

广西地区 α 地中海贫血高危胎儿产前基因诊断

α - Thalassemia Prenatal Gene Diagnoses in Guangxi Region

林伟雄 龙桂芳 李卫 谢建生 金琪 李琪 唐霞
Lin Weixiong Long Guifang Li Wei Xie Jiansheng Jin Qi Li Qi Tang Xia

(广西医科大学第一附属医院儿科血红蛋白研究室 南宁市滨湖路6号 530021)

(Laboratory of Hemoglobin, Department of Pediatrics, First Affiliated

Hospital, Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 1989年以来,应用 PCR技术选择性扩增 α_2 珠蛋白基因及斑点杂交方法对 167例 α 地中海贫血高危胎儿进行产前基因诊断。结果, HbBart's水肿胎儿 2例, HbH病 16例, 其余为非 Bart's水肿胎儿或非 HbH病胎儿。

关键词 α 地中海贫血 PCR 产前诊断

中图分类号 R 714.55

Abstract Prenatal gene diagnoses were performed for 167 fetuses who were at the risk of major α - thalassemia since 1989 by using PCR method. As a result, 27 fetuses with HbBart's fetal hydrops syndrome and 16 with HbH disease were detected.

Key words α - thalassemia, PCR, prenatal diagnoses

α 地中海贫血(简称 α 地贫)是由于 α 珠蛋白基因(简称 α 基因)缺失或突变引起的一组常染色体隐性遗传性血液病。一般归纳为缺失型和非缺失型两大类。在缺失型中又分为 α 地贫1和 α 地贫2两种类型。已知的 α 地贫1基因型共有16种, α 地贫2有7种。国内常见的 α 地贫1和 α 地贫2基因型分别为 $(-\alpha-SEA)$ 和 $(-\alpha^{3.7})$,而非缺失型 α 地贫基因以Hbcs最常见。 α 地贫2杂合子 $(-\alpha/\alpha)$ 无贫血表现,属“静止型” α 地贫, α 地贫2纯合子 $(-\alpha/-\alpha)$ 和 α 地贫1杂合子 $(-\alpha-/\alpha)$ 的 α 珠蛋白链合成轻度减少,可有轻度贫血表现。 α 地贫1与 α 地贫2双重杂合子 $(-\alpha-/-\alpha)$ 的 α 珠蛋白合成明显减少,过剩的 β 链自身聚合成HbH,易沉积于红细胞内引起溶血和中度贫血,表现为缺失型HbH病。Hbcs与 α 地贫1的双重杂合子 $(\alpha^{cs}/-\alpha-)$ 也表现为HbH病,但是由于 (α^{cs}/α) 的代偿能力比 $(-\alpha)$ 弱,因此,HbH-cs病的临床表现要比缺失型HbH病严重。 α 地贫1纯合子 $(-\alpha-/-\alpha)$ 无 α 珠蛋白合成,引起HbBart's胎儿水肿综合征,是最严重的 α 地贫类型,胎儿于妊娠中后期因严重贫血缺氧而死于宫内或出生后即死亡。不仅如此,还常常引

起妊娠中毒症和产后大出血等,严重威胁孕妇的生命安全。通过产前诊断可以早期发现HbBart's水肿和HbH病胎儿,并及时处理,不仅可以控制病残儿的出生率,提高人口素质,还可以减轻孕妇负担,减少并发症,降低孕产妇死亡率。

1 材料与方法

1.1 对象

要求作 α 地贫产前基因诊断的夫妇有下述类型:

(1) 有Bart's水肿胎儿生育史;(2) 有HbH病生育史;(3) 夫妇其中一方为HbH病患者;(4) 体检发现双方或一方为 α 地贫1基因携带者。上述夫妇均经广西医科大学第一附属医院血红蛋白研究室Hb电泳(pH值8.3)和 ζ 珠蛋白肽链检查证实^[1]。

1.2 方法

(1) 取样,妊娠54d~68d取绒毛或20~25周抽取羊水

(2) DNA按经典的酚氯仿法提取^[2]。

(3) 按Yuiw Edward Hsia等^[3]方法对缺失型HbH病,HbH-cs病和HbBart's胎儿水肿综合征进行产前基因诊断。引物和探针碱基序列见表1。

表 1 引物及探针的碱基序列

Table 1 Sequences of primers and probes used

		5' ————— 3'									
引物 Primer	P1	CCT	GGG	CCG	CAC	TGA	CCC	TCT	T		
	P2	GTC	TGA	GAC	AGG	TAA	ACA	CCT	CCA	T	
	A	GCC	AAG	GAC	AGG	TAC	GGC	TGT	CAT	C	
	B	TGC	AGC	TTG	TCA	CAG	TGC	AGC	TCA	CT	
探针 Probe	Hbcs	M	AAA	TAC	CCT	CAA	GCT	GGA	G		
		N	AAA	TAC	CCT	TAA	GCT	GGA	G		

表中, P1为起始引物, 与 α_2 珠蛋白基因(简称 α_2 基因)第533~605nt负链序列互补, 与 α_1 珠蛋白基因(简称 α_1 基因)相比较, α_2 基因在此缺失7个碱基, 因此该位点序列为 α_2 基因所特有。P2为回头引物, 与 α_2 基因第898~923nt非同源区的正链序列(为 α_2 基因所特有)互补。由于P1、P2分别与 α_2 基因的两个不同的特有序列互补, 因此, 具有高度特异性。只有含有这两个特有序列的 α_2 基因才能被扩增。扩增片段长339bp, 含有终止密码, 用于检测Hbcs突变。引物A和B扩增长约613bp的 β 珠蛋白基因片段, 用作内对照。两对引物可在同一反应管内扩增, HbBart's胎儿水肿综合征和缺失型HbH病DNA只有613bp扩增带而无339bp扩增带, 其他受检胎儿DNA既有339bp也有613bp扩增带。检测HbH-cs病时, 不需要引物A和B作内对照。但是PCR扩增后还要进行特异寡核苷酸探针斑点杂交。

2 结果

167例受检胎儿中, 共检出HbBart's胎儿水肿综合征2例, HbH 16例(其中非缺失型HbH-cs 7例), 其余12例排除HbBart's胎儿综合征或HbH病(包括HbH-cs)继续怀孕, 孕中后期B超和产后复查除4例外均与产前基因诊断相符, 部分随访病例未发现畸形与生理功能缺陷。

3 讨论

广西的 α 地贫除缺失型外, 尚有33%为非缺失型^[4], 在缺失型中, α 地贫基因型绝大多数为(- - SEA), α 地贫基因型主要是(- $\alpha^{3.7}$), 其次是(-

$\alpha^{4.2}$), (- $\alpha^{3.5}$)目前只见于印度人。这些 α_2 地贫基因型均造成 α_2 基因3'端非同源区缺失, 因此可以应用选择性扩增 α_2 基因的PCR方法直接对广西HbBart's水肿综合征(- - /- -)和缺失型HbH病(- $\alpha^{3.7}$ /- - 或 - $\alpha^{4.2}$ /- -)进行快速产前诊断。从取样到作出诊断只需1d~3d。非缺失型最常见的是Hbcs但对于HbH-cs病的诊断, 由于在PCR扩增后还需要使用放射性同位素标记的寡核苷酸探针进行斑点杂交, 所需的时间一般为3d~15d, 取决于同位素探针的放射强度。

一般情况下, 用引物P1、P2进行的PCR方法, 结合夫妇双方 ζ 肽链检查结果和 α 地贫生育史, 可以完成HbBart's胎儿水肿综合征和HbH病的产前基因诊断。但是当夫妇一方是HbH患者(包括缺失型和非缺失型HbH-cs), 另一方是 α 地贫杂合子或是潜在的 α 地贫杂合子、Hb-cs杂合子时, 就必须对胎儿进行Bart's胎儿、缺失型HbH、非缺失型HbH-cs病、Hb-cs纯合子和 α 地贫纯合子鉴别。Hb-cs纯合子因其有较为类似于HbH病的临床表现, 应防止其出生。 α 地贫纯合子应通过直接检测 α 地贫基因进行鉴别。

167例产前诊断病例有4例误诊, 均出自抽取绒毛的病例, 我们对术后组织DNA重新进行基因分析, 结果全部不能被P1、P2引物扩增。我们认为误诊原因可能是没有彻底分离绒毛组织中的母体脱膜细胞所致, 中期抽取羊水细胞时进行悬浮分离是避免漏诊的有效方法^[5]。

参考文献

- 唐智宁等. 检查 ζ 珠蛋白肽链诊断 α 地中海贫血. 中华血液学杂志, 1988, 9(11): 687.
- 吴冠芸, 王申五主编. 基因诊断. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 131~144.
- Hsia Y J E et al. Molecular screening for haemoglobin constant spring. The Lancet May, 1989, 898~990.
- 文晓军, 梁徐等. 应用PCR技术进行非缺失型HbH病的基因筛查. 中华医学遗传学杂志, 1992, 9(5): 273~275.
- 李卫, 林伟雄等. 一种从母血污染的羊水中分离胎儿脱落细胞的简易方法. 广西医科大学学报, 1995, 12(3): 462.

(责任编辑: 蒋汉明)