

CNV-seq 技术对 1953 例自然流产物的染色体数目和拷贝数变异分析

项菁* 赵伊冉 葛志红 危薇

(上海交通大学医学院苏州九龙医院,江苏 苏州 215028)

【摘要】 目的 基于染色体拷贝数变异测序(copy number variation sequencing,CNV-seq)技术对 1953 例自然流产物进行遗传学检测,探讨流产组织染色体数目异常和拷贝数变异(copy number variation,CNV)在自然流产中的发生情况。**方法** 回顾性统计分析 2014 年 3 月至 2019 年 11 月送检并行 CNV-seq 检测的 1953 例自然流产组织染色体变异分析结果。**结果** ①1953 例流产组织样本中,1013 例存在染色体异常,异常率为 51.87%,其中以染色体非整倍体最常见,共有 870 例,发生率为 44.55%(870/1953),占异常核型的 85.88%(870/1013),涉及除 1 号染色体外的所有染色体,以 16-三体发生频率最高,其次为 22-三体、X 单体 15-三体和 21-三体。②本次研究发现孕妇年龄 ≥ 35 岁组胚胎染色体异常率明显高于年龄 < 35 岁组(56.57%vs. 42.17%, $P < 0.05$);早期自然流产(孕周 < 12 周)的胚胎染色体异常率明显高于中晚期自然流产(58.76%vs. 23.21%, $P < 0.01$);而产妇既往流产次数与胚胎染色体的异常率无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 胚胎染色体异常,尤其染色体非整倍体异常,是自然流产的主要原因,多发于孕早期,且随着孕妇年龄增长,胚胎染色体异常发生率显著升高。

【关键词】 二代测序;染色体拷贝数变异测序;自然流产;染色体异常;拷贝数变异

【中图分类号】 R394.2

【文献标识码】 A

Chromosome number and copy number variation analysis of 1953 tissues from spontaneous abortions were analyzed by CNV-seq technique

Xiang Jing*, Zhao Yiran, Ge Zhihong, Wei Wei

Suzhou Kowloon Hospital Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Suzhou 215000, Jiangsu, China

* Corresponding author: Xiang Jing, E-mail: lovences@126.com

【Abstract】 Objective Based on copy number variation sequencing (CNV-seq) technology, we tested 1953 products of spontaneous abortion, to explore the occurrence of chromosomal abnormalities and copy number variation (CNV) in abortion tissues. **Methods** Retrospective statistical analysis was performed on the chromosome variation analysis results of 1953 cases of spontaneous abortion from March 2014 to November 2019 tested by CNV-seq. **Results** ① Among the tissue samples of 1953 aborted cases, 1013 had chromosome abnormalities, with an abnormal rate of 51.87%. And chromosome aneuploidy was the most common, with a total of 870 cases, with an incidence of 44.55% (870/1953), in accounts for 85.88% of chromosome abnormalities (870/1013). Involving all the chromosomes except chromosome 1, trisomy 16 had the highest occurrence frequency, followed by trisomy 22, monosomy X, trisomy 15 and trisomy 21. ② In this study, it was found that the embryo chromosome abnormality rate in the pregnant women aged ≥ 35 years old group was significantly higher than that in the pregnant women aged < 35

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.04.010

* 通信作者: 项菁, E-mail: lovences@126.com

years old group (56.57% vs. 42.17%, $P < 0.05$). The chromosome abnormality rate of early spontaneous abortion (gestational week < 12 weeks) was significantly higher than that of late spontaneous abortion (58.76% vs. 23.21%, $P < 0.01$). The number of previous miscarriages had little relationship with the abnormal rate of embryo chromosomes ($P > 0.05$). **Conclusions** Chromosomal abnormalities, especially chromosomal aneuploidy, were the main causes of spontaneous abortion of fetus, which mostly occurred in the early stage of pregnancy. Moreover, the incidence of chromosomal abnormalities of fetus increased significantly with the age of pregnant women.

【Key words】 Next generation sequencing; CNV-seq; Spontaneous abortion; Chromosomal abnormalities; Copy number variation

自然流产(spontaneous abortion, SA)是妊娠早期常见的并发症,发生率为10%~15%^[1,2]。发生胚胎停育及自然流产的原因包括遗传学因素、免疫因素、内分泌因素及环境因素等^[3-5]。西方学者的研究发现,约50%早期自然流产的发生与染色体异常有关,其中染色三体最常见,其次是三倍体、性染色体单体X、四倍体和染色体结构异常^[6]。

随着分子生物学检测技术的发展,流产组织物的检测方法也不断更新迭代。传统的核型分析技术虽是染色体检测的“金标准”,但需细胞培养,操作复杂、耗时过长,且存在较高失败风险^[7]。荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)虽然解决了细胞培养的问题,缩短了操作时长,但受限于特定荧光探针数目,不能全面反映流产组织的染色体情况^[8]。单核苷酸多态性微阵列(single nucleotide polymorphism array, SNP array)技术虽然能够实现全基因组覆盖,但因价格昂贵未能有效推广^[9,10]。近年来,随着二代测序(next generation sequencing, NGS)技术的应用推广,越来越多的研究机构开发出基于NGS平台的染色体异常检测技术。2009年Xie等^[11]首次报道了一种名叫拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)的技术,可以在全基因组范围内检测拷贝数变异(copy number variation, CNV)。2013年,Shenpei等^[12]采用基于CNV-seq的技术检测孕妇血浆中胎儿染色体拷贝数变异,发现对 > 10 Mb的重复或缺失的检测灵敏度和特异性分别为100%和99.92%。同年Xie等^[13]报道了基于低覆盖度的CNV-seq技术可以实现48h内快速检测自然流产组织的非整倍体异常,并实现了对40例流产物的

100%准确检测。2015年Liu等^[14]采用CNV-seq技术与核型分析技术分别对64例流产物进行检测对比,发现CNV-seq技术可以检测出核型分析无法分辨的一个2.58Mb的微小缺失。Cohen等^[15]采用CNV-seq技术对因样本质量差导致微阵列比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybridization, aCGH)检测失败的样本进行检测,在9例产前诊断异常的样本中准确地发现了致病性CNV,证明了CNV-seq对于质量不好的样本也可以有效的检测。

本文为了进一步了解自然流产和染色体异常的相关关系,对近几年就诊于本院及合作单位的自然流产患者,经知情同意后采集其流产组织样本并进行CNV-seq检测分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年3月至2019年11月间,因自然流产到本院行胚胎染色体检查的患者共1953例,产妇年龄20~48岁,平均 (32.5 ± 5) 岁,孕周4~28周,既往流产次数0~5次。

1.2 实验方法

1.2.1 样本准备 采集黄豆粒大小(100mg)流产组织,生理盐水充分清洗后置于无菌采样管中冻存(-20°C 暂存)。使用QIAampDNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, Germany)进行流产组织基因组DNA提取,要求提取DNA总量 > 500 ng,浓度 > 20 ng/ μl 。

1.2.2 检测方法 参考文献^[13]采用酶切法进行测序文库构建:使用片段化酶将基因组DNA随机打断,末端修复和dA尾添加后,在其两端加上含特定

标签序列的测序接头,PCR 扩增放大后获得测序文库,使用 Qubit dsDNA HS Assay kit(Invitrogen)试剂盒进行文库质检定量。定量合格后的文库在 Illumina Hiseq2000 高通量测序仪上进行 PE100 测序,保证每个样本的检测有效读段(Reads)数 $>2M$ 。然后进行生物信息学分析,把测序得到的每个 DNA 片段序列定位到人类基因组参考序列(GRCh37/hg19)上,去除低质量的碱基序列后使用环状二元分割算法(circular binary segmentation,CBS)进行拷贝数分析,通过 Z 检验查找发生染色体片段变异的可靠性,最终获得 23 对染色体上的 CNV 情况。

1.2.3 统计学方法 使用 SPSS 19.0 统计软件对结果进行分析,计数资料采用频数及率表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流产组织染色体异常率及非整倍体分布

1953 例流产组织样本中,1013 例存在染色体异常,异常率为 51.87%,其中以染色体非整倍体最常见,共有 870 例,发生率为 44.55%(870/1953),占异常核型的 85.88%(870/1013),涉及除 1 号染色体外的所有染色体,以 16-三体发生频率最高,其次为 22-三体、X 单体 15-三体和 21-三体。涉及 13、15、16、21、22、X 号染色体的非整倍体异常共 612 例,占所有非整倍体异常的 70.34%(612/870)。染色体 13、14、15、16、21、22、X 中,非整倍体异常占染色体异常比例的 90%以上;1 号染色体均为拷贝数变异,没有发现非整倍体异常;7、9、11 号染色体非整倍体异常占比偏低。同时发现,在染色体异常样本中存在多重染色体异常情况,有 110 例样本存在多重染色体异常,发生率 10.86%(110/1013);有 65 例样本存在多重非整倍体异常,发生率 7.47%(65/870)。详细数据参表 1、图 1。

表 1 流产组织染色体异常结果分析

染色体	染色体异常例数 (例)	多重染色体异常例数 (例)	非整倍体异常例数 (例)	多重非整倍体异常例数 (例)	非整倍体异常占比 (%)
1	11	2	0	0	0.0
2	47	10	36	10	76.6
3	22	3	18	2	81.8
4	23	6	15	1	65.2
5	16	3	10	2	62.5
6	24	7	16	3	66.7
7	31	3	18	3	58.1
8	41	9	28	7	68.3
9	24	3	20	3	83.3
10	14	1	11	1	78.6
11	16	6	8	1	50.0
12	16	3	12	2	75.0
13	48	4	45	4	93.8
14	22	5	20	2	90.9
15	61	7	58	7	95.1
16	178	13	167	8	93.8
17	11	1	7	0	63.6
18	23	3	18	2	78.3
19	4	1	2	0	50.0
20	19	3	16	3	84.2
21	61	7	60	2	98.4
22	121	6	115	2	95.0
X	175	3	167	0	95.4
Y	5	1	3	0	60.0
累计	1013* (51.87%,1013/1953)	110(10.86%,110/1013)	870(85.88%,870/1013)	65(7.47%,65/870)	

注:* 染色体异常数目中出现的多重染色体异常,优先以非整倍体进行统计,对多重非整倍体异常的,按染色体号顺序依次进行统计,避免重复计数。

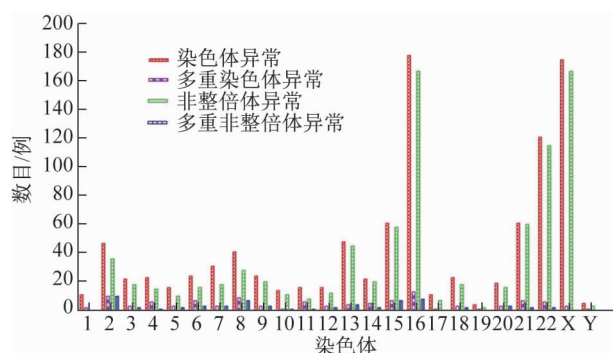


图1 染色体异常和非整倍体在各染色体上的分布情况(含多重)

同时,我们也单独分析了1013例染色体异常样本中各种变异类型的分布情况(表2),染色体三体最多(61.11%),其次为嵌合三体(14.12%),单体(9.77%);微重复和微缺失样本数目略高于重复和缺失,分别占比4.64%和3.16%;最少的为嵌合单体,仅发现10例(0.99%)。

表2 染色体异常样本中各种变异类型分布情况

项目	异常病例 (例)	在异常病例 中的占比(%) (n=1013)	发生率(%) (n=1953)
非整倍体			
单体	99	9.77	5.07
嵌合单体	10	0.99	0.51
三体	619	61.11	31.69
嵌合三体	143	14.12	7.32
重复/缺失			
重复($\geq 5M$)	19	1.88	0.97
微重复($< 5M$)	47	4.64	2.41
嵌合重复	17	1.68	0.87
缺失($\geq 5M$)	26	2.57	1.33
微缺失($< 5M$)	32	3.16	1.64
嵌合缺失	11	1.09	0.56

2.2 孕妇年龄、孕周、既往流产次数与染色体异常关系 本次研究发现孕妇年龄 ≥ 35 岁组胚胎染色体异常率明显高于年龄 < 35 岁组,差异有统计学意义(56.57% vs. 42.17%, $P < 0.05$) (见表3);早期自然流产(孕周 < 12 周)的胚胎染色体异常率明显高于中晚期自然流产(孕周 ≥ 12 周),差异有统计学意义(58.76% vs. 23.21%, $P < 0.01$) (见表4);而产妇既往流产次数与胚胎染色体的异常率关系不大($P > 0.05$) (表5)。

3 讨论

自然流产是指妊娠周数不足28周,胎儿体重低

表3 孕妇年龄与染色体异常发生率间的关系

组别	染色体正常 (例)	染色体异常 (例)	异常发生率 (%)	χ^2	P
< 35 岁	399	291	42.17%	20.13	0.014
≥ 35 岁	162	211	56.57%		

表4 孕妇流产孕周与染色体异常发生率间的关系

组别	染色体正常 (例)	染色体异常 (例)	异常发生率 (%)	χ^2	P
< 12 周	160	228	58.76%	72.31	0.001
≥ 12 周	172	52	23.21%		

表5 孕妇流产次数与染色体异常发生率间的关系

组别	染色体正常 (例)	染色体异常 (例)	异常发生率 (%)	χ^2	P
< 2 次	203	194	48.87%	0.431	0.137
≥ 2 次	71	77	52.03%		

于1kg自发出现的妊娠终止,发病率约10%~15%,多为孕早期自然流产(12周内)。传统核型分析是染色体疾病诊断的金标准,但其分辨率低,仅能检测约10Mb以上的重复和缺失。研究表明,常规G显带核型分析认为核型正常的细胞中还存在各种类型的CNVs^[16,17],如Liu等^[18]使用CNV-seq技术检测出了G显带核型分析漏检的嵌合和一个2.58Mb的微缺失。自1995年起,aCGH技术逐渐应用于流产组织遗传学检测,并取得了很好的临床效果^[19]。近年,随着CNV-seq技术的诞生,很多学者将两种技术做了对比,发现CNV-seq和aCGH的检测一致性近乎100%^[20],且能够检测出许多aCGH技术无法分辨的拷贝数变异。

本文基于CNV-seq技术对1953例流产组织样本进行的遗传学检测发现,51.87%存在染色体异常,其中85.88%为染色体非整倍体异常,涉及除1号染色体外的所有染色体,以16-三体发生频率最高,其次为22-三体、X单体15-三体和21-三体。

通过CNV-seq技术分析流产组织染色体畸变是否存在,如结果无异常时,可基本排除遗传畸变影响,从而考虑精子畸形、免疫、感染环境等因素。如染色体畸变为非整倍体异常,多是生殖细胞发育或受精卵卵裂过程中,染色体不分离或丢失等原因所致。如染色体畸变为缺失或重复,则需进一步分析是新发变异还是遗传,夫妻双方均需行CNV-seq检测以分析CNV多态性影响。在人类基因组中大约

有 4.8%~9.5% 区域为 CNV, 其中 99% 以上属于良性变异即多态性, 但另外 1% 的 CNVs 会导致严重的染色体疾病^[21]。根据最新 CNV 指南^[22], CNV 可分为 5 类: 致病、可能致病、临床意义不明、可能良性、良性。当出现临床意义未知 CNV 时, 通常采用的方法是进行亲代验证, 以明确哪些是存在于双亲中而无明显临床表现的变异, 哪些是新发突变。本研究共发现 152 例(占染色体异常比例为 15.02%) 流产组织中存在缺失和重复(含嵌合), 查证 Clinvar、DGV、DECIPHER 等数据库, 发现约 30% 有明确致病描述, 约 20% 为可能致病, 良性或可能良性的很少(<5%)。其中未见报道的 CNV 异常有待后续进一步验证, 包括收集夫妻双方血样进行 CNV-seq 检测等。

本次研究还发现孕妇年龄 ≥ 35 岁组胚胎染色体异常率明显高于年龄 < 35 岁组, 差异有统计学意义(56.57% vs. 42.17%, $P < 0.05$); 早期自然流产(孕周 < 12 周)的胚胎染色体异常率明显高于中晚期自然流产(孕周 ≥ 12 周), 差异有统计学意义(58.76% vs. 23.21%, $P < 0.01$); 而产妇既往流产次数与胚胎染色体的异常率没有统计学意义($P > 0.05$)。

本研究的结果印证了母亲年龄增长和胚胎染色体异常发生率升高具有相关性, 提示高龄人群应更注重胎儿染色体检查。对于自然流产尤其早期自然流产者, 借助 CNV-seq 技术的检测, 可有助于判知流产的遗传学病因, 评估再发风险, 对后期的生育指导提供重要的遗传咨询信息。

参 考 文 献

- [1] BARDOS J, HERCZ D, FRIEDENTHAL J, et al. A national survey on public perceptions of miscarriage [J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 125(6):1313-1320.
- [2] ZHU J, LIANG J, MU Y, et al. Sociodemographic and obstetric characteristics of stillbirths in China: a census of nearly 4 million health facility births between 2012 and 2014 [J]. *Lancet Glob Health*, 2016, 4:e109-118.
- [3] LOMAX B, TANG S, SEPAROVIC E, et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66:1516-1521.
- [4] KIM JW, LEE WS, YOON TK, et al. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment [J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11:153.
- [5] DANIELY M, AVIRAM-GOLDRING A, BARKAI G, et al. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13:805-809.
- [6] CHOI TY, LEE HM, PARK WK, et al. Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2014, 57:518-525.
- [7] LIN SB, XIE YJ, CHEN Z, et al. Improved assay performance of single nucleotide polymorphism array over conventional karyotyping in analyzing products of conception [J]. *J Chin Med Assoc*, 2015, 78:408-413.
- [8] JOBANPUTRA V, ESTEVES C, SOBRINO A, et al. Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens [J]. *Prenat Diagn*, 2011, 31:755-759.
- [9] QU S, WANG L, CAI A, et al. Exploring the cause of early miscarriage with SNP-array analysis and karyotyping [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2019, 32:1-10.
- [10] DA SILVA FB, MACHADO-NETO JA, BERTINI V, et al. Single-nucleotide polymorphism array (SNP-A) improves the identification of chromosomal abnormalities by metaphase cytogenetics in myelodysplastic syndrome [J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70:435-442.
- [11] XIE C, TAMMI MT. CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10:80.
- [12] CHEN S, LAU TK, ZHANG C, et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33: 584-590.
- [13] XIE W, TAN Y, LI X, et al. Rapid detection of aneuploidies on a benchtop sequencing platform [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33:232-237.
- [14] LIU S, SONG L, CRAM DS, et al. Traditional karyotyping vs copy number variation sequencing for detection of chromosomal abnormalities associated with spontaneous miscarriage [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 46:472-477.
- [15] COHEN K, TZIKA A, WOOD H, et al. Diagnosis of fetal submicroscopic chromosomal abnormalities in failed array

- CGH samples; copy number by sequencing as an alternative to microarrays for invasive fetal testing [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015,45:394-401.
- [16] REDON R, ISHIKAWA S, FITCH KR, et al. Global variation in copy number in the human genome [J]. Nature, 2006,444:444-454.
- [17] MORROW EM. Genomic copy number variation in disorders of cognitive development [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2010,49:1091-1104.
- [18] LUI S, SONG L, CRAM DS, et al. Traditional karyotyping vs copy number variation sequencing for detection of chromosomal abnormalities associated with spontaneous miscarriage[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015;472-477.
- [19] BRYNDORF T, KIRCHHOFF M, ROSE H, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics [J]. Am J Hum Genet, 1995,57:1211-1220.
- [20] ZHU X, LI J, RU T, et al. Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next - generation sequencing[J]. Prenat Diagn, 2016, 36(4):321-327.
- [21] KLOPOCKI E, MUNDLOS S. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet 2011,12:53-72.
- [22] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会, 中国优生科学协会基因诊断与精准医学分会, 胡婷, 等. 拷贝数变异检测在产前诊断中的应用指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(09):909-917.

(收稿日期:2020-11-09)

编辑:宋文颖

· 视频导读 ·

那些无需宫内干预的 TTTS—谈谈 TTTS 胎儿激光治疗的为或不为

邹刚

(上海市第一妇婴保健院 产前诊断中心 & 胎儿医学科, 上海 201204)

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.04.020



是不是所有的双胎输血综合征(twin-twin transfusion syndrome, TTTS)都需要做宫内干预呢? 来自上海市第一妇婴保健院的邹刚教授通过复习文献并结合临床实践, 讨论了 TTTS 宫内治疗的“为或不为”。他指出目前已有随机对照研究和大样本的 Meta 分析证实了对于 TTTS I 期的期待治疗是安全的方案, 如期待过程中发现病情进展或出现羊水急性过多, 可考虑胎儿镜治疗。TTTS IV 期进行积极的宫内干预, 其两胎存活率和至少一胎存活率并不低于 TTTS III 期。对于临床上较为常见的选择性宫内生长受限(selective intrauterine growth restriction, sIUGR) III

型基础上发展起来的 TTTS, 有时行保守的羊水减量术可以获得较好的结局。对前壁胎盘或脐带插入点较近的 TTTS 病例, 激光手术难度大, 血管残留风险高, 需要结合术者的经验做谨慎决定。他还指出宫内治疗需要永远站在病人利益最大化的角度, 而不是追求个人“功利化”。对于特殊病例, 在保证母体安全的前提下, 提供基于循证的咨询和个性化的方案远比技术本身更为重要。