

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.19.001

1 例罕见型 Hb Bart's 胎儿水肿综合征胎儿家系分析*

陈 唯, 陈 洁, 廖群英

广西壮族自治区梧州市妇幼保健院遗传实验室, 广西梧州 543002

摘要:目的 对罕见型血红蛋白(Hb) Bart's 胎儿水肿综合征胎儿家系进行地中海贫血表型和地中海贫血基因分析,以及产前诊断。方法 采集家系成员外周血进行血细胞检查及 Hb 组分分析;采集家系成员外周血及胎儿羊水采用 Gap-PCR 及 PCR-反向点杂交法进行 4 种 α -缺失型地中海贫血、3 种 α -非缺失型地中海贫血及 17 种 β -地中海贫血基因检测。结果 血液学表型分析显示,先证者母亲及父亲均为小细胞低色素性贫血患者。先证者母亲检出泰国型缺失($-\text{THAI}/\alpha\alpha$)杂合突变;先证者父亲检出东南亚型缺失($-\text{SEA}/\alpha\alpha$)杂合突变;先证者兄长地中海贫血基因检测未见异常;先证者检出东南亚型缺失合并泰国型缺失($-\text{SEA}/-\text{THAI}$)双重杂合突变,为 Hb Bart's 胎儿水肿综合征。结论 应严格遵循血液学表型与地中海贫血基因型相结合的分析原则,对平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量降低和 HbA2 正常或偏低,而常规 α -地中海贫血基因检测未见异常的人群进行罕见型泰国型缺失($-\text{THAI}/\alpha$ -地中海贫血检测,以预防漏检和误诊。

关键词:泰国型缺失 α -地中海贫血; 罕见型; Hb Bart's 胎儿水肿综合征; 家系分析

中图法分类号:R556.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)19-2753-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



A pedigree analysis of a rare Hb Bart's fetal edema syndrome*

CHEN Wei, CHEN Jie, LIAO Qunying

Genetics Clinical Laboratory, Maternity and Child Care Hospital of
Wuzhou City, Wuzhou, Guangxi 543002, China

Abstract: Objective To analyze the phenotype, gene and prenatal diagnosis of thalassemia in a rare family with Hb Bart's fetal edema syndrome. **Methods** The peripheral blood of family members were collected for hematological examination and hemoglobin component analysis. The peripheral blood and amniotic fluid of family members were collected for 4 types of α -deletion thalassemia by Gap-PCR and PCR reverse dot blot. And 3 types of α -non-deletion and 17 types of β -deletion genes were detected. **Results** Hematological phenotype analysis showed that the mother and father of the proband were all small cell hypochromic anemia. The mother of proband was detected as Thailand deletion α -thalassemia ($-\text{THAI}/\alpha\alpha$) heterozygous mutation, the father of proband was detected as SEA deletion α -thalassemia ($-\text{SEA}/\alpha\alpha$) heterozygous mutation, no abnormality was found in the brother of the proband, the proband was detected as a double heterozygous mutation ($-\text{SEA}/-\text{THAI}$), who was Hb Bart's fetal edema syndrome. **Conclusion** It is necessary to strictly follow the analysis principle of combining hematological phenotype with the genotype of agranulocytosis. It is necessary to detect the rare type α -thalassemia in the population with low level of MCV and MCH, and low or normal level of HbA2, and without abnormal detection result of routine α -thalassemia gene, which can prevent missed diagnosis and misdiagnosis.

Key words: Thailand deletion α -thalassemia; rare type; Hb Bart's fetal edema syndrome; pedigree analysis

α -地中海贫血主要由位于 16 号染色体 16p13.3 位点的珠蛋白基因缺失、点突变,引起相应珠蛋白链的合成受到抑制或功能丧失所致。 α -珠蛋白基因突变大多数为大片段缺失引起,同时包含少量的点突变^[1-2]。广西壮族自治区是地中海贫血高发区,地中

海贫血也是该地区最常见和危害最大的遗传病之一。常规 α -地中海贫血基因检测只包括常见的 3 种基因型缺失($-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}/$)和 3 种点突变($\alpha^{\text{QS}}\alpha/$ 、 $\alpha^{\text{CS}}\alpha/$ 、 $\alpha^{\text{WS}}\alpha/$),不包括泰国型缺失($-\text{THAI}/$)检测,该型地中海贫血容易被漏检和误诊。因此,在进行地中海

* 基金项目:广西壮族自治区梧州市科学技术局科研立项课题(201902224)。

作者简介:陈唯,男,副主任技师,主要从事地中海贫血的分子诊断研究。

贫血基因检测时,一定要结合地中海贫血表型的筛查,密切注意受检者的地中海贫血筛查表型结果与基因型是否相符,在二者检测结果不相符时,应考虑是否存在罕见型地中海贫血,尤其是来自有生育胎儿水肿综合征或血红蛋白(Hb)H 病胎儿史家庭的受检者。本研究对近期进行产前诊断羊水标本地中海贫血基因检测时发现的 1 例东南亚型缺失合并泰国型缺失(--SEA/-THAI)双重杂合突变的 Hb Bart's 胎儿水肿综合征胎儿进行家系分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者,孕 23 周胎儿,其父母均为梧州市藤县人。先证者父母于 2012 年在某县医院进行婚前检查,血细胞检查均显示为小细胞低色素性贫血,Hb 分析显示血红蛋白 A2(HbA2)正常和偏低。母亲地中海贫血基因检测未见异常;父亲检出东南亚缺失型 α-地中海贫血杂合突变。临床医生怀疑胎儿母亲为缺铁性贫血患者,补铁后未见平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)等指标升高,该女性于 2014 年曾产下健康一子,此次怀孕为第二次怀孕,在孕 23 周进行 B 超检查时发现胎儿心胸比值增大、胎盘增厚等症状,遂转诊来本院接受进一步医学检查。医生建议采用羊水穿刺进行产前诊断分析,并对胎儿父母及其兄长进行地中海贫血筛查及基因检测家系分析。

1.2 仪器与试剂 α-缺失型地中海贫血基因检测试剂盒为深圳益生堂生物企业有限公司产品。微量样品基因组 DNA 提取试剂盒为北京天根有限公司产品。β-地中海贫血及 α-非缺失型地中海贫血基因检测试剂盒为亚能生物技术(深圳)有限公司产品。PCR 扩增使用 Hema9600PCR 扩增仪,凝胶成像使用黑马 GSG-2000 凝胶成像系统,分子杂交使用精宏恒温水浴摇床。Sysmex XN-1000 全自动血液分析仪为日本 Sysmex 公司产品,Bio-Rad VARIANT™ II Hb 分析系统为美国 Bio-Rad 公司产品,Lab-Aid 核酸提取仪为厦门致善生物科技股份有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 血细胞检查 采用 Sysmex XN-1000 全自动血液分析仪进行血常规检测,MCV<82 fL、MCH<

27 pg 作为地中海贫血初筛标准。

1.3.2 Hb 组分分析 采用 Bio-Rad VARIANT™ II Hb 分析系统进行 Hb 组分分析,HbA2>3.5%或(和)血红蛋白 F(HbF)>2.6%作为 β-地中海贫血筛查标准。

1.3.3 地中海贫血基因检测 (1)外周血 DNA 提取,采用 Lab-Aid 核酸提取仪进行外周血 DNA 的提取。(2)羊水 DNA 提取,羊水穿刺取两份羊水标本,1 份羊水标本用于细胞培养,培养 7 d 后用其细胞做平行管基因分析,两次结果一致方能发出报告。另 1 份羊水标本以 4 000 r/min 离心 10 min,去上清液保留沉淀物(羊水细胞)转移至 1.5 mL 离心管中,采用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取 DNA,离心管中加入细胞裂解液及蛋白酶 K 消化,转移裂解液至吸附柱,洗脱 DNA。(3)DNA 扩增:采用 Gap-PCR 法检测 α-缺失型地中海贫血--SEA/-、--THAI/-、α^{3.7}/、-α^{4.2}/4 种缺失型。α-缺失型扩增程序为 96℃,5 min;98℃,45 s,65℃,90 s,72℃,3 min,10 个循环;98℃,30 s,65℃,45 s,72℃,3 min,25 个循环;72℃,10 min。采用 PCR-反向点杂交法检测 CD41-42、IVS-II-654、-28、CD71-72、CD17、βE、CD43、-29、CD31、-32、IVS-I-I、CD27/28、-30、CD14-15、CAP、Int、IVS-I-5 17 种 β-地中海贫血位点突变和 α^{QS}α、α^{CS}α、α^{WS}α 3 种 α-非缺失型地中海贫血突变。β-地中海贫血及 α-非缺失型地中海贫血点突变扩增程序为 50℃,15 min,95℃,10 min;94℃,60 s,55℃,30 s,72℃,30 s,35 个循环;72℃,5 min。(4)电泳与杂交:α-缺失型地中海贫血检测取 2 μL 扩增产物,用 1.0%琼脂糖凝胶(内加核酸染料)在 5 v/cm 电压下电泳 60 min,在黑马凝胶成像系统上观察结果。β-地中海贫血及 α-非缺失型地中海贫血点突变检测,使用恒温水浴摇床于 42℃杂交 1.5~4.0 h。洗膜,显色后观察结果。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 软件、AutoCAD 绘图工具分别进行数据、图像处理。

2 结果

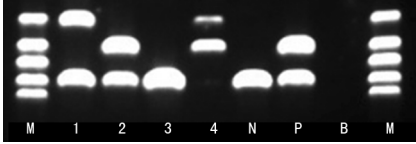
2.1 表型结果 夫妻双方的血液学结果均为小细胞低色素贫血。Hb 分析结果正常或偏低。见表 1。

表 1 Hb Bart's 胎儿水肿综合征家系成员表型和基因型资料

成员	诊断	年龄或胎龄	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA2 (%)	HbF (%)	α-地中海 贫血基因型	β-地中海 贫血基因型
母亲	α ⁰ 携带者	31 岁	102	72.1	24.8	2.4	1.1	--THAI/αα	β ^N /β ^N
父亲	α ⁰ 携带者	32 岁	135	65.8	22.3	2.5	0.9	--SEA/αα	β ^N /β ^N
兄长	健康	4 岁	123	83.9	27.5	2.6	2.0	αα/αα	β ^N /β ^N
先证者	Hb Bart's 水肿胎儿	孕 23 周	—	—	—	—	—	--SEA/--THAI	β ^N /β ^N

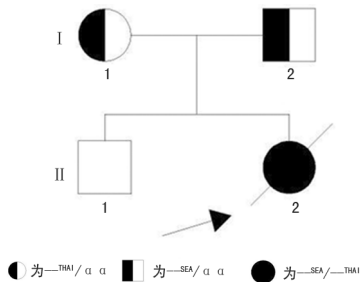
注:—为无数据

2.2 基因分析 先证者 α -地中海贫血基因检测出 $-SEA/-THAI$ 双重杂合突变, β -地中海贫血基因 17 种位点突变检测未见异常。先证者母亲 α -地中海贫血基因检测出 $-THAI/\alpha\alpha$ 杂合突变, β -地中海贫血基因 17 种位点突变检测未见异常。先证者父亲 α -地中海贫血基因检测出 $-SEA/\alpha\alpha$ 杂合突变, β -地中海贫血基因 17 种位点突变检测未见异常。先证者兄长 α -地中海贫血基因检测未见异常, β -地中海贫血基因 17 种位点突变检测未见异常。见表 1 及图 1、2。



注: 1 为母亲 ($-THAI/\alpha\alpha$); 2 为父亲 ($-SEA/\alpha\alpha$); 3 为兄长 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); 4 为先证者 ($-SEA/-THAI$); N 为正常对照 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); P 为阳性对照 ($-SEA/\alpha\alpha$); B 为空白对照 (无扩增条带); M 为 DNA 相对分子质量标准

图 1 家系 α -缺失型地中海贫血电泳图



注: I 代 1 为母亲 ($-THAI/\alpha\alpha$); I 代 2 为父亲 ($-SEA/\alpha\alpha$); II 代 1 为兄长 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); II 代 2 为先证者 ($-SEA/-THAI$)

图 2 Hb Bart's 胎儿水肿综合征胎儿家系谱

3 讨论

泰国缺失型 α -地中海贫血属于罕见型缺失型地中海贫血, 为 α -珠蛋白基因簇大片段缺失, 且断裂点及缺失区域明确, 缺失范围为 chr16:199800-233300, 包括 ζ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 基因在内的 33 501 个碱基^[3]。采用 Gap-PCR 分析技术可以检测东南亚型缺失 ($-SEA/-$)、泰国型缺失 ($-THAI/-$)、右侧缺失 ($-\alpha^{3.7}/-$)、左侧缺失 ($-\alpha^{4.2}/-$) 4 种 α -地中海贫血基因缺失型^[4-5]。根据检测的 4 种缺失型地中海贫血基因的缺失范围及断裂点设计 4 对引物, 分别扩增出 0.9 kb (泰国型缺失)、1.2 kb (东南亚型缺失)、1.4 kb (左侧缺失)、2.0 kb (右侧缺失) 大小的扩增片段, 同时在 4 种缺失片段的共同缺失区域设计一对 $\alpha 2$ 基因正常内对照引物, 扩增片段大小为 1.7 kb, 用以区分突变纯合子, 在未发生缺失突变时可作为内对照, 判断扩增是否成功。由 5 对引物组成多重 Gap-PCR 检测体系, 可根据特异性扩增片段的大小及组合结果检测各种不同的基因型。从本案例表型可以看出, 先证者母亲 MCV、MCH 和 HbA2 均偏低, 呈现明显的小细胞低色素贫血。经常规地中海贫血基因检测, 3 种缺失型和 3 种非缺失型 α -地中海贫血, 以及 17 种位点突变 β -地中海贫血基因

未见异常, 应进行补铁观察分析是否是缺铁性贫血或者考虑为罕见型 α -地中海贫血。采用其他方法进一步确定该胎儿是否存在罕见缺失突变 (例如采用 ML-PA、Gap-PCR、基因测序等技术做进一步检测, 必要时还应进行家系分析以确认是否为新的突变)。先证者 23 周胎龄时 B 超检查显示全身水肿, 心胸比值增大、胎盘增厚。进行羊水穿刺做地中海贫血基因检测分析, 检出 $-SEA/-THAI$ 双重杂合突变, 综合确认为 Hb Bart's 胎儿水肿综合征。先证者母亲为泰国缺失型 ($-THAI/\alpha\alpha$) α -地中海贫血, 先证者父亲为东南亚缺失型 ($-SEA/\alpha\alpha$) α -地中海贫血, 胎儿出生有 25% 的概率为重型地中海贫血患儿。如果不结合患者的血液学表型和超声检查, 并同时胎儿基因检测, 就不能及时发现胎儿为东南亚型缺失合并泰国型缺失 ($-SEA/-THAI$) 双重杂合突变的 Hb Bart's 胎儿水肿综合征, 则极易发生漏诊。地中海贫血遍布全球, 在我国南方地区发病率较高, 主要分布在广东、广西、海南等地。 α -地中海贫血和 β -地中海贫血在广西壮族自治区人群中携带率分别高达 17.55% 和 6.43%^[6]。在我国南方地区, 泰国型缺失 ($-THAI/-$) 地中海贫血发病率仅次于常见的 3 种缺失型地中海贫血^[7]。泰国型缺失 ($-THAI/-$) 地中海贫血合并其他 α -地中海贫血, 在临床上可以形成中间型 (HbH 病) 和重型 α 地中海贫血。泰国型缺失 α -地中海贫血基因的缺失范围包括 α 珠蛋白基因簇中的多个基因, 其缺失片段较东南亚型更大, 包括 ζ 基因, 因此, 可能导致胎儿水肿出现得更早^[8-10]。泰国缺失型 α -地中海贫血家系的产前诊断应结合夫妻双方血液学特征、不良生育史、常见地中海贫血基因检测结果及超声检查结果来进行家系调查以明确病因, 尤其在南方地中海贫血高发区, 临床医生与实验室检测人员应加强沟通, 根据地中海贫血筛查者的血液学表型, 选择全面、准确、可靠的诊断方法, 优化地中海贫血基因检测诊断流程, 加强对罕见型泰国型缺失 α -地中海贫血的检测, 建立规范的产前诊断操作程序, 预防重型地中海贫血患儿出生。泰国型缺失 α -地中海贫血的准确检测对于遗传咨询和产前基因诊断具有重要的临床意义, 通过对这个家系的分析, 丰富了缺失型 α -地中海贫血的资料。

参考文献

- [1] 徐键健, 廖颖茵, 高俊. 广东地区地中海贫血筛检者的基因检测和类型分析[J]. 实用医学杂志, 2019, 48(2): 285-289.
- [2] 华亮, 李婉玲, 蔡燕娜. 广州地区疑诊地中海贫血患儿 α -地中海贫血基因突变型研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2010, 15(5): 212-214.
- [3] PANGESON T, SANGUANSEMSRI P, SANGUANSEMSRI T, et al. Association of tissue-specific DNA methylation alterations with α -Thalassemia Southeast Asian Deletion[J]. Genet Epigen, 2017, 9: 1-7.

总体验证研究结果表明,血清 SAA 测定试剂盒在 AU5800 生化分析仪上设置的性能满足厂家声明,并可达到预期用途要求。对标本反应区间 OD 值设置有助于识别钩状效应,为临床提供准确结果。

参考文献

[1] SACK G J. Serum amyloid A-a review[J]. Mol Med, 2018,24(1):46.

[2] 中国中西医结合学会检验医学专业委员会. 血清淀粉样蛋白 A 在感染性疾病中临床应用的专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019,42(3):186-192.

[3] 杨红玲,郑磊,周才,等. 胶体金渗滤法检测血清淀粉样蛋白 A 方法评价及其在儿童感染性疾病诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2014,37(11):836-841.

[4] 滕晓梅. 免疫比浊法用于全自动生化分析仪中产生钩状效应的防范[J]. 国际检验医学杂志, 2015,36(12):1649-1650.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会临床检验中心,北京航天总医院,中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会北京医院. 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证:WS/T 420-2013[S]. 北京:中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2013.

[6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会临床检验中心,北京航天总医院,中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会北京医院. 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证:WS/T 492-2016[S]. 北京:中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2016.

[7] Clinical Laboratory and Standards Institute. Protocols determination of limits of detection and limits of quantitation;EP17-A[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2003.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices;EP5-

A2[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2004.

[9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures;EP6-A[S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,2003.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory;SC28-A3[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2008.

[11] 王萍,余明杰,潘军峰,等. CRP 与 PCT 测定对新生儿细菌感染的诊断价值及指导合理使用抗菌药物的意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2018,28(2):261-264.

[12] 中国医学会重症医学分会. 中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[J]. 全科医学临床与教育, 2015,13(4):365-367.

[13] 申旺,叶丽燕,杨文丽,等. 血浆(1,3)- β -D-葡聚糖在侵袭性真菌感染临床诊治中的应用评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2018,28(9):1288-1291.

[14] 杨德平. SAA、CRP、WBC 指标联合检测对儿童早期病毒感染性疾病的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016,37(4):546-548.

[15] 李林峡,吴亦栋,周杰林,等. 血清淀粉样蛋白 A 在不同类型手足口病急性期中的应用[J]. 中国现代医生, 2017,55(32):43-45.

[16] 肖子衿,李永杰,王伶. OLYMPUS 生化分析仪检测尿 mALB 时后带现象预警参数设置的研究[J]. 实验与检验医学, 2018,36(6):836-839.

[17] 杨杰,李茂城,尹小毛,等. 27 项特定蛋白项目检测结果分析及钩状效应的防范方法[J]. 检验医学与临床, 2019,16(1):8-12.

[18] 杨杰,李玲,张瀚允,等. 5 种免疫透射比浊法试剂盒检测特定蛋白钩状效应的性能评估[J]. 国际检验医学杂志, 2019,40(2):140-143.

(收稿日期:2019-02-12 修回日期:2019-05-10)

(上接第 2755 页)

[4] 邓涛,谢明水,刘方方,等. 血常规检测在珠蛋白生成障碍性贫血和缺铁性贫血患者中的临床价值[J]. 中国实验诊断学, 2018,22(4):665-666.

[5] 肖奇志,周玉球,张永良,等. 单管多重 PCR 结合 RDB 技术在 α -珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012,33(3):271-273.

[6] 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, 2011:60.

[7] 杨宇航. 基于高通量测序技术的贵州省地中海贫血分子流行病学特征分析[D]. 遵义:遵义医学院, 2018.

[8] WANG Y,LIU C,ZHANG L,et al. Identification of a novel 44.6-kb deletion causing $\alpha 0$ -thalassemia in southern China[J]. Int J Lab Hematol, 2017,39(4):e94-e97.

[9] 黄海龙,林娜,徐两蒲,等. 产前诊断泰国缺失型 α -地中海贫血引起的胎儿巴氏水肿[J]. 中华妇产科杂志, 2010,45(7):532-533.

[10] YANG Y,LI D Z. Early onset of fetal hydrops associated with the α -thalassemia——(THAI) deletion [J]. Hemoglobin, 2014,38(6):431-434.

(收稿日期:2019-01-12 修回日期:2019-04-24)