

• 个案分析 •

无创产前基因检测诊断 Pallister-Killian 综合征 1 例分析*

冯 暄,张 钊,张庆华,郝胜菊,郑 雷,周秉博,王 兴
(甘肃省妇幼保健院医学遗传中心,甘肃兰州 730050)

关键词:Pallister-Killian 综合征; 12 号染色体; 无创产前基因检测; 高通量染色体拷贝数变异检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.12.031 中图法分类号:R714.5

文章编号:1673-4130(2020)12-1533-04 文献标识码:C

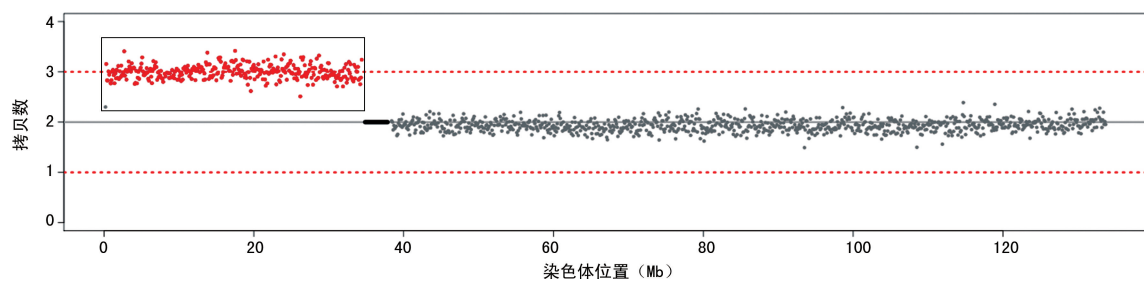
Pallister-Killian 综合征(PKS)属于染色体微缺失综合征的一种,可导致患儿身体不同程度残疾、生长发育迟缓或智力损伤等。PKS 的临床表现包括特征性颅面畸形、先天性心脏缺损、膈疝、癫痫和皮肤色素异常等^[1]。PKS 较为罕见,诊断困难,产前筛查是预防 PKS 患儿出生的有效手段^[2]。本研究通过无创产前基因检测(NIPT)诊断了 1 例 PKS,现将结果报道如下。

1 临床资料

孕妇,27 岁,孕 2 产 1,孕 18 周,否认近亲婚配,无遗传病家族史。于外院行超声检查提示:胎儿先天性膈疝,股骨、肱骨低于 M-2SD 线,心脏移位至右侧胸腔,肺动脉主动脉比值增大,心包积液,三尖瓣反流(少量)。因血清学产前筛查 18-三体综合征高风险于本院就诊,18-三体综合征风险值为 1/266。产科医生咨询后,建议直接行羊水穿刺产前诊断,但孕妇因担心羊膜腔穿刺风险,自愿选择 NIPT,在充分了解

NIPT 的优势与局限性后,签署知情同意书,并于孕 22 周时进行检测。

1.1 NIPT 静脉采集 10 mL 外周血,4℃ 下 1 600×g 离心 10 min,取上清液 2 mL 分装后再次于 4℃ 下 16 000×g 离心 10 min,获得的血浆继续进行游离 DNA 提取,剩余标本于-80℃ 保存备用。标本 DNA 检测合格后用 PCR-free 法进行文库制备,采用 NextSeq CN500 高通量测序仪(贝瑞基因公司)完成 36 bp 的单端测序,检测试剂盒为贝瑞基因公司生产的胎儿染色体非整倍体检测试剂盒(可逆末端终止测序法),测序深度为 0.3×,并进行生物信息学分析。NIPT 结果提示:13、18、21-三体无异常,但存在 12 号染色体短臂部分重复 dup(12)(p13.33-p11.1),Z 值为 20.81,起始位置为 chr12:200000-34499999,片段大小为 34.3 Mb,代表 12 号染色体短臂部分三体,见图 1,需行进一步的有创性诊断确诊。



注:方框所示为染色体短臂重复部位,拷贝数为 3。

图 1 NIPT 12 号染色体拷贝数变异散点图

1.2 胎儿羊水细胞染色体核型分析 经产科医生咨询,签署知情同意书后,于孕 24 周时行羊水穿刺。抽取羊水 30 mL,取 10 mL 用于高通量测序,其余 20 mL 分 2 管,以 2 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,取沉淀细胞,加适量羊水细胞培养基,接种于无菌培养瓶内,置于 37℃、含 5%二氧化碳的培养箱中静置培养 8~9 d,常规收获制片。以 G 显带染色制备染色体标本,对每例标本均按照《人类细胞遗传学国际命名

体制(2013)》标准,计数 20 个中期分裂相细胞,分析 5 个核型。胎儿羊水细胞染色体核型分析结果:47,XX,+i(12)(p10)[58]/46,XX[42],说明该标本为 12 号染色体短臂等臂染色体的嵌合体,见图 2。

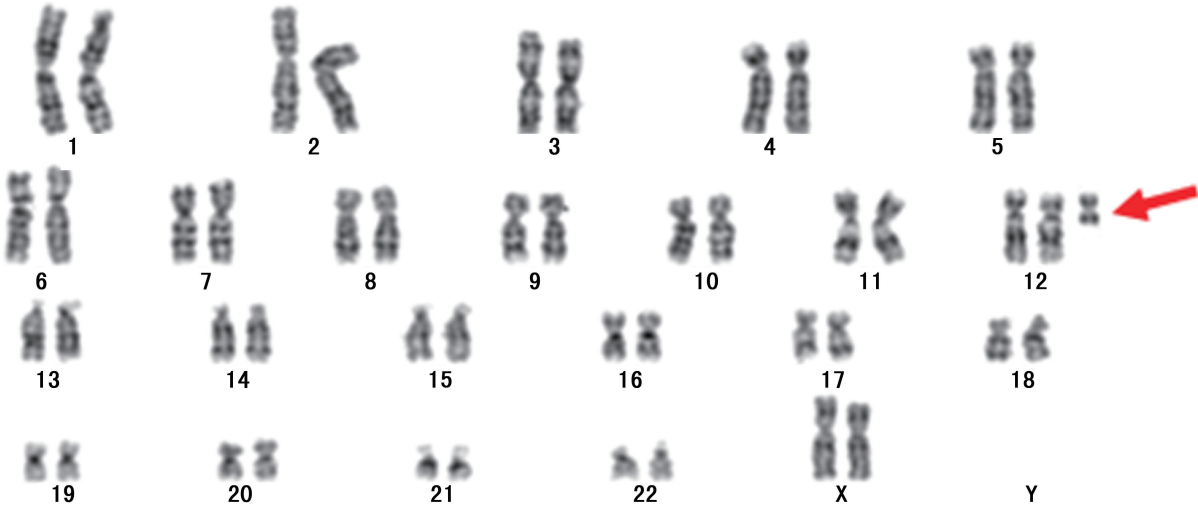
1.3 胎儿羊水高通量染色体拷贝数变异检测(CNV-seq) 提取羊水基因组 DNA,进行文库构建:通过片段化-连接、PCR 前纯化、PCR 扩增、PCR 后纯化等过程,采用 NextSeq CN500 高通量测序仪(贝瑞基因公

* 基金项目:甘肃省兰州市科技计划项目(2017-4-50)。

本文引用格式:冯暄,张钊,张庆华,等.无创产前基因检测诊断 Pallister-Killian 综合征 1 例分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(9):1533-1536.

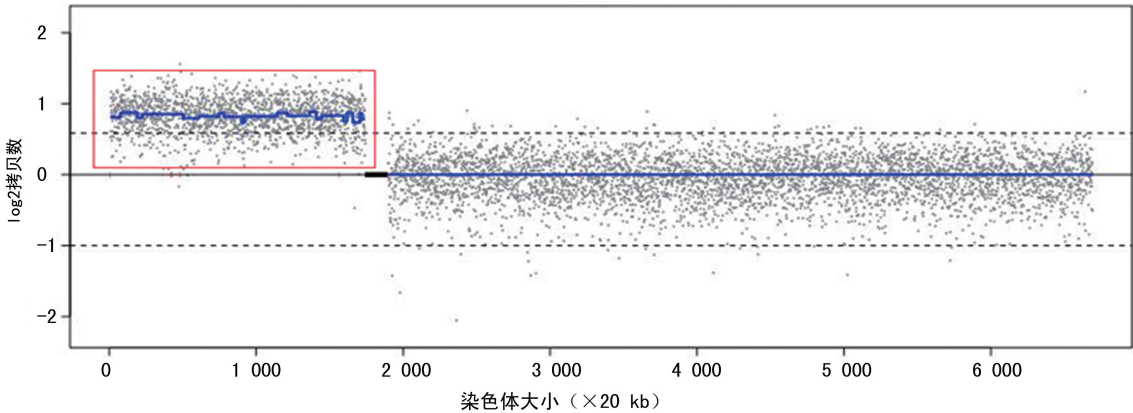
司),进行 CNV-seq,测序结果经贝瑞基因公司 Enliven[®] 变异注释系统标注。CNV-seq 结果为:dup(12)(p13.33-p11.1)(mos),提示该标本 12 号染色体 p13.33-p11.1 处检测到拷贝数为 3.5,片段大小为 34.70 Mb 的嵌合重复区域,起始位置为 chr12:160001-34860000,见图 3、4。经查阅数据库[包括 Decipher 数据库、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、PubMed 数据库及 UCSC Genome Browser 数据库],

得出该标本的变异包含了 PKS 的全部区域,结合羊水细胞染色体核型分析与 CNV-seq 的结果,该标本确诊为 PKS。
1.4 孕妇及其配偶外周血染色体核型分析 为明确变异来源,对该孕妇及其配偶进行了外周血染色体核型分析,夫妻双方 G 显带核型结果均未见异常,见图 5,说明胎儿染色体变异为新发。



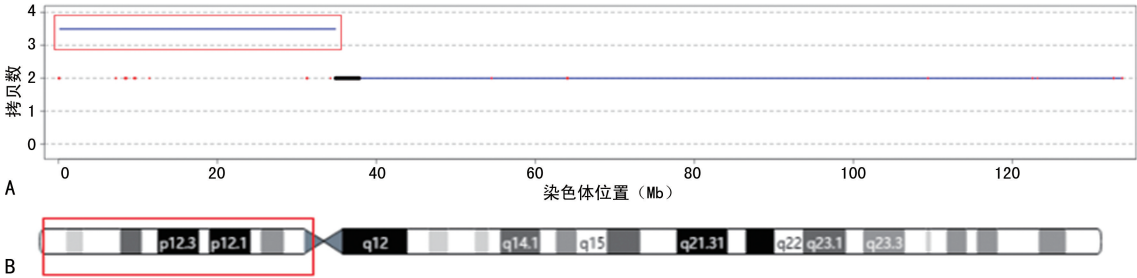
注:胎儿染色体核型为 47,XX,+i(12)(p10);箭头所示 1 个额外染色体,为 12 号染色体短臂等臂染色体。

图 2 胎儿羊水细胞染色体核型图



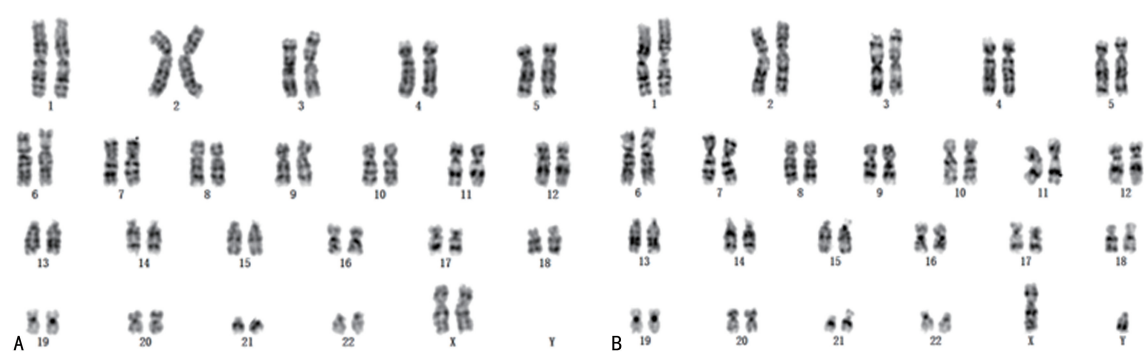
注:方框所示为染色体拷贝数异常。

图 3 CNV-seq 12 号染色体测序散点图



注:A 为 12 号染色体拷贝数变异测序图,方框所示为染色体短臂重复部位,拷贝数为 3.5;B 为 12 号染色体,方框所示为 12 号染色体短臂重复部位示意图。

图 4 CNV-seq 12 号染色体拷贝数变异图



注:A 为孕妇外周血染色体核型:46,XX;B 为孕妇配偶外周血染色体核型:46,XY。

图 5 孕妇及其配偶外周血染色体核型图

2 讨 论

PKS 的细胞遗传学特点是特定组织中以嵌合体形式存在的 12 号染色体短臂等臂染色体,故也称为等臂 12p 综合征或 12p 四体综合征。PKS 的嵌合效应是由于额外染色体上携带的基因最终导致颅面部、心血管、肾脏和其他系统异常。PKS 可累及体内所有器官及系统,其典型临床表现如下:(1)特殊面容包括皮肤色素异常、粗犷面容、眼距宽、高腭弓、前额突出、短颈等;(2)神经系统异常包括脑结构异常、癫痫、肌张力减退;(3)心脏缺陷包括心房和室间隔缺损;(4)胸部受累包括肺发育不全、膈疝;(5)胃肠道表现包括肠旋转不良及肛门移位;(6)骨骼肌肉系统发育异常包括 PKS 特有的生长模式,即在宫内提示明显的生长过度现象,但在出生后立即表现为生长发育迟缓;(7)75% 的 PKS 患儿还有一定程度的视力损伤^[2-3]。PKS 胎儿在妊娠中期超声检查中可显示出明显的异常,包括羊水过多、膈疝、中枢神经系统异常、胎儿水肿、颜面部异常、心室扩张、短肢畸形等。当超声检查提示羊水过多、膈疝、肢骨短小,尤其伴有生长过度时,应首先考虑 PKS^[4]。本研究中该孕妇妊娠中期超声检查提示:胎儿先天性膈疝,股骨、肱骨低于 M-2SD 线,心脏移位至右侧胸腔,肺动脉主动脉比值增大,心包积液,三尖瓣反流(少量)。符合 PKS 超声检查的主要特征。

PKS 具有特殊的细胞遗传学特点,即异常的染色体有组织特异性,通常在皮肤成纤维细胞中可以检测到异常。因此,由于嵌合体的组织特异性,PKS 的诊断可能经常被遗漏,并且通常在快速分裂的细胞,如外周血淋巴细胞中不能检测到^[5-6]。已报道的病例中均未在外周血淋巴细胞中诊断出异常染色体 i(12)(p10)^[7]。据不同组织中期染色体核型分析统计,包含有异常染色体 i(12)(p10)的组织包括:淋巴细胞(检出率为 0%~2%)、成纤维细胞(检出率为 50%~100%)、羊水细胞和骨髓细胞(检出率均为 100%)^[8]。皮肤成纤维细胞中检测嵌合体的成功率高于外周血,因为其异常细胞的损耗率低于 T 淋巴细胞^[9]。本病例羊水细胞中 i(12)(p10)检出率为 58%,说明 CNV-seq 技术可以精准地检测出比例高于 5% 的嵌合体,也证明了在 PKS 的诊断方面,羊水细胞的检出率较高。

羊水 CNV-seq 结果显示,12 号染色体短臂重复,其拷贝数为 3.5。一般来说,单纯的染色体重复检测到的拷贝数应为 3,但该标本是 12 号染色体短臂等臂四倍体的嵌合体,所以导致其拷贝数为 3.5。目前,诊断 PKS 的方法主要为细胞遗传学及分子遗传学两类,本病例采用的细胞遗传学技术为染色体核型分析,其是染色体检查的“金标准”;但由于 PKS 特殊的细胞遗传学特点,在不同组织中的检出率有很大差别,所以染色体核型分析技术对 PKS 的检出率并不高。本病例采用的分子遗传学技术为 CNV-seq,其不针对特定区域设计探针,而是进行全基因组测序,覆盖了 23 对染色体,精确度高,可检测到相对分子质量为 100×10^3 以上的染色体变异,并具有很好的重复性与拟合度,与芯片技术比较,具有成本低、通量高、覆盖范围广及稳定性更高等优点。

PKS 属于染色体微缺失综合征的一种。染色体的微缺失或微重复都属于染色体的拷贝数变异,可引起微缺失或微重复综合征,导致患儿身体出现不同程度器官功能异常、生长发育迟缓或智力损伤等^[10]。有研究显示,有 1.65% 的孕妇在产前诊断中可检出有临床意义的染色体微缺失或微重复^[11]。要想有效预防出生缺陷,就需要进行大规模的产前筛查,并对高风险人群进行产前诊断。NIPT 作为高通量测序在临床应用最成熟的领域,其检测胎儿染色体非整倍体异常已经成为临床产前筛查的重要部分。2015 年国际产前诊断协会针对 NIPT 出台了最新临床应用指南,明确指出 NIPT 可对染色体微缺失或微重复进行检测^[12]。近年来,随着测序技术的进一步发展,一些实验室引入了染色体微缺失或微重复的无创产前筛查,作为除了整个染色体非整倍体检测之外的另一种选择,称之为扩展性的无创产前筛查技术^[13]。扩展病种的无创性产前检测,筛查的范围扩大到全染色体基因组 7 Mb 的片段变异和常见的微缺失或微重复^[14],但目前并没有充足的临床应用反馈数据。本研究中采用 NIPT 筛查出胎儿 12 号染色体短臂重复片段大小为 34.3 Mb,并通过 CNV-seq 证实与胎儿有创产前诊断结果相符,证明了 NIPT 对检测染色体大片段的重复有较高的灵敏度和特异性。

综上所述,PKS 是一种散发的罕见染色体疾病,

具有复杂的临床表现及特殊的遗传学特征,临床上往往容易漏诊,所以准确有效的产前诊断是避免缺陷患儿出生,减轻患儿家庭和社会负担的最佳手段。临床上,在产前发现羊水过多、先天性膈疝、过度发育的胎儿时应该高度警惕,同时建议孕妇完善产前诊断。此外,随着 NIPT 技术的飞速发展,相信其在产前检测领域将会做出更大的贡献。

参考文献

[1] IZUMI K, KRANTZ I D. Pallister-Killian syndrome[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2014, 166(4): 406-413.

[2] LEIGH S, RAMYA T, MICHELLE B, et al. Pallister-Killian syndrome in a two-year-old boy[J]. Clin Case Rep, 2017, 5(6): 774-777.

[3] AMERH S A, AUDREY P, MARIEN B D, et al. Postnatal clinical phenotype of five patients with Pallister-Killian syndrome (tetrasomy 12p): interest of array CGH for diagnosis and review of the literature[J]. Mol Genet Genom Med, 2019, 7(10): e00939.

[4] 符元春, 田艾军, 张军辉. Pallister-Killian 综合征产前超声表现 1 例[J]. 中华超声影像学杂志, 2014, 23(1): 85-87.

[5] BIRSEN K, HULYA K, ASADOLLAH G, et al. Pallister-Killian syndrome: clinical, cytogenetic and molecular findings in 15 cases[J]. Mol Cytogenet, 2018, 11(5): 45-49.

[6] LIN L, LINHUAN H, XUAN H, et al. Prenatal diagnosis of Pallister-Killian syndrome in one twin[J]. Clin Case Rep, 2018, 6(8): 1470-1473.

[7] CONLIN L K, KAUR M, IZUMI K, et al. Utility of SNP arrays in detecting, quantifying, and determining meiotic

origin of tetrasomy 12p in blood from individuals with Pallister-Killian syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2012, 158(12): 3046-3053.

[8] JAMUAR S, LAI A, UNGER S, et al. Clinical and radiological findings in Pallister-Killian syndrome[J]. Eur J Med Gen, 2012, 55(3): 167-172.

[9] MI-NA L, JIWON L, HEE J Y, et al. Using array-based comparative genomic hybridization to diagnose Pallister-Killian syndrome[J]. Ann Lab Med, 2017, 37(1): 66-70.

[10] WAPNER R J, BABIARZ J E, LEVY B, et al. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndrome[J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(3): e1-e9.

[11] GIAN C D R, JOSE L B, CATIA M B, et al. Expanding the indications for cell-free DNA in the maternal circulation: clinical considerations and implications[J]. Am J Obstet Gynecol, 2019, 220(6): 537-542.

[12] PETER B, ANTONI B, ROSSA W K, et al. Position statement from the chromosome abnormality screening committee on behalf of the board of the international society for prenatal diagnosis[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(8): 725-734.

[13] DESHENG L, DAVID S C, HU T, et al. Clinical utility of noninvasive prenatal screening for expanded chromosome disease syndromes[J]. Genet Med, 2019, 21(9): 1998-2006.

[14] LIANG D, PENG Y, LV W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(5): 519-526.

(收稿日期: 2019-07-18 修回日期: 2019-03-25)

(上接第 1511 页)

[6] LI W, LI H, ZHANG L, et al. Long non-coding RNA LINC00672 contributes to p53 protein-mediated gene suppression and promotes endometrial cancer chemosensitivity[J]. J Biol Chem, 2017, 292(14): 5801-5813.

[7] LIANG C, ZHUANG H, ZHOU Z, et al. SNHG3 promotes proliferation and invasion by regulating the miR-101/ZEB1 axis in breast cancer[J]. Rsc Advances, 2018, 8(27): 15229-15240.

[8] DIVINE L M, NGUYEN M R, MELLER E, et al. AXL modulates extracellular matrix protein expression and is essential for invasion and metastasis in endometrial cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77291-77305.

[9] 别延红, 李纳, 吴又明, 等. 转录因子增强子结合蛋白-4 基因沉默对子宫内膜癌细胞凋亡的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(2): 5-9.

[10] 郑国旭, 史圣甲, 魏铭, 等. E 盒锌指结合蛋白 1 基因沉默抑制结肠癌 HCT116 细胞增殖并促进其凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(4): 396-398.

[11] 沈晓萍, 王娟, 滕银成. EZH-2 在子宫内膜癌中的表达及其与肌层浸润的相关性研究[J]. 东南大学学报(医学

版), 2016, 35(2): 244-246.

[12] 陈丽娟, 石琦, 陈建琴, 等. 子宫内腺癌组织和血清中 E 盒结合锌指蛋白表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(1): 117-119.

[13] WU B Q, JIANG Y, ZHU F, et al. Long noncoding RNA PVT1 promotes EMT and cell proliferation and migration through down regulating p21 in pancreatic cancer cells[J]. Technol Cancer Res Treat, 2017, 16(6): 819-827.

[14] ZHU Y, SHEN J, GAO L, et al. Estrogen promotes fat mass and obesity-associated protein nuclear localization and enhances endometrial cancer cell proliferation via the mTOR signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 35(4): 2391-2397.

[15] 伍娇娇, 凌斌. E-cadherin 与上皮间质转化的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(12): 1996-1999.

[16] 高学忠, 袁惠玲, 吴丽华. 沉默 E 盒锌指结合蛋白 1 对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(22): 5541-5549.

(收稿日期: 2019-07-11 修回日期: 2020-04-19)