

• 论 著 •

妊娠期糖尿病孕妇外周血胎儿游离 DNA 检测及其临床意义^{*}

江 鸿, 费安兴, 魏莉平, 邹甜甜, 何 松, 李 胜[△]
(鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院检验科, 湖北黄石 435000)

摘 要:目的 通过检测妊娠期糖尿病孕妇外周血胎儿游离 DNA 浓度变化, 分析基因表达水平是否正常, 为诊断和阐明妊娠期糖尿病及其遗传效应提供理论依据。**方法** 用血浆基因组 DNA 磁珠法抽提 12~25 周孕早中期孕妇外周血中胎儿游离 DNA, 妊娠期糖尿病组和健康对照组各 15 例, 通过高通量测序检测孕妇胎儿染色体基因拷贝数及评估其风险值。**结果** 与健康对照组比较, 妊娠期糖尿病组的孕妇胎儿游离 DNA 文库浓度差异无统计学意义($P>0.05$), 染色体基因拷贝数无显著变化, 但个别存在 18 号染色体基因微重复, 可能与妊娠期糖尿病基因表达异常相关。**结论** 对妊娠期糖尿病孕妇外周血胎儿游离 DNA 检测, 将有助于进一步研究妊娠期糖尿病形成的分子机制及其临床诊断。

关键词: 妊娠期糖尿病; 高通量测序; BGI-50; 母体血浆; 胎儿游离 DNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.024 **中图法分类号:** R446; R287.1

文章编号: 1673-4130(2020)02-0224-04 **文献标识码:** A

Detection of fetal free DNA in peripheral blood of pregnant women with gestational diabetes mellitus and its clinical significance^{*}

JIANG Hong, FEI Anxing, WEI Liping, ZOU Tiantian, HE Song, LI Sheng[△]

(Department of Clinical Laboratory, Huangshi Maternity and Children's Health Hospital of Edong Healthcare Group, Huangshi, Hubei 435000, China)

Abstract: **Objective** To provide a theoretical basis for the diagnosis and elucidation of gestational diabetes mellitus and its genetic effect, the changes of fetal free DNA concentration in peripheral blood of pregnant women with gestational diabetes mellitus were detected and the level of gene expression was analyzed. **Methods** The fetal free DNA was extracted from the peripheral blood of 12—25 week pregnant women in the early and middle stages by the method of plasma genomic DNA magnetic beads. There were 15 cases in the gestational diabetes mellitus group and 15 cases in the control group. High throughput sequencing was used to detect the copy number of fetal chromosome genes and evaluate the risk value. **Results** Compared with the healthy control group, there was no significant difference in the concentration of fetal free DNA library among pregnant women with gestational diabetes mellitus ($P>0.05$). There was no significant change in the number of copies of chromosome genes, but some of them had microduplication of chromosome 18, which may be related to the abnormal gene expression of gestational diabetes. **Conclusion** The detection of fetal free DNA in peripheral blood of pregnant women with gestational diabetes will be helpful to further study the molecular mechanism of gestational diabetes and its clinical diagnosis.

Key words: gestational diabetes; high-throughput sequencing; BGI-50; maternal plasma; free fetal DNA

国际糖尿病协会权威数据显示, 糖尿病的发病呈快速增长和低龄化的态势, 已跃居全世界发病率和病死率最高的疾病之一。全球糖尿病患者 2010 年已接近 3 亿, 预计到 2030 年将超过 4.35 亿, 糖尿病及并发症已成为全球范围内日益严重的健康问题。糖

尿病将成为世界经济增长的主要牵制力之一, 这显示了全球糖尿病防治的严峻形势。

妊娠期糖尿病(GDM)是指在妊娠期间首次发生或发现的葡萄糖耐量异常, 是糖尿病的一种特殊类型, 其发病率在各国差异较大, 为 1%~14%。GDM

^{*} 基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研基金项目(WJ2019F042)。

作者简介: 江鸿, 女, 主任技师, 主要从事检验医学、新生儿疾病筛查研究。 [△] 通信作者, E-mail: 601208989@qq.com。

本文引用格式: 江鸿, 费安兴, 魏莉平, 等. 妊娠期糖尿病孕妇外周血胎儿游离 DNA 检测及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(2):

对孕妇、胎儿和新生儿均有较大的负面影响,GDM 患者中羊水过多、妊娠期高血压、巨大儿、剖宫产、胎儿畸形、新生儿低血糖、低血钙、新生儿窒息甚至死亡的发生率明显增高,GDM 产妇自己发展为 2 型糖尿病的概率也会大大增加,且其分娩的子女(特别是出生时为巨大儿的子女)成年后发生肥胖及 2 型糖尿病等代谢性疾病的概率也会显著增高,这种遗传效应导致糖尿病的发病具有明显的家族聚集性,这对患者的整个家庭乃至整个社会都会造成极大的影响^[1-3]。本研究以黄石地区孕妇人群为研究对象,通过高通量技术平台,检测 GDM 孕妇外周血胎儿游离 DNA,筛选孕妇妊娠期胎儿染色体非整倍数拷贝变异,为进一步解析影响妊娠期孕妇糖尿病致病基因的分子机制研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1—6 月来鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院围保门诊产检的 GDM 孕妇的静脉血样本作为 GDM 组,共 15 例;健康对照组为体检健康孕妇,共 15 例。孕妇年龄 22~35 岁,孕周 12~26 周。GDM 的诊断标准参照《妇产科学》第 6 版^[4]和国家原卫生部妊娠期糖尿病的筛查和诊断标准(2011 年)^[5]。GDM 组孕妇与健康对照组均为单胎,年龄、孕周差异无统计学意义($P>0.05$),所有健康对照组孕妇体检健康,无高血压、糖尿病史等其他既往病史。本研究经鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院伦理委员会批准(1.0 版,2018-12-24)。

1.2 方法

1.2.1 血浆 DNA 抽提 GDM 组是血糖耐受量异常组,健康对照组是正常血糖浓度组。通过采集孕妇外周静脉血 10 mL 左右,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,1 500 g 离心 10 min,取分离得到的母体血浆进行胎儿游离 DNA 提取,参照华大基因核酸提取试剂盒进行操作。首先,配置蛋白酶 K 溶液,在 96 孔内按照 1:10 比例加入蛋白酶 K 和磁珠液,用封口胶密封,50 ℃ 恒温振荡器中 250 r/min 洗脱 1 h。然后,在每孔内加入 20 μL 磁珠和 400 μL binding buffer 震荡 2~3 min 混匀,放置磁力架中 5 min,倒掉上清;分别用 600 μL 洗脱液离心 5 min 混匀,放置磁力架中 5 min,倒掉上清。最后,每孔加入 50 μL Elution Buffer 1 300 r/min,70 ℃,20 min,放置于磁力架中获得 DNA 溶液。DNA 质量检测是通过 Qubit 4 荧光定量仪上测定 DNA 浓度和总量,吸光度(A)260/280 在 1.8~2.0。

1.2.2 cDNA 合成及文库构建 采用华大基因 BGINIFT 检测试剂盒的建库方法构建 cDNA 文库,具体步骤如下:对血浆提取的 DNA 通过末端修复、接头连接、PCR 扩增进行文库制备;制备阴性对照和阳性对照混合液,分别取 38.5 μL 分子级水,再分别加入 1.5 μL 阴性对照品、阳性对照品,充分混匀。制备

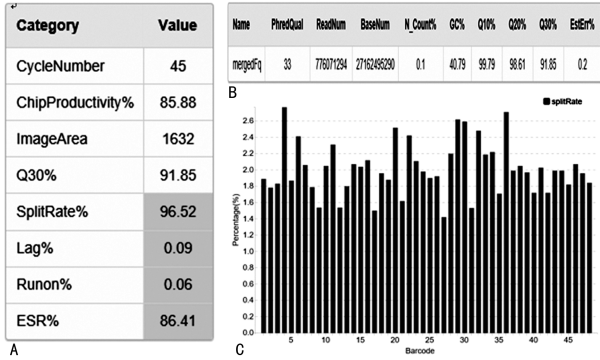
10.0 μL 末端修复液,其中末端修复酶 0.6 μL,末端修复缓冲液 9.4 μL。将上述 PCR 管加入 10 μL 末端修复混合液,充分混匀,瞬间离心,置于 PCR 仪上,37 ℃ 孵育 10 min,冷却至 4 ℃ 保存;接头连接采用磁珠法,将总体积 30 μL 的连接反应混合液(24 μL 连接缓冲液,1 μL 连接酶和 5 μL 标签接头)加入 PCR 管内,置于 PCR 仪上 23 ℃ 孵育 20 min,冷却至 4 ℃ 保持;再将 PCR 管过磁力架,弃掉上清液后,加入 200 μL 75%乙醇,吹打混匀,过磁力架至溶液澄清,弃掉上清;加入 23 μL 洗脱缓冲液,充分混匀,室温静置 5 min,置于磁力架 3 min 至溶液澄清,取 21 μL 上清液于新 PCR 管中。PCR 反应程序为:98 ℃,2 min,1 个循环;98 ℃,15 s,56 ℃,15 s,72 ℃,30 s,12 个循环;72 ℃,5 min,1 个循环,4 ℃,保存。以文库浓度≥2 ng/μL 为合格标准。

1.2.3 上机检测 对构建好的 cDNA 文库经纯化合格后,使用 BGISEQ-50 测序平台测序。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS11.0 软件分析,GDM 组与健康对照组比较采用 Z 检验验证,使用华大基因公司“胎儿染色体非整倍体基因检测软件”计算 Z 值,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较用 t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序质量质控分析 每次检测样本测序有效数据量不少于 3.5 M 条 DNA 序列,每次检测结果同时满足阴性对照品检测为阴性,阳性对照品检测为阳性结果。扩增循环数设定为 45 个循环,随着循环数增加,唯一比对测序条带数>2.5 M,Q20 达到 95%以上,Q30 均达到 90%以上,GC%含量在 38%~42%,可见数据质控合格,可以进行下一步结果分析,见图 1。



注:A 表示基因芯片参数;B 表示基因序列读取结果;C 表示标签拆分率。

图 1 测序质控图

表 1 GDM 组和健康对照组孕妇胎儿游离 DNA 文库浓度比较(ng/μL)

组别	n	DNA 文库浓度	P
健康对照组	15	18.20±0.35	>0.05
GDM 组	15	17.60±0.70	

2.2 2 组孕妇外周血胎儿游离 DNA 文库浓度比较
GDM 组孕妇和健康对照组孕妇胎儿游离 DNA 文库浓度分别为(17.60±0.70)、(18.20±0.35)ng/mL,2 组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3 2 组孕妇外周血胎儿染色体拷贝数结果分

析 采用 Z 检验验证 GDM 组与健康对照组,结果显示,当阳性判断值判断为 3 时,显著性水平 $P<0.01$, $Z<3$,可判定为阴性,并且 GDM 组和健康对照组间染色体拷贝数无明显差异。见表 2。

表 2 GDM 组和健康对照组孕妇胎儿游离 DNA 染色体非整倍体拷贝数及风险值

组别	Z(chr13) 绝对值	Z(chr18) 绝对值	Z(chr21) 绝对值	13 风险	18 风险	21 风险	缺失/重复
健康对照组	<3	<3	<3	低风险	低风险	低风险	无
GDM 组	<3	<3	<3	低风险	低风险	低风险	存在 1 例,dup(18p11.31-p11.23,2.02M)-M
阴性对照	<3	<3	<3	低风险	低风险	低风险	无
阳性对照	21.20	19.04	16.00	高风险	高风险	高风险	无

3 讨 论

关于 GDM 的发病机制学说众多,有遗传易感学说、胰岛素抵抗学说、氧化应激学说、细胞因子分布及表达异常学说等,其中,胰岛素抵抗(IR)普遍被认为是导致 GDM 发生发展的主要机制^[6-7]。大量研究表明,糖尿病是一种多基因病,GDM 是糖尿病中的独立类型,对孕妇和胎儿均存在重大影响,GDM 不仅与生理性代谢相关,起决定性作用的仍然是易感基因和致病相关基因^[8-10]。因此,本研究旨在通过检测 GDM 孕妇外周血胎儿游离 DNA 变化,分析基因表达水平是否正常,为诊断和阐明 GDM 及其遗传效应提供依据。

近年来,国内外广泛提出了“精准医疗计划”,特别是伴随着高通量测序技术的发展,基因测序的成本日益降低,基因测序技术日渐在肿瘤检测、液体活检和产前诊断等诸多领域凸显重要价值和应用前景^[11-13]。本研究中通过华大基因 BGISEQ-50 测序仪,采用联合探针锚定聚合技术(cPAS)和 DNA 纳米球(DNB)技术,将 DNA 分子锚与荧光探针在 DNB 纳米球上进行聚合,并产生荧光信号,然后通过高分辨率成像系统对光信号进行拍照采集,光信号经过数字化处理后即可获得碱基序列。其中,DNB 通过线性扩增的方法进行增强信号,这种方法可以有效降低单拷贝的错误率^[14],十分有效地保证测序过程的准确。本实验均设置对照组及质控,测序结果显示有效测序量达到 5 M 以上,测序饱和量均达到要求,两组 Q20 和 Q30 均分别高于 90%以上,GC 含量均在 50%范围内,由此证明测序结果十分可靠。

正常母亲和胎儿的染色体基因在表达水平上是相同的,如果出现孕妇或胎儿染色体基因表达水平异常,那么可能与一些先天性疾病发生密切相关。汤冬玲^[15]的研究表明,GDM 就可能与基因表达水平异常直接相关,游离胎儿 DNA 水平的升高可能与 GDM 的病理变化使胎盘屏障不完善,胎儿有核细胞进入母

体量增多有关。因此,孕妇外周血中胎儿 DNA 水平的改变可作为辅助诊断及预防 GDM 的一项有效指标。本研究采用无创孕妇外周血游离 DNA 测序技术,理论上可以通过检测游离在母体外周血的胎儿 DNA 来检测胎儿的遗传物质,从而实现无创零风险的遗传检测。已有大量报道显示,无创 DNA 检测技术准确性高,基本接近产前诊断的准确性,具有非侵入性、无流产风险的优势,其综合先进的生物信息学分析技术,准确检测出常见胎儿染色体非整倍体异常^[16-18]。本研究显示,GDM 组孕妇胎儿游离 DNA 文库浓度并无显著异常,但进一步通过染色体非整倍体变异分析发现个别在 18 号染色体基因拷贝数存在微重复,但是否与糖尿病致病相关仍有待实验进一步验证。

4 结 论

本研究通过高通量技术揭示,GDM 孕妇外周血胎儿游离 DNA 无明显异常,染色体基因拷贝数无明显差异,为进一步研究 GDM 形成的分子机制和临床诊断奠定了基础。

参考文献

[1]

FLORIS I,DESCAMPS B,VARDEU A,et al. Gestational diabetes mellitus impairs fetal endothelial cell functions through a mechanism involving microRNA-101 and histone methyltransferase enhancer of zester homolog-2[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2015,35(3):664-674.

[2]

DAMM P,HOUSHMAND-OEREGAARD A,KELSTRUP L,et al. Gestational diabetes mellitus and long-term consequences for mother and offspring:a view from Denmark[J]. Diabetologia,2016,59(7):1396-1399.

[3]

BINDER A M,LAROCCA J,LESSEUR C,et al. Epigenome-wide and transcriptome-wide analyses reveal gestational diabetes is associated with alterations in the human leukocyte antigen complex[J]. Clin Epigenetics,2015,7(1):79.

[4]

乐杰. 妇产科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2005:

160.

[5] 卫生部医疗服务标准专业委员会. 妊娠期糖尿病诊断标准; WS331-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 1-10.

[6] SABRY M M, MAHMOUD M M, SHOUKRY H S, et al. Interactive effects of apelin, renin-angiotensin system and nitric oxide in treatment of obesity-induced type 2 diabetes mellitus in male albino rats[J]. Arch Physiol Biochem, 2019, 125(3): 244-254.

[7] GAO L R, ZHANG N K, ZHANG Y, et al. Overexpression of apelin in Wharton' jelly mesenchymal stem cell reverses insulin resistance and promotes pancreatic β cell proliferation in type 2 diabetic rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 339.

[8] SALMINEN A, KAUPPINEN A, KAARNIRANTA K. AMPK/Snf1 signaling regulates histone acetylation: impact on gene expression and epigenetic functions[J]. Cell Signal, 2016, 28(8): 887-895.

[9] 谢琴, 姜艳华, 黄红丽. Toll 样受体 4 在妊娠期糖尿病患者外周血和胎盘组织中的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志 2017, 38(14): 1901-1903.

[10] 马丽媛, 李超, 王伟伟. 雌激素受体 β 基因 AluI, RsaI 位点多态性与妊娠期糖尿病易感性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1062-1065.

[11] SUDMANT P H, RAUSCH T, GARDNER E J, et al. An integrated map of structural variation in 2 504 human genomes[J]. Nature, 2015, 526(7571): 75-81.

[12] 1 000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, ABECASIS GONCALO R, AUTON ADAM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes[J]. Nature, 2012, 491(7422): 56-65.

[13] SHEA J, AGARWALA V, PHILIPPAKIS A A, et al. Comparing strategies to fine-map the association of common SNPs at chromosome 9p21 with type 2 diabetes and myocardial infarction[J]. Nat Genet, 2011, 43(8): 801-805.

[14] HUANG J, LIANG X M, XUAN Y, et al. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer[J]. Gigascience, 2017, 6(5): 1-9.

[15] 汤冬玲. 妊娠糖尿病孕妇外周血中胎儿游离 DNA 的定量检测[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(12): 23-25.

[16] 洪桂华, 林华, 董娴, 等. 无创 DNA 检测在产前诊断中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(1): 66-67.

[17] BRISON N, NEOFYTOU M, DEHASPE L, et al. Predicting fetoplacental chromosomal mosaicism during non-invasive prenatal testing[J]. Prenat Diagn, 2018, 38(4): 258-266.

[18] NICOLAIDES K H, SYNGELAKI A, DEL MAR GIL M, et al. Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood[J]. Fetal Diagn Ther, 2014, 35(3): 212-217.

(收稿日期: 2019-06-22 修回日期: 2019-10-15)

(上接第 223 页)

器官移植前 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ Treg 细胞占 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞百分比与 TGF- β 1、IL-10 水平呈正相关, 差异有统计学意义, 与于丹军等^[7]在妇科肿瘤研究结果相一致。表明 Treg 可能通过引起 TGF- β 、IL-10 上调而发挥免疫抑制的作用。

移植患者 TGF- β 1、IL-10 的水平下降, 移植前高于移植后, 但经统计分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。可能与移植前患者体内存在的 TGF- β 1、IL-10 水平有关。具体机制尚不清楚, 有待进一步的观察研究。

4 结 论

Treg 细胞及细胞因子在器官移植免疫中发挥着重要的作用, 本研究观察 Treg 细胞与细胞因子 TGF- β 1、IL-10 水平在移植前呈正相关。Treg 细胞在移植后数周下降为 0, 几周后缓慢出现表达, 细胞因子移植后下降。临床中有关 Treg 细胞与细胞因子在移植前后监测的数据稀少, 还需要更多的研究来明确这类细胞作为一种免疫指标的作用。

参考文献

[1] 夏志超, 曾仲. 调节性 T 细胞及其与移植免疫和肿瘤免疫

的研究进展[J]. 云南医药, 2016(4): 458-460.

[2] PILAT N, KLAUS C, SCHWARZ C, et al. Rapamycin and CTLA4Ig synergize to induce stable mixed chimerism without the need for CD40 blockade[J]. Am J Transplant, 2015, 15(6): 1568-1579.

[3] 罗文峰, 时军, 黄跃胜, 等. 调节性 T 细胞与肾移植急性排斥反应的关系[J]. 江西医药, 2014, 54(1): 9-11.

[4] 张慧芸, 娄金丽, 李宁, 等. $CD4^{+}CD25^{+}$ 调节性 T 细胞及其在肝移植后免疫耐受中的作用[J]. 北京医学, 2010, 32(9): 748-750.

[5] 钟嘉明. 肝移植受者外周血调节性 T 细胞变化及其临床意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.

[6] 农村立, 龙腾河, 郭玺, 等. 肝移植组织中调节性 T 淋巴细胞的表达及分布[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 903-906.

[7] 于丹军, 樊静, 胡月, 等. 妇科肿瘤患者外周血中调节性 T 细胞和血清中 TGF- β 、IL-10 的变化及相关性研究[J]. 河北医科大学学报, 2016, 57(11): 1307-1316.

(收稿日期: 2019-06-12 修回日期: 2019-10-14)