

部分型母源性 16 单亲二体型与均称型胎儿生长受限

邓 妮, 尹玉竹, 郝秀兰, 章 钧, 林俊伟, 侯红瑛*
(中山大学附属第三医院产科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】应用人类全基因组单核苷酸多态性芯片(SNP array)探讨特发性均称型胎儿生长受限(Symmetric FGR)的病因。【方法】对血清学筛查唐氏综合征高风险且系列超声检查发现 20 周前已出现胎儿生长受限征象的 36 例孕妇行羊水胎儿细胞 G 显带染色体核型分析,其中核型正常的 34 例孕妇,应用人类全基因组 SNP array 对羊水水中的胎儿细胞及父母双方的外周血细胞进行遗传学分析。【结果】发现 2 例部分型母源性 16 单亲二体型(mUPD 16),1 例位点为 16p12.2-p13.3,长度约为 21.0 Mbp 和 16q24.1-24.3,长度约为 4.1 Mbp;另 1 例位点为 16q21-q24.3,长度约为 24.1 Mbp。【结论】部分型母源性 16 单亲二体型可能与均称型胎儿生长受限的发生有关,影响胎儿生长发育的基因有可能定位于 16q24。

关键词:单亲二体型;均称型胎儿生长受限;单核苷酸多态性芯片; SNP array

中图分类号:R745 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2013)06-0883-05

Segmental Maternal Uniparental Disomy 16 with Symmetric Fetal Growth Restriction

DENG Ni, YIN Yu-zhu, HAO Xiu-lan, ZHANG Jun, LIN Jun-wei, HOU Hong-ying
(Department of Obstetrics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【objective】 To explore the cause of idiopathic symmetric fetal growth restriction with the Genome-wide human single nucleotide polymorphisms array (SNP array). 【Methods】 The amniotic fetal cells of 36 women who had high risk of Down's syndrome by serum screening and had signs of fetal growth restriction before 20 weeks of gestation by serial ultrasound examination were carried out G-banded chromosome karyotype analysis. 34 of these women had normal karyotype. Fetal cells in the amniotic fluids of them and peripheral blood cells of parents were carried out genetic analysis by genome-wide human SNP array. 【Results】 Two cases of segmental maternal uniparental disomy 16 (mUPD 16) were found. The regions of isodisomy of one case located on 16p12.2-p13.3 with the length of about 21 Mbp and 16q24.1-24.3 with the length of about 4.1 Mbp; the region of the other case located on 16q21-q24.3 with the length of about 24.1 Mbp. 【Conclusion】 Segmental maternal uniparental disomy 16 is probably related with the development of symmetric fetal growth restriction. The genes that can affect the fetal growth are probably located in the region of 16q24.

Key words: uniparental disomy; symmetric fetal growth restriction; single nucleotide polymorphisms array; SNP array

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(6):883-887]

均称型胎儿生长受限 (symmetric fetal growth restriction, symmetric FGR)是指胎儿头围、体质量和身长三方面均受限,头围及腹围均小,胎儿体质量低于同孕龄正常体质量的第 10 位百分数,在妊娠 20 周前出现,在 FGR 中约占 20%~30%,其病因多而复杂,但相当部分的病因为特异性的,至今未明^[1-2]。人类全基因组单核苷酸多态性芯片(single nucleotide polymorphisms array, SNP array)是目前

研究基因功能,寻找与疾病相关的基因及其突变位点,以及进行遗传连锁分析的一种重要手段^[3]。中山大学附属第三医院自 2012 年起,应用 SNP array 对羊水水中的胎儿细胞及父母双方的外周血细胞进行遗传学分析,以探寻常规染色体核型分析不能发现的均称型胎儿生长受限的病因,共发现 2 例部分型母源性 16 单亲二体型(maternal uniparental disomy 16, mUPD 16),现报道如下。

收稿日期:2013-07-03

基金项目:广东省科技计划项目(2009B060700107);广东省科学技术厅承担政府特定任务项目(2011B061200045)

作者简介:邓妮,硕士,主治医师, E-mail: dengni2011@hotmail.com; * 通信作者:侯红瑛,主任医师,硕士生导师, E-mail: gdgzhhyy@163.com

1 材料和方法

1.1 研究对象

我院自 2012 年 1 月起至 2013 年 6 月,共 36 例因血清学筛查唐氏综合征高风险在妊娠中期需行羊水细胞 G 显带染色体核型分析的病例纳入研究,孕妇年龄 24~41(31±5)岁,纳入标准:孕期系列超声检查提示妊娠 20 周前即存在胎儿生长受限征象,其双顶径、股骨长、腹围及胎儿体质量估计等胎儿生物学指标均低于正常孕龄的第十位百分数^[4],并已排除其他可能导致均称型胎儿生长受限的高危因素的存在,如 TORCH 综合征、宫内感染、抗磷脂抗体综合征、存在狼疮抗凝物等。已取得孕妇及其丈夫的知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 羊水细胞 G 显带染色体核型分析 36 例孕妇通过羊膜腔穿刺术抽取羊水行羊水细胞培养染色体分析的孕周是 18~24 周。在超声引导下经腹抽吸羊水 20 mL,分别装在 2 支消毒试管内,加盖。取出的羊水离心 10 min,弃上清液,留 1 mL 左右羊水混匀细胞沉淀物成细胞悬液,其中一管行羊水细胞培养 G 显带染色体核型分析。

1.2.2 羊水细胞 SNP array 分析 另外一管羊水细胞悬液使用 Qiasm DNA mini kit(Qiagen,德国)提取 DNA 后定量选取 200 ng 采用人类全基因组 SNP 分型芯片 Cyto-12(Illumina,美国)进行拷贝数变异基因芯片分析和单核苷酸多态性分析,以期发现染色体上微小片段的拷贝数变异(Copy number variation, CNV)和丢失杂合性(Loss of heterozygosity, LOH)。

1.2.3 父母亲外周血淋巴细胞 G 显带染色体核型分析及 SNP array 分析 用 EDTA 抗凝管抽取孕妇及其配偶肘静脉血各 2 mL,混匀后取 200 μL 用于提取 DNA 并行淋巴细胞培养 G 显带染色体核型分析及 SNP array 分析。

2 结果

2.1 羊水细胞培养 G 显带染色体核型分析结果

36 例纳入研究的病例中,羊水细胞培养 G 显带染色体核型分析发现 2 例染色体核型异常,1 例 47XY,+21,另 1 例 47XY,+18。余 34 例核型均正

常 46XX(XY)。

2.2 羊水中胎儿细胞的 SNP array 扫描分析结果

G 显带染色体核型分析核型正常的 34 例孕妇的羊水细胞运用人类全基因组 SNP array 技术进行遗传学分析,共发现 2 例部分型 16 单亲二体型,其余 32 例部分样本检测到小片段拷贝数变异,经与正常多态性国际数据库(DGV)比对后均属于正常多态性。2 例单亲二体型具体情况如下。

例 1: 28 岁,孕 1 产 0,月经规律,周期 30 d,停经 45 d 时超声检测提示“宫内妊娠 6⁺周,胚胎存活”。停经 19⁺周时超声检测提示“双顶径 39 mm,股骨长 23 mm,腹围 129 mm,胎儿体质量估计 208 g,胎儿大小相当于 17⁺周”,双顶径、股骨长、腹围及胎儿体质量估计均小于正常孕龄的第十位百分数^[4]。停经 20⁺周时因唐氏综合征筛查高风险行羊水细胞学检查,G 显带核型分析显示核型为 46,XX。进一步用 SNP array 对羊水细胞进行遗传学分析,结果显示 16 号染色体短臂末端和长臂末端存在单亲二体型区域,具体位置是 p12.2-p13.3,长度约为 21.0 Mbp;16q24.1-q24.3,长度约为 4.1 Mbp(图 1)。停经 24⁺周时三维超声结果显示无明显的严重畸形,双顶径 53 mm,股骨长 37 mm,腹围 170 mm,胎儿体质量估计 462 g,均小于正常孕龄的第十位百分数。该孕妇进行定期规律的产前检查,在停经 31⁺周时发现存在重度子痫前期,经积极治疗后无好转,于停经 32⁺周时剖宫产终止妊娠,出生体质量 1 050 g,小于正常孕龄的第十位百分数,新生儿未发现明显的结构畸形。

例 2: 29 岁,孕 4 产 0,月经规律,周期 28 d,停经 13⁺周超声检查提示“头臀径 68 mm,胎儿大小相当于 13⁺周”。停经 18⁺周超声检查提示双顶径 37 mm,股骨长 22 mm,腹围 106 mm,胎儿体质量估计 166 g,胎儿大小相当于 16⁺周”,双顶径和股骨长、腹围及胎儿体质量估计均小于正常孕龄的第十位百分数^[4]。停经 22⁺周因外周血唐氏综合征筛查高风险行羊水细胞学检查,G 显带核型分析显示核型是 46,XY。进一步用 SNP array 对羊水细胞进行遗传学分析,结果显示 16 号染色体长臂末端存在单亲二体型区域,具体位置为 16q21-q24.3,大小约 24.1 Mbp(图 2)。停经 24⁺周时三维超声结果显示无明显的严重畸形,双顶径 54 mm,股骨长 39 mm,腹围 181 mm,胎儿体质量估计

530 g,均小于正常孕龄的第十位百分数。孕妇在停经 36⁺ 周时自发性胎膜早破早产,出生体质量 1 950 g,小于正常孕龄的第十位百分数,新生儿未发现明显结构畸形。

2.3 父母亲外周血淋巴细胞 G 显带染色体核型分析及 SNP array 分析结果

胎儿父母亲外周血细胞 G 显带染色体核型分析提示核型正常,分别为 46,XY 和 46,XX。SNP array 遗传学连锁分析提示 2 例胎儿部分型 16 染色体单亲二体型为母源性。

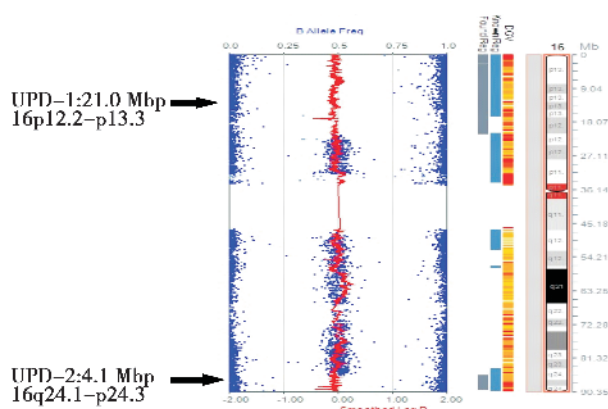


图 1 例 1 的 SNP array 检测结果

Fig.1 SNP array result of Case 1

SNP array analysis revealed loss of heterozygosity on 16p12.2-p13.3 with the length of about 21 Mbp and 16q24.1-24.3 with the length of about 4.1 Mbp.

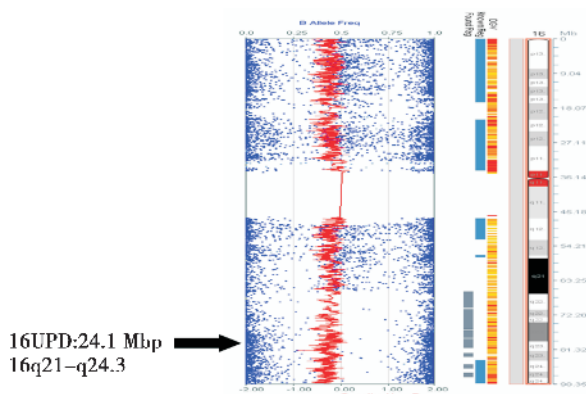


图 2 例 2 的 SNP array 检测结果

Fig.2 SNP array result of Case 2

SNP array analysis revealed loss of heterozygosity on 16q21-q24.3 with the length of about 24.1 Mbp.

3 讨 论

胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)是

产科常见的合并症,是围生儿死亡,新生儿病态及长期生长发育障碍的重要原因,根据 FGR 出现的时间和胎儿发育是否均称,又分为均称型 FGR (symmetric FGR) 和非均称型 FGR (asymmetric FGR)。其中均称型 FGR 在妊娠 20 周前即出现,这段时期为胎儿发育的第一阶段,主要以细胞增殖为主,其病因多而复杂,包括病毒感染、胎儿染色体核型异常、接触放射性物质及其他有毒物质等,但相当一部分均称型 FGR 的病因为特发性的,至今未明^[2]。

本研究通过羊水胎儿细胞 G 显带染色体核型分析,发现了 2 例染色体核型异常,1 例 47XY,+21,另 1 例 47XY,+18,染色体异常是均称型胎儿生长受限的重要原因之一。另外,本研究通过 SNP array 发现了 2 例单亲二体型,这是传统染色体核型分析无法发现的细微 DNA 改变,为探求特发性均称型 FGR 的病因提供了新的方法。mUPD 16 是指 16 号染色体的两条同源染色体全部(整体型)或部分区域(部分型)均来自母亲。自 Engel 于 1980 年将单亲二体型(uniparental disomy, UPD)引入医学遗传学以来^[5],UPD 对胎儿发育的影响逐渐引起人们的关注^[6]。本研究中发现的 2 例单亲二体型均为 mUPD 16,胚胎均在妊娠 20 周前出现了均称型胎儿生长受限征象,新生儿出生时的体质量均小于正常孕龄的第十位百分数。妊娠中期的三维彩色超声检查均未发现胎儿存在明显的畸形,出生后亦未发现明显的新生儿结构畸形。另外,例 1 在妊娠晚期出现重度子痫前期,妊娠 28~40 周是胎儿发育的第三阶段,细胞增生肥大为其主要特征,这个阶段发生的 FGR 属非均称型^[2],全身小血管痉挛导致的胎盘灌流下降无疑进一步加重了该胎儿在第一阶段就已经存在的生长受限程度。

已经发表的为数不多的文献报道中,mUPD 16 对胎儿的影响并不一致,部分病例因胎儿或母亲的原因而妊娠终止^[7],胚胎存活继续妊娠或活产儿的病例中,部分表型完全正常,部分仅存在胎儿生长受限,少部分存在畸形,如心脏结构异常、胎儿体蒂异常、中枢神经系统异常、肛门闭锁等,且在存在胎儿畸形的病例中,胎盘特异性嵌合体及胎儿生长受限均普遍存在^[8]。学者们对 mUPD 16 单亲二体型是否是导致胎儿生长受限的原因方面存在着较大的分歧^[9]。这可能与以

下三方面的因素有关。一是报道的病例少,据 Kotzor 等^[8]2005 年统计,文献报道的 16-mUPD 约为 50 例。作为诊断染色体疾病的常规技术,染色体核型分析无法检测单亲二体型、染色体杂合性缺失等细微 DNA 异常改变;而 FISH 技术虽可精确分辨细微的 DNA 改变,但只能对 1 个或数个已知区域进行检测。而随着近年来基因芯片技术的发展,尤其是 SNP array 技术的应用,才能对上千种甚至更多基因的表达水平、突变和多态性进行检测,才使单亲二体型的诊断成为可能。二是,分析 mUPD 16 对胎儿生长的影响时,很难排除胎盘特异性嵌合体(confined placental mosaicism, CPM)的干扰。在 mUPD 16 形成的三体补救(trisomy rescue)过程中,会有相当数量的二体/三体嵌合体存在,CPM 是指染色体嵌合体仅存在于胚外组织胎盘绒毛组织,而未存在于胎儿组织细胞中,故在胎儿细胞的 G 显带染色体核型分析中核型显示为正常。mUPD 16 常和 CPM 同时存在,CPM 引起的胎盘结构异常,会影响胎儿的血液供应,从而导致营养不足和 FGR。但一般认为,CPM 不会引起胎儿结构的畸形,且发生严重 FGR 的病例中往往有 CPM 和 UPD 的共存,从而推断 UPD 对胎儿生长发育的可能有相当程度的影响,但目前尚无定论^[10]。三是,在已报道的 mUPD 16 病例中,分型较为复杂,除整体型和部分型外,尚可分为单亲二体型(一对同源染色体均来自母亲的同一条染色体 isodisomy)和单亲异二体型(一对同源染色体分别来自母亲的一对同源染色体 heterodisomy),不同类型的单亲二体型的形成与染色体不分离(non-disjunction)的发生有关,但不分离发生的时段(有丝分裂和减数分裂 I 期,II 期)并不相同,对胎儿发育的影响亦不尽相同^[11]。在本研究中,2 例 mUPD 16 均为部分型,且单亲二体型区域均未包含着丝粒在内,其形成机制可能与有丝分裂过程中染色体不分离有关,同源染色体中一条染色体发生了不包含着丝粒在内的部分缺失,其缺失的杂合性由另一染色体的相对应部分进行复制来弥补^[12]。

本研究发现的 2 例部分型单亲二体型,其中 1 例的单亲二体型区域(region of isodisomy)位于染色体短臂末端和长臂末端上,具体位点是 p12.2-p13.3,长度是 21 Mbp 和 16q24.1-24.3,长度约为 4 Mbp。另 1 例单亲二体型区域位于染色体长臂

上,具体位点为 16q21-q24.3,大小为 24 Mbp。目前,mUPD 16 影响胎儿生长的作用机制仍不清楚,一般认为可能与印记基因的作用^[6]或常染色体隐性遗传致病基因的暴露有关^[9]。在父母受精卵形成过程中,特异性地对源自父亲或源自母亲的等位基因做一印记使其只表达父源或母源等位基因的现象被称作基因印记(gene imprinting)。印记基因与胚胎及胎盘的早期发育有关,mUPD 16 意味着在 16 号染色体的相关区域缺失来自父系基因的影响,若这些基因恰好对生长发育起决定作用时,会导致 FGR 或特异的生长发育异常的出现。另外,来自母系的 16 号染色体特定区域上,可能存在对胚胎发育有不利影响的隐性遗传致病基因,单亲二体型意味着该隐性致病基因成为纯合子,从而导致胎儿生长受限或胎儿畸形等现象的出现。有意思的是,本研究发现的 2 例部分型 mUPD 16 在 16q24.1-24.3 均有单亲二体型区域的存在,提示单亲二体型导致胎儿生长受限的作用机制可能与其在染色体上的定位区域相关,16q24 这一区域可能有影响生长发育的基因存在。另外,有学者认为,UPD 导致的胎儿生长受限的严重程度可能与这一区域的长度相关。Sayeda 等^[13]对发现的 5 例 mUPD 16 的单亲二体型区域进行分析,观察到单亲二体型的定位区域长度越长,胎儿生长受限出现的程度越严重。但在本研究中,2 例的单亲二体型区域长度相差并不大,约为 25.1 Mbp (21+4.1)和 24.1 Mbp,故考虑胎儿生长受限的严重程度可能与单亲二体型区域的长度无关,但不容忽视的是,这一区域的长度越长,常染色体隐性遗传致病基因暴露的概率就越大。同样在 16q24 区域,有学者发现,来自母亲该区域的 MLYCD 基因缺失 ACTG 四个碱基,胎儿该区域单亲二体型的形成使这一隐性遗传致病基因得以暴露,从而引起常染色体隐性疾病丙二酸单酰辅酶 A 脱羧酶缺乏症(malonyl CoA decarboxylase deficiency)^[9]。

SNP array 使单亲二体型、染色体杂合性缺失等细微的 DNA 改变的发现成为可能,在产前诊断中不失为传统染色体核型分析的重要补充。尽管目前 SNP array 发现的相当一部分拷贝数变异的临床意义并不明确,且有相当一部分属于正常变异^[3],但根据遗传学现有研究结果,在正常人群中是不存在 mUPD 16 的^[8]。综上所述,部分型 mUPD 16 可能与均称型胎儿生长受限的发生有关,其作

用机制,可能与单亲二体型在染色体上的定位区域相关,16q24这一区域可能有决定影响生长发育的基因存在。在以后的研究中,应进行相关区域的印记基因分析及基因序列分析,以进一步明确单亲二体型导致均称型FGR的作用机制是由于印记基因的作用,抑或是与常染色体隐性致病基因的显露有关。

参考文献:

- [1] Brodsky D, Christou H. Current concepts in intrauterine growth restriction [J]. *Intensive Care Med*, 2004, 19(6): 307-319.
- [2] Moh W, Graham JM Jr, Wadhawan I, et al. Extrinsic factors influencing fetal deformations and intrauterine growth restriction [J/OL]. *J Pregnancy*, 2012, 2012: 750485. doi: 10.1155/2012/750485. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409542>
- [3] Ganesamoorthy D, Bruno DL, McGillivray G, et al. Meeting the challenge of interpreting high-resolution single nucleotide polymorphism array data in prenatal diagnosis: does increased diagnostic power outweigh the dilemma of rare variants [J]. *BJOG*, 2013, 120(5): 594-606.
- [4] 严英榴, 杨秀雄. 产前超声诊断学 [M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 52-57.
Yan YL, Yang XX. *Ultrasonography in obstetrics* [M]. Second edition. Beijing: People's medical publishing house Co.LTD, 2012: 52-57.
- [5] Engel EA. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy [J]. *Am J Med Genet*, 1980, 6(2): 137-143.
- [6] Kotzot D. Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2008, 31(1): 100-105.
- [7] Kondo Y, Tsukishiro S, Tanemura M, et al. Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion [J]. *J Hum Genet*, 2004, 49(4): 177-181.
- [8] Kotzot D, Utermann G. Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated [J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 136(3): 287-305.
- [9] Malvagis S, Papi L, Morrone A, et al. Fatal malonyl CoA decarboxylase deficiency due to maternal uniparental isodisomy of the telomeric end of chromosome 16 [J]. *Ann Hum Genet*, 2007, 71(Pt 6): 705-712.
- [10] Yong PJ, Barrett IJ, Kalousek DK, et al. Clinical aspects, prenatal diagnosis, and pathogenesis of trisomy 16 mosaicism [J]. *J Med Genet*, 2003, 40(3): 175-182.
- [11] Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(7): 1263-1275.
- [12] Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD) [J/OL]. *Mol Cytogenet*. 2010, 3: 8. doi: 10.1186/1755-8166-3-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853554>
- [13] Abu-Amero SN, Ali Z, Abu-Amero KK, et al. An analysis of common isodisomic regions in five mUPD 16 probands [J]. *J Med Genet*, 1999, 36(3): 204-207.

(编辑 王晓鹰)