

# 胎儿游离 DNA 浓度低的影响因素及其与妊娠结局的关系

潘小莉 潘云 李海波\*

(宁波市妇女儿童医院 出生缺陷综合防治重点实验室,浙江 宁波,315000)

**【摘要】** 无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)在 21 三体、18 三体和 13 三体都具有较高的特异性和敏感性,甚至在其他常染色体非整倍体、性染色体非整倍体和微缺失/微重复综合征中也有较高的阳性预测值。NIPT 检测的准确性取决于胎儿游离 DNA 浓度(fetal fraction, FF)。FF 与采样孕周呈正相关,与孕妇体重或 BMI 呈负相关。孕妇年龄、受孕方式、母体血清标志物和胎儿非整倍体均可影响 FF。此外,低胎儿游离 DNA 浓度(low fetal fraction, LFF)还可增加不良妊娠结局风险,如胎儿非整倍体、染色体变异和妊娠并发症等。在临床进行 NIPT 检测时,应重视 FF 孕妇。对于两次 LFF 孕妇,应建议进行后续的遗传咨询和侵入性产前诊断。

**【关键词】** 无创产前检测; 检测失败; 胎儿游离 DNA 浓度; 妊娠结局

**【中图分类号】** R715.5 **【文献标识码】** A

1997 年 Lo YM 等<sup>[1]</sup>首次在母体外周血中发现游离 DNA,随着高通量测序技术的发展,基于游离 DNA 的无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)已成为产前筛查的重要组成部分。NIPT 是通过母体外周血中游离 DNA 进行高通量测序,结合生物信息分析,评估胎儿患染色体异常的风险。相比于传统筛查,NIPT 在各种临床适应症中,21 三体、18 三体和 13 三体都具有较高的特异性和敏感性,均可达到 99% 以上<sup>[2-4]</sup>;甚至在其他常染色体非整倍体、性染色体非整倍体和微缺失/微重复综合征中也有较高的阳性预测值<sup>[3,5]</sup>。

然而在实际应用中,约 1%~3% 的 NIPT 样本会因各种原因检测失败,包括了实验技术(标本采集、实验操作和测序平台等)、母体和胎儿等因素。胎儿游离 DNA 浓度(fetal fraction, FF),即胎儿游离 DNA(cell-free fetal DNA, cffDNA)占母体总游离 DNA 的比例,是 NIPT 实验中数据分析和结果判读的一个重要质控参数。提高 FF,有利于提高分

析胎儿染色体非整倍性、片段拷贝数等异常的准确性。孕 5 周开始,胎盘滋养层细胞开始凋亡,释放 cffDNA 入母体外周血。当孕 10~20 周时,cffDNA 平均浓度为 10%~15%<sup>[6]</sup>。一般情况下,FF 可达到 4% 以上,当 FF 过低(FF<4%)时,易导致 NIPT 检测失败,增加胎儿非整倍体假阳性,影响拷贝数异常的检测<sup>[7]</sup>。因此,低胎儿游离 DNA 浓度(low fetal fraction, LFF)是影响 NIPT 准确性的重要因素。分析 LFF 的影响因素,阐明 LFF 与妊娠结局的关系,具有重要临床意义。作者将通过既往研究综述造成 LFF 的原因,及结合自己的临床实际工作经验分析 LFF 与妊娠结局的关系。

## 1 影响 cffDNA 浓度的相关因素

较多研究表明,除实验因素外,FF 主要受母体和胎盘因素的影响。母体自身游离 DNA 增加,或 cffDNA 减少,都可造成 LFF。

1.1 孕周与 FF 的关系 首先孕周是影响 FF 的关键因素,目前主要认为 cffDNA 是胎盘细胞凋亡后产生的游离 DNA 释放到母体血液中而形成的,FF 随着采样孕周的增加而升高<sup>[8-13,16]</sup>。可能是由于胎盘体积因孕周增加而增大,凋亡细胞增加,使母体外周血中 cffDNA 增加,FF 升高。Yuan X 等<sup>[8]</sup>将研

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.04.004

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2021C03030);宁波市社会发展公益项目(202002N3150;2022S035);宁波市医疗卫生高端团队重大攻坚项目(2022020405);宁波市重点技术研发项目(2023Z178)

\* 通信作者:李海波,Email:libaibo-775@163.com

究人群的 FF 根据四分位数进行分组,发现 FF 随采样孕周显著增加。吴丽芳等<sup>[9]</sup>认为 FF 与孕周具有正相关性。也有研究提示 NIPT 失败组的采样孕周显著低于 NIPT 成功组,经 Logistic 回归分析建立模型,发现 16.36 周为 NIPT 最佳采样孕周<sup>[10]</sup>。国外一项大样本量( $n=140377$ )研究发现<sup>[11]</sup>,孕 10~12.5 周间,cfDNA 以每周 0.44% 的速度增加;孕 12.5~20 周,每周的增加速度为 0.083%;孕 20 周以后增加速度显著增加,可达 0.821%,可见 FF 各孕周增加速率不一致,呈 U 型趋势。Hou 等<sup>[12]</sup>将孕周进行分组,同样发现大孕周(>19 周)组的 FF 显著高于小孕周组(<18 周)。Bajka Anahita 等<sup>[3]</sup>也发现在孕 9 周和孕 20 周时,FF 显著升高。

1.2 孕妇体重或 BMI 与 FF 的关系 孕妇体重或 BMI 也是预测 LFF 的预测因素<sup>[7-9,11-12,14-15,17,20-21]</sup>。FF 与孕妇体重呈负相关<sup>[9]</sup>。Norton ME 等<sup>[7]</sup>发现 LFF 的孕妇体重显著高于正常 FF 的孕妇。在孕早期肥胖孕妇( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ )的 FF 显著低于正常体重孕妇( $P < 0.001$ ),同样肥胖孕妇的 NIPT 失败率也较高( $P < 0.001$ ),但总 cfDNA 无显著差异( $P = 0.10$ )<sup>[13]</sup>。因此,孕妇体重或 BMI 与 FF 呈负相关,可能与母体外周血循环量、脂肪细胞凋亡、白细胞和基质血管凋亡增加有关,从而稀释了 cfDNA,使 FF 降低。当 BMI 超过  $20 \text{ kg/m}^2$  时,BMI 每增加  $5 \text{ kg/m}^2$ ,FF 就降低 1.17%;当 BMI 超过  $40 \text{ kg/m}^2$  时,FF 趋于稳定<sup>[11]</sup>。Hou 等<sup>[12]</sup>将 BMI 再细分组,分成 <  $18.5 \text{ kg/m}^2$ 、 $18.5 \sim 24.9 \text{ kg/m}^2$ 、 $25 \sim 29.9 \text{ kg/m}^2$  和  $> 30 \text{ kg/m}^2$  四组,发现这四组的 FF 逐级递增且差异有统计学意义,与上述结论一致。在双胞胎妊娠中,LFF 与 BMI 增加也密切相关。Li J 等<sup>[14]</sup>对 500 例双胞胎孕妇进行研究,发现母亲 BMI 在 LFF 组( $FF < P25$ )显著高于高 cfDNA 浓度组( $FF > P75$ )( $P < 0.001$ )。

1.3 孕妇年龄与 FF 的关系 孕妇年龄是否影响 FF 仍存在一些争议。有些研究认为,FF 随着孕妇年龄的增大而降低<sup>[12,15,17]</sup>,呈负相关( $P = 0.001$ )<sup>[8]</sup>。有研究将孕妇年龄分成 18~24 岁、25~29 岁、30~34 岁、35~39 岁和  $\geq 40$  岁五组,FF 分别为 14.38%、13.98%、13.18%、12.34% 和 11.90%,呈逐级降低趋势<sup>[12]</sup>。而有些研究认为两者相关性并不明显<sup>[9]</sup>。因此,孕妇年龄与 FF 的相关性尚未达成共识,我中心近 6 万例样本,剔除 BMI 等因素后,发现 FF 确实存在随年龄增加而下降趋势,但尚无统计学意义。

1.4 受孕方式与 FF 的关系 有研究认为辅助生殖孕妇的 FF 显著低于自然受孕者<sup>[8,15,17]</sup>。FF 与辅助生殖呈负相关( $P = 0.047$ )<sup>[8]</sup>。可能是辅助生殖孕妇接受过激素治疗和其血清标志物,如游离人绒毛膜促性腺激素(free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin, free  $\beta$ -HCG)和妊娠相关蛋白 A(pregnancy-associated plasma protein A, PAPP)较低引起,且新鲜胚胎移植的孕妇的 FF 要低于冷冻胚胎移植<sup>[15]</sup>。但也有研究认为,受孕方式对 FF 并无影响。最近一项大样本研究显示辅助生殖( $n = 5851$ ,平均  $FF = 9.2\%$ )和自然妊娠( $n = 15707$ ,平均  $FF = 9.2\%$ )的 FF 并没有显著差异<sup>[16]</sup>。

1.5 母体血清标志物与 FF 的关系 母体血清 free  $\beta$ -HCG MOM 和 PAPP MOM 与 FF 呈正相关,free  $\beta$ -HCG 和 PAPP 是胎盘衍生蛋白,均由胎盘产生,一定程度上反映了胎盘功能状态,因此三者之间存在一定的线性关系<sup>[17]</sup>。而吴丽芳等<sup>[9]</sup>认为 FF 仅与 PAPP 存在正相关性( $P = 0.031$ ),与 free  $\beta$ -HCG 无明显相关性( $P = 0.356$ )<sup>[8]</sup>。

1.6 胎儿非整倍体与 FF 的关系 FF 与非整倍体存在一定的相关性。18 三体和 13 三体阳性孕妇因 LFF 导致 NIPT 检测失败的概率分别为 8.0%(4/50)和 6.3%(1/16),显著高于 21 三体组和低风险组<sup>[17]</sup>。胎儿非整倍体对 FF 的影响会随着采样孕周的变化而变化。在孕 16 周后,21 三体阳性孕妇的 FF 显著高于正常孕妇;孕 21 周前,18 三体阳性孕妇的 FF 显著低于正常孕妇;孕 18 周前,13 三体阳性孕妇的 FF 显著低于正常孕妇<sup>[11]</sup>。

此外,还存在一些潜在的影响因素。种族也可能影响 FF,南亚族孕妇的 FF 显著低于高加索人<sup>[17]</sup>。Kuhlmann-Capek<sup>[18]</sup>等人研究表明,服用两种或两种以上药物(包括阿司匹林、波立维、肝素、抗生素、化疗、抗病毒、抗糖尿病和抗甲状腺药物)与 LFF 的高发生率相关。孕妇炎症状态(白细胞计数)<sup>[19]</sup>、吸烟<sup>[20]</sup>、经产妇<sup>[20]</sup>、肝素治疗<sup>[21]</sup>、慢性高血压<sup>[21]</sup>、1 型或 2 型糖尿病<sup>[21]</sup> 都可降低 FF。

## 2 cfDNA 浓度低与不良妊娠结局的关系

2.1 LFF 与胎儿非整倍体和染色体变异的有关 LFF 与胎儿非整倍体和染色体变异有关,发生率约为 1%~2%<sup>[23]</sup>。LFF 孕妇非整倍体的发生率明显高于普通人群(1.4%与 0.4%, $P < 0.05$ ),先天性结构异常的发生率也较高(4.1%与 1.7%, $P <$

0.05)<sup>[20]</sup>。Becking 等<sup>[23]</sup>将染色体非整倍体进一步分组,发现 LFF 与胎儿 13 三体、18 三体、X 单体、其他三倍体和其他染色体异常的风险增加有关,但与 21 三体无关。卢婉对 24 例因 LFF 导致 NIPT 失败的孕妇追踪随访发现,10 例经羊水穿刺后检出 1 例 21 三体综合征和 1 例平衡易位,异常率达 8.33%<sup>[24]</sup>。但也有研究发现,在排除 BMI 和采样孕周后,LFF 的非整倍体发生率并没有显著增加(OR = 1.37[0.3-7.4]), $P=0.714$ )<sup>[25]</sup>。

2.2 LFF 与妊娠并发症的关系 cffDNA 主要来源于胎盘,而胎盘生理异常是妊娠相关并发症的主要原因。LFF 可能是由胎盘质量较小或功能受损进而滋养层细胞凋亡减少所致,因此其可能是不良妊娠结局的预测因子<sup>[8, 14, 15, 20]</sup>,如小于胎龄儿 (small for gestational age infant, SGA)、妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)、妊娠肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)、子痫前期 (preeclampsia, PE)、胎儿生长受限 (fetal growth restriction, FGR)、妊娠期高血压综合征 (pregnancy-induced hypertension syndrome, PIH) 和早产 (preterm birth, PTB) 等。

SGA 和 PTB 是婴幼儿病残甚至死亡的重要原因之一。LFF 与 SGA、PTB 的相关性也渐受关注。Yuan X 等<sup>[8]</sup>人发现 LFF 与 PTB (妊娠 < 34 周) 和 SGA (< 2500 g) 风险增加显著相关。Clap<sup>[26]</sup>等人对 2035 名单胎妊娠妇女进行研究,发现 LFF (FF < P5) 组中,SGA (< P5) 的风险显著高于正常 FF 组 (6.9% vs. 3.2%,  $P=0.04$ ),而 SGA (< P10) 在两组中未见异常。此外,有研究证明 LFF 能增加 SGA 发生率同样适用于双胎妊娠。Li J 等<sup>[14]</sup>将 500 名双胎妊娠孕妇的 cffDNA 根据四分位数进行分组,发现 LFF 组 (< P25) 的 SGA 风险显著增加;进一步将 LFF 组分四组 (FF < P25, < P10, < P5, < P2.5),同样发现 SGA 风险随着 FF 降低而增加。因此 LFF 或许可以成为单/双胎孕妇发生 SGA 的一个预测因子。

目前,较多国内外研究认为 LFF 与 PIH,尤其是 PE 之间存在相关性。Suzumori 等<sup>[27]</sup>人发现与对照组相比,早孕期 LFF 孕妇在后期发生 PIH 的风险更高。同样,Rolnik 等<sup>[22]</sup>也证明早发型 PE 孕妇中,FF 降低而 cffDNA 水平升高。有研究认为 LFF 与孕妇 PE (< 34 周) 和 PIH 风险增加均显著性相关<sup>[20]</sup>,而 Yuan X 等<sup>[8]</sup>人通过 logistic 回归分析

发现 LFF 与 PE 风险增加显著相关,而与 PIH 无显著相关性。Rolnik DL 等<sup>[22]</sup>人还发现 LFF 与 PAPP-A 和胎盘生长因子 (placental growth factor, PlGF) 呈正相关,进而使 PE 风险显著增加。但也有研究认为,在排除了 BMI 的影响后,FF 与 PIH 不再显著性相关<sup>[21]</sup>。

胎盘功能不全是引起 FGR 的重要原因之一。LFF 与 FGR 之间的相关性存在一定的争议性。Rolnik 等<sup>[22]</sup>发现与正常对照组相比,FGR 孕妇的早孕期 FF 较低,可能由早孕期 PAPP-A 和 PlGF 降低所致,与 Morano 等<sup>[28]</sup>研究结果一致。也有研究认为两者并无相关性<sup>[29-30]</sup>。可能是母体游离 DNA 和 cffDNA 升高水平相近,使 FF 变化不明显<sup>[30]</sup>。

综上,FF 是影响 NIPT 临床功效性的重要参数。FF 与采样孕周呈正相关,与孕妇体重或 BMI 呈负相关。孕妇年龄、受孕方式、母体血清标志物和胎儿非整倍体均可影响 FF,但相关性尚未达成共识。此外,还存在一些潜在的影响因素,如孕妇炎症、种族、药物史、吸烟、糖尿病和高血压等。LFF 可能增加胎儿非整倍体和染色体变异的风险,还可能增加妊娠并发症 (尤其是 PE、PTB、FGR、SGA 和 PIH) 风险,而与 GDM 和 ICP 相关性不明显。

因此,在临床进行 NIPT 检测时,应详细了解孕妇基本情况,选择合适的孕周,控制基础疾病 (炎症、糖尿病和高血压等),尽量避免使用相关药物。对于首次 LFF 孕妇,可建议再次采血重新检测,以提高 NIPT 成功率<sup>[6]</sup>,而对于两次 LFF 孕妇,应建议进行后续的遗传咨询和侵入性产前诊断。

#### 参考文献

- [1] LO YM, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *The Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [2] 刘静, 赵建宏, 楚伟, 等. 河北省 42 万余例孕妇无创产前检测结果回顾性分析一线筛查方案评价 [J]. *中华妇产科杂志*, 2022, 57(12):900-906.
- [3] BAJKA ANAHITA, BAJKA MICHAEL, CHABLAIS FABIAN, et al. Audit of the first >7500 noninvasive prenatal aneuploidy tests in a Swiss genetics center [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2022, 305(5): 1185-1192
- [4] XIANG L, ZHU J, DENG K, et al. Non-invasive prenatal testing for the detection of trisomies 21, 18, and 13 in pregnant women with various clinical indications: A multicenter observational study of 1,854,148 women in China [J]. *Prenat Diagn*, 2023, 43(8):1036-1043.

- [5] 张玉鑫, 闫露露, 刘颖文, 等. 无创产前检测对于筛查非目标染色体异常的价值[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(6): 621-626.
- [6] DENG C, LIU S. Factors Affecting the Fetal Fraction in Noninvasive Prenatal Screening: A Review [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10:812781.
- [7] NORTON ME, JACOBSSON B, SWAMY GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(17):1589-1597.
- [8] YUAN X, ZHOU L, ZHANG B, et al. Association between low fetal fraction of cell free DNA at the early second-trimester and adverse pregnancy outcomes [J]. *Pregnancy hypertension*, 2020, 22: 101-108.
- [9] 吴丽芳, 林小玲, 徐雪琴, 等. 不同孕周胎儿游离 DNA 含量变化及其影响因素[J]. 中华围产医学杂志, 2016, 19(8): 572-574.
- [10] 姜海燕. 基于 Logistic 回归分析探讨无创产前检查筛查失败的影响因素[D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [11] KINNINGS SL, GEIS JA, ALMASRI E, et al. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing [J]. *Prenatal diagnosis*, 2015, 35(8): 816-822.
- [12] HOU Y, YANG J, QI Y, et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction: statistical analysis of 13,661 maternal plasmas for non-invasive prenatal screening [J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1): 62.
- [13] SHREE R, KOLAROVA TR, MACKINNON HJ, et al. Low fetal fraction in obese women at first trimester cell-free DNA based prenatal screening is not accompanied by differences in total cell-free DNA [J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(10): 1277-1286.
- [14] LI J, GU X, WEI Y, et al. Correlation of low fetal fraction of cell-free DNA at the early second-trimester and pregnancy complications related to placental dysfunction in twin pregnancy [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 1011366.
- [15] TALBOT AL, AMBYE L, HARTWIG TS, et al. Fetal fraction of cell-free DNA in pregnancies after fresh or frozen embryo transfer following assisted reproductive technologies [J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(6): 1267-1275.
- [16] BALAGUER N, MATEU-BRULL E, GÓMEZ-LÓPEZ M, et al. Cell-free fetal DNA testing performance and fetal fraction estimation are not affected in ART-conceived pregnancies [J]. *Hum Reprod*, 2022, 37(12): 2743-2756.
- [17] REVELLO R, SARNO L, ISPAS A, et al. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47(6): 698-704.
- [18] KUHLMANN-CAPEK M, CHIOSSI G, SINGH P, et al. Effects of medication intake in early pregnancy on the fetal fraction of cell-free DNA testing [J]. *Prenat Diagn*, 2019, 39(5): 361-368.
- [19] QIAO L, CAO X, TANG H, et al. White blood cell count affects fetal fraction and test failure rates in noninvasive prenatal screening [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2023, 10: 1088745.
- [20] BECKING EC, WIRJOSOEKARTO SAM, SCHEFFER PG, et al. Low fetal fraction in cell-free DNA testing is associated with adverse pregnancy outcome: analysis of a subcohort of the TRIDENT-2 study [J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(10): 1296-1304.
- [21] BURNS W, KOELPER N, BARBERIO A, et al. The association between anticoagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to a low fetal fraction [J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(11): 1125-1129.
- [22] ROLNIK DL, DA SILVA COSTA F, LEE TJ, et al. Association Between Fetal Fraction on Cell-Free DNA Testing and First-Trimester Markers for Pre-eclampsia [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019, 74(5): 265-266.
- [23] BECKING EC, SCHUIT E, VAN BAAR DE KNEGT SME, et al. Association between low fetal fraction in cell-free DNA screening and fetal chromosomal aberrations: A systematic review and meta-analysis [J]. *Prenat Diagn*, 2023, 43(7): 838-853.
- [24] 卢婉, 刘艳秋, 黄婷, 等. 孕妇外周血无创产前检测失败的原因分析及妊娠追踪[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(1): 63-68.
- [25] LOPES JL, LOPES GS, ENNINGA EAL, et al. Most non-invasive prenatal screens failing due to inadequate fetal cell free DNA are negative for trisomy when repeated [J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(7): 831-837.
- [26] CLAPP MA, BERRY M, SHOOK LL, et al. Low Fetal Fraction and Birth Weight in Women with Negative First-Trimester Cell-Free DNA Screening [J]. *Am J Perinatol*, 2020, 37(1):86-91.
- [27] SUZUMORI N, SEKIZAWA A, EBARA T, et al. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018, 224:165-169.
- [28] MORANO D, ROSSI S, LAPUCCI C, et al. Cell-Free DNA (cfDNA) Fetal Fraction in Early- and Late-Onset Fetal Growth Restriction [J]. *Mol Diagn Ther*, 2018, 22(5): 613-619.
- [29] RAFAELI-YEHUAI T, IMTERAT M, DOUVDEVANI A, et al. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200360.
- [30] 小白艺, 冯俏丽, 韩振艳, 等. 孕妇外周血中游离胎儿 DNA 浓度与不良妊娠结局的关系[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2020, 41(6): 917-923.

(收稿日期: 2023-08-09)

编辑: 刘邓浩