

- [10] 陈汝福,邹声泉. 肝癌细胞根治性切除术后复发与转移的研究进展[J]. 肿瘤防治杂志,2000,7(1):83-85.
- [11] Yin JL, Shackel NA, Zekry A, et al. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I[J]. Immunol Cell Biol,2001,79(3):213-221.
- [12] Fu M, Wang C, Li Z, et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions[J]. Endocrinology,2004,145(12):5439-5447.
- [13] Sala A. B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer[J]. Eur J Cancer,2005,41(16):2479-2484.
- [14] Brignole C, Marimpietri D, Pagnan G, et al. Neuroblastoma targeting by c-myc-selective antisense oligonucleotides entrapped in anti-GD2 immunoliposome: immune cell-mediated anti-tumor activities [J]. Cancer Lett,2005,228(1-2):181-186.

(收稿日期:2007-07-05 修回日期:2007-08-15)

## 多重定量荧光 PCR 在 21-三体及性染色体多倍体畸变诊断中的应用<sup>▲</sup>

唐宁<sup>1</sup> 蔡稔<sup>1</sup> 梁昕<sup>1</sup> 陈华云<sup>2</sup> 丁渭<sup>2</sup> 潘莉珍<sup>1</sup> 罗颖花<sup>1</sup> 许泽辉<sup>1</sup> 韦小妮<sup>1</sup>

(1 广西柳州市妇幼保健院,柳州市 545001;2 中山大学达安基因有限公司,广州市 510665)

**【摘要】** 目的 探讨多重定量荧光 PCR(QF-PCR)技术在染色体非整倍体畸变诊断中的应用价值。方法 抽取脐血样本 16 份,羊水样本 73 份,21、X、Y 染色体数目异常患者及其父母外周静脉血 71 份,针对 21 号染色体和 X、Y 染色体上 7 个基因位点 21S1435、D21S11、D21S1411、AMXY、DXS981、DXS6809 和 X22 应用 QF-PCR 方法进行多重扩增,毛细管电泳法检测并分析结果。所有样本同时进行染色体核型分析。结果 染色体核型分析中有 129 例为正常核型 46,XX(XY);26 例 21-三体(其中 1 例为易位型,余为标准型);1 例 45,XO/46,XX;2 例 47,XXX;1 例 47,XXY;1 例 45,XX,der(13,21)。QF-PCR 结果中,确诊 1 例 47,XXY,26 例 21-三体征中 23 例确诊,2 例 47,XXX 被提示可能存在性染色体数目异常,其余为阴性结果。结论 多重定量荧光 PCR 技术可用于染色体非整倍体畸变的快速诊断。

**【关键词】** 短串联重复序列;定量荧光 PCR;染色体非整倍体畸变

**【中图分类号】** R 596.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2007)11-1666-03

### Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction for the diagnosis of trisomy 21 and sex chromosome aneuploidies

TANG Ning, CAI Nian, LIANG Xi, CHEN Hua-yun, DING Wei, PAN Li-zhen, LUO Ying-hua, XU Ze-hui, WEI Xiao-ni

(1 Liuzhou Maternal and Children Health Care Hospital, Liuzhou 545001, China; 2 Daan Gene Co. Ltd. of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510665, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the significance of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the diagnosis of trisomy 21 and sex chromosome aneuploidies. **Methods** DNA templates were obtained from 16 cord blood samples, 73 amniotic fluid samples, 71 peripheral blood; Seven markers located on chromosomes X, Y and 21 (AMXY, DXS981, DXS6809, X22, D21S1435, D21S11 and D21S1411) were amplified by multiplex QF-PCR assay, amplification products were analyzed by capillary electrophoresis, cytogenetic analysis was performed in all samples. **Results** Cytogenetic analysis showed that there were 26 trisomy 21 abnormal samples; 45, X/46, XX ( $n=1$ ); 47, XXX ( $n=2$ ); 47, XXY ( $n=1$ ); 45, XX, der(13,21) ( $n=1$ ). The result of QF-PCR: one case was confirmed to be 47, XXY; 23 cases to be 47, XX or XY, +21; two 47, XXX suggested sex chromosome abnormal, others were negative. **Conclusion** Multiplex QF-PCR could be applied in rapid diagnosis of chromosome aneuploidies.

**【Key words】** Small tandem repeats (STR); Quantitative fluorescent PCR (QF-PCR); Chromosome aneuploidies

染色体非整倍体是指细胞的染色体数目多或少了一条或多条。非整倍体畸变可分为单体型、三体型、多体型、嵌合体。临床上常见的非整倍体畸变包括了 21-三体综合征(Down 综合征)、18-三体综合征(Edwards 综合征)、13-三体综合征(Patau 综合征),以及一些性染色体畸变,例如 X 单体(Turner 综合征),或性染色体三体,如 47XXX(X 三体综合征)、47XXY(Klinefelter 综合征)、47XYY(XYY 综合征)等。多年研究表明 13、18、21 及 X、Y 非整倍体占新生儿染色体数目异常的 95%。在这类遗传病中,在胎儿期常有流产、死胎、畸胎等,患儿可表现为先天智力低下、生长发育迟缓,常伴有五官、四肢、

内脏等方面畸形,在这类遗传病中,在胎儿期常有流产、死胎、畸胎等,患儿可表现为先天智力低下、生长发育迟缓,常伴有五官、四肢、内脏等方面畸形,对家庭和社会造成重大危害。基于这点,学者们在不断地寻求各种诊断方法来避免这类患儿的出生。

近年来,随着多学科不断发展并相互渗透,使得染色体畸变诊断技术不断提高,快捷和准确是发展方向。多重定量荧光 PCR(quantitative fluorescent PCR, QF-PCR)是目前用于染色体畸变产前诊断的快捷有效的一项技术,我们应用此项技术在染色体非整倍体畸变的诊断上作了一些研究,现报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 样本来源 抽取在我院行产前诊断的孕中期胎儿脐血样本 16 份和羊水样本 73 份,门诊就诊的 21、X、Y 染色体数目异常患者及其父母外周静脉血 71 份。各类样本进行细胞培养及染色体核型分析,同时进行 QF-PCR 检测。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验所需的主要设备:显微镜(日本 OLYMPUS-BX51)、全自动染色体分析系统(英国 AI 公司)、基因扩增仪(美国 ABI5700 型)、遗传分析仪(美国 ABI3100 型)。

1.2.2 样本采集及处理:脐血及羊水样本由产科专职产前诊断医师抽取。脐血取 0.5~1 ml,肝素抗凝。其中 0.05~0.3 ml 用于 DNA 提取,其余用于细胞培养染色体核型分析;羊水取 15~30 ml,2~10 ml 用于用于 DNA 提取,其余用于细胞培养染色体核型分析;外周血抽取 3 ml,EDTA 盐抗凝,0.3~1 ml 用于 DNA 提取,其余用于染色体核型分析。

1.2.3 DNA 提取方法:脐血及外周血样本用全血 DNA 提取试剂盒按规程提取,由宁波中鼎生物技术公司提供;羊水样本按经典酚氯法提取 DNA。

1.2.4 染色体核型分析运用 G 显带分析技术;

1.2.5 QF-PCR:针对 21 号染色体上特异的 3 个 STR 位点(D21S1435、D21S1411、D21S11),X 染色体上的两个 STR 位点(DXS981、DXS6809),X、Y 染色体上共有的 STR 位点 X22 及性别特异性位点 AMXY 进行单管定量荧光 PCR 七重复合扩增,各遗传位点扩增上游引物标记荧光集团,其中 21 号染色体上遗传位点用 FAM 标记,性染色体上遗传位点用 HEX 标记,应用美国 ABI 3100 遗传分析仪对产物进行检测和数据分

析。PCR 反应体系:检测试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供。PCR mastermix 16  $\mu$ l,Primer mix 4  $\mu$ l,Taq 酶 0.5  $\mu$ l,DNA 样品 X  $\mu$ l(20~30 ng),水(3.5-X  $\mu$ l),反应体系总量 25  $\mu$ l。PCR 反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,然后 93 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 26 个循环;最后 60 $^{\circ}$ C 60 min。每批次实验均同时设 21 三体阳性质控及性染色体多倍体阳性质控、阴性质控,以监控实验的有效性。

1.2.6 毛细管电泳检测和结果分析:毛细管电泳体系为 Hi-Di<sup>TM</sup> formamide 10.0  $\mu$ l GeneScan ROX-500 0.5  $\mu$ l PCR 产物 1  $\mu$ l,反应体系总量 11.5  $\mu$ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C,5 min,冰浴 5 min;瞬时离心混合物,转移至 0.5 ml 离心管在 ABI 3100 遗传分析仪进行电泳。

QF-PCR 结果分析:依据 2004 年欧盟 ACC/CMGS 会议形成的最佳操作指南<sup>[1]</sup>,制定如下结果解释:对于 21-三体患者,在 3 个 STR 位点中至少有 2 个位点表现为 3 个荧光峰,峰值比接近 1:1:1,或表现为双峰,但峰值比 <0.65 或 >1.8。

对于在 X Y 染色体上的位点,数据分析有以下几种情形:  
①AMXY 位点出现双峰,峰值面积比小于 0.65 或者大于 1.8;  
②DXS981、DXS6809 位点任何一个位点出现双峰,峰值面积比为 0.8-1.4;  
③X22 位点出现双峰,峰值面积比小于 0.65 或者大于 1.8;  
④X22 位点出现 3 个等位基因,峰值面积比值为 1:

1:1 时;⑤DXS981、DXS6809 和 X22 位点任何一个位点出现是个等位基因,峰值面积比值为 1:1:1 时;⑥DXS981、DXS6809 和 X22 位点任何一个位点出现两个等位基因,峰值面积比为 2:1 或 1:2 或出现峰值面积未达到 2:1 或 1:2,但小于 0.65 或者大于 1.8 时。依据以上所列的 6 种情形,如果满足下面三种组合的任何一种结果均可以预测性染色体出现多倍体异常:性染色体上遗传位点荧光峰至少有两个位点同时满足①、②时;性染色体上 AMXY、X22 位点荧光峰同时满足①、③或者①、④时;性染色体上 DXS981、DXS6809 和 X22 位点荧光峰至少有 2 个位点同时满足以上条件⑤、⑥中任何一条或者⑤+⑥时,预测患有性染色体多倍体。当性染色体上所有遗传位点荧光峰均为单峰时,预测结果与性染色体数目异常(Turner 综合征或者超雌综合征)相关,同时也不能排除代表一个正常的女性,需要结合临床和其他方法分析。

## 2 结果

16 例脐血样本中,染色体核型分析结果为正常核型的有 15 例,与 QF-PCR 结果一致;1 例核型分析结果为 47,XXX,其 QF-PCR 结果是 X、X/Y 位点上的荧光峰均为单峰,提示检测结果可能与性染色体数目异常有关。

73 例羊水样本中,染色体核型分析结果为正常核型 70 例,与 QF-PCR 结果一致;1 例核型分析结果为 47,XXX,其 QF-PCR 结果是 X、X/Y 位点上的荧光峰均为单峰;2 例核型分析结果为标准型的 21-三体,QF-PCR 结果是 1 例 21-三体;另 1 例则为阴性,其 21S1435 位点表现为双峰,峰值比 <0.65 或 >1.8,其余 D21S11、D21S1411 位点呈单峰。

71 例外周血样本中,染色体核型分析结果 1 例 45,X0/46,XX,其 QF-PCR 结果是阴性;1 例核型分析结果为 47,XXY,QF-PCR 结果是 XXY 综合征;24 例核型分析结果为 21-三体(其中 1 例是易位型 21-三体)。QF-PCR 结果 22 例 21-三体征(包括 1 例易位型 21-三体),余 2 例 QF-PCR 为阴性结果。1 例 45,XX,der(13,21)罗氏易位携带者及 44 例正常核型,与 QF-PCR 结果一致。

综上所述,130 例染色体数目正常的样本(1 例罗氏易位携带者及 129 份正常核型者)其染色体核型分析结果与 QF-PCR 结果是一致的;在染色体数目异常的 30 份样本中,QF-PCR 确诊 1 例 47,XXY,26 例 21-三体征中 23 例确诊,3 例为阴性结果。这 3 例阴性的样本 QF-PCR 检测结果在 D21S1435 位点均表现双峰,峰值比 <0.65 或 >1.8, D21S11、D21S1411 位点表现为单峰,达不到诊断标准,故判为阴性;1 例 45,X0/46,XX 此系统未能检出;2 例 47,XXX 的样本此检测系统提示可能与性染色体数目异常有关。

## 3 讨论

上世纪 70 年代的染色体显带技术、核型分析技术的建立及应用,使临床对染色体病的诊断提高到一个新台阶,目前已发现了 2 万多种人类染色体数目及结构畸变<sup>[2]</sup>。对于染色体数目及结构畸变,核型分析技术是金标准,其准确度高,但操作繁琐,耗时长,对技术人员要求高等,使得它无法用于大规

模的筛查和快速诊断,特别对于产前诊断的样本,我们需要一种快速的诊断方法以减少孕妇的身心负担。

多重定量荧光 PCR 技术是近上世纪 90 年代开始运用的一项技术,联合染色体上多态性 STR 位点的检测分析,在国外常用在染色体非整倍体产前诊断<sup>[3]</sup>。国内学者也有这学面应用研究,臧春霞等<sup>[4]</sup>运用多重荧光 PCR 技术对血清学筛查阳性的行产前诊断的 9 例胎儿羊水样本进行检测,确诊 18-三体、21-三体和 Klinefelter 综合征各 1 例。杨昕等<sup>[5]</sup>运用荧光定量 PCR 技术对 250 例羊水样本进行检测,检出 24 例 21-三体。我们运用此技术确诊了 23 例 21-三体及 1 例 Klinefelter 综合征。QF-PCR 技术可作为一种快速的分子生物学方法应用于染色体非整倍体的诊断。

从我们的检测结果来看, QF-PCR 技术存在着假阴性结果,例如对于 45,X0/46,XX 嵌合体样本此方法出现漏检; 3 例 21-三体呈假阴性,其 21S1435 位点表现为双峰,峰值比 < 0.65 或 > 1.8,但其余 2 个位点呈单峰,达不到诊断标准。出现这些假阴性的原因,是否是 STR 位点的选择不适合本地区的人群使用,基于样本太少,且本地区的 STR 位点资料空白,有待进一步研究。而 2 例 47,XXX 样本其 QF-PCR 结果是 X、X/Y 位点上的荧光峰均为单峰,提示检测结果可能与性染色体数

目异常相关,未能确诊,需要结合临床和染色体核型分析。因此该项技术不能完全取代传统的染色体核型分析。但其诸多优势如样本用量少、快速、高通量等,可作为染色体非整倍体畸变的快速筛查及传统的染色体核型分析的补充。

## 参 考 文 献

- [1] Mann K, Ogilvie C, Donaghue C, et al. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy, 2004. CMGS Best Practice Guidelines for QF-PCR.
- [2] 梁志成. 生一个健康宝宝-遗传优生的奥秘[M]. 广州:暨南大学出版社, 2004.
- [3] Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(9): 855-860.
- [4] 臧春霞, 李玉华, 王仁礼. 多重荧光 PCR 在常见染色体非整倍体疾病快速产前诊断中的应用研究[J]. 生殖与避孕, 2004, 24(6): 333-337.
- [5] 杨昕, 廖灿, 黄以宁, 等. 荧光定量 PCR 产前快速诊断唐氏综合征可行性研究[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(8): 599-602.

(收稿日期:2007-08-10 修回日期:2007-09-12)

## 老年急性心肌梗死患者血液 $\gamma$ -干扰素水平变化的研究<sup>▲</sup>

唐 剑<sup>1</sup> 张 康<sup>2</sup> 莫丕立<sup>2</sup> 叶少武<sup>2</sup> 黎志革<sup>2</sup> 陈永雄<sup>2</sup> 陆兆华<sup>2</sup> 彭晓燕<sup>2</sup> 陀健琳<sup>2</sup>

(1 广西医科大学第七附属医院, 梧州市 543001; 2 广西梧州市人民医院, 梧州市 543000)

**【摘要】目的** 探讨老年急性心肌梗死(AMI)患者血清  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )的水平含量与发病关系。**方法** 采用酶联免疫吸附法(ELISA)分别测定 34 例老年 AMI 患者、38 例老年稳定型心绞痛(SA)患者及 39 例老年对照组(NC)的血清 IFN- $\gamma$  水平。**结果** NC 组与 SA 组比较 IFN- $\gamma$  含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而 AMI 组 IFN- $\gamma$  含量低于 NC 组及 SA 组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。**结论** 老年 AMI 患者 IFN- $\gamma$  水平降低,机体免疫调节失衡,可能对老年 AMI 的形成和发展产生影响。IFN- $\gamma$  水平可作为老年 AMI 严重程度的监测指标。

**【关键词】** 急性心肌梗死;老年;免疫功能;  $\gamma$ -干扰素;酶联免疫吸附法

**【中图分类号】** R 541.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2007)11-1668-03

### Study on variation of IFN- $\gamma$ in serum of senior citizen with acute coronary syndromes

TANG Jian, ZHANG Kang, MO Pei-li, YE Shao-wu, LI Zhi-ge, CHEN Yong-xiong, LU Zhao-hua, PENG Xiao-yan, TUO Jian-lin  
(The Seventh Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, People's Hospital of Wuzhou city, Wuzhou 543001, China)

**【Abstract】Objective** To evaluate the level of IFN- $\gamma$  in serum of senior citizen with acute myocardial infarction (AMI) when the disease occurs. **Methods** The level of IFN- $\gamma$  in serum of 28 senior citizens with AMI (AMI group), 38 cases with stable angina (SA group) and 39 normal controls (NC group) was assayed by ELISA method. **Results** To compare the level of IFN- $\gamma$  in NC group with SA group, the improvement was no significant difference ( $P > 0.05$ ). But the level of IFN- $\gamma$  in AMI group was less than that in NC group and SA group, the improvement was obvious ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The level of IFN- $\gamma$  in serum of senior citizen with AMI is reduced and the immune adjustment in body is unbalance. It may have an effect on the forming and progress of AMI. The level of IFN- $\gamma$  in serum can serve as an index to detect the serious degree of AMI.

**【Key words】** Senior citizen; Acute myocardial infarction; Immunity; Interferon- $\gamma$ ; Enzyme-linked immunosorbent assay

▲广西科学研究与技术开发计划课题资助项目(桂科攻 047200220)

作者简介:唐剑(1959~)男,籍贯:广西梧州,汉族,研究生学历,内科副主任医师,硕士生导师,广西医科大学第七附属医院副院长。研究方向:冠心病诊断与治疗。E-mail: tangjian3@126.com