

全外显子组测序在产前诊断中的应用及其发展方向

林晓莹 魏佳雪*

(广东省第二人民医院 产前诊断中心, 广东 广州 510317)

【摘要】 血清学筛查、超声检查和染色体核型分析是传统产前诊断的主要手段,而近年来,产前分子诊断成为产前诊断的重要内容,荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)、荧光定量 PCR 技术、多重连接依赖探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)和染色体微阵列分析(chromosome microarray analysis, CMA)等已广泛应用于产前诊断的临床实践中。而对于那些超声检查异常,核型分析和染色体微阵列分析结果为阴性的产前诊断病例中,全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)往往能提供更多的遗传信息,从而提高其检出率,有效提高产前诊断的准确性和特异性。同时,WES在产前诊断的临床实践中也面临着如方法局限性、遗传咨询、社会伦理学等方面的挑战。因此,本文主要针对 WES目前在产前诊断的应用情况进行讨论,并对其今后发展方向进行展望。

【关键词】 全外显子组测序; 产前诊断; 分子诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

我国是出生缺陷高发国家,每年新增出生缺陷数约 90 万例,其中出生时临床明显可见的出生缺陷约有 25 万例^[1]。同时,胎儿异常能在 2%~5% 的妊娠中被发现,且围产期死亡例数的 20%^[2-5]。因此,产前诊断是防治出生缺陷的重要内容。

出生缺陷病因包括环境因素和遗传因素,根据《全球出生缺陷报告》,全球每年出生遗传相关出生缺陷婴儿近 800 万,占出生总人数 6%^[6]。遗传性病

因可分为染色体病(含基因组病)、单基因病和多基因病,传统产前诊断的主要手段如血清学筛查、超声检查和染色体核型分析已满足不了当前产前诊断发展的需要。近年来,产前分子诊断成为产前诊断的重要内容,荧光原位杂交技术、荧光定量 PCR 技术、多重连接依赖探针扩增技术和染色体芯片分析等已广泛应用于产前诊断的临床实践中,并有相应的指南和应用专家共识^[7,8]。表1为美国妇产科医

表 1 ACOG 和 SMFM 关于产前基因诊断检测方法的总结

检测方法	检测时间	检测范围	评价
核型分析	7~14d	染色体异常>5~10Mb	染色体异常的传统检测手段
FISH-直接制样(间相)	24~48h	快速评估主要的非整倍体(21/18/13/X/Y)	FISH 直接检测来自绒毛细胞的准确性不如从绒毛或羊水细胞经细胞培养后的检测,结果应由培养细胞的检测或有其他的临床指征加以确认
FISH-经培养细胞(分裂相)	7~14d	微缺失和重复	可用于临床怀疑某种特定的异常
染色体微阵列分析	3~5d(直接检测); 7~14d(培养细胞)	拷贝数变异>50~200 kb	在全基因组水平上对拷贝数变异进行筛查;能检测主要染色体异常除了平衡易位和某些三倍体。有多个微阵列分析平台
植入前遗传学诊断	1~2d	已被明确的遗传疾病及其致病变异	需要产前的取绒毛或羊水细胞做基因诊断验证
分子 DNA 检测	3~14d	已在家庭里被确认的遗传变异或因胎儿超声检查异常或其他检查异常而怀疑的遗传变异	通常是一项特定的检测,主要针对在胎儿的超声检查或其他检查发现异常而怀疑的某种疾病或某一类疾病

师学会(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)和母胎医学会(Society for Maternal-fetal Medicine, SMFM)对产前诊断检测技术应用情况的总结^[9]。

全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)是利用序列捕获技术可以将人基因组的外显子区域DNA捕获并且富集。虽然外显子区域仅占全基因组1%~2%左右,却包含了85%的致病变异,目前推荐用于儿科和成人医学,例如有多个出生缺陷或神经发育迟缓而其他检测无法提供有效信息的临床适应证。产后诊断数据显示WES在疑似患有某种遗传性疾病但未得到明确诊断的病例中的总体诊断率为25%~30%^[10,11]。

然而,在实践中,许多单基因疾病在宫内会出现异常,这些异常能被超声检查发现,但核型和染色体微阵列分析(chromosome microarray analysis, CMA)显示为正常未得到明确诊断时,其中6.2%~80.0%可用WES发现其致病变异^[12-14],而检出率的高低往往取决于临床能提供给WES分析的信息。WES提供准确的产前诊断信息,有助于选择妊娠结局、围产期管理方式和判断再发风险,做进一步的生殖指导等。

WES的应用可积极推动产前诊断的快速发展,但同时也面临着挑战和困难,因此本文将针对WES目前在产前诊断应用的优势和挑战进行探讨,并对其发展方向进行展望。

1 WES在产前诊断中的应用优势

1.1 WES有助于提高产前诊断的诊断率 对于超声检查异常而核型和CMA结果正常的产前诊断病例中,WES往往能作为有效的补充手段,有效检出致病变异,从而提高产前诊断的诊断率。Best^[13]统计了截至2017年7月的WES的产前数据,发现WES总体诊断率在6.2%~80.0%,其中部分研究未在WES之前报告其有正常的核型或CMA结果,但在这些研究中,其诊断率也差异很大。这与Jelin等^[15]统计的结果是一致的。WES的产前诊断率取决于提供分析的临床提示和以下的多种因素,包括:单一与多器官系统受累,特定器官系统受累,先证者WES与家系WES(即Trio WES)^[12,16]。

1.2 WES有助于为患儿的早期诊断和胎儿宫内治疗提供有效信息 产前在明确诊断后对某些遗传性

疾病的胎儿可及时进行宫内治疗和对孕妇的分娩提前制定及采取合适的方案,以降低患儿的死亡率和患病率,从而更好地维护母婴的健康。例如,产前诊断丙酮酸脱氢酶缺乏症能使产后的及时治疗成为可能,有助于改善妊娠结局^[17-22]。

有研究发现,宫内治疗成骨不全症(osteogenesis imperfecta,OI)胎儿的效果要比在出生后再进行间充质干细胞移植治疗效果好,可减少患儿预期骨折的发生率及其后遗症^[23]。很多OI病例是在妊娠期间发生新发突变,由于OI具有遗传异质性,因此WES能提供更加全面且快速的产前分子诊断,以便于提前进行宫内干预。

此外,产前WES能为患儿提供额外和准确的预后信息,以评估宫内手术的利弊,如在对严重脑室扩大的胎儿进行干预时应考虑是否要排除是否携带L1CAM突变^[24]。

1.3 WES有助于人类胎儿发育的研究 由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health,NIH)资助的几个中心目前利用WES来鉴定新基因^[25]。虽然大多数新基因主要是在产后检测中被鉴定出来的,但与死胎或反复流产相关的,且需要通过产前WES或全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)来深入了解其功能的基因,也许对人类胎儿发展至关重要。

产前WES研究已成功识别以前未被识别的且与已知的孟德尔疾病基因相关的产前表型,以及鉴定新的人类发育障碍的候选基因,如KCTD1基因^[26]。此外,产前WES研究有可能提高对致死性胎儿异常的遗传性疾病的了解,通常这些疾病完整的表型是未知的,如KIF14基因的研究^[27,28]。

因此,研究工作者和临床实验室建议产前WES的临床信息数据库需要建立并且共享^[15],以便于临床的使用。

2 WES在产前诊断应用中的挑战

2.1 WES的方法局限性 WES的方法局限性主要表现在:①相关基因覆盖不全,例如HBB基因,其中一些致病变异发生在内含子上,而WES未能覆盖完全。这种情况需通过替代方法(如一代测序)进行补充,但由于产前所需的时间有限,这些替代方法并不总是可行。②WES对于重复序列和高GC含量的区域很难捕获^[29]。③对有假基因的或有高

度同源基因家族的基因难以检测,如 *HBA* 基因、*IKBKKG* 基因、*CYP21A2* 基因等。^④ WES 目前无法做到可靠地检测所有类型的遗传变异,如拷贝数变化、低水平镶嵌现象、非整倍性、结构染色体重排或三核苷酸重复,以及非编码区域中的变异。因此,目前,常规测试如微阵列等仍应与产前 WES 同时考虑,特别是当临床怀疑已知的遗传性综合征的产前表现时。

2.2 产前 WES 的遗传咨询 WES 的遗传咨询在产前诊断中所面临的困难要比在产后更为艰巨,因为产前诊断的结果往往影响着妊娠结局,这不仅会给孕妇及其家庭带来重要影响,也关乎到胎儿的生命,尤其在我国目前医患关系紧张的情景之下,如何对 WES 的结果进行正确地判读得到明确诊断,如何将产前诊断结果清楚地解释给孕妇及其家庭就显得至关重要。

产前 WES 的遗传咨询所面临的挑战主要来源于 3 个方面:①胎儿表型信息的不确定性。首先,因超声医师水平差异,胎儿结构异常可能出现过度诊断或漏诊可能;再者,单基因病胎儿微妙表型异常在产前超声中难以明确,且有一些遗传性疾病可能存在不完全外显、表型多样性或者迟发等复杂的遗传背景,且许多孟德尔遗传病的表型还是无法通过超声等手段观察到,例如生长延缓、智力发育障碍等;此外, ClinVar 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) 和人类基因突变数据库 (Human Gene Mutation Database, HGMD) (<http://www.hgmd.org>) 等能给产后表型-基因型提供参考信息,也有相关文献探讨了这两个数据库的应用价值^[30,31]。而目前尚未有类似的产前表型-基因型数据库。②对变异的解读,尤其是对临床意义未明变异的解读。美国医学遗传学和基因组学 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 指南明确将变异进行分类,并对其报告的原则和要求进行说明^[32]。但在实践工作中,医院和第三方检测机构的实验室是否都能严格按照 ACMG 指南要求进行解读,分析人员水平的差异以及临床医生对遗传学知识的掌握程度等都给临床诊断及咨询服务带来挑战。③对次要或偶然发现的处理。对于产后 WES, ACMG 建议临床实验室积极寻找并报告 59 个基因中的已知的致病变异和疑似致病变异,这些基因与肿瘤和心脏病的易感性有很

大的关联^[33],并且可在大约 1% 的人口中发现^[34]。对于产前 WES 的次要发现,其具体实践尚未找到相应的指南或准则。对于是否要报告次要发现或意外发现,建议要在检测前知情同意中告知胎儿的父母,这与大多数专家的意见也是一致的^[35]。

2.3 WES 在产前诊断应用的社会伦理学问题 产前 WES 引起的社会伦理学问题一直备受关注且有争议^[35]。首先,产前诊断本身就否定了胎儿作为一个生命的自主权^[36];其次,基于产前诊断信息,父母有可能选择终止妊娠或是产后有不对等的抚养方式,这都有可能给父母和孩子带来沉重的心理负担^[37],因此必须仔细权衡这其中的利弊。此外,对于次要或偶然发现,尤其是出现非亲子或非伦理父母血缘关系的意外问题,母亲需要单独接受咨询,且有做出是否报告的选择权。

2.4 WES 在产前诊断应用的费用 目前,目标区域检测、WES 和 WGS 都是依靠第一代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 平台发展的产物,它们的区别在于覆盖的基因数和区域有所不同,例如目标区域检测多是把同一疾病或同一系列疾病相关的基因组合在一起,往往包括几个至上百个基因;WES 覆盖了人类基因组 2 万多个基因的外显子区域;而 WGS 则是覆盖了人类基因组所有已知或未知基因的外显子区和内含子区。随着测序成本的降低,目标区域检测, WES 和 WGS 的成本差异主要在于对变异分析的成本,包括分析团队的人力成本、数据处理及储存的成本和分析所需的时间成本。因此,目标区域检测成本收费较低, WES 次之, WGS 难度最大,价格也就越高。

对于产前诊断,相比目标区域检测和 WGS, Trio WES 是较为全面且经济快速的检测方法。目前对于产前 WES 的经济效益尚未得到正式地评估,但从产后大规模样本来看, WES 的应用更有利于节省医疗费用^[38]。

3 WES 的未来发展方向

随着技术不断改进,测序成本的降低和生物信息分析能力的优化, WGS 的应用是势必发展的。目前,也有不少在临床应用 WGS 的报道^[39-41]。然而, WGS 覆盖的范围比 WES 更广,所能挖掘的信息更多,这比 WES 的应用需要面临更多的困难,尤其在解读咨询上,因此这也限制了 WGS 目前的广泛应用。

无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)是利用母体外周血浆中胎儿游离DNA进行分析的一种检测方法,目前多应用于筛查胎儿21、18、13-三倍体的非整倍体异常,也能检测出一些单基因遗传病^[42]。在技术层面上,利用母体外周血浆中胎儿游离DNA进行WES或WGS检测是可以实现的,但不成熟,仍需要解决如WGS可能出现覆盖不全、假阳性率和假阴性率高、需要排除胎盘嵌合等问题^[43]。

单细胞测序允许对单个细胞进行特异性分析,单细胞的WES和WGS测序也早有报道,多应用于植入前诊断中对非整倍体、拷贝数变异(copy number variations, CNVs)和某些单基因疾病的检测^[44]。采用胎盘不同位置的多个细胞进行单细胞测序分析有助于排除母体污染或胎盘嵌合的问题,在产前诊断中的应用有很大的潜力。

综上所述,在超声检查异常而核型和CMA分析结果正常的胎儿中,WES能提高其产前诊断率,且其诊断范围增加且分散,极大提高罕见病检出率。2018年发表的关于使用全基因组测序进行胎儿诊断的联合立场声明及2020年1月发表的ACMG对胎儿外显子测序(exome sequencing, ES)在产前诊断中应用的意见中均已提出在胎儿超声异常,但核型及CMA正常的情况下可采用测序进行检测^[45,46]。但是,WES的应用同时带来一系列挑战,包括技术、应用、伦理、经济等,仍不建议常规使用WES进行产前诊断^[45,47],需进一步证实技术可行性及临床效力。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告(2012)[R]. 北京:中华人民共和国卫生部,2012.

[2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on overall prevalence of major birth defects-Atlanta, Georgia 1978-2005[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008, 57:1-5.

[3] MATTHEWS TJ, MACDORMAN MF, THOMA ME. Infant mortality statistics from the 2013 period linked birth/infant death data set[J]. Natl Vital Stat Rep, 2015, 64(9):1-30.

[4] BOYD PA, TONKS AM, RANKIN J, et al. Monitoring the prenatal detection of structural fetal congenital anomalies in England and Wales; register-based study[J]. J Med Screen, 2011, 18(1):2-7.

[5] CALZOLARI E, BARISIC I, LOANE M, et al. Epidemiology of multiple congenital anomalies in Europe; a EUROCAT population-based registry study [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2014, 100(4):270-276.

[6] 任爱国. 美国一基金会发布全球出生缺陷报告[J]. 中国生育健康杂志, 2006(2):121-122.

[7] Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis [J]. Am J Obstet Gynecol, 2016, 215(4):B2-9.

[8] 荧光定量PCR技术在产前诊断中的应用协作组. 荧光定量PCR技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(5):321-324.

[9] American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, Committee on Genetics, Society for Maternal - Fetal Medicine. Practice bulletin No. 162: prenatal diagnostic testing for genetic disorders[J]. Obstet Gynecol, 2016, 127(5):e108-22.

[10] YANG Y, MUZNY DM, REID JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of Mendelian disorders [J]. N Engl J Med, 2013, 369(16):1502-1511.

[11] Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders [J]. Nature, 2015, 519(7542):223-228.

[12] YADAVA SM, ASHKINADZE E. Whole exome sequencing (WES) in prenatal diagnosis for carefully selected cases[J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216:S87-S88.

[13] BEST S, WOU K, VORA N, et al. Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing[J]. Prenat Diagn, 2018, 38(1):10-19.

[14] RONALD W, SLAV P, KELLY B, et al. Whole exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies; a prospective study of sequential patients [J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216:S5-6.

[15] JELIN AC, VORA N. Whole exome sequencing: applications in prenatal genetics [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2018, 45(1):69-81.

[16] FILGES I, NOSOVA E, BRUDER E, et al. Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype [J]. Clin Genet, 2014, 86(3):220-228.

[17] RETTERER K, JUUSOLA J, CHO MT, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications [J]. Genet Med, 2016, 18(7):696-704.

[18] SKIRTON H, GOLDSMITH L, JACKSON L, et al. Offering prenatal diagnostic tests; European guidelines for clinical practice [J]. Eur J Hum Genet, 2014, 22(5):580-586.

[19] ILLSINGER S, DAS AM. Impact of selected inborn errors of metabolism on prenatal and neonatal development [J]. IUBMB Life, 2010, 62(6):403-413.

[20] NATARAJAN N, TULLY HM, CHAPMAN T, et al. Prenatal presentation of pyruvate dehydrogenase complex deficiency [J]. Pediatr Radiol, 2016, 46(9):1354-1357.

[21] ROBINSON JN, NORWITZ ER, MULKERN R, et al. Prenatal diagnosis of pyruvate dehydrogenase deficiency using

- magnetic resonance imaging [J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(12):1053-1056.
- [22] SOFOU K, DAHLIN M, HALLBÖÖK T, et al. Ketogenic diet in pyruvate dehydrogenase complex deficiency: short- and long-term outcomes[J]. *J Inher Metab Dis*, 2017, 40(2):237-245.
- [23] WESTGREN M, GÖTHERSTRÖM C. Stem cell transplantation before birth—a realistic option for treatment of osteogenesis imperfecta? [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(9):827-832.
- [24] STUMPEL C, VOS YJ. *Gene Reviews*[M]. Seattle (WA): University of Washington, 2015:1993-2017.
- [25] BÄMSHAD MJ, NG SB, BIGHAM AW, et al. Exome sequencing as a tool for mendelian disease gene discovery[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(11):745-755.
- [26] VORA NL, POWELL B, BRANDT A, et al. Prenatal exome sequencing in anomalous fetuses: new opportunities and challenges[J]. *Genet Med*, 2017, 19(11):1207-1216.
- [27] FILGES I, NOSOVA E, BRUDER E, et al. Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype[J]. *Clin Genet*, 2014, 86:220-228.
- [28] FUJIKURA K, SETSU T, TANIGAKI K, et al. Kif14 mutation causes severe brain malformation and hypomyelination[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53490.
- [29] BENJAMINI Y, SPEED TP. Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(10):e72.
- [30] Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1):D862-D868.
- [31] STENSON PD, MORT M, BALL EV, et al. The human gene mutation database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(6):665-677.
- [32] 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.
- [33] KALIA SS, ADELMAN K, BALE SJ, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics[J]. *Genet Med*, 2017, 19:249-255.
- [34] JOHNSTON JJ, RUBINSTEIN WS, FACIO FM, et al. Secondary variants in individuals undergoing exome sequencing: Screening of 572 individuals identifies high-penetrance mutations in cancer-susceptibility genes[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 91(1):97-108.
- [35] HORN R, PARKER M. Opening Pandora's box?: ethical issues in prenatal whole genome and exome sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2018, 38(1):20-25.
- [36] YURKIEWICZ IR, KORF BR, LEHMANN LS. Prenatal whole-genome sequencing is the quest to know a fetus' s future ethical? [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370:195-197.
- [37] BOTKIN JR, BELMONT JW, BERG JS, et al. Points to consider: ethical, legal, and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescents[J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97:6-21.
- [38] SABATINI LM, MATHEWS C, PTAK D, et al. Genomic sequencing procedure microcosting analysis and health economic cost-impact analysis: a report of the Association for Molecular Pathology[J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18:319-328.
- [39] KITZMAN JO, SNYDER MW, VENTURA M, et al. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(137):137ra76.
- [40] MACERA MJ, SOBRINO A, LEVY B, et al. Prenatal diagnosis of chromothripsis, with nine breaks characterized by karyotyping, FISH, microarray and whole-genome sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(3):299-301.
- [41] WATSON CM, CRINNION LA, TZIKA A, et al. Diagnostic whole genome sequencing and split-read mapping for nucleotide resolution breakpoint identification in CNTNAP2 deficiency syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A(10):2649-2655.
- [42] 韩璐好,陈晓丹,蒋玮莹.无创产前检测的发展进程[J].*中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(7):4-7.
- [43] VAN DEN VEYVER IB. Recent advances in prenatal genetic screening and testing[J]. *F1000Res*, 2016, 5:2591.
- [44] WANG J, SONG Y. Single cell sequencing: a distinct new field[J]. *Clin Transl Med*, 2017, 6(1):10.
- [45] Joint Position Statement from the International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), the Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), and the Perinatal Quality Foundation (PQF) on the use of genome-wide sequencing for fetal diagnosis [J]. *Prenat Diagn*, 2018, 38(1):6-9.
- [46] MONAGHAN KG, LEACH NT, PEKAREK D, et al. The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [J]. *Genet Med*, 2020.
- [47] Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee opinion No. 682: Microarrays and next-generation sequencing technology: the use of advanced genetic diagnostic tools in obstetrics and gynecology [J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 128(6):e262-e268.

(收稿日期:2019-07-05)

编辑:宋文颖