

广西壮族地区 β -珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断分析*

何 升, 张 强, 唐燕青, 韦 媛, 陈秋莉, 郑陈光[△] (广西壮族自治区妇产医院/妇幼保健院, 遗传代谢中心实验室, 南宁 530012)

【摘要】 目的 预防和控制广西地区 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。**方法** 1 058 对夫妇均为 β -珠蛋白基因突变者, 在孕早期取胎儿绒毛组织, 孕中期取脐血或羊水, 孕晚期取脐血; 对羊水细胞和绒毛组织进行原位培养, 脐血进行血液学和血红蛋白分析, 分别采用培养前后的组织或脐血进行 β -珠蛋白基因检测。**结果** 1 068 例胎儿中检出 β -珠蛋白生成障碍性贫血胎儿 253 例, 携带者 500 例, 正常胎儿 315 例。所有 β -珠蛋白生成障碍性贫血胎儿均终止妊娠。**结论** 在组织培养和血液学指标检测的基础上, 基因检测能准确地对所有 β -珠蛋白基因突变进行产前诊断, 有效地避免了 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。

【关键词】 β -珠蛋白生成障碍; 产前诊断; 壮族地区
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 08. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)08-1009-02

Prenatal diagnosis of β -thalassemia in Guangxi Zhuang Autonomous Region* HE Sheng, ZHANG Qiang, TANG Yan-qing, WEI Yuan, CHEN Qiu-li, ZHENG Chen-guang[△] (Department of Genetic Metabolism, Obstetrics and Gynecology Hospital/Maternal and Children Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530012, China)

【Abstract】 Objective To prevention and control the birth of children with β -thalassemia in Guangxi. **Methods** For couples with mutation of β -globin gene, fetal villus tissues were collected at the first trimester, cord blood or amniotic fluid were collected at the second trimester, and cord blood were collected at the third trimester. In situ cultivation was performed for cells in amniotic fluid and villus tissues, hematology and hemoglobin analysis were performed for cord blood, and β -globin gene was detected for tissues before and after cultivation or for cord blood. **Results** Among 1 068 fetuses, 315 cases were definitely diagnosed with β -thalassemia, 500 cases were carriers, and 253 cases were healthy. Pregnancies of women with fetus of β -thalassemia were all terminated. **Conclusion** On the basis of tissue cultivation and detection of hematology indicators, the performance of gene detection could be valuable for the prenatal diagnosis of β -thalassemia in high-risk pregnancy, which might be helpful for the prevention of the birth of children with β -thalassemia.

【Key words】 β -thalassemia; prenatal diagnosis; Zhuang area

有研究显示, 人群中 β -珠蛋白生成障碍性贫血和血红蛋白病均有较高的发生率, 分别为 6. 43% ~ 7. 53%、0. 38% ~ 0. 52%, 双重杂合子、纯合子的发生率也较高^[1-3]。重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿多在 3~6 个月后开始出现贫血, 直到发展为重度贫血, 必须依靠输血来维持生命; 治疗费用昂贵, 但也仅能缓解症状, 最后将死于铁沉积等并发症。因此, 产前诊断是预防该类患儿出生的主要方法。在西方和我国香港、广州等经济发达地区产前诊断已广泛实施, 珠蛋白生成障碍性贫血患儿已达到了零出生或明显减少^[4]。本研究对广西壮族地区 β -珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断经验进行分析, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2003 年 1 月至 2012 年 8 月, 在广西壮族自治区妇产医院/妇幼保健院进行产前检查或在外院珠蛋白生成障碍性贫血筛查阳性, 经血红蛋白分析, AbA2 水平升高(>3. 5%) 的夫妇进行 β -珠蛋白基因检测, 确诊夫妇均为 β -珠蛋白基因突变的妊娠 1 031 例和曾孕育 β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的妊娠 27 例, 其中双胎妊娠 10 例。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 超声引导下, 妊娠 8~13 周经腹行绒毛取样, 15~22 周行羊膜腔穿刺术取羊水 10 mL, 19~28 周行经腹

脐带穿刺取脐带血 1~2 mL, 术后观察 1 h 无异常方可出院。

1.2.2 细胞培养 在倒置显微镜下, 将绒毛膜细胞与母体组织进行分离后置于 15 mL 无菌离心管内, 加入胶原酶进行消化 5 min, 离心, 弃上清液备用; 取 5 mL 羊水置于 15 mL 无菌离心管, 离心, 弃上清液后留下 1 mL 混匀。在上述离心管中加入 3 mL 培养基(Gibco), 并充分混匀, 转入原位细胞培养瓶中; 置 37 ℃, 5% 的二氧化碳培养; 5~7 d 置倒置显微镜下观察, 当出现 3 个以上贴壁细胞克隆时, 换掉培养液, 当出现大量贴壁细胞时, 用生理盐水反复清洗干净后, 取贴壁细胞于 1. 5 mL EP 管内备用。

1.2.3 脐带血血液学分析 用 SEY2010 血细胞分析仪及配套试剂进行血液学分析, Bio-Rad VARIANT 全自动血红蛋白分析系统分析胎儿脐带血血红蛋白组分。

1.2.4 基因突变分析 培养的绒毛膜、羊水细胞和脐血采用盐析技术提取胎儿 DNA, 采用单管多重 PCR 结合反向点杂交技术检测 17 种中国人常见 β -珠蛋白基因突变 [CD41/42-(TTCT), CD17(AAG→TAG), IVS-Ⅱ-654(C→T), -28(A→G), CD71/72(+A), CD26(GAG→AAG), CD31-C, CD43 GAG→TAG, -32(C→A), CD27/28(+C), -29(A→G), -30(T→C), CD14/15+G, CAP+40to+43(-AAAC), Int, IVS-Ⅰ-5(G→T) 和 IVS-Ⅰ-1(G→T)]。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260093)。
作者简介: 何升, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事分子遗传学研究。 △ 通讯作者, E-mail: jy20070718@126. com。

1.2.5 遗传咨询 所有对象均建立病例档案,被详细地告知侵入性取材、胎儿流产和误诊的风险,签署产前诊断同意书。根据产前诊断结果告知患者胎儿的状况,对于β-珠蛋白生成障碍性贫血胎儿建议终止妊娠,但最后由夫妇决定。

2 结 果

2.1 父母基因型与胎儿诊断 1 058 对夫妇中,共检出 2 090 例(98.77%)广西常见β-珠蛋白基因突变[CD41/42-(TTCT),CD17(AAG→TAG),-28(A→G),IVS-II-654(C→T),CD26(GAG→AAG),CD71/72(+A),IVS-I-1(G→T)],24 例(1.23%)少见β-珠蛋白基因突变,经基因序列分析发现 Gγ+(Aγδβ)0 和 βIVS-I-30(G→T)各 1 例,见表 1。1 068 例胎儿中,检出 315 例(29.49%)正常,500 例(46.82%)携带和 253 例(23.69%)珠蛋白生成障碍性贫血,见表 2。

表 1 1 058 对夫妇 β-珠蛋白基因突变频率与分布[n(%)]

基因型	频率[n(%)]	基因型	频率[n(%)]
CD41-42(-CTTT) ^a	929(43.90)	IVS-I-1(G→T) ^a	78(3.69)
CD17(A→T) ^a	611(28.88)	-29(A→G) ^b	15(0.71)
-28(A→G) ^b	142(6.71)	CD43(G→T) ^a	8(0.38)
IVS-II-654(C→T) ^a	132(6.24)	CD27/28(+C) ^a	1(0.05)
CD26(G→A) ^b	101(4.77)	Gγ+(Aγδβ) ^a	1(0.05)
CD71/72(+A) ^a	97(4.58)	IVS-I-30(G→T) ^a	1(0.05)

注:^a 基因型为 β0;^b 基因型为 β+。

表 2 β-珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断结果

基因类型	绒毛(n)	羊水(n)	脐带血(n)	合计(%)
正常	56	201	58	315(29.49)
携带	79	304	117	500(46.82)
双重杂合子或纯合子	32	167	54	253(23.69)
合计	167 ^a	672 ^b	229 ^c	1 068(100.00)

注:^a 包括 1 个双胎妊娠,^b 包括 8 个双胎妊娠,^c 包括 1 个双胎妊娠。

2.2 双胎妊娠情况 在 10 例双胎妊娠中,9 例在孕 15~22 周取羊水,1 例在孕 25⁺³ 周取脐血进行β-珠蛋白基因检测,其中 1 例两个胎儿均正常,1 例一个胎儿正常,一个胎儿为β-珠蛋白基因突变携带,2 例两个胎儿均为β-珠蛋白基因突变携带,1 例一个胎儿正常,一个胎儿为β-珠蛋白基因突变双重杂合子,5 例两个胎儿均为β-珠蛋白基因突变双重杂合子或纯合子。

2.3 妊娠结局与随访 β-珠蛋白基因检测为正常或携带的胎儿均继续妊娠,双重杂合子或纯合子的胎儿均终止妊娠。发现可能与产前诊断相关流产 6 例,部分在本院引产胎儿及分娩的新生儿经过血液学或基因分析,其结果与产前诊断符合率 100%。随访所有妊娠,未发现异常。

3 讨 论

广西人群中β-珠蛋白基因突变携带率为 6.43%,每年出生的新生儿约为 500 000 人,每年超过 160 例妊娠为β-珠蛋白生成障碍性贫血。本研究对 1 058 对高危夫妇进行产前诊断,共检出 253 例胎儿为中、重度地贫。

珠蛋白基因突变的类型在不同的国家和地区存在较大的差异,在中国已有超过 30 种突变。本地区临床主要采用聚合酶链反应结合反向点杂交技术检测 17 种中国人群常见β-珠蛋白基因突变,其包括了 99% 的常见珠蛋白突变类型,其中最多的 7 种突变大约为 90%,而本地区珠蛋白基因存在一定的突变或未包括在这 17 种常见突变中^[5]。因此,对有珠蛋白生成障碍性贫血血液学和临床表现的,而常见基因检测未发现珠蛋白基因突变或有重度贫血患儿生育史的妊娠,建议进行基因序

列分析,以发现新的珠蛋白基因突变类型。本研究中,对部分患者进行了基因序列分析或广西地区常见缺失型的 gap-PCR 检测,发现 Gγ+(Aγδβ)0 和 βIVS-I-30(G→T)各 1 例。

珠蛋白生成障碍性贫血的产前诊断,主要是通过对胎儿绒毛组织、羊水或脐带血进行珠蛋白基因突变分析。绒毛组织主要用于妊娠早期的诊断,本研究中仅 167 例(14.98%)经过绒毛取样进行产前诊断,其主要为城市人群和有β-珠蛋白生成障碍性贫血患儿生育史的妊娠,这可能与取消强制婚检以后,自愿进行婚前医学检查的人数急剧减少,且本地区孕妇到医院建卡的时间多在妊娠 3 个月以后,已错过早孕期产前诊断的时机等有关。羊膜腔穿刺取羊水是最常见的取材方式,本研究中,有 66.67% 的妊娠选择羊膜腔穿刺术,检出珠蛋白生成障碍性贫血妊娠 167 例。虽然,脐带穿刺具有很高的流产率,通过对脐带血血液学指标和血红蛋白组分分析,可为产前诊断提供更多的资料^[6]。2006 年以后,国内已将其取材时间提早到了 18 周,且也建立安全可靠地手术流程,穿刺的成功率和安全性大大提高^[7]。通过脐带穿刺取脐带血 229 例,仅发生与其相关的流产 1 例;在检出的 54 例珠蛋白生成障碍性贫血胎儿中,其 HbA 平均水平为 1.04%(0.0%~3.2%)。

本研究基于胎儿羊水细胞贴壁生长儿母体血细胞悬生长的特性,采用原位培养后羊水细胞进行产前诊断;同时,考虑绒毛取样量的限制,可能导致不能满足检出,也采用该方法进行培养。对于检测结果不用再采用培养后细胞进行检测,或再次取样进行确诊。本研究中,培养前后检测结果不一致标本 1 例,产后经脐血基因检测与培养后细胞检测一致。

总之,采用上述方法,作者可以对胎儿进行准确的诊断,大大降低了本地区出生缺陷的发生率。

参考文献

[1] 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.

[2] 吕福通, 谢丹尼, 陈美佳, 等. 地中海贫血干预的跟踪随访工作探讨[J]. 中国计划生育学杂志, 2009, 17(5): 308.

[3] 李东明, 玉晋武, 韦媛, 等. 高效液相色谱分析在 HbE 筛查中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(14): 1808-1809.

[4] Liao C, Mo QH, Li J, et al. Carrier screening for alpha- and beta-thalassemia in pregnancy: the results of an 11-year prospective program in Guangzhou Maternal and Neonatal hospital[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(2): 163-171.

[5] Zheng CG, Liu M, Du J, et al. Molecular spectrum of α- and β-globin gene mutations detected in the population of Guangxi Zhuang Autonomous Region, People's Republic of China[J]. Haematologica, 2011, 35(1): 28-39.

[6] Li DZ, Liao C, Li J, et al. Prenatal diagnosis of β-thalassemia in Southern China[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, 128(1): 81-85.

[7] 廖灿, 潘敏, 李东至, 等. B 超引导下的脐静脉穿刺术在产前诊断应用中的安全性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(12): 813-815.