

地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展

陈凤英

河池市第三人民医院 广西 河池 547000

【摘要】地中海贫血是一种血红蛋白病症,该病具有遗传性,分为 α -与 β -两种类型。目前针对地中海贫血,临床尚无理想的治疗方式,多是经过产前诊断,以预防地中海贫血患儿出生。目前实验室针对 α 、 β 型地中海贫血的分子诊断方式,主要是利用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)的多种检测技术,除此之外,基因芯片、高通量测序技术等也在临床广泛应用,上述检测技术均有其优缺点。选择一种合适、科学、有效的检测方式,有利于提升地中海贫血检测的准确率,同时还能够积极引导患者实施产前诊断,为提升整体人口素质提供有效的理论依据,故本文就地中海贫血的实验室分子诊断技术研究部进展做一综述。

【关键词】反向斑点杂交技术;裂隙聚合酶链反应;地中海贫血;多种连接探针扩增技术;基因芯片技术

【中图分类号】R556

【文献标识码】A

【文章编号】2096-1685(2021)27-0185-02

地中海贫血为一组遗传性病症,主要源于合成血红蛋白的球蛋白链显著减少或血红蛋白结构异常造成。据调查,地中海贫血在我国南部较为常见,中国南方约有20%的人群携带地中海贫血基因,患病率约为8%^[1]。依据存在缺陷的珠蛋白基因种类,地中海贫血中以 α 、 β 型最为常见,其具有广泛的临床症状,给患者生理、心理等带来严重影响^[2]。目前针对地中海贫血的治疗,临床一般是依据其类型选择相应的治疗方式,但 α 、 β 型地中海贫血尚无有效、经济的治疗方案^[3],故采取准确、合理的诊断方式,尽早对地中海贫血进行筛查,并判断其类型,对预防、治疗地中海贫血具有重要意义。研究显示,实验室分子诊断技术在地中海贫血检查中具有一定的重要价值,其中以聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)为基础的检测方式最为常见^[4]。故本文就地中海贫血的实验室分子诊断技术研究部进展做一综述,旨在为日后临床诊断地中海贫血提供有效的理论依据。

1 以PCR为基础的分子诊断技术

1.1 反向斑点杂交技术

随着分子生物学技术的发展,反向斑点杂交(Reverse dot blot, RDB)在临床得以广泛应用。RDB主要是利用扩增靶序列与固化了多种特异性探针的膜条杂交,此技术经过一系列杂交,即可同时筛选被检DNA中的多种突变^[5],其基本原理是借助生物素等标记探针以及特异性扩增PCR产物杂交,经过对斑点杂交信号强弱进行检查,判断结果。该检测技术操作简便、价格低廉,其已在病原菌检验、基因突变检验中显示出其独特优点^[6]。张力、袁张洪^[7]等人对219例 β -地中海贫血患者给予PCR与RDB联合检测,结果得出,PCR-RDB法基因诊断相对敏感,具有较高的敏感性、特异性等。

1.2 裂隙聚合酶链反应

中国人 α 地中海贫血分子基础主要为大片段基因缺失, $\alpha 3.7$ 、 $\alpha 4.2$ 等均为常见的基因缺失类型^[8]。多数患者可选取裂隙聚合酶链反应(gap polymerase chain reaction, Gap-PCR)方式进行诊断,但不能完全忽视点突变型 α 地中海贫血,因点突变型血红蛋白H病的贫血程度比缺失造成的血红蛋白H病更为严重,因此在诊断前,应全面分析夫妻双方的基因,以免发生突变型 α 地中海贫血患者漏诊^[9]。Gap-PCR原理主要是源于缺失序列的两端设计一对引物,于正常序列中,因引物距离较远,甚至超出有效扩增范围,而无法形成扩增产物。朱丽秀、赖晓兰、林焯^[10]等人研究显示,对1500例 α 地中海贫血与650例 β 地中海贫血进行研究,对 α 地中海贫血给予Gap-PCR与RDB诊断,结果显示,1500例 α 地中海贫血共检测出800例患有水肿胎。由上述得出, α 地中海贫血使用Gap-PCR检测具有一定的应用价值。

2 多种连接探针扩增技术

多种连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)是近年来得到发展的一种待检DNA序列实时定性与半定量分析的新型技术。MLPA具有高效、特异性佳等优点,其在一次反应中能够对45个核苷酸序列拷贝数的变化进行检测^[11]。相关研究显示,针对缺失性 α 地中海贫血使

用Gap-PCR与MLPA联合检测,可显著提升疾病检出率^[12]。但应注意虽MLPA技术对于突变型地中海贫血具有一定的局限性,但若将其与常规检测方式联合应用,可在一定程度上提升罕见或未未知缺失型 α 地中海贫血的检出率以及诊断准确性。

3 基因芯片技术

基因芯片技术主要是由大量寡核苷酸片段或DNA片段有序排列于固相载体上,并提出待检测样本DNA,与芯片杂交,随后对芯片的荧光强度实施扫描,利用生物信息学对结果进行分析,最终得到样本中基因序列与表达相关信息。近年来,随着生物学技术不断发展,液相芯片在临床得以应用,其是美国纳斯达克上市的Luminex公司研制出的新一代生物芯片技术,该技术既保持生物芯片的高通量性,又具有较高的准确度、灵敏度以及线性测定范围宽等特点,是地中海贫血基因芯片诊断中较为理想的一种方式,其在分子领域中具有较为广阔的应用前景^[13]。黄培坚、邓文成、尹志军^[14]等人研究显示,其对832例各类地中海贫血基因型患者给予液相芯片技术检测,同时也实施Gap-PCR,对 α 缺失型进行验证,使用PCR-RDB对 α 、 β 突变型进行验证,结果得出,两种方式检测为99.199%,液相芯片出现黄区或灰区标注的结果,一致率为100.00%。

4 高通量测序

高通量测序技术(Next generation sequencing, NGS)又称二代测序技术,其使用专门为每个平台设计的合成DNA片段,在固体支持基质上扩增DNA文库,随后实施循环测序。王珂、党瑜慧、李芝兰^[15]等人研究显示,其对2858例实施孕前或孕期对夫妇的外周血进行常规检测、血红蛋白电泳分析、传统地中海贫血基因筛查、NGS,结果显示,NGS筛选 α 地中海贫血与 β 地中海贫血漏诊率分别为0.87%、1.59%。

5 小结

近年来,随着我国医疗技术不断发展,地中海贫血检测技术不断完善,多种实验室分子诊断技术在临床得以应用,其中包括PCR-RDB、Gap-PCR、MLPA、基因芯片技术、高通量测序技术等,我国地中海贫血检出率也随之提升。但每种技术均有一定的优缺点,在临床应用就有一定的限制性。因此充分掌握每种技术的应用范围、局限性等,并结合实验室实际情况,寻找一种准确、有效的诊断,对于降低地中海贫血患儿出生率具有重要意义。

参考文献

- [1] 马强,刘青松,蔡燕,等.一例 α 地中海贫血罕见突变携带者的分子遗传学诊断[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(4):368-370.
- [2] 商璇,徐湘民.地中海贫血的分子基础与精准诊断[J].中国实用儿科杂志,2018,33(12):954-957.
- [3] 秦丹卿,姚翠泽,周伟宁,等.一种罕见 β -地中海贫血基因突变类型的分子诊断和产前诊断[J].国际遗传学杂志,2017,40(6):348-352.
- [4] 秦丹卿,何天文,尹爱华.地中海贫血(下转第188页)

知程度有所不足。此外关于消渴病的实验研究相对来说较少,大都停留在对糖尿病患者的观察,对一些中药物的药理也缺乏研究,循证医学依据较少。此外虽然消渴病中药治疗方法众多,但在形式上大都是以汤剂为主,广泛推广及应用的难度较大^[15]。因此在今后的研究工作中,需要对相关中药的药理学展开研究,同时建立中医药有关消渴病的知识和服务体系,宣传中医防治消渴病的相关知识,加强现代医学技术的应用,促使中药剂型多样化,提高临床消渴病治疗效果。

参考文献

[1] 方朝晖, 仝小林, 段俊国, 等. 糖尿病前期中医药循证临床实践指南[J]. 中医杂志, 2017,58(3):266-270.
 [2] 段思柳, 唐玲, 刘宇, 等. 0级糖尿病足中药足浴护理效果的 Meta 分析[J]. 中国护理管理, 2016,16(2):159-163.
 [3] 庄杰. 加味猪苓汤结合常规疗法治疗糖尿病肾病的临床疗效分析[J]. 中国医药指南, 2019, 17(6):151.
 [4] 宋晓蕾. 猪苓汤合膈下逐瘀汤治疗糖尿病性肾病 28 例临床研究[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(7):50-51.
 [5] 石东妮, 卢海霞, 熊吴燕. 六味地黄丸联合不同方案治疗 2 型糖尿病的疗效及安全性 Meta 分析[J]. 中国药物评价, 2020, 37(1):55-60.
 [6] 闫恒, 张辉. 消渴病自拟方润燥生津汤及相应病机应对[J]. 光明中医, 2016, 31(20):3012-3014.

[7] 韩云平. 玉液汤加减(糖尿病二号方)治疗消渴病(气阴两虚型)临床疗效观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2017, 5(20):149.

[8] 陈素云, 孙桂芳. 滋阴润燥生津组方治疗干燥综合征疗效观察[J]. 中国社区医师, 2015(3):100-101.

[9] 许敏, 黄洁. 复方血栓通胶囊对单纯性糖尿病视网膜膜病变的疗效分析[J]. 内蒙古中医药, 2013,32(35):73-74.

[10] 王志忠, 杨斌, 李国强, 等. 伏格列波糖分散片联合参芪降糖颗粒治疗 2 型糖尿病的效果及安全性分析[J]. 中国医药导报, 2013,10(27):14-16.

[11] 吴名, 张蒙, 王瑞珉, 等. 针灸治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中医学报, 2015,30(6):810-812.

[12] 王仲, 余海, 张川, 等. 中药熏洗联合甲钴胺胶囊对糖尿病周围神经病变的随机对照观察[J]. 吉林医学, 2018, 39(8):1418-1420.

[13] 孟杰. 下肢力量训练联合中药熏洗对 2 型糖尿病周围神经病变患者护理效果研究[J]. 包头医学, 2019,43(2):57-59.

[14] 方朝晖, 仝小林, 段俊国, 等. 糖尿病前期中医药循证临床实践指南[J]. 中医杂志, 2017, 58(3):266-270.

[15] 李靖, 付天昊, 高宏杰. 消渴病中药治疗钩沉——从吕仁和教授六对用药规律看消渴病的中药治疗[J]. 中华中医药学刊, 2007,25(5):886-888.

(上接第 185 页) 产前基因诊断技术的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017,9(4):223-227,240.

[5] 杜利君, 邢晏, 蒋兴亮, 等. 四川南充地区 1056 例地中海贫血初筛阳性样本的基因诊断结果分析[J]. 川北医学院学报, 2018,33(4):574-577.

[6] Yu Fu, Xiaoting Shen, Dongjia Chen, et al. Multiple displacement amplification as the first step can increase the diagnostic efficiency of preimplantation genetic testing for monogenic disease for β -thalassemia[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2019,45(8):1515-1521.

[7] 张力, 张洪为. 聚合酶链式反应联合反向斑点杂交法对于 β -地中海贫血的筛查价值[J]. 医学信息, 2014,27(24):198-199.

[8] 欧阳红梅, 高玉红, 杨必清, 等. 云南少数民族地区新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因型研究[J]. 重庆医学, 2018,47(30):3899-3903.

[9] 杜丽, 秦丹卿, 刘玲, 等. 台湾型缺失 β 地中海贫血的基因诊断、产前诊断和植入前遗传学诊断[J]. 中国实验血液学杂

志, 2019,27(5):1585-1591.

[10] 朱丽秀, 赖晓兰, 林焯, 等. 地中海贫血产前基因诊断回顾性分析[J]. 中国卫生标准管理, 2019,10(21):49-51.

[11] 王秋华, 陈杏园, 罗世强, 等. MLPA 技术流产孕妇遗传学病因分析中的应用[J]. 国际遗传学杂志, 2018,41(6):470-477.

[12] 陈杏园, 罗世强, 王秋华, 等. 早孕期流产胚胎组织 MLPA 检测结果及与年龄和孕周的关系分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(10):1289-1293.

[13] Bibi Sabiha, Syed Adnan Haider, Hanifullah Jan, et al. Development of the Next Generation Sequencing-Based Diagnostic Test for β -Thalassemia and its Validation in a Pashtun Family[J]. Hemoglobin, 2020,44(4):254-258.

[14] 黄培坚, 邓文成, 尹志军. 液相芯片技术在地中海贫血基因诊断中的应用[J]. 海南医学, 2018,29(15):2128-2130.

[15] 王珂, 党瑜慧, 李芝兰, 等. 高通量测序技术筛检地中海贫血的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2019,27(4):1220-1226.

(上接第 186 页)

[5] 周姣姣, 韦玉和. 难治性高血压诊疗分析—原发性醛固酮增多症的临床筛查及治疗[J]. 中国保健营养, 2018,28(3):113.

[6] 刘子安, 宫海滨, 李春梅, 等. 169 例难治性高血压病因回顾性分析[J]. 中国卫生标准管理, 2017,8(25):8-9.

[7] 汤之铭, 刘欣. 螺内酯联合三联疗法治疗难治性高血压的疗效及安全性[J]. 贵州医药, 2020,44(4):565-567.

[8] 杨晶敏, 杨文, 刘浩云. 螺内酯、特拉唑嗪、比索洛尔对难治性高血压患者的治疗效果及安全性研究[J]. 中国全科医学, 2018,21(31):3845-3849.

[9] 杨文, 刘浩云, 秦雷. 螺内酯与呋塞米对老年难治性高血压患者降压效果及安全性分析[J]. 广东医学, 2019,40(8):1100-1103.

[10] 秦忠心, 张振建, 操传斌, 等. 螺内酯在伴肾上腺增生难治性高血压治疗中的疗效观察[J]. 大连医科大学学报, 2017,39(6):552-556.

[11] Bayushi Putra, Jonny, Alfonsus Soewandi. Renal intra-arterial heparin flushing for blood pressure control in refractory hypertension: A new method to salvage the unsalvageable renal artery stenosis[J]. Indian Journal of Nephrology, 2019,29(3):200-203.

[12] 曲凡, 杨锡燕. 五苓散合黄连解毒汤加减治疗难治性高血压的临床效果[J]. 中国老年学杂志, 2020,40(4):692-694.

[13] 董徽, 蒋雄京, 彭猛, 等. 经皮经导管射频消融去肾交感神经术治疗中青年难治性高血压:6 个月临床结果[J]. 中华高血压杂志, 2018,26(1):41-45.

[14] 温轮明, 李静婷, 余福玲, 等. 肾动脉去神经术治疗难治性高血压的疗效观察及术式改良[J]. 中华高血压杂志, 2019,27(4):341-348.

[15] 吕天娇, 李凌燕, 张弘, 等. 肾动脉主干加分支射频消融在难治性高血压治疗中的应用[J]. 介入放射学杂志, 2020,29(9):879-882.