

无创产前基因检测技术在胎儿染色体非整倍体筛查中的应用研究

杨洁霞 郭芳芳 彭海山 齐一鸣 王东梅 侯亚平 欧阳浩新 尹爱华*

(广东省妇幼保健院, 广东 广州 511442)

【摘要】 目的 探讨高通量测序平台的无创基因检测技术应用于产前诊断的可行性。**方法** 选择 2012 年 4 月到 2013 年 5 月在广东省妇幼保健院产前诊断中心就诊, 孕龄 12~32 周的 3711 例单胎妊娠高危孕妇, 记录临床指征、年龄、孕周等数据。采用高通量测序平台的无创产前基因检测技术对其外周血游离胎儿 DNA 进行分析。检测结果为高危的孕妇行羊膜腔穿刺或脐血穿刺术进行胎儿染色体核型分析。**结果** 3711 例孕妇中游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术检测出 74 例染色体高风险胎儿, 羊水/脐血核型分析证实其中 59 例为染色体异常, 分别为 41 例 21-三体 and 8 例 18-三体, 4 例 13-三体, 5 例性染色体异常, 1 例其他常染色体异常, 1 例 21-三体和 7 例其他染色体异常证实为假阳性。**结论** 利用高通量测序平台的无创产前基因检测技术可快速、准确地检测出胎儿 13、18、21 染色体非整倍体异常, 其敏感性、特异性与染色体核型分析技术具有较高的一致性。但是对于其他染色体异常准确性还有待技术完善来进一步提高, 对于染色体微缺失、微重复的检测也日益受到众多专家学者的关注, 这也是我们以后研究的方向之一。

【关键词】 游离 DNA; 染色体非整倍体; 无创; 产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Using massively parallel genome sequencing technology to detect pregnant women free DNA in peripheral blood plasma, for fetal chromosomal aneuploidy noninvasive prenatal genetic testing, explore aneuploid noninvasive prenatal genetic testing in the value of prenatal screening and prenatal diagnosis. **Method** From February 2012 to May 2013, a total of 3711 high-risk pregnant women were recruited at Prenatal Diagnostics Center of Guang dong Province MCH, with gestational age from 12 to 34 weeks. Five milliliters of peripheral blood were drawn, the DNA were extracted from mother plasma and barcoded, And test results of high risk which accepted interventional prenatal diagnosis as fetal amniotic fluid or cord blood that is collected by the cell culture underwent karyotype analysis or array-CGH identified chromosome aneuploidy. And all detected pregnant women after childbirth were followed-up. **Results** 3711 cases of pregnant women with a high risk of blood were 74 cases, including 21-trisomy 41 cases; 18-trisomy 8 cases, 13-trisomy 4 cases, sex chromosome abnormalities in 5 cases, other chromosomal abnormalities 1 case. Combined the results of interventional prenatal diagnosis and followed-up, detection rate of this method for 21-trisomy(40/41)、18-trisomy(8/8)、13-trisomy(4/4) reach 100%, the misdiagnosis rate is 1.08%; sex chromosome detection rate and other chromosome detection rate of 100% (6/6), the misdiagnosis rate of 2.43%. **Conclusions** Using non-invasive prenatal genetic testing to detect maternal blood plasma of free fetal chromosomal DNA lines aneuploidy screening for 21-trisomy、18-trisomy and 13 - trisomy, the sensitivity, specificity and chromosomal karyotyping have high consistency. But for the sex

chromosomes and other chromosomal abnormalities often have some limitations, but also need more data accumulate. The technology has the non-invasive, high accuracy, high throughput advantages in clinical which have considerable potential value.

【Key words】 cffDNA; chromosome aneuploidy; non-invasive; prenatal diagnosis

出生缺陷是影响出生人口素质的重要问题,中国每年有1600万新生儿出生,出生缺陷率4%~6%。而染色体异常是导致出生缺陷的重要因素,唐氏综合征又称先天愚型或21-三体综合征,是新生儿常见的染色体病,发生率约为1/800,占小儿三体型染色体70%~80%^[1]。传统的产前诊断方法是通过获取胎儿的绒毛、羊水、脐血或者胎儿的组织来进行诊断,这些手段不容易被妊娠妇女接受;并且也对孕妇和胎儿产生一些潜在的风险^[2]。传统的唐氏综合征筛查血清学和超声筛查方法,灵敏度不够,检出率低^[3],1997年Lo等^[4]发现妊娠妇女的血浆和血清中含有游离的胎儿DNA,为无创性产前诊断提供了新的可能。近年来大规模平行测序技术应用于产前诊断,为无创性产前诊断提供了坚实的技术保障,开辟一条切实可行的有临床应用价值的道路^[5]。章容等^[6]应用无创MPS与染色体非整倍筛查已有相关研究,本文总结了迄今已经完成3711例孕妇的无创筛查结果,旨在探讨非整倍体无创产前基因检测在产前筛查及产前诊断中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择2012年2月至2013年5月在广东省妇幼保健院产前诊断中心就诊,高龄妊娠、唐氏综合征筛查异常孕妇3711例,因有4例无法得到检测结果而剔除,共计3707例纳入研究,对其进行常规方法产前诊断和无创产前基因检测方法的介绍,经过知情同意、自愿选择接受无创产前基因检测,孕龄为12~34周,孕妇年龄17~45岁,B超提示宫内妊娠单活胎。每个参与者签署知情同意书后抽取外周静脉血5ml。

1.2 样本采集、分离 取孕妇外周静脉血5ml,EDTA-K2抗凝,1600×g离心10分钟,上清血浆分离后再次以16000×g离心10分钟。以上两次离心

步骤须在采血后的8小时内进行,血浆存放-80℃冰箱进一步冻存。

1.3 DNA提取和测序分析 600μl母体血浆提取血浆DNA,严格按照说明书操作。提取过程中应设置阴性对照。提取后的DNA在-80℃条件下保存。提取的血浆DNA进行文库构建。使用Q-PCR检测文库产量,定量好的文库经Life Proton测序。

1.4 数据分析 将孕妇血中所有游离DNA全部进行测序,获得分布在每条染色体上真实核酸片段的数量,测序结果经比对、拼接、计算k-mer覆盖度^[7],根据生物信息学分析,计算出每条染色体对应的覆盖深度值,并转化为衡量风险的风险指数,确定胎儿患染色体非整倍体的风险。

1.5 胎儿染色体核型确诊方法 无创产前基因检测结果高风险的孕妇,在知情同意原则下行介入性产前诊断,即采集胎儿羊水或脐血,经细胞培养后行染色体核型分析或array CGH检测确定染色体异常。

1.6 随访结果分析处理 对每一位接受检测的孕妇进行妊娠结局的随访跟踪,记录胎儿出生后情况,有无漏诊病历,以便分析无创检测方法的检出率、假阴性率、假阳性率等。

1.7 统计学处理 统计学处理采用SPSS13.0软件。

2 结果

2.1 接受无创产前基因检测的孕妇的临床资料(表1) 平均年龄(28±5.41)岁,平均孕周(18±4.12)周。

2.2 无创结果高风险孕妇介入性产前诊断结果 无创产前基因检测共提示74例染色体数目异常,其中21-三体43例、18-三体10例、13-三体6例、性染色体异常7例、其他染色体异常8例。74例高风险

患者中 70 例同意做介入性产前诊断,采集胎儿羊水或脐血,经细胞培养后行染色体核型分析或 array CGH 确定染色体非整倍体。确认异常核型 53 例 (75.71%),结果见表 2。结合随访结果,对 21-三体检出率为 100% (41/41),漏诊率为 0,误诊率为 0.027% (1/3707);18-三体检出率为 100% (8/8),漏诊率为 0,误诊率为 0.027% (1/3707);对 13-三体检出率为 100% (4/4),漏诊率为 0,误诊率为 0.054% (2/3707)。

2.3 无创产前基因检测技术对性染色体及其他常染色体的检出情况 该方法共检出性染色体异常 7 例,7 例孕妇全部接受产前诊断染色体核型分析(结果见表 3),检出率为 100% (5/5),漏诊率为 0,误诊率为 0.054% (2/3707)。检出其他常染色体异常 8 例,全部接受羊水或脐血穿刺行 array CGH 检测,1

例结果异常,检出率 100%,误诊率 0.19% (7/3707)。

表 1 3707 例无创产前基因检测孕妇标本临床资料

资料类别	结果
孕妇年龄和体重	
年龄(岁)	28.0±5.41
体重(kg)	50.3±8.56
高龄(≥35岁)[例(%)]	868(23.41%)
初产妇[例(%)]	2558(69.02%)
孕周[例(%)]	
12~15 ⁺ 6周	606 (16.33)
16~19 ⁺ 6周	1776 (47.90)
20~23 ⁺ 6周	1145 (30.90)
≥24 周	180(4.86)
唐筛情况[例(%)]	
高风险	2264(61.70)
临界风险	609(16.27)
低风险	533(14.42)
未做	301(6.14)

表 2 无创产前基因检测高风险结果与介入性产前诊断结果比较

染色体异常	无创高风险(例)	介入性产前诊断结果(例)		符合率(%)	检出率(%)
		相符	不相符		
21-三体	43*	41	1	97.62	100.00
18-三体	10◆	8	1	88.89	100.00
13-三体	6*	4	0	100.00	100.00
性染色体异常	7	5	2	71.43	100.00
其他常染色体异常	8	1	7	11.11	100.00
总计	74	59	11	14.29	100.00

注: * 1 例拒绝做进一步检查,直接引产;◆ 1 例超声畸形直接引产;☆ 2 例超声畸形直接引产

表 3 无创产前基因检测对性染色体异常的检出情况

序号	无创结果	例数	介入性产前诊断结果	符合率(%)
1	XO	2	XO	50.00
2	XXX	2	47, xxx/48, xxxxx	100.00
3	XXY	2	47. XXY	100.00
4	XYY	1	47. XYY	100.00

3 讨论

染色体数目或结构异常所致的疾病称为染色体病^[8]。染色体病没有有效的治疗方法,染色体病患儿一旦出生,给家庭和社会带来巨大的经济压力和精神负担,目前主要通过产前筛查和诊断避免患儿出生。通用的产前筛查方法是检测与染色体非整倍体异常相关的因素^[9],但是目前的唐氏综合征筛查方案有 5% 的假阳性率,而筛查准确率也只有 70% 或 85%^[10]。这些筛查高风险的孕妇需要进行进一步介入性产前诊断,对孕妇和胎儿都存在一定的风险。1997 年 Lo 等^[4]发现妊娠妇女的血浆和血清中

含有游离的胎儿 DNA,为无创性产前诊断提供了新的可能。以及高通量测序技术的出现,大大提高了染色体非整倍体异常的检出率,结合随访结果,该方法对 21-三体检出率 100%,漏诊率为 0,误诊率为 0.027%;18-三体检出率 100%,漏诊率为 0,误诊率为 0.027%;对 13-三体检出率 100%,漏诊率为 0,误诊率为 0.054%。可有望替代敏感度较低的传统血清学筛查方法。这一点国内学者章容等^[6]已有大样本的研究证明。

孕妇外周血中的游离胎儿 DNA 之所以可以运用于无创性产前基因检测,主要因为它们存在以下几个方面的生理特点:孕妇血中胎儿游离 DNA 含量相对较孕妇血中胎儿细胞丰富^[1],游离胎儿 DNA 保留了父母的多态性位点信息,半衰期短,大部分孕妇产后 2 小时即检测不到胎儿游离 DNA 的存在^[11]。但是胎儿游离 DNA 也存在不稳定的特性,呈起伏波动,因此可能存在检测失败的风险,Bian-

chi等^[12]采用无创性产前基因检测技术筛查了532例孕妇,有16例(3%)孕妇血浆未能提取出足量的胎儿DNA导致检测失败,我们3715例标本中95例(2.56%)重新抽血后得到检测结果,另外还有4例(0.108%)两次抽血后仍然无法得到明确检测结果而予退费处理。因此我们在知情同意书里充分说明可能出现重新抽血或检测不出结果可能。

无创产前基因检测技术应用于胎儿染色体非整倍体检测已日趋成熟,因其检出率高而且不会对胎儿造成流产风险越来越被临床医生及孕妇群体接受,章容等^[6]学者已有大样本研究,研究结果在本研究中也充分得到印证,本研究还对无创产前基因检测技术对性染色体和其他常染色体的检出率做了初步分析,该方法共检出性染色体异常7例,结合随访结果,计算出该方法检出率100%,漏诊率为0,误诊率为0.054%。检出其他常染色体异常8例,全部接受羊水或脐血穿刺行array CGH检测,1例结果异常,检出率100%,误诊率0.19%。这些数据说明对于性染色体和其他常染色体异常还有一定的局限性,还需要更多的数据积累。

无创产前基因检测技术与传统筛查方法相比较具有明显优势,但是由于其费用相对比较昂贵,同时检测实验室要求具备高水平的分析技术^[13],短期内难以普及。而且对于染色体嵌合结构^[14]和微小缺失及重复等无法检测,在临床应用还存在一定的局限性,也决定其暂时无法取代传统的血清学和超声结合筛查方法。但是无创产前基因检测技术具有无创性、高准确性、高通量等优势,而且可以用于单基因病、RH血型不合、以及一些其他妊娠期疾病的检测,目前国内外很多专家学者都在致力于这方面的研究,相信在不久的将来,该技术临床应用前景非常广阔,为降低中国出生缺陷做出更大的贡献。

参 考 文 献

[1] Ministry of Health, People's Republic of China. Report on Women and Children's Health Development in China[M]. Beijing: Ministry of Health, 2011.

[2] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum; implications for non-invasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998,

62(4): 768-775.

- [3] Ghaffari SR, Tahmasebpour AR, Jamal A, et al. First-trimester screening for chromosomal abnormalities by integrated application of nuchal translucency, nasal bone, tricuspid regurgitation and ductus venosus flow combined with maternal serum free beta-hCG and PAPP-A: a 5-year prospective study[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2012, 39(5):528-534.
- [4] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [5] Chiu RW, Chan KC, 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(51):20458-20463.
- [6] 章容,徐聚春,许欢欢,等. 5997例母血胎儿游离DNA无创大规模平行测序筛查胎儿染色体数目异常[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(16):1744-1747.
- [7] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(13): 1225-1232.
- [8] 吴清明,周瑾. 出生缺陷产前筛查及产前诊断研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(1):129-131.
- [9] Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First trimester or second trimester screening, or both, for Down syndrome[J]. N Engl J Med, 2005, 353(19):2001-2011.
- [10] Pertl B, Bianchi DW. First-trimester prenatal diagnosis: fetal cells in the maternal circulation[J]. Semin Perinatol, 1999, 23: 393.
- [11] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. Am J Hum Genet, 1999, 64(1):218-224.
- [12] Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing[J]. Obstet Gynecol, 2012, 119(5): 890-901.
- [13] Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic chromosome-dosage approach[J]. Clin Chem, 2010, 56(1):90-98.
- [14] Wright CF, Chitty LS. Cell-free DNA and RNA in maternal blood: implications for safer antenatal testing[J]. BMJ, 2009, 339:b2451.

(收稿日期:2016-05-18)

编辑:刘邓浩