

新疆少数民族地区先天性心脏病核心家系标本库的建立和应用

王晓伟¹,朱伟¹,陶正贤¹,扎灵丽²,丁木拉提²,许洪元^{2*},刘金华²,马彦青²,阿斯卡尔²,吾米提²,刘虎²

(¹南京医科大学第一附属医院,江苏 南京 210029;²新疆维吾尔自治区伊犁州友谊医院,新疆 伊犁 835000)

[摘要] 目的:探讨在新疆伊犁少数民族地区建立多民族先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)核心家系标本库,样本的采集、保存和质量控制,为各民族 CHD 遗传学研究提供实验标本和研究资料。方法:超声诊断明确并进行手术治疗的 CHD 先证者及其血缘父母进行调查和填写调查表,采集人群的血液学标本和组织标本按分子生物学实验要求分装处理,深低温冷冻保存。结果:收集多民族 CHD 核心家系患者 200 余例,存储标本 700 余份。具备完整的血样标本、心肌标本和相关临床资料。包括哈萨克族、维吾尔族、汉族、回族、蒙古族、锡伯族等。调查中发现 2 例 CHD 家系患者。通过标本库的建立和应用,摸索积累与患者及家属交流、争取配合、采样、保存和信息管理的经验。结论:建立规范的多民族 CHD 核心家系标本库是进行 CHD 遗传学研究的基础之一,完善的标本及相关资料为后续研究提供了保证,标本库的建立有利于合理有效地利用资源

[关键词] 少数民族地区;先天性心脏病;核心家系标本库

[中图分类号] R541.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-228-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20150220

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)指出生前发生的影响心脏及其附近血管结构的异常,活产儿中的发病率为 6‰~8‰。根据中国出生缺陷监测网络的数据,CHD 为中国首位高发出生缺陷,围生儿中发生率超过 25/万,是导致围生儿死亡和婴儿死亡的主要先天异常。CHD 不但影响存活儿童的生长发育,而且降低成年人的生存质量。现有研究表明,导致 CHD 的原因非常复杂,除遗传因素外,社会、环境和行为等均为协同致病因素,是多基因和环境因素共同作用的结果^[1]。

新疆自治区由于医疗条件差、保障水平低,CHD 一直是常见病、多发病,成为农民的严重疾病负担^[2]。2011 年新疆维吾尔自治区开展“春苗工程”,免费救治 CHD 患者。伊犁州友谊医院在积极手术治疗 CHD 的同时,建立了伊犁州多民族 CHD 核心家系标本库,这是新疆地区首家多民族 CHD 核心家系标本库,为 CHD 的遗传易感性研究提供资源保证,明确分布规律及探索可能的发病因素,便于基因诊断和早期预防。标本库收集哈萨克族维吾尔族、汉族和其他少数民族心血管患者生物标本并加以保存和利用,减少资源浪费,合理利用收集的标

本资源,为新疆地区心血管疾病,特别是 CHD 的基础和临床研究提供资料。

1 资料与方法

1.1 资料

标本的来源有两个方面,一是手术过程获取。超声诊断明确并进行心脏手术时获取,包括血液标本和心肌组织标本。二是流行病学普查获取。医疗队携带复查仪器设备下到各级县、乡基层医院,对在其他医院进行手术后的患者进行随访、复查,并同时获取血液学标本。

血浆、血细胞标本:获取抗凝全血,4 000 r/min 离心 10 min,用加样器小心吸取,将每支抗凝血按以下类型分装至冻存管中,2 管血浆、2 管白细胞、1 管红细胞。分装过程均在无菌条件下操作完成,上述标本均使用条形码编号贴于冻存管侧壁和盖子上编号。

心肌组织标本:组织由专业医生取材,取材后分成两等份:一份倒入足量的福尔马林液,隔天将组织拿出放入包埋盒,标示姓名、病理号,做石蜡包埋。一份用 15 号刀片切成数等份放入标示好姓名、病理号、取材部位的冻存管置入深低温冰箱或液氮存储罐中保存。

实验用房 2 间放置超低温冰箱、液氮存储罐、冰柜等冷冻设备用于存放标本;库房设备:超低温冰箱 1 台(青岛海尔);冰柜 2 台(青岛海尔);液氮

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动基金资助(2012);江苏省高校自然科学基金(12KJB320003);新疆科技厅科技援疆专项(2013911121)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:changch1999@163.com

存储系统 1 套(赛默飞公司,美国);普通离心机 2 台(上海安亭);低温冷冻超速离心机 1 台(贝可曼公司,美国),条码打印机及扫描枪(广州吉成)。

1.2 方法

1.2.1 临床资料获取和标本的标记、存放

到医院病案室查询已出院患者或到病房查询在院患者的病历,流行病学调查的患者直接询问患者的亲属,根据 CHD 危险和遗传因素调查表收集资料。与患者及家属进行接触交流,告知本课题研究意义、院方的要求及对患方的益处,取得其理解和配合,并记录以上信息,如发现家系患者则绘制家系图。

所有标本均进行统一编码,每个核心家系包括先证者、先证者父亲及母亲等 3 份血样,每份血样离心后将上层血浆、中层白细胞、下层红细胞等分别装入冻存管,统一编号后集中存放。其中分装的血浆放置-80℃冰箱保存,白细胞和红细胞放置-20℃冰箱保存。心肌组织标本置入-80℃冰箱和液氮存储罐保存。

1.2.2 标本库的管理和质量控制

包括标本库的信息管理和使用管理。其主要内容包括:①所有标本均进行统一编码,采用以下方式编码:个体编号+年份+标本类型+住院号+诊断,并与临床资料进行对应。编码贴于冻存管侧壁,将冻存管排序放入冻存盒中,资料要求正楷字体填写,严禁字迹潦草;②样本存放位置信息:包括存放设备编号、冻存盒规格及编号、样本数量、计量单位、存放在冻存盒冻存架及冰箱中的位置坐标等;③血样、组织标本和临床资料收集:由 2 名工作人员共同完成,1 人负责填写资料抽取血样,另 1 人负责全程检查及质量控制。所有临床资料和标本均按照不同民族分类储存;④专人对入库标本进行管理,其他人员不得私自自动用标本,定期由课题组相应工作人员对库存情况进行检查 1 次。经课题组负责人同意后,将标本取出进行相关研究,记录出库日期、出库数量、具体负责人,用 Excel 打印出库标本编号、姓名一览表存档。

2 结果

目前标本库收集多民族 CHD 核心家系患者 200 余例,存储标本 700 余份。具备完整的血样标本、心肌组织标本和相关临床资料。包括哈萨克族、维吾尔族、汉族、回族、蒙古族、锡伯族等。调查中发现 2 例 CHD 家系病情患者。所有标本均有详细的流行病学资料及临床检测结果,随机抽取样本做质

量监测,电泳结果未见显著降解,目前标本正被课题组使用,效果良好(表 1)。

表 1 多民族核心家系标本库标本分类表 (份)

民族	血浆标本	白细胞标本	红细胞标本	心肌标本
哈萨克族	78	78	78	72
维吾尔族	57	57	57	53
汉族	31	31	31	30
回族	27	27	27	24
蒙古族	8	8	8	6
锡伯族	2	2	2	2

3 讨论

CHD 是常见的危害婴幼儿健康的先天畸形,其发病率为活产婴儿的 6‰~8‰,且世界各地报道的发病率无明显差别^[6-7]。由于 CHD 的救治具有专业性要求高、难度大、治疗费用高等特点,给社会和家庭带来了巨大的负担。依据近两年统计显示,新疆自治区总人口为 2 158.63 万,人口出生率和自然增长率分别为 15.99‰和 10.56‰,以新疆每年新增活产婴儿数平均 30 万余例估算,每年新增先心病患儿数约为 2 000 余例;但每年接受手术和介入治疗的 CHD 患儿 800 余例。伊犁哈萨克自治州现有人口约 260 多万人,根据估算每年新增 CHD 患儿约 300 例。特别是农牧区居民由于医疗条件差、保障水平低,儿童 CHD 已成为农民的重大疾病负担。

遗传因素在 CHD 发生机制中的作用日益成为国内外研究的热点,目前已知的与人类 CHD 发生相关的致病基因如 TBX5、NKX2.5、GATA-4 均是首先通过 CHD 家系的基因检测研究证实^[10]。近年来随着人类基因组计划的顺利完成,研究人类疾病的方法和技术手段迅速发展,通过基因组分析技术不仅能直接探索研究特定家系的病因,还可以识别心脏发育缺陷相关的易感基因或揭示基因新的功能,这将为散发先心病致病基因分析指明方向。而这些科学研究的基础就是标本库的建立。新疆维吾尔自治区地域广泛、多民族居住,具有丰富的生物医学资源,然而由于观念及认识的差异,各种疾病的标本库建立较晚^[8-9]。赵娟等^[4]在新疆石河子医学院建立多民族(维吾尔族、哈萨克族、汉族等)肿瘤疾病的标本库,迄今收集标本近 2 万份,用于新疆地区民族高发性肿瘤疾病的研究,效果良好。目前在新疆尚没有关于 CHD 的标本库建立。

2011 年,对伊犁州八县两市进行了 CHD 的流

行病学调查,结果显示不同地区和民族的CHD发病率有一定差异,而要深入分析新疆伊犁地区各民族CHD的发病情况、对比可疑发病基因、发现各民族CHD致病基因,要在分子生物学与医学遗传学层次上进一步的深入研究,必须要有一定数量的不同民族患者的标本和临床资料,CHD标本库的建立则是其基础。

目前CHD遗传易感基因的研究主要集中于自身对照或CHD患者和正常人群对照,而核心家系可以通过CHD先证者及其血缘父母的对比研究,在保证遗传稳定性基础上寻找新的多态性基因,有望为CHD的遗传易感性提供新的证据。核心家系是指先证者及其血缘父亲、母亲,是进行遗传流行病学和遗传易感性研究的基础,核心家系不仅需要先证者的标本和资料,而且需要其血缘父母的标本及资料^[11]。

标本库自2012年10月建立并正常运行以来,共收集CHD核心家系患者200余例,存储标本700余份。具备完整的血样标本、心肌组织标本及相关临床资料。调查中发现2例CHD家系病情患者。以标本库为依托,本课题组准备针对于哈萨克族CHD室间隔缺损患者的miRNA-1/miRNA-133a基因簇调控区域遗传变异与室间隔缺损相关性进行科学研究。

标本库的建立,首先要考虑的是建库条件,如组织、血液标本的来源,设施设备等;在建库过程中还应该做好以下几个方面的工作。①伦理方面是前提:收集患者的标本务必征得患者或家属同意并签署知情同意书,避免不必要的纠纷。②标本质量保证是关键:标本的收集应严格按照规范由专人执行,收集者应当具备相当的专业知识,富有责任心;标本的保存过程中应该对标本的相关资料完整保存,并定期对标本进行质量检查;为保证标本的保存质量,应尽量缩短标本从离体到冻存的时间;组织的取材分装应在无菌条件下进行,操作过程需戴手套;分离血清所使用的所有器械枪头等使用前须处理;分装管数应考虑到样本的使用量,避免反复冻融。③标本的使用是目的,妥善处理好标本的使用,从而做到物尽其用,减少不必要的浪费;所有标本的管理控制很重要,任何人不能私自动用标本。标本库在取得现有成绩的基础上正努力完善,计划将全血标本抽提成DNA保存,更加合理有效的利用资源^[12]。

在新疆自治区这样一个多民族区域,建立多民

族的、较大样本量的CHD核心家系标本库既可以充分发挥地区资源优势,为不同民族CHD发病机制的遗传学研究提供物质基础,使CHD的早期预防和干预成为可能,又可以为核心家系标本库的建立过程及规范管理进行积极探索。

[参考文献]

- [1] Hoffman JI, Kaplans. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardio, 2002, 39(12):1890-1900
- [2] 魏磊,刘金华,朱伟,等.新疆伊犁州儿童先心病2:1配对病例对照病因分析[J].南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(1):78-82
- [3] Steu S, Baucamp M, von Dach G. A procedure for tissue freezing and processing applicable to both intra-operative frozen section diagnosis and tissue banking in surgical pathology[J]. Virchows Arch, 2008, 452:305-312
- [4] 赵娟,李锋,李思源,等.生物样本库的建立和管理[J].现代生物医学进展,2010,10(5):999-1000
- [5] 葛莲英,杨春,贺海平,等.肿瘤组织标本库的创建和管理方法探索[J].现代肿瘤医学,2010,18(11):2097-2099
- [6] Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, et al. American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; endorsed by the American Academy of Pediatrics [J]. Circulation, 2007, 115:2995-3014
- [7] 刘瀚文,谢亮,邓长飞,等.儿童先天性心脏病生物资源信息管理平台的建立[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2011,30(3):178-182
- [8] 党奕武,陈罡,罗殿中,等.肿瘤组织标本库的创建及意义[J].实用医技杂志,2008,15(12):1499-1501
- [9] 张颖,叶永照,胡业珠,等.肿瘤资源库的建立和管理[J].中山大学学报:医学科学版,2006,27(3):1-2
- [10] Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease[J]. Nature, 2008, 451:943-948
- [11] 聂龙,崔英,岳惠芬,等.肝癌核心家系调查分析及标本数据库的建立[J].中国癌症防治杂志,2011,3(1):10-12
- [12] Pulley JM, Brace MM, Bernard GR, et al. Attitudes and perceptions of patients towards methods of establishing a DNA biobank [J]. Cell Tissue Bank, 2008, 9(1):55-65

[收稿日期] 2014-06-29