

· 临床研究 ·

# CNV-seq技术在自然流产遗传学诊断中的应用

倪蓉, 梁健, 赵超, 吕述彦

淮安市第一人民医院生殖健康与不孕症科, 江苏 淮安 223300

**[摘要]** 目的:探讨低深度全基因组拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)技术在流产物遗传学分析及诊断中的应用。方法:收集2016年1月—2018年12月在淮安市第一人民医院就诊的流产组织样本112例,采用二代测序技术对流产物样本进行全基因组测序,利用生物信息学方法分析流产样本可能存在的染色体异常。结果:①在112例流产样本中,染色体结果异常共56例(50.0%, 56/112),出现异常信号频率高的分别是16三体(27.1%)、45,X(24.3%)、13三体(10.8%)、18三体(10.8%)。在56例染色体异常结果中,染色体数目异常37例(66.1%),染色体结构异常12例(21.4%),嵌合体7例(12.5%)。在12例染色体结构异常中,共发现24个基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV),最小片段长度0.24 Mb,最大片段58.90 Mb。在检测出的24个CNV中,18个CNV有临床意义。其中2个包含微缺失/微重复综合征。②患者年龄 $\geq 35$ 岁发生染色体异常导致的流产者占63.2%,年龄 $< 35$ 岁发生染色体异常导致的流产者占47.3%, $\geq 35$ 岁组的异常率比 $< 35$ 岁组高15.9%。结论:CNV-seq技术不但能够高效检测出非整倍体和嵌合体,还能高效检测出小片段的缺失和重复,大大提高了染色体异常的检出率,可为流产病因分析及夫妻双方再次生育提供更有价值的信息。

**[关键词]** CNV-seq; 自然流产; 染色体核型分析**[中图分类号]** R714.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)03-424-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20210321

自然流产是怀孕最常见的并发症<sup>[1]</sup>,在临床妊娠中自然流产占10%~20%<sup>[2-3]</sup>,流行病学证据表明,遗传因素在流产的发病机制中起着重要作用<sup>[4]</sup>。研究表明,50%~60%孕早期流产是由胚胎染色体异常引起,且孕中期妊娠流产中仍有30%是由胚胎染色体异常引起<sup>[5-6]</sup>。近年来,随着二代测序技术的发展,其在检测流产组织的非整倍体和拷贝数变异中具有非常高的灵敏度和特异度<sup>[7-8]</sup>,为流产物的检测提供了一种快捷、准确、高成功率的检测手段。本研究以低深度全基因组拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)技术对112例流产物样本进行检测,对部分流产物结果异常的夫妻双方行外周血染色体核型分析检测,以探讨CNV-seq技术在胚胎组织遗传学诊断中的应用价值,以期为夫妻双方再次生育提供遗传风险评估和指导。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取2016年1月—2018年12月在淮安市第一人民医院就诊的自然流产患者112例,对其流产物进行全基因组测序,检测均获患者及家属知情同意

并签署知情同意书。孕妇年龄20~45岁,根据孕妇年龄分为 $\geq 35$ 岁和 $< 35$ 岁组。对于流产物染色体异常患者,征求夫妻双方同意行外周血染色体核型检测。本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样本采集及DNA提取

留取清宫术后绒毛组织,经无菌生理盐水冲洗至无血水后,将组织样本剪碎,选取3~5 mg放置离心管内,加入180  $\mu$ L Buffer ATL及20  $\mu$ L Proteinase K,漩涡混匀,放入56  $^{\circ}$ C水浴锅中消化过夜。采用天根DNA提取试剂盒提取全基因组DNA,终浓度20 ng/ $\mu$ L。

#### 1.2.2 高通量测序分析

DNA文库构建及荧光定量PCR分析后,用NextSeq CN500机器对样品DNA进行全基因组测序(0.1X),测序数据与已知人类参考基因组(hg19)序列比较分析,得到匹配序列,计算待测样本的拷贝数,根据检测值判断对应染色体检测区域的检测结果。将样本检测发现的基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV)与人类染色体变异数据库(database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensemble resources, DECIPHER)、基因

变异数据库(database of genomic variants, DGV)以及在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIN)进行比对,分析CNV的临床意义。此外利用STR技术对流产物母本外周血及流产组织进行STR分析,排除母源污染和三倍体及多倍体的倍性分析。

## 2 结果

在112例流产样本中,染色体结果异常共56例(50.0%,56/112)。在56例染色体异常结果中,染色体数目异常37例(66.1%),染色体结构异常12例(21.4%),嵌合体7例(12.5%)。

### 2.1 染色体数目异常

出现异常信号频率高的分别是16三体(27.1%)、45,X(24.3%)、13三体(10.8%)、18三体(10.8%)(表1)。

### 2.2 染色体结构异常

112例流产物样本中共检测出染色体结构异常12例,共发现24个CNV,最小片段长度0.24 Mb,最大片段58.90 Mb。在检测出的24个CNV中,18个CNV有临床意义。在检测出的致病性CNV中,发现2个包含微缺失\微重复综合征,即Cridu chatsyn-drome综合征和Wolf-Hirschhorn Syndrome综合征,其中Wolf-Hirschhorn Syndrome综合征还伴有12、20号染色体部分区域重复(表2),经该夫妻双方知情同意后行外周血染色体检测,女方为平衡易位携带者[46,XX,t(4;12;20),图1]。12例流产物染色体结构异常患者,其中4例夫妻双方行外周血染色

表1 染色体数目异常检出情况

异常类型	例数	百分比 (%)	异常类型	例数	百分比 (%)
16三体	10	27.1	7三体	1	2.7
45,X	9	24.3	12三体	1	2.7
13三体	4	10.8	14三体	1	2.7
18三体	4	10.8	15三体	1	2.7
2三体	2	5.4	21三体	1	2.7
20三体	2	5.4	合计	37	100.0
22三体	1	2.7			

体检测,除上述1例女方为平衡易位携带者外,其余3例夫妻双方外周血染色体检测结果均正常。

### 2.3 嵌合体

112例流产物样本中,共检测出7例嵌合体,其中1例为70,XNN,+2[60%]/69,XNN[40%],为3倍体嵌合体(表3)。

### 2.4 年龄因素

患者年龄≥35岁发生染色体异常导致的流产者占63.2%,年龄<35岁发生染色体异常导致的流产者占47.3%,虽然二者在统计学上无显著差异,但≥35岁组的异常率比<35岁组高15.9%(表4)。

## 3 讨论

CNV-seq基于二代测序技术对样本DNA进行全基因组测序(0.1X),测序结果与人类参考基因组进行比对,通过生物信息学分析以发现受检样本可能存在的染色体相关异常。染色体核型技术可以准确检测出自然流产或者胎儿的染色体数目或结

表2 染色体结构异常检出情况

异常类型	年龄	片段大小(Mb)	有无临床意义
*46,XN,del(4)(p16.3-p15.32),dup(12)(p13.31-p11.22),dup(20)(q13.12-q13.33)	26	15.64、21.74、17.28	有
*46,XN,del(5)p(15.33p13.3),dup(5)p(13.3p13.2)	33	33.56、2.38	有
46,XN,dup(16)(p13.3q21)(q21q24.3)	39	58.90、23.88	有
*46,XN,del(14)(q32.13q32.33)	33	11.34	有
46,XN,del(15)(q25.2)	30	1.78	有
*46,XN,del(4)(q32.2q32.3)(mos),del(4)(q32.3q35.2),dup(12)(q24.12q24.33)(mos),dup(16)(q21q24.3)(mos)	26	5.54、21.44、22.08、27.96	有
46,XN,del(8)(p23.3p23.2),dup(8)(p23.2),dup(8)(p23.2p23.1)	28	2.56、1.56、2.24	有
46,XN,del(X)(q23),dup(X)(q26.3)	30	0.23、0.38	有
46,XN,del(18)(p11.22p11.21)	33	1.08	无
dup(X)(p11.3p11.23),dup(11)(p11.12)	29	0.64、0.52	无
46,XN,dup(3)(q22.1),dup(8)(q24.23)	24	0.24、0.64	无
46,XN,dup(7)(q34)	28	0.36	无

\*:为夫妻双方行外周血染色体检测。

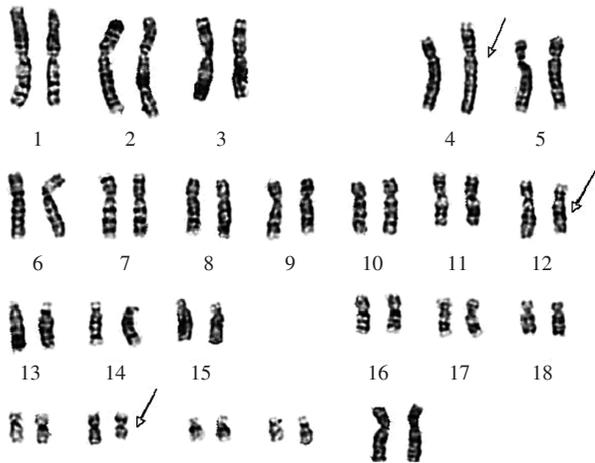


图1 1例典型复发流产孕妇外周血染色体核型分析结果提示46,XX,t(4;12;20)

表3 嵌合体异常类型检出情况

异常类型	例数	比例(%)
46,XY/46,XX	2	28.5
47,XN,+13[30%]/46,XN[70%]	1	14.3
47,XN,+2[50%]/46,XN[50%]	1	14.3
47,XN,+4[30%]/46,XN[70%]	1	14.3
47,XN,+6[40%]/46,XN[60%]	1	14.3
70,XNN,+2[60%]/69,XNN[40%]	1	14.3
合计	7	100.0

表4 不同年龄组染色体异常情况 [n(%)]

分组	正常	异常
≥35岁(n=19)	7(36.8)	12(63.2)
<35岁(n=93)	49(52.7)	44(47.3)

$\chi^2=1.01, P=0.31$ 。

构异常,是产前诊断的“金标准”<sup>[9]</sup>。但染色体核型需要培养绒毛细胞,制片及分析核型时间较长,失败率高。CNV-seq则弥补了上述缺陷:①检测效果好,相比核型分析,其分辨率可达到100 kb,能发现更多的致病性CNV;②报告周期短,10 d即可出报告;③操作方便简单,4 h即可完成多样本检测,因不需要培养绒毛细胞,直接获取绒毛或胎儿组织提取DNA进行测序,成功率高。但该技术也存在弊端,例如CNV-seq技术无法发现染色体相互易位、倒位等染色体平衡性结构重排,也无法对包括单亲二倍体(uniparental disomy, UPD)在内的杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)进行检测。

胚胎染色体异常作为自然流产的主要原因,占自然流产的50%~60%<sup>[10]</sup>,其遗传变异符合生命进化演变的基本特征。从细胞遗传学水平看,DNA的变异主要包括染色体数目的变异和染色体结构的变

异。数目变异包括染色体组成倍地增加或减少,以及单条染色体的增加或减少;结构变异主要指染色体片段的重复、缺失、倒位和易位等。本研究中,112例流产物样本均培养成功,共发现染色体异常数56例,其中非整倍体37例(66.1%),出现异常信号频率高的分别是16三体(27.1%)、45,X(24.3%)、13三体(10.8%)、18三体(10.8%),可见染色体数目异常是流产的主要原因。此外,未检测到1号和19号染色体三体,这与文献报道相符<sup>[11-12]</sup>。因1号染色体占人类基因组全长的8%,19号染色体具有较高的G+C含量、高重排率和高复制率的特点,两条染色体若发生非整倍体异常,在妊娠初期(4周内)即可导致胚胎死亡,许多患者会认为是正常月经,并不会引起重视。

染色体结构变异也是自然流产的重要因素<sup>[13]</sup>,本研究共检测出染色体结构异常12例(10.7%),高于以往研究(6%),究其原因可能是传统核型分析分辨率低及CNV-seq技术成功率、分辨率高,能发现更多CNV。在12例结构异常中共发现24个CNV,最小片段长度0.24 Mb,最大片段58.90 Mb,涉及大量功能基因。在检测出的24个CNV中,18个CNV有临床意义,这些致病性的CNV将导致胚胎/胎儿严重发育迟缓、宫内发育迟缓、多发畸形、心脏异常等。本研究发现1例Wolf-Hirschhorn Syndrome综合征,此外还伴随12、20号染色体部分区域重复,该综合征患者主要临床表征为智力障碍,小头畸形,肌张力减退,癫痫,宫内或出生后生长发育迟缓,小于胎龄儿,典型的“希腊头盔”面容<sup>[14]</sup>。该夫妻双方行外周血染色体检测,女方为平衡易位携带者[46,XX,t(4;12;20)],建议其再生育时进行植入前遗传病诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)。此外还发现1例Cridu chatsyndrome综合征,该综合征患者主要临床表征有哭声小且似猫叫,特殊面容,小头畸形,精神发育异常和生长发育迟缓等<sup>[15]</sup>,夫妻双方未行进一步检查,已生育一健康胎儿,考虑新发可能性大。染色体微缺失/微重复综合征胚胎致死性虽不如染色体数目异常,仅在临床表型严重的情况下才会致死,这主要受遗传外显率和表现度的影响,CNV-seq技术可以快速、高效地检测出染色体结构异常导致的流产,并通过对夫妻双方外周血染色体及对应位点的检测,为再次生育进行遗传风险评估。

孕妇年龄为染色体异常的高危因素,随着二孩政策的实施,尤其是高龄孕妇的增多,其卵母细胞

在减数分裂及有丝分裂过程中错误分离和复制的风险增高,发生胚胎染色体异常导致流产的风险增大。本研究显示患者年龄 $\geq 35$ 岁发生染色体异常导致的流产者占63.2%,年龄 $< 35$ 岁发生染色体异常导致的流产者占47.3%,虽然二者在统计学上无显著差异,但 $\geq 35$ 岁组比 $< 35$ 岁组异常率高出15.9%,可见年龄因素至关重要。

综上所述,CNV-seq技术不但能够高效检测出非整倍体和嵌合体,还能高效检测出染色体小片段的缺失和重复,大大提高了染色体异常的检出率,可为流产病因的分析及夫妻双方再次生育提供更有价值的信息。

#### [参考文献]

- [1] YAKUT S, TORU H S, ÇETIN Z, et al. Chromosome abnormalities identified in 457 spontaneous abortions and their histopathological findings [J]. *Turk Patoloji Derg*, 2015, 31(2): 111-118
- [2] 赵艳辉, 庞泓, 高铭, 等. 早期自然流产的遗传因素分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27(1): 55-57
- [3] SHEN J, WU W, GAO C, et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology [J]. *Mol Cytogenet*, 2016, 9: 7
- [4] BAGHERI H, MERCIER E, QIAO Y, et al. Genomic characteristics of miscarriage copy number variants [J]. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21(8): 655-661
- [5] 周丽颖, 余兰, 梁毓, 等. 自然流产遗传病因的高通量测序检测[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(8): 35-36
- [6] 罗岚蓉, 李坚. 自然流产的细胞遗传学研究进展[J]. *中国工程科学*, 2015, 17(6): 65-69
- [7] 龙驭云, 李孝东, 汤欣欣, 等. 基于高通量测序技术的稽留流产绒毛遗传学分析[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(24): 1001-4411
- [8] 钱芳波, 沈晔. 全基因组染色体芯片在流产绒毛及死胎遗传学诊断中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(11): 1586-1592
- [9] 吴庆华, 史惠蓉, 王艳华, 等. FISH快速检测自然流产绒毛染色体非整倍体异常[J]. *实用妇产科杂志*, 2012, 3(28): 215-218
- [10] VAN DEN BERG M M, VAN MAARLE M C, VAN WELY M, et al. Genetics of early miscarriage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(12): 1951-1959
- [11] OLSON H, SHEN Y, AVALLONE J, et al. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy [J]. *Ann Neurol*, 2014, 75(6): 943-958
- [12] 杨岚, 钱芳波, 陆牡丹, 等. 自然流产绒毛染色体畸变率与复发性流产次数的关系探讨[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(8): 1220-1225
- [13] 彭继苹, 袁海明. 染色体微阵列分析技术在2600例流产产物中的应用[J]. *遗传*, 2019, 40(9): 779-788
- [14] 郭莉, 何轶群, 卢建, 等. 产前Wolf-Hirschhorn综合征的临床诊断[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(10): 144-148
- [15] AMATA A O. Difficult airway management and suspected malignant hyperthermia in a child with Cri Du Chat Syndrome [J]. *Saudi J Anaesth*, 2019, 13(1): 81-83

[收稿日期] 2019-10-22