

染色体微阵列分析在胎儿唇腭裂畸形中的临床应用

孟卓¹,熊礼宽^{2,3},林小影^{1,2},王辉林^{2,3}

(1.深圳市宝安区妇幼保健院超声科,广东 深圳 518000;

2.深圳市出生缺陷研究重点实验室,广东 深圳 518040;

3.深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室,广东 深圳 518000)

【摘要】 目的 探讨染色体微阵列分析技术(CMA)在产前诊断胎儿唇腭裂畸形(CLP)中的临床应用价值。方法 研究对象为2014年7月至2016年12月期间在深圳市宝安区妇幼保健院产前超声诊断的19例CLP胎儿和2例产前超声漏诊的单一腭裂患儿,其中12例单纯性CLP,9例综合征性CLP。21例样本中羊水13例,脐带血1例,引产胎儿组织2例,新生儿外周血5例。采用染色体核型技术和CMA技术对样本进行检测,获得基因组拷贝数变异(CNVs),对比CMA技术和传统染色体核型技术对唇腭裂患者检出异常结果的敏感性,评估不同类型唇腭裂患者携带CNVs的差异。结果 CMA结果中33.3%(7/21)为CNVs,染色体核型结果中9.5%(2/21)为染色体异常,差异无统计学意义($P>0.05$)。CMA结果中单纯性CLP检出CNVs率为25.0%(3/12),综合征性CLP检出CNVs率为44.4%(4/9),差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 不管是综合征性的唇腭裂,还是单纯性的唇腭裂,使用CMA技术进行分析均较传统染色体核型技术能提高异常检出率,但尚需进一步证实CMA在产前超声诊断唇腭裂胎儿时的临床应用价值。

【关键词】 产前诊断;超声;胎儿;唇腭裂;染色体微阵列分析技术;基因组拷贝数变异

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)03-0336-03

Clinical value of chromosomal microarray analysis in etiological study of fetuses with congenital cleft lip and palate. MENG Zhuo¹, XIONG Li-kuan^{2,3}, LIN Xiao-ying^{1,2}, WANG Hui-lin^{2,3}. 1. Department of Ultrasound, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Healthcare Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA; 2. Shenzhen Municipal Key Laboratory of Birth Defects Screening and Engineering, Shenzhen 518040, Guangdong, CHINA; 3. Central Laboratory, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Healthcare Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To discuss the clinical value of chromosomal microarray analysis (CMA) in the diagnosis of fetal cleft lip and palate (CLP). **Methods** A total 21 CLP cases in Shenzhen Bao'an Maternal and Child Healthcare Hospital from July 2014 to December 2016 were enrolled, in which 19 were diagnosed by prenatal ultrasound and 2 were missed by prenatal ultrasound. There were 12 non-syndromic cases and 9 syndromic cases. Among the patients, 13 amniotic fluid samples, 1 cord blood sample, 2 fetal organic tissue samples and 5 venous blood samples were collected. Chromosome karyotype and CMA technology were used to detect and analyze the samples. Genome copy-number variations (CNVs) were obtained, and the sensitivity of the two methods for detecting cleft lip and palate was compared. The differences in abnormal CNVs in different types of CLP patients were evaluated. **Results** CMA results showed 33.3% (7/21) of CNVs, and karyotype results showed 9.5% (2/21) of chromosomal abnormalities, with no statistically significant difference ($P>0.05$). Of the CMA results, the detection rate of CNVs in non-syndromic CLP was 25.0% (3/12), and the rate of CNVs in syndromic CLP was 44.4% (4/9), but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Compared with the traditional karyotype analysis, CMA technique has slightly higher sensitivity for detection of CLP, but Further studies are needed to confirm the value of CMA.

【Key words】 Prenatal diagnosis; Ultrasound; Fetal; Cleft lip and palate; Chromosomal microarray analysis (CMA); Copy-number variations (CNVs)

我国卫生部2012年发布的《中国出生缺陷防治报告》显示唇腭裂在先天性畸形中排位第三^[1],我国为唇腭裂高发的国家。唇腭裂畸形分为单纯性唇腭裂(70%)和综合征性唇腭裂(30%)^[2]两种类型,前者包括唇裂伴或不伴腭裂(cleft lip with or without cleft palate, CL/P)以及单纯性腭裂(cleft palate, CP)^[3]。由于唇腭裂影响胎儿容貌,常会导致患儿身心发育不良,给社会及父母造成沉重的经济负担,因此产前诊断胎

儿唇腭裂畸形有非常重要的社会意义。随着细胞遗传学的发展,产前超声提示胎儿结构畸形时,可进一步对疾病进行遗传学诊断。过去30年G-带核型分析是产前诊断的首选方法,可以准确地检测大于5 Mb的染色体异常。近年来染色体微阵列分析技术(CMA)作为一种新的分子遗传学技术,其分辨率达到100 k,研究报道在超声发现胎儿异常时采用CMA技术可增加6%的异常率^[4]。目前采用CMA技术对唇腭裂患者进

基金项目:广东省深圳市卫生计生系统科研项目(编号:201401089);广东省深圳市三名工程项目(出生缺陷防治研究与转化团队)

通讯作者:林小影。E-mail:linxiaoying0898@163.com

行检查已经逐步应用到临床诊断^[5]中,但产前诊断胎儿唇腭裂时应用CMA技术进行分析的报道还较少。因此,本项目拟对CMA技术在产前超声诊断胎儿不同类型唇腭裂畸形的临床应用价值进行评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年7月至2016年12月期间在深圳市宝安区妇幼保健院产前超声诊断的19例唇腭裂畸形(cleft lip and palate, CLP)胎儿和2例产前超声漏诊的单一腭裂患儿。其中12例单纯性CLP [1例单一唇裂(isolated cleft lip, CL), 11例CLP]; 9例综合征性CLP [2例单一腭裂(isolated cleft palate, CP), 7例CLP]。综合征性CLP合并的畸形有脑膨出、无叶全前脑、小脑下蚓部发育不良、草莓头、小下颌、法乐氏三联症、主动脉狭窄、肺动脉狭窄、外耳畸形、腹壁裂、左侧多囊性发育不良肾、脊柱弯曲成角、右上肢缺如、足内翻、足外翻、重叠指等。在孕妇知情同意下,产前取羊水或脐血或引产胎儿的组织,产后取出生新生儿外周血作为样本。共21例样本,其中羊水样本13例,脐带血样本1例,引产胎儿组织2例,新生儿外周血5例。

1.2 方法 所有病例样本均事先经常规G显带染色体核型分析,同时用CMA方法检测胎儿样本,根据美国安捷伦公司Array CGH芯片平台(8×60 k)的标准实验操作流程对样本DNA进行处理。使用相配套的CytoGenomics软件对扫描芯片产生的文件进行数据分析。根据美国医学遗传学与基因组学学会指南(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)和国内CMA专家指南,查询公共数据库OMIM、Decipher、DGV及PubMed等以及本实验室的

内部数据库对CNVs结果进行在线比对,结合临床超声结果定义CNVs的性质(良性、意义不明、致病性),筛选出与唇腭裂相关的候选基因。分析唇腭裂是属于单纯性唇腭裂还是合并了其他结构异常的综合征性唇腭裂。对比CMA技术和传统染色体核型技术对唇腭裂患者检出异常结果的敏感性,评估不同类型唇腭裂患者携带异常CNVs的差异。

1.3 统计学方法 应用软件SPSS13.0进行数据分析,组间计数资料比较采用 χ^2 检验或精确概率法,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 21例唇腭裂标本的细胞遗传学比对 共21例唇腭裂病例样本均成功进行了染色体核分析和CMA检测。21例染色体核型分析结果中有2例(9.5%)出现异常,均为47,XY,+18。21例CMA检测结果中有7例(33.3%)出现致病性CNVs。CMA的阳性检出率较染色体核型分析提高了23.8%,但差异无统计学意义($\chi^2=3.535, P=0.060$),这可能是由于本研究样本较小所致。12例单纯性CLP中检出CNVs 3例(25.0%),9例综合性CLP中检出CNVs 4例(44.4%),综合征性CLP的致病性CNVs率高于单纯性CLP,但差异无统计学意义($P=0.397$)。

2.2 7例CNVs结果及超声表现 7例CNVs包含Tri 18、15q21.3q22.2拷贝数重复、5q35.2q35.3拷贝数缺失、15q11.1q11.2拷贝数缺失、1p34.3p34.2拷贝数重复、11q23.3q25拷贝数重复、22q11.1q11.21拷贝数重复。其中2例为Tri 18,这2例在染色体核型分析中也被检出,其余5例在染色体核型分析中显示为正常,见表1。

表1 7例CNVs结果及超声表现

序号	染色体核型	致病性CNV	与之相关的临床表型	是否与唇腭裂相关	本病例临床表型
1	47,XY,+18	Tri 18	胎儿心脏结构异常、胎儿宫内发育迟缓、唇腭裂、双侧的脉络膜囊肿、上消化道狭窄、马蹄肾、双肾上腺缺如、双侧胸腔积液、眼距宽、左手特殊握拳等	有	中央型Ⅲ度唇腭裂、无叶全前脑、草莓头、小下颌、小脑下蚓部发育不良、室间隔缺损、主动脉弓缩窄可能、右手重叠指唇腭裂,其他异常因孕周太小未发现
2	47,XX+18	Tri 18	胎儿心脏结构异常、胎儿宫内发育迟缓、唇腭裂、双侧的脉络膜囊肿、上消化道狭窄、马蹄肾、双肾上腺缺如、双侧胸腔积液、眼距宽、左手特殊握拳等	有	右侧Ⅱ度唇腭裂
3	46,XX	15q21.3q22.2拷贝数重复	包含多个OMIM疾病致病基因,其中ALDH1A2的基因重复;未报道有一例病例报道与Cantrell五联症相关:脐膨出、心脏异位、下部胸骨、前纵隔及心包缺陷	有可能	右侧Ⅲ度唇腭裂
4	46,XX	5q35.2q35.3拷贝数缺失	包含多个OMIM疾病致病基因,其中NSD1的缺失导致了Sotos综合征,该综合征具有儿童期生长过度、巨头畸形、特殊面容、认知障碍等临床表型	未报道	左侧Ⅲ度唇腭裂
5	46,XX	15q11.1q11.2拷贝数缺失	NIPA1:为常染色体显性痉挛性麻痹致病基因。该区域的缺失与发育迟缓、行为异常、癫痫	未报道	Ⅰ度腭裂、左侧多囊性发育不良肾、重叠指
6	46,XX	1p34.3p34.2拷贝数重复	多个OMIM基因,其中MACF1与帕金森相关	未报道	Ⅲ度唇腭裂、小下颌、足外翻、外耳畸形、主动脉狭窄、肺动脉狭窄
7	46,XX	11qter三体	11qter三体:小颌畸形,高足弓,唇腭裂,耳坑,短人中等特殊面容,可能还伴有心脏畸形,智力障碍,男性偶有小阴茎或隐睾生殖系统畸形等	有	无
		22q11.1q11.21拷贝数重复	22q11.2微重复综合征:不同程度的智力低下或学习障碍,发育迟缓和神经发育疾病等	无	

3 讨论

超声是产前筛查胎儿先天性唇腭裂最便捷有效的技术,二维及三维超声成像技术的联合应用可以多角度诊断唇腭裂的位置、类型、程度及是否伴发其他结构畸形,在诊断胎儿唇腭裂畸形中起了重要作用。产前超声检查与胎儿细胞和分子遗传学诊断相结合能有效提高产前诊断的准确性,从遗传学的角度提供更多的疾病信息。

既往研究表明产前超声没有发现合并其他结构异常的唇腭裂与染色体核型异常的相关性较低^[6]。近年来,随着细胞遗传学实验技术的快速发展,对疾病的诊断已经由染色体核型进展到基因片段大小及位点的改变。大量的研究已经证实一些传统的染色体核型检测无法发现的微小异常、微重复和微缺失可以通过CMA进行检测^[7-8],被认为是染色体核型的有利补充。产前超声诊断胎儿唇腭裂时应用CMA检测,已有学者报道此技术能有较高的异常检查率^[9]。本研究中CMA的阳性检出率约为33.3%,高于染色体核型的9.5%。虽然CMA和染色体核型分析的阳性检出率差异无统计学意义,但这可能是由于样本量较小所致。因此,产前超声诊断胎儿唇腭裂时,选择CMA检测有机会发现微小的异常,是染色体核型的有利补充,可为患者提供更多的遗传学信息。

唇腭裂常常合并其他结构异常,本研究病例中有43.0%(9/21)的综合征性唇腭裂。文献报道唇腭裂与约350种综合征有相关性,其中严重的可以致命^[10]。因此,产前超声发现唇腭裂时,必须仔细扫查胎儿其他结构。当唇腭裂合并其他结构异常时,其CNVs检出率高达44.4%,高于单纯性唇腭裂25.0%的CNVs检出率,虽然差异无统计学意义,但以上结果仍提示产前超声诊断综合征性唇腭裂时应考虑胎儿有较大的基因异常的可能性。

本研究中的综合征性唇腭裂合并的其他结构畸形在目前的产前超声诊断中均较为成熟,但有些异常的临床表型在产前超声检查时较难发现,常常要到晚孕期或出生后才出现。本研究中有1例单纯性唇腭裂,孕26周超声检查提示胎儿右侧Ⅲ度单纯性唇腭裂,未发现合并其他结构异常。该患者于孕26周行胎儿脐带血穿刺并进行CMA检测,结果显示在5q35.2q35.3区域存在拷贝数缺失。研究表明该缺失区域包含的NSD1(OMIM:606681)的缺失可导致Sotos综合征,75%的Sotos综合征均由该基因异常引起^[11-12]。Sotos综合征具有儿童期生长过度、巨头畸形、

特殊面容、认知障碍等临床表型,但这些表型在产前超声检查时无法被诊断。目前仅有一篇文献报道该区域的缺失伴发了唇腭裂。该病例是否提示唇腭裂与Sotos综合征具有相关性,尚需进一步研究。因此,即使是单纯性CLP,若选择继续妊娠,必须考虑到有其他临床表型是产前超声无法发现的,本研究结果支持可选择CMA检测。

综上所述,CMA技术在产前超声诊断唇腭裂胎儿的遗传学分析中是染色体核型的有利补充。不管是综合征性的唇腭裂,还是单纯性的唇腭裂,使用CMA技术进行分析均较传统染色体核型技术能提高异常检出率,尤其唇腭裂合并其他结构异常时,其发现CNVs的概率更高。本课题组未来会继续扩大样本量,寻找更多唇腭裂与CNVs的相关性。

参考文献

- [1] 秦怀金,朱军.中国出生缺陷防治报告(2012)[M].北京:人民卫生出版社,2013:2-3.
- [2] Murray JC. Gene environment causes of cleft lip and or palate [J]. Clin Genet, 2002, 61(4): 248-256.
- [3] Mossey PA, Little J, Munger RG, et al. Cleft lip and palate [J]. Lancet, 2009, 374(9703): 1773-1785.
- [4] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis [J]. N Eng J Med, 2012, 367(23): 2175-2184.
- [5] 陈嘉珮,牛振民,乌丹旦,等.中国人群非综合征性唇腭裂患者IRF6基因突变检测[J].中国口腔颌面外科杂志,2014,12(4): 333-336.
- [6] Chmait R, Pretorius D, Moore T, et al. Prenatal detection of associated anomalies in fetuses diagnosed with cleft lip with or without cleft palate in utero [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2006, 27(2): 173-176.
- [7] Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities [J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(6): 1261-1270.
- [8] Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects [J]. Genet Med, 2009, 11(3): 139-146.
- [9] Cao Y, Li Z, Rosenfeld JA, et al. Contribution of genomic copy-number variations in prenatal oral clefts: a multicenter cohort study [J]. Genet Med, 2016, 18(10): 1052-1055.
- [10] Gorlin RJ, Cervenka J, Pruzansky S. Facial clefting and its syndromes [J]. Birth Defects Orig Artic Ser, 1971, 7(7): 3-49.
- [11] Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, et al. Haploinsufficiency of NSD1 causes sotos syndrome [J]. Nat Genet, 2002, 30(4): 365-366.
- [12] Baujat G, Cormier-Daire V. Sotos syndrome [J]. Orphanet J Rare Dis, 2007, 2(1): 36.

(收稿日期:2017-07-20)