

• 论 著 •

男性胎儿 DNA 含量低的孕妇的无创产前检测*

宋春林, 刘正平, 钟 进, 伍秋艳, 陈淑芬
(佛山市妇幼保健院, 广东佛山 528000)

摘要:目的 探讨外周血中胎儿 DNA 含量低的孕妇的无创产前检测(NIPT)。方法 回顾分析 2015 年 4 月至 2016 年 3 月间在佛山市妇幼保健院行 NIPT 的 3 240 例孕妇实验数据与随访资料, 根据其 Y 染色体 z 值, 筛选出胎儿为男性且胎儿 DNA 含量低于 8% 的样品共 150 例, 利用琼脂糖凝胶电泳富集法提高胎儿 DNA 含量, 进行 NIPT, 对比非整倍体筛查结果的准确率。结果 琼脂糖凝胶电泳富集法将样品中的胎儿 DNA 含量从平均 5% 提高到 9.2%。对比胎儿 DNA 含量提高前后的 NIPT 结果是一致的。结论 当胎儿 DNA 含量高于 5% 时, 胎儿 DNA 含量不会影响 NIPT 结果的准确率。

关键词: 游离胎儿 DNA; 无创产前检测; 琼脂糖凝胶电泳; 准确率

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)20-2827-03

Influence of cell free fetal fraction DNA for noninvasive prenatal test*

SONG Chunlin, LIU Zhengping, ZHONG Jin, WU Qiuyan, CHEN Shufen

(Foshan Maternal and Children's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To explore the influence of lower concentration of cell free fetal fraction DNA in maternal plasma on non-invasive prenatal test(NIPT). **Methods** A total of 3 240 pregnant women accepted NIPT in Foshan Maternal and Children's Hospital from April, 2015 to March, 2016 were analyzed retrospectively, and 150 samples of which were male fetus judged by Z score of Y chromosome and the cell free fetal fraction DNA were lower than 8% were selected. The cell free fetal fraction DNA were increased by agarose gel electrophoresis, then conducted NIPT, compared with the results of aneuploidy screening. **Results** The cell free fetal fraction DNA were increased from 5% to 9.2% by agarose gel electrophoresis. The result of NIPT after increasing fetal fraction was consistent with it before. **Conclusion** Concentration of cell free fetal fraction DNA has no influence on the result of NIPT when cell free fetal fraction DNA is above 5%.

Key words: cell free fetal fraction DNA; non-invasive prenatal test; agarose gel electrophoresis; accuracy

无创产前检测(NIPT)是从孕妇外周血中提取胎儿游离 DNA 碎片来筛查胎儿染色体非整倍体。早期研究显示, 胎儿 DNA 含量低于 3%~4% 会增加 NIPT 结果的假阴性率^[1]。因此在低于这个比例的时候, 生物学统计分析软件会提示“Fetal%”, 得不出胎儿染色体非整倍体检测结果。胎儿 DNA 含量随着孕周增大而升高, 而与孕妇体质量指数(BMI)呈负相关, 与胎盘大小及生物学标记物的浓度呈正相关^[2]。回顾本院 2011—2014 年孕妇外周血的胎儿染色体非整倍体 NIPT 检测数据, 发现大约 3% 的孕妇外周血中胎儿 DNA 含量极低, 需要等较大孕周之后重新采血检测, 有时因再次检测失败而放弃做 NIPT, 尤其是一些通过辅助生殖技术怀孕的孕妇, 即使到孕 16 周, 胎儿 DNA 含量仍然低于 4%, 而这些孕妇一般不愿进行有创产前诊断, 且有较强的意愿希望尽早知道筛查结果^[3]。有研究显示, 孕妇外周血中的游离胎儿 DNA 多在 300 bp 以下, 而母体来源的片段较大^[4]。因此, 本研究拟通过琼脂糖凝胶电泳分离回收富集胎儿 DNA, 并分析其对结果的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年 4 月至 2016 年 3 月在佛山市妇幼保健院产科门诊产检的孕妇。所有纳入研究的孕妇均自愿选择 NIPT 并签署了知情同意书。孕周大于 24 周仍然强烈要求做 NIPT 的孕妇被告知可能错过最佳介入性产前诊断时间而影响最后的确诊。

1.2 方法

1.2.1 磁珠法提取 DNA 采用 Streck 抗凝管收集孕妇外周血 10 mL, 4 °C 下 1 600 r/min 离心 10 min, 分离血浆。16 000 r/min 离心 10 min 去除管底红细胞。16 000 r/min 离心 5 min, 取 600 μ L 上清, 针对血浆中胎儿游离 DNA 片段较小的特点, 对超顺磁性纳米颗粒的表面进行改良和表面修饰后, 采用磁珠法分离胎儿游离 DNA。用 Qubit 仪器检测 DNA 浓度。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳富集 DNA 对 150 例怀有男性胎儿且 Y 染色体 z 值较低的孕妇重新采血 10 mL, 将磁珠法所获得的血浆游离样品全部加样于 1.2% 琼脂糖凝胶, 配以 DD 核酸染料, 5 \times TBE 电泳缓冲液, 在 5 V/cm 电场强度下电泳 50 min。电泳结束后, 在紫外光下以 DL500 DNA Marker 为标志, 在 100~300 bp 处将每条泳道切割, 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收富集胎儿片段 DNA。

1.2.3 NIPT 根据 EZ-PALO 快速建库流程, 按对应的 index 编号建库, 取 2 μ L 回收产物用 ABI Step One 荧光定量 PCR 仪进行浓度检测。采用 CN500 测序平台进行单端 36+8(index) bp 测序。参照人类基因组的各条染色体上唯一基因序列片段及特定位点的特征, 对比得到检测的各个序列位置信息, 同时定位于相应的染色体上, 并且统计分析位于每条染色体上的序列条数, 计算获得染色体的比例, 从而计算各条染色体的 z 值, 评估结果为三体综合征高风险或低风险。

* 基金项目: 广东省佛山市科技局攻关项目(2015AB0409)。

作者简介: 宋春林, 男, 副主任技师, 主要从事产前诊断研究。

1.3 确诊与随访 对于 NIPT 结果提示高风险的孕妇,给予遗传咨询,孕 16~24 周时行羊水穿刺培养 8~10 d,孕周大于 24 周者行脐血穿刺培养 3 d,通过细胞培养进行 G 带染色核型分析确诊。对于 NIPT 结果提示低风险的孕妇,定期电话随访,分娩时采集产后脐血进行染色体核型分析。

2 结果

2.1 孕妇年龄与孕周 孕妇平均年龄 31.6 周岁,其中高龄孕妇比例为 44.8%(1 452/3 240)。孕周平均为 17 周,孕周高于 24 周者占 7%(228/3 240)。B 超软指标异常者 177 例,B 超结构异常者 41 例。

2.2 NIPT 结果 检出 13-单体高风险 1 例,为假阳性;NIPT 检出 13-三体高风险 2 例,其中 1 例外院引产,1 例羊水穿刺确认核型正常,随访结局顺产分娩,为假阳性;检出 18-三体高风险 9 例,其中 1 例脐血穿刺核型正常并分娩,为假阳性,1 例拒绝介入性产前诊断,失访,其余 7 例确认核型为 18-三体,引产;检出 21-三体高风险 20 例,其中 1 例为 21-三体嵌合体,1 例核型正常,顺产分娩,为假阳性,其余 18 例核型分析结果均为 21-三体,随访资料显示引产。

2.3 琼脂糖凝胶电泳富集 DNA 质量鉴定 总共筛选到 145 例为男胎且根据其 Y 染色体 z 值粗略估算其胎儿 DNA 含量低于 8%,5 例为男胎且胎儿 DNA 含量低于 4%,生物软件提示为“Fetal%”未给出检测信息。经过琼脂糖凝胶电泳富集 DNA,145 例胎儿 DNA 含量平均值从 8%提高到 9.2%,5 例胎儿 DNA 含量从低于 4%提高到 6%,通过了 NIPT 数据标准。

2.4 胎儿 DNA 富集前后 NIPT 指标对比 以介入性产前诊断羊水或脐血穿刺培养后的核型分析结果为金标准,未进行有创产前诊断者,出生时取脐带血 2 mL 做核型分析。NIPT 对 21-三体综合征的诊断敏感度为 100%(18/18),特异度为 99.9%(3 220/3 222),阳性预测值为 90%(18/20),阴性预测值为 100%(3 220/3 220)。150 例经琼脂糖凝胶电泳富集的胎儿 DNA 样品的 NIPT 结果除 1 例为 21-三体外,其余均为低风险,与核型分析结果一致,其敏感度和特异度均为 100%。

3 讨论

唐氏综合征的发病率约为 1/750,中国每年大约有 26 600 例唐氏综合征患儿出生,给家庭和社会带来很大的经济负担和心理负担。产前筛查是唯一有效的措施。然而传统的血清学筛查有假阳性高、漏诊率高的缺陷,而介入性产前诊断亦有周期长的缺陷,还有导致胎儿感染或流产的风险。自从 Lo 等^[2]报道发现孕妇血浆中存在胎儿游离 DNA 后,随着二代测序技术的成熟,NIPT 逐渐广泛地应用于胎儿染色体非整倍体的检测^[5]。

然而近几年一些文献强调,现在很多实验室并没有估算 NIPT 时孕妇外周血中游离胎儿 DNA 的含量,有些实验室甚至没有检测提取的 DNA 浓度。研究发现,这有可能导致假阴性结果。而过去的研究已经表明,孕妇的孕周、BMI、胎盘大小和生物学标记浓度以及是否采用辅助生殖技术,都影响着孕妇外周血中的胎儿 DNA 含量^[6-7]。本实验室的数据也表明,有一定比例的样品由于胎儿 DNA 含量过低导致没有给出 NIPT 的结果信息,显示“Fetal%”。Artieri 等^[8]的研究也发现了孕妇外周血中胎儿 DNA 含量偏低时对 NIPT 结果的影响。

对于孕妇外周血中胎儿 DNA 含量低的这一现象,国内已有文献报道琼脂糖凝胶电泳的方法可以有效区分母源性和胎源性 DNA^[9-10]。因此,本研究选取了 2015 年 4 月至 2016 年 3

月间在佛山市妇幼保健院行 NIPT 的 3240 例实验数据与随访资料作为研究对象,评估通过琼脂糖凝胶电泳富集提高胎儿 DNA 含量的意义。为了粗略估算胎儿 DNA 浓度,本研究首先通过 NIPT 结果中 Y 染色体 z 值判断男胎及胎儿 DNA 浓度,从而筛选出 150 例胎儿 DNA 含量低于 8%的孕妇外周血样品。

本研究调整了琼脂糖凝胶电泳的凝胶浓度和电泳电压,回收 DNA 进行 NIPT,根据 Y 染色体 z 值估算胎儿 DNA 浓度,从平均 5%提高到 9.2%,说明琼脂糖凝胶电泳富集胎儿 DNA 的方法取得了较好的效果。本研究还回顾了 NIPT 结果的灵敏度和特异度等各项指标,与文献报道的一致^[11]。富集后的结果与随访资料比较也提示结果一致。说明富集效果比较理想,而且说明当胎儿 DNA 浓度高于 5%时,胎儿 DNA 浓度不影响 NIPT 结果的准确性,这与 Zhou 等^[12]的研究结论是一致的。特别是 5 例之前检测失败的样品,传统流程是要等待孕妇孕周更大时再重新采血进行检测,但有时依然检测失败,孕妇会因等待而焦虑,而经过富集后,胎儿 DNA 含量均达到 5%以上,二代测序数据量合格,并与随访资料的核型分析结果是一致的,证明该法在胎儿 DNA 浓度极低时有一定的意义。

但本研究也存在一定的局限性:一方面是本研究通过 Y 染色体的 z 值来粗略判断胎儿 DNA 浓度,这在检测中会有一些的偏差,且样本数量不够大;另一方面是本研究不能检测女胎的 DNA 浓度和评估其有效性。

参考文献

- [1] Sehnert AJ, Rhee B, Comstock D, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood[J]. Clin Chem, 2011, 57(7):1042-1049.
- [2] Lo YM. The quest for accurate measurement of fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem 2011, 57(3):522-523.
- [3] Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, et al. Fetal Fraction in Maternal Plasma Cell-Free DNA at 11-13 Weeks' Gestation; Effect of Maternal and Fetal Factors[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 31(4):237-243.
- [4] Li Y, Di Naro E, Vitucci A, et al. Size fractionation of cell-free DNA in maternal plasma improves the detection of a paternally inherited beta-thalassemia point mutation by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 25(2):246-249.
- [5] Jin Y, Miao Z, Ge J, et al. Prenatal diagnosis of fetal chromosome aneuploidy by massively parallel genomic sequencing[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2014, 94(23):1788-1790.
- [6] Zhang J, Zhang B. Second-generation non-invasive high-throughput DNA sequencing technology in the screening of Down's syndrome in advanced maternal age women[J]. Biomed Rep, 2016, 4(6):715-718.
- [7] Takoudes T, Hamar B. Performance of non-invasive prenatal testing when fetal cell-free DNA is absent[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015, 45(1):112.
- [8] Artieri CG, Haverty C, Evans EA, et al. Noninvasive prenatal screening at low fetal fraction: comparing whole-genome sequencing and single-nucleotide polymorphism methods[J]. Prenat Diagn, 2017, 37(5):482-490. (下转第 2831 页)

CRP 与 IL-8 相关系数为 0.457 ($P=0.087$), 与 ET-1 相关系数为 0.598 ($P=0.019$), IL-8 与 ET-1 相关系数为 0.695 ($P=0.004$); AECOPD 未合并肺栓塞患者血 CRP 与 IL-8 相关系数为 0.522 ($P=0.000$), CRP 与 ET-1 相关系数为 0.351 ($P=0.007$), IL-8 与 ET-1 相关系数为 0.260 ($P=0.049$)。本研究验证了 AECOPD 合并肺栓塞患者体内存在更强的炎性反应, 且各炎性指标间具有一定相关性。同时本研究发现合并肺栓塞的 AECOPD 患者心肌酶学指标 LDH、cTnI 及 NT-proBNP 更高, 提示肺栓塞一定程度上损伤心肌, 这与既往文献研究结果一致^[17-18]。

综上所述, AECOPD 若出现血 D-二聚体明显升高, 或者患者体内存在明显的炎性反应时, 需考虑肺栓塞或体内静脉微栓塞, 对于无条件进行肺动脉造影检查的患者, 可根据临床需要给予抗凝剂治疗, 达到治疗或预防的目的。

参考文献

- Bertoletti L, Quenet S, Mismetti P, et al. Clinical presentation and outcome of venous thromboembolism in COPD [J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(4): 862-868.
- 李有霞, 郑则广, 刘妮, 等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重伴肺动脉栓塞的危险因素分析[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(4): 298-303.
- Rizkallah J, Man S, Sin DD. Prevalence of pulmonary embolism in acute exacerbations of COPD A systematic review and metaanalysis[J]. *Chest*, 2009, 135(3): 786-793.
- Iwaki M, Ito S, Morioka M, et al. Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(3): 531-536.
- 白久武, 高蓓兰, 徐金富, 等. 老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期继发肺栓塞和/或深静脉血栓的机制研究[J]. *中华全科医师杂志*, 2014, 13(6): 448-451.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- Zhong N, Wang C, Yao W, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in China: a large, population-based survey[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(8): 753-760.
- Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Sanchez PR, et al. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Thorax*, 2005, 60(11): 925-931.
- Bertoletti L, Quenet S, Laporte S, et al. Pulmonary embolism and 3-month outcomes in 4036 patients with venous thromboembolism and chronic obstructive pulmonary disease: data from the RIETE registry[J]. *Respir Res*, 2013, 14: 75.
- Gunen H, Gulbas G, In E, et al. Venous thromboemboli and exacerbations of COPD[J]. *Eur Respir J*, 2010, 35(6): 1243-1248.
- Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines(8th Edition)[J]. *Chest*, 2008, 133(6 Suppl): 454S-545S.
- 钟南山, 刘又宁. 呼吸病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 38-44.
- 王辰, 杜敏捷, 曹大德. 慢性肺源性心脏病急性发作期肺细小动脉血栓形成的病理观察[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(2): 123.
- 解玉东. IL-8 和 ET-1 在慢性阻塞性肺疾病急性加重合并肺栓塞的表达及临床意义[J]. *中国医学工程*, 2013(12): 15-16.
- 王同生, 毛毅敏, 孙瑜霞, 等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重合并肺栓塞的临床特征与高危因素研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(19): 2163-2166.
- 刘芳芳, 翟振国, 杨媛华, 等. 血液中炎症相关指标的动态变化及其与静脉血栓栓塞症的相关性[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(24): 1860-1863.
- 张蕴, 杨媛华, 庞宝森, 等. 急性肺血栓栓塞患者血清心肌酶的变化[J]. *中华急诊医学杂志*, 2008, 17(12): 1296-1300.
- Gutte H, Oxbol J, Kristoffersen US, et al. Gene expression of ANP, BNP and ET-1 in the heart of rats during pulmonary embolism[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11111.
- (收稿日期: 2017-04-15 修回日期: 2017-06-19)
- (上接第 2828 页)
- 谭艳平, 杨玖英, 朱英国, 等. 琼脂糖电泳凝胶中回收微量 DNA 片段的新方法[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2004, 23(1): 10-14.
- 杨麒麟. 选择性扩增孕妇血浆中游离胎儿 DNA 方法建立及其在 21-三体综合征无创性产前检测中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- Gil MM, Quezada MS, Revello R, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2014, 45(3): 249-266.
- Zhou Y, Zhu Z, Gao Y, et al. Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma [J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(11): 1429-1435.
- (收稿日期: 2017-04-21 修回日期: 2017-06-25)