

孕妇年龄、孕周及体重指数对孕妇外周血中胎儿游离DNA比例的影响

薛莹 丁洁 贺权泽 王挺

(南京医科大学附属苏州医院 生殖与遗传中心,江苏 苏州 215000)

【摘要】 目的 无创产前诊断(noninvasive prenatal testing, NIPT)是通过提取母体外周血中游离DNA,经高通量测序技术和生物信息学分析,发现游离DNA中是否存在比例异常的染色体,进而判断胎儿是否存在染色体非整倍体。孕妇外周血中胎儿游离DNA比例是影响NIPT准确性的重要因素,评价孕妇年龄、孕周和体重指数(body mass index, BMI)对胎儿游离DNA比例的影响对提高NIPT的准确性有重要意义。**方法** 回顾性分析了2015年3月至2016年5月苏州市立医院2563例孕有正常男性胎儿孕妇的NIPT检测结果及相关数据,提取孕妇外周血胎儿游离DNA浓度、孕妇年龄、孕周和体重指数等信息,对以上参数进行了归一化处理后再进行相关性分析,挖掘孕妇年龄、孕周和BMI对孕妇外周血中胎儿游离DNA比例的影响。**结果** 数据显示孕妇外周血中胎儿游离DNA比例与孕周呈正相关(线性回归方程 $y=0.003x+0.060$, $R^2=0.752$, $P=0.01144$);孕妇年龄与BMI也呈正相关(线性回归方程 $y=0.112x+18.80$, $R^2=0.721$, $P=6.46E-08$);而胎儿游离DNA比例与孕妇BMI、年龄均呈负相关,且在样本量较大时相关性显著。**结论** 孕妇年龄、BMI的增加都会相对降低孕妇外周血中胎儿游离DNA的比例,孕妇年龄越大则BMI也会相对越大,而孕周的增大会提高孕妇外周血中胎儿游离DNA比例,因此,针对高龄且高BMI值的孕妇适当延后进行NIPT的孕周可以提高NIPT检测的准确性。

【关键词】 无创产前诊断;孕妇外周血中胎儿游离DNA比例;年龄;孕周;体重指数

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Noninvasive prenatal testing is a new technology based on the fact that fetal DNA has been found in maternal plasma. Therefore, by extracting cell-free DNA from maternal plasma with then high through sequencing and bioinformatic analysis, screening of fetal aneuploidy become reality. However, the fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma is an essential factor which affect accuracy of Noninvasive prenatal testing, therefore, to evaluate the factors which relate to fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma, such as maternal age, gestational age and body mass index, could improve the accuracy of Noninvasive prenatal testing. **Method** 2563 male pregnancies that received Noninvasive prenatal testing at Center for Reproduction and Genetics of Nanjing Medical University Affiliated Suzhou Hospital from March, 2015 to May, 2016 were involved in this study, and the relationship between maternal age, gestational age, body mass index and fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma were performed normalization and then analysed by correlation analysis. **Results** The pregnant woman aged about 27 and account mostly in this study and the average gestational age was 17~18 weeks. The peak of body mass index and fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma were 22 kg/m² and 0.12, respectively. The correlation analysis showed positive correlation between gestational age and fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma (Linear e-

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2017.03.002

基金项目:江苏省卫生厅青年项目(Q201412);江苏省临床医学科技专项(BL2013019);苏州市科技支撑计划项目(SS201429);苏州市临床医学中心项目(SZZX201505)

* 通讯作者:王挺, E-mail: biowt@163.com

quation of regression: $y = 0.003x + 0.060$, $R^2 = 0.752$, $P = 0.01144$), and displayed negative correlation between maternal age, BMI and fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma, the maternal age and body mass index also displayed positive correlation (Linear equation of regression: $y = 0.112x + 18.80$, $R^2 = 0.721$, $P = 6.46E-08$). **Conclusions** The fraction of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma showed reserved trend of maternal age and body mass index, but displayed same trend with gestational age, and maternal age and body mass index showed negative correlation. Therefore, appropriate gestational age of noninvasive prenatal testing should be given for those pregnancies had advanced maternal age and higher body mass index.

【Key words】 maternal age; gestational age; body mass index; circulating cell-free fetal DNA; noninvasive prenatal testing

自从1997年卢煜明^[1,2]教授在孕妇外周血中发现胎儿游离DNA,为无创产前诊断打开了一扇新的大门。近些年随着新一代测序技术(next generation sequencing, NGS)的快速发展使得无创产前诊断(noninvasive prenatal testing, NIPT)在临床上得到了很好的应用^[1]。NIPT是通过提取母体外周血中游离DNA,经高通量测序技术和生物信息学分析,发现游离DNA中是否存在比例异常的染色体,进而判断胎儿是否存在染色体非整倍体。如果胎儿游离DNA的比例过少,则无法正确反映胎儿的游离DNA在各染色体上的分布情况,很容易影响NIPT检测结果的准确性^[3]。影响胎儿游离DNA比例的因素有很多种,如孕周、孕妇体重等^[4],因此对影响胎儿游离DNA比例的多重因素进行分析,对于提高NIPT的准确性有重要意义。体重指数(body mass index, BMI)是当今国际上常用的衡量人体胖瘦程度以及是否健康的一个标准^[5],是一种比体重更准确的健康评价标准,由于人种间的差异中国人BMI明显低于西方人的BMI,因此中国人BMI分级标准与西方人略有差异^[6]。本研究通过综合分析2563例孕有正常男性胎儿孕妇的BMI、孕周和年龄,找出其对胎儿游离DNA比例的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾性分析2015年3月至2016年5月在苏州市立医院生殖与遗传中心进行无创产前筛查检测且资料记录完整的孕有男性胎儿孕妇的NIPT检测结果,去除双胞胎、试管婴儿、肝炎病毒阳性、超声异常、不良孕产史、家族遗传病、癌症等异常情况,共计2563例样本用于分析

孕妇年龄、孕周和BMI对孕妇外周血中胎儿游离DNA比例的影响。NIPT检测方法选用中山大学达安基因公司的基因测序仪和胎儿染色体非整倍体21-三体、18-三体和13-三体检测试剂盒(半导体测序法)。

1.2 研究方法

1.2.1 体重指数(body mass index, BMI)计算及分级方法 根据文献报道^[7],BMI的计算公式: $BMI = \text{体重(kg)} / \text{身高(m)}^2$

1.2.2 胎儿游离DNA比例计算方法 胎儿游离DNA比例计算公式^[8]:胎儿游离DNA比例(f) = $\frac{\%chrYmf - \%chrYff}{\%chrYam - \%chrYff}$

其中%chrYmf为孕有男性胎儿孕妇血浆中Y染色体的百分比,%chrYff为所有孕有男性胎儿孕妇血浆中Y染色体的百分比中值,%chrYam为成年健康男性血浆中Y染色体百分比的中值。

1.2.3 相关性分析 本研究分别对孕周与胎儿游离DNA比例、孕妇BMI与胎儿游离DNA比例、孕妇年龄与孕妇BMI、孕妇年龄与胎儿游离DNA比例做了相关性分析,具体方法如下:

①数据分组:胎儿游离DNA比例与孕周有较强的正相关性,为消除其在相关性分析的影响,我们根据孕周进行分组(孕周12~14、15~16、17~18、19~20、21~22、23~24及25~26)。

②孕妇年龄与BMI相关性分析:根据孕妇年龄对孕妇BMI进行分组并计算每组BMI的中值,分组后去除样本数小于5的组,然后使用孕妇年龄和对应BMI中值进行相关性分析。

③胎儿游离DNA比例与孕周相关性分析:根

据孕周对孕妇胎儿游离 DNA 比例进行分组,计算每组孕周和胎儿游离 DNA 比例中值,分组后去除样本数小于 5 的组,然后使用孕周和对应胎儿游离 DNA 的中值比例进行相关性分析。

④胎儿游离 DNA 比例与孕妇年龄相关性:将孕妇按照不同孕周进行分组,由于孕 21~22,23~24,25~26 这 3 组的孕妇数量过少,因此将这 3 组并为 1 组(孕周 12~14、15~16、17~18、19~20 及 21~26)。

为了消除孕妇 BMI 对胎儿游离 DNA 比例的影响,对胎儿游离 DNA 浓度进行了数据校正,校正后胎儿游离 DNA 比例命名为 cfEB(circulating cell-free fetal DNA of each BMI),每单位 BMI 对应的胎儿游离 DNA 比例,校正方法公式(3): $cfEB = \text{胎儿游离 DNA 比例} / \text{BMI} \times 1000$ (3)。然后计算不同孕周下孕妇年龄与对应 cfEB 中值的相关性。

⑤胎儿游离 DNA 比例与孕妇 BMI 相关性:为了消除孕妇年龄对该相关性分析的影响,对胎儿游离

DNA 浓度进行了数据校正,校正后胎儿游离 DNA 比例命名为 cfEA(circulating cell-free fetal DNA of each age,每单位年龄对应的胎儿游离 DNA 比例),校正方法公式(4): $cfEA = \text{胎儿游离 DNA 比例} / \text{孕妇年龄} \times 1000$ (4),计算不同孕周下 BMI 与对应 cfEA 中值的相关性(分组同上)。

2 结果

2.1 样本分布分析 如图 1a 所示,本研究中孕妇的年龄呈现为两个峰值,分布在 26 岁和 35 岁,其中 ≥ 35 岁的有 681 人(26.57%)。图 1b、c、d 分别为本研究中孕妇孕周、BMI 和胎儿游离 DNA 比例的分布图,本研究所有样本的孕周、BMI 及胎儿游离 DNA 比例均只有一个峰值,孕周峰值在 17~18 周, BMI 峰值在 21~22 kg/m²,胎儿游离 DNA 比例峰值为 0.12。从图 2 我们可以看出,随着孕周的增大,高龄孕妇的比例逐渐下降。

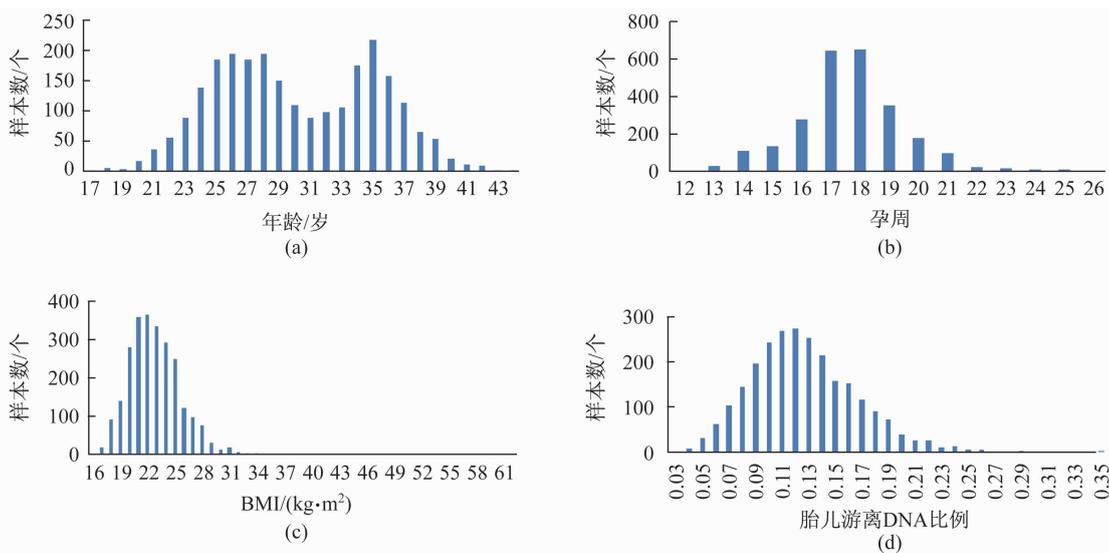


图 1 本研究中样本各参数分布(a)年龄;(b)孕周;(c)BMI;(d)胎儿游离 DNA 比例

2.2 孕妇年龄、孕周及孕妇 BMI 对胎儿游离 DNA 比例的影响 如图 3 所示,胎儿游离 DNA 比例与孕周呈现明显正相关性($R^2 = 0.7526, P = 0.01144$),与先前的文献报道结果一致^[4]。基于孕周对胎儿游离 DNA 的影响,我们根据孕周对孕妇进行了分组,并对胎儿游离 DNA 比例进行了不同的归一化后分别计算了孕妇年龄、孕妇 BMI 和胎儿游离 DNA 比例的相关性。图 4 为孕妇年龄与孕妇 BMI 的相关性分析,我们可以看出,随

着孕妇年龄的增大,孕妇的 BMI 也明显增大。如图 5 所示,在 17~18 周时,孕妇的年龄与胎儿游离 DNA 浓度呈现为较强的负相关性($R^2 = 0.7114, P = 1.59E-06$);在 15~16 周和 19~20 周时,孕妇的年龄与胎儿游离 DNA 浓度也有一定的负相关性($R^2 = 0.3372, R^2 = 0.4201$)。但是在 12~14 周和 21~26 周时,孕妇年龄与胎儿游离 DNA 呈现的相关性很小(图 5a、e),可能是因为 12~14 周和 21~26 周的孕妇样本分布较少(图

1B)且孕周跨度较大造成的。图6为不同孕周下孕妇BMI与胎儿游离DNA比例的相关性,从图中我们可以看出除12~14孕周外,孕妇BMI均与胎儿游离DNA均呈现较强的负相关性(分别为 $R^2=0.9927, R^2=0.7298, R^2=0.7095, R^2=0.7509$)。

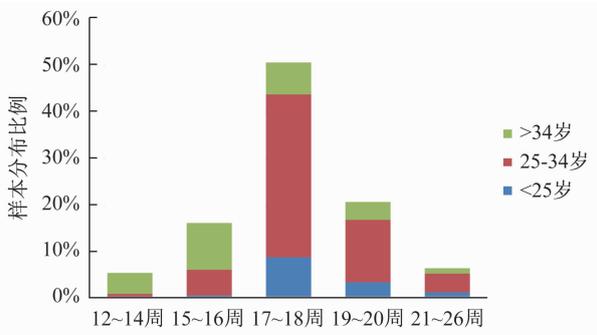


图2 本研究中不同孕周下孕妇年龄分布

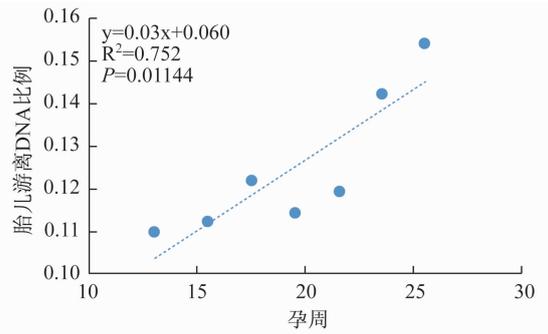


图3 孕周与胎儿游离DNA比例的线性相关性

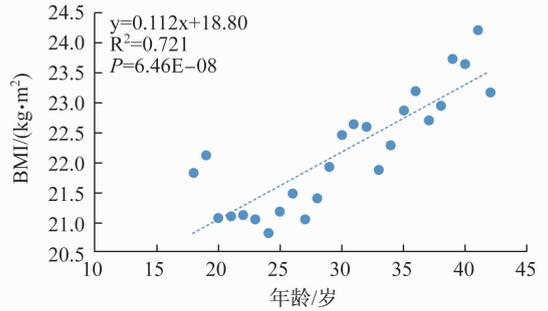


图4 孕妇年龄与BMI的线性相关性

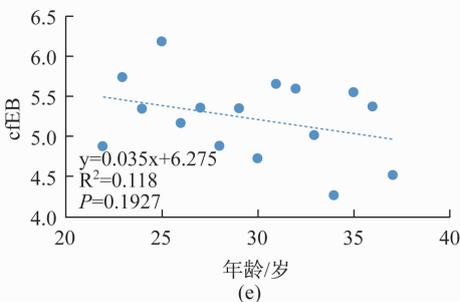
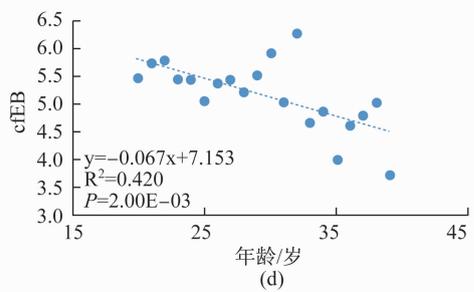
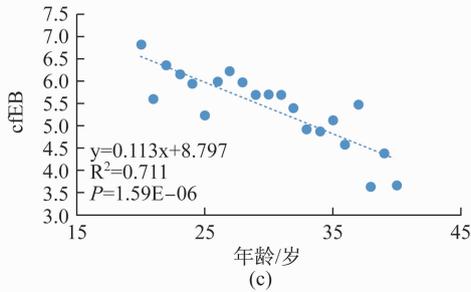
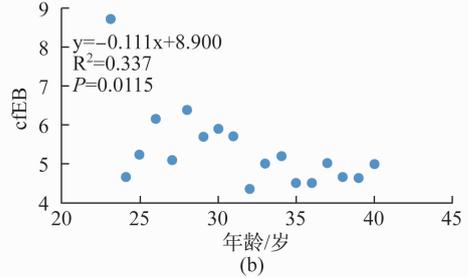
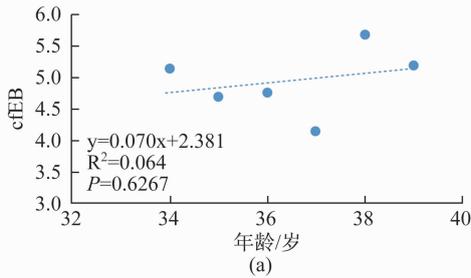


图5 不同孕周下孕妇年龄与cfEB的相关性;(a)12~14周;(b)15~16周;(c)17~18周;(d)19~20周;(e)21~26周

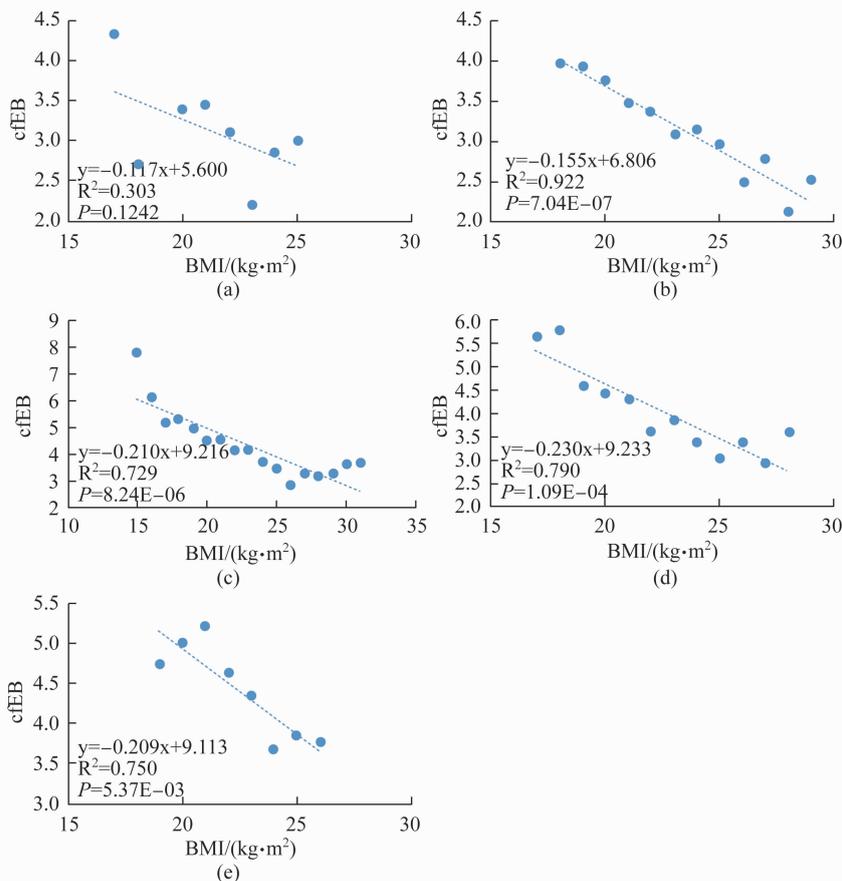


图 6 不同孕周下孕妇 BMI 与 cfEA 的相关性;(a)12~14 周;(b)15~16 周;(c)17~18 周;(d)19~20 周;(e)21~26 周

3 讨论

从图 3~6 可以看出,胎儿游离 DNA 比例与孕妇进行 NIPT 检查的孕周、孕妇的 BMI 及孕妇的年龄都有一定的相关性,而孕妇的 BMI 与孕妇年龄也有一定的相关性;整体趋势为孕妇进行 NIPT 的孕周越早胎儿游离 DNA 比例越低;孕妇的 BMI 越大则胎儿游离 DNA 比例越低;孕妇的年龄越大则 BMI 相对越大,在一定孕周下孕妇年龄越大胎儿游离 DNA 浓度也越低。表 1 为 17~18 周孕妇在不同年龄和 BMI 下的胎儿游离 DNA 比例分布,从表上可以明显看出,胎儿游离 DNA 比例小于 0.10 的孕妇都分布在 BMI≥24 样本中,并主要分布在 BMI≥28 的孕妇中,而 BMI≥28 的孕妇中,有 19.5% 的孕妇年龄≥35 岁且胎儿游离 DNA 比例小于 0.10,因此在一定孕周下孕妇的年龄和 BMI 越大,胎儿游离 DNA 的比例则越低。

从样本分布来看,进行 NIPT 的人群分布主要为

25~27 岁的孕妇和高于 35 岁的高龄孕妇,而高龄产妇进行 NIPT 检查时的孕周往往低于非高龄产妇进行 NIPT 检测时的孕周(图 2)。通过前期的分析发现胎儿游离 DNA 比例与孕周、孕妇年龄和 BMI 有潜在联系,对以上 3 个因素进行多元线性回归分析发现,在年龄分布不均的情况下,孕妇年龄与胎儿浓度的相关性不明显($P>0.05$),当年龄分布均匀时年龄与胎儿浓度显著相关($P<0.05$)(图 5c)。

根据文献报道^[9],已知胎儿游离 DNA 比例是影响 NIPT 准确性的重要因素,综合以上分析可以发现当前进行 NIPT 的高龄产妇主要有以下几个特点:①高龄;②孕周早;③BMI 较大。这几个特点都会造成胎儿游离 DNA 比例过低。且通过文献报道已知,高龄孕妇孕有 21-三体综合征的概率明显高于低龄孕妇^[10],因此应对高龄且高 BMI 的孕妇选择合适的孕周进行 NIPT 检测。同时,在孕妇进行产前遗传咨询时,建议孕妇相对控制体重,也对提高 NIPT 的准确性有一定的帮助。

表 1 17~18 周孕妇在不同年龄和 BMI 下的胎儿游离 DNA 比例分布

年龄(岁)	胎儿游离 DNA 比例(%)			
	BMI<18.5	18.5≤BMI<23.9	24.0≤BMI<27.9	BMI≥28.0
≤20	0.18±0.06	0.12±0.03	/	0.04
21	0.15±0.06	0.12±0.03	0.11±0.04	0.05
22	0.14±0.04	0.14±0.03	0.07±0.02	0.07
23	0.15±0.05	0.13±0.03	0.11±0.03	/
24	0.18±0.08	0.13±0.04	0.10±0.04	/
25	0.16±0.06	0.12±0.04	0.10±0.03	0.11±0.03
26	0.16±0.06	0.14±0.03	0.11±0.04	0.20
27	0.14±0.04	0.13±0.03	0.12±0.03	0.10±0.02
28	0.14±0.04	0.13±0.03	0.12±0.04	0.11
29	0.18±0.04	0.13±0.04	0.10±0.03	0.06±0.04
30	0.15±0.03	0.14±0.05	0.10±0.03	0.11±0.02
31	0.14	0.14±0.05	0.11±0.02	0.19
32	0.17	0.13±0.05	0.11±0.04	0.08
33	0.13±0.03	0.12±0.05	0.11±0.03	0.10±0.04
34	0.12	0.11±0.04	0.11±0.03	0.09±0.04
35	0.14±0.02	0.12±0.04	0.11±0.04	0.07±0.03
36	0.15	0.11±0.03	0.10±0.04	0.10±0.03
37	/	0.13±0.05	0.14±0.02	0.13±0.01
38	0.17	0.10±0.04	0.06±0.01	0.10
39	/	0.12±0.03	0.10±0.04	0.09±0.02
≥40	/	0.13±0.04	0.09±0.03	0.04

参 考 文 献

- [1] Devers PL, Cronister A, Ormond KE, et al. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors[J]. J Genet Couns, 2013,22(3): 291-295.
- [2] Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [3] Kim SK, Hannum G, Geis J, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(8): 810-815.
- [4] Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell - free DNA in maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(7): 662-666.
- [5] Deurenberg P, Deurenberg-Yap M, Guricci S. Asians are different from Caucasians and from each other in their body mass index/body fat per cent relationship[J]. Obes Rev, 2002, 3(3): 141-146.
- [6] Zhou BF. Predictive values of body mass index and waist circumference for risk factors of certain related diseases in Chinese adults: study on optimal cut - off points of body mass index and waist circumference in Chinese adults[J]. Biomed Environ Sci, 2002, 15(1): 83-96.
- [7] 师婕, 张帆. 产时孕妇体重指数与新生儿体重及分娩方式的关系[J]. 内蒙古医学杂志, 2006, 38(12): 1197.
- [8] Wang T, He Q, Li H, et al. An optimized method for accurate fetal sex prediction and sex chromosome aneuploidy detection in non-invasive prenatal testing[J]. PloS One, 2016, 11(7): e0159648.
- [9] Kinnings SL, Geis JA, Almasri E, et al. Factors affecting levels of circulating cell - free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(8): 816-822.
- [10] Loane M, Morris J K, Addor M C, et al. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening[J]. Eur J Hum Genet, 2013, 21(1): 27-33.

(收稿日期:2017-02-13)

编辑:宋文颖