

基于胎儿细胞的无创产前检测技术研究进展

杨芳¹ 蒋慧² 王威^{1*}

(1. 北京华大基因研究中心有限公司, 北京 101300;

2. 深圳华大基因研究院, 广东 深圳 518083)

【摘要】 经过近半世纪的探索研究, 基于母体内胎儿细胞的产前检测技术随着新技术的开发和利用, 尤其在单细胞测序技术长足发展这一背景下, 正在逐步走向临床。在此我们回顾这类研究的最新进展, 讨论此类技术的突破对将来的产前诊断技术策略的影响。

【关键词】 胎儿有核红细胞; 胎儿细胞; 滋养层细胞; 无创产前诊断

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

实现对胎儿疾病的无创产前检测一直是产前诊断领域的重要研究目标。1893年, Georg Schmorl^[1] 在子痫孕妇的肺部发现了一种疑似胎儿滋养层细胞的细胞, 首次提出母体外周血循环中存在胎儿细胞的可能。1969年, Walknowsha等^[2] 首次在早孕期及中孕期的胎儿细胞能通过胎盘系统进入了母体血液循环。母血中存在胎儿细胞(fetal cells from the maternal circulation, FCMBs)这一发现激发了人们开始基于这些胎儿细胞进行无创产前诊断的探索。

如何利用这类稀少细胞实现产前诊断并开发相应的技术和策略? 这方面研究至今已近半个世纪之久。但是, 由于细胞量稀少、对细胞分离与检测的要求高, 基于母血胎儿细胞的无创产前检测并未取得突破性进展。随着1997年母血中的胎儿游离核酸(cell free fetal DNA, cffDNA)的发现^[3], 以及高通量测序技术(next generation sequencing, NGS)日臻成熟, 借助于NGS对cffDNA进行大规模并行测序可以实现对染色体非整倍体的准确检测, 目前的无创产前检测(noninvasive prenatal test, NIPT)技术主要指的是这类技术。但是, 基于母血中游离胎儿核酸的产前技术仍然存在一定的局限性, 如检测基因突变特别是新发突变, 以及对于嵌合体等检测准确度不高。基于FCMBs的检测有望获得胎儿

完整基因组信息, 实现更准确检测。另一方面, cffDNA含量存在个体差异性, 例如体重肥胖的孕妇由于cffDNA含量偏低造成假阴性; 而基于FCMBs的无创产前检测, 如果能够成功分离到胎儿来源的细胞, 则能够进行产前检测, 在一定程度上弥补现有方法的不足。近几年, 随着单细胞分离和检测技术的快速发展, 人们将目光再次聚焦在了母血中胎儿细胞的分析检测上。本文将回顾不同来源的胎儿细胞, 对其种类、特性、主要分离和检测技术进行系统性介绍。

1 母血及其他部位的胎儿细胞

尽管研究已经充分证实了妊娠期母体外周血中存在胎儿细胞, 但孕妇体内外周血中胎儿细胞十分稀少, 一般情况1ml妊娠期母血中仅6~8个胎儿细胞^[4]。单位血量中胎儿细胞数量稀少, 是胎儿细胞难以应用于临床的首要障碍。

通过胎盘转移到母血中的细胞大致可分为4类: 白细胞(leukocytes)、未分化的干细胞和祖细胞(progenitors)、胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cell, FNRBC)以及滋养层细胞(trophoblasts)。

有些过去被认为是出现在母血的胎儿淋巴细胞, 后来被归类为表现CD34和CD38特异型免疫的淋巴样或髓样干细胞^[5]。这类细胞是最早在母血

中被成功分离的胎儿细胞^[2],针对该类细胞的研究开展了很多年,但是后来发现它们在妊娠结束后会长期滞留于母体中。有报道指出,妊娠后27年仍能在母亲体内检测到男性胎儿的祖细胞和淋巴细胞^[6]。这类情况有可能影响二次妊娠的产前检查。因此有学者指出这类细胞不适合用于产前诊断,而且在针对其他类型细胞的研究中要排除这类细胞的影响。

胎儿粒细胞(属于祖细胞)的研究极少,成功分离十分困难,因此也不作为能够实现产前诊断的备选。

胎儿白细胞能够在母体内进行自我增殖,曾经被认为能够解决胎儿细胞含量少这一问题。然而,与淋巴细胞类似,其在妊娠结束后仍长久存在于母体器官和外周血中,影响下次妊娠检测。

胎儿滋养层细胞和胎儿有核红细胞因为其外形易于辨别,并且不会影响二次妊娠检测,成为这几年的热点研究对象。

1.1 胎儿滋养层细胞(fetal trophoblasts) 胎儿滋养层细胞是母体外周血循环中最早被发现的一类胎儿细胞。1893年,Schmorl^[1]在一位子痫患者肺部发现了一些形态上像绒毛上皮细胞的多核细胞,他认为这些就是属于男性胎儿的滋养层细胞,并首次提出母体血液循环中有来自胎儿的细胞的理论。滋养层形成胎盘绒毛的细胞核层和合体滋养细胞,其中有一些侵入子宫和子宫螺旋动脉,合体滋养层细胞则通过特定渠道进入了母血循环。进入母血循环的这些细胞体型较大,具有特殊的形体,理论上易于分离,不过因为体积偏大,容易积聚与肺部毛细血管中,所以外周血中含量相对稀少。滋养层细胞被认为是出现在母血中最早的一种胎儿细胞,而且在妊娠终止后不会长时间停留,利用它来开发产前诊断技术似乎是合理的。但是,由于其来自于绒毛层,具有1%染色体嵌合率,这一概率与绒毛穿刺检测出现嵌合的概率近似^[7]。此外,滋养层细胞多核,不适合用FISH相关常规检测染色体非整倍体技术。外周血中滋养层细胞的检测时间窗口还没有统一的说法,一般认为孕9~11周是比较合适的采集时间,而

宫颈口的滋养层细胞采集最优时间为孕13~15周^[8]。滋养层细胞特异性标记不多,已证实的标记有角细胞蛋白(cytokeratin)、CD105和CD141。

1.2 胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cell, FNRBC) FNRBC是胎儿造血系统建立和发育过程中胎儿血液循环中出现的特征性细胞。出现在母血中的FNRBC来源于绒毛膜间隙,穿过胎盘屏障释放到母体血液循环中。外周血中FNRBC的含量变化与胎儿造血系统的发育程度有关。随着胎儿造血系统的逐渐发育成熟,血液循环中有核红细胞逐渐减少。孕早期可在外周血中发现,适宜的采集孕周目前没有定论,一般认为孕11~16周是合适的采集时间。目前报道显示,最早于孕6周就能在外周血中发现^[9]。

这类细胞的生命周期只有90天左右,没有来自于上一次妊娠细胞的干扰。FNRBC形态特殊,有一个小而密集的细胞核偏于细胞一边,细胞质清澈,核质比较大,容易与其他种类细胞相分离。其表达多种相对稳定的特异性抗原,如CD71受体、GPA受体、多种胎儿血红蛋白肽链($\gamma\epsilon\zeta$)等,有利于对目标细胞进行分类、鉴别和富集。FNRBC完全来自于胎儿,拥有胎儿完整的遗传信息。通常来说,正常成人外周血中不会出现有核红细胞,但特殊病理情况下,如溶血性贫血、恶性肿瘤、骨髓纤维化症或急性慢性白血病等疾病会发生成人有核红细胞释放到外周血中。

1.3 母体其他来源的胎儿细胞 胎儿细胞不仅存在于孕妇外周血中,还存在于骨髓、心脏、肝脏、肺脏、子宫颈和胆囊等位置^[10,11]。其中,宫颈口的胎儿细胞可以用宫颈刷得到。这些细胞大多为滋养层细胞。早在1971年,Shettles^[12]就报道了子宫颈处有胎儿细胞的存在。遗憾的是,后来的几组研究结果不稳定,甚至可能出现检测不到胎儿细胞的现象^[13,14]。2014年,Bolnick等人^[15]的一项研究得到了相当喜人的结果。他们用细胞刷从子宫颈收集细胞,并用滋养层细胞特异的人类白细胞抗原-G(HLA-G)抗体鉴定,在56例跨越孕4~20周的孕妇中平均每例获得(746±59)个胎儿细胞,特异性达到95%~100%。不过,尽管一直有研究团队开展

此类研究,但直到现在,利用此类细胞进行产前诊断仍存在很多问题,比如采集细胞的方法是否真正属于无创,收集的细胞是否因嵌合性问题造成准确率不高等。

2 胎儿细胞的分离、富集、鉴别技术

实现无创产前首先要解决的问题就是要找到这些在母体外周血循环中“万里挑一”的胎儿细胞。在母体标本背景复杂而目标细胞含量极低的情况下,减少损失和提高纯度须两者兼顾。其中,分离富集技术曾是阻碍利用胎儿细胞进行产前诊断进入临床应用的障碍。以往的研究中,通过目标细胞不表达标记阴性筛选降低母源污染,通过目标细胞特异表达标记阳性筛选提高目标细胞收集效率,是分离富集的首选策略。尽管多种手段结合使用能够大幅提高分选效率,但最后的结果来看仍然存在母源污染^[16],因此目标细胞源性的鉴定就十分必要。大多数实验室常规路径是:初级分离-分离富集-鉴定-分析(图1)。

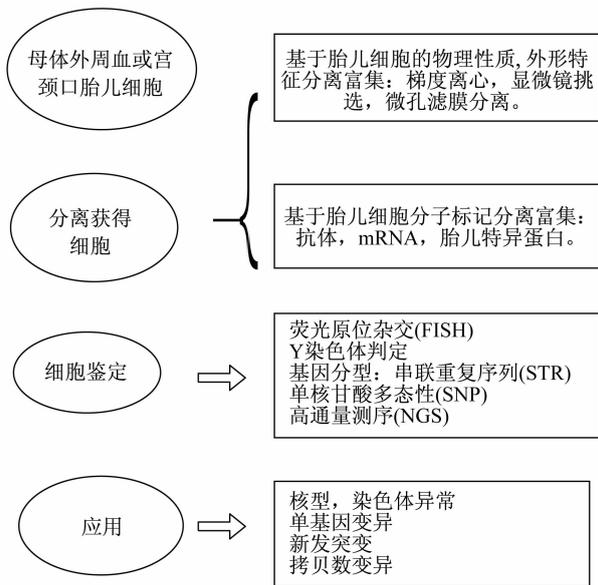


图1 母血或其他部位胎儿细胞分离与检测常规技术路线

2.1 分离和富集 针对母血或其他部位胎儿细胞,目前报道的主流分离富集方法有:基于密度梯度离心的物理分离法、基于细胞形态大和小的滤膜/芯片分选和高通量扫描电镜,以及利用分子标志物的分选荧光激活细胞分选(fluoresceactivated cell sor-

ting, FACS)和磁激活细胞分选法(magetically-activated cell sorting, MACS)。

2.1.1 密度梯度离心法 密度梯度离心法的原理是用一定的介质在离心管内形成密度梯度,将准备分离的混合细胞悬液置于顶部,并通过离心力作用使细胞分层到特定的位置上,根据细胞密度形成不同的细胞区带,实现目标细胞分离。离心介质的选择很多,例如淋巴细胞分离液、粒细胞分离液、尿素等。在不同介质下,不同目标细胞的分离条件有所不同。以淋巴细胞分离液介质为例,胎儿有核红细胞的分离条件在1.077g/ml和1.110g/ml^[17,18];滋养层细胞分离条件为1.051g/ml和1.064g/ml^[19-21]。

密度梯度离心分离母血中胎儿细胞始于1990年,Bhat团队使用Histopaque中性粒细胞分离液在1.077g/ml条件下分离胎儿脐血和母血混合物模型^[17]。1993年,同一团队开发了三层密度梯度的处理方法,分离效率比之前提升25倍^[22]。2003年,Al-Mufti等^[23]在比较试验中得出结论,认为三层密度梯度在富集效果上优于单层密度梯度方法。但鉴于分离后的纯度不足,密度梯度离心方法常作为富集胎儿细胞的第一步处理方法。不过,2014年Ahmed Emad^[24]在试图量化比较两种密度梯度离心条件下(400g,30分钟;1g,5~6小时)分离母血中胎儿细胞的效果时发现,密度梯度离心虽然可以把胎儿细胞与大部分母源细胞分开,但目标细胞的损失也较大,分别可达60%~80%和50%~70%。这一结果提示我们,在分离富集胎儿细胞的流程设计中,提高纯度的同时,如何尽量避免目标细胞损失也相当重要。

2.1.2 基于细胞大小的微孔膜/芯片系统 2012年,Paterlin-Brechot等人^[24]借鉴了基于大小分离上皮细胞瘤的方法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET),成功利用胎儿滋养层细胞的大小来实现分离,并成功进行了检测囊性纤维化(CF)和脊髓性肌营养不良(SAM)两种遗传病的产前诊断,并实现100%的检测率。此外,利用微流控芯片通过芯片微通道过滤分离特定大小的胎儿细胞,也是一种基于细胞大小的分离方法。这种技术可以实现胎儿细胞的逐一分离。在单细胞测序技术发展

中,采用这类技术得到的目标细胞量虽然少,但是纯度高,依然能够实现检测。但是,这类过滤分离技术的操作、设备和实验环境要求都比较高,样品污染和损耗风险较大,是否能最终走进临床还待进一步考察。

2.1.3 通过胎儿细胞外形荧光显微镜挑选 用倒置显微镜连接电子设备可直接通过细胞形态鉴定细胞类型。例如在淋巴细胞分离介质,1.077g/ml条件下密度梯度离心外周血得到淋巴细胞、白细胞和有核红细胞的混合物,然后通过外形检出有核红细胞。滋养层细胞和有核红细胞的外形特征参见上文,荧光显微镜下形态见图2。其优点是成本低,缺点则是通量低。

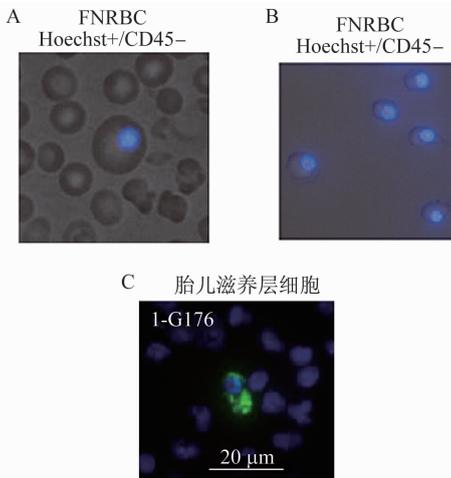


图2 FN-RBC和胎儿滋养层细胞荧光显微镜下形态

A:胎儿有核红细胞与白细胞,胎儿有核红细胞体积约为白细胞2倍,Hoechst染色蓝色荧光,阳性,CD45染色绿色荧光,阴性^[24];B:从外周血中分离获得的胎儿有核红细胞^[25];C:为胎儿滋养层细胞,细胞核(DAPI;蓝色荧光),细胞角蛋白(CK,绿色荧光)^[26]

2.1.4 基于分子标志物的细胞分选 荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting,FACS),也称为流式细胞术(flow cytometer,FCM),其原理是通过强激光激发被不同荧光标记的细胞,产生荧光或散射光,利用光信号分选细胞。其特点是可以快速测量悬浮于液体中的分散细胞的一系列生物物理和生物化学特征性参量,并根据预定的参选范围把指定的细胞亚群分选出来。1979年,Herzenberg等^[27]首次将荧光激活细胞分选技术(FACS)用于胎儿细胞富集。1990年,Bianchi

等^[28]首次利用该技术成功富集了孕妇外周血中的胎儿有核红细胞。其后相当一段时间,FACS技术成为当时胎儿细胞研究的流行应用技术之一。FACS方法的优点是可同时富集不同细胞亚群,富集特异性强、纯度高,但耗时较长、技术复杂,需专业技术人员操作。

磁激活细胞分选法(magnetically-activated cell sorting,MACS)的原理为在外加磁场的帮助下,将结合磁性微粒的单克隆抗体标记的细胞分离出来。1992年,Ganshirt-Ahler等^[29]首次用MACS对母血中胎儿细胞进行富集。2014年,丹麦的Hatt L和Brinch M^[30]用CD105和CD141组合标记MACS的方法,得到了高达91%的富集效率,然后用特异的外胚层细胞角蛋白组合抗体标记(CK cocktail)染色分选收集的细胞,此时能获得85%的目标胎儿细胞,最终用FISH技术对该方法得到的胎儿细胞进行了性别鉴定,结果实现了100%准确。MACS系统的优点是用时短,费用相对较低,可同时分离多个样本,分离后细胞仍有活性。缺点是富集纯度相对较低,一般要与其他策略结合使用。

从复杂的母源细胞高背景环境中分离出极为稀少的胎儿细胞用于产前诊断,有两个必须要满足的条件,即分离纯度要高,同时分选后细胞要保证数量和质量,以用于后续分析。上述方法中,离心法最便宜,但分离特异性不理想;FACS特异但耗时长,技术门槛高;MACS门槛低,耗时短,分离后的细胞仍有活性,但筛选参数有限,单一使用纯度不够;显微操作分选特异性高但通量小,人员和设备要求高。除了以上分离富集胎儿细胞的方法外,还有磁泳、双向电泳、凝集素分选、激光捕获显微切割,以及压力捕获分选方法等。大量的技术尝试都告诉我们,使用单一某种方法很难实现稳定高效的胎儿细胞分选,需联合使用多种条件同时分选才能在效率、时间和成本上接近临床要求。

2.2 富集前培养胎儿细胞的研究 从最开始到现在,一直有研究者尝试条件培养目标胎儿细胞,实现胎儿细胞的增殖来提高分选的效率。曾经有大量的实验投入到增殖母血中的胎儿淋巴细胞上。虽然得

到了一些不错的增殖结果,但是由于研究者普遍认为淋巴细胞并不适用于产前诊断,这方面的研究未再继续开展。2016年,Schuring-Blom等^[31]在条件培养增殖滋养层细胞上取得了一些进展,在实现从全血中持续稳定提取胎儿细胞的问题上进行了大胆的探索。

2.3 胎儿细胞的鉴定 在利用 FCMB 进行产前诊断时,鉴定细胞的胎儿源性并排除母源细胞污染是产前诊断的前提。针对 Y 染色体的核酸序列 PCR 或免疫荧光,可以帮助对目标细胞的胎儿来源进行鉴定。随着单细胞全基因组扩增与测序技术的发展,利用全高通量测序技术分析母亲外周血胎儿细胞成为一种选择,此时基因组来源与鉴定尤为重要。在测序前,可以采用定量 PCR(qPCR)对核酸质量进行分析。

2.3.1 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 通过 Y 染色体特定位点设计荧光探针,杂交后通过荧光显色可以鉴定男胎细胞。在胎儿细胞特异表达标记不明确的情况下,选择怀有男胎的孕妇进行外周血中胎儿细胞的相关研究,无疑是一种十分方便的方法。在利用多重染色 FISH 时,还可以同时得到胎儿细胞的性别和核型。1979年,Herzenberg 用 HLA 抗体鉴定了细胞来源自胎儿^[27]。2014年,Hatt L 等^[30]报道利用和鉴定角蛋白抗体(cytokeratin, CK)筛选胎儿滋养层细胞。FISH 鉴定用时短、成本低、准确率高,但缺点是不能用于细胞的定量分析,而且鉴定后的细胞不能再用于其他检测分析,对细胞量是一种损失。

2.3.2 胎儿细胞特异核酸序列扩增 鉴定胎儿细胞源也可以对胎儿细胞特有的核酸序列(如 SRY 特异序列、胎儿特异 HLA 序列)进行扩增,可以实现细胞量极少的情况下鉴定细胞的来源,并实现定量分析。PCR 扩增 Y 染色体的特异性 DNA 序列(SRY)是最早被用来鉴定母体内胎儿细胞的技术。孕妇外周血中发现来自胎儿的滋养层细胞,有核红细胞,以及具有重要意义的胎儿游离核酸^[1],都是通过 SRY 序列鉴定细胞或核酸的胎儿源性以实现的。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)

序列是胎儿细胞特异表达的,且不限于男胎细胞,同样可以通过 PCR 技术实现鉴定和定量。目前,这类技术敏感性已经升级,可以实现单细胞的目标基因扩增。

2.3.3 基因型分析 在利用高通量测序技术对胎儿细胞开展研究时,也可以使用基因型分析法(genotyping)鉴定细胞来源。常用的基因型分析手段有 STR 和 SNP。

短片段重复序列(short tandem repeat, STR)广泛存在于人类基因组中,具有高度多态性。STR 一般由 2~6 个碱基构成一个核心序列,核心序列串联重复排列,有核心序列重复数目的变化产生长度多态性。对同一位置的 STR 序列进行 PCR 扩增,通过产物多态性可以有效的区分目标基因组是否来自于同一个体。

与 STR 基因分型类似,单碱基多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)利用人类基因组中广泛存在的单碱基多态位点,PCR 扩增目标 SNP 区域,可以对基因组来源进行鉴定。

基因型分析鉴定细胞源不仅通量高,灵活性强,准确率高,而且不影响对目标胎儿细胞的分析研究,不会造成胎儿细胞的损失。

2.4 自动化分选系统 通过对目标细胞物理性质,特异分子标记等特性的深入研究,最近几年的分选技术已初步实现可自动化,大大加快了进入临床的进程,更系统、一体化的策略呼之欲出。随着新抗体的发现和单细胞分析技术的发展,打破了传统的分离富集鉴定技术的分界,开发基于胎儿细胞的产前诊断策略有了新的方向。

美国 RareCyte 公司已经开发了一个鉴定完整胎儿细胞系统(RareCyte's AccuCyte blood separation system)。这项技术利用两步特殊设计的密度离心将孕妇全血分离,得到有核细胞,利用目标细胞的形态特征显微成像挑选单个的目标细胞,然后用 Y-PCR 测序和 STR 确定细胞源和基因型,最后用排除了母源污染的产物上玻片进行单细胞分析。这种方法大大节省了人力,提高了效率,最早孕 10 周时就可以检测,已经开展临床评估。

丹麦 Arcedi Biotech 公司专注于利用胎儿细胞的无创产前诊断技术,通过 MACS 技术从母血中分离富集胎儿细胞,并用拥有专利的混合抗体获得单个胎儿滋养层细胞,结合 NGS 和 aCGH 技术分析胎儿的遗传信息,在 111 位孕 10~17 周孕妇的检测中准确分离并鉴定了胎儿细胞^[32]。

美国 KellBenx 公司利用一种特异表达于胎儿红细胞的抗体(Kellbenx Monoclonal 4B9 antibody),芯片直接捕获 FNRBC 然后进行测序、PCR 分析,FISH 与免疫组化等一系列分析。公司声称,他们用这种方法已成功检测胎儿 13、18、21 和 X、Y 染色体异常。

加拿大舍布鲁克大学 Régen Drouin 团队评估了一套全自动扫描电镜分选母血中胎儿细胞的系统。该系统每毫升正常孕妇全血能够分选 3~6 个胎儿细胞,怀有 T21 胎儿的孕妇则可以每毫升回收 13~21 个胎儿细胞^[24]。

这类研究已经在胎儿细胞分离和鉴定的技术上取得重大突破,在小规模临床实验中均具有较好的表现,为后续将胎儿细胞应用产前诊断提供了较好的工具支撑,但是这些技术能否走入临床还待进一步评估。

3 利用胎儿细胞的无创产前分子诊断技术

自从发现母体中的胎儿细胞以来,用这些细胞进行产前诊断的努力从未间断。过去数十年研究已经表明,从母体中分离胎儿细胞可以用于性别鉴定、核型分析、染色体疾病和单基因病诊断,甚至获得完整胎儿基因组。这些工作包括概念证实性研究、新技术开发与应用研究。

实现利用胎儿细胞的核型分析可以选择高效的 FISH 检测,可分析染色体多倍体或大片段的缺失重复以及性别鉴定。而单病的检测可以选择目标基因 PCR 或全基因组扩增技术,实现单病的准确检测甚至新发单基因病的检测。1969 年,Walknowska 等^[33]最早利用母体外周血中胎儿细胞鉴定性别,在孕早期母体外周血中的胎儿淋巴细胞对 Y 染色体 FISH 检测验证证实胎儿为男性。1979 年,Herzenberg 等^[27]用 FACS 技术分离胎儿

细胞,HLA-2 抗体鉴定细胞来源自胎儿,利用 FISH 检测技术成功利用胎儿细胞检验胎儿核型和性别。1993 年,美国联合多家实验室成立国家儿童健康和发育合作组织(NICHD),针对利用胎儿细胞开发无创产前诊断技术成立了胎儿细胞分离研究(The National Institute of Child Health and Human Development Fetal Cell Isolation Study,简称 NIFTY)项目。2002 年,NICHD 成员之一,来自贝尔实验室的 Bianchi 团队,在评估了多种方法后,最终选择利用流式分选(FACS)和磁力分选技术(MACS)分离母体外周血循环中的 FNRBCs,并检测 21 号染色体非整倍体,实验表明这一方法可达到 74% 特异性,对比传统血清学筛查并没有显著性优势,难以实现大规模推广^[34]。2012 年,Mouawia 等^[35]用 ISET 滤膜分选方法分离胎儿滋养层细胞,并用 PCR 等方法鉴定和分析,最终实现囊性纤维化和脊髓性肌营养不良两种遗传病的产前检测,结果准确率为 100%,初步实现利用胎儿细胞的遗传病分子诊断。

基于 NGS 对单个或者少量细胞进行基因组分析,为胎儿细胞应用于产前诊断提供了强有力的工具。将分离的细胞的全基因组 DNA 进行扩增,获得高覆盖率的完整的基因组之后,通过外显子捕获再高通量测序或者直接针对全基因组进行鸟枪法测序,是一项适用于极少量细胞的测序技术。这类技术不仅可应用于细胞的鉴定,还可以在鉴定的同时得到更全面精准的遗传信息。尤其是后续开发的单细胞测序技术,在产前诊断研究中已经显现了优势。2011 年,冷泉港实验室的研究团队运用单细胞测序得到了乳腺癌细胞的拷贝数变异(CNV)数据^[36]。2012 年,深圳华大基因研究院建立了一种基于多重置换扩增(MDA)的单细胞测序新方法,提升了单细胞测序技术的分辨率和基因组覆盖度,具有更好的敏感性和特异性^[37]。2013 年单细胞测序技术被应用在循环肿瘤细胞研究上,利用该技术的胎儿细胞分选和鉴定技术也得到了突破^[38]。今年,Xie 团队通过转座子插入线性放大 DNA 样本,构建无偏见细胞基因组文库,检测到单个人类细胞的单核苷酸突变(SNV),基因拷贝数变异(CNV)的分辨率达到

了 Kb 水平^[39],相信会进一步促进更多领域的产前诊断。

近年来,已经有研究开始探讨将单细胞基因组测序技术应用于母血胎儿细胞基因组遗传学分析。2014年,新加坡南洋理工大学的 Rui Hua 等人^[25]分离早孕期(早孕期终止妊娠的)孕妇的绒毛膜和绒毛中的 FNRBC,利用全基因组测序对 FNRBC 进行分析,成功检测到 2 例 T21、2 例 T18 和 1 例 T15。该团队显微镜挑选早孕期终止妊娠的孕妇的绒毛膜绒毛(流产组织)中的有核红细胞,每例样本取 1~3 个 NRBC,全基因组测序后 Z 值判断分析染色体非整倍体。虽然这是首次利用高通量测序技术成功实现少量 FNRBC 的染色体非整倍体检测,但是需要指出的是这篇文章没有讨论无创检测的可行方法,也没有 NRBC 的细胞源鉴定。2016年,Baylor 实验室的 Breman^[26]团队,分离早孕期孕妇外周血中的胎儿滋养层细胞,通过全基因组测序后分析胎儿的染色体异常,和拷贝数变异(CNV)。Breman 团队对 10~16 孕周的怀有男胎的孕妇,分别取 30ml 外周血,两步法梯度离心分离血细胞,免疫组化挑选 cytokeratin 阳性 CD45 阴性的细胞,提取基因组后利用 Y-PCR 和 STR 基因型分析及性别鉴定。全基因组扩增和 aCGH 分析目标细胞的染色体核型和 CNV。NGS 成功检测出 T15、T18、T21。aCGH 分析得到 1 例 15 号染色体 2.7Mb 缺失。除此以外,有 1 例 NIPT 检测 T13 假阳性样本,该样本取得的滋养层细胞中 9 个 NGS 显示为 T13,另外 3 个则显示正常,提示胎儿滋养层细胞的检测存在由于嵌合现象造成的假阳性。Breman 等人的研究提示,利用高通量测序的手段检测胎儿孕早期母体外周血中的滋养层细胞可以有效实现产前诊断。尽管进入临床应用还为时尚早,但这一组数据仍令人振奋。同年 11 月,丹麦的 Steen Kolvraa^[32]团队分离孕妇外周血中的胎儿细胞达到平均 12.8 个/30ml 的效果,并利用 NGS 和 aCGH 技术检测到胎儿的 21 号,X 和 Y 染色体非整倍体和 2 例罕见的染色体畸形(环状 X 染色体)。该团队用他们开发的鸡尾酒分选策略(cocktail,CK)得到了非常好的胎儿细

胞分选效果^[28],并在此基础上利用全基因组扩增技术对目标细胞的基因组进行扩增,然后利用高通量测序和 aCGH 技术实现细胞染色体的检测。对于 2 例 X-ring 染色体的检出,作者认为是得益于全基因组扩增技术使得单细胞提供足够的基因组信息进行下游分析成为可能。同时提出,对羊水穿刺得到的胎儿细胞进行 WGA 将会得到更多的信息。作者认为对于更微小的拷贝数变异检测,这种方法将会超越 aCGH 技术。

基于胎儿细胞利用单细胞测序技术实现胎儿单基因病诊断,已经有一些公司实现了高效低成本的检测。可能出于商业的考虑,这一部分的报道还不多,但可以想见,随着单细胞基因测序技术的发展,胎儿细胞的基因信息更加完整和准确,因此利用胎儿细胞的单病诊断会很有前景。

4 基于胎儿细胞的无创产前分子检测技术的优势、局限性及解决方法

基于 cfDNA 的无创产前检测技术已经被广泛接受,对发病率最高的出生缺陷疾病之一的唐氏综合征的检测准确率已达到 99%,未来的出生缺陷防控可能重点将转移到单基因变异和多拷贝数变异(CNV)引起的遗传病上。利用快速发展的测序技术,基于胎儿细胞的产前检测拥有更为丰富的遗传信息,将能实现 CNV,新发基因突变(*de novo*),甚至转录调控方面疾病的防控。

相比于 cfDNA,利用胎儿细胞的 NIPT 具备以下优势:①所有分析 100%来自于胎儿的基因组,这种检测将有望达到诊断级别;②虽然利用 cfDNA 的 NIPT 技术在加深测序深度时能够检测深度的微缺失微重复,但是仍然不如直接用胎儿细胞进行可选择的技术手段多,基于胎儿细胞的该类检测可能实现更经济准确;③在全基因组测序技术的支持下,新发基因突变和多基因复杂遗传病诊断将有所突破;④相较于高风险,肥胖等问题的孕妇是否适用基于 cfDNA 的 NIPT 仍存在争议,拥有更多直接的生物学证据的 fetal-cell NIPT 更适用于更广范围的孕妇。更全面的比较见表 1。

表1 母体外周血中的胎儿细胞和胎儿游离核酸的比较

	设备	优点	缺点
胎儿细胞	细胞分选平台	极有可能成为一种替代金标准的诊断技术	分离细胞仍受操作人员水平,实验条件等限制;成本较高
	显微镜	直接分析单个细胞或少量细胞库	S期或凋亡细胞对完整DNA的获得有一定影响
	细胞培养	适用FISH或qf-PCR技术等快速分析染色体异常。	基于少量细胞的分析很有可能因为嵌合出现假阳性假阴性
	CGH-SNP分析平台	能够分析单基因变异 能检查更微小的CNV	
胎儿游离DNA	DNA提取	临床已经被广泛接受	仍然是一种筛查手段而非诊断技术
	质谱	加成本 and 深测序深度可以查到更微小的CNV	游离DNA含量存在个体差异,影响检测的准确率
		操作步骤少,更易操作	分析更多的是依靠信息学得到,而不是直接的生物学证据 对于嵌合情况很难判断
两者共同点	PCR平台	无创检测胎儿染色体异常	
	NGS平台	无创检测胎儿CNV	对设备和专业人员的要求都很高

尽管已经有很多直观的证据表明基于胎儿细胞的无创产前检测有以上一些优势,但是在最终走向临床前仍有很多问题需要解决。

现有技术下,基于母亲外周血的胎儿细胞的检测因为是脱落自胎儿系统的细胞,无论滋养层细胞还是胎儿有核红细胞,都存在嵌合性问题。嵌合性导致的假阳性、假阴性是基于胎儿细胞产前诊断的一大挑战。Breman^[7]认为,增加检测的细胞量能够修正以上问题,并建议一个检测至少应取3~5个胎儿细胞,提高检测的准确率。SNP、aCGH或NGS是否能够真正解决这一问题还需更多的验证。此外,取得的胎儿细胞可能处于不同的细胞期,S期细胞会有基因组不均衡的情况,凋亡的细胞则可能存在基因变异。细胞分选过程可能需要筛除这类胎儿细胞。有研究认为NGS可以鉴别S期细胞。

用全外显或全基因组测序筛查新发突变一直是产前检测的一大挑战。新发突变造成的智力缺陷发病率比唐氏综合症的发病率要高出3~5倍。基于胎儿细胞的NIPT技术是否能够解决这一难题,需要更多的数据。利用高通量测序技术针对癌症的研究已经取得了一些相关的结果,如何将技术应用于胎儿细胞检测,仍需更多的探索。

因为使用的是极少细胞进行测序分析,会产生如基因脱扣等其他的问题。全基因组测序技术的难点在于基因组的覆盖度和高保真性。增加检测的细胞数量可能是较好的解决方法。

胎儿细胞的数量与妊娠期并发症及自身免疫性疾病的发生关系有待进一步的研究和证实,已经有研究结果提示子痫、肿瘤、胎儿严重出生缺陷可能会有外周血中的胎儿细胞数量增多的现象,为这些疾病的研究开拓了一个新领域。

此外,现在即使最有效分离手段分离得到胎儿细胞的量都很少。而胎儿细胞的量还受到个体差异、孕周差异和选择的抗体和设备型号不同而很难稳定。此外,分离手段对细胞完整性的破坏也对检测具有潜在影响。尽管高效自动化的分选系统大大提高了从外周血中分选胎儿细胞的效率,但需要在更广泛的人群中评估方法的特异性、灵敏性、稳定性等相关指标。

5 总结

利用胎儿细胞进行产前诊断仍处于实验室阶段,评估其是否能真正超越现有的基于胎儿游离核酸的NIPT检测成为真正应用于临床的诊断手段,仍需要技术的优化和临床数据的证明。但随着近几年高通量测序技术不断升级,利用高通量测序技术的基于胎儿细胞的产前检测取得了一些可喜的数据,加强了这类研究的信心。相信随着技术的进步,其应用前景越来越清晰,更多的方法会在临床验证中越来越成熟,临床可行性值得期待。

参考文献

[1] Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungenber-

- puerperal-eklampsie [M]. Leipzig: Verlag FCW Vogel. 1893.
- [2] Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer [J]. *Lancet*, 1969, 1(7606):1119-1122.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350:485-487.
- [4] Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques [J]. *Clin Genet*, 2001, 60:145-150.
- [5] Emad A, Bouchard EF, Lamoureux J, et al. Validation of automatic scanning of microscope slides in recovering rare cellular events: application for detection of fetal cells in maternal blood [J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34:538-546.
- [6] Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum [J]. *Proc Natl AcadSci USA*, 1996, 93:705-708.
- [7] Breman AM, Chow JC, U'Ren L, et al. Evidence for feasibility of fetal trophoblastic cell-based noninvasive prenatal testing [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(11):1009-1019.
- [8] Morris Fiddler. Fetal cell based prenatal diagnosis: perspectives on the present and future [J]. *J Clin Med*, 2014, 3:972-985.
- [9] Steele CD, Wapner RJ, Smith JB, et al. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 1996, 39(4):801-813.
- [10] Lapaire O, Holzgreve W, Oosterwijk JC, et al. Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation [J]. *Placenta*, 2007, 28:1-5.
- [11] Askelund KJ, Chamley LW. Trophoblast deportation part I: review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy [J]. *Placenta*, 2011, 32:716-723.
- [12] Shettles LB. Use of the Y chromosome in prenatal sex determination [J]. *Nature*, 1971, 230(5288):52-53.
- [13] Fang CN, Kan YY, Hsiao CC. Detection of fetal cells from transcervical mucus plug before first-trimester termination of pregnancy by cytokeratin-7 immunohistochemistry [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2005, 31(6):500-507.
- [14] Katz-Jaffe MG, Mantzaris D, Cram DS. DNA identification of fetal cells isolated from cervical mucus: potential for early non-invasive prenatal diagnosis [J]. *BJOG*, 2005, 112(5):595-600.
- [15] Bolnick JM, Kilburn BA, Bajpayee S, et al. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) for noninvasive prenatal screening at 5 to 20 weeks of gestation [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(1):135-142. e6
- [16] Beaudet AL. Using fetal cells for prenatal diagnosis: history and recent progress [J]. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 2016, 172(2):123-127.
- [17] Bhat NM, Bieber MM, Teng NN. One step separation of human fetal lymphocytes from nucleated red blood cells [J]. *J Immunol Methods*, 1990, 131:147-149.
- [18] Ganshirt-Ahlert D, Borjesson-Stoll R, Burschlyk M, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting [J]. *Am J Reprod Immunol*, 1993, 30:194-201.
- [19] Ganshirt-Ahlert D, Burschlyk M, Garritsen HS, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1992, 166:1350-1355.
- [20] Karl PI, Alpy KL, Fisher SE. Serial enzymatic digestion method for isolation of human placental trophoblasts [J]. *Placenta*, 1992, 13:385-387.
- [21] Van Wijk IJ, van Vugt JM, Mulders MA, et al. Enrichment of fetal trophoblast cells from the maternal peripheral blood followed by detection of fetal deoxyribonucleic acid with a nested X/Y polymerase chain reaction [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1996, 174:871-878.
- [22] Bhat NM, Bieber MM, Teng NN. One-step enrichment of nucleated red blood cells [J]. A potential application in perinatal diagnosis [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 158:277-280.
- [23] Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, et al. Distribution of fetal erythroblasts enriched from maternal blood in multifetal pregnancies [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18:1933-1936.
- [24] Emad A, Drouin R. Validation of automatic scanning of microscope slides in recovering rare cellular events: application for detection of fetal cells in maternal blood [J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(6):538-546.
- [25] Rui Hua. Detection of aneuploidy from single fetal nucleated red blood cells using whole genome sequencing [J]. *Prenatal Diagnosis*, 2014, 34:1-8.
- [26] Breman AM, Chow JC, U'Ren L, et al. Evidence for feasibility of fetal trophoblastic cell-based noninvasive prenatal testing [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(11):1009-1019.
- [27] Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, et al. Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting [J]. *Proc Natl AcadSci*

- USA,1979, 76:1453 - 1455.
- [28] Bianchi DW, Flint AF, PizzimentiMF, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:3279-3283.
- [29] Ganshirt-Ahlert D, Burschik M, Garritsen HS, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood [J]. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166:1350-1355.
- [30] Hatt L, Brinch M, Singh R, et al. A new marker set that identifies fetal cells in maternal circulation with high specificity [J]. Prenat Diagn, 2014, 34(11):1066-1072.
- [31] Schuring-Blom H, Lichtenbelt K, van Galen K, et al. Maternal vitamin B12 deficiency and abnormal cell-free DNA results in pregnancy [J]. Prenat Diagn, 2016, 36(8):790-793.
- [32] Kolvraa S, Singh R, Normand EA, et al. Genome-wide copy number analysis on DNA from fetal cells isolated from the blood of pregnant women [J]. Prenat Diagn, 2016, 36(12):1127-1134.
- [33] Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer [J]. Lancet, 1969, 1(7606):1119-1122.
- [34] 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.
- [35] Mouawia H, Saker A, Jais JP, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy [J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25:508-520.
- [36] Baslan T, Kendall J, Rodgers L, et al. Genome wide copy number analysis of single cells [J]. Nat Protoc, 2012, 7(6):1024-1041.
- [37] Xu X, Hou Y, Yin X, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor [J]. Cell, 2012, 148: 886-895.
- [38] Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells [J]. Am J Pathol, 2000, 156(1):57-63.
- [39] Chen C, Xing D, Tan L, et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LI-ANTD) [J]. Science, 2017, 356(6334):189-194.

(收稿日期:2017-06-29)

编辑:宋文颖

· 视频导读 ·

基因芯片在孕期提供最全面的诊断信息

Brynn Levy

(哥伦比亚大学医学中心临床细胞遗传学实验室)



基因芯片技术近年来在我国发展迅猛,它也因能为孕期提供全面的诊断信息而受到产科医生的青睐。在第六届“中国胎儿医学大会”上,我们邀请了来自哥伦比亚大学从事细胞遗传学研究的Brynn Levy教授就基因芯片在产前诊断中的应用做一介绍。

在这个视频中,Brynn Levy教授主要介绍了绒毛膜或羊水细胞的染色体核型分析、为什么要使用基因芯片、单亲二倍体的来源、三倍体的检测、超声所见异常结果、从基因型推测临床表型以

及一些存在的错误,并对一些典型案例进行讲解和分析。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2017.03.008