

· 临床研究 ·

单纯性圆锥动脉干畸形患者染色体 22q11.2 微缺失的研究

沈蕾¹, 徐月娟², 赵鹏军², 孙锬²

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院 上海儿科医学研究所, 上海 200092;
2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心心内科, 上海 200127)

[摘要] 目的 心血管畸形是 22q11.2 缺失综合征常见的临床表现, 随着研究的深入, 该综合征发生率逐渐提高。该文就单纯性心脏圆锥动脉干畸形患者染色体 22q11.2 微缺失发生率进行研究。方法 对 24 例单纯性圆锥动脉干畸形患者, 包括 2 例永存动脉干, 5 例肺动脉闭锁/室间隔缺损, 13 例法洛四联症, 4 例右室双出口进行 22q11.2 内位点 DNA 探针荧光原位杂交(FISH)检测。结果 24 例单纯性圆锥动脉干畸形患者中仅 1 例患者有 22q11.2 缺失, 发生率为 4.2%, 低于以往报道。结论 尽管 22q11.2 缺失在伴其他系统异常的心脏圆锥动脉干畸形患者中较常见, 单纯性圆锥动脉干畸形患者很少发现该缺失。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(1): 25-28]

[关键词] 荧光原位杂交; 染色体; 22q11.2; 圆锥动脉干畸形; 儿童

[中图分类号] Q987.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)01-0025-04

Frequency of 22q11 deletions in children with isolated conotruncal defects

SHEN Lei, XU Yue-Juan, ZHAO Peng-Jun, SUN Kun. Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Sun K, Email: drkunsun@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective The frequency of the 22q11.2 deletion syndrome is increasing worldwide. The cardiovascular anomalies are one of the most frequent clinical manifestations in this syndrome. This study was designed to determine the frequency of 22q11.2 deletions in a prospectively ascertained sample from children with isolated conotruncal defects in China. **Methods** Twenty-four children with isolated conotruncal defects were prospectively enrolled and screened for the presence of 22q11.2 deletions using fluorescence *in situ* hybridization. The 24 patients consisted of two cases of persistent truncus arteriosus (PTA), five cases of pulmonary atresia/ventricular septal defect (PA/VSD), thirteen cases of tetralogy of Fallot (TOF), and four cases of double outlet right ventricle (DORV). **Results** Only 1 of the 24 patients had 22 q11.2 deletions. The frequency of 22q11.2 deletions (4.2%) was lower than that reported by other authors. **Conclusions** Although 22q11.2 deletion is common in syndromic conotruncal anomalies, it is rare in isolated conotruncal anomalies. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(1): 25-28]

Key words: Fluorescence *in situ* hybridization; Chromosome; 22q11.2; Conotruncal anomaly; Child

22q11.2 微缺失在活产儿发生率为 1/4 000 ~ 1/6 000^[1], 涉及多种表型异常。Wilson 等^[2] 根据其主要的异常表型命名为 CATCH22 综合征, 即心脏畸形(cardiac anomaly)、异常面容(abnormal face)、胸腺发育不良(thymic hypoplasia)、腭裂(cleft palate)、低钙血症(hypocalcemia)及 22q11.2 微缺失。主要包括 DiGeorge 综合征(DiGeorge syndrome, DGS), 圆锥动脉干异常面容综合征(conotruncal anomaly face syndrome, CAFS)和腭-心-面综合征(velo-cardio-facial syndrome, VCFS)以及一部分单纯圆锥动脉干畸形。随着研究的深入, 该综合征的其他表现如学习认知障碍、精神异常、发育迟缓等不

断被发现, 从而有学者提出“CATCH 22 综合征”命名并不适宜, 提出命名为“22q11.2 微缺失综合征”。75%~85%的 22q11.2 微缺失综合征病人伴发心脏畸形^[3], 主要表现为圆锥动脉干畸形, 如法洛四联症(tetralogy of Fallot, TOF), 肺动脉闭锁/室间隔缺损(pulmonary atresia/ventricular septal defect, PA/VSD), 右室双出口(double-outlet right ventricle, DORV), 永存主动脉干(persistent truncus arteriosus, PTA), 以及 B 型主动脉弓离断(interrupted aortic arch, IAA)。关于伴综合征的圆锥动脉干畸形患者 22q11.2 微缺失的研究已经有很多, 本研究就无其他系统异常的单纯圆锥动脉干畸形患者 22q11.2 微

[收稿日期] 2008-04-10; [修回日期] 2008-05-09
[基金项目] 上海市科委基金(NO. 05ZR14067)。
[作者简介] 沈蕾, 女, 硕士, 副研究员。主攻方向: 儿童遗传性疾病的分子生物学研究。
[通讯作者] 孙锬, 男, 教授, 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心心内科, 邮编: 200127。

缺失情况进行研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集 2007 年 10 ~ 12 月在我院治疗的 24 例圆锥动脉干畸形患者(男 13 例,女 11 例,年龄 0.5 ~ 15 岁),其中 PTA 2 例,PA/VSD 5 例,TOF 13 例,DORV 4 例。所有患者心脏畸形均经心脏彩色多普勒、心导管造影明确诊断。入选患儿均无其他心外畸形。

1.2 研究方法

1.2.1 GTG-显带核型分析 采集外周血 2 mL,以 1640 培养基(添加 25% 小牛血清,1% 植物血凝素)于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 68 ~ 72 h,培养完成前 60 min 加入秋水仙素 100 μL(8 μg/mL),继续培养至终止。离心弃上清液,加入预温 37℃ 的 0.075 mol/L 氯化钾低渗液 8 ~ 9 mL,用吸管充分吹打混匀,置 37℃ 水浴锅中低渗处理 20 min,用现配的甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定。如上制备中期

染色体标本,每个病例检测 20 个 G-显带有丝分裂中期相染色体。

1.2.2 荧光原位杂交(FISH) 选用 Vysis 公司双色荧光 LSI N25 DiGeorge/VCFS 区域探针,其中橙红色荧光信号 N25(D22S75)位于染色体 22q11.2 上的缺失关键区域(DGCR),绿色荧光信号标记染色体 22q13.3ARSA 位点(内对照)。

玻片经变性后,与探针杂交,孵育过夜,DAPI 复染,荧光显微镜(Olympus BX51)观察,染色体自动分析图像处理系统摄取染色体核型,拍摄荧光信号。结果判定有绿色荧光信号标记者为 22 号染色体;如果两条 22 号染色体长臂上均见橙红色信号,表明无 22q11.2 微缺失,仅 1 条 22 染色体可见橙红色信号,表明有 22q11.2 微缺失。

2 结果

2.1 G-显带核型分析

24 例患者外周血中期染色体 G-显带分析均未发现数目及结构异常(表 1)。

表 1 病例临床资料及 G-显带和 FISH 诊断结果

病例号	性别	年龄(岁)	诊断	G 显带	22q11.2 缺失
1	F	0.75	PTA(A IV), IAA(B), VSD, PDA, LSCA	46,XX	无
2	F	0.75	PTA(AI), VSD, ASD, PH	46,XX	无
3	M	0.83	TOF, SAPCA	46,XY	无
4	M	3.00	TOF, right aortic arch	46,XY	无
5	M	0.67	TOF, ASD, LSVc, MAPCA	46,XY	无
6	F	1.67	TOF, PFO, SAPCA	46,XX	无
7	M	15.0	TOF, SAPCA	46,XY	无
8	M	0.68	TOF, right aortic arch	46,XY	无
9	F	6.00	TOF, ASD, SAPCA	46,XX	无
10	F	1.75	TOF, ASD(II)	46,XX	无
11	F	0.75	TOF, ASD, right aortic arch, SAPCA	46,XX	无
12	F	12.0	TOF, PFO, right aortic arch, SAPCA	46,XX	无
13	M	0.50	TOF, ASD, SAPCA	46,XY	无
14	M	1.33	TOF, PFO	46,XY	无
15	M	6.00	TOF	46,XY	无
16	M	0.83	PA/VSD, ASD, MAPCA	46,XY	无
17	F	0.50	PA/VSD, PDA, left pulmonary artery stenosis, PFO	46,XX	无
18	F	1.09	PA/VSD, PDA	46,XX	无
19	M	8.00	PA/VSD, ASD, hyperplasic left and right pulmonary arteries,MAPCA	46,XY	无
20	F	1.67	PA/VSD, PFO, PDA, mesocardia, ventricular inverted transposition	46,XX	无
21	F	2.00	DORV, VSD, PH, aberrant right subclavian artery	46,XX,21pstk +	有
22	M	0.50	DORV, VSD, PS, PDA	46,XY	无
23	M	5.00	DORV, VSD, PS	46,XY	无
24	M	5.00	DORV, VSD(remote), CAVC,SV,PS, right aortic arch, TAPVC	46,XY	无

注释:F 女,M 男,PTA 永存动脉干,VSD 室间隔缺损,IAA 主动脉离断,PDA 动脉导管未闭,ASD 房间隔缺损,PH 肺动脉高压,PA 肺动脉闭锁,PFO 卵圆孔未闭,TOF 法洛四联症,DORV 右室双出口,TR 三尖瓣反流,MR 两尖瓣反流,CAVC 完全性房室通道,TAPVC 完全性肺静脉异位引流,LSVC 左上腔静脉,CS 冠状静脉窦,SAPCA 小侧枝血管,MAPCA 大侧枝血管,left pulmonary artery stenosis 左肺动脉狭窄,hyperplasic left and right pulmonary arteries 左右肺动脉发育不良,mesocardia 中位心,ventricular inverted transposition 心室反位,aberrant right subclavian artery 迷走右锁骨下动脉,right aortic arch 右位主动脉弓

2.2 FISH 分析

24 例中有 23 例可见正常杂交信号,即每个分裂相均可在 2 条 22 号染色体长臂上见到 4 个杂交信号(2 个绿色信号,2 个橙红色信号)。另 1 例(例

21) 每个分裂相仅可见到 3 个杂交信号——2 个绿色信号和 1 个橙红色信号,表明有 22q11.2 微缺失。例 21 患儿的 G-显带核型及 FISH 图像见图 1。

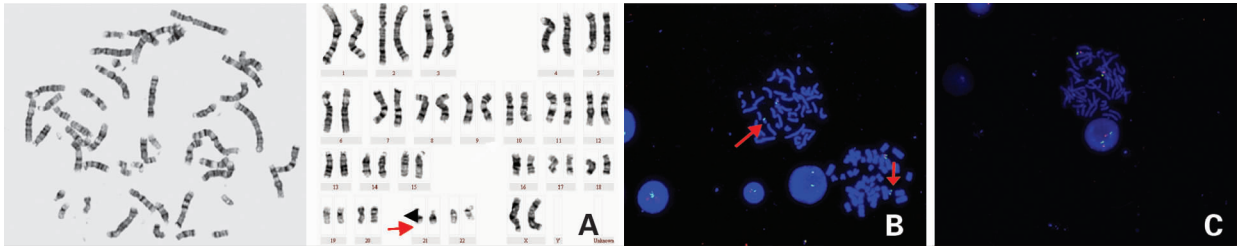


图 1 G-显带核型及 FISH 图像 A:患儿 G-显带分析示核型为 46,XX,21pstk+,21 号染色体随体柄增长为正常变异,临床认为无病理意义。B:患儿 FISH 分析结果显示 22q11.2 微缺失(箭头示),结合 G-显带分析,该患儿的核型为 46,XX,21pstk+,ish del(22)(q11.2)(D22S75-)。C:正常无微缺失患儿 FISH 分析图像。

3 讨论

标准 G-显带技术是遗传病最为常用的诊断方法,其操作简便,价格低廉,但是分辨率有限,不易发现微小的缺失、易位、倒位等染色体异常。此次研究中,24 例患儿的 G-显带核型均正常或属于正常变异,而 FISH 检测发现 1 例 22q11.2 微缺失。因此,对疑为患有染色体缺失综合征的患者,有必要进行 FISH 等检测,以明确诊断。FISH 技术具有简便、快捷、特异性高、灵敏性强的特点,在诊断染色体微缺失方面具有独特的优势。

22q11.2 微缺失综合征是由 22q11.2 微缺失引起的较为常见的染色体疾病。22q11.2 缺失一般认为分为 3 种类型,最常见的是缺失 3 Mb 大小的片段,90% 的缺失患者为此类型,而 7% 的患者发生 1.5 Mb 片段缺失,极少数患者发生其他缺失或易位^[4,5]。研究显示该综合征涉及多个基因的缺失,而 TBX1 基因可能是主要致病基因^[6,7]。这些基因的丢失影响了胚胎期心脏神经嵴细胞的正常功能,从而造成出生后神经嵴相关组织(胸腺,腭,圆锥动脉干)的畸形^[8]。

先天性心脏病是 22q11.2 微缺失综合征的主要临床表现之一,75%~85% 的 22q11.2 微缺失患者发生心脏畸形。大样本研究显示,先心病(主要为圆锥动脉干畸形)患者 22q11.2 微缺失发生率一般为 12.8%~17.8%^[9~11]。其中 TOF,IAA,PTA 和 VSD 患者发生缺失几率较大^[3]。Goldmuntz 等^[10]统计发现 50% 的 IAA 患者,34.5% 的 PTA 患者,以及

15.9% 的 TOF/PA-VSD 患者有 22q11.2 缺失。Botto 等^[1]通过人群调查(儿童)发现 47% 的 B 型 IAA 患儿,19% 的 PTA 患儿,12% 的 TOF(包括 PA/VSD)患儿,2.0% 的 D-TGA 患儿,1.1% 的 VSD 患儿有 22q11.2 缺失。Khositseth 等^[13]报道了 61 例圆锥动脉干畸形患者 22q11.2 缺失情况,发现 100% 的 IAA 患者,50% 的 TA 患者,33.3% 的 VSD(肺动脉下)患者,33.3% 的 PA/VSD 患者,以及 3.1% 的 TOF 患者有缺失。与非缺失患者相比,22q11.2 缺失患者更易合并其他心脏畸形如动脉导管未闭(patent ductus arteriosus,PDA)、主动脉弓异常、主动脉侧枝及肺动脉异常^[6,14]。

同时,不少文献研究提示大部分单纯性圆锥动脉干畸形与 22q11.2 缺失关系不大,对有 22q11.2 缺失的圆锥动脉干畸形患者进行仔细检查,会发现一些 22q11.2 微缺失综合征患者常见的面容异常^[14]。同时,由于 22q11.2 微缺失综合征临床表现的 non 特异性,一些临床表现在幼儿期可能难以发觉^[12],因此,对单纯圆锥动脉干畸形患者 22q11.2 缺失情况还需作进一步评估。

在本研究中,我们应用 FISH 技术分析了 24 例单纯性圆锥动脉干畸形患儿 22q11.2 缺失情况,仅有 1 例 DORV 患儿(4.2%)有 22q11.2 微缺失,其余患者均未发现该缺失。本组患儿 22q11.2 缺失的发生率较低的原因可能与以下因素有关:①入选的患儿均无其他心外畸形;②样本量小;③ D22S75 探针位于 DGCR 的近端^[15],致使 DGCR 远端的缺失和不位于 DGCR 内的缺失不能被检测到;④可能存在其他更小的缺失,而 FISH 技术的分辨力尚难以发

现。一些研究者应用实时荧光定量 PCR 及近年出现的 MLPA(multiplex ligation dependent probe amplification)技术检测 22q11.2 异常,发现这些技术结果判断可靠,且能发现 N25 或 TUPLE1 位点 FISH 探针不能检测的缺失^[16,17]。这些技术的应用将更有利于深入研究圆锥动脉干畸形患者 22q11.2 缺失情况。

本研究显示,单纯性心脏圆锥动脉干畸形患者较少出现 22q11.2 微缺失。然而,考虑到 CATCH 22 综合征临床症状的复杂性及非特异性,建议对 TOF, PA/VSD,IAA,PTA 患儿进行 22q 11.2 微缺失检测,预测患儿是否有发生 22q11.2 缺失综合征其他症状的风险。由于染色体微缺失携带者有 50% 的几率传给后代,建议对 22q11.2 微缺失患儿的父母也进行微缺失检测,为遗传咨询提供帮助。

[参 考 文 献]

[1] Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion; phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population[J]. *Pediatrics*, 2003, 112(1):101-107.

[2] Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome; part of CATCH22[J]. *J Med Genet*, 1993, 30(10): 852-856.

[3] Park IS, Ko JK, Kim YH, Yoo HW, Seo EJ, Choi JY, et al. Cardiovascular anomalies in patients with chromosome 22q11.2 deletion; a Korean multicenter study[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 114(2):230-235.

[4] Lindsay EA. Chromosomal microdeletions; dissecting del22q11 syndrome[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(11): 858-868.

[5] Edelmann L, Pandiata RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, et al. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11[J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(7): 1157-1167.

[6] Beauchesne LM, Warnes CA, Connolly HM, Ammash NM, Grogan M, Jalal SM, et al. Prevalence and clinical manifestations of 22q11.2 microdeletion in adults with selected conotruncal anomalies[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(6):1114-1115.

[7] Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagil I, Campbell CE, Rauch A.

Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(3):510-517.

[8] McElhinney DB, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Goldmuntz E. Cardiovascular anomalies in patients diagnosed with a chromosome 22q11 deletion beyond 6 months of age[J]. *Pediatrics*, 2001, 108(6): E104.

[9] Waldo K, Miyagawa-Tomita S, Kumiski D, Kirby ML. Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract; aortic sac to ventricular septal closure[J]. *Dev Biol*, 1998, 196(2):129-144.

[10] Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, McDonald-McGinn D. et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32(2): 492-498.

[11] McElhinney DB, McDonald-McGinn D, Zackaz EH, Goldmuntz E. Cardiovascular anomalies in patients diagnosed with a chromosome 22q11 deletion beyond 6 months of age[J]. *Pediatrics*, 2001, 108(6): E104.

[12] Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects[J]. *Am J Med Genet A*, 2003, 116A(2): 129-135.

[13] Khositseth A, Tocharoentanaphol C, Khowsathit P, Ruangdaraganon N. Chromosome 22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects[J]. *Pediatr Cardiol*, 2005, 26(5): 570-573.

[14] Maeda J, Yamagishi H, Matsuoka R, Ishihara J, Tokumura M, Fukushima H, et al. Frequent association of 22q11.2 deletion with tetralogy of Fallot[J]. *Am J Med Genet*, 2000, 92(4):269-272.

[15] Mehraein Y, Wippermann CF, Michel-Behnke I, Nhan Ngo TK, Hillig U, Giersberg M, et al. Microdeletion 22q11 in complex cardiovascular malformations[J]. *Hum Genet*, 1997, 99(4):433-442.

[16] Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Lopes AA, Krieger JE. PCR screening for 22q11.2 microdeletion; development of a new cost-effective diagnostic tool[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 369(1): 78-81.

[17] Stachon AC, Baskin B, Smith AC, Shugar A, Cytrynbaum C, Fishman L, et al. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification[J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143A(24):2924-2930.

(本文编辑:吉耕中)