

142例胎儿唇腭裂的超声诊断与遗传因素分析

成晨^{1#} 杨颖^{2#} 王卫云¹ 陈芳² 黄慧¹ 杨帆¹ 陈欣林^{1*} 郭健^{2*}

(1 湖北省妇幼保健院,湖北 武汉 430070;2 深圳华大生命科学研究院,广东 深圳 518083)

【摘要】目的 探讨胎儿唇腭裂的影像学特征与遗传基础。**方法** 142例病例均接受产前超声系统检查,经过两级医生检查及会诊做出最终诊断。同时收集活产胎儿的胎儿脐带或引产胎儿的大腿肌肉组织,进行全基因组测序(whole genome sequencing, WGS),以发现染色体数目异常和拷贝数异常(copy number variations, CNVs)。**结果** 142例孕妇年龄分布为21~41岁,孕周为12~35周。142例胎儿中,男性94例,女性48例,男女比例为1:0.51。根据唇腭裂的类型,单纯唇裂有84/142例(59.15%),唇裂合并其他系统畸形情况有31/142例(21.83%)。单纯唇腭裂有14/142例(9.86%),唇腭裂合并其他系统畸形情况有13/142例(9.15%)。9.2%(13/142)的胎儿有染色体数目异常,8.4%(12/142)的胎儿检出了致病性CNV。**结论** 对CNVs的检测可以增加胎儿唇腭裂的遗传检测诊断率,在临床中应重视检测致病性CNVs。

【关键词】 唇腭裂;染色体异常;微缺失/重复;拷贝数变异

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

Prenatal diagnosis and genetic analysis in a series of 142 fetuses with Cleft Lip and palate

Cheng Chen¹, Yang Ying², Wang Weiyun¹, Chen Fang², Huang Hui¹, Yang Fan¹, Chen Xinlin^{1*}, Guo Jian^{2*}

1. Maternity and Child Healthcare Hospital Hubei, Hubei 430070, China. 2. BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China.

Corresponding author: Chen Xinlin, E-mail: 928339431@qq.com, Guo Jian, E-mail: guojian@genomics.cn

【Abstract】Objective To study the imaging features of 142 fetuses with cleft lip and explore the genetic basis of these fetuses. **Methods** A cohort of 142 fetuses with cleft lip (including cleft palate), which were detected by prenatal ultrasound and confirmed by specialist consultants, were collected. The available tissues, including fetal umbilical cord from live-born fetuses or thigh muscle from aborted fetuses, were subject to low pass whole-genome sequencing (WGS), to identify chromosomal anomalies and copy number variations (CNVs). **Results** The age distribution of 142 pregnant women ranged from 21 to 41 years old and gestational weeks ranged from 12 to 35 weeks. Of these 142 fetuses, there are 94 male fetuses and 48 female fetuses, and the male to female ratio was 1:0.51. According to the types of cleft lip and palate, there were 84/142 cases (59.15%) of cleft lip alone, and 31/142 cases (21.83%) of cleft lip combined with other systematic malformations. There were 14/142 cases of cleft lip and palate alone (9.86%), and 13/142 cases of cleft lip and palate combined with other system malformations (9.15%). 9.2% (13/142) of fetuses had chromosome anomalies, and 8.4% (12/142) of fetuses had a pathogenic CNV. **Conclusion** The overall genetic diagnosis rate is 17.6% (25/142). The detection rate of chromosome anomalies was 9.2% (13/142). The detection rate of the CNV was 8.4% (12/142).

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.01.002

共同第一作者

基金项目:湖北省卫生健康委项目(WJ2018H0164、WJ2018H0132、WJ2017Z019)

* 通信作者:陈欣林,E-mail:928339431@qq.com;郭健,E-mail:guojian@genomics.cn

Identification of pathogenic CNVs can increase the genetic diagnosis of cleft lip and palate, and thus attentions should be paid to CNVs analysis.

【Key words】 Cleft lip and palate; Chromosomal anomalies; Microduplication/deletions; Copy number variations

先天性唇腭裂(包括腭裂)是人类最常见的先天出生缺陷,每500~1000例新生儿中就有1例是唇腭裂^[1]。遗传和流行病学研究表明了唇腭裂是一个多因素的疾病,遗传模式很复杂,遗传和环境因素都会导致疾病风险^[2]。从胚胎发生学来看,唇腭裂的类型包括4种,单纯唇腭裂、唇腭裂合并其他系统畸形、单纯唇裂、唇裂合并其他系统畸形。总体来说,亚洲和美洲印第安人的出生患病率最高,在不同人群中的易感位点可能有所不同,然而,最近的流行病学资料表明,唇裂可能具有独特的病因特征,包括很强的遗传相关性^[3]。本研究对142名唇腭裂胎儿的染色体数目异常以及拷贝数变异进行分析,探讨其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 对象 2014年1月至2017年12月在湖北省妇幼保健院就诊,胎儿超声提示唇裂或唇腭裂的孕妇,知情同意自愿留取活产胎儿的脐带或引产胎儿的大腿肌肉组织样本进行全基因组测序(whole-

genome sequencing, WGS)的142例孕妇。孕妇年龄分布为21~41岁,孕周为12~35周。

1.2 方法

1.2.1 仪器使用 德国Siemens S2000彩色多普勒超声诊断仪,相控阵腹部6C2探头,频率3~5MHz,韩国Samsung WS80,探头频率6~10MHz,筛查胎儿各系统。

1.2.2 测序 ①提取胎儿DNA;DNA提取试剂盒由QIAGEN公司生产;②全基因组测序:使用华大基因BGISEQ-500测序平台对收集的样本进行低深度WGS以检测染色体数目异常以及大于100kb以上的拷贝数变异(copy number variations, CNV)。

2 结果

2.1 一般情况 142例胎儿中,男性94例,女性48例,男女比例为1:0.51。孕妇的年龄分布和孕周分布见图1。单纯唇裂、单纯唇腭裂合并其他系统畸形的分类及数目情况见图2。唇裂与唇腭裂合并畸形涉及的疾病种类见表1。

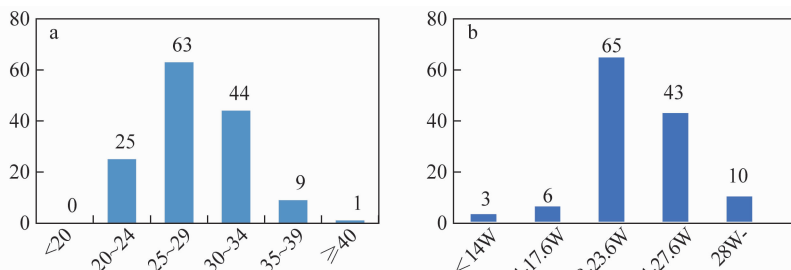


图1 收集的142例唇腭裂胎儿例本的孕妇信息
a. 孕妇年龄(岁)分布情况;b. 孕周分布情况

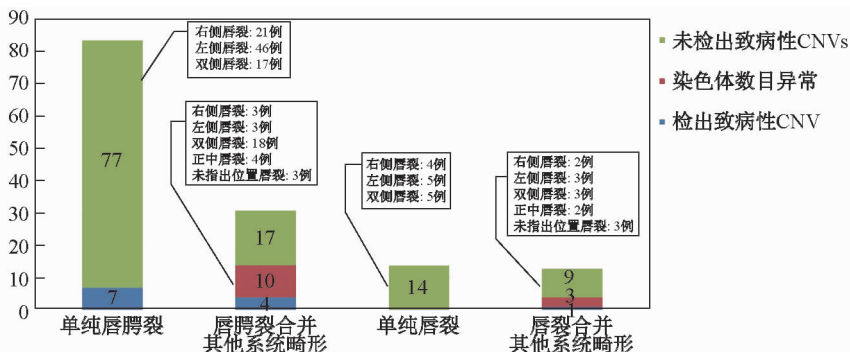


图2 单纯唇裂、单纯唇腭裂及合并其他系统畸形情况

未检出染色体数目异常或致病性CNVs病例可进行高深度的基因组测序分析

2.2 低深度全基因组测序检出唇腭裂胎儿的情况

单纯性唇裂和合并唇腭裂染色体及 CNV 情况见表 2,唇腭裂合并畸形的染色体及 CNV 情况见表 3。

表 1 唇裂与唇腭裂及合并畸形情况

疾病分类	唇裂 (例)	占总例本数 (%)	唇腭裂 (例)	占总例本数 (%)
神经系统畸形	5	3.52	16	11.27
先天性心脏病	4	2.82	15	10.56
其他颜面畸形	4	2.82	7	7.45
骨骼异常	4	2.82	6	4.23
腹壁缺损	4	2.82	4	2.82
泌尿系统异常	1	0.70	3	2.11
胸腔异常	1	0.70	1	0.70
胎儿水肿	1	0.70	1	0.70
胎儿附属物异常	1	0.70	1	0.70
多胎异常	0	0	2	1.41
脊柱异常	0	0	1	1.41
消化系统畸形	0	0	1	0.70
合计	13	9.15	31	21.83

表 2 单纯性唇裂和单独性唇腭裂染色体及 CNV 情况

唇腭裂类型	染色体异常 (例)	检出率 (%)	致病性 CNV (例)	检出率 (%)
单纯性唇裂(n=14)	0	0	0	0
单纯性唇腭裂(n=84)	0	0	7	8.33
合计	0		7	

表 3 唇腭裂合并畸形的染色体及 CNV 情况

唇腭裂类型	染色体 异常(例)	占比 (%)	致病性 CNV(例)	占比 (%)
唇裂合并其他系统畸形(n=13)	3	23.08	1	7.69
唇腭裂合并其他系统畸形(n=31)	10	32.26	4	12.9
合计	13		5	

2.3 检出致病性 CNV 的阳性病例 在患者中所检出致病性 CNV 的具体情况见下表 4。

3 讨论

唇腭裂是一种多基因参与的遗传病,并且伴有

表 4 检出致病性 CNV 的阳性病例

病人 编号	孕妇 年龄 (岁)	孕周 (W)	胎儿 性别	胎儿表现	致病性 CNV
病例 1	23	—	女	上唇偏左侧唇腭裂	DEL(1p36.32p36.33)(2.9 Mb)
病例 2	27	23.1	女	上唇偏左侧唇腭裂	DEL(9q31.1q32)(12.4 Mb)
病例 3	22	23.6	男	上唇偏左侧唇腭裂	DEL(22q11.21)(2.6 Mb)
病例 4	26	—	女	上唇双侧唇腭裂	DEL(22q11.21q11.23)(2.1 Mb)
病例 5	23	21.4	女	上唇双侧唇腭裂	DEL(Xp11.3p11.4)(3.9 Mb)
病例 6	27	27.2	男	上唇双侧唇腭裂,AC 及四肢长骨均位于正常值百分之五位以下,小脑蚓部发育不良,小脑蚓部缺失,小脑延髓池增宽(Dandy Walker),脊柱颈胸段排列紊乱,双手叠指;羊水过多胎儿先天性心脏病,法洛四联症;心律不齐	DEL(3p26.3p14.3)(57.7 Mb)
病例 7	28	25.5	女	双侧侧脑室位于正常值上限,上唇正中唇裂伴双侧腭裂;脐膨出可能胎儿 FL、HL 均位于正常值的第五个百分位数以下;羊水过多	DEL(3p26.3)(1.9 Mb)
病例 8	27	25.1	男	脑膜膨出,双侧侧脑室增宽,上唇偏左侧唇腭裂;单脐动脉(左侧缺如)	DEL(6q25.3q27)(10.3 Mb)
病例 9	26	29.3	女	上唇偏左侧唇腭裂;右位主动脉弓,左锁骨下动脉迷走,气管后导管(先天性血管环)属于唇裂合并其他系统畸形	DUP(16p11.2)(0.8 Mb)
病例 10	29	26.2	男	上唇双侧唇腭裂	DUP(22q11.22q11.23)(1.3 Mb);
病例 11	27	21.5	男	上唇偏右侧唇腭裂,永久性右位脐静脉	DUP(22q11.23)(0.6 Mb)
病例 12	34	21.3	男	上唇正中稍偏左侧唇腭裂,眼距明显增宽、两鼻孔分离、面部中线融合异常、脏胚体缺失	DUP(17p13.3)(0.4 Mb)
					DUP(22q11.21)(3.2 Mb)

环境因素的影响。唇腭裂与许多因素相关,比如唇腭裂家族遗传史,主/被动吸烟,饮酒等不良生活习惯,孕早期患病和用药,孕妇叶酸服用不足,感染史,孕妇早期精神压力大等^[4-6]。因此,产前诊断胎儿唇腭裂具有非常重要的意义。找到该病的遗传原因,了解该病的发病机制。

本研究利用低深度全基因组测序技术手段对唇腭裂胎儿进行了测序。我们选取了大样本量唇腭裂胎儿样本,并对其进行了系统而精准的分类与统计。在我们 142 例胎儿中,女性胎儿唇腭裂发生率低于

男性胎儿,男女比例为 1:0.51。根据唇腭裂的类型,我们对唇腭裂胎儿样本进行了分类,包括单纯唇裂、唇裂合并其他系统畸形情况;单纯唇腭裂、唇腭裂及合并其他系统畸形情况。单纯性唇腭裂发生率最高,占总数的 59%(84/142),其次依次是唇腭裂及合并其他系统畸形,占比 22%(31/142)、单纯唇裂占比 10%(14/142)、唇裂及合并其他系统畸形占比 9%(13/142)。我们发现,唇裂和唇腭裂伴发其他系统畸形情况的病种排名几乎是一致的。与唇腭裂合并出现的系统畸形种类高达 12 种。唇裂和唇

腭裂伴发其他系统畸形情况的病种发生率最高的3个病种依次是神经系统畸形、先天性心脏病和其他颜面异常。因此,当我们遇到唇腭裂的病例时,应留心是否有其他系统的畸形,尤其关注神经系统畸形、先天性心脏病和其他颜面异常。

142例胎儿中,单纯性唇腭裂胎儿共98例(69%,98/142),唇腭裂合并其他系统畸形胎儿总共42例(31%,44/142)。唇腭裂合并其他系统畸形的发生率低于单纯性唇腭裂。98例唇腭裂胎儿中,未发现染色体数目异常,其中7例检出致病性CNVs(7%,7/98),提示我们对于单纯性唇腭裂胎儿,只进行染色体遗传检查,可能会漏检,应重视对CNV的检查。而对于42例唇腭裂合并其他系统畸形胎儿,有13例染色体异常,占比31%(13/42),5例胎儿检出致病性CNV,占比12%(5/42)。对于这类胎儿,临床中应首先注重对染色体异常的检查,其次关注CNV异常。总体而言,阳性诊断率为17.6%(25/142),我们总共发现了13例染色体异常,占总例本数的9.2%(13/142),而12例胎儿致病性CNV的检出,增加了8.4%的诊断率(12/142)。从病因学出发,对唇腭裂胎儿行单纯的染色体检查是有局限性的,需要增加CNV的检查以提高总检出率。

传统的染色体核型检查,也就是G-显带检查,是目前常用的方法,可检查大片段的染色体数目异常,包括非整倍体和三倍体。近年来,染色体微阵列分析技术(chromosomal microarray analysis,CMA)也成为常见的产前出生缺陷筛查的遗传学检测手段,该方法能检测出染色体结构异常,包括染色体微缺失和微重复。随着遗传检测手段的不断更新,更多的遗传学检测手段投入到对唇腭裂的研究当中。周仁等^[7]利用二代测序数据探索发现SPRY基因家族中的单核苷酸多态性与中国人群非综合征型唇腭裂的发病风险存在关联,但未发现该家族具有亲源效应。彭莉等^[8]通过二代测序进行基因型分型染色10q25区域的rs7078160和rs4752028位点与中国人群非综合征型唇腭裂的发病相关。基于全基因组连锁分析发现了包括TOX3和COL21A1基因在内的4p15.2-p16.1、6p11.2-p12.3、14q13-q21,和16q12.1这4个不同的位点,这两个基因的CNV低拷贝增加了唇腭裂的风险^[9]。Yu等^[10]通过全基因组

关联分析找到两个大人队列的6个唇腭裂的新易感位点,包括1p36、2p21、3p11.1、8q21.3、13q31.1和15q22.14个新的关联基因座(RAD54B、TMEM19、KRT18、WNT9B、GSC/DICER1、PTCH1、RPS26、OFCC1/TFAP2A、TAF1B、FGF10、MSX1、LINC00640、FGFR1和SPRY1)。与以上常规方法不同,我们的研究尝试采用了全基因组低深度分析,对142例胎儿例本进行了分析,总诊断率在17.6%。对于142例胎儿样本中的大多数CNV阴性例本,我们将再通过高深度测序探索单个碱基水平的改变,并扩大样本量,拟找到更多的唇腭裂的基因突变和de novo突变,以揭示更多唇腭裂发生的遗传学基础,帮助产前唇腭裂出生缺陷的筛查和产前诊断。

参 考 文 献

- [1] Uslu VV, Petretich M, Ruf S, et al. Long-range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis[J]. *Nat Genet*, 2014,46(7): 753-758.
- [2] Ludwig KU, Mangold E, Herms S, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci[J]. *Nat Genet*, 2012,44(9): 968-971.
- [3] Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, et al. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences[J]. *Nat Rev Genet*, 2011,13(3): 167-178.
- [4] 吴楠, 卢永平, 刘昆, 等. 非综合征型唇腭裂发病危险因素的病例对照研究[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2018,8: 33-36.
- [5] 杨娟, 郭煜. 非综合征性唇腭裂胎儿的影响因素分析[J]. *河南医学研究*, 2018,10(8): 1348-1350.
- [6] 徐丽芳, 葛星, 刘亚鹏, 等. 200例非综合征性唇腭裂危险因素调查[J]. *江苏预防医学*, 2015,26(1): 107-108.
- [7] 周仁, 郑鸿尘, 李文咏, 等. 利用二代测序数据探索SPRY基因家族与中国人群非综合征型唇腭裂的关联[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2019,51(3): 564-570.
- [8] 彭莉, 牛振民, 黄薇, 等. 染色体10q25位点多态性与中国非综合征性唇腭裂的关联研究[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2016,14(4): 324-327.
- [9] Mohamad Shah NS, Sulong S, Wan Sulaiman WA, et al. Two novel genes TOX3 and COL21A1 in large extended Malay families with nonsyndromic cleft lip and/or palate[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019,7(5): e635.
- [10] Yu Y, Zuo X, He M, et al. Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity[J]. *Nat Commun*, 2017,8: 14364.

(收稿日期:2019-11-10)

编辑:宋文颖