

224 例单核苷酸多态微阵列芯片检出拷贝数变异胎儿的产前诊断结果

许玲 王挺 黎凤珍 卢建 张畅斌 黄华梅*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 探讨单核苷酸多态微阵列芯片(single nucleotide polymorphisms microarray, SNP-array)技术在产前诊断中的应用。**方法** 回顾性选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月在广东省妇幼保健院就诊的 224 例核型分析未见异常但 SNP-array 检出拷贝数变异(copy number variations, CNVs)的单胎妊娠孕妇,随访妊娠结局。分析产前诊断指征、超声异常与 CNVs 的关系。**结果** 224 例孕妇中,最多见的超声异常是胎儿侧脑室增宽和颈项透明层增厚,分别占 14.7%(33/224)和 12.1%(27/224)。224 例 CNVs 中,意义不明的 CNVs 占 34.8%(78/224),致病性 CNVs 占 33.0%(74/224),杂合性缺失占 17.0%(38/224),可能致病 CNVs 占 12.9%(29/224),良性 CNVs 占 2.2%(5/224)。杂合性缺失病例中致病性杂合性缺失有 3 例,占 7.9%(3/38)。74 例致病性 CNVs 中,以 17 号、X、16 号染色体受累最多,分别占 18.9%(14/74)、17.6%(13/74)和 14.9%(11/74),其中有 5 例涉及 2 条染色体异常,占 6.8%(5/74);产前诊断指征以肾脏异常、侧脑室增宽和颈项透明层增厚为主,分别占 18.9%(14/74)、18.9%(14/74)和 16.2%(12/74)。224 例孕妇中 79 例终止妊娠,其中 3 例于脐带血或羊膜腔穿刺术后胎死宫内终止妊娠;51 例失访;94 例活产分娩,但其中 5 例新生儿异常(膈疝 3 例,耳聋和淋巴管瘤各 1 例)。**结论** SNP-array 技术能检出核型分析检测不出的亚显微结构异常,结合传统的细胞遗传学检测,能更好地避免异常患儿的出生。

【关键词】 多态性;单核苷酸;微阵列分析;DNA 拷贝数变异;超声检查;产前

【中图分类号】 R714.56 **【文献标识码】** A

Single nucleotide polymorphism microarray identified copy number variations in 224 fetuses with normal karyotypes

Xu Ling, Wang Ting, Li Fengzhen, Lu Jian, Zhang Changbin, Huang Huamei

Medical Genetic Centre, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511442, China

Corresponding author: Huang Huamei, Email: 804414135@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the performance of single nucleotide polymorphism microarray (SNP-array) in prenatal diagnosis. **Methods** This study retrospectively analyzed 224 cases of singleton pregnancies with normal chromosomal karyotypes but copy number variations (CNVs) detected by SNP-array in Guangdong Women and Children Hospital from January 2015 to December 2017. Pregnancy outcomes of these cases were followed up. Relationships of prenatal diagnostic indications and ultrasound abnormalities with CNVs were analyzed. **Results** Among the 224 cases, the most common ultrasound abnormalities were fetal cerebral ventriculomegaly and increased nuchal translucency, accounting for 14.7% (33/224) and 12.1% (27/224), respectively. Variants of uncertain significance, pathogenic CNVs, loss of heterozygosity, potentially pathogenic and benign CNVs were 34.8% (78/224), 33.0%

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.04.016

* 通信作者:黄华梅,E-mail:804414135@qq.com

(74/224), 17.0% (38/224), 12.9% (29/224) and 2.2% (5/224), respectively. Three out of the 38 cases of loss of heterozygosity were pathogenic (7.9%). Among the 74 cases with pathogenic CNVs, chromosomes 17, X and 16 were the most involved, accounting for 18.9% (14/74), 17.6% (13/74) and 14.9% (11/74), respectively; five of which [6.8% (5/74)] showed abnormalities in two chromosomes; and renal abnormalities (18.9%, 14/74), fetal cerebral ventriculomegaly (18.9%, 14/74) and increased nuchal translucency (16.2%, 12/74) were the main prenatal diagnostic indications. Among the 224 pregnancies, 79 were terminated and three of them terminated due to intrauterine fetal death after cordocentesis or amniocentesis; 51 lost in follow up; 94 newborns were born and 5 of them with abnormality (3 of diaphragmatic hernia, one of deafness and one of lymphangioma). **Conclusion** SNP-array technology is able to detect submicroscopic structural abnormalities that cannot be found by karyotype analysis. Combined with traditional cytogenetic detection, SNP-array can better avoid the birth of abnormal neonates.

【Key words】 Polymorphism; Single nucleotide; Microarray analysis; DNA copy number variations; Ultrasonography; Prenatal

近年来,染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis,CMA)技术被越来越多地应用于产前诊断中。CMA技术相比于传统的核型分析,可以提高染色体异常的检出率,甚至可作为超声检查异常胎儿的首选产前诊断方法^[1,2]。CMA主要包括微阵列比较基因组杂交以及单核苷酸多态性微阵列(single nucleotide polymorphism-array, SNP-array)技术。SNP-array的技术原理是将大量单核苷酸多态性序列位点用特殊方法固定在芯片上,获得高密度的SNP-array,然后与样品杂交,再通过激光扫描及软件分析获得结果^[3]。相较于微阵列比较基因组杂交,SNP-array技术不仅可检出微小的染色体异常,还可以检出单亲二倍体、三倍体和高比例嵌合体^[4]。本研究通过分析224例核型分析未见异常但SNP-array检出拷贝数变异(copy number variations,CNVs)的产前诊断病例,统计其超声检查结果,随访妊娠结局,探讨SNP-array技术在产前诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析2015年1月至2017年12月在广东省妇幼保健院医学遗传中心就诊的224例核型分析未见异常但SNP-array检出CNVs的单胎妊娠孕妇。224例孕妇的产前诊断指征为不良生育史、高龄妊娠、无创产前检测高风险以及超声

检查结果异常,如胎儿颈项透明层(nuchal translucency,NT)增厚、肾脏异常、侧脑室增宽、心脏异常、鼻骨缺如及胎儿生长受限(fetal growth restriction,FGR)等。

1.2 SNP-array检测 ①DNA提取:取10ml羊水或1ml脐静脉血,使用QIAamp DNA Blood Mini Kit试剂盒(美国Qiagen公司)进行DNA提取,并用NANODROP 2000分光光度计测定DNA浓度是否达标。②SNP-array检测:取DNA样本应用Affymatrix公司的CytoScan 750K芯片进行检测,包括酶切、连接、聚合酶链反应扩增、纯化、片段化、标记、杂交洗涤、扫描和分析等步骤,所得结果用ChAS3.1.0.15软件进行分析。所得CNVs结果,参照DGV(<http://projects.tcag.ca/variation>)、DECIPHER(<http://decipher.sanger.ac.uk/>)、PubMed(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)、在线人类孟德尔遗传(www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)等数据库进行分析。③结果判读:参照文献^[5],将CNVs分为致病性CNVs、良性CNVs、可能致病CNVs、意义不明的CNVs(variants of unknown significance, VOUS)及杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)。

1.3 随访 对所有病例进行电话随访,追踪妊娠结局及新生儿生长发育情况。

1.4 统计学分析 正态分布计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表

示。采用描述性统计分析。

2 结果

2.1 超声资料 224 例孕妇年龄为 (30.1 ± 5.3) 岁,范围为 18~45 岁;羊膜腔穿刺或脐静脉穿刺取样时的孕周为 (24.6 ± 5.3) 周,范围为 17~38 周;超声显示的异常主要是胎儿侧脑室增宽和 NT 增厚。见表 1。

2.2 SNP-array 检测结果 VOUS 占 34.8%(78/224),致病性 CNVs 占 33.0%(74/224),LOH 占 17.0%(38/224),可能致病 CNVs 占 12.9%(29/224),良性 CNVs 占 2.2%(5/224)。5 例致病性

CNVs 异常涉及 2 条染色体,占 6.8%(5/74)。见表 2。

表 1 224 例胎儿超声检查情况及其构成比

超声情况 ^a	例数[例(%)]
侧脑室增宽	33(14.7)
颈项透明层增厚	27(12.1)
肾脏异常	24(10.7)
胎儿生长受限	22(9.8)
心脏异常	17(7.6)
鼻骨缺如	8(3.6)
肠管回声增强	5(2.2)
脉络丛囊肿	4(1.8)
未见异常 ^b	84(37.5)
合计	224(100.0)

注:^a合并几项超声异常的胎儿,以主要异常进行分类;^b产前诊断指征为不良生育史、无创产前检测高风险和高龄妊娠等

表 2 224 例胎儿的 CNVs 分类、超声表现及妊娠结局

CNVs 分类	例数	缺失 (例)	重复 (例)	多重异常 (例)	片段范围	产前诊断指征(例)							妊娠结局(例)		
						NT 增厚	侧脑室 增宽	肾脏 异常	心脏 异常	FGR	其他 ^a		终止 妊娠	活产 分娩	失访
VOUS	78	11	67	0	138.7kb~6.4Mb	6	8	7	10	5	42		18	50	10
致病性 CNVs	74	55	14	5	127kb~14.2Mb	12	14	14	4	9	21		38	18	18
LOH	38	—	—	—	1.49~50Mb	3	3	3	1	4	24		11	12	15
可能致病 CNVs	29	15	14	0	192kb~3.92Mb	6	8	0	2	4	9		11	10	8
良性 CNVs	5	3	2	0	1.11~4.5Mb	0	0	0	0	0	5		1	4	0

注:^a包括鼻骨缺如、肠管回声增强、脉络丛囊肿及超声未见异常(产前诊断指征为不良生育史、无创产前检测高风险和高龄妊娠等);“—”指无数据

2.3 超声未见异常病例 CNVs 类型分布 84 例超声检查未见异常者的产前诊断指征包括无创产前检测高风险、不良生育史和高龄妊娠等,检出的致病性 CNVs 占 23.8%(20/84),VOUS 占 34.5%(29/84),可能致病 CNVs 占 10.7%(9/84),LOH 占 25.0%(21/84),良性 CNVs 占 6.0%(5/84)。

2.4 致病性 CNVs 共检出 74 例致病性 CNVs,以 17、X 和 16 号染色体受累最多,见表 3。

表 3 74 例致病性 CNVs 的受累染色体分布及其构成比

受累染色体	例数[例(%)]
1 号	4(5.4)
2 号	3(4.0)
3 号	1(1.4)
4 号	1(1.4)
5 号	2(2.7)
6 号	4(5.4)
7 号	1(1.4)
10 号	1(1.4)
11 号	1(1.4)
12 号	1(1.4)
14 号	1(1.4)
15 号	3(4.0)
16 号	11(14.9)
17 号	14(18.9)
22 号	8(10.8)
X	13(17.6)
多重异常	5(6.7)
合计	74(100.0)

2.5 LOH 病例 共检出 38 例 LOH,片段大小为 1.49~50Mb,产前诊断指征多样,最多见无创产前检测高风险,见表 4。

表 4 38 例 LOH 病例的产前诊断指征及其构成比

产前诊断指征	例数[例(%)]
无创产前检测高风险	7(18.4) ^b
不良生育史	6(15.8)
高龄妊娠	6(15.8) ^b
其他超声异常 ^a	5(13.2)
胎儿生长受限	4(10.5) ^b
颈项透明层增厚	3(7.9)
侧脑室增宽	3(7.9)
肾脏异常	3(7.9)
鼻骨缺如	1(2.6)
合计	38(100.0)

注:^a其他超声异常包括:唇裂、胸腔积液、透明隔腔发育不良、输尿管扩张和无脑儿;^b其中 1 例为致病性 LOH

2.6 多重 CNVs 异常病例 74 例致病性 CNVs 中有 5 例涉及 2 条染色体异常,占 6.7%(5/74),其中 1 例是 4 号和 6 号染色体重复,另外 4 例是部分单体和部分三体。见表 5。

2.7 随访结果 224 例孕妇中,79 例终止妊娠,94 例活产分娩,51 例失访。79 例终止妊娠孕妇中有 2 例于脐静脉穿刺术后胎死宫内,其中 1 例检出致病性 CNVs (11p15.5 重复 0.74 Mb),超声提示双肾

表5 5例多重CNVs异常孕妇临床资料

病例序号	SNP-array 结果	核型分析结果 ^a	CNVs 类型	片段大小	羊膜腔穿刺或脐静脉穿刺孕周(周)	妊娠结局
1	arr[hg19]4q11q12(52,686,030-56,547,127)×3;6q14.1q15(79,930,874-92,773,215)×3	46,XY	重复	3.86 Mb/12.84 Mb	22 ⁺	终止妊娠
2	arr[hg19]14q32.2q32.33(101,194,123-107,284,437)×3;19p13.3(260,911-642,888)×1	46,XY	重复/缺失	6.1 Mb/382 kb	18 ⁺	终止妊娠
3	arr[hg19]18q23(73,830,798-78,013,728)×3;22q13.2q13.33(43,846,598-51,197,766)×1	46,XY	重复/缺失	4.18 Mb/7.35 Mb	20 ⁺	阴道分娩,男婴,出生体重3 800 g
4	arr[hg19]1q43q44(238,380,327-247,179,291)×1;16q24.1q24.3(84,160,071-88,638,764)×3	46,XY	重复/缺失	8.8 Mb/4.48 Mb	27 ⁺	终止妊娠
5	arr[hg19]2q36.3q37.3(228,576,326-242,782,258)×3;7q35q36.3(147,066,162-159,119,707)×1	46,XY	重复/缺失	14.2 Mb/12.1 Mb	27 ⁺	终止妊娠

注:^a 鉴于核型分析的最小分辨率为5~10 Mb,对于重复或者缺失片段低于10 Mb的病例,核型分析报告为46,XY或者46,XX,并去掉未见异常核型后缀,以区分正常病例

增大、羊水过多;另1例超声提示羊水过少,CNVs为VOUS(22q13.2重复1.5 Mb)。还有1例于羊膜腔穿刺术后胎死宫内,超声提示NT增厚(3.0 mm),检出致病性CNVs(22q11.21重复3.15 Mb)。

94例活产分娩孕妇中1例新生儿生后听力筛查提示耳聋,SNP-array检出致病性CNVs(17q12缺失1.6 Mb),1例新生儿产前超声提示为淋巴瘤,SNP-array检出良性CNVs(4q13.3重复1.1 Mb),随访到2岁暂未见异常;3例新生儿于产前超声发现膈疝,CNVs均为良性变异,出生后接受治疗,随访至2岁暂未见异常。

3 讨论

SNP-array技术在检测染色体亚微观结构上具有传统核型分析难以比拟的优势,对超声异常病例的染色体结构异常的检出率高于传统的核型分析,且有取代传统核型分析成为超声异常患者的首选检查技术的趋势^[6-9]。然而,关于超声表现和CNVs的相关性及最终妊娠结局的大样本研究较少。本研究选择224例核型分析未见异常但SNP-array检出CNVs的孕妇,回顾性分析超声表现与CNVs的关系,探讨SNP-array在产前诊断中的价值。

3.1 CNVs的分类及超声表现 在检出CNVs的224例孕妇中,主要的超声异常是胎儿侧脑室增宽和NT增厚。研究显示,胎儿侧脑室增宽是早孕期超声筛查中最常见的颅脑异常,发生率为1.5%~2.2%,大多数轻度侧脑室增宽可于中孕期消失,而重度侧脑室增宽则常伴有其他异常且预后不良^[10]。

NT增厚与唐氏综合征、水肿等胎儿异常密切相关,是早孕期超声筛查最常见的异常指标^[11]。遗传咨询中,这2类产前诊断指征者推荐将CMA作为一线检测方法。

本研究224例CNVs病例中,VOUS占34.8%(78/224),致病性CNVs占33.0%(74/224),LOH占17.0%(38/224),可能致病CNVs占12.9%(29/224),良性CNVs占2.2%(5/224)。国内一项研究对208例超声异常孕妇行SNP-array检测,检出29例CNVs,其中致病性CNVs18例,占62.1%(18/29)^[12],高于本研究,可能与本研究包含了超声未见异常的病例以及不同基因芯片平台的CNVs报告标准不同有关。

3.2 致病性CNVs的超声表现及妊娠结局 本研究74例致病性CNVs中,以17、X和16号染色体受累最多。人类17号染色体由8100万个碱基对组成,包含1500多个基因,基因密度在人类染色体中排第二,包含与Miller-Dieker综合征、乳腺癌、神经纤维瘤等多种疾病相关的基因。本研究检出的14例17号染色体致病性CNVs中,有2例Miller-Dieker综合征(17p13.3缺失),7例17q12微缺失综合征,5例致病性CNVs位于17p12(3例重复、2例缺失)。2例Miller-Dieker综合征胎儿超声均提示侧脑室增宽,孕妇选择终止妊娠。7例17q12微缺失综合征胎儿中6例超声显示不同程度的肾脏异常,1例超声发现颅骨光环欠规则且后颅窝池近消失。17q12区域包含HNF1B等20个基因,该区域缺失与肾囊肿和糖尿病综合征相关,相关表型主要

包括泌尿生殖系统异常(尤其是肾囊肿、肾小球囊性病损和肾发育不良)、糖尿病、孤独症谱系神经认知障碍。17q12缺失的外显率为34.4%^[13]。本研究7例17q12微缺失综合征胎儿中,4例终止妊娠,2例失访,1例活产分娩;该活产新生儿出生体重3900g,随访至1岁半,家属反映除听力发育较差,其他无异常。5例胎儿17p12致病性CNVs的孕妇,3例选择终止妊娠,1例失访,另外1例17p12重复的孕妇于39周活产分娩,婴儿随访至1岁3个月未发现异常。

本研究中检出5例多重致病性CNVs,其中1例为4号和6号染色体部分重复,另外4例来自亲代隐性平衡易位后产生的部分三体部分单体,因易位后的片段大小低于人眼的分辨率,故核型分析报告为46,XY或者46,XX。传统的光学显微镜最小可检测到3Mb的染色体片段异常,然而由于各实验室G显带制片水平的差异,分析人员对高分辨染色体带纹敏感性不同,以及易位发生的位置等因素,实际上5~10Mb范围内的片段异常在核型分析过程中极易被漏诊^[14]。本研究通过SNP-array技术,在核型分析未见异常的产前诊断病例中发现了4例亲代存在隐性平衡易位,这类平衡易位在传统的染色体G显带分析技术中,由于易位片段小和易位后异常染色体变化不明显,因此建议亲代行高分辨染色体G显带分析。而且,解读核型报告时要谨慎,如异常片段低于5Mb时,核型报告为46,XY或者46,XX,并去掉未见异常核型的后缀。该5例病例中有4例选择终止妊娠,另1例于孕39周阴道分娩—3800g男婴,随访至1岁2个月,生长发育落后,肌张力低下,语言发育迟缓。

3.3 LOH 本研究共检出38例LOH,其中3例为致病性LOH,占7.9%(3/38),涉及6、15和20号染色体,此3条染色体都有单亲二倍体致病性报道^[15-17]。这3对夫妇双方行SNP-array验证,6号染色体LOH为父源性单亲二倍体,该单亲二倍体可导致新生儿一过性糖尿病,知情同意后孕妇选择继续妊娠,于孕30周剖宫产—1900g男婴,随访至2岁,暂未见异常;15号染色体LOH的病例经验证后提示父源性缺失,确诊为Prader-Willi综合征,家

属知情同意后选择终止妊娠;20号染色体LOH病例超声检查提示胎盘增厚,羊水偏少,但孕妇拒绝进一步验证和随访。

3.4 随访 遗传咨询工作中,随访有着重要的参考意义,但本研究失访率较高,为22.8%(51/224),原因是电话信息有误或者拒绝随访。本研究中35例未致病LOH和78例VOUS在目前的数据库中暂未见有异常病例的报道,不排除随着数据库的积累更新后会出现新发病例,对这部分人群的遗传咨询应谨慎对待,要充分告知其SNP-array技术的意义和局限性,对有产前诊断指征者,在经济条件允许的情况下,应建议行SNP-array和细胞遗传学联合检测,以避免漏诊。

参考文献

- [1] FU F, DENG Q, LEI TY, et al. Clinical application of SNP array analysis in fetuses with ventricular septal defects and normal karyotypes[J]. Arch Gynecol Obstet, 2017,296(5): 929-940.
- [2] FIORENTINO F, NAPOLETANO S, CAIAZZO F, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities[J]. Eur J Hum Genet, 2013,21(7):725-730.
- [3] WALLENBORN M, PETTERS O, RUDOLF D, et al. Comprehensive high-resolution genomic profiling and cytogenetics of human chondrocyte cultures by GTG-banding, locus-specific FISH, SKY and SNP array[J]. Eur Cell Mater, 2018, 35:225-241.
- [4] VOSECKÁ T, MUSIL Z, ViCHA A. Detection of chromosome changes by CGH, array-CGH and SNP array techniques in tumours[J]. Cesk Patol, 2014,50(1):25-29.
- [5] KEARNEY HM, THORLAND EC, BROWN KK, et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants[J]. Genet Med, 2011,13(7):680-685.
- [6] 吴莉,钟进,索冬梅,等. 染色体微阵列技术在产前诊断先天性心脏病中的应用价值[J]. 广东医学,2017,38(23):3595-3598.
- [7] 常亮,赵楠,魏媛,等. 单核苷酸多态性微阵列与染色体核型分析的产前诊断意义比较[J]. 北京大学学报(医学版), 2014,46(5):676-680.

- [8] RIEDIJK S, DIDERICH KE, VAN DER STEEN SL, et al. The psychological challenges of replacing conventional karyotyping with genomic SNP array analysis in prenatal testing[J]. J Clin Med, 2014, 3(3):713-723.
- [9] SREBNIK MI, DIDERICH KE, JOOSTEN M, et al. Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: causative, unexpected and susceptibility CNVs [J]. Eur J Hum Genet, 2016, 24(5):645-651.
- [10] 景柏华, 陈俊雅, 范丽欣, 等. 胎儿侧脑室不对称的临床意义及预后[J]. 中华围产医学杂志, 2018, 21(6):417-421.
- [11] 吴坚柱, 周祎, 杨柳, 等. 早孕期超声异常胎儿的染色体核型分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(3):408-411.
- [12] 吴轲, 唐少华, 陈冲, 等. 产前超声异常胎儿的全基因组拷贝数变异分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(2):178-182.
- [13] ROSENFELD JA, COE BP, EICHLER EE, et al. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations [J]. Genet Med, 2013, 15(6):478-481.
- [14] Batzir NA, Shohat M, Maya I. Chromosomal microarray analysis (CMA) a clinical diagnostic tool in the prenatal and postnatal settings[J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2015, 13(1):448-454.
- [15] LEUNG WC, LAU WL, LO TK, et al. Two IUGR fetuses with maternal uniparental disomy of chromosome 6 or UPD (6)mat[J]. J Obstet Gynaecol, 2017, 37(1):113-115.
- [16] IZUMI K, SANTANI AB, DEARDORFF MA, et al. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 15 in Prader-Willi syndrome: utility of genome-wide SNP array [J]. Am J Med Genet A, 2013, 161(1):166-171.
- [17] MULCHANDANI S, BHOJ EJ, LUO M, et al. Maternal uniparental disomy of chromosome 20: a novel imprinting disorder of growth failure[J]. Genet Med, 2016, 18(4):309-315.

(收稿日期:2020-10-17)

编辑:宋文颖