

染色体微阵列技术及全外显子测序在先天性心脏病产前诊断中的应用价值

廖灿*

(广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心 产前诊断中心, 广东 广州 510000)

【摘要】 先天性心脏病(简称先心病)是最常见的一类出生缺陷疾病,先心病患者合并心外畸形和神经发育障碍的风险通常会增加。因此,揭示胎儿先心病的遗传学病因,对于临床产前诊断以及遗传咨询非常重要。目前染色体微阵列分析技术已常规用于产前诊断胎儿先心病;全外显子测序技术正被越来越广泛地应用于结构异常胎儿,包括先心病胎儿的产前诊断。本文系统归纳了近年来染色体微阵列分析及全外显子测序技术在先天性心脏病产前诊断中的应用价值,为进一步临床推广提供参考。

【关键词】 先天性心脏病; 产前诊断; 染色体微阵列分析; 全外显子测序

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

先天性心脏病(congenital heart defect, CHD)简称先心病,是最常见的一类出生缺陷疾病,每1000名活产婴儿中约有10名(~1%)患病受累^[1]。根据患病率排序,最常见的先心病类型依次为室间隔缺损(3.07%)、房间隔缺损(1.44%)、动脉导管未闭(1%)、肺动脉狭窄(0.55%)、法洛四联症(0.36%)、大动脉转位(0.3%)、房室间隔缺损/主动脉缩窄(0.29%)^[2]。先心病的病因复杂,包括染色体异常、单基因疾病、表观遗传改变、环境因素、多基因因素、母亲年龄或疾病等^[3, 4]。

遗传和表型的异质性以及可变外显率,增加了先心病遗传学诊断的复杂性。由染色体非整倍体所导致的先心病约占13%,染色体缺失重复,即拷贝数变异(copy number variant, CNV)约占10%,单基因疾病变异约占11%,环境因素约占10%,其余约55%仍病因不明^[5]。导致先心病的常见遗传综合征包括染色体非整倍体如21/18/13三体以及Turner综合征,染色体微缺失如22q11微缺失综合征、Williams综合征(7q11.23微缺失)等,单基因疾病如Noonan综合征、Kabuki综合征、CHARGE综

合征等^[2]。采用全外显子测序(whole exome sequencing, WES)技术检测CHD患者的一项大规模的研究表明,分别有8%和2%的病例归因于新发常染色体显性变异和常染色体隐性变异^[6]。根据先心病是否合并心外先天畸形(congenital anomalies, CA)和/或神经发育障碍(neurodevelopmental disabilities, NDD),可分类为孤立性CHD及非孤立性CHD(或称综合征型CHD)。已有研究表明,先心病患者合并心外畸形和神经发育障碍的风险增加,这是由于先心病与神经发育障碍、心外畸形具有共同的遗传学基础^[7]。

揭示胎儿先心病的遗传发病机制,对于临床产前诊断非常重要,主要原因包括:①为先心病胎儿提供更准确的预后,以及相关干预治疗结果的遗传咨询。②评估先心病胎儿相关的心外畸形。③评估先心病胎儿合并神经发育障碍疾病的风险。④评估先心病胎儿家系亲属的风险,以及将来妊娠的再发风险。⑤提高先心病胎儿的生存率。⑥有助于未来胚胎种植前诊断和早孕期产前诊断。

胎儿先心病产前遗传学诊断的方法主要是染色体核型分析和染色体微阵列分析(chromosome microarray analysis, CMA),分别检测染色体非整倍体和染色体结构变异。目前下一代测序(next-

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.01.002

* 通信作者:廖灿, Email: canliao6008@163.com

基金项目:十四五国家重点研发计划项目(2021YFC2701002)

发现。上述结果数据的差异可能与胎儿病例选择、样本分布差异、样本量等因素有关。

染色体微阵列分析在胎儿先心病产前诊断中的应用文献总结详见表1。

表1 CMA在胎儿先心病产前诊断中的应用文献总结($n \geq 100$)

研究来源	病例纳入标准	孤立性		非孤立性		合计			
		例数 (n)	诊断率 (%)	例数 (n)	诊断率 (%)	例数 (n)	非整倍体 诊断率 (%)	CNV 诊断率 (%)	总诊断率 (%)
Lu et al. 2022 ^[13]	所有类型 CHD	134	20.9	66	31.8	200	11.5	13.0	24.5
Zhang et al. 2022 ^[14]	所有类型 CHD	867	8.1	168	21.4	1035	4.8	5.3	10.1
Qiao et al. 2021 ^[15]	所有类型 CHD	277	12.3	83	31.3	360	8.1	8.6	16.7
Sagi-Dain et al. 2021 ^[16]	所有类型 CHD	1433	3.8	295	13.2	1728	3.1	2.3	5.4
Mustafa et al. 2020 ^[17]	所有类型 CHD	141	22.0	76	64.5	217	29.5	7.4	36.9
Song et al. 2019 ^[18]	所有类型 CHD	123	9.8	67	9.0	207	8.2	8.7	16.9
Turan et al. 2018 ^[19]	所有类型 CHD	92	16.4	53	24.5	145	14.0	20.0	34.0
Wang et al. 2018 ^[20]	所有类型 CHD	421	14.3	181	35.9	602	14.1	14.3	28.4
Hureaux et al. 2019 ^[21]	孤立性 CHD	239	7.9	NA	NA	239	NA	7.9	7.9
Maya et al. 2020 ^[24]	室间隔缺损	568	1.4	123	14.6	691	2.0	1.7	3.8
Cai et al. 2018 ^[25]	室间隔缺损	79	1.3	72	36.1	151	9.3	13.3	22.5
Fu et al. 2017 ^[26]	室间隔缺损	73	5.5	71	11.3	144	NA	8.3	8.3
Cheng et al. 2022 ^[27]	孤立性室间隔缺损	168	4.2	NA	NA	168	NA	4.2	4.2

二、全外显子测序技术在先心病产前诊断中的应用

NGS技术已被证明是临床诊断孟德尔遗传病的有力工具^[28,29]。全外显子测序(WES)是神经发育障碍患者的一线诊断检测^[30]。美国医学遗传学和基因组学会(ACMG)最新的临床指南建议,将全外显子测序和全基因组测序作为一级或二级检测,用于1岁之前患有的一种或多种心外先天畸形的患者,或18岁之前发病的发育迟缓或智力残疾患者^[31]。鉴于在出生后患者中的成功应用以及当前产前基因检测的局限性,WES正被更广泛地应用于临床产前诊断。但是除了胎儿结构异常的应用指征,目前尚无证据支持在产前诊断中将WES作为常规检测^[32,33]。近几年,越来越多研究报道了WES在结构异常胎儿病例中的检测效能,包括先心病胎儿的产前诊断^[13,15,34-40]。有研究表明,WES对各种结构异常胎儿病例的总体诊断率为15%(415/2771),其中对孤立性CHD胎儿的诊断率为11%(85/773)^[41]。

针对WES在先心病产前诊断中应用的荟萃分析显示^[35],总体诊断率为21%($n=636$),孤立性和非孤立性CHD病例的诊断率分别为11%($n=288$)和37%($n=241$)。根据不同的CHD类型,WES在心脏分流病变组(包括室间隔缺损、房间隔缺损、肺

静脉异位引流、房室间隔缺损)的诊断率最高(41%),其次为右心缺陷(26%)。在CHD合并心外畸形的病例中,诊断率最高的是CHD合并泌尿生殖系异常(44.2%)。约70%诊断病例的致病变异为常染色体显性新发,且最常见的单基因疾病综合征是歌舞伎综合征(19.8%)。另一项荟萃分析^[15]也得出了类似结果,CHD胎儿中的WES诊断率为17%($n=1557$),孤立性和非孤立性CHD的诊断率分别为10%和36%。

国内两项大样本量针对CHD胎儿的WES诊断率则低于上述两项荟萃分析^[15,36],这可能是与胎儿病例选择、样本分布差异、样本量以及是否合并心外畸形等因素有关。其中一项是笔者所在的中心针对260例CHD胎儿的WES检测分析^[36],总体诊断率仅为10%,孤立性和非孤立性CHD的诊断率分别为7.9%和15.7%。简单型CHD(定义为解剖学上单一或独立的实体)和复杂型CHD(定义为单心室、大动脉L型转位或多个心脏异常)的诊断率分别为9.9%和16.7%^[42],二者间无显著差异。根据不同CHD类型,WES诊断率从高到低依次为:心脏横纹肌瘤(60%)、复杂型CHD(16.7%)、隔膜缺损(14.0%)、圆锥动脉干缺损(9.9%)、右心缺陷(8.3%)、左心缺陷(7.9%)、内脏反位(6.7%)及主动脉弓异常(5.3%)。另一项国内研究显示WES

总体诊断率为8% ($n=300$)^[15], 孤立性CHD诊断率为7.2%, 非孤立性CHD诊断率为12%。在不同类型CHD中, 房室间隔缺损的诊断率(20%)最高, 其次分别为复杂型CHD(14.3%)、圆锥动脉干缺损(10.3%)、右心缺陷(9.1%)。这些数据与本中心的研究结果类似, 并且均提示WES检出率与CHD是否合并心外畸形相关, 而与CHD本身的复杂程度无关。

值得注意的是, 孤立性和非孤立性CHD胎儿的分类是基于产前影像学检查结果, 而并非所有非孤立性(综合征型)CHD都能通过产前检查被正确归类。事实上, 由于胎儿期疾病的不同表现形式、不完全外显率或仅在孕晚期出现的结构异常, 在产前环境中并不总是能够确定完整、准确、清晰的胎儿“表型”^[43]。产前影像学方法无法检测某些疾病表型, 如发育迟缓、智力低下、细微畸形特征或代谢异常。此外, 先心病是一组倾向于高度异质性、具有多基因和多因素致病机制的疾病, 某些情况可能无法通过基因组检测揭示病因。所有这些情况都使产前WES的分析变得更加复杂和具有挑战性。已有研究揭示了CHD、神经发育障碍和先天性畸形具有共

同的遗传基础^[7], 在产前胎儿病例中更加证明了这一事实。在WES明确诊断的CHD胎儿病例中, 约85%的阳性病例诊断为涉及CHD和神经系统表型的遗传性综合征, 这其中约60%的病例根据产前超声最初被归类为孤立性CHD, 但根据遗传学诊断被重新归类为非孤立性(综合征型)CHD^[36]。因此, 在产前诊断中, 无论是孤立性CHD, 还是非孤立性CHD(即综合征型CHD), 在常规检测(核型分析和CMA)阴性后进行进一步的分子诊断尤为重要。

WES技术在产前诊断胎儿结构异常中表现出显著的临床应用价值, 但也存在技术局限性, 主要包括无法检测假基因、动态突变, 以及内含子、基因侧翼序列的微小变异; 无法检测染色体结构变异包括平衡易位、倒位等; 也无法检测未完全覆盖区域。可能原因包括高GC含量区(鸟嘌呤和胞嘧啶所占比率称为GC含量)、序列高度重复区及基因组其它位置存在高度同源的序列等。因此在检测前需充分评估疾病表型和疾病种类, 以便选择适用的检测技术。

全外显子测序技术在胎儿先心病产前诊断中的应用文献总结详见表2。

表2 WES在胎儿先心病产前诊断中的应用文献总结($n \geq 50$)

研究来源	病例纳入标准	孤立性		非孤立性		合计	
		例数 (<i>n</i>)	诊断率 (%)	例数 (<i>n</i>)	诊断率 (%)	例数 (<i>n</i>)	总诊断率 (%)
Lu et al. 2022 ^[13]	所有类型CHD	44	9.1	8	25.0	52	11.5
Chen et al. 2022 ^[34]	所有类型CHD	NA	NA	NA	NA	235	16.2
Qiao et al. 2021 ^[15]	所有类型CHD	250	7.2	50	12.0	300	8.0
Mone et al. 2021 ^[35]	所有类型CHD	122	11.5	75	14.7	197	12.7
Li et al. 2020 ^[36]	所有类型CHD	190	7.9	70	15.7	260	10.0
Lord et al. 2019 ^[37]	所有类型CHD	NA	NA	NA	NA	81	11.1
Petrovski et al. 2019 ^[38]	所有类型CHD	49	2.0	28	10.7	77	5.1
Yi et al. 2022 ^[39]	内脏反位	NA	NA	NA	NA	69	11.6
Sun et al. 2020 ^[40]	左心异常	53	15.1	13	38.5	66	19.7

三、CMA和WES检测的遗传咨询

无论是CMA还是WES检测技术, 相比特定基因检测, 在提高检出率的同时, 都会增加检出不明确结果以及意外/次要发现的可能。任何新技术的应用, 都将对医患双方的认知教育提出更高的要求, 同时也带来一些重大的挑战。全面的检测前咨询、充分的知情同意及全面的检测后咨询非常必要。提供

检测技术时, 进行检测前咨询、签署知情同意书、结果解释及检测后咨询的人员, 必需熟知各项技术的利弊。检测前咨询和知情同意书内容应包括: 检测结果类型(致病性、可能致病性、不明确、可能良性或良性变异); 结果是否包括意外发现(如与胎儿指征无关的儿童早期起病的疾病)、次要发现(如肿瘤易感基因)及成年期发病的相关基因; 报告周期以及检测风险(如检测失败或可能在分娩前未能获得胎儿

结果)^[32,33]。还需强调的一点是,检测前咨询还应涉及检测结果的时效性,即报告内容仅基于报告发放当时的知识,随着时间的推移,对疾病相关基因的知识、序列变异的致病性及胎儿表型的认知上都可能发生变化;以及涉及测序原始数据在不同医院间如何共享、重分析等,样本储存和(或)数据存储是否符合国家安全。比如产前诊断后,又到其他医院生殖做PGD,或者数据需要拿到其他医院重分析。检测后咨询和结果返回情况(如报告哪些结果),应根据检测前咨询时医患双方讨论的结果而定。同时需建立多学科讨论会诊机制,多学科成员应包括临床遗传学专家、有应用测序技术经验的人员、产前影像学专家及产前咨询医师。进行结果解读和咨询前,最好先通过多学科讨论,并结合临床记录、检测结果和胎儿影像学资料综合分析^[32,33]。

四、结语

CMA及WES在先天性心脏病产前诊断中的应用价值已得到广泛肯定,尤其是WES正被更普遍地应用于临床产前诊断。尽管目前基于WES数据也可以分析CNV,但CMA仍然是检测CNV更为可靠的技术。对于先天性心脏病胎儿,无论是否为孤立性CHD或合并其他结构异常的非孤立性CHD,无论是否为简单型CHD或复杂型CHD,均应为所有CHD胎儿提供CMA和/或WES检测的选项。尽管WES产前诊断CHD的诊断率显著增加,但这一技术的临床常规应用需要强有力的生物信息学、临床、实验室和伦理路径。需要建立临床指南,概述胎儿应采用何种诊断模式,在基因检测前后应如何进行咨询,应报告哪类结果,以及如何解读不明确结果,以确保临床检测的正确实施。

参 考 文 献

- [1] VAN DER LINDE D, KONINGS EE, SLAGER MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011,58(21):2241-2247.
- [2] TEODORO JERVES, ANDREA BEATON, PAUL KRUSZKA. The genetic workup for structural congenital heart disease[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2020, 184(1):178-186.
- [3] TENNSTEDT C, CHAOUI R, KORNER H, DIETEL M. Spectrum of congenital heart defects and extracardiac malformations associated with chromosomal abnormalities: results of a seven year necropsy study[J]. *Heart*, 1999,82(1):34-39.
- [4] HAMEED AB, SKLANSKY MS. Pregnancy: maternal and fetal heart disease[J]. *Curr Probl Cardiol*, 2007, 32(8):419-494.
- [5] NICHOLAS S DIAB, SYNDI BARISH, WEILAI DONG, et al. Molecular Genetics and Complex Inheritance of Congenital Heart Disease[J]. *Genes (Basel)*, 2021,12(7):1020.
- [6] SHENG CHIH JIN, JASON HOMSY, SAMIR ZAIDI, et al. Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands[J]. *Nat Genet*, 2017, 49(11):1593-1601.
- [7] JASON HOMSY, SAMIR ZAIDI, YUFENG SHEN, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies [J]. *Science*, 2015,350(6265):1262-1266.
- [8] RONALD J WAPNER, CHRISTA LESE MARTIN, BRYNN LEVY, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(23):2175-2184.
- [9] MILLER DT, ADAM MP, ARADHYA S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies[J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86:749-764.
- [10] HOCHSTENBACH R, BUIZER-VOSKAMPJE, VORSTMAN JA, et al. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2011, 135:174-202.
- [11] DUNCAN A, LANGLOIS S; SOGC Genetics Committee; CCMG Prenatal Diagnosis Committee. Use of array genomic hybridization technology in prenatal diagnosis in Canada[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2011,33(12):1256-1259.
- [12] American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis [J]. *Obstet Gynecol*, 2013,122(6):1374-1377.
- [13] FENGYING LU, PENG XUE, BIN ZHANG, et al. Estimating the frequency of causal genetic variants in fetuses with congenital heart defects: a Chinese cohort study[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2022,17(1):2.

- [14] ZHU ZHANG, TING HU, JIAMIN WANG, et al. Pregnancy outcomes of fetuses with congenital heart disease after a prenatal diagnosis with chromosome microarray[J]. *Prenat Diagn*, 2022,42(1):79-86.
- [15] F QIAO, Y WANG, C ZHANG, et al. Comprehensive evaluation of genetic variants using chromosomal microarray analysis and exome sequencing in fetuses with congenital heart defect[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2021,58(3):377-387.
- [16] LENA SAGI-DAIN, AMIHOOD SINGER, REEVAL SEGEL, et al. The yield of chromosomal microarray in pregnancies with congenital cardiac defects and normal noninvasive prenatal screening[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2021,225(3):333. e1-333. e14.
- [17] HIBA J MUSTAFA, KATHERINE M JACOBS, KATELYN M TESSIER, et al. Chromosomal microarray analysis in the investigation of prenatally diagnosed congenital heart disease[J]. *Am J Obstet Gynecol MFM*, 2020,2(1):100078.
- [18] TINGTING SONG, SHANNING WAN, YU LI, et al. Detection of copy number variants using chromosomal microarray analysis for the prenatal diagnosis of congenital heart defects with normal karyotype[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019,33(1):e22630.
- [19] SIFA TURAN, MEHMET RESIT ASOGLU, RINAT GABBAY-BENZIV, et al. Yield rate of chromosomal microarray analysis in fetuses with congenital heart defects[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018,221:172-176.
- [20] YAN WANG, LI CAO, DONG LIANG, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with congenital heart disease: a prospective cohort study[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018,218(2):244. e1-244. e17.
- [21] MARGUERITE HUREAUX, SARAH GUTERMAN, BÉRÉNICE HERVÉ, et al. Chromosomal microarray analysis in fetuses with an isolated congenital heart defect: A retrospective, nationwide, multicenter study in France[J]. *Prenat Diagn*, 2019,39(6):464-470.
- [22] GIOIA MASTROMO, NADER KHALEGHI HASHEMIAN, DANIELE GUADAGNOLO, et al. Chromosomal Microarray Analysis in Fetuses Detected with Isolated Cardiovascular Malformation: A Multicenter Study, Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022,12(6):1328.
- [23] YINGJUAN LIU, SEN CHEN, LIESL Z? HLKE, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies[J]. *Int J Epidemiol*, 2019,48(2):455-463.
- [24] IDIT MAYA, AMIHOOD SINGER, HAGITH YONATH, et al. What have we learned from 691 prenatal chromosomal microarrays for ventricular septal defects[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 202,99(6):757-764.
- [25] MEIYING CAI, HAILONG HUANG, LINJUAN SU, et al. Chromosomal abnormalities and copy number variations in fetal ventricular septal defects[J]. *Mol Cytogenet*, 2018,11:58.
- [26] FANG FU, QIONG DENG, TING-YING LEI, et al. Clinical application of SNP array analysis in fetuses with ventricular septal defects and normal karyotypes[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017,296(5):929-940.
- [27] KEN CHENG, HANG ZHOU, FANG FU, et al. Should prenatal chromosomal microarray analysis be offered for isolated ventricular septal defect? A single-center retrospective study from China[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022,9:988438.
- [28] YANG Y, MUZNY DM, REID JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders[J]. *N Engl J Med*, 2013,369:1502-1511.
- [29] YANG Y, MUZNY DM, XIA F, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing[J]. *JAMA*, 2014,312:1870-1879.
- [30] SRIVASTAVA S, LOVE-NICHOLS JA, DIES KA, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders[J]. *Genet Med*, 2019,21:2413-2421.
- [31] KANDAMURUGU MANICKAM, MONICA R MCCLAIN, LAURIE A DEMMER, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)[J]. *Genet Med*, 2021,23:2029-2037.
- [32] International Society for Prenatal Diagnosis, Society for Maternal and Fetal Medicine, Perinatal Quality Foundation. Joint Position Statement from the International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), the Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), and the Perinatal Quality Foundation (PQF) on the use of genome-wide sequencing for fetal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2018,38(1):6-9.
- [33] MONAGHAN KG, LEACH NT, PEKAREK D, PRASAD P, ROSE NC; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)[J]. *Genet Med*, 2020,22:675-680.
- [34] XINLIN CHEN, YULIN JIANG, RUIGUO CHEN, et al. Clinical efficiency of simultaneous CNV-seq and whole-exome sequencing for testing fetal structural anomalies[J]. *J Transl Med*, 2022,20(1):10.
- [35] F MONE, R Y EBERHARDT, R K MORRIS, et al. Con-

