

# 无创性产前诊断:从梦想到现实

刘子建 梁德杨

(香港中文大学妇产科部威尔斯亲王医院)

无创性产前诊断(non-invasive prenatal diagnosis, NIPD)是一个长期追求的目标。几十年来,研究人员一直在努力寻找有效方法,去分离、纯化,并识别存在于母体循环中的少量胎儿细胞,胎儿细胞浓度约为每毫升母血中 1~6 个<sup>[1]</sup>。虽然不时有报告称成功的分子诊断方法已经出现,2774 名参与者的的大样本研究表明,在 41.4% 的孕有非 21-三体综合征男性胎儿的妇女样本中至少能检测到一个胎儿细胞,其假阳性率估计在 0.6%~4.1%<sup>[2]</sup>。但这样的结果还远不能被接受的,这种 NIPD 方法被认为是毫无前途可言的<sup>[3]</sup>。

然而,在过去十年中,对游离细胞胎儿脱氧核糖核酸(cell-free fetal deoxyribonucleic acid, cffDNA)的研究使笔者对 NIPD 的理解发生了革命性的变化。12 年前由罗等人首先报道了产妇的血循环中有 cffDNA 的存在,他们使用了一个怀有男性胎儿的孕妇血浆和血清,用简单的常规聚合酶链反应(PCR)方法令人信服地证明了 Y 染色体 DNA 序列的存在<sup>[4]</sup>。最近,存在于孕妇血浆中的胎儿核糖核酸(RNA)也已经被发现<sup>[5]</sup>。这些突破为 NIPD 以及无创性的产前胎儿生理及病理生理学监测开辟了新的可能。因此,笔者将总结在这激动人心的医学领域中的最新发展,并探讨 NIPD 在何种程度上可被实现。

## 1 孕妇血浆中 cffDNA 的生理

使用实时 PCR 系统发现,在早期到中期妊娠的孕妇血浆中 cffDNA 占有游离细胞 DNA 的 3.4%,随着妊娠的发展这一比例最终上升至 6.2%<sup>[6]</sup>。在早孕期甚至早在妊娠第五周,就可以在孕妇血浆中可靠地检测出游离细胞胎儿 DNA<sup>[7]</sup>。游离细胞胎儿 DNA 的平均半衰期为 16.3 分钟,在产

妇血循环中很快被清除,在分娩一天后的产妇血清中就检测不到了<sup>[8]</sup>。与胎儿细胞不同, cffDNA 在分娩后不会持续存在于母体血循环中,这是非常重要的产前诊断的观点。

在早产、子痫前期、胎盘粘连曾行体外胎儿倒转术的孕妇中可检测到异常高水平的 cffDNA<sup>[9~11]</sup>。虽然这些观察报告表明, cffDNA 定量分析可能有助于预测或早期发现产科并发症,但是,仍然缺乏直接证据证明这一方法的临床疗效。另外,由于 Y 染色体源性序列被用作男性胎儿的标记,意味着这种临床方法可能限于怀有男性胎儿的妊娠。

最近的研究发现了胎儿和母体 DNA 间本质上的差异。胎儿 DNA 短于母体 DNA,并具有不同的甲基化模式<sup>[12,13]</sup>。这些差异非常显著,足以从产妇 DNA 中净化或分离出胎儿 DNA。

在孕妇血浆中发现 cffDNA 后不久,又报道了胎儿源性的 RNA<sup>[14]</sup>。这些 mRNAs 或信使 RNAs 令人惊讶地稳定存在于孕妇血浆中并在分娩后被迅速的清除<sup>[15]</sup>,表明这些循环的 mRNA 分子可以提供实用的标记供临床使用。对数以千计的 mRNA 的表达研究以基因芯片系统为基础,这种无创性的胎儿基因表达监测为研究正常及异常妊娠提供了一种独特的方法<sup>[16]</sup>。例如,识别和监测与胎儿生长发育相关的基因,以便及早发现胎儿生长发育方面的问题<sup>[17]</sup>。

## 2 产前胎儿性别鉴定

许多研究报告使用 cffDNA 来确定胎儿性别,因为比从怀有男性胎儿的孕妇血浆中检测 Y 染色体序列相对容易,而母体血浆中原本并不存在 Y 染色体序列。对于那些具有性连锁疾病危险的人, NIPD 胎儿性别鉴定可以减少 50% 的有创性检查。

胎儿性别鉴定是非常准确的,在早期、中期和晚期妊娠的准确性分别为99.4%、97.8%和100%<sup>[18]</sup>。

### 3 产前恒河猴基因型

使用cffDNA的NIPD的第一次胜利是恒河猴基因型,这种基因型可用于检测Rh阴性孕妇所怀胎儿的并发症。无RHD基因的恒河猴D类(RhD)阴性的孕妇血浆或血清中出现胎儿源性的RHD基因序列,表明一个RhD阳性胎儿的存在<sup>[19]</sup>。这种情况类似于:孕妇血浆中检测到Y染色体特异序列,表明胎儿是男性。由于其精确度高,自2001年以来,国际血型参比实验室在英国的布里斯托尔,通过在孕妇血浆中使用cffDNA来提供胎儿RhD分型<sup>[20]</sup>。目前在许多国家这种方法是首选的,而不是通过有创性检查得到胎儿组织后对其基因表现型进行检测。最近对包括44个草案37个研究的一项荟萃分析表明,整体测试的敏感性和特异性分别为95.4%和98.6%<sup>[21]</sup>。然而,其中的16个研究取得了100%的诊断准确率,表明诊断的准确性可能受到血液样本处理和分子研究的协议的严重影响。

### 4 单基因疾病的产前诊断

对于病理状况下继承了父母源性基因的单基因疾病,如父亲是携带者的常染色体显性遗传性疾病,无创性产前诊断可能相对简单点。在这种情况下,从孕妇血浆中检测到致病基因序列将预示胎儿受影响。相反,对单基因疾病包括遗传自母亲的致病基因,NIPD曾经被认为是不可能的,因为无法区分孕妇血浆中致病信号来源于胎儿还是产妇。

万一夫妻携带有不同的基因突变并且孕妇血清中无法检测到父亲的突变时,一个简单的办法是排除常染色体隐性的可能性。当已检测到父亲的突变时,有创性产前诊断对于确定是否胎儿也遗传了母亲的基因突变有预示作用,这将决定胎儿是否受到影响。这个简单的排除方法将消除约50%的不必要的有创性产前诊断,并已在地中海贫血及类似情况的NIPD中有报告<sup>[22-24]</sup>。几项检验NIPD方法精确性的大规模研究正在进行中。

### 5 染色体异常的产前诊断

对产前诊断而言,胎儿染色体非整倍性最常见。在这种情况下的诊断,需要对感兴趣的染色体的拷贝数有一个准确的评估。这曾经被认为是一个无法解决的问题,但最近也有了许多突破,使染色体异常的NIPD成为可能。目前有两个主要的技术问题必须克服:第一,增加cffDNA分级浓缩;第二,找到一种可靠的方法估算异常染色体的拷贝数。

已有几种方法被用来增加cffDNA分级浓缩。虽然笔者知道胎儿源性的cffDNA比较短<sup>[12]</sup>,但目前尚不清楚该浓缩方法对于许多染色体异常的NIPD是否适合,这一做法的劳动密集程度也限制了其临床应用的潜力。另一些人试图抑制产妇的DNA,例如加入甲醛,这将使cffDNA的浓度相对提高<sup>[25]</sup>。但是如此可喜的成果并没有被其他人重复做出来<sup>[26]</sup>。

分子方法提供了一个更有前途的提高cffDNA浓度的方法。通过系统性搜查,与产妇基因相比较,就有可能识别出胎儿基因组的许多甲基化区域<sup>[27]</sup>。使用不同的分子技术,现在可以选择性地扩大低甲基化或高甲基化的DNA序列,从而提高了cffDNA浓度<sup>[28,29]</sup>。另一种分子方法是使用RNA。利用芯片为基础对胎盘和产妇细胞间的mRNA表达进行广泛比较,使笔者能够获得一个胎儿特异性mRNA的长清单,其在胎盘组织中高度表达,但在产妇组织中几乎没有或没有表达<sup>[16]</sup>。代替几乎是纯粹的胎儿DNA样本,笔者现在用一个几乎纯粹的胎儿RNA样品进行进一步的NIPD。

利用甲基化或以RNA为基础的技术,笔者已经可以浓缩胎儿核酸样品,但仍需要制定出一种评估有疑问的特定染色体剂量的方法。可在感兴趣的染色体DNA或RNA序列中,利用等位基因比率方法搜索出多态性等位基因。整倍体的多态性标记将有1:1的比率,而那些三倍染色体将有1:2或2:1的比率。这种方法已成功应用于两种测试研究中:一个是基于甲基化的技术对18-三体综合征进行NIPD,一个是基于RNA的方法对21-三体综合征进行NIPD<sup>[30,31]</sup>。在这些早期无创性研究中,怀有

18-三体综合征的胎儿的所有病例被正确的检测出来,而怀有 21-三体综合征胎儿的病例有 90% 被检测出来,其对照组中排除率为 96.5%。一些使用这些方法的大规模临床研究正在进行中,临床使用的测试很快就能实现商品化。

等位基因比率方法的主要缺点是需要有大量的多态性位点。最近有两个独立的研究小组都报告了使用大规模并行基因组测序的新方法,即使在低浓度下也能精确计量 DNA 的拷贝数<sup>[32,33]</sup>。在此方法中,孕妇血浆中的所有 DNA 片段,不论其来源都被测序,并将每个独特序列与相应染色体上的正常人类基因组序列对比以标出他们原来的染色体位置。从特定染色体中可以计算出基因序列所占百分比。21 号染色体构成百分比的差异被成功地用于 14 例 21-三体综合征和 21 例正常者的 NIPD<sup>[32]</sup>。这种新办法对于一个实验中的多发性染色体畸变的 NIPD 似乎有很大的潜力。但是,这种办法仍然非常复杂和昂贵,只有等到常规临床使用时,这些问题才有望解决。

## 6 结论

在过去的十年中,在胎儿染色体和基因方面的 NIPD 有了激动人心的重大发展。非整倍体胎儿是目前有创性产前诊断最常见的适应证,吸引了很多关注并将研究重点放在这一领域。现在有足够的证据来证实染色体异常的 NIPD 是可行的,并且有一个以上的方法可以做到这一点。剩下的惟一挑战是改进技术,并探索一个产科患者负担得起的平台。然而,值得注意的是,由于这一领域发展迅速,在标准化和实验室的质量控制上目前是有困难的。因此,应对提供 NIPD 服务的实验室的绩效进行仔细监测,以确保实现高精度的 NIPD。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61:822-829.
- [ 2 ] Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study[J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22:609-615.
- [ 3 ] Jackson L. Fetal cells and DNA in maternal blood[J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23:837-846.
- [ 4 ] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350:485-487.
- [ 5 ] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2000, 46:1832-1834.
- [ 6 ] 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, 62:768-775.
- [ 7 ] Rijnders RJ, Van Der Loo RB, Peters ED, et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma[J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23:1042-1044.
- [ 8 ] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64:218-224.
- [ 9 ] Leung TN, Zhang J, Lau TK, et al. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour[J]. *Lancet*, 1998, 352:1904.
- [ 10 ] Lau TK, Lo KW, Chan LY, et al. Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183:712-716.
- [ 11 ] Leung TN, Zhang J, Lau TK, et al. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop pre-eclampsia[J]. *Clin Chem*, 2001, 47:137-139.
- [ 12 ] Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2004, 50:88-92.
- [ 13 ] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2002, 48:35-41.
- [ 14 ] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Circulating fetal RNA in maternal plasma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 945:207-210.
- [ 15 ] Ng EK, Tsui NB, Lau TK, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:4748-4753.
- [ 16 ] Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling[J]. *J*

- Med Genet, 2004, 41:461-467.
- [17] Pang WW, Tsui MH, Sahota D, et al. A strategy for identifying circulating placental RNA markers for fetal growth assessment[J]. Prenat Diagn, 2009, 29:495-504.
- [18] Galbiati S, Smid M, Gambini D, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation[J]. Hum Genet, 2005, 117:243-248.
- [19] Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma[J]. N Engl J Med, 1998, 339:1734-1738.
- [20] Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1022:119-123.
- [21] Geifman-Holzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—a meta-analysis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195:1163-1173.
- [22] Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, et al. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study[J]. Clin Chem, 2002, 48:778-780.
- [23] Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma[J]. Lancet, 2002, 360:998-1000.
- [24] 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, 101:10762-10767.
- [25] Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation[J]. JAMA, 2004, 291:1114-1119.
- [26] Chung GTY, Chiu RWK, Chan KCA, et al. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment[J]. Clin Chem, 2005, 51:655-658.
- [27] Chim SS, Jin S, Lee TY, et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21[J]. Clin Chem, 2008, 54:500-511.
- [28] 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, 102:14753-14758.
- [29] Tong YK, Chiu RW, Leung TY, et al. Detection of restriction enzyme-digested target DNA by PCR amplification using a stem-loop primer: application to the detection of hypomethylated fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2007, 53:1906-1914.
- [30] Tong YK, Ding C, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations[J]. Clin Chem, 2006, 52:2194-2202.
- [31] Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection[J]. Nat Med, 2007, 13:218-223.
- [32] 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 USA, 2008, 105:20458-20463.
- [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, 105:16266-16271.

(收稿日期:2009-04-28)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对作者署名的要求

作者姓名在文题下依次排列,在编排过程中不应再做更动;作者单位按照邮政编码、所在省市县、单位全称、具体科室的顺序列于文题下方。作者应是:参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者;起草或修改论文中主要观点或其他主要内容者;能对编辑部的修改意见进行核修,在学术方面进行答辩,并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。作者中有外籍作者应征得本人同意,并附证明信。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部