

联合运用多种技术鉴别 3 例罕见嵌合型 22-三体

胡晶晶 蔡婵慧 黎凤珍 兰菲菲

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 初步探讨嵌合型 22-三体胎儿的临床特征。**方法** 回顾性分析 2017 年 1 月至 2018 年 11 月在本院医学遗传中心确诊的 3 例嵌合型 22-三体胎儿的产前诊断结果和妊娠结局。**结果** 3 例胎儿羊水染色体 G 显带分析结果中有 2 例是嵌合型 22-三体, 1 例是正常核型结果 46,XX; 3 例胎儿羊水荧光原位杂交检测结果中, 1 例未做荧光原位杂交检测, 1 例结果提示胎儿为 22-三体嵌合体, 1 例结果提示胎儿 22 号染色体数目正常; 3 例胎儿羊水染色体微阵列分析结果中, 1 例结果提示胎儿 22 号染色体存在拷贝数中性的杂合性丢失, 2 例结果提示 2 个胎儿均为 22-三体嵌合体。**结论** 嵌合型 22-三体胎儿的临床特征缺乏特异性, 使用单一的方法进行检测有可能发生漏诊, 对于产前筛查怀疑是 22-三体的胎儿应进行多种方法同时检测, 对于产前诊断确诊为嵌合型 22-三体的胎儿, 应对胎儿预后进行多学科会诊评估。

【关键词】 嵌合型 22-三体; 染色体核型; 染色体微阵列; 荧光原位杂交; 产前诊断

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To explore the clinical application of cytogenetic techniques combined with chromosomal microarray and fluorescence in situ hybridization in the prenatal diagnosis of mosaic trisomy 22 fetal. **Methods** Retrospective analysis the prenatal diagnosis results and pregnancy outcomes of 3 mosaic trisomy 22 fetus diagnosed by the Medical Genetics Center of Guangdong Women and Children Hospital from January 2017 to November 2018. **Results** Among the 3 amniotic fluid karyotyping results, 2 cases were mosaic trisomy 22, and 1 case was normal karyotype 46,XX. Among the 3 amniotic fluid fluorescence in situ hybridization test results, 1 case did not undergo the FISH test, 1 case indicated that the fetus was mosaic trisomy 22, and 1 case indicated that the number of chromosome 22 was normal. Among the analysis results of amniotic fluid chromosomal microarray in 3 fetuses, the results of 1 case indicated that cnLOH was present on chromosome 22, and the results of 2 cases indicated that both fetuses were mosaic Trisomy 22. **Conclusions** The clinical characteristics of mosaic trisomy 22 fetus are lack of specificity, detection using a single method may lead to missed diagnosis, multiple methods should be used to detect the fetus that is suspected to be a mosaic trisomy 22 fetus in prenatal screening, and multi-disciplinary team consultation and evaluation should be conducted on the prognosis of the fetus that is confirmed to be a mosaic trisomy 22 fetus in prenatal diagnosis.

【Key words】 mosaic trisomy 22; karyotype; chromosomal microarray; fluorescence in situ hybridization; prenatal diagnosis

在人类常染色体非整倍体数目异常中 22-三体是比较罕见的, 其在新生儿中的发生率大约是

1/30 000~1/50 000^[1], 同时, 22-三体在自然流产物中却非常常见。据报道, 自然流产物因染色体非整倍体数目异常导致流产的原因中 22-三体是第二常见的, 仅次于 16-三体, 其发生率约为 1/2800。该流

行病学数据表明 22-三体胎儿绝大部分会在孕早期流产或者胎死宫内,能够存活到孕中期之后的胎儿,很多是嵌合型 22-三体胎儿。嵌合体在产前诊断领域中是经常遇到的难点,其主要难在对嵌合体结果的正确解读和遗传咨询。随着分子技术的不断发展,对于染色体嵌合体的分子检测方法也越来越多,包括荧光定量 PCR 技术、荧光原位杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)、染色体微阵列技术(chromosomal microarray analysis, CMA)等。本研究旨在总结本中心近两年遇到的嵌合型 22-三体胎儿的产前诊断结果进行回顾性分析,以探讨各种检测技术在这类胎儿产前诊断中的应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象 2017年1月至2018年11月在本院医学遗传中心进行介入性产前诊断(经腹羊膜腔穿刺)后诊断为嵌合型 22-三体的胎儿 3 例。孕妇年龄分别为 37 岁、36 岁和 25 岁,平均年龄 32.7 岁。穿刺时的孕周依据孕早期 B 超估算,3 例孕妇穿刺时是孕周分别为 20⁺, 20⁺ 和 18⁺ 周。

1.2 方法

1.2.1 染色体 G 显带分析 将在 B 超引导下将穿刺获得的 10 ml 羊水分别接种到 2 个原位培养瓶和 2 个直径 60 mm 圆形培养皿中进行原位培养,培养 7 天后换液。观察 2 个原位培养瓶中细胞克隆达到 15 个以上后开始收获。经吉姆萨染色制片后,在显微镜下计数分析所有克隆,每个克隆分析至少 2 个核型。如果 2 个原位培养瓶中的分析发现有嵌合,则将 2 个圆形培养皿中贴壁的羊水细胞经 0.25% EDTA-Typsin 消化后按常规方法制备染色,以增加计数分析。结果依据人类细胞基因组学国际命名体系(ISCN 2013)对染色体核型进行命名。

对于羊水细胞中染色体核型真假嵌合体的判断依据分为 3 个等级。Ⅰ级:单个培养物中单个克隆有一个异常细胞的嵌合体;Ⅱ级:同一克隆中发现 2 个以上的细胞有相同的染色体异常或者相同的染色体异常在同一培养物中发现 2 个以上的克隆,但是在其他独立培养物中未见相同的染色体异常;Ⅲ级:2 个或以上的独立培养物中发现 2 个或 2 个以上的

相同染色体异常的细胞。

1.2.2 荧光原位杂交检测 在 B 超引导下将穿刺获得 2 管各 5 ml 的羊水分别接种 2 个 60 mm 圆形培养皿中进行培养,培养 7 天后换液并收集上清。待细胞长至整个培养皿大约 2/3 面积后,用 3 ml 0.25% EDTA-Typsin 37 °C 消化 5 min,加入 3 ml 培养基中和胰酶,并用吸管轻轻吹打细胞后收集上清,1500 rpm 离心 5 min,去上清。加入 0.06 M KCl 溶液 5 ml,37 °C 水浴 10 min。加入 2 ml 卡氏固定液(3:1 的甲醇:冰醋酸)固定 5 min,1500 rpm 离心 5 min 后去上清。加入 5 ml 卡氏固定液固定 5 min。放入冰箱冷藏 10 min 后 1500 rpm 离心 5 min,去上清并滴片,每份样本滴 2 张玻片,每张玻片滴 2 滴。将制备的玻片放入 60 °C 烤箱 2 h。从冷冻冰箱中拿出探针(美国雅培 LSI22 BCR 基因探针),在每一滴细胞区域加入 2.5 μl 探针,盖上 12 mm 圆形盖玻片并用封片胶封片,然后将玻片置入杂交仪(美国雅培 ThermoBrite 原位杂交仪)进行变性杂交。杂交完成后取出玻片并去除盖玻片,依次放入 75 °C 洗液 I (0.4×SSC/0.3% NP-40) 2 min,洗液 II (2×SSC/0.1% NP-40) 30 s, 75% 乙醇 2 min。待玻片干燥后加入 DAPI II 复染液(美国雅培)5 μl,盖上方形盖玻片。用 ZEISS Imager. A1 荧光显微镜(德国 ZEISS)观察细胞,用 Isis FISH imaging system 软件采集并分析图像。

结果的判读:每例样本计数 100 个细胞,其中若异常细胞比例大于 10% 则提示该指标阳性;若正常细胞的比例 ≥90%,异常细胞的比例 <10%,则提示该指标无异常;异常细胞的比例介于 10%~60% 之间者则提示为嵌合^[2]。

1.2.3 染色体微阵列分析 将在 B 超引导下将穿刺获得的羊水(10ml),用于提取基因组 DNA,使用美国 Affymatrix 公司的 CytoScan 750k 芯片按照该公司提供的标准化操作流程完成全部检测(包括 DNA 的提取、酶切、连接、PCR、PCR 产物纯化、定量、片段化、标记、杂交、洗涤、染色和扫描),得到数据后经 ChAS3.1.0.15 软件进行结果分析,最终结果判读参照 OMIM、UCSC、ISCA、DGV、DECIPHER 等数据库。

2 结果

2.1 染色体G显带分析结果 3例胎儿羊水染色体G显带分析结果中有病例1和病例2是嵌合型22-三体结果,嵌合比例分别为6.7%和10%,且均为Ⅲ级嵌合体,即真性嵌合体。另外1例是正常核型结果46,XX。具体结果见表1。

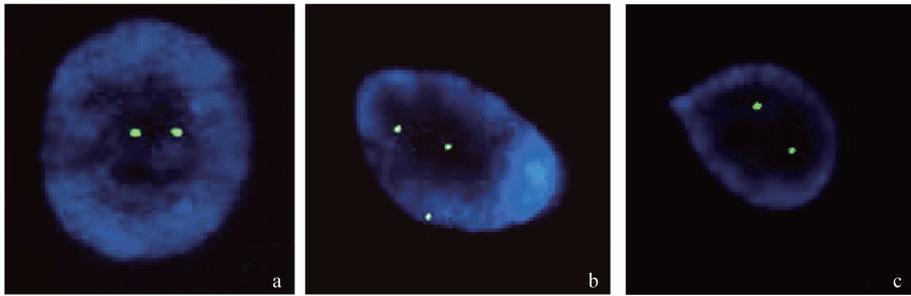


图1 病例2和病例3的FISH结果图

a. 病例2的2个22号染色体BCR基因信号;b. 病例2的3个22号染色体BCR基因信号;
c. 病例3的2个22号染色体BCR基因信号

2.3 染色体微阵列分析 3例胎儿羊水染色体微阵列分析结果中,病例1的染色体微阵列结果为 arr[hg19] 22q12.3q13.33(37,439,032-51,157,531) × 2hmz,提示胎儿22号染色体22q12.3-q13.33区域存在拷贝数中性的杂合性丢失现象(copy-neutral

2.2 荧光原位杂交检测结果 3例胎儿羊水荧光原位杂交检测结果中,病例1未做荧光原位杂交检测,病例2荧光原位杂交检测结果为 nuc ish(BCR×1)(15/100),提示胎儿为22三体嵌合体,病例3荧光原位杂交检测结果为 nucish(BCR×2),提示胎儿22号染色体数目正常。具体结果见表1,病例2和病例3的FISH结果图见图1。

loss of heterozygosity, cnLOH),区域大小约13.7Mb。病例2的染色体微阵列结果为 arr(22) × 2-3,提示胎儿为22号染色体的三体嵌合体。病例3的染色体微阵列结果为 arr(22) × 2-3,提示胎儿为22号染色体的三体嵌合体。具体结果见表1。

表1 3个病例的产前诊断结果和妊娠结局

病例编号	孕妇年龄(岁)	孕周(周)	B超	NIPT	核型结果	核型嵌合比例(%)	CMA结果	CMA嵌合比例	FISH结果	妊娠结局
1	37	20 ⁺	胎儿室缺,永存左上腔静脉,右锁骨下动脉迷走	—	mos 47,XX,+22[3]/46,xx[42]	6.7	arr[hg19] 22q12.3q13.33(37,439,032-51,157,531) × 2hmz	—	—	孕25 ⁺ 周胎死宫内
2	36	20 ⁺	N	提示22号染色体数目偏多	mos 47,XY,+22[2]/46,xy[18]	10	arr(22) × 2-3	10%	nuc ish(LSI22 × 1)(15/100)	孕34 ⁺ 周早产2kg男婴,发育情况正常
3	25	18 ⁺	N	提示22号染色体数目偏多	46,XX	—	arr(22) × 2-3	25%	nuc ish(LSI22 × 2)	继续妊娠

注:“—”表示未做该项检测或者无此项结果;“N”表示结果正常

3 讨论

胎儿三体的发生超过90%的原因是因为父母双方的配子形成、发育异常而导致,这种异常大多数是卵母细胞减数分裂的错误而导致的。胎儿三体的

发生也有小部分原因是在受精卵第一次有丝分裂的时候发生^[3]。母亲高龄目前也是公认的一个重要因素,主要因为高龄母亲的卵子会发生老化。有报道显示35岁以上的女性发生染色体非整倍体异常的风险明显高于低于35岁的女性^[4]。

本文中的病例1和病例2的孕妇也均是高龄母亲,而且两例胎儿的羊水细胞染色体核型结果均是Ⅲ级嵌合体。一般认为Ⅰ级嵌合为假性嵌合,没有临床意义;Ⅱ级嵌合通常是假性嵌合或者是因体外培养造成的嵌合,但是也有 $<1\%$ 的可能是真性嵌合;Ⅲ级嵌合一般认为才是真性嵌合。据报道,羊水中发生真性嵌合的几率大概是 $0.2\% \sim 0.5\%$ ^[5]。而嵌合体发生的机制主要包括:①不分离(non-disjunction);②后期延滞(anaphase lagging);③内复制(endoreplication);④胎儿发生自救后出现的单亲二倍体的产生^[6]。嵌合细胞中正常细胞系和异常细胞系的分布主要依赖于异常有丝分裂细胞发生的时间和部位。如果嵌合发生得较早,发生在胎儿和胎盘未分离之前,则嵌合会在胎儿和胎盘中同时存在;如果嵌合发生得较晚,发生在胎儿和胎盘分离之后,则嵌合就会局限在胎儿和胎盘之中的一个^[7]。

目前,纯合22-三体综合征病例的报道只有几十例,因为绝大多数纯合22-三体的胎儿会早期自然流产或者胎死宫内,虽然有极少数的22-三体新生儿出生,但是其生命也很短暂。从已报道的资料来看,22-三体胎儿并没有特异性的临床特征。Schwendemann等^[8]总结了9例纯合22-三体胎儿孕11~20周的B超特征,发现55%的22-三体胎儿会出现羊水过少,三分之一胎儿有NT增厚和宫内生长受限,其他少见的B超特征有淋巴水囊瘤、单侧肾积水、膀胱缺如等。Stressig R等^[9]总结的22-三体胎儿的B超声特征包括宫内生长受限、肢体发育不良、颜面部畸形(小颌畸形、小头畸形、唇腭裂等)、先天性心脏病等。本文中,只有病例1的B超有先天性心脏病的表现。病例2和病例3的B超结果未见明显异常,究其原因,可能有以下几点:①低比例嵌合;②嵌合细胞受累组织少;③检测结果是假阳性结果,特别是CMA结果,一般认为CMA技术对于嵌合体的检测结果只有异常细胞的比例大于等于30%时才是比较可靠的^[10]。

从已出生的22-三体个体报道资料来看,大部分患者都是嵌合体,其临床表现严重程度跟受累组织嵌合度没有关系,而且大部分有明显的生长发育迟缓和智力低下。即使有少部分智力正常患儿,但

这部分患儿大多也是有其他身体缺陷,如:先天性心脏病,耳聋,视力缺陷等^[11]。

本文中病例1在进行介入性羊水穿刺后,胎儿于孕25⁺周出现胎死宫内;病例2和病例3在拿到介入性产前诊断结果后进行了多学科会诊,孕妇及家属在得知胎儿的可能预后并经过慎重考虑后均选择继续妊娠,病例2在孕34⁺周时早产一约2 kg男婴,出生时各项评分正常,病例3还在继续妊娠。由于这3个病例的孕妇只在本中心进行了羊水穿刺和多学科会诊,因此,我们没能得到这3个胎儿的其他组织(如皮肤或口腔黏膜等)来进行遗传学检测,这也是本文的一个遗憾。

本文中,每个病例均使用了两种或两种以上的检测方法,如果仅使用核型检测或者微阵列检测,其检出率均为66.7%(2/3),漏诊率33.3%(1/3);如果仅使用原位荧光杂交方法检测,其检出率均为50%(1/2),漏诊率50%(1/2)。说明如果仅仅使用一种方法,对嵌合型22-三体的发现均有可能发生漏诊。当然,由于本文的病例数太少,每种方法对嵌合型22-三体的检出率还有待更多的数据支持。

综上所述,由于嵌合型22-三体胎儿的临床特征缺乏特异性,使用单一的方法进行检测有可能发生漏诊,对于产前筛查怀疑是22-三体的胎儿应进行多种方法同时检测。同时,对于产前诊断确诊为嵌合型22-三体的胎儿,应进行多学科会诊评估,对家属做到充分的知情同意并让他们做出合理的选择。

参考文献

- [1] Thirona Naicker, Colleen Aldous. Two trisomy 22 live births in one hospital in 15 months; is it as rare as we thought? [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2014, 33:35-41.
- [2] 荧光原位杂交技术在产前诊断中的应用协作组. 荧光原位杂交技术在产前诊断中应用的专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 51(4):241-244.
- [3] Yan Du, Lanting Chen, Jing Lin, et al. Chromosomal karyotype in chorionic villi of recurrent spontaneous abortion patients[J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(1):32-39.
- [4] Kroon B, Harrison K, Martin N, et al. Miscarriage karyotype and its relationship with maternal body mass index, age, and

- mode of conception[J]. *Fertil Steril*, 2011,95:1827-1829.
- [5] Lin CJ, Chen SW, Chen CP, et al. Higher male prevalence of chromosomal mosaicism detected by amniocentesis[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018,57:370-373.
- [6] Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans[J]. *Hum Reprod Update*, 2014,20(4): 571-581.
- [7] 郭颖,常颖,陈叙.嵌合体形成及其对产前筛查及诊断结果的影响[J]. *国际妇产科学杂志*, 2018,45(1):14-18.
- [8] Schwendemann WD, Contag SA, Koty PP, et al. Ultrasound findings in trisomy 22[J]. *Am J Perinatol*, 2009,26(2):135-137.
- [9] Stressig R, Kortge-Jung S, Hickman G, et al. Prenatal sonographic findings in trisomy 22[J]. *Ultrasound Med*, 2005, 24:1547-1553.
- [10] 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组. 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2014,49(8):570-572.
- [11] Nikhil Gholkar, Chanchal Singh, Anita Kaul, et al. Antenatal Detection of Mosaic Trisomy 22 with a Finding of Blake's Pouch Cyst[J]. *J Fetal Med*, 2018,5:53-57.

(收稿日期:2019-01-23)

编辑:宋文颖