

孕妇外周血游离 DNA 深度测序在胎儿染色体非整倍体无创检测中的应用研究

卢守莲,黄欢,王珏,曹郡,孙丽洲*

(南京医科大学第一附属医院产科产前诊断中心,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**评估孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序在检测胎儿染色体非整倍体异常中的优势。**方法:**通过高通量测序技术检测 1 000 例妊娠 13 周以上孕妇的外周血中胎儿游离 DNA,判断胎儿非整倍体异常,通过传统染色体核型分析及胎儿出生后的临床随访对检测结果进行验证。**结果:**1 000 例标本中 1 例检测失败,其余 999 例中共检出 18 例异常,其中 12 例 21 三体,2 例 18 三体,1 例 13 三体,1 例 X 单体,1 例 X 三体,1 例 XXY。12 例 21 三体阳性病例中,有 1 例为双胎妊娠,核型分析显示一胎正常,一胎为 21 三体;1 例 X 三体经核型分析诊断为正常女性,其余检测结果均与染色体核型分析结果相符,对于 21 三体、18 三体、13 三体和性染色体非整倍体异常的总阳性检测率 94.44%。所有检测结果为阴性者,均进行产后随访新生儿面容、体格发育等情况,未发现有 21 三体、18 三体、13 三体等常见染色体非整倍体异常征象,无假阴性病例。**结论:**孕妇外周血胎儿游离 DNA 高通量测序对于检测胎儿 21 三体、18 三体和 13 三体准确度高,对性染色体非整倍体的检测,本技术检测指标有待进一步提高。

[关键词] 非整倍体;胎儿游离 DNA;无创产前检测;高通量测序

[中图分类号] R446.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-499-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140420

Detection of fetal chromosomal aneuploidies by deep sequencing of cell-free DNA in maternal peripheral blood

Lu Shoulian, Huang Huan, Wang Jue, Cao Jun, Sun Lizhou*

(Center of Prenatal Diagnosis, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore advantages of high-throughput sequencing of cell-free DNA from maternal peripheral blood for detection of chromosomal aneuploidies in prenatal diagnosis. **Methods:** A total of 1 000 maternal peripheral blood samples from gravidas with more than 13 weeks of pregnancy were collected, and the cell-free DNA in the peripheral blood samples were detected using high-throughput sequencing to determine chromosomal aneuploidy. The cases of chromosomal aneuploidies and euploidies were validated by traditional chromosomal karyotype analysis and clinical follow-up of babies after the birth. **Results:** In the analyses of 1 000 cases, one case failed. The results of the remaining 999 cases indicated 18 cases of abnormalities, including 12 cases of trisomy 21, two cases of trisomy 18, one case of trisomy 13, one case of X monomers, one case of trisomy X, one case of XXY. From 12 cases of trisomy 21, there was one case of gemellary pregnancy, and the results of fetal karyotype analysis showed that one fetal was euploid and the other fetal was trisomy 21. One case of trisomy X was validated as euploid by karyotype analysis and the remaining detection results were consistent to those with karyotype analysis. The total positive detection rate of trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13 and sex chromosome aneuploidy was 94.44%. No abnormal signs of chromosome aneuploidies (trisomy 21, trisomy 18 and trisomy 13) were found in follow-up of face and physical development of babies after the birth for all cases with negative results, and there were no false-negative cases. **Conclusion:** High-throughput sequencing of cell-free DNA from maternal peripheral blood has high accuracy for detecting fetal trisomy 21, trisomy 18 and trisomy 13. For sex chromosome aneuploidy detection, measurement indicators in this study should be further improved.

[基金项目] 国家自然科学基金(21305069);江苏省妇幼保健重点学科科研项目(FXK201217);江苏省妇幼保健院青年人才培养项目(FRC201302)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lizhou_sun121@hotmail.com

[Key words] chromosomal aneuploidy; cell-free fetal DNA; noninvasive prenatal detection; high-throughput sequencing

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04): 499-503]

染色体非整倍体异常是较为常见的遗传病^[1-2], 其中 21 三体(trisomy 21, T21)、18 三体(trisomy 18, T18)、13 三体(trisomy 13, T13)及性染色体异常是新生儿常见的染色体非整倍体异常。据文献报道, T21、T18、T13 以及性染色体异常在新生儿的发生率分别为 1/800、1/6 000、1/10 000 和 1/500^[3-5]。现阶段, 对胎儿常见染色体非整倍体异常的筛查最为普遍和有效的方法是早孕期或中孕期筛查^[6-7], 评定胎儿 T21、T18 及 T13 的风险。但即使使用最完备的筛查方案, 对 T21 的检出率最多也只能达到 90%, 同时会有 5% 的假阳性率, 而一般临床上常用的二联或三联筛查方案在筛查阳性率为 5% 时对 T21 的检出率仅能达到 70%~80%^[8-9]。由于筛查阳性的孕妇需要进一步行侵入性产前诊断, 有一定的风险, 诸如流产、术后感染甚至胎儿细胞培养失败等, 总的意外发生率约为 1/300。近几年发展起来的孕妇外周血胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cfDNA) 的检测技术使产前筛查步入更为广阔的发展空间^[10]。通过高通量平行测序技术检测孕妇外周血 cfDNA 片段, 根据信息提示, 评估胎儿罹患染色体异常的可能性。本院从 2011 年 12 月开始尝试对部分有产前诊断指征的高危孕妇进行孕妇外周血 cfDNA 检测, 至 2013 年 6 月共完成 1 000 例, 本文通过分析研究测序所得的孕妇外周血 cfDNA 检测结果, 探讨该技术在产前筛查常见染色体异常中的应用价值。

1 对象和方法

1.1 对象

1 000 例孕妇均为在本院产前诊断中心门诊就诊有侵入性产前诊断指征的高危孕妇, 年龄 20~45 岁, 平均年龄 31.2 岁; 孕周均在 13 周以上, 平均孕周 20² 周; 体重 45~80 kg, 平均体重 59.2 kg。产前诊断指征包括高龄、母血清学筛查高风险或超声检查胎儿有与染色体异常相关的软标志等, 所有孕妇均排除近期有输血、肿瘤等易引起母体自身游离 DNA 增高的可能, 孕妇或其丈夫为染色体平衡易位者不纳入研究范围。所有参与研究的孕妇均在咨询门诊接受了详细的咨询, 对孕妇外周血 cfDNA 检测技术的检测范围、检测适应证及局限性等均充分了解, 并被告知若检测结果阳性需接受侵入性产前诊断, 签署

知情选择同意书。

1.2 方法

1.2.1 孕妇血浆的采集与检测

每例孕妇抽取 10 ml 外周血置于细胞游离 DNA 采血管 (Streck 公司, 美国) 中, 通过新一代 DNA 测序技术对母体外周血浆中的游离 DNA 片段 (包含胎儿游离 DNA) 进行深度测序 (北京贝瑞和康生物技术有限公司临床检验中心), 并将测序结果进行生物信息分析, 从中得到胎儿的遗传信息, 以准确检测胎儿是否患有染色体疾病。具体实验步骤为样本离心分离血浆、提取血浆 DNA、构建测序文库、测序、序列比对等, 最后通过软件分析计算 Z 值, > 3 者为阳性。

1.2.2 染色体核型确诊方法

孕妇外周血 cfDNA 检测阳性者一律进行侵入性产前诊断, 分析胎儿细胞染色体核型, 妊娠孕周在 22 周以内者行羊膜腔穿刺术, 孕周在 22 周以上者行胎儿脐静脉穿刺术。染色体核型分析诊断标准参考 ISCN2005 标准执行。

2 结果

2.1 高通量测序及染色体核型分析结果

1 000 例样本中有 1 例因外周血游离 DNA 含量过低导致无法检测, 其余 999 例均检测成功。在检出的 18 例染色体非整倍体异常病例中, 12 例为 21 三体, 2 例为 18 三体, 1 例为 13 三体, 1 例 X 单体, 1 例 X 三体以及 1 例 XXY。通过有创产前诊断对所有阳性病例均进行胎儿染色体核型分析, 结果显示有 1 例 X 三体为假阳性, 核型分析诊断为正常女性, 其余病例染色体核型均与无创检测结果相符 (表 1)。在检测为 21 三体的病例中, 有 1 例为双胎妊娠, 核型分析显示一胎为整倍体, 一胎为 21 三体。

2.2 灵敏性、特异性、阳性预测值及阴性预测值

所有孕妇外周血 cfDNA 检测阴性者通过产后随访新生儿面容, 体格发育等情况未发现 T21、T18 等常见染色体异常征象, 无漏检病例。在本研究中对 21 三体、18 三体等常染色体异常的孕妇外周血 cfDNA 的检测技术灵敏性、特异性、阳性预测值及阴性预测值均达到了 100%, 对性染色体的检查, 该技术检测指标有待提高 (表 2)。

表 1 18 例 cffDNA 高通量测序及羊水细胞染色体核型分析结果

Table 1 A total of 18 cases results of high-throughput sequencing of cffDNA and karyotype analysis of amniotic fluid cells

样本编号	孕妇年龄(岁)	孕周	诊断指征	cffDNA 结果	核型分析结果
11A1986	29	22 ⁺²	T21 高危	47,XY,+21	47,XY,+21
11A1996	23	28 ⁺⁰	T21 临界风险	45,X0	45,X0
11A1857	45	24 ⁺⁴	高龄	47,,XY,+21	47,XY,+21
12A00849	39	27 ⁺⁴	高龄	47,XY,+21	47,XY,+21
12A01654	43	21 ⁺¹	高龄	47,XX,+21	47,XX,+21
12X03066	25	18 ⁺⁴	T18 高危	47,XY,+18	47,XY,+18
12A04715	37	15	高龄,双胎之一水肿	47,XY,+21	46,XY;47,XY,+21
12X13822	33	19 ⁺¹	T21 高危	47,XY,+21	47,XY,+21
12X26711	27	20	T21 高危	47,XY,+21	47,XY,+21
12X36797	34	19 ⁺²	T21 高危	47,XY,+21	47,XY,+21
12X43663	42	24 ⁺⁵	高龄	47,XY,+21	47,XY,+21
12X49851	28	18 ⁺⁵	T21 临界风险	47,XXX	46,XX
13X06932	34	27 ⁺³	室间隔缺损	47,XX,+21	47,XX,+21
13X06958	31	22 ⁺⁵	T21 临界风险	47,XY,+18	47,XY,+18
13X18602	22	26	超声检查胎儿心脏异常	47,XX,+21	47,XX,+21
13X76830	37	21	超声检查胎儿心脏异常	47,XX,+13	47,XX,+13
13X29237	27	24	T21 高危	47,XXY	47,XXY
13X43243	27	18	T21 高危	47,XX,+21	47,XX,+21

2.3 不同诊断指征样本的阳性检出率

1 000 例检测标本中母血清学筛查高风险者 605 例,共检出 10 例异常,阳性率 1.65%;高龄孕妇 230 例,检出 4 例异常,阳性率 1.74%;因为超声检

查胎儿有与染色体异常相关的软标志而施行诊断者 119 例,其中 1 例高龄孕妇同时合并胎儿水肿,纳入超声异常检查组,检出 4 例异常,阳性率 3.36%;其他指征者 46 例,无异常检出(表 3)。

表 2 孕妇外周血游离 DNA 检测技术对胎儿染色体非整倍体检测的效果评价

Table 2 Evaluating the effect of high-throughput sequencing of cffDNA from maternal peripheral blood for detection of chromosomal aneuploidies (%)

非整倍体类型	灵敏度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
T21	100(12/12)	100(987/987)	100(12/12)	100(987/987)
T18	100(2/2)	100(997/997)	100(2/2)	100(997/997)
T13	100(1/1)	100(998/998)	100(1/1)	100(998/998)
47,XXY	100(1/1)	100(998/998)	100(1/1)	100(998/998)
45,X	100(1/1)	100(998/998)	100(1/1)	100(998/998)
47,XXX	0(0/1)	100(998/998)	0(0/1)	100(998/998)
合计	94.44(17/18)	100(981/981)	94.44(17/18)	100(981/981)

表 3 不同诊断指征样本的阳性检出率对比

Table 3 Comparing positive rates of samples with different diagnostic indications

诊断指征	样本数	阳性数	阳性率(%)
母血清学筛查高风险	605	10	1.65
高龄	230	4	1.74
胎儿超声异常	119	4	3.36
其他	46	0	0.00
合计	1 000	18	1.80

3 讨 论

孕妇外周血游离 DNA 检测技术是对目前临床

上常用的胎儿染色体疾病筛查方案的补充,以其极高的灵敏度和特异性很快得到广泛认可和发展。这项技术最先用于 T21 的检测,很快发展为 T18、T13 及其他染色体异常的检测^[11],最近有学者用这种技术尝试进行胎儿染色体微缺失、微重复及平衡易位的检测也取得了成功^[12-14]。据文献报道这项技术对 T21、T18 及 T13 的检测敏感性在 98%以上,而假阴性率不到 1%,对于性染色体异常的检测准确性相关文献不多,只有一项研究报告检测准确性约为 93%^[15-17]。本研究显示 999 例检测成功的标本中检出的 T21、T18 及 T13 共 15 例,均与传统的核型分

析结果相符,而检测结果正常的孕妇胎儿出生后也未发现漏诊病例,证实这种检测技术对 T21、T18 及 T13 检测的可靠性。

本研究共发现了 3 例性染色体异常,经与传统核型分析对照,2 例异常与本技术检测结果相符,1 例为正常胎儿。文献报道孕妇外周血游离 DNA 检测技术对性染色体异常的检测灵敏度及特异性均不如 T21、T18 等^[18]。很多学者将该技术对于性染色体异常较低的检测效率归结为 CPM。

一般认为在妊娠 8 周后孕妇外周血中胎儿 DNA 含量上升并稳定存在,孕期胎儿 DNA 含量在 5%~50%,孕周越大 DNA 含量越高。孕妇外周血中胎儿 DNA 检测技术要求胎儿 DNA 含量占外周血中总 DNA 的 5%以上,所以当孕妇由于各种原因导致自身游离 DNA 含量增高时孕妇血中胎儿 DNA 含量就相对偏低,这时就会导致检测失败。临床上引起孕妇本人 DNA 增高的常见原因有溶血、肿瘤等,另外也可能与个体差异有关。本研究中,1 000 例检测标本有 1 例由于孕妇外周血中胎儿 DNA 含量过低导致检测结果失败,通过重复抽血仍然检测失败,而孕妇本人并没有常见的易导致 DNA 含量增高的原因存在,所以需要积累资料作更深入的研究。

一般认为孕妇外周血中胎儿 DNA 来源于胎盘部位的滋养细胞,由于胎盘滋养细胞与胎儿均源于同一个受精卵,理论上两者的基因组构成应该一致,故通过胎儿 DNA 信息反映胎儿染色体核型理论上是可行的,这也从本研究中孕妇外周血游离 DNA 检测技术对 T21、T18 极高的灵敏度和特异性中得到了证实。但是大约有 2%的活产胎儿会出现限制性胎盘镶嵌体 (confined placental mosaicism, CPM) 特殊现象,这主要表现为胎盘部位滋养细胞染色体核型异常而胎儿正常,此时孕妇外周血中胎儿游离 DNA 信息会表现为异常,而胎儿染色体核型是正常的,所以通过孕妇外周血游离 DNA 检测技术显示阳性者一律需要接受介入性产前诊断。所以目前本文将该技术定位为一种比传统血清学筛查更为准确的筛查方案而不是诊断手段。至于本研究结果中对 T21 及 T18 高达 100%的灵敏度和特异性则可能与本研究样本量偏少有关。CPM 虽然不会引起胎儿畸形,但由于含异常基因组的胎盘细胞会影响或破坏胎盘功能,胎儿极易发生发育迟缓、死胎或死产,所以当孕妇外周血游离 DNA 检测显示阳性而胎儿正常者一定要加强孕期及分娩期监护,避免不良妊娠结局。

本研究中 1 000 例标本阳性检出率达到 1.8%,远高于正常新生儿染色体异常的发生率,这与本研究选择的检测人群有关,即对象为胎儿罹患染色体异常的高危人群,阳性率符合产前筛查的预期目标。研究显示以超声异常者阳性率最高,这与染色体异常者的临床表现相关,而与本研究的检测方法无关。因此,本检测方法对高龄、母血清学筛查高风险或超声检查胎儿有与染色体异常相关的软标志者均适用,更适用于不适合做产前有创诊断的人群,如孕妇本人携带病毒、胎盘前置、孕囊低置、羊水过少、RH 阴性等特殊孕妇人群。

深度测序是孕妇外周血游离 DNA 检测的技术原理,将外周血中所有游离 DNA 片段通过高通量测序分析基因信息转而反映基因载体染色体的信息。目前该技术展示了临床应用价值,相信随着检测技术的稳定发展,该技术必定会有更多的临床应用。

[参考文献]

- [1] 段程颖,王 玮,陈 璞,等. 自然流产绒毛染色体非整倍体探讨[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(6):855-858
- [2] 张 燕,张 凤,周亚东,等. 自然妊娠和 ART 妊娠早期流产绒毛细胞遗传学检查的临床应用价值[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,32(7):937-941
- [3] Jiang F, Ren J, Chen F, et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies[J]. BMC Med Genomics, 2012, 5(1): 57
- [4] Witters I, Fryns JP. Prenatal diagnosis of trisomy 21: registration results from a single genetic center [J]. Genet Couns, 2008, 19(2): 157-163
- [5] Ong S, Tonks A, Woodward ER, et al. An epidemiological study of holoprosencephaly from a regional congenital anomaly register: 1995-2004 [J]. Prenat Diagn, 2007, 27(4): 340-347
- [6] 蒋 涛,孙 云,张晓娟,等. 南京地区孕早期产前筛查指标中位数建立和临床意义探讨[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(1): 71-75
- [7] 王 铮,桂俊豪,杨 柳,等. 唐氏筛查在孕妇产前诊断中的必要性研究 [J]. 检验医学与临床,2012,9(19): 2434-2435
- [8] Nicolaidis KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks[J]. Prenat Diagn, 2011, 31(1): 7-15
- [9] ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities [J]. Obstet Gynecol, 2007, 109(1): 217-227
- [10] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of mas-

- sively 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] Chen EZ,Chiu RW,Sun H,et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing [J]. *PLoS One*,2011,6 (7): e21791
- [12] Jensen TJ,Dzakula Z,Deciu C,et al. Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma [J]. *Clin Chem*,2012,58 (7):1148-1151
- [13] Yu SC,Jiang P,Choy KW,et al. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma [J]. *PLoS One*,2013,8(4):e60968
- [14] Papageorgiou EA,Patsalis PC. Maternal plasma sequencing:a powerful tool towards fetal whole genome recovery [J]. *BMC Med*,2013,11(1):56
- [15] 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(3):c7401
- [16] Palomaki GE,Deciu 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
- [17] Canick JA,Kloza EM,Lambert-Messerlian GM,et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations [J]. *Prenat Diagn*,2012,32(8):730-734
- [18] 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
- [收稿日期] 2013-10-09

(上接第 485 页)

- ma cholesterol esterification and transfer,the menopause, and hormone replacement therapy in women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,1999,84(10):3534-3538
- [6] Zhang C,Zhuang Y,Qiang H,et al. Relationship between endogenous estrogen concentrations and serum cholesteryl ester transfer protein concentrations in Chinese women [J]. *Clin Chim Acta*,2001,314(1-2):77-83
- [7] Li ZQ,Hailemariam TK. Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization [J]. *Biochim Biophys Acta*,2007,(1771):1186-1194
- [8] Hojjati M,Li ZQ,Zhou HW,et al. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. *J Biol Chem*,2005,280(11): 10284-10289
- [9] Li ZQ,Basterr MJ,Hailemariam TK,et al. The effect of dietary sphingolipids on plasma sphingomyelin metabolism and atherosclerosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005,1735(2):130-134
- [10] Funder JW. Aldosterone,hypertension and heart failure: insights from clinical trials [J]. *Hypertens Res*,2010,33 (9):872-875
- [11] Ghosh RK,Ghosh SM. Current status of CETP inhibitors in the treatment of hyperlipidemia:an update [J]. *Curr Clin Pharmacol*,2012,7(2):102-110
- [12] Hooper AJ,Burnett JR. Anacetrapib,a cholesteryl ester transfer protein inhibitor[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012,21(1):103-109
- [收稿日期] 2013-11-13