thalassemia and 9 cases (0.85%) were abnormal hemoglobin. **Conclusion** The filter paper dry blood hemoglobin component analysis can effectively screen out the children patients with thalassemia and is worthy of popularization and application. Qingyuan area belongs to the high prevalence area of thalassemia. It is necessary to carry out the newborn thalassemia screening so as to improve birth population quality.

**Key words:** thalassemia; newborn screening; capillary electrophoresis; hemoglobin component analysis

珠蛋白生成障碍性贫血(简称地贫),是由于造血所需的珠蛋白链发生缺失或突变,从而导致慢性进行性溶血的一种可致病基因遗传给后代的遗传性疾病<sup>[1]</sup>。由于常染色体的遗传缺陷,一种或多种组成珠蛋白的肽链减少或不能合成,使血红蛋白分子的结构发生异常,导致血红蛋白合成不足而发病<sup>[2]</sup>。根据缺失和突变的肽链不同,可分为 $\alpha$ -地贫和 $\beta$  地贫两类。不同类型的地贫在临幊上症状轻重不一,静止型和轻型者多无症状或仅有轻度贫血,中间型表现为轻度到重度贫血,有很大的

个体差异,重型 $\alpha$ -地贫简称巴氏胎儿水肿,多数胎死宫内或出生几小时后夭折;重型 $\beta$  地贫需要长期输血以维持生命<sup>[3]</sup>。在我国发病地区主要为广东、广西、海南、贵州、四川等沿海地区,母儿的病死率均很高<sup>[4]</sup>。对重型地贫目前还没发现有效的治疗方法,早发现、早治疗、提高患儿的生活质量,为下次妊娠提供遗传资料。为此,本文对 2015 年 5 月至 2016 年 2 月在清远市新生儿疾病筛查中心进行新生儿地贫筛查,对初筛阳性者召回进一步基因检测,并进行基因型分析,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2015年5月至2016年2月在清远市新生儿疾病筛查中心进行新生儿疾病筛查的新生儿,地贫初筛阳性者召回进一步基因确诊,共1 056例。

**1.2 方法** 按《新生儿疾病筛查规范》<sup>[5]</sup>要求进行样本采集、送检,采用毛细管电泳方法检测干血斑血红蛋白成分,仪器为法国Sebia Capillarys 2 neonatfast全自动毛细管电泳仪,试剂为仪器配套,筛查结果有Hb Bart's>0的为α地贫表型;HbA<9.5%、HbA2>0.1综合分析法为β地贫表型,出现异常血红蛋白等为异常血红蛋白病。采用裂口-聚合酶链式反应(Gap-PCR)进行3种常见α地贫缺失型(-SEA/-α3.7和-α4.2)基因检测,PCR结合反向点杂交技术分别检测17种常见β突变和3种常见α突变(HbCS、HbQS及HbWS)进行确诊,基因分析试剂盒为深圳亚能生物公司提供。

## 2 结 果

**2.1 筛查结果** 1 056例初筛阳性者标本中共检出地贫908例,符合率为85.90%。α地贫确诊符合率为95.05%(691/727),β地贫确诊符合率为65.00%(208/320),α地贫筛查符合率显著高于β地贫,筛查为HbE的13例新生儿中共召回9例,全部确诊为HbE杂合子,筛查符合率100.00%。

**2.2 地贫基因确诊情况** 确诊为α地贫的共650例,检出率为61.60%,其中静止型210例(19.90%)、标准型408例(38.60%)、血红蛋白H病32例(3.00%);检出β地贫204例,检出率为19.30%;α地贫复合β地贫41例(3.90%),重型β地贫4例(0.35%),HbE9例(0.85%)。筛查结果见表1。

表1 清远地区新生儿地贫筛查结果

项目	筛查出人数 (n)	基因确诊数 (n)	符合率 (%)	占确诊地贫的 百分比(%)
静止型α地贫	234	210	89.7	19.90
轻型α地贫	408	408	100.0	38.60
中间型α地贫	32	32	100.0	3.00
α地贫复合β地贫	53	41	77.4	3.90
轻型β地贫	316	204	65.0	19.30
重型β地贫	4	4	100.0	0.35
HbE	9	9	100.0	0.85
合计	1 056	908	85.9	100.00

## 3 讨 论

地贫亦称海洋性贫血,是我国南方地区最常见的一种常染色体隐性遗传的单基因溶血性血液疾病,是由于造血所需的珠蛋白链发生缺失或突变,导致构成血红蛋白四聚体的α链和β链比例失衡,形成无效造血进而引起慢性溶血性贫血<sup>[6]</sup>。根据缺陷珠蛋白类型,可分为多种类型地贫,α和β地贫是最常见的突变类型<sup>[7]</sup>。根据α珠蛋白基因缺失的程度,α地贫可分为静止型、标准型、中间型和重型<sup>[8]</sup>。静止型和标准型α地贫又称为轻型α地贫,是由于1个或2个α基因发生了缺失或突变,患者可没有任何临床症状或轻微贫血;中间型α地贫又称HbH病,血红蛋白成分分析可见H区带,患者可出现中度或重度贫血,个体差异和基因型不同导致贫血程度不一。重型α地贫又称胎儿巴氏水肿综合征,胎儿常于23~38周时流产、死胎或分娩后0.5 h内死亡,孕妇容易并发妊娠高血压综合征、

产后出血等产科并发症。β地贫临幊上分为轻型、中间型和重型3种类型,重型β地贫患儿出生时正常,但到3~6个月大时便出现严重的逐渐加重的贫血,需要每月输血一次治疗,往往到十几岁时会因为体内过多的铁沉积而死亡,给家庭造成沉重的负担,对于重症β地贫临幊还没有有效的治疗方法<sup>[9]</sup>,有效地干预出生缺陷,是优化和提高人口整体素质的必然选择<sup>[10]</sup>。大量的临幊资料证明了地贫的遗传规律与父母携带的基因型有关,故只有通过对携带地贫基因的人群进行筛查,才能够有效地控制地贫的发展,从而杜绝重症地贫儿的出生。

本研究应用法国Sebia Capillarys全自动毛细管电泳仪对2015年5月至2016年3月清远地区出生的新生儿进行滤纸干血斑血红蛋白成分分析,初筛阳性者召回抽静脉血应用Gap-PCR和PCR结合反向点杂交技术进行地贫的基因确诊,并以基因检测结果作为标准对筛查结果进行了评价。结果1 056例初筛阳性者标本中共检出地贫908例,符合率为85.90%,α地贫确诊符合率为95.05%(691/727),β地贫确诊符合率为65.00%(208/320),α地贫筛查符合率显著高于β地贫;筛查为HbE的13例新生儿中共召回9例,全部确诊为HbE杂合子,筛查符合率100.00%。确诊为α地贫650例,检出率为61.60%,其中静止型210例(19.90%)、标准型408例(38.60%)、血红蛋白H病32例(3.00%);检出β地贫204例,检出率为19.30%;α地贫复合β地贫41例(3.90%),重型β地贫4例(0.35%),异常血红蛋白9例(0.85%)。通过本研究发现采用血红蛋白成分分析筛查地贫结果与基因检测结果符合率为85.90%,这一结果与相关文献报道结果接近<sup>[11]</sup>,证实了血红蛋白电泳法在地贫筛查中的优势,准确性较高,敏感性与特异性理想,特别是对新生儿的α地贫,只要检测出Hb Bart's区带,就基本可以确诊为α地贫患儿,并可根据区带的大小判断其基因型,符合率可高达95.00%以上。本研究还发现以HbA作为β地贫筛查的单一指标容易漏检,其原因可能与β珠蛋白基因的表达量个体差异有关,与新生儿出生后采血时机也有关系,故β地贫的筛查符合率只为65.00%,有可能造成漏检和假阳性的发生,应进一步寻找其他特异指标。

综上所述,清远地区新生儿地贫的阳性率较高,特别是标准型α地贫,通过对新生儿进行地贫筛查,并确诊基因型,建立一个完善的出生健康档案,做到早治疗、早预防,更有效地提高儿童的生活质量和智力发育,因此对新生儿进行地贫筛查有重大的意义。应采取加强对婚检、孕检人群的地贫知识宣传、建立有效地贫防控机制、规范地贫诊断技术、实验室管理等综合预防控制措施,加大开展地贫基因携带人群的筛查力度,加强遗传咨询,合理指导婚配,杜绝重型地贫患儿的出生,有效地干预出生缺陷,提高出生人口的整体素质。

## 参考文献

- [1] 甘冰,毛锦江.贵港地区1 185例新生儿地中海贫血筛查分析[J].中国优生与遗传杂志,2014,22(1):212-213.
- [2] Tang HS,Zhou JY,Xie XM,et al. Screening for common nondeletional α-thalassemias in Chinese newborns by determination of Hb Bart's using the Sebia Capillarys 2 electrophoresis system[J]. Hemoglobin, 2012, 36 (2): 196-199.
- [3] 张莉.地中海贫血的临床表现与鉴别[J].(下转第357页)

前,研究已发现 CDA 基因编码区域有 3 个多态性位点,分别是 A79C(rs2072671)、G208A(rs60369023)和 C435T(rs1048977)。其中,多态性位点 G208A 仅仅存在于亚洲人群中,该位点发生突变后,可降低 CDA 酶活性,改变癌症患者的药代动力学,导致患者使用吉西他滨时,其清除减少而体内药物暴露增多,尤其在联合使用铂类药物时,患者机体极易发生中性粒细胞减少<sup>[3]</sup>。此外,多态性位点 A79C 也可使癌症患者 CDA 酶的活性降低。有研究证实,在非小细胞肺癌患者中,A79C 位点发生突变能降低用药后的患者对药物的敏感度,降低患者总体生存率<sup>[4-5]</sup>。而携带多态性位点 C435T 突变型基因的癌症患者,虽然总体生存率比较低,但并未在相关研究中发现 CDA 酶活性与此突变位点间存在作用关系<sup>[6]</sup>。

虽然有关 CDA 基因突变位点的检测方法有多种,并且各有优劣,但临幊上并没有明确的检测标准,也没有相关的临幊检测报道。因此,建立一种可靠的 CDA 基因突变位点的检测技术,将有助于遴选出适合接受吉西他滨化疗的患者,使患者能够更好地接受靶向药物治疗,从而实现 NSCLC 的个体化治疗。在本研究中,虽然 qPCR 法敏感度高,重复性好,但实验成本高,荧光素种类及检验光源的局限性,限制了它的应用能力;内源控制物的选择也是实验结果可靠与否的关键;扩增产物及实验室环境的污染也会导致结果的不确定性。Sanger 测序法被认为是最基本、最直接的检测方法,它既能检测出已知的突变,又能检测出未知的突变,虽然其检测的敏感度不如 qPCR 法,但其操作简便、准确性高、通量高且费用低,使其更具有临幊应用价值。

尽管不同的试验检测方法优势各不相同,但是目前测序法仍是普遍公认的一种可靠的检测突变标准方法。本试验比较了 qPCR 法和 Sanger 测序法两种方法对基因突变检测的敏感度、特异度等指标,探讨 Sanger 测序法是否适用于临幊检测晚期非小细胞肺癌患者 CDA 基因突变。结果显示,这两种试验方法检测出结果的符合率为 98.39%,敏感度为 92.50%,特异度为 99.52%,一致性检验 Kappa 值为 0.939,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示两种检测方法的一致性较好;两种试验方法共同检测出的所有样本突变类型完全吻合,确定了 Sanger 测序法检测的准确性。

对 4 例 Sanger 测序法和 qPCR 法检测结果不一致的样本进行分析后发现,3 例患者 Sanger 测序法阴性,而 qPCR 法检测为阳性,其原因可能是 qPCR 法检测敏感度较 Sanger 测序法高,而使该 3 例患者突变未被 Sanger 测序法检出,但也不能排除 qPCR 法检测结果为假阳性的可能性;1 例患者 qPCR 法检测为阴性,而 Sanger 测序法检测为阳性,其原因可能是 qPCR 法检测结果为假阴性,但也不排除 Sanger 测序法在检测过程中出现交叉污染而致假阳性的可能性。此外,由于体细胞

突变肿瘤组织的异质性,导致不同患者 CDA 基因突变型 DNA 水平存在不同,这也可能是造成这两种不同检测方法敏感度差异的主要原因。

综上所述,Sanger 测序法的敏感度和特异度与 qPCR 法相比,分别为 92.50% 和 99.52%,并且 Sanger 测序法根据其测序峰图可对基因突变型别进行直观的判定,操作也相对简便易行,能同时检测多个位点,可应用于晚期非小细胞肺癌患者的临幊分子诊断,从而指导和监控临幊吉西他滨耐药的治疗,可促进合理用药,实现个体化治疗,减轻患者社会与家庭经济负担。

## 参考文献

- [1] Azzoli CG, Baker S Jr, Temin S, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(36): 6251-6266.
- [2] Yue L, Saikawa Y, Ota K, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity[J]. Pharmacogenetics, 2003, 13(1): 29-38.
- [3] Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients; the impact of a cytidine deaminase polymorphism[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(1): 32-42.
- [4] Gilbert J, Salava O, Yuan J, et al. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1794-1803.
- [5] Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6): 1797-1803.
- [6] Soo R, Wang L. Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2009, 63(1): 121-127.

(收稿日期:2016-08-04 修回日期:2016-10-24)



(上接第 354 页)

- [J]. 国际检验医学杂志,2013,34(21):2875-2875.
- [4] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2004:621.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查规范[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2010.
- [6] 华静,李明,陶小梅,等. 175 例儿童地中海贫血基因诊断分析[J]. 国际医药卫生导报,2005,22(2):121-123.
- [7] 边旭明. 实用产前诊断学[M]. 北京:人民军医出版社,2008:419.

- [8] 康熙雄. 临床电泳[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:296-297.
- [9] 陈鸣鸣. 新生儿出生缺陷影响因素及近五年变化趋势分析[D]. 长春:吉林大学,2007.
- [10] 罗家有. 我国出生缺陷干预的现状与发展趋势[J]. 实用预防医学,2005,12(2): 458-460.
- [11] 黄丽华. 广西柳州地区新生儿 α 地中海贫血筛查分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,32(10):70.

(收稿日期:2016-09-04 修回日期:2016-10-24)