

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.12.003

论著 · 临床研究

智力障碍儿童的亚端粒拷贝数变异检测

朱丽娜 王艳 彭薇 马秀伟 杨晓 刘欣 封志纯

(北京军区总医院附属八一儿童医院, 北京 100700)

[摘要] **目的** 应用多重连接探针扩增技术 (MLPA) 检测亚端粒拷贝数变异, 探讨遗传性智力障碍 (ID) 的发病机制。**方法** 收集 68 例 G- 显带染色体核型分析结果正常的 ID 患儿, 通过 MLPA P036 筛查亚端粒拷贝数变异。**结果** 68 例患儿中检出亚端粒拷贝数异常者 7 例 (10%), 均为缺失突变, 其中 1 例患儿涉及 2 个亚端粒的缺失变异, 另 1 例患儿涉及 4 个亚端粒的缺失变异。**结论** 亚端粒拷贝数变异是遗传性 ID 的重要病因; MLPA 可作为研究遗传性 ID 患儿发病机制的经济、有效的方法。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(12): 1273-1276]

[关键词] 智力障碍; 亚端粒; 拷贝数变异; 多重连接探针扩增; 儿童

Detection of subtelomeric copy number variations in children with intellectual disability

ZHU Li-Na, WANG Yan, PENG Wei, MA Xiu-Wei, YANG Xiao, LIU Xin, FENG Zhi-Chun. Bayi Children's Hospital, General Military Hospital of Beijing, Beijing 100700, China (Feng Z-C, Email: zhjfengzc@126.com)

Abstract: Objective To detect subtelomeric copy number variations in children with genetic intellectual disability (ID) using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), and to investigate the pathogenesis of genetic ID. **Methods** A total of 68 children with ID who had normal results of G-banding karyotype analysis were included in the study. Their subtelomeric copy number variations were detected using MLPA P036. **Results** Among the 68 children with ID, 7 (10%) showed subtelomeric copy number variations, and all the variations were deletion mutations. Among them, 1 case carried 2 subtelomeric microdeletions, and 1 case carried 4 subtelomeric microdeletions. **Conclusions** Subtelomeric copy number variations are important causes of genetic ID. MLPA can be used as an economic and effective method for investigating the pathogenesis of genetic ID.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(12): 1273-1276]

Key words: Intellectual disability; Subtelomere; Copy number variation; Multiplex ligation-dependent probe amplification; Child

智力障碍 (intellectual disability, ID) 是严重影响儿童身心健康、伴有明显神经系统损坏的慢性疾病, 主要临床特征为认知能力和社会适应功能的缺陷, 通常于 18 岁前发病, 发病率为 1%~3%^[1-3]。ID 病因复杂, 可分为遗传性因素及非遗传性因素, 在遗传性 ID 中, 染色体数目及结构异常是最常见的病因^[4]; 近年来研究显示亚端粒的拷贝数变异也是重要的致病原因, 占遗传性 ID 的 5%~10%^[4-5]。大部分染色体亚端粒区域富含基因, 易于发生基

因重组^[6], 导致疾病发生。目前检测拷贝数变异的方法主要有微阵列比较基因组杂交 (CGH)、基因分型为基础的单核苷酸多态性 (SNP)、高通量二代测序、荧光原位杂交等, 但以上方法检测费用昂贵、费时、费力, 基层医院不易推广。多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 技术是一种分子遗传学诊断方法, 可以检测亚端粒的重排, 包括缺失及重复突变^[7-9], 具有经济、高效、易于推广等优点。

[收稿日期] 2015-02-10; [接受日期] 2015-04-06

[作者简介] 朱丽娜, 女, 硕士研究生, 主治医师。

[通信作者] 封志纯, 男, 教授, 主任医师。

本研究采用 MLPA 技术对 68 例遗传性 ID 患儿进行了亚端粒缺失及重复突变检测,旨在探讨遗传性 ID 的病因及遗传学机制,对于 ID 的早期诊断、早期干预及遗传咨询具有重大意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年至 2014 年北京军区总医院附属八一儿童医院门诊就诊的 ID 患儿 68 例,男性 42 例,女性 26 例,年龄在 1~15 岁,父母临床表型正常。

纳入标准:经过智商测定确诊为中度-重度 ID;无明确的脑损伤病史;染色体核型分析正常;头颅影像学检查未见明显异常;智力及语言、运动发育落后;母亲孕产史正常;家族中无智力异常者。

同时选取 50 例智力正常儿童作为对照组,其中男性 25 例,女性 25 例,年龄在 1~15 岁,本研究获得家属书面知情同意及医学伦理委员会的批准。

1.2 研究方法

标本采集:取患儿及父母以及对照组儿童外周血各 1 mL。使用离心柱法(Tiagen 人类血液基因组提取试剂盒)提取外周血 DNA。

筛查亚端粒重排:应用 MLPA-P036 试剂盒(MRC-Holland 公司生产, <http://mrc.holland.com>)检测亚端粒重排,该试剂盒可以对 1~22 号染色体及 X/Y 染色体亚端粒区域进行拷贝数变异检测。筛查结果阳性时采用 MLPA-P070 试剂盒对结果进行验证,该试剂盒探针同样可以检测 23 对染色体的亚端粒重排,但探针结合的部位不同与 P036 试剂盒,因此可见相互验证结果。MLPA 步骤可以分为多重探针杂交、连接、多重 PCR 反应、毛细管电泳及数据采集,每一步骤均严格按照操作说明进行。

MLPA 产物的分析与结果判定:采用 ABI3130 遗传分析仪对 PCR 扩增产物进行毛细管电泳及数据采集,并使用 Genemarker1.6 软件进行数据的分析。根据荧光强度峰值与对照峰值的比值判断是否存在缺失或是重复突变;根据说明书,比值小于 0.7 提示拷贝数减少,即缺失突变;比值大于 1.3 提示拷贝数增加,即重复突变;比值介于 0.7~1.3

之间为正常。

2 结果

2.1 一般资料

68 例遗传性 ID 患儿中共检出亚端粒异常者 7 例(10%),患儿临床特征见表 1。

表 1 染色体亚端粒异常 ID 患儿的临床特征

样本编号	年龄	性别	先天畸形	IQ 值	癫痫病史
ID22	7 岁	男	无	30	有
ID26	14 岁	女	身材矮小,面容异常	28	有
ID51	3 岁	男	无	40	无
ID63	11 岁	女	小头畸形,面容异常	30	无
ID73	8 岁	男	无	25	无
ID75	1 岁	男	无	30	无
ID82	5 岁	女	面容异常,先天性心脏病	35	有

2.2 MLPA 检测结果

7 例染色体亚端粒异常患儿均为缺失突变,其中 1 例患儿(ID82)涉及 2 个基因(BC-2、RABL2B)的缺失突变,另 1 例患儿(ID26)涉及 4 个基因(BC-2、RABL2B、SLC6A12、SOX12)的缺失突变。在 7 例染色体亚端粒异常患儿中,6 例是常染色体亚端粒缺失突变引起,包括:8pter、19qter、22qter、12pter、9pter 和 20pter;1 例患儿是性染色体亚端粒异常引起。正常对照未检测到亚端粒的异常。见表 2。

表 2 MLPA 检测结果

样本编号	突变基因	突变类型	染色体位置	比值
ID22	FBXO25	缺失	8pter	0.448
ID26	BC-2	缺失	19qter	0.470
	RABL2B	缺失	22qter	0.651
	SLC6A12	缺失	12pter	0.645
	SOX12	缺失	20pter	0.224
ID51	DMRT1	缺失	9pter	0.640
ID63	BC-2	缺失	19qter	0.652
ID73	SYBL1	缺失	Xq/Yq	0.524
ID75	BC-2	缺失	19qter	0.621
ID82	BC-2	缺失	19qter	0.625
	RABL2B	缺失	22qter	0.673

3 讨论

ID的病因复杂,30%~50%的ID患者病因不明^[10],随着技术FISH技术及MLPA技术的发展,发现许多不明原因的ID是由亚端粒异常引起的^[11-12];亚端粒位于染色体末端的编码区,含有大量功能基因且易发生重组,但重组机制不明确^[1]。本研究利用MLPA技术对68例ID患儿进行亚端粒重排筛查,发现7例患儿存在该区域变异,检出率为10%,与文献报道一致^[7,13]。在7例染色体亚端粒异常患儿中,6例是常染色体亚端粒缺失突变引起,包括:8pter、19qter、22qter、12pter、9pter和20pter,1例患儿是性染色体亚端粒异常引起,而在其他研究中则显示X连锁型ID占的比例较高^[14-15],可能为本研究中的68例患儿均无异常家族史(即新发突变)导致。

本研究中,患儿ID26和ID82均存在19qter、22qter微缺失改变,部分临床症状相同,如:均具有异常面容(眼距宽、鼻梁低、唇厚、人中长)、智力低下、运动发育落后、自闭症行为、癫痫发作;患儿ID26同时存在12pter、20pter缺失改变,临床症状也更为严重,表现为耳位低、手小、短指畸形、身材矮小,自幼频繁发生抽搐,抗癫痫药物疗效不佳,患儿严重的临床表型可能是与多基因的联合缺失有关。患儿ID82除上述临床症状外,还患有先天性室间隔缺损,先天性心脏病是由于上述亚端粒缺失突变引起,还是环境与基因共同作用致病,目前还难以确定。患儿ID63和ID75均具有19qter缺失,均表现为智力低下,ID63同时还表现为小头畸形及异常面容(双眼斜视、眼距宽、鼻梁低、人中长),与ID26和ID82相似。本研究中,4例患儿均具有19qter缺失,其中3例患者异常面部表型相似,是否为相关基因缺失改变导致的特征性面容,还需进一步研究证实。文献报道,9pter缺失综合征典型的临床表现包括智力低下、三角头畸形及性逆转^[16],但本研究中患儿ID51仅仅表现为智力低下,不伴随其他畸形及性别发育异常。亚端粒拷贝数变异引起遗传性ID临床症状复杂,具有同质异型性,很难找到一种特征性临床表现来区分是某种亚端粒变异所致,影响临床表型的因素多种多样,包括缺失片段的大小、变异所在的染色体位置、缺失片段所含的

基因数目及相关片段是否存在三体等。

目前,检测拷贝数变异的技术主要包括:微阵列比较基因组杂交技术、单核苷酸多态性基因分型为基础的阵列技术及第二代高通量测序技术,但是这些方法操作成本高、价格贵,生物信息学分析难度大、难推广;MLPA技术具有灵敏、高效、省时、省力的特点,易于推广应用,可以作为筛查亚端粒重组的一种常规检测技术。

[参 考 文 献]

- [1] Medina A, Pineros L, Arteaga C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to subtelomeric rearrangements in idiopathic intellectual disability in Colombia[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 50(3): 250-254.
- [2] Perou R, Bitsko RH, Blumberg SJ, et al. Mental health surveillance among children--United States, 2005-2011[J]. *MMWR Surveill Summ*, 2013, 62 Suppl 2: 1-35.
- [3] Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, et al. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society[J]. *Neurology*, 2011, 77(17): 1629-1635.
- [4] 季涛云, 吴晔, 王静敏, 等. 检测不明原因智力障碍/脑发育迟缓儿染色体亚端粒重组突变[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2011, 30(3): 173-177.
- [5] Shevell M, Ashwal S, Donley D, et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society[J]. *Neurology*, 2003, 60(3): 367-380.
- [6] Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres[J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(2): 91-102.
- [7] Wu Y, Ji T, Wang J, et al. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation[J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11: 72.
- [8] Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries[J]. *Eur J Med Genet*, 2011, 54(4): e425-e432.
- [9] 杨月华, 胡娅莉, 朱湘玉, 等. 多重连接探针扩增技术在先天性心脏病22q11微缺失/微重复综合征诊断中的应用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(11): 892-896.
- [10] de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation[J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(4): 606-616.
- [11] Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, et al. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation[J]. *Nat Genet*, 1995, 9(2): 132-140.

- [12] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): e57.
- [13] Novelli A, Ceccarini C, Bernardini L, et al. High frequency of subtelomeric rearrangements in a cohort of 92 patients with severe mental retardation and dysmorphism[J]. *Clin Genet*, 2004, 66(1): 30-38.
- [14] Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(3): 310-316.
- [15] Ravn JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities[J]. *J Med Genet*, 2006, 43(6): 478-489.
- [16] Barbaro M, Balsamo A, Anderlid BM, et al. Characterization of deletions at 9p affecting the candidate regions for sex reversal and deletion 9p syndrome by MLPA[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(11): 1439-1447.

(本文编辑: 王庆红)

· 消息 ·

2016 年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)核心库期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国内外儿科研究及动态、论著(临床研究、实验研究、疑难病研究和病例分析)、临床经验、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月 15 日出版,向国内外公开发行人。2014 年起本刊改为全彩版,版面编排、设计更加美观。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 20 元,全年 240 元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免审稿费,审稿周期 3~6 周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部,邮编 410008

电话:0731-84327402;传真:0731-84327922;Email: ddek7402@163.com;网址: [http:// www.cjcp.org](http://www.cjcp.org)

中国当代儿科杂志编辑部

2015 年 10 月 30 日