

文章编号: 1001-764X(2011)07-551-03

染色体微阵列分析是发育迟缓和先天畸形患者的首选检测*

——浅谈对“国际标准细胞基因组微阵列协会陈述”的理解

崔英霞, 夏欣一(南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所临床中心实验科, 南京 210002)

关键词: 染色体微阵列; 拷贝数变异; 发育迟缓; 智力低下; 孤独症; 多发先天畸形

中图分类号: R722.1

文献标识码: A

染色体微阵列(chromosomal microarray, CMA)技术对于临床上原因不明的发育迟缓(developmental delay, DD)、智力低下(intellectual disability, ID)、各种孤独症(autism spectrum disorders, ASD)和多发先天畸形(multiple congenital anomalies, MCA)的诊断显示了很好的应用前景。最近, 国际标准细胞基因组微阵列(International Standard Cytogenomic Array, ISCA)协会两次召开国际会议并形成文件, 评估了 2003 ~ 2008 年国际上包括 33 组共 21 698 名患者的 CMA 结果, 比较了 CMA 与传统 G-显带技术对于 DD/ID 和 MCA 病因学诊断率的差异, 结果显示 CMA 有很高的敏感性, 对于 DD/ID 的病因诊断率高达 15% ~ 20%, 而传统的 G-显带核型分析诊断率却仅有 3%。因此提出 CMA 对于原因不明的 DD/ID 和 MCA 的病因诊断是首选试验, 可以替代传统的 G-显带核型分析。会议提出了对染色体拷贝数变异的临床解释。

1 染色体微阵列技术平台

CMA 又称为分子核型(molecular karyotyping), 是用微阵列技术即基因芯片技术对受检者基因组拷贝数变异(copy number variations, CNVs)的情况进行检测。CNV 是指与参照基因组比较, 大于 1 kb ~ 1 Mb 的 DNA 片段的缺失、插入、重复和复杂多位点的变异^[1-2]。CNV 广泛存在于人类和其他哺乳动物的基因组中, 是一种重要的结构变异(structural variant), 可分为病理性和良性。CMA 有商业型和学术研究型。目前临床常用的商业型芯片根据设计探针的不同大致分为 3 类: 寡核苷酸的微阵列(oligonucleotide-based array), BAC 克隆的微阵列(BAC-based array)和 SNP 的微阵列(SNP-based array)。早期的微阵列探针密度低, 仅覆盖与疾病相关的靶区域和亚端粒以及着丝粒周围区域, 可检出染色体的微缺失和微重复综合征。随后的微阵列, 增加了探针密度和覆盖率, 除亚端粒和着丝粒周围区域外, 在靶区域外也有探针覆盖, 这种覆盖区域就是所谓的主链(backbone)区域。最近, 高密度的 backbone 微阵列或高密度的基因组微阵列提供了全基因组的覆盖率, 在基因覆盖区域通常可检测到 20 ~ 50 kb 不平衡 CNV, 在亚端粒和着丝粒周围的无基因区(即 backbone 区)可检测到 100 ~ 250 kb 的不平衡^[3], 因此大大提高了疾病的检出率。

2 CMA 和 G-显带技术对原因不明的 DD/ID 和 MCA 病因诊断率的差异

原因不明的 DD/ID 占人群约 3%^[4], 各种 ASD 患者大约占 0.6%^[5], 原因有遗传性因素和非遗传性因素。对这些患者的遗传学病因的诊断, 根据先前发表的指南原则^[6], 首先进行 G-显带的染色体核型分析, 在排除染色体不平衡的基础上, 再对常见的单基因病如脆性 X 染色体综合征和其他相关基因进行检测。G-显带技术作为细胞遗传学的传统检测项目临床应用已接近 40 年, 由于操作方便, 以明确的界标作为判读标准, 有规范的国际命名体制(international system of cytogenetic nomenclature, ISCN), 因此被临床广泛接受。但 G-显带技术与 CMA 技术比较, 分辨率较差, 主观性较强, 对小片段染色体畸变的诊断要求检验人员有丰富的经验。而 CMA 作为一种新型的技术, 在实验技术、覆盖范围和临床解读等方面虽有待进一步的完善, 但由于其分辨率高, 客观性好, 对于原因不明的 DD/ID、ASD 和 MCA 显示了很好的应用前景。ISCA 协会在召开的国际会议上, 充分评估了 33 组共 21 698 名患者的 CMA 和 G-显带的分析结果后发现, CMA 对原因不明的 DD/ID 和 MCA 的遗传学病因诊断率(12.3%)明显高于 G-显带(<3%)。G-显带能够检测到 3 Mb 的基因组的不平衡, 但也常漏掉 5 ~ 10 Mb 的重复或缺失。而目前的寡核苷酸 CMA 可发现小到 500 bp 的基因组不平衡^[7], 在很多区域内可检测出 10 ~ 20 kb 的 CNV。与此类似, Sagoo 等^[8]对 13 926 名 ID 或/和 MCA 患者进行 G-显带和 CMA 的 meta 分析, G-显带正常的个体经 CMA 检测有 10% 的患者能够发现染色体不平衡。尽管 CMA 不能检测平衡易位和低水平的嵌合体, 但在原因不明的 DD/ID 和 MCA 群体中平衡易位和嵌合体比例较低, 仅占不到 1%。在充分比较和论证基础上, ISCA 协会建议^[3], CMA 对于 DD/ID 和 MCA 的病因诊断应为首选, 可替代传统的 G-显带核型分析。但对于产前诊断、白血病核型诊断和其他恶性肿瘤的诊断, 目前不推荐首先使用 CMA 检测。根据美国妇产科学会(American College of Obstetrics and Gynecology, ACOG)的建议^[9], G-显带和荧光原位杂交(FISH)仍然是产前诊断的标准检查。

3 对 DD/ID、MR、MCA、ASD 的临床遗传学检测流程

ISCA 协会推荐的对原因不明 DD/ID、MR、MCA、ASD 的检测流程见图 1^[3]。这类患者首先应该进行 CMA 检查, 根据 CNV 区是否有注释的基因重复或丢失, 是否位于 backbone 区, 将其界定为 3 类: 异常, 正常, 临床意义不确定的变异(variant of uncertain clinical significance, VOUS)。CMA 检测

* 基金项目: 国家自然科学基金(30901652)。

作者简介: 崔英霞, 1954 年生, 女, 主任技师, 从事医学遗传学专业, E-mail: cuiyx55@yahoo.com.cn。

异常的患者还要进行 FISH、G-显带、qPCR 或 多重探针连接扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 检测,以证实 CMA 的结果。对于复发风险 (recurrent risk, RR) 的判定,可与亲代的 FISH 和 G-显带结果进行对比,根据 CNV 是遗传而来还是新发生的突变加以判定。新发生的突变复发风险较低;而源自平衡易位携带者的亲代、源自不平衡的亲代患者,或者源自不平衡的但外显不全的亲代,其复

发风险均增高。对于 VOUS 的患者,则需要对其亲代进行 FISH、CMA、G-显带、qPCR、MLPA 检查,对结果进行对比分析。如果 CNV 是新发生的,属于异常但复发风险较低;如果源自不平衡的但未患病的亲代,属于家族变异;如果源自不平衡的患病的亲代和平衡易位携带者的亲代,则属于异常并且复发风险增高。CMA 检测正常的患者,则根据临床的评估,进一步检测脆性 X 染色体或其他基因。

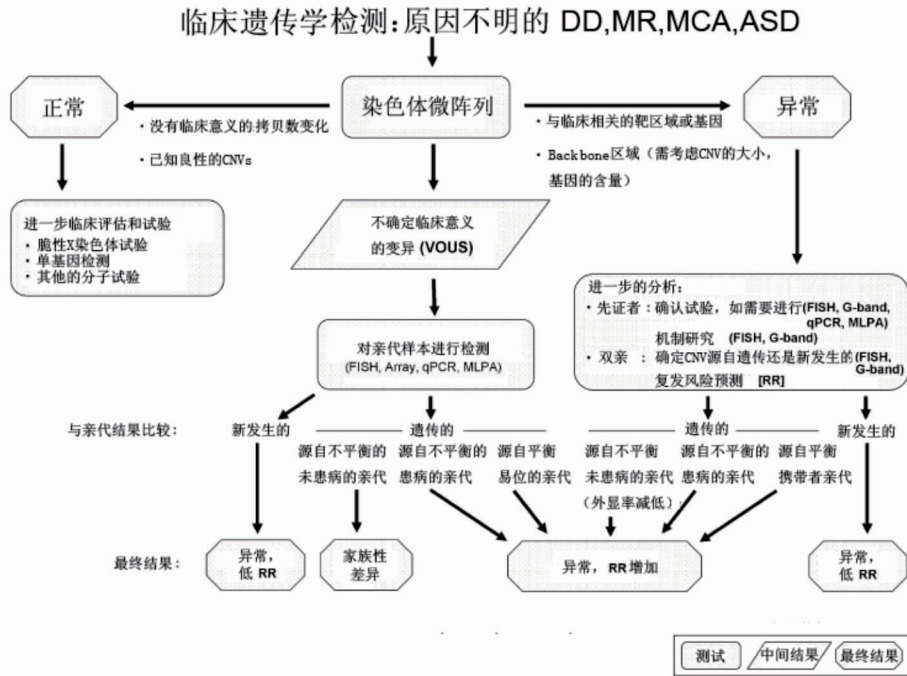


图 1 ISCA 协会提出的对原因不明的 DD/ID、MR、MCA、ASD 的检测流程

4 染色体微阵列结果的分类和判定

CMA 的结果分为两大类:一类是病理性的;一类是良性的。具体分为:(1)大片段新发生的 CNV 位于已知的综合征区域,属于异常或病理性的;(2)VOUS,这类患者经过与亲代的检测结果对比,进一步归为病理性的和良性的;(3)先前没有报告过的 CNV,但遗传自健康亲代,考虑是良性的。以下这些情况^[3]考虑可能为病理性的 CNV:患者与亲代相比,CNV 有扩大;相同的 CNV 源自患病的亲代;类似的 CNV 源自患病的亲属;CNV 位于 DD/ID、MR、MCA、ASD 各种数据库中;CNV 包含疾病基因 (online mendelian inheritance in man, OMIM);CNV 区域含基因丰富。以下这些情况考虑可能为良性的 CNV:相同的 CNV 源自健康的亲代;类似的 CNV 源自健康的亲属;CNV 位于健康人的数据库中,CNV 区域不含基因;拷贝数重复区域没有剂量敏感基因;CNV 不含有已知的基因调控原件。通过群体研究发现, < 500 kb 的 CNV 99% 以上源自遗传^[10],其中 90% ~ 95% 是正常的,在健康人群中,仅有 1% ~ 2% 的个体 CNV > 1 Mb;而病理性的 CNV 通常是新发生的并且 > 1 Mb。但要注意的是,遗传自非典型患病亲代的 CNV,位于染色体 1q21.1 (OMIM 612474 和 612475)^[11]、1q41q42^[12]、3q29 (OMIM 609425 和 611936)^[13]、15q11.2^[14]、15q13.2q13.3 (OMIM 612001)^[15]、16p11.2 (OMIM 611913)^[16]、16p13.11^[14,17] 和 22q11.2 (OMIM 188400 和 608363)^[18],也属于病理性的。这可能由于亲代的临床表

现不典型,呈现较低的外显率和表现度,容易误认为是健康者。因此临床要高度关注,以免漏诊。

目前新推荐的 CMA 国际命名体制概括于 2009 年 ISCN^[19]中,这对实验室间的结果比较、区分病理性和良性的 CNV 具有重要的指导意义。ISCA 协会已经启动了新的 CNV 的数据库,临床 MCA 实验室负责积累临床表型的资料,这些均作为 dbGap (美国卫生院数据库)中的一个计划。不足的是当前 MCA 检测的费用仍然较高。相信随着科技的进步,会进一步完善 MCA 检测的技术平台,降低检测成本,更广泛应用于病理性 CNV 引起的疾病诊断和遗传咨询中。

5 参考文献

[1] Freeman JL, Perry GH, Feuk L, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity [J]. Genome Res, 2006, 16 (8): 949-961.
 [2] Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7 (2): 85-97.
 [3] 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.
 [4] 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.
- [5] Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, *et al.* The epidemiology of autism spectrum disorders[J]. *Annu Rev Public Health*, 2007, 28:235-258.
- [6] Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays[J]. *Pediatrics*, 2006, 117(6):2304-2316.
- [7] Conrad DF, Pinto D, Redon R, *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome[J]. *Nature*, 2010, 464(7289):704-712.
- [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 metaanalysis of 19 studies and 13,926 subjects[J]. *Genet Med*, 2009, 11(3):139-146.
- [9] American College of Obstetrics and Gynecology. ACOG Committee Opinion No. 446: Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis[J]. *Obstet Gynecol*, 2009, 114(5):1161-1163.
- [10] McCarroll SA, Kuruville FG, Korn JM, *et al.* Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(10):1166-1174.
- [11] Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, *et al.* Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(16):1685-1699.
- [12] Shaffer LG, Theisen A, Bejjani BA, *et al.* The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome[J]. *Genet Med*, 2007, 9(9):607-616.
- [13] Willatt L, Cox J, Barber J, *et al.* 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(1):154-160.
- [14] de Kovel CG, Trucks H, Helbig I, *et al.* Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies[J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 1):23-32.
- [15] Miller DT, Shen Y, Weiss LA, *et al.* Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(4):242-248.
- [16] Weiss LA, Shen Y, Korn JM, *et al.* Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(7):667-675.
- [17] Miller DT, Shen Y, Weiss LA, *et al.* Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(4):242-248.
- [18] Derbent M, Bikmaz YE, Yilmaz Z, *et al.* Variable phenotype and associations in chromosome 22q11.2 microdeletion[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(6):659-660.
- [19] Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature [M]. Switzerland: Karger, 2009.

(收稿日期:2010-12-15,修回日期:2011-02-20)

(本文编辑:许晓蒙,陈维忠)