

成能力,根据患者血小板生成状况制定个性化治疗方案,从而降低治疗风险。

4.2 评估骨髓抑制程度 巨核细胞系统一旦受到抑制,将对机体造成极大危险。RP 对凝血机制的维持起重要作用,有较高 RP 数量的患者不易出现严重的出血性并发症^[11]。外周血 RP 能预测骨髓巨核细胞生成血小板的能力,说明在接受放化疗或骨髓移植的患者中,监测 RP 和 IPF 的变化对判断骨髓抑制程度及预后评估具有重要意义,有助于判断继发出血的可能性,也可作为决定是否需预防性输注单采血小板或使用刺激因子的可靠依据。

4.3 判断骨髓抑制后造血重建 RP 检测可为预测血小板恢复时间提供有价值的信息^[13]。通过对急性髓细胞白血病化疗后恢复期血小板和 RP 的连续观察,发现多数病例 RP 的增加早于血小板。异基因造血干细胞移植和骨髓移植后,RP、IPF 与外周血血小板计数间的相关性更密切;IPF 随血小板数量的下降而下降,并最早开始回升,较血小板和 RP 回升分别提前 2.5 d 和 14 d;随着血小板数量的升高,IPF 由峰值迅速回落至正常水平,说明 IPF 能更早反映骨髓抑制后造血重建,是预测骨髓造血重建可靠易行、价值较大的指标^[13-14]。骨髓造血重建时,RP 与 IPF 的回升均早于白细胞,尽管 RP 与白细胞无直接关系,但仍提示 RP 在骨髓造血重建初期最早释放入外周血;RP 和 IPF 的检测能更加准确地、全面地反映骨髓抑制的恢复情况,可作为骨髓血小板生成的监控指标^[15]。

4.4 观察造血促进因子使用效果 使用巨核细胞刺激因子后,RP 是最早出现增加的指标;曹永献等^[16]的研究结果表明,外周血 RP 与 IPF 是反映化疗后患者骨髓变化的敏感指标,能准确反映血小板的生成情况。说明 RP 检测是目前判断巨核细胞刺激因子疗效的最佳选择。

5 结 语

外周血 RP、IPF 的测定,除有助于血小板减少症的诊断及病因学研究外,也可用于评估放化疗前后骨髓血小板生成能力、骨髓抑制程度、骨髓抑制缓解和恢复状况以及造血促进因子疗效。当骨髓抑制发生时,RP、IPF 有助于判断继发出血的可能性,并为是否输注单采血小板和使用刺激因子提供依据。

参考文献

[1] Briggs C, Kunka S, Hart D, et al. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia[J]. Br J Haematol, 2004, 126(1): 93-99.

• 综 述 •

[2] Bowles KM, Cooke LJ, Richards EM, et al. Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia[J]. Clin Lab Haematol, 2005, 27(6): 370-373.

[3] 王贤, 夏永泉, 生媛, 等. SYSTEM XE-2100 全自动血细胞分析仪与流式细胞仪检测网织血小板结果比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 12(18): 2087-2089.

[4] Yasunori A, Hideo W, Hiroaki T, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF)[J]. Thrombosis Research, 2006, 118(4): 463-469.

[5] 孙德华, 王前, 郑磊, 等. 网织血小板与血常规中血小板相关参数之间的相关性[J]. 血栓与止血, 2008, (14)4: 171-174.

[6] 宋红蕾, 冯萍, 朱雪明. 网织血小板与 MPV、血小板数量的关系探讨[J]. 临床输血与检验, 2004, 6(2): 91-92.

[7] Briggs C, Harrison P, Machin SJ, et al. Continuing developments with the automated platelet count[J]. Int J Lab Hematol, 2007, 29(2): 77-91.

[8] 蒋东霞, 徐虹, 胡杰英, 等. 人红白血病细胞来源的 DC 对细胞因子诱导的杀伤细胞逆转多药耐药的影响[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 21(7): 494-496.

[9] Salvagno GL, Montagnana M, Degan M, et al. Evaluation of platelet turnover by flow cytometry[J]. Platelets, 2006, 17(3): 170-177.

[10] 曹永献, 肖淑欣, 姚远, 等. 网织血小板对急性非淋巴细胞性白血病化疗患者骨髓功能恢复的评价作用[J]. 山东医药, 2006, 46(11): 6-7.

[11] Chaoui D, Chakroun T, Robert F, et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy[J]. Transfusion, 2005, 45(5): 766-772.

[12] 刘湘帆, HIDEO WADA, 胡翊群. 网织血小板的研究和应用[J]. 诊断学理论与实践, 2005, 4(6): 505-506, 509.

[13] 陈兵, 欧阳建, 陈军浩, 等. 异基因干细胞移植后网织血小板的临床观察[J]. 临床血液学杂志, 2005, (18)1: 50-51.

[14] Takami A, Shibayama M, Orito M, et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2007, 39(8): 501-507.

[15] 陈兵, 欧阳建, 陈军浩, 等. 网织血小板与造血干细胞移植后造血重建的相关性研究[J]. 江苏医药杂志, 2003, 29(10): 751-752.

[16] 曹永献, 吴春梅, 卢伟. 网织血小板检测方法的改良及临床应用[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(3): 207-209.

(收稿日期: 2010-06-01)

地中海贫血的实验室诊断进展

代宏剑, 温柏平 综述, 杨俊逸 审校
(昆明市儿童医院检验科, 云南 650010)

关键词: 地中海贫血; 实验室; 医院; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.053

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0251-02

地中海贫血是由于编码珠蛋白的 α 或 β 类珠蛋白基因发生缺失或点突变, 使 α 或 β 类珠蛋白链缺如或不足所致的贫血, 东南亚是地中海贫血高发地区之一, 我国广东、广西、云南、四川等省份发病率高。地中海贫血目前还缺少经济、有效的治疗手段, 通过产前诊断淘汰受累胎儿是世界上公认的首选对

策^[1], 因此婚前、产前地中海贫血诊断尤为重要。随着 DNA 分析技术的不断发展, 更灵敏、更简便的诊断方法被各个实验室采用。本文现就地中海贫血诊断方法做一综述。

1 地中海贫血的分子基础

血红蛋白(hemoglobin, Hb)由血红素和珠蛋白构成, 每 1

个珠蛋白分子是由 1 对 α 类链和 1 对 β 类链构成的四聚体。健康成人 Hb 有 3 种: HbA($\alpha_2\beta_2$, 约占总 Hb 的 95%~96%)、HbA2($\alpha_2\delta_2$, 约占总 Hb 的 2%~3%) 和 HbF($\alpha_2\gamma_2$, 占总 Hb 的 2% 以下)^[2]。

1.1 α 地中海贫血 编码 α 类链的 α 珠蛋白基因定位于 16p13.33, 包含 2 个表达基因 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、1 个胚胎期表达的 ξ 基因、3 个假基因($\psi\xi 1$ 、 $\psi\alpha 2$ 、 $\psi\alpha 1$) 和 1 个功能未明的 θ 基因, 长约 30 kb; 这些基因紧密连锁, 成人只有 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 基因表达。如果 1 条 16 号染色体缺失 1 个 α 基因称 α^+ 地中海贫血, 基因型为 $\alpha^-/\alpha\alpha$ 或 $\alpha^-/\alpha\alpha$; 2 个都缺失称 α^0 地中海贫血, 基因型为 $-/\alpha\alpha$ 。每种 α 地中海贫血单倍型与正常单倍型组合构成各种 α 地中海贫血杂合子, 各种 α 地中海贫血单倍型互相组合就构成各种纯合子或双重杂合子。大多数的 α 地中海贫血都是由缺失所致, 目前世界上至少发现了 35 种缺失, 中国人中发现了 7 种(3 种 α^+ 地中海贫血和 4 种 α^0 地中海贫血), 最常见的为东南亚型($-\text{SEA}$ 型)。少数 α 地中海贫血由基因突变引起, 中国人最常见的 3 种为 HbCS、HbQS 和 HbWM^[3]。

1.2 β 地中海贫血 编码 β 类链的 β 珠蛋白基因定位于 11p15.5, 包含 γ 、 δ 、 $\beta 3$ 个基因, 长约 70 kb, 这些基因也紧密连锁。 β 珠蛋白完全不能合成者称 β^0 地中海贫血, 能合成但合成量减少称 β^+ 地中海贫血。2 条 11 号染色体上的 2 个 β 珠蛋白基因的突变和突变类型决定了 β 珠蛋白的表达状况, 并最终决定了个体的临床表型。迄今发现 β 地中海贫血存在 170 多种突变类型, 其中 10 种为缺失型, 其余均为点突变, 我国已报道 27 种点突变^[2-3]。

2 地中海贫血传统诊断方法

2.1 血常规测定 地中海贫血的重要典型特征之一是小红细胞和低色素, 因此最重要的血液学指标是血红蛋白含量、红细胞计数和红细胞比容, 由此得出平均红细胞体积(MCV)及平均红细胞血红蛋白含量(MCH)。若 $\text{MCV} \leq 80 \text{ fL}$ 、 $\text{MCH} \leq 25.0 \text{ pg}$, 则可能为地中海贫血。血常规测定方法简单、自动化程度高、普及率高, 可满足不同实验室的需要。缺点是不能与缺铁性贫血鉴别。

2.2 红细胞渗透脆性试验 地中海贫血患者的红细胞膜存在形态、生化、代谢异常, 在低渗盐溶液中易膨胀破裂而溶血, 该试验是地中海贫血群体筛查最简便的方法。

2.3 HbA、HbA2、HbF 测定 临床上常用醋酸纤维薄膜电泳检测 Hb 各组份, 各种 Hb 在 pH8.5 的缓冲液中均带负电荷, 在电场作用下向阳极泳动, 不同 Hb 等电点不同, 电泳速度不同, 故在电泳图谱上呈现不同区带位置, 通过比较各区带染色的强度计算 HbA、HbA2、HbF 的含量, 对 Hb 的筛查有重要价值^[4], 但陈旧 Hb 区带分散, 效果差, 易发生沉淀。高效液相层析法测定 HbF 和 HbA2 克服了标本质量带来的影响, 准确度高, 重复性好, 不受高脂血液样本、黄疸标本的干扰, 且检测速度快, 对地中海贫血具有较好的初筛作用^[5]。为了提高检测灵敏度和特异性, 地中海贫血筛查通常将上述 3 种方法联合应用。MCV、红细胞渗透脆性试验及 Hb 电泳 3 项平行联合检测的灵敏度及特异度分别达 100.0%、79.7%, 平行联合检测的灵敏度与各单项检测灵敏度之间差异有统计学意义($P < 0.05$), 是地中海贫血诊断及其产前筛查中最理想的试验方法^[6]。

3 基因诊断

上世纪 80 年代后, 分子生物学技术日新月异, 特别是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术不断发展和完善, 使地中海贫血的基因诊断已成为普遍的常规检测方法。

3.1 α 地中海贫血的基因诊断 (1)Southern 杂交: Southern 杂交虽为缺失型 α 地中海贫血诊断的金标准, 但由于其方法本身操作繁琐、费时、影响因素多, 已很少被临床实验室采用。(2)gap-PCR: 通过设计 2 对引物, 其中 1 对引物位于缺失区域的两侧, 扩增缺失基因, 当无缺失时由于 2 个引物之间的距离较远, 一般 PCR 不能扩增; 另 1 对引物其中一侧与上述引物中的一侧相同(共用), 另一侧位于缺失区域, 扩增正常的 α 珠蛋白编码基因, 这样只有杂合子或正常情况下才会有特异性扩增片段的出现。通过 2 对引物有无扩增条带的组合, 可区分正常、杂合子和纯合子。该方法简单实用, 被临床实验室普遍采用。Chong 等建立了基于 gap-PCR 技术的多重 PCR(M-PCR)方法, 在同一反应体系中引入多对引物, 可以同时诊断 α^{SEA} 、 $\alpha^{3.7}$ 、 $\alpha^{4.2}$ 等, 使得 α 地中海贫血的基因诊断更为经济、快捷^[7]。(3)单链构象多态性分析(single-strand conformation polymorphism, SSCP): 变性后的单链 DNA 由于碱基序列的不同可引起构象差异, 这种差异将造成相同或相近长度的单链 DNA 的电泳迁移率不同, 从而可用于 DNA 中单个碱基突变、微小插入或缺失的检测。SSCP 多用于未知突变的检测。(4)等位基因特异性寡核苷酸分析法(allele-specific oligonucleotide, ASO): ASO 为 1 种以杂交为基础、对已知突变进行检测的技术。以 PCR 和 ASO 相结合, 设计一段 20bp 左右的寡核苷酸片段, 其中包含了发生突变的部位, 以此为探针, 与固定在膜上的经 PCR 扩增的样品 DNA 杂交。可以用各种突变类型的寡核苷酸探针, 同时以正常探针为对照, 如出现阳性杂交带, 则表明 PCR 扩增样品中存在与该 ASO 探针相应的点突变。

3.2 β 地中海贫血的基因诊断 (1)限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)连锁分析: 在 β 基因簇中目前已发现 17 个多态性限制酶切位点, 经过对受检者及父母的 1 个或几个多态性酶切位点进行家系连锁分析, 可以进行产前诊断。(2)PCR-反向斑点杂交(PCR-reverse dot blot hybridization, PCR-RDB): 设计 2 对生物素标记的引物扩增 β 地中海贫血基因, 其中 1 对扩增第 1、第 2 外显子以及第 1 内含子 5'端部分调控区, 另 1 对扩增第 2 内含子和第 3 外显子部分, 2 段扩增序列包括大部份 β 基因。根据正常及突变序列设计氨基标记的寡核苷酸探针, 包埋在尼龙膜上。探针与扩增产物杂交后, 通过酶促反应显示出杂交信号, 根据正常及突变基因的杂交情况, 确定个体的基因型。该方法具有快速、简便、高灵敏度和特异性强的特点, 但在 RDB 检测过程中, 斑点信号可能会存在不均一现象, 而且 RDB 检测受到各种试验因素、条件的影响, 其稳定性和重复性有待提高。(3)基因芯片: 将许多特定的寡核苷酸片段(或 cDNA 片段)作为靶基因, 有规律地排列固定于支持物上; 样品 DNA 通过 PCR 扩增掺入荧光标记分子或放射性同位素作为探针, 然后按碱基配对原理将两者进行杂交; 再通过荧光或同位素检测系统对芯片进行扫描, 由计算机系统对每个探针上的信号做出比较和检测, 从而得出所需要的信息。基因芯片突出优点是高通量, α 地中海贫血和 β 地中海贫血的诊断可以集成在 1 张芯片上进行^[8]。但芯片制作的工艺复杂, 信号检测也需专门的仪器设备, 一般实验室难以承担其高昂的费用。

4 结 语

地中海贫血的生化筛查和基因诊断各有优劣。生化筛查以其费用低廉、操作简单, 目前还起着不可替代的作用。基于 PCR 技术的基因诊断对操作人员和设备要求较高, 应特别注意其稳定性和准确性, 如果仅仅只用 1 种 PCR(下转第 257 页)

续表 1 麻疹及风疹疑似患者临床标本不同检测方法结果

序号	标本号	FQ-PCR	病毒分离	IgM 抗体 (≤5 d)	IgM 抗体 (10~12 d)
12	CPCDC08-0020	阳性	阳性	阳性	阳性
13	CPCDC08-0021	阳性	阳性	阳性	阳性
14	CPCDC08-0022	阳性	阳性	阳性	阳性
15	CPCDC08-0024	阳性	阴性	阴性	阳性
16	CPCDC08-0025	阳性	阴性	阳性	阳性
17	CPCDC09-0001	阳性	阳性	阳性	阳性
18	CPCDC09-0002	阳性	阴性	阴性	阳性
19	CPCDC09-0003	阳性	阴性	阳性	阳性
20	CPCDC09-0004	阳性	阴性	阴性	阳性
阳性率(%)		100	45	65	100

讨 论

麻疹引起的并发症几乎存在于人体的各个器官,其中造成死亡的最常见原因是肺炎、喉炎及脑炎,麻疹病毒感染在发病初期症状很难与风疹病毒感染鉴别。目前为止,ELISA 法检测血清中特异 IgM 抗体仍是诊断麻疹病毒感染最主要的方法之一。许多学者认为 ELISA 法简单易行,但患者感染病毒后,血清中产生特异 IgM 抗体需要一段时间,发病早期 IgM 抗体产生较少或不产生,阳性率仅为 50%~73%,尤其在发病的当天与次日检出的 IgM 抗体阳性率更低。但患者临床就诊与采血的时间往往处于发病的初期,所以临床上用 IgM 抗体作为确诊指标,不可避免地会形成一定程度的漏检。本研究通过对 20 例患者的咽拭子和血清检测也证实了这一点,血清检测 IgM 抗体往往是患者发病的第 4~5 天,此时的血清 IgM 抗体阳性率为 65%,而此时的 FQ-PCR 法检测咽拭子阳性率为 100%。1 周后再次测血清 IgM 抗体,7 例阴性者全部转为阳性,反过来也证实了起初 FQ-PCR 检测未有假阳性的产生,这进一步说明了 FQ-PCR

法的灵敏性与特异性比 ELISA 法检测血清麻疹特异性 IgM 抗体要高。综上所述,FQ-PCR 法检测有敏感性和特异性高、定性准确、重复性好等特点,有助于动态反映病毒复制、突变情况,预测抗病毒治疗效果,是了解病情严重程度、病情转归及预后的有效手段之一。FQ-PCR 法可在发热 1 天的患者标本中检测出麻疹病毒,同时不受标本量的限制,更适合于早期诊断的实验室检查或鉴别诊断,为临床医生提供准确的诊断依据。更重要的是,医务人员还可以根据患者的实际情况选择更加科学有效的检验方法,满足临床诊断的不同需求。

参考文献

[1] 罗小铭,张晋昕. 全球麻疹消除的意义与发展现状[J]. 医学综述, 2008,14(1):119-120.

[2] Himan AR. 中国麻疹控制策略的建议[J]. 中国计划免疫, 2002,8(2):111-114.

[3] 许文波,朱贞,蒋小泓,等. 中国麻疹实验室网络的建立及运转[J]. 中国计划免疫,2006,12(1):1-6.

[4] 姜明杰,甘云,梁勇,等. 荧光定量-聚合酶链反应法快速检测麻疹病毒核酸[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(4):20-22.

[5] 刘毅,武继守,候铁军,等. 2007 年陕西省麻疹减毒活疫苗强化免疫效果评价[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(2):176-177.

[6] 王虹,许颂霄. 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(1):74-76.

[7] 刘斌剑,李佳霖,孙月庭. 终点法荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(10):865-867.

[8] Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence[J]. Nat Biotechnol,1999,17(8):804-807.

(收稿日期:2010-04-03)

(上接第 252 页)

及衍生技术进行诊断,可能会导制误诊。特别是产前诊断取材时,易受母亲标本的污染,极低量的母亲 DNA 污染均可干扰检测结果。

近年来新发展的诊断方法弥补了传统方法的不足,如超声诊断。超声诊断是目前最易为患者接受,无创伤,最易普及的 1 种诊断 Bart's 水肿胎的方法。Bart's 水肿胎是最严重的 α 地中海贫血,但由于水肿胎有多种原因引起,若需查明胎儿的基因型背景,仍需进行 DNA 分析。Shihabi 等^[9]报道了使用毛细管电泳技术诊断 α 地中海贫血的方法,缺失型和非缺失型 α 地中海贫血均可采用,显示出了巨大优势及应用潜能。有报道用抗转铁蛋白受体单克隆抗体从母血中筛选出胎儿细胞,应用于地中海贫血在内的众多单基因病诊断^[10]。以上研究均预示着基因诊断发展的方向,相信在不久的将来,地中海贫血的基因诊断技术将更加成熟、完善。

参考文献

[1] Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies [J]. Baillieres Clin Haematol, 1998,11(1):215-238.

[2] 张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2003:204-234.

[3] 李巍,何蕴韶. 遗传咨询[M]. 郑州:郑州大学出版社,2003:405-

419.

[4] 陈忠领,魏新燕,范美珍,等. 血红蛋白电泳在地中海贫血筛查中的应用价值[J]. 现代预防医学,2007,34(6):1132-1134.

[5] Huang CC, Lee CN, Chen CP, et al. Molecular assay of α (3, 7) and α (4, 2) deletions causing α -thalassemia by denaturing high-performance liquid chromatography [J]. Clin Bioche, 2007, 40(11): 135-139.

[6] 何雅军,杨小华,马福广,等. 平均红细胞体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):244-226.

[7] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia [J]. Blood, 2000, 95(1):360-362.

[8] Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhuanfong Z, et al. Simultaneous detection of alpha-thalassemia and beta-thalassemia by oligonucleotide microarray [J]. Haematologica, 2004, 89(8):1010-1012.

[9] Shihabi ZK, Hinsdale ME, Dangherty HK Jr. Hemoglobin A2 quantification by capillary zone electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2000, 21(4):749-752.

[10] Chen HP, Wang TR, Xu JP, et al. Fetal origin of single nucleated erythroblasts and free DNA in the peripheral blood of p regnant woman [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2003, 85(1):1-5.

(收稿日期:2010-06-12)