

先天性软骨发育不全的产前诊断

胡章雪 综述 李力 审校

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

【摘要】 先天性软骨发育不全(ACH)是一种严重的遗传性侏儒症。患儿出生后一般在儿科或骨科就诊,因发病率低而往往不引起妇产科医生的重视。此病尚无有效的治疗方法,在产前进行明确诊断后终止妊娠是目前减少此病发生的唯一方法。随着基因诊断技术的发展,开展软骨发育不全的围产期干预成为可能。

【关键词】 软骨发育不全;产前诊断;基因诊断

中图分类号:R681.1 文献标识码:A 文章编号:1004-7379(2004)05-0377-03

先天性软骨发育不全(achondroplasia, ACH)是一种人类最常见的以短肢、躯干相对正常和巨头为特征的常染色体显性遗传性侏儒,常合并有其他遗传性疾病或出现肌肉骨骼系统其他畸形以及呼吸、神经系统的严重并发症。我国 ACH 的发生率为 0.18/万,围产期死亡率为 0.01%¹。在产前进行明确诊断后终止妊娠是目前减少此病发生的唯一方法。随着人们对软骨发育不全遗传学发病机制认识的不断深入、产前诊断及分子生物学诊断技术的发展,软骨发育不全的产前基因诊断也成为可能,完善产前诊断技术将大大减少此类缺陷儿的出生。

1 病因学研究

1.1 遗传机制 ACH 的发病与遗传有密切关系,为常染色体显性遗传,纯合子患者的子女 100%发病,杂合子患者的子女发病率为 50%。由于不少患者不结婚或难产,致使无下一代,使该病的遗传形式受到影响,统计显示 80%~90%病例没有家族史。

Shiang 等² 将 ACH 的致病基因定位于 4 号染色体短臂 t 末端,Rousseau³ 几乎同时发现成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor 3, FGFR3) 跨膜区基因第 1138 位核苷酸的突变,是 ACH 发病的原因。FGFR3 是酪氨酸激酶受体家族中的一种,具有多种活性。FGFR3 在骨骼发育初期的软骨中表达水平最高,FGFR3 与配体成纤维细胞生长因子结合后,引发偶联和自磷酸化作用,通过干扰软骨细胞的增生和分化抑制软骨的化骨过程。FGFR3 跨膜区基因 1138 位核苷酸突变后,引发 FGFR3 功能持续地、不依赖配体地激活,突变的受体拒绝配体介导的调控,导致 FGFR3 对骨骼生长的负向调节作用失控。

1.2 高危因素 ACH 一般都是散发性的病例,临床观察表明,父亲年龄高者生育软骨发育不全患儿的机率明显升高,故认为其基因突变只发生在父系染色体,往往在受精之前即已发生,在精子发生过程中影响 DNA 复制和修复的因素,会增加基因突变的发生率⁴。但是,Tiemann 等⁵ 专门研究了男性精子细胞的基因突变,发现与年龄并无明显相关性。也

有观点认为,任何可能导致基因改变的外界因素都有可能导

2 产前影像学诊断

2.1 B 超 B 超下可见胎儿头大、股骨、胫骨和腓骨均短,三叉形态和“古钟”样胸腔,胎儿腹部膨隆,腹围增大,胎儿四肢短小,长骨短粗且伴有弯曲,骨端膨大;羊水量增多^{6,7}。胎儿软骨发育不全的超声诊断主要应与成骨不全鉴别,两种畸形的胎儿均有肢体短小。成骨不全是一种常染色体隐性遗传病,超声检查示胎儿四肢骨变短小,回声减弱,肢体长骨回声中断或畸形,极易骨折或骨折造成的骨畸形,应注意鉴别。目前,超声检查已在妇产科得到广泛应用,超声诊断胎儿软骨发育不全准确性高,方法简便易行,无创伤性,重复性好,是初步筛查软骨发育不全的理想方法,但仅能在孕晚期进行诊断,故也有一定的局限性。

2.2 三维超声成像技术 实时三维超声成像研制成功,是近年来超声技术领域内的一项重大突破,此项技术具有巨大的潜力,可以明显地提高图像的时间和空间分辨率,可以改善胎儿面部、肢体和生殖器等图像的分辨力和清晰度,准确显示检测对象的轮廓与形态,对临床诊断软骨发育不全将有更大帮助,Krakow 等⁸ 认为三维超声成像技术比普通的产科 B 超更容易发现异常。

2.3 X 线诊断 此病 X 线表现较典型⁹:(1)四肢长骨短宽,骨骺线不规则,骨骺可见碎裂状;(2)指骨短粗呈哑铃状,手指略等长;(3)腰椎椎弓根间距逐渐变小,与正常相反;(4)骨盆小,髂嵴上缘和侧缘的弧度变平,骶髂关节位置降低,坐骨大切迹变小呈锐角;(5)髌臼顶部常增宽变平,其下缘平坦缺如。孕晚期经 B 超检查明确诊断的胎儿畸形,考虑为软骨发育不全者,而孕妇又不愿意行基因诊断,或条件限制不能开展基因诊断者,征得孕妇及家属同意可行 X 线检查,以进一步明确诊断,为孕妇选择继续妊娠或终止妊娠提供依据。

3 产前基因诊断

3.1 胎儿 DNA 采集

3.1.1 超声引导下经皮脐静脉穿刺 超声引导下经皮脐静脉穿刺获取纯胎儿血标本,再从胎儿血中提取 DNA,其灵敏度和准确性是其他方法无法比拟的,但因系有创性的产前诊断方法,故不宜作疾病筛查用,一般对有家族史或经影像学检查高度怀疑软骨发育不全而需基因诊断确诊的胎儿采用此方法较能为孕妇及家属所接受。提高脐静脉穿刺的成功率及安全性,是此项技术的关键。马小燕等¹⁰用此方法抽取胎儿血液,穿刺成功率 98.7%。

3.1.2 绒毛活检术 多数学者主张在妊娠 8 周后进行,过早胎盘绒毛太薄,超声下难以与包绕它的蜕膜组织区分开,且不易取得绒毛组织,有报道认为过早绒毛活检有导致胎儿肢端发育障碍的风险。采取 5mg 绒毛即可用来进行 DNA 分析,活检有经腹和经宫颈两种方式。Antoniadi 等¹¹用此方法对包括软骨发育不全在内的多种遗传病进行了基因诊断,并认为如果操作规范这是避免来源母体 DNA 污染标本较好的方法。

3.1.3 母体血中富集胎儿 DNA 从 1997 年学者们在怀男胎的母体血浆或血清中发现存在胎儿 DNA 以来,从孕妇外周血中分离胎儿细胞一直是遗传病非创伤性产前诊断的主要思路与探索途径。Hiroshi 等¹²用此方法尝试对软骨发育不全进行基因诊断取得了成功。然而胎儿细胞的富集效率低和母体背景过高影响了胎儿特异等位基因的检测,使其难以成为临床实用的非创伤性产前诊断的检测方法。

3.1.4 羊水细胞培养 1966 年 Stede 和 Breg 首次培养羊水细胞成功并用于胎儿染色体疾病的产前诊断,此后这项技术成为产前诊断的一种重要手段。然而,由于羊水中活细胞少,培养周期长,无菌要求高,稍不注意即致失败,即使培养成功,因分裂相少,形态不佳,达不到分析要求,无法进行进一步研究如 FISH 等,使羊水产前诊断的应用受到限制。许争峰等¹³对传统的羊水培养方法做了改良,取得了较满意的效果。

3.1.5 胚外体腔穿刺术 是指于孕早期,在超声引导下,用穿刺针刺入孕囊内的胚外体腔,抽吸液体用作产前诊断的一项新技术。由于此项技术最早可在孕 6 周进行,是目前可以开展的较早的产前诊断取材技术。自 1993 年, Jurkovic 首次尝试用于产前诊断以来,此项技术引起了国内外众多研究者的关注。对于有家族史的孕妇应尽早进行基因诊断,胚外体腔穿刺应是采集胎儿 DNA 最好的方式。孙路明等¹⁴对这项技术进行研究后认为,胚外体腔穿刺术是安全的,但若正式用于临床,其远期安全性尚需进一步探讨。

3.2 基因诊断

3.2.1 PCR-SSCP 结合限制性内切酶分析 FGFR3 跨膜区基因第 1138 位核苷酸发生 GA 碱基转换后将产生 S₆ 内切酶位点,抽提软骨发育不全患者的 DNA,PCR 扩增含有 FGFR3 基因高发突变位点 G80R 区域,将 PCR 产物直接用限制性内切酶 S₆ 消化,15% PAGE 凝胶电泳。电泳检测结果是软骨发育不全患者将出现正常 PCR 产物条带及其被内切酶消化后的 2 条带,而患者父母及正常人仅出现 PCR 产物

相同大小的单条带。PCR-限制性酶切法已经成为国内外实验室常用的对软骨发育不全患者 FGFR3 基因常见突变进行检测的方法¹⁵。

3.2.2 基因测序 DNA 测序表明,软骨发育不全患者 95% 以上的突变是 FGFR3 跨膜区基因第 1138 位核苷酸 GA 碱基转换,其余则为 GC 突变,这两种突变都导致了 FGFR3 跨膜区第 380 位密码子的错义突变(甘氨酸 Gly 替换为精氨酸 Arg)。对于有条件的实验室,可以直接通过对 PCR 产物的基因测序来检测 FGFR3 跨膜区基因的突变,将测序结果和正常基因序列对照,若能发现第 1138 位核苷酸发生 GA 或 GC 的碱基转换则可确诊为软骨发育不全,若与正常序列相同则可完全排除。由于基因测序尚不能保证 100% 的准确性,故应取不同 PCR 产物从两端分别进行测序才能确诊。

3.2.3 基因芯片技术 基因芯片技术具有大规模、高通量、速度快、准确度高优点,故诊断一些基因突变引起的遗传病具有很高的价值。Pinar 等¹⁶研制出诊断软骨发育不全的电化学芯片,并成功地用于软骨发育不全的基因诊断,基因芯片诊断不但可以明确有无突变,而且能明确突变类型,高密度芯片诊断能达到与基因测序一样的准确性,并且能够明确患者是杂合子还是纯合子,产业化的芯片相对基因测序也更易于普及。基因芯片诊断技术将是未来软骨发育不全基因诊断的发展方向。

3.3 胚胎植入前诊断 胚胎植入前诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 通常指从获得的卵母细胞取极体或从体外受精的胚胎的部分细胞进行检测,将确诊无遗传病的胚胎移植入子宫,从而防止遗传病代代相传。首次 PGD 在 1989 年由 Handyside 所在的生殖中心报道,并于次年妊娠获得成功。至今已有分布于 17 个国家的 100 多个生殖中心建立了 PGD 技术,大约已经进行了 5000 个 PGD 的临床治疗周期,接近 1000 例妊娠¹⁷。Rechitsky¹⁸等已经成功地开展了软骨发育不全的 PGD。但是,因为软骨发育不全 80% 以上无家族史,仅对患者进行 PGD 是不安全的,确保无任何遗传病变婴儿的出生,是产前诊断的最终目标。对每例移植胚胎均在植入前进行软骨发育不全的突变筛选才是最安全的。

4 展望

提高先天性软骨发育不全的产前诊断是广大妇产科工作者的重要任务,也是提高我国优生优育水平的重要措施。我们建议在 B 超常规筛选的前提下,对父母患病或 B 超可疑胎儿软骨发育不全的孕妇应立即对胎儿的遗传物质进行基因诊断。而软骨发育不全的胚胎植入前诊断将是软骨发育不全夫妇生育健康后代的希望。

参 考 文 献

- 1 梁娟,王艳萍,缪蕾,等. 中国围产儿软骨发育不全特征分析 J. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(16): 1523-1524
- 2 Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia J. Cell, 1994, 78 (2): 335-342

- 3 Rousseau F, Bonaventure J, Legeai M, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia J. Nature, 1994, 371 (6494): 252-254
- 4 Aitken R, Baker M, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease J. Reprod Biomed Online, 2003, 7 (1): 65-70
- 5 Tiemann I, Navidi W, Grewal R, et al. The observed human sperm mutation frequency can not explain the achondroplasia paternal age effect J. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (23): 14952-14957
- 6 B éatrice D, Romain F, Brigitte Viville, et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. A report of 47 cases J. Annales de G énéologie, 2000, 43(3-4): 163-169
- 7 Latini G, Felice D, Parrini S, et al. Polyhydramnios: a predictor of severe growth impairment in achondroplasia J. J Pediatr, 2002, 141(2): 274-276
- 8 Krakow D, Williams J, Poehl M, et al. Use of three-dimensional ultrasound imaging in the diagnosis of prenatal-onset skeletal dysplasias J. Ultrasound Obstet Gynecol, 2003, 21 (5): 467-472
- 9 Cheema J, Grissom L, Harcke H. Radiographic characteristics of lower-extremity bowing in children J. Radiographics, 2003, 23(4): 871-880
- 10 马小燕, 李秋明, 关步云. 超声引导下经皮肤脐静脉穿刺术的应用 J. 实用妇产科杂志, 2003, 19(4): 250-251
- 11 Antoniadis T, Yapijakis C, Kaminopetros P, et al. A simple and effective approach for detecting maternal cell contamination in molecular prenatal diagnosis J. Prenat Diagn, 2002, 22(5): 425-429
- 12 Hiroshi S, Akihiko S, Taro M, et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma J. Lancet, 2000, 356(9236): 1170
- 13 许争峰, 胡娅莉, 朱瑞芳. 改良羊水原位培养法进行产前诊断的研究 J. 现代妇产科进展, 2003, 12(4): 273-275
- 14 孙路明, 王德芬, 凌梅立, 等. 胚外体腔穿刺术的初步临床研究 J. 现代妇产科进展, 2003, 12(4): 284-286
- 15 鹿占成, 陈颖, 王丽娟, 等. 检测 FGFR3 基因鉴别诊断先天性软骨发育不全 J. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(2): 16-17
- 16 Pinar K, Dilsat O, Arzum E, et al. Detection of achondroplasia G80R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology J. Clinica Chimica Acta, 2003, 336 (1): 57-64
- 17 Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis J. Lancet, 2003, 362(9379): 250
- 18 Rechitsky S, Verlinsky O, Amet T, et al. Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders J. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 183(9): S65-S68

(收稿日期 2003-12-26)

输卵管通液过敏性休克 1 例

山东省千佛山医院 周明书, 张国翔, 荣风年

患者, 女, 33 岁, 诊断为继发性不孕。经查体无通液术禁忌证, 无药物过敏史。于 2003 年 11 月 11 日, 月经干净 4d, 在我院门诊行首次输卵管通液术, 药液为生理盐水 20ml、庆大霉素 8 万 U、糜蛋白酶 4000U、地塞米松 5mg, 缓慢注入宫腔, 推注过程中感阻力较大, 患者诉下腹胀痛明显, 考虑输卵管通而不畅。后以双侧阴道侧穹窿封闭治疗, 共 10d, 用药同上。2003 年 12 月 10 日, 月经干净 3d, 再次行输卵管通液术, 用药同前, 推注过程中阻力较小, 患者稍感下腹胀痛, 无其他特殊不适, 术后 3min, 突然全身颤栗, 胸闷, 心悸, 呼吸困难, 意识丧失, 面部潮红肿胀, 口唇紫绀, 牙关紧闭, 口吐泡沫, 脉搏细速, 血压测不到, 双肺弥漫性水泡音。立即予以吸氧、吸痰, 肌注肾上腺素 1mg、地塞米松 10mg, 泵入多巴胺 200mg, 5min 后意识恢复, 心率 130/min, 血压 60/40mmHg, 继续泵入多巴胺, 40min 后心率、血压平稳, 抢救成功。诊断为过敏性休克。

讨论 糜蛋白酶是从牛胰腺中提纯的蛋白水解酶, 临床常用于炎症、局部水肿、积血等的辅助治疗, 但因是异体蛋白酶, 具有抗原性, 大量非口服使用时可引起过敏性休克, 且多发生在停用后再次使用时。庆大霉素偶尔也可引起过敏性休克, 属 I 型(速发型)超敏反应, 多在首次用药时发生, 此例在侧穹窿封闭过程中多次使用庆大霉素, 未发生过敏反应, 故我们认为此例为糜蛋白酶引起的过敏性休克, 提示在治疗前应详细询问患者有无药物过敏史, 慎重使用可能导致过敏的药物。建议用糜蛋白酶前先做皮肤过敏试验。参照乐杰主编的《妇产科学》(第 6 版), 输卵管通畅试验宜选用透明质酸酶(剂量 1500U), 临床上不良反应较罕见。

(收稿日期 2004-02-02)