

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:52 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.034.html>

## 应用 PCR 和 FISH 方法诊断 X-连锁隐性鱼鳞病 3 例

张学奇, 刘晶晶, 林孝华, 邵笑红, 蔡剑峰, 徐云升, 李智铭

**摘要** 应用多聚酶链反应(PCR)和荧光原位杂交(FISH)方法对 3 例 X-连锁隐性鱼鳞病(XLRI)患者进行分子诊断。对 2 个 X-连锁隐性鱼鳞病家系 3 例患者及家族成员采集外周血标本后,先采用 PCR 扩增 STS 基因的两末端序列及侧翼的微卫星标记;再应用 cDNA STS 基因特异性探针进行间期白细胞核进行 FISH 检测。选取 X 染色体上自 DXS1139 至 DXF22S1 区域内 7 个微卫星标记进行 PCR 扩增以确定 DNA 缺失大小。PCR 检测 STS 基因两端序列结果没有扩增产物。FISH 方法也证实了患者 STS 基因 DNA 序列存在缺失。应用多态性微卫星序列进行 PCR 扩增,结果表明患者存在 X 染色体上 STS 基因及其侧翼序列,自 DXS1139 至 DXF22S1 区域内, DNA 缺失达 1.97 Mb。PCR 和 FISH 方法证实 XLRI 患者 STS 基因及其两侧翼序列 DNA 缺失,具有重要的遗传咨询意义。

**关键词** X-连锁隐性鱼鳞病; STS 基因; STS 基因缺失; PCR; FISH

中图分类号 R 758.2+5; Q 3-3; Q 343

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1859-04

2016-09-20 接收

基金项目:温州科学技术局课题(编号:Y20140576);国家自然科学基金(编号:81272987)

作者单位:温州医学院附属第一医院皮肤科 温州 325000

作者简介:张学奇,男,医师,硕士;

李智铭,男,医师,博士,责任作者, E-mail: 422835614@qq.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.034

鱼鳞病是一组具有异质性的皮肤角化性疾病,典型特征以全身皮肤片状鳞屑,由多种不同基因突变所致<sup>[1]</sup>。先天性鱼鳞病表现为既具有不同临床表现,又具有多种遗传背景,包括常染色体显性遗传、常染色体半显性遗传、常染色体隐性遗传和 X-连锁隐性鱼鳞病(X-linked recessive ichthyosis, XLRI)等<sup>[1-2]</sup>。XLRI 女性为携带者而不发病,男性发病,其发病率为 0.016 7%~0.050 0%<sup>[3]</sup>。XLRI 通常出生时发病,表现为头皮、颈项、躯干和四肢泛发性鳞屑,也可以具有皮肤外器官受累的症状,表现为角膜混浊、睾丸肿瘤、隐睾症、睾丸微结石、抗类固醇性肾病综合征、前弹力层角膜营养不良、注意力缺陷多动症、癫痫、智力障碍等<sup>[3-6]</sup>。因类固醇硫酸酯酶(steroid sulfatase, STS)基因发生点突变、部分或全部缺失等,引起 STS 酶活性丧失而致 XLRI 患者发病。其中,约 90% 的 XLRI 患者是由于整个 STS 基因及其侧翼部分序列的缺失而发病。在染色体缺失性遗传疾病中,STS 基因的这种完全缺失性突变发生率最高<sup>[7-9]</sup>。STS 基因位于 X 染色体短臂的远端(即 Xp22.3)<sup>[10]</sup>。根据 DND 缺失程度的不同,患者可仅表现为皮肤损害,也可同时具有其他器官的损害。

## Application of emergency off-pump coronary artery bypass grafting in unsuccessed percutaneous coronary intervention

Sun Ayu, Zhao Zhiwei, Ge Jianjun

(Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract** The results of 12 patients who underwent emergency off-pump coronary artery bypass grafting(OP-CABG) following unsuccessed percutaneous coronary intervention(PCI) were retrospectively analyzed. In-hospital mortality was not observed in this group. The mean duration of postoperative stay in the hospital was (14±5) d and mean duration of follow-up was (25±9) months. During follow-up after hospital discharge, 11 patients' cardiac function was good. 1 patient occurred angina and recovered after medical treatment. Emergency OPCABG is an effective management for unsuccessed PCI. The long term outcome of patients requiring emergent OPCABG is favorable in this cohort.

**Key words** percutaneous coronary intervention; emergency surgery; coronary artery bypass grafting

这种联合基因缺失综合征包括 Kallmann 综合征、低生育力和矮小体格的症候群、斑点状软骨发育异常、智力缺陷、眼白化病等<sup>[6,10-11]</sup>。该研究通过多聚酶链反应(PCR)和荧光原位杂交(FISH)方法对3例XLRI患者STS基因缺失程度进行分子检测,旨在为XLRI的基因诊断和遗传咨询提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 本文2个鱼鳞病家系的3例患者均为男性,年龄分别为18、20、25岁,均表现为全身皮肤鳞屑。其中,家系1共22个家族成员(男11/女11),有1例患者和2例女性携带者;家系2共35个家族成员(男18/女17),有2例患者和1例女性携带者。患者均自学龄前发病,四肢斑疹鳞屑,随着年龄增长,渐播及躯干、颈项、头皮和耳前。掌跖、毛发和指趾甲没有异常表现。患者出生时没有发生分娩相关并发症,无胎样儿表现及其他异常情况。家族成员中无相似皮肤病表现和其他皮肤病表现。2个家系检查显示除3例患者外(图1、2),其他家族成员没有显示存在鱼鳞病症状和体征;也没有家族流产史;患者父母没有血缘关系。通过家系图分析显示患者为常染色体隐性遗传病或X连锁隐性遗传病。

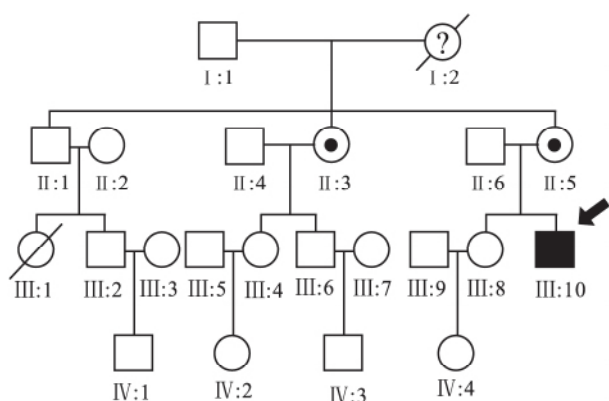


图1 XLRI患者4代家系1图谱

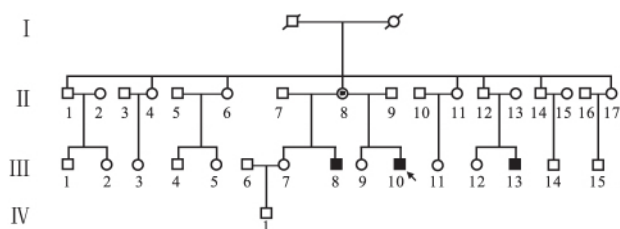


图2 XLRI患者4代家系2图谱

血常规、免疫球蛋白电泳、 $\beta$ 脂蛋白电泳、肝肾

功能、甲状腺功能、性激素、肾上腺激素、尿常规等实验室检查结果均为正常值范围。肝肾睾丸超声扫描没有异常发现。G带染色体分析显示先证者核型为46,XY。因此,这2个家系的患者首先诊断为先天性常染色体隐性鱼鳞病(autosomal recessive congenital ichthyosis, ARCI)或XLRI(OMIM#308100)。

**1.2 PCR和DNA缺失检测法** 向3例患者和家族成员说明研究目的并签署知情通知书。研究方案经温州医科大学伦理委员会审核通过。应用QIAamp®试剂提取基因组DNA。应用Primer3(version 0.4.0)软件设计STS基因5'和3'两个末端的引物2对:分别为5'-STS F: 5'-CCAGGATCACCT-GAAACTCC-3', R: 5'-ATGCAACACAAGCAGGTAGC-3' (产物大小为400 bp); 3'-STS F: 5'-TGCTAATCT-TCCATCCACTGC-3', R: 5'-CATTTGGAAGGCTC-CCATT-3' (产物大小为445 bp)。另外选取TGM1基因的一对引物 F: 5'-CTGGCTCATCTCATTCTCCT-GCT-3', R: 5'-TGGCAGGAACACTTGTGT-3'作为阳性反应对照。所有PCR反应的总体积是10  $\mu$ l反应体系,包括10 ng的基因组DNA。检测DNA片段缺失程度,参考文献<sup>[12]</sup>报道,再选取STS基因侧翼区域的8对引物,自远端至近端依次为(telomeric-DXS89、DXS1139、DXS1130、5'-STS、3'-STS、DXS1133、DXS237、DXS1132、DXF22S1、DXS278-centromeric),进行相关序列扩增。

**1.3 FISH检测法** 按染色体标本制备的常规方法,将家系1患者(III:10)、携带者(II:3和II:5)、家系2患者(III:8, III:10)及正常对照者的外周血淋巴细胞进行培养和间期细胞涂片制作。先将这些细胞涂片置于原位杂交仪(StatSpin® S500-24,美国ThermoBrite公司)上,应用70%福尔马林/2  $\times$  SSC 75  $^{\circ}$ C变性5 min。接着,浓度递增冰乙醇(70%、85%、100%)依次脱水各3 min。最后,将细胞涂片晾干。

先用钻石刀在细胞涂片上标刻好方形区域(0.4 cm  $\times$  0.4 cm),然后将变性的地高辛标记的STS-cDNA核酸探针(美国Vysis公司)加入这一区域内,接着置于37  $^{\circ}$ C孵育过夜进行共变性。为了去除非特异性结合的探针,应用0.4  $\times$  SSC/0.3% NP-40缓冲液在73  $^{\circ}$ C冲洗2 min,然后,应用2  $\times$  SSC/0.1% NP-40缓冲液在常温下冲洗30 s。将玻片凉干后,应用DAPI II (0.14 mg/ml)进行复染,接着表面滴加抗荧光衰减剂Vectashield(美国Vector Laboratories公司)。这时,可每个标本玻片镜下选取100个间期细胞核进行分析。应用位点特异性双

色 LSI® STS 探针进行检测分析时,其中绿色探针信号表示 X 染色体上的着丝粒区,红色探针信号表示 X 染色体上的 STS 基因区。

## 2 结果

**2.1 PCR 和 DNA 缺失检测结果** 在 2 个家系中,PCR 检测显示患者 STS 基因 5'端和 3'端都没有目标扩增产物,同时,相应的对照组有扩增产物。当检测 DNA 片段缺失程度时显示:家系 1 患者自近端 DXS1130 至远端 DXF22S1 的引物都没有相应的扩增产物;家系 2 患者自近端 DXS1139 至远端 DXF22S1 的引物都没有相应的扩增产物;同时,其双亲及其他家族成员和正常对照都具有相关 STS 基因及其侧翼序列的扩增产物。见图 3。

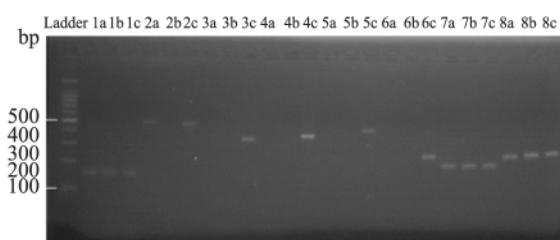


图3 STS 基因及其两侧翼标记的 PCR 分析

序号 1~8 分别表示 8 对引物的 PCR 扩增产物;a、b、c 分别表示家系 1 患者、家系 2 患者、正常对照者

**2.2 FISH 检测结果** 对与细胞 X 性染色体上相杂合探针的信号颜色情况来作出判断:男性细胞涂片中,若 X 染色单体上仅显示单个绿色信号而无红色信号的标本提示这是存在 STS 基因缺失的男性患者(图 4A),而当 X 染色单体上同时显示绿色信号和红色信号的标本为正常男性(图 4B)。在女性细胞涂片中,若一条 X 染色单体上同时显示 1 个绿色信号和 1 个红色信号,而另一条 X 染色单体上仅显示 1 个绿色信号但没有红色信号;这表明仅存在单拷贝的 STS 基因,是 STS 致病基因的女性携带者(图 4C,家系 1 的 II3、II5 和家系的 II8)。

## 3 讨论

本研究 3 例患者皮损表现为全身伸侧面和屈侧面对称分布的大块状、棕褐色鳞屑,没有内脏累及的皮肤外症状。根据实验室 DNA 缺失和 FISH 的检测结果,以及家系图谱的遗传模式,3 例患者的诊断应首先考虑 ARCI 或 XLRI。

XLRI 和 ARCI 以及其他类型的鱼鳞病的鉴别

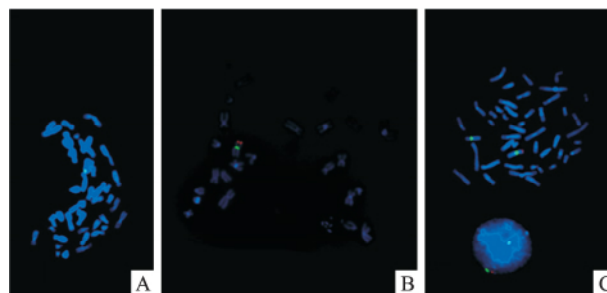


图4 XLRI 患者、携带者及正常者的原位荧光杂交

A: 患者间期细胞核中 X 染色单体仅有绿色信号而无红色信号; B: 正常男性一条 X 染色单体上同时显示绿色信号和红色信号; C: XLRI 携带者间期核和中期核仅一条 X 染色单体上同时有绿色信号和红色信号,而另一条仅有绿色信号而无红色信号;绿色信号表明 LSI 着丝粒探针的存在,红色信号表明 STS 基因探针的存在

要点是对患者进行相关基因的遗传分析。14q11.2 区域 TGM1 基因失活是多数 ARCI 患者最常见的致病原因,达 30%~55%<sup>[2,42]</sup>。当对候选基因 TGM1 进行测序分析后,没有显示任何突变或其他异常情况。

对 3 例 XLRI 患者的致病基因 STS 进行 PCR 检测,其 5'和 3'两端均没有检测到扩增产物。接着,选取 X 染色体上从 DXS1139 至 DXF22S1 区域内 7 个多态性微卫星标记,也都没有扩增到相应的产物。因此,这些遗传分析结果揭示患者隐藏着一个包含 STS 基因及其两侧翼区域内的 DNA 片段缺失。而且, FISH 分析也证实了患者的 DNA 缺失,其母亲都是致病基因 STS 的携带者(即图 1 的 II3、II5 和图 2 的 II8)。根据 NCBI 图谱分析,3 例 XLRI 患者分别隐藏着 X 染色体上从 DXS1139 至 DXF22S1,从 DXS1130 至 DXF22S1,前者约有 1.97 Mb DNA 片段的缺失突变,后者约有 25.7 Mb DNA 片段的缺失突变。这两突变断点都是先前报道的最常见位点<sup>[7,9-40]</sup>。对于这 3 例 XLRI 患者来说, Kallman 基因位于这个区域之外。因此,该 3 例患者可排除 Kallman 综合征及其相关连锁基因综合征。根据临床表现和遗传分析结果,患者的最后诊断确定为 XLRI。

本研究中遗传分析结果对该家族相关成员的遗传咨询具有重要的实际意义。特别是 3 个致病基因携带者和 3 例患者,其男性后代可能会遗传致病基因而发病,而女性后代可能会是致病基因携带者。

## 参考文献

- [1] Zhang X, Liu J, Shao X, et al. Detection of the deletion of the STS gene and flanking sequences using polymerase chain reaction in a Chinese pedigree: the first case report of X-linked ichthyosis

- associated with testicular microlithiasis [J]. *Eur J Dermatol*, 2013 23(5): 731–3.
- [2] Liu J J, Yuan Y Y, Zhang X Q, et al. Mutations of transglutaminase-1 in Chinese patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: a case report with clinical and genetic analysis of Chinese cases reported in literature [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2015 40(1): 56–62.
- [3] Shapiro L J, Weiss R, Buxman M M, et al. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis [J]. *Lancet*, 1978 2(8093): 756–7.
- [4] Schmuth M, Martinz V, Janecke A R, et al. Inherited ichthyoses/ generalized Mendelian disorders of cornification [J]. *Eur J Hum Genet* 2013 21(2): 123–33.
- [5] Oji V, Tadini G, Akiyama M, et al. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009 [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2010 63(4): 607–41.
- [6] Shwayder T. Ichthyosis in a nutshell [J]. *Pediatr Rev*, 1999 20(1): 5–12.
- [7] Mishra K, Batra W, Basu S, et al. Steroid-resistant nephrotic syndrome associated with steroid sulfatase deficiency-x-linked recessive ichthyosis: a case report and review of literature [J]. *Eur J Pediatr*, 2012 171(5): 847–50.
- [8] Hung C, Ayabe R I, Wang C, et al. Pre-Descemet corneal dystrophy and X-linked ichthyosis associated with deletion of Xp22.31 containing the STS gene [J]. *Cornea* 2013 32(9): 1283–7.
- [9] Kent L, Emerton J, Bhadravathi V, et al. X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit hyperactivity disorder, autism and social communication deficits [J]. *J Med Genet* 2008 45(8): 519–24.
- [10] Carrascosa-Romero M C, Suela J, Alfaro-Ponce B, et al. X-chromosome-linked ichthyosis associated to epilepsy, hyperactivity, autism and mental retardation, due to the Xp22.31 microdeletion [J]. *Rev Neurol* 2012 54(4): 241–8.
- [11] Cuevas-Covarrubias S A, González-Huerta L M. Analysis of the VCX3A, VCX2 and VCX3B genes shows that VCX3A gene deletion is not sufficient to result in mental retardation in X-linked ichthyosis [J]. *Br J Dermatol* 2008 158(3): 483–6.
- [12] Farasat S, Wei M H, Herman M, et al. Novel transglutaminase-1 mutations and genotype-phenotype investigations of 104 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in the USA [J]. *J Med Genet* 2009 46(2): 103–11.

## Three patients with X-linked recessive ichthyosis to be diagnosed through PCR and FISH techniques

Zhang Xueqi, Liu Jingjing, Lin Xiaohua, et al

(Dept of Dermatology, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000)

**Abstract** To diagnose patients of X-linked recessive ichthyosis (XLRI) involving a complete deletion of the steroid sulfatase (STS) gene detected with PCR and FISH. Cutaneous examination was performed and peripheral blood samples were collected from three patients affected XLRI. PCR amplification of both ends of the STS gene was first performed, and then FISH in metaphase leukocytes was performed with the cDNA STS probe. Finally, amplification of the regional markers from DXS1139 to DXF22S1 on the X chromosome was performed through PCR. PCR amplification both the ends of STS gene using genomic DNA failed to produce any amplicons. However, each exon was successfully amplified using genomic DNA and primers from control samples. Subsequently, FISH analyses showed no red signal for the STS gene and only one green signal for the X-chromosome centromere in three patients. Analyses of the deletion of STS gene and its flanking sequences in one Chinese pedigree with XLRI using polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization techniques were performed, which has great significance for the genetic counseling.

**Key words** X-linked recessive ichthyosis; STS gene; STS gene deletion; polymerase chain reaction; fluorescence in situ hybridization techniques