

发根脆性 X 智力低下蛋白检测法诊断脆性 X 综合征

罗序峰¹, 钟建民¹, 张晓珍², 邹音³, 陈勇¹, 吴华平¹, 虞雄鹰¹

(江西省儿童医院 1. 神经内科; 2. 遗传室; 3. 病理科, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的 至今己有多种筛查和诊断脆性 X 综合征 (fragile X syndrome, FXS) 的方法, 以 PCR 法和 Southern 印迹方法应用最广, 然而每种方法均存在各自的局限性。该研究探讨发根脆性 X 智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP) 检测在诊断或筛查 FXS 中的可靠性, 以建立一种快速、简便、价廉且可靠的诊断 FXS 的方法。方法 采用发根 FMRP 免疫组化的检测方法对 80 例健康儿童、40 例不明原因智力低下儿童、已确诊 FXS 家系成员 12 例进行检查; 用 7-deza-dGTP PCR 法进行对照, 探讨其对诊断 FXS 的应用价值。结果 在 80 例健康儿童中, 发根 FMRP 的表达率均在 80% 以上。40 例不明原因智力低下患儿中, 2 例确诊为 FXS 患儿的发根 FMRP 表达率分别为 10% 和 0, 另 38 例非 FXS 患者发根 FMRP 的表达率均在 80% 以上。在 FXS 家系调查中, 确诊的 2 例 FXS 患者的发根 FMRP 表达率均为 0。结论 发根 FMRP 检测诊断 FXS 具有快速、简便、价廉、可靠等特点, 值得进一步推广应用。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11 (10): 817-820]

[关键词] 智力低下; 脆性 X 综合征; 脆性 X 智力低下蛋白; 免疫组织化学检测; 儿童

[中图分类号] R394-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)10-0817-04

Hair root fragile X mental retardation protein assay for the diagnosis of fragile X syndrome

LUO Xu-Feng, ZHONG Jian-Min, ZHANG Xiao-Zhen, ZOU Yin, CHEN Yong, WU Hua-Ping, YU Xiong-Ying. Department of Neurology, Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006, China (Zhong J-M, Email: zhongjm@163.com)

Abstract: Objective Fragile X syndrome (FXS) may be identified by many methods, such as PCR assay and Southern blot. However, each method has its limits or shortcomings. This study explored the reliability of the rapid, convenient and inexpensive hair root fragile X mental retardation protein (FMRP) assay in the identification of FXS. **Methods** FMRP in hair roots was determined by immunohistochemistry assay in 80 healthy children, in 40 children with mental retardation of unknown etiology and in 12 family members in one pedigree of FXS. FXS was confirmed by 7-deza-dGTP PCR. **Results** There was a high expression of FMRP in hair roots ($\geq 80\%$) in healthy children. Two children were confirmed with FXS by 7-deza-dGTP PCR in 40 children with mental retardation of unknown etiology. FMRP expression was 10% and zero respectively in the two children. The other 38 children had FMRP expression of more than 80%. FMRP was not expressed in the two cases of FXS from the pedigree of FXS. **Conclusions** Inexpensive, rapid and convenient hair root FMRP assay is reliable for the diagnosis of FXS and may be widely applied for screening and diagnosing FXS in children with mental retardation.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10): 817-820]

Key words: Mental retardation; Fragile X syndrome; Fragile X mental retardation protein; Immunohistochemistry assay; Child

脆性 X 综合征 (fragile X syndrome, FXS) 是一种三核苷酸 CGG 动态突变所致的遗传性疾病。男性发病率为 1/4 000, 女性为 1/6 000^[1]。FXS 患者在所有智障人群中所占比例为 2.6%~8.7%^[1]。至今己有多种筛查和诊断方法, 但以聚合酶链反应技术 PCR 法和 Southern 印迹方法应用最广^[2], 然而每种方法均存在各自的局限性。如细胞遗传学方法

由于脆性位点表达率不高, 容易产生假阴性, 而经典的 Southern 印迹方法虽然准确性最高, 但方法过于繁杂、诊断周期长且实验技术难度大。其他基因诊断的方法对实验室条件要求也较高, 且所需仪器价格不菲, 操作条件要求较为严格, 难以在基层开展。所以对 FXS 简易、快速诊断方法的研究仍是热点之一。本试验采用发根脆性 X 智力低下蛋白

[收稿日期] 2009-01-08; [修回日期] 2009-03-09
[基金项目] 江西省卫生厅学科带头人计划课题 (45062)。
[作者简介] 罗序峰, 男, 硕士, 住院医师。主攻方向: 小儿神经系统疾病。
[通讯作者] 钟建民, 男, 主任医师。江西省儿童医院神经内科, 邮编: 330006。

(fragile X mental retardation protein, FMRP) 检测的方法来诊断或筛查 FXS, 以期建立一种简便、快速、价廉、可靠的诊断方法, 现报道如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

不明原因智力低下患儿 40 例, 来源于江西省儿童医院神经内科与儿童保健门诊, 全部符合美国《精神疾病诊断统计手册》(DSM-IV) 中智力低下诊断标准, 并除外①分娩损伤; ②窒息、颅内出血; ③后天致残 (包括中毒、外伤、各种脑炎、脑膜炎、脑病以及惊厥后脑损伤等); ④营养不良及常见代谢、内分泌性疾病; ⑥社会心理因素; ⑦染色体数目异常等继发性智力低下。其中男性 33 例, 女性 7 例, 年龄 5 个月至 13 岁 8 个月, 其中 3 岁以下 13 人, 3~7 岁 16 人, >7 岁 11 人。

体检健康儿童 80 例作为对照。其中男性 51 例, 女性 29 例; 年龄 5 个月至 15 岁 1 个月, 3 岁以下 14 人, 3~7 岁 21 人, >7 岁 45 人。

经细胞遗传学证实的 FXS 家系一个, 共有成员 12 人, 其中 FXS 2 例^[3]。

本研究获得了所有参与检测者家属的知情同意。

1.2 实验方法

所有研究对象均采用 7-deza-dGTP PCR 和发根 FMRP 免疫组织化学检测法进行检测。

1.2.1 7-deza-dGTP PCR 实验方法和结果判断参照文献报道^[4]的方法进行, 试剂盒由湖南计划生育研究所提供, PTC-200PCR 仪为 BIO-RAD 公司产品。

1.2.2 发根 FMRP 免疫组织化学方法 按 Willemsen 等^[5]创立的发根 FMRP 免疫组织化学方法的原理, 用 EP 管代替培养皿作为试验的载体进行操作。采集耳后各区带有毛囊的发根, 女性 20 根, 男性 10 根。-80℃ 低温冰箱保存。

1.2.2.1 主要试剂 一抗采用美国 CHEMICON 公司的鼠抗人 FMRP 单克隆抗体 (批号: LV1350410); 二抗采用北京中杉金桥生物技术有限公司的 SP-9002 Histostain™-PLUS Kits 免疫组化染色试剂盒 (批号: 1378644); ZLI-9032 DAB Kit/DAB 浓缩型 DAB 试剂盒。

1.2.2.2 实验步骤 用 3% 多聚甲醛固定发根 10 min, 100% 甲醇渗透 20 min, 0.1 MPBS 洗涤 5 min × 3 次, 过氧化物 (3% H₂O₂ 去离子水) 室温孵育

30 min, 0.1 M PBS 液洗涤 5 min × 3 次, 鼠抗人 FMRP 单克隆抗体 (1:800) 孵育 3 h (37℃), 0.1 M PBS 液洗涤 5 min × 3 次, 再用生物素标记的羊抗鼠 IgG 孵育 (37℃ 孵育 30 min), 0.1 M PBS 液洗涤 5 min × 3 次, 辣根酶标记链霉卵白素工作液溶液孵育 (37℃ 孵育 30 min), 0.1 M PBS 液洗涤 5 min × 3 次, 最后用 DAB 显色 1 min 后终止染色并置于玻片上, 在显微镜下观测结果。

1.2.2.3 结果判断 当发根有 FMRP 表达时, 发根 DAB 显色为棕黄色或黄色; 当发根无 FMRP 表达时, 发根 DAB 不显色而呈白色。发根 FMRP 表达率 = 阳性发根数/检测的总发根数。

2 结果

2.1 7-deza-dGTP PCR 检测结果

在 80 例健康儿童中, 均可见目标带及内参带; 不明原因智力低下患儿 40 例中, 两例可见内参带正常表达, 目标带消失, 符合 FXS。其他患儿均可见目标带及内参带, 没有发现携带者; 在 FXS 家系中, 两例患儿均未见目标带, 只见内参带。其他成员均可见目标带及内参带。见图 1。

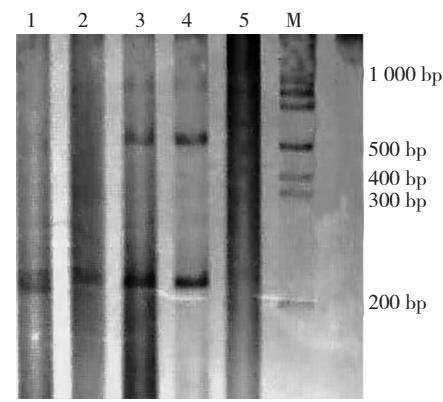


图 1 7-deza-dGTP PCR 法产物电泳图 1, 2 泳道为患者, 均只可见内参带, 没有出现 500 bp 或 1 000 bp 目标带。其中 1 泳道为智力低下的 FXS 阳性患者, 2 泳道为 FXS 家系中的患者; 3, 4 泳道为非 FXS 患者, 可见清晰的 500 bp 的目标带及内参带, 未见 1 000 bp 以上目标带; 5 泳道为生理盐水对照带; mark 泳道为标记泳道, 用于确定产物分子量的大小。

2.2 发根 FMRP 检测结果

在 80 例健康儿童中, 发根 FMRP 表达率均为 80% 以上。不明原因智力低下患儿 40 例中, 发现 2 例发根 FMRP 表达率分别为 10% 和 0, 均通过 7-deza-dGTP PCR 法诊断为 FXS 病例, 其余 38 例发根 FMRP 表达率均在 80% 以上。在 FXS 家系中, 有两

例 FMRP 表达率为 0,且均为 X 染色体脆性位点和 7-deza-dGTP PCR 检测诊断为 FXS 病例,其余成员 FMRP 表达率均大于 80%。不同人群发根 FMRP 表达率见图 2。

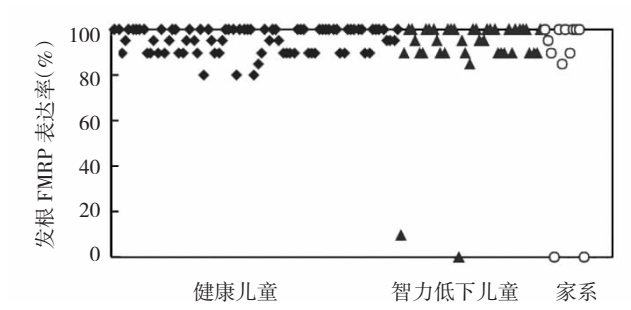


图2 不同人群发根 FMRP 表达率比较 健康儿童 80 例发根 FMRP 表达率均为 80% 以上;不明原因智力低下儿童 40 例中,发现 1 例表达率为 10%,另 1 例为 0,余发根均为 80% 以上;在 FXS 家系中,两例 FXS 全突变患者发根 FMRP 表达率均为 0,余发根 FMRP 表达率均为 80% 以上。

3 讨论

FXS 是遗传性智力低下疾病中最常见的一种,由致病基因 FMR1 启动区 CGG 三联重复序列不稳定扩增所引起。其发生率在先天性智力低下患者中仅次于唐氏综合征。FXS 临床表型包括智力低下、注意障碍、学习困难、孤独症样行为、多动症、癫痫发作等;典型患者尚具有高前额、大耳和下颌突出,青春期后大睾丸,关节活动度过大等体格特征^[6]。由于在青春期前儿童无特异性临床表现,诊断主要依据基因检测^[6]。近年来发现 FMRP 的表达与智力低下之间存在密切的关系^[7,8],为通过 FMRP 检测来诊断 FXS 提供了理论依据。

本研究中 40 例不明原因智力低下患儿中,发现 1 例男性病例发根 FMRP 表达率为 10%,另 1 例女性病例完全没有表达,而非 FXS 患者的发根 FMRP 表达率均大于 80%。在男性患者,只存在一条 X 染色体,如果该染色体发生病变,发根 FMRP 的表达率为零,本例患者表达率为 10%,且合并有长脸、大耳等外貌特征,由于患儿年幼,尚未进入青春期,大睾丸不明显,推测可能为嵌合体所致,即全突变和前突变相混合的类型,与 Willemsen 等^[9]文献报道相似,可采用 Southern 印迹法进一步确定其基因型。对于女性患者,有两条 X 染色体,在胚胎发育时期存在随机失活现象,在外周血涂片检测 FMRP 时由于女性患者 X 染色体的失活,仍然可以出现外周血淋巴

细胞内的 FMRP 的高表达(可达到 80%)^[9]。由于发根和大脑组织均来源于胚胎发育的外胚层,两者具有更好的同源性,检测发根的 FMRP 可以间接推测 FMRP 在大脑组织的表达,有文献认为发根 FMRP 检测要比外周血检测 FMRP 诊断 FXS 更具有优势^[5]。Willemsen 等^[7]对女性携带者的发根 FMRP 检测发现发根 FMRP 表达率与智力水平成正相关,提示该方法也可应用于女性患者的诊断,本例患者的 FMRP 表达率为零,且具有大耳、长脸等体格特征,说明该患者为全突变。在 FXS 家系中的 2 例患者中,FMRP 表达率均为 0,也与 7-deza-dGTP PCR 检测结果相符。进一步验证了该方法的特异性和灵敏度。

在本研究中,80 例健康儿童的发根 FMRP 检测发现 42 例(52.5%)发根 FMRP 表达率为 100%,发根 FMRP 表达率最低为 80%,与国外文献报道相符^[5]。为达到较好的诊断效能,操作时应注意以下几个方面:①所有使用液体的操作中,液体使用量以全部浸没发根为宜;②开始实验时,要对采集的发根进行必要的修剪,使其长度方便操作;③37℃ 孵育时必须盖紧盖子,以防液体蒸发,从而改变试剂浓度,影响实验结果;④整个操作过程中,建议戴无菌乳胶手套;由于头发及 EP 管均属于细小物品,建议采用眼科镊进行操作较为方便;⑤本方法试验结果为阴性时诊断为患者,所以每例患者诊断时都应该加用阳性对照来提高诊断效能,防止假阴性的发生。

在本研究中,发根 FMRP 表达的结果与 7-deza-dGTP PCR 和细胞遗传学方法完全吻合,说明其灵敏性和特异性与 7-deza-dGTP PCR 相似。在所有不明原因的智力低下患者中发现患者两例,检出率为 5%,与文献报道 FXS 患者在所有智障人群中所占比例为 2.6%~8.7% 相符^[1],但高于 Pang 等^[10]对 1 127 名中国智力低下患者进行 FMR1 基因分析的 2.8% 检出率,这可能与本组资料中已排除了已知原因的智力低下患儿有关;低于我们以前报道^[11]的外周血 FMRP 检测男性患者的 13.16% 检出率,分析其原因,可能与本组资料包括女性患者有关,因为本病女性发病率远低于男性^[1]。以现有的初步研究来看,非 FXS 患者发根 FMRP 表达率大于 80%,低于该值则可能为 FXS 病例。由于本试验病例数过少,存在抽样误差的可能,有待进一步进行大样本并按实验诊断的流行病学评价及采用受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)来探讨其诊断界值。

与1999年Willemsen等^[5]创立的发根FMRP免疫组织化学检测方法相比,由于采用了200 μL EP管代替直径3 cm培养皿作为实验的载体,极大地减少了检测试剂的用量,从而减少了检测的费用,使之在经济欠发达的中国全面推广具有了扎实的基础,并且由于发根在EP管中可以完全浸泡,并不需要摇床就可以达到完全浸泡的目的,使目标蛋白和一抗完全结合。整个实验过程仅需8 h,且相对无创,家长及患儿容易接受,标本采集方便且易于保存,甚至家长可以自行采集标本,以邮件邮寄的方式送达实验室。较之PCR及Southern印迹法,无需严格的实验条件和昂贵的实验设备,在普通实验室即可开展,已有商品化试剂盒,且价格低廉,可以在基层医疗机构开展应用。

综上所述,发根FMRP检测是一种快速、简便、价廉、可靠的诊断方法,也可用于女性患者的检测,并且由于该方法直接检测FMRP,可检测三核苷酸动态突变或FMR1基因点突变所致的FXS患者,弥补了目前PCR检测无法诊断FMR1基因点突变的缺陷。发根FMRP检测特别适合于大规模智力低下患者FXS的筛查。我国人口基数大,病人绝对数目并不少,开发一种快速、简便、价廉、可靠的诊断方法具有重要的意义。首先,作出早期诊断,可以对患者进行尽早干预,以改善生活技能和提高生活自理能力;其次,对于筛查出患者的家庭进行完善的基因型检测,可以指导计划生育,防止智力低下人口的出生,从而提高人口素质。对FXS的筛查可从特殊的医疗机构或者教育机构开始,比如智障中心,特殊教育学校等,对不明原因智力低下的患儿进行筛查,进而对FXS病例进行家系调查,可进一步提高检出的阳性率并降低检测费用。

[参 考 文 献]

[1] 杨芳,白玉杰,李家林. FXS与脆性X智障蛋白的相关性研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(5):299-301.

[2] Willemsen R, Oostra B. FMRP detection assay for the diagnosis of the Fragile X syndrome[J]. Am J Med Genet, 2000, 97(4):183-188.

[3] 张晓珍,赵鑫,余继英,李宗浩,赵鑫,刘毅. 一个脆性X染色体综合征家系[J]. 遗传与疾病, 1990, 7(1):51.

[4] 李辉,李麓芸,倪斌,吴嵩龄,殷照初,邹永华,等. 用聚合酶链反应技术对脆性X综合征进行筛查与诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(6):519-521.

[5] Willemsen R, Anar B, De Diego Otero Y, de Vries BB, Hilhorst-Hofstee Y, Smits A, et al. Noninvasive test for fragile X syndrome, using hair root analysis[J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(3):98-103.

[6] 王三梅,李明,潘虹,杨艳玲,王静敏,卜定方. 智力低下和孤独症男童脆性X基因突变的研究[J]. 临床儿科杂志, 2006, 24(12):959-962.

[7] Willemsen R, Smits A, Severijnen LA, Jansen M, Jacobs A, Bruyn ED, et al. Predictive testing for cognitive functioning in female carriers of the fragile X syndrome using hair root analysis[J]. J Med Genet, 2003, 40(7):377-379.

[8] Ravindran MS, Patel ZM, Adhia RA, Dsouza AK, Babu S. Validity of analysis of FMRP expression in blood smears as a screening test for Fragile X syndrome in the Indian population[J]. J Clin Lab Anal, 2005, 19(3):120-123.

[9] Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique[J]. Hum Genet, 1997, 99(3):308-311.

[10] Pang CP, Pooh PM, Chen QL. Trinucleotide CCG repeat in the FMR1 gene in Chinese mentally retarded patients[J]. Am J Med Genet, 1999, 84(3):179-183.

[11] 钟建民,吴华平,陈勇,柯江伟,邹时朴,李建华,等. 外周血淋巴细胞FMRP检测在脆性X综合征中的应用[J]. 江西医药, 2007, 42(7):579-582.

(本文编辑:王庆红)