# aCGH应用于产前诊断意外发现DMD基因缺失或重复病例分析

吴秋华，石凤蕊，刘　瑗，王　林，翟　文，强　荣
（西北妇女儿童医院医学遗传中心，陕西 西安 710061）

[**摘　要**]**目的**　探讨微阵列比较基因组杂交(aCGH)技术应用在产前诊断中发现抗肌萎缩蛋白基因(又称DMD基因)缺失或重复的重要价值。**方法**　收集2019年9月至2020年7月在西北妇女儿童医院因高危因素(高龄、血清学筛查高风险、无创筛查高风险或超声软指标异常等)选择aCGH技术进行产前诊断的851例孕妇的羊水样本进行检测，并进一步采用多重连接探针扩增(MLPA)方法对DMD基因变异样本进行验证。**结果**　在851例孕妇的羊水样本中，经aCGH产前诊断时意外发现4例羊水样本存在DMD基因缺失或重复，同时MLPA检测验证了上述变异。胎儿1：男胎，arr[GRCh37]Xp21.1(31691172-31766673)×0，DMD基因E52-53缺失；胎儿2：男胎，arr[GRCh37]Xp21.2(31016983-31351900)×2，DMD基因E61-79重复；胎儿3：女胎，arr[GRCh37]Xp21.2(31182699-31474949)×3，DMD基因E58-74重复；胎儿4：男胎，arr[GRCh37]Xp21.1(31777925-32152126)×2，DMD基因E45-51重复。4例变异均遗传自母亲。**结论**　产前诊断是防止DMD患者出生的重要手段，aCGH技术用于产前诊断不仅可以检测染色体微缺失和微重复综合征，还有助于检测由基因缺失或重复引起的单基因疾病，从而为临床诊断及遗传咨询提供了理论依据。

[**关键词**]微阵列比较基因组杂交；抗肌萎缩蛋白基因；产前诊断；多重连接探针扩增
Doi：10.3969/j.issn.1673－5293.2024.05.008
[**中图分类号**]R17　　[**文献标识码**]A　　[**文章编号**]1673－5293(2024)05－0047－08

## Case analysis of accidental discovery of DMD gene deletion or duplication using aCGH in prenatal diagnosis

WU Qiuhua，SHI Fengrui，LIU Yuan，WANG Lin，ZHAI Wen，QIANG Rong
（*Center of Medical Genetics，Northwest Women's and Children's Hospital，Shaanxi Xi'an* 710061，*China*）

[**Abstract**] **Objective** To explore the important value of array comparative genomic hybridization (aCGH) technology in prenatal diagnosis for the detection of deletions or duplications in the dystrophin gene (also known as the DMD gene). **Methods** Amniotic fluid samples from 851 pregnant women who underwent prenatal diagnosis using aCGH technology due to high-risk factors (such as advanced maternal age, high-risk serum screening, high-risk non-invasive screening, or abnormal ultrasound soft markers) at Northwest Women's and Children's Hospital from September 2019 to July 2020 were collected for testing. Furthermore, the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method was used to validate DMD gene variations. **Results** Among the 851 amniotic fluid samples from pregnant women, aCGH prenatal diagnosis unexpectedly revealed 4 cases of DMD gene deletions or duplications. Subsequent MLPA testing confirmed the above variations. Fetus 1: male, arr [GRCh37]Xp21.1 (31691172-31766673)×0, DMD gene E52-53 deletion; Fetus 2: male, arr [GRCh37]Xp21.2 (31016983-31351900)×2, DMD gene E61-79 duplication; Fetus 3: female, arr [GRCh37]Xp21.2 (31182699-31474949)×3, DMD gene E58-74 duplication; Fetus 4: male, arr [GRCh37]Xp21.1 (31777925-32152126)×2, DMD gene E45-51 duplication. All 4 variations were inherited from the mothers. **Conclusion** Prenatal diagnosis is an important means to prevent the birth of DMD patients. The application of aCGH technology in prenatal diagnosis not only detects chromosomal microdeletions and microduplications syndromes but also helps to detect single-gene diseases caused by gene deletions or duplications, providing a theoretical basis for clinical diagnosis and genetic counseling.

[**Key words**] array comparative genomic hybridization; dystrophin gene; prenatal diagnosis; multiplex ligation-dependent probe amplification

[**收稿日期**]2023－05－23
[**基金项目**]国家自然科学基金项目(82201865)；陕西省重点研发计划项目(2023-YBSF-305)
[**作者简介**]吴秋华(1984—)，女，主管技师，主要从事遗传检验工作。
[**通讯作者**]强　荣，主任医师。

Duchenne 型肌营养不良症(duchenne muscular dystrophy,DMD)是临床中最常见的进行性肌营养不良症,由位于染色体 Xp21.1 的抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因(又称 DMD 基因)突变引起[1]。大多数患者为男性,女性一般为致病基因携带者。DMD 在活产男婴中的发病率接近 2.86/万(1/3 500)[2]。DMD 临床典型特征为对称性的近端肌肉无力伴腓肠肌假性肥大,患者一般在 3～5 岁时出现症状,进行性加重,直至失去行走能力,在 30 岁左右死于心肺衰竭。约 40% 的 DMD 病例为新发突变[3],无 DMD 家族史,一般在出生后才能被发现。微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization,aCGH)等新技术广泛应用于产前诊断后,越来越多的染色体微缺失和微重复被检测到,甚至可能有一些意想不到的发现。本研究收集了 2019 年 9 月到 2020 年 7 月在西北妇女儿童医院因高危因素(高龄、血清学筛查高风险、无创筛查高风险或超声软指标异常等)选择 aCGH 技术进行产前诊断的 851 例孕妇的羊水样本进行检测,意外发现 4 例胎儿存在 DMD 基因外显子重复或缺失,报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

孕妇 1,34 岁,孕 1 产 0,孕 21 周$^{+3}$天,B 超提示胎儿(胎儿 1)脐膨出。本次系因多囊卵巢促排妊娠,否认孕期不规则出血史,否认其他有毒有害物质接触史,无宠物接触史。平素月经规律,乙肝小三阳携带,丈夫体健。其妹生育 1 儿 1 女,均体健。孕妇及其丈夫无遗传病家族史。

孕妇 2,33 岁,孕 2 产 1,孕 26 周$^{+5}$天,B 超提示胎儿(胎儿 2)右位主动脉弓伴左侧锁骨下动脉迷走、胎儿左心室强光点,产前血清学筛查未见异常。本次妊娠有感冒史,咳嗽病史,口服桔贝合剂。孕前诊断为抑郁症,服用抗抑郁药(安定、百解忧等)1 个月,停药 20 天后停经。既往月经规律,生育 1 女,半年前女儿患特异性皮炎。孕妇既往鼻炎病史,无遗传病家族史。

孕妇 3,33 岁,孕 3 产 1,孕 27 周$^{+3}$天,孕 22 周时系统 B 超提示胎儿(胎儿 3)颈后皮肤皱褶(nuchal fold,NF)增厚(6.8mm),胎儿心脏 B 超未见明显异常,产前血清学筛查示唐氏临界风险(1∶413),孕妇外周血胎儿游离 DNA 无创产前检测(noninvasive prenatal test,NIPT)低风险。10 年前(2010 年)顺产 1 男婴,目前体健[孕妇自述,后经多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification,MLPA)检测确定该男童为 DMD 外显子部分重复]。否认孕期有毒有害物质接触史,既往体健,无遗传病家族史。

孕妇 4,32 岁,孕 1 产 0,孕 28 周$^{+5}$天,B 超提示胎儿(胎儿 4)骶尾椎先天发育异常,左侧侧脑室后角增宽至 10mm,胎儿心脏 B 超未见明显异常。本次因不孕行试管助孕,一代试管失败,二代试管补救后妊娠,种植 1 枚胚囊,产前血清学筛查低风险,NIPT 低风险,既往体健,无遗传病家族史。

本研究已通过西北妇女儿童医院医学伦理委员会审批(2023-013)。所有孕妇及家属均签署书面知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 的提取

所有孕妇均行羊膜腔穿刺术,抽取羊水 10mL,离心收集羊水中的细胞。使用 PureGene 组织提取试剂盒(Qiagen,德国)提取羊水基因组 DNA,进行 aCGH 和 MLPA 检测。抽取孕妇外周血 3～4mL,使用血液基因组 DNA 试剂盒(天根,北京)提取外周血 DNA,进行 MLPA 检测。为了确保结果的准确性,使用荧光标记短串联重复序列(short tandem repeats,STR)复合扩增检测试剂盒(阅微,江苏)对羊水和孕妇外周血的 DNA 进行扩增,以分析待检样本中是否存在母体细胞污染。

#### 1.2.2 aCGH 的检测

检测方法参照有关参考文献[4]。按照 aCGH 技术流程进行标记、纯化、杂交、洗涤。试剂盒均为 Technologies Agilent 公司生产,杂交芯片为美国 Agilent Technologies 公司生产的 PerkinElmer CGX™(8×60K)芯片。使用 SureScan 微阵列扫描仪(Agilent Technologies,美国)扫描芯片,并使用 Cytogenomics 软件(Agilent Technologies,美国)分析结果。最后,使用 Genoglyphix®(https://uk.genoglyphix.com/)在线判读数据并进行分析。参考 DGV、DECIPHER、ISCA、OMIM、ClinVar、PubMed 等公共和实验室数据库,针对≥100kb 的拷贝数变异(copy number variation,CNVs)片段进行致病性分析。根据最新版美国医学遗传学与基因组学学会

(The American College of Medical Genetics and Genomics,ACMG)的序列变异解读指南[5]进行致病性分析解读。

1.2.3 MLPA 的检测

DMD 基因检测试剂盒(MRC-Holland,荷兰)含有 2 个探针(SALSA MLPA P034/P035),可检测 DMD 基因的 79 个外显子是否存在缺失或重复。使用 ABI 3500DX 测序仪(Thermo Fisher Scientific,美国)进行毛细管电泳,使用 Coffalyser 软件(http//www.mlpa.com)分析数据。以探针相对峰面积增加或减少 30%分别提示 DMD 基因外显子的重复或缺失。

## 2 结果

### 2.1 aCGH 及 MLPA 检测结果

所有羊水样本均无肉眼可见性母血污染,经 STR 检测,均无母体细胞污染,可用于后续检测。

羊水 aCGH 及 MLPA 检测结果提示:

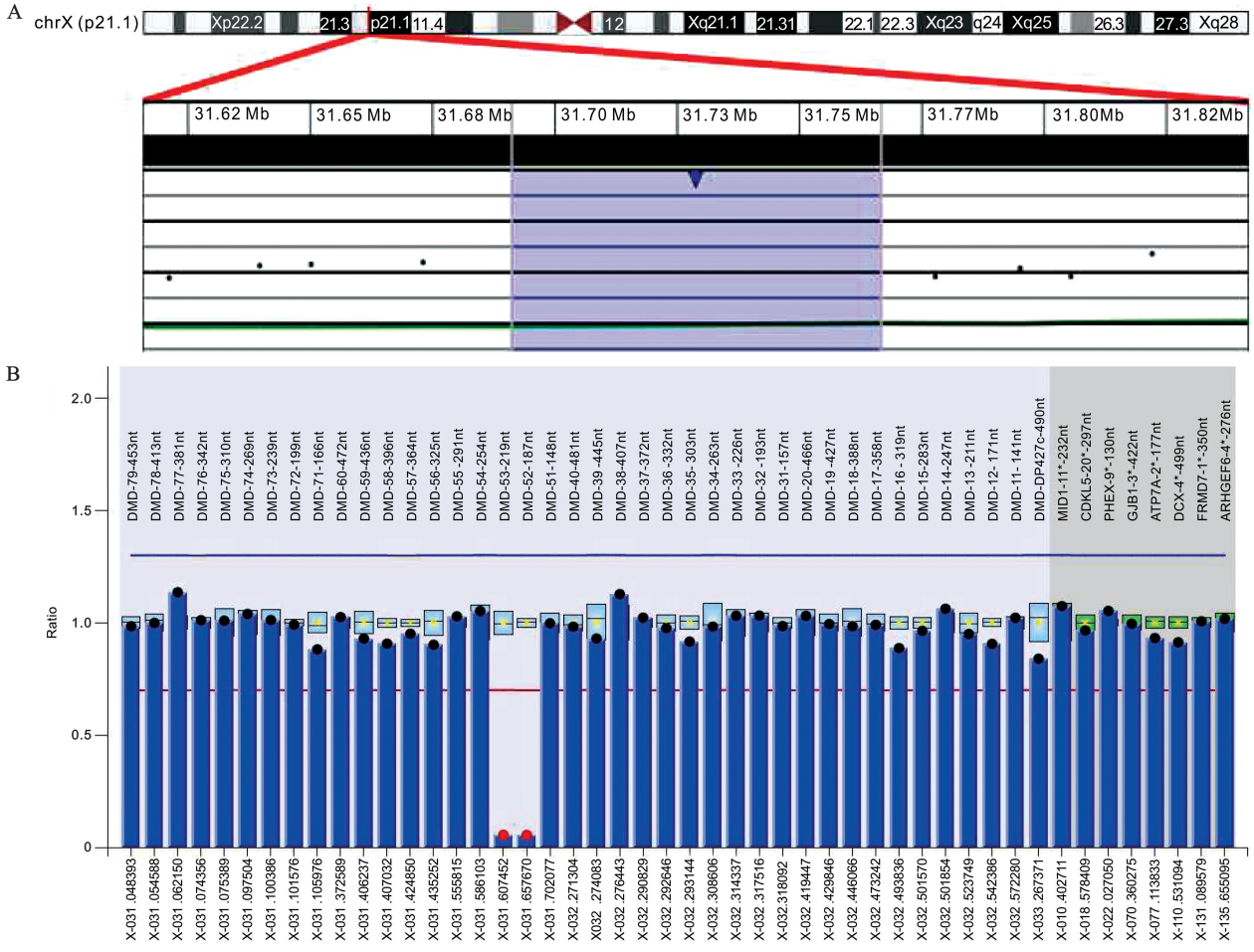
胎儿 1:男胎,arr[GRCh37]Xp21.1(31691172-31766673)×0(Xp21.1 缺失 75.5kb),MLPA 提示 DMD 基因 E52-53 缺失,见图 1。

胎儿 2:男胎,arr[GRCh37]Xp21.2(31016983-31351900)×2(Xp21.2 重复 334.92kb),MLPA 提示 DMD 基因 E61-79 重复,见图 2。

胎儿 3:女胎,arr[GRCh37]Xp21.2(31182699-31474949)×3(Xp21.2 重复 292.25kb),MLPA 提示 DMD 基因 E58-74 重复,见图 3。

胎儿 4:男胎,arr[GRCh37]Xp21.1(31777925-32152126)×2(Xp21.1 重复 374.20kb),MLPA 提示 DMD 基因 E45-51 重复,见图 4。

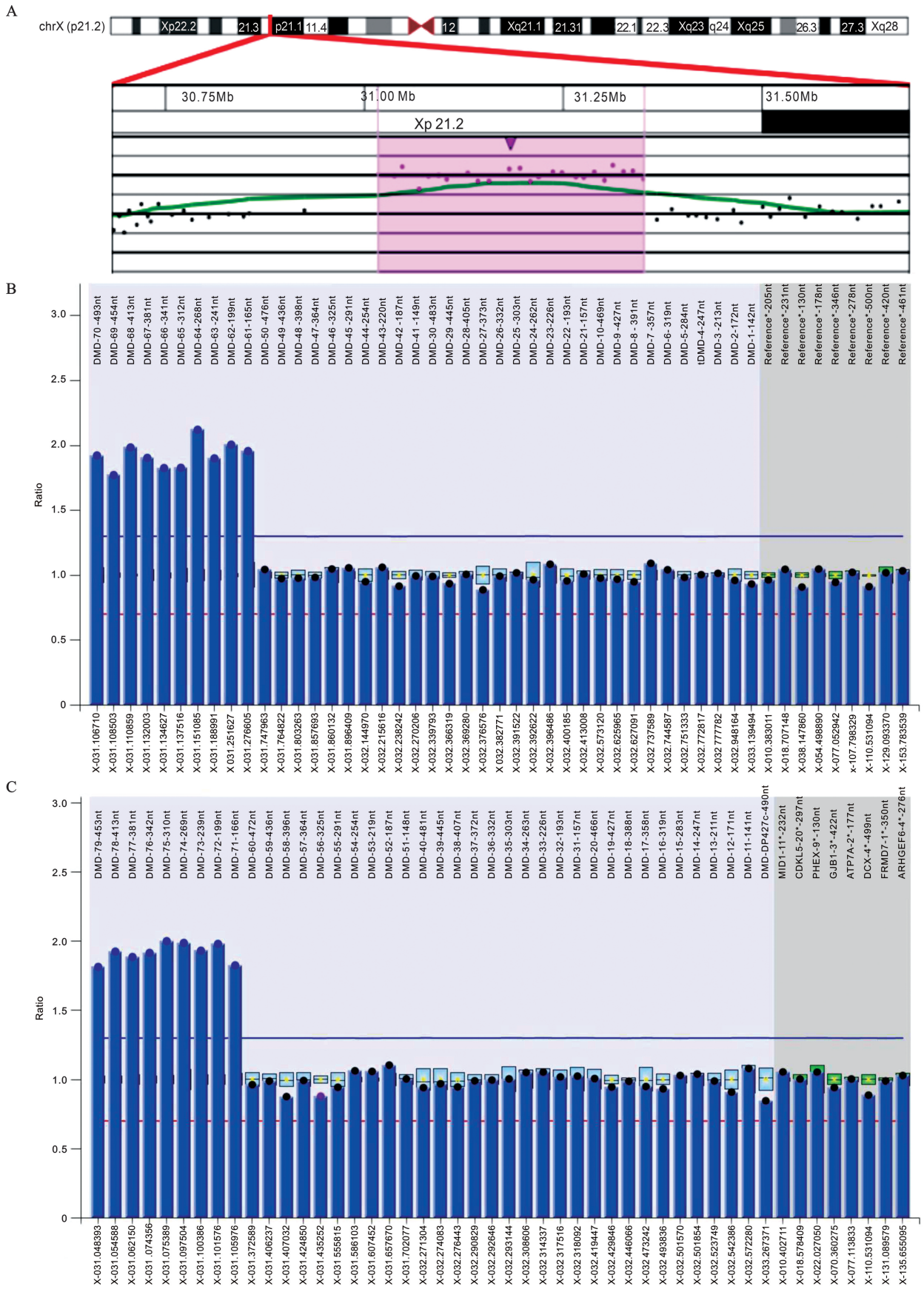
4 例孕妇外周血 MLPA 提示:孕妇 1 的 DMD 基因 E52-53 杂合缺失;孕妇 2 的 DMD 基因 E61-79 重复;孕妇 3 的 DMD 基因 E58-74 重复;孕妇 4 的 DMD 基因 E45-51 重复。4 例胎儿的 DMD 基因变异均遗传自母亲。




注:A 为 aCGH,arr[GRCh37]Xp21.1(31691172-31766673)×0;B 为 MLPA,DMD 基因 E52-53 缺失。

**图 1 胎儿 1 的 aCGH 和 MLPA 检测结果**

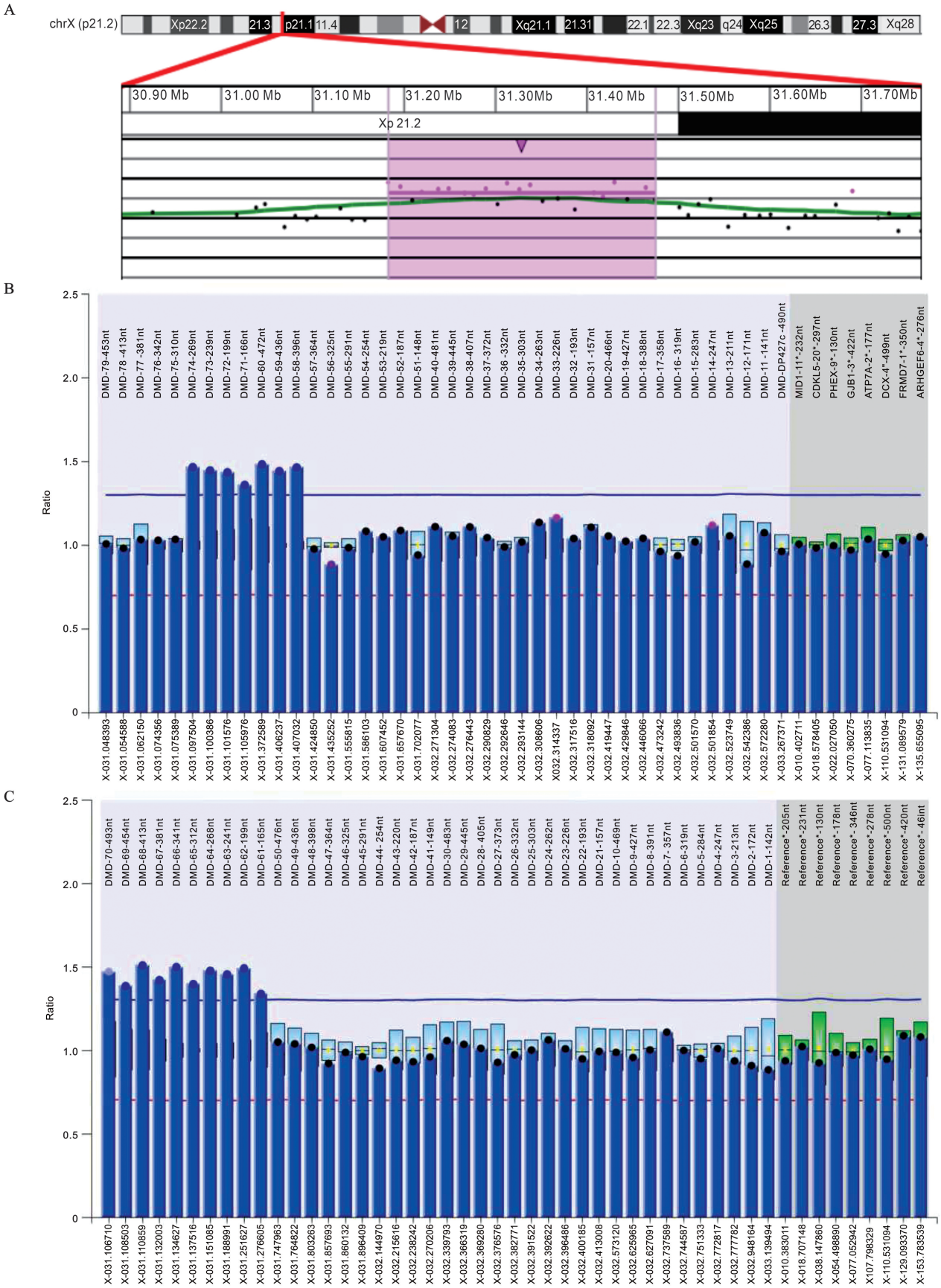
Fig.1 aCGH and MLPA detection results of fetus 1




注：A 为 aCGH，arr[GRCh37]Xp21.2(31016983-31351900)×2；B 和 C 为 MLPA，DMD 基因 E61-79 重复。

**图 2　胎儿 2 的 aCGH 和 MLPA 检测结果**

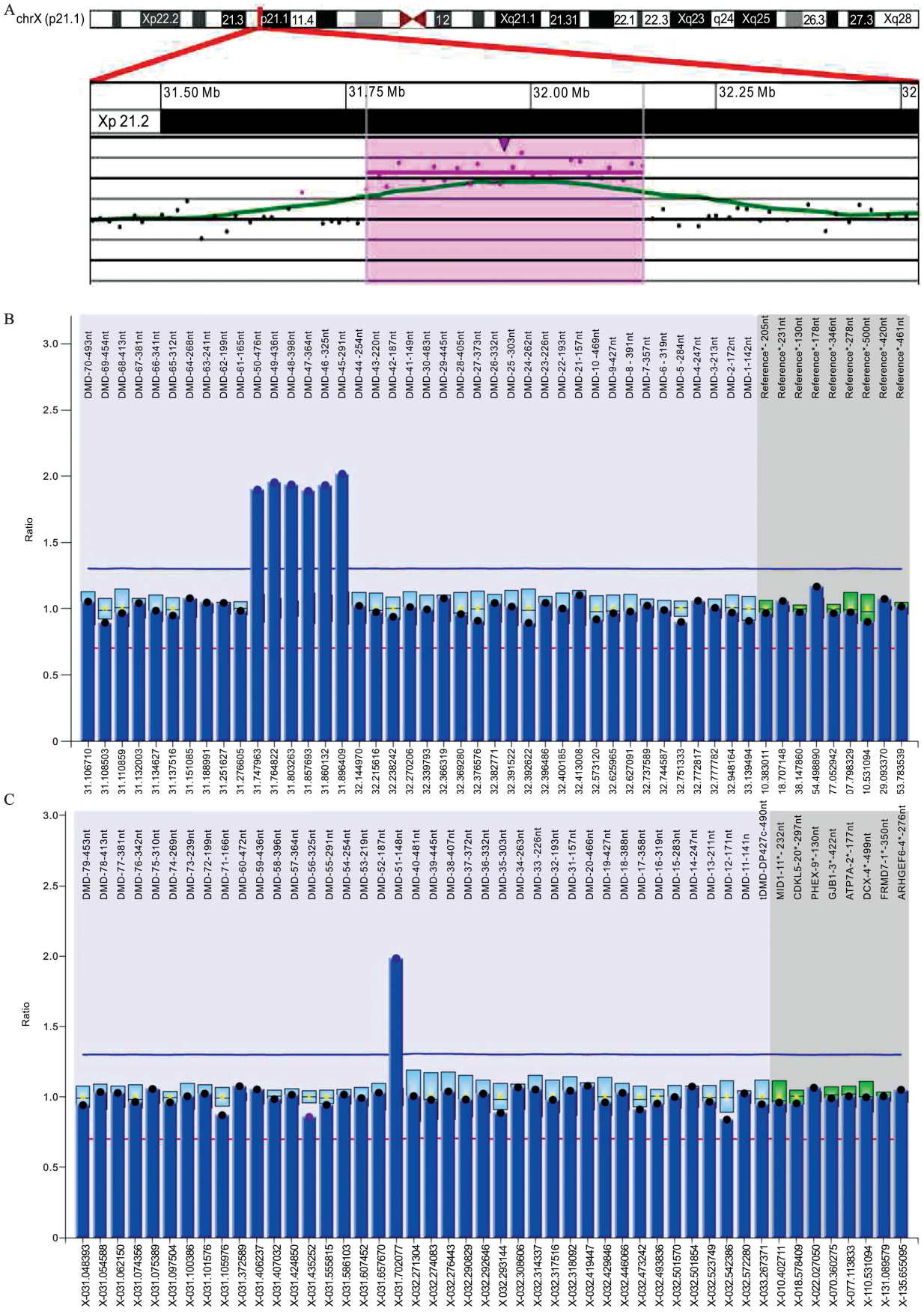
Fig.2　aCGH and MLPA detection results of fetus 2




注：A 为 aCGH，arr[GRCh37]Xp21.2(31182699-31474949)×3；B 和 C 为 MLPA，DMD 基因 E58-74 重复。

**图 3 胎儿 3 的 aCGH 和 MLPA 检测结果**

Fig.3 aCGH and MLPA detection results of fetus 3




注：A 为 aCGH，arr[GRCh37]Xp21.1(31777925-32152126)×2；B 和 C 为 MLPA，DMD 基因 E45-51 重复。

**图 4　胎儿 4 的 aCGH 和 MLPA 检测结果**

Fig.4　aCGH and MLPA detection results of fetus 4

### 2.2 妊娠结局

经详细的遗传咨询和慎重考虑，孕妇 1、孕妇 2 和孕妇 4 均选择终止妊娠；孕妇 3 选择继续妊娠，其女胎出生时表现出双腿向上弯曲，体毛浓密，新生儿疾病筛查未见异常，全外显子组测序（whole exome sequencing，WES）（随访时家属自述）未检测出 DMD 基因变异。4 例胎儿的检测结果及妊娠结局见表 1。

**表 1　4 例胎儿检测结果及妊娠结局**

Table 1　Test results and pregnancy outcomes of 4 fetuses

| 病例 | 胎儿性别 | aCGH 检测结果 | MLPA 检测结果 | 是否遗传自母亲 | 妊娠结局 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 男 | arr[GRCh37]Xp21.1 缺失 75.5kb(31691172-31766673)×0 | DMD 基因 E52-53 缺失 | 是 | 终止妊娠 |
| 2 | 男 | arr[GRCh37]Xp21.2 重复 334.92kb(31016983-31351900)×2 | DMD 基因 E61-79 重复 | 是 | 终止妊娠 |
| 3 | 女 | arr[GRCh37]Xp21.2 重复 292.25kb(31182699-31474949)×3 | DMD 基因 E58-74 重复 | 是 | 出生时双腿向上弯曲，体毛浓密 |
| 4 | 男 | arr[GRCh37]Xp21.1 重复 374.20kb(31777925-32152126)×2 | DMD 基因 E45-51 重复 | 是 | 终止妊娠 |

## 3 讨论

目前，对 DMD 尚无有效治愈方法，该病对患者、家庭和社会均造成沉重负担。尽管学者们对 DMD 基因治疗进行了许多研究，如通读治疗、外显子跳跃治疗、载体介导的基因替代治疗和基因编辑治疗，但目前基因治疗仍然面临着巨大的挑战和困境[6]。因此在出生前及时发现并终止妊娠是避免 DMD 患儿出生及降低出生缺陷率的关键。女性 DMD 携带者一般无临床表型，无 DMD 家族史的患者尤其是新发病例通常无法在出生前被发现，因此产前 DMD 基因筛查尤为重要，产前诊断是预防 DMD 患者出生的重要手段。

### 3.1 aCGH 技术在临床染色体疾病诊断中的应用

近年来，随着产前诊断技术的不断发展，aCGH 作为新兴技术在临床染色体疾病诊断中逐渐得到了广泛的应用[7-9]。aCGH 技术基于芯片平台，用不同荧光标记待测样本与标准基因组 DNA 对照，最后杂交于微阵列芯片上，可检测待测样本基因组相对于标准基因组 DNA 拷贝数的变化。它与传统的染色体 G 显带核型分析技术相比，具有分辨率高、覆盖面广、速度快和自动化程度高的优点，可大大提高产前诊断的准确性及疾病的检出率[10-11]。Costa 等[12]研究表明，使用 aCGH 技术比单独使用常规核型分析的诊断率提高了 4.9%。aCGH 技术在产前诊断领域应用的临床指征主要有高龄、NIPT 检测 DNA 高风险、夫妻一方染色体异常、B 超提示异常、不良孕育史等[13]。本研究中 4 例胎儿均存在超声软指标异常，胎儿 1 为脐膨出，胎儿 2 为心血管结构异常，胎儿 3 为 NF 增厚伴血清学筛查临界风险，胎儿 4 为骶尾椎先天发育异常伴左侧侧脑室后角增宽。目前，以上异常与 DMD 基因的相关性均未见文献报道。产前超声软指标是产前诊断中不可忽视的一部分，超声软指标异常的出现意味着胎儿存在潜在的其他结构异常或染色体异常风险[14]，且合并超声软指标异常数量越多的胎儿染色体异常发生率越高[15]。因此，对于胎儿超声软指标异常阳性时，有必要行介入性产前诊断，及时明确诊断可为产前咨询和后续临床处理提供依据[16]。aCGH 技术应用于产前诊断可显著提高胎儿染色体异常的检出率，有效降低胎儿出生缺陷的发生[17]。

### 3.2 DMD 的遗传咨询

虽然 aCGH 并非是 DMD 的特异性诊断技术，但在产前诊断过程中意外检出 DMD 基因或其他致病基因的微重复或微缺失的情况时有发生[18-19]。本研究通过 aCGH 技术进行了羊水产前诊断，意外发现了 4 例羊水样本的染色体 Xp21.2 或 Xp21.1 区域存在小片段的缺失或重复，该片段覆盖了 DMD 基因的外显子部分区域，同时 MLPA 检测证实了这些突变。这为 aCGH 技术对产前诊断的重要性再次提供了强有力的证据。李涛等[20]对 64 个 DMD 基因新发突变家系女性再妊娠进行产前诊断，结果发现胎儿中有 2 例存在 DMD 基因外显子缺失突变。本研究中 4 例孕妇均为 DMD 携带者，因此建议凡有 DMD 胎儿妊娠史的女性，即使本人 DMD 基因外显子未见变异，仍建议其再孕时及时进行 DMD 基因产前诊断。在本研究中，孕妇 3 的女性胎儿为 DMD

外显子重复携带者，但其出生后表现为双腿向上弯曲，体毛浓密，新生儿疾病筛查和 WES 未检测出明显异常，推测其双腿向上弯曲有可能是关节紧张，与宫内姿势有关；毛发的密度和颜色往往受父母遗传因素影响，先天性多毛症或一些内分泌疾病如先天性肾上腺皮质增生、垂体病变及卵巢病变也会引起体毛过重[21-23]；因此认为其双腿和体毛的问题应该与 DMD 基因外显子重复无关。

综上所述，产前诊断是预防 DMD 患者出生的重要手段，aCGH 技术用于产前诊断不仅可以检测染色体微缺失和微重复综合征，还有助于发现 DMD 或其他染色体片段缺失或重复所致的单基因疾病，在一定程度上降低了单基因疾病的漏诊率，为全面评估胎儿和后续的遗传咨询提供理论依据。

## ［参考文献］


[1]Fortunato F，Farnè M，Ferlini A.The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin[J].Neuromuscul Disord，2021，31(10)：1013-1020.

[2]中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组.杜氏进行性肌营养不良的临床实践指南[J].中华医学遗传学杂志，2020，37(3)：258-262.

[3]高值，刘莉娜，王艳丽，等.中原地区 67 个 DMD 家系产前诊断结果的分析[J].中华医学遗传学杂志，2022，39(7)：669-673.

[4]Jin Q，Qiang R，Cai B，et al.The genotype and phenotype of chromosome 18p deletion syndrome：case series[J].Medicine (Baltimore)，2021，100(18)：e25777.

[5]Richards S，Aziz N，Bale S，et al.Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants：a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology[J].Genet Med，2015，17(5)：405-424.

[6]吴璇，俞立强，刘美蓉，等.恢复杜氏肌营养不良症中抗肌萎缩蛋白表达的治疗方法研究进展[J].中华神经科杂志，2022，55(5)：551-560.

[7]Cheng S S W，Chan K Y K，Leung K K P，et al.Experience of chromosomal microarray applied in prenatal and postnatal settings in Hong Kong[J].Am J Med Genet C Semin Med Genet，2019，181(2)：196-207.

[8]Türkyılmaz A，Geckinli B B，Tekin E，et al.Array-based comparative genomic hybridization analysis in children with developmental delay/Intellectual disability[J].Balkan J Med Genet，2022，24(2)：15-24.

[9]Pinheiro M I，Silva C，Lourenço L，et al.Array-CGH：importance in the study of developmental delays in pediatrics[J].Rev Neurol，2020，71(5)：171-176.

[10]Chen Q，Xu Z，Chen G，et al.Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of three chromosomal abnormalities with favorable outcomes[J].Taiwan J Obstet Gynecol，2020，59(2)：338-341.

[11]Kowalczyk K，Bartnik-Głaska M，Smyk M，et al.Comparative genomic hybridization to microarrays in fetuses with high-risk prenatal indications：polish experience with 7400 pregnancies[J].Genes (Basel)，2022，13(4)：690.

[12]Costa B C，Grangeia A，Galvão J，et al.Prenatal diagnosis study using array comparative genomic hybridization for genotype-phenotype correlation in 772 fetuses[J].Ann Diagn Pathol，2022，61：152059.

[13]田海英，罗真真，汪琳琳，等.染色体微阵列技术在产科和儿科遗传病诊断中的临床应用价值分析[J].国际检验医学杂志，2022，43(6)：701-704.

[14]张欢.产前超声软指标的临床意义[J].医学理论与实践，2018，31(1)：29-31.

[15]南钰，刘宗谕，张剑，等.妊娠 16～18 周超声软指标与胎儿染色体异常的关系[J].中华医学杂志，2018，98(41)：3320-3323.

[16]郭芬芬，徐盈，张建芳，等.单一超声软指标阳性与胎儿染色体异常的关系[J].山西医科大学学报，2019，50(3)：357-360.

[17]余珍，魏洁，张金花，等.染色体微阵列芯片技术在 3200 例孕妇产前诊断中的应用[J].中国优生与遗传杂志，2021，29(6)：843-845.

[18]宋婷婷，黎昱，徐盈，等.产前染色体微阵列分析意外发现 DMD 基因缺失[J].中华医学遗传学杂志，2019，36(8)：773-776.

[19]张倩，吴东，肖海，等.微阵列比较基因组杂交在产前诊断中意外检出 Duchenne 肌营养不良基因变异的回顾性分析[J].中华围产医学杂志，2021，24(8)：601-607.

[20]李涛，刘红彦，肖海，等.DMD 基因新发突变家系生育史女性再发风险分析[J].中华检验医学杂志，2021，44(6)：509-515.

[21]罗飞宏.先天性肾上腺皮质增生症诊断治疗进展[J].中华实用儿科临床杂志，2015，30(8)：564-569.

[22]唐金玲，汤建萍.先天性胎毛性多毛症一例[J].实用皮肤病学杂志，2018，11(4)：255-256.

[23]王诗韵，张丽，张磊，等.以多毛症为表现的卵巢雄激素分泌性肿瘤 1 例[J].中国临床案例成果数据库，2022，4(1)：E02399-E02399.


［专业责任编辑：陈　倩　于学文］
［中文编辑：王　懿；英文编辑：牛　惠］