

# 基于低深度全基因组拷贝数变异测序(CNV-Seq)的稽留流产发生次数及年龄分析

陈惠英 范舒舒\* 徐静 曾丹 苗淑红 龙梅 汪成 林莉 江孜孜  
(粤北人民医院 生殖遗传中心,广东 韶关 512000)

**【摘要】 目的** 应用低深度全基因组拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-Seq)检测稽留流产物(绒毛/胎儿组织)染色体,探讨胎儿绒毛/组织染色体异常与稽留流产发生次数及年龄的关系。**方法** 应用 CNV-Seq 技术,对2019年2月至2021年2月在粤北人民医院妇产科就诊的208例稽留流产物(绒毛/胎儿组织)进行染色体检查。按流产次数、流产发生年龄进行分组:其中初次稽留流产76例,≥2次稽留流产127例;发生流产年龄<35岁151例,≥35岁52例。分析不同流产次数的染色体异常情况、不同年龄段染色体异常情况。**结果** 在208例稽留流产标本中成功检测203例,检测成功率为97.60%。检出染色体异常107例,异常率为52.71%;其中初次稽留流产的染色体异常40例,异常率为52.63%,≥2次稽留流产的染色体异常67例,异常率为52.75%,<35岁的染色体异常70例,异常率为46.36%,≥35岁的染色体异常37例,异常率71.15%。初次稽留流产与≥2次稽留流产的染色体异常率比较差异无统计学意义( $\chi^2=0.00, P=1.00$ ),<35岁与≥35岁稽留流产的染色体异常率比较差异有统计学意义( $\chi^2=9.54, P=0.01$ )。**结论** CNV-Seq 技术有助于查找稽留流产的遗传学原因,对再生育指导有重要意义。染色体异常是稽留流产发生的主要原因,复发性流产的染色体异常发生率未见显著增加,高龄显著增加稽留流产染色体异常发生率。

**【关键词】** 稽留流产;拷贝数变异测序;遗传学异常;流产次数;年龄

**【中图分类号】** R715.5 **【文献标识码】** A

## Analysis of missed abortion frequency and age based on copy number variation sequencing (CNV-Seq)

Chen Huiying, Fan Shushu\*, Xu Jing, Zeng Dan, Miao Shuhong, Long Mei, Wang Cheng, Lin Li, Jiang Meimei

(Reproductive genetics center of North Guangdong People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512000, China)

**【Abstract】 Objective** To detect the chromosome of missed abortion (villi/fetal tissue) by copy number variation sequencing (CNV-Seq), and to explore the relationship between chromosome abnormalities of fetal villi/tissue and the frequency and age of missed abortion. **Methods** Using CNV-Seq technique, 208 missed abortions (villi/fetal tissue) from February 2019 to February 2021 in the Department of Obstetrics and Gynecology of the People's Hospital of Northern Guangdong were examined for chromosomes. According to the number of abortions and the age of abortion: 76 cases of first missed abortion and 127 cases of ≥2 missed abortions; The age of abortion was less than 35 years in 151 cases and ≥35 years in 52 cases. The chromosome abnormalities of different abortion times and different age groups were analyzed. **Results** 203 of 208 missed abortion samples were successfully detected, and the success rate was 97.60%. The detection rate of chromosome abnormality was 107 cases (52.71%); Among them, there

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.04.005

\* 通信作者:范舒舒,Email:171484626@qq.com

基金项目:广东省韶关市卫生健康科研项目(Y21124)

were 40 cases of chromosomal abnormalities in the first missed abortion (52.63%), 67 cases of chromosomal abnormalities in  $\geq 2$  missed abortions (52.75%), 70 cases of chromosomal abnormalities under 35 years old (46.36%), and 37 cases of chromosomal abnormalities  $\geq 35$  years old (71.15). There was no significant difference in the chromosome abnormality rate between the first missed abortion and  $\geq 2$  missed abortions ( $\chi^2 = 0.00, P = 1.00$ ), and there was significant difference in the chromosome abnormality rate between missed abortions under 35 years old and  $\geq 35$  years old ( $\chi^2 = 9.54, P = 0.01$ ).

**Conclusion** CNV-Seq technology is helpful to find out the genetic causes of missed abortion and is of great significance to the guidance of reproduction. Chromosome abnormality is the main cause of missed abortion. The incidence of chromosome abnormality in recurrent abortion has not increased significantly, and the incidence of chromosome abnormality in missed abortion has increased significantly in old age.

**【Key words】** Missed abortion; Copy number variation sequencing (CNV-Seq); Genetic abnormalities; Number of abortions; Age

稽留流产是指妊娠不足 28 周、胎儿体重不足 1000g, 胚胎或胎儿已死亡滞留宫腔未及时排出, 是自然流产前的病理性过程<sup>[1]</sup>。我国稽留流产发生率为 13%<sup>[2]</sup>, 稽留流产的原因包括遗传、免疫、内分泌、环境、子宫畸形等<sup>[3]</sup>, 其中, 遗传因素尤其是染色体异常占 60%<sup>[4]</sup>。研究显示, 随生育年龄增加, 由于胎儿染色体异常导致的自然流产率增加<sup>[5]</sup>。当同一性伴侣伴有 2 次以上自然流产或胚胎停止发育可诊断复发性流产, 妊娠妇女中该病发病率约为 2%~5%, 随着流产次数增加, 相应复发风险率增加<sup>[4,6]</sup>。稽留流产物(绒毛/胎儿组织)染色体检查有助于查找流产原因、指导再生育。低深度全基因组拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-Seq)具有通量高、精确、报告周期短等特点, 在临床上的应用具有一定的优势<sup>[7]</sup>。本研究主要应用 CNV-Seq 技术对稽留流产物(绒毛/胎儿组织)进行遗传学分析, 探讨稽留流产发生次数及年龄与胎儿/胚胎遗传学异常的关系。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 对 2018 年 10 月至 2020 年 10 月在粤北人民医院妇产科就诊的 208 例稽留流产绒毛/胎儿组织进行染色体检查, 孕周 $<28$  周, 超声确诊为胚胎停止发育/胎死宫内, 排除孕期感染等原因(患者阴道分泌物检测支原体、衣原体、淋球菌、分泌物培养、阴道微生态无异常)。采用 CNV-Seq 技术进行绒毛/胎儿组织染色体检查。患者年龄为 20~

45 岁, 孕龄为 6~27<sup>+6</sup> 周。本研究通过粤北人民医院伦理审查, 批件号 KY-2020-037。检测前获得患者知情同意并签字。

### 1.2 检测方法

1.2.1 取样 取约 10mg 绒毛组织样本(小孕周无法取得胎儿组织时)或 1cm $\times$ 1cm 胎儿组织样本。使用生理盐水多次漂洗, 放至无菌标本专用瓶内冷冻保存。标本交由深圳华大临床检验中心检测。

1.2.2 检测步骤 ①提取 DNA: 标本于室温下解冻, 标本剪碎研磨后加入消化液, 混匀离心 5min (2000r/min)、去除上清液, 使用 PBS 清洗后倒入 1.5ml 的 EP 管内, 往内加入 200 $\mu$ l Buffer AL 并震荡混匀, 温育 10min (56 $^{\circ}$ C) 后瞬时离心, 往内加入 200 $\mu$ l 无水乙醇并混匀, 使用过滤柱离心 1min (6000g) 后添加 Buffer AW 1500 $\mu$ l, 再次离心 1min (6000g) 后添加 Buffer AW 2500 $\mu$ l, 离心 3min (6000g) 后拿出过滤柱, 加入 Buffer AE 50 $\mu$ l, 最后离心 1min (6000g)。②CNV-Seq 检测: 检测污染情况及 DNA 的完整性采用琼脂糖凝胶电泳分析, 采用 Nanodrop 检测 DNA 的纯度。③构建文库: 经过末端修复、接头连接、纯化接头连接产物、PCR 反应、PCR 产物纯化等步骤, 定量检测后进行核酸纳米球制备、Qubit 质控, 测序使用分辨率为 5Mb 的 BGISEQ-500 平台。测序数据的分析使用比对软件, 匹配不同测序序列标签与相应染色体。参考基因组为 GRCh37/hg19。

1.3 统计学方法 运用 SPSS 22.0 统计软件分析

数据。计数资料用频数和构成比(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 稽留流产物(绒毛/胎儿组织)染色体异常情况  
在208例稽留流产物(绒毛/胎儿组织)中,有203例成功地进行了CNV-Seq技术检测,另有5例因DNA降解问题检测失败,检测成功率为97.60%。在203例稽留流产物(绒毛/胎儿组织)中,染色体正常96例,染色体异常107例,异常率为52.71%。

表1 组内发生率前5位不同流产次数及年龄的染色体异常情况[例(%)]

排序	初次稽留流产(n=76)		≥2次稽留流产(n=127)		<35岁(n=151)		≥35岁(n=52)	
	异常结果	例数	异常结果	例数	异常结果	例数	异常结果	例数
1	21三体	6(15.00)	X单体	12(17.91)	X单体	13(18.57)	16三体	5(13.51)
2	X单体	5(12.50)	16三体	10(14.93)	22三体	9(12.86)	X单体	4(10.81)
3	2三体	4(10.00)	22三体	9(13.43)	16三体	8(11.43)	13三体	4(10.81)
4	22三体	4(10.00)	缺失/重复	8(11.94)	18三体	6(8.57)	22三体	4(10.81)
5	16三体	3(7.50)	13三体	6(8.96)	缺失/重复	5(7.14)	2三体	3(8.11)

2.2 初次稽留流产及≥2次稽留流产胎儿绒毛/组织染色体结果分析  
初次稽留流产76例,其中胎儿组织/绒毛染色体异常40例,异常率52.63%;≥2次稽留流产127例,其中67例胎儿组织/绒毛染色体异常,异常率为52.75%;两组比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.00, P = 1.00$ ),见表2。

表2 初次稽留流产及≥2次稽留流产胎儿绒毛/组织染色体结果

结果分类	初次稽留流产(n=76)	≥2次稽留流产(n=127)
正常(例)	36	60
染色体异常(例)	40	67
异常率(%)	52.63	52.75

2.3 高龄与非高龄女性稽留流产绒毛/胎儿组织染色体结果分析  
<35岁组151例,其中胎儿组织/绒毛染色体异常70例,异常率46.36%;≥35岁稽留流产52例,其中37例胎儿组织/绒毛染色体异常,异常率为71.15%;两组比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.54, P = 0.01$ ),见表3。

## 3 讨论

3.1 染色体异常为稽留流产的主要原因  
本研究通过CNV-Seq技术检测稽留流产的绒毛/胎儿组织

稽留流产染色体异常包括数目异常88例(82.24%)、嵌合体11例(10.28%)、染色体片段缺失/重复8例(7.48%)。染色体异常依次包括X单体17例,16三体13例,22三体13例,13三体8例,染色体片段缺失/重复8例,18三体7例,2三体6例,X单体嵌合6例,15三体5例,21三体5例,69,XNN5例,14三体3例,18三体嵌合3例,20三体2例,48,XN,+5,+212例,48,XXY,+182例,16三体嵌合1例,21三体嵌合1例。不同流产次数及年龄的染色体异常前5位如表1。

染色体,发现染色体数目异常为稽留流产的主要原因。随年龄增加,稽留流产的染色体异常率上升。随流产次数增加,染色体异常率未出现升高。因此,对不明原因及有再生育需求的稽留流产者,对流产组织进行遗传学原因检查尤为重要,同时需要完善其它流产相关因素检查,进行病因治疗、避免复发性流产发生<sup>[8]</sup>。对于高龄女性,进行孕期的介入性产前诊断排除胎儿染色体异常是有积极意义的。

表3 高龄与非高龄女性稽留流产绒毛/胎儿组织染色体异常检出率

结果分类	<35岁(n=151)	≥35岁(n=52)
正常(例)	81	15
染色体异常(例)	70	37
异常率(%)	46.36	71.15

3.2 遗传学因素是复发性流产病因的重要组成部分  
有学者研究了2次以内自然流产与大于2次的自然流产的病因构成比进行研究发现:随着流产次数增加,胎儿染色体异常率并未相应增加<sup>[9,10]</sup>,本研究与相关文献报道一致。复发性流产的原因多样,包括染色体异常、子宫结构异常、内分泌及代谢紊乱、感染、免疫相关因素、抗磷脂抗体综合征、血栓前状态等<sup>[3]</sup>。胎儿染色体异常来源于两个方面:一是

因为配子形成、受精卵分裂过程中受内外因素的影响而出现异常突变,致使胚胎不能正常发育,导致胎儿的死亡、流产或畸形;二是由父母中任何一方的染色体异常导致配子形成过程中不平衡分裂,引起胚胎死亡、流产<sup>[11]</sup>。本研究中染色体异常主要表现为染色体数目异常,多为配子形成过程中减数分裂或胚胎分裂过程中有丝分裂错误导致的新发突变。连续多次胎儿染色体异常的复发性流产可能更多由父母染色体异常核型所致,文献报道复发性流产中约3%~6%的双亲之一携带染色体平衡易位<sup>[12]</sup>,生殖细胞在减数分裂过程中,异位的染色体同源配对形成四射体,理论上只形成18种配子,其中只有1种正常配子、1种平衡易位配子、以及16种不平衡配子,与正常配子结合后,只有1/18的几率分娩正常后代,1/18的几率分娩平衡易位后代,16/18的几率为部分单体或部分三体的不平衡胚胎,从而导致流产、死胎、畸形或新生儿死亡等不良结局出现<sup>[13]</sup>。

复发性流产的发病率为1%~5%,偶发性自然流产可看作在配子形成及胚胎发育过程出现的随机错误事件,属自然淘汰过程,但2次以上自然流产者的再次妊娠流产发生率上升3倍,3次后再发风险高达80%<sup>[14,15]</sup>。对于复发性流产的患者,在排除父母染色体异常的基础上,同时应完善相关检查,对子宫解剖结构、内分泌代谢、感染、免疫、凝血等方面进行全面的检查,进一步明确流产原因、进行相应的治疗。

3.3 染色体异常率随年龄增加而上升 本研究发现高龄女性的稽留流产组织染色体异常发生率升高,与文献报道一致。年龄是影响胚胎染色体异常的重要因素,随着年龄的增长,减数分裂过程中纺锤体形成的误差率增加<sup>[5]</sup>。本研究中稽留流产组织染色体异常以数目异常为主,其中以三体型为最常见的异常类型,与相关文献报道符合,染色体三体通常是由于减数第一次分裂或减数第二次分裂时染色体不分离导致的,常见于女性卵子产生时,其发生率与孕妇年龄有关,随着孕龄的增加而增加<sup>[16]</sup>。研究表明,母亲的年龄是流产的独立的危险因素,35岁以后染色体异常相关的流产率上升最明显,年龄大于44岁,流产风险增加至74.7%<sup>[11,17]</sup>。染色体数目

异常具有极高的胚胎致死性,多数发生早期流产,仅极少数存活出生。因此,对于对于高龄女性稽留流产,需首先排除胚胎染色体异常,对于已出现染色体异常导致的复发性流产,行胚胎植入前诊断有助于改善预后,降低稽留流产发生率。

对稽留流产绒毛/胎儿组织染色体常规进行CNV-Seq检测、查找遗传学原因。此外,还需要进行子宫解剖结构、内分泌代谢、感染、免疫、凝血等方面进行全面的检查、查找流产原因<sup>[18]</sup>,为患者提供科学的再生育风险评估和指导,必要时针对流产原因进行治疗,从而改善再次妊娠结局。

#### 参 考 文 献

- [1] 谢辛,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 第9版,北京:人民卫生出版社,2018:70-73.
- [2] 陈钰,何淑凤,钱芳波. 环境及不良生活习惯与稽留流产发生的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(15):143-145.
- [3] GONG G, YIN C, Y HUANG, et al. A survey of influencing factors of missed abortion during the two-child peak period[J]. J Obstet Gynaecol. 2021, 41(6):977-980.
- [4] 黄海雁,张惠玲,陈肖娟. 胚胎植入前遗传学筛查(PGS)在高龄和复发性流产(RSA)患者中的应用价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2020, 28(2):195-197.
- [5] MAGNUS MC, WILCOX AJ, MORKEN NH, et al. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study[J]. BMJ. 2019, 364:l869.
- [6] KASER D. The status of genetic screening in recurrent pregnancy loss[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2018, 45(1):143-154.
- [7] 陈惠英, 范舒舒, 许红雁, 等. 基于全基因组测序技术的早期及晚期稽留流产遗传学分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2020, 31(10):1359-1362.
- [8] QUENBY S, GALLOS I D, DHILLON-SMITH R K, et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss[J]. Lancet. 2021, 397(10285):1658-1667.
- [9] 张丽梅, 杨燕宁, 张瑞晓, 等. 自然流产两次与三次及以上的早期复发性流产患者病因构成的比较[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(12):855-859.
- [10] PAPAS RS, KUTTEH WH. A new algorithm for the evaluation of recurrent pregnancy loss redefining unexplained miscarriage: review of current guidelines [J]. Curr Opin Obstet Gynecol. 2020, 32(5):371-379.

- [11] GRUHN J R, ZIELINSKA A P, SHUKLA V, et al. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span[J]. Science, 2019, 365(6460): 1466-1469.
- [12] 刘霞. 复发性流产与染色体核型异常的关系及其干预措施分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(04): 435-437.
- [13] 吕梦欣, 钱源, 陈俊霞, 等. 分析染色体异常在胎儿复发性流产中的意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(05): 527-530+510.
- [14] VAN D, KOLTE A M, JACQUELINE L, et al. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update. 2020, 26(3): 356-367.
- [15] 杨金伟, 王志强, 柴三明, 王等. 植入前胚胎遗传学筛查对复发性流产患者妊娠结局的影响[J]. 中国计划生育学杂志, 2019, 27(09): 1163-1165.
- [16] 王婕, 王福玲. 不同年龄组孕妇稽留流产绒毛染色体分析[J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(12): 931-932+935.
- [17] DIMITRIADIS E, MENKHORST E, SAITO S, et al. Recurrent pregnancy loss[J]. Nat Rev Dis Primers. 2020, 6(1): 98.
- (收稿日期: 2022-03-09)  
编辑: 刘邓浩

## 国家重点研发计划“重大胎儿疾病宫内诊断和治疗 新技术研发”成果简述

段 涛

(上海市第一妇婴保健院 产前诊断中心, 上海 200000)

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.04.015



主题为“精准产前诊断,合理宫内干预”的第十二届中国胎儿医学大会上,上海市第一妇婴保健院段涛教授对国家重点研发计划项目——“重大胎儿疾病宫内诊断和治疗新技术研发”项目成果进行了简要介绍。该项目主要围绕建立胎儿重大疾病的临床队列、构建胎儿重大疾病的精准产前诊断技术平台、构建胎儿重大疾病的合理产前干预技术平台这三个内容展开。在由上海市第一妇婴保健院牵

头的全国八大胎儿医学中心的专家团队不懈努力下,历经三年半的不断推进,项目最终成功地建立起多中心标准化的重大胎儿疾病临床队列及生物样本库、胎儿疾病精准产前诊断的技术平台和胎儿疾病的合理宫内干预技术平台,建立并探索了胎儿疾病诊疗新路径,获得了丰硕的成果:包括发表多篇论文、编写教科书及专著,撰写国家级指南/专家共识等。通过举办胎儿医学大会、建立中国宫内治疗协作网络、举办系列胎儿医学基本理论及实践实训、组织国际顶级胎儿医学导师对国内胎儿医学专科人才开展培训等多种方式,进行项目示范推广及临床实践应用。段涛教授表示,课题的结束只是一个阶段的总结,通过项目带动,胎儿医学的发展进程会更加顺畅,中国的胎儿医学会有更好的明天。