

• 论 著 •

限制性胎盘嵌合对无创产前基因检测的影响*

王 杰^{1,2}, 王晓华¹, 武丽琼¹, 刘雅贤¹, 郭志远¹, 梁 庄³, 侯丽青¹, 贾跃旗^{1△}

1. 内蒙古自治区妇幼保健院遗传优生科, 内蒙古呼和浩特 010010; 2. 内蒙古大学省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 内蒙古呼和浩特 010021; 3. 内蒙古自治区妇幼保健院超声医学科, 内蒙古呼和浩特 010010

摘 要:目的 探讨限制性胎盘嵌合(CPM)对无创产前基因检测(NIPT)的影响。方法 对 16 例经 NIPT 检测后结果提示高风险的孕妇进行产前诊断, 采用羊膜腔穿刺术、脐血穿刺及荧光原位杂交技术(FISH)对胎儿进行产前诊断核型分析, 并于引产或生产后对胎盘进行 FISH 或染色体微阵列分析(CMA)检测。结果 经产前诊断 14 例标本与 NIPT 检测结果一致, 且引产后胎盘组织检测结果与 NIPT 结果一致; 2 例产前诊断结果与 NIPT 结果不一致, 其中 1 例经羊水细胞诊断核型正常, 胎盘 CMA 检测存在 21-三体嵌合, 1 例 NIPT 检测 6 号染色体三体高风险, 经羊水细胞 CMA 诊断结果为 $\text{arr}[\text{GRCh37}]16\text{p}13.11(14892975_16528123) \times 1$, 胎盘 CMA 检测结果显示存在 6 号三体嵌合及 16p13.11 区域中 1.36M 缺失。经统计, NIPT 结果与胎盘检测结果的一致率为 93.8%(15/16), 与产前诊断结果的一致率为 87.5%(14/16)。结论 CPM 的存在是引起 NIPT 结果与产前诊断结果不一致的重要原因, 建议 NIPT 高风险的孕妇通过侵入性诊断来进一步明确诊断, 检测结果高度提示为 CPM 的孕妇应加强胎儿宫内发育情况的监控, 并留取胎盘标本, 以进一步明确异常来源。

关键词: 无创产前基因检测; 限制性胎盘嵌合; 胎儿宫内生长受限

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.21.002

中图法分类号:R714.5

文章编号:1673-4130(2021)21-2567-04

文献标志码:A

Impact of confined placental mosaicism on noninvasive prenatal genetic testing*

WANG Jie^{1,2}, WANG Xiaohua¹, WU Liqiong¹, LIU Yaxian¹, GUO Zhiyuan¹,
LIANG Zhuang³, HOU Liqing¹, JIA Yueqi^{1△}

1. Department of Genetic Eugenics, Inner Mongolia Autonomous Region Maternity and Child Health Care Hospital, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China; 2. State Key Laboratory of Grassland Livestock Reproductive Regulation and Breeding Co-build by Province and Ministry, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China; 3. Department of Ultrasonic Medicine, Inner Mongolia Autonomous Region Maternity and Child Health Care Hospital, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China

Abstract: **Objective** To explore the influence of confined placental mosaicism (CPM) on non-invasive prenatal genetic testing (NIPT). **Methods** The prenatal diagnosis was performed in 16 pregnant women with high risk indicated by NIPT results. The chromosomal karyotyping analysis of prenatal diagnosis in fetus was performed by adopting the amniocentesis, umbilical blood puncture and fluorescent in situ hybridization (FISH). FISH or chromosome microarray analysis (CMA) were performed on placenta after induced labor or delivery. **Results** The 14 samples diagnosed by prenatal diagnosis were consistent with the results of NIPT, moreover the detection results of placental tissue after induced labor were consistent with NIPT; the prenatal diagnostic results of other two cases were inconsistent with the NIPT results, in which 1 case was the normal karyotype diagnosed by amniotic fluid cells, and there was 21-trisomy chimerism by placental CMA detection. Another case was the high risk of chromosome 6 detected by NIPT, and the diagnostic result of amniocentesis was $\text{arr}[\text{GRCh37}]16\text{p}13.11(14892975_16528123) \times 1$. There was a trisomy 6 and a 1.36M deletion in the 16p13.11 region detected by the placenta CMA. The consistent rate of NIPT results with placental test results

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08006)。

作者简介: 王杰, 女, 主管技师, 主要从事分子遗传学研究。△ 通信作者, E-mail: JYQ721027@163.com。

本文引用格式: 王杰, 王晓华, 武丽琼, 等. 限制性胎盘嵌合对无创产前基因检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(21): 2567-2570.

was 93.8% (15/16), and the consistent rate with prenatal diagnosis was 87.5% (14/16). **Conclusion** The presence of CPM is an important cause of the inconsistency between the NIPT results and prenatal diagnosis results. It is recommended that pregnant women with high risk further clear the diagnosis by the invasive diagnosis. For the pregnant women with CPM highly indicated by the detection results, the monitoring of fetal intrauterine development should be strengthened, and placental specimens is collected to further identify the source of the abnormality.

Key words: non-invasive prenatal test; confined placental mosaicism; fetal intrauterine growth retardation

近年来,随着分子遗传学技术的迅速发展,无创产前基因检测(NIPT)技术在临床上受到了越来越广泛的关注。作为一项优秀的产前筛查工具,NIPT 技术具有无创、高精度等诸多优势。它主要通过检测孕妇外周血浆中的胎儿游离 DNA(cffDNA),对 21、18、13-三体 and 性染色体非整倍体(SCAs)进行筛查,大大提高了这几种染色体病的检出率。但是,在这项技术的背后,限制性胎盘嵌合(CPM)一直是困扰大家的难题。CPM 是指胎盘内同时存在两种或多种细胞系,其染色体核型与胎儿存在差异,胎儿染色体核型大多正常。早孕期绒毛活检(CVS)中 CPM 的发生率为 1%~2%^[1-2],其中 30%~50%的 CPM 会在妊娠过程中丢失胎盘非整倍体细胞系^[3]。而在异常细胞持续存在的病例中,CPM 可能会增加不良妊娠结局的风险^[4]。本研究对在内蒙古自治区妇幼保健院进行 NIPT 检测阳性的孕妇进行产前诊断,并在引产或生育后取胎盘组织进行荧光原位杂交技术(FISH)或染色体微阵列分析(CMA)检测,评估 CPM 对 NIPT 结果的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016—2018 年在内蒙古自治区妇幼保健院产前诊断中心经 NIPT 检测后,结果提示高风险的孕妇,经产前诊断,在孕妇知情同意的情况下于终止妊娠或足月生产后采集 16 例胎盘标本。本研究经内蒙古自治区妇幼保健院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 NIPT 检测 抽取孕妇外周静脉血 5 mL,置于 cffDNA 专用真空采血管(康为世纪)中,分别以 $1\ 600\times g$ 及 $16\ 000\times g$ 低温离心 10 min 后得到血浆标本。按王杰等^[5]报道的方法提取血浆游离 DNA 并制备文库,DNA 文库经质控后达到 290 bp 左右的片段峰值,水平 $>30\text{ nmol/L}$ 。借助于 BGI500 测序平台进行测序,利用高分辨率成像系统及生物信息系统转换得待测序列。所得序列经与人参考基因组 GRCh37/hg19 比对确定每一测序 reads 染色体的定位,计算得出标准化 Z 值。标本满足质量控制标准(有效数据量 $\geq 3.5\text{ Mb}$,无扩增偏倚,cffDNA 比例 $\geq 3.5\%$)时根据标准化 Z 值评估检测结果,若 Z 值的

绝对值 ≥ 3 ,提示为高风险;Z 值介于 $-3\sim <3$,结果为低风险。

1.2.2 羊水细胞培养及染色体制备 按照实验室标准流程进行培养、制片、染色等,根据人类细胞基因组学国际命名体系标准(2020)进行核型分析诊断。

1.2.3 胎盘组织的采集 孕妇终止妊娠或足月生产后排出生胎盘,分别取胎盘边缘、胎盘中央近胎儿面、胎盘近脐带根部母体面组织各 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$,浸泡于装有无菌 PBS 的离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.4 FISH 检测 (1)样品载玻片预处理:羊水细胞经离心、低渗后滴片固定于载玻片,胎盘组织标本剪碎、60%冰乙酸吹打固定于载玻片,固定好的玻片标本经 SSC 溶液洗涤和胃酶处理,预冷的乙醇溶液固定,将核酸暴露。(2)变性:将玻片和探针分别在变性剂中 $76\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性。玻片变性后经预冷的乙醇溶液固定,待其干燥后,置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片机上预热。(3)杂交:将变性后的探针滴于玻片杂交区,加盖盖玻片,封胶,在封闭的湿盒中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜杂交。(4)洗涤:将杂交后的玻片置于变性液中洗涤,洗脱未特异杂交的探针,再用 70%乙醇溶液中固定。(5)镜检:将洗涤后的玻片经 DAPI 复染剂染色,在荧光显微镜下镜检。(6)结果判读:镜下进行细胞计数。每个杂交区至少计数 50 个信号强且无重叠的杂交细胞。如果超过 90%的细胞显示非整倍信号,则判断为非整倍体;如果 10%~60%的细胞显示非整倍体信号,则可能为嵌合体;如果信号差无法确定则加大细胞计数至 100 个。所有标本均在盲法设计下,与染色体核型分析比较。

1.2.5 CMA 检测 应用 Affymetrix 公司的 CytoScan HD 全基因芯片扫描技术检测全基因组拷贝数变异(CNVs)。标本依次进行 PCR 扩增、提纯、定量、片段化处理,再将 DNA 溶液标记后加入杂交试剂孵育,载入到芯片中进行杂交反应;洗染芯片后用 Affymetrix GeneChip Scanner 扫描分析,通过 AGCC 软件芯片图像显示分析生成原始 cel 文件,并利用 CHAS 软件分析结果^[5]。检测到的 CNVs 与基因组数据 (GRCh37/hg19) 进行比对,借助于 UCSC、DECIPHER、ISCA CNVs 多态性数据库、既往文献及在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM),对其临床意义进行

系统的评估和判断,并按照人类细胞基因组学国际命名体系标准(ISCN2020)进行结果描述。

2 结果

2.1 NIPT 高风险产前诊断、胎盘检测结果 16 例 NIPT 高风险且采集到胎盘的研究标本包含 21-三体高风险 13 例,经产前诊断后 12 例与 NIPT 结果一致,引产后对胎盘组织进行 FISH/CMA 检测,结果与 NIPT 一致。1 例产前诊断后胎儿染色体核型未见异常(标本 1),与 NIPT 检测结果不一致;NIPT 提示 18-三体高风险 2 例,经产前诊断及胎盘检测后均与 NIPT 结果一致;NIPT 提示 6 号染色体三体高风险 1 例(标本 2),抽取羊水进行 CMA 产前诊断后结果提示胎儿 16 号染色体存在部分缺失:arr[GRCh37]16p13.11(14892975_16528123)×1,与 NIPT 检测结果不一致,该区域覆盖了 16p13.11 微缺失综合征的全部区域。

经统计,NIPT 结果与产前诊断结果的一致率为 87.5%(14/16),与胎盘检测结果的一致率为 93.8%(15/16)。其中 NIPT 提示 21-三体高风险与产前诊断结果的一致率为 92.3%(12/13),与胎盘检测结果的一致率为 100.0%(13/13);NIPT 提示 18-三体高风险与产前诊断结果的一致率为 100.0%(2/2),与胎盘检测的一致率为 100.0%(2/2);NIPT 提示 6 号染色体三体高风险与产前诊断检测、胎盘检测结果均存在偏差。

2.2 2 例 NIPT 假阳性标本胎盘检测及孕期回顾性分析 2 例标本 NIPT 假阳性标本,分别在生育或引产后取胎盘组织进行 CMA 检测。其中,标本 1 孕妇(24 岁)NIPT 提示 21-三体高风险,孕期经羊水核型分析检测胎儿核型未见异常(46,XN)。足月分娩后,胎盘多点 CMA 检测存在不同比例的嵌合,胎盘边缘区域检测结果为 arr(21)×3[0.4];胎盘中央近胎儿面为 arr(21)×3[0.33];胎盘近脐带根部母体面为 arr(21)×3[0.25]。对其孕期情况进行回顾分析,该孕妇孕期平顺,超声影像学检测胎儿生长发育未见明显异常。足月择期子宫下段剖宫产术终止妊娠,产一男婴,新生儿出生体质量 3.2 kg,外观无明显畸形。

标本 2 孕妇(32 岁)NIPT 提示 6 号染色体三体高风险,经羊水 CMA 基因芯片检测后提示胎儿 16 号染色体存在部分缺失:arr[GRCh37]16p13.11(14892975_16528123)×1。引产后留取胎盘组织经 CMA 检测后提示存在 6 号染色体三体嵌合与 16p13.11 区域部分缺失,其中胎盘边缘区为 arr(6)×3[0.25];胎盘中央近胎儿面区为 arr[GRCh37](6)×3[0.52],16p13.11(14892975_16528123)×1;胎盘近脐带根部母体面为 arr(6)×3[0.4]。对其孕期情况进行回顾,孕早期胎儿颈项透明层(NT)超声检测未

见异常,但孕中期出现胎儿宫内生长受限,影像学检查提示胎儿双顶径头围相当于 25⁺⁵ 周,腹围相当于 24 周,股骨、肱骨相当于 22⁺⁵ 周,23⁺³ 周时,股骨肱骨<2s,双侧肾盂分离,分别为左侧宽 0.53 cm、右侧宽 0.51 cm(图 1)。引产后,胎儿外观无其他明显畸形。孕妇及其配偶进行外周血 CMA 分析,未见异常。



图 1 标本 2 胎儿双肾超声横切面图

3 讨论

NIPT 技术自开展以来在全世界范围内得到了广泛的使用,尽管得到了很高的认可,但是它仍然是一项筛查技术,还不能完全取代产前诊断技术。影响 NIPT 结果的原因主要来源于母体因素或者胎儿因素,母体因素包括母体本身染色体异常、恶性肿瘤、移植男性器官、组织,胎儿因素包括 cffDNA 偏低、胎盘嵌合体及双胎之一消失^[1]。由于 NIPT 技术主要检测的是母体血浆中 cffDNA,而 cffDNA 主要来源于胎盘绒毛外层凋亡的滋养层细胞,进入母亲外周血液循环,因此胎盘嵌体会直接影响 NIPT 结果。

在 CPM 中胎盘多同时存在两种或多种细胞系,其染色体核型与胎儿存在差异,此时胎儿染色体核型大多正常,这种情况就会导致 NIPT 假阳性^[1,6]。GRATI 等^[7]对 52 673 例 CVS 标本的回顾性分析发现,在不同胎盘嵌合类型中都会存在一定比例的 13-三体、18-三体和 21-三体。随着大家研究的深入,CPM 对 NIPT 检测影响的病例陆续增加。谢润桂等^[8]对 86 例 NIPT 假阳性病例进行母血和胎盘的检测,得出胎盘和母血中异常的游离 DNA 释放是 NIPT 假阳性的主要原因。高雅等^[9]报道了 1 例由于 21-三体 CPM 造成的 NIPT 假阳性,同时指出羊水穿刺过程中胎盘或胎盘滋养层细胞污染可能引起产前诊断的假阳性。李萌萌等^[10]也报道 1 例由于胎盘存在 2-三体、7-三体及 21-三体嵌合引起 NIPT 假阳性的案例,该孕妇在 28 周时出现胎儿宫内生长发育迟缓,孕妇本人于 37 周出现子痫的表现。本研究通过对羊水细胞和胎盘组织的检测,发现 NIPT 结果与产前诊断的一致率为 87.5%,但是与胎盘检测结果的一致率可达 93.8%。其中 NIPT 提示的 21-三体的高风险与产前诊断结果的一致率为 92.3%(12/13),胎盘检测

与 NIPT 结果的一致率为 100.0%(13/13);18-三体的产前诊断与 NIPT 结果的一致率为 100.0%(2/2),胎盘检测与 NIPT 结果的一致率为 100.0%(2/2);6 号染色体三体的产前诊断检测、胎盘检测与 NIPT 结果均存在偏差。

本研究有 2 例 NIPT 假阳性标本。其中标本 1 NIPT 提示 21-三体高风险,产前诊断后胎儿染色体核型未见异常。该孕妇孕期平顺,超声影像学检测胎儿生长发育未见明显异常。后足月择期子宫下段剖宫产术终止妊娠,产一男婴,新生儿出生体质量 3.2 kg,外观无明显畸形。胎儿出生后多点胎盘检测后存在不同比例的 21-三体嵌合。标本 2 NIPT 提示 6 号染色体三体高风险,抽取羊水进行 CMA 产前诊断,提示胎儿存在 16p13.11 部分缺失。已报道携带有相同片段缺失的患者主要表现包括中度/重度智力障碍、癫痫、发育迟缓、前脑无裂畸形、小头畸形、特殊面容、拇指外翻等^[11]。本例受检者在孕中期出现胎儿宫内生长受限,影像学检查提示胎儿双顶径头围相当于 25⁺周,腹围相当于 24 周,股骨、肱骨相当于 22⁺周,23⁺周时,股骨肱骨<2s,双侧肾盂分离,分别为左侧宽 0.53 cm、右侧宽 0.51 cm。孕妇充分知情,被告之后选择引产,引产后取胎盘组织进行 CMA 检测,结果提示 6 号染色体三体嵌合与 16p13.11 存在 1.36M 部分缺失。2 例经产前诊断结果显示 NIPT 假阳性,胎儿染色体核型和胎盘结果不一致。标本 2 孕妇的胎盘多点标本 CMA 检测为 6 号染色体三体与 16 号染色体微缺失的嵌合,与胎儿的染色体核型结果不一致,证实本例孕妇胎盘存在 CPM。该孕妇在孕 25 周出现胎儿生长受限,推测是 CPM 导致的^[12-14]。标本 1 孕妇胎儿孕期生长发育良好,可能是由于胎盘中异常细胞比例较低,对胎儿血液供应影响较小所致。进一步说明 CPM 是引起 NIPT 结果与产前诊断结果不一致的重要原因,因此对于 NIPT 高风险的孕妇建议通过侵入性诊断来进一步明确诊断,不能单纯基于 NIPT 结果来决定终止妊娠。

综上所述,由于 NIPT 检测存在假阳性及假阴性等局限性,对于高风险的孕妇需进行产前诊断以明确诊断。对于检测结果高度提示为 CPM 的孕妇,妊娠期应加强对胎儿在宫内发育情况的监测,当出现胎儿生长受限时,对脐动脉血流及大脑中动脉血流进行检测,并在后续分娩时留取胎盘标本,以明确胎盘染色体核型的诊断。

参考文献

[1] 张红云,符美丽,王威. 染色体非整倍体无创产前基因检

测假阳性假阴性生物学原因分析[J/CD]. 中国产前诊断杂志(电子版),2017,9(3):53-63.

[2] LEDBETTER D H,ZACHARY J M,SIMPSON J L,et al. Cytogenetic results from the U. S. Collaborative Study on CVS[J]. Prenat Diagn,2010,12(5):317-345.

[3] LOUISE W H,BRADLEY Q,MORTON C C. Confined placental mosaicism as a risk factor among newborns with fetal growth restriction[J]. Prenat Diagn,2010,26(5):428-432.

[4] 周希亚,戚庆伟,郝娜,等. 限制性胎盘嵌合体对产前诊断的影响[J]. 生殖医学杂志,2015,24(3):171-176.

[5] 王杰,郭志远,冀云鹏,等. 母体 X 染色体异常对无创产前 DNA 性染色体非整倍检测结果的影响分析[J]. 中国生育健康杂志,2018,29(6):533-535.

[6] GRATI F R,FERREIRA J,BENN P,et al. Outcomes in Pregnancies with a confined placental mosaicism and implications for prenatal screening using cell-free DNA[J]. Genet Med,2020,22(2):309-316.

[7] GRATI F R,FRANCESCA M,FERREIRA J C,et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results[J]. Genet Med,2014,16(8):620-624.

[8] 谢润桂,何怡,魏顺娣,等. 86 例无创 DNA 产前检测假阳性病例原因分析[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(21):2671-2673.

[9] 高雅,姚宏,苏凤侠,等. 胎盘限制性嵌合导致母血 cfDNA 检测假阳性一例[J]. 中华医学遗传学杂志,2020,37(6):627-628.

[10] 李萌萌,蒋宇林,戚庆伟,等. 孕妇外周血游离 DNA 产前筛查提示限制性胎盘嵌合一例[J]. 中华妇产科杂志,2020,55(2):136-137.

[11] TAN L,BI B,ZHAO P,et al. Severe congenital microcephaly with 16p13.11 microdeletion combined with NDE1 mutation,a case report and literature review[J]. BMC Medical Genetics,2017,18(1):141-145.

[12] WOLSTENHOLME J,ROONEY D E,DAVISON E V. Confined placental mosaicism,IUGR, and adverse pregnancy outcome:a controlled retrospective U. K. collaborative survey[J]. Prenat Diagn,2010,14(5):345-361.

[13] AMOR D J,WEE THONG N,ELIZABETH W,et al. Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism[J]. Prenat Diagn,2010,26(5):443-448.

[14] QI Y,YANG J,HOU Y,et al. The significance of trisomy 7 mosaicism in noninvasive prenatal screening[J]. Hum Genomics,2019,13(1):18-22.

(收稿日期:2020-12-29 修回日期:2021-08-13)