

· 个案分析 ·

1 例嵌合型特纳综合征的产前诊断*

郭媛媛, 王 连, 马盼盼, 冯 暄, 郝胜菊, 张庆华[△]

甘肃省妇幼保健院医学遗传中心, 甘肃兰州 730050

关键词: 染色体核型分析; 二代测序技术; 荧光原位杂交; 特纳综合征; 羊水培养

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.06.027

中图法分类号: R446.9

文章编号: 1673-4130(2023)06-0766-03

文献标志码: C

特纳综合征是一种常见的性染色体异常染色体疾病,又被称作女性先天性卵巢发育不全综合征^[1]。早孕期该疾病有 99% 染色体单体胚胎会自然流产,活产女婴中的发病率约为 1/2 500^[2]。特纳综合征的主要临床特征为身材矮小、颈蹼、乳头间距增宽、卵巢子宫及其他第二性征发育不良,多数患者月经异常,一般智力正常但其智力平均水平比健康同龄人低 10~15 分^[3-4]。部分特纳综合征患者有卵巢组织且功能正常,30%~40% 特纳综合征患者出现性发育,据报道 4% 患者有月经初潮,1% 患者具有生育能力^[5-6]。有研究报道,特纳综合征患者会出现多种并发症,包括循环系统、内分泌系统、骨病、甲状腺疾病等,而且有些患者会出现性早熟。确诊特纳综合征的关键时期是围产期,及早诊断对胎儿的妊娠结局及出生后的生活质量产生重大影响^[7]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 孕妇,32 岁,孕 19⁺₆ 周来本院产前诊断中心进行遗传咨询,外周血无创产前检测结果提示低风险,辅助检查报告提示 X 染色体数目偏少。孕妇 20⁺ 周行羊膜腔穿刺手术,并签署相关知情同意书,羊水及外周血样本送至本院医学遗传中心进行染色体核型和低深度全基因组测序拷贝数变异检测技术(CNV-seq),同时用荧光原位杂交技术进行验证。

1.2 方法

1.2.1 羊水细胞染色体核型分析 将抽取的羊水进行双线常规染色体培养和制备,主要步骤分别为羊水收获,细胞悬液滴片,吉姆萨染色,扫片仪(GSL-120)扫描后在电脑上计数 20 个中期细胞,分析 5 个核型,嵌合体需扩大计数至 50 个中期细胞。

1.2.2 染色体拷贝数变异(CNV)检测 首先提取(德国 QIAGEN 公司)并纯化(美国 Omega Bio-tek 公司)DNA,然后用试剂盒(贝瑞和康生物技术有限公司)进行文库构建,最后通过测序仪(Next seq 500)进

行检测。测序类型 SE45,平均测序深度 0.1×,所得序列与 hg19(已知人类参考基因组)比对。采用文献[8]上检测算法分析数据,最小分辨率为 100 kb。最后通过 DECIPHER、OMIM、DGV 等数据库针对 CNV 进行致病性分析。

1.2.3 羊水及外周血荧光原位杂交(FISH)检测

FISH 探针购于美国雅培公司,X 探针(DXZ1)用绿色荧光标记。胰酶消化法预处理羊水细胞,经氯化钾低渗,最后甲醇和冰醋酸处理得到细胞悬液,经滴片和洗片后加入探针杂交过夜,最后用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚复染,荧光显微镜下计数 100 个细胞,异常信号加大计数至 200 个细胞。

2 结 果

2.1 羊水染色体核型分析 计数中期细胞 50 个,X0 细胞占 31 个,其余细胞均含标记(mar)染色体,见图 1。羊水 G 显带染色体核型分析结果显示为 45,X[31]/46,X,+mar[19]。

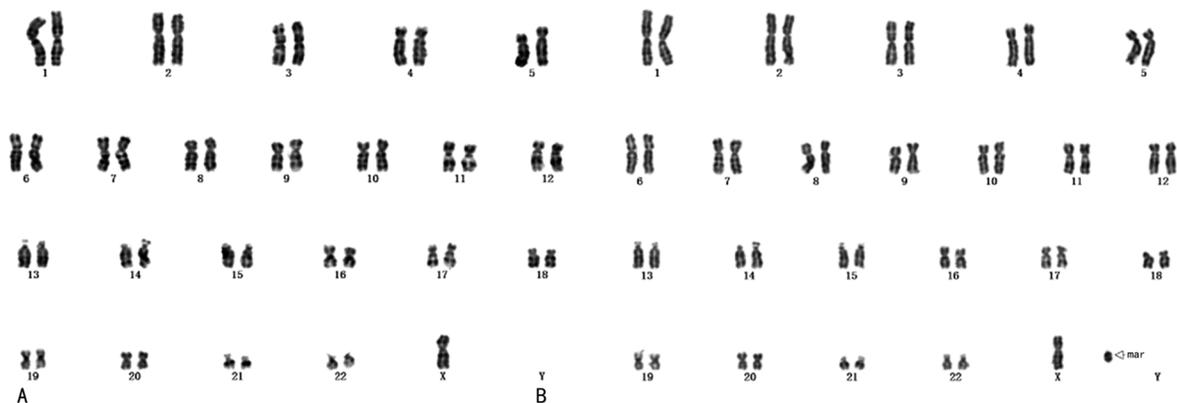
2.2 CNV 数据分析 CNV 致病性分析显示 X 染色体 p22.33p11.21 处缺失 54.64 Mb 区域(拷贝数为 1.0)、p11.21q22.1 处嵌合性缺失 45.14 Mb 区域(拷贝数为 1.6)、q22.1q28 处缺失 52.46 Mb 区域(拷贝数为 1.0),见图 2。由此可预测胎儿染色体核型为 45,X[40%]/46,X,der(X)del(X)(p11.21)del(X)(q22.1)[60%]。

2.3 羊水及外周血 FISH 分析 羊水 FISH 检测显示,计数 200 个细胞,其中 126 个可见 2 个清晰的绿色信号、74 个仅见 1 个绿色信号,结果为 nuc ish(DXZ1×1)[74/200]/(DXZ1×2)[126/200];外周血 FISH 检测显示,全部细胞均可见 2 个清晰的绿色信号,结果为 nuc ish(DXZ1×2)。见图 3。

2.4 疾病诊断 通过羊水染色体核型分析、CNV-seq 和 FISH 技术综合判断,可确诊该胎儿为嵌合型特纳综合征患者;胎儿出生后须进行早期干预,以降低该综合征的并发症并减缓相关临床症状。

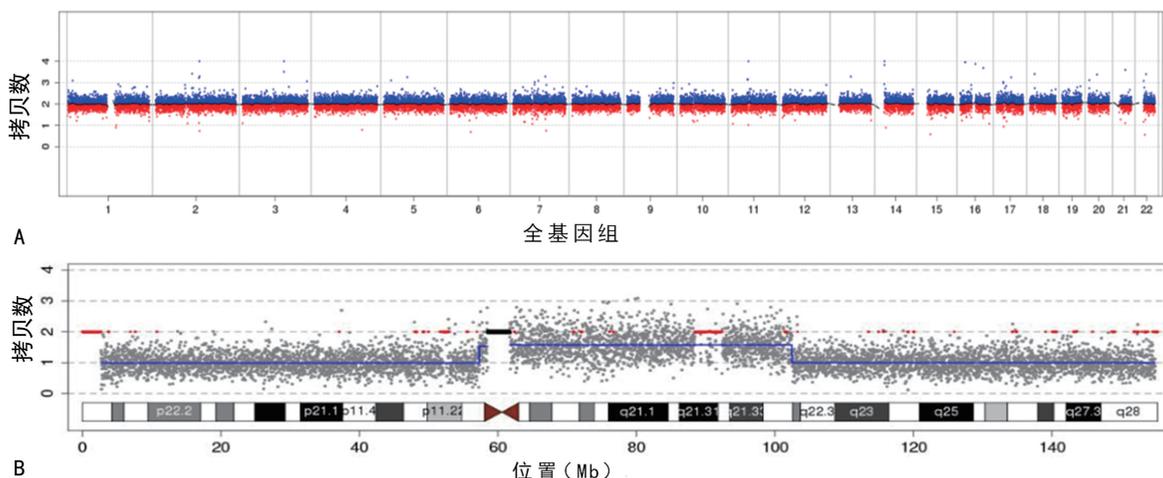
* 基金项目:兰州市人才创新创业项目(2018-RC-95)。

[△] 通信作者,E-mail:45251377@qq.com。网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1176.R.20230222.1045.002.html\(2023-02-22\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1176.R.20230222.1045.002.html(2023-02-22))



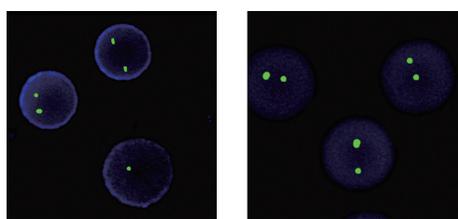
注:A 表示核型:46,X,+mar[19];B 表示核型:45,X[31]。

图 1 胎儿染色体核型图



注:A 表示全基因组检测结果;B 表示 X 染色体测序结果。

图 2 胎儿 CNV 测序结果



注:A 表示孕妇外周血、B 表示孕妇羊水。

图 3 孕妇 FISH 检测结果

3 讨论

特纳综合征是由一条 X 染色体完全或部分缺失导致的性染色体异常疾病,占新生女婴的 1/5 000,是目前人类唯一可以生存的单体综合征,其主要核型包括 X 染色体单体(染色体核型为 45,X 约占 50%)、嵌合体(占 20%~30%)和其他 X 染色体结构异常^[9];结构异常有等臂 X、X 缺失、X 末端重排、环状 X 染色体等^[10]。

确诊特纳综合征的关键时期是围产期,通常采用早中孕期母血清学筛查发现可能风险,但该方法敏感度和准确度较低,具有一定的假阳性和假阴性率。近年来应用广泛的无创产前检测技术可有效提高筛查精度和效率,有研究表明,无创产前检测对 21-,18-和

13-三体的检测特异度和灵敏度均大于 99%,对性染色体的灵敏度为 85.7%^[11-13]。

对于产前筛查出的高风险孕妇,联合分子遗传学、细胞遗传学等多种检测技术进行胎儿产前诊断,可提高产前诊断精度。本研究通过采用染色体核型分析、CNV-seq 和 FISH 技术进行产前诊断,确诊胎儿为罕见嵌合型特纳综合征患者。羊水染色体核型分析是产前诊断的金标准及重要手段,主要诊断染色体数目异常,平衡易位(大于 10 Mb)和倒位等结构异常,但是不能识别 5 Mb 以下不平衡易位,且判断异常染色体来源存在困难^[14-15];本研究通过羊水细胞染色体核型分析发现,胎儿 45,X[31]/46,X,+mar 嵌合体,即计数 50 个中期分裂相中有 31 个细胞只含有 1 条 X 染色体,其余分裂相中缺少 1 条性染色体,多 1 条标记染色体(+mar 为未知来源),但染色体核型分析仅能识别 10 Mb 以上的缺失或者重复,且对于额外增加的小染色体无法从形态上识别,该标记染色体可来源于任意一条染色体,其致病性的严重程度还需通过其大小和是否含有常染色质决定^[16],因此判断 mar 来源尤为重要。CNV-seq 可有助于排查 mar 变异来源,可以检测小于 100 kb 的染色体微缺失微重复^[17],速度快、准确率高及通量大,目前该技术已被作为一

线产前诊断方法与染色体核型分析联合应运^[18];本研究发现,胎儿 X 染色体 p22.33p11.21 处缺失 54.64 Mb 区域(拷贝数为 1.0),p11.21q22.1 处嵌合性缺失 45.14 Mb 区域(拷贝数为 1.6),q22.1q28 处缺失 52.46 Mb 区域(拷贝数为 1.0),预测为 45,X[40%]/46,X,der(X)del(X)(p11.21)del(X)(q22.1)[60%],推测核型中标记染色体为长臂与短臂均部分缺失的 X 染色体。FISH 技术有助于进一步确认推测及确定嵌合比例,可以对细胞中待测核酸进行定量,定性及定位检测,主要应运于产前细胞及分子遗传学检测提示异常的验证^[19]。胎儿羊水行间期 FISH 检测,提示 nuc ish(DXZ1×1)[74/200]/(DXZ1×2)[126/200],由于 X 探针杂交于着丝粒,因此 CNV-seq 检出部分缺失的 X 在 FISH 中会显示为 XX;由 FISH 结果可进一步推定羊水培养核型分析所见 mar 为长臂与短臂部分缺失的 X 染色体。同时,对胎儿母亲外周血进行 FISH 检测提示所计数细胞中 X 探针均为 2 个信号,提示为正常女性。孕妇血液中少量 DNA 会通过胎盘屏障,染色体异常或染色体嵌合会影响检测结果准确性,因此该检测可以排出假阳性,再次提示胎儿为 X 染色体嵌合结构异常。另外,本研究发现胎儿羊水染色体核型与 CNV 和 FISH 嵌合比例有差异。有报道表明,9 号染色体经体外培养后存在细胞克隆的消失现象,即异常染色体在传代过程中被选择性淘汰。因此可以推测此样本中缺失的 X 染色体在培养过程中有部分羊水细胞克隆丢失,从而导致二者嵌合比例不同,但该差异并不影响特殊特纳综合征的明确诊断。

综上所述,染色体核型分析与 CNV-seq 技术联合应用有助于微小不平衡易位(缺失与重复)的检出,且能高精度推断出未知染色体来源,而 FISH 技术则可以进一步验证异常染色体的嵌合比例、来源与位置。多种遗传学检测技术联合可有效提高特纳综合征产前诊断分析精度、明确胎儿染色体核型,从而降低出生缺陷。

参考文献

- GRAVHOLT C H, DOLLERUP O L, DUVAL L, et al. A rare case of embry-onal carcinoma in a patient with Turner syndrome without Y chromosomal material but mutations in KIT, AKT1, and ZNF358 demonstrated using exome sequencing[J]. *Sex Dev*, 2017, 11(5/6): 262-268.
- HEWITT J K, JAYASINGHE Y, AMOR D J, et al. Fertility in Turnersyndrome[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2013, 79(5): 606-614.
- GRAVHOLT C H, VIUFF M H, BRUN S, et al. Turner syndrome: mechanisms and management [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(10): 601-614.
- EL-MANSOURY M, BARRENÁS M L, BRYMAN I, et al. Chromosomal mosaicism mitigates stigmata and cardiovascular risk factors in Turner syndrome[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2007, 66(5): 744-751.
- BAEK J U, PARK H K, SHIM E J, et al. Precocious puberty in Turner syndrome variant[J]. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2012, 25(5): 113-114.
- HEWITT J K, JAYASINGHE Y, AMOR D J, et al. Fertility in Turner syndrome [J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2013, 79(5): 606-614.
- 施健灵, 莫春娥, 侯显良, 等. 特纳综合征临床研究进展 [J]. *国际遗传学杂志*, 2021, 10(44): 326-331.
- Tattini, D Aurizio R, Magi. Detection of genomic structural variants from next-generation sequencing data [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3: 92.
- ZHONG Q, LAYMAN L C. Genetic considerations in the patient with Turner syndrome-45,X with or without mosaicism[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(4): 775-779.
- 夏俊珂, 刘艳霞, 赵勇江, 等. 罕见特纳综合征的细胞遗传学和分子遗传学检测一例 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 2(37): 162-164.
- 金克勤, 骆健峰, 张丽萍, 等. 无创产前检测对于胎儿染色体拷贝数变异的检测价值 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2021, 4(38): 329-334.
- DAN S, WANG W, REN J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11105 pregnancies with mixed risk factors [J]. *Prenatal diagnosis*, 2012, 32(13): 1225-1232.
- JIANG F, REN J, CHEN F, et al. Noninvasive fetal trisomy(NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies [J]. *BMC Med Genomics*, 2012, 5(1): 57.
- 吴东, 王红丹, 张卉, 等. 一例 2p15-p18.1 微缺失综合征导致多发畸形的临床表型和遗传学分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(6): 823-826.
- 杜柳, 谢红宁, 郑菊等. 颈部透明层增厚胎儿中 CMA 技术检测拷贝数变异的分析 [J]. *中华妇产科杂志*, 2018, 53(10): 671-676.
- LIEHR T, WEISE A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19(5): 719-731.
- LIANG D, PENG Y, LV W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndrome [J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(5): 519-526.
- 中华医学会医学遗传学会分会临床遗传学组. 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2019, 36(4): 293-296.
- 中国医院协会临床检验专业委员会出生缺陷防控实验技术与管理学组, 刘世国, 王敬丽, 等. 产前荧光原位杂交技术专家共识 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(9): 918-923.