

荧光原位杂交技术在先天性心脏病产前诊断中的应用

赵 婧, 黄 湘, 李红艳, 梁少霞 (广东省中山市博爱医院产前诊断中心 528400)

【摘要】 目的 探讨采用荧光原位杂交技术(FISH)检查法对先天性心脏病胎儿进行染色体 22q11 微缺失产前诊断的临床应用。**方法** 应用常规染色体核型分析及 FISH 检查法,对 2012 年 3 月至 2014 年 10 月中山市博爱医院收治的 52 例疑似妊娠 22q11 微缺失胎儿的孕妇进行产前 22q11 微缺失检查并跟踪随访。**结果** 所有胎儿染色体核型分析均无异常,FISH 检查结果显示 3 例呈阳性。**结论** 染色体核型分析无法检测 22q11 微缺失综合征,因此对有 22q11 微缺失先天性心脏病风险的胎儿产前诊断应用 FISH 检查法,可提高检测的准确性。

【关键词】 22q11 微缺失; 荧光原位杂交技术; 先天性心脏病; 产前诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.23.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)23-3512-03

Application of FISH in the prenatal diagnosis of congenital heart disease ZHAO Jing, HUANG Xiang, LI Hong-yan, LIANG Shao-xia (Prenatal Diagnosis Center, Boai Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

【Abstract】 Objective To investigate the detection of 22q11 micro-deletion by FISH in the prenatal diagnosis of congenital heart disease. **Methods** 52 pregnant women admitted to Boai Hospital of Zhongshan City during March 2012 to October 2014 who were suspected pregnancy 22q11 micro-deletion fetuses were received conventional chromosome karyotyping and FISH test for prenatal diagnosis about 22q11 micro-deletion, then were followed up. **Results** None of the karyotype analysis results showed abnormal, while there were 3 positive cases tested by FISH. **Conclusion** Karyotype analysis cannot detect 22q11 micro-deletion syndrome, hence FISH should be used in the prenatal diagnosis for fetuses with the risk of congenital heart disease caused by 22q11 micro-deletion, which can improve the accuracy of detection.

【Key words】 22q11 micro-deletion; FISH; congenital heart disease; prenatal diagnosis

先天性心脏病(CHD)是一种严重影响人类健康的疾病,其病因复杂,治疗困难。我国每年大约有(10~15)万 CHD 患儿出生,患儿家庭和社会都承担着巨大的负担。CHD 主要是指胎儿在胚胎发育期心脏及周围血管组织发育异常造成的胎儿出生后心脏、血管功能结构的异常,是最常见的一种胎儿畸形,也是我国生育监测的主要病种之一^[1]。新生儿 CHD 患病率为 0.8%~1.0%,因为 CHD 治疗困难、新生儿手术的复杂和危险,使 CHD 病死率极高。有统计显示,死胎死产中有 1/5 是患有严重 CHD 的胎儿,而因先天性缺陷夭折的新生儿中严重 CHD 患儿占 1/3,儿童期死亡患儿超过半数是 CHD 患儿^[2]。作为一种先天畸形疾病,CHD 的发病原因复杂,目前研究主要与遗传、环境、遗传-环境因素共同作用有关^[3]。遗传因素主要体现为染色体异常,而 22q11 微缺失综合征是最常见的一种染色体异常,是比较常见的 CHD 病因。研究报道最多的心脏畸形,国内比例为 74%,美国该比例达 85%,一般是圆锥动脉干呈现畸形,表现为法洛四联征、主动脉中断、肺动脉闭锁、室间隔缺损等,前二者疾病的预后极差^[4]。对于 22q11 微缺失的检查,由于该缺失片段大小在 1.5~3.0 Mb,是比进行染色体核型分析时的分辨下限 5.0 Mb 还小的片段,因此通过常规的染色体核型分析产前诊断法无法检测出该疾病,需要引入分辨率更高的技术手段。本研究采用荧光原位杂交技术(FISH)检查法对 22q11 微缺失 CHD 胎儿进行产前诊断,FISH 检查法是将经荧光标记的特异性探针与相关染色体中 DNA 序列杂交,再通过荧光显微镜观察待检染色体是否存在

某些片段的缺失^[5]。该方法快速、准确、敏感性高、特异性强,是进行 22q11 微缺失检查的首选技术。本研究即对使用 FISH 检查法的 22q11 微缺失 CHD 胎儿的产前检查的临床应用进行探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 3 月至 2014 年 10 月本院收治的 52 例似妊娠 22q11 微缺失胎儿的孕期妇女作为研究对象,所有产妇的胎儿胎龄 3~8 个月不等,孕妇年龄 23~35 岁,平均 28.4 岁。研究对象包括 24 例曾生产或引产过一个 CHD 或面部畸形胎儿的孕妇,本次妊娠的彩色多普勒超声检测中未显示心脏畸形或面部畸形;23 例产前彩色多普勒超声检测显示胎儿有心脏畸形^[6];5 例超声检测怀疑胎儿有唇、腭裂。进一步研究前,所有病例及其家属均知晓研究内容,签署知情同意书,此研究获得了医院伦理委员会批准。

1.2 方法 进行羊水细胞的常规染色体核型分析及 FISH 检查^[7]。

1.2.1 羊水细胞获得 施行羊膜腔穿刺术以获得适量羊水细胞,用于实验室的染色体核型分析及 FISH 检查。采集羊水细胞前,产妇排净膀胱、仰卧位;事前经超声检查确定胎盘位置、羊水深度,便于穿刺部位的选择;穿刺时一手固定穿刺部位,一手准确将穿刺针垂直刺入宫腔,拔除针芯,见有清亮的淡黄色羊水溢出,使用注射器抽取 10 mL 羊水后再插入针芯、拔除穿刺针。将羊水存入无菌试管,送实验室培养以进行下一步检查;对产妇穿刺部位进行无菌敷料处理,观察半小时如无异常,

告知相关注意事项后即可离开。

1.2.2 常规染色体核型分析 22q11 微缺失综合征除了微片段缺失外,可能还伴有染色体异位,数目、形态异常(环形)等畸变。因此在进行 FISH 检查前常需通过常规染色体核型分析以排除可能的畸变。将所采集的羊水装于离心管中进行细胞接种培养;获得的细胞经固定、滴片、烤片制成标本,将染色体标本片放入所制备的胰蛋白酶溶液中,振荡 2、3 min 用生理盐水漂洗,经染色剂染色、冲洗、晒干后进行镜检,查看染色体带纹显现(显带)效果,可多做几次取得最满意效果;选择镜检中分散效果较好的核型为图像采集对象。

1.2.3 FISH 检查 将染色体核型分析余下的细胞悬液制成标本片备用。以北京金菩嘉公司的双色荧光 22q11 探针和相应试剂盒为检测工具,探针与变性后标本片的杂交结合位点为 TUPLE1;22q11;ARSA;22q13。二者的荧光信号分别为红色和绿色,是彼此的内对照探针,而 TUPLE1 与 ARSA 互为内对照基因。以荧光显微镜记录最终结果,通过 FISH 图像分析处理系统采集染色体核型与荧光信号。

1.3 判定标准 FISH 检查后进行镜检,随机选择 100 个左右中期分裂状态的细胞进行观察,细胞内有绿色荧光标记的是 22 号染色体,若 22 号染色体上还可可见 2 个红色荧光信号,说明 22q11 无缺失;若只见一个红色荧光信号,说明存在 22q11 微缺失。因此,判定结果为:若 90% 以上细胞内各有 2 个红、绿荧光信号(图 1),可判定为 FISH 检查呈阴性,胎儿不存在 22q11 缺失;若有 60% 分裂状态细胞出现 1 个红色荧光信号、2 个绿色荧光信号(图 2),可判定 FISH 检查呈阳性,胎儿存在 22q11 微缺失。

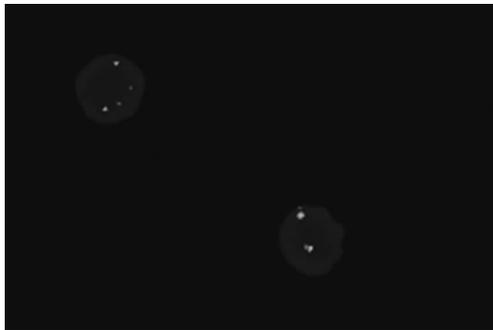


图 1 FISH 检查阴性结果



图 2 FISH 检查阳性结果

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对所得数据进行描述性统计学分析。

2 结 果

2.1 常规染色体核型分析结果 对所有产妇的羊水细胞进行常规染色体核型分析后显示未检测到染色体微缺失、核型分析

均无异常,可排除可能存在的染色体异位、数目异常等染色体畸变。

2.2 FISH 检查结果 24 例曾生产或引产过一个 CHD 或面部畸形胎儿的孕妇,本次妊娠的彩色多普勒超声检测中未显示异常;FISH 检查结果显示超过 90% 细胞内有 2 个红 2 个绿荧光信号,说明不存在 22q11 微缺失。23 例产前彩色多普勒超声检测显示胎儿有心脏畸形的孕妇,施行 FISH 检查的产前诊断,结果显示,20 例患者有 90% 细胞内呈现 2 个红 2 个绿荧光信号,说明不存在 22q11 微缺失,另 3 例有 60% 以上细胞呈现 1 红 2 个绿荧光信号,说明存在 22q11 微缺失;5 例超声检测怀疑胎儿有唇、腭裂的病例产前诊断 FISH 检测结果显示有 2 个红 2 个绿荧光信号,不存在 22q11 微缺失。得出 FISH 检查结果后,对于证实有 22q11 微缺失的阳性患者,孕妇及其家属同意进行引产手术,而其他患者出于个人考虑作出了活产与引产的决定,详细检查和随访结果见表 1。

表 1 52 例孕妇产前 FISH 检查及随访结果表(n)

临床指征	n	FISH 检查阳性	FISH 检查阴性	随访结果
本次妊娠超声检查无异常	24	0	24	活产 24 例
唇裂/腭裂	5	0	5	活产 2 例/引产 3 例
法洛三联征	3	0	3	引产 3 例
室间隔缺损	10	2	8	活产 6 例/引产 4 例
单心室	2	0	2	引产 2 例
肺动脉狭窄	2	0	2	活产 2 例
心内膜垫缺失	2	0	2	活产 2 例
左心发育不良综合征	2	1	1	引产 2 例
动脉导管未闭	2	0	2	引产 2 例

3 讨 论

CHD 是导致新生儿缺陷或死亡的主要原因,病因复杂。目前少数确证的病因之一认为它是一种多基因遗传病,是 22q11 微缺失综合征的主要表型^[8-9]。CHD 治疗困难,目前只能通过手术治疗,但花费巨大,为患儿带来身体的痛苦,更可能造成家庭严重的经济负担。因此,通过产前诊断筛选,确定胎儿是否患有 CHD,根据产前诊断结果对胎儿的预后进行更准确、合理评估十分重要。但以往检查方法中,若超声检查显示胎儿心脏有畸形或其他畸变,通常只进行常规的染色体核型分析,分析无异常便判定胎儿未患 CHD。胎儿出生后,进一步检查发现患有 22q11 微缺失综合征,该疾病会造成人体多个系统、器官的缺陷,包括 CHD、唇裂和腭裂、心胸发育不良、认知障碍、免疫力低下等^[10]。这显示了染色体核型分析法在 CHD 产前诊断上精确性不足的问题,因此目前普遍引进并采用分辨率、准确性更高,敏感度、特异性更强的 FISH 检查法进行 CHD 产前诊断^[11]。

22q11 微缺失是指 22 号染色体长臂 1 区 1 带 2 亚带内 22q11.21~22q11.23 这一固定区域的杂合性缺失,与 CHD 密切相关。22q11 微缺失综合征的新生儿患病率在 1/6 000~1/4 000 且不同性别患病率无显著差异,该综合征会导致多种生理缺陷,涉及多个重要脏器,包括心脏畸形、面部异常、唇裂和腭裂、胸腺发育不良等,且随着疾病进展,患儿的认知学习能力、精神状态、身体发育等都会出现异常或迟缓;临床表型主要

有 CHD、圆锥动脉干-面部异常综合征、腭-心-面综合征 (VCFS) 及迪格奥尔格综合征。现今仍没有关于遗传病的有效治疗手段,从优生优育角度出发,防止患重大先天性疾病患儿的出生是主要手段,而准确、有效的产前诊断是降低患病患儿出生率的重要方法。

目前研究指出 22q11 微缺失主要是由于染色体在减数分裂后期进行重组时出现了不对称等异常现象造成的,该微片段的缺失会造成新生儿多方面的身体缺陷,主要包括 DiGeorge 综合征、锥干型心脏畸形、VCFS 等,其他 22q11 缺失的表型还有低血钙症、免疫功能低下等。22q11 微缺失片段在 D22S427/1638 到 D22S306/308 区间内,片段大小 1.5~3.0 Mb,小于染色体核型分析的分辨率下限 5 Mb,因此需要分辨率更高的技术手段才能进行检测^[12]。FISH 检查法通过特异性探针与羊水细胞杂交,检测 TUPLE1 基因,可用于判定胎儿是否存在 22q11 微缺失,可为 22q11 微缺失 CHD 疑似胎儿的产前诊断提供更可靠的检测依据,为遗传咨询、优生优育提供参考,有利于下一步及时的临床干预和风险评估。

本研究中的 52 例孕妇羊水细胞的染色体核型分析均显示无异常,而 FISH 检查有 3 例呈阳性,阳性病例中有 2 例是室间隔缺损的指征,说明 22q11 微缺失可能与胎儿心脏室间隔缺损有较大相关性,最终阳性病例均选择了引产终止妊娠。另 20 例彩色多普勒超声显示胎儿有心脏畸形、22q11 微缺失高风险的病例最终 FISH 检测结果呈阴性,说明 CHD 是多基因遗传与环境因素共同作用的结果,未来还需对 CHD 的病因进行更深入的分析以指导诊断与治疗^[13]。目前对于患有 22q11 微缺失综合征新生儿的治疗方法有手术治疗心脏畸形,手术整形、矫正腭及面部异常,加强补钙治疗低血钙症,存在语言、认知、行动发育缓慢者,应及时进行早教干预加以控制,以期慢慢得到改善。

参考文献

[1] van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(21):2241-2247.

- [2] 郑莉娟,朱小梅,卢雪珍,等.先天性心脏病流行病学调查分析及干预对策[J].*中国妇幼保健*,2008,23(26):3754-3756.
- [3] 黄娟娟.先天性心脏病发生相关因素研究[D].郑州:郑州大学,2013.
- [4] McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome)[J]. *Medicine*,2011,90(1):1-18.
- [5] 辛毅,潘晓冬,刘晴,等.荧光原位杂交技术产前诊断先天性心脏病 22q11.2 微缺失应用价值[J].*心肺血管病杂志*,2012,41(3):236-240.
- [6] 王敏,邓伶兰.彩色多普勒超声心动图在小儿先天性心脏病诊断中的价值研究[J].*中国医药导刊*,2013,15(12):1978.
- [7] Lee MY, Won HS, Baek JW, et al. Variety of prenatally diagnosed congenital heart disease in 22q11.2 deletion syndrome[J]. *Obstet Gynecol Sci*,2014,57(1):11-16.
- [8] 孙晓燕,王云英,瓮占平,等. TUPLE1 基因缺失在先天性心脏病发病机制中作用的研究[J].*中国优生与遗传杂志*,2013,19(2):11-13.
- [9] Richards AA, Garg V. Genetics of congenital heart disease [J]. *Curr Cardio Rev*,2010,6(2):91-97.
- [10] 杨文娟,吴青青.胎儿畸形与 22q11 微缺失相关性的研究进展[J].*中国妇产科临床杂志*,2011,12(2):151-153.
- [11] 李胜利.胎儿先天性心脏病的筛查和诊断[J].*中国实用妇科与产科杂志*,2010,26(12):920-922.
- [12] 王凤羽,马林先,李聪敏,等.先天性心脏病患儿 22q11 微缺失的临床研究[J].*中国计划生育学杂志*,2012,21(2):109-113.
- [13] 刘珍,朱军.先天性心脏病的环境与遗传高危因素研究进展[J].*实用妇产科杂志*,2011,27(4):260-264.

(收稿日期:2015-04-02 修回日期:2015-06-29)

(上接第 3511 页)

- [6] Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, et al. Friedewald-estimated versus directly measured low-density lipoprotein cholesterol and treatment implications[J]. *J Am Coll Cardiol*,2013,62(8):732-739.
- [7] Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile[J]. *JAMA*,2013,310(19):2061-2068.
- [8] Lane DM. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP. III): A switch from dietary modification to risk factor assessment[J]. *Curr Opin Investig Drugs*,2001,2(9):1235-1236.
- [9] 武阳丰,赵冬,周北凡,等.中国成人血脂异常诊断和危险分层方案的研究[J].*中华心血管病杂志*,2007,35(5):428-433.
- [10] Meeusen JW, Lueke AJ, Jaffe AS, et al. Validation of a proposed novel equation for estimating LDL cholesterol

[J]. *Clin Chem*,2014,60(12):1519-1523.

- [11] Tsai CH, Wu HH, Weng SJ. Comparison of various formulae for estimating low-density lipoprotein cholesterol by a combination of ages and genders in Taiwanese adults [J]. *BMC Cardiovasc Disord*,2014,14(2):113-119.
- [12] Teerakanchana T, Puavilai W, Suriyaprom K, et al. Comparative study of LDL-cholesterol levels in Thai patients by the direct method and using the Friedewald formula [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*,2007,38(3):519-527.
- [13] 仲鹏,孙晓斐,丛培玲,等.瑞舒伐他汀对 LDL-C 轻度增高的高血压病患者动脉硬化的疗效观察[J].*济宁医学院学报*,2014,37(1):33-36.
- [14] 鄢盛恺.关于临床血脂测定的建议[J].*中华检验医学杂志*,2003,26(3):53-55.

(收稿日期:2015-03-17 修回日期:2015-06-28)