

孕产妇 358 名产前地中海贫血基因筛查和诊断分析

熊 彪, 柳明波, 李崇建, 劳文珠

作者单位: 535000 广西, 钦州市第一人民医院(广西医科大学第十附属医院)检验科

作者简介: 熊 彪(1963 -), 男, 大学本科, 医学学士, 副主任技师, 研究方向: 检验医学。E-mail: xiongbiao1360@163.com

通讯作者: 柳明波(1979 -), 男, 医学硕士, 检验技师, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: mingabo@126.com

[摘要] **目的** 分析孕产妇产前地中海贫血的基因筛查和诊断情况。**方法** 应用全血细胞计数和血红蛋白电泳技术对 358 名孕妇进行产前筛查, 分析红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)值以及血红蛋白电泳异常区带; 应用裂口-聚合酶链式反应(Gap-PCR)和聚合酶链式反应(PCR)结合反向点杂交技术进行地中海贫血的基因诊断。**结果** 358 名孕产妇中仅发现 3 例血红蛋白病[2 例血红蛋白 K(HbK)和 1 例血红蛋白 D(HbD)]。**结论** Gap-PCR 和 PCR 结合反向点杂交技术在诊断地中海贫血中存在一定的漏检风险, 该技术需与 DNA 测序配合使用才能提高诊断的准确度。

[关键词] 血红蛋白病; 地中海贫血; 基因诊断

[中图分类号] R 446.11 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-3806(2012)08-0766-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.08.25

Analysis on prenatal screening and diagnosis of gene of thalassemia in 358 pregnant women XIONG Biao, LIU Ming-bo, LI Chong-jian, et al. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Qinzhou, Guangxi 535000, China

[Abstract] **Objective** To analyze the status on prenatal screening and diagnosis of the gene of thalassemia in pregnant women. **Methods** The complete blood count and hemoglobin electrophoresis were used for the analysis of MCV, MCH values, and abnormal hemoglobin electrophoresis zone in 358 pregnant women received prenatal screening of thalassemia. **Results** Three cases of hemoglobinopathies were found, including 2 cases of HbK, 1 case of HbD. **Conclusion** Gap-PCR and PCR binding reverse dot blot technique in the diagnosis of thalassemia has a certain undetected risk, such cases need to test in conjunction with DNA sequencing.

[Key words] Hemoglobinopathies; Thalassemia; Genetic diagnosis

地中海贫血(简称地贫)是最常见的遗传性血液病之一,好发于地中海沿岸、美国黑人人群和印度次大陆等地区,在我国南方(广西、广东、贵州、四川、湖北、湖南、福建、云南、海南、台湾等省)发病率也较高。地贫在临床表现、血液学和生化检测指标方面呈现高度的异质性。重型地贫贫血严重,常依靠反复输血维持生命;轻型地贫可无临床症状,极易被漏诊和误诊^[1],因此地贫筛查及早诊断显得尤其重要。以前常用筛查方法有血细胞分析、红细胞脆性实验和血红蛋白电泳或定量检测等;近年来聚合酶链式反应(PCR)、聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)和聚合酶链式反应-反向点杂交(PCR-RDB)等技术也应用于地贫的基因诊断。我们对 358 名孕妇产前筛查情况进行了分析,并对应用 PCR-RDB 技术进行地贫基因诊断的可靠性进行了验证,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2011-01~2011-08 在我院妇产科产前筛查

的 358 名孕妇为研究对象,首先进行血液常规检查和血红蛋白电泳检测,如果结果显示红细胞平均体积(MCV) < 82 fl 和红细胞平均血红蛋白含量(MCH) < 27 pg,以及有血红蛋白异常区带或血红蛋白 A2(HbA2)含量异常者,同时进行地贫的基因分析。

1.2 标本收集 全部对象空腹 12 h 后采静脉血乙二胺四乙酸·二钾(EDT A·2K)抗凝管 3 ml 用于检测血细胞,另外肝素抗凝管 3 ml 用于血红蛋白电泳分析。对筛查阳性者,即抽静脉血 EDT A·2K 抗凝全血进行地贫的基因诊断。

1.3 检测方法

1.3.1 试剂 血红蛋白 SPIFE 全自动电泳仪及其预制琼脂糖凝胶由美国 Helena 公司提供。地贫基因诊断使用深圳亚能生物技术有限公司提供的地贫基因诊断试剂盒,按说明书进行操作,先提取全血 DNA,然后进行 PCR 扩增。

1.3.2 血红蛋白电泳检测 先 3 000 rpm 离心 2 min 沉淀红细胞,吸取红细胞 200 μ l 于 10 ml 生理盐水中清洗,3 000 rpm 离心 3 min,去上清,加入 540 μ l 蒸馏水混匀溶解红细胞,然

后加入 600 μl 四氯化碳抽提血红蛋白,充分振荡,3 000 rpm 离心 5 min,吸取上清上样,铺 SPIFE 预制琼脂糖凝胶,在 Helena 全自动电泳仪电泳,染色,脱色,最后扫描分析。

1.3.3 缺失型 α 地贫基因检测 将 PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,然后在紫外灯下观察基因;图谱为 1 800 bp、2 000 bp、1 600 bp、1 300 bp 的条带者,分别为 α 珠蛋白正常基因;如显示为 3.7 缺失型、4.2 缺失型、SEA 缺失型的扩增产物,即进行 3.7、4.2、SEA 三种缺失型的基因诊断。

1.3.4 β 地贫基因检测 采用单管多重 PCR 及 DNA 芯片反向点杂交 (PCR-ASO/PCR-RDB) 技术检测中国人较常见的 17 种 β 地贫基因突变位点。将扩增产物与结合有中国人较常见的 17 种 β 地贫基因突变寡核苷酸探针膜条进行反向点杂交来鉴定 β 地贫基因突变类型。

1.3.5 α 地贫点突变基因检测 与 β 地贫基因检测方法相同,该方法可检出 QS、CS、WS 3 种点突变类型。

2 结果

2.1 地贫基因检测结果 筛查结果及基因分析阳性者确诊为地贫病例,共检出 α 地贫 72 例,占 62.61%;β 地贫 36 例,占 31.30%;αβ 复合型地贫 7 例,占 6.09%。见表 1~3。

表 1 72 例 α 地贫基因型及构成

基因型	例数	构成比(%)
-α ^{4.2} /--SEA	4	5.6
αα/--SEA	48	66.7
-α ^{3.7} /--SEA	4	5.6
-α ^{3.7} /-α ^{4.2}	1	1.4
αα/-α ^{3.7}	4	5.6
αα/-α ^{4.2}	6	8.3
αα/-α ^{CS}	3	4.2
αα/-α ^{WS}	2	2.8
合计	72	100.0

表 2 36 例 β 地贫基因型及构成

基因型	例数	构成比(%)
17/β ^E	1	2.8
41-42	1	2.8
41-42/IVS-Ⅱ-654	1	2.8
71-72/17	1	2.8
17	7	19.4
41-42	16	44.4
41-42/IVS-Ⅱ-654	1	2.8
71-72	1	2.8
Int	1	2.8
-28	1	2.8
IVS-Ⅰ-1	1	2.8
IVS-Ⅱ-654	2	5.6
β ^E	2	5.6
合计	36	100.0

表 3 7 例 αβ 复合地贫基因型及构成

基因型	例数	构成比(%)
--SEA/β ¹⁷	1	14.3
--SEA/β ⁴¹⁻⁴²	2	28.6
--SEA/β ^E	1	14.3
-α ^{3.7} /β ⁴¹⁻⁴² /β ⁴³	1	14.3
-α ^{4.2} /β ¹⁷	1	14.3
-α ^{WS} /β ^{IVS-Ⅱ-654}	1	14.3
合计	7	100.0

2.2 血红蛋白电泳检测结果 电泳发现 2 例血红蛋白 K (HbK)和 1 例血红蛋白 D(HbD)的孕妇,其中 1 例 HbK 者红细胞计数为 3.39 × 10¹²/L,血红蛋白为 101 g/L (偏低),但 MCV 和 MCH 均正常。该 3 例地贫的基因分析结果均未发现异常突变或缺失。见图 1、2。

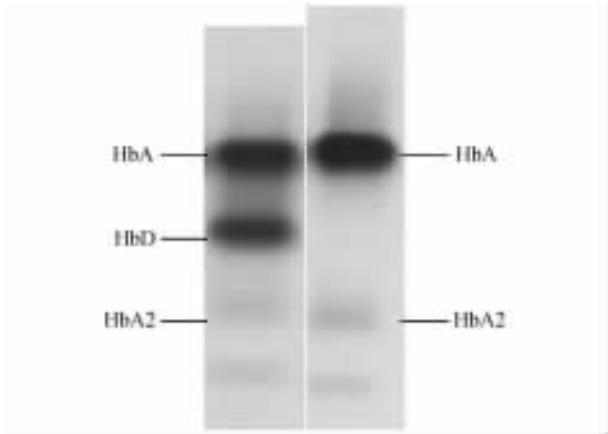


图 1 1 例 HbD 与正常血红蛋白电泳图

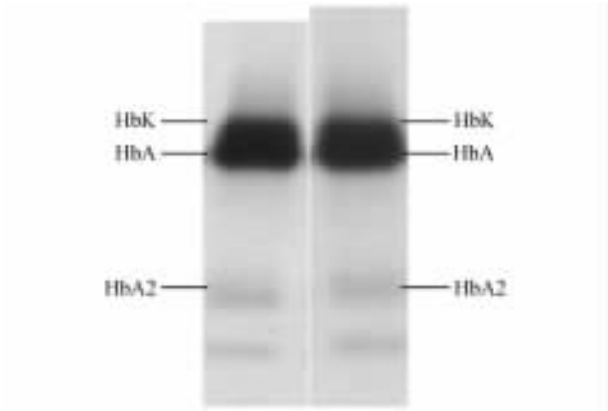


图 2 2 例 HbK 蛋白电泳图

3 讨论

3.1 地贫的重要特征是小细胞低色素症,其次是 HbA2 含量的改变。采用全血细胞计数和(或)血红蛋白分析是地贫筛查的主要技术手段。全血细胞计数和(或)血红蛋白分析目前均已相应的高通量自动化仪器,可以满足大人群筛查的需要^[2]。在成人外周血上述两个指标的阳性即可初步诊

断为地贫基因携带者(即杂合子)。而地贫基因诊断目前常用技术有 Gap-PCR 和 PCR-RDB 两种。Gap-PCR 又叫跨越断点 PCR,是目前检测缺失型 α 地贫的常用方法,其原理是:于缺失序列的两侧设计一对引物,在正常 DNA 序列中,上下游引物间相距很远,扩增片段长或超出有效扩增范围而不能生成扩增产物;由于缺失的存在,使断端连接而致两引物之间的距离靠近,因而可以扩增出特定长度的片段。PCR 结合反向点杂交(reverse dot blot, RDB)检测 α 、 β 地贫点突变,其是遵循等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)探针杂交法的基本原理,即通过 ASO 探针检测 PCR 扩增产生的来自样品 DNA 的片段进行突变基因的检测。因此受以上检测原理和实验设计的限制,主要可以检测 α 地贫 3.7、4.2、SEA 三种缺失型及 QS、CS、WS 三种点突变类型和我国常见 17 种 β 地贫基因突变位点^[3]。如发现地贫表型阳性的样品,在排除以上突变或缺失的情况下(我们发现的 3 例为异常血红蛋白区带表型的样本),则提示此被检样品为罕见基因突变类型,或尚未发现的基因突变新类型。在这种情况下,需考虑对珠蛋白基因进行测序分析,以期发现造成地贫表现的基因缺失或突变。

3.2 本文发现的 3 例少见的异常血红蛋白病例,由于受实验检测条件的限制而没有进一步做 DNA 测序,但根据资料可以了解到常见的血红蛋白 D-Punjab (HbD-Punjab),其变异型是 β 链 121 谷氨酸→谷氨酰胺, HbD 纯合子可有轻度溶血

性贫血的实验室检查结果,血片中可见到靶形红细胞和球形红细胞, HbD 杂合子血红蛋白值正常可见少量靶形红细胞,本文发现的病例表型与文献^[4]报道一致。而 HbK 为南方常见的快速 β 链异常血红蛋白病,变异型包括 β 链 46 甘氨酸→谷氨酸和 β 链 132 赖氨酸→谷氨酰胺,一般无明显临床症状,实验室检测表现血象正常或小细胞低色素性贫血,本文发现的 2 例 HbK 也有类似表现。但是偶见 HbK 纯合子与 β 地贫呈合并状态时,需要做产前诊断,才能避免漏检风险^[5]。

参考文献

- 1 Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden [J]. Blood, 2010, 115(22):4331-4336.
- 2 Liu J, Jia X, Tang N, et al. Novel technique for rapid detection of alpha-globin gene mutations and deletions [J]. Transl Res, 2010, 155(3):148-155.
- 3 李莉艳,莫秋华,徐湘民. 反向点杂交快速诊断非缺失型 α -地中海贫血[J]. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20(4):345-347.
- 4 Taghavi BM, Karimipoor M, Amirian A, et al. Co-inheritance of hemoglobin D and β -thalassemia traits in three Iranian families: clinical relevance [J]. Arch Iran Med, 2011, 14(1):61-63.
- 5 Molez JF, Galacteros F, Bosseno MF, et al. A case of a combination heterozygote with hemoglobin K Woolwich and hemoglobin C (Hb Kw/HbC) discovered in Bobo- Dioulasso (Burkina Faso) [J]. Med Trop (Mars), 1989, 49(1):33-36.

[收稿日期 2011-12-05][本文编辑 黄晓红 吕文娟]

学术交流

急性心肌梗死患者不同接诊方法的预后比较分析

麦泉云, 曾 宇, 杨新疆

作者单位: 535000 广西,钦州市第二人民医院急诊科

作者简介: 麦泉云(1963-),男,在职研究生,医学学士,副主任医师,研究方向:心肺脑复苏、急危重症急救。E-mail: maiquanyun@163.com

[摘要] **目的** 探讨急性心肌梗死(AMI)患者不同接诊方法与预后之间的相互关系,旨在提高 AMI 抢救成功率。**方法** 对该院急诊科 2000~2010 年出院前急救的 AMI 患者 132 例(观察组)和同期由家属或同事送来急诊救治的 AMI 患者 136 例(对照组)作回顾性对比分析。**结果** 观察组病死率为 12.12%,低于对照组的 22.79%($\chi^2=3.89, P<0.05$)。**结论** 不同接诊方法对 AMI 患者预后有差别,院前急救能降低 AMI 患者病死率。

[关键词] 急性心肌梗死; 接诊方法; 院前急救; 病死率

[中图分类号] R 542.2⁺1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-3806(2012)08-0768-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.08.26

Prognostic comparison of different reception methods in the patients with acute myocardial infarction MAI Quan-yun, ZENG Yu, YANG Xin-jiang. Department of Emergency, the Second People's Hospital of Qinzhou City, Guangxi 535000, China

[Abstract] **Objective** To explore the relation between different reception methods and prognosis in patients