

母血浆中胎儿游离 DNA 检测及非侵入性产前诊断的研究进展

张胜利 朱宝生*

(昆明医科大学,云南省第一人民医院 遗传诊断中心,云南 昆明 650032)

【摘要】 通过母血浆中胎儿游离 DNA 检测获得胎儿信息,成为非侵入性产前诊断的研究热点。随着研究的不断深入,对母血浆中胎儿游离 DNA 生物学特性的认识日趋丰富。就其来源、片段长度分布及清除机制都有进一步发现,其生物学标记物也呈现多样性。从父源性的 Y 染色体特异序列的检测到表观遗传学方面的突破,使非侵入性产前诊断技术的应用范围不再局限于男胎也降低了诊断的假阴性率。此外,对其检测技术及方法理论日臻成熟,从传统的 PCR 实验方法到肽核酸、时间飞行质谱技术、QPCR、数字化 PCR、大规模平行基因组测序,都为实现非侵入性产前诊断技术在临床的广泛应用奠定基础。现已利用母血浆中胎儿游离 DNA 开展研究或进行临床诊断的有胎儿性别鉴定、胎儿 Rh 基因检测、胎儿非整倍体检测、胎儿染色体片段异常的检测、妊娠相关疾病、单基因病等。本文回顾了母血浆中胎儿游离 DNA 的应用研究。

【关键词】 胎儿游离 DNA;非侵入性产前诊断;生物学标记物;应用研究

【中图分类号】 R394.2 **【文献标识码】** A

出生缺陷是影响出生人口素质的重要问题,其会给社会和家庭带来沉重负担,而中国又是出生缺陷高发国家,降低出生缺陷人口的出生率尤为重要。随着全国出生缺陷监测能力的提高,以医院为基础的出生缺陷监测数据由 1996 年的 87.7 万上升到 2010 年的 149.9 万,增长幅度达 70.9%^[1]。产前诊断是预防出生缺陷的重要措施,传统的产前诊断方法如绒毛活检取样、羊膜腔穿刺、脐血穿刺等均为介入性操作,这些操作的潜在风险,如流产、感染、致畸等,给孕妇和家人带来一定的精神压力,且由于其创伤性的存在也使得产前诊断只在有限的人群范围内进行,这些风险的存在也带来一定的医疗隐患。非侵入性的产前检查方法,如血液或超声检查的检测范围局限,不能作为诊断去解决病人存在的问题。而母血浆中胎儿游离 DNA 的发现,极大促进了非侵入性产前诊断的研究,成为近年产前诊断研究的

热点。本文对胎儿游离 DNA 在非侵入性产前诊断中的应用作一综述。

1 孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的发现、来源、特征及清除机制

1.1 孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的发现 1969 年 Walknowska 等人发现孕男胎的妇女外周血中含有 46,XY 细胞,证实了孕妇外周血中确实存在胎儿细胞,但由于检测成本高、技术繁琐,而且母外周血中的胎儿细胞数量极少,限制了大规模临床应用。1996 年 Chen 等首次在肺癌患者血浆和血清中检测到肿瘤特异性 DNA 序列。由于胎儿和肿瘤在生物学上存在着相似性,受此启发,1997 年,Lo 等^[2]在孕男胎孕妇外周血浆及血清提取的 DNA 中扩增出 Y 染色体特异性序列,首次证明妊娠妇女外周血的血浆及血清中存在着稳定的游离胎儿 DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA),在孕早期和孕晚期分别占血浆总 DNA 的 3.4% 和 6.2%^[3],其他实验室也有研究报道 cffDNA 大约占总游离 DNA 的 10%~20%^[4]。

基金项目:本文受云南省医学领军人才培养计划(项目编号:L-201201)资助

* 通讯作者:朱宝生, E-mail:bszhu@aliyun.com

1.2 孕妇血浆中 cfDNA 的来源 目前认为孕妇外周血中 cfDNA 的来源有以下几种可能的机制: ①胎盘滋养层细胞源性学说^[5], 该观点认为, 胎儿 DNA 来源于滋养层细胞, 孕 4 周时滋养层间隙被母血充盈, 合体滋养层细胞可直接渗透入母血, 激活母体免疫系统, 破坏胎盘滋养层细胞, 导致胎儿 DNA 直接进入母血循环, 此时胎盘形成, 但胎盘循环未建立, cfDNA 的出现证明胎盘滋养层细胞是母血浆中胎儿 DNA 的最初来源, 在母体血浆中检测出了胎盘特异 mRNA 及胎盘来源的母胎差异性甲基化^[6] (cfDNA 更加证明了此学说)。②胎儿有核细胞破坏凋亡学说, 该说认为 cfDNA 来源于进入孕妇外周血中的胎儿有核细胞的破坏和凋亡, 胎儿细胞通过胎盘进入到母血中, 被母体免疫系统破坏, cfDNA 残留下来。研究证实, 在孕妇血浆中, 存在胎儿有核红细胞的凋亡, 且有证据表明, cfDNA 具有凋亡 DNA 片段的一些特征。③胎盘通道学说, 该学说认为, 在胎儿发育过程中, 胎儿细胞凋亡后释放出的 DNA 通过胎盘运输到孕妇外周血中。Sekizawa 等^[7] 研究发现母胎界面为双向性通道, 母胎之间的游离 DNA (cell-free, cfDNA) 可以通过胎盘转运。④还有学说认为, 孕妇血浆中 cfDNA 来自于不同胎儿组织的 DNA 释放入羊水中, 再通过胎盘和羊膜腔的直接弥散作用进入母血中^[8]。目前关于 cfDNA 的来源尚没有肯定的解释, 以上几种学说都有其证据存在, 所以其来源有待深层次研究。

1.3 孕妇血浆 cfDNA 的特征 研究表明 cfDNA 具有细胞凋亡的生化特性, 即基因组 DNA 的片断化。研究表明^[9] 孕妇血浆中 cfDNA 分子大于 201bp 的占 57%, 胎源性 cfDNA 分子中 80% 片段长度在 193bp 以下, 大于 303bp 的为 0。新近研究报道^[10] 胎源性 cfDNA 的平均最大片段长度为 286bp, 并推论其是由 ≤ 2 个核小体组成。目前对此现象尚无确切解释, 但此类发现使 cfDNA 分离和检测更进一步, 在进行无创性产前分子基因诊断中也有重要意义。

1.4 孕妇血浆 cfDNA 的清除机制 母血中 cfDNA 半衰期为 16.3(4~30)分钟, 在产后 2 小时后绝大多数产妇检测不到循环的胎儿 cfDNA。因

此, 以母血中 cfDNA 为产前基因诊断研究的对象可以避免前次妊娠残留有胎儿 DNA 而影响本次妊娠的分析结果。Illanes 等^[11] 的数据表明肾脏在血浆 DNA 清除中起主要作用, 而这一结果也使其发现了尿中存在游离胎儿 DNA 的事实, 为无创伤性产前诊断提供了新的选择。此外, 母体血液中的血浆核酸酶、肝脏、肾脏对游离 DNA 也具有一定的清除作用。

2 血浆中胎儿 DNA 的检测

2.1 生物学标记物的发展 最早, 通过男胎父源性的 Y 染色体特异序列的检测作为 cfDNA 存在的标记物, 这就使得对孕妇外周血胎源 DNA 的应用局限在检测的胎儿遗传物质必须能与母亲遗传物质显著区分开来, 即胎儿从父方继承来的基因或突变, 这种限制使得对 cfDNA 存在的检测及从母亲遗传的等位基因的检测陷入困境, 因而大大限制了 cfDNA 在产前诊断领域的应用。

有研究者^[12] 根据母胎游离 DNA 分子大小的差异, 通过电泳法和过柱法分离和富集 cfDNA, 并与其他技术结合用于后续检测。这一技术方案已被认为是相对可靠的, 但分离纯化过程中可能存在样本的污染。还有研究集中在短串联重复序列 (STRs) 和单核苷酸多态性 (SNPs) 多态性上。邓志辉等^[13] 通过扩增片段长度较小多态性丰富的 MiniSTR 等位基因座, 检测胎儿 cfDNA, 结果在 9 例孕妇血浆样本中检测到父源性 STR 等位基因。Dhallan 等^[14] 建立了通过单核苷酸多态性 (SNPs) 区分胎儿 DNA 和孕母 DNA 并诊断胎儿染色体的数目的方法。在 SNP 的基础上采用单等位基因碱基延伸反应用于非侵入性产前诊断也有研究^[15]。这些方法已取得一些进展但仍有其局限性, 由于方法较复杂且受到基因多态性的影响, 尚未大规模应用于临床。

在表观遗传学方面也有突破, 自 Chim 等研究证实, maspin 基因在胎盘细胞中处于低甲基化状态, 而在母血细胞中处于高甲基化状态后, Chan 等^[16] 也发现了位于 3 号染色体的 RASSF1A 基因在母血细胞和胎盘间有着不同的甲基化形式。利用母胎 cfDNA 甲基化的差异, 既可以突破母血浆中检

测 cfDNA 的局限性,也可进行其他疾病的检测。Papageorgiou 等^[17]利用 21 号染色体上的母胎基因甲基化程度的差异,分析母胎 21 号染色体比例来检测 21 三体胎儿。随着表观遗传学的发展,应用 DNA 甲基化差异进行非侵入性产前诊断的方法得到不断应用^[18]。

2.2 相关检测技术的进步 由于孕妇血中胎儿游离 DNA 绝对量极其微少,需要采用非常敏感的方法才能获得稳定可靠的检测结果,而 PCR 技术的发展使微量的胎儿 DNA 的检测成为可能。但由于传统的 PCR 实验方法的局限性不能满足临床的需求,所以新的检测技术方法不断被应用。

2.2.1 肽核酸 肽核酸(peptide-nucleic acid, PNA)是一类新的信息分子,其以比普通核酸更高的亲和力及特异性与 DNA 或 RNA 杂交,形成具有高度热稳定性的复合物,来封闭母源性野生型模板,而另一组检测突变的 DNA 引物参与父源性突变位点序列的 PCR 扩增。

2.2.2 飞行时间质谱技术 由于母源性和胎源性的游离 DNA 的长度分布差异,应用飞行时间质谱技术,2 种来源的 DNA 电离状态的存在差异,在电场作用下分子通过飞行管道到达检测器的飞行时间不同,进而区分 2 种来源的 DNA。

近年来发展的基质辅助激光解析电力飞行时间质谱技术是一种新型的质谱技术,其特点是在基质中软电离不会把分子打碎,可以检测混合物,灵敏度高,其检测效果类似于父源性等位基因得到了“提纯”或富集,产生的检测图谱非常清晰。该技术已成为目前国际上母体血浆胎儿核酸突变分析的重要技术。但是其存在成本高、耗时长、步骤繁琐、实验条件要求高等问题。

2.2.3 实时荧光定量核酸扩增检测系统(QPCR)

在 PCR 反应体系中加入荧光基团利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。该技术结合其他技术在非侵入性产前诊断中有较广应用。

2.2.4 数字化 PCR 数字 PCR 技术(digital PCR, dPCR)是将样本处理至单目标分子后,同时独立行 PCR 反应,从而对样本进行绝对定量检测。后经过

不断改良,发展出了 BEAMing 技术和微液数字 PCR 技术,检测反应更多更全,极大推进了该技术的临床应用可行性。Lun 等^[19]对实时荧光 PCR、质谱、微液数字 PCR 这 3 项技术进行了对比分析后,证实微液数字 PCR 技术具有最佳的稳定性和定量准确性。微液数字 PCR 技术无论在定性还是定量检测方面都具有快速、准确、灵敏、特异等诸多优点,是一项十分适用于母血中胎儿游离 DNA 检测的技术。虽然目前其操作成本较高,但是相信随着技术领域的不断突破,微液数字 PCR 有望成为分子诊断实验室的常规技术^[20]。

2.2.5 大规模平行基因组测序 该技术对全基因组进行分析,不依赖于单个位点,能同时进行上亿个测序反应。对孕妇血浆中 cfDNA 进行测序,得到的碱基序列与人类基因组数据库进行比对,通过生物信息统计分析来检测疾病。

在非侵入性产前诊断的过程中,以上各种生物学标记物及检测技术的相互结合,相互促进,使非侵入性产前诊断技术不断进步与完善。

3 孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的临床应用研究

母血中 cfDNA 的在产前诊断方面的应用主要分为两方面,包括对胎儿 DNA 质的检测和胎儿 DNA 量的测定。质的检测是通过检测胎儿 DNA 某些致病基因的存在或对某些性染色体连锁疾病或者其他疾病进行产前诊断。而有些疾病可以引起游离胎儿 DNA 量的异常,对胎儿游离 DNA 量的检测可以及早发现疾病的存在,及早进行控制和治疗。目前,游离胎儿 DNA 已经用于性别鉴定及性染色体连锁疾病、胎儿 Rh 系统基因型的检测、妊娠相关疾病、胎儿染色体病、胎儿染色体片段异常、父系单基因遗传病等的产前诊断研究中。

3.1 性别鉴定及 X 连锁遗传病 目前 X 连锁遗传病有 200 多种,常见的有肌营养不良、血友病、先天性肾上腺皮质增生等,对此类疾病,性别鉴定有着重要的优生优育意义。既往临床早期产前性别诊断存在流产和致畸风险,不易被孕妇接受,而母血中胎儿 DNA 在性别遗传鉴定方面的研究开展较早、准确也有其优势所在。Mohamad 等^[21]用 mini-STR 和荧

光定量 PCR 两种方法,在早孕期分别检测母血浆胎儿游离 DNA 的 Y 染色体的特异性序列,结果显示两种方法的敏感性和特异性分别为 95.9%、98% 和 91.8%、100%。近期,一项综合分析了 90 个研究中心的 10 587 名胎儿性别鉴定的结果显示^[22],用母血浆胎儿游离 DNA 结合多种实验技术对胎儿性别鉴定的平均敏感性为 96.6%,特异性为 98.9%。利用胎儿游离 DNA 进行性别鉴定其准确性已经得到极大验证,这样只需对孕男胎的妇女行进一步的创伤性产前基因诊断即可,避免了对孕女胎妇女行创伤性产前诊断而导致的不必要的流产致畸风险。虽然这些研究的准确性已较满意,但是对于仍可能存在的假阴性及假阳性的情况,研究者有采用 STR 的方法检测 X 染色体上的位点来进一步诊断女性胎儿,还有采用检测常染色体上的通用标记物来作为阳性对照,确定胎源性物质的存在^[23]。无创产前性别鉴定对 X 连锁遗传病的诊断有较高的临床价值,其高准确性可降低侵入性产前诊断的使用率,进而减少流产和畸形的发生。

3.2 胎儿 Rh 系统基因型 RhD 阴性的孕妇如有 RhD 阳性胎儿孕产史,则以后生育均可能引起胎儿红细胞的破坏进而出现严重的贫血,还可引起新生儿溶血、心力衰竭、核黄疸甚至死亡。虽然 RhD 阴性的发生率在不同人种中有所不同,但对于 RhD 阴性的孕妇进行胎儿产前的 RhD 血型检测仍是非常有必要的。这项检测可使孕 RhD 阴性胎儿免于进行不必要的主动免疫治疗,而使孕 RhD 阳性胎儿能够及早地选择主动免疫治疗或终止妊娠,为其临床推广应用奠定了理论基础。传统的介入性产前诊断存在母胎出血、刺激抗体产生的风险,所以非侵入性产前诊断就更凸显出它的优势。Brojer 等^[24]对 230 例 RhD 阴性的孕妇进行研究,扩增 RhD 基因的第 4 内含子、第 7 和第 10 外显子,准确率达 99%。自 2001 年起,国际血型参比实验室英国国家血液中心将利用孕妇血浆游离 DNA 进行胎儿 RhD 的基因分型作为常规检查项目,这是首个临床开展的以 DNA 为基础的非侵入性产前诊断常规项目,此后,法国和荷兰也将此列入常规项目。而 Rh 系统的 c、E、K 基因型的检测也通过此方法得到应用。

Scheffer 等^[25]用荧光定量 PCR 技术,共对 362 名有检测指征的孕妇进行 Rh 系统基因型的检测 (RhD168 例、RhC49 例、RhE85 例、RhK 60 例),其中 351 例(97%)得到检测结果,且该部分无假阴性及假阳性结果存在,另 11 例由于胎儿游离 DNA 含量低及其他原因导致无检测结果。采用非侵入性产前诊断技术对胎儿 Rh 系统基因型进行预测有较高的敏感性及特异性,可作为应用于临床的诊断技术。

3.3 妊娠相关疾病 研究发现很多妊娠相关疾病存在胎儿游离 DNA 浓度的异常升高^[26],例如早产、胎儿宫内生长受限、羊水过多、侵入性胎盘、胎死宫内、妊娠剧吐等,研究最多的是先兆子痫的异常变化,其可能的病理原因,一方面由于子痫前期胎盘通透性增加,可导致母血中 cfDNA 增多;另一方面,在高血压等病理情况下,母体的肝、肾对 cfDNA 的清除减少^[27],致使 cfDNA 的浓度升高。Cotter 等^[28]对 88 个病例和 176 个正常对照研究,发现早期母血中游离胎儿 DNA 增加的孕妇将更易发展为先兆子痫,游离胎儿 DNA 的量和先兆子痫的发病风险之间存在一种剂量关系。另由 Levine 等^[29]研究的较大样本量的结果显示,在 120 例发展为先兆子痫的病人和 120 例正常人群对照中,在相同孕周条件下,前者的 cfDNA 量为后者的 2~5 倍。InIllanes S 等^[30]在患有妊娠期高血压病的孕妇外周血中检测到 cfDNA 显著升高,而在子痫发作之前其水平则有异常升高的情况。因此测定 cfDNA 的浓度可能对先兆子痫的筛查具有一定意义。但也有研究结果认为中孕期 cfDNA 的浓度不能预测不良妊娠结局^[31]。该研究收纳了 611 名孕妇,对其检测发现,有不良妊娠结局的病例不能与 cfDNA 的浓度建立对应关系。由于对 cfDNA 的浓度预测价值存在争论,所以只有经过大样本多中心的研究,才能对 cfDNA 浓度的真正预测价值进行有效评估。

3.4 胎儿非整倍体染色体病 通常由于异常的减数分裂,使细胞内同源染色体数目发生改变,产生非整倍体胎儿。部分非整倍体胎儿会发生自然流产,而有一部分则可存活出生,但几乎都存在出生缺陷,最常见的是 21 三体综合征。早期研究发现孕有 21 三体综合征胎儿的孕妇血浆中胎儿游离 DNA 量比

正常组高。近年来,由于胎儿标记物和检测技术的不断发展和相互结合应用,胎儿非整倍体染色体病的诊断不断进步。2010年,Tong等^[32]应用母胎差异性甲基化及dPCR技术相结合的新方法检测21-三体,成功检测5例21-三体产妇的血浆样本,另外24个整倍体的孕妇血浆的分析,出现一个假阳性,可见表观遗传的染色体剂量方法也是非侵入性产前诊断的一种新方法。而在大规模并行基因组测序技术的推动下,母血浆cffDNA应用于常见非整倍体的诊断研究,取得了更大发展。Fan等^[33]首次对18例样本进行高通量测序分析,准确检测出9例21-三体、2例18-三体、1例13-三体和6例染色体整倍体。Bianchi等^[34]通过对532例唐氏高危样本进行测序检测其唐氏综合征的灵敏度为100%,假阳性率为0,性别检测的灵敏度大于99%。而Jiang等^[35]对903名孕妇的研究显示,在该研究组中16例21-三体胎儿、12例18-三体胎儿、2例13-三体胎儿全部检测诊断正确,但存在1例18-三体的假阳性,其对常染色体三体的检测敏感性为100%,特异性为99.9%;在7例性染色体异常的病例中发现1例假阴性存在,其对性染色体三体的检测敏感性为85.7%,特异性为99.9%。由于双胎及多胎的母血中的浓度及胎儿遗传物质的区分等困难,使双(多)胎的研究较少。有研究^[36]检测4例双胎样本,其中1例为47,XY,+21核型的同卵双胎;另1例为异卵双胎,2个胎儿之一为1-三体,另一胎儿核型正常;剩余2例双胎核型正常。Canick等^[37]对25例双胎进行检测,其中17例整倍体,5例同卵T21、2例异卵T21、1例异卵T13均得到准确检测;另外2例三胎正常病例也得到准确预测。虽然目前在双(多)胎病例研究中有较好的检出率和极低的假阳性率,但由于双(多)胎病例的复杂性,仍需要有更多的病例进行验证。

该技术对单胎的常见常染色体数目异常疾病诊断的技术较成熟,但对双胎及其他染色体异常包括数目和结构异常都需要大量的样本的研究和技术的提高。在大规模推广应用之前需要有更多的检测支持及经济性、实用性、合理性的分析,以减少不恰当应用带来的不必要损失^[38]。

3.5 胎儿染色体片段异常 鉴于利用胎儿游离DNA采用基因组测序的方法诊断21、13、18及性染色体数目异常的技术的发展和延伸,研究者同样应用测序技术来诊断胎儿染色体片段异常,并取得较好验证结果。Peters等^[39]对确诊的1例父源性12p11.22~12p12.1缺失的胎儿进行无创诊断实验,在其母妊娠35周时提取母血浆游离DNA,用7例染色体正常的标本进行对照,并对12号和14号染色体进行测序检测和数据分析。结果显示,病例胎儿在12号染色体上存在约4Mb长度的微缺失,与对照组的结果比较差异有统计学意义。Taylor等^[40]近期又对2例中孕期22q11.2微缺失的胎儿进行测序检测,同样成功检测到2例胎儿的微缺失存在,对照组比较差异有统计学意义。虽然在胎儿染色体片段异常的诊断方面有一定的进展,但仍然存在技术的局限性,例如增加的数据处理需要、全基因组测序覆盖的范围等。另外,临床的大规模应用还需更多的样本和临床验证。

3.6 胎儿单基因疾病 目前单基因病在新生儿中的发病率达3%左右,介入性产前诊断仍是诊断的金标准,目前可以用cffDNA成功检测的单基因病有软骨发育不全、囊性纤维化病、地中海贫血、亨廷顿病、强直性肌营养不良、先天性肾上腺增生等。由于缺乏有效区分母体血浆中高母源性DNA和低胎源性游离DNA的手段,以及母源性基因突变或父母为相同基因突变时无法诊断胎儿基因型等。目前利用cffDNA检测遗传病只能检测父源性单基因遗传病,且许多遗传病为突变所致,母胎DNA序列差异很小,所以两者的鉴别要求实验有较高的特异性敏感性,而要达到精确的鉴别在技术上比较困难,需要更精密的分析仪器和有效的试验方法相结合。Ding等^[15]选择12例胎儿可能遗传 β -地中海贫血的孕妇胎儿,采用单个等位基因碱基延伸反应对孕妇血浆中父源性的胎儿等位基因进行PCR扩增,产物经基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测,成功预测到胎儿的基因型。近期,Papasavva等^[41]选择了49个 β 球蛋白基因上的高杂合SNP位点,对101例可能遗传父源性突变的 β -地中海贫血胎儿进行检测,结果显示应用此方法对诊断该疾病有较好的敏

感性和特异性,为 β -地中海贫血的非侵入性产前诊断提供了蓝本。利用大规模并行基因组测序技术,Lo等^[42]利用孕妇血浆中DNA进行全基因组测序,获得了完整的胎儿及孕妇的基因组序列,构建了全基因组遗传图谱,为直接利用胎儿游离DNA进行无创产前基因诊断开辟了新天地。

也有研究对母源性突变位点进行的探索,Fiona等^[43]对5例母胎基因型不同的标本进行检测,利用数字化核酸片段长度的方法来筛选母胎DNA,结合数字化突变位点进行相对定量技术,对PCR扩增的产物定量分析,统计分析孕妇血浆中野生型和突变性的比例,来预测胎儿的基因型。该检测中有3例与预期结果相符,虽然该检测的标本例数较少,准确性不是很高,但对母源性突变的检测推进具有重要意义。Lun FMF等^[44]也采用该方法对母亲为杂合突变的血红蛋白 β 链上的突变进行检测,结果显示利用数字化相对突变剂量和数字化核酸片段长度相结合的方法可增加胎儿基因型检测率,能让非侵入性产前诊断单基因病走的更远。

4 目前利用孕妇血浆中胎儿DNA行产前诊断的一些问题

孕妇血浆中胎儿游离DNA的研究推动了非侵入性产前诊断遗传病和妊娠相关疾病的预测的发展。但是,我们在对胎儿游离DNA认识和应用方面还存在一些问题:①缺乏简单、有效的胎儿标记来证明提取的血浆DNA中有胎儿DNA的存在;②胎儿游离DNA的结构、来源及清除机制还没有完全搞清楚;③母血循环中胎儿DNA是否有转录活性;④母血中胎儿游离DNA的拷贝数低,及其富集技术的局限;⑤PCR的假阴性、假阳性问题,大部分染色体病不能有效诊断;⑥双胎或多胎的复杂性也是一个不可忽视的问题;⑦母源性突变的检测、双亲携带相同突变的胎儿基因分型、单基因疾病的检测的局限性,尚无一种理想、可行的cffDNA基因突变检测方法。这些问题都将是今后研究的方向。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国卫生部. 中国妇幼卫生事业发展报告(2011)

[R]. 2011.

- [2] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [3] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4): 768-775.
- [4] Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, et al. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2009, 21(2):175-179.
- [5] Alberry M, Maddocks D, Jones M, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(5):415-418.
- [6] Chim SS, Tong YK, Chiu RW, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(41):14753-14758.
- [7] Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, et al. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta[J]. *Hum Genet*, 2003, 113(4):307-310.
- [8] Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review[J]. *Placenta*, 2004, 25 Suppl A:S93-S101.
- [9] Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(1):88-92.
- [10] Kimura M, Hara M, Itakura A, et al. Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2011, 73(3-4):129-135.
- [11] Illanes S, Denbow ML, Smith RP, et al. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine[J]. *Prenat Diagn*, 2006, 26(13):1216-1218.
- [12] Li Y, Holzgreve W, Hahn S. Size fractionation of cell-free DNA in maternal plasma and its application in noninvasive detection of fetal single gene point mutations[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 444:239-251.
- [13] 邓志辉, 李茜, 梁延连, 等. MiniSTR 技术应用于孕妇血浆中胎儿游离DNA检测的研究[J]. *中国输血杂志*, 2008, 21(7):498-501.
- [14] Dhallan R, Guo X, Emche S, et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study[J]. *Lancet*, 2007, 369(9560):474-481.
- [15] Ding C, Chiu RW, Lau TK, et al. MS analysis of single-

- nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(29):10762-10767.
- [16] Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(12):2211-2218.
- [17] Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, et al. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(5):1609-1618.
- [18] White HE, Dent CL, Hall VJ, et al. Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e45073.
- [19] Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(10):1664-1672.
- [20] Chiu RW, Cantor CR, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies [J]. *Trends Genet*, 2009, 25(7):324-331.
- [21] Aghanoori MR, Vafaei H, Kavoshi H, et al. Sex determination using free fetal DNA at early gestational ages: a comparison between a modified mini-STR genotyping method and real-time PCR[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 207(3):202. e1-8.
- [22] Wright CF, Wei Y, Higgins JP, et al. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis[J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5:476.
- [23] Akolekar R, Farkas DH, VanAggmael AL, et al. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (cffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation[J]. *Prenat Diagn*, 2010, 30(10):918-923.
- [24] Brojer E, Zupanska B, Guz K, et al. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma[J]. *Transfusion*, 2005, 45(9):1473-1480.
- [25] Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, et al. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women; evaluation of a 7-year clinical experience [J]. *BJOG*, 2011, 118(11):1340-1348.
- [26] Geifman-Holtzman O, Ober Berman J. Prenatal diagnosis: update on invasive versus noninvasive fetal diagnostic testing from maternal blood[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008, 8(6):727-751.
- [27] Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation[J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(4):304-308.
- [28] Cotter AM, Martin CM, O'Leary JJ, et al. Increased fetal RhD gene in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of pre-eclampsia[J]. *BJOG*, 2005, 112(5):584-587.
- [29] Levine RJ, Qian C, Leshane ES, et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(3):707-713.
- [30] Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis: implications for antenatal diagnosis and the management of high-risk pregnancies[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2008, 13(2):55-56.
- [31] Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, et al. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia[J]. *Placenta*, 2011, 32:17-20.
- [32] Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(1):90-98.
- [33] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(42):16266-16271.
- [34] Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Maternal Blood IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing[J]. *Obstet Gynecol*, 2012, 119(5):890-901.
- [35] Jiang F, Ren J, Chen F, et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies[J]. *BMC Med Genomics*, 2012, 5:57.
- [36] Sehner AJ, Rhee B, Comstock D, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(7):1042-1049.
- [37] Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations [J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(8):730-734.
- [38] Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study[J]. *BMJ*, 2011, 342:c7401.
- [39] Peters D, Chu T, Yatsenko SA, et al. Noninvasive prenatal

- diagnosis of a fetal microdeletion syndrome[J]. N Engl J Med,2011,365(19):1847-1848.
- [40] Jensen TJ, Dzakula Z, Deciu C, et al. Detection of microdeletion 22q11. 2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma[J]. Clin Chem,2012,58(7):1148-1151.
- [41] Pappas TE, Lederer CW, Traeger-Synodinos J, et al. A minimal set of SNPs for the noninvasive prenatal diagnosis of β -thalassaemia[J]. Ann Hum Genet,2013,77(2):115-124.
- [42] Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus[J]. Sci Transl Med,2010,2(61):61-91.
- [43] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(50):19920-19925.
- [44] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(50):19920-19925.

编辑:刘邓浩

(收稿日期:2013-05-15)

读者 · 作者 · 编者

中国产前诊断杂志开通官方“微平台”啦!

自去年开始本刊开通了网上编审平台:www.chinjpd.com,使得投稿、审稿以及查询稿件状态更为便捷,同时大家可以从网站上查阅到行业内的新进展、新动态,并自由地下载过刊文献,进行学习交流。

随着“微”生活的兴起,“微博”“微信”这一新兴的互联网产物正逐步改变着我们汲取信息的方式,许多您所感兴趣的信息会主动地“推”送到您的面前。为了进一步加强与各位读者的互动,使广大公众更及时便捷地了解本杂志,掌握国内外产前诊断领域的最新动态信息,中国产前诊断杂志现已开通新浪微博(图1)和微信公众平台(图2)。通过“微平台”,我们会及时追踪本学科领域相关的最新进展、对一些影响力深远的学术会议进行即时报道、对国内外先进的产前诊断技术与广大读者共同学习交流。通过网站平台、微博平台、微信平台等新媒体的建设形成一个国内产前诊断行业的学术圈,从而为本刊与读者之间开辟一个更为及时方便的沟通渠道,同时也为业内同行们开辟一个与志同道合的良师益友进行讨论交流的空间。我们热切欢迎您的关注、转发和评论,让我们一起来共同打造属于我们自己专业的纯学术空间吧!



图1 微博二维码

注:请在新浪微博页面请输入“中国产前诊断杂志”进行搜索,或用手机扫描本页中的二维码添加关注。



图2 微信公众平台二维码

注:请使用手机微信的二维码工具进行扫描,或搜索“中国产前诊断杂志”及公众微信号“CHINJPD”并添加关注。