

22q11 微缺失与先天性心脏病的关系的研究

杜玉荣¹, 杨焕杰¹, 谭震², 黄昀¹, 李树林²,
田家伟³, 张贵寅¹, 李璞¹, 傅松滨¹

(1. 哈尔滨医科大学医学遗传研究室, 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学附属
第一医院, 哈尔滨 150086; 3. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 哈尔滨 150086)

摘要:应用染色体荧光原位杂交(FISH)技术,对25例不同表型的先天性心脏病患者外周血标本进行22q11微缺失的检测,以探讨先天性心脏病与22q11微缺失的关系。受检的23例单纯性先天性心脏病患者,无22q11缺失者为19例,发生缺失者为4例;2例法鲁氏四联症伴心外多发畸形患者,有22q11缺失。上述结果表明,先天性心脏病与22q11微缺失有关。

关键词:荧光原位杂交;先天性心脏病;染色体微缺失

中图分类号:R596

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2005)06-0873-04

Study on the Relationship Between 22q11 Microdeletion and Congenital Heart Disease

DU Yu-Rong¹, YANG Huan-Jie¹, TAN Zhen², HUANG Yun¹, LI Shu-Lin²,
TIAN Jia-Wei³, ZHANG Gui-Yin¹, LI Pu¹, FU Song-Bin¹

(1. Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University Harbin 150086, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University Harbin 150086, China)

Abstract: To investigate if microdeletion of chromosome 22q11 is an epidemiologically important cause of congenital heart disease (CHD), we studied 25 cases with CHD phenotypes. Venous blood samples were tested by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for microdeletion of 22q11. Among 23 cases with simple CHD, 19 were shown not to have microdeletion of 22q11 and the other 4 cases were shown to have 22q11 microdeletion. Microdeletion of 22q11 was found in 2 cases with Tetralogy of Fallot (TOF) accompanied by multiple malformations. The results suggested that microdeletion of 22q11 was associated with CHD.

Key words: FISH; congenital heart disease; chromosome microdeletion

先天性心脏病(CHD)是一种严重威胁患儿健康的常见出生缺陷,其主要临床表现为心脏、血管的发育异常,包括室间隔缺损(VSD)、房间隔缺损(ASD)、动脉导管未闭(PDA)、法氏四联症(TOF)、主动脉弓离断(IAA)、主动脉右置、永存动脉干(TA)等症。较严重的先心病多伴有心外畸形及多种功能障碍,如腭裂、唇裂、免疫功能下降、语言障碍、身体

和智力发育不良等。有报道先天性心脏病与22q11.2微缺失相关^[1~3],但也有作者认为单纯的、非综合征的先天性心脏缺陷与22q11微缺失无关^[4~6]。

本研究应用荧光原位杂交技术,对25例不同表型的先天性心脏病患者22q11微缺失进行检测以探讨22q11缺失与先天性心脏病间的关系。

收稿日期:2004-12-13;修回日期:2005-05-19

作者简介:杜玉荣(1975—),女,硕士,专业方向:遗传学与细胞生物学。E-mail: yurongdudu@yahoo.com.cn; Tel: 0451-86631911

通讯作者:傅松滨(1962—),男,教授,博士生导师,研究方向:医学遗传学。E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 病例

25 例不同表型、不同性别的先天性心脏病患者, 年龄 4 个月至 19 岁。其中病例 1~14, 22~25 由辽宁省计划生育研究所提供; 病例 15~21 由哈尔滨医科大学附属第一、二医院提供。临床表型: 病例 1, 卵圆孔未闭; 病例 2~8, 室间隔缺损; 病例 9~10, 动脉导管未闭; 病例 11, 动脉导管未闭伴二、三尖瓣脱垂; 病例 12, 肺动脉瓣狭窄; 病例 13, 先天性单心室; 病例 14, 法鲁氏四联症伴异常面容; 病例 15, 法鲁氏四联症伴唇裂。病例 16~25, 单纯法氏四联症。

1.2 实验方法

1.2.1 制片

按文献[7]制备患者外周血淋巴细胞染色体标本。

1.2.2 G 显带后荧光原位杂交

取 1 μL 22q11 区带特异性探针, 加 0.5 μL Cot1 DNA 与 3.5 μL MM2.1 杂交液混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 20 min。G 显带玻片标本经甲醇脱色、乙醇系列脱水、气干后, 固定两次, 1 \times PBS 漂洗, 乙醇系列脱水, 气干。置 70 $^{\circ}\text{C}$ 预温的 70% 甲酰胺/2 \times SSC 中变性 3 min, 冰乙醇梯度脱水、气干。将变性的探针滴于玻片上, 橡胶水封片,

37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。将玻片置于 50% 甲酰胺/2 \times SSC、1 \times SSC 漂洗各 3 次, 分别加入 avidin-FITC 及其抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育各 30 min, 每次孵育后, 4 \times SSC/0.1% Tween20 中, 42 $^{\circ}\text{C}$, 漂洗 3 次, 最后经系列乙醇脱水, 气干, 加碘化丙啶(PI)复染。

1.2.3 非显带标本荧光原位杂交

染色体标本乙醇脱水, 气干, 放入 70% 甲酰胺/2 \times SSC 中, 73 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。将 7 μL 杂交母液, 1 μL N25 探针与 2 μL 三蒸水混匀, 离心, 于 73 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。将变性后的探针加在气干的玻片标本上, 盖上盖玻片, 用橡胶水封严, 放在湿盒中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 12~16 h。玻片置于预温的 50% 甲酰胺/2 \times SSC 中, 46 $^{\circ}\text{C}$ 漂洗 3 次, 每次 10 min。2 \times SSC 中, 46 $^{\circ}\text{C}$ 漂洗 10 min, 2 \times SSC/0.1% NP-40 中, 46 $^{\circ}\text{C}$ 漂洗 5 min, 经系列乙醇脱水, 气干, 加 DAPI 复染。

1.2.4 荧光显微镜观察 (Zeiss)

Cytovision(Applied Imaging)分析并打印照片。

1.2.5 统计分析

使用 SAS 6.12 软件, 用 CMH χ^2 方法分析先天性心脏病类型与 22q11 缺失之间的关系。

2 结果

2.1 FISH 分析结果

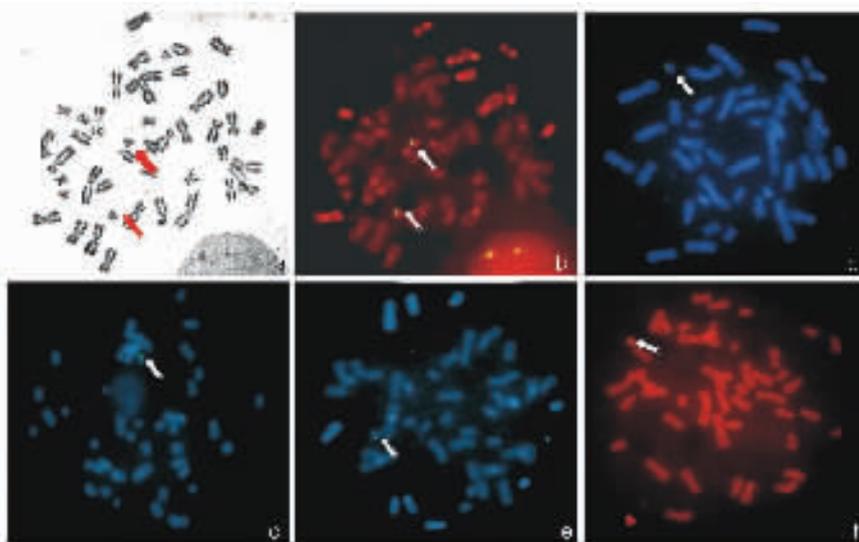


图 1 22q11 缺失检测结果

a: 卵圆孔未闭患者 G 显带结果; b: 卵圆孔未闭患者 22q11 缺失检测结果, 箭头所示 22q11 区域有 2 个杂交信号; c: 动脉导管未闭患者 22q11 缺失检测结果, 箭头所示 22q11 区域有 1 个杂交信号; d: 动脉导管未闭伴二、三尖瓣脱垂患者 22q11 缺失检测结果, 箭头所示 22q11 区域有 1 个杂交信号; e: 肺动脉瓣狭窄患者 22q11 缺失检测结果, 箭头所示 22q11 区域有 1 个杂交信号; f: 法氏四联症伴多发畸形患者 22q11 缺失检测结果, 箭头所示 22q11 区域有 1 个杂交信号。

Fig.1 Deletion result of 22q11

a: The result of G-banding in the case with Patent Foramen Ovale; b: Detection of 22q11 microdeletion in the case with Patent Foramen Ovale. The arrow shows two 22q11 hybridization signals; c: The result of 22q11 microdeletion in the case with Patent Ductus Arteriosus. The arrow shows one 22q11 hybridization signal; d: The result of 22q11 microdeletion in the case with Patent Ductus Arteriosus accompanied by Mitral or Tricuspid Valve Prolapse. The arrow shows one 22q11 hybridization signal; e: The result of 22q11 microdeletion in the case with Pulmonary Valve Stenosis. The arrow shows one 22q11 hybridization signal; f: The result of 22q11 microdeletion in the case with Tetralogy of Fallot accompanied by multiple malformations. The arrow shows one 22q11 hybridization signal.

病例 1,卵圆孔未闭,G 显带核型正常(图 1-a),FISH 检测有 2 个特异信号(图 1-b),表明 22q11 无缺失;病例 2~8,室间隔缺损,G 显带核型正常,FISH 检测有 2 个特异信号,表明 22q11 无缺失;病例 9~10,动脉导管未闭,FISH 检测有 1 个特异性信号(图 1-c),表明有 22q11 微缺失;病例 11,动脉导管未闭伴二、三尖瓣脱垂,FISH 检测有 1 个特异信号(图 1-d),表明有 22q11 微缺失;病例 12,肺动脉瓣狭窄,FISH 检测有 1 个特异信号(图 1-e),表明有 22q11 微缺失;病例 13,先天性单心室,G 显带核型正常,FISH 检测有 2 个特异信号,表明 22q11 无缺失;病例 14~15,法鲁氏三联症伴多发畸形,G 显带核型正常,FISH 有 1 个特异信号(图 1-f),表明有 22q11 微缺失。病例 16~25,单纯法氏三联症,病例 16,G 显带核型正常,FISH 检测有 2 个特异信号,表明 22q11 无缺失。

2.2 统计分析结果

我们将 25 例先心病患者 22q11 缺失检测结果(表 1),采用 CMH χ^2 检验对其进行统计学分析, $P=0.01$,认为先天性心脏病发生与 22q11 微缺失有关。

表 1 25 例先心病患者 22q11 缺失检测结果

Table 1 22q11 microdeletion result of 25 cases patient with CHD

临床表型 Clinical	病例数 Cases	22q11 缺失 22q11deletion	无缺失 Without deletion
卵圆孔未闭 Foramen Ovale	1	0	0
室间隔缺损 Ventricular septal defect	7	0	7
动脉导管未闭 Ductus Arteriosus	2	2	0
肺动脉瓣狭窄 Pulmonary Valve Stenosis	1	1	0
动脉导管未闭伴 二、三尖瓣脱垂 Ductus Arteriosus accompanied by Mitral or Tricuspid Valve Prolapse	1	1	0
法四伴多发畸形 Tetralogy of Fallot accompanied by multiple malformations	2	2	0
先天性单心室 Congenital sigle ventricle	1	0	1
单纯法氏三联症 Tetralogy of Fallot	10	0	10

3 讨论

先天性心脏病(CHD)是一种严重威胁患儿健康的常见出生缺陷,其主要临床表现为心脏、血管的发育异常,较严重的先心病多伴有心外畸形及多种功能障碍,表现为综合征,1993 年,Wilson 以首字母缩写将其命名为 CATCH 综合征,即心脏畸形、异常面容、胸腺发育不良、腭裂和低钙血症,该征包括腭-心-面综合征(VCFs)、先天性胸腺发育不全(Di-George 综合征或 DGS)、圆锥动脉干异常面容综合征(CAFS)等,其病因为 22q11 微缺失^[8],又称为“22q11 缺失综合征”。法氏三联症(TOF)、动脉导管未闭(PDA)、永存动脉干(TA)、离断型主动脉弓(IAA)、肺动脉瓣狭窄等心脏锥干畸形(CTD)以及室间隔缺损(VSD)是先心病常见的表型。有报道 TA 患者 22q11 微缺失发生率为 30%,TOF 约 15%,VSD 约 10%^[1],因此有人提出非综合征的先天性心脏缺陷与 22q11 微缺失有关^[2~3]。但 Amati 对 107 名 TOF 患者进行了检测,结果无一发现 22q11 缺失^[4],说明单独发生的心脏畸形与 22q11 微缺失并无必然联系,Borgmann 和 Yong 的工作也证实,单纯的先天性心脏缺陷与 22q11 微缺失无关^[5,6]。

本研究应用荧光原位杂交技术,对 25 例不同表型的先天性心脏病患者 22q11 微缺失进行检测,以探讨 22q11 缺失与先天性心脏病之间的关系。结果显示,23 例单纯性先天性心脏病患者,4 例有 22q11 微缺失(13%),2 例法鲁氏三联症伴多发畸形患者有 22q11 微缺失,采用 CMH χ^2 检验对上述结果进行统计学分析, $P=0.01$,认为先天性心脏病发生与 22q11 微缺失有关。

基于上述结果,我们认为,凡是先天性心脏病患者,无论其是否合并有其他的畸形或异常,均应进行 22q11 微缺失的检测。一方面,对于一个 22q11 微缺失携带者而言,无论其临床表现轻重如何,其后代获得这一染色体异常的机率都是 50%,并且后代有可能表现为严重的综合征,因此对其做出及时、正确的诊断可以避免有严重综合征患儿的出生。当发现患儿有 22q11 微缺失时,应对其父母进行同样的检测,以便为他们生育第二胎提供准确的遗传咨询。另一方面,“22q11 缺失综合征”能够引起多种多样的临床表型,其范围之广几乎涉及全身所有器官。比如常见的心脏畸形、腭裂、唇裂、胸腺发育不良以

及进食困难、呼吸系统感染、肾脏畸形、学习能力下降、语言功能障碍等等^[9~11]。正因为如此,临床诊断中往往忽略了那些轻微的、不典型的和晚出现的表型,从而使表型与 22q11 微缺失间的关系更为复杂。而对单纯性先天性心脏病患者进行 22q11 微缺失的检测,可以校正临床表型的复杂性、多变性以及临床诊断中范围、手段、方法的局限所造成诊断的不准确性,提高不典型性“22q11 缺失综合征”的检出率。这一方面有助于及时发现和矫治一些较晚才表现出来的先天性缺陷,如语言发育障碍、学习能力低下、精神异常等。另一方面也有助于提高遗传咨询的准确性。

19 例单纯性先天性心脏病,没有检测到 22q11 微缺失。这一结果支持先心病的发生是多基因与环境因素相互作用的结果。研究表明,位于 DGCR 中的 *UFD1L* 基因, *Tbx1* 基因及与 *UFD1L* 相邻的 *CNC45L* 基因可影响神经嵴细胞存活^[9~11],使未成熟的胸腺细胞凋亡,并使组成主动脉弓、腭及颅面结构的细胞减少,影响长期记忆和学习能力,最终导致 CATCH 综合征中的许多表型,除此之外,其他染色体上相关基因及环境因素(宫内环境)的影响也在先天性心脏病的发生中起作用。

参考文献(References):

- [1] Scambler P J. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(16): 2421~2426.
- [2] Yamagishi H, Garg V, Matsuoka R, Thomas T, Srivastava D. A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science*, 1999, 283(5045):1158~1161.
- [3] Webber S A, Hatchwell E, Barber J C. Importance of microdeletions

of chromosomal region 22q11 as a cause of selected malformations of the ventricular outflow tracts and aortic arch: a three-year prospective study. *J Pediatr*, 1996, 129(1):26~32.

- [4] Amati F, Mari A, Digilio M C, Mingarelli R, Marino B, Giannotti A, Novelli G, Dallapiccola B. 22q11 deletions in isolated and syndromic patients with tetralogy of Fallot. *Hum Genet*, 1995, 95(5):479~482.
- [5] Borgmann S, Luhmer I, Arslan-Kirchner M, Kallfelz H-C, Schmidtke J. A search for chromosome 22q11.2 deletions in a series of 176 consecutively catheterized patients with congenital heart disease: no evidence for deletions in non-syndromic patients. *Eur J Pediatr*, 1999, 158(12):958~963.
- [6] Yong D E, Booth P, Baruni J, Massie D, Stephen G, Couzin D, Dean J C S. Chromosome 22q11 microdeletion and congenital heart disease—a survey in a paediatric population. *Eur J Pediatr*, 1999, 158(7):566~570.
- [7] LIU Quan-Zhang. Methodology of Human Chromosome. Beijing: People's Sanitation Press, 1992.
刘权章. 人类染色体方法学. 北京:人民卫生出版社, 1992.
- [8] Wilson D I, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*, 1993, 30(10):852~856.
- [9] Funke B, Epstein J A, Lazaros K Kochilas, Min Min Lu, Pandita R K, Liao Jun, Bauerndistel R, Schüler T, Schorle H, Brown M C, Adams J, Morrow B E. Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(22):2549~2556.
- [10] Novelli G, Amati F, Dallapiccola B. UFD1L and CDC45L: a role in DiGeorge syndrome and related phenotypes? *Trends Genet*, 1999, 15(7):251~254.
- [11] Vitelli F, Morishima M, Taddei I, Elizabeth A. Lindsay and Antonio Baldini. *Tbx1* mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(8):915~922.