

网络出版时间: 2019-9-3 17:27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.035.html>

CNV-Seq 在高龄孕妇产前诊断中的应用

汪菁, 徐晶晶*, 陈玲, 刘文, 宋雅娴, 胡月, 彭亚琴, 吴丽敏, 公颜平, 于婷

摘要 探讨基于高通量测序技术的基因组拷贝数变异测序 (CNV-Seq) 在高龄孕妇产前诊断中的应用价值。对 80 例高龄孕妇行羊水穿刺, 在对胎儿羊水细胞进行 G 显带染色体核型分析的同时利用高通量测序技术检测胎儿细胞基因组 DNA 测序结果与人类参考基因组 (GRCh37, UCSC release hg19) 进行比对分析, 然后通过 ISCA、Decipher、Clinvar 等数据库评估检测到的 CNV 致病性, 进而比较 G 显带染色体核型分析与 CNV-Seq 结果间的差异。送检的 80 例羊水样本中 CNV-Seq 检测出 21 三体 6 例, 18 三体 3 例, 性染色体非整倍体异常 2 例 (1 例是 47,XXX, 1 例是 47,XXY), 这些结果与 G 显带染色体核型分析结果一致, CNV-Seq 额外检出明确致病染色体微缺失 2 例, 可能致病染色体微缺失 1 例, 临床意义未明的染色体微缺失、微重复 39 例, 染色体未发现微缺失、微重复例数 27 例, 染色体异常检出率为 17.5%, 在染色体 G 显带核型分析结果基础上, 致病性异常检出率额外增加了 3.75%。CNV-Seq 在高龄孕妇产前诊断中有良好的应用价值, 该技术与 G 显带染色体核型分析联合应用能明显

提高高龄孕妇染色体异常检出率。

关键词 高龄孕妇; 基因组拷贝数变异测序; 核型分析; 产前诊断

中图分类号 R 715.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1659-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.034

随着 DNA 测序技术的发展, 更多基于测序的分子诊断方法越来越成熟, 基于高通量测序的基因组拷贝数变异 (CNV-Seq) 是其中一种新兴的应用于产前诊断的检测方法, 有助于检测出染色体的微缺失和微重复, 提高染色体异常检出率。现对进行产前诊断的高龄孕妇羊水样本同时进行染色体 G 带核型分析和 CNV-Seq 检测, 对该检测数据进行回顾性分析, 旨在探讨 CNV-Seq 是否能够有效提高高龄孕妇染色体异常检出率, 从而达到降低高龄妊娠出生缺陷率的目的。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2018 年 1~8 月在中国科学技术大学附属第一医院 (安徽省立医院) 产前诊断中心进行产前诊断的 80 例孕周为 18 周⁺3~28 周、年龄为 35~45 岁的高龄孕妇, 通过羊膜腔穿刺术获取羊水样本 80 份, 同时进行染色体 G 显带核型分

2019-07-20 接收

基金项目 “科大新医学”联合基金项目 (编号: WK9110000051); 中华国际科学交流基金会 (编号: Z2019LAH003)

作者单位: 中国科学技术大学附属第一医院 (安徽省立医院) 妇产科, 合肥 230001

作者简介: 汪菁, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: ahwangjing1968@126.com

* 对本文具有同等贡献

An exploratory scoring system: evaluate whether esophageal foreign bodies can be successfully removed under gastroscopy

Yu Wenyong, Ding Xiping, Zhang Kaiguang et al

(Dept of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001)

Abstract A retrospective study of 162 cases of successful and unsuccessful removal of esophageal foreign bodies by endoscopy with transparent cap at the front of gastroscope was carried out. Through detailed analysis of clinical data and rigorous statistical treatment, an operable scoring system was established to evaluate whether the foreign bodies in esophagus could be successfully removed under gastroscope on the basis of endoscopy, foreign species and foreign body size. The accuracy of the prediction was 91.4%, which indicated the accuracy of the scoring system. The preoperative scoring system for removal of esophageal foreign bodies under endoscopy can predict whether the foreign bodies can be successfully removed by gastroscope.

Key words scoring system; evaluation; esophageal foreign body

析和 CNV-Seq 检测,孕妇签署产前诊断和 CNV-Seq 知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 羊膜腔穿刺 孕妇在 B 超引导下,由具有产前诊断资质的医师行羊膜腔穿刺术,每个孕妇抽取 3 管羊水,每管 10 ml,共 30 ml 羊水,其中 2 管羊水进行细胞培养,供染色体核型分析,剩余 1 管进行 CNV-Seq 检测。

1.2.2 染色体 G 显带核型分析 抽取 20 ml 羊水进行细胞接种,每个孕妇的样本进行两线培养,培养至 7 d 左右显微镜下观察细胞状态,换液培养,1~2 d 后进行细胞收获、染色制片、核型分析。

1.2.3 CNV-Seq 检测 抽取 10 ml 羊水,样本由华大基因公司完成 CNV-Seq,该检测针对染色体非整倍体变异和 100 kb 以上的 CNV,其方法如下:使用 DNAeasy Blood&Tissue Kit(Qiagen)从羊水细胞中分离基因组 DNA,使用 50 ng 基因组 DNA 作为起始模板,构建测序文库,最后在 BGISEQ-500 测序仪上进行测序。使用 Burrows-Wheeler Aligner(Version 0.7.7) 比对软件将读序信息与人类参考基因组(GRCh37,UCSC release hg19)进行比对、分析得到生物信息学结果,判断是否存在染色体非整倍体变异和 CNV,并通过 ISCA、Decipher、Clinvar 等数据库查询,对检测到的 CNV 的致病性进行评估。

1.3 随访 对所有孕妇进行电话随访,追踪妊娠结局及新生儿健康状况。

2 结果

2.1 染色体 G 显带核型分析结果 本研究对 80 例高龄孕妇同时进行了羊水细胞染色体核型分析和羊水 CNV-Seq 检测,染色体核型分析检测出 13 例异常核型,其中 21 三体 6 例,18 三体 3 例,性染色体非整倍体异常 2 例(1 例是 47,XXX,1 例是 47,XXY),低比例嵌合 2 例(46,XN,t(11;15)[6]/46,XN[56];47,XN,+2[10]/46,XN[120])。染色体异常检出率为 16.25%,致病性异常检出率为 13.75%。见表 1。

2.2 CNV-Seq 检测结果 CNV-Seq 检测结果致病性染色体异常例数 14 例,异常检出率 17.5%,其中 21 三体 6 例,18 三体 3 例,性染色体非整倍体异常 2 例(1 例是 47,XXX,1 例是 47,XXY),明确致病性染色体微缺失 2 例,可能致病性染色体微缺失 1 例,临床意义未明的染色体微缺失、微重复 39 例,致病性染色体异常检出率为 17.5%,在染色体 G 显带核

型分析结果基础上致病性染色体异常检出率增加了 3.75%。

2.3 染色体 G 显带核型分析联合 CNV-Seq 检测结果 染色体 G 显带核型分析联合 CNV-Seq 检测的致病性异常例数为 14 例,致病性异常检出率为 17.5%,比单一的染色体 G 显带核型分析高出 3.75%。染色体 G 显带核型分析比 CNV-Seq 检测额外检出了 2 例小于 10% 的低比例嵌合(46,XN,t(11;15)[6]/46,XN[56];47,XN,+2[10]/46,XN[120])。CNV-Seq 检测比染色体 G 显带核型分析额外检出了 2 例明确致病性染色体微缺失和 1 例可能致病性染色体微缺失(表 2),两种方法对于其他染色体非整倍体异常的检出结果一致。

表 1 染色体核型异常结果及其相应 CNV-Seq 结果

编号	年龄 (岁)	核型结果	CNV-Seq 结果	两种结果 一致性	妊娠 结局
1	36	47,XN,+21	47,XN,+21	一致	引产
2	43	47,XN,+21	47,XN,+21	一致	引产
3	36	47,XN,+21	47,XN,+21	一致	引产
4	40	47,XN,+21	47,XN,+21	一致	引产
5	45	47,XN,+21	47,XN,+21	一致	引产
6	42	47,XN,+21	47,XN,+21	一致	活产
7	43	47,XN,+18	47,XN,+18	一致	引产
8	40	47,XN,+18	47,XN,+18	一致	引产
9	36	47,XN,+18	47,XN,+18	一致	引产
10	37	47,XXX	47,XXX	一致	活产
11	45	47,XXY	47,XXY	一致	引产
12*	42	46,XN,t(11;15) [6]/46,XN[56]	临床意义 未明 CNV	不一致	活产
13*	39	47,XN,+2[10]/ 46,XN[120]	正常	不一致	活产

* 为染色体核型低比例嵌合病例

表 2 致病性染色体微缺失结果

编号	年龄 (岁)	CNV-Seq 结果	核型 结果	妊娠 结局
1	36	Xp22.31(6,427,993~8,147,809) 缺失 1.72 Mb	正常	引产
2	36	Yq11.223q11.23(24,026,787~26,227,153) 缺失 2.20 Mb	正常	引产
3	40	16p11.1p11.2(34,214,421~35,180,066) 缺失 965.64 Kb	正常	活产

2.4 随访结果 对所有高龄孕妇进行产后电话随访,11 例致病性染色体异常患者已进行引产;2 例染色体非整倍体异常孕妇已足月分娩,其中 1 例为 47,XXX,足月分娩,尚未见明显异常,1 例为 47,XN,+21,足月分娩(孕妇强烈要求保留胎儿),胎儿出生后已出现心脏异常;1 例疑似致病染色体

16p11.1p11.2 微缺失,已足月分娩,未见明显异常;
2 例低比例嵌合,足月分娩,未见明显异常。

3 讨论

CNV-Seq 是一项基于高通量测序技术的基因组拷贝数变异检测,可通过测序深度的调整,改变分辨率,检测不同大小的 CNV,本研究中所用的方法分辨率为 100 kb,该方法可很好的弥补核型分析分辨率低的不足。CNV-Seq 的优势主要有检测范围广、高通量、周期短、分辨率高、操作简便、低 DNA 样本量^[1],并且已有很多研究者对该方法的适用性进行评估,Wang et al^[2]报道该技术相较于核型分析对致病性或可能致病性的检出率由 1.8% 提高至 2.8%,有很好的可靠性和准确性。本研究对 80 例高龄孕妇的羊水样本同时进行了 CNV-Seq 和核型分析,致病性异常 14 例,检出率为 17.5%,致病性染色体非整倍体异常 11 例,包括 21 三体 6 例,18 三体 3 例,性染色体非整倍体异常 2 例,致病性染色体微缺失 3 例(明确致病的染色体微缺失 2 例,可能致病的染色体微缺失 1 例)。CNV-Seq 和核型分析均检测出致病性染色体非整倍体异常,但 3 例致病性染色体微缺失,均未在核型分析时被检测到。该结果表明对高龄孕妇实施产前诊断非常必要,并且应用 CNV-Seq 能明显增加致病性染色体微缺失、微重复的检出率。染色体微缺失、微重复会导致一些复杂临床表型(如生长发育异常、智力发育迟缓、内脏器官畸形、内分泌异常等)的综合征发生,是染色体疾病中的常见类型,目前已发现 67 余种染色体微缺失、微重复综合征,发病率约在 1/4 000 ~ 1/50 000^[3]。通过本研究证实 CNV-Seq 是检测该种染色体畸变的有效方法,因此对高龄孕妇的产前诊断联合应用核型分析和 CNV-Seq 有很重要的临床意义。

对 3 例核型分析未检测到的致病性染色体微缺失结果分析如下:① 致病性染色体微缺失病例 1: Y 染色体长臂部分(24,026,787 ~ 26,227,153)片段缺失一个拷贝,长约 2.20 Mb,为已知致病突变。该区域包含于“Spermatogenic failure, Y-linked”报道区域内,并且覆盖该病相关的“AZFc region”的主要基因 BPY2、DAZ、CDY1 等,Y 染色体 AZFc 区域缺失是导致男性生精障碍最常见的原因。“Spermatogenic failure, Y-linked”的主要临床特征为无精症、轻度至严重少精症,从而导致男性不育。个体间临床表征具有差异性。阿周存等^[4]2006 年报道,对 128 例严重寡精症患者和 287 个正常生精男性的 DAZ 基因

缺失进行研究,发现 DAZ1/DAZ2/DAZ3/DAZ4 缺失仅见于严重寡精症患者,频率为 11.7%; DAZ1/DAZ2 缺失的频率在严重寡精症患者中显著高于正常男性(9.4% vs 2.8%, $P=0.004$);这些结果提示 DAZ 基因全部拷贝缺失是严重寡精症患者生精障碍的常见遗传病因,而 DAZ1/DAZ2 缺失则可能是一种高风险因素。该孕妇已进行引产。② 致病性染色体微缺失病例 2: X 染色体短臂部分(6,427,993 ~ 8,147,809)片段缺失一个拷贝,长约 1.72 Mb,为已知致病变异。该区域包含 OMIM 收录的致病基因 STS,STS 基因功能异常关联疾病“Ichthyosis, X-linked”。多篇文献^[5-7]报道,在 X-linked ichthyosis 患者中检出 STS 基因部分或全基因缺失突变。“Ichthyosis, X-linked”的临床表现包括:眼角膜混浊,视力通常不受影响;鱼鳞病,皮损通常对称发生,主要发生在四肢、头皮、颈部和躯干上,呈棕色;男性隐睾,睾丸癌风险增加;产前表现为晚产;出生后 1 年内发病,大部分(80% ~ 90%)由 STS 基因缺失导致,男性发病率为 1:6 000^[8-9]。该病呈 X 连锁隐性遗传,本送检样本检出 STS 基因缺失一个拷贝,由于该孕妇胎儿为男性,则会导致疾病的发生。该孕妇已进行引产。③ 可能致病性染色体微缺失病例 3: 16 号染色体短臂部分(34,214,421 ~ 35,180,066)片段缺失一个拷贝,长约 965.64 kb,为疑似致病变异。据 Molck et al^[10]报道,在 1 例表型为动脉闭锁、室间隔缺损和肺动脉闭锁缺陷的患者中检出了 16p11.1p11.2 区域的缺失变异,长约 961 kb,该区域包含基因 UBE2MP1、LOC146481、LOC100130700、RN5S411 和 FLJ26245。本次检出变异与文献报道变异相近,为疑似致病变异。电话随访,该孕妇足月分娩,目前未发现明显异常,将继续对其随访了解其远期预后。

本研究中有 2 例核型分析检出的 10% 以下低比例嵌合异常未能通过 CNV-Seq 检测到,此案例一方面反映了 CNV-Seq 的不足,但另一方面也能在未实施其他方法复查的情况下通过 CNV-Seq 印证该羊水细胞嵌合比例低于 10%。临床建议这 2 例孕妇去其他医院通过 FISH 复查,但孕妇拒绝。羊水培养中很容易出现假性嵌合,羊水中假性嵌合体大多为两条染色体的易位、一条染色体的丢失、标记染色体、一条染色体的增加和染色体部分三体等,大部分妊娠结局良好^[11]。该两例嵌合,1 例为 46,XN,t(11;15)[6]/46,XN[56],另 1 例为 47,XN,+2[10]/46,XN[120],嵌合比例较低,并且比较符合

羊水假性嵌合体,在孕妇未通过其他方法验证的情况下,B超监测并随访,该2例孕妇均已足月分娩,未发现异常。

通过此项研究发现高龄与染色体异常密切相关,并且该染色体异常不仅包括非整倍体染色体异常,也包括染色体的微缺失和微重复。因此在对高龄孕妇实施产前诊断时,联合核型分析和CNV-Seq检测将有效提高致病性检出率,降低出生缺陷,为临床的产前咨询提供有效可靠的依据。

参考文献

- [1] 刘洪倩,刘俊涛,郭玲仟,等. 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(4): 293-6.
- [2] Wang J, Chen L, Zhou C, et al. Prospective chromosome analysis of 3429 amniocentesis samples in China using copy number variation sequencing[J]. *Am J Obstet Gynecol* 2018, 219(3): 287.e1-18.
- [3] Watson C T, Marques-Bonet T, Sharp A J, et al. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2014, 15: 215-44.
- [4] 阿周存,杨元,张思仲,等. 严重寡精症 ICSI 精子供体的 DAZ 基因拷贝缺失研究[J]. 遗传, 2006, 28(9): 1057-60.
- [5] Valdes-Flores M, Kofman-Alfaro S H, Vaca A L, et al. Deletion of exons 1~5 of the STS gene causing X-linked ichthyosis[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(3): 456-8.
- [6] Ben Khelifa H, Soyah N, Ben-Abdallah-Bouhjar I, et al. Xp22.3 interstitial deletion: a recognizable chromosomal abnormality encompassing VCX3A and STS genes in a patient with X-linked ichthyosis and mental retardation[J]. *Gene*, 2013, 527(2): 578-83.
- [7] Hung C, Ayabe R I, Wang C, et al. Pre-descemet corneal dystrophy and X-linked ichthyosis associated with deletion of Xp22.31 containing the STS gene[J]. *Cornea* 2013, 32(9): 1283-7.
- [8] Yen P H, Allen E, Marsh B, et al. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: Implications for X-Y interchange[J]. *Cell*, 1987, 49(4): 443-54.
- [9] Yoneda K. Inherited ichthyosis: syndromic forms[J]. *J Dermatol* 2016, 43(3): 252-63.
- [10] Molck M C, Simioni M, Paiva V T, et al. Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease[J]. *J Pediatr (Rio J)* 2017, 93(5): 497-507.
- [11] 张璘,任梅宏,宋桂宁,等. 产前诊断中有关染色体嵌合体的诊断、处理及临床分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 23(10): 54-7.

Application of CNV-Seq in prenatal diagnosis of elderly pregnant women

Wang Jing, Xu Jingjing, Chen Ling, et al

[Dept of Gynaecology and Obstetrics,

The First Affiliated Hospital of USTC(Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001]

Abstract To evaluate CNV-Seq based on high-throughput sequencing in prenatal diagnosis of elderly pregnant women. The genomic DNA of fetal amniotic fluid cells of 80 elderly pregnant women was detected by high-throughput sequencing technique while G-banding chromosome karyotype analysis was performed. The sequencing reads were precisely mapped using the human genome(GRCh37, UCSC release hg19) as a reference. Then, the pathogenicity of CNVs were interrogated in ISCA, Decipher, Clinvar and other databases. The differences between G-banded chromosome karyotype analysis and CNV-Seq results were compared. Of 80 amniotic fluid samples, 6 cases of trisomy 21, 3 cases of trisomy 18, 2 cases with sex chromosomal numerical abnormality(47,XXX, 47,XXY) were detected by CNV-Seq. The result was consistent with that of G-banding karyotype analysis. In addition, 2 clearly pathogenic chromosome microdeletion, 1 suspected pathogenic chromosome microdeletion, and 39 chromosome microdeletion and microduplication with unknown clinical significance were detected by CNV-Seq. There were 27 cases without chromosome microdeletion or microduplication. The detection rate of chromosomal abnormalities was 17.5% by CNV-Seq. On the basis of the results of G banding karyotype analysis, the detection rate of abnormalities increased by 3.75%. CNV-Seq has a good application value in prenatal diagnosis of elderly pregnant women. The combined application of CNV-Seq and G-banding chromosome karyotype analysis can significantly improve the detection rate of chromosome abnormalities in elderly pregnant women.

Key words elderly pregnant women; CNV-Seq; karyotyping; prenatal diagnosis