

423 例孕妇地中海贫血筛查及基因检测结果分析和临床意义

谢建渝¹, 虞柯静¹, 罗文梅², 董国强^{1△}, 徐正会¹ (1. 重庆华西妇产医院, 重庆 400039;
2. 重庆金域医学检验所, 重庆 400039)

【摘要】 目的 探讨孕妇贫血(简称地贫)在产前检查中的发病率及对地贫基因携带的干预,更好地预防和减少重症地贫新生儿的出生。**方法** 筛查实验采用以碱性血红蛋白电泳为主,结合血常规、红细胞孵育渗透脆性试验(简称脆性试验)、镜检血红蛋白 H 包涵体或高效液相色谱法(HPLC)对异常血红蛋白带进行分析;基因诊断法采用聚合酶链反应(PCR)和反向斑点杂交法(RDB)对地贫基因分型。**结果** 血红蛋白成分分析结果:红细胞孵育渗透脆性试验结果阳性为 6 例;红细胞体积分布宽度(RDW)实验结果阳性为 108 例;平均红细胞体积(MCV)实验结果阳性为 60 例,其中大于 100 fL 为 48 例, <80 fL 为 12 例;碱性血红蛋白电泳实验结果阳性为 18 例,其中小于 96.50% 为 3 例, >97.50% 为 15 例。423 例受检者均未检测到异常血红蛋白带。门诊 423 例孕妇地贫筛查的阳性率为 4.26%(18/423)。其中 α -地贫者 15 例,阳性率为 3.55%(15/423), β -地贫者 3 例,阳性率为 0.71%(3/423)。基因检测结果,筛查的 423 例孕妇中有 333 例孕妇小细胞低色素贫血[血常规 MCV $\leq$ 80 fL, 平均红细胞血红蛋白含量(MCH) $<$ 27 pg]疑似地贫者进行地贫基因诊断分析,333 例地贫基因受检者中确诊为地贫者 48 例,占 14.41%。其中 α -地贫 24 例,占 7.21%(24/333); β -地贫 24 例,占 7.21%(24/333)。**结论** 重庆主城区妊娠妇女人群中存在较高的地贫发病率和地贫基因携带率。因此妇女孕期小细胞低色素贫血的需要进行地贫筛查及基因分析,对地贫基因携带者进行出生缺陷干预,减少出生缺陷,对优生优育和提高人口素质具有重要意义。

【关键词】 地中海贫血; 血红蛋白成分; 基因分型; 妊娠妇女

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)10-1325-03

Analysis of thalassemia screening and genetic test in 423 pregnant women XIE Jian-yu¹, YU Ke-jing¹, LUO Wen-mei², DONG Guo-qiang^{1△}, XU Zheng-hui¹ (1. Chongqing Huaxi Gynaecology Hospital, Chongqing 400039, China;
2. Chongqing Kingmed Center for Clinic Laboratory, Chongqing 400039, China)

【Abstract】 Objective To investigate the incidence rate of thalassemia in pregnant women during prenatal detection, and to explore the methods to prevent and reduce the birth rate of infants with severe thalassemia. **Methods** Alkaline hemoglobin electrophoresis, combined with blood test, red blood cells incubated osmotic fragility test (fragility test), microscopic examination of hemoglobin H inclusions or high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of abnormal hemoglobin band, were performed or screening test. Polymerase chain reaction (PCR) and reverse dot blot (RDB) were used for genetic diagnosis of thalassemia genotyping. **Results** Among analysis of hemoglobin components, red blood cell incubated osmotic fragility was positive in 6 cases, red blood cell volumedistribution width (RDW) was positive in 108 cases, mean corpuscular volume (MCV) was positive in 60 cases, of which 48 cases were more than 100 fL, and 12 cases were less than 80 fL, and alkaline hemoglobin electrophoresis was positive in 18 cases, of which 3 cases were less than 96.50% 15 cases more than 97.5%. Among 423 cases, receiving detection, no case was found to be with abnormal hemoglobin. In 423 cases of outpatient pregnant women, thalassemia screening positive rate was 4.26%(18/423), including α -thalassemia for 15 cases, accounting for 3.55%(15/423) and β -thalassemia for 3 cases, accounting for 0.71%(3/423). Genetic test results indicated that out of 423 pregnant women, who were screened, 333 cases were with small cell hypochromic anemia (MCV $\leq$ 80 fL, MCH $<$ 27 pg). Further examination showed that in these 333 suspected thalassemia cases, 48 cases were with thalassemia, accounting for 14.41%, including 24 cases with α -thalassemia, accounting for 7.21%(24/333) and 24 cases with β -thalassemia, accounting for 7.21%(24/333). **Conclusion** Indicating that there might be a high prevalence of thalassemia and thalassemia gene carrier in main area of Chongqing. Therefore, thalassemia screening and genetic analysis should be performed in pregnant women with small cell hypochromic anemia, which might be an effective way to reduce birth defects and improve the quality of population.

【Key words】 thalassemia; hemoglobin composition; genotyping assay; pregnant women

珠蛋白生成障碍性贫血又称地中海贫血(简称地贫),是一种由于珠蛋白基因缺失或突变导致肽链合成障碍而引起的遗传性溶血性贫血。目前对地贫尚无根本有效的治疗方案,只有通过遗传筛查、B 超检查和产前诊断才能有效杜绝重症地贫患儿的出生;通过孕前检查、孕期保健和产前筛查,出生缺陷率可减少 40%~50%。筛查实验通过以碱性血红蛋白电泳为主,结合血常规、红细胞孵育渗透脆性试验(简称脆性试验)、镜检血红蛋白 H 包涵体/高效液相色谱法(HPLC)对异常血红蛋白带进行分析;基因诊断法对地贫基因分型检测,采用聚合酶链反应(PCR)和反向斑点杂交(RDB)技术检测我国常见的 17 种 β -地贫基因突变和 3 种常见的 α -地贫基因缺失。作者对 423 例孕妇进行地贫筛查和基因诊断,就血红蛋白成分和地贫基因分型进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 12 月至 2013 年 9 月到重庆华西妇产医院进行地贫筛查的 423 例孕妇作为研究对象,年龄 20~33 岁,平均(26.30±4.21 岁),孕周 13~28 周,平均(22.50±3.81)周。

1.2 检测仪器及试剂

1.2.1 地贫血红蛋白成分分析仪器为 Helena SPIFE 3000 全自动电泳分析系统,试剂 SPIFE Alkaline Hemoglobin Gel。

1.2.2 α -地贫基因分型检测使用的仪器试剂为美国 BIO-RAD 公司生产的 S1000 基因扩增仪,美国 BIO-RAD 公司生产 POWER300 凝胶电泳系统、美国 BIO-RAD 公司生产 Gel Doc™ 2000 凝胶成像系统、德国 Eppendorf 公司生产的 5415D 高速离心机; α -地贫基因分型使用的试剂由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。

1.2.3 β -地贫基因分型使用的仪器试剂为美国 BIO-RAD 公司生产的 S1000 基因扩增仪、韩国 Finemould 公司生产的 Combi-D24 双层杂交箱、德国 Eppendorf 公司生产的 5415D 高速离心机; β -地贫基因分型使用的试剂由深圳益生堂生物企业有限公司提供。

1.3 方法 采用碱性血红蛋白电泳为主,结合血常规、脆性试验、镜检血红蛋白 H 包涵体或 HPLC 对异常血红蛋白带进行分析,采用 PCR 和 RDB 对地贫基因分型。

1.3.1 α -地贫质控 (1) α -地贫缺失型质控品:采用检测结果为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 、 $\alpha\alpha/-SEA$ 、 $-\alpha^{3.7}/-SEA$ 、 $-\alpha^{4.2}/-SEA$ 、 $(-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 和 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha)$ 双杂共 6 种缺失型的标本,每个工作日用其中的 1 种缺失型作为质控,随患者标本检测,6 种缺失型依次轮流循环作为质控检测。(2)阴性质控品:健康人的标本。(3) α -地贫质控接受标准:接受标准阴性质控的扩增条带为 1.7 kb。突变质控的扩增条带与预期的相符。

1.3.2 β -地贫质控

1.3.2.1 β -地贫突变质控品 采用日常检测中出现过的突变标本,包括 IVS-II -654、CD41-42、-28、CD17、IVS-I -1、-29、 βE 、CD71-72、CD43、CAP、CD14-15、CD27-28 共 12 种突变,每个工作日用其中的 1 种突变作为质控,随患者标本检测。12 种突变依次轮流循环作为质控检测。当月若有少见突变类型,可以增加检测少见质控类型,少见质控类型包括 Int 突变、IVS1-5

突变、-32 杂合子、CD31 杂合子、-30 杂合子。

1.3.2.2 野生型质控品 用健康人的标本。

1.3.2.3 β -地贫质控接受标准 (1)突变型质控:突变位点有蓝色斑点出现,且与预期相符。(2)野生型质控:7 个正常位点应至少有 6 个位点有蓝色斑点出现。

1.3.3 诊断标准

1.3.3.1 地贫筛查 (1)用血细胞分析仪测定红细胞平均体积(MCV),正常标准 $MCV<80$ 或大于 100 fL,平均红细胞血红蛋白量(MCH) >27 pg。(2)血红蛋白测定:血红蛋白 A2 $<2.5\%$ 行 α -地贫基因分析;血红蛋白 A $>3.5\%$ 行 β -地贫基因分析。

1.3.3.2 基因分析 地贫基因分析采用 PCR 技术、 β -地贫基因分析采用反向点杂交技术(RDB)。

2 结果

2.1 血红蛋白成分分析结果

2.1.1 423 例受检者中,脆性试验结果阳性为 6 例,结果分别为 44%(3 例)、54%(3 例)。

2.1.2 红细胞体积分布宽度(RDW)实验结果阳性为 108 例。

2.1.3 平均红细胞体积(MCV)实验结果阳性为 60 例(其中大于 100 fL 为 48 例, <80 fL 为 12 例)。

2.1.4 血红蛋白实验结果阳性为 96 例。

2.1.5 碱性血红蛋白电泳,可特异性的检测出血红蛋白 A2 与血红蛋白 F(A+F),碱性电泳实验结果阳性为 18 例(其中小于 96.50% 3 例, $>97.50\%$ 15 例)。

2.1.6 282 名受检者均未检测到异常血红蛋白带。血常规及异常血红蛋白带等检查结果,见图 1。

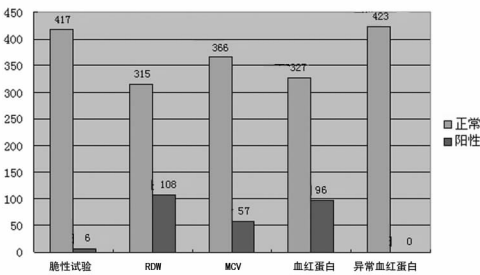


图 1 血常规及异常血红蛋白带等检查结果

2.2 282 例碱性血红蛋白电泳 特异性的检测出血红蛋白 A2 与血红蛋白 F(A+F) 的含量;血红蛋白(A+F) 碱性电泳实验结果阳性为 18 例(4.26%),其中有 3 例血红蛋白 F 降低怀疑为 β -地贫,阳性率为 0.71%(3/423);有 15 例血红蛋白 A2 降低怀疑为 α -地贫,阳性率为 3.55%(15/423)。血红蛋白成分分析结果正常为 405 例,正常率为 95.74%。

2.3 地贫基因检测结果

2.3.1 在对就诊的 423 例中 333 例孕期小细胞低色素贫血(血常规结果 $MCV\leq 80$ fL, $MCH<27$ pg)疑似地贫者进行地贫基因诊断分析,333 例受检者确诊为地贫基因携带者 48 例,占 14.41%(48/333)。其中 α -地贫 24 例,占 7.21%; β -地贫 24 例,占 7.21%。无地贫基因携带为 85.58%(285/333)。

2.3.2 地贫基因缺陷类型结果见表 1。

表 1 地贫基因缺陷类型结果

基因位点	基因缺陷型别	<i>n</i>	携带率(%)
α-地贫 1 基因(SEA)	α-地贫 1 基因杂合子(—/αα)	12	3.60
α-地贫 2 基因(3.7/4.2)	基因缺失(3.7 型),纯合子(—α/—α)	0	0.00
	基因缺失(4.2 型),杂合子(—α/αα)	3	0.90
β-地贫血基因分型(17 种突变)	CD17 位点突变基因杂合子	3	0.90
	CD41-42 位点突变基因杂合子	15	4.50
	IVS-II-654 位点突变基因杂合子	6	1.80

3 讨 论

患者的红细胞较脆弱且容易死亡,其带氧能力亦不足,超过某种程度则无法正常生活;在结婚以前健康检查可以筛选出来,是一种常染色体隐性基因遗传,患者红细胞的体积较正常细胞小,且有时因血红素含量低较苍白或呈靶型。地中海贫血的最大危害来自于贫血,长期贫血会导致患者脏器功能减退,首先骨髓会过度造血,引起骨板变薄,导致患者骨质疏松,长期贫血会导致铁的吸收过量,还会导致心功能衰竭、肝脾肿大等临床症状,影响生长发育。此病目前国内外尚无有效的治疗方法,仅能依靠输血维持生命,即使是进行造血干细胞移植,不但花费巨大,目前成功率也仅在 70%左右^[1]。

据流行病学调查显示,长江以南(广东、广西、海南、云南、四川、重庆等)均为地贫的主要高发区。在广西、广东、海南等南方省区,地贫基因携带者高达 20%以上^[2];在四川、重庆、云南等省,基因携带率为 6%左右。若夫妻为同型地贫的基因携带者,每次怀孕,其子女有 1/4 的机会为正常,1/2 的机会为基因携带者,另 1/4 的机会为重型地中海型贫血患者。

淘汰重型地贫患儿是目前国际上公认的预防对策^[3]。当前,实验室诊断技术主要有筛查法和基因诊断法两种^[4]。地贫的基因检测技术很多,如血红蛋白电泳、血常规、脆性试验等^[5]。目前,最常用的产前筛查方法是通过血液分析仪检查 MCV 和 MCH。以 MCH<27 pg 或 MCV<80 fL 为标准,筛查出地贫携带者。当 MCH 或 MCV 小于该标准后,进行血红蛋白电泳。若血红蛋白 A<2.5%,则高度怀疑为 α-地贫基因携带者。如果发现了血红蛋白 H 包涵体,则可诊断为中间型 α-地贫。同时还应注意血清铁蛋白测定,以排除缺铁性贫血^[6]。此类方法操作要求低,费用低廉,但敏感性差,特异性不高;而近来广泛应用的血红蛋白电泳法也存在着准确性和重复性不佳的缺点^[7]。且部分患者 MCV 及脆性试验正常,是造成 β-地贫基因携带者漏诊的主要原因,漏诊率达到 13.23%。本研究对 423 例孕妇进行地贫初筛,并进行血红蛋白成分分析,其中怀疑为 α-地贫者 15 例(3.55%),怀疑为 β-地贫者 3 例(0.71%),总计阳性率为 4.25%。

本研究采用 PCR 和 RDB 技术检测我国常见的 17 种 β-地贫基因突变和 3 种常见的 α-地贫基因缺失,这是地贫诊断的最终方法和金标准,结果可作为遗传咨询依据,并指导产前诊断。作者对就诊的 423 例中 333 例孕期小细胞低色素贫血疑似地贫者进行地贫基因诊断。333 例受检者中确诊为地贫基因携带者 48 例,占 14.41%(48/333)。其中 α-地贫 24 例,占 7.21%;β-地贫 24 例,占 7.21%。无地贫基因携带为 85.58%

(285/333)。从表 1 可以得出:α-地贫基因位点或基因缺陷型分别为 α-地贫 1 基因(SEA)、α-地贫 1 基因杂合子(—/αα),携带者有 12 例,携带率为 3.60%;α-地贫 2 基因(3.7/4.2)、基因缺失(3.7 型),纯合子(—α/—α),未检测出携带者;基因缺失(4.2 型),杂合子(—α/αα),携带者为 3 例,携带率为 0.90%。β-地贫血基因分型(17 种突变),基因缺陷型主要是以下 3 种基因缺陷型:(1)分别为 CD17 位点突变基因杂合子,携带者有 3 例,携带率为 0.90%;(2)CD41-42 位点突变基因杂合子,携带者有 15 例,携带率为 4.50%;(3)IVS-II-654 位点突变基因杂合子,携带者有 6 例,携带率为 1.80%。从表 1 中可见:以 α-地贫 1 基因杂合子(—/αα)和 β-地贫血基因 CD41-42 位点突变基因杂合子为多见,携带者有 27 例(8.10%)。

由于目前对地贫尚无有效的根治方法,而夫妇携带的异常 α、β-地贫基因可以遗传给子女,根据遗传情况,假设夫妇双方均为 α-地贫基因携带者,将会有 1/4 的危险分娩出一个重型 α-地贫新生儿,并会导致胎儿宫内水肿及死亡。目前,仅能进行产前检查避免患儿的出生,而对 α-地贫纯合子胎儿则无有效的治疗措施^[8]。因此,进行产前筛查和基因诊断的可杜绝纯合子患儿的出生,减少杂合子患儿的出生^[9]。如果双方同时为轻型地贫也可能造成子代的重型地贫。在地贫的高发区,防止地贫患儿的出生是一项非常重要的任务。

对本院就诊的 333 例小细胞低色素贫血孕妇人群进行地贫筛查研究结果得到孕妇地贫在重庆地区的筛查率为 4.25%,表明在重庆地区的孕妇贫血人群中,有很大部分与地贫相关。应进一步完善规范地贫筛查流程。但目前群众对此遗传性疾病还未引起广泛关注,应大力度地开展地贫知识的普及与宣传工作,由于目前国内外均无有效的根治性方法。建立起在产前检查中进行常规地贫的筛查,为进一步进行基因诊断和遗传咨询提供基础,以防止重度新生儿地贫的出生,对优生优育和提高人口素质具有重要意义。

本研究结果表明:重庆地区孕妇地贫筛查的阳性率为 4.2%;地贫基因携带率为 14.41%。与马升俊等^[10]报道的相符。若夫妻为同型地中海型贫血的基因携带者,其子女有 1/4 的概率为正常,1/2 的概率为基因携带者,另 1/4 的概率为重型地中海型贫血患者。所以对孕妇进行地贫筛查和地贫基因诊断是非常必要的,能够切实提高地贫基因缺陷检出率,从而检出更多的携带者,以便有效地指导婚配与生育,起到有效干预出生缺陷的作用,最终达到将重型患儿的出生率几乎降为零的目标,对优生优育和提高人口素质具有重要意义。

表 3 乳房胀痛与雌、孕激素水平的关系(̄x±s)

组别	n	黄体期			晚卵泡期		
		雌二醇(pmol/L)	孕酮(nmol/L)	雌二醇/孕酮	雌二醇(pmol/L)	孕酮(nmol/L)	雌二醇/孕酮
乳房胀痛者	52	364.8±111.6	73.7±24.6	2.3	298.1±103.4	4.0±1.2	18.6
未有乳房胀痛者	46	327.6±100.2▲	62.5±28.1▲	6.8▲	383.3±177.6▲	3.4±1.0▲	35.8▲

注:与乳房胀痛者比较,▲P<0.05。

3 讨 论

乳腺作为女性的重要内分泌器官,在生命及月经的不同时期常会出现不同的变化,且个体差异性较大,随着现今社会的不断发展,乳腺疾病已成为严重影响女性生活质量的因素之一,其发病率呈现不断上升趋势。已有研究证实,月经不同时期的健康成熟女性,乳腺超声均显示其发生着周期性变化,其成因多与雌、孕激素作用有关^[2-3]。其中黄体期,乳腺小叶的扩大与腺管分支增加及伸展有关,以至于小叶腺泡上皮发生增殖变化^[4];而晚卵泡期的乳腺则多以导管的变化为主,导管延伸,管腔扩大。本研究结果亦证实,与黄体期比较,晚卵泡期的乳腺体层厚度与雌二醇水平均减少,而导管宽度则增加,与前述结果相契合。

同时,有研究证实,在月经周期的后半期是乳腺上皮细胞的增生最活跃期,而增殖高峰则出现在月经周期的第 21.5 天,增生的乳腺组织主要发生黄体期^[5-6],本研究结果与之相同。同时,在本研究结果中,超声乳腺结构的变化,多为随着月经周期而变化的乳腺结节的变化。据此,作者认为乳腺结构随体内激素的变化而变化的现象,属于生理性反应。

既往研究证实,周期性乳房胀痛与激素水平的变异有关^[7]。但也有研究者认为,乳腺胀痛多与两方面有关,一是雌孕激素的比值,二是乳腺组织的过度反应^[8]。本研究中亦证实,在月经的不同时期,雌孕激素的比值是导致乳房胀痛的因素。

综上所述,随着月经周期的变化,乳腺腺体声像图表现亦随之变化,乳房胀痛与乳腺腺体结构变化相关;而乳腺腺体结构变化和乳房胀痛与雌孕激素比值变化有关。在 HRT 治疗过程中,应根据不同的月经时期,进行乳腺超声以及雌孕激素

监测,以防止出现乳腺腺体结构发生变化,进而引发乳房胀痛,从而更好地保障女性身心健康。

参考文献

[1] 严松莉. 乳腺超声与病理[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009.

[2] 李兰,杨红鹰. 乳腺导管内增生性病变的病理学特点及其与浸润性癌的关系[J]. 诊断病理学杂志,2008,15(1):68-72.

[3] 侯新燕,矫健,朱洁,等. 高频超声观测国人健康女性静止期乳腺导管管径变化趋势[J]. 中国超声医学杂志,2008,24(11):981-983.

[4] 严松莉,秦仕生,汤兵辉. 彩超在乳腺癌和纤维腺瘤鉴别诊断中的价值[J]. 中国超声诊断杂志,2004,5(2):83-87.

[5] 曾枝柳. 乳腺疾病的超声影像诊断研究及进展[J]. 中国医药指南,2013,11(5):434-436.

[6] 陈薇,欧阳昭连,王艳斌,等. 三维超声技术进展及其乳腺诊断应用现状[J]. 中国医疗器械杂志,2013,32(4):277-280.

[7] Athanasiou A, Tardivon A, Ollivier L, et al. How to optimize breast ultrasound[J]. Eur J Radiol, 2009, 69(1):6-13.

[8] Printz C. Ultrasound better than mammography for women younger than 40 years with symptoms of breast Cancer[J]. Cancer, 2013, 119(6):1118.

(收稿日期:2013-12-23 修回日期:2014-02-14)

(上接第 1327 页)

参考文献

[1] 叶国永,张莉,黄国珍,等. MLPA 与基因测序技术检测联用检测地中海贫血基因缺陷分析[J]. 中国当代医药, 2012,19(24):90-91.

[2] 杨艳. 地中海贫血筛查及基因检测结果分析[J]. 中国临床新医学,2012,5(12):1159-1161.

[3] Saadi H, Alexander S, Barlow P, et al. Major alpha thalassaemia; antenatal diagnosis, case report and literature review[J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2009, 38(3):258-262.

[4] Li Y, Di Naro E, Vitucci A, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma[J]. JAMA, 2005, 293(7):843-849.

[5] 覃西,毛炜,吴洁,等. 非基因法检测地中海贫血现状[J].

中国优生与遗传杂志,2007,15(3):122-124.

[6] Leung TN, Lau TK, Chung TK. Thalassaemia screening in pregnancy[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 17(2):129-134.

[7] Colah RB, Surve R, Sawant P, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies[J]. Indian Pediatr, 2007, 74(7):657-662.

[8] 陈晨春,仇小强. α-地中海贫血流行状况[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(6):858-861.

[9] 吴琦嫦,周裕林,王文博,等. 厦门地区 α 地中海贫血发病率及基因诊断前期研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(8):26-28.

[10] 马升俊,肖永君,韦子斌,等. 全自动血红蛋白分析仪在地中海贫血筛查诊断中的应用[J]. 中国医药导报, 2013, 10(9):92-93.

(收稿日期:2013-10-21 修回日期:2013-12-24)