

无创性产前基因检测胎儿 Turner 综合征 1 例并文献复习

许烨烨¹ 王威² 蒋馥蔓² 丛林^{1*}

(1. 安徽医科大学第一附属医院产前诊断中心, 安徽 合肥 230022;

2. 深圳华大基因研究院, 广东 深圳 518083)

【摘要】 目的 探讨胎儿 Turner 综合征的诊断方法。**方法** 结合超声、大规模基因并行测序技术、染色体核型分析检测胎儿 Turner 综合征。**结果** 测序技术的结果和染色体核型分析相符, 显示胎儿核型为 45,XO, 引产后详细检查胎儿证实超声所见。**结论** 运用母体外周血游离血浆 DNA 采用大规模基因并行测序技术产前检测胎儿染色体数目异常是可行的。

【关键词】 Turner 综合征; 核型分析; 大规模并行测序; 非整倍体

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** B

Non-invasive Prenatal Genetic Diagnosis of A Case of Turner Syndrome and Literature Review

Xu Ye-ye¹, Wang Wei², Jiang Fu-man², Cong Lin^{1*}.

(1. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Prenatal Diagnosis Center, Anhui Hefei 230022, China; 2. Shenzhen BGI Research Institute, Shenzhen 518083, China)

【Abstract】 Objective To discuss the diagnostic methods of fetal Turner syndrome. **Method** A combination of ultrasound findings, massively parallel genomic sequencing technique, chromosomal karyotype analysis to detect fetal Turner syndrome. **Results** sequencing outcome and karyotype analysis come to consistently, showing fetal karyotype 45,XO. Detailed examination of the fetal after induced labor in vitro confirmed ultrasound findings. **Conclusions** Non-invasive prenatal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood is feasible.

【Key words】 Turner syndrome; Karyotype analysis; Massively parallel sequencing; Aneuploidy

Turner 综合征又称先天性卵巢发育不全, 是最常见的性染色体非整倍体疾病, 在新生女婴中的发病率约为 1/2500。该病在活产中核型为 45,XO 约占 55%, 嵌合体约为 15%, 结构重排的染色体约为 25%, Y 染色体存在的为 5%^[1]。Turner 综合征的主要临床表现为身材矮小、原发性闭经、第二性征不发育、性腺发育不良、颈蹼、面容异常(眼睑下垂、后发际低等), 常合并多种骨骼畸形。胎儿 Turner 综合征多在产前经超声检查发现异常, 超声诊断该病的依据为颈后囊性淋巴管瘤、全身水肿及浆膜腔积

液, 但因其缺乏特异性, 加之超声检查尚不能显示胎儿卵巢, 进一步确诊则依赖于细胞遗传学或分子诊断的方法。我们结合超声、染色体核型分析及胎儿羊水染色体核型分析产前诊断 Turner 综合征 1 例, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 孕妇, 28 岁, G1P0, 孕 19⁺₅ 周, 孕 3 月曾感冒, 未服药自愈。夫妻体格发育及智力均无明显异常, 均无畸形阳性家族史。产前诊断超声所见: 胎儿双顶径 34 mm (16⁺₄ 周), 头围 118 mm (15⁺₆ 周), 腹围 120 mm (17⁺₅ 周), 肱骨长 16 mm,

基金项目: 安徽省科技厅科技攻关项目资助(08010302181)

* 通讯作者: 丛林, E-mail: conglin1957@163.com

股骨长 16 mm(14^{+6} 周),胎盘位于子宫前壁,厚 25 mm,成熟度 0 级。胎心率 154 次/分,律齐,脐动脉 2 根,羊水平段 34 mm。头颅光环完整,脑中线居中,脑室未见扩张,小脑横径 9 mm。胎儿上唇线连续,眼鼻存在。脊柱连续完整,胸腹壁连续,心脏显示欠清晰。四肢长骨存在,胃泡、膀胱、双肾存在。胎儿颈部扫及 51 mm×58 mm 液暗区,内见分隔。全身皮下软组织增厚,最厚达 3.6 mm,双侧侧脑室宽 7.4 mm,双侧胸腔扫及少量游离液暗区(图 1)。超声提示:①宫内妊娠,单活胎;②胎儿颈部淋巴水囊瘤;③胎儿全身皮下软组织水肿;④胎儿双侧侧脑室稍增宽;⑤双侧胸腔少量积液。患者及家属要求引产并于产前诊断中心咨询病因,于入院第 3 天行羊膜腔穿刺术取羊水行胎儿染色体核型分析,随后行“羊膜腔内利凡诺注射引产术”。羊膜腔穿刺术前抽取孕妇外周血 5 ml 置 EDTA 抗凝管供母血胎儿 DNA 检测。引产后详细检查胎儿证实超声诊断。

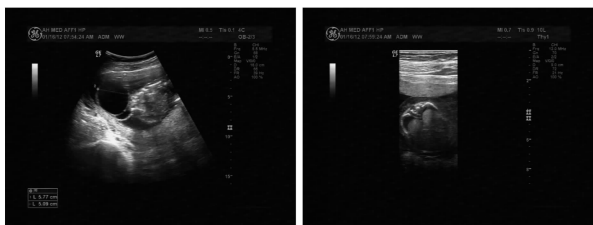


图 1 胎儿颈部见 51 mm×58 mm 液暗区,内见分隔;双侧胸腔少量液性暗区

1.2 实验方法

1.2.1 染色体核型分析 将抽取的羊水以 2000 r/min, 10 min 离心后弃上清,加入培养基(Amino MAX II Complete Medium, GIBCO, 美国)7 ml, 重悬后分装 2 个培养瓶, 10 天后换液, 11 天后收获细胞, 常规方法低渗、预固定、反复固定后滴片染色, 100×油镜下观察。

1.2.2 无创基因检测

1.2.2.1 血浆 DNA 提取 将孕妇外周血 5 ml 在 4℃条件下以 1600 g, 10 min 离心后取上清, 再将上清液以 16 000 g, 10 min 离心后所得上清即为血浆, 使用 QIAGEN 公司提供的 QIAamp DNA Blood Mini Kit 提取血浆游离 DNA, 按说明书操作。

1.2.2.2 大规模基因并行测序 因母体血浆中

DNA 已经是片段化的,故无需进一步的片段化,将提取的游离 DNA 通过新一代 Illumina HiSeq2000 测序仪(深圳华大基因研究院提供)进行大规模基因并行测序,通过测序可以获得约百万条短 DNA 序列读本。

1.2.2.3 生物信息学处理 生物信息学分析软件为有效的大规模核算数据库比对软件(ELAND), 通过此分析软件将所测 DNA 序列和人类参考基因组进行比对,这一比对的目的是确定所测血浆 DNA 片段的染色体来源,然后计数每一染色体来源的序列数量(仅计算能唯一匹配到该条染色体上的序列),计算血浆样本中每一染色体序列数目与总染色体序列数目之和的比率 %chrN, 进一步计算所检测样本的 Z 值(T-score), Z 值指的是偏离于参考数据组均值的多少个标准差,即

$$Z = \frac{\%chrN(\text{检测样本}) - \%chrN(\text{正常参考群体平均值})}{SD(\text{正常参考群体的 } \%chrN \text{ 标准差})}$$

正常孕妇 Z 值的 99% 置信区间为 $[-3, 3]$, 对于孕有非整倍体如 21 三体胎儿的孕妇因血浆中含比正常女性胎儿多的微量 DNA 而显示 Z 值偏高, 以 Z 值大于 3 为分隔值来判断胎儿是否为 21 三体; 而 X 单体因血浆中含比正常女性胎儿少的微量 DNA 而显示 Z 值偏低, 以 Z 值小于 (-3) 为分隔值来判断胎儿是否为 X 单体。

2 结果

2.1 无创基因检测结果 孕妇血浆 DNA 样本经测序后比对及生物信息学分析显示 X 染色体 Z 值 < -3 , 在参考值范围 $[-3, 3]$ 之外, 无 Y 染色体序列, 其余 1~22 号染色体的 Z 值均在 $[-3, 3]$ 区间之内, 提示胎儿 X 染色体偏少, 考虑胎儿核型 45, XO。结果与之后报告的染色体核型分析结果相符, 送检标本至报告时间为 10 天(图 2)。

2.2 染色体核型分析结果 羊水细胞染色体核型为 45, XO[20], 确诊为 Turner 综合征(图 3)。

2.3 引产后检查结果 引产后详细观察, 为一女性死胎, 胎儿大小与妊娠月份相符, 头皮、全身皮肤除手心、脚心外均水肿, 颈后部水肿呈囊状。

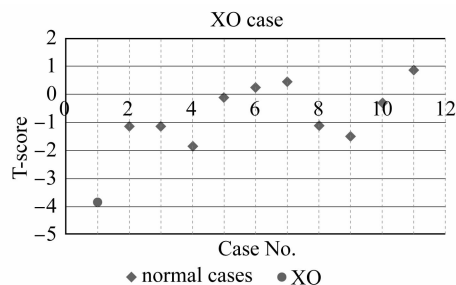


图2 该孕妇及其他10例血浆样本检测的Z值,红色表示该孕妇的结果

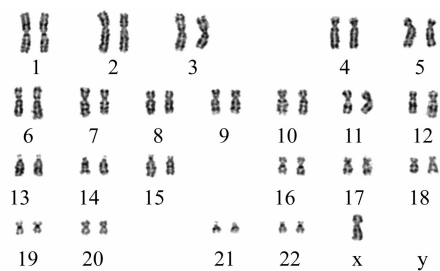


图3 胎儿染色体核型分析结果

3 讨论

胚胎染色体核型为45,XO者占有孕胚的1%~2%,其中99%发生流产,而1%左右能够存活的具体原因尚不明确^[2],Turner综合征是惟一能够存活的染色体单体疾病,可在产前得以诊断进行相关干预。

目前,胎儿染色体非整倍体的检查包括初期筛查评估风险值,对于高风险人群需进一步确诊,胎儿细胞核型分析是产前诊断胎儿染色体异常的金标准,却是以侵入性的方式获取胎儿细胞因而有流产及感染的风险,加之细胞培养周期长,孕妇等待结果的过程心里负担重,无创性产前诊断技术一直是人们美好的愿望。

1997年,孕妇外周血中胎儿游离DNA的发现为无创产前诊断打开了新的篇章^[3]。然而,孕妇外周血中的胎儿游离DNA分子在总游离DNA分子中的比例相对小,仅占3%~6%,分离和检测胎儿游离DNA分子有一定难度。目前研究多集中于两个方面:①表观遗传学方法寻找胎儿特异标记物;②高通量基因测序检测胎儿非整倍体。本文病例我们应用高通量测序的方法对孕妇外周血中游离DNA进行全基因组测序,得出胎儿染色体为45,XO,与

核型分析结果一致。

高通量测序技术能一次并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定,利用孕妇外周血游离DNA进行高通量测序及后续的生物信息学比对分析,能够准确地确定某一染色体序列数目的变化,定量的测定母体血浆中DNA分子的微小变化,用于胎儿染色体非整倍体的检测。最初主要集中于21三体胎儿的研究,2008年Chiu和Fan^[4,5]两个研究小组首次证实了应用母体血浆DNA行大规模基因并行测序检测胎儿21三体的可行性,后期通过大规模临床研究验证其临床有效性和实际可行性。Chiu等^[6]分析753名接受过核型分析确诊的21三体高风险孕妇,其中86名怀有21三体胎儿,对孕妇血浆DNA分子进行大规模基因并行测序,21三体胎儿检测的敏感性为100%,特异性为97.9%;Ehrich等^[7]同样分析449名孕妇,21三体胎儿检测的敏感性为100%,特异性为99.7%。Palomaki GE等^[8,9]分析212例21三体孕妇及1484例对照组,敏感性为98.6%,假阳性率为0.2%。同样的方法理论上还可以检测18三体、13三体、Turner综合征(45,X)、克氏综合征(47,XXY)等,但因临床样本较少,目前的研究还达不到21三体的检测效率。本研究我们仅对1例特纳氏综合征进行了平行测序,X染色体的Z值位于正常区间之外,说明该样本外周血中X染色体含量低于正常孕妇,提示胎儿缺失一条X染色体,得出的结果与核型分析一致,出结果时间明显快于传统的细胞培养方法,体现了此项检查的优越性,但有研究对高危人群的平行测序结果显示,该方法对性染色体的检测敏感性不高,所以需积累更多病例和改善检测技术才能有效应用于临床。近期,Bianchi等^[10]应用高通量测序技术对532份母体血浆DNA样本进行检测,结果显示21、18、13三体、X单体检测的敏感性分别为100%、97.2%、78.6%、93.8%,结果令人鼓舞。

为了提高检测效能,有研究者分析了影响检测准确性的因素包括DNA片段GC含量、测序深度、生物信息学分析方法等,他们对分析过程加以改进,用连接测序代替合成测序法^[11],或信息学分析过程对高GC含量片段进行加权以减少GC偏倚^[12],通

过增加非重复序列读本数量加大测序深度^[13]等,并加以临床验证,有效地提高了检测的准确性,且使检测范围扩展到每一条染色体。Amy J. Sehnert 等^[14]认为测序过程每次运行及每次运行各通道之间存在变异,为了尽量减少此变异,作者采用了一种新算法,用标准化的染色体值(NCVs)检测每一染色体异常,在 48 例实验组中以 100% 准确率检测出 21 三体(13/13)和 18 三体(8/8),检出 1 例 13 三体(1/2),检出 2 例 X 单体(2/3),未检出者均位于临界区间,正常核型胎儿性别均得到正确预测。应用此算法对双胎中至少有一胎为 21 三体的母体血浆样本进行检测,均得以正确检测得到,此为首次报道。

利用新一代高通量测序技术对孕妇外周血中游离的 DNA 进行测序来检测胎儿染色体非整倍体异常,具有无创、早期、快速、准确等优点,在孕周 12 周以上的孕妇,只需要抽取 5ml 母体外周血即可进行检测,7 天出检测报告,有较高的敏感性与特异性,避免了胎儿宫内感染和流产的风险,极大的降低了孕妇及家属的心理担忧,能尽早提供产前诊断信息有助于病人及家属早做干预性决定。该项技术还在进一步研究中,随着大规模临床试验的验证,有望代替侵入性的产前诊断方法,代表了当前产前诊断和防止先天性缺陷儿出生的最新发展方向。本文结果也证实了基因测序技术诊断染色体非整倍体异常是可行的,其无创性及快速性也正是产前诊断所追求的目标。但是,此方法毕竟未获取纯胎儿遗传信息,结果受多种因素影响,目前不能作为诊断,而只能作为一种筛查方法,了解非整倍体异常情况发生的风险高低,因其费用较高,难以临床大规模普及。应用外周血游离 DNA 进行无创性的产前诊断仍需更多的探索。

参 考 文 献

[1] 夏家辉,李麓云. 染色体病[M]. 北京:科学出版社,1989. 226-227.
[2] Wolff DJ, Van Dyke DL, Powell CM, et al. Laboratory guideline for Turner syndrome[J]. Gen et Med, 2010, 12 (1):52-55.
[3] Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350:485-487.

[4] 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.
[5] Chiu RWK, Chan KCA, 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.
[6] Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YW, et al . Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large-scale validity study[J]. Br Med J ,2011,342: c7401.
[7] Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, et al . Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood;a study in a clinical setting[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(3):183-185.
[8] Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study [J]. Genet Med, 2011,13:913-920.
[9] Palomaki GE, Cosmin Deciu, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as down syndrome; an international collaborative study[J]. Genet Med,2012,4(3):296-305.
[10] Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-Wide Fetal Aneuploidy Detection by Maternal Plasma DNA Sequencing[J]. Obstet Gynecol,2012, Epub ahead of print.
[11] Chiu RW, Sun H, Akolekar R, et al. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21[J]. Clin Chem, 2010,56:459-463.
[12] Fan HC, Quake SR. Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics[J]. PLoS One,2010,5:e10439.
[13] Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing[J]. PLoS ONE,2011,6:e21791.
[14] Sehnert AJ, Rhee B, Comstock D, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood [J]. Clin Chem,2011,57:1042-1049.

编辑:郑枫芸

(收稿日期:2012-03-28)