

无创产前诊断在胎儿染色体结构异常中的研究进展

赵馨 魏然 尹爱华*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 510010)



尹爱华, 教授、主任医师、医学博士、博士生导师; 广东省妇幼保健院出生缺陷防治与产前诊断中心/医学遗传中心主任、广东省妇幼代谢与遗传医学重点实验室副主任, 医院重点科技人才、学科带头人; 曾在香港大学、哈佛大学、悉尼大学访学, 进修遗传咨询与产前诊断技术。目前任国家产前诊断专家组专家、中国医师协会遗传医师分会常务委员兼青年委员会副主任委员、中国优生科学协会常务理事兼出生缺陷防控专业委员会副主任委员、广东省医学会医学遗传分会副主任委员、广东省地中海贫血防治协会副会长、广东省医学会妇幼保健学分会产前诊断学组组长、广东省妇幼保健协会常务理事、广东省优生优育协会生化免疫委员会副主任委员、海峡两岸医药卫生交流协会遗传与生殖专业委员会常务委员兼副青年委员会主任委员。2014年荣获“广东青年五四奖章”。先后牵头承担国家生殖健康与出生缺陷重大专项、国家自然科学基金项目、国家863计划项目子课题及省、市部级重点课题十多项, 获得国家教育部科技进步二等奖1项、国家科技进步奖二等奖1项、广东省科技进步一等奖1项、广州市科技进步一等奖1项、国家发明专利5项。发表了论著、文章近100篇, 其中SCI文章19篇。

一直以来, 人们致力于开发一种早期、安全、准确的产前筛查方法以排查胎儿染色体异常, 降低新生儿出生缺陷率。传统的介入性产前诊断方法有0.5%~1%的流产风险。因此, 人们开始寻找一种准确又无创的产前诊断途径。研究至今, 在孕妇外周血中发现了胎儿有核红细胞、胎儿游离DNA、胎儿游离RNA等新兴的研究物质, 为非介入性产前诊断提供可能, 其中基于胎儿游离DNA的胎儿染色体21、18、13-三体综合征的产前筛查已成功应用于临床, 胎儿其他染色体数目异常以及结构异常、单基因病等的诊断方法也成为研究热点, 本文就其在胎儿染色体结构异常中的研究进展做一综述。

1 孕妇外周血中胎儿游离DNA的发现及生物学特性

在1997年, Lo等^[1]首次在孕妇血浆中检测到胎儿游离DNA(cffDNA)的存在。随着研究发现cffDNA在孕妇外周血中的含量丰富, 较胎儿细胞

大约多出20倍, 最早可在妊娠5周从母体外周血液中检测到, 并随孕周增长而增加, 妊娠晚期在母血DNA中的浓度可达6.2%。而在胎盘娩出后, 又可以数分钟的半衰期从孕妇血浆中迅速清除, 两个小时即可从母亲外周血中完全消失, 不会影响下次妊娠检测结果。关于其来源, 有学说认为cffDNA主要来源于滋养层或胎盘细胞的凋亡, 少量来自于胎儿血循环或胎儿细胞。约85%的胎儿DNA分子片段长度为100~300bp, 而大部分孕妇自身DNA分子片段长度大于1000bp, 母胎DNA多分子片段差异为从孕妇外周血中富集胎儿DNA提供了可能; 近年已有学者从cffDNA中谱画出胎儿的完整基因组DNA, 因此, cffDNA是无创产前诊断最理想的分子标记。但是孕妇血浆DNA是由孕妇自身DNA和cffDNA混合构成, 识别孕妇外周血中cffDNA要求高精度度及高准确性的检测工具, 二代测序技术以及数字PCR的出现, 为利用cffDNA的产前诊断研究提供了广泛的发展前景^[2]。

2 孕妇外周血中 cffDNA 在产科领域中的应用

对 cffDNA 进行准确的定性及定量检测,发现在子痫前期^[3]、胎盘源性胎儿生长受限^[4, 5]、胎盘植入^[6]、早产^[7]、以及妊娠肝内胆汁淤积综合征^[8]的孕妇中,母血中 cffDNA 的含量异常增高,且与疾病严重程度呈正相关,原因可能是此类疾病共同的病理基础即胎盘小动脉痉挛^[3]、血管内皮损伤^[7, 8]和缺氧及再充氧^[3]作用造成胎盘损伤,氧化应激增加胎盘细胞的凋亡和坏死,以及肝细胞破坏^[8]和肾小球肾小管功能障碍^[3, 8]影响降解有关。孕期监测到胎儿 cffDNA 浓度异常升高可提示病理性妊娠高风险。

3 孕妇外周血中 cffDNA 在无创单基因病中的应用

单基因遗传病是由一对等位基因控制的遗传性疾病。基于 cffDNA 的无创产前研究至今分为3个阶段:①第一阶段,检测父源性致病位点;②第二阶段,检测父源性遗传序列中杂合度高的 STR 位点或者 SNP,不仅解决了由 cffDNA 含量过低造成假阴性的问题,同时也扩大了检测范围,即使夫妻双方拥有相同的突变位点,也可通过其他 SNP 位点排除胎儿的纯合突变;③第三阶段的检测利用数字 PCR、高通量测序等高敏感性及准确性的检测平台,可检测母源性致病位点,结合单倍型构建,准确推断胎儿基因型。迄今,已有软骨发育不良、阿佩尔综合征、Huntington 舞蹈病、囊性纤维化、地中海贫血等单基因病研究报道^[9-13]。

4 孕妇外周血中 cffDNA 在胎儿染色体异常中的应用

4.1 孕妇外周血中 cffDNA 在胎儿染色体数目异常中的应用 临床上使用的无创诊断胎儿 21-三体综合征的方法原理是利用高敏感性检测方法区别孕有非整倍体胎儿与孕有正常胎儿的孕妇外周血中致病染色体数目中微小差异^[14]。2008年^[15]首次将高通量测序技术应用于胎儿 21 体综合征的无创检测中,计数 cffDNA 中所有染色体序列,并将其与人类基因组序列对比,根据同一条染色体上多个序列计数来判断靶染色体数目异常。其优点在于不会受限

于检测胎儿特异性序列,或母胎差异性位点,通过检测孕妇血浆中 cffDNA 的所有序列读数,经过比对孕有正常胎儿孕妇外周血中相应染色体的序列读数,最终统计分析得出结论。此为胎儿染色体非整倍体检测奠定基础。

自 2011 年开始,利用高通量测序平台检测胎儿 21、18、13 染色体非整倍体的方法已广泛应用于临床,包括北美、欧洲以及亚洲,灵敏度及特异性均高于 99%,但是检测准确性与胎儿 DNA 占母血总 DNA 的浓度有关,小于 4% 无法检出结果。有报道指出,迄今为止,全世界超过 60 个国家已采用此项技术完成 75 万例以上的检测^[16]。

特纳综合征(45,XO)、克氏综合征(47,XXY)和 XYY 综合征是常见的性染色体非整倍性,由于 X 染色体 GC 含量造成偏移、性染色体之间的高度同源性、Y 染色体含有较多的回文结构、Y 染色体长度变异及胎儿染色体存在嵌合可能等加大了无创产前诊断胎儿性染色体非整倍体分析的难度。经过多位研究者的研究,利用 cffDNA 检测胎儿性染色体非整倍体可达到 96.2% 灵敏度(95% 置信区间 78.4~99.8),假阳性率 0.3%(95% 置信区间 0~1.8)^[17]。

双胎妊娠进行胎儿非整倍体鉴定的关键在于双胎合子类型的确定以及单个胎儿 cffDNA 在母血中的含量测定。单卵双胎的两个胎儿染色体核型完全相同,各胎儿 cffDNA 在母血中的比例相对恒定,可作为单胎妊娠检测。双卵双胎需要对每个胎儿在母血中 cffDNA 浓度进行精确测定,而双胎妊娠中各胎儿 cffDNA 含量变异较大^[18]。Canick 等^[19]已知双胎合子类型,并假定每个胎儿在母血中 cffDNA 含量均等的前提下,检测了 25 例样本,检出 7 例 21-三体胎儿,1 例 13-三体胎儿,以及 17 例正常胎儿,检出率 100%(置信区间 59%~100%),假阳性率 0(95 置信区间 10%~19.5%)。

4.2 孕妇外周血中 cffDNA 在胎儿染色体微重复微缺失异常中的应用 除了非整倍体,染色体结构异常也是导致先天畸形、发育迟缓等的重要原因。近年来,随着 CMA 技术的发展,产后 CMA 技术的应用已证实存在出生缺陷、生长发育迟缓、智力低下儿的遗传学中拥有至关重要的作用,2009 年开始,美国妇产

科协会、欧洲细胞遗传协会等先后发表了指南,指出产前胎儿超声结构畸形或MRI异常时,CMA常是进行CMA检查的适应证,因此,当无创胎儿21、18、13-三体综合的产前筛查在临床上取得成功后,将应用范围拓展至染色体微重复微缺失综合征的诊断成为研究主要方向,而近年来,已有利用高通量测序检测cffDNA诊断胎儿染色体微重复微缺失的病例报道,但尚无无创方法发现胎儿染色体嵌合的报道。

2011年,《新英格兰杂志》首次报道了一例通过高通量测序检出胎儿22号染色体上4.2Mb的缺失案例,该孕妇于孕35周采血,胎儿DNA占母血中总DNA的5.7%^[20]。

Jensen^[21]选择22号染色体上 $3 \times 106\text{bp}$ 作为靶序列,对孕19~20周的高危胎儿以及正常胎儿的母血进行靶序列测序分析,鉴定两个胎儿21号染色体上3.0Mb缺失,但实验要求cffDNA占母血中总DNA的10%以上,检测深度4倍。

Yu等^[22]利用二代测序平台,检测出6例致病CNVs 3Mb病例,证实通过高通量测序检测cffDNA可检测胎儿染色体微缺失微重复综合征,并提高测序深度,可以检测低至1Mb左右胎儿染色体拷贝数变异,并发现一例母体自身携带染色体微重复片段,而胎儿染色体正常的病例,因母体携带染色体异常测序得出的Z值远大于胎儿异常的Z值,但是要达到95%检测敏感性,每例样本需读取240Mb读数。

Srinivasan等^[23]随后研究11位孕有异常核型胎儿的孕妇,提高测序深度达200Mb reads,证实高通量测序平台可检测出所有的20-三体综合征以及微重复微缺失,不适用于嵌合体核型检测,在易位标本中,可通过断裂点附近的小片段缺失来判断断裂位置,无法提示平衡易位,并且通过提高测序深度,最高可达100kb分辨率,发现了诸多在孕中期染色体核型分析不能发现的微小病变。以上研究也要求较高的测序深度及较高的胎儿DNA浓度。

Chen^[24]结合既往研究采取的动态阈值、二次元分割算法以及GC偏倚纠正方法,开发了低覆盖率(0.08倍)测序母体外周血DNA检测大于10Mb的胎儿染色体微缺失微重复的方法,检测1311例样本,检出4例致病片段,大小为9.01~28.46Mb之间,检测

敏感性100%,特异性99.92%,假阴性率0%。

Rampa^[25]设计了一种新的Hidden Markov模型,将SNP位点等位基因不平衡性、父母基因型相近的SNP位点信息和测序的深度要求有机统一起来,检测硅片中模拟cffDNA浓度分数13%的母体外周血模型,发现可检出90%致病片段大于4.4Mb的样本,检出40%致病片段在50~400Kb的染色体异常,目前暂无进一步临床验证研究。

Yin^[26]团队利用半导体测序技术,对cffDNA进行全基因组测序。检测出1476例超声异常胎儿的孕母外周血,在不用测序深度及不同cffDNA在母血浆中浓度比例的情况下,评估高通量测序检测胎儿染色体微重复微缺失综合征的临床应用价值,发现检出率与cffDNA在母血浆中的浓度比例及测序深度正相关,在3.5M reads时,可检出71.8%的染色体片段异常,检测5Mb以上片段的灵敏度98.15%,特异度97.84%,假阳性率2.16%,假阴性率1.85%。提供检测深度至10M reads,检测1Mb以上染色体片段,灵敏度可至97.08%,特异度98.6%,假阳性率1.99%,假阴性率2.92%;并在检测中发现55例假阳性,考虑其中53%与孕妇被染色体片段重复及缺失相关,其余病例原因不明。

5 未来与展望

发现cffDNA至今已近20年,经多年的研究实践,现已成功应用于临床,即无创胎儿21、18、13-三体综合征的产前筛查,有效地降低了不必要的介入性产前诊断。目前部分国家,胎儿性染色体异常以及双胎妊娠胎儿染色体异常的无创检测方法也逐步走向临床。经研究提示,利用高通量测序技术检测孕妇血浆中cffDNA诊断胎儿染色体微重复微缺失综合征是可行的,但由于cffDNA在母血中浓度较低、测序深度等造成的成本过高以及较高的阳性率,至今该无创技术仍处于研究中,相信随着生物信息学的进一步发展以及对测序成本逐渐降低,在不久的将来,这项技术也将应用于临床。

参考文献

[1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal

- DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [2] Lo YM. Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma[J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(3):293-296.
- [3] Zeybek YG, Günel T, Benian A, et al. Clinical evaluations of cell-free fetal DNA quantities in pre-eclamptic pregnancies[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2013, 39(3):632-640.
- [4] Al Nakib M, Egrave D, Re R, et al. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2009, 26(1):24-28.
- [5] Illanes S, Parra M, Serra R, et al. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction[J]. *Prenat Diagn*, 2009, 29(12):1118-1122.
- [6] Samuel A, Bonanno C, Oliphant A, et al. Fraction of cell-free fetal DNA in the maternal serum as a predictor of abnormal placental invasion-a pilot study[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(11):1050-1053.
- [7] Jakobsen TR, Clausen FB, Rode L, et al. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(9):840-845.
- [8] Yi P, Yin N, Zheng Y, et al. Elevated plasma levels of hypermethylated RASSF1A gene sequences in pregnant women with intrahepatic cholestasis[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(3):977-981.
- [9] Au PKC, Kwok YKY, Leung KY, et al. Detection of the S252W mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in fetal DNA from maternal plasma in a pregnancy affected by Apert syndrome[J]. *Prenat Diagn*, 2011, 31(2):218-220.
- [10] Chavez-Saldana M, Garcia-Cavazos R, Viguera RM, et al. Prenatal diagnosis in a cystic fibrosis family: a combined molecular strategy for a precise diagnosis[J]. *Rev Invest Clin*, 2011, 63(4):433-435.
- [11] Pappasava T, van Ijcken WF, Kockx CE, et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to beta-thalassaemia[J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21(12):1403-1410.
- [12] Macher HC, Martinez-Broca MA, Rubio-Calvo A, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2A using COLD-PCR combined with HRM genotyping analysis from maternal serum[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51024.
- [13] Bustamante-Aragones A, Vallespin E, Rodriguez DAM, et al. Early noninvasive prenatal detection of a fetal CRB1 mutation causing Leber congenital amaurosis[J]. *Mol Vis*, 2008, 14: 1388-1394.
- [14] Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(4):401-406.
- [15] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(51):20458-20463.
- [16] Verweij EJ, van den Oever JME, de Boer MA, et al. Diagnostic accuracy of noninvasive detection of fetal trisomy 21 in maternal blood: A systematic review[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31(2):81-86.
- [17] Mazloom AR, Džakula Ž, Oeth P, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(6):591-597.
- [18] Qu JZZ, Leung TY, Jiang P, et al. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(2):427-435.
- [19] Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(7):667-674.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Yu SC, Jiang P, Choy KW, et al. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e60968.
- [23] Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, et al. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(2):167-176.
- [24] Chen S, Lau TK, Zhang C, et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(6):584-590.
- [25] Rampa EKL, Arbabi A, Brudno M. Probabilistic method for detecting copy number variation in a fetal genome using maternal plasma sequencing[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(12):i212-i218.
- [26] Yin A, Peng C, Zhao X, et al. Noninvasive detection of fetal subchromosomal abnormalities by semiconductor sequencing of maternal plasma DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(47):14670-14675.

(收稿日期:2016-11-12)

编辑:宋文颖