

· 临床研究 ·

荧光原位杂交技术在性反转诊断中的应用价值 (附 3 例 46,XY 性反转女性病例报道)*

方 宁,刘祖林,万卫红,祁 莹,陈代雄

(遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室 563000)

摘要:目的 评价荧光原位杂交技术(FISH)在性反转诊断中的应用价值。方法 用常规 G 显带方法分析 3 例生殖器发育障碍的社会性别为女性患者的外周血染色体核型,并采用 FISH 分析其 X、Y 染色体。结果 FISH 结果与 G 显带核型一致,3 例患者均为 46,XY 女性性反转。结论 FISH 对于性反转颇具诊断价值,对中期分裂相有限及分散不佳的染色体标本均可作出明确诊断。

关键词:性反转综合征;荧光原位杂交;46,XY 女性;染色体畸变

中图分类号:R446.61;R596.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)03-0290-02

Value of fluorescence in situ hybridization for sexual reverse syndrome*

FANG Ning, LIU Zu-lin, WAN Wei-hong, et al.

(Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

Abstract: Objective To evaluate the value of fluorescence in situ hybridization (FISH) for sexual reverse syndrome, and report three 46,XY sex reversal syndromes. **Methods** G-banding was used to detect the karyotypes in peripheral blood of three patients (social gender: female) with dysgenitalism, and their sex chromosomes were analyzed by FISH. **Results** The results of FISH were consistent with G-banding. Three patients were diagnosed as 46,XY sex reversed female. **Conclusion** FISH technique is very valuable in diagnosis of the sex reversal syndrome.

Key words: sex reversal syndrome; fluorescence in situ hybridization; 46,XY female; chromosome aberration

性反转综合征(Sex reversal syndrome)是一类性别发育异常的遗传性疾病,其主要特征表现为性腺性别与染色体性别不符,包括 46,XX 男性和 46,XY 女性。46,XY 女性是指 46,XY 性反转女性(46,XY reversal female),群体发病率约为 1:100 000^[1]。本室应用荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridisation, FISH)结合外周血染色体核型分析诊断 3 例 46,XY 性反转综合征,并对 FISH 在性反转综合征诊断中的价值作一探讨。

1 临床资料

1.1 病例介绍 病例 1,社会性别女性,16 岁,因原发性闭经就诊。查体:乳房有发育,双乳头凹陷,外阴发育为女性,无阴毛,可见大小阴唇和阴道口,盲端阴道,未见宫颈。B 超检查示始基子宫,卵巢显示不清。血激素检查:FSH 26.0mIU/mL, LH 22.2mIU/mL,均高于正常男性。彩超检查示左下腹 26mm×14mm 囊性包块,内部回声均匀,彩色多普勒超声(CDFI)检测未见明显血流信号。家属口述患者 2 岁时曾因右侧腹股沟区有一包块,医生告知手术切除物似“睾丸”。

病例 2,社会性别女性,22 岁,因无月经来潮及左下腹股沟包块 15 年入院。查体:乳房有发育,外阴发育尚可,无阴毛,阴道长达 7cm,未见宫颈;左耻骨联合偏左侧可扪及一条索状包块,边界清,活动欠佳,有触痛。B 超检查示盆腔内无子宫及卵巢,耻骨联合上偏左侧示 22mm×14mm 囊性区,内透声好。血

激素检查:FSH 15.7mIU/mL, LH 28.5mIU/mL,均高于正常男性。彩超检查示左侧腹股沟区实性包块,遂行手术切除,病理诊断为发育不全睾丸组织。

病例 3,社会性别女性,3 岁,因疑性畸形就诊。查体:外阴幼女状,双侧大阴唇内可扪及睾丸样包块。B 超检查示盆腔无子宫及卵巢。

1.2 诊断方法

1.2.1 中期分裂相 G 显带分析 取肝素抗凝的患者外周血,按 1:10 比例接种于含 100μg/mL 植物血凝素(PHA)和 20% 小牛血清 RPMI-1640 培养基中,置 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱培养 70h 后加秋水仙素至终浓度 0.2μg/mL,继续培养 1h,收获细胞,染色体制片及 G 显带按常规方法进行。显微镜下观察,用 Cytosision 软件进行染色体采集、分析。每个样品观察 30 个分裂相,分析 20 个核型。

1.2.2 FISH X、Y 染色体特异区域探针购自北京金菩嘉医疗科技有限公司。X 染色体着丝粒探针(杂交位点位于 Xp11.1-q11.1)荧光信号为绿色(FITC),Y 染色体着丝粒探针(杂交位点位于 Yp11.1-q11.1)荧光信号为橘红色(rhodamine)。杂交体系为 10μL(杂交缓冲液 7μL,去离子水 1μL, X 和 Y 探针各 1μL,混匀),于 73℃ 水浴变性 5min,置 45~50℃ 水浴保温。染色体玻片 56℃ 老化 30min,经 70%、85%、100% 梯度乙醇脱水,自然干燥。杂交前玻片置于 45~50℃ 烤

* 基金项目:卫生部基金资助项目(WKJ2007-3-001)。

片机上预热。将 10 μ L 探针混合物滴于玻片杂交区,立即加盖盖玻片,封片。将玻片置于杂交仪(HYBrite™,VYSIS,UAS)按设定程序进行杂交:75℃变性 5min,42℃杂交 16h。杂交后的玻片去掉盖玻片,用 47℃、含 50%甲酰胺的 2 \times SSC 洗涤 3 次,每次 10min,再用 47℃、2 \times SSC 和含 0.1NP-40 的 2 \times SSC 分别洗涤 1 次,暗处自然干燥。滴加 15 μ L 4,6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)复染液于玻片杂交区,暗处孵育 10~20min。在荧光显微镜下选用合适的滤玻片观察杂交信号。

2 结 果

3 例患者外周血标本染色体核型均为 46,XY。FISH 结果显示,无论是中期分裂相还是间期细胞,X、Y 染色体特异区域均能显示极好的荧光杂交信号(插页 II 图 11)。

3 讨 论

46,XY 女性性反转综合征的表型为女性,性腺呈索条状,睾丸不发育,具有女性内、外生殖器。依据患者表型特征和染色体检测结果,3 例患者均确诊为 46,XY 女性性反转综合征。该综合征遗传方式比较复杂,可由非易位性 SRY 基因突变引起的病例则会呈 Y-连锁遗传,但也可能由 X-连锁或生化缺陷引起而呈 X-连锁隐性遗传或常染色体隐性遗传。XY 女性的发病机制是睾丸性别决定功能的丢失,其遗传学病理机制涉及:(1)X、Y 染色体之间或 Y 染色体与常染色体之间的易位导致含 SRY 基因的 Y_p 末端部分缺失,核型为 46,XY;(2)SRY 基因突变,核型为 46,XY;(3)家族性异质性 SRY 基因突变;(4)雄激素受体基因突变^[2]。

FISH 是 20 世纪 80 年代末在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传学技术,其原理是通过荧光标记的寡核苷酸探针特异地和互补核酸序列在完整的细胞内结合,可以对染色体或特定基因的数目异常,特定片段的缺失、易位和重排进行诊断研究^[3-7]。FISH 具有安全、分辨率好、不需要体外培养、对中期分裂相和间期细胞染色体可快速检测等优点,在生物医学领域已广泛用于染色体或基因异常的细胞、组织样本进行检测和诊断,为各种基因相关疾病的分型、预后和预后提供准确的依据^[8-9]。由于荧光探针主要为国外产品,价值昂贵,国内至今未能将 FISH 技术常规用于染色体异常的诊断。本实验采用国产 X、Y 染色体特异区域探针所进行的 FISH 结果表明,无论是中期分裂相还是间期细胞,X、

Y 染色体特异区域均可显示高分辨荧光杂交信号,具有很高的敏感性和特异性。这说明 FISH 技术对于性反转具有极高的诊断价值,尤其对中期分裂相有限及分散不佳的染色体标本可作出明确的诊断。鉴于国产探针价格相对便宜,将 FISH 技术和常规染色体显带方法结合起来用于染色体异常诊断值得推广。

参考文献:

[1] 陆国辉. 产前遗传病诊断[M]. 广州: 广东科技出版社, 2002:452.
 [2] Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, et al. The metabolic and molecular bases of inheritant disease[M]. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 739.
 [3] 王云华, 崔英霞, 姚兵, 等. 多色荧光原位杂交技术的临床应用[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(6): 438.
 [4] 陈亚军, 史桂兰, 赵春. 46, XY 女性性反转患者的细胞和分子遗传学检测[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 32(6): 86.
 [5] 王晓兰, 姚凡, 刘楠, 等. FISH 在乳腺癌组织 MER2/neu 原癌基因检测上的应用及其临床意义的研究[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(5): 664.
 [6] 李静然, 魏丽惠, 刘宁, 等. FISH 检测宫颈脱落细胞 hTERT 基因表达及其临床意义[J]. 现代妇产科进展, 2008, 17(10): 725.
 [7] 刘学军, 刘慈, 尹红亚, 等. 荧光原位杂交技术在胎儿染色体数目异常诊断中的应用[J]. 山东医药, 2008, 48(33): 10.
 [8] Klinger K, Langes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in unculture amniocytes by using fluorecence in situ hybridization (FISH) [J]. Am J Hun Genet, 1992, 51(1): 55.
 [9] Bryndorf T. Rapid detection of numerical aberrations of chromosomes 13, 18 and 21 in chorionic mesenchyma cells [J]. Prenat Diagn, 1993, 13(9): 815.

(收稿日期: 2009-05-07 修回日期: 2009-08-10)

(上接第 289 页)

表达及 VEGF 抗体抑制血管生成的实验研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(15): 1369.
 [3] 吕厚君. ICAM-1 和 VEGF 在原发性肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 医药论坛杂志, 2008, 29(16): 15.
 [4] Tseng PL, Tai MH, Huang CC, et al. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients[J]. J Surg Oncol, 2008, 98(5): 349.
 [5] 程惠华, 傅志超, 王凤玫. 电离辐射对缺氧条件下肝癌细胞 HIF-1 α 及 VEGF 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,

2008, 28(2): 284.

[6] 黄清南, 黄耀, 张卫星. 血管内皮生长因子在原发性肝癌高强度聚焦超声治疗前后变化分析[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(31): 7638.
 [7] Thomas MB, Morris JS, Chadha R, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(6): 843.

(收稿日期: 2009-08-29 修回日期: 2009-09-09)