

# 染色体拷贝数变异测序(CNV-seq)对稽留流产绒毛组织的病因学检查分析

张卉 祖淑静 张宁 单飞 杨威

(哈尔滨市红十字中心医院,黑龙江 哈尔滨 150076)

**【摘要】 目的** 探讨染色体拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)在稽留流产绒毛组织检测染色体畸变的价值,明确流产病因。**方法** 选取哈尔滨市红十字中心医院妇产科门诊诊断早期稽留流产 224 例患者自愿接受流产病因学检测,进行检测前咨询,告知 CNV-seq 技术检测目的及意义,行人工流产时留取绒毛组织送检行 CNV-seq。**结果** 224 例流产组织 CNV-seq 检测成功率 100%,检出染色体畸变 114 例,阳性检出率为 51%,其中数目异常 71 例,包括特纳综合征 20 例、16-三体 19 例、22-三体 7 例、21-三体 6 例、3-三体 3 例、14-三体 2 例、4-三体 2 例、20-三体 1 例、18-三体 1 例、15-三体 1 例、8-三体 1 例、三倍体 8 例,其他染色体畸变包括嵌合体、微缺失/微重复(多态性和致病性不明确)43 例。**结论** CNV-seq 诊断稽留流产病因染色体畸变,其特异性较高,胚胎染色体非整倍体是导致早期胚胎停止发育流产的重要原因,CNV-seq 在稽留流产染色体异常和拷贝数变异具有较好的临床应用价值,明确流产的遗传学病因,为再次妊娠提供指导有重要意义。

**【关键词】** CNV-seq; 稽留流产; 绒毛组织; 染色体畸变

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

**【Abstract】 Objective** To investigate the value of chromosome copy number variation sequencing (CNV-seq) in detecting chromosomal aberrations in the villus tissue and to clarify the cause of missed abortion.

**Methods** Collect 224 patients with early missed chromosomal aberrations abortion and accepted voluntarily to detect the etiology. Before the test, the purpose and significance of CNV-seq were informed. The aborted villus tissues were taken and were performed by CNV-seq. **Results** The success rate of CNV-seq detection in 224 abortion tissues was 100%, and 114 cases of chromosome aberrations were detected. The positive rate was 51%, including 71 cases with abnormal chromosome number, including 20 cases of Turner syndrome, 19 cases of trisomy 16, 7 cases of trisomy 22, 6 cases of trisomy 21, 3 cases of trisomy 3, 2 cases of trisomy 14, 2 cases of trisomy 4, 1 case of trisomy 20, 1 case of trisomy 18, 1 case of trisomy 15, 1 case of trisomy 8, 8 cases of triploid, and 43 cases of other chromosome aberrations including chimera, micro-deletion / micro-repetition (polymorphism and pathogenicity is not clear). **Conclusions** Diagnosis of missed abortion for the chromosomal aberrations by CNV-seq is high specificity. Embryonic chromosome aneuploidy is an important cause of early embryonic abortion. CNV-seq has better clinical application value in detecting abnormal chromosomal and copy number variation in missed abortion, and it is significant to identify the etiology of abortion, and provide guidance for re-pregnancy.

**【Key words】** CNV-seq; missed abortion; villus tissue; chromosomal aberrations

稽留流产又称过期流产,指胚胎或胎儿已死亡滞留宫腔内未及及时自然排出者。胚胎或胎儿染色体异常是早期流产最常见的原因,约占 50%~60%,染色体异常包括数目异常和结构异常。其中数目异常以三体综合征居多,常见的有 13、18、21、16 和 22-三体,其次为 X 单体,三倍体和四倍体少见。结构异常引起流产并不常见,主要有平衡易位、倒置、缺失、重叠及嵌合体等<sup>[1]</sup>。

染色体拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)是采用高通量测序(next generation sequencing, NGS)技术对样本 DNA 进行低深度全基因组测序,将测序结果与人类参考基因组碱基序列进行对比,通过生物信息分析发现样本存在的拷贝数变异(CNVs)。具有流程简单、易操作、通量高、兼容性好、所需 DNA 样本量低等优点,样本可为外周血、羊水、脐血、绒毛组织等<sup>[2]</sup>。为临床检测染色体疾病提供新的解决手段,可发现染色体非整倍体及染色体微缺失/微重复等。CNV-seq 技术可用于产前诊断、流产原因排查、不孕不育原因查找,以及疑似染色体疾病患者的染色体异常检测。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2017 年 1 月至 2019 年 3 月在哈尔滨市红十字中心医院妇产科门诊临床诊断的 224 例稽留流产患者,患者身体健康状况良好,单胎。经产前诊断门诊遗传咨询自愿接受流产病因学检测的患者,进行检测前咨询,告知 CNV-seq 技术检测目的及意义,行人工流产时留取绒毛组织送检行 CNV-seq。年龄在 20~42 岁,孕龄 12 周内的患者。

### 1.2 实验方法

1.2.1 标本的采集对临床明确稽留流产的患者夫妇进行检测前的遗传咨询并签署知情同意书。收集稽留流产患者的绒毛组织(无菌操作,无污染)取 50~100g,放入生理盐水中多次漂洗,漂洗至无血液成分,取黄豆粒大小的绒毛组织放入 PE 管密封管内,及时送检。

1.2.2 将采集到标本送检至北京贝瑞和康生物技术有限公司。

1.3 CNV-seq 实验方案及流程图,详见表 1、图 1。

表 1 CNV-seq 技术实验方案

样品类型	取样	运输及保存
绒毛组织	取流产组织黄豆大小,放入 EP 管中密闭,保存。	不可冷冻,4℃保存及运输,48 小时内送至实验室处理。

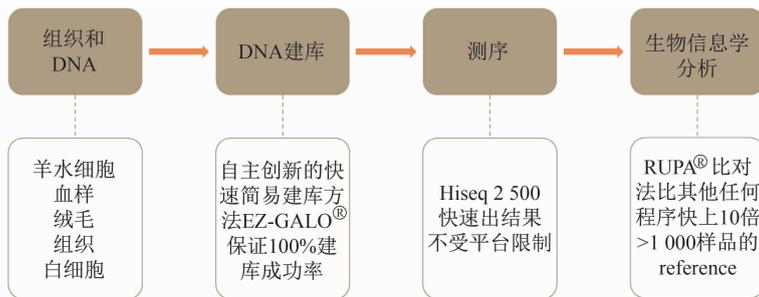


图 1 CNV-seq 实验流程图

1.4 数据分析把检测的 DNA 序列数据和基因组数据库进行比对,得到样本中每条染色体上可比对的唯一序列含量,根据生物信息学分析,计算出每条染色体的覆盖深度值,并转化为衡量染色体异常风险的指数。样本中某一染色体 DNA(chr N)所占总

DNA 比例可以表示为覆盖深度  $Cov\text{-chr N}$ 。然后对深度进行修正,通过样本染色体的  $Cov\text{-ratio}$  来判断胎儿染色体拷贝数是否异常,统计检验的值为  $Cov\text{-ratio}$  值,  $Cov\text{-chr N}$  以及  $Cov\text{-ratio}$  值计算如下:覆盖深度  $Cov\text{-chr N} = \text{样本染色体 N 上唯一序}$

列片段总数/参考序列染色体 N 上唯一序列片段总数;样本的 chr N 的 Cov-ratio=chrN 的修正深度/平均修正深度;样本的 Cov-ratio 值 >1.3 判定为样本染色体重复, Cov-ratio 值 <0.7 判定为样本染色体缺失。

## 2 结果

2.1 CNV-seq 结果 224 例稽留流产绒毛组织, 检测出染色体畸变 114 例, 其中阳性检出率为 51% (114/244), 其中数目异常 71 例, 占 31.70%, 其中包括特纳综合征 20 例、16-三体 19 例、22-三体 7 例、21-三体 6 例、13-三体 3 例、14-三体 2 例、20-三体 1 例、18-三体 1 例、15-三体 1 例、8-三体 1 例、4-三体 1 例、三倍体 8 例。详见表 2。

表 2 CNV-seq 阳性结果(染色体数目异常)

三体和单体类型	例数(例)	占异常百分比(%)
特纳综合征(45,X)	20	17.54
16-三体	19	16.66
22-三体	7	6.14
21-三体	6	5.26
13-三体	3	2.63
14-三体	2	1.75
4-三体	2	1.75
20-三体	1	0.87
18-三体	1	0.87
15-三体	1	0.87
8-三体	1	0.87
三倍体(69,XXY)	8	7.02

2.2 CNV-seq 结果根据测序及统计每条染色体的唯一序列片段所得出的结果分析, CNV-seq 发现染色体畸变阳性率为 51% (114/224), 单纯数目异常为 31.70% (71/224), 嵌合体为 3.12% (7/224), 其它染色体畸变包含微缺失/微重复为 16.07% (36/224)。临床意义不明的拷贝数目变异(Copy number variants of uncertain significance, VUS), 即未确定性质的已报道 DNA 异常或未见报道的新变异, 尚不能确定与其表型意义可能与稽留流产有无关系。详见表 3。

表 3 CNV-seq 阳性结果(染色体畸变除去数目异常

以外嵌合体、部分微缺失/微重复)			
类型	缺失/重复位置(嵌合况)	大小	
嵌合体	7-三体【40%】/正常【60%】		
	19-三体【25%】/正常【75%】		
	13-三体【20%】/正常【80%】		
	22-三体【50%】/正常【50%】		
	14-三体【70%】/21-三体【60%】		
	X 单体【60%】/正常【40%】		
	8/21-三体【70%】/正常【30%】		
微缺失	16q21.2	1.08 Mb	
	16q23.1	0.24 Mb	
	1p13.2	0.26 Mb	
	Xp22.31	1.70 Mb	
	5q35.3	2.36 Mb	
	15q23.1	2.38 Mb	
	15q21.2	1.84 Mb	
	7q21.3	14.62 Mb	
	微重复	17p13.3-p13.1	7.56 Mb
		15q21.2	2.34 Mb
20q12.2		0.84 Mb	
5p12-p11		0.76 Mb	
Xp22.33		0.48 Mb	
8p23.1		0.5 Mb	
1p23.22		0.36 Mb	
3q21.1		0.52 Mb	
7p22.2		0.34 Mb	
其他畸变		70,XXY,+2	
	48,XXY,+15		

注:高通量测序 DNA 测序查询的数据库: DGV、DECIPHER、OMIM、UCSC 以及 PubMed 公共数据库资源。

## 3 讨论

3.1 稽留流产是胚胎停止发育未及时排除体外胚胎停止发育的主要原因之一是胚胎染色体异常, 导致染色体异常的原因目前无明确定论, 高龄是高危因素, 与环境、感染、免疫、不良因素也有相关性。检测胚胎染色体异常的方法有染色体核型分析、荧光原位杂交(FISH)、高通量 DNA 测序等技术。染色体核型分析常用 G 显带技术能够检查出绝大多数的染色体的异常情况, 包括染色体数目异常如三体型、单体型、多倍体, 染色体结构异常如易位、倒位及 10Mb 以上的片段缺失、重复等。染色体核型分析应用范围广、应用时间较长, 检测结果比较受临床医师信赖, 是对绒毛、羊水或脐血进行产前诊断的主要方法和金标准。染色体核型分析技术检测流产绒毛组织染色体的研究已经比较深入。在国外, 早在 1975 年就有学者报道了 1500 例自然流产组织样本

之后发现约有 60% 的绒毛染色体数目异常,主要为非整倍体和多倍体<sup>[3]</sup>。国内学者们在染色体核型分析技术检测绒毛染色体方面也做了大量研究:欧阳鲁平等<sup>[4]</sup>利用传统核型分析技术检测了 1160 例早孕期流产绒毛样本,检测成功 1140 例,检测成功率为 98.2%,检测出 62 例染色体异常核型,占 5.44%,其中数目异常共 32 例(51.6%),以 45,X 最多见,共 15 例,其次是 13-三体 6 例,结构异常 5 例,嵌合体 22 例。本研究对 224 例稽留流产绒毛组织进行 CNV-seq 检测,共检测出 71 例数目异常,45,X 最多见,共 20 例,16-三体 19 例,22-三体 7 例也是导致流产的主要原因,这与孙义锡<sup>[5]</sup>的研究结果一致。与欧阳鲁平等<sup>[4]</sup>研究结果相近。CNV-seq 比较核型分析技术,对检测标本要求较低,分辨率及检测成功率高,成为快捷、准确、灵活的新型检测手段<sup>[6]</sup>。随着高通量测序技术的成熟与发展,全基因组测序被应用到各种领域,尤其是遗传性疾病的研究方面备受关注。目前人类已知疾病中,大约有 4000 多种疾病与基因异常有关<sup>[7]</sup>。在传统细胞遗传学只能检测 5Mb 以上的缺失和重复,5Mb 以下隐藏着众多的微小不平衡,是细胞遗传学检测难以诊断的。

3.2 FISH 与传统染色体核型分析技术 FISH 有着快速、高效等特点,但也存在一定的局限性。FISH 技术现阶段只能针对已知的染色体非整倍体异常进行检测,根据目前的研究,三体型可发生在除了 1 号染色体以外所有的染色体,而目前在临床上使用的 FISH 探针只涉及 13、16、18、21、22、X 和 Y 这 7 条染色体,不能覆盖所有染色体组,这将会漏诊和误诊。临床常用 21、18、13、X、Y 五条探针。FISH 技术只能检测染色体的数目异常,并不能对染色体结构异常进行检测。也不能检测染色体微小变异,也就是说,FISH 检测结果为阴性的样本,并不能说明该样本不存在由易位、倒位、缺失及重复等结构异常所导致的染色体核型异常。据文献报道,有 15%~30% 的核型异常是 FISH 不能检测出来的<sup>[8]</sup>。FISH 存在有一定的假阳性率和假阴性率。有文献进行了大样本的研究,分析了 29039 例样本只有 1 例假阳性(假阳性率=0.003%)和 7 例假阴

性结果(假阴性率=0.024%)<sup>[9]</sup>。

3.3 CNV-seq 应用本研究 224 例检测成功率 100%,阳性样本占总样本率 51%(114/224),低于范宝光等<sup>[10]</sup>研究的 64.15%,徐蕾等<sup>[11]</sup>研究的 79.59%。单纯数目异常为 31.70%(71/224),嵌合体为 3.12%(7/224),其他染色体畸变包含微缺失/微重复为 16.07%(36/224)。文献报道<sup>[12]</sup>流产染色体异常 16-三体最多见,其次 21-三体和 22 号三体。Jiandong Shen 等<sup>[13]</sup>采用高通量测序技术检测了 436 例流产绒毛样本,检出异常核型样本 225 例,占 51.6%,包括 188 例非整倍体异常,23 例片段微缺失微重复,及 14 例三倍体。1978 年顾世光报道,早期稽留流产中 30.5%~54.9% 的流产儿具有异常染色体<sup>[14]</sup>。赵佳<sup>[15]</sup>等人对 1032 例大样本流产绒毛样本进行检测,检出异常核型 445 例,异常率 43.12%。我们研究 224 例稽留流产患者中特纳综合征 20 例,16-三体 19 例,22-三体 7 例,21-三体 6 例,也是比较常见,与文献报道基本相符合。其次 13-三体 3 例,14-三体 2 例,20-三体 1 例,18-三体 1 例,15-三体 1 例,8-三体 1 例,4-三体 1 例,三倍体 8 例。特纳综合征病例大多数在胚胎期流产。本研究检测 20% 以上的染色体嵌合及染色体微缺失/微重复变异。其他染色体畸变包含微缺失/微重复为 16.07%(36/224)。

3.4 CNV-seq 的优势与细胞培养核型分析相比其特异性、敏感性在检测染色体数目异常上具有较高的一致性,能够精确分析,利用 HiSeq2500 测序快速要得到结果,在时间上有较大优势。由于不需要进行细胞培养,减少了细胞培养失败的可能性。相较于染色体核型分析和 FISH 技术,采用高通量基因测序技术对流产绒毛进行检测有以下几方面的优势。第一,高通量测序又可称为新一代深度测序,是指一次性能并行测序几百万到十亿条 DNA 分子,可对一个物种的转录组和基因组进行更深入、更全面、更细致的分析<sup>[16]</sup>。以 Solexa 技术为例,采用了该技术的 Hi Seq 2500 测序仪,一台机器在短短两周的时间内能产出超过 300G 的数据,这相当于把人类基因组重复测序 100 遍以上,短时间内大输出量的测序与以往技术相比较最突出的优势。第二,

实验对样本要求较低,即使绒毛样本退化只要 DNA 含量达到一定的测序要求就能对样本进行检测,这就很大程度上提升了样本的检测成功率。第三,对于染色体结构异常,该技术可检测到 100kb 以上的染色体片段的微缺失和微重复,提高了染色体异常的检出率。而以往使用染色体核型分析技术只能排查出 10Mb 以上的染色体结构异常,这就导致很多存在细微结构异常的染色体被漏诊,所以有学者认为,早期自然流产绒毛的染色体异常率实际上应该高于普遍报道的 50%<sup>[17]</sup>。有文献报道,通过大样本量的研究,采用高通量检测技术对智力低下的患者进行遗传学分析,发现这些患者存在染色体结构上的微缺失微重复<sup>[18]</sup>。

3.5 CNV-seq 结果解读分析绒毛组织染色体畸变是否存在,如结果无异常时,可以基本排除稽留流产非遗传物质染色体畸变所致,建议夫妻进行其他检查。流产原因还有精子畸形率、免疫、感染环境等等。如染色体畸变为非整倍体多数是生殖细胞成熟或受精卵早期卵裂过程中,染色体不分离或丢失等原因造成的<sup>[19]</sup>。稽留流产的病因可能与夫妻年龄、情绪、孕前孕期接触有毒有害物理、化学、药物等不良环境相关。如染色体畸变为缺失/重复,考虑拷贝数变异是新发突变还是来源于亲本(夫妻之一),夫妻均需行 CNV-seq 检测。无论是新发突变还是来源亲本再次妊娠均需进行遗传咨询及产前诊断。

总之,应用 CNV-seq 对稽留流产绒毛组织染色体畸变进行检测能明确稽留流产的病因,有利于临床医师快速准确寻找稽留流产病因,对再次妊娠有重要的指导意义。

#### 参考文献

- [1] 谢幸,孔北华,段涛等. 妇产科学. 9 版[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:70-73.
- [2] 刘洪倩,刘俊涛,郭玲仟. 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华医学遗传学杂志,2019,36(4):293-296.
- [3] Boue J, Bou A, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotypes spontaneous human abortion[J]. Tetatology, 1975, 12: 11-26.
- [4] 欧阳鲁平,陈少科,费冬梅,等. 1160 例早孕期绒毛染色体细胞遗传学分析[J]. 重庆医学,2015,2(44):813-815.
- [5] 孙义锡,罗玉琴,钱叶青,等. 单核苷酸多态性微阵列芯片在早期自然流产绒毛组织遗传学分析中的应用[J]. 浙江大学学报(医学版),2017,46(3):262-267.
- [6] 蔡莉蓉,戚红,祝建疆,等. 高通量测序技术与传统染色体核型分析技术在稽留流产遗传学分析中的比较[J]. 中国优生与遗传学杂志,2015,23(1):6-7.
- [7] Dewey FE, Grove ME, Pan C, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing [J]. JAMA, 2014, 311(10):1035-1045.
- [8] Wilink FA, Van Opstal D, Papatsonis DNM. False positive FISH diagnosis of monosomy X in uncultured amniotic fluid cells due to a chromosome Y deletion[J]. Prenat Diana, 2008, 28(9):871-873.
- [9] Tepperberg J, Pettenail MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multicenter retrospective study and review of the literature[J]. Prenat Diagn, 2001, 21: 293-301.
- [10] 范宝光,张玥红,王宾红,等. 高通量基因测序技术检测稽留流产绒毛染色体异常的价值[J]. 中国妇产科临床杂志,2018,19(1):55-56.
- [11] 徐蕾,杨国珍,程明亮,等. 测序技术检测流产产物拷贝数目变异的应用[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(9):701-705.
- [12] Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparative method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage [J]. Am J Hum Genet, 1990, 47(4):656-663.
- [13] Shen J, Wu W, Gao C, et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology [J]. Mol-Cytogenet, 2016, 9: 7.
- [14] 顾世光,高尔生,赵鹏飞. 生殖健康[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:74-75.
- [15] 赵佳,毕川,高雅,等. NGS 技术检测自然流产胚胎或绒毛染色体非整倍体及拷贝数变异的研究[J]. 中国优生与遗传杂志. 2015,23(2):12-15.
- [16] 赵华巍,戚红,蔡莉蓉,等. 高通量测序技术与传统染色体核型分析技术在胎儿畸形染色体分析中的比较[J]. 中国优生与遗传杂志,2015,23(8):10-12.
- [17] 陈雪,胡娅莉. 自然流产的遗传因素及诊断[J]. 国外医学:妇产科分册,2004,31(6):340.
- [18] Anne M, Slavotinek Novel microdeletion syndromes detected by chromosome Microarrays[J]. Hum Genet, 2008, 124: 1-17.
- [19] 郭玲仟,张学. 医学遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社,2016:21-22.

(收稿日期:2019-05-14)

编辑:宋文颖