

高通量基因测序技术在自然流产胎儿绒毛染色体的核型分析

方有燕, 吴欢, 贺小进, 陈大蔚, 周一茹, 周平, 曹云霞, 魏兆莲

摘要 目的 探讨自然妊娠与辅助生殖助孕(ART)流产组织胎儿绒毛染色体异常情况。方法 采用高通量测序技术对364例流产组织进行染色体核型分析,并根据染色体非显带核型对三体核型进行分组,将其分为A、B、C、D、E、F、G 7组。结果 ①绒毛染色体总异常发生率为48.90%(178/364),自然妊娠组绒毛染色体异常发生率显著高于ART组(52.85% vs 40.68%)($P=0.033$);异常核型以三体型最多见,占65.17%,染色体微缺失/微重复次之,占15.73%;②ART组<35岁与≥35岁胚停组织绒毛染色体异常发生率差异无统计学意义,自然妊娠组两者间差异有统计学意义($P=0.005$);③流产组织中女性胚胎异常核型占总异常核型的46.89%,男性胚胎占53.11%,两者差异有统计学意义($P=0.007$);④ART组以复发性流产最常见,占60.00%;⑤自然流产组织中胚胎异常核型主要分布于E组和G组,男胚A组异常核型显著多于女胚($P=0.007$)。结论 高通量测序在自然流产绒毛组织染色体核型分析中有较高的应用价值,有助于判断早期流产的遗传学病因,为再次妊娠遗传学咨询提供服务。

关键词 高通量基因测序技术; 自然流产; 胎儿绒毛; 染色体; 核型分析

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0266-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.021

近年辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)在个体化控制性超促排卵方案的应用、实验室技术以及仪器设备方面均取得了长足的进步,ART术后的临床妊娠率有了很大的提高,但高流产率仍是一个亟待解决的问题。常见的流产病因包括遗传因素、免疫因素、内分泌、生殖道感染、生殖道畸形及高凝血状态等,其中遗传因素尤其染色体异常被认为是最常见早期流产诱发因素^[1]。绒毛细胞来源于胚胎外胚层细胞,具有与胚胎组织相同

的遗传特性,因此可通过检测自然流产组织染色体核型,了解胚胎细胞的遗传性状,分析胚胎停育的可能病因。既往关于胚停绒毛染色体分析多采用传统的染色体显带和荧光原位杂交技术,且关于不同病因ART流产组织染色体分析鲜有报道。该研究采用高通量测序技术分析364例自然流产绒毛组织染色体异常的发生率、核型分布及与孕妇年龄、胎儿性别、妊娠方式、不同ART病因之间的关系,报道如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2014年9月~2016年12月于安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖中心行胎儿绒毛染色体检测的364例患者作为研究对象,年龄19~44(30.440±4.768)岁,孕5~15周,其中13~15周仅1例。根据妊娠方式,将其分为自然妊娠组及ART组。364例患者中自然妊娠246例,ART术后妊娠118例,B超提示胚胎停止发育(未见胚芽或未见心管搏动),在取得患者知情同意的前提下采集胚胎绒毛标本并行高通量测序。

1.2 高通量测序法检测绒毛染色体核型 ①提取基因组DNA, Wizard试剂盒进行产物纯化, Qubit法检测纯化后的产物; ②构建基因组DNA小片段文库: 采用Life Tech的ION XPRESS LIBRARY KIT进行DNA片段化,并构建DNA小片段文库; ③按照PGM测序操作指南(Ion PGM-200 Sequencing Kit V2 only)进行高通量测序及信息分析。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件对数据进行分析。计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态分布的计量资料组间比较采用两组独立样本 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本总体检测结果 364例绒毛组织中检出染色体数目及结构异常178例,异常率为48.90%(178/364),其中自然妊娠组130例,异常率52.85%(130/246),显著高于ART组的40.68%

2017-11-10 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1708085MH214)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖中心, 合肥 230022

作者简介: 方有燕, 女, 硕士研究生;

魏兆莲, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: weizhaolian_1@126.com

(48/118) ($P < 0.05$)。异常核型以常染色体三体型为主,占异常核型的 65.17%;其次为染色体结构微缺失/微重复,占 15.73%;性染色体单体占 6.74%;三倍体占 5.06%;嵌合体占 3.93%。除 1、6、11 号染色体外非整倍体的发生涉及所有染色体,其中 16 号染色体发生率最高,占异常染色体的 21.35%;22 号染色体次之,占 11.24%;常染色体的非整倍体多为三体型,性染色体的非整倍体则以单体型为多,仅有 1 例常染色体单体,核型为 45,XY,-21。见表 1。

表 1 早期自然流产绒毛组织染色体异常核型及分布

染色体异常	n	异常病例的比例	
		(n=178, %)	(n=364, %)
常染色体三体	116	65.17	31.87
47, XN, +16	38	21.35	10.44
47, XN, +22	20	11.24	5.49
47, XN, +15	6	3.37	1.65
47, XN, +21	10	5.62	2.75
47, XN, +13	4	2.25	1.10
47, XN, +2	5	2.81	1.37
47, XN, +3	3	1.69	0.82
47, XN, +9	3	1.69	0.82
47, XN, +14	3	1.69	0.82
47, XN, +10	4	2.25	1.10
47, XN, +20	2	1.12	0.55
47, XN, +4	4	2.25	1.10
47, XN, +8	2	1.12	0.55
47, XN, +5	3	1.69	0.82
47, XN, +17	4	2.25	1.10
47, XN, +18	2	1.12	0.55
47, XN, +19	1	0.56	0.27
47, XN, +12	1	0.56	0.27
47, XN, +7	1	0.56	0.27
常染色体单体	1	0.56	0.27
45, XN, -21	1	0.56	0.27
复杂异常	4	2.25	1.10
48, XN, +6, +18	1	0.56	0.27
48, XN, +18, +22	1	0.56	0.27
48, XN, +14, +20	1	0.56	0.27
48, XN, +18, +21	1	0.56	0.27
嵌合体	7	3.93	1.92
69, XXN/70, XXN, +16	2	1.12	0.55
69, XXN/70, XXN, +6	1	0.56	0.27
46, XN/47, XN, +14	1	0.56	0.27
46, XN/45, X0	2	1.12	0.55
46, XN/47, XN, +2	1	0.56	0.27
性染色体单体	12	6.74	3.30
45, X0	12	6.74	3.30
性染色体三体	1	0.56	0.27
47, XNN	1	0.56	0.27
三倍体	9	5.06	2.47
69, XXN	8	4.57	2.20
70, XXN, +7	1	0.56	0.27
微缺失/微重复	28	15.73	7.69

2.2 年龄与染色体异常 ART 组 ≥ 35 岁流产绒毛组织染色体异常发生率虽高于 < 35 岁患者,但差异无统计学意义;自然妊娠组 ≥ 35 岁流产绒毛组织染色体异常发生率显著高于 < 35 岁患者 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 年龄与染色体异常

项目	异常率(%)	χ^2 值	P 值
ART 组			
<35 岁	36.26(33/91)	3.211	0.073
≥ 35 岁	55.56(15/27)		
自然妊娠组			
<35 岁	48.88(97/198)	7.804	0.005
≥ 35 岁	73.68(28/38)		

2.3 ART 助孕病因与胚胎染色体异常 ART 组流产胎儿绒毛染色体异常率为 40.68% (48/118),以复发性流产最常见,占 60.00%,其次为男方因素,占 48.39%。见表 3。经 χ^2 检验,差异无统计学意义,尚不能表明 ART 组不同病因染色体异常率不同。

表 3 ART 助孕妊娠组不同病因分布

病因	n	异常[n(%)]	χ^2 值	P 值
输卵管因素	44	17(38.64)	3.861	0.425
多囊卵巢综合征	20	6(30.00)		
子宫内膜异位症	13	4(30.77)		
男方因素	31	15(48.39)		
复发性流产	10	6(60.00)		

2.4 性别与胚胎染色体异常核型分布 362 例胚胎组织中(其中 2 例因测试时要求保密,具体性别不详,予以排除,其中 1 例核型异常),男胚 166 例,女胚 196 例,男胚异常核型占总异常核型的 53.11% (94/177),显著高于女胚的 46.89% (83/177) ($P = 0.007$)。在 177 例异常染色体核型中,常染色体三体型占 65.64% (116/177),其中男胚 63 例,女胚 53 例。按照染色体非显带核型对三体型进行分组,将其分为 A、B、C、D、E、F、G 7 组,详见表 4,男、女胚均主要分布于 E 组(38.10% vs 37.74%)和 G 组(22.22% vs 30.19%);男胚 A 组三体型显著多于女胚 ($P < 0.05$),其余各组在性别间分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

3 讨论

绒毛滋养层细胞是受精卵有丝分裂的衍生物,

表4 不同性别胚胎染色体非显带核型分组分布

染色体非显带核型分组	男胚	女胚	χ^2 值	P 值
A 组: 1~3	8	0	7.229	0.007
B 组: 4~5	5	2	0.880	0.348
C 组: 6~12、X	5	6	0.384	0.535
D 组: 13~15	6	7	0.393	0.531
E 组: 16~18	24	20	0.002	0.968
F 组: 19~20	1	2	0.546	0.460
G 组: 21~22、Y	14	16	0.953	0.329

因其与胎儿组织具有相同的遗传性状,故可以作为检测早期胎儿染色体异常的材料,对自然流产的遗传学病因做出诊断,为胚停夫妇再次妊娠的遗传咨询提供信息。

自然流产的发生率约占所有妊娠的 15%~20%,是妊娠期常见的并发症^[2]。自然流产多发生于妊娠早期,导致流产的病因众多,其中染色体异常占 50%~70%^[3],是导致胚胎早期流产的主要原因,因为染色体数目异常的胚胎遗传缺陷更大,导致遗传物质不平衡,致死性更高^[3-4]。有研究者认为常染色体三体以 16 号染色体三体最常见,约占 1/3,且具有高致死性^[2,5]。本研究结果显示,染色体数目异常发生率为 41.21% (150/364),其中 16 号染色体三体发生率为 32.76% (38/116),与相关研究^[2,5]报道一致。45,X0 是人类唯一能生存的单体综合征^[6],本研究中 45,X0 核型有 12 例,占所有异常染色体核型的 6.74%,该异常核型的形成除与减数分裂时性染色体不分离导致一条染色体缺失有关外,多由于父系性染色体丢失所致。通过对 116 例常染色体三体核型按染色体非显带核型图进行分组,显示男胚、女胚均主要分布在 E、G 两组,这可能与常染色体三体主要为 16、22 号染色体异常,而 16、22 号染色体分别位于 E、G 两组有关。本研究中男胚 A 组三体核型显著多于女胚,因样本量小,尚不足以得出结论,仍需扩大样本量进一步研究证实。

本研究中自然妊娠组年龄小于 ART 组,但绒毛染色体异常的发生率却高于 ART 组 (52.85% vs 40.68%),可能与行 ART 患者的配子及胚胎经体外优化、筛选后染色体异常率降低有关。有研究^[5,7]显示,20~24 岁、40~44 岁、45 岁及以上流产率分别为 10%、51%、75%,≥39 岁年龄组约占总人数的 25%,21 三体综合征的发生率占 1.44%,显著高于 35~38 岁年龄组的 0.65%。这些研究^[5,7]表明,随着年龄增长,不仅流产率增加,染色体异常率也明显增高。本研究结果也证实,自然妊娠组 ≥35 岁患者染色体异常率高达 73.68%,显著高于 <35 岁的

48.99%。ART 组不同年龄间染色体异常率差异无统计学意义,可能与 ART 组 ≥35 岁例数偏少有关,尚需扩大样本量进一步验证。

有研究^[8]表明,不明原因性妊娠丢失与精子染色质的高频组装异常有关。本研究 ART 组中男方因素主要包括少、弱、畸形精子症、单/双侧输精管缺如、梗阻性无精子症等,其染色体异常发生率高达 48.39%,可能与该组患者 DNA 碎片指数较高有关,García-Ferreira et al^[9]研究表明,DNA 碎片指数较高组 (37.10 ± 17.61) 胚胎染色体非整倍体率显著高于 DNA 碎片指数较低组 (21.3 ± 13.48, 17.4 ± 10.79) (73.9% vs 61.1% vs 59.1%),由于精子核染色质的去凝作用以及随后形成的雄原核对正常受精和胚胎发育都至关重要,精子 DNA 碎片指数高表明染色质损伤,可降低受精能力和胚胎发育潜能,最终导致妊娠丢失^[8]。因此对 ART 后的早期流产应充分考虑到男方精子染色体异常因素,术前应常规检查男方精子染色体有无异常,以避免或减少早期妊娠丢失。

本研究中多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 患者绒毛染色体异常发生率为 30.00%,明显低于复发性流产和男方因素的患者,与 Wang et al^[10]报道的结果一致 (胚停组织染色体非整倍体发生率为 28.1%),结果表明,虽然 PCOS 患者早期流产率高达 50%,但染色体非整倍性可能并不是其早期流产的主要原因,而母体内分泌因素 (如高黄体生成素水平、高雄激素水平、孕酮产物异常、胰岛素抵抗) 及其导致的子宫内膜容受性降低可能是 PCOS 患者早期流产的主要风险因素。子宫内膜异位症患者染色体异常发生率与 PCOS 患者相近 (30.77%),可能与子宫内膜异位病灶的炎症反应、细胞因子的异常改变影响卵子成熟和质量以及子宫内膜容受性降低有关^[11]。

早期自然流产除表现为染色体异常率增高,还存在性别特异性胚胎淘汰现象^[12]。本研究 362 例绒毛组织中,胚停女胚占比高于男胚 (196 vs 166),但男胚异常核型占比高于女胚 (53.11% vs 46.89%),与其他研究者的报道^[13-14]一致,具体机制尚不清楚。

此外,本研究发现染色体结构异常占有较高的比重 (7.69%),占所有异常染色体核型的 15.73%,因此应重视早期流产染色体的结果异常。这可能与高通量测序技术相比于传统染色体核型分析和荧光原位杂交技术具有更高的检测深度和准确度有关。

高通量测序技术可检测到 0.5 Mbp 以上的染色体片段缺失,能发现更多的染色体片段微缺失和微重复等结构异常。

综上所述,自然流产胚胎染色体异常核型率高于 ART 组;年龄与胚胎染色体异常率增高有关;染色体数目异常是导致胚胎早期流产的主要原因,16 号染色体三体是最常见的胚胎染色体数目异常;胚停女胚占比高于男胚,但男胚异常核型占比高于女胚;应重视不明原因妊娠丢失的男方精子染色体异常。高通量测序技术相较于传统染色体核型分析和荧光原位杂交技术具有更高的检测深度和准确度,能发现更多的染色体结构和数目异常,对阐明早期流产的遗传学病因及再次妊娠的遗传咨询具有重要意义。

参考文献

- [1] Ouyang Y, Tan Y, Yi Y, et al. Correlation between chromosomal distribution and embryonic findings on ultrasound in early pregnancy loss after IVF-embryo transfer [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(10): 2212–8.
- [2] An N, Li L, Zhang X, et al. Result and pedigree analysis of spontaneously abortion villus chromosome detecting by FISH [J]. *Genet Mol Res* 2015, 14(4): 16662–6.
- [3] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage [J]. *Hum Reprod* 2012, 27(8): 2297–303.
- [4] 郭楠, 刘雨生, 周桂香, 等. 129 例自然妊娠与 ART 术后妊娠早期流产胎儿绒毛染色体核型分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(2): 163–6.
- [5] Tur-Torres M H, Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017, 42: 11–25.
- [6] 刘长明, 丛林, 袁静, 等. 荧光原位杂交技术联合染色体核型分析诊断胎儿 Turner 综合征 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(4): 389–91.
- [7] Zhu Y, Lu S, Bian X, et al. A multicenter study of fetal chromosomal abnormalities in Chinese women of advanced maternal age [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2016, 55(3): 379–84.
- [8] Leach M, Aitken R J, Sacks G. Sperm DNA fragmentation abnormalities in men from couples with a history of recurrent miscarriage [J]. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2015, 55(4): 379–83.
- [9] García-Ferreira J, Luna D, Villegas L, et al. High aneuploidy rates observed in embryos derived from donated oocytes are related to male aging and high percentages of sperm DNA fragmentation [J]. *Clin Med Insights Reprod Health* 2015, 9: 21–7.
- [10] Wang Q, Luo L, Lei Q, et al. Low aneuploidy rate in early pregnancy loss abortuses from patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biomed Online* 2016, 33(1): 85–92.
- [11] Pallacks C, Hirchenhain J, Krüssel J S, et al. Endometriosis doubles odds for miscarriage in patients undergoing IVF or ICSI [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017, 213: 33–8.
- [12] Lebedev I. Molecular cytogenetics of recurrent missed abortions [J]. *Indian J Med Res* 2006, 124(1): 9–10.
- [13] Russo R, Sessa A M, Fumo R, et al. Chromosomal anomalies in early spontaneous abortions: interphase FISH analysis on 855 FFPE first trimester abortions [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(2): 186–91.
- [14] Äyräs O, Eronen M, Tikkanen M, et al. The significance of gender in fetuses with increased nuchal translucency: pregnancy outcomes and long-term outcomes of children [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(9): 901–5.

Application of next-generation sequencing technique in chromosome karyotype analysis of spontaneous abortion villi

Fang Youyan, Wu Huan, He Xiaojin, et al

(*Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the occurrence of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion villi derived from both natural pregnancy (NP) and assisted reproductive technology (ART). **Methods** Chromosome karyotype analysis of fetal villi were carried out in 364 cases of abortion women through high-throughput sequencing technology, and the trisomy was grouped into A, B, C, D, E, F, G seven groups according to the karyotype of non-banding chromosome. **Results** ① Of the 364 cases, abnormal karyotypes were identified in 178 cases (48.90%), and the incidence of chromosomal abnormalities in NP group was significantly higher than ART group (52.85% vs 40.68%) ($P=0.033$). Moreover, trisomy was the most frequent abnormal karyotype (65.17%), followed by the copy number variation (15.73%); ② There was no significant difference in incidences of chromosomal abnormality between <35 years and ≥ 35 years in ART group, while which showed significant difference in NC group ($P=0.005$); ③ There were significant difference in incidence of chromosomal abnormality between female embryos and

七氟醚对肝脏缺血再灌注损伤所致术后认知功能变化的影响

高培, 李元海, 王义桥, 郝利娜

摘要 目的 观察七氟醚静吸复合麻醉对肝脏部分切除术患者肝脏缺血再灌注损伤所致术后认知功能变化的影响。方法 择期行肝脏部分切除术的肝脏肿瘤患者 40 例, 随机分为两组 ($n=20$): 实验组和对照组, 两组患者手术方式一致。于术前、术后 1、3、7 d 分别监测患者外周血肝功能指标谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST); 于术前 1 d、术后 7 d 行神经心理学组合测试, 根据 Z 值计算公式, 计算患者术后认知功能障碍 (POCD) 的发生率。结果 与术前比较, 患者血清 ALT、AST 术后明显升高, 实验组术后 1、3、7 d 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 实验组 Hopkins 言语学习测试、循迹连线测试 A、循迹连线测试 B、词语延迟记忆术前与术后成绩差值明显升高 ($P < 0.05$), 实验组和对照组 POCD 的发生率分别为 10% 和 30%, 对照组 POCD 的发生率明显高于实验组 ($P < 0.05$)。结论 七氟醚静吸复合麻醉可以减轻肝脏部分切除术后患者的缺血再灌注损伤, 减少 POCD 的发生。

关键词 肝脏手术; 七氟醚; 缺血/再灌注损伤; 术后认知功能障碍; 神经心理学测评

中图分类号 R 614.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0270-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.022

肝脏手术时为减少出血, 肝门阻断是常用的手段, 在解除肝门阻断恢复血流灌注后, 常会造成肝脏

缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)。HIRI 可导致肝脏组织变性坏死、肝功能下降, 同时可对远隔器官产生影响。研究^[1]表明, HIRI 可释放大量炎性介质, 是发生术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 的重要危险因素。七氟醚是目前广泛应用于临床的吸入麻醉药, 有报道^[2-3]称其对机体多个脏器功能均具有保护作用。该研究拟探讨七氟醚静吸复合麻醉对肝脏部分切除术中 HIRI 及其所致术后认知功能变化的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究已获安徽医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准, 并与患者或亲属签署知情同意书。选择择期行肝脏部分切除术的患者 40 例, 入选标准: 年龄 45~65 (53.33 ± 11.49) 岁, ASA II~III 级, 肝功能分级 A 级, 心功能 II~III 级, 简易智能量表 (MMSE) > 23 分, 术中均需行第一肝门阻断, 阻断时间 < 30 min, 预计手术时间 2~4 h。排除标准: 患者合并有严重肝肾功能障碍, 患有中枢神经系统和心理疾病及合并脑血管疾病, 服用镇静剂、抗抑郁药及精神活性药物滥用史, 酗酒, 有严重的视力、听力障碍或因其他原因不能配合完成认知功能测试者, 手术时间 < 2 h 或 > 4 h。实验分组: 采用随机数字表法, 将患者分为两组, 实验组: 采用七氟醚静吸复合麻醉, 对照组: 采用全凭静脉麻醉。

1.2 麻醉方法 患者术前禁食禁饮 8~12 h, 术前

2017-10-31 接收

基金项目: 安徽省公益性技术研究联动项目 (编号: 1704f0804021)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院麻醉科, 合肥 230022

作者简介: 高培, 女, 硕士研究生;

李元海, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: liyuanhai-1@163.com

male embryos (46.89% vs 53.11%, $P=0.007$); ④ Recurrent spontaneous abortion was the most common cause of infertility in ART group, and the incidence of villi chromosomal abnormality was up to 60.00%; ⑤ Chromosomal abnormalities in both female and male embryos were mainly distributed in group E and group G, while chromosomal abnormality of A group in male embryos were significantly more than female ($P=0.007$). **Conclusion** Numerical abnormalities of chromosomes are the most important cause of early spontaneous abortion, and karyotype analysis of the villus is helpful for identifying the cause of abortion and could provide some valuable information for genetic counselling of next pregnancy.

Key words next-generation sequencing technique; spontaneous abortion; chorionic villus; chromosome; karyotype analysis