

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.06.019

C 显带和 N 显带技术在标记染色体和双着丝粒染色体辅助诊断中的应用*

徐玉婵, 韦德宁, 罗颖花, 韦朔峰, 蔡 稔, 唐 宁, 严提珍[△]

柳州市妇幼保健院/广西科技大学附属妇产医院、儿童医院医学遗传科/柳州市生殖与遗传研究所, 广西柳州 545001

摘要:目的 探讨 C 显带和 N 显带技术在标记染色体(mar)和双着丝粒染色体核型分析辅助诊断中的应用价值。方法 选取 2018 年 3 月至 2020 年 2 月于柳州市妇幼保健院进行外周血染色体核型分析的 19 560 例就诊者为研究对象,分析 C 显带和 N 显带技术辅助诊断染色体核型的价值。结果 19 560 例外周血染色体核型分析中,经 G 显带结合 C 显带和 N 显带检出的染色体多态共 199 例,检出率为 1.02%,其中涉及异染色质的有 142 例,占 71.36%,涉及核仁区变异的有 57 例,占 28.64%。检出 7 例 mar,其中有 5 例 N 显带见两端有随体,C 显带见深染或部分深染的异染色质。1 例智力低下的 6 岁患儿 N 显带未见随体,C 显带未见异染色质。检出 6 例双着丝粒染色体,就诊原因有不育、矮小症和发育迟缓。结论 C 显带和 N 显带技术除了辅助诊断染色体核型多态性以外,对双着丝粒染色体、mar 的分析也具有一定的意义。

关键词:染色体核型分析; C 显带; N 显带; 标记染色体; 双着丝粒染色体

中图分类号:R394.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)06-0793-04

C 显带技术由 ARRIGHI 和 HSU 于 1971 年发明,一般认为 C 显带深染的区域是结构异染色质区域,也就是 DNA 高度重复序列区域。人类近端着丝粒染色体(13、14、15、21 和 22 号染色体)的副缢痕处与核仁形成有关,故称为核仁形成区(NOR),用 N 显带技术(硝酸银染色法)可使染色体的随体及核仁组织区出现特异性的黑色银染物^[1]。目前,C 显带和 N 显带技术的相关研究很少,本实验室在工作中发现 C 显带和 N 显带技术除了辅助诊断染色体多态性以外,对双着丝粒染色体、标记染色体(mar)的分析也具有一定的意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 3 月至 2020 年 2 月于柳州市妇幼保健院进行外周血染色体核型分析的就诊者 19 560 例为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 取受试者外周血 2 mL,置于肝素抗凝的无菌真空采血管中,轻轻颠倒混匀后运送到实验室检测。

1.2.2 染色体核型分析(G 显带) 将外周血标本 0.5 mL 接种于淋巴细胞培养液,37 °C 培养 72 h 后进行常规染色体制备及 G 显带。计数 20 个中期分裂相细胞,分析 5 个及以上核型,当发现嵌合体或异常细胞时,再增加计数至 100 个中期分裂相细胞。必要时

采用 C 显带、N 显带进行辅助诊断。染色体核型描述采用人类细胞基因组学国际命名体系(ISCN)2016 年版的相关标准。

1.2.3 染色体分析(C 显带) 将制好的玻片置于 0.2 mol/L 氯化氢中,室温下处理 5 min,然后用 60 °C 蒸馏水冲净;浸入 60 °C 的 5%氢氧化钡液中 1~4 min,蒸馏水冲净;在 60 °C 的 2×SSC 液中处理 10 min,蒸馏水冲净;以稀释 10 倍的吉姆萨染液染色 5~10 min(37 °C),冲洗、晾干。

1.2.4 染色体分析(N 显带) 将制好的玻片置于干燥培养皿并放入 60 °C 水浴箱中,新鲜配制 0.1%甲酸 1 mL,加入 0.5 g 硝酸银,充分溶解后滴在覆盖了两层擦镜纸的玻片上,直至擦镜纸呈棕黄色,取走擦镜纸,将玻片冲洗后以吉姆萨染液染色 5~10 min(37 °C),冲洗、晾干。

1.3 统计学处理 采用 Excel2010 进行数据分析。

2 结果

2.1 C、N 显带技术对染色体多态性的检出情况 19 560 例外周血染色体核型分析中,经 G 显带结合 C 显带和 N 显带检出的染色体多态共 199 例,检出率为 1.02%;其中涉及异染色质的有 142 例,占 71.36%,涉及核仁区变异的有 57 例,占 28.64%。染色体多态检出的人群中以不孕不育、不良妊娠史、反复流产等原因就诊的有 126 例,占 63.32%,其中不孕不育为主

* 基金项目:广西壮族自治区柳州市科技重大专项(2018AF10501);广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20180044、Z20180041、Z20170534、Z20170529)。

[△] 通信作者,E-mail:439078813@qq.com。

本文引用格式:徐玉婵,韦德宁,罗颖花,等.C 显带和 N 显带技术在标记染色体和双着丝粒染色体辅助诊断中的应用[J]. 检验医学与临床,2021,18(6):793-796。

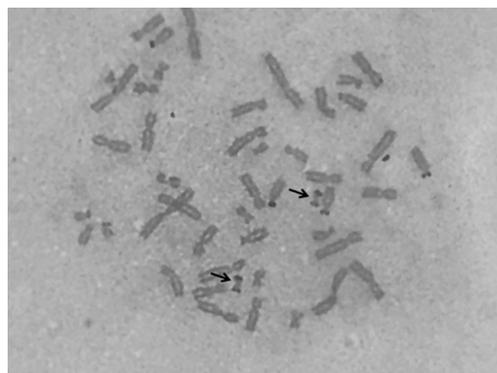
要就诊原因,占 51.59%(65/126),具体的染色体多态类型及构成比见表 1。

表 1 199 例外周血染色体多态类型和构成比

方法	类型	n	构成比(%)
C 显带	13ph	4	2.01
	14ph	7	3.52
	15ph	14	7.04
	21ph	6	3.02
	22ph	7	3.52
	1qh+	23	11.56
	9qh+	11	5.53
	16qh+	33	16.58
	inv(Y)	35	17.59
	Yqh-	2	1.01
	合计	142	71.36
N 显带	13pss	6	3.02
	14pss	6	3.02
	15pss	5	2.51
	21pss	25	12.56
	22pss	7	3.52
	21phpss	1	0.50
	14ps+	1	0.50
	Yqs	6	3.02
合计	57	28.64	

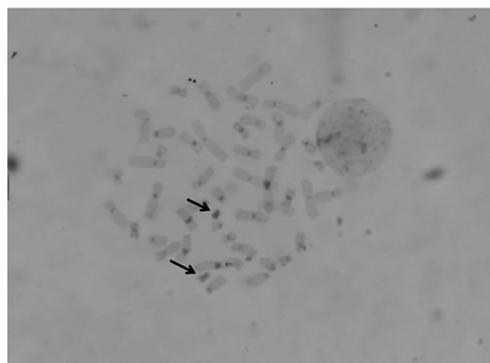
注:ph 表示短臂异染色质,qh+表示长臂次缢痕增加,qh-表示长臂异染色质减少,inv 表示倒位,pss 表示双随体,ps+表示随体增大,qs 表示长臂有随体。

2.2 C、N 显带技术对 mar 的辅助诊断意义 19 560 例外周血染色体核型分析中,检出 7 例 mar,进行 C、N 显带分析,发现其中有 5 例 N 显带见两端有随体,C 显带见深染或部分深染的异染色质。临床表现以不孕不育为主,3 例不育,2 例不孕,1 例发育迟缓。其中 1 例 36 岁的不孕女性染色体核型为 48,XX,+2mar,2 个形态相似的 mar N 显带见头尾两端均有随体(图 1),C 显带见深染的异染色质(图 2)。另有 1 例智力低下的 6 岁患儿染色体核型为 47,XX,+mar[26]/46,XX[81],其较低比例的嵌合型 mar N 显带未见随体,C 显带未见异染色质。



注:箭头所示的 2 个 mar 均有双随体。

图 1 染色体核型为 48,XX,+2mar 的不孕女性 N 显带图



注:箭头所示的 2 个 mar 均为深染的异染色质。

图 2 染色体核型为 48,XX,+2mar 的不孕女性 C 显带图

2.3 C 显带对双着丝粒染色体的辅助诊断意义 G 显带结合 C 显带确诊各类型双着丝粒染色体核型 6 例,其中 4 例涉及性染色体,2 例是等臂双着丝粒 Y 染色体和 45,X 细胞系的嵌合体。就诊原因中有 3 例矮小症,2 例不育,1 例发育迟缓。其中 1 例 4 岁女性患儿因矮小症就诊,染色体核型分析为等臂双着丝粒 X 染色体,经 C 显带发现其中 1 个着丝粒较松散,呈细线状,是没有活性的假着丝粒,核型为 46,X,psu idic(X)(p22.1)。另有 1 例 11 岁男性矮小症患儿染色体核型为等臂双着丝粒 Y 染色体,经 C 显带发现 2 个着丝粒较致密,均为有活性的真着丝粒,核型为 46,X, idic(Y)(p11.3)[88]/45,X[12]。

3 讨论

染色体多态性是指不同个体之间染色体结构和染色体着色强度存在恒定的细小差别,通常指 D、G 组染色体随体区变异(主要包括随体区增大、双随体)及 1、9、16 号染色体副缢痕增加或缺失等,传统观点认为上述变异不会引起表型效应,但也有不少学者认为染色体多态性降低了受精率和优质胚胎率,与男性无精、少精等生育异常密切相关,也是导致女性不良妊娠的重要因素^[2-4]。本研究中,染色体多态检出率为 1.02%,检出的人群以不孕不育、不良妊娠史、反复流产等原因就诊多见,又以不孕不育为主要就诊原因,占 51.59%。

mar 是指通过常规细胞遗传学显带技术可以辨认但无法确定其来源或特征的染色体。mar 的发生率在新生儿中为 0.044%,在不孕不育人群中为 0.125%,在发育迟缓患儿中为 0.288%^[5]。细胞遗传学中 C 显带和 N 显带技术与分子诊断技术相结合,可以对额外小标记染色体(sSMCs)的性质、来源和致病性进行明确诊断^[6]。据文献报道,来源于常染色体的 mar 约 80%为 D、G 组染色体,30%~50%为 15 号染色体重复片段^[5,7]。家族遗传性和由异染色质组成的 mar 临床表型正常,而新发的包含常染色质的 mar 常导致异常临床表型。人类的近端着丝粒染色体(D、G 组)短臂细长易断裂,断裂重接后没有与原来的染色体长臂连接,而是两端着丝粒的短臂连接,最终形成

具有双随体的 mar, 由于其断裂处靠近着丝粒, 具有着丝粒功能, 所以可随细胞分裂而稳定的向子代传递。近端着丝粒染色体的短臂暂未发现有致病基因, 所以这类 mar 一般认为其临床表型是正常的^[8]。杨兰等^[9]对携带 sSMCs 的 26 例患者进行 C、N 显带分析, 发现 17 例含有随体片段, 2 例含有异染色质片段, 1 例同时含有随体和异染色质片段, 5 例 sSMCs 可能是常染色质来源。席惠等^[10]通过联合运用多种技术鉴别 4 例胎儿新发 mar, 其中 C 显带示 2 例为异染色质结构, 胎儿出生后生长发育均在正常范围内; 2 例为非异染色质结构, 进一步行单核苷酸多态芯片检测, 结果示 1 例未见致病性改变, 1 例为 4 号染色体部分重复。本研究发现的 7 例 mar 中, 有 5 例 N 显带见两端有随体, C 显带见深染或部分深染的异染色质, 临床表型主要为不孕不育。另有 1 例 6 岁患儿虽为较低比例的嵌合型 mar, 却表现为智力低下, 其 N 显带未见随体, C 显带未见异染色质。由于经济原因, 该患儿并未进一步行染色体微阵列分析(CMA)或基因组拷贝数变异测序(CNV-seq)等分子诊断技术来鉴别 mar 的来源和致病性。

双着丝粒染色体是由两条非同源或同源染色体发生一次末端缺失后, 两段具有着丝粒的片段重接形成, 如果是两条同源染色体片段断裂重接, 两臂成镜像关系, 则称为等臂双着丝粒染色体, 其在健康人群中非常少见, 多见于经染色体断裂剂处理、白血病及骨髓增生异常患者的骨髓染色体核型^[11-13]。少数双着丝粒染色体中的 1 个着丝粒失活, 仅存在 1 个具有功能活性的着丝粒, 且具有稳定的结构^[14], 称为假双着丝粒染色体。鉴别双着丝粒染色体的两个着丝粒是否都具有活性, 即判断双着丝粒的真假性, 可初步从 G 显带结果判断, 一般有活性的着丝粒比较致密, 有明显的缩窄, 无活性的着丝粒较疏松, 缩窄不明显, 当 G 显带不明显无法鉴别时可借助 C 显带。本研究中, 1 例 4 岁女性患儿因矮小症就诊, 染色体核型分析 G 显带为等臂双着丝粒 X 染色体, 经 C 显带发现其中 1 个着丝粒较松散, 呈细线状, 是没有活性的假着丝粒。双着丝粒染色体在细胞分裂时是不稳定的, 因此可形成不同类型的细胞系, 且多为与 45, X 细胞系的嵌合体。严芳等^[15]发现, 6 例性别混乱患者染色体核型均为等臂双着丝粒 Y 染色体, 其中 5 例与 45, X 细胞系嵌合, 且 Y 染色体断裂点的不同及 45, X 在细胞系中所占比例的差异导致表型的不同。本研究发现, 6 例双着丝粒染色体中有 4 例涉及性染色体, 有 2 例是等臂双着丝粒 Y 染色体和 45, X 细胞系的嵌合体, 临床表现为矮小症、不育和发育迟缓。

综上所述, C 显带和 N 显带技术较常用于随体区变异、异染色质长度变化及有无等染色体多态性的鉴别。本研究发现, C 显带和 N 显带在 mar 的来源及致病性的初步判断上具有一定意义, 如 N 显带见两端有

随体, C 显带见深染的异染色质, 极有可能来源于 D、G 组染色体短臂的断裂重接, 通常无临床表型; 如 N 显带未见随体, C 显带未见异染色质, 致病的可能性大, 需进一步行 CMA、CNV-seq 等分子诊断技术鉴别其来源和致病性。C 显带在鉴别双着丝粒染色体的真假性上也有一定价值, 假性、无活性的着丝粒其 C 显带较松散, 呈细线状。此外, 对于涉及随体、异染色质的复杂染色体核型鉴定, 亦可通过 C 显带和 N 显带技术进行辅助诊断。因此, 对于一些传统的细胞遗传学技术, 在临床工作中应积极总结经验, 挖掘其多方面的临床应用价值。

参考文献

- [1] 曾艳, 张建军. 改良 N 显带法的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(11): 56-60.
- [2] 段如冰, 梁晓东, 戢开丽, 等. 染色体多态性对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局影响的 Meta 分析[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5): 45-51.
- [3] 宋旭梅, 王贵杰, 随瑞芝, 等. 男性生育异常与染色体多态相关性分析[J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(5): 457-461.
- [4] 王贤群, 吴森星, 宗劲, 等. 染色体多态性与女性不良妊娠结局关系探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(3): 303-304.
- [5] 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.
- [6] 佟玉龙, 潘虹, 卫凯平, 等. 20 486 例产前诊断样本中额外小标记染色体的核型结果分析[J]. 中华围产医学杂志, 2019, 22(5): 303-309.
- [7] 吴晓鸣, 朱燕, 严芳, 等. 2 例胎儿 15 号额外标记染色体产前遗传学分析[J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(5): 329-332.
- [8] 苏景玉, 郑海洋, 费冬梅, 等. 标记染色体的诊断与遗传咨询[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(5): 60-61.
- [9] 杨兰, 张晓, 林娟, 等. 额外小标记染色体的遗传学检测和临床效应分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(10): 1047-1050.
- [10] 席惠, 王华, 贾政军, 等. 联合运用多种技术鉴别四例胎儿新发标记染色体[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(10): 25-27.
- [11] PUTRA M, SURTI U, HU J, et al. Beyond down syndrome phenotype: paternally derived isodicentric chromosome 21 with partial monosomy 21q22. 3[J]. Am J Med Genet A, 2017, 173(12): 3153-3157.
- [12] SAROVA I, BREZINOVA J, ZEMANOVA Z, et al. High frequency of dicentric chromosomes detected by multi-centromeric FISH in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype[J]. Leuk Res, 2018, 68: 85-89.
- [13] 李能干, 史克倩, 刘恒涛, 等. 核型分析与 FISH 技术诊断成人 B 细胞急性淋巴细胞白血病等臂双着丝粒费城染色

体[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2018, 27(1): 47-52.

[14] 韦小妮, 严提珍, 罗颖花, 等. 非罗伯逊易位型的双着丝粒染色体的表型与分子、细胞遗传学分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(6): 41-44.

[15] 严芳, 张智, 李亚红, 等. 等臂双着丝粒 Y 染色体的细胞遗传学相关研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(10): 51-53.

(收稿日期: 2020-07-13 修回日期: 2020-11-28)

· 临床探讨 · DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.06.020

COPD 合并 2 型糖尿病患者血清及呼出气冷凝液中 hs-CRP、IL-6 的水平变化及临床意义*

何海艳, 吴丹丹, 朱曼旎, 马航, 吕学东[△]

南通大学第二附属医院呼吸内科, 江苏南通 226001

摘要:目的 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并 2 型糖尿病(T2DM)患者血清及呼出气冷凝液(EBC)中超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和白细胞介素-6(IL-6)的水平变化及临床意义。方法 选取 2018 年 1 月至 2019 年 3 月在该院呼吸与危重症医学科门诊就诊的稳定期 COPD 患者, 按照是否合并 T2DM 分为 COPD 合并 T2DM 组(33 例)和单纯 COPD 组(31 例)。比较两组 COPD 病情、肺功能、血气分析指标, 以及血清及 EBC 中 hs-CRP、IL-6 水平。结果 单纯 COPD 组合并肺动脉高压、1 年内急性加重的人数比例低于 COPD 合并 T2DM 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与单纯 COPD 组比较, COPD 合并 T2DM 组第 1 秒用力呼气容积、用力肺活量水平均明显下降, 血清及 EBC 中 hs-CRP、IL-6 水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组动脉血氧分压、动脉血二氧化碳分压水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 炎性反应在 COPD 合并 T2DM 中起重要作用。COPD 合并 T2DM 患者肺功能下降更明显, 更易合并肺动脉高压, 病情急性加重也更频繁。

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 2 型糖尿病; 超敏 C 反应蛋白; 白细胞介素-6; 呼出气冷凝液

中图分类号:R563.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)06-0796-04

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种严重危害人类健康的疾病, 其特征是持续性气流受限, 病因与气道及肺部对有害气体和颗粒产生的异常炎症反应有关。除了肺功能异常外, COPD 还可累及多种肺外器官和组织^[1]。糖尿病是 COPD 最常见的合并症, 和 COPD 的不良预后密切相关。研究发现, 与未合并糖尿病的 COPD 患者相比, 合并糖尿病的患者 2 年死亡风险明显升高^[2]。本研究通过观察 COPD 合并 2 型糖尿病(T2DM)患者的临床特征、肺功能, 以及血清、呼出气冷凝液(EBC)中超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和白细胞介素-6(IL-6)的水平变化, 探讨炎性反应在 COPD 合并 T2DM 患者中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2019 年 3 月在本院呼吸与危重症医学科门诊就诊的稳定期 COPD 患者 64 例为研究对象。按照是否合并 T2DM 分为 COPD 合并 T2DM 组和单纯 COPD 组。COPD 合并 T2DM 组 33 例, 其中男 18 例, 女 15 例; 平均年龄(69.0±6.3)岁; 病程(16.3±5.5)年。单纯 COPD 组

31 例, 其中男 17 例, 女 14 例; 平均年龄(69.6±5.1)岁; 病程(15.1±5.8)年。纳入标准: COPD 与 T2DM 均符合相关诊断标准; 年龄>18 岁。排除标准: 近期使用过糖皮质激素或抗菌药物; 合并其他肺部疾病、严重肝肾功能不全、感染性疾病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤及血液系统疾病等。两组年龄、性别、病程等一般资料比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。所有患者均签署知情同意书。本研究经本院医学伦理委员会批准通过。

1.2 方法

1.2.1 肺功能及血气分析指标检测 采用肺功能仪检测第 1 秒用力呼气容积(FEV1)、用力肺活量(FVC)。抽取桡动脉血 3 mL, 用血气分析仪检测动脉血氧分压(PaO₂)和动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)水平。

1.2.2 心脏彩超检查 采用彩色多普勒超声诊断仪检测三尖瓣最大返流速度(V), 根据简化伯努利公式计算肺动脉收缩压(PASP)=4V²+右心房压。右心房增大时 PASP=4V²+10, 右心房无增大时 PASP=4V²+

* 基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20180267)。

[△] 通信作者, E-mail: xuedonglv@126.com。