

生长受限胎儿染色体微阵列结果分析

朱辉 林少宾 黄林环 何志明 黄轩 周祎 方群 罗艳敏

(广州市中山大学附属第一医院 妇产科胎儿医学中心, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的 探讨染色体微阵列分析(CMA)技术在胎儿生长受限(FGR)中的应用价值。方法 选取2013年3月至2015年5月在中山大学附属第一医院胎儿医学中心以FGR为指征行产前诊断的95份病例进行回顾性分析,所有病例行传统染色体核型分析,68例行CMA检测。结果 核型分析检测出8.42%(8/95)的异常,而CMA发现14.71%(10/68)的异常。在核型正常的FGR中,CMA额外检出8.33%的异常。CMA检测的异常包括2号染色体单亲二体和5q12.1、19p13.3p13.2和11p14.3等染色体微缺失/微重复。相关基因包括PMP22、ERCC8和C3。结论 CMA技术可以显著提高FGR遗传学病因的检出率。

【关键词】 胎儿生长受限;染色体微阵列分析技术;染色体核型分析

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To evaluate the contribution of chromosomal microarray analysis (CMA) in the prenatal diagnosis of fetal growth restriction (FGR). **Method** Ninety-five FGR cases between March 2013 to May 2015 were retrospectively analyzed. All of cases were evaluated by traditional karyotype while 68 cases were evaluated by CMA. **Results** Chromosomal aberrations were detected in 8.42% of the cases (8/95) by karyotype analysis, while in 14.71% of the cases (10/68) by CMA. In cases with normal karyotype, CMA identified significant abnormalities in 8.33% of FGR cases. The aberrations detected by CMA include uniparental disomy 2, microdeletions or microduplications of 5q12.1, 19p13.3p13.2 and 11p14.3, containing PMP22, ERCC8 and C3 gene. **Conclusions** CMA is an effective method for the genetic diagnosis of FGR.

【Key words】 fetal growth restriction; chromosomal microarray analysis; karyotype.

胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)指胎儿受各种不利因素影响,未能达到其潜在所应有的生长速率。FGR是围生期的重要并发症,其围生儿死亡率为正常胎儿的4~6倍,居围生儿死亡原因第二位^[1]。FGR的发生率约5%~10%^[2]。影响FGR的病因复杂,其中遗传因素所占的比例约为30%~70%,约40%尚不明确^[3,4]。染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)技术可以在全基因组范围内检测染色体不平衡的拷贝数变异(copy number variant, CNV),能高分辨检测染

色体的微缺失和微重复。与染色体核型分析和荧光原位杂交(FISH)检测相比,CMA技术具有高通量、高分辨率和高自动化检测的优势,近年来已经应用于侵入性产前诊断。本文对2013年3月至2015年5月在中山大学附属第一医院胎儿医学中心以FGR为指征行产前诊断的95份病例进行回顾性分析,旨在探讨CMA在FGR的产前诊断中的应用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析2013年3月至2015年5月在中山大学附属第一医院胎儿医学中心产前诊断为FGR的95例临床资料。根据末次月经及孕早期B超检查核实孕周无误。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2016.02.004

基金项目:中山大学青年教师培育项目(13ykpy18)

* 通讯作者:罗艳敏 邮箱:luoyanm@mail.sysu.edu.cn

1.2 诊断标准 FGR 的诊断标准为胎儿体重低于同孕龄胎儿平均体重第十百分位数。

1.3 实验方法

1.3.1 标本的采集 所有参与研究的对象均接受检测前的遗传咨询并签署知情同意书。依据孕周大小进行羊膜腔穿刺(16~24周)和脐静脉穿刺(>24周)。在B超腹部探头引导下分别行羊膜腔穿刺术抽取羊水30ml或脐静脉穿刺抽取脐血3ml进行培养以及染色体核型分析或CMA。

1.3.2 染色体核型分析 对取得的胎儿羊水或脐血标本进行常规细胞培养、制片、G显带,显微镜下检查20个核型,分析3个核型,若出现嵌合体则检查50个或100个核型。

1.3.3 CMA检测 采用美国Affymetric公司提供的高分辨率全基因组CytoScan HD芯片。实验操作严格按照Affymetric公司提供的操作流程。该芯片不仅能检测基因组缺失、重复,还能检测杂合性缺失和单亲二体。

1.3.4 CNV的判断和评价 数据分析过程分别参照本实验室内部数据库以及在线公开数据库,如DGV数据库、DECIPHER数据库、OMIM数据库等。

1.4 统计学处理 用SPSS 20.0软件计算95%的可信度区间(confidence intervals, CI)和统计分析。

2 结果

2.1 临床资料特点 孕妇平均年龄(28±4)岁(19~38岁),初产妇71例,经产妇24例。在中孕期产前诊断为FGR 50例,在晚孕期产前诊断为FGR 45例。孕妇初次诊断FGR的平均孕周(27±4)周(18~35周),行介入性产前诊断的平均孕周为(29±4)周(20~36周)。妊娠结局中足月分娩31例,早产13例,引产36例,失访15例。

2.2 核型分析与CMA检测结果的比较 95例FGR均行核型分析检测,68例行CMA检测。传统染色体核型分析在8.42%(8/95)的病例中检出异常(95%CI, 2.84%~14.01%),CMA发现14.71%(10/68)的异常(95%CI, 6.29%~23.12%)。

2.3 核型正常FGR的CMA检测结果 在核型正常的FGR中,有60例行CMA检测,CMA检出5例异常(8.33%;95%CI, 1.34%~15.33%)。涉及的染色体片段包括17p12区域1.364Mb的微重复、

2号染色体的单亲二体、5q12.1区域307kb的微缺失、19p13.3p13.2区域1.153Mb的微缺失和11p14.3区域1.357Mb的微缺失。

3 讨论

3.1 核型分析与CMA技术优缺点的比较 染色体核型分析作为传统的检测染色体异常的方法,已应用于产前诊断多年,可在全基因组检测染色体数目或大的结构异常。但传统核型分析技术耗时较长,对细胞培养要求较高,分辨率低(难以检出小于5Mb的染色体异常),自动化分析程度低,主观性较强,无法对FGR中染色体亚显微结构变异——染色体微重复、微缺失进行检测。

CMA较核型分析技术而言,具有快速、简便、高通量、高自动化、客观性好,能够检测染色体亚显微结构的改变。在2012年,Wapner^[5]在研究了行绒毛活检或者羊膜腔穿刺4406例的临床资料的基础上,发现CMA在胎儿结构异常中的检出率为6%。在一横断面研究中, Lee CN^[6]分析了2497例产前超声提示异常但核型正常的样本,结果表明CMA在单发畸形中可检出10.5%的有临床意义的异常,在多发畸形中,其检出率可达到15.4%。与之类似,Gruchy N等^[7]对38例FGR或/合并胎儿多发畸形的孕妇行CMA检测,发现在染色体核型分析正常的情况下,CMA能检出8%有意义的染色体异常。本研究的结果与文献报道的结果基本一致,进一步证实了FGR的遗传学病因除了与染色体结构异常或非整倍体有关,还与染色体微缺失/微重复有关。

3.2 CMA检测结果分析 本研究中,CMA检测发现17p12区域存在大小约为1.364Mb的微重复(重复区域含PMP22基因)和2p25.3q37.3区域存在父源性单亲二体(UPD2)。PMP22串联重复可致进行性腓骨肌萎缩症1型(Charcot-Marie-Tooth syndrome type 1A, CMT1A)^[8]。目前暂未发现CMT1A与胎儿生长发育相关的报道。有研究发现FGR是UPD2的常见临床表型^[9],但其作用机制仍不清楚。

此外,CMA检测发现5q12.1区域大小约为307kb的微缺失。在这缺失片段中,包含致病基因切除修复交叉互补8基因(excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, group 8,

ERCC8)。一般认为 ERCC8 是导致 Cockayne 综合征 A (Cockayne syndrome A, CSA) 的致病基因。Cockayne 综合征是一种罕见的常染色体隐性遗传的神经退行性病变,主要临床表现为生长发育迟缓、进行性的神经功能障碍、光敏性皮炎、特殊的鸟脸样面容、恶病质性侏儒症外貌、先天性白内障等^[10,11]。ERCC8 编码的蛋白质功能大多与核酸切除修复中的转录偶联修复通路有关。而在 2014 年, Sylvia Koch 等^[12]对 ERCC8 的功能有新的发现, ERCC8 编码的蛋白质是 RNA 聚合酶 I 的转录因子,通过与 CS 蛋白 TFIIH 和 CSB 结合,促进核糖体的生成,从而促进细胞的生长。目前文献报道的 CSA 大部分与 ERCC8 的复合杂合突变有关^[13,14],其缺失是否导致 CSA 的发生,尚未见报道。此外,其基因缺失可能导致核糖体合成不足,从而导致细胞凋亡及 FGR 的出现的推测,也需进一步的探讨。

在 19p13.3p13.2 区域, CMA 检出大小约为 1.153Mb 的微缺失。该缺失区域包含 OMIM 基因 C3。该基因编码的蛋白质是一种急性期反应物,在补体经典激活途径和旁路激活途径中均发挥重要作用^[15]。在一项动物研究中, Wang-Ngai Chow 等^[16]发现敲除了 C3 基因的小鼠受孕率低,囊胚小,胎盘大小及重量均低于野生型。其作用机制有两种可能:一是胎盘过小导致母胎之间的营养物质运输减少;二是缺乏 C3 的衍生物 C3a。C3a 又称为促酰化蛋白 (acylation stimulating protein, ASP),可诱导脂肪细胞分化,促进甘油三酯的合成。C3a 的缺乏可能导致脂肪代谢紊乱,从而影响胎儿大小。因此,我们推测本例 FGR 可能是由于 C3 的缺失,导致营养物质代谢紊乱或营养供应不足,从而影响胎儿的发育,但仍需深入的研究来明确其作用机制。

综上所述,本研究结果进一步证实了 FGR 的发生与染色体微缺失/微重复存在密切相关性。CMA 技术不仅能够检测到传统染色体核型分析技术检测不到的染色体微缺失/微重复,还能提示 FGR 候选致病基因,是寻找 FGR 遗传病因的有效方法。

参 考 文 献

[1] Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 204: 288-300.

[2] Froen JF, Gardosi JO, Thurmann A, et al. Restricted fetal

growth in sudden intrauterine unexplained death[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2004, 83: 801-807.

[3] Dunger DB, Petry CJ, Ong KK. Genetic variations and normal fetal growth[J]. *Horm Res*, 2006, 65(Suppl. 3): 34-40.

[4] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第 7 版, 北京: 人民卫生出版社, 2008:130.

[5] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367: 2175-2184.

[6] Lee CN, Lin SY, Lin CH, et al. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies[J]. *BJOG*, 2012, 119: 614-625.

[7] Gruchy N, Decamp M, Richard N, et al. Array CGH analysis in high-risk pregnancies: comparing DNA from cultured cells and cell-free fetal DNA[J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(4): 383-388.

[8] Murray I, Havel PJ, Sniderman AD, et al. Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein[J]. *Endocrinology*, 2000, 141 (3): 1041-1049.

[9] Chen CP, Su YN, Chern SR, et al. Mosaic trisomy 2 at amniocentesis: Prenatal diagnosis and molecular genetic analysis[J]. *Taiwanese J Obst Gynecol*, 2012, 51(4): 603-611.

[10] Nance MA, Berry SA. Cockayne syndrome: review of 140 cases [J]. *Am J Med Genet*, 1992, 42(1): 68-84.

[11] Natale V. A comprehensive description of the severity groups in Cockayne syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A (5): 1081-1095.

[12] Koch S, Garcia Gonzalez O, Assfalg R, et al. Cockayne syndrome protein A is a transcription factor of RNA polymerase I and stimulates ribosomal biogenesis and growth[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(13): 2029-2037.

[13] Cao H, Williams C, Carter M, et al. CKN1(MIM 216400): mutations in Cockayne syndrome type A and a new common polymorphism[J]. *J Hum Genet*, 2004, 49(1): 61-63.

[14] Ridley AJ, Colley J, Wynford-Thomas D, et al. Characterisation of novel mutations in Cockayne syndrome type A and xeroderma pigmentosum group C subjects[J]. *J Hum Genet*, 2005, 50(3): 151-154.

[15] Degn SE, Jensenius JC, Thiel S. Disease-causing mutations in genes of the complement system[J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(6): 689-705.

[16] Chow WN, Lee YN, Wong PC, et al. Complement 3 Deficiency Impairs Early Pregnancy in Mice[J]. *Mole Reprod Dev*, 2009, 76(7): 647-655.

(收稿日期: 2016-04-30)

编辑: 宋文颖