

α -地中海贫血无创产前诊断研究进展

王梓茗 综述 尹爱华* 审校

(广州医科大学附属广东省妇儿医院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

【摘要】 α -地中海贫血是我国南部常见的单基因遗传病,其中以--SEA 缺失型携带率最高,纯合的--SEA 可致严重的胎儿贫血,可发生宫内死亡或在出生后 24 小时内死亡,重型地中海贫血尚无有效的治疗方法。目前常依赖有创产前诊断方法明确胎儿基因型,从而避免患病胎儿出生,而羊水穿刺、绒毛活检等有创方法有一定的流产及宫内感染风险,迫切需要一种无创、安全、快速的产前诊断方法。随着孕妇血浆中胎儿游离 DNA(cffDNA)的发现,无创产前诊断方法得以实现,并已应用于胎儿非整倍体及多种单基因遗传病的诊断中。本文主要综述 α -地中海贫血的无创产前诊断的平台发展。

【关键词】 α -地中海贫血; cffDNA; 无创产前诊断

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

地中海贫血是一种常见的单基因遗传病,高发于热带、亚热带地区如东南亚、印度、地中海、中东、北非等地区及中国广西、广东、海南等省份。我国以 α -地中海贫血最常见, α -地中海贫血的携带率高达 7.88%^[1],其中--SEA 则是占比最多的类型,- $\alpha^{3.7}$ 、- $\alpha^{4.2}$ 次之。--SEA 是一条染色体上两个拷贝的 α -珠蛋白基因均缺失 DNA,因此无法合成 α -珠蛋白,当--SEA 纯合时,则无有效 α -珠蛋白合成,胎儿在宫内即发生贫血,胎儿及胎盘高度水肿,即 Bart 水肿胎,最迟在出生后 24 小时内死亡。当夫妻双方均为--SEA 携带者,则有 25% 的概率出现纯合型地贫胎儿。

目前认为最有效的预防措施主要是对高危孕妇进行产前诊断,并对重型地贫患儿进行选择性流产,从而有效避免重型地中海贫血患儿出生。传统的产前诊断方法为有创方法,即通过有创方法取样,直接检测胎盘或胎儿细胞中的遗传物质,是产前诊断中的金标准,但具有流产、胎儿损伤的风险。直到孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的发现,使得无创、准确、简便、快速的产前诊断方法得以发展。本文主要综述无创产前诊断技术在 α -地中海贫血方面的技术进展。

1 有创产前诊断方法现状

常用有创产前诊断方法主要包括:①绒毛活检术:时间是孕 11~13⁺⁶周,可用于早期诊断,缺点是胎儿丢失率相对较高(0.22%);②羊膜腔穿刺术:在妊娠 16 周后进行,比绒毛活检安全(胎儿丢失率 0.11%),缺点有损伤胎儿的风险;③胎儿脐静脉穿刺术:穿刺时间在孕 24 周后,缺点是对穿刺人员技术要求高,以及术中、术后胎儿并发症发生率高,包括短暂的胎儿心动过缓、脐带出血以及绒毛膜-羊膜炎等^[2]。有创产前诊断方法目前广泛应用于核型分析、亲子鉴定及地中海贫血、耳聋等多种单基因遗传病的产前诊断中。

2 孕妇血浆中胎儿遗传物质的发现

1990 年, Bianchi^[3]首次阐述了母血中胎儿游离有核红细胞(fetal nucleated red blood cell, FNR-BC)的存在,因其具有胎儿全套遗传物质,被认为是最理想的无创产前诊断工具。然而胎儿有核红细胞在孕妇外周血中有核红细胞的仅占 30%~50%^[4],不仅需要的工作量大且易污染。同时,单个细胞中含有的遗传物质少,不易检测多个位点。

1997 年, Lo^[5]首次从孕妇血浆中检测出男性胎儿 Y 染色体上特异序列,证实了胎儿游离 DNA

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2017.04.011

基金项目:广东省自然科学基金(2016A030313787)

* 通讯作者:尹爱华, E-mail: yinaiwah@vip.126.com

(cell-free fetal DNA, cffDNA)的存在,使检测孕妇血浆中胎儿游离核酸为基础的无创产前诊断(non-invasive prenatal diagnosis, NIPD)成为现实。Lo^[6]的研究还表明,胎儿游离DNA最早可在孕7周时检出,即理论上在孕早期就可进行检测,胎儿游离DNA含量随着孕周的增加而逐渐增加。胎儿游离DNA是同时期胎儿细胞成分的21倍,胎儿游离DNA具有重要的特征:①胎儿游离DNA明显短于孕妇来源的游离DNA^[7];②胎儿游离DNA的主要来源是进入母血中的胎盘滋养层细胞凋亡释放^[8];③胎儿游离DNA在母亲血浆中平均半衰期仅为16分钟^[9];④胎儿游离DNA在胎儿娩出后迅速被清除,在产后2小时后即从母血中消失,不易受既往妊娠影响;⑤胎儿游离DNA的含量与胎儿孕周、孕妇体重、先兆子痫等多种因素相关。相比于胎儿有核红细胞,胎儿游离DNA含量更加丰富^[6],且富集血浆游离DNA相对容易。

3 胎儿游离DNA的产前诊断研究现状

无创产前诊断最早应用于检测胎儿性别决定基因(SRY)及DYS14以排除X连锁遗传疾病,以及从RhD(-)的孕妇血浆中检测胎儿Rhesus D基因以获得胎儿处置的诊断依据^[10, 11]。时至今日,无创产前诊断已应用于多种单基因遗传病的排除性诊断,如囊性纤维病、软骨发育不全、亨廷顿病、先天性肾上腺皮质增生症等^[12]。

第二代测序(next-generation sequencing, NGS)应用于非整倍体无创产前检测的理念最早于2008年提出^[13],目前该技术已应用于13、18、21号染色体的非整倍体无创产前诊断中,21-三体检出率达到了99.3%,13-三体、18-三体检出率均达97.4%^[14]。同时随着二代测序的平台的发展,已经通过全基因组测序的方法绘制出完整的胎儿游离DNA图谱,以及新算法的提出,例如基于NGS平台对于序列的绝对定量而提出的相对单体型剂量(relative haplotype dosage, RHDO)方法,可以借助单体型分析估算胎儿遗传的母源位点^[8],推动了无创产前诊断方法的进步。捕获序列测序方法较全基因组测序更有针对性,测序成本更低廉,目标区域测序更精准,逐渐取代全基因组测序成

为新的发展方向。

4 α -地中海贫血无创产前诊断的方法进展

Chiu^[15]在2002年首次报道了地中海贫血无创产前诊断应用,利用荧光定量PCR的方法,从孕妇血浆检测胎儿是否遗传父亲的 β -地中海贫血致病基因,从而开启了地中海贫血无创产前诊断的道路。常用检测策略为排除法,即排除父源突变位点的方法,目前已有报道MALDI-TOF、单碱基引物延伸芯片、荧光定量PCR等多种方法在无创产前诊断方面的研究,且同样适用于 β -地中海贫血以外的以点突变为主的多种单基因遗传病的。而常见的 α -地中海贫血类型为缺失型,且缺失片段较大,其常用检测方法主要包括gap-PCR、多重荧光定量PCR、多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)等方法,而这些方法在高度片段化的cfDNA中检测大片段缺失存在困难。同时,Bart水肿胎发生在携带--^{SEA}的母亲当中,则cfDNA背景中本身包含有1:1比例的--^{SEA}和野生型序列,排除法并不适用。目前研究的策略可以大体分为定量方法及多态位点分析方法。定量分析方法包括直接定量及相对剂量方法。相对突变含量方法是同时扩增含有对野生型或突变型基因的片段并分别定量,利用孕妇血浆中两种型别的序列是否存在不平衡来判断胎儿的基因型。而当胎儿为杂合时,突变型基因与野生型基因仍保持1:1;当胎儿为突变型基因纯合时,突变型基因含量显著多于野生型。多态位点分析方法是利用致病基因紧密连锁的STR及SNP位点,从孕妇血浆中检测胎儿特异的STR或SNP位点,从而判断胎儿是否遗传来自父亲的野生型或突变型位点。该方法需要事先明确父母双方致病基因相关的SNP或STR位点,当双方均携带相同的SNP或STR时,该方法无法识别父源位点。

4.1 qPCR和QF-PCR Tungwiwat^[16]使用巢式qPCR(quantitative real-time polymerase chain reaction)的方法特异性扩增突变型(--^{SEA})基因,正常胎儿($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)突变型基因拷贝数为0,而Bart水肿胎中突变型基因则明显高于标准型和HbH病,因此

能够分辨 Bart 水肿胎的发生。Long^[17]则以 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 基因之间的区域、无其他同源性的一段基因作为目的基因,以 β -珠蛋白基因为参照,用 QF-PCR (quantitative fluorescence polymerase chain reaction)同时扩增内参(β -珠蛋白基因)和 α -珠蛋白链上的目的基因,并使用毛细管电泳分析 PCR 产物峰面积比值改变以判断 Bart 水肿胎的发生。定量方法具有简便、分析简单、能够直接估计胎儿基因型的优点,但在极低的胎儿浓度下,real-time PCR 尚无法区分目的基因和野生型基因的变化。

Ho^[18]则利用-SEA 断裂区内的两个微卫星位点 16PTEL05 和 16PTEL06 检测-SEA 基因,-SEA 基因并不存在这两个微卫星序列,通过检测父源特异的微卫星序列,即可判断胎儿是否遗传父亲的野生型基因,反之则遗传了父亲的-SEA 基因,该方法能从混合样本中检测到仅 2%的胎儿 DNA,但 2/3 是由于胎儿遗传了父母相同的遗传标记或未能检出父源 STR 峰而不适用。Yan^[19]则利用缺失区域内的 9 个 SNP 位点,在孕妇血浆中检测父源特异的 SNP,并能够排除 49.3%的父源性遗传-SEA 导致的 Bart's 水肿胎。尽管如此,因为必须从大样本随机人群中筛选出候选多态性位点,并在携带者人群中筛选出合适的多态性位点,费时费力;还必须借助繁复的方法确定其单体型,但由于并非对胎儿致病基因的直接检测,需要提前获得父母双方的单体型,大大增加了检测周期及检测成本,难以推广;该方法有赖于足够数量的多态性位点才可做出准确诊断,而可用于从孕妇血浆中鉴别的遗传位点相当有限,相当比例的病例缺乏或仅有 1 个可供无创产前诊断检测的位点,不足以提供足够的信息分析,局限了对于致病基因的连锁分析的应用。

4.2 高通量测序 Ge^[20]则使用目标序列捕获测序方法在检测胎儿致病性 CNV 的策略;而 Wang^[21]则阐述了利用家系分析确定父母双方单体型,与孕妇血浆利用隐马尔科夫模型的 Viterbi 算法预测胎儿的单倍型和基因型,且相较于 Ge 的方法,由于目标区域长度短,且仅涉及少量高变异 SNP 位点,因此检测成本低。目标捕获序列针对性高,利用探针捕获所需研究的区域,可有效降低测序成本,而且对目标区域的测序深度更深,因此不仅能检测出 SNP

或点突变,也能有效识别出较大的缺失片段,如-SEA。然而,两种方法都对胎儿血浆浓度要求较高,在孕妇血浆中捕获的目标区域的特异性不如基因组中捕获^[20],目标区域的覆盖度易波动,因此在孕早期推行仍需要条件的优化;捕获探针需额外订制,因此订制的成本及周期较长。

4.3 数字 PCR 数字 PCR 的反应体系与荧光定量 PCR 相似,但是通过稀释后将不同靶分子分布于单个反应室中,大部分反应室仅含不超过 1 个目标 DNA 分子,每个反应室单独进行 PCR 扩增,不同靶分子的分布符合泊松分布,通过对所有反应室中的阳性结果进行统计,可以做出目标分子的精确定量。早期需稀释加样到 96 孔板、384 孔板或 1536 孔板,依赖繁琐的加样工作。微流式 PCR 芯片的出现,大大节省了加样工作,能将样品分布于芯片上预制的 20 000 个微孔中,但微流控芯片昂贵且通量有限,且易分散不均匀而影响分析。时至 2011 年,Bio-Rad 公司的微滴数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)技术推出,其原理是将样品分成大小均一的 20 000 个“油包水”微滴进行数字计数,生成的反应体系在直接 96 孔板上进行反应,最多可同时检测 95 个样品,最终利用双荧光通道检测,对扩增阳性油滴进行计数,且分散效果更稳定。传统荧光定量 PCR 依赖于标准曲线,需要额外的标准品,且易受扩增效率影响,而数字 PCR 用阳性结果数代替标准曲线,不仅减少了工作量和耗材,而且同时提供了定性和精确定量的结果,有利于数字化的分析。同时,单分子扩增的环境,使目标基因和参照基因可在独立的环境中扩增并独立统计,能同时对两个基因进行精确定量,进而基于目标基因拷贝数/参照基因拷贝数得出精确的拷贝数定量,而 qPCR 的模板含量改变间接推算拷贝数变化,并非直接拷贝数改变定量,且仅能分辨 1.5~2 倍的变化。由于独立的单分子扩增,极大程度上降低了与目标序列有竞争性作用的背景序列浓度,可从高度同源的背景中检测出低至 0.001% 的突变^[22],大大提高稀有基因的检测灵敏度。

Lun^[23]的研究证实了数字 PCR 在目标分子拷贝数定量的优势,利用相对突变剂量(relative mutation dosage, RMD)和 SPRT 算法能识别出野生型

和突变型基因含量的不平衡,从而预测胎儿在目标等位基因的基因型,是针对单基因病无创产前检测的重要策略。Pornprasert 在数字 PCR 平台上分别定量,计算野生型、突变型基因的相对含量,能精确区分出 Bart's 水腫胎、标准型 α -地中海贫血及正常人群,其结果也是符合预期,即在怀有 Bart's 水腫胎的孕妇血浆中,该比值为 0,而怀有正常的胎儿的孕妇的比值相较于东南亚缺失型杂合的胎儿的比值显著升高。此外,数字 PCR 是高通量测序之外有力的 CNV 分析工具,且可以在原始样品上直接检测,不仅工作量小,检测周期短,也避免了高通量测序建库时引入的误差,以及测序深度、覆盖度对于分析精度的影响^[22],有文献报道,通过利用多重荧光数字 PCR 检测 α -珠蛋白基因拷贝数来辨别常见的缺失型突变的方法^[24],对珠蛋白基因簇上多个位点进行定量。尽管如此,目前这些工作主要在外周血基因组 DNA 中分析,应用到无创产前诊断中仍然存在挑战。其中,在高度片段化的 cffDNA 中,高度同源的序列,尤其是假基因的存在,仍会给引物的设计带来困难,对拷贝数定量带来干扰。

5 展望

无创产前诊断是直接获取孕妇血浆中胎儿游离 DNA 进行检测的手段,相较于有创方法更安全、样本获得更方便、无并发症、早期诊断、快速等优点,是产期诊断中的重要研究方向,以实现胎儿的早期检测、及早干预,避免患病胎儿出生。而地中海贫血作为中国南方最主要的单基因遗传病,其无创产前诊断的实施具有重大意义。现时的技术难题包括:① cffDNA 浓度低,尤其是孕早期,有赖于高灵敏的检测方法;②排除法诊断仅能避免 50% 的介入诊断手段;③ cfDNA 是高度片段化的,富集、检测仍存在挑战。而数字 PCR 平台能够在复杂的孕妇血浆 DNA 背景中检测出微量的胎儿基因,可灵敏地检测出胎儿特异点突变。高通量测序、数字 PCR 是“数字化”定量目标分子的平台,从单分子层面同时对大量 DNA 分子进行分析,准确度优于传统分析平台,从而在较低的胎儿浓度下进行精确的差异分析。而微滴数字 PCR 在检测时间和检测成本上都优于高通

量测序,且相比高通量测序不受测序深度、覆盖度、均一性影响,不仅分析更简便,对突变的识别和计数更具优势,理论上可精确到单个突变分子的检测。目前已有文献报道利用数字 PCR 在多种点突变为主的单基因病的无创产前诊断,但在缺失型突变的检测上仍然是困难的。同时,需要明确,数字 PCR 和传统 PCR 方法一样,只能针对常见的突变和缺失,对于新的突变或罕见突变和缺失的检测仍存在障碍,需要逐步摸索完善方法学。但随着新方法的普及和大样本临床研究的推行,方法学的探索将逐渐成熟,地中海贫血的无创产前诊断有望走入临床应用。

参考文献

- [1] Lai K, Huang G, Su L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 920.
- [2] Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, et al. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(1): 16-26.
- [3] Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(9): 3279-3283.
- [4] Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, et al. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(12): 1162-1165.
- [5] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487.
- [6] 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.
- [7] Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(1): 88-92.
- [8] Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(61): 61r-91r.
- [9] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(1): 218-224.

- [10] Lo YM. Fetal RhD genotyping from maternal plasma[J]. *Ann Med*, 1999, 31(5): 308-312.
- [11] Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, et al. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood[J]. *Vox Sang*, 2003, 85(4): 300-306.
- [12] Drury S, Mason S, Mckay F, et al. Implementing Non-Invasive Prenatal Diagnosis (NIPD) in a National Health Service Laboratory; From Dominant to Recessive Disorders[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 924: 71-75.
- [13] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(51): 20458-20463.
- [14] Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(1): e10002.
- [15] Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma[J]. *Lancet*, 2002, 360(9338): 998-1000.
- [16] Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, et al. Development and application of a real-time quantitative PCR for prenatal detection of fetal alpha(0)-thalassemia from maternal plasma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1075: 103-107.
- [17] Long XJ, Long GF, Lin WX. Noninvasive prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetus using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2009, 30(3): 175-178.
- [18] Ho SS, Chong SS, Koay ES, et al. Noninvasive prenatal exclusion of haemoglobin Bart's using foetal DNA from maternal plasma[J]. *Prenat Diagn*, 2010, 30(1): 65-73.
- [19] Yan TZ, Mo QH, Cai R, et al. Reliable detection of paternal SNPs within deletion breakpoints for non-invasive prenatal exclusion of homozygous alpha-thalassemia in maternal plasma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24779.
- [20] Ge H, Huang X, Li X, et al. Noninvasive prenatal detection for pathogenic CNVs: the application in alpha-thalassemia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67464.
- [21] Wang W, Yuan Y, Zheng H, et al. A Pilot Study of Noninvasive Prenatal diagnosis of alpha- and beta-thalassemia with target capture sequencing of cell-free fetal DNA in maternal blood[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2017, 21(7): 433-439.
- [22] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22): 8604-8610.
- [23] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50): 19920-19925.
- [24] Lee TY, Lai MI, Ramachandran V, et al. Rapid detection of alpha-thalassaemia variants using droplet digital PCR[J]. *Int J Lab Hematol*, 2016, 38(4): 435-443.

(收稿日期:2017-11-09)

编辑:宋文颖