

# 产前诊断中 CNV-seq 与核型分析联合应用的意义

郭利丽 丁建林 王少帅\*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 妇产科,湖北 武汉 430000)

**【摘要】 目的** 基于高通量测序的基因拷贝数变异技术与染色体核型分析技术联合应用检测孕妇的羊水细胞,探讨两种检测在产前诊断中联合应用的意义。**方法** 高危孕妇行羊膜腔穿刺术后同时行染色体核型分析及基因组拷贝数变异测序(copy number variation sequencing,CNV-seq),选取结果具有代表性的孕妇为研究对象,对检测结果分析讨论。**结果** 选取的 10 例孕妇中,只有 1 例染色体数目异常的结果两种检测方法相同,核型分析检出 1 例正常、3 例易位、1 例倒位、1 例非同源罗氏易位、1 例额外小标记染色体(small supernumerary marker chromosomes,sSMC)核型,CNV-seq 检出 2 例正常核型、2 例致病性、5 例意义不明确性微缺失/重复改变。**结论** 染色体核型分析在产前诊断中地位不可取代,CNV-seq 检测是产前诊断中强有力的补充,两项检测联合应用可以互补不足相互验证,提高产前诊断率。同时 CNV-seq 中非明确致病性缺失/重复的检测结果为产前遗传咨询提出了新的挑战,需要更多的基于人群的大数据和病例的积累才能更好地遗传咨询。

**【关键词】** 基因组拷贝数变异测序; 产前诊断; 羊水细胞; 染色体核型分析; 意义不明确改变

**【中图分类号】** R394.3 **【文献标识码】** A

## Efficacy of copy-number variation sequencing technology joint application with karyotyping in the prenatal diagnosis

Guo Lili, Ding Jianlin, Wang Shaoshuai\*

Laboratory of Prenatal Diagnosis, Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

\* Corresponding author; Wang Shaoshuai, E-mail: colombo2008@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the efficacy of copy number variation sequencing (CNV-seq) versus karyotyping in the prenatal diagnosis by joint application of high-throughput sequencing based on copy number variation with karyotyping to detect the amniotic fluid cells in pregnant women. **Methods** Among the highrisk pregnant women who underwent karyotyping and CNV-seq after amniocentesis, we selected the representative results as the study subjects, Analyzed and discussed their test results. **Results** among the selected 10 cases, only 1 case had the same result of the two testing technique. Karyotyping detected 1 normal karyotype, 3 case translocation, 1case inversion, 1 case non-homologous Robertsonian translocation, 1 case small supernumerary marker chromosomes(sSMC); CNV-seq detected 2 normal karyotype, 2 cases pathogenic microdeletion or/and duplication and 5 cases variant of unknown significance duplication or/and deletion. **Conclusion** Karyotyping still plays an irreplaceable role in prenatal diagnosis of amniocentesis and CNV-seq can be a powerful supplement for prenatal diagnosis. The combination of

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.04.006

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1000405, 2018YFC1002903)

\* 通信作者:王少帅,E-mail:colombo2008@sina.com

karyotyping and CNV-seq can complement each other and mutual confirmation. Otherwise genetic testing is now facing new challenges due to results with VOUS. In order to have a better explanation for VOUS, More cases and population-based data should be accumulated.

**【Key words】** Copy number variation sequencing; Prenatal diagnosis; Amniotic fluid cells; Karyotype analysis; Variant of unknown significance

随着我国经济技术的发展,人们受教育水平的提高,大家对优生优育的概念日益重视。目前因病毒感染、药物使用不当、营养不良等因素导致的胎儿发育异常比例下降,而遗传因素引起的出生缺陷检出率升高<sup>[1]</sup>。其中染色体病是导致出生缺陷最常见原因之一,几乎占据了1岁之前确诊的先天性异常患儿的15%<sup>[2]</sup>,且常为致愚、致残、致死性,难以治疗、预后差,给家庭和社会造成极大的负担,严重影响人口素质。因此,染色体异常疾病的预防和早期诊断具有重要的意义。

在产前环境中,染色体异常表现形式多种多样,从多倍体到全染色体的非整倍体,再到只能用基于DNA拷贝数方法检测的微重复微缺失。传统经典的染色体G显带技术只能稳定区分大于10M的缺失和重复以及大片段的结构重排。而基于高通量测序方法的染色体拷贝数变异检测(copy number variation sequencing, CNV-seq)虽然分辨率是G显带技术的100倍,但只能检测总体染色体数目的改变而不能检测结构的重排,所以在产前诊断中两种方法相结合是否可以提高异常染色体的检出率有待探讨。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究选取了2019年1~9月在华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科因具有产前诊断指征而行羊膜腔穿刺术的10例孕妇,年龄23~40岁,孕18~30<sup>+</sup>周,所有参与者均签署知情同意书。

1.2 研究方法 孕妇在传染病4项、凝血常规、心电图、血常规等检查结果无异常后,签署知情同意书,B型超声辅助行羊膜腔穿刺术。无菌条件下取羊水约30ml,均分在3份无菌管中,其中2份羊水分别放在2个独立的细胞培养箱中培养,行传统的

羊水细胞染色体核型分析技术,1份行CNV-seq检查。培养的羊水细胞视生长状况一般于10~14d后收获,常规制片G显带,核型计数30个细胞,分析3~5个以上分裂象,根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN)(2016)》描述染色体异常核型。

## 2 结果

本研究从2019年1~9月在华中科技大学同济医学院附属同济医院产前诊断中心行羊膜腔穿刺术的人群中选取了10例结果具有代表性的病例进行分析。其检测结果和孕妇信息如表1所示。9例羊膜腔穿刺后同时行羊水核型分析和CNV-seq,只有1例孕妇其两种不同检测方法的结果相同,其余8例均不同。例9因孕30<sup>+</sup>周,错过羊水细胞培养的最佳时间又因脐血不宜获取而只行羊水CNV-seq检测。

## 3 讨论

3.1 染色体核型分析与CNV-seq联合应用可相互验证胎儿染色体的数目异常 染色体数目异常是产前诊断中最为常见的胎儿染色体异常,可引起严重的出生缺陷,而有些染色体的数目异常并不会引起胎儿的结构异常,所以必须经过羊膜腔穿刺术后行染色体检查才能被确诊。例10可以证明无论是需要进行羊水细胞培养后制片显带的染色体核型分析技术,还是不需要培养直接提取羊水中胎儿DNA进行测序的CNV-seq技术,都可以准确地检测胎儿染色体的非整倍体异常。在产前诊断这个特殊环境中,同时使用两种原理方法不同的检测技术可以相互验证其结果的准确性,若出现结果不相符可以及时行第三种检测方法进行验证以最大限度地降低缺陷儿的出生,减少漏诊误诊。

3.2 染色体核型分析与CNV-seq联合应用可明确胎儿染色体大片段重排的类型及意义 染色体核型

表 1 染色体核型分析与 CNV-seq 两种检测技术的结果比较分析

病例	年龄(岁)	产前诊断指征	核型结果	CNV-seq 结果	结果说明
1	38	高龄;女方核型: 46,XX,t(2;3)(q21;q26)	46,XN,t(2;3)(q21;q26)	46,XN	平衡易位,正常
2	40	NIPT 示 del(10) (q23.1q23.31)	46,XN,t(6;8)(p25;q12)t (10;11)(q21;p15)	seq[hg19]del(10)(q23.1q23.31); seq[hg19]dup(16)(p13.11)	10q23.1q23.31 缺失 5.78Mb 为意义不明确;16p13.11 处重复 1.26Mb 为意义不明确
3	39	高龄	46,XN,t(7;20)(q21;q13)	seq[hg19]dup(15)(q13.3)	15q13.3 重复 0.44Mb 为多态性
4	36	高龄	45,XN,rob(14;21)(q10;q10)	46,XN	非同源罗氏平衡易位,正常
5	29	鼻骨未显示	46,XN,inv(9)(p12q13)	seq[hg19]dup(18)(p11.23)	18p11.23 重复 0.4Mb 为多态性
6	37	NIPT 示 dup(15)	47,XY,+mar	seq[hg19]dup(15)(q11.2q13.2); seq[hg19]dup(15)(q13.2q13.3); seq[hg19]dup(2)(p25.3); seq[hg19]dup(18)(p11.23)	15q11.2q13.2 重复 7.86Mb 为致病性;15q13.2q13.3 重复 2.08Mb 为致病性;2p25.3 重复 0.36Mb 为多态性;18p11.23 重复 0.34Mb 为多态性
7	32	NIPT 示 dup(4)	46,XN	seq[hg19]dup(4)(q12)	4q12 重复 2.72Mb 为可疑致病性
8	28	NIPT 示 dup(9)	46,XN,dup(9)(q31q34)	seq[hg19]dup(9)(q31.2q34.11);	9 重复 21.26Mb 为可疑致病性
9	23	羊水多;双肾有回声	/	seq[hg19]del(17)(q12)	17q12 缺失 1.38Mb 为致病性
10	30	18-三体高风险	48,XXY,+18	48,XXY,+18	克氏综合征和爱德华综合征为致病性

分析可以检测染色体的倒位、易位及罗伯逊易位的类型。最新研究表明染色体相互易位和罗氏易位在产前诊断样本中占比约 1.82% 和 0.89%<sup>[3]</sup>,若胎儿易位或倒位遗传自双亲之一(病例 1),并不涉及遗传物质的丢失或增加,则不影响胎儿的表型和智力发育<sup>[4]</sup>,只与未来的生殖咨询相关,孕妇可继续妊娠。而在产前诊断样本中新发染色体平衡重排发生率约 0.09%<sup>[5]</sup>,这种新发的明显的平衡重排与 6.7% 的先天性异常相关<sup>[6]</sup>。这可能在发生重排的同时发生了其他拷贝数变异(copy number variation,CNV),需要通过更高分辨率的检测方法进一步确认。如本研究中的病例 2,其核型分析结果为 46,XX,t(6;8)(p25;q12),t(10;11)(q21;p15),为明显的平衡易位。CNV 检测显示 10q23.1-23.31 缺失 5.78Mb,该缺失覆盖了 10q22.3-q23.2 缺失综合征(OMIM#612242)约 79% 的区域;16 号染色体 p13.11 处重复 1.26Mb,覆盖了 16p13.11 复发性微重复(是神经认知紊乱敏感位点)综合征约 84% 的区域,为一种非明确致病性改变,即易位的同时发生了 G 显带无法识别的 CNV。病例 3、病例 4 和病例 5 虽为新发易位或倒位,但经 CNV-seq 检测,在染色体重排的同时并无致病性遗传物质的增多或减少。因此,相互易位或倒位的胎儿携带者需联合 CNV-seq 检测确定染色体在发生重排的同时总体遗传物质是否发生了改变,以提高诊断的精准

度,减少漏诊误诊。

遗传物质不发生改变的还有罗伯逊易位,根据易位染色体的种类分为同源性和非同源性,罗伯逊易位由于短臂小、遗传基因较少,遗传效应不明显,这种患者与平衡易位携带者相似,不影响胎儿的表型和智力发育。而同源罗伯逊易位患者虽表型和智力发育正常但生育下一代时与正常配子结合后,理论上只能形成单体或三体型合子,不能生育正常的孩子<sup>[7]</sup>,所以当核型分析确定胎儿为同源罗伯逊易位时,即使 CNV-seq 检测无总体遗传物质的改变,遗传咨询时也应如实告知孕妇胎儿以后可能面临的生育问题,让其慎重考虑。

3.3 染色体核型分析与 CNV-seq 联合应用可明确胎儿额外小标记染色体的性质 产前诊断中额外小标记染色体(small supernumerary marker chromosome,sSMC)的发生率为 0.77%,其中超声检查异常胎儿者发生率增高到 2.04%<sup>[8]</sup>,sSMC 是否有表型效应与其来源、基因组含量、家族遗传性、是否嵌合等因素有关。染色体核型分析可以直观的看到 sSMC 的形态结构及位置,如本研究中的病例 6,染色体核型分析结果为 47,XY,+mar。除了有正常的 46 条染色体外,还发现 1 个额外小标记染色体,但不能确定其来源及是否致病。而 CNV-seq 检测提示 15q11.2q13.2 重复 7.86Mb 及 15q13.2q13.3 重复 2.08Mb,数据库信息显示该区域包括了 15q11-

q13 重复综合征(OMIM # 608636)以及 *UBE3A* 基因(OMIM # 601623)的全部,为一种致病性变异。通过 CNV 检测可以得知核型分析中检测到的 sSMC 应该为 15 号染色体长臂的一部分。结合两项检测结果,不仅明确了核型分析中 sSMC 的大小、来源、具体区域范围,根据数据库信息预测了胎儿的临床表型,还确定了 CNV-seq 检测到的 15q11-q13 重复片段的形态构象,让检测结果更直观明了,方便患者理解。

3.4 CNV-seq 检测可额外诊断微缺失/微重复综合征 基于高通量测序的染色体拷贝数变异可以检测 >100kb 以上的微重复微缺失,随着无创产前筛查技术(non-invasion prenatal test, NIPT)的开展和普及,越来越多的孕妇因 NIPT 中小片段的重复或缺失需要行羊膜腔穿刺术在产前做确诊。如病例 7,NIPT 提示 dup(4)重复需做确诊。传统核型分析的低分辨率已不能满足此类患者的需求,此时求助于高分辨率的 CNV-seq 检测,核型结果显示正常,CNV-seq 检测显示 4q12 重复 2.72Mb,该区域包括 *TMEM165* 基因(OMIM # 614726)的全部,其突变与先天性糖基化障碍 2k 型(carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 2k,CDG2K)(OMIM # 614727)疾病相关,经数据库查询未发现该基因重复导致 CDG2K 的病例报道,所以该重复为意义不明确性(variants of unknown significance, VOUS)变异。病例 8 核型分析发现 9 号增加了一个未知来源片段,经 CNV-seq 检测证明此片段来自 9 号染色体的 q31.2q34.11,查询数据库发现有 1 例 9q33.3 重复患者表征为整体发育迟缓、特殊面容等,其父亲携带此重复片段,并无明显临床表征。病例 9 孕 30 周因 B 超显示羊水多,双肾有回声行羊膜腔穿刺术,CNV-seq 结果显示 17q12 缺失 1.38Mb,覆盖了肾囊肿和糖尿病综合征(renal cysts and diabetes syndmme,RCAD)约 98%的区域,并包含了该综合征的关键基因 *HNF1B*,主要累及肾脏功能,表现为肾发育不良、肾集合系统畸形等,是一种致病性缺失。此结果显示的症状与孕妇的 B 超结果高度吻合。

以上这些异常均属于因染色体失衡引起的微缺失/微重复综合征(microdeletion/microduplication

syndromes, MMS),是一组重要的染色体疾病,占有新生儿先天性畸形的 1%~2%。在产前诊断中如果仅进行染色体核型分析,就会造成 MMS 的漏诊。所以,在产前环境中行 CNV-seq 不仅可以解决 NIPT 中微小片段的产前诊断还可以有效避免染色体失衡引起的 MMS 遗漏,有效提高产前诊断率。

3.5 CNV-seq 检测 VOUS 结果的解读对产前咨询提出了新的挑战 核型分析检测到的染色体不平衡因涉及的片段大,改变的基因多,所以经常表现为完全显性,如果正常的父母中也有相同发现则可预测为良性改变,对胎儿影响不大。然而,CNV-seq 可以检测亚微观的不平衡,基于正常人群的研究表明正是人类染色体 DNA 序列的持续不断改变,人类才得以进化和适应新的环境<sup>[9]</sup>,所以 CNV 并不总是可以引起异常表型,有些 CNV 是正常的,而有些可能为不完全显性和(或)可变性表达,或在特定的遗传变异体中表型才会体现,所以 CNV-seq 检测结果会出现 VOUS。因 VOUS 是人群中不常见的基因改变,所以有很少甚至没有临床证据可利用去评估他们的致病性,这就使得遗传咨询中解释 VOUS 的 CNV 面临新的挑战。遗传咨询者可以利用公共数据库和每年新报道病例帮助患者确定 CNV 的性质。一般而言,CNV 遗传自表型正常的父母其临床相关性降低;然而,外显不全和(或)可变性表达的 CNV,因病人的临床表型各不相同,无法预测产后结局,尤其是涉及神经发育紊乱方面更是无法预估<sup>[10]</sup>。基于此,遗传咨询者在产前诊断前应和孕妇做好沟通,将所有可能情况告知患者,由患者知情决定。

虽然 CNV-seq 检测为遗传咨询提出挑战,但其优势还是显而易见的,在产前环境中该技术已经成为备受关注的标准,比传统的核型分析提高约 5% 的检出率<sup>[11]</sup>。一项对从事产前遗传咨询者的横向研究表明,95% 的遗传咨询者会将 CNV 应用到产前诊断中,71% 的会介绍给所有需要进行羊水穿刺的孕妇<sup>[12]</sup>。美国妇产科协会(The American Congress of Obstetrics and Gynecology, ACOG)和母胎医学学会(Society for Maternal-Fetal Medicine, SMFM)推荐在产前诊断中超声检查胎儿有重要结构异常时执行高通量测序方法<sup>[13]</sup>。但在

结构正常的胎儿中也有将近 1.7% 的致病性 CNV 被报道<sup>[11]</sup>。因此,一些官方提倡在所有侵入性产前诊断中应用高通量测序方法<sup>[14,15]</sup>。最近 ACOG 和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)资助的临床基因组资源中心(ClinGen)联合发布了《原发性拷贝数变异解读与报告技术标准》,CNV 将使用明确的打分制度,根据不同致病性的证据进行分数的加减<sup>[16]</sup>,这为产前及遗传病检测领域 CNV 报告的解读提供了指导和参考。

#### 4 总结

产前诊断是降低出生缺陷的主要途径,而出生缺陷原因复杂多样,产前环境又较为特殊,需要在有限的时间内给出有效的诊断,对于遗传病因不明确的异常表型,最好结合使用多种技术。通过分析本研究中的病例可以知道隶属于细胞遗传学的染色体核型分析技术和归于分子诊断学的 CNV-seq 技术在染色体疾病检测方面各有利弊,两种方法联合使用既能相互验证检出的异常核型,又能互相补充不同种类的异常核型,联合应用可以有效提高产前诊断的异常核型的检出率,对减少遗传缺陷患儿的出生具有重大的社会效益。CNV-seq 结果的解读为遗传咨询提出了挑战,随着行业标准的出台,CNVs 报告的解读有了更多的指导和参考,随着人群大数据的建立和病例的不断积累,相信产前诊断技术和咨询会发展更好。

#### 参考文献

[1] 严恺,金帆. 出生缺陷相关遗传病产前诊断技术新进展[J]. 浙江大学学报(医学版),2017,46(3): 227-232.

[2] ZEITLIN J, MOHANGOO A, CUTTINI M, et al. The European perinatal health report: comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe[J]. J Epidemiol Community Health, 2009,63:681-682.

[3] 代鹏,孔祥东. 355 例产前胎儿羊水细胞易位染色体核型分析及遗传咨询[J]. 中国优生与遗传杂志,2019,27(5):560-563.

[4] KAIHUI Z, YAN H, RUI D, et al. Familial intellectual disability as a result of a derivative chromosome 22 originating from a balanced translocation(3; 22) in a four generation family[J]. Mol Cytogenet, 2018,11:18.

[5] GIARDINO D, CORTI C, BALLARTI L, et al. De novo

balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2009, 29(3):257-265.

[6] WARBURTON D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(5):995-1013.

[7] 滕义建, 顾茂胜, 王传霞. 徐州地区染色体罗伯逊易位携带者产前诊断的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(8): 53-54.

[8] 潘虹. 额外小标记染色体的特点、产前诊断和遗传咨询[J]. 中华围产医学杂志, 2012, 10(15): 588-591.

[9] IAFRATE AJ, FEUK L, RIVERA MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome[J]. Nat Genet, 2004,36(9):949 - 951.

[10] WERNER-LIN A, MCCOYD JLM, BERNHARDT BA. Balancing genetics (science) and counseling (art) in prenatal chromosomal microarray testing[J]. J Genet Couns, 2016,25 (5):855-867.

[11] SARA BH, TRILOCHAN SAHOO, MARY KT, et al. ACOG and SMFM Guidelines for Prenatal Diagnosis: Is Karyotyping Really Sufficient? [J]. Prenat Diagn, 2018, 38 (3):184-189.

[12] DURHAM L, PAPANNA R, STEVENS B, et al. The utilization of prenatal Microarray: A survey of Current genetic counseling practices and barriers[J]. Prenat Diagn, 2019, 39(5):351-360.

[13] American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis [J]. Obstet Gynecol, 2013,122(6):1374-1377.

[14] Miny P, Wenzel F, Terzanli S, et al. Chromosomal microarrays in prenatal diagnosis: time for a change of policy? [J]. Microarrays, 2013,2(4):304-317

[15] EVANS MI, ANDRIOLE S, EVANS SM. Genetics: update on prenatal screening and diagnosis[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015,42(2):193-208.

[16] RIGGS ER, ANDERSEN EF, CHERRY AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)[J]. Genet Med, 2020,22(2):245-257.

(收稿日期:2020-01-16)

编辑:宋文颖