

新分子学技术在产前诊断非整倍性染色体疾病中的应用

SOGC

【摘要】 目的 综述分子学技术在快速产前诊断胎儿非整倍性染色体疾病中的应用进展,及尚处于研发阶段的新技术。**局限性** 本文仅初步探讨了快速非整倍性染色体疾病诊断的方案。**证据来源** MEDLINE 数据库 1992 年至今的相关文献,本文提供其摘要信息。**证据价值** 本报道所涉及技术进展由加拿大妇产科学会基因委员会提供,由加拿大妇产科学会执行委员会批准。**收益、风险及成本** 本进展提供了分子学技术快速诊断非整倍性染色体疾病的方法,以及支持上述技术在胎儿产前诊断临床应用的证据。此类方法在诊断胎儿非整倍性染色体疾病方面具有可靠、低成本的特点,但在诊断整倍体性的染色体畸变等疾病方面,部分疾病虽然临床特征很显著,这些分子学技术仍显示出不足之处。

1 简要说明

目前可利用的非整倍性染色体疾病快速诊断(RAD)方法包括荧光原位杂交(FISH)及定量荧光聚合酶链反应(QF-PCR)。多样性连接依赖的探针扩增技术(MLPA)是仍处于研究阶段的新技术。

已知 FISH 和 QF-PCR 技术(目前已有的证据也显示 MLPA 技术),在细胞遗传学全核型分析方面拥有相似的敏感性和特异性(目前是检测 13、18、21 及性染色体的“金标准”)。MLPA 和 QF-PCR 技术的优势在于显著地降低了检测时间,且自动化检测批量样本使得单位样本的检测费用大大降低。FISH 技术难以做到自动化,仍比 PCR 技术检测费用高。

目前非整倍性染色体疾病快速诊断(RAD)方法的主要缺陷是无法检测目标染色体除了非整数倍性染色体疾病以外的染色体畸变。其中一些疾病在临床上可预测有一定的发病率。

未来,RAD 技术可能适合胎儿非整倍体畸形风险增加而需侵入性诊断明确的孕妇,但不适合有其他风险如 B 超提示的胎儿结构异常或有染色体重排(如平衡易位)的个人或家族史者。此类孕妇仍需进行细胞遗传学全核型分析。

在产前诊断中引入这项新技术时应该综合分析它所带来的风险、收益和成本。RAD 技术可能在未来在羊水穿刺诊断非整数倍染色体病方面,作为全染色体核型分析的替代技术。然而,争论的焦点在于侵入性诊断方法将增加妊娠的风险,使得“完整”的检测更能获得接受。因此,产前分子生物学技术需要有更多低成本的染色体疾病的诊断。

本文仅综述该领域当前的临床和科学研究进展。文中所涉及内容不应作为授课内容或成为指导临床治疗和操作的依据。各地学术机构可以对本文内容和观点做修正。若根据当地水平和情况作相应修正的,需做好备案或记录。若未获得 SOGC 组织书面许可,禁止以任何形式复制本文内容。

2 引言

加拿大预防及健康中心推荐产前筛查染色体疾

主要作者:Rebecca Sparkes MD, Calgary AB, Jo-Ann Johnson MD, Calgary AB, Sylvie Langlois MD, Vancouver BC

加拿大妇产科学会基因委员会成员:R. Douglas Wilson(Chair), MD, Philadelphia PA, Victoria Allen, MD, Halifax NS, Claire Blight, RN, Halifax NS, Valerie Desilets, MD, Montreal QC, Alain Gagnon, MD, Vancouver BC, Jo-Ann Johnson, MD, Calgary AB, Sylvie Langlois, MD, Vancouver BC, Anne Summers, MD, North York ON, Phil Wyatt, MD, PhD, Toronto ON

本报道所涉及技术进展由加拿大妇产科学会基因委员会提供,由加拿大妇产科学会执行委员会批准。

本刊的中文翻译获得 SOGC 的许可,特此感谢加拿大妇产科学会的大力协助!原文发表于《J Obstet Gynaecol Can》. 2008;30(7):617-621

病,特别是对唐氏综合征的筛查,并允许孕妇自己做出是否继续妊娠的选择^[1]。通过羊水穿刺或绒毛膜活检技术进行的检查有0.5%的流产风险,且上述技术受到有限公共医疗资源的限制而不能推广。因此,新的指南建议通过非侵入性方法筛选唐氏综合征高风险的孕妇作为侵入性检查的对象^[2]。除了诊断唐氏综合征、13和18三体,在某些情况下仍需用到侵入性检查。例如B超发现胎儿结构异常,或父母一方有染色体重排可能造成胎儿染色体异常时,其他类型的染色体异常(缺失或重叠)风险增加,仍需用到侵入性检查。

G显带全核型分析是目前对高风险胎儿染色体病标准的侵入性检查方法,检出率大于1/300,这和该技术导致的流产率接近。核型分析在诊断常染色体13、18、21三倍体和性染色体一些非倍数性畸变时有100%的敏感性和特异性,这些畸形占胎儿染色体结构异常的大部分且与孕妇年龄偏大有关^[3]。此外,核型分析在检测其他染色体畸形时也有作用,包括数目上(如三体和特定结构异常染色体)和结构上(缺失、易位、倒置或插入),其分辨能力在1 000万个碱基对左右。这种染色体畸变常与母亲年龄无明显关系且与生化筛查结果无关,常为偶然发现或超声提示胎儿结构异常时检出^[4,5]。

核型分析也有很多应用上的局限^[6]。由于检测需要细胞培养和收获,同时需要大量实验分析处理,故全核型分析需要7~14天时间。各个实验室的核型分析费用不一,平均一次全核型分析大约需要500加元,包括材料和技术人员时间(J. Chernos, personal communication, June 2006)。为研制有力的分子基因检测技术目前已投入大量努力,这种技术分析前无需细胞培养并可以实现自动化,因此可以提供更加快捷的检测结果同时降低医疗费用,节约医疗资源。这种新方法的主要缺陷是无法检测目标染色体除了非整数倍性染色体疾病以外的染色体畸变,而其中一些疾病在临床上有显著的发病率。

3 非整倍性染色体疾病快速诊断方法

目前临床应用的有效的RAD检测技术主要有2种:FISH和QF-PCR,需要指出的是它们作为核

型分析的补充,而不是替代。MLPA是一项针对其他适应证的新技术,目前仍处于研究阶段,将来可能用于产前诊断。

3.1 荧光原位杂交(FISH)

3.1.1 技术 FISH应用一个荧光标记的探针,以发现一段特定的DNA序列,这个探针可与其选择性配对^[7]。产前诊断时,FISH用于非培养的,分裂间期的细胞。为了达到快速诊断的目的,探针特异性的检测13、18、21、X和Y染色体。样本用显微镜观察,每个细胞内的荧光信号代表该细胞内目标染色体的拷贝数。操作指南要求计数100个细胞,以排除超过10%~15%的染色体镶嵌,该水平近似于全核型分析。

3.1.2 临床应用 在英国和欧洲,对分裂间期的细胞进行FISH检测非常广泛,常结合全核型分析^[8,9]。在加拿大大多数研究中心,FISH作为染色体异常高风险和高龄妊娠附加检查,以便为决定终止妊娠的夫妇提供更快速的诊断。FISH也可用于诊断与胎儿结构畸形相关的几种常见染色体微缺失(22号染色体长臂11位点基因缺失综合征,与某些心脏畸形有关)或者夫妇已生育一染色体微缺失的后代。

3.1.3 优点和局限 在英国一项医疗技术评估中,FISH对目标染色体非整倍性缺失敏感性和特异性均为100%^[10]。另一个优点是可以诊断三体性。FISH主要的局限和限制其费用降低的因素是FISH需人工操作^[10,11]。FISH分析需要大量的时间及熟练的技术。母体细胞富集(少见)可干扰检测诊断。此外FISH和全核型分析使得费用加倍,可达1 000美元(J. Chernos, personal communication, June 2006)。

3.2 荧光定量聚合酶链反应

3.2.1 技术 聚合酶链反应(PCR)是一项公认的分子遗传学技术,它通过特异性引物结合来选择性地扩增相应的染色体DNA片段。荧光定量聚合酶链反应(QF-PCR)是一项可以测量DNA序列拷贝数的新技术^[11-13]。通过QF-PCR技术,科学家可以对未培养的羊水细胞或绒毛中提取的DNA中感兴趣的染色体上(13,18,21,X和Y)特异的DNA多态性标记物进行扩增。荧光标记引物结合到每个靶

序列,使 DNA 聚合酶链复制,合成双链 DNA。扩增后,毛细管电泳分离产物。计算机辅助测量荧光信号强度可以测量每个靶序列即每个染色体的拷贝数。

3.2.2 临床应用 在一些欧洲国家,例如英国,QF-PCR 普遍被用于检测常染色体和性染色体的非整倍体异常^[14-17]。目前,这一技术在加拿大并没有被普遍用于产前诊断。

3.2.3 优势和局限性 根据英国健康技术评估,QF-PCR 技术在检测非整倍体异常上与原位杂交技术(FISH)以及核型分析一样是可靠、精确的,并且其灵敏度和特异度分别达到 95.65% 和 99.97%^[10]。此外,这一技术还可以准确地检测出三倍体。QF-PCR 技术可以在全核型水平上检测到嵌合体^[18]。由于母源细胞污染而掩盖胎儿染色体核型异常的问题被减少到最低,并在少数研究中这一结果是模棱两可的,通过比较母亲的血液样本可以用来作出裁决^[11]。这一技术相比 FISH 的主要优点是易于自动化操作和样本的定量,从而降低成本至每样本约 20 美元^[10]。然而,大部分诊断实验室使用商业套件来操作 QF-PCR 的,这可能使成本超出这一数额。

3.3 多重连接探针扩增

3.3.1 技术 多重链接探针扩增(MLPA)是一项基于 PCR 的新技术,它可以分辨出 DNA 特异性序列之间的拷贝数的差别^[19]。当 MLPA 探针与邻近靶序列完全杂交,由两部分组成的独特的探针就可以通过 DNA 聚合酶连接在一起,用 1 对通用引物扩增连接好的探针,就可以使所有的靶位点被扩增。通过毛细管电泳后按大小分离产物,每个扩增峰代表特异性探针的扩增产物。通过一系列标准化计算,根据扩增峰的改变就可以测量靶序列甚至每条染色体的拷贝数。

3.3.2 临床应用 MLPA 是一项新兴的技术,并且许多独立的研究团队已将该技术用于非整倍体检测的产前诊断应用^[20-23]。然而,这一新技术并未被那些使用 FISH 或 QF-PCR 的研究中心作为常规的检测方法。MLPA 技术还有其他方面的应用,包括结合 FISH 技术进行微缺失综合症的产前诊断。目

前,更多研究专注于一些 MLPA 试剂盒的研发,以此来进行一些其他方法不能检测的疾病的产前诊断(例如 Prader-Willi 和 Angelman)。

3.3.3 优点和限制 MLPA 技术已被证明是一种快速、简便、可靠的检测方法,并且其成本与 QF-PCR 检测法相差无几^[21]。目前已报道的非嵌合体性非整倍体异常检测的灵敏度为 100%,特异度为 99.8%,但这仅是对 527 例羊水穿刺样本进行检测所得的数据,数据相对较少。MLPA 有许多潜在的优势,包括低成本以及一个样本可以同时扩增多个位点进行检测(最多可达到 40 个)。当然这一技术也有许多不足之处而难以进一步发展,包括无法检测所有的三体综合征;无法确定对嵌合体异常的检测灵敏度;以及该检测方法比较费时。MLPA 目前仍处于研究阶段,尚无法广泛应用于产前诊断。

4 讨论

我们已经分析了 RAD 检测方法的优点及其局限性。显然,分子遗传学作为一个辅助手段,在染色体疾病的产前诊断方面有积极的推动作用,而不是替代细胞遗传学。FISH 和 QF-PCR 技术是众所周知的,而 MLPA 检测法的在胎儿非整倍体检测方面(13、18、21 及性染色体异常)的灵敏度及特异度同全核型分析无差。而 QF-PCR 和 MLPA 检测法相比全核型分析更有优势,表现在大大缩短了检测运转周期、检测自动化、样本定量后降低了每个样本的检测成本。而 FISH 检测法不能做到自动化检测,并且成本高于基于 PCR 的其他检测方法。

在加拿大大多数的研究中心,会对一些高风险妊娠孕妇进行 RAD 检测(主要是 FISH),因为这样可以更快地提供结果给她们以决定是否终止妊娠。RAD 检测资格是基于地区确定的标准来评定的,这需要考虑到额外的成本、阳性结果的可能性、以及对临床管理的影响。例如在一些研究中心,对怀有非整倍体胎儿风险达到 1/20 甚至更高的妇女或者妊娠晚期孕妇可进行 FISH 检测。在这种情况下,认为 RAD 进是一项辅助检测,仍推荐采取全细胞遗传学核型分析检测。

FISH 或者 QF-PCR 检测方法是否是这些情况

下惟一的选择是有争议的^[5,13,17,24-27]。支持者认为使用 QF-PCR 进行快速非整倍体检测是一种高性价比的方法,这可以对筛查阳性的孕妇检测出绝大多数有临床意义的染色体异常。这一方法不仅快速,并可以准确地进行染色体技术,接近 100%地检测出 13、18、21 三体及单倍体 X 等染色体异常,而无需进行全核型分析。反对者坚决主张任何对于染色体异常检测的漏检都是不可接受的。他们认为抚养残疾孩子对于其父母的无形付出比起快速非整倍体检测为他们省去的费用沉重得多。需要强调的是,对于所有超声检测出异常的病例(包括胎儿颈项透明测量大于 3.5mm 以及胎儿异常)或者有疾病遗传史的孕妇,全核型分析作为备用培养检测方式是必要的。

另一个支持 RAD 检测的理由是这可以避免使用侵入性方法对罕见的染色体异常进行不必要的检测鉴定(13、18、21 三体异常)。染色体异常预测结果通常是没有或者不确定,这在遗传咨询上临床意义的表述是有困难的,这有可能会引起孕妇夫妇的焦虑,可能会导致想继续妊娠的孕妇选择终止妊娠。然而事实上,其他染色体异常的预测(或有可能)有临床意义,Ogileve 等^[24]指出对于一般人群而言,非整倍体染色体异常的检测率在产前和产后是相似的。孕妇通常因为怀有非整倍体胎儿风险较高而要承受侵入性检测,但其实她们生育非整倍体染色体异常胎儿的风险并不比未选中的妊娠妇女高^[4]。

在产前诊断方面,如同其他医疗领域,进展的衡量标准是随着时间的推移是否可以为患者提供更多的信息和选择(例如,更多的筛查方法选择和更好的诊断性检测)。然而在某些情况下,仅做 RAD 检测来替代核型分析意味着给孕妇提供更少的信息,而不是更多。分子生物学技术很可能成为解决这一问题的关键,从而可以向患者提供更多的信息。MLPA 和微阵列分析(Rickman 等^[3,28]的综述)这些最佳的技术可以同时检测更多的疾病,同时,生物技术行业的竞争也大大降低了检测的成本。可以想象在不远的将来,接受羊水穿刺的妇女可以通过这一项检查来选择检测全部或者部分染色体非整倍体异

常,而所需的费用比目前的核型分析要低。

词汇表

非整倍体:染色体数目不是 23 的整倍数,通常是指在配子产生过程中由于减数分裂时未发生分离错误引起的。

常染色体:除了性染色体外的其他染色体。

染色体:包含一条 DNA 单链的线性结构,人体通常含有 46 条染色体,分成 23 对。

DNA 杂交:标记的 DNA 探针与互补的靶序列结合。

染色体组型:一个人的染色体组成,即个体的染色体显微照片,系统地排列成 23 对。

单体型:1 条染色体缺失。

嵌合型:个体或组织中存在 2 个或更多不同基因型的细胞系。

染色体数量畸变:染色体数量不是 46。

染色体结构畸变:染色体数量为 46,但存在部分染色体缺失(删除)、增加(插入)或重排(易位或倒置)。

三倍体:1 条染色体数量为 69(每条染色体存在 3 份拷贝)。

三体型:存在 1 条额外的染色体。

参考文献

- [1] Dick PT. Periodic health examination, 1996 update: 1. Prenatal screening for and diagnosis of Down syndrome. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination[J]. CMAJ, 1996, 154: 465-479.
- [2] Summers AM, Langlois S, Wyatt P, et al. Prenatal screening for fetal aneuploidy[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2007, 29: 146-161.
- [3] Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH[J]. J Med Genet, 2006, 43: 353-361.
- [4] Ryall RG, Callen D, Cocciolone R, et al. Karyotypes found in the population declared at increased risk of Down syndrome following maternal serum screening[J]. Prenat Diagn, 2001, 21: 553-557.
- [5] Leung WC, Lau ET, Lao TT, et al. Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome[J]? Obstet Gynecol, 2003, 101: 856-861.
- [6] Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on

- genomic microarrays[J]. *Hum Reprod Update*, 2004, 10: 221-226.
- [7] Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 51: 55-65.
- [8] Bryndorf T, Christensen B, Vad M, et al. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial[J]. *Prenat Diagn*, 1997, 17: 333-341.
- [9] Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature[J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21: 293-301.
- [10] Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, et al. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities[J]. *Health Technol Assess*, 2003, 7: 1-146.
- [11] Mann K, Donaghue C, Fox SP, et al. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy[J]. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12: 907-915.
- [12] Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms[J]. *Hum Mol Genet*, 1993, 2: 43-50.
- [13] Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk[J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6: 855-860.
- [14] Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5: 1176-1179.
- [15] Cirigliano V, Ejarque M, Canadas MP, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies[J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7: 1001-1006.
- [16] Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, et al. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies[J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8: 1042-1045.
- [17] Leung WC, Waters JJ, Chitty L. Prenatal diagnosis by rapid aneuploidy detection and karyotyping: a prospective study of the role of ultrasound in 1589 second-trimester amniocenteses [J]. *Prenat Diagn*, 2004, 24: 790-795.
- [18] Donaghue C, Mann K, Docherty Z, et al. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis[J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25: 65-72.
- [19] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e57.
- [20] Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, et al. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) [J]. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13: 171-175.
- [21] Hochstenbach R, Meijer J, van de BJ, et al. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) [J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25: 1032-1039.
- [22] Gerdes T, Kirchhoff M, Bryndorf T. Automatic analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification products (exemplified by a commercial kit for prenatal aneuploidy detection) [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26: 4327-4732.
- [23] Slater HR, Bruno DL, Ren H, et al. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA) [J]. *J Med Genet*, 2003, 40: 907-912.
- [24] Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, et al. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing[J]. *BJOG*, 2005, 112: 1369-1375.
- [25] Caine A, Maltby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment[J]. *Lancet*, 2005, 366: 123-128.
- [26] Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future[J]. *Pathol Biol*, 2003, 51: 156-160.
- [27] Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, et al. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study[J]. *BMJ*, 2006, 332: 452-455.
- [28] Rickman L, Fiegler H, Carter NP, et al. *Eur J Med Genet*, 2005, 48: 232-240.