

遗传性疾病产前诊断方法及其进展

钱欣 王建莉*

(浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

【中图分类号】R714.55 【文献标识码】A

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.03.013

遗传性疾病(简称遗传病)是指以遗传因素作为惟一或主要致病因素的一大类疾病,遗传因素以细胞水平的染色体数目或结构畸变和分子水平的基因改变为主。据统计,活产新生儿中患不同种类遗传病者占4%~5%,其中单基因病占1%,多基因病占2%~3%,染色体病占0.5%。约1%新生儿患严重畸形,0.5%有代谢异常^[1]。随着临床遗传学的发展,分子遗传学等新技术的应用,使很多并不常见的遗传病得以诊断、治疗、预防并进行有效的产前诊断。

遗传病通常分为3种类型:①染色体病(chromosomal disorder),指由染色体数目异常或结构畸变所引起的一类疾病。分为常染色体病与性染色体病。染色体数目异常多数由于同源染色体或姐妹染色体不分离所致,临床上常见整倍体畸变、非整倍体畸变(单体综合征、三体综合征等)和嵌合体等表现形式。结构畸变则由染色体断裂丢失或错误重接所致,如缺失、倒位、重复、易位等结构异常。目前已报道的染色体病超过300种,分布在22条常染色体和2条性染色体上。染色体病患者智力显著低下,缺乏劳动和生活自理能力,会给家庭和社会带来沉重的负担。所以深入研究其发生的原因和采取预防措施是亟待解决的课题。②单基因遗传病(single gene disorder; monogenic disease; monogenic disorder),指单个基因突变所引起的一类疾病。致病基因存在于核基因中,亦存在于线粒体基因中;前者发病方式遵循孟德尔遗传规律,而后者不符合孟德尔遗传规律,属于母系遗传或细胞质遗传范畴。该类疾病的群体患病率约为1/10 000,病种约有6000多种。③多基因遗传病(polygenic disorder;

multifactorial disease),指由多个易感基因突变在环境因素(如物理、化学或生物因素)影响下所导致的疾病。常见的多基因病有糖尿病、高血压和唇腭裂等,群体患病率在0.1%~1.0%之间。

遗传病的产前诊断主要通过获取胎儿细胞进行出生前的遗传病诊断。目前临床上用于胎儿细胞采集的方法有羊膜腔穿刺术(amniocentesis),绒毛活检术(chorionic villi sampling, CVS),经皮脐血穿刺术(cordocentesis)等。

1 产前诊断标本获取

1.1 羊膜腔穿刺术获取胎儿样本 羊水细胞是产前诊断中最常用的标本之一,其主要来源于胎儿皮肤、消化道、呼吸道等脱落上皮细胞。根据其形态学和生物学生长特性,可分为羊水特异性细胞、上皮样细胞和成纤维细胞^[2]。羊水标本取材风险相对较小,多大型多中心研究已经证实了羊水穿刺的安全性及其细胞遗传学诊断的准确性(超过99%)^[3]。一般在妊娠18~23周时,于B超引导下经腹部行羊膜腔穿刺,取20~25 ml羊水,培养成功率较高。文献报道羊膜腔穿刺术自发流产率为1.4%~3.5%^[3],与医生经验有密切关系,在本院约为0.1%。

1.2 绒毛膜穿刺术获取胎儿样本 绒毛组织从受精卵发育而成的,位于胚囊之外且又具有和胚胎同样的遗传性,利用绒毛进行产前诊断,多于妊娠9~11周进行,早孕期绒毛活检被认为是产前诊断的一个突破,通过提取出绒毛组织可以对胎儿行基因与酶学诊断,最大限度降低遗传性疾病患儿的出生。取绒毛要求较高的技术,医生的经验是至关重要的。目前获取绒毛标本最常用的方法是经宫颈绒毛活检,成功率高到98.2%,胎儿丢失率为3.5%,自发流产率为2.6%~4.5%,缺点是绒毛膜样本容易存

* 通讯作者:王建莉,Email:jlwang@zju.edu.cn

在母血污染^[4],有报道称早期绒毛活检相关流产率与中期羊水穿刺相似^[3]。行绒毛活检时若胎盘厚度不足应延期手术,穿刺中应避免穿刺针过于靠近母体面以免母体组织污染。早期绒毛膜活检的临床诊断率明显高于孕中期^[3],超声筛查的介入对于早期诊断胎儿染色体异常具有关键作用,所以在临床开展早期筛查与早孕期诊断具有十分重要的意义。

1.3 经皮脐血穿刺术获取胎儿样本 经皮脐血穿刺一般在妊娠23周后进行。当羊水细胞培养失败或是错过最佳羊水穿刺者可选择行经皮脐血穿刺术进行产前诊断。脐静脉穿刺较脐动脉穿刺更为简单、安全,后者会增加心动过缓或穿刺后出血时间延长的发生率。可以根据脐动静脉相对大小的不同与Doppler彩色血流图中血流的方向来区分动静脉。有文献报道脐带穿刺术失败率为9%^[5],故本取材方法比上述两种取材术的相关并发症和流产率均增高,推荐本取材法仅适用于作为产前诊断的补救措施或某些特殊疾病的诊断手段,不应该成为产前诊断的常规手段。

1.4 母体外周血中胎儿游离DNA的获取 1997年Lo等^[6]利用传统聚合酶链反应PCR首次发现在孕妇血浆中存在游离的胎儿DNA,不久后其他学者也证实了循环胎儿DNA的存在并已显示出其潜在的临床应用价值。母血胎儿游离DNA主要来源于孕妇凋亡的胎盘滋养层细胞,其特点是:①均以小片段的形式存在,80%的胎儿游离DNA片段小于193 bp;②半衰期短,仅16分钟左右,其数量因此总保持在较低的水平,约占整个血浆总DNA含量的3%~6%^[7]。Lo等^[8]通过对妊娠期产后妇女血浆中胎儿细胞内DNA和胎儿游离DNA的比较发现,59%的孕妇在孕5~8周时血浆中即能检测到胎儿游离DNA,在孕7~16周时明显升高,并随孕周增加而升高,于分娩时达到高峰。因此可以通过采集母体外周血,从而获取胎儿的游离DNA。

2 遗传病产前诊断技术

2.1 染色体核型分析 根据染色体的长度、着丝点位置、臂比以及随体的有无等特征,并借助染色体显带技术对染色体进行分析、比较、排序和编号。

染色体核型分析是遗传性疾病产前诊断的主要方法。常用的染色体核型分析技术有:①非显带染

色体核型分析:通常采用Giemsa染液对染色体标本进行染色处理,结果整条染色体显示紫红色。非显带染色体标本上虽然可以根据染色体的形态识别1、2、3、16、17和18号,有时还可以识别Y染色体,但却不能有把握地鉴别其他大多数染色体。②显带染色体核型分析:用各种不同的方法与不同的染料处理染色体标本,使每条染色体上出现明暗相间、深浅不同的带纹的技术称为显带技术。自20世纪70年代以来,显带技术得到了很大发展,其中G显带是应用最广泛的一种显带技术。人类染色体标本经胰蛋白酶、NaOH与缓冲液等试剂处理后再用Giemsa染色,可使每条染色体上呈现出深浅交替的横纹,这就是G显带技术。因每条染色体都有其较为恒定的带纹特征,可以较为准确的识别及诊断经G显带处理的染色体标本。

关于G显带的机理目前有多种说法, Lee等认为染色体上与DNA结合较为疏松的组蛋白易被胰蛋白酶分解,经染色后这些区段成为浅带,而组蛋白和DNA结合牢固的区段则被染成深带。也有人认为,易着色的阳性带为含有较多AT的染色体节段,而含GC多的染色体段则不易着色。总的来说,G显带的机理尚未得到定论。

自1970年Caspersson等首次报道用喹吖因对人体染色体进行染色可在各号染色体上显现出宽窄不一带纹以来,细胞遗传学者以不同的染色方法为基础,提出各种显带方法的名称。

如用Q显带法以芥子喹吖因作为染料,染出的荧光带称为Q带;G显带法用Giemsa作为染料,染出的带称为G带;R显带法同样用Giemsa作为染料,因预处理不同获得与G带着色强度正好相反,染出的带称为R带;C显带法专一的显示“结构性异染色质”,称为C带;T显带用于鉴别染色体的端粒;N显带则在核仁组织区浓染。

2.2 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术 用带荧光标记的物质将目的DNA片段标记,然后将其杂交到中期染色体或间期染色质纤维上,在荧光显微镜下观察,判断目的DNA在染色体上的位置或在间期核中的数目,主要用于检测染色体微小片段的改变或直接检测间期细胞核中染色质的变化。用于FISH检测的探针分为直接标记探针与间接标记探针两种,前者应用耦联

荧光分子的 dNTP 标记探针,杂交洗涤后可直接在荧光显微镜下检测;后者则采用生物素或地高辛等分子的 dNTP 标记探针,杂交洗涤后用偶联有荧光分子的具有高度特异性与亲和力的抗生物素或抗地高辛抗体进行免疫荧光扩增,最后在荧光显微镜下观察分析。两种方法的比较:①直接标记的探针杂交后经简单洗涤即可显示杂交信号,简单方便,而间接标记的探针杂交后需通过一系列检测步骤,容易引起较高的背景;②间接标记的探针可进行多步骤信号放大,直接标记的探针荧光信号不能放大;③多色 FISH 选择直接标记探针较多。

2.3 微阵列比较基因组杂交技术(Array CGH)

需提取样本中的基因组 DNA,并与基因芯片杂交,杂交结果通过生物信息学的方法,分析样本染色体可能存在的微缺失、微重复。该技术是 FISH 技术的延伸,其基本原理是用不同的荧光染料分别标记待测 DNA 样本与参考 DNA 样本,等量混合后与微阵列玻片上的 oligonucleotide 探针进行竞争性杂交。Array CGH 技术可在一张芯片上实现全基因组检测和基因组异常的解析,在染色体微结构畸变、追溯标记染色体来源等方面具有明显的优势,几乎可以检测出除基因突变或染色体平衡易位以外的基因组失衡。研究显示,有智力障碍、畸形、发育障碍等提示染色体病的症状,但核型分析为正常或平衡易位的患者,应用 Array CGH 后其异常检出率约为 10%~50%^[9]。主要优势体现在:无需细胞培养;全基因组覆盖检测;分辨率高于核型分析;准确检测全部染色体非整倍体疾病,以及染色体微缺失、微重复疾病。

2.4 多重酶联依赖探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 由 Schouten 等于 2002 年首先报道,是一种针对被测 DNA 序列进行定性与半定量分析的新技术。具有高效性、特异性,并在一次反应中可以检测多达 45 个核苷酸序列拷贝数的改变,目前已经应用于多个临床领域、多种疾病的研究。基本原理为靶序列 DNA 和探针杂交后通过连接、PCR 扩增,扩增产物经毛细管电泳分离,分析软件对收集到的数据进行分析,最后得出结论。每一个 MLPA 探针都包含一对荧光标记的寡核苷酸片段,其中一个由化学合成,而另一个则由 M13 噬菌体衍生法制备。每个探针都有一段引物

序列与一段特异性序列。MLPA 反应时,寡核苷酸片段与靶序列杂交后通过连接酶连接两部分探针。因连接反应特异性高,只有当靶序列与探针特异性序列完全互补,连接酶才能将两段探针连成一条完整的核酸单链;若靶序列与探针序列不能完全互补,即使它们之间只相差一个碱基,也会导致杂交不完全,使连接反应无法进行。当连接反应完成后,用一对通用引物扩增连接好的探针,其扩增产物的长度惟一且稳定,范围在 130~480bp。最后,经毛细管电泳分离扩增产物,再通过软件分析,得出结论。只有当连接反应顺利完成,才能进行 PCR 扩增并收集相应的探针的扩增峰,当检测的靶序列发生点突变、缺失或重复时,相应探针的扩增峰会随之缺失、降低或增加,因此可以根据扩增峰的改变判断靶序列是否有拷贝数异常或点突变存在。

MLPA 目前多用于检测染色体的非整倍体改变与 SNP 多态性或点突变,在一些可以明确诊断的单基因病中也有较多的应用。MLPA 结合了 PCR 扩增与 DNA 探针杂交技术,具有较多的优点,主要体现在①特异性,可以针对单一位点进行点突变检测;②高效性,一次反应可以检测 45 个靶序列的拷贝数改变;③快速性,一次检测可以在 24 小时内完成;④简便性,多采用试剂盒进行相关检测,操作简单且容易掌握。MLPA 也存在一定的局限性,如检测需要精确的 DNA 浓度,不能用于单个细胞检测,只适用于检测已知的基因缺失或重复,不能检测未知的畸变,亦不能检测染色体平衡易位等。但 MLPA 作为一种新兴的分子遗传学技术,其发展空间大,应用领域也会日益广泛。

2.5 定量荧光聚合酶链反应(quantitative-fluorescent multiplex polymerase chain reaction, QF-PCR)

是一种利用荧光引物对染色体也行的短串联重复序列(short tandem repeat, STR)位点进行扩增,经荧光检测对染色体数目异常做出快速诊断的方法。其优点主要表现在高效性、高特异性与快速性等方面。STR 遗传多态性主要通过杂合度与多态信息量等指标来衡量。当多态信息量 >0.5 时,表明遗传标记可提供高度的遗传信息^[10]。STR 位点的基因频率、杂合度等因样本来源、种族差异等不同而有所差异。故使用 STR 位点做快速产前诊断时,应对选取的位点进行统计学分析,选取可提供高度遗

传信息、高杂合度的位点进行检测。未在 QF-PCR 非整倍体诊断中使用过的新 STR 位点应进行大样本(>100)验证后使用,包括在非整倍体样本中确认标记序列的位置,并排除常见的多态性。正常的二倍体细胞的 2 个等位基因在 QF-PCR 检测过程中会优先扩增其中的一个,其产物会被作为模板过度表达^[11],所以在实验结果中等位基因峰面积比值并不是理论上的 1:1,文献报道正常杂合二倍体的峰面积比一般在 0.8~1.4 之间^[12];三体综合征患者的峰面积比理论值为 1:1:1 或 1:2/2:1,实际检测中当 3 个等位基因中有两个等位基因比值在 0.45~0.65 或 1.8~2.4,即可定义三体。因 QF-PCR 检测结果受到位点选择、STR 杂合度等因素的影响,故在临床项目开展中应充分考虑其局限性。

2.6 无创产前基因检测 通过采集孕妇 5ml 外周血,提取胎儿游离 DNA,通过新一代高通量测序技术,并结合生物信息分析,得出胎儿患染色体非整倍性疾病(21 三体,18 三体,13 三体)的风险率。该方

法最佳检测时间为孕早、中期,具有无创取样、无流产风险、高灵敏度,高准确性的特点。

在对胎儿游离 DNA 清除率的研究中发现,因血浆中胎儿游离 DNA 半衰期短,其水平能实时地反映胎儿 DNA 的生成和清除。因此孕妇外周血中胎儿游离 DNA 具有浓度高、清除快、高敏感性且易于分析的特征,这种循环胎儿游离 DNA 的存在使无创伤产基因检测技术应运而生。目前为止国内已完成数万样本量的检测,检出率达 99.9%,准确率达 99.7%。

综上所述,表 1 列出各种产前诊断技术的优势之处与各自的局限性。随着细胞遗传学与分子遗传学的不断发展,产前诊断的新技术理论知识的不断完善,未来会有更多的检测技术朝着高特异性、高检出率、高分辨率、高覆盖率及低成本、低耗时、低误差、低并发症等方向发展,相信在不久的将来,各种产前诊断技术将更好的服务于社会,并为优生优育做出巨大贡献。

表 1 各种遗传病检测技术的比较

	优势	局限性	在遗传病产前诊断中的用途
染色体核型分析	染色体异常诊断“金标准”; 检测覆盖 46 条染色体; 可检测所有的数目异常; 可检测约 8M 以上的结构异常; 显带方式多样化,可满足不同需求 检测费用低	对样本来源有一定要求; 需要经过细胞培养,检测周期长,多数 需要两周以上; 人工操作,工作量大,存在人为误差	适用于所有符合产前诊断指针 的孕妇
FISH	可检测大于 300 kb 的染色体异常; 耗时相对较低; 待测样本可不经细胞培养	对样本来源有一定要求; 只能检测已知序列特定区段; 覆盖疾病种类相对较少; 一次仅能检测数个位点; 人工操作,存在人为误差	适用于产前筛查提示 21 三体高 风险、18 三体高风险的孕妇
Array CGH	适用样本类型广泛; 全基因组覆盖; 检测周期短; 分辨率高; 自动化,工作量大,人为误差小	检测费用高; 分析数据量大,对数据分析者要求高, 某些结果存在不确定性; 无法检测出染色体平衡易位等异常	适用于死胎、反复性流产,需要 查明原因的夫妇,或产前细胞遗 传学诊断不明确但超声发现胎 儿结构异常的孕妇
MLPA	特异性强,可以针对单一位点进行点突变检测; 一次反应可以检测 45 个靶序列的拷贝数改变; 一次检测可以在 24h 内完成; 多采用试剂盒进行相关检测,操作简单且容易掌握	检测需要精确的 DNA 浓度; 不能用于单个细胞检测; 只适用于检测已知的基因缺失或重 复,不能检测未知的畸变,亦不能检测 染色体平衡易位等	适用于有明确诊断特定单基因 病妊娠史的孕妇
QF-PCR	适用样本类型多样化; 可快速诊断染色体非整倍体改变; 试剂盒检测,操作简便,人为误差小	覆盖疾病类型少; STR 位点挑选要求相对较高; 嵌合体检出率低	可以作为核型分析的辅助诊断 技术
无创产前 基因检测	明显优势在于本检测技术属于非侵入性产前诊断 技术; 假阳性率与假阴性率低; 检测周期相对较短	目前只适用于 21、13、18 与性染色体 非整倍体改变的检测; 母亲染色体异常对检测结果影响较大	适用于产前筛查高风险但不符 合侵入性产前诊断指针的孕妇、 不存在 B 超提示结构异常的 单纯产前筛查高风险孕妇、错过有 创产前诊断检测时间的孕妇

参考文献

- [1] 边旭明. 实用产前诊断学[M]. 北京:人民军医出版社, 2008:496.
- [2] Yeh YC, Wei HL, Lee WY, et al. Cellular Cardiomyoplasty with Human Amniotic Fluid Stem Cells: In Vitro and In Vivo Studies[J]. Tissue Engineering Part A, 2010, 16(6): 1925-1936.
- [3] 刘俊涛. 侵入性产前诊断技术的系列评估[D]. 博士研究生学位论文. 北京:北京协和医院. 2011:25-39.
- [4] 廖世秀. Down's 综合征的产前诊断研究进展[J]. 国外医学计划生育分册, 2003, 22(2): 81-85.
- [5] Aina-Mumuney AJ, Holcroft CJ, Blakemore KJ, et al. Intrahepatic vein for fetal blood sampling: one center's experience[J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 198(4): 387.
- [6] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [7] 郭奇伟, 周裕林. 利用母血胎儿游离 DNA 进行单基因病无创产前诊断研究进展[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(4): 410-413.
- [8] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768-775.
- [9] 耿茜, 吴维青, 罗福薇, 等. 应用 Array-CGH 及 MLPA 技术检测核型不明的 4 例染色体不平衡易位[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(3): 288-292.
- [10] Armstrong RN, Colyer HA, Mills KI. Screening for miRNA expression changes using quantitative PCR (Q-PCR) [J]. Methods Mol Biol, 2012, 863(3): 293-302.
- [11] 李红娟, 石为, 卢翔云, 等. 用高通量实时荧光 PCR 技术研究低浓度 MNNG 诱发的细胞基因应答反应[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23: (1) 1-6.
- [12] Chen CP, Huang HK, Su YN, et al. Trisomy 7 mosaicism at amniocentesis: interphase FISH, QF-PCR, and aCGH analyses on uncultured amniocytes for rapid distinguishing of true mosaicism from pseudomosaicism[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2012, 51(1): 77-82.

(收稿日期: 2014-04-02)

编辑: 宋文颖

视频导读

双胎输血综合征激光治疗后的结局

Dick Oepkes

(荷兰莱顿大学医学中心 产科)



双胎输血综合征(twin-twin transfusion syndrome, TTTS)是双胎妊娠中一种严重并发症,围产儿死亡率极高。患有 TTTS 的胎儿若未经治疗,死亡率可达 80%~90%,幸存儿也会引起较高风险的脑损伤;经传统方法治疗之后,胎儿可于 29 周终止妊娠,存活率为 50%~60%,会引起 30% 的神经损伤;若采用激光手术治疗后,胎儿终止妊娠的时间可延长至 34 周,术后存活率上升至 75%,神经损伤率降至 7%(3%~12%)。

在该视频中, Dick Oepkes 教授向我们阐述了激光治疗 TTTS 后可能产生的并发症及结局。现如今,国内 TTTS 病例也日趋增多,这些知识和经验值得国内的产科医生学习和借鉴。

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.03.014