

## $\alpha$ -地中海贫血的筛查与产前诊断的研究进展

梁莉

(广西百色市妇幼保健院优生遗传科, 广西 百色 533000 E-mail:315792402@qq.com)

**摘要:**  $\alpha$ -地中海贫血是一组发病率较高的常染色体隐性遗传病,是广西围产儿及新生儿死亡、出生缺陷及孕产妇并发症(产后出血、妊高征等)的主要原因之一,严重影响了高发区出生人口素质。通过人群筛查,对高危地贫儿的早期产前诊断可阻止  $\alpha$ -重型地贫患儿的出生。近年来国内研发和应用了各种新技术, $\alpha$ -地贫的筛查及基因诊断方法特异性更高,我国在  $\alpha$ -地贫的防治工作上取得显著的成效,本文主要介绍  $\alpha$ -地中海贫血的分子基础以及总结  $\alpha$ -地中海贫血的在筛查方法方面及产前诊断的研究进展。

**关键词:**  $\alpha$ -地中海贫血;基因检测;筛查;产前诊断

**中图分类号:** R714.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2015)01-0143-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.01.061

$\alpha$ -地中海贫血(简称地贫)是一组发病率较高的常染色体隐性遗传病,主要表现为慢性溶血性贫血,在东南亚、地中海、中国等地区多见。据有关调查资料显示,全世界人口的  $\alpha$ -地贫的基因携带率为 20%,全球每年发生 55 000 例致死  $\alpha$ -重型地贫胎儿水肿综合征,东南亚地区 90% 以上的胎儿水肿综合征是由于重型  $\alpha$ -地贫引起的 Hb Bart's 胎儿水肿综合征<sup>[1]</sup>。我国  $\alpha$ -地贫携带者主要集中广西、广东、海南等南方等地区。重型  $\alpha$ -地贫是广西围产儿及新生儿死亡、出生缺陷及孕产妇并发症(产后出血、妊高征等)的主要原因之一,严重影响了高发区出生人口素质,因此在  $\alpha$ -地贫高发地区开展大规模的人群筛查,高危人群地贫基因诊断等是非常重要的。近年来,我国结合国外地贫防治的经验,研发和应用了各种新技术, $\alpha$ -地贫的筛查及基因诊断方法特异性更高,我国在  $\alpha$ -地贫的防治工作上取得显著的成效,本文主要介绍  $\alpha$ -地贫的分子基础以及总结  $\alpha$ -地贫的筛查、产前诊断的研究进展。

### 1 $\alpha$ -地贫的分子遗传基础

$\alpha$ -珠蛋白基因位于 16 号染色体短臂末端(16p12-16Pter),每条染色体上有 2 个连锁的  $\alpha$ -珠蛋白基因拷贝( $\alpha 1$  和  $\alpha 2$ ), $\alpha$ -珠蛋白基因部分缺失或全部缺失或功能障碍导致不同的类型,其临床分型的依据:正常人有 4 个  $\alpha$ -珠蛋白基因,以  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  表示;缺失 1 个  $\alpha$ -珠蛋白基因为静止型,以  $-\alpha/\alpha\alpha$  表示;缺失 2 个  $\alpha$ -珠蛋白基因为标准型,以  $-\alpha/\alpha$  或  $-\alpha/-\alpha$  表示;缺失 3 个  $\alpha$ -珠蛋白基因为血红蛋白 H 病(HbH),以  $-\alpha/-\alpha$  表示;4 个  $\alpha$ -珠蛋白基因都缺失即为重型(Hb Bart's 胎儿水肿综合征),以  $-\alpha/-\alpha$  表示。 $\alpha$ -地贫是人类最常见且危害最大的单基因遗传病之一。根据限制性内切酶图谱、基因克隆和 DNA 序列分析, $\alpha$ -地贫分子缺陷有基因的大片段缺失突变和非缺失突变两大类。我国目前发现缺失型  $\alpha$ -地贫有 7 种,其中最常见的是  $\alpha$ -地贫-1, $\alpha$ -地贫-2,非缺失型  $\alpha$ -地贫突变有 7 种,以 Hb CS 与 Hb QS、Hb WS 最为多见<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -地贫不同的基因型的组合在临床上可以有轻重不同的表现。

### 2 $\alpha$ -地贫的筛查方法

包括血液学检查和血红蛋白的分析等<sup>[3]</sup>。

#### 2.1 血常规 血常规是 $\alpha$ -地贫筛查的首选方法,具

有方法简便、低廉等特点, $\alpha$ -地贫的红细胞重要特征之一是小细胞和低色素<sup>[4]</sup>,以 MCH、MCV 数值对地贫筛查和诊断意义最大。我国诊断贫血的标准为  $MCV \leq 80$  fl,  $MCH \leq 27$  pg<sup>[5]</sup>。有研究结果表明,MCV 筛查地贫的灵敏度为 98.8%<sup>[6]</sup>,可以筛查出轻型  $\alpha$ -地贫、HbH 病、 $\beta$ -地贫、复合型地贫,但对静止型  $\alpha$ -地贫灵敏度为 33.3%<sup>[7]</sup>,漏诊率较高。高慧等<sup>[8]</sup>曾报道 MCV 对静止型  $\alpha$ -地贫的诊断意义不大,容易漏诊。

#### 2.2 红细胞脆性实验 红细胞渗透脆性实验是地贫群体筛查的一种非常简便方法。Sirichotiyakul S 等<sup>[9]</sup>研究显示,利用红细胞脆性实验只是筛查 $\alpha$ -地贫-1 的敏感性、特异性高,而筛查其他型别的 $\alpha$ -地贫明显降低,容易漏检,尤其是孕妇的漏检率最大。目前很多医院已经不使用这个方法进行妊娠期地贫的筛查,但是该方法不需要特殊的仪器设备,一些基层医院还在使用。

#### 2.3 血红蛋白分析 电泳分析是地贫筛查最为常用且最为有效的方法,是诊断 Hb 疾病不可缺少的手段。毛细血管电泳具有敏感性高、分辨率高、检测快捷、低廉、操作简单等特点,对地贫筛查有良好的效果<sup>[10-11]</sup>。高效液相色谱法(HPLC)准确快速,对 HbA2 测定的为 $< 2.5\%$ 作为 $\alpha$ -地贫的阳性指标,是世界地贫协会推荐的 HbA2 定量的金标准。但利用 HbA2 筛查 $\alpha$ -地贫的敏感性和特异性相对不高,且与基因诊断的结果可能不符<sup>[12]</sup>。但有文献报道,HPLC 筛查 $\alpha$ -地贫的敏感性和特异性相对不高,符合率为 62.6%<sup>[13]</sup>。Can Liao 等<sup>[14-15]</sup>的研究显示:毛细血管电泳筛查 HbCS 的敏感性为 100%,而 HPLC 的敏感性只有 76%。

#### 2.4 高分辨率溶解曲线(HRM) 在我国非缺失型 $\alpha$ -地贫中,HbQS 极不稳定,HPLC 及毛细血管电泳技术均不能筛查 HbQS。近几年来兴起的一种遗传学分型方法——HRM 技术,能有效筛查非缺失型 $\alpha$ -地贫。Liu YN 等<sup>[16]</sup>的研究表明 HRM 技术对检测非缺失型 $\alpha$ -地贫携带者与异常血红蛋白的检出率为 100%,敏感性和特异性亦为 100%。

#### 2.5 联合筛查 有研究表明,联合筛查可以大大提高地贫筛查的特异性,但比单项检测的灵敏度低。MCV、红细胞脆性实验和血红蛋白分析等 3 种方法单

项检测  $\alpha$ -地贫的灵敏度分别为 91%、81.9% 和 69.8%，而联合检测的特异度达 100%，特别是可以提高轻型  $\alpha$ -地贫筛查的准确性。

### 3 $\alpha$ -地贫的产前诊断

产前诊断是在胎儿出生前应用各种方法检测胎儿的健康状态，对重型地贫的胎儿作出诊断，进行选择流产，从而降低重型地贫儿的出生率。产前诊断是预防  $\alpha$ -地贫的重要措施，包括影像学诊断、胎儿取材和实验室诊断。

**3.1 超声对重型  $\alpha$ -地贫胎儿的筛查诊断** 重型  $\alpha$ -地贫的胎儿会在形态上呈现出一定的畸形，如胎儿水肿、肝脾肿大、腹腔积液、胎盘增大等。超声测量胎儿心、胸横径的比值是诊断重型  $\alpha$ -地贫胎儿的一种有效、准确、安全的方法，适应于地贫高发地区和人群对重型  $\alpha$ -地贫胎儿的筛查。对妊娠 12~25 周的胎儿，测定心胸比值的特异性为 99.23%，灵敏度为 100%<sup>[17]</sup>。但是一些重型  $\alpha$ -地贫胎儿超声影像阳性征在妊娠晚期才被发现，这给产科处理增加了风险，而且超声检查无法诊断中间型  $\alpha$ -地贫 (HbH 病)。所以，超声诊断不能够取代对  $\alpha$ -地贫血高危儿的基因诊断。

**3.2 胎儿组织的取样** 20 世纪 80 年代广泛开展地贫产前诊断，主要有绒毛活检、羊膜腔穿刺和脐带血取样技术。早孕期绒毛穿刺取样的优点是能在早孕期进行产前诊断，若胚胎为重型地贫，选择性流产的方法简单，从而减少孕妇的身心损害和经济负担。胎儿脐血取样可获得较多的胎儿血细胞，但该项技术诊断时间较晚，操作技术要求高不易推广，少量母血污染不易发现，而且胎儿丢失率达 2%。羊膜腔穿刺是目前产前诊断最常用的取样技术，选择在妊娠 16~22 周进行，该项技术操作最简单，安全性高，胎儿丢失率低，约为 0.5%，因此，孕中期羊水为最优选择样本。由于上述产前诊断技术具有一定的创伤性，容易出现一些流产、感染、羊水栓塞、胎儿窘迫、羊水渗漏、宫内感染、胎儿损伤等并发症。

**3.3 胎儿 DNA 的基因诊断**  $\alpha$ -地贫是世界上最早应用 DNA 诊断技术进行产前诊断的人类遗传病<sup>[18]</sup>。以聚合酶链反应 (PCR) 为基础的各种方法广泛应用于各型  $\alpha$ -地贫的基因诊断。与外周血基因诊断不同，胎儿 DNA 的基因分析还包括胎儿 DNA 的鉴定。应用荧光 PCR、STR 片段分析技术等鉴定胎儿是否受到母亲 DNA 的污染，确保诊断质量。胎儿 DNA 的分析结果应反复核对，并与夫妇的基因型比较，避免漏诊或误诊。现阶段最常用的  $\alpha$ -地贫基因检测技术的主要有以下几种：

**3.3.1 等位基因特异性 PCR 方法 (AS-PCR)** 该技术是通过设计 3'-端碱基特异性的 PCR 引物来检测 DNA 序列点突变的技术，操作简单、快捷，但缺点是特异性较低，易出现假阳性或假阴性，只作为一种检测已知突变的方法，可鉴别非缺失型 HbH 病基因型，但对罕见型的突变无法鉴别，适合在基层医院使用。

**3.3.2 PCR 结合反向点杂交技术 (RDB)** RDB 是用于检测突变型  $\alpha$ -地贫，该技术方便、快速、准确，有一定的检测通量，在临床实际应用了二十多年，可一次同

时检查多种微小缺失和突变，可提高诊断效率。

### 3.3.3 跨越断裂点聚合酶链反应 (Gap-PCR) 技术

Gap-PCR 是目前检测缺失型  $\alpha$ -地贫的常用方法。该技术具有较大的扩增能力与较高的灵敏性，能有效地对  $\alpha$ -SEA 基因进行分子筛查和对 Hb Bart's 水肿胎进行产前诊断，还能鉴别临床常见的缺失型 HbH 病和非缺失型 HbH 病，很快被广泛应用。

**3.3.4 DNA 序列测定技术** DNA 序列测定可以检测罕见或未知突变，是基因检测的金标准。DNA 序列测定技术具有检测快速且成本低廉等特点，已经在很多医疗单位普遍开展起来。

**3.3.5 基因芯片检测技术** 该技术是具有高效、微量、敏感、高通量等特点，能快速地从分子水平诊断  $\alpha$ -地贫，适合于大面积普查，缺点是成本造价高，目前较难在临床广泛推广。

**3.4 无创性地贫产前诊断** 20 世纪 90 年代，人们开始探索无创性产前诊断，通过分离母亲外周血中的胎儿细胞，游离胎儿 DNA 等，进行胎儿遗传性疾病的产前诊断，是一种非损伤性、非侵入性产前诊断新途径。目前的研究热点是如何利用孕妇血浆游离胎儿 DNA 进行地贫产前诊断。

#### 3.4.1 孕妇血浆胎儿 DNA 的分离和产前诊断

1997 年 Lo 首次报道孕妇血浆中含有胎儿 DNA。有研究表明胎儿 DNA 在孕妇血浆游离 DNA 的比例高达 20%<sup>[19]</sup>，在妊娠第 5 周就可以检测到，多数学者认为 12~15 周取材最合适。该技术具有取样方便、风险小、不受孕妇年龄影响等优点，国内外都有研究成功案例。但该项技术操作复杂，技术风险大，费用昂贵，而且目前还不能完全将胎儿 DNA 从此嵌合体中分离出来。因此该项技术已经成为现代地贫产前基因诊断的研究方向，随着分子生物学技术的发展和研究方法的改进，无创性地贫产前诊断将会在临床上广泛应用。

**3.4.2 胚胎植入前遗传学诊断 (PGD)** PGD 是在体外受精-胚胎移植 (IVF) 检查上实施的一门技术，可以有效避免再次妊娠重型地贫儿。国内邓捷等<sup>[20]</sup>应用荧光 PCR 对  $\alpha$ -地贫进行 PGD，有获得成功的案例。但是，地贫 PGD 的临床应用存在一定医疗风险，而且 PGD 的实施需要有资质的生殖中心，技术难度大，限制了 PGD 在临床上的推广应用，但 PGD 仍是一些具有适应证的夫妇进行地贫产前诊断的选择。

## 4 意义

随着医学技术的不断发展， $\alpha$ -地贫的筛查方法有很多种，但各有其优缺点。应根据当地的实际情况及医疗机构实验室的条件制定筛查的方法及流程，但是  $\alpha$ -地贫的诊断最好能以血液学常规检查→血红蛋白电泳分析→基因分型联合检测的顺序为基础，如果跳过筛查直接基因诊断，容易出现漏诊。 $\alpha$ -地贫筛查及基因诊断在地贫防治工作的非常重要，是防治  $\alpha$ -地贫的基础。通过筛查可以发现双方可疑地贫的夫妇，对有生育高风险胎儿的夫妇进行综合评估，尽早选择适宜的产前诊断技术进行胎儿基因诊断，可避免重型  $\alpha$ -地贫胎儿出生，有效降低出生缺陷率，对提高我国出生人口遗传素质具有极重要的意义。

## 参考文献:

- [1] 徐湘民,张新华,陈荔丽,等.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011:45.
- [2] 唐海深,李东至.  $\alpha$ -地中海贫血的筛查进展[J]. 中国产前诊断杂志:电子版,2012,4(2):32-36.
- [3] 贾冰,林志芳,纪新梅,等.常见筛查方法在地中海贫血诊断中的临床应用[J]. 检验医学与临床,2010,7(13):1339-1340.
- [4] Benz EJ Jr. Newborn screening for  $\alpha$ -thalassaemia - keeping up with globalization[J]. N Engl J Med, 2011, 24,364(8):770-771.
- [5] 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,2011:3.
- [6] Savitree P, Supatra S, Kasemsri S, et al. Sensitivity and specificity of mean corpuscular hemoglobin (MCH): for screening  $\alpha$ -thalassaemia - 1 and  $\beta$ -thalassaemia traits [J]. J Med Assoc Thal, 2009, 92(6):739-743.
- [7] 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.
- [8] 高慧,李上奎.  $\alpha$ 地贫静止型基因分析及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(11):18-19.
- [9] Sirichotiyakul S, Wanapirak C, Srisupundit K, et al. A comparison of the accuracy of the corpuscular fragility and mean corpuscular volume tests for the  $\alpha$ -thalassaemia 1 and  $\beta$ -thalassaemia traits [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2009, 107(1):26-29.
- [10] Chen YL. Capillary electrophoresis combining three-step multiplex polymerase chain reactions for diagnosing  $\alpha$ -thalassaemia [J]. Electrophoresis, 2011, 32(3-4):379-385.
- [11] Srivorakun H, Fucharoen G, Changtrakul Y, et al. Thalassaemia and hemoglobinopathies in Southeast Asian newborns: diagnostic assessment using capillary electrophoresis system [J]. Clin Biochem, 2011, 44(5-6):406-411.
- [12] 星元陈,卢业成,初德强,等.全自动毛细管电泳与琼脂糖电泳检测血红蛋白的比较[J]. 广东医学,2009,30(5):778-780.
- [13] 吴洁,覃西. HPLC 与 Zeta 链蛋白检测在地中海贫血筛查中的临床应用价值[J]. 医学综述,2009,15(1):139-141.
- [14] Liao C, Zhou JY, Li DZ, et al. Screening for Hb Constant Spring in the Guangdong Province South China. using the Sebia capillary electrophoresis system [J]. Hemoglobin, 2011, 35(1):87-90.
- [15] Liao C, Zhou JY, Li DZ, et al. Detection of Hb Constant Spring by a capillary electrophoresis method [J]. Hemoglobin, 2010, 34(2):175-178.
- [16] Liu YN, Li R, Liao C, et al. Screening for mutations in the  $\alpha$ -globin genes leading to abnormal hemoglobin variants with high resolution melting analysis [J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(2):273-277.
- [17] 徐两蒲,黄海龙,何德钦,等.福建地区孕妇  $\alpha$ 地中海贫血基因突变类型及产前诊断[J]. 实用妇产科杂志,2011,27(11):86-863.
- [18] 刘新雄.  $\alpha$ 地中海贫血的分子基础及产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(3):5-6.
- [19] 陈冬,李萍,荣卡彬,等.地中海贫血筛查实用技术的运用研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2008,16(6):39-41.
- [20] 邓捷,彭文林,刘颖,等.应用荧光聚合酶链反应对  $\alpha$ -地中海贫血进行值入前遗传学诊断[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(38):2682-2684.
- 收稿日期:2015-01-13
- (上接第 142 页)
- [22] 周琳,吴琼海,沈伟伟,等.浙江省台州市接受抗病毒治疗的艾滋病患者生存分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(12):1049-1051.
- [23] 付笑冰,林鹏,刘勇鹰,等.广东省艾滋病患者抗病毒治疗后生存时间分析[J]. 华南预防医学,2009,35(3):1-4.
- [24] Sun DY, Wang Q, Yang WJ, et al. Survival analysis on AIDS antiretroviral therapy in Henan province during 2003-2009 [J]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2012, 33(2):181-184.
- [25] 卫军,贾少贤,宁少萍,等.运城市艾滋病免费抗病毒治疗病例生存分析[J]. 中国艾滋病性病,2012,18(7):448-450.
- [26] 李晓春,高丽,王丽艳,等.云南省澜沧县艾滋病病毒感染者及病人生存质量现状及相关因素研究[J]. 中华疾病控制杂志,2011,15(7):571-574.
- [27] Grabar S, Kousignian I, Sobel A, et al. Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV [J]. AIDS, 2004, 18(15):2029-2038.
- [28] Mocroft A, Youle M, Morcinek J, et al. Survival after diagnosis of AIDS: a prospective observational study of 2625 patients. Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group [J]. BMJ, 1997, 314(7078):409-413.
- [29] Collazos J, Ansensi V, Cartón JA, et al. Sex differences in the clinical, immunological and virological parameters of HIV - infected patients treated with HAART [J]. AIDS, 2007, 21(7):835-843.
- [30] Hawkins C, Chalamilla G, Okuma J, et al. Sex differences in antiretroviral treatment outcomes among HIV - infected adults in an urban Tanzanian setting. [J]. AIDS, 2011, 25(9):1189-1197.
- [31] Ingle SM, May M, Gill MJ, et al. Impact of risk factors for specific causes death in the first and subsequent years of ART among HIV - infected patients [J]. Clinical Infectious Diseases, 2014, 59(2):287-297.
- [32] Cornell M, Schomaker M, Garone DB, et al. Gender differences in survival among adult patients starting antiretroviral therapy in South Africa: a multicentre cohort study [J/OL]. PLoS Medicine, 2012, 9(9):e1001304.
- 收稿日期:2014-11-25