

· 临床研究 ·

甲基化特异性 PCR 方法诊断 Prader-Willi 综合征

王薇, 吴晓燕, 宋红梅, 邱正庆, 魏珉

(北京协和医学院, 北京协和医院儿科, 北京 100730)

[摘要] **目的** Prader-Willi 综合征(PWS)是多系统异常的复杂临床综合征, 仅根据临床症状很难诊断, 国外已建立快速、高效、特异性、敏感性均佳的甲基化特异性 PCR (MS-PCR)方法用于临床诊断, 但我国还未有系统的对照研究。该研究目的便是建立 PWS 的 MS-PCR 诊断方法, 并对临床疑似患者进行筛查。**方法** 将 44 例受试者, 分为正常对照组(16 例)、临床确诊患者组(7 例)及临床疑似患者组(21 例)。采用盐析法提取基因组 DNA; 应用 CpGemone™ Fast Modification 试剂盒行亚硫酸盐修饰; 以正常人为阴性对照, 未修饰的基因组 DNA 为系统对照, 以 M(母源)、P(父源)两对引物同时对修饰产物行 PCR; 扩增产物以琼脂糖凝胶电泳分离。**结果** ①16 例正常对照的 PCR 结果同时显示 M、P 两条带, 7 例临床确诊的 PWS 患者均只显示一条 M 带; ②经 MS-PCR 筛查的 21 例临床疑似患者, 2 例确诊为 PWS, 其他 19 例排除 PWS。**结论** 该研究成功建立 MS-PCR, 并对疑似患者进行了筛查确诊。MS-PCR 为特异高效的 PWS 确诊方法且方便易行。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 485-488]

[关键词] Prader-Willi 综合征; 甲基化特异性 PCR; 诊断; 儿童
[中图分类号] R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)04-0485-04

Diagnosis of Prader-Willi syndrome by methylation-specific PCR

WANG Wei, WU Xiao-Yan, SONG Hong-Mei, QIU Zheng-Qing, WEI Min. Department of Pediatrics, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China (Song H-M, Email: songhm1021@hotmail.com)

Abstract: Objective Prader-Willi syndrome (PWS) is a complex, multisystem disorder, which is difficult to be diagnosed based on clinical symptoms and the purpose of this study is to establish methylation-specific PCR (MS-PCR) assay for the diagnosis of PWS, and evaluate its use in clinical cases. MS-PCR assay has been developed abroad for 10 years, and it is efficient, fast, specific and sensitive but it has not yet been used in clinical diagnosis in our country. **Methods** Forty-four subjects were assigned to 3 groups: normal controls ($n = 16$), typical PWS patients ($n = 7$) and suspected PWS patients ($n = 21$). Genome DNA was extracted by salt fractionation method and treated with CpGemone™ Fast Modification Kit. Using unmodified genome DNA as system control, the modified DNA was amplified by PCR with two primer pairs (M and P), and separated by agarose gel electrophoresis. **Results** All normal controls showed both 174 bp (M) and 100 bp (P) products, while all of the seven typical PWS patients demonstrated only 174 bp (M) product. In the 21 suspected patients, two cases were confirmed with PWS by MS-PCR, while others were excluded from PWS. **Conclusions** MS-PCR appears to be a specific, efficient and convenient assay for the diagnosis of PWS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(4): 485-488]

Key words: Prader-Willi syndrome; Methylation-specific PCR; Diagnosis; Child

Prader-Willi 综合征(PWS)是一种复杂的多系统异常的临床综合征, 最早由 Prader 等于 1956 年报道^[1], 新生儿发病率为 1: 12 000 ~ 15 000。其主要临床特征包括: 新生儿肌张力低下、发育迟缓、身材矮小、行为异常、童年期开始肥胖、下丘脑性性腺发育不良及长颌、窄脸、杏仁眼、小嘴、薄上唇、嘴角向下的特征性外貌^[2,3], 脊柱侧凸也很常见(37.5%)且随年龄增长而发病率增高^[4]。该病为 15q11-13 区域的父源印记基因缺陷所致^[5]。由于基因印记不同, 正常人非甲基化的父源等位基因具备活性, 而甲基化的母源等位基因没有活性。PWS 患者这一区域父源基因功能缺陷, 其主要遗传类型有: 15q11-13 区域约 6Mb 的父

[收稿日期] 2008-02-01; [修回日期] 2008-03-10
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(资助号: 2005CB522507); 十五国家科技攻关计划项目(2004BA720A04); 北京市科学技术委员会研发攻关类项目(D0906005040491)。
[作者简介] 王薇, 女, 硕士研究生。主攻方向: 儿童遗传性疾病。
[通讯作者] 宋红梅, 女, 教授, 硕士生导师, 儿科副主任。中国医学科学院北京协和医院儿科, 邮编: 100730。

源染色体缺失(70%)、母源同源二倍体(maternal uniparental disomy, UPD), (20% ~ 25%)、印记中心(imprinting center, IC)微缺失及突变(1% ~ 5%), 以及少量的染色体平衡易位^[3,6]。PWS 患者的死亡率高达 3%^[7], 且常为突发及不可预期的, 所以早期诊断对患者进行早期治疗、改善生活质量延长其寿命具有极重要的意义。目前 PWS 的临床诊断标准已经确立^[8](表 1^[2])。但对于很多疑似患者而言, 仅根据临床症状很难诊断, 需要应用分子生物学方法进行遗传基因的分析。目前的基因分析诊断方法包括: 高分辨染色体分析、荧光原位杂交(FISH)、甲基化特异性聚

合酶链式反应(MS-PCR)等^[8]。但是高分辨染色体分析仅适用于大的缺失或染色体异常^[9], FISH 虽可作为染色体分析的补充, 检出存在微缺失的 PWS 患者, 但 UPD 或印记中心突变的患者却由于不存在基因缺失而被漏诊。近十年来国外已建立了 MS-PCR 方法用于检测 PWS 患者, 其耗时短、需样本量少, 是一种快速、高效、特异性、敏感性均佳的分子诊断方法。然而, 我国仅有少数单位进行过少数病例的检测报道, 未进行系统的对照研究。本研究目的是建立一种快速高效的 MS-PCR 诊断 PWS 的方法, 以对 PWS 患者进行确定诊断并应用于临床。

表 1 PWS 诊断标准

主要标准
1. 新生儿和婴儿期中枢性肌张力低下, 吸吮力差, 随年龄增长而逐渐改善;
2. 婴儿期喂养困难, 需特殊喂养工具; 体重增长不满意;
3. 12 个月到 6 岁间, 额外或快速的体重增加(额外被定义为大于 2 个百分点), 不干预情况下出现中枢性肥胖;
4. 特征性面容: 婴儿期长颅、窄脸、杏仁眼、小嘴、薄上唇、嘴角向下(3 种及以上);
5. 在不同年龄段出现的性腺机能减退, 生殖器官发育不全。 16 岁前: 男性阴囊发育不良, 隐睾, 小阴茎和/或小睾丸(小于同龄人第 5 百分位); 女性生殖器官缺乏或严重发育不良, 小阴唇和/或小阴蒂; 若干预, 16 岁以后仍性腺不成熟或成熟不完全, 与之相伴的青春期性征发育延迟。男性呈小性腺、面部或身体毛发减少、不变声; 女性仍无月经或月经少;
6. 6 岁以下, 整体发育迟缓; 再稍大些儿童, 有轻到中度的神经发育延迟或学习障碍;
7. 摄食过度或强迫性摄食;
8. 15q11-13 缺失, 通过高分辨染色体分析(>650 带)或其他 PWS 染色体的细胞遗传分子学方法分析异常, 包括 UPD。
次要标准
1. 胎动减少或婴儿期无生气或哭声弱, 随年龄增长而改善;
2. 特征性行为问题: 易怒、猛烈情感爆发和强迫性行为、好争辩、对抗、程序化行为及固执、言语重复症、偷窃和撒谎(5 种及以上);
3. 睡眠紊乱或睡眠呼吸暂停;
4. 没有遗传背景, 15 岁时仍身材矮小(无 GH 干预者);
5. 色素减退——与家族其他成员相比颜色较浅的头发、皮肤;
6. 与同身高人相比, 手小(<第 25 百分位)和/或脚小(<第 10 百分位);
7. 手窄, 双尺骨边缘缺乏弧度;
8. 眼睛问题(内斜视、近视);
9. 唾液粘稠, 可在嘴角结痂;
10. 语言清晰度异常;
11. 自我皮肤损伤(抠、抓等)。
支持证据
1. 痛阈高;
2. 生病时少呕吐;
3. 婴儿期体温不稳定或较大儿童及成年人的体温敏感性改变;
4. 脊柱侧凸或后凸;
5. 早期肾上腺皮质机能初现(early adrenarche);
6. 骨质疏松;
7. 对智力拼图游戏等有不寻常的技能;
8. 神经肌肉检查正常。

计算得分: 主要标准每个 1 分, 次要标准每个 0.5 分, 支持证据增加了诊断的确定性, 但没有得分。< = 3 岁, 5 分(有 4 个以上来自主要标准); > 3 岁和成年人, 8 分(有 5 个以上来自主要标准)即可以做出诊断。

1 对象

本研究已经取得所有受试者本人或其家长的知情同意。将 44 例受试者共分为 3 组: 正常对照组、

临床诊断患者组和临床疑似患者组。正常对照组 16 例, 男女各 8 例。临床诊断患者组(7 例), 2005 年至今到儿科遗传门诊就诊, 就诊年龄 1 岁 11 月至 17 岁, 男 4 例, 女 3 例。据 1993 年国际诊断标准^[2], 除主要标准中第 8 条外, 其他总评分均 > 8 分,

临床诊断 PWS。临床疑似患者组 21 例,2005 年至今于本院就诊,就诊年龄 3.5 ~ 15 岁,男 11 例,女 10 例,据临床诊断标准不能确诊的疑似患者(除主要标准第 8 条外,评分 3.5 ~ 7.5 分,≥7 分的共有 3 例)。

2 方法

2.1 盐析法提取基因组 DNA

常规盐析方法提取 DNA,使终浓度为 1 μg/μL。

2.2 亚硫酸盐修饰 DNA 及提纯

亚硫酸修饰 DNA 及提纯 (CpGemone™ Fast DNA Modification Kit CHEMICON®, S7824),取 2 ~ 3 μg DNA 按照试剂盒的说明书操作修饰、提纯,所得修饰后 DNA 终体积为 50 ~ 60 μL。

2.3 聚合酶链式反应 (PCR)

参考文献^[10]设计引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(终浓度 10 μmol/L)。M-引物上游:5'-TAAATAAGTACGTTTGC GCGGTC-3'; M-引物下游:5'-AACCTTACCCGCTCCATCGCG-3'; P-引物上游:5'-GTAGGTTGTTGTGTATGTTTAGGT-3'; P-引物下游:5'-ACATCAAACATCTCCAACAACCA-3'。

以正常人为阴性对照,未修饰的基因组 DNA 为系统对照。反应体系:10 倍浓度 PCR 缓冲液 (Hotstart Taq Reaction Buffer, Tiangen®) 3 μL, 2.5 mmol/L dNTP (Takara®, 2.5 mmol/L) 2.4 μL, M 上下游引物各 3.4 μL, P 上下游引物各 2 μL, ddH₂O 8 μL, 2.5 mmol/L MgCl₂ 0.6 μL (Applied Biosystems®), 热启动酶 Hotstart Taq DNA Polymerase (Tiangen®, 2.5 U/μL) 或 Hotmaster Taq DNA Polymerase (Tiangen®, 2.5 U/μL) 0.2 μL, 修饰后的模板 DNA 5 μL, 总体积 30 μL。扩增条件:95℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 30 s, 59℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

2.4 凝胶电泳

以 3% 琼脂糖 (Promega®) 凝胶电泳分离,在 120V 电压下电泳 30 min 后 UV 扫描成像。

3 结果

阴性对照组 16 例受试者 174 bp 的 M(母源)条带及 100 bp 的 P(父源)条带皆可见;经临床诊断标准确诊的患者组 7 例全部仅显示 174 bp 的 M 条带, P 带缺失;临床疑似患者组 19 例 M、P 带皆可见,未见父源染色体的异常缺失,从而除外 PWS; 2 例仅可见 M 带,结合临床确诊为 PWS 患者 (图 1)。

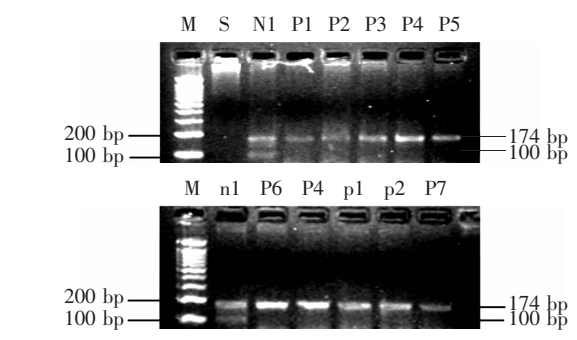


图 1 各组病例 PCR 后电泳结果 S:系统对照;N: 正常对照;P: 临床诊断患者;p: 疑似患者组中经筛查出来的 PWS 患者;n: 疑似患者组中被除外 PWS 的受试者。

4 讨论

基因组印记指的是,在配子形成时,由于亲代等位基因上的标记不同所导致的在发育过程中母源和父源基因的表达不同。基因印记是一个渐进形成的过程,需要三个主要步骤:配子 DNA 的标记,标记在胚胎及成人期体细胞组织中的维持,以及配子发生时标记的复位。基因印记可以看作是功能失活以及染色体区域失活的过程,通常伴有 CpG 岛上超甲基化。DNA 的甲基化是在印记的维持还是在印记建立阶段起作用尚不明,然而 DNA 的甲基化被看作是导致基因标记以及亲代等位基因不同的主要机制^[6]。与基因组中绝大多数的非印记基因不同,某一印记基因不能从两个亲代等位基因同时表达,而只能从某一特定的亲代基因(父源或母源)表达,另外一个等位基因便处于失活状态。PWS 是基因印记病的一个代表性疾病。人类 15q11-13 区域中含有很多簇状分布的父源印记基因,当这些印记基因缺陷时,便导致 PWS[有趣的是这一区域中还有一些母源印记基因,同一区域母源染色体缺失便造成 Angleman 综合征(AS)]。PWS 是由两个或两个以上父源表达的基因缺陷引发的临近基因综合征,至今未见单基因上出现点突变的患者^[3]。

MS-PCR 的原理为:人类 15q11-13 区域的父源印记等位基因部分区段高度保守,而母源基因通常伴有甲基化。位于此区域的小核核蛋白相关多肽 N (SNRPN) 基因的 CpG 岛上有不同的甲基化位点,母源染色体上有 >96% 的 CpG 二核苷酸是甲基化的,而父源染色体上都是非甲基化的^[10]。经过亚硫酸盐修饰后,父源 DNA 上非甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶,而母源 DNA 甲基化胞嘧啶则保持不变,这样等位基因的序列就产生了差异,再应用相应特异的 PCR 引物与之配对(父源-P 引物对,母源-M 引物对)进行 PCR 扩增,便可将等位基因区分开^[11]。这两对引物

与未经处理基因组 DNA 皆无互补配对,因此不会产生 PCR 产物。正常人父源及母源基因都完整,同时显示 M、P 两条带;而 PWS 患者由于父源基因异常,所以只显示 M 带。除 SNRPN 基因外,ZNF127、一些临近 SNRPN 的位点和印记中心侧翼区也可作为鉴别靶定位点^[12]。SNRPN 基因是最可靠的诊断位点,可检出绝大多数 PWS,并可用于产前诊断^[12],所以我们选取 SNRPN 作为 MS-PCR 诊断 PWS 的基因位点。

MS-PCR 是一种快速、高效、特异性和敏感性均佳的分子诊断方法,对于 PWS 三种遗传类型中的父源基因缺失及 UPD 都可检出,诊断 PWS 的覆盖率可高达 99%^[9]。MS-PCR 耗时短(从取血到诊断最快仅需 3 d),所需样本量少花费少。这样对新生儿筛查以及临床疑似患者的筛查及高危人群的产前诊断就具有重要的意义。我们用 MS-PCR 所检测的 16 例与该疾病不相关的正常人,无 1 例出现假阳性结果,7 例临床确诊的 PWS 均被检测出异常结果。21 例临床疑似患者中有 3 例临床评分 ≥ 7 分,主要标准评分均 ≥ 5 分;经由 MS-PCR 确诊的 2 例患者便在其中(男女各一)。这说明临床评分越高,PWS 的可能性越大,如果临床评分达到 7 分及以上,则需高度怀疑 PWS。经 MS-PCR 确诊的 9 例 PWS 均存在新生儿期及婴儿期肌张力减低、喂养困难史,1~5 岁开始摄食过度,逐渐出现肥胖,有特殊面容,所以这些症状在临床上应予以高度重视。

然而要确定患者为哪一种遗传类型,MS-PCR 尚显无能为力。另外一些染色体平衡易位患者以及可表达 SNRPN 基因,但不表达 IPW 基因的患者也可出现不典型的 PWS 表现^[13],这类患者的 MS-PCR 结果为阴性。这时,应进一步行高分辨染色体分析、FISH 等检查,以弥补诊断缺陷。

与普通的 PCR 方法相比,MS-PCR 操作要显得相对困难,其所要求的条件严格、适宜的可调范围比较窄,主要包括引物的浓度及比例、复性温度。一定要将两个引物对的浓度比例调节好,使正常对照的 M 带及 P 带亮度相近,否则,患者有可能出现一条比 M 带暗很多的 P 带的假阴性结果。推测其原因可能为,尽管经过了亚硫酸盐修饰,但是母源及父源的等位基因序列仍然十分相近,P 引物过量时,仍可能与母源基因产生错配。当调节引物浓度比使正常对照的 M 带与 P 带调节到亮度相近时,便可用于病例诊断,且患者均未见假阴性结果出现。所以掌握好实验条件后,本方法是稳定可靠的。并且由此可知,在对疑似患者进行诊断的过程中必须要同时设

立系统对照、阴性对照以及阳性对照。

致谢:感谢北京协和医学院基础学院医学遗传学系以及协和医院中心实验室遗传室所提供的帮助。

[参 考 文 献]

[1] Cortés MF, Allende RMA, Barrios RA, Curotto LB, Santa María VL, Barraza OX, et al. Clinical, genetic and molecular features in 45 patients with Prader-Willi syndrome [J]. *Rev Med Chil*, 2005, 133(1):33-41.

[2] Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O’Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria [J]. *Pediatrics*, 2001, 108(5): E92.

[3] Jiang YH, Wauki K, Liu Q, Bressler J, Pan Y, Kashork CD, et al. Genomic analysis of the chromosome 15q11-q13 Prader-Willi syndrome region and characterization of transcripts for GOLGA8E and WHCD1L1 from the proximal breakpoint region [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:50.

[4] de Lind van Wijngaarden RF, de Klerk LW, Festen DA, Hokken-Koelega AC. Scoliosis in Prader-Willi syndrome: Prevalence, effects of age, gender, body mass index, lean body mass and genotype [J]. *Arch Dis Child*, 2008 Feb 8. [Epub ahead of print]

[5] Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndrome [J]. *Trends Genet*, 1998, 14(5): 194-200.

[6] Fridman C, Koiffmann CP. Genomic imprinting: genetic mechanisms and phenotypic consequences in Prader-Willi and Angelman syndromes [J]. *Genet Mol Biol*, 2000, 23(4): 715-724.

[7] de Lind van Wijngaarde RF, Otten BJ, Festen DA, Joosten KF, de Jong FH, Sweep FC, et al. High prevalence of central adrenal insufficiency in patients with Prader-Willi syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(5): 1649-1654.

[8] Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria [J]. *Pediatrics*, 1993, 91(2): 398-402.

[9] Keder L, Butler MG. The genetics of Prader-Willi syndrome: an explanation for the rest of Us, March-May 2000 [DB/OL]. Revised and updated in July 2004. [2005]. http://www.pwsausa.org/syndrome/Genetics_of_PWS.htm.

[10] Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis [J]. *Nat Genet*, 1997, 16(1): 16-17.

[11] Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinniss WJ, Jones KL. Prader-Willi and Angelman syndrome: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method [J]. *Am J Med Genet*, 1997, 73(3):308-313.

[12] Glenn CC, Deng G, Michaelis RC, Tarleton J, Phelan MC, Surh L, et al. DNA methylation analysis with respect to prenatal diagnosis of the Angelman and Prader-Willi syndromes and imprinting [J]. *Prenat Diagn*, 2000, 20(4): 300-306.

[13] Conroy JM, Grebe TA, Becker LA, Tsuchiya K, Nicholls RD, Buiting K, et al. Balanced translocation 46, XY, t(2; 15)(q37.2; q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(2):388-394.

(本文编辑:吉耕中)