

# 多重聚合酶链反应在 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血诊断中的应用

张 晔(沈阳医学院奉天医院检验中心, 沈阳 110024)

**【摘要】 目的** 探讨应用多重聚合酶链反应(PCR)技术在缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血(HbH)患者基因类型快速诊断中的价值。**方法** 选择沈阳医学院奉天医院 2006 年 1 月至 2012 年 1 月收治入院,采用多重 PCR 进行 HbH 检测的疑似 HbH 患者 202 例的临床资料进行回顾性分析,并对样本进行基因类型测序及血液实验学参数分析。**结果** 本研究中疑似为 HbH 的 202 份临床标本,基因检测证实其中 136 例为 HbH。与 PCR 检测相比,一管法红细胞脆性、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白含量与红细胞分布宽度变异系数检测的灵敏度分别为 85.29%、99.44%、73.53% 和 61.03%,特异性分别为 69.70%、66.67%、62.12% 和 60.61%。在 136 例 HbH 患者中--SEA/ $\alpha\alpha$  104 例、- $\alpha$ 3.7/ $\alpha\alpha$  14 例、- $\alpha$ 4.2/ $\alpha\alpha$  4 例、- $\alpha$ 3.7/--SEA 11 例和 - $\alpha$ 4.2/--SEA 3 例,分别占 76.47%、10.29%、2.94%、8.09% 和 2.21%。**结论** 多重 PCR 方法能快速检测 HbH 基因型,尤其是 HbH 的双重 HbH 基因型,操作简便,结果准确,可应用于临床 HbH 的基因型检测,尤其适用于大规模人群的 HbH 基因型筛查。

**【关键词】** 多重聚合酶链式反应;  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血; 基因类型; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.14.017 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)14-1812-02

Application of multiplex polymerase chain reaction in the diagnosis of  $\alpha$ -thalassemia ZHANG Ye (Testing Center, Fengtian Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110024, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the application of multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique in deletion  $\alpha$ -thalassemia (HbH) patients with gene type rapid diagnosis value. **Methods** From January 2006 to January 2012, retrospective analysis clinical data of multiplex PCR for detection of 202 cases in patients with suspected for  $\alpha$ -thalassemia in the hospital, and the samples were analyzed for gene sequencing and experimental hematology parameters. **Results** 136 cases were proved to be  $\alpha$ -thalassemia by gene detection in 202 cases with suspected for  $\alpha$ -thalassemia. And PCR detection compared to a tube method, the sensitivity of erythrocyte fragility, MCV, MCH and RDW-CV was 85.29%, 99.44%, 73.53% and 61.03% respectively, the specificity of that was 69.70%, 66.67%, 62.12% and 60.61%. In 136 patients with  $\alpha$ -thalassemia, --SEA/ $\alpha\alpha$  104 cases, - $\alpha$ 3.7/ $\alpha\alpha$  14 cases, - $\alpha$ 4.2/ $\alpha\alpha$  4 cases, - $\alpha$ 3.7/--SEA 11 cases and - $\alpha$ 4.2/--SEA 3 cases, accounting for 76.47%, 10.29%, 2.94%, 8.09% and 2.21% respectively. **Conclusion** The multiplex PCR method can rapidly detect  $\alpha$ -thalassemia genotypes, especially HbH  $\alpha$ -thalassemia dual genotype. Operation is simple and accurate, can be applied to clinical detection of genotype of  $\alpha$ -thalassemia, especially in large population of  $\alpha$ -thalassemia genotype screening.

**【Key words】** multiplex polymerase chain reaction;  $\alpha$ -thalassemia; genotype; diagnosis

珠蛋白生成障碍性贫血是一组常见的常染色体隐性遗传病。目前珠蛋白生成障碍性贫血疾病发病情况比较严重。 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血表现为  $\alpha$ -珠蛋白合成减少或完全不合成,其分子机制已研究得较清楚<sup>[1]</sup>。珠蛋白生成障碍性贫血基因分析情况以及导致珠蛋白生成障碍性贫血的原因要素研究是防治珠蛋白生成障碍性贫血疾病的重中之重<sup>[2]</sup>。本文作者通过对 2006 年 1 月至 2012 年 1 月收治入院的疑似  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血患者 202 例,采用多重聚合酶链反应(PCR)技术对缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血(HbH)患者基因类型进行快速检测,分析基因检测技术对 HbH 患者快速诊断的价值。现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 资料来源于本院 2006 年 1 月至 2012 年 1 月收治入院的经多重 PCR 进行 HbH 检测确诊的 HbH 患者 38 例,其中男 17 例,女 21 例;年龄 1~55 岁,平均(23.4 $\pm$ 5.4)岁,所有患者均为婚孕筛查发现为珠蛋白生成障碍性贫血,以及珠蛋白生成障碍性贫血的先证者和其家系检测获得。其中

轻型 22 例,重型 16 例,所有研究病例均经血红蛋白(Hb)、平均红细胞容积(MCV)、血红蛋白 A<sub>2</sub>(HbA<sub>2</sub>)、抗碱血红蛋白(HbF)、红细胞(RBC)脆性及 Hb 电泳检测证实。

**1.2 HbH 诊断标准**<sup>[3]</sup> (1)临床:可有黄疸、贫血、肝脾肿大。(2)血液学:①Hb 降低或正常,网织 RBC 增高或正常;②RBC 大小不均,中心浅染,有靶形 RBC;③平均红细胞血红蛋白含量(MCH)降低;④RBC 渗透脆性降低;⑤骨髓增生活跃以上,以红系为主。(3)生化检查:Hb 电泳出现 HbH 带。(4)遗传:家系中可有 HbH 病患者。(5)有条件应做  $\alpha/\beta$  肽链合成速率比及基因分析。

## 1.3 检测方法

**1.3.1 血液学检测** 采用 CELL-DYN-1700 型血细胞自动分析仪检测 Hb 和 RBC, HbF 采用 1 min 碱变性法, RBC 脆性采用比色一管法(正常参考值:>60%), Hb 电泳和 HbA<sub>2</sub> 采用 Hb 自动电泳扫描分析仪(Beckman)检测。

**1.3.2 外周血白细胞 DNA 提取** 抽取 2 mL 静脉肝素抗凝血,样本置于枸橼酸钠常规抗凝管中,混匀后存于 4℃ 72 h 内

(或置于一70℃低温冰箱保存),用全血DNA提取试剂盒按说明进行操作。

**1.3.3 PCR反应体系** 采用深圳益生堂生物企业公司生产的HbH基因诊断试剂盒,严格按照说明书进行操作。反应总体积50μL,TaqDNA聚合酶2U,dNTP 200μmol/L,模板DNA 1μg。PCR反应条件:97℃预变性5min,55℃5min(加Taq酶),72℃2min,循环1次;94℃50s,55℃1min,72℃1min,循环30次。PCR产物经1%琼脂糖电泳,溴乙啶染色,紫外透射仪观察,扩增成功可见2条特异的DNA片段(601,423bp)。PCR产物分别加2μL电泳加样缓冲液,混匀后将1.0%琼脂糖凝胶加入样孔中。稳压(5~6V/cm)电泳约45min置于UVP灯下观察。

表 1 PCR 检测和血液学方法检测结果比较(n)

| 基因型         | RBC 脆性(%) |     | MCV(fL) |     | MCH(pg) |     | RDW-CV(%) |       | HbA2(%) |      | 合计  |
|-------------|-----------|-----|---------|-----|---------|-----|-----------|-------|---------|------|-----|
|             | <60       | >60 | <80     | >80 | <26     | >26 | <15.9     | >15.9 | <2.5    | >2.5 |     |
| αα/αα       | 20        | 46  | 22      | 44  | 25      | 41  | 26        | 40    | 6       | 60   | 66  |
| --SEA/αα    | 92        | 12  | 104     | 0   | 78      | 26  | 62        | 42    | 5       | 99   | 104 |
| -α3.7/αα    | 6         | 8   | 4       | 10  | 6       | 8   | 6         | 8     | 1       | 13   | 14  |
| -α4.2/αα    | 4         | 0   | 1       | 3   | 2       | 2   | 3         | 1     | 0       | 4    | 4   |
| -α3.7/--SEA | 11        | 0   | 11      | 0   | 11      | 0   | 9         | 2     | 0       | 11   | 11  |
| -α4.2/--SEA | 3         | 0   | 3       | 0   | 3       | 0   | 3         | 0     | 0       | 3    | 3   |
| 合计          | 136       | 66  | 145     | 57  | 125     | 77  | 109       | 93    | 12      | 190  | 202 |

表 2 各基因型血液学指标及 RBC 脆性实验结果比较(̄x±s)

| 基因型         | n   | RBC 脆性(%) | MCH(pg)  | RDW-CV(%) | MCV(fL)  | HbA2(%)   |
|-------------|-----|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| αα/αα       | 66  | 68.0±15.1 | 26.3±3.9 | 17.5±1.8  | 78.6±9.7 | 1.90±0.36 |
| --SEA/αα    | 104 | 35.6±12.1 | 21.1±1.4 | 17.3±2.6  | 67.2±4.2 | 2.05±0.25 |
| -α3.7/αα    | 14  | 54.1±7.3  | 28.0±1.5 | 15.6±1.0  | 82.7±5.6 | 2.23±0.16 |
| -α4.2/αα    | 4   | 55.3±6.9  | 27.0±2.2 | 14.8±1.3  | 83.5±4.7 | 2.14±0.17 |
| -α3.7/--SEA | 11  | 32.1±8.1  | 17.8±3.3 | 14.3±2.1  | 60.4±6.3 | 1.51±0.33 |
| -α4.2/--SEA | 3   | 31.6±7.2  | 17.2±3.6 | 14.6±1.8  | 59.3±7.2 | 1.46±0.29 |

3 讨 论

珠蛋白生成障碍性贫血是由于常染色体遗传缺陷导致Hb中的珠蛋白合成障碍,因而一种或几种珠蛋白数量不足或完全缺乏,RBC易被溶解破坏而造成溶血性贫血<sup>[4]</sup>。其中α-珠蛋白链合成障碍称为HbH,β-珠蛋白链合成障碍称为β-珠蛋白生成障碍性贫血。前者多发于东南亚,后者多发于地中海、中东、阿拉伯、印度、东南亚地区<sup>[5]</sup>。我国HbH在广东、广西、四川的发病率占1%~4%;β-珠蛋白生成障碍性贫血的发病率为1.002%,以云南、贵州、四川、广东、广西多见,其中广西的发病率为1.12%<sup>[6]</sup>。根据基因缺陷程度,α-型珠蛋白生成障碍性贫血一般分4型,即静止型、标准型、HbH病、HbBart's胎儿水肿综合征。HbH出生时可无临床表现,可在脐血中发现含量在25%左右的HbBart's,随着年龄增大可出现贫血、黄疸、肝大、臀状头、鼻梁凹陷、门齿突出。标准型与静止型无明显临床表现或仅有轻度贫血症状及小细胞低色素细胞<sup>[7]</sup>。出生时可查出HbBart's,HbA2稍降低,煌焦油蓝染色可可见少数红细胞变形性珠蛋白小体(计数在千分之几水平)。HbBart's胎儿水肿综合征患者多于妊娠34周左右早产死亡<sup>[8]</sup>。胎盘大而易碎,胎儿苍白,全身水肿,有轻度黄疸,皮肤可有出血点,心脏扩大,胸腺缩小,肺发育不全,脑血管弯曲。

**1.3.4 序列分析** PCR产物经纯化后,用MegaBACE 1000型全自动毛细管测序仪进行测序。

2 结 果

本研究中202份疑似为HbH的临床标本,基因检测证实其中136例为HbH,其结果经序列分析证实。与PCR检测相比,一管法RBC脆性、MCV、MCH与RBC分布宽度变异系数(RDW-CV)检测的灵敏度分别为85.29%、99.44%、73.53%和61.03%,特异性分别为69.70%、66.67%、62.12%和60.61%。在136例HbH患者中--SEA/αα 104例、-α3.7/αα 14例、-α4.2/αα 4例、-α3.7/--SEA 11例和-α4.2/--SEA 3例,分别占76.47%、10.29%、2.94%、8.09%和2.21%,见表1、2。

肝脾肿大尤以肝大为著,腹水较多,并见胸腔及心包积液。骨髓象增生活跃,RBC增生旺盛,含铁血黄素明显沉着<sup>[9]</sup>。

本研究针对中国人常见的HbH建立一种快速、简便、可靠的PCR基因诊断技术。利用单管多重PCR进行扩增,同时检测3种缺失型和正常的α-珠蛋白基因。本研究中疑似为HbH的202份临床标本,基因检测证实其中136例为HbH,其结果经序列分析证实。与PCR检测相比,一管法RBC脆性、MCV、MCH与RDW-CV检测的灵敏度分别为85.29%、99.44%、73.53%和61.03%,特异性分别为69.70%、66.67%、62.12%和60.61%。在136例HbH患者中--SEA/αα 104例、-α3.7/αα 14例、-α4.2/αα 4例、-α3.7/--SEA 11例和-α4.2/--SEA 3例,分别占76.47%、10.29%、2.94%、8.09%和2.21%。

基因检测结果分析表明,该法快速、准确,可用于常规临床标本的检测。

参考文献

[1] 李泽松,李建新,张文,等.多重聚合酶链反应在α-地中海贫血诊断中的应用[J].中华检验医学杂志,2005,28(3):247-250.  
[2] 吴洁莹,廖灿,李坚,等.多重PCR用于(下转第1815页)

| 表 1 不同影像学方法检查肺底积液结果比较 |    |      |      |        |
|-----------------------|----|------|------|--------|
| 组别                    | n  | 检出例数 | 漏诊例数 | 准确率(%) |
| 二维 B 超                | 79 | 76   | 3    | 96.2   |
| X 线片                  | 79 | 60   | 19   | 75.9   |
| CT                    | 66 | 62   | 4    | 93.9   |

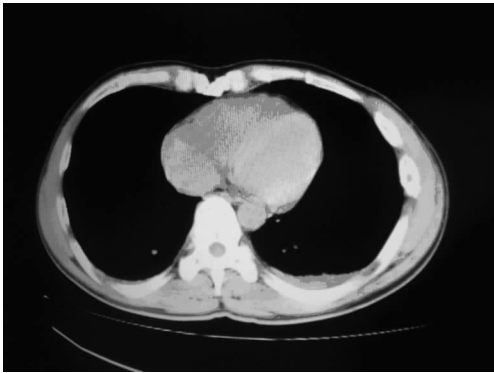


图 2 左侧肺底新月形胸膜增厚

3 讨 论

肺底积液是指肺底胸膜与隔胸膜之间的胸腔积液,又称肺下积液<sup>[2]</sup>,形成因素较多,临床上最常见于结核,但也可见于肿瘤或肿瘤胸膜转移、心功能不全以及结缔组织病等。结核性胸膜炎是指结核杆菌及其代谢产物进入高度敏感的胸膜腔后引发的机体变态反应<sup>[2]</sup>,其主要的病理特点表现为胸膜的充血、水肿、炎性细胞浸润和血浆蛋白的渗出。由于早期受累的仅仅是隔胸膜,肋胸膜未受累及,因而炎性反应仅表现为局部渗出的少量积液积聚在肺底与横隔膜之间,形成所谓的肺底积液。结核性肺底积液的临床表现常以胸痛、咳嗽为主,本组患者胸痛发生率为 94.9%(75/79),咳嗽发生率为 75.9%(60/79)。而低热、盗汗、乏力等对结核性疾病诊断有倾向性的症状发生率较低,其中低热的发生率为 53.1%(42/79),盗汗、乏力的发生率仅为 13.9%。提示肺底积液的检出对结核性胸膜炎的早期诊断具有十分重要的意义。

X 线片检查时典型的表现为患侧肺下野密度增高,肺底部模糊、毛糙,而左侧由于胃泡的干扰,肺底少量积液时的变化更加不易显示,这也是 X 线片对肺底积液显示不理想的重要原因之一。本研究结果提示,X 线片对肺底积液的诊断准确率仅为 75.9%,而漏诊率高达 24.1%。

CT 扫描具有良好的密度和空间分辨率,可清晰地显示患者胸膜的厚度以及积液的量,且对肺内结核病灶、肺门或纵隔淋巴结结核的检出率极高。然而对游离于肺底部的少量积液,仰卧位 CT 扫描表现为胸腔外围及下部新月形液性密度影、隔下梭形液性密度影、或者增厚的胸膜。本研究结果提示,CT 对肺底积液的诊断准确率高,漏诊率低,临床价值大。但由于 CT 检诊的费用高,临床上很少将其作为检诊的首选手段。

二维超声检查时肺底积液表现为隔与肺底胸膜影分离,二者间多呈上下径线窄、左右径线宽的扁平状液性暗区,其上界模糊,可见弧形强回声,位于脊柱左侧或右侧,此为肺底组织的多次强回声气体反射,并随呼吸上下移动;其下界清晰,积液声窗图像显示弧形突起的隔顶清晰显现,肋隔角处无回声区的左右径线明显增宽,呈不锐利三角形,其下肋间液性暗区明显减少或消失。本研究结果提示,超声对肺底积液的诊断准确率高达 96.2%,漏诊率仅为 3.8%。有文献报道 B 超检查肺底积液的准确率达到 100.0%<sup>[3]</sup>,甚至对少至 100 mL 积液也能准确显示<sup>[4]</sup>。与 X 线片相比,二维超声只要透质分界阻抗差在 0.1%即可有界面的声波反射,因而大大提高了少量胸腔积液的检出准确率,而 X 线片需要组织密度差高于 10.0%才会有差异<sup>[5]</sup>。此外,二维超声检查不仅简便、可靠、价廉、无射线,而且便于床旁操作,重复性好,在必要时甚至可以实时动态地在超声引导下胸腔穿刺抽吸、置管引流、胸膜活检,也可在治疗的不同阶段动态监测积液量的变化、置管的位置等,以协助临床医生制订切实合理的治疗方案,提高治愈率。

参考文献

[1] 黄家喜.肺底积液的 X 线诊断与鉴别[J].实用诊断与治疗杂志,2007,47(2):157-158.

[2] 苏建增.结核性胸膜炎的影像学表现及诊断价值[J].中国现代医生,2009,4(5):108-109.

[3] 夏宇,姜玉新.呼吸系统的超声诊断[M].北京:人民卫生出版社,2004:447.

[4] 周永昌,郭万学.超声医学[M].4 版.北京:科学技术文献出版社,2002:856.

[5] 郭玉瑞.胸腔积液 B 超与 X 线 CT 诊断对照分析[J].基层医学论坛,2010,14(31):1023-1024.

(收稿日期:2012-12-18 修回日期:2013-03-11)

(上接第 1813 页)

缺失型  $\alpha$ -地中海贫血的基因检测[J].中国实验血液学杂志,2004,12(4):472-474.

[3] 文婕.地中海贫血基因诊断和产前诊断的研究[D].昆明:昆明医学院,2009:5-61.

[4] Oron-Karni V, Filon D, Oppenheim A, et al. Rapid detection of the common mediterranean alpha-globin deletions/rearrangements using PCR[J]. Am J Hematol, 1998, 58(4):306-310.

[5] 黄钰君,区小冰,余一平,等.广州地区儿童  $\alpha$ -地中海贫血的发生率及缺失基因检测结果分析[J].中国小儿血液,2005,10(5):205-208.

[6] Ko TM, Tseng LH, Hsieh FJ, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia of Southeast Asian

deletion by polymerase chain reaction [J]. Human Genetics. 1992, 83(3):245-248.

[7] Chong S, Boehm C, Higgs D, et al. Single-tube multiplex-pcr screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia[J]. Blood, 2000, 95(1):360-362.

[8] 刘敬忠,周桔,王立荣,等.缺失型  $\alpha$ -地中海贫血的基因诊断新技术研究[J].中华血液学杂志,2001,22(4):193-196.

[9] 何雅军,杨小华,马福广,等.红细胞平均体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J].中华检验医学杂志,2005,25(3):24-26.

(收稿日期:2012-10-21 修回日期:2013-02-12)