

全国产前诊断羊水染色体技术学习班

专题讲座 (9)

江苏省医学情报研究所

1980年5月

遗传疾病的筛选(普查)工作 及其技术的进展

南京医学院 姚荷生

(一) 遗传疾病的筛选的意义

近一二十年来遗传疾病和先天性畸形在儿科疾病中越来越显得突出,引起了医务界和广大人民的普遍重视。据英国 carter 在1954年调查的结果,这两种情况造成的婴儿死亡率占整个婴儿死亡率的31%;而 Roberts调查1960—1966年间婴儿死亡的百分数,这两者占41.5%。Mi ller 报导,美国哥伦比亚儿科医院儿科病床约50%被遗传病因的病

表: 英国儿科死亡的百分数

病因	1954年 (Cater)	1960—1966年(Roberts)
遗传疾病	12.0	11.0
先天性畸形	19.0	30.5
未详	40.0	9.2
恶性肿瘤	14.5	8.8
环境因素	14.5	40.5

儿占住。加拿大蒙特利尔儿童医院统计,患遗传的婴儿占11%(其中常染色体隐性病为2.0%,常染色体显性病为2.0%,性联遗传病为2.7%,多因子遗传病为3.9%,染色体畸变综合征0.4%)。先天性畸形18.4%。未详的6.9%。

Crow氏说,“在现代人类社会中患有遗传疾病的人数不是无关重要的。我们相信,世界上患遗传疾病的人和患其他疾病的人一样关怀他们自己的健康。还有,在巨大的世界人口控制的纲内,越来越多的人接受了限制家庭人口的观念。因此,人们似乎更关心他们的子孙的生活的质量。父母不愿接受那些遗传上有缺陷的胎儿或先天性畸形的新生儿,如果他们能够避免的话。所以我们予期社会将鼓励产前诊断的遗传的方法学的发展和应用,而且将更早而不是更迟,将更多而不是更少。”

遗传疾病的筛选(普查)是早期发现和预防遗传疾病的一项重要社会措施。其程

序是在一定范围的群体内,对某种或某些有害的遗传进行普查,特别是利用产前诊断和新生儿诊断,尽早地发现这些性状,阻止有害的突变基因的表现。其目的是为了预防和及时治疗遗传疾病,减轻病人的痛苦,保护人民的健康,来改善个人和整个社会的生活的质量。

在意大利,由于开展了对地中海贫血病的基因携带者的筛选工作。地中海贫血病患者的百分数显著地降低了。因而使人们对遗传疾病的筛选的意义有了更多的理解。同时适合于进行大规模的普查的技术有了很大发展。遗传疾病的筛选工作近年来发展很快。现在已经从大规模筛选工作中取得许多宝贵的资料,使我们能预测在某一特定的群体中新生的遗传病人的数目。遗传疾病的筛选已成为公共卫生领域中一个新的方面。

(二) 遗传疾病的筛选工作的现状

近来在北美和西欧,遗传疾病的筛选工作有了很大的发展。最有名是加拿大的魁北克(Quebec)遗传医学网。其宗旨是应用遗传知识于有遗传疾病的人,重点面向某些可治疗的遗传病与能听从忠告的病人。最初是在1968年为苯丙酮尿症(PKU)及有关疾病的筛选而建立的,其靶群体包括所有的新生儿。参加到这个网中来的单位都是自愿的。现在参加的大学已有四个,每个大学有一个医学中心,负责网的活动和给各区分配任务。参加的医院有158个。医学中心设有中心实验室,负责解决疑难,制订规划,指导工作,发展新的技术,如全血的自动荧光测定分析,筛选苯丙酮酸和酪氨酸的新方法。对新生儿尿中氨基酸的单向划分层析新方法等。大规模筛选的样品在中心实验室分析。对危险率高的遗传疾病的筛选由各个分区中心执行,并对病人及其家属提供忠告和治疗方案。现在这个网为六百万人民服务。它们诊断和开始治疗的病儿平均年龄是十天。大部分病儿得到及时的拯救。

美国的加利福尼亚(California)州建立了一种所谓中心、卫星系统,包括一个综合的遗传医学中心和12个卫星门诊所。进行PKU和其他先天性代谢病的普查。1975年美国有12个州进行了PKU筛选工作。1976年已达44个州。有几个州还筛选了其他几种代谢病,特别是先天性甲状腺发育不良。预计要满足全美国的遗传咨询的需要,应约有60—70个综合中心,每个中心有15个卫星诊所。最近新泽西(New Jersey)州曾对台——沙(Tay—Sachs)氏病进行筛选,预计对象有1805人,携带者的范围在1:19~1:33之间。现在北美活着出生的新生儿中,根据政府监督下的计划,约有90%受到对一个或几个先天性代谢病的筛选。

在西欧,意大利进行了对地中海贫血病的筛选计划。1975—1976年在拉丁(Latium)地区对17724个学生进行筛选,地中海贫血病患者的平均数为2.42%,1977年在罗马筛选过40000个中学生,用电泳和微电泳检定血红蛋白部的 α 、 γ 或 β 链。西德在1966—1973年和1974—1966两次在北莱茵威斯特伐利亚普查过PKU等先天性代谢病,先后分别查到181和44个PKU病人。1977年法国的土伦区曾进行过大规模的血蛋白病的筛选计划。筛选774个孩子的结果,共发现27个病例,占3.48%。其中包括:杂合的地中海贫血病11例,血红蛋白过多症1例,杂合的镰形细胞贫血病6例,纯合的镰形细胞贫血病1例,杂

合的血红蛋白C过多症 3 例,镰形血红蛋白C过多症 2 例,杂合的血红蛋白D过多症 3 例。

1977年澳洲的墨尔本的维多利亚王后纪念医院的筛选和咨询服务部曾对地中海贫血病进行过产前筛选工作。古巴在1978年曾分析过24000个血液样品,用多丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamidey gel) 电泳筛选,发现血红蛋白S基因携带者频率为 3%,血红蛋白C为0.7%。

1975—1976年全世界的某些代表性的新生儿筛选中心,对先天性代谢病,包括PKU,高苯丙氨酸尿症,半乳糖血症,高精氨酸血症,胱氨酸尿症,同型胱氨酸尿症,特别是PKU筛选。把获得的资料从东欧向西排列,阐明了遗传的(种族的)关系。

(三) 遗传疾病的筛选方法与技术的进展

Watts 把筛选工作分为两类:一类是非选择性的,目的是筛选整个群体;一类是选择性的,目的是筛选群体中的某一部分。

1) 非选择性筛选:近来已能制订查清某一特定疾病的非选择筛选或整个群体的筛选规划。这种规划的要求是:(1)有可靠的和简单的试验方法,(2)设有假阴性;很少假阳性,(3)异常的发生率相当高(1:1000),(4)靶群体在伦理上能接受,即可得到靶群体的同意,(5)对靶群体有信得过的安全。现在普遍做的是关于PKU的非选择性筛选规划。其他的仅在某些地方局部地做过。举几个例:

1) 苯丙酮尿症(PKU)筛选的技术。常用的有①Guthrie细菌抑制检验法。利用枯草杆菌(Bacillus Subtilis AFCC 6051)在最低培养基中的生长受苯丙氨酸、苯丙酮酸和苯乳酸阻抑的原理,用一小块纸盘,浸润血液,放在琼脂培养基表面。另用枯草杆菌的干的孢子粉作接种物,加到装有山芋浸液的培养基的培养皿中。并制备对照者的血斑纸圆盘,也放到培养皿中。经过一定时间,观察血苯丙氨酸水平(mg/100ml.)。6 mg/100ml.以上作为阳性。

②单相纸上层析法。刺指头或脚跟,让血滴在滤纸卡片上成三个分开的点。它被吸透并干燥后,在250°F中消毒3分钟。把血液样品转移到层析纸上。将纸卷成圆柱形放到层析槽中,用丁醇、醋酸和水等层析溶剂使纸显影。每个血液样品做双份层析。一张纸用(水合)茚三酮(ninhydrin)染色,可以检出一切氨基酸的显著过多的量(除脯氨酸外)。一张纸用靛红(isatin)染色。它更灵敏地析出脯氨酸。

2) 先天性甲状腺发育不良的筛选方法:根据血液中的甲状腺 T_4 ,3.53'——三碘甲状腺素(反 T_3)、和促甲状腺激素(TSH)的浓度。或者和用滤纸干血斑法筛选PKU时结合进行。反 T_3 是对用脐带血作新生血儿筛选的最适合的参数,正常水平在相应的成人值的2和10倍之间。反 T_3 测量也可以运用于羊水,因此作产前诊断是可能的。

3) 半乳糖血症的筛选方法。需用脐带血做,因此可以和先天性甲状腺发育不良的筛选结合起来进行。

4) 胰的囊性纤维变性的筛选方法。一种方法是检查汗中电介质(NaCl)的异常,一种方法是检查胎粪中蛋白质和某种酶的过多的量,结果都要用电离子透入法汗试验来作验证。

5) 镰形细胞病和地中海贫血病的筛选方法。产前诊断的方法建立在珠蛋白 B 链合成的测量的基础上。从羊水中取得胎儿的成纤维细胞中的 DNA, 用核酸内切限制酶把它切成碎片, 进行互补珠蛋白链的分子杂交。根据基因图鉴定基因是正常的或异常的。

6) Duchenne 型肌肉营养不良的筛选方法。检查血清肌酸激酶的水平, 在 1—2 岁时达到高于正常值的 100 倍。用肌电图和肌肉活检进一步证实。

2、先天性代谢病的选择性筛选

选择性筛选的意思是对临床或遗传的观察确定下来的群体中的一个亚群进行试验。对象是已试验过的已知病例的血亲。在常染色体隐性疾病方面, 先要检验先证病例的兄弟姊妹, 在常染色体显性疾病方面, 要调查双亲和同胞。在伴性隐性疾病方面, 要调研母方从女系传下来的男性血亲。选择性筛选包括在先证者家庭之内的携带者的检出。为了这一目的, 在常染色体显性疾病方面, 要研究父母及同胞, 在伴性疾病的情况, 要在家族的母方的女性血亲中和在病人的姊妹中寻找携带者。

关于这方面的方法学的进展主要的有: (1) 多种病筛选技术, (2) 组织酶学方法等。

1) 多种病筛选方法是近年来发展起来的, 它是综合的 (即是, 能检出所有的变异型), 特异的 (能区别出所出的变异型), 能在一次分析作出不含糊的鉴定和检出未曾怀疑过的变异型。它被应用于 (甲) 特征性的非氨基有机酸尿疾病, (乙) 异常的寡糖尿症。 (丙) 糖结合代谢的生物合成通路的代谢障碍的鉴定。

已知有 50 多种先天性代谢病和异常的非氨基有机酸尿有关, 筛选这些异常的方法的程序大致是, 取清晨尿, 进行量的抽取, 通过离子交换, 用液体醋酸嘧啶洗提, 经过冷冻、干燥。然后进行气相、液相层析。作定量分析, 最后作气相分析和质谱测定。能检出 40 多种已知有机酸尿。Chalmers 和 Watts 用这种方法研究了约 400 个住院新生儿和婴儿, 发现 8 个病人有前所未知的代谢病, 包括枝链酮酸尿症, 丙酮酸尿症等。10 例被怀疑的有机酸症得到证实。11 例有异常的有机酸尿。

2) 组织酶法对先天性代谢病的筛选。过去的工作主要是在血液和在皮肤的成纤维细胞上做的。现在一个新的发展是用发根来做。

发根对这类工作好象有很大的潜力。因为它们提供一种代谢上很活跃的外胚层组织的活杆, 而且很容易取得。它们不需要培养, 因此不易发生变化, 但在成纤维细胞的培养过程中可以发生。要用培养的成纤维细胞来确定中等水平的酶活性尤其困难, 而这是溶酶体蓄积病的携带者的特征, 因为细胞从培养基中摄入某些酶。毛根也表现某种程度的无性繁殖的生长, 而且由于在女子中 X 染色体的随机失活, 能在伴 X 病症中表明两个类型的毛束——有正常酶活性的和有降低的活性的。除了区分眼睛皮肤白化症的酪氨酸酶阳性和酪氨酸酶阴性的研究外, 毛囊的酶活性的测定主要地应用在临床生化遗传学中, 为了鉴定伴性隐性疾病 (各 Lesch—Nyhan 综合征, Fabry 氏病, G—6—P—D 缺乏症, Hunter 氏综合征等) 病人的母方女性亲属的携带者。举一个例子——用发根筛选 Lesch—Nyhan 综合征。

Lesch—Nyhan 综合症是一种罕见的嘌呤代谢病, 它是伴性遗传的。临床的特征是: 智力迟钝, 大脑麻痹, 尿石, 自残地咬手指和嘴唇。病因是缺乏次黄嘌呤——鸟嘌呤

——磷酸核苷转移酶 (HGPRT)。从女性杂合子得到的成纤维细胞的培养出现两种细胞群体,一种群体表达突变的HGPRT等位基因。另一种表达正常的HGPRT等位基因。然而在杂合子造血系统的细胞中好象只出现一个表现型——正常等位基因的表现型,由于正常的HGPRT细胞在骨髓中选择地生长过盛。

从头皮的不同区域各拔出一根毛囊,把那些有看得见的鞘和根的发修剪得刚刚高于鞘。(因为HGPRT活性最初限于毛鞘中)。放进0.03ml的缓冲液中,然后冷冻和融化三次。检验每个毛囊的HGPRT和APRT(腺嘌呤磷酸核糖转移酶)的活性,用聚乙烯亚胺(Polyethylene imine)纤维素薄层层析。把HGPRT活性和APRT活性之比(AGPRT/APRT)作为对检出杂合子的HGPRT活性的比较测定。杂合子也可以单独地用HGPRT试验来鉴定。

每个被试验的杂合子表现出三类毛囊——没有酶活性的有中等活性,和有正常活性的。因此,通过HGPRT活性不同的三类毛囊的存在,可以很快地鉴定Lesch—Nyhan综合症杂合子并把它和正常人及患病半合子区别出来。

在早期妊娠时诊断母方是Lesch—Nyhan综合症的杂合子,很有价值。因为它很快地决定是否要对孕妇作羊水穿刺。除了临床的价值外,毛囊在遗传研究中更为重要了。在研究X—染色体失活方面它可能特别有意义。由于毛囊在嵌合体杂合子中常常包括仅一个类型的细胞,因此可以把它作为无性繁殖系(克隆)来利用。

发根不仅应用于性染色体隐性疾病的筛选,也可应用于常染色体隐性疾病的筛选,例如台—沙(Tay—Sachs)氏病。这个病是由于己糖胺酶的缺失,引起GM2神经节糖嵌在神经原内蓄积而发生的。