

• 论 著 •

无创产前基因测序在胎儿染色体非整倍体基因检测中的临床应用

翁慧男¹, 梁嘉颖¹, 曾伟宏¹, 汤惠霞¹, 孙 怡², 马将军³

(1. 广东省妇幼保健院, 广东广州 510010; 2. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东广州 510240;

3. 中山大学肿瘤防治中心, 广东广州 510060)

摘要:目的 探讨无创产前基因检测技术在胎儿染色体非整倍体疾病诊断中的检出效率及临床应用价值。方法 回顾性分析 2011 年 1 月到 2013 年 1 月在广东省妇幼保健院就诊的孕妇, 纳入标准为高龄妊娠, 产前筛查高风险、B 超显示胎儿异常等要求无创产前基因检测的孕 12 周以上的孕妇 1 865 例, 通过母体外周血中胎儿游离 DNA, 应用无创产前基因检测得出胎儿患染色体非整倍性疾病(21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征)的风险率。并对高风险胎儿采取羊水或脐血, 再行细胞培养染色体核型分析以确定胎儿染色体核型, 对低风险胎儿均随访至出生后。结果 实施无创产前基因检测 1 865 例, 结果显示为高风险共 21 例, 其中 21-三体综合征高风险为 14 例, 18-三体综合征高风险为 5 例, 13-三体综合征为 2 例。以羊水或脐血染色体核型分析的结果为金标准进行结果对照, 检测出的 14 例 21-三体综合征高风险中, 13 例确诊为 21-三体综合征, 另 1 例拒绝产前诊断, 自行引产, 无法确诊核型。检测出的 5 例 18-三体综合征高风险经核型分析确诊为 18-三体综合征, 13-三体综合征无假阳性。所有低风险胎儿出生后的随访中没有发现假阴性。经统计分析胎儿无创产前基因检测 21-三体综合征的敏感性为 100%, 准确性为 92.9%。18-三体综合征和 13-三体综合征的敏感性及准确性均为 100%。结论 无创产前胎儿非整倍体基因检测可提高产前诊断效率, 其敏感性、准确性与染色体核型分析技术具有高度的一致性, 能减少患儿的出生, 快捷、安全、较介入性产前诊断易于接受, 具有较高的临床实际应用价值。

关键词: 无创产前基因检测; 染色体非整倍体综合征; 高通量测序

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)16-2386-03

The application of non-invasive prenatal genetic sequencing for fetal chromosomal aneuploidy

Weng Huinan¹, Liang Jiaying¹, Zeng Weihong¹, Tang Huixia¹, Sun Yi², Ma Jiangjun³

(1. Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China;

2. The Affiliated Orthopedic Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510240, China;

3. Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong, 510060, China)

Abstract: **Objective** To explore the efficiency and the clinical application value of non-invasive prenatal genetic testing for fetal chromosomal aneuploidy. **Methods** A total of 1 865 pregnant women treated in Guangdong Women and Children Hospital from January 2011 to January 2013 were selected. Inclusion criteria: advanced age, prenatal screening for high risk, and fetal abnormality indicated by color ultrasonography, agreeing with non-invasive prenatal genetic testing. After non-invasive prenatal genetic testing, the pregnant women with positive result underwent cell culture and chromosomal karyotyping. Following the situations after delivery were designed as the final criteria for definite diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy. **Results** A total of 1 865 pregnant women underwent non-invasive prenatal genetic testing, of which 21 pregnant women were found with positive result, including 14 pregnant women with trisomy 21, 5 pregnant women with trisomy 18, 2 pregnant women with trisomy 13. The results of chromosomal karyotyping after amniocentesis or umbilical cord blood puncture were designed as golden standard. Among the women with trisomy 21, one woman refused the prenatal diagnosis, self induced labor and could not be confirmed karyotype. No false positive case was found among the women with trisomy 18 and 13. No missed diagnosis was found among the pregnant women with negative result during follow-up after delivery. Through statistical analysis of non-invasive prenatal fetal genetic testing, the sensitivity for the trisomy 21 was 100%, and the accuracy was 92.9%. The sensitivity and accuracy for the trisomy 18 and 13 were 100%. **Conclusion** Non-invasive prenatal genetic testing can improve the diagnostic efficacy before delivery, reduce the birth of ill infants, and it is a quick, safe, easy-accepted and reliable prenatal diagnostic method, which is worthy to be popularized and an inexorable trend of development in the future.

Key words: non-invasive prenatal testing; chromosomal aneuploidy syndrome; massively parallel sequencing

胎儿染色体非整倍体疾病是指染色体数目的增加或减少不是单倍体的整数倍, 临床上常见的非整倍体包括 21-三体综合征(唐氏综合征)、18-三体综合征(爱德华氏综合征)、13-三体综合征(帕陶氏综合征), 以及一些性染色体三体型及 X 单体型。目前, 此类疾病并无有效的治疗方法, 只能通过产前筛

查、产前诊断预防患儿的出生, 因此, 此类疾病的患儿给家庭和社会带来了极大的精神和经济负担。目前明确诊断依靠有创的产前诊断方法: 绒毛活检、羊水穿刺、脐血穿刺以及取胎儿部分组织活检, 从中提取染色体进行核型分析。这些检查均为侵入性操作, 可致宫腔内的感染、胎儿流产、胎死宫内等严重后

果^[1],且染色体核型分析检验周期较长,孕妇及家庭往往难以接受。胎儿染色体非整倍体无创基因检测是通过母体外周血中游离胎儿 DNA 应用高通量测序技术检测胎儿染色体数目异常的一种无创产前检测方法,是产前诊断领域的一项新兴技术。较之侵入性产前诊断,具有流程简便、安全性高(无创)、检测时间早、快速、可靠,且易于接受等特点。目前这一检测方法被用于诊断和排除胎儿遗传性疾病、监控妊娠合并征等,是无创产前检测未来发展的趋势。本文通过回顾分析本院 2 年来进行无创产前基因检测的资料,就其检测的准确性、敏感性及应用价值进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 1 月到 2013 年 1 月在本院就诊的因高龄妊娠、产前筛查高风险、B 超显示胎儿异常等要求无创产前基因检测的孕妇 1 865 例,孕周为 13~34 周,年龄为 20~42 岁,排除双胎或多胎妊娠。

1.2 方法 在获得孕妇知情同意后抽取孕妇外周静脉血 5 mL,EDTA 抗凝,按照全血样本编号在离心管盖上写上对应的血浆编号及分离日期。在 4℃ 预冷离心机内 1 600×g 离心 10 min,取上清液装到无菌离心管中。初步分离的血浆在 4℃ 下再次以 1 600×g 离心 10 min,以去除残存的细胞。两次离心处理后的血浆立即低温保存,一周之内-20℃ 条件下暂存;长期保存需置于-80℃ 冰箱中,血浆不可常温保存。挑选出合格样本提取血浆中游离 DNA,制备测序文库,采用 Illumina HiSeq2000 高通量测序仪进行检测,应用生物信息工具放大并分析外周血中不同染色体水平的差异,从而精确识别胎儿染色体非整倍体异常,最终得出胎儿患染色体非整倍性疾病(21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征等)的风险概率。合格标准:外观上要求样本保存管完好,无裂管、无开盖等泄漏或外溢;样本体积要求孕妇外周血 5 mL,血浆样本量要求 2 mL;样本质量要求无污染、无溶血现象。对检测结果中高风险的孕妇进行遗传咨询,在其知情同意的情况下进行羊水或脐血穿刺,经细胞培养后行 G 显带染色体核型分析确定胎儿染色体核型。

1.3 随访 对所有阳性检测结果的孕妇做好随访工作,随访至胎儿出生,并对所有新生儿进行常规的体格检查。同时对检测的阴性结果经过出生后的观察随访,来判断有无漏诊率。

2 结果

2.1 无创产前基因检测结果 1 865 例无创产前基因检测结果显示为高风险共 21 例,阳性率为 1.13%,其中 21-三体综合征高风险为 14 例,18-三体综合征高风险为 5 例,13-三体综合征高风险为 2 例。

2.2 确诊结果 以羊水或脐血染色体核型分析的结果为金标准进行结果对照,检测出的 14 例 21-三体综合征高风险中 13 例确诊为 21-三体综合征,另 1 例拒绝产前诊断,自行引产,无法确诊核型。检测出的 5 例 18-三体综合征高风险经核型分析确诊为 18-三体综合征,检测出的 2 例 13-三体综合征高风险为阳性。对低风险孕妇的分娩结果进行追踪随访,未发现染色体非整倍体异常者。经统计分析胎儿无创产前基因检测 21-三体综合征的敏感性为 100%,因 1 例高风险孕妇无法确定核型,故其准确性为 92.9%。检测出的 5 例 18-三体综合征高风险经核型分析确诊为 18-三体,检测出的 2 例 13-三体综合征高风险经核型分析确诊为 13-三体综合征,经统计分析 18-三体综合征和 13-三体综合征的敏感性及准确性均为 100%,见

表 1.

表 1 无创产前基因检测与染色体核型分析的比较			
分类	无创产前 基因检测(n)	染色体核型 分析(n)	准确率(%)
21-三体综合征	14	13	92.90
18-三体综合征	5	5	100.00
13-三体综合征	2	2	100.00
合计	21	20	95.24

3 讨论

常规的产前诊断技术需要通过穿刺(绒毛穿刺、羊膜腔穿刺及脐静脉穿刺)的方法取得胎儿的组织进行遗传学检测,而介入性产前诊断存在 1%~3% 的流产风险^[2],所以,多年来众多学者致力于寻找一种无创、快速、经济和准确的产前诊断方法。

无创产前基因检测技术是指通过扩增孕妇血中游离胎儿 DNA 片段,采用高通量测序技术对其进行测序和计数,通过生物信息技术的处理,来判断胎儿是否存在染色体异常的方法,这种方法具有无创、快速、准确的特点。1997 年 Lo 等^[3] 报道了在孕妇外周血中有胎儿游离 DNA 的存在,且在孕早期就可检测到,其水平随着孕周的增加而增加,分娩后 2 h 即被清除,不会对下一次妊娠产生影响,随后又有研究发现孕妇血浆中存在胎儿核糖核酸^[4],这些发现为产前诊断提供了一个新的方向。应用无创产前基因检测技术对所取的孕妇外周血样本中所有游离的 DNA 进行高通量测序,不依赖特定目标区域、多态性位点,并基于生物统计学将测序结果进行信息分析,根据分析结果判断胎儿患染色体非整倍性疾病的风险。

21-三体综合征又称唐氏综合征或先天愚型,是新生儿常见的染色体疾病,发病率约为 1/800^[5],18-三体综合和 13-三体综合的发病率分别为 1/5 000 和 1/7 000,是临床上比较常见的染色体疾病^[6],且随年龄增长,孕妇生育染色体异常患儿的概率还可增高。Chiu 等^[7-8] 用二代测序技术,检测出 753 例孕妇中有 86 例孕妇孕有 21-三体综合征胎儿。21-三体综合征的阳性指示值为 96.6%,阴性指示值为 100%,灵敏度为 100%,特异度为 97.9%。随后 Palomaki 等^[9] 及 Dan 等^[10] 的研究也得到了相似的结果,证明了此结论的可靠性。而本次临床研究显示无创产前基因检测的敏感性为 100%,准确性为 92.9~100%,得到了与上述报道相近的研究结果,说明无创产前基因检测具有非常高的敏感性和准确性,能以非常低的假阳性率发现几乎所有的患有 21-三体综合征或 18-三体综合征的胎儿。同时因其无创性避免了传统的产前诊断方法对孕妇及胎儿的伤害,更易被孕妇及家庭所接受。此外,依照中国目前的产前诊断模式,无创产前基因检测可以避免过度的侵入性产前诊断,其检测受孕周限制少,孕早期即可进行检测(一般孕 12 周即可进行检测)。孕妇可以在孕早期及时终止妊娠,减少对身体的伤害,并且可以降低孕妇的心理和精神负担。Lo 等^[11] 证实妊娠第 7 周即可检测到胎儿游离 DNA,其浓度随孕周增加而增加。Rijnders 等^[12] 对辅助生殖的孕妇研究中发现,妊娠第 37 天就可以检测到胎儿游离 DNA,9 周时检出率达 100%。虽然胎儿游离 DNA 在母体血液循环中出现的时间和数量存在个体差异,但总的趋势还是随着孕周的增加胎儿游离 DNA 的水平增加,检出率随之增加。

国际产前诊断学会认为安全、准确、早期的基因筛查技术是产前筛查技术未来的发展趋势,在孕妇知情同意的情况下可以自主选择是否将无创产前检测作为首选筛查方法,而且这一发展趋势也得到了国内外该领域专家的一致认可^[13]。

依据现有的研究,笔者认为在高龄以及唐氏筛查、高风险孕妇中进行无创产前检测可有效检出 21 及 18-三体综合征,大量减少侵入性操作,缓解绝大部分孕妇的焦虑,降低胎儿宫内感染及流产风险。更重要的是本研究结果显示无创产前基因检测技术与目前的筛查及诊断方法相比,在胎儿染色体非整倍体疾病的诊断中具有高度的敏感性和准确性,同时具有无创性、安全性、检测周期短等优势,能大大改善产前诊断的服务模式,其综合效益大为提高,具有较高的临床实际运用价值,是未来产前筛查检测领域的发展趋势。

近年来,Lo 等^[14]直接利用孕妇外周血 DNA 进行全基因组测序,获得了完整的胎儿基因组序列,构建了遗传图谱,为无创产前基因检测技术取得突破提供了新的途径。随着其检测样本的增加和技术的改进,其准确性和局限性将进一步改善,据此可探讨是否可以建立胎儿染色体非整倍体疾病新的产前筛查和产前诊断模式。

参考文献

[1] Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, et al. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1988, 95(4): 330-333.

[2] Evans MI, Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic procedures 2005[J]. Semin Perinatol, 2005, 29(4): 215-218.

[3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(976): 485-487.

[4] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2000, 46(11): 1832-1834.

[5] 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.

[6] Bian XM. Practical prenatal diagnosis[M]. Peking: People's Military Surgeon Publishing House, 2008: 91-98.

[7] Chiu RW, Sun H, Akolekar R, et al. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21[J]. Clin Chem, 2010, 56(3): 459-463.

[8] Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study[J]. BMJ, 2011, 342(2): 7401.

[9] Palomaki GE, Decui C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study[J]. Genet Med, 2012, 14(3): 296-305.

[10] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(13): 1225-1232.

[11] 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.

[12] Rijnders RJ, Van Der Lijdt RB, Peters ED, et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell free maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2003, 23(13): 1042-1044.

[13] Benn P, Borrell A, Cuckle H, et al. Prenatal detection of down syndrome using massively parallel sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the board of the international society for prenatal diagnosis, 24 October 2011[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(1): 1-2.

[14] 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, 61(2): 38-41.

(收稿日期: 2015-03-01)

(上接第 2385 页)

HBV、HCV 病毒引起的 ALT 升高报废血液同样在 HBsAg、HCV-Ab 检测中报废, 90% 以上的单纯 ALT 升高不仅仅是导致大量血液的报废, 而且对献血者造成了不必要的心理负担, 打击再次献血者的积极性^[8]。

世界卫生组织在其 2009 年发布的血液筛查建议书中明确提出建议, 在实施抗-HCV 检测后, ALT 作为血液筛查项目, 对于提升血液的安全性已没有实际意义。另外血液筛查模式又增加了高灵敏度的核酸检测, 因此, 血液筛查 ALT 临界值的变更, 不会对中国的血液安全造成额外的影响, 还在很大程度上降低了血液报废率, 缓解了目前国内供血紧张形势。研究发现学生是 ALT 不合格率最低的献血人群, 其次为农民, 最高的是职员^[9], 针对各种能导致 ALT 非特异性升高的因素, 加强采血前的征询和宣传教育工作, 同时要做好 ALT 升高的献血者知情告知工作, 减小不必要的心理压力, 同时引导与鼓励其选择正确的时机参加下次的无偿献血。

参考文献

[1] 王洪, 王立芹, 牛景萍, 等. 邯郸地区无偿献血者 ALT 影响因素多

重线性回归分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(12): 1317-1319.

[2] 王志红, 任诚诚, 李慧晓. 无偿献血员街头初筛淘汰人群分布特征分析[J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2013, 24(2): 259-261.

[3] 陈云光, 周仲民, 张晓萍. 无偿献血者血液中 ALT 和 HbsAg 及抗-HCV 结果分析[J]. 柳州医学, 2012, 25(1): 16-18.

[4] 高艳, 陈志强, 麦永平, 等. 茂名市无偿献血人群血液检测情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 599-600.

[5] 周宝琴, 杨忠思, 李秋华, 等. 青岛地区 ALT 初筛前后无偿献血者检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(10): 872-873.

[6] 卢春柳, 邱昌文, 孙泽峰, 等. 血站血液筛查检测中 ALT 与病毒性肝炎的相关性调查研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(6): 494-495.

[7] 熊华平, 戎霞, 黄珂, 等. 广州地区 HCV 阳性无偿献血者 ALT 检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(6): 538-540.

[8] 廖蓉仙, 余军民, 胡锋华, 等. 387 名 ALT 单项不合格献血者情况分析[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(7): 532-533.

[9] 郝志伟, 宋任浩. 无偿献血者谷丙转氨酶检测结果及其分布特征调查[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23): 3180-3181.

(收稿日期: 2015-02-08)