论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1744-04

5 997 例母血胎儿游离 DNA 无创大规模平行测序筛查胎儿染色体数目异常

章 容,徐聚春,许欢欢,胡 斌,董艳玲,胡 华,李俊男,姚 宏 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科,产前诊断中心)

[摘要] **目的** 对比观察母血胎儿游离 DNA 大规模平行测序(massively parallel sequencing, MPS)无创筛查对常见染色体数目异常的检测能力。**方法** 2011 年 6 月至 2012 年 11 月在第三军医大学西南医院产前诊断中心共募集 5 997 例孕妇参与本项研究,年龄 18 ~ 46 岁,孕周 12 ~ 36 周。抽取孕妇静脉血 5 mL,分离胎儿游离 DNA,常规 Barcoding 建库,Illumina GA Ⅱx 测序,测序片段用基于二元假设的 *t* 检验和 L-score 分析。测序提示异常患者进行传统核型分析确认。**结果** 5 997 例患者,母血胎儿游离 DNA MPS 提示染色体异常患者 113 例。提示异常的患者有 89 例做了核型对比分析,21-三体符合率 100%(28/28),18-三体符合率 87.5%(7/8),性染色体异常符合率 33.3%(14/42)。传统唐氏综合征筛查对 21-三体的漏检率为 11.8%(2/17),而 MPS 方法无一漏检。年龄($P=0.261$)和孕周($P=0.309$)对 MPS 的异常检出率没有显著影响。**结论** 无创 MPS 检测对 21-三体筛查的准确性和可信度高,优于传统唐氏综合征筛查方法,适用于 21-三体胎儿的产前初筛,以降低羊水/脐血穿刺有创检测比例。

[关键词] 产前诊断;染色体病;核型;大规模平行测序

[中图法分类号] R596.1;R714.55 [文献标志码] A

Non-invasive screening for chromosome abnormality in fetal free DNAs by massively parallel sequencing: report of 5 997 pregnant mothers

Zhang Rong, Xu Juchun, Xu Huanhuan, Hu Bin, Dong Yanling, Hu Hua, Li Junnan, Yao Hong (Center of Prenatal Diagnostics, Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the detection rate of massively parallel sequencing (MPS)-based screening for chromosome abnormality of fetus free DNAs in their mother's plasma, and provide clinical data for this non-invasive prenatal screening. **Methods** A total of 5 997 pregnant women with an age from 18 to 46 and a gestational age from 12 to 36 weeks who receiving prenatal examination in our center from June 2011 to November 2012 were recruited in this study. Five milliliters of peripheral blood were collected, and then the fetus DNAs were extracted from mother plasma and barcoded. The libraries of each sample were pooled and subjected to Illumina GA Ⅱx analyzer. Short reads were analyzed by binary hypothesized *t* tests and L-score analysis. Positive results of MPS were validated by cordocentesis based karyotyping. **Results** A total of 113 patients were found to be abnormal by MPS. Among them, 89 mothers accepted cordocentesis based karyotyping, and the obtained sensitivity for trisomy 21 and trisomy 18 were 100% (28/28) and 87.5% (7/8), respectively. However, the sensitivity for sex chromosome abnormality was 33.3% (14/42). Routine screening for Down's syndrome showed a false negative ratio of 11.8% (2/17), while MPS had no false ratio. The age ($P=0.261$) and gestational weeks ($P=0.309$) had no significant effect on the detection rates of MPS. **Conclusion** Non-invasive MPS screening is a more reliable detection for trisomy 21 than conventional routine screening for Down's syndrome, and is suitable for large-scale screening for trisomy 21 to reduce the ratio of invasive cordocentesis based karyotyping.

[通信作者] 姚 宏,E-mail: yaohong6319@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130625.1251.009.html(2013-06-25)

[**Key words**] prenatal diagnosis; chromosome abnormality; karyotype; massively parallel sequencing

Corresponding author: Yao Hong, E-mail: yaohong6319@sina.com

中国每年有1 600万新生儿出生,出生缺陷率4%~6%。染色体异常是导致出生缺陷的重要因素,在新生儿中的发生率约为0.6%[1-2]。因此,染色体异常的筛查成为产前诊断的重要内容。目前,羊水/脐血穿刺-核型分析是染色体异常检测的金标准,但其检测有一定技术难度,且为有创操作,因羊水/脐血穿刺导致流产的概率为0.5%~1%[3]。传统基于生化指标和超声流程的无创唐筛方法假阳性率太高,敏感性不够[4]。因此,需要发展高敏感性的产前无创染色体数目检测方法。

1997年Lo等[5]发现妊娠妇女的血浆和血清中含有游离的胎儿DNA,开辟了新的无创产前基因诊断技术领域。过去10年相继发展了多种基于母血中胎儿游离DNA的无创产前诊断检测[6]。2008年兴起的大规模平行测序(massively parallel sequencing, MPS)技术,被证明可以有效检测21-三体[7-8]。为进一步评估MPS对胎儿染色体数目异常的检测能力,我们与深圳华大合作开展了基于母血胎儿游离DNA进行MPS无创筛查的临床研究,迄今已经完成5 997例孕妇的无创筛查,并与传统唐筛和羊水/脐血穿刺-核型分析方法进行了比较。结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2011年6月至2012年11月在第三军医大学西南医院妇产科进行孕期保健的孕妇,对其进行常规方法和无创MPS筛查方法的介绍,经过知情同意、自愿选择接受无创产前MPS基因检测,共募集5 997例。年龄18~46岁,孕12~36周,B超提示单胎、无地中海贫血基因携带者、孕前3个月无输血或骨髓移植记录。本研究严格遵守医学伦理学原则,获得了西南医院伦理委员会的批准。

1.2 样本采集、分离

根据患者知情、自愿原则,行无创产前MPS检测前签署知情同意书;无菌抽取孕妇外周静脉血5 mL,EDTA-K2抗凝,1 600×g离心10 min,上清血浆分离后再次以16 000×g离心10 min。经此二步离心后的血浆冻存于-80 ℃保存,干冰运送至深圳华大基因研究院进行后续MPS检测。

1.3 MPS分析

2 mL母体血浆采用QIAamp DSP DNA blood mini Kit(德国Qiagen公司)提取分离胎儿游离DNA,采用Genomic DNA Library Preparation Kit和Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit(Illumina公司)Barcoding建库,然后经Illumina GAⅡx测序。测序结果经比对、拼接、计算k-mer覆盖度,用基于二元假设的t检验和L-score判断某条染色体是否有拷贝数异常[8]。

1.4 核型验证

无创产前MPS检测提示异常的孕妇,在知情同意原则下进行核型分析验证。如孕周在18~24周,行羊膜腔穿刺术,抽取羊水25 mL;若孕周超过24周,进行脐血穿刺,抽取脐血2 mL。常规行羊水细胞或脐血培养,制片,G显带,计数核型不少于30个分裂相,异常核型计数50个分裂相以上,分析3~5个核型。

1.5 统计学处理

频数分布差异的比较采用χ^2检验,定量指标差异的比较采用t检验。统计学处理采用SPSS 13.0软件。

2 结果

2.1 MPS检测结果

接受无创产前MPS检测的孕妇的临床资料见表1。平均年龄30.4岁,平均孕周19(12~36)周,5 997例孕妇中,有3 349例做了传统的唐筛,2 755例唐筛高风险(82.26%)。未做唐筛的2 648例中,包含1个或多个高危因素的孕妇有1 619例(61.14%)。无创产前MPS检测共提示113例染色体数目异常,其中21-三体36例、18-三体8例、13-三体2例、性染色体异常52例(XXX、XXY、XYY等)、其他染色体异常15例。其中89例同意做羊水/脐血穿刺-核型分析,确认异常核型52例(58.43%),结果见表2。

表1 5 997例无创产前MPS检测孕妇的临床资料

项目	[n(%)]
年龄	
18~24岁	835(13.92)
25~29岁	2 001(33.37)
30~34岁	1 411(23.53)
35~39岁	1 584(26.41)
≥40岁	166(2.77)
初产孕妇	4 139(69.02)
孕周	
12周	8(0.13)
13~16周	1 014(16.91)
17~20周	3 366(56.13)
21~24周	1 082(18.04)
25~36周	527(8.79)
唐筛	
高风险	2 755(82.26)
低风险	594(17.74)
未做唐筛(包含1个或多个高危因素)	1 619(61.14)
未做唐筛(无高危因素)	1 029(38.86)

表2 MPS检测异常孕妇采用羊水/脐血穿刺核型分析验证的结果

染色体异常类型	MPS检测	核型验证		符合率(%)
		错误	正确	
21-三体	36	0	28	100
18-三体	8	1	7	87.5
13-三体	2	1	0	0
其他染色体	67	35	17	32.7
总计	113	37	52	58.4

2.2 MPS无创检测和传统唐筛的比较

我们进一步比较了传统唐筛和无创产前MPS检测的准确性,传统唐筛对21-三体的漏检率为11.8%(2/17),而MPS方法无一漏检。总共3 349例孕妇做了唐筛,筛出高风险的孕妇2 755例,其中核型验证出15例21-三体,2例18-三体,敏感性为0.62%。而无创产前MPS检测提示出36例21-三体,8例18-三体,36例做核型验证,发现28例21-三体,7例18-三体,敏感性为97.2%。因此,和传统唐筛相比,MPS检测可减少96.2%的有创羊水/脐血穿刺操作,这对21-三体和18-三体胎儿产前诊断的无创化具有很强的实用价值。

2.3 年龄和孕周对MPS检测的影响

由于MPS方法是基于分析母血胎儿游离DNA,其浓度变化对检测方法有重要影响。我们分析了年龄和孕周对MPS方法的染色体异常检出率的影响,结果见表3。我们的结果表明,孕周范围在12~36周,MPS检测的异常率没有显著变化。而年龄≥40岁的孕妇,其妊娠胎儿的染色体异常率相比其他年龄组显著升高(4.22%,$P=0.037$)。

表3 MPS方法对不同年龄和孕周孕妇血浆染色体异常检出率

项目	MPS检测结果(n)		异常率(%)
	正常	异常	
年龄(岁)			
18~24	819	16	1.92
25~29	1 963	38	1.90
30~34	1 387	24	1.70
35~39	1 556	28	1.77
≥40	159	7	4.22[a]
孕周			
12	8	0	0
13~16	996	18	1.78
17~20	3 309	57	1.69
21~24	1 060	22	2.03
25~36	511	16	3.04

a: $P=0.037$,与其他年龄段比较

2.4 羊水/脐血穿刺核型验证情况

从表2可以看出,MPS检测和经典核型检测对比分析结果表明21-三体符合率100%(28/28),18-三体符合率87.5%(7/8),其他染色体异常符合率32.7%(17/52)。MPS方法检测异常经羊水/脐血穿刺核型检测验证的异常核型结果见表4,可见无创产前MPS检测对男性和女性胎儿的21-三体和18-三体异常均能有效检测。

表4 MPS方法检测异常的羊水/脐血穿刺-核型分析结果

MPS检测异常类型	n	羊水核型(n)
21-三体	28	47,XY,+21(17)
		47,XX,+21(11)
18-三体	8	47,XY,+18(1)
		47,XX,+18(6)
		46,XX(1)
13-三体	2	46,XX(1)
		46,XX(1)

3 讨论

染色体数目或结构异常所致的疾病称为染色体病。染色体病是出生缺陷的常见病因之一,现发现人类染色体数目异常和结构异常近万种,染色体病综合征100余种[1]。以前只能通过核型分析才能发现胎儿是否患有某种染色体病,但其有创操作存在一定的流产风险。传统基于血生化和超声的唐筛是无创方法,但对染色体数目异常检测的敏感度太低。现在无创产前MPS检测通过提取母血胎儿游离DNA,进行大规模平行测序,经序列的染色体覆盖度等生物学信息分析,从而做出染色体异常风险程度判断。其判断结果对21-三体的准确性达到99%以上,可望替代不敏感的传统唐筛方法[7-8]。我们的大样本临床研究表明,MPS检测对21-三体和18-三体具有很高的敏感性,非常适用于对21-三体和18-三体胎儿的初筛。和传统唐筛相比,MPS检测可减少96.2%的有创羊水/脐血穿刺操作,对21-三体和18-三体胎儿产前诊断的无创化具有很强的实用价值。目前分析策略的MPS对于13-三体和性染色体数目异常的识别率尚不理想。Chen等[9]采用非重复掩盖的人基因组参考序列提高测序短序列的比对匹配数量,并校正GC含量偏倚,这种新分析策略使13-三体识别率从36%提升到100%(25/25),18-三体识别率从73%提升到91.9%(34/37)。因此,分析技术的改进,将进一步提升对13-三体和其他染色体数目异常的识别能力,拓展无创产前MPS技术的应用范围。

理论上,在妊娠第30天左右就能在母血中检测到胎儿DNA。但是,胎儿游离DNA的浓度变化范围较

大,对其检测存在失败的风险。Bianchi 等[10]采用MPS筛查了532例孕妇,有16例(3%)孕妇血浆未能提取出足量的胎儿DNA导致检测失败,96例唐氏综合征胎儿中有4例(4.2%)MPS检测结果为无法判断,426例正常胎儿中有24例(5.6%)MPS检测结果为无法判断。游离胎儿DNA的浓度受多种因素的影响,如先兆子痫、妊娠呕吐、早产、非整倍体胎儿[11]。怀有21-三体胎儿的孕妇血浆中胎儿DNA浓度明显升高,但18-三体胎儿的孕妇并不出现这种现象,这可能是18-三体胎儿的MPS检测符合率低于21-三体胎儿的原因。我们的研究均在孕12周后采血,避免了孕早期胎儿DNA含量不足的因素。而且,12~36周的MPS检测的异常比例大致相等,维持在1.7%~3.0%水平,说明我们开展的无创MPS检测的采血时间是适合的。

由于欧美等国MPS检测的费用在765~2 762美元不等,还是比较昂贵,同时检测实验室要求具备高水平的分析技术。从卫生经济角度考虑,Wald 等[12]提出在孕早期可以先用传统方法组合,如超声、游离β-hCG、PAPP-A和年龄因素评估,确定高危风险的孕妇进一步做MPS检测。低风险的孕妇在孕中期再次采用超声、游离β-hCG、PAPP-A、AFP、uE3、inhibin-A和年龄等指标重新评估,高风险的孕妇直接行羊水穿刺/核型分析。随着MPS技术的快速发展,其成本也在不断下降。同时,将来MPS数据的生物信息学分析服务将更加普及,因此MPS检测的费用将会逐步下降,必然成为常规筛查。总之,无创MPS产前检测为非侵入性检测,对孕妇和胎儿都是安全的,并且在妊娠早期就可以开展,具有很高的敏感性和准确性。随着二代测序技术的快速进步和费用的快速下降,无创MPS产前检测胎儿游离DNA将成为所有孕妇围产保健的常规步骤,为降低出生缺陷做出重要贡献。

本研究为回顾性总结分析,不足之处在于:①经典核型检测验证的孕妇仅36例,19.6%的MPS异常孕妇未进一步做核型验证,可能导致符合率的高估;②没有对大样本的孕妇同时开展MPS无创筛查、传统唐筛、羊水/脐血穿刺-核型分析3种方法之间的比较,缺乏假阴性率的评价;③需要改进分析方法,拓展对13-三体、其他三体、性染色体等数目异常的筛查能力,扩大应用范围。因此,后续应进一步开展大样本、前瞻性的临床研究,同时比较MPS无创筛查、传统唐筛、羊水/脐血穿刺-核型分析3种方法的灵敏度、特异性,从而对MPS无创筛查方法的准确性做出完整的评估(假阴性率、假阳性率等)。同时,发展新的算法和分析策略,拓展对13-三体、其他三体、性染色体等数目异常的筛查能力,扩大MPS无创筛查方法的应用范围。

参考文献:

[1] 吴清明, 周瑾. 出生缺陷产前筛查及产前诊断研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(1): 129-131.

[2] Ministry of Health, People's Republic of China. Report on Women and Children's Health Development in China[M]. Beijing: Ministry of Health, 2011.

[3] Liao C, Wei J, Li Q, *et al*. Efficacy and safety of cordocentesis for prenatal diagnosis[J]. Int J Gynecol Obstet, 2006, 93(1): 13-17.

[4] Ghaffari S R, Tahmasebpour A R, Jamal A, *et al*. First-trimester screening for chromosomal abnormalities by integrated application of nuchal translucency, nasal bone, tricuspid regurgitation and ductus venosus flow combined with maternal serum free beta-hCG and PAPP-A: a 5-year prospective study[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2012, 39(5): 528-534.

[5] Lo Y M, Corbetta N, Chamberlain P F, *et al*. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.

[6] 郭奇伟, 周裕林. 利用母血胎儿游离DNA进行单基因病无创产前诊断研究进展[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(4): 410-413.

[7] Chiu R W, Chan K C, Gao Y, *et al*. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51): 20458-20463.

[8] Dan S, Wang W, Ren J, *et al*. Clinical application of massively 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.

[9] Chen E Z, Chiu R W, 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.

[10] Bianchi D W, Platt L D, Goldberg J D, *et al*. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing[J]. Obstet Gynecol, 2012, 119(5): 890-901.

[11] 杨波, 吕运来, 马红丽, 等. 孕妇外周血中胎儿游离DNA的研究进展[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(10): 910-913.

[12] Wald N J, Bestwick J P. Incorporating DNA sequencing into current prenatal screening practice for Down's syndrome[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58732.

(**收稿**:2013-05-24;**修回**:2013-06-18)

(编辑 王 红)