

在臺灣發展單一基因缺陷之非侵入性產前檢察方法：
用母血中胎兒細胞分子診斷東南亞型地中海型貧血

**Development of Non-Invasive Fetal DNA Diagnosis from
Maternal Blood: Application of Prenatal Diagnosis of alpha
Thalassemia-1 SEA Type in Taiwan**

計畫編號：NSC 88-2314-B-040-034

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：賴妍倩 中山醫學院醫事技術學系

E-MAIL: yenchin@mercury.csmc.edu.tw

一、中文摘要

東南亞型地中海型貧血在臺灣有很高的盛行率。因此產前診斷重型地中海型貧血對於此病的防治相當重要。最近幾年，產前基因診斷是利用羊膜穿刺，絨毛膜穿刺或抽臍帶血來得到胎兒細胞。這些侵入性的方法有可能對胎兒造成危險。而由母血中分離胎兒細胞是最不危險的方法。因此從母親周邊血液中純化胎兒細胞成為將來產前診斷單一基因缺陷疾病最可能的理想途徑。

本計畫的目的希望在臺灣建立由母血中分離胎兒細胞的方法而且運用於產前診斷地中海型貧血。另一方面打算將這些生物技術延伸應用在其他臺灣常見之單一基因缺陷遺傳疾病上。

關鍵詞：東南亞型地中海型貧血、母血中胎兒細胞、有核紅血球

Abstract

There is a high prevalence of α thalassemia-1 SEA type in the Taiwan area. Prenatal diagnosis of severe forms of thalassemia is important for the prevention of this disease. Currently, amniocentesis, chorionic villus sampling (CVS) and fetal

blood sampling are used to obtain fetal cells for genetic diagnosis. These invasive procedures pose a small but not negligible risk for the fetus. Isolating fetal cells from maternal blood for genetic analysis is the least invasive method. Prenatal diagnosis of single gene disorders by recovering fetal cells from maternal circulation appears to be a feasible approach.

In this study, we would like to develop the methodology for the prenatal diagnosis of α thalassemia-1 SEA type by using the fetal cell enriching from maternal blood in Taiwan. Hopefully, this new methodology would benefit both scientifically and clinical medical technology as well.

Keywords: α thalassemia-1 SEA type, prenatal diagnosis, fetal cells in maternal blood, nucleated red blood cells

二、計畫緣由與目的

在東南亞的中國人中，地中海型貧血 (α thalassemia-1) 症候群是最普遍的遺傳疾病。在台灣一般族群中約有 5-7% 的人口帶有地中海型貧血的基因。其中 90% 以上是兩個 α 基因都被刪除掉的東南亞型地中海型貧血 (Southeast Asia, SEA type)。而這對染色體上的四個 α 基因如果都不見了，則

會因無法產生 α 血紅素蛋白，而造成嚴重致命的胎兒水腫(Hb Bart's hydrops; Weatherall, 1981; Bunn, 1986)。因 Hb Bart's hydrops，除會造成胎死腹中或在出生後不久死亡外。其母親產生併發症的危險性較高。因此一個對此疾病快速而安全的診斷方法在臨床上就非常重要。

產前診斷血色素疾病的方法包括直接從胎兒血液中測量球蛋白鏈的形成，及從羊水細胞或絨毛膜細胞中分析胎兒 DNA 的血色素基因。直接抽取胎兒血液需要懷孕 18 週以後才能施行。羊膜穿刺術(amniocentesis)需要在懷孕中期(16 - 18 週)才能施行，且須等待 1 - 2 週的羊水培養結果。這表示孕婦需經長時間的等待才知道答案，且若需流產時其手術也較困難。因為目前較常使用的方法是絨毛膜採樣(chorionic villus sampling, CVS)。通常建議在懷孕 10 - 12 週時施行，但其流產率則提高為 15% (Old et al., Williamson, 1996)。這些侵入性的產前診斷方法，複雜且專門的處置對胎兒都有極小但存在的危險性。也就是說 CVS 或羊膜穿刺術可能引起自發性發育停止，而造成流產 (Williamson, 1996)。所以我們需要發展安全快速而且在懷孕早期即可施行的產前診斷方法。

在國外以母血胎兒細胞來做產前診斷已經有多個成功的例子。包括使用母親血液中的胎兒有核紅血球細胞來產前診斷的杜馨氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy)。和使用母親血液中的一個胎兒有核紅血球細胞來產前診斷胎兒 RhD 血型。假如由母血中分離胎兒細胞技術成功，除了方便許多單一基因缺陷疾病的產前診斷，另外也可以延伸定量 PCR 反應在染色體套數分析上。可於一工作天內快速偵測三染色體 21 (trisomy 21) (Von

Eggeling, 1993)。而唐氏症胎兒之篩檢將可普遍於每個孕婦。

有文獻指出，在所有懷孕 8 - 11 週婦女之周邊血液均可收集到胎兒有核紅血球 (Lo, 1990)。Takabayashi 等人報告一種分離的方法，以 Percoll 及非連續性密度(discontinuous density gradient)方法與顯微操作(micromanipulator)，分離出母親血液中的胎兒紅血球細胞。Cheung 等人鑑定出母親血液中的胎兒紅血球細胞，且將其核在顯微鏡下一顆顆地挑出(Cheung, 1996)。他們將這些核放在一起，使用 PCR 方法提供產前診斷鎌刀型貧血(sickle cell disease)與乙型地中海型貧血(β -thalassemia)。這是懷孕早期使用母親血液中胎兒細胞作非侵略性診斷單一基因缺陷的第一個例子。此方法相當適合於產前診斷，因為此方法可以避免掉侵略性產前 DNA 診斷方法任何機會的污染。

有鑑於此，本計畫分二方面同時進行。其一是東南亞型地中海型貧血分析。檢體是 EDTA 抗凝固之胎兒臍帶血或成人周邊血液。分別做血色素的蛋白電泳分析及其基因 DNA 分析。其二是將胎兒細胞由母親血液中分離出來。一般做法是先利用密度梯度離心及紅血球分解。接著用 MACS, FACS 或免疫小珠純化胎兒細胞。接著利用 PCR 做診斷，確認胎兒細胞無誤。

三、結果與討論

東南亞型地中海型貧血 DNA 分析之技術一旦成熟。即使檢體是極少之胎兒細胞一樣可行。終極目標則是配合臨床，建立中臺灣地區衛生署評鑑合格之地中海型貧血診斷中心。

另外我們以血色素蛋白電泳分析篩檢東南亞型地中海型貧血，包括成人及胎兒各約 100 個檢體。其中比較特別的結果是，至目前為止尚未發現有異常之 α 地中海型貧血。可是文獻記錄台灣之 α 地中海型貧血應有 4%。是否我們的樣本數太少或方法不對？或是時代不同，盛行率已有明顯差異？此部份之結果有待其 DNA 分析結果全部完成之後，及收集更多樣本分析，來做進一步釐清。

因為在國內對分離母血胎兒細胞並沒有正式文獻發表。本計劃企圖建立實驗室的標準步驟，以便於之後研究和臨床運用得以遵循。其步驟如下，得到檢體後，先用 Ficoll-Hypaque 密度梯度離心，以去除母親大部份紅血球。接下來將細胞與已結合單株抗體之 Dynabeads 反應，在 4 °C 冰箱中旋轉混合 1 小時。含細胞之試管須保持直立在 Cookson 35 Mega Dynal MPC 磁場中。針對 CD45 depletions，我們取出上清液，並分析其中男性細胞。此流程可得到剝落之滋養層細胞或胎兒有核紅血球細胞。若是陽性選擇 CD71，則去除上清液，可得到胎兒有核紅血球。再接著將黏在 beads 上的細胞以 1 mg/ml proteinase K 溶液在 56 °C 反應 45 分鐘移除下來。將細胞煮沸 15 分鐘然後以 Cookson magnet 持住。取出上清液分析其中男性細胞。分析男性細胞的方法是利用 XY 染色體上 amelogenin 基因的 DNA 片段長度不同的多形性以區分。

我們取部份經 Ficoll-Hypaque 密度梯度離心得到的 MNCs 做抹片並染色，計數其中胎兒有核紅血球個數。發現同一個孕婦，在每一單位母血中之胎兒血球數目隨懷孕周數增加而增多。

四、計畫成果自評

在熱帶或亞熱帶地區，由於輕型地中海型貧血或變異血紅素對某些傳染病有抵

抗的作用(如瘧疾)，因此較適於生存，因而造成很高的帶因率。之於臺灣也不例外。是否醫藥進步，我們已經克服瘧疾。再加上衛生署全面篩檢重型地中海型貧血胎兒，是不是這二個因素的影響，而造成我們觀察之 α 地中海型貧血盛行率偏低。以目前之結果尚不得而知，必須進一步做更嚴謹之流行病學調察與分析，才能下結論。

有文獻指出，出現在母血中的胎兒有核紅血球數目與懷孕週數沒有明顯相關 (Shulman, 1998)。但本實驗由同一個孕婦取得之血液分析則可明顯看出變化。二實驗之差異前者是來自許多孕婦平均之結果，有機率及個人變異存在之可能性。本實驗可排除不同人之差異性，但仍需大量的樣本來做總結論。

最近，以非侵入性方法來得到胎兒細胞做為細胞遺傳學分析已在實驗室證明可行。因為國內並沒有正式文獻發表分離母血胎兒細胞之技術。本計劃已經建立實驗室的標準步驟，以便於之後研究和臨床運用得以遵循。但是至目前為止，由母親血液循環中分析胎兒細胞做為產前診斷依然不是臨床可實際運用的實驗室技術。所以我們仍須致力於改進細胞分離及鑑定技術以期待在最近的將來能使非侵入性產前診斷方法成為臨床上可運用的技術。

發展分離母血中胎兒細胞剛開始時當然希望能做確定的染色體分析(karyotypic analysis)，但是它們無法繼續分裂生長，所以這些相當少的細胞無法做染色體分析，只能做螢光原位雜交(fluorescence in situ hybridization, FISH)及聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)。通常 PCR 是用來偵測一個基因有或沒有，沒辦法對染色體數目或異常有所幫助。雖然有些人用定量 PCR 來做唐氏症診斷(trisomy

21), 但無法對只含部份染色體或拼湊的染色體提供診斷(Von Eggeling, 1993)。相反的, FISH 可以抓到常見之染色體異常如 trisomy 13、18、21、XXY 及單染色體 X, 但無法抓到刪除或被重新組合的染色體 (Chueh, 1990; Norton, 1996; Davies, 1994)。不過定量 PCR 已被證實是一個可靠, 靈敏且正確的方法來評估細胞檢體的產量及純度(Bianchi, 1994)。而且 PCR 可以用來偵測一個基因有或沒有, 剛好適於我們做地中海型貧血的基因診斷。

五、參考文獻

1. Bianchi, D. W., Shuber, A. P., DeMaria, M. A., Fougner, A. C. and Klinger, K. W. (1994) Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 171, 922-926.
2. Bunn, H. F. and Forget, B. G. (1986) "Hemoglobin Molecular, Genetic, and Clinical Aspects." Philadelphia: W. B. Saunders.
3. Cheung, M. -C., Goldberg, J. D. and Kan, Y. W. (1996) Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nature Genetic*. 14, 264-268.
4. Chueh, J. and Golbus, M. S. (1990) Prenatal diagnosis using fetal cells in the maternal circulation. *Seminar Perinatal*. 14, 471-482.
5. Davies, A. F., Barber, L., Murer-orlando, M., Davies, A. F., Barber, L., Murer-Orlando, M., Bobrow, M. and Adinolfi, M. (1994) An improved method for the detection of trisomy 21 in unculture amniocytes by fluorescence in situ hybridization. *Annals New York Academy of Sciences*. 731, 67-73.
6. Lo, Y. MD., Patel, P., Sampietro, M., Gilmer, M. D. G., Fleming, K. A. and Wainscoat, J. S. (1990) Detection of single copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet*. 335, 1463-1464.
7. Norton, M. E. and Bianchi, D. W. (1996) Prenatal diagnosis using fetal cells in the maternal circulation. In: Kuller, J. A., Chescheir, N. C., Cefalo, R. C., eds. *Prenatal diagnosis and reproductive genetics*. St. Louis: Mosby, pp 228-235.
8. Old, J. M., Weatherall, D. J., Ward, R. H. T., Petrou, M., Modell, B., Rodeck, C. H., Warren, R. and Morsman, J. M. (1996) First trimester diagnosis of the hemoglobin disorders. *Annals New York Academy of Sciences*. 349-356.
9. Shulman, L.P., Phillips, O. P., Tolley, E., Sammons, D. and Wachtel, S. S. (1998) Frequency of nucleated red blood cells in maternal blood during the different gestational ages. *Human genetics*. 103, 723-726.
10. Von Eggeling, F., Freytag, M., Fahsold, R., Horsthemke, B. and Claussen, U. (1993) Rapid detection of trisomy 21 by quantitative PCR. *Human Genetics*. 91, 567-570.
11. Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. (1981) "The Thalassemia Syndromes." Oxford: Blackwell.
12. Williamson B. (1996) Towards non-invasive prenatal diagnosis. *Nature Genetics*. 14, 239-240.
13. Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W. and Araheim, N. (1992) Whole genome amplification from a single cell: implication for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 5847-5851.