

地中海贫血的诊断技术

刘大玉 普翠芬* 王雪茵
大理大学第一附属医院 云南大理 671000

摘要: 地中海贫血 (Thalassemia) 又称海洋性贫血, 是因人体珠蛋白基因缺失或突变而引起的一种慢性溶血性贫血。它是一种常染色体隐性遗传病, 通过婚前及产前检查等方式对育龄期妇女进行地贫的筛查和诊断, 避免严重地贫儿童的出生, 同时对降低严重地贫新生儿的出生率起到尤为突出的作用。

关键词: 地中海贫血; 珠蛋白; 基因突变

地中海贫血 (Thalassemia) 是1925由Thomas Cooley和Pear Lee首次描述于意大利儿童间的严重地中海贫血症, 根据 α/β 珠蛋白链比例失衡的类型, 分为 α 、 β 、 δ 、 γ 等类型, 其中以 α 和 β 地贫最常见, 该病在撒哈拉以南非洲、地中海区域、东亚和东南亚高度流行。我国长江以南发病率高, 以两广地区为主。有5%~20%的人群携带 α 地贫基因和1.5%的人群携带 β 地贫基因, 超过90%的患者分布在热带和亚热带地区^[1-2]。地中海贫血发病率高, 危害性大, 分布范围广, 并且有地域、种族差异, 是全球最常见、危害最严重的单基因血液遗传病。随着治疗方式和基因诊断技术的进步, 地中海贫血的诊断及预后均有较大的改善, 然而重型地中海贫血仍无经济有效的治疗方式。

一、地中海贫血的分子学基础

1. α 地中海贫血

α 地中海贫血由 α 珠蛋白链缺失或突变导致, 健康人群是4个 α 珠蛋白基因, 分别位于两条16号染色体上, 称为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 。当夫妻双方携带同型地贫基因时有1/4概率生出重型地贫患儿。 α 地中海贫血的严重程度取决于缺失等位基因的数量。单个 α 珠蛋白的缺失导致静止型 α 地贫, 多无明显异常。两个 α 珠蛋白的缺失导致轻型 α 地贫, 表现为轻度贫血, 当任意一条染色体上的两个 α 基因缺失称 $\alpha 1$ 或 $\alpha 0$, 当两条染色体上各缺失一个 α 基因称 $\alpha 2$ 或 $\alpha +$ 。三个 α 基因均缺失称中间型 α 地贫, 即血红蛋白H病, 在婴儿期常伴随进行性肝腹部肿大、溶血、骨骼畸形等临床表现。未检测出 α 基因称

重型 α 地贫, 患儿常表现严重的Hb Bart's, 即胎儿水肿综合征(--/--)。胎儿多伴随重度贫血及水肿表现, 多在妊娠28-38周出现宫内死亡或出生后发生夭折, 故此型需要进行产前诊断。

2. β 地中海贫血

β 地中海贫血是由 β 珠蛋白链的合成受到抑制或者不合成导致, 由于11号染色体上2个 β 珠蛋白基因点突变造成。若11号染色体上检测到一个 β 珠蛋白称轻型 β 地贫, 一般无明显临床症状。若11号染色体上未检测到 β 珠蛋白称重型 β 地贫, 患儿常出现严重的贫血症状。因为胎儿血红蛋白(HbF)的原因, 在新生儿时无明显临床症状, 多在出生后3-9月出现进行性小细胞低色素性贫血, 需终身输血, 部分在儿童期出现夭折。若患者的 β 血红蛋白无明显的降低, 将患中间型地贫, 此型分子基础差异大、临床症状不等, 与地贫基因类型关联复杂, 多在幼儿期表现为轻至中度贫血, 无需终生输血治疗。

二、实验室检查

地中海贫血严重影响患儿的生命, 目前临床上缺少经济有效的治疗方法, 从血细胞计数、红细胞形态到血红蛋白检测如: Hb电泳、高效液相色谱(HPLC)或毛细管电泳(CE)进行Hb定量及定性分析^[3]。后来基因检测逐渐被认可如: Gap-PCR、PCR-RDB、MLPA, 或用Sanger测序、高通量测序技术明确诊断。这些突破性技术使地中海贫血的检测更加可靠更好的帮助临床医生给出明确的解释。

1. 地中海贫血的产前筛查

根据《产前地中海贫血筛查指南》, 筛查方式包括血液学和血红蛋白分析。血常规被称为贫血类疾病首选

作者简介: 刘大玉 (1996.03-), 女, 汉族, 河南省信阳市, 硕士研究生, 研究方向: 妇产科。

及基础性检验手段。具有快速、经济有效的优势，在地贫的筛查和临床鉴别中有至关重要的作用。某研究指出 $MCV \leq 95 \text{ fl}$ 和 $MCH \leq 30 \text{ pg}$ 时，筛查 α 地贫携带者时灵敏度为 100%，而且 MCH 比 MCV 特异度更高。地贫患者红细胞体积不等，且呈现均一性分布。而缺铁性贫血呈现非均一性分布。血红蛋白检测，具有特异度高、诊断迅速的优点。质谱分析法 (MS) 是电泳和色谱技术的辅助手段，更适合新生儿筛查。等电聚焦能较好地分离 HB 变体。高效液相色谱 (HPLC) 和毛细管区带电泳 (CE) 可以区分地中海贫血疾病和携带者。

2. 地中海贫血夫妻的基因诊断

PCR 反向斑点杂交 (PCR-RDB) 具有便捷、敏感、样本量少的长处，是目前检测已知突变位点的 β 地中海贫血及非缺失型 α 地中海贫血的主要方法，但只检测已知突变，具有易受其他因素影响及判读的主观性等弊端。该法对设备要求低，可在一般实验室进行，被广泛使用。但仅能诊断缺失纯合子，对临床未报道的基因型无效，无法诊断杂合子导致的假阳性结果^[4]。实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 简便、快捷，可检测缺失及非缺失突变，还能发现基因拷贝数增加，如 $\alpha 3.7$ 和 $\alpha 4.2$ 等三联体基因的情况多重连续探针扩增技术 (MLPA) 具有高流量、高精度和小样本量的优点，但容易污染样本、需要高水平的专业知识的缺点。Southern 印迹杂交是经典的分子遗传学技术，该方法是缺失型 α 地贫的经典检测方法。但技术繁琐、周期长，对样本纯度要求高，且能否成功还依赖于杂交探针，不适合临床大样本研究。

Sanger 测序又称“第一代测序技术”，具有高精度性和自动化的优势。被誉为 DNA 测序的“金标准”。但是成本高、通量低、耗时长，未被广泛应用于新生儿地贫的筛查。Sanger 测序法是检测地中海贫血点突变和变异体的最佳方法，但无法识别地中海贫血的缺失突变

高通量测序技术 (NGS) 即“二代测序技术”。具有高效、精准和可重复等优势，是目前基因突变检测最直接、最准确的方法，不仅有助于检测遗漏的地中海贫血携带者，而且在检测罕见变异、解决复杂血液学问题以及为新生儿诊断提供非侵入性替代方案方面的优势不容忽视。NGS 方法可在婴儿出生后对其进行早期识别，这对于临床表现不典型或标准基因分型方法产生不确定性诊断的患者尤其重要。但仍然存在局限性，包括生成短读序列^[5]、成本高及它在鸟嘌呤胞嘧啶 (GC) 丰富区域错误地映射序列。这些 GC 区域的突变将被遗漏，导致假

阴性结果。使它作为一种独立的技术而不是传统方法的使用。有报道指出将 gap-PCR 和 NGS 联合检测可以提高诊断率，避免重度地中海贫血胎儿在妊娠晚期或孕前流产^[6]。一些研究人员开发了基于 NGS 的胚胎植入前遗传学诊断 (PGD)，这使严重地中海贫血的高危夫妇有机会怀上健康的孩子，而不需要终止妊娠。且其他 NGS 协议更具灵活性，这对流行国家的地中海贫血筛查具有吸引力^[7]。尽管存在不足，NGS 填补了常规方法在识别地中海贫血突变方面的空白。在取得改进之前，低成本的常规技术仍将是地中海贫血检测的黄金标准，特别是在流行地区。随着 NGS 的成本越来越低，这项技术很可能在不久的将来扩展到地中海贫血项目，以实现更好的诊断和提供个性化治疗。

第三代测序技术 (TGS) 即单分子测序技术，已成为地中海贫血基因检测的新技术。TGS 具有高通量长 reads、测序过程无扩增的优点，能够高精度地识别富含重复 gc 和高度同源的区域，可以检测已知和未知的变体，不受嘌呤及嘧啶含量的限制，最大程度地规避了扩增当中的引入错误。

地中海贫血等位基因综合分析 (CATSA) 的长读测序方法在检测范围、准确的胎儿变异检测和表型预测方面具有优势，可为产前诊断提供帮助，但 CATSA 的成本较高，但相信随着测序通量的提高和成本的降低，CATSA 将被广泛应用于地中海贫血等遗传性疾病的载体筛查

综上所述，地中海贫血将严重影响人类健康和新生儿人口质量，对地贫基因阳性的夫妇进行系统筛查，预防中度地贫，杜绝重型地贫患儿出生，减少出生缺陷儿童是必不可少的。现下对于地中海贫血的分子机制及诊断技术的研究已相当深入，但随着新型技术的发展仍需提高地贫诊断的准确率，减少漏诊率，总结各诊断方法是否存在其独有特点，以便于指导临床选择最适宜的诊断技术。

参考文献

- [1] Kattamis A, Kwiatkowski JL, Aydinok Y. Thalassaemia [J]. Lancet, 2022, 399(10343): 2310-2324.
- [2] Lee JS, Cho SI, Park SS, et al. Molecular basis and diagnosis of thalassemia [J]. Blood Res, 2021, 56(S1): S39-S43.
- [3] Vijian D, Wan Ab Rahman WS, Ponnuraj KT, Zulkafli Z, Mohd Noor NH. Molecular detection of alpha

thalassemia: a review of prevalent techniques. *Medeni Med J.* (2021) 36:257 – 69.

[4]Lin M, Wang Q, Zheng L, et al. Prevalence and molecular characterization of abnormal hemoglobin in eastern Guangdong of southern China. *Clin Genet*,2012, 81(2): 165–171.

[5]Clark BE, Shooter C, Smith F , Brawand D, Thein SL. Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters. *Int J*

Lab Hematol. (2017) 39:111 – 20.

[6]Zhao J, Li J, Lai Q, et al. Combined use of gap-PCR and next-generation sequencing improves thalassaemia carrier screening among premarital adults in China. *J Clin Pathol.* 2020 Aug;73(8):488–492.

[7]Chen P, Yu X, Huang H, Zeng W, He X, Liu M, et al. Evaluation of Ion Torrent next-generation sequencing for thalassemia diagnosis. *J Int Med Res.*(2020) 48:300060520967778.