·论　著·

脐带血血红蛋白电泳联合基因检测 β-珠蛋白生成障碍性贫血的诊断价值

林　丽,陈秋莉,韦　媛,陈碧艳,王　梁,何　升△

(广西壮族自治区妇幼保健院妇产医院遗传代谢中心实验室,南宁 530003)

摘　要:目的　探讨脐带血血红蛋白(Hb)电泳在早期辅助诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血的临床价值。**方法**　共收集南宁地区父母双方均为珠蛋白生成障碍性贫血携带者产前诊断的胎儿脐带血 1 599 例,所有标本均确诊。采用 Sebia 全自动毛细管电泳系统对脐带血进行 Hb 电泳组分检测。**结果**　共检出 β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者 186 例,其中重型 68 例。使用 ROC 曲线分析 Hb A 值对 β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者和中重型的诊断结果,携带者最佳截断值为 5.15%,敏感性 83.9%,特异性 82.3%;中重型者最佳截断值为 3.2%,敏感性 100.0%,特异性 99.4%。**结论**　脐带血 Hb A 值可有效辅助诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血。

关键词:脐带血;　血红蛋白电泳;　产前诊断;　珠蛋白生成障碍性贫血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.012　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2016)19-2689-03

The value of combined tests of hemoglobin electrophoresis and genetic testing in neonatal cord blood screening for β-thalassemia

LIN Li, CHEN Qiuli, WEI Yuan, CHEN Biyan, WANG Liang, HE Sheng△

(*Department of Genetic and Metabolism, Maternal and Children Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi* 530003, *China*)

Abstract: Objective　To explore the clinic utility of Hb A level in neonatal cord blood screening for β-thalassemia. **Methods**　A total of 1 599 neonatal cord specimens whose parents were carriers of β-thalassemia prenatal diagnosised by routine molecular genetic were collected by cordocentesis. These samples were analyzed by the capillary electrophoresis system (Sebia). **Results**　Among 1 599 fetuses, 186 were diagnosed as β-thalassemia carriers, 68 were β-thalasseima intermedia/major. ROC analysis demonstrated that the optimal cutoff value for identifying β-thalassemia carrier from the Hb A level was 5.15% (sensitivity = 83.9%, specificity=82.3%), and that was 3.2% for β-thalasseima intermedia/major (sensitivity=100.0%, specificity=99.4%). **Conclusion**　The Hb A level of cord blood was an effective marker to screen the β-thalassemia for fetuses and is therefore well-suited for clinical diagnostic use.

Key words: cord blood;　hemoglobin electrophoresis;　prenatal diagnosis;　thalasemia

珠蛋白生成障碍性贫血是珠蛋白基因表达降低或缺失造成的一种常见的遗传溶血性疾病,根据受累基因的不同可分为 α-、β-珠蛋白生成障碍性贫血,其中约 90% 的 α-珠蛋白生成障碍性贫血是由大片段缺失突变造成,约 90% β-珠蛋白生成障碍性贫血是由点突变造成,广西地区 β-珠蛋白生成障碍性贫血基因携带率为 6.43%[1-2]。目前有 872 种突变已确认可导致 β-珠蛋白生成障碍性贫血,其基因型分类有助于调整最佳治疗方案,判断预后及遗传咨询,其中大多数中重型患儿出生后 3～6 个月出现临床症状[3-4]。早期快速筛查对该病的预防控制有重要意义。我国中重型 β-珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生预防主要是依靠对高风险夫妇的筛查及产前诊断,产前诊断的方式主要采集绒毛(孕 8～12 周),羊水(孕 14～24 周),脐带血(>23 孕周)提取 DNA 后,常规 PCR 实验确诊,存在母血污染及漏检风险[5]。近年来,胎儿脐带血血红蛋白(Hb)分析作为一种快速、灵敏的方法可作为珠蛋白生成障碍性贫血的辅助筛查方法应用于临床,特别是基因诊断未普及地区及父母基因型未知的胎儿[6]。采用毛细管电泳筛查脐带血 Hb 联合基因检测,辅助产前诊断 α-珠蛋白生成障碍性贫血,但 β-珠蛋白生成障碍性贫血相关脐带血电泳组分的研究较少[7-8]。现探讨脐带血电泳产前筛查在辅助诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血的临床价值,报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2013 年 1 月至 2015 年 12 月南宁地区父母双方均为珠蛋白生成障碍性贫血携带者,产前诊断且孕周为 24～28 周的胎儿脐带血 1 599 例。

1.2　方法　脐静脉穿刺抽取 1～2 mL 脐带血,枸橼酸钠抗凝。采用 gap-PCR 法检测联合反向点杂交对常见 6 种 α-珠蛋白生成障碍性贫血及 17 种 β-珠蛋白生成障碍性贫血进行基因诊断,罕见珠蛋白生成障碍性贫血及异常 Hb 进行 Sanger 测序,确定其基因型。使用 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪(法国 Sebia)进行脐带血电泳组分分析。

1.3　统计学处理　采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,并对各组 Hb A 值统计分析。组间比较使用 t 检验,应用受试者工作特征(ROC)曲线分析 Hb A 值的筛查效率,经比较优选

作者简介:林丽,女,技师,主要从事人类遗传病的分子基础及临床遗传学诊断技术学和应用研究;人类遗传病的遗传流行病学及分子进化研究。　△　**通讯作者**,E-mail:heshengbio@163.com。

最佳截断值[9]。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　　果

2.1 脐带血 β-珠蛋白生成障碍性贫血基因型分布结果　1 599例脐带血标本经基因诊断后，正常组 337 例，β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者 186 例，其中中重型 68 例。β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者以 βCD41-42/βN、βCD17/βN 最为常见，其频率分别为 4.62%、3.75%。见表 1。

表 1　脐带血 β-珠蛋白生成障碍性贫血基因型分布结果

基因型	表型	n	频率(%)
杂合突变			
βCD41-42/βN	β0/β	74	4.62
βCD17/βN	β0/β	60	3.75
βCD71-72/βN	β0/β	13	0.81
β-28/βN	β+/β	12	0.75
βIVS-Ⅱ-654/βN	β+/β	9	0.56
βCD26/βN	β+/β	9	0.56
βIVS-Ⅰ-1/βN	β0/β	9	0.56
纯合突变或双重杂合突变			
βCD41-42/βCD41-42	β0/β0	13	0.81
βCD41-42/βCD17	β0/β0	13	0.81
βCD17/βCD17	β0/β0	9	0.56
βCD41-42/βCD26	β0/β+	6	0.36
βCD41-42/βCD71-72	β0/β0	4	0.25
βCD41-42/βⅣS-Ⅱ-654	β0/β+	3	0.19
βCD41-42/βⅣS-Ⅰ-1	β0/β0	3	0.19
βCD41-42/β-28	β0/β+	2	0.13
βCD41-42/βCD43	β0/β0	2	0.13
βⅣS-Ⅱ-654/β-28	β+/β+	2	0.13
βⅣS-Ⅱ-654/βCD17	β+/β0	2	0.13
β-28/βCD26	β+/β+	2	0.13
β-28/β-28	β+/β+	1	0.6
β-28/βCD71-72	β+/β0	1	0.6
βⅣS-Ⅱ-654/βCD26	β+/β+	1	0.6
βCD41-42/β-29	β0/β+	1	0.6
βCD17/βⅣS-Ⅰ-1	β0/β0	1	0.6
βCD17/βCD71-72	β0/β0	1	0.6
βCD71-72/βCD26	β0/β+	1	0.6

2.2 脐带血 Hb A 值在不同类别的多重比较结果　各组 Hb A 值统计结果显示，正常组、β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者、β-珠蛋白生成障碍性贫血中重型各组均值分别为(7.54±3.04)%、(3.74±2.18)%、(0.39±0.83)%，多重比较差异有统计学意义($P<0.001$)。见图 1。

2.3 各组最佳 Hb A 截断值结果比较　采用 ROC 曲线分析 β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者、β-珠蛋白生成障碍性贫血中重型胎儿筛查的截断值及对应的特异性和敏感性，选出最佳指标。β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者 ROC 曲线下面积(AUC)为0.893，最佳截断值为 5.15%，敏感性 83.9%，特异性 82.3%；β-珠蛋白生成障碍性贫血中重型者 AUC 为 1.000，最佳截断值为 3.2%，敏感性 100.0%，特异性 99.4%。

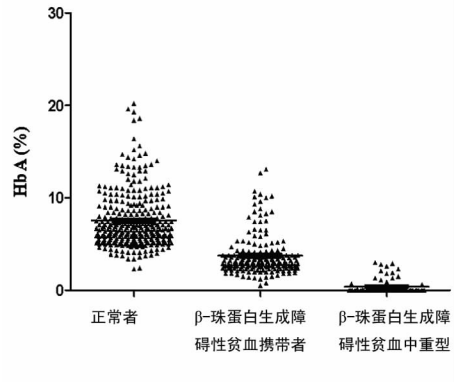

图 1　脐带血 Hb A 值在 β-珠蛋白生成障碍性贫血不同类别的多重比较结果

3 讨　　论

β-珠蛋白生成障碍性贫血重型患儿出生后 6～24 个月发病，而中间型患儿在 2 岁以后发病，我国 β-珠蛋白生成障碍性贫血的诊断主要依靠成人 Hb A 值及基因诊断，其产前诊断则主要是运用 PCR 相关技术从胎儿绒毛、羊水细胞提取的 DNA 并联合父母基因型进行基因诊断[10-11]。目前绒毛取样是较早的产前诊断方式，在孕 9 周左右就可得到基因诊断结果。PCR 技术敏感性较高，微量 DNA 标本就可获得实验结果[12]。但是由于产前标本取样的特殊性及实验条件等影响，存在胎儿基因母血污染、等位基因脱扣等漏检、误检风险。因此胎儿脐带血 Hb 分析联合基因诊断技术可提高产前诊断的敏感性和特异性。

β-珠蛋白肽链在胎儿 3 个月时开始出现，与 α-珠蛋白肽链构成 Hb A，是胎儿出生前的 Hb 组分之一。随着 β-珠蛋白出生前后开始表达并逐渐增强，Hb A 也逐渐取代 Hb F 成为成人最主要的 Hb[4]。因此胎儿脐带血 Hb 电泳 Hb A 值可早期辅助诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血。本研究 337 例正常胎儿脐带血 Hb A 平均值为(7.54±3.04)%，β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者为(3.74±2.18)%，中重型为(0.39±0.83)%，各组两两之间比较，差异有统计学意义($P<0.001$)，说明胎儿时期 β 基因突变可导致 β-珠蛋白链合成降低，使 Hb A 值较正常胎儿明显减少。对异常 Hb E 携带者，可在脐带血中检出异常 Hb E，但敏感性较低。

本研究采用 ROC 曲线分析并计算 AUC，评价脐血 Hb 电泳对 β-珠蛋白生成障碍性贫血诊断的准确性，AUC 越接近 1 说明诊断效果越好。再结合敏感性与特异性，对每个截断值进行分析，从中选出最佳指标，即最大约登指数对应的 cut off 值。脐血 Hb 电泳对 β-珠蛋白生成障碍性贫血携带者诊断的 AUC 为 0.893，最佳截断值为 5.15%，敏感性 83.9%，特异性 82.3%；其中中重型者 AUC 为 1.000，最佳截断值为 3.2%，敏感度 100.0%，特异性 99.4%。本研究结果显示，南宁地区胎儿脐带血筛查及基因分布情况，与成人 β-珠蛋白生成障碍性贫血基因型分布相符[2]。

综上所述，产前诊断是有效控制中重型珠蛋白生成障碍性贫血患儿出生的重要手段。本研究结果表明，脐带血 Hb 电泳

分析可有效辅助诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血。脐带血 Hb 电泳组分分析不仅可鉴定母血污染,利用 Hb A 截断值也可有效进行初步筛查,降低产前诊断的漏检率。对无条件开展基因诊断的基层医院,可应用脐血 Hb 电泳初步筛选可疑患者,并做进一步检测。

参考文献

[1] Giordano PC. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis[J]. Methods Mol Biol, 2013,919(23):131-145.

[2] Xiong F,Sun M,Zhang X,et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010,78(2):139-148.

[3] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社,2011.

[4] Kazazian HH. The thalassemia syndromes:molecular basis and prenatal diagnosis in 1990[J]. Semin Hematol, 1990,27(3):209-228.

[5] Srivorakun H,Fucharoen G,Sae-Ung N,et al. Analysis of fetal blood using capillary electrophoresis system:a simple method for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases[J]. Eur J Haematol,2009,83(1):57-65.

[6] 郭浩,杜丽,唐斌,等. 脐血血红蛋白电泳在新生儿地中海贫血筛查中的应用[J]. 实用医学杂志,2014,30(12):1953-1955.

[7] 李继慧,张炬光,邓国生. 应用脐带血电泳筛查新生儿 α-地中海贫血[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(8):75.

[8] Lin L,Chen DN,Guo J,et al. Development of a capillary zone electrophoresis method for rapid determination of human globin chains in α and β-thalassemia subjects[J]. Blood Cells Mol Dis,2015,55(1):62-67.

[9] Prajantasen T,Fucharoen S,Fucharoen G. High resolution melting analytical platform for rapid prenatal and postnatal diagnosis of β-thalassemia common among Southeast Asian population[J]. Clin Chim Acta,2015,441(441):56-62.

[10] Prajantasen T,Fucharoen S,Fucharoen G,et al. Prenatal and post-natal screening of β-thalassemia and hemoglobin E genes in Thailand using denaturing high performance liquid chromatography[J]. Mol Biol Rep,2013,40(4):3173-3179.

[11] Ho SS,Chong SS,Koay ES,et al. Microsatellite markers within $-^{SEA}$ breakpoints for prenatal diagnosis of HbBarts hydrops fetalis[J]. Clin Chem,2007,53(2):173-179.

[12] Kho SL,Chua KH,George E,et al. A novel gap-PCR with high resolution melting analysis for the detection of α-thalassaemia Southeast Asian and Filipino β-thalassaemia deletion[J]. Sci Rep,2015,5(2):137-139.

(收稿日期:2016-03-11　　修回日期:2016-05-21)

(上接第 2688 页)

[6] 周刚,邱大卫,秦大江,等. 二重荧光定量 RT-PCR 检测胰腺癌患者 CD44v6 基因的表达[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(18):2051-2054.

[7] Golshani R,Lopez L,Estrella V,et al. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion,and angiogenesis through CD44[J]. Cancer Res, 2008,68(2):483-491.

[8] Kuncová J,Urban M,Mandys V. Expression of CD44s and CD44v6 in transitional cell carcinomas of the urinary bladder:comparison with tumour grade,proliferative activity and p53 immunoreactivity of tumour cells[J]. APMIS,2007,115(11):1194-1205.

[9] Sauter A,Kloft C,Gronau S,et al. Pharmacokinetics,immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine,a novel CD44v6-targeting immunoconjugate,in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Int J Oncol,2007,30(4):927-935.

[10] Kawano T,Yanoma S,Nakamura Y,et al. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer[J]. Am J Otolaryngol,2005,26(5):308-313.

[11] Prigozhina NL,Zhong L,Hunter EA,et al. Plasma membrane assays and three-compartment image cytometry for high content screening[J]. Assay Drug Dev Technol, 2007,5(1):29-48.

[12] Wang SJ,Wong G,De Heer AM,et al. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression[J]. Laryngoscope,2009,119(8):1518-1530.

[13] Golshani R,LuisLopez,Estrolla V,et al. Hyalu-tonic acid synthase-I expression regulates bladder cancer growth,invasion,and angiogenesis throush CD44[J]. Cancer Res, 2008,68(2):483-491.

[14] Rupp U,Schoendorf-Holland E,Eichbaum M,et al. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer:final results of a phase I study[J]. Anti-Cancer Drugs,2007,18(4):477-485.

(收稿日期:2016-03-02　　修回日期:2016-05-24)