

· 临床研究 ·

高风险血红蛋白 H 病产前基因诊断^①

曾瑞萍^② 李洪义 胡彬 方群 舒亚莉 陈丽瑜

(中山医科大学医学遗传学教研室, 广州, 510089)

提 要 用 α 珠蛋白基因探针和 DNA 印迹杂交法对 17 例有血红蛋白 H 病高风险胎儿进行了产前基因诊断, 诊断结果有 5 例为 α 地中海贫血(α 地贫)1 杂合子或正常, 5 例为 α 地贫 2 杂合子, 3 例为血红蛋白 H 病, 1 例为血红蛋白 Bart 胎儿水肿综合征, 其余 3 例由于双亲一方为非缺失型 α 地贫, 故对其胎儿的基因型不能作出准确诊断。

关键词 地中海贫血; 血红蛋白 H 病; 产前基因诊断; DNA 印迹杂交; 珠蛋白基因探针
中图分类号 R394

血红蛋白 H 病(HbH 病)是一种较严重的 α 地中海贫血(α 地贫), 具有遗传异质性, 在临床表现方面亦有很大差异, 表现为中等度贫血到较严重贫血, 轻度脾大, 偶有需要输血者, 患者部分丧失劳动能力。广东地区 α 地贫发病率为 9.54%^[1], HbH 病占 α 地贫的 0.25%。发病分子机制主要为 α 珠蛋白基因缺失或点突变致基因功能缺陷, 从而导致 α 珠蛋白合成严重障碍, β 珠蛋白链相对过多, 过剩的 β 链聚合成 β 四聚体(β_4)即 HbH。HbH 极不稳定, 易氧化变性形成 H 包涵体, 沉积于红细胞内使细胞变形及通透性改变, 导致溶血性贫血。本病目前尚无有效治疗方法, 开展孕早期胚胎基因诊断, 防止患儿出生, 是最有效的预防措施。我们用 α 珠蛋白基因探针对 17 例高风险 HbH 病胎儿进行了产前诊断。

1 材料与方 法

1.1 产前诊断对象

17 例产前基因诊断对象中有 12 例均已生育过 1 个 HbH 病患者, 另 5 例由于夫妇一方已确诊是 HbH 病, 而另一方为轻型 α 地贫, 并已生育过 HbH 病患者或 Hb Bart 水肿胎。

1.2 α 珠蛋白基因探针制备

含 α 珠蛋白基因 1.8kb 片段的 PBR322 质粒扩增后, 用碱变性法提取纯化 PBR 322 重组质粒^[2], *Pst* I 酶切, 琼脂糖电泳分离, 用透析袋电洗脱法回收 1.8 kb 片段, 经 α -³²P dCTP 缺口平移法标记探针。

1.3 DNA 提取

孕妇夫妇双方及 HbH 病患者均采外周血 3~5ml, 肝素抗凝, 按文献^[5]方法提 DNA。胎儿 DNA: 5 例绒毛, 12 例羊水标本采集时间按文献^[1]进行, DNA 抽提方法按文献^[4,5]进行。

1.4 其 它

DNA 酶解, 琼脂糖电泳, DNA 转移, DNA 分子杂交及放射自显影等均按文献^[3]方法进行。

① 本研究由省科委科学基金重点项目资助;

② 第一作者, 58 岁, 女, 教授; 方群, 舒亚莉, 本校附属第一医院妇产科; 陈丽瑜, 广州市第一人民医院妇产科

2 结果

*Bam*H I 和 *Bgl* I 酶谱分析有 7 种不同带谱代表不同类型的 α 地贫(附表)。

2.1 限制性酶谱分析结果

附表 限制性酶谱结果(单位 kb)

类型	正常或 α 地贫杂合子	α 地贫 2 杂合子		血红蛋白 H 病			α 地贫纯合子
		右缺失型	左缺失型	右缺失型	左缺失型	非缺失型	
<i>Bgl</i> I	12.5 7.2	15.8 12.5 7.2	12.5 7.2	15.8	7.2	12.5 7.2	— —
<i>Bam</i> H I	14.0	14.0 10.5	14.0 10.5	10.5	10.5	14.0	—
基因型	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ $\alpha\alpha/---$	$\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$	$\alpha\alpha/\alpha^{-4.2}$	$---/\alpha^{-3.7}$	$---/\alpha^{-4.2}$	$---/\alpha\alpha^T$	$---/---$
临床表现	正常或轻型	静止型	静止型	HbH 病	HbH 病	HbH 病	HbBart 水肿胎

2.2 基因诊断结果

7 对夫妇属 α 地贫 1 和 α 地贫 2 杂合子婚配,其中 4 对一方为右缺失型 α 地贫 2 ($\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$) 杂合子,另一方为 α 地贫 1 杂合子($\alpha\alpha/---$);3 对一方为左缺失型 α 地贫 2 杂合子($\alpha\alpha/\alpha^{-4.2}$),另一方为 α 地贫 1 杂合子。以上夫妇均已生育过 1 例 HbH 病患者。胎儿产前诊断结果为 1 例右缺失型 α 地贫 2 杂合子($\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$), 2 例左缺失型 α 地贫 2 杂合子($\alpha\alpha/\alpha^{-4.2}$),其中 4 例限制性酶谱结果表明有两种可能,即正常($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)或 α 地贫 1 杂合子($\alpha\alpha/---$)(图 1), 3 例已足月分娩,脐带血 Hb 电泳证实 2 例新生儿为 α 地贫 1 杂合子, 1 例正常,均与产前诊断相符合。

7 对夫妇一方为 HbH 病(右缺失 4 例,左缺失 3 例),另一方为 α 地贫 1 杂合子。胎儿基因诊断结果:2 例右缺失型 HbH 病(已终止妊娠),1 例左缺失型 HbH 病(图 2), 1 例 α 地贫 1 杂合子或正常,1 例为 Hb Bart 水肿胎(终止妊娠)。

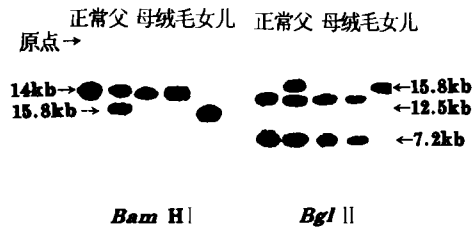


图 1 放射自显影限制酶切图谱
父为右缺失型 α 地贫 2 杂合子($\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$),母为 α 地贫 1 杂合子($\alpha\alpha/---$);女儿为 α 地贫 2 与 α 地贫 1 双重杂合子(HbH 病, $---/\alpha^{-3.7}$);胎儿正常或 α 地贫 1 杂合子

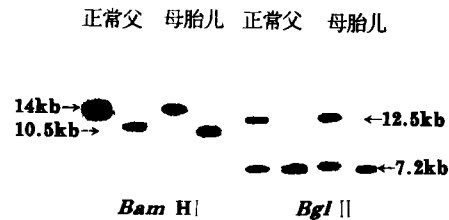


图 2 放射自显影限制酶切图谱
父为左缺失型 HbH 病,母为 α 地贫 1 杂合子;胎儿为左缺失型 HbH 病

两对夫妇一方为 α 地贫 1 杂合子,另一

方为非缺失型 α 地贫2杂合子,其余1对夫妇一方为 α 地贫1杂合子,一方为非缺失型HbH病。这3对夫妇由于各有一方为非缺失型 α 地贫2或HbH病,故此3例胎儿不能根据酶谱作出明确基因诊断。

1对夫妇一方为非缺失型HbH病,另一方为 α 地贫1杂合子,胎儿产前诊断结果可排除Bart水肿胎,但不能排除HbH病,因其带型与正常者相同,故分析存在3种可能: α 地贫1杂合子、非缺失型HbH病或非缺失型 α 地贫2杂合子($\alpha\alpha/\alpha\alpha^T$)。

3 讨论

血红蛋白H病是 α 地中海贫血中较严重的一种类型,发生的分子机制有两种,一种是 α 珠蛋白基因的缺失引起,称缺失型HbH病,基因型为($--/-\alpha$);另一种为 α 珠蛋白基因缺失与点突变共同作用所致,这一类称非缺失型HbH病,基因型为($--/\alpha\alpha^T$)^[6],点突变具有遗传异质性。迄今世界范围内已发现非缺失型 α 地贫达18种^[7],临床表现有很大差异,一般非缺失型HbH病临床表现比缺失型严重^[7],有报道非缺失型HbH病引起水肿胎者^[8]和HbH病智力低下综合征^[10]。目前对重型 α 地贫即Bart胎儿水肿综合征的产前诊断已有商品化的PCR诊断药盒。对HbH病产前诊断目前还只能用 α 或 ζ 珠蛋白基因探针进行DNA印迹杂交,方法虽较繁杂费时,但诊断准确。对非缺失型HbH病需要DNA印迹杂交并结合PCR/ASO点杂交检测点突变类型才能最后做出诊断或产前诊断。我们用 α 珠蛋白基因探针印迹杂交法对我国常见的缺失HbH病、Bart

水肿胎作出了产前诊断。对非缺失型HbH病的基因诊断正在研究之中。

参 考 文 献

- 1 曾瑞萍,杜传书,陈丽瑜,等. 70例 α 珠蛋白生成障碍性贫血产前基因诊断. 中华血液学杂志, 1992,13(5): 227
- 2 蔡良琬主编. 核酸研究技术. 北京:北京科学出版社,1987. 27~30
- 3 曾瑞萍,杜传书. 7例 α 地中海贫血杂合子基因分析. 中华血液学杂志,1987,11(8): 676
- 4 孙念怙,王凤云,吴玉珍,等. 妊娠早期产前诊断微绒毛提取DNA方法. 遗传与疾病,1985,4(2): 240
- 5 Chan V, Chosh A, Chan TK. Prenatal diagnosis of homozygous α -thalassemia by direct DNA analysis of uncultured amniotic fluid cell. J Br Med, 1984, 288: 1327
- 6 Hill AVS, Thein SL, Mavo B, et al. Non-deletion haemoglobin H disease in Papua New Guinea. J Med Genet, 1987, 24: 767
- 7 Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, et al. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. Blood, 1989, 73: 1081
- 8 Liabhaber SA, Kan YW. α -thalassemia caused by an unstable α globin mutant. J Clin Invest, 1983, 71: 461
- 9 Chan V, Chan TK, Ling ST, et al. Hydrops fetalis due to an unusual form of HbH disease. Blood, 1985, 66: 224
- 10 Wilkie AOM, Buckle VJ, Harris PC, et al. Clinical features and molecular analysis of the α -thalassemia/mental retardation syndrome. Am J Hum Genet, 1990, 46: 1112

(1994-05-22 收稿 1994-09-10 修回)

PRENATAL GENE DIAGNOSIS OF HIGH RISK HEMOGLOBIN H DISEASE

Zeng Ruiping Li Hongyi Hu Bin Fang Qun Shu Yali Chen Liyu

(Medical Genetic Department of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Prenatal gene diagnosis were carried out on 17 cases of high risk hemoglobin H (HbH) pregnant with southern blotting hybridization by using globin gene probe. The results reveal 5 cases of α -thalassemia 2 heterozygot, 5 α -thalassemia heterozygot or normal, 3 HbH disease and 1 Bart's hydrop fetal syndrome. No confirmative diagnosis in 3 cases because of one of the parent is non-defect type of α -thalassemia.

Key words thalassemia; hemoglobin H disease; prenatal gene diagnosis; DNA blotting hybridization; globin gene probe

.....

人食管癌裸鼠移植瘤株的建立及其应用研究

课题负责 蔡海英

(中山医科大学肿瘤防治中心;广州,510060)

研究者于1988年首次用人食管癌手术切除标本组织直接移植于裸鼠,成功地建立了两个移植瘤株,分别命名为人食管鳞状细胞癌裸鼠移植瘤株(HEC₂)和人食管腺鳞癌裸鼠移植瘤株(HEC₆)。两瘤株已在鼠间传递50代,历时4年。应用当前国际上先进技术——裸鼠技术、流式细胞术、电镜超微结构技术、染色体分析和免疫组化等,从整体、细胞及分子水平研究了两移植瘤株的生物学特性,显示:生长稳定、潜伏期短,移植成功率达100%,仍能保持原人食管癌的特性,为肿瘤生物学及抗癌药物研究提供了理想的模型。应用研究包括:①用HEC₂进行放射增敏作用的研究,以外源性血卟啉衍生物作为光敏剂,结果表明:单纯放射组和血卟啉加放射组的肿瘤抑制率分别为57.7%和85.4%,显示血卟啉衍生物对人食管癌裸鼠移植瘤的X线分次照射有明显的增效作用,②用HEC₆比较了化疗药物平阳霉素与5-氟脲嘧啶(5-Fu)对肿瘤细胞的作用,发现平阳霉素对食管腺鳞癌有明显抑制作用,较5-Fu疗效更好,直接为临床治疗食管癌提供了重要依据。该研究成果已在广州、北京、上海等地推广应用,取得较好效益。获1993年卫生部科技进步三等奖,同获广东省医药卫生科技进步二等奖。

(冯世容)