

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.12.002

论著 · 临床研究

4 例 Williams-Beuren 综合征家系 遗传学诊断与产前诊断

刘洋^{1,2} 徐志勇² 吴维青² 罗福薇² 谢建生²

(1. 南方医科大学研究生学院, 广东 广州 518010;
2. 南方医科大学附属深圳市妇幼保健院出生缺陷预防控制重点实验室, 广东 深圳 518000)

【摘要】 Williams-Beuren 综合征是一类常见的染色体微缺失综合征, 早期诊断及干预对患儿及其家庭十分重要。本研究应用染色体核型分析技术 (G 显带), 多重连接依赖探针扩增技术 (MLPA) 及微阵列比较基因组杂交技术 (array-CGH) 对 4 个家系中 1 例超声异常的胎儿及 3 例发育异常患儿行染色体核型和基因组 DNA 分析, 为这 4 个家庭的再生育提供指导, 为产前诊断提供依据。研究结果发现 1 例产前超声异常孕妇羊水及 3 例发育异常患儿外周血 MLPA 分析提示染色体 7q11.23 区域 ELN 基因探针信号降低, array-CGH 检测提示染色体 7q11.23 区域杂合缺失。4 个家系中母亲再次妊娠时取羊水细胞标本行上述检测均未发现异常。研究结果提示 MLPA 技术及 array-CGH 技术能够快速、准确地诊断 Williams-Beuren 综合征, 为临床提供更好的遗传咨询服务。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(12): 1267-1272]

【关键词】 Williams-Beuren 综合征; 多重连接依赖探针扩增技术; 微阵列比较基因组杂交技术

Genetic and prenatal diagnosis for four families with Williams-Beuren syndrome

LIU Yang, XU Zhi-Yong, WU Wei-Qing, LUO Fu-Wei, XIE Jian-Sheng. Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou 518010, China (Xie J-S, Email: jsxieszmch@aliyun.com)

Abstract: Williams-Beuren syndrome is a common chromosome microdeletion syndrome. Early diagnosis and treatment are very helpful for patients and their families. This study identified the chromosome karyotype in one fetus with ultrasonography abnormalities and three children with developmental disorders from four families. This provided guidance for subsequent pregnancy and prenatal diagnosis by using routine G-banding chromosome karyotyping analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and array comparative genomic hybridization (array-CGH). In one amniotic fluid sample from a pregnant woman with fetal abnormalities on an ultrasound screen and three peripheral blood samples from three children with developmental disorders, the decreased signal of ELN gene probes at 7q11.23 and heterozygous deletions at 7q11.23 were detected by MLPA and array-CGH analysis. The laboratory genetic tests of amniotic fluid samples were normal when the mothers from the four families became pregnant again. It was concluded that MLPA and array-CGH are rapid and accurate tools for the diagnosis of Williams-Beuren syndrome and can provide more information for clinical genetic counseling. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(12): 1267-1272]

Key words: Williams-Beuren syndrome; Multiplex ligation-dependent probe amplification; Array comparative genomic hybridization

Williams-Beuren 综合征 (OMIM: 194050) 是一种由染色体 7q11.23 区域微缺失导致的累及多系统缺陷的罕见病, 缺失大小一般介于 1.5~1.8 Mb 之间, 累及 26~28 个基因, 发病率约为 1/10000^[1-2], 在微缺失综合征中比较常见。Williams-Beuren 综合

征主要临床表现有: 特殊面容, 包括鼻梁低平、鼻孔前倾、眶周丰满、小下颌等; 先天性心血管畸形, 最常见为主动脉瓣上狭窄 (SVAS); 内分泌系统异常, 如高血钙、高血糖、甲状腺功能异常; 智力低下; 发育迟缓; 认知行为异常等^[1,3]。

[收稿日期] 2015-07-17; [接受日期] 2015-08-27

[作者简介] 刘洋, 男, 硕士研究生。

[通信作者] 谢建生, 男, 教授。

早期诊断 Williams-Beuren 综合征有助于对患儿进行及时治疗 and 干预。同时,对该综合征进行产前诊断能够避免夫妇再次生育相同疾病患儿,减少出生缺陷发生率。因此,寻找快速准确的方法早期诊断 Williams-Beuren 综合征能够为患者及其家庭提供重要帮助。本次研究以 4 例 Williams-Beuren 综合征家系为研究对象,借助细胞遗传学及分子遗传学技术进行遗传学诊断及产前诊断。同时结合以往文献报道,以期发现该综合征的产前胎儿异常表现及母体异常等。

1 资料与方法

1.1 研究对象

4 例 Williams-Beuren 综合征家系具体临床信息如下:

家系 1: 孕妇, 23 岁, 孕 2 次, 自然流产 1 次。末次月经为 2013 年 5 月 8 日, 孕 16 周唐氏筛查报告 21 三体风险值为 1/2304, 于停经 24 周 B 超提示胎儿大小约 23 周; 停经 28 周 B 超提示胎儿大小相当于 26⁺³ 周, 胎儿左肾实质回声不均, 肾皮质下见一小液性暗区 4 mm × 4 mm。于停经 29 周行羊膜腔穿刺术, 对羊水细胞行染色体核型分析、多重链接依赖探针扩增计数 (MLPA) 检测 (P095, P036, P070, P245) 及微阵列比较基因组杂交技术 (array-CGH) 检测, 结果发现胎儿为 Williams-Beuren 综合征患儿。经遗传咨询, 孕妇选择引产终止妊娠。2014 年再次妊娠, 末次月经为 2014 年 8 月 27 日, 为避免再次妊娠该类综合征患儿, 孕妇要求行产前诊断。于孕 18 周行羊膜腔穿刺术, 羊水染色体核型分析、MLPA 检测均未发现异常。

家系 2: 患儿, 女, 现 10 岁, 因智力发育落后, 于 3 岁 9 个月大时行智商测定, IQ 结果为 47。患儿呈现特殊面容: 鼻梁低平、鼻孔朝前、眶周丰满、下颌小、牙齿发育不良 (图 1A、B)。染色体核型分析结果为 46, XX, 15S+, 其余临床信息不详。现其母亲再次妊娠, 为避免再次生育相同疾病患儿来我院遗传咨询。抽取患儿外周血行染色体核型分析、MLPA (P245) 检测及 array-CGH 检测, 结果提示患儿为 Williams-Beuren 综合征。其母亲于孕 18 周行羊膜腔穿刺术, 羊水细胞染色体核型

分析、MLPA 检测 (P095, P036, P070, P245) 均未发现异常。

家系 3: 患儿, 女, 其母亲孕期无明显异常。患儿出生后于 5 岁时发现心脏杂音 (胸骨右缘及左缘第二肋间可闻及收缩期 3/6 级杂音, A2<P2), 心脏彩色多普勒超声检查示主动脉瓣上狭窄 (中度), 患儿呈现特殊面容: 眼距宽、眶周丰满、鼻梁低平、鼻孔朝前、下颌小 (图 1C), 拟诊 Williams-Beuren 综合征。家属因经济问题, 未对患儿行手术治疗及进一步遗传学检测。患儿 9 岁时, 其母亲再次妊娠来我院行遗传咨询, 抽取患儿外周血行染色体核型分析、MLPA (P245) 检测及 array-CGH 检测证实患儿为 Williams-Beuren 综合征。于孕 18 周对孕妇行羊膜腔穿刺术, 羊水细胞染色体核型分析、MLPA 检测 (P095, P036, P070, P245) 均未发现异常。

家系 4: 患儿, 男, 其父母拟生育第二胎前来遗传咨询, 自述患儿有先天性心脏病史 (主动脉弓缩窄), 已行手术治疗。就诊时发现患儿逻辑思维混乱, 待人友好, 不惧陌生人, 呈现特殊面容: 眼距宽、眶周丰满、眉毛稀疏、下唇外翻、鼻唇沟长、牙齿发育不整齐 (图 1D、E)。遂抽取患儿外周血行染色体核型分析、MLPA (P245) 检测及 array-CGH 检测, 提示为 Williams-Beuren 综合征。其母亲于 2013 年再次怀孕, 于孕 18 周行羊膜腔穿刺术, 羊水细胞染色体核型分析、MLPA 检测 (P095, P036, P070, P245) 结果均未发现异常。

1.2 染色体核型分析 (G 显带)

外周血及羊水标本经培养后, 常规行 G 显带染色体核型分析。

1.3 基因组 DNA 提取

外周血及羊水标本基因组 DNA 采用 Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen 公司生产) 提取。提取出的 DNA 使用 Nanodrop2000 蛋白核酸分析仪检测 DNA 浓度及纯度。确保 DNA 总量大于 2500 ng, A260/A280 在 1.8~2.0 之间后再进行后续实验。

1.4 MLPA 检测

采用 MLPA P036、P070、P245 试剂盒 (MRC-Holland 公司生产) 对外周血及羊水基因组 DNA 进行 23 对染色体亚端粒微缺失微重复检测及常见染色体微缺失综合征检测 (Prader-willi/Angelman 综

合征、DiGeorger 综合征、Williams 综合征、猫叫综合征等)。羊水标本加做 MLPA P095 检测以排除 13、18、21、X、Y 五种常见染色体非整倍体异

常。实验操作流程均按照 MRC-Holland 公司试剂盒说明书进行。



图 1 3 个不同家系患儿图片 图 A、B 分别显示家系 2 患儿的面部特征及牙齿发育不良；图 C 为家系 3 患儿的面部特征；图 D、E 分别为家系 4 患儿的面部特征及牙齿发育不良。3 个家系之间没有亲缘关联。

1.5 array-CGH 检测

家系 1 标本采用 DNA Chip Version 1.0 (香港中文大学设计) 于 Agilent 芯片检测平台上进行检测；家系 2、3、4 标本使用 Agilent Oligonucleotide array 180 K 芯片进行分析。

2 结果

2.1 染色体核型分析 (G 显带) 结果

家系 2、3、4 患儿的 3 份外周血标本及家系

1 孕妇、家系 2、3、4 患儿母亲的 5 份羊水标本 G 显带核型分析均未发现异常。

2.2 MLPA 检测

家系 2、3、4 患儿的 3 份外周血标本及家系 1 孕妇第 2 次妊娠羊水细胞标本 MLPA P245 检测均发现 7q11.23 区域 ELN 基因探针信号值降低 (图 2)，MLPA P036、P070、P095 检测均无异常发现。其余 4 份羊水细胞标本 MLPA P095、P036、P070、P245 均无异常发现，且胎儿现均已顺利出生，随访至今尚无异常发现。

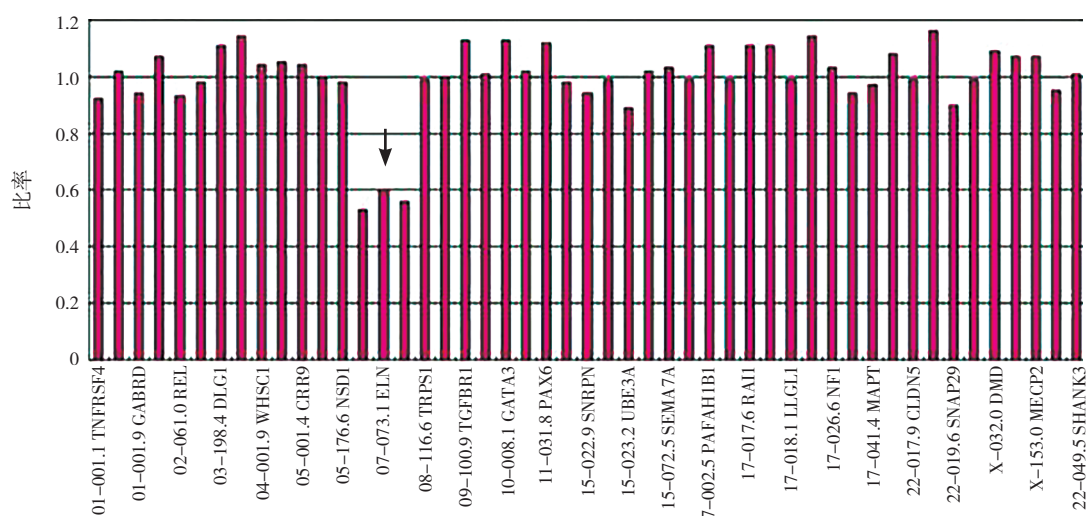


图 2 家系 2 患儿 MLPA (P245) 柱形图结果 与正常女性比较, 可见 ELN 基因探针所处位置信号与正常人信号的比值为 0.5 左右 (箭头所示), 其余探针的信号比值均在 1.0 左右, 由此可判断 ELN 基因所在区域存在缺失。

2.3 array-CGH 检测

家系 1 孕妇第 2 次妊娠羊水标本经 array-CGH 检测发现 arr[hg19]7q11.23 (72,875,683-74,285,345) × 1, 缺失大小约为 1.4 Mb, 检索 Decipher 数据库提示该缺失为致病性, 临床表现为

Williams-Beuren 综合征 (图 3)。3 例患儿外周血标本检测结果均于 7 号染色体 7q11.23 区域 (Chr7: 72,364,314-73,777,467 NCBI136/hg18) 发现 1.413 Mb 的缺失, 经检索 Decipher 数据库提示为 Williams-Beuren 综合征 (图 4)。

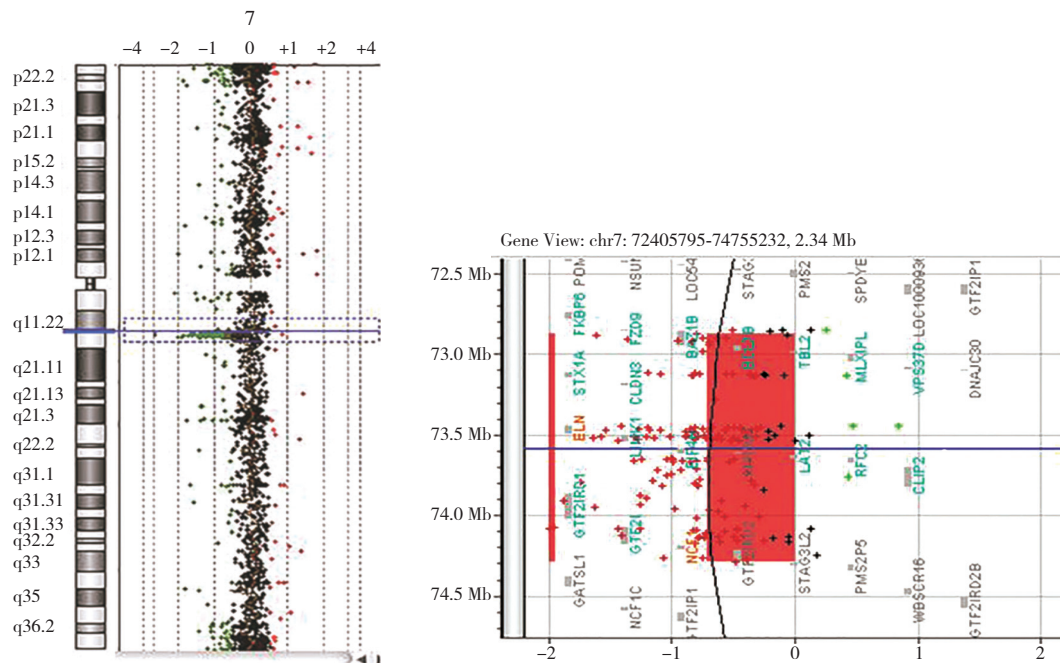


图 3 家系 1 孕妇第 2 次妊娠羊水标本 array-CGH 结果图 左侧显示的是羊水标本 7 号染色体的缺失区域 (蓝色方框所示位置), 右侧为缺失区域放大图。

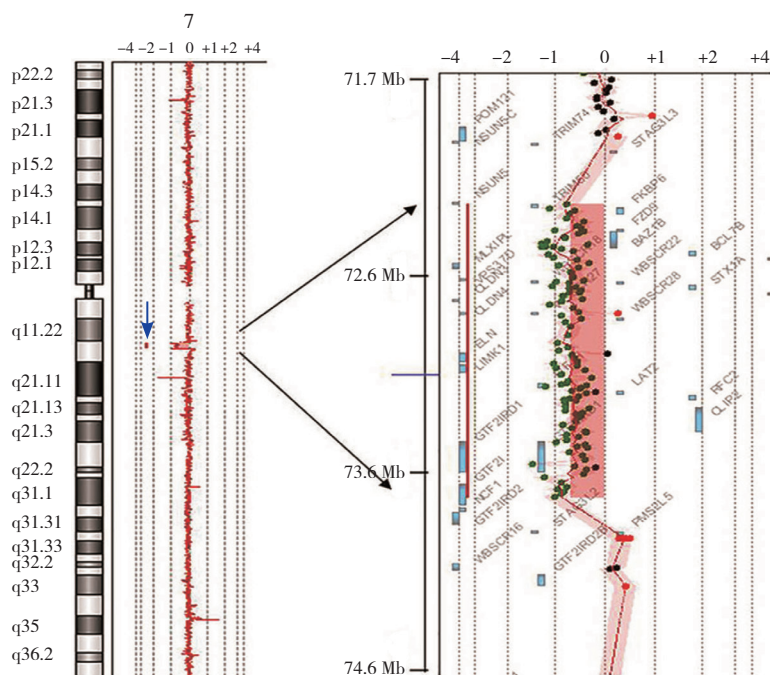


图 4 家系 2、3、4 患儿外周血 array-CGH 结果图 三者缺失区域一致。左侧显示的是 7 号染色体的缺失区域 (蓝色箭头所示位置), 右侧为缺失区域放大图。

3 讨论

Williams-Beuren 综合征心血管系统异常的发生率高达 84%，其中主动脉瓣上狭窄最常见，约见于 69% 的患者中^[4]，ELN 基因的缺失是导致该病心血管异常的主要致病基因^[5-6]。本研究中家系 1 孕妇第 2 次妊娠时，孕 24 周及 28 周 B 超检查均未发现胎儿存在心血管异常，孕妇因胎儿宫内生长受限（IUGR）及肾脏超声异常行羊膜腔穿刺术，最终诊断为 Williams-Beuren 综合征。经询问病史，其余 3 例患儿母亲妊娠期间均未发现明显异常。Marcato 等^[7]曾报道过 7 例 Williams-Beuren 综合征患儿产前异常表现，其中 5 例患儿存在先天性心血管畸形，1 例于胎儿尸检中发现，1 例于孕 23 周行 B 超检查发现室间隔缺损，其余 3 例均于孕 29 或 30 周行 B 超检查发现主动脉瓣上狭窄。上述 7 例患儿中只有 1 例因室间隔缺损行羊膜腔穿刺确诊，5 例因超声发现 IUGR 后行羊膜腔穿刺检查确诊^[7]。因此，IUGR 和心血管异常可能是 Williams-Beuren 综合征患儿在胎儿期最常见的临床表现，而心血管异常于孕晚期检出率更高。肾脏异常也可见于 Williams-Beuren 综合征患者中，其具体发生率不详^[1]。

约 90%~95% 的 Williams-Beuren 综合征患者于染色体 7q11.23 区域缺失约 1.55 Mb，涉及 26~28 个基因。5%~8% 的 Williams-Beuren 综合征患者缺失大小为 1.8 Mb，涉及 28 个基因。二者区别主要在于缺失区域是否包含 NCF1 基因和 GTF2IRD2 基因^[4]。上述两类缺失患者中除高血压发病风险不同之外尚未发现其他表型差异^[8-9]。另外约有 2% 的患者存在非典型缺失。本次研究的 4 例家系中，3 例患儿经 Agilent Oligonucleotide array 180K 芯片检测的标本缺失区域相同，均为 arr[hg18]7q11.23（72,364,314-73,777,467）×1，缺失区域涉及基因从 TRIM50 到 GTF2I，包括了从 FKBP6 到 GTF2I 的所有基因。1 例孕妇经 DNA Chip Version 1.0 检测阳性标本缺失区域为 arr[hg19]7q11.23（72,875,683-74,285,345）×1，包含从 BAZ1B 到 GTF2IR 所有基因，未包含 FKBP6 及 FZD9 两个基因。FKBP6 及 FZD9 基因缺失与 Williams-Beuren 综合征表型的相关性尚不十分明确，FZD9 基因可能与患者骨质减少有关^[1]；FKBP6 基因参与精子

的生成过程，在敲除 FKBP6 基因的雄性小鼠中可观察到无精或少（弱）精等表现，而敲除此基因的雌性小鼠则没有异常^[10]。

Williams-Beuren 综合征属于常染色体显性遗传性疾病，患者染色体变异可遗传自患病父母，但几乎所有 Williams-Beuren 综合征患者的染色体变异是父亲或母亲生殖细胞形成过程中的自发变异，因此对于曾生育过该综合征患儿的健康夫妇，再次生育 Williams-Beuren 综合征患儿的概率小于 1%^[1]。本次的 4 例家系中，夫妇双方再次妊娠时均未发现胎儿存在 7q11.23 区域微缺失。

Array-CGH 技术能够检测出常规染色体核型不能发现的染色体微缺失和微重复，从而大大提高了染色体结构异常的检出率。目前，该项技术已经被推荐作为不明原因生长发育迟缓、智力低下、自闭症谱系障碍以及先天性畸形患儿的一线遗传学检测技术^[11-14]。在产前诊断领域该技术也被推荐为产前超声检查发现胎儿存在结构异常的一线检测方法^[15-16]。MLPA 技术操作简便，成本远远低于 array-CGH 技术，同时又能够对常见的染色体结构异常进行检测，因此该技术可以作为一种筛查技术应用于上述领域。MLPA 技术也可以同 FISH 技术一样作为一种验证方法来对 array-CGH 技术等其他方法检出的染色体结构异常进行验证。通过 MLPA 及 array-CGH 技术，我们能够在产前及新生儿期确诊 Williams-Beuren 综合征患者，从而为孕妇及其家属决定是否继续妊娠提供遗传学参考信息，指导儿科医生对该综合征患儿进行早期治疗和长期管理。

【参考文献】

- [1] Pober BR. Williams-Beuren syndrome[J]. N Engl J Med, 2010, 362(3): 239-252.
- [2] Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome[J]. J Child Neurol, 2002, 17(4): 269-271.
- [3] Gray JC 3rd, Krazinski AW, Schoepf UJ, et al. Cardiovascular manifestations of Williams syndrome: imaging findings[J]. J Cardiovasc Comput Tomogr, 2013, 7(6): 400-407.
- [4] Pober BR, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome[J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1606-1615.
- [5] Delio M, Pope K, Wang T, et al. Spectrum of elastin sequence variants and cardiovascular phenotypes in 49 patients with Williams-Beuren syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2013, 161A(3): 527-533.

- [6] Louw JJ, Verleden G, Gewillig M, et al. Haploinsufficiency of elastin gene may lead to familial cardiopathy and pulmonary emphysema[J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(8): 2053-2054.
- [7] Marcato L, Turolla L, Pompilii E, et al. Prenatal phenotype of Williams-Beuren syndrome and of the reciprocal duplication syndrome[J]. *Clin Case Rep*, 2014, 2(2): 25-32.
- [8] Kozel BA, Danback JR, Waxler JL, et al. Williams syndrome predisposes to vascular stiffness modified by antihypertensive use and copy number changes in NCF1[J]. *Hypertension*, 2014, 63(1): 74-79.
- [9] Del Campo M, Antonell A, Magano LF, et al. Hemizyosity at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(4): 533-542.
- [10] Raudsepp T, McCue ME, Das PJ, et al. Genome-wide association study implicates testis-sperm specific FKBP6 as a susceptibility locus for impaired acrosome reaction in stallions[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(12): e1003139.
- [11] Chong WW, Lo IF, Lam ST, et al. Performance of chromosomal microarray for patients with intellectual disabilities/developmental delay, autism, and multiple congenital anomalies in a Chinese cohort[J]. *Mol Cytogenet*, 2014, 7: 34.
- [12] Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, et al. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features[J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2013, 17(6): 589-599.
- [13] 何玺玉, 陈晓春, 李然, 等. 微阵列比较基因组杂交技术对不明原因智力低下 / 生长发育迟缓患儿的分子诊断 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(5): 459-463.
- [14] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies[J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5): 749-764.
- [15] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(23): 2175-2184.
- [16] Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities[J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21(7): 725-730.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

《中国当代儿科杂志》投稿须知 (一)

作者在向本刊投稿前, 请先仔细阅读本刊稿约并参照本刊已发表文章的格式修改整理稿件。本刊稿约刊登在每年的第 1 期, 也可在本刊网站查阅 (www.cjcp.org)。本刊已发表文章可在本刊网站免费浏览下载。

本刊对投稿稿件的格式 (包括字体、字号、行间距、中英文作者姓名及作者单位格式、标题格式、图表格式、参考文献格式等) 要求很严格, 格式不符合要求者会驳回重投, 直至符合要求才接受送审。若作者对格式修改存在疑问, 可直接通过电话 (0731-84327402) 与编辑部取得联系。

中国当代儿科杂志编辑部
2015 年 12 月 1 日