

- [5] 樊静媛,杨振.不同营养支持对 COPD 急性加重期合并 II 型呼吸衰竭患者的临床观察[J].重庆医学,2018,47(17):2372-2374.
- [6] 远青钊,罗琴,王在义,等.经鼻高流量加温湿化吸氧治疗在慢性阻塞性肺病合并呼吸衰竭患者中应用的疗效观察[J].新疆医科大学学报,2018,41(5):556-559.
- [7] 白春学,蔡柏蔷,宋元林.现代呼吸病学[M].上海:复旦大学出版社,2014:158-162.
- [8] 田建霞,陈晓香,王继莘,等. CAT 和 mMRC 评分指导治疗影响 COPD 稳定期患者预后的大样本临床研究[J].河北医药,2018,40(15):2288-2291.
- [9] 费建荣,朱佳威.活血祛瘀化痰法对慢性阻塞性肺疾病伴肺心病患者高凝血状态及心肺功能的影响[J].中国生化药物杂志,2017,37(6):129-130.
- [10] CHEN S J, YEH C M, CHAO T F, et al. The use of benzodiazepine receptor agonists and risk of respiratory failure in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide Population-Based Case-Control study[J]. Sleep, 2015, 38(7):1045-1050.
- [11] ROTTA A T, PIVA J P. Pediatric acute respiratory distress syndrome: much more than little acute respiratory distress syndrome[J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16(5):483-484.
- [12] 赵明丽,王玉忠,张露露. COPD 合并肺心病患者血清 hs-CRP、BNP 的含量及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(10):1670-1672.
- [13] 何六涛,陈华春,余旭舟,等.米力农注射液治疗肺心病合并呼吸衰竭患者的临床疗效[J].中国生化药物杂志, 2017, 37(2):264-266.
- [14] 游雯,宋阳春,傅锐,等.丹参川芎嗪注射液联合血塞通胶囊对肺心病患者血液黏稠度的影响[J].中国生化药物杂志, 2017, 37(4):131-133.
- [15] 柴晶晶,朱华栋,于学忠,等.慢性阻塞性肺疾病评估测试对 COPD 急性加重的有效性评估[J].中国急救医学, 2017, 37(2):158-163.
- [16] 陶小华.有创和无创正压通气对 COPD 急性加重并严重呼吸衰竭患者血浆脑钠肽水平的影响[J].中国老年学杂志, 2015, 35(4):973-974.
- [17] 窦培红.经鼻导管湿化高流量吸氧在呼吸衰竭患者中的应用[J].吉林医学, 2016, 37(9):2371-2372.
- [18] 张敏达,谢林花,朱冬梅,等.经鼻高流量湿化氧疗在 COPD 患者中的应用效果[J].中华现代护理杂志, 2018, 24(11):1335-1338.

(收稿日期:2019-02-19 修回日期:2019-05-06)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.027

全基因组低覆盖度测序结合传统细胞遗传学核型分析在罕见遗传病诊断中的应用*

罗华玉,龙若庭,赵理平,邱显荣,杨惠琼,肖鸽飞[△]

广东省珠海市妇幼保健院医学遗传研究所,广东珠海 519001

摘要:目的 对 1 例 NT 增厚的彩超异常胎儿进行遗传学分析及诊断,探讨多种检测方法的联合应用在遗传病检测中的实际意义。方法 采用全基因组低覆盖度测序(WGS)法检测胎儿染色体非整倍体及 100 kb 以上的拷贝数微缺失/微重复,同时用常规 G 显带法对羊水行胎儿脱落细胞染色体核型分析。结果 WGS 显示胎儿 4q 末端存在 34.16 Mb 的重复合并 18q 末端存在 19.97 Mb 的缺失,经结合 G 显带核型分析最终确定该胎儿核型为 46, XN, der(18)t(4;18)(q32.1;q21.3)。结论 应用 WGS 结合染色体 G 显带核型分析技术,确诊了 1 例 4q 部分三体合并 18q 部分单体衍生的不平衡重排染色体的彩超异常胎儿,证明合理运用细胞遗传学和分子遗传学检测方法有助于对染色体异常的遗传学变异病例进行明确诊断。

关键词:4q 部分三体; 18q 部分单体; 产前诊断; 核型分析; 全基因组低覆盖度测序

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)15-2199-04

4 号染色体(Chr 4)部分三体合并 18 号染色体(Chr 18)部分单体综合征是一种罕见的染色体异常。Chr 4q 部分三体综合征 1972 年由 SURANA 和 CONEN 首次报道,多数源于亲代染色体平衡易位携带者。根据 BORGAONKAR 等(1984 年)统计,携带者所孕患儿除大部分流产、死产外,出生的患儿的经验风险是(10.53±2.87)%,绝大部分病例为 4q25→

qter 片段的重复,并通常伴有其他染色体的部分单体^[1]。常规的 G 显带核型分析只能检测到 5 Mb 以上的染色体片段异常,较小的结构重排则需要分辨率更高的检测手段^[2]。本研究对 1 例 B 超显示颈项透明层厚度(NT)增厚的胎儿用常规 G 显带法对羊水行胎儿脱落细胞的染色体核型分析,同时采用全基因组低覆盖度测序(WGS)法检测胎儿染色体非整倍体及

* 基金项目:广东省珠海市科技计划项目(20191208E030013)。

[△] 通信作者, E-mail: xgf8111_cn@hotmail.com。

100 kb 以上的拷贝数微缺失/微重复,准确诊断出 1 例 Chr 4q 部分三体合并 Chr 18q 部分单体胎儿,指导临床对胎儿进行核型-表型的相关性分析,并为其再次妊娠提供指导方向。现就该病例的检测报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 珠海市妇幼保健院产前门诊常规产检某孕妇,29岁,体健,孕3产1,曾顺产一名健康女婴,现6岁。本次怀孕为自然妊娠,血清学唐氏筛查结果 21 三体(T21)为 1/4 348, T18 为 1/10 300,均为低风险。孕 13⁺2 周时 B 超显示胎儿 NT 为 3.2 mm,被建议进一步做产前诊断,遂于孕 19⁺5 周时抽取胎儿羊水细胞行 WGS 检测和染色体常规 G 显带核型分析。本研究得到医院伦理委员会批准和孕妇家属的知情同意。

1.2 检测方法

1.2.1 WGS 检测 由深圳华大基因公司采用该公司生产的磁珠法 DNA 提取试剂盒抽提羊水胎儿细胞 DNA,使用 BGISEQ-500 基因测序仪及配套试剂对胎儿 DNA 进行全基因组的低覆盖度测序,以检测胎儿染色体非整倍体异常、100 kb 以上的拷贝数微缺失/微重复。

1.2.2 染色体核型分析 使用 BIOAMFIM-2 公司生产的羊水培养基对胎儿羊水细胞进行培养,取中期染色体行常规 G 显带核型分析,经 Imager Z2 型号的蔡司染色体全自动核型分析仪采图,并通过终端 Ikaros 软件计数 30 个分裂象,分析 5 个核型,核型描述以《人类细胞遗传学国际命名体制》(ISCN2016)为标准。

2 结果

2.1 胎儿羊水细胞 WGS 结果 46, XN, dup(4q32.1q35.2). seq[GRCH37/hg19](156,749,582-190,910,498) × 3, 重复片段长约 34.16 Mb; 46, XN, del(18q21.32q23). seq[GRCH37/hg19](57,985,798-77,958,754) × 1, 缺失片段长约 19.97 Mb。提示该胎儿的 Chr 4q 末端有 3 copy 重复,合并 Chr 18q 末端 1 copy 缺失。

2.2 染色体核型分析结果 300~400 条带范围异常 Chr 18 带纹变化不明显,不易察觉(图 1),在接近 550 条带水平将同源染色体中的一条 Chr 18 号与另一条 Chr 18 相比较时可发现其中一条 Chr 18q 末端深带稍宽,推测可能有其他染色体片段易位至其末端所致(图 2)。经结合 WGS 和 G 显带核型分析的结果表明,胎儿携带 1 条由缺失长臂末端的 Chr 18 与 Chr 4 长臂末端重复部分相连接重排而产生的衍生染色体,最终确定胎儿核型为 46, XN, der(18) t(4;18)(q32.1;q21.3)。



图 1 胎儿染色体 G 显带核型图(300~400 条带)



图 2 胎儿染色体 G 显带核型图(400~550 条带)

3 讨论

Chr 4q 重复综合征患者临床特征多变,与 Chr 4q 重复片段的大小和特异性相关的单染色体有关。张艳亮等^[3]通过对目前世界上已报道的 32 例单纯 4q 部分三体病例进行总结发现,三体化区域越靠近着丝粒,患者的表型越轻微。最常见的临床特征包括生长迟缓、鼻柱高(宽)、耳低位(畸形)和内眦赘皮,颈短、小头畸形、内眦距过宽、人中短和癫痫等也较常见,拇指、心脏和肾脏异常很少见,且都存在智力低下,4q 三体化区域越大,智力低下越严重。本病例中 WGS 结果显示胎儿 4q32.1q35.2 重复区域的片段大小约 34.16 Mb,属于 4q 末端重复,该区域为已知致病区域,经查 OMIM 数据库 4q32.1q35.2 含有 GLRB、ETFDH、NEK1、HPGD、AGA、CYP4V2 等 60 多个致病基因,与遗传性感觉神经病变、小脑萎缩、淋巴管畸变、天冬氨酸葡萄糖尿症、小眼畸形或缺、耳肩胛臂的肌营养不良、先天性心脏病等有关^[4-7]。PET-RICZKO 等^[8]也曾报道一个 9 岁男孩被诊断为部分 3p 单体和部分 4q 三体,有智力障碍、畸形特征、共济失调等表现,家族史和医学评估显示,其父亲表现出相似的面部畸形特征、智力障碍、四肢瘫痪和进行性脑脊髓共济失调。先证者的染色体畸变遗传自父亲,父亲的染色体为 3p 和 4q 平衡易位,而父亲的异常染色体又遗传自祖父。根据细胞遗传学理论,这类染色体变异极有可能是亲代平衡易位的不平衡分离而导致的基因组失衡^[7]。本病例因这对夫妇拒绝继续做

外周血染色体的家系验证,而无法得知该变异是遗传自双亲还是新发。

Chr 18q 部分缺失综合征是由 18q 部分缺失所引起,包括单纯的缺失和不平衡异位所导致的缺失。因染色体缺失片段大小和位置的不同,临床表现高度变异,冯杰彬等^[9]通过染色体微阵列分析在 18q 上鉴定了 6.612~22.973 Mb 的致病性拷贝数变异,认为基因 NFATC1、GALR1、MBP、SALL3 和 TSHZ1 可能是先天性心脏病、精神运动发育迟缓、生长发育迟缓和腭裂的致病基因。WGS 显示本病例中胎儿缺失了 18q21.3q23 区域约 19.97 Mb 大小的片段,位于 Chr 18q 末端,涵盖在染色体 18q 缺失综合征区域内。据报道,染色体 18q22.3-q23 区域包含了 SALL3 和 TSHZ1 等关键基因,与唇腭裂表型有关^[10]。本病例中孕妇在孕早期即发现胎儿超声示 NT 增厚,当时尚未发现其他明显的指标异常。NT 增厚是产前出生缺陷二级防控的一个有效超声筛查指标,一般在孕 11~13⁺6 周超声检测,当 NT \geq 3.0 mm 时,胎儿 T21 检出率为 28%~100%,特异度为 48%~99%。它不仅对常见染色体非整倍体(T18、T21、T13)缺陷筛查是有效的,也可用于不常见染色体异常的筛查,同时提示胎儿可能存在其他结构畸形^[11]。

本病例分析所用到的实验室检测方法中,传统的细胞染色体 G 显带核型分析可从细胞水平上直观地评估病例是否携带异常染色体,是遗传病诊断中检测染色体异常的金标准,但此法因是通过肉眼观察来识别染色体变异,存在一定的主观性,对染色体的微缺失/微重复的分辨也不足,也不能精确定位变异染色体片段的来源和大小^[12]。而基于 DNA 分子水平的 WGS 检测拷贝数变异能对前法进行有效的补充,可精确检测变异染色体的断裂点位置、变异区域包括哪些基因、缺失/重复的区域拷贝数是多少等,从而可以初步评估该变异可能引起的临床症状有哪些,为疾病的诊断和预后的判断提供有力的科学依据。但此法也有一定的局限性,不能检测分辨率更小的染色体变异(如基因点突变等)、不能发现染色体平衡性重排、不能有效识别三倍体等染色体整倍变异等。所以,产前筛查指标异常者在行传统的细胞遗传学检测的同时应充分考虑不同方法的优缺点,结合分子遗传学检测手段,通过多种方法的联合应用,才能更加可靠地提高异常结果的诊断率,有效降低出生缺陷的发生。

值得注意的是,本病例在进行染色体核型分析时,由于异常的 Chr 18q 末端(18q21.3-qter)被 Chr 4q 末端(4q32.1-qter)所取代,虽然变异所涉及的片段已超过 10 Mb,但由于带纹的相似和位置的巧合,衍生的 Chr 18 在 G 显带 300~400 条带分辨率时并不易被识别。但在 G 显带接近 550 条带的分辨率时,经仔细比对可见衍生的 Chr 18q 末端深带稍宽,染色体的总长度也比另一条 Chr 18 略长,经结合 WGS 检测

结果判断,是胎儿 Chr 4q 末端的 34.16 Mb 重复易位至 Chr 18q 末端,同时在 Chr 18q 末端存在一段 19.97 Mb 的缺失。该病例提示,在做细胞遗传实际工作中,带纹的清晰与否及分辨率的高低会严重影响到检测结果的准确性。且染色体带纹正常与否需人工判读,同一核型有可能因阅片者经验和仔细程度不同而对结果的判断存在一定的差异。由此可见,在细胞遗传工作中提高 G 显带水平很有必要,或实施高分辨 G 显带技术也能有助于提高异常染色体的检出率,同时在细胞遗传的产前诊断工作中实行双人双线制片、阅片方式也势在必行。阅片过程应仔细辨认、认真比对、总结经验,以期从多个环节把关,防止对异常结果的漏检。

参考文献

- [1] 刘枚章. 临床遗传学彩色图谱[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:138.
- [2] 吴坚柱,谢英俊,林少宾,等. 一例 9p 部分单体合并 11q 部分三体的分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2015,32(1):69.
- [3] 张艳亮,戴勇,涂植光,等. 一例 4q 部分三体 10q 部分单体的分子细胞遗传分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2010,27(2):155-156.
- [4] STOREY E, BAHLO M, FAHEY M, et al. A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009, 80(4):408-411.
- [5] GORDON K, SCHULTE D, BRICE G, et al. Mutation in vascular endothelial growth factor-C, a ligand for vascular endothelial growth factor receptor-3, is associated with autosomal dominant Milroy-like primary lymphedema[J]. Circ Res, 2013, 112(6):956-960.
- [6] ALDAHMEH M A, MOHAMMED J Y, AL-HAZZAA S, et al. Homozygous null mutation in ODZ3 causes microphthalmia in humans[J]. Genet Med, 2012, 14(10):900-904.
- [7] 胡萍,杨琳,詹国栋,等. 新生儿 2q37 缺失伴 4q 部分三体全基因组拷贝数变异(CNVs)分析[J]. 复旦学报(医学版),2014,41(2):183-190.
- [8] PETRICKO E, BICZYNSKO-MOKOSA A, BOGDANOWICZ J, et al. Familial distal monosomy 3p26.3-pter with trisomy 4q32.2-qter, presenting with progressive ataxia, intellectual disability, and dysmorphic features[J]. Am J Med Genet A, 2012, 158A(6):1442-1446.
- [9] 冯杰彬,郝建锁,陈亦阳,等. 18q 缺失综合征患者的染色体微阵列分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2016,33(2):203-207.
- [10] DOSTAL A, NEMECKOVA J, GAILLYOVA R. The 18q deletion syndrome and analysis of the critical region for orofacial cleft at 18q22.3[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2009, 37(5):272-275.
- [11] 库扎克. 胎儿畸形超声图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:63-65.

[12] 罗华玉,肖奇志,苏文,等.1例18号染色体短臂部分四体胎儿的遗传学分析[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(5):731-734.

(收稿日期:2019-04-10 修回日期:2019-06-22)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.028

番禺地区 RhD 阴性孕妇基因分型对输血安全的影响及对策研究*

谢敬文¹,阮丽芬²,蓝文莉¹,马伟文¹

1. 广东省广州市番禺区中心血站,广东广州 511400;2. 广东省广州市番禺区中心医院,广东广州 511400

摘要:目的 对番禺地区 RhD 阴性的孕妇进行 RHD 基因分型以及产后追踪,为临床制订科学、合理的预防策略提供科学依据。方法 收集 2016 年 1 月至 2018 年 6 月番禺地区 RhD 阴性孕产妇标本 40 例,用间接抗人球蛋白试管法进行 RhD 阴性确认,用吸收放散试验进行放散 D 筛查,用 PCR-SSP 方法进行 RHD 基因分型。结果 经鉴定 40 例均为 RhD 阴性,吸收放散试验鉴定 9 例为放散 D 表型(Del),占比 22.5%。对 40 例标本进行基因分型检测,24 例为 RHD 基因全缺失型,占比 60.0%;9 例为 RHD1227A DEL 型,与血清学放散 D (Del)一致,占比 22.5%;5 例 RHD-CE(2-9)-D 型占比 12.5%;2 例 10 外显子全阳性,经进一步测序分析确定均为 RHD 711 del C 型,占比 5.0%。结论 该地区 RhD 阴性孕产妇中存在较高比例的 RHD1227A DEL(放散 D),临床医生适当结合吸收放散试验和基因分型结果,能更精准判断孕妇 RhD 血型,从而更加科学地制订产前抗-D 筛查和预防 RHD-HDN 发生的管理策略。

关键词:RhD 阴性; 孕妇; 产前筛查; 稀有血型; 基因分型; RHD 基因

中图分类号:R457.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)15-2202-03

RhD 血型的重要性仅次于 ABO 血型系统,在 Rh 血型系统中 D 抗原的临床意义最大。D 抗原在汉族人群中的占比很高,本地区约有 0.23% 的个体为 D 抗原阴性^[1]。汉族人群中的 RhD 阴性血型有着复杂而丰富的遗传多态性,D 抗原也存在多种变异体。D 抗原是由 RHD 基因编码 417 个氨基酸组成的糖蛋白,其中 RHD 1227A DEL 型具有完整的 RHD 基因。RhD 阴性个体在接受 D 抗原致敏后几乎不产生同种不规则抗-D^[2],因此这类孕妇可以不必进行频繁的抗-D 监测以及预防性注射 Rh 免疫球蛋白阻断母体产生抗-D。现将广州市番禺地区 RhD 阴性孕妇 RHD 基因分型研究分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2018 年 6 月在本地区中心医院等各级医院筛查 RhD 阴性的孕妇共 40 例(孕产史见表 1),留取 EDTA-K₂ 抗凝全血 5 mL 备用。同时对孕妇生产情况进行回访追踪调查分析。

表 1 40 例孕妇的历史怀孕、生产和基因分型分布情况(n)

项目	孕 0 产 0	孕 1 产 0	孕 1 产 1	孕 2 产 1	孕 2 产 2	孕 3 产 1	孕 5 产 1
未产生抗-D	15	3	12	4	1	2	1
产生抗-D	0	0	0	0	0	2	0
合计	15	3	12	4	1	4	1

1.2 仪器与试剂

1.2.1 设备 高速离心机(北京白洋离心机厂生产),低速离心机(北京医用离心机厂生产),涡旋振荡

器(其林贝尔公司生产),水浴箱(上海博讯公司生产),电泳仪(北京六一仪器厂生产),水平电泳槽(北京六一仪器厂生产),9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司生产),凝胶成像系统(珠海黑马公司生产)。

1.2.2 试剂 单克隆(IgM 型)抗-D(德国 Biotest 公司,生产批号:1029060/20181808),IgG 型抗-D 试剂(上海血液生物医药有限责任公司,生产批号:20160120/201710203),IgM/IgG 型抗-D(法国 DIA-GAST 公司,生产批号:BMJ1204D/BGM1604B),多特异性抗人球蛋白试剂(上海血液生物医药有限责任公司,生产批号:20160120/20175002),酸放散液(广州展全公司,生产批号:20160103/20170101)。电泳缓冲液(天津秀鹏生物技术开发有限公司,生产批号:20160105/201708011);琼脂糖(北京康为世纪公司,生产批号:06910K);血液基因组 DNA 提取试剂盒(天津秀鹏生物技术开发有限公司,生产批号:20160125/201708010);RH 基因变异体基因分型检测试剂盒(天津秀鹏生物技术开发有限公司,生产批号:201602100/201708010)。

1.3 方法

1.3.1 常规血清学方法鉴定 RhD 阴性(试管离心法) 取 3 种不同批号的 IgG 或 IgM+IgG 性质的抗-D 100 μL,分别与被检者 5%红细胞悬液 50 μL 混匀,使用 O 型 RhD 阴、阳性红细胞作为阴、阳性对照管,置 37 °C 水浴 60 min,再以大量生理盐水洗涤 3 次,去除上清液,分别向各管加入 100 μL 多特异性抗人球

* 基金项目:广东省广州市番禺区科技和信息化局 2017 年医疗卫生计划项目(2017-Z04-22)。