文章编号:1000-5404(2012)02-0132-02

短篇论著

粘多糖贮积症Ⅱ型的酶学诊断、产前诊断及临床分析

张雪梅,刘之英,陈新莲,刘洪倩,谢良玉,魏杨君,刘珊玲,王 和 (610041 成都,四川大学华西第二医院妇产科产前诊断中心,遗传实验室,教育部妇儿疾病与出生缺陷重点实验室)

[摘要] **目的** 检测硫酸艾杜糖-2-硫酸酯酶酶活性,对粘多糖贮积症Ⅱ型疾病进行诊断及产前诊断。**方法** 设置荧光检测仪激发波长355 μm,发射波长460 μm,检测处理后的血浆或细胞上清液。**结果** 共测17标本,门诊患者10例,其中1例为女性,硫酸艾杜糖-2-硫酸酯酶酶活性均异常;胎儿产前诊断7例,根据酶活性结果判定5例正常,2例患病。**结论** 荧光酶学方法检测粘多糖贮积症Ⅱ型疾病操作快速、诊断明确。

[关键词] 粘多糖贮积症Ⅱ型;X连锁隐性遗传病;荧光酶学检测;诊断,产前诊断

[中图法分类号] R589.1;R714.55 [文献标志码] A

粘多糖贮积症Ⅱ型(mucopolysaccharidosis typeⅡ,MPSⅡ, OMIM 309900),又称Hunter综合征,是一种X连锁隐性遗传病,是由于溶酶体内的硫酸艾杜糖-2-硫酸酯酶(sulphatase iduronate-2-sulphate sulphatase, IDS)缺陷,导致分解不完全的硫酸皮肤素和硫酸乙酰肝素大量贮积于全身各种脏器和组织中。国外数据显示其发病率为1/132 000~1/110 000[1-2]。该病临床表现多样,病情的发展具有进行性加重的特点。重型患者一般2~4岁起病,临床表现为智力低下、面容丑陋、多发性骨骼畸形、肝脾肿大、心脏病变等,一般在15岁之前死亡。轻型患者一般10岁前发病,临床症状较轻且寿命一般不受影响。

根据该病的临床表现和X线骨片的改变,结合实验室检查可以确诊。对IDS进行基因分析或测定IDS活性均是有效的检测方法,IDS活性的检测是诊断该病的金标准。我们在临床中采用荧光酶学检测的方法进行该病的诊断及产前诊断,现将检测方法及病例分析如下。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源 2006年1月至2011年6月本院遗传咨询门诊及儿科门诊收治10例MPSⅡ重度患儿,有典型的临床表现,如智力低下、面容粗糙、多发性骨骼畸形、肝脾肿大,但无角膜混浊(图1)。患儿发病年龄自新生儿至2岁,就诊年龄自新生儿至8岁,其中1例为女性。7例胎儿产前诊断,其中1例因第1次诊断为患儿引产,2年后再次怀孕进行了第2次产前诊断。本组病例均在我院进行了MPSⅡ的酶活性检测,均签署了同意进行该项检测的知情同意书并同意将分析结果进行报道。



图1 2例粘多糖贮积症Ⅱ型患儿的特殊面容

1.1.2 材料 底物MU-αIdoA-2S、LEBT购自MOSCERDAM,氯化铵、碳酸氢钾、乙二胺四乙酸钠均为国产分析纯。96孔板条(丹麦Nunc公司),荧光检测仪(Wallec公司的Victor2),超声细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所JY92-Ⅱ)。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 底物:配制0.1 mol/L Na-acetate/0.1 mol/L acetic acid buffer pH 5.0,溶解MU-αIdoA-2S成1.25 mmol/L MU-αIdoA-2S。红细胞裂解液:155 mmol/L氯化铵、10 mmol/L碳酸氢钾、1 mmol/L乙二胺四乙酸钠(EDTA),pH 7.4。

1.2.2 待测样本准备 ①白细胞:抗凝外周血10 ml加红细胞裂解液40 ml混匀,4 ℃条件下放置30 min后,1 800 r/min离心10 min,弃上清;再加10 ml红细胞裂解液清洗白细胞,

[基金项目] "十一五"国家科技支撑计划(2006BAI05A10);国家自然科学基金(30973461,30772323,30571942);教育部长江学者与创新团队基金(IRT0935)

[通信作者] 王 和,E-mail:wanghe_cd@126.com
刘珊玲,E-mail:sunny630@126.com

1 800 r/min 离心 10 min,弃上清,此步骤视裂解效果可重复。加双蒸水悬浮白细胞,超声破碎细胞,离心后取上清检测蛋白浓度后备用。②血清:外周血 10 ml 离心后取血浆。③羊水细胞标本:于 18~24 周抽取羊水 10 ml,培养后收获细胞,用 PBS 反复洗涤 3 次,加双蒸水悬浮细胞,超声破碎细胞,离心后取上清检测蛋白浓度后备用。

1.2.3 酶活性检测 96 孔板中每孔加入 10 μl 细胞上清液(或血浆)及 20 μl 底物,混匀后 37 ℃孵育 4 h,加入磷酸盐/柠檬酸缓冲液 20 μl 及 LEBT 10 μl,37 ℃孵育 24 h,加 $NaHCO_3$/Na_2CO_3 缓冲液终止反应,用荧光检测仪检测其荧光强度,激发波长 355 μm,发射波长 460 μm。

1.3 检测对照设定

每一检测样本均设立复孔。每次检测均设正常酶活性标本对照。对每个待测样本均同时检测 2 种不同的酶活性(包括待测酶在内)。

1.4 计算酶活性

对每一次检测均同时做标准相对分子质量的 4-甲基伞形酮荧光量测定,计算检测样本的酶活性。检测单位为蛋白质纳摩尔数,即[nmol/(h·mg)],如为血浆则检测单位为[nmol/(h·ml)]。

2 结果

10 例为酶学诊断,8 例检测到无酶活性,其临床表现均很典型并严重。女性患儿有典型的临床表现,MPS 其他酶学亚型均为正常,MPSⅡ的酶学检测显示无酶活性。2 例患儿检测到酶活性极低,分别为 0.64 nmol/(4 h·mg)及 0.85 nmol/(4 h·mg),均明显低于正常酶活性。检测 19 例正常人 MPSⅡ酶活性参考范围为 21~70 nmol/(4 h·mg)。

7 例酶学产前诊断,5 例为正常胎儿,2 例诊断为患病胎儿均进行了引产手术,其中 1 例第 1 次产前诊断为患病胎儿进行了引产,再次怀孕后进行第 2 次产前诊断为正常胎儿。酶学诊断正常的胎儿出生后均进行了随访,至今未见异常,最长随访时间为 5 年,最短随访时间为 10 个月。每个病例同时进行了目标酶(MPSⅡ)及对照酶活性的检测,对照酶活性均正常。

3 讨论

MPSⅡ目前仍无有效的根治疗法,且一般不能生存到成年。因此,开展诊断和产前诊断,防止重型患儿出生是目前最有效的防治手段。目前诊断方法包括基因诊断及酶活性分析。目前 IDS 基因上的突变报道有 300 余种,进行基因诊断的方法可有效的发现携带者,但基因诊断需要完整的家系,过程复杂、成本相对较高;且 IDS 突变形式多样,需多种检测方法结合,否则可能遗漏,临床上不易常规开展[3-4]。遗传代谢性疾病是由于酶的缺陷,荧光酶学检测方法结果更为直观,可直接提示是否为某种遗传代谢性疾病。用该法进行诊断或产前诊断,操作相对简单、快速、方便实用,又是对其功能的检测,易为临床遗传实验室开展。但酶活性分析的方法也有局限性,对携带者还不能达到准确诊断,因此对于家系中的携带者可采用基因诊断及酶学分析结合进行[5]。MPSⅡ是一种 X 连锁隐性遗传病,女性患者非常少见,文献报道的仅有 10 余例[6],目前认为女性患者的发病机制是由于 X 染色体的失活或 X 长臂部分失活。我们检测到的这 1 例女性患儿,无明显家族史,有典型的临床表现,由于患儿为女性,先进行了其他 MPS 亚型检测均正常,后进行 MPSⅡ型检测无酶活性,得以确诊。这也体现了酶学检测的优势;同时提醒同行们注意不要因为患者为女性而造成对 MPSⅡ的误诊。对 MPSⅡ进行产前诊断,预防患儿的出生,是进行产前诊断的目的。本组 7 例产前诊断中有 2 例胎儿被诊断为 MPSⅡ而进行了引产,5 例酶活性正常胎儿出生后随访至今无发病。应当对该病引起足够的关注,通过酶学检测的方法可有效诊断发病胎儿,从而预防患儿出生。

参考文献:

[1] Machill G, Barbujani G, Danieli G A, *et al*. Segregation and sporadic cases in families with Hunter's syndrome[J]. J Med Genet, 1991, 28(6): 398-401.

[2] Nelson J, Crowhurst J, Carey B, *et al*. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia[J]. Am J Med Genet A, 2003, 123A(3): 310-313.

[3] Lualdi S, Regis S, Di-Rocco M, *et al*. Characterization of iduronate-2-sulfatase gene-pseudogene recombinations in eight patients with Mucopolysaccharidosis type II revealed by a rapid PCR-based method[J]. Hum Mutat, 2005, 25(5): 491-497.

[4] Froissart R, Da-Silva I M, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum[J]. Acta Paediatr Suppl, 2007, 96(455): 71-77.

[5] Schwartz I V, Pinto L L, Breda G, *et al*. Clinical and biochemical studies in mucopolysaccharidosis type II carriers[J]. J Inherit Metab Dis, 2009, 32(6): 732-738.

[6] Pinto L L, Vieira T A, Giugliani R, *et al*. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review[J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5: 14.

(**收稿**:2011-10-25;**修回**:2011-11-06)

(编辑 栾 嘉)