

论著 · 临床研究

应用荧光原位杂交法检测口腔黏膜脱落细胞诊断唐氏综合征

郑雷¹ 刘东海² 郝胜菊¹ 易彬² 闫有圣¹

(1. 甘肃省妇幼保健院遗传室,甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃省妇幼保健院儿科,甘肃 兰州 730050)

[摘要] 目的 目前,临床应用荧光原位杂交(FISH)法诊断唐氏综合征多采用血液及皮肤活检组织,属于有创检查。该研究探讨应用 FISH 方法检测口腔黏膜细胞(无创取材)对唐氏综合征的诊断价值。**方法** 应用 FISH 方法对 2010 年 3 月至 2011 年 3 月 16 例可疑唐氏综合征患儿外周血及口腔黏膜脱落细胞进行检测分析;同时进行外周血淋巴细胞染色体核型分析。**结果** FISH 法检测外周血及口腔黏膜脱落细胞标本,显示 14 例为 21-三体综合征,2 例 21 号染色体数目正常,结果与外周血染色体核型分析结果一致。**结论** 应用 FISH 方法对口腔黏膜脱落细胞标本进行检测可为唐氏综合征的准确、无创性诊断提供新的检测途径。

[中国当代儿科杂志,2012,14(3):202-204]

[关键词] 荧光原位杂交;口腔黏膜脱落细胞;唐氏综合征;无创性诊断;儿童
[中图分类号] R596.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)03-0202-03

Value of oral mucosa cast-off cells as samples in fluorescent *in situ* hybridization for the diagnosis of Down's syndrome

ZHENG Lei, LIU Dong-Hai, HAO Sheng-Ju, YI Bin, YAN You-Sheng. Genetics Lab Maternal and Child Health Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China (Email: zhenglei_2003@163.com)

Abstract: Objective At present, blood and skin biopsy tissues are used in the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) test for the diagnosis of Down's syndrome, however, the samples are usually obtained invasively. This study explores the value of oral mucosa cast-off cells in the FISH test, as samples obtained non-invasively, for the diagnosis of this disorder. **Methods** Peripheral blood and oral mucosa cast-off cells were sampled for the FISH test in 16 children with suspected Down's syndrome between March 2010 and March 2011. Chromosomal karyotype analysis of peripheral blood lymphocytes ("gold standard" for the diagnosis of Down's syndrome) was also conducted. **Results** The FISH test, in which both peripheral blood and oral mucosa cast-off cells were examined, showed that 14 children had 21-trosomy syndrome and the other 2 children had normal numbers of cromosome 21. The results of the FISH test were the same as the results of the chromosomal karyotype analysis. **Conclusions** Use of the FISH method to test samples of oral musoca cast-off cells is non-invasive and reliable for the diagnosis of Down's syndrome in children, and is hence worthy of recommendation. **[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14 (3):202-204]**

Key words: Fluorescence *in situ* hybridization; Oral mucosa cast-off cell; Down's syndrome; Noninvasive diagnosis; Child

唐氏综合征(Down's syndrome),也称为 21-三体综合征或先天愚型,临床表现多为先天性智力障碍,特殊面容,精神体格发育迟滞,并伴有其他严重多发性畸形,是一种发病率较高的常染色体疾病。在新生儿中发病率约为 1/800~1/600^[1]。荧光原位杂交(FISH)方法可以对未经培养的组织细胞进行检测,具有快速、分析方法简便、直观性强等优点。目前临床应用 FISH 法诊断唐氏综合征多采用血液

及皮肤活检组织标本,属于有创性检查。口腔黏膜细胞起源于胚胎外胚层细胞,与机体组织细胞具有相同的遗传物质,因此可应用 FISH 方法检测口腔黏膜脱落细胞对唐氏综合征进行诊断,但诊断的准确性如何,目前该方面报道少见。因此本研究应用 FISH 方法对我院 2010 年 3 月至 2011 年 3 月 16 例可疑唐氏综合征小儿进行无创性诊断,为该项无创性诊断技术在儿科系统的应用提供临床依据。

[收稿日期]2011-08-29;[修回日期]2011-10-05
[作者简介]郑雷,男,硕士研究生,主治医师。

1 资料与方法

1.1 研究对象

我院 2010 年 3 月至 2011 年 3 月住院及门诊可疑唐氏综合征患儿 16 例,年龄为 4 h 至 10 个月。其中男婴 10 例,女婴 6 例。所有病例均采集口腔黏膜脱落细胞和外周血进行 FISH 检测,同时对外周血淋巴细胞培养后进行染色体核型分析。16 例患儿的临床表现见表 1。本研究获得患儿家长知情同意。

表 1 16 例可疑唐氏综合征患儿临床表现

临床体征	病例数(%)
眼裂外上斜	15(94)
鼻梁扁平	16(100)
伸舌	12(75)
通贯掌	16(100)
肌张力低下	11(69)
第 5 指变短	7(44)
第 1、2 趾间距增宽	8(50)
先天性心脏病	4(25)
先天性巨结肠	1(6)
十二指肠狭窄	1(6)
肛门闭锁	1(6)
低位耳	7(44)
眼距宽	16(100)
内眦赘皮	14(88)

1.2 方法

1.2.1 标本采集 使用无菌棉签采集双侧颊黏膜拭子,置于干燥无菌离心管内。同时采集肝素钠抗凝静脉血 2 mL 送检。

1.2.2 口腔黏膜脱落细胞的处理 参照文献方法^[2],标本经过消化、低渗、固定处理后滴片进行

FISH 检测。

1.2.3 外周血染色体制备与核型分析 按照常规染色体 G 显带制备方法,经 72 h 培养后、收集分裂中期细胞,低渗、固定、制片和染色,再行核型分析。

1.2.4 FISH 检测 所有标本均采用北京金普嘉公司 13/21(DLEU2/DSCR2) FISH 探针进行荧光原位杂交检测。其中 13q14(DLEU2)探针显绿色荧光信号;21q22(DSCR2)探针显红色荧光信号。按试剂说明书配备探针,使用杂交仪于 75℃变性 5 min;40℃杂交过夜后去封片膜;于 50% 甲酰胺/2 × SSC 洗脱 3 次,每次 5 min;0.1/2 × SSC 洗 2 次,每次 5 min;0.1% NP-40/SSC 洗 1 次,5 min;置 70% 乙醇中脱水 3 min;晾干后 DAPI 复染 10 min。在 Lecia DM6000B 荧光显微镜下观察。选择背景干净、杂交信号清晰、形态完整的细胞,计数 200 个细胞内 FISH 的杂交信号。

2 结果

外周血染色体核型分析发现,16 例可疑唐氏综合征患儿中有 14 例染色体核型异常,其中 9 例为 47,XY,+21;4 例为 47,XX,+21;1 例为 46,XY,t(13;21)(q10;q10);其余 2 例染色体核型正常(46,XY)。FISH 法对外周血、口腔黏膜脱落细胞检测发现 14 例患儿 13/21(DLEU2/DSCR2)荧光探针杂交区可见 3 个红色荧光信号,表明 21 号染色体数目有 3 个;2 例染色体核型正常患儿 FISH 检测 13/21(DLEU2/DSCR2)荧光探针杂交区见 2 个红色荧光信号,表明 21 号染色体数目正常。该结果与染色体核型分析结果一致。两种方法的检测结果见表 2。

表 2 FISH 及染色体核型分析结果 (n=16)

试验方法	试验结果	阳性例数	检测时间
染色体核型分析 (外周血)	47,XY,+21	9	3~5 d
	47,XX,+21	4	
	46,XY,t(13;21)(q10;q10)	1	
	46,XY	2	
FISH	nuc ish 13q14(DLEU2×2),21q22(DSCR2×3)	14	15~26 h
(口腔黏膜脱落细胞、外周血)	nuc ish 13q14(DLEU2×2),21q22(DSCR2×2)	2	

3 讨论

唐氏综合征是由于 21 号染色体在细胞有丝分

裂过程中发生不分离而引起的出生缺陷,是导致智力低下的主要遗传学因素之一^[3]。常用诊断方法有以下几种:(1)染色体核型分析方法:是目前诊断唐氏综合征最常用的方法。该方法检测周期长,方

法繁琐,需要较高的染色体核型分析、识别能力。如果染色体分散差、显带不清楚时,会严重影响核型的分析与判断,容易造成临床上误诊与漏诊。(2)荧光定量 PCR 方法:应用荧光定量 PCR 方法进行唐氏综合征分子诊断,目前有两种方法,分别为绝对定量分析方法^[4]和相对定量法。由于荧光定量 PCR 引物的稳定性、特异性以及探针的稳定性对结果均产生非常大的影响,探针设计及实验条件的确立都要经过一段时间的摸索,因而限制了该方法的推广应用。(3)STR-PCR 方法:唐氏综合征主要是由配子在减数分裂时染色体不分离形成的^[5]。陈振斌等^[6]通过 STR 分型,根据 STR 位点出现 3 条带图谱诊断唐氏综合征。该方法中如何选择有效的 STR 位点进行检测是目前存在的主要问题。此外,应用该方法不易检查嵌合体核型。(4)FISH 法:它是以特定荧光标记的已知顺序的核酸为探针,与待检标本中的核酸根据碱基互补的原理进行杂交,用荧光显微镜对杂交信号进行检测。该方法可以对未经培养的组织细胞进行检测,具有快速、分析方法简便、直观性强等优点。21-三体综合征主要由于 21-三体或易位引起 21q22-ter 部分三体所致。商品化 FISH 探针设计的检测位点集中于 21q22.13~q22.2,防止了易位型三体由于染色体短臂断裂、丢失或着丝粒融合而导致的检测漏诊和假阴性结果。目前多用于唐氏综合征高危孕妇羊水、绒毛标本的产前诊断。

唐氏综合征的经典检测方法是应用细胞遗传学手段,进行外周血淋巴细胞染色体核型分析。FISH 法可用于血液、活检组织、石蜡切片等多种标本类型的临床检测。由于该方法可以对未经培养的间期组织细胞进行检测,同时具有快速、准确、特异性强等优点,近年来被广泛用于唐氏综合征的产前诊断以及唐氏综合征患者的临床诊断。但是目前临床应用 FISH 法诊断唐氏综合征多采用血液及皮肤活检组织标本,属于有创性检查。口腔黏膜细胞起源于胚

胎外胚层细胞,与机体组织细胞具有相同的遗传物质。2003 年 Velagaleti 等^[7]用 FISH 方法,利用口腔黏膜脱落细胞,成功诊断了 Pallister-Killian 综合征 (PKS) 患儿。认为该方法具有无创、简便、结果可靠等优点。本研究应用 FISH 法对 16 例可疑唐氏综合征患儿口腔黏膜脱落细胞进行检测,与常规外周血淋巴细胞染色体核型分析方法相比,对 21-三体的诊断具有相同的检出率,而检测时间仅仅是后者的 1/3~1/5;同时口腔黏膜脱落细胞取材方便、无创伤。因此该方法非常适用于可疑唐氏综合征患儿的快速检测,值得推广应用。

[参 考 文 献]

[1] 李璞. 医学遗传学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999:281.

[2] Nieuwint AW, Van Hagen JM, Heins YM, Madan K, Ten Kate LP. Rapid detection of microdeletions using fluorescence in situ hybridisation (FISH) on buccal smears[J]. J Med Genet, 2000, 37(6): E4.

[3] 王芳,杨尧,杨晓,王春枝,何玺玉. 92 例先天性智力低下患儿细胞遗传学分析[J]. 中国当代儿科杂志,2011,13(8):651-653.

[4] 郑明明,胡娅莉,许争峰,王志群,史婷琦,叶晓东,等. 实时荧光定量聚合酶链反应技术在产前诊断唐氏综合征中的应用[J]. 中华妇产科杂志,2004, 39(10):678-681.

[5] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 1991,10(4):506-513.

[6] 陈振斌,雷箴,阎梅,朱金玲,肖白,梁燕,等. 用短串联重复序列诊断唐氏综合征[J]. 中华医学遗传学杂志,2004,21(2):190-192.

[7] Velagaleti GV, Tapper JK, Rampy BA, Zhang S, Hawkins JC, Lockhart LH. A rapid and noninvasive method for detecting tissue-limited mosaicism: detection of i(12)(p10) in buccal smear from a child with Pallister-Killian syndrome[J]. Genet Test, 2003,7(3): 219-223.

(本文编辑:王庆红)