

高通量基因测序在胎儿性染色体非整倍体产前检测中的应用价值

郑芳秀,周琴,陈英革,张晓青,张 玟,黄瑞萍,缪婷婷,蒋 健

(南京医科大学附属常州妇幼保健院,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:探讨应用高通量基因测序检测胎儿性染色体非整倍体的可行性。方法:选择 2012 年 5 月—2015 年 5 月在常州市妇幼保健院产前诊断中心就诊的 3 218 例单胎孕妇,在知情同意的原则下抽取孕妇外周血,提取血浆中胎儿游离 DNA,制备文库,采用 Illumina NextSeq CN500 测序平台对其进行测序分析,对测序提示的性染色体异常患者行羊膜腔穿刺,羊水细胞培养后染色体 G 显带核型分析。结果:3 218 例样本中,高通量基因测序提示 16 例性染色体非整倍体。经知情同意,12 例孕妇自愿接受羊水产前诊断,其中 8 例羊水 G 带核型结果与测序结果一致。包括 3 例 45,X;3 例 47,XXX;2 例 47,XXY;其余 4 例 G 带核型正常。结论:高通量基因测序可用于胎儿性染色体非整倍体的产前检测,但还需改进测序方案,积累临床数据,提高效果。

[关键词] 高通量测序;性染色体非整倍体;无创产前检测

[中图分类号] R714.15

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2015)12-1796-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20151233

出生缺陷已成为影响儿童健康和出生人口素质的重大公共卫生问题。染色体非整倍体异常是最为严重的出生缺陷之一^[1],其中最为常见的是 21 三体综合征(T21)、18 三体综合征(T18)、13 三体综合征(T13)和性染色体异常。近年来,随着分子生物学的飞速发展,基于高通量基因测序技术的无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)已广泛应用于胎儿染色体非整倍体异常的产前检查,其对 T21、T18 和 T13 检测的准确率分别高达 99.4%、97.4%和 92.5%,假阳性率分别为 0.2%、0.5%和 0.8%^[2]。然而,该技术在性染色体异常产前检测的研究较少。本研究采用高通量测序技术检测孕妇外周血中胎儿游离 DNA,结果提示性染色体异常的孕妇再行羊水核型分析,以探讨高通量基因测序用于胎儿性染色体非整倍体检测的可行性。

1 对象和方法

1.1 对象

2012 年 5 月—2015 年 5 月,在常州市妇幼保健院产前诊断中心就诊,经知情同意自愿选择 NIPT 的 3 218 例单胎孕妇,孕龄 15~26 周,年龄 16~49 岁。NIPT 指征如下:血清学筛查高风险(即 T21 风险值 $\geq 1/300$,T18 风险值 $\geq 1/350$)、血清学筛查临界风险(即 $1/1\ 000 \leq T21$ 风险值 $< 1/300$, $1/1000 \leq T18$ 风险值 $< 1/350$)、高龄(预产期年龄 ≥ 35 岁)、超声提示胎儿结构异常、超声软指标异常、染色体非整倍

体生育史及部分自行要求行 NIPT 检测的孕妇。

1.2 方法

1.2.1 无创基因检测

孕妇知情同意后,使用北京 Streck 公司生产的 cell-free DNA BCT 采血管抽取孕妇外周血 10 mL,室温保存,48 h 内分离血浆,4℃条件下 1 600 g 离心 10 min,取上清血浆 16 000 g 离心 10 min,分离上清血浆至 EP 管中,得到至少 1.2 mL 血浆。提取血浆中胎儿游离 DNA,构建文库。采用 Illumina NextSeq CN500 测序平台对其进行测序,获得不低于 400 M 的有效 reads 数,平均每个样本不低于 4 M 的 reads。运行序列比对软件 BWA map 将测序所得序列比对至人类基因组参考序列图谱。使用自有软件 BGD v2.0.1 针对比对结果进行每条染色体序列个数统计。计算每条染色体 reads 所占比例(%chrN),sample 代表需检测的样品,mean%ChrNreference 和 S.D.% ChrNreference 分别代表参照样品种平均值和变异系数,并利用以下公式计算各个染色体 Z 值。利用 Z 值来评估样本的实际患病情况(cutoff:|Z|=3)。

$$\text{chrN Z-score for test sample} = \frac{\%chrN_{\text{sample}} - \text{mean}\%chrN_{\text{reference}}}{\text{S.D.}\%chrN_{\text{reference}}}$$

1.2.2 羊水细胞培养和核型分析

对无创基因测序提示性染色体非整倍体异常患者,进行产前遗传咨询,经知情同意后于孕 18~22 周在超声引导下羊膜腔穿刺术,细胞培养、制片、阅片过程均按本实验室常规操作进行^[3]。

2 结果

2.1 无创基因和羊水细胞核型分析结果

3 218 例样本中,NIPT 提示共有 16 例性染色体非整倍体异常。包括 9 例 45,X;3 例 47,XXX;4 例 47,XXY。经产前遗传咨询,12 例孕妇自愿接受羊膜腔穿刺术,经羊水细胞培养 G 显带染色体核型分析,发现 8 例核型结果与 NIPT 结果一致,包括 3 例 45,X;3 例 47,XXX;2 例 47,XXY。4 例样本出现 NIPT 假阳性,NIPT 提示 3 例 45,X 和 1 例 47,XXY,而羊水染色体核型分析均为正常核型(表 1)。

虽经充分产前咨询,仍有 3 例孕妇(2 例 45,X

和 1 例 47,XXY)拒绝羊膜腔穿刺,胎儿出生后,电话随访家长诉胎儿并无异常,未对胎儿进行染色体核型分析。另 1 例孕妇(45,X)因胎儿 B 超提示颈部水囊瘤予引产。

2.2 高通量基因测序应用于性染色体非整倍体产前检查的准确性

3 218 例样本中,经 NIPT 后羊水细胞核型分析确诊 8 例性染色体非整倍体异常孕妇,发生率为 0.25%(8/3 218),应用高通量基因测序技术检测性染色体非整倍体异常的阳性预测值为 66.6%(8/12)。同时,本次研究 12 例 NIPT 提示异常孕妇中,4 例经羊水确诊为假阳性。

表 1 两种方法检测胎儿性染色体异常结果对比

例号	产前诊断指征	NIPT 结果	羊水染色体核型结果
1	血清学筛查 21 三体高风险	45,X	46,XX
2	高龄妊娠	47,XXY	46,XY
3	高龄妊娠	45,X	46,XX
4	血清学筛查 21 三体临界风险	47,XXX	47,XXX
5	血清学筛查 21 三体高风险	45,X	拒绝羊水穿刺
6	血清学筛查 18 三体高风险	45,X	45,X
7	血清学筛查 21 三体高风险	45,X	45,X
8	高龄妊娠	47,XXY	47,XXY
9	高龄妊娠	45,X	颈部水囊瘤引产
10	血清学筛查 21 三体高风险	45,X	拒绝羊水穿刺
11	高龄妊娠	45,X	46,XX
12	高龄妊娠	47,XXX	47,XXX
13	血清学筛查 21 三体高风险	47,XXY	47,XXY
14	血清学筛查 21 三体高风险	47,XXX	47,XXX
15	血清学筛查 21 三体高风险	45,X	45,X
16	高龄妊娠	47,XXY	拒绝羊水穿刺

3 讨论

近年来,国内外诸多报道^[4-8]均已证实 NIPT 对 T21、T18 和 T13 的检出具有较高的准确性和特异性,但该技术用于性染色体非整倍体产前检测的准确性则差别较大。Mazloom 等^[9]报道,NIPT 对 45,X、47,XXX 和 47,XXY 的检出率分别为 83%、85%及 83%。而段红蕾等^[10]对江苏省 13 041 例接受 NIPT 的病例进行回顾性分析,发现 NIPT 对 X 染色体数目异常的阳性预测值为 40.9%(18/44),即一半以上经染色体核型分析证实为假阳性。本研究中,NIPT 提示 16 例性染色体非整倍体异常,除 3 例孕妇拒绝做羊膜腔穿刺,1 例孕妇因胎儿超声示颈部水囊瘤引产外,12 例样本经染色体核型分析验证,8 例与测序结果一致,其余 4 例均为正常核型。3 218 例样本中,性染色体非整倍体的发生率为 0.25%,低于

张月萍等^[11]报道的羊水产前诊断性染色体非整倍体的发生率(0.32%,44/13 795)。可能与本研究样本量较少,且未对检测人群中高龄指征的构成比进行分析有关。而高龄孕妇由于卵子老化,减数分裂时发生染色体不分离的概率升高,不仅胎儿常染色体异常的风险增加,性染色体异常的概率也会随着孕妇年龄的增长逐渐增加。应用 NIPT 检测性染色体非整倍体异常的阳性预测值为 66.67%(8/12),高于国内同类文献^[10]的报道(40.9%),但其检测的准确性仍有待进一步提高。

此外,本研究对 NIPT 提示性染色体非整倍体异常的 12 例样本进行染色体核型分析,发现 45,X 的准确率为 50%(3/6),47,XXX 和 47,XXY 的准确率为 83%(5/6)。可见使用高通量测序作为无创产前诊断技术对性染色体三体检测的准确率高于性染色体单体,可能与该技术本身存在一定的技术劣

势有关,其数据分析部分对算法的依赖太大,给出的是一个统计分析结果,故不能排除小概率事件的发生。上述结果由于样本例数偏少,有待进一步积累病例资料研究分析。

本研究中出现 4 例假阳性,可能与母体因素、胎盘滋养层细胞、性染色体互换等因素有关。而随访过程中,4 例孕妇均拒绝做进一步检测,故无法得知假阳性产生的确切原因。但其中 1 例孕妇因胎儿 B 超提示颈部水囊瘤直接引产,据研究报道^[12]70%胎儿颈部淋巴水囊瘤为 Turner 综合征,另 5%为 T18 综合征、5%为 T21 综合征,约 20%的胎儿染色体核型无异常,推测该例样本进行羊水诊断证实为 45,X 的可能性大。目前本单位获得了国家高通量基因测序 NIPT 临床试点资质,将加大该技术的规范应用,同时也会加强临床应用研究,以得出更科学的临床数据。

[参考文献]

[1] 边旭明. 胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产前检测 [J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(5): 330-333

[2] 郭伟诚, 林惠玲. 无创 DNA 产前检测在筛查胎儿非整倍体染色体病的应用[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(17): 2270-2272

[3] 张晓青, 韩小亚, 孙达成, 等. 常州地区 2005~2009 年孕中期产前筛查结果分析[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(10): 1258-1260

[4] Lau TK, Chen F, Pan X, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by ma-

ternal plasma DNA sequencing [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(8): 1370-1374

[5] Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing[J]. Obstet Gynecol, 2012, 119(5): 890-901

[6] Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 42(1): 15-33

[7] 向萍霞, 刘翎, 冷培, 等. 游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术在产前筛查的临床应用[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(10): 777-780

[8] 马京梅, 潘虹, 付杰, 等. 高危孕妇外周血胎儿游离核酸无创性产前检测的前瞻性研究[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(11): 849-852

[9] Mazloom AR, Džakula Ž, Oeth P, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma [J]. Prenat Diagn, 2013, 33(6): 591-597

[10] 段红蕾, 李洁, 薛源, 等. 江苏省 13041 例无创产前检测的指征及结果分析[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17(12): 813-816

[11] 张月萍, 伍俊萍, 李笑天, 等. 孕中期羊水细胞染色体核型分析及其异常核型发生率的比较[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(9): 644-648

[12] 杜宇辉, 吴松. 经阴道超声诊断胎儿颈部淋巴水囊瘤并全身水肿二例[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(17): 5379

[收稿日期] 2015-05-13

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。