

• 基础实验研究论著 •

SNP 微阵列检测发育迟缓患儿的基因组拷贝数变异

刘 妮¹, 宋兰林², 熊 丽², 邓 康², 刘思平^{2△}(1. 中山大学附属第一医院病理科, 广东广州, 510080; 2. 南方医科大学
南方医院产前诊断与遗传病诊断技术中心, 广东广州, 510515)

摘要:目的 检测特殊面容、精神运动发育迟缓的患儿基因组拷贝数变异(CNVs)1例,寻找与遗传学相关的致病因素,并探讨 SNP 微阵列(SNP Array)在分子细胞遗传学诊断中的优越性。**方法** 应用 G 显带对患儿及其父母进行核型分析,进一步采用 SNP Array 对患儿进行 CNVs 分析,并用荧光原位杂交技术(FISH)对结果进行验证及家系分析。**结果** 患儿及其父母外周血 G 显带核型分析未见异常,SNP Array 结果发现患儿 22 号染色体 q11.2 位置出现微缺失,FISH 验证了 SNP Array 结果同时发现患儿的微缺失来源于父方。**结论** 患儿特殊面容、精神运动发育迟缓与 22 号染色体微缺失相关联,SNP 微阵列具有高分辨率和高准确性的优点,是临床遗传学诊断特别是特殊面容、不明原因智力低下患者遗传学诊断的重要技术。

关键词:原位杂交; 荧光; 精神发育迟滞; DiGeorge 综合征; 遗传学技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)17-2216-02

Copy number variations were detected for a pediatric patient by SNP Array

Liu Ni¹, Song Lanlin², Xiong Li², Deng Kang², Liu Siping^{2△}(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Technology Center of Prenatal Diagnosis and Genetic Diseases
Diagnosis, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: **Objective** To detect copy number variations of a pediatric patient with special face and delayed psychomotor development, exploring the pathogenic factors of genetics, and investigate the superiority of SNP Array(SNP Array) in molecular cytogenetic diagnosis. **Methods** The karyotype analysis of the pediatric patient and her parents was by G banding, furthermore, Copy number variations were detected for a pediatric patient by SNP Array while fluorescence in situ hybridization(FISH) was used to verify the results and pedigree analysis. **Results** The G banding showed the karyotyping of three of them were normal, while the results of the SNP Array demonstrated the micro deletion on chromosome 22 location q11.2, the result was verified and the micro deletion found came from her father by Fish. **Conclusion** The pediatric patient with special face and delayed psychomotor development was associated with the micro deletion on chromosome 22 location q11.2, due to its high resolution and accuracy, the SNP array has provided a powerful tool for genetics diagnosis especially for the patients with unexplained mental retardation.

Key words: in situ hybridization, fluorescence; mental retardation; DiGeorge syndrome; genetic techniques

DiGeorge 综合征、腭心面综合征和先天性异常面容综合征等被证实与 22q11.2 微缺失相关,其发病率为活产新生儿的 1/3 000~1/4 000^[1]。22q11.2 发生 3 Mb 左右的微小缺失是发病的主要原因,研究发现存在此缺失的病例临床表型不一^[2]。随着研究的深入,22q11.2 微缺失综合征的其他表现如学习认知障碍、精神异常、发育迟缓等不断被发现^[3]。Miller 等^[4]认为,对于智力低下、发育迟缓、先天多发畸形与自闭症等患儿微阵列比较基因组杂交是首选的检测方法,它有利于提高疾病的检出率,明确诊断。本实验应用 SNP Array 对一智力低下、特殊面容的患儿进行全基因组扫描、拷贝数变异分析,并采用荧光原位杂交技术对结果进行确认及家系分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患儿,女,2 岁 4 个月,因中耳炎、听力受损到南方医院耳鼻喉科就诊,医生在对症就诊同时发现其为特殊面容,语言发育相对滞后。后转诊到小儿科,问病史,患儿系第 2 胎足月顺产,母亲自述怀孕没有异常表现,患儿语言发育较差,只能进行简单的几句交流,运动、应答一般。第 1 胎小孩患有

“法氏三联症”而夭折,怀孕过程中曾有风疹病毒感染史。查体:人中短、上唇薄,眼距宽,耳廓较大、听力测试听力受损,明显的鼻及鼻梁基部宽大,颈部、胸部与腹部未见异常,上下肢发育正常。心脏听诊正常、X 射线检查正常,耳聋基因检查未见基因突变。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

1.2 细胞培养与 G 显带核型分析 抽取患儿及其父母的外周血,接种于 1640 培养基里 37℃ 恒温培养 72 h 后加秋水仙素收获。按常规 G 显带方法进行制片、显带与染色,收集细胞悬液 4℃ 保存备用。镜下分析按照《中华人民共和国卫生行业标准 WS 322.2-2010》进行。

1.3 微阵列比较基因组杂交

1.3.1 基因组 DNA 的提取 采用德国 Qiagen QIAamp DNA blood mini kit 提取全血基因组 DNA,操作按说明进行,用 TE 洗脱溶解 DNA,保持 DNA 浓度大于 50 ng/μL,OD 值为 1.8~2.0。

1.3.2 杂交实验^[5] 实验检测选用 Illumina HumanCy-

toSNP-12 Beadchip 芯片,其包含约 30 万个探针检测位点。通过全基因组扩增过夜、扩增后的 DNA 片段化、沉淀悬浮片断化的 DNA、DNA 片断上芯片杂交、芯片上单碱基延伸等实验步骤完成杂交实验,最后洗涤包被芯片,负压晾干,采用 Iscan 扫描系统进行数据采集,用 Karyostudio 软件进行数据分析。

1.4 FISH 检测 采用商品化 FISH 试剂盒,其内含有 TUPLE1 探针(22q11.2)和对照探针 ARSA(22q13.3),对患儿及其父母的细胞悬液进行检测。杂交玻片的准备:将细胞悬液调整成合适的浓度分成两个杂交区域分别滴加到事预冷好的载玻片上;按产品说明进行样本老化,样本 DNA 变性,探针准备,杂交过夜,杂交后洗涤,染色复染,封片镜检。Olympus BX51 显微镜下观察结果,镜下计数 200 个细胞。ASI Spectral Imaging 5.0 图像分析软件采集和处理图像。

2 结果

2.1 G 显带核型分析结果 按照《中华人民共和国卫生行业标准 Ws 322.2-2010》,镜下计数 20 个分裂中期的细胞分析 5 个分裂中期的细胞,患儿及其父母的核型分析为正常结果。见图 2。

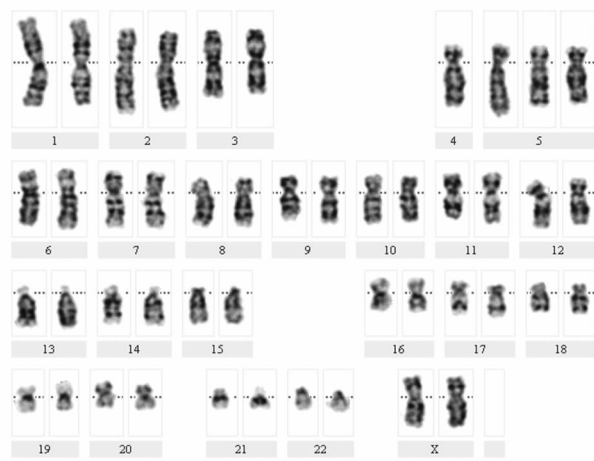


图 2 患儿 320-440 条带 G 显带核型图

2.2 SNP 微阵列比较基因组杂交结果 对患儿基因组进行 SNP array 扫描分析,进行拷贝数变异(CNVs)检测限定设定。分析发现结果存在一个 CNV,检测结果的荧光信号比值出现偏小趋势,比值向 0.25 的方向偏移,B Allele Freq 只有两种形式(A,B),原来的杂合性(AB)丢失,显示此区段发生了缺失,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。分析缺失片段位于 Chr22q11.21,起止位点为 18889490-21798907,大小为 2 909 Mb,包含 DGCR6;PRODH;KIAA1647;DGCR9;DGCR10;DGCR2;DGCR14 等一系列可致病基因。

2.3 FISH 结果 通过镜下计数 200 信号较好的细胞核,分析发现患儿及其父亲绿色探针 ARSA(22q13)出现 2 个信号点,而红色探针 TUPLE1(22q11.2)仅出现 1 个信号点,出现了 22q11.2 微缺失,验证了患儿 SNP array 检测发现的 22q11.2 微缺失,而其母亲两个红色信号与绿色信号均在。FISH 检测结果发现,患儿 22q11.2 微缺失来源于父亲。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨论

查询 Decipher 数据库相似杂合性缺失的病例记录,发现临床表型的差异性较大,以 DiGeorge 综合征较为常见,也有表

现为心脏发育异常,免疫系统发育异常,低钙血症,智力低下,也有没有明显临床表型,对比类似片段杂合性缺失病例的表型,发现所有病例表型均有不同程度的鼻子发育畸形。

22q11.2 微缺失发病机制是由于减数分裂期间 22q11.21~22q11.23 区域的 8 个低拷贝重复序列介导了同源染色体的不平衡重组,导致了一条 22 号染色体长臂的微缺失,使得该区域等位基因的单倍型剂量不足,在缺失区域中,HLRA、UFD1L、TBX1、COMT 和 CRKL 等基因被认为与 DiGeorge 综合征密切相关。其中 TBX1 基因被发现心脏发育过程中起着十分重要的作用^[6]。22q11.2 微缺失的患者都有着先天性心脏病,特别是圆锥动脉干心脏异常,典型的面部表型,腭咽闭合功能不全,先天性低钙血症和免疫缺乏等临床特征。绝大多数微缺失的患者有 22q11.2 3Mb 的缺失,而 7% 的有一个较小的 1.5 Mb 的缺失^[2]。22q11.2 微缺失有着 180 多种相关疾病的表型谱,包括先天性心脏病、腭咽闭合功能不全等,而其中有一部分患者只有认知障碍、精神发育异常,患儿有重大的脑容量减少^[7]。研究者总结了 10 例 22q11.2 微缺失综合征的不同表型^[8-14]。从典型脸型、心脏、低血钙、免疫、认知及其他等方面分析,疾病的表型谱跟缺失片段大小并不关联。在缺失同为约 3 Mb 的情况下,所总结病例中一些可表现为以上全部方面的异常外还伴有其他方面的异常如短指,也可表现为以上某些方面的轻度异常,如轻度的室间隔缺损,还有表现为先天畸形等比较严重的异常,而有些病例表型并不明显,只有典型脸型和轻度的听力下降,这种病例往往容易被临床所忽略。在所总结的病例中,有缺失片段为 1.5 Mb 却表现为严重的自身免疫性疾病及低血钙,还有缺失片段为 2.0 Mb 的病例除具备以上多方面的异常外,还表现为皮肤病、肥胖。由此可见,22q11.2 微缺失综合征临床表现多样,缺失片段大小一样的患者也可表现出不同的临床特征。

临床运用 Array 在不明原因的智力低下、发育迟缓、先天多发畸形与自闭症等患者的使用比例增加,在每位患者执行染色体和染色体核型分析的整体价值是增加的^[4]。国际化的细胞遗传学芯片联合会(ISCA Consortium)举行两次的国际研讨会及回溯 33 篇 21 698 位患者参与 Array 研究的报告,提供了充足的实证相较于染色体核型分析的优缺点,及诊断染色体异常的多样性、相关影响实验的解释,Array 检查提高了在不明原因的发展迟缓、智力低下、自闭症患者的诊断率(15%~20%),而染色体核型分析只有约 3% 的诊断率,因而 Array 对于微小片段的缺失或增加有较高的敏感性^[15-16]。

参考文献

- [1] Maruyama S, Suda M, Kobayashi T. A case of DiGeorge syndrome with left internal carotid artery absence probably causing one-and-a-half syndrome[J]. No To Hattatsu, 2012, 44(5): 392-396.
- [2] Garavelli L, Rosato S, Wischmeijer A, et al. 22q11.2 Distal Deletion Syndrome: Description of a New Case with Truncus Arteriosus Type 2 and Review[J]. Mol Syndromol, 2011, 2(1): 35-44.
- [3] 林胜谋, 方群. 22q11.2 微缺失综合征研究现状[J]. 国外医学:遗传学分册, 2004, 27(6): 371-374.
- [4] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies [J]. Am J Hum Genet, 2010, 86(5): 749-764. (下转第 2220 页)

氨基末端激酶通路(JNK)活化、caspase-13 的激活^[9]。

JNK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中重要的组成部分,参与从细胞表面向细胞核传递信号。JNK 也被称为应激活化蛋白激酶,可以被许多刺激(如生长因子、环境因素、细胞因子等应激)激活,从而参与细胞增殖、分化及凋亡。JNK 基因可以编码 46kDa 及 55kDa 两种不同蛋白,取决于是否存在羧基。

对许多疾病的研究都支持 JNK 通路在细胞凋亡中的促进作用:Ap25-35 通过激活 JNK 及其底物 c-JUN 诱导海马神经元凋亡,给予特异性抑制剂 SP600125 后,抑制了 JNK 及 c-JUN 的激活,细胞凋亡减少^[10]。Wang 等^[11]研究证实 JNK 途径参与了甲基苯丙胺引起的神经母细胞瘤的细胞凋亡,同时证实了 SP600125 有保护作用。

SP600125 是一种常用的 JNK 途径的高选择性抑制剂,通过竞争性结合 ATP 位点抑制 JNK 激酶。SP600125 可以通过抑制 JNK 介导的 c-Jun 磷酸化而发挥作用,因其高效、高选择性常常被用于 JNK 信号通路的研究^[12]。当 SP600125 浓度为 10 μmol/L 时可使 JNK 通路抑制 75%,当浓度达 20 μmol/L 时可使 JNK 通路抑制大于 90%,本实验用 SP600125 预先干预,可以抑制 p-JNK 的表达,从而起到减少细胞凋亡的作用,一方面验证了 JNK 通路在高 Ang II 所致足细胞损伤中的促凋亡作用,另一方面也为足细胞的保护提供了新的治疗靶点。

参考文献

[1] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2006, 55(1):225-233.

[2] Park CW, Kim HW, Ko SH, et al. Accelerated diabetic nephropathy in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor

alpha[J]. *Diabetes*, 2006, 55(4):885-893.

[3] Johnson R, Yamabe H, Chen YP, et al. Glomerular epithelial cells secrete a glomerular basement membrane-degrading metalloproteinase[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1992, 2(9):1388-1397.

[4] Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(12):2131-2147.

[5] Glembofski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. *Circ Res*, 2007, 101(10):975-984.

[6] Thomas CG, Spyrou G. ERdj5 sensitizes neuroblastoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(10):6282-6290.

[7] Singh R, Leehey DJ. Effect of ACE inhibitors on angiotensin II in rat mesangial cells cultured in high glucose[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4):1040-1045.

[8] 曹延萍. 内质网应激在糖尿病肾损害过程中的作用及其机制研究[D]. 河北:河北医科大学, 2011.

[9] 吴涛, 季光, 郑培永, 等. 内质网应激与肝细胞凋亡[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(23):2507-2515.

[10] 徐玮, 邓珏蕾, 汤荟冬, 等. JNK 信号转导通路在 Ap25-35 诱导大鼠原代海马神经元凋亡中作用机制的研究[J]. *中国神经科学杂志*, 2004, 20(2):135-139.

[11] Wang SF, Yen JC, Yin PH, et al. Involvement of oxidative stress-activated JNK signaling in the methamphetamine-induced cell death of human SH-SY5Y cells[J]. *Toxicology*, 2008, 246(2/3):234-241.

[12] Jin HO, Seo SK, Woo SH, et al. SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(1):123-127.

(收稿日期:2013-04-12)

(上接第 2217 页)

[5] 廖灿, 符芳, 杨昕, 等. 应用微阵列比较基因组杂交技术产前诊断 DiGeorge 综合征一例[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28(2):238.

[6] Ou Z, Berg JS, Yonath H, et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes[J]. *Genet Med*, 2008, 10(4):267-277.

[7] Simon TJ, Wu Z, Avants B, et al. Atypical cortical connectivity and visuospatial cognitive impairments are related in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome[J]. *Behav Brain Funct*, 2008, 4(1):25.

[8] Rauch A, Pfeiffer RA, Leipold G, et al. A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(2):659-666.

[9] Rauch A, Zink S, Zweier C, et al. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2[J]. *J Med Genet*, 2005, 42(11):871-876.

[10] Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, et al. 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1):214-221.

[11] Tan TY, Collins A, James PA, et al. Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities[J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A(7):1623-1633.

[12] Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, et al. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome)[J]. *J Pediatr*, 2001, 139(5):715-723.

[13] Bassett AS, Chow EW, Husted J, et al. Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 138(4):307-313.

[14] Maalouf NM, Sakhaee K, Odvina CV. A case of chromosome 22q11 deletion syndrome diagnosed in a 32-year-old man with hypoparathyroidism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(10):4817-4820.

[15] 吴志俊, 金玮. 拷贝数变异:基因组多样性的新形式[J]. *遗传*, 2009, 31(4):339-347.

[16] 马芬, 吴凤霞, 李宁, 等. 应用 Affymetrix 全基因组芯片检测染色体 7q36 区域的 DNA 拷贝数突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2009, 26(3):336-339.

(收稿日期:2013-04-01)