

无创DNA在染色体非整倍体疾病中的作用

卞朝利

东莞明志医学检验实验室 广东 东莞 523830

【摘要】：目的：探究新一代测序技术的无创 DNA 产前检测 (NIPT) 在诊断胎儿染色体非整倍体疾病中的应用效果。**方法：**研究时间为 2021 年 1 月 -2022 年 12 月，研究对象为此期间在我院接受外周血中游离胎儿 DNA 检测的 840 例孕妇。以其血清学筛查结果以及孕妇年龄为依据对 840 例孕妇进行分组，为唐筛高危组、高龄组及其他因素组。提取孕妇外周血，血浆分离后提取胎儿游离 DNA 序列进行高通量测序分析，若检测结果为阳性，则需要行羊水穿刺或脐带穿刺，以此获得胎儿细胞，分析染色体核型并验证；若检测结果为阴性，则通过电话随访方式了解其胎儿出生后情况。**结果：**本次研究中共计 840 例孕妇完成游离 DNA 胎儿染色体非整倍体检测。其中，检测结果异常者共计 14 例，其中 12 例进行羊水或（和）脐带血产前诊断。8 例 21- 三体阳性者中，进行产前诊断例数为 7，6 例核型为 47, XN, + 21, 1 例核型为 21, 21, 21- 三体检测符合率为 100%。1 例 18- 三体阳性患者，进行产前诊断，核型为 47, XN, +18。18- 三体检测符合率为 100%。1 例 13- 三体阳性患者，未进行产前诊断，随访，流产。结果阴性者 826 例，对其在研究期间进行随访，新生儿并无异常情况。**结论：**新一代测序技术的无创 DNA 产前检测能够有效进行胎儿染色体非整倍体疾病诊断。

【关键词】：胎儿染色体非整倍体疾病；产前诊断；无创 DNA；新一代测序技术

The Role of Noninvasive DNA in Chromosome Aneuploid Diseases

Chaoli Bian

Dongguan Mingzhi Medical Laboratory Guangdong Dongguan 523830

Abstract: Objective: To explore the application of non-invasive DNA prenatal detection (NIPT), a new generation of sequencing technology, in the diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy. Methods: The study period was from January 2021 to December 2022. The subjects were 840 pregnant women who received free fetal DNA detection in peripheral blood in our hospital during this period. 840 pregnant women were grouped according to the results of serological screening and the age of pregnant women, and were divided into Tang screening high-risk group, elderly group and other factor groups. The maternal peripheral blood was extracted, and the fetal free DNA sequence was extracted after plasma separation for high-throughput sequencing analysis. If the test result was positive, amniocentesis or umbilical cord puncture was required to obtain fetal cells, analyze the chromosome karyotype and verify; If the test result is negative, the postnatal condition of the fetus will be known through telephone follow-up. Results: A total of 840 pregnant women completed the detection of fetal chromosomal aneuploidy with free DNA in this study. Among them, there were 14 cases with abnormal detection results, of which 12 cases underwent prenatal diagnosis of amniotic fluid or (and) umbilical cord blood. Among the 8 cases with trisomy 21 positive, the number of prenatal diagnosis cases was 7, the karyotype of 6 cases was 47, XN,+21, the karyotype of 1 case was 21, 21, and the coincidence rate of trisomy 21 detection was 100%. One patient with trisomy 18 positive underwent prenatal diagnosis. The karyotype was 47, XN,+18. 18 The coincidence rate of trisomy test was 100%. One case of trisomy 13 positive patient, without prenatal diagnosis, was followed up and aborted. Results 826 cases were negative. During the follow-up period, there was no abnormality in the newborn. Conclusion: The non-invasive prenatal DNA detection with the new generation sequencing technology can effectively diagnose fetal chromosomal aneuploidy disease.

Keywords: Fetal chromosomal aneuploidy disease; Prenatal diagnosis; Non invasive DNA; New generation sequencing technology

我国新生儿出生缺陷发生率较高，严重情况下患儿会受到较大影响，如智力发育障碍、器官功能缺损，甚至会出现终身残疾、死亡的情况，其家庭会面对巨大的精神压力与经济压力^[1]。以往临床中常使用羊膜腔穿刺、脐血穿刺、绒毛活检等方式进行产前诊断，会带给孕妇一定创伤，而且存在一定风险性，孕妇诊断耐受性与依从性并不理想。随着医疗技术不断进步，无创 DNA 产前检测技术 (NIPT) 逐渐应用于临床中，只需要取孕妇静脉血，通过新一代 DNA 测序技术对母体血浆中游离 DNA 片段进行测序，并对测序结果进行生物信息分析，最终明确胎儿是否存在三大染色体疾病，极大程度上降低了我国新生儿出生缺陷发生率。

染色体非整倍体异常时胎儿中较为常见的一种染色体

异常情况，几乎每三百个胎儿中就有一个胎儿发生，其主要包括 13- 三体综合征、18- 三体综合征、21- 三体综合征等^[2]。其中，21- 三体综合征也被叫做唐氏综合征。该疾病患儿主要症状为先天智力低下、五官畸形、四肢畸形等。因此，孕妇产前检查中进行胎儿染色体非整倍体疾病诊断是非常重要的，利于促进优生。本文将进行无创胎儿染色体非整倍体产前检测的孕妇作为研究对象，针对新一代测序技术的无创 DNA 产前检测在诊断胎儿染色体非整倍体疾病的价值进行探讨。现将具体内容进行如下汇报。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究时间为 2021 年 1 月 -2022 年 12 月，研究对象为此期间于我院进行接受外周血中游离胎儿 DNA 检测的 840

例孕妇，均为单胎妊娠，孕周 12-35 周。以其血清学筛查结果以及孕妇年龄为依据对 840 例孕妇进行分组，为唐筛高危组、高龄组及其他因素组。唐筛高危组 538 例，将 9-13 周早期唐筛及 15-20 周中期唐筛提示高风险的孕妇纳入一组；高龄组 252 例，预产年龄 ≥ 35 岁；其他因素组 50 例，包括羊水过多/少、胎儿侧脑室轻度扩张、B 超发现胎儿偏小、胎儿长臂回声增强、肱骨/股骨偏短、室间隔膜部缺损等等。孕妇与其家属了解本次研究内容，均为自愿参加，且已签署知情同意书。

1.2 方法

样本采集。孕妇参与检测前，医护人员需要为其进行无创 DNA 检测相关知识讲解。在羊水穿刺或脐带血穿刺等创伤性操作前，抽取待检测者 10ml 静脉血，使用 EDTA 抗凝管/CF 管保存，且需要做好相关标记。

血浆分离。样本采集后 8h 内，需要完成母血血浆分离工作：（1）4℃ 低温下 1600g 采血管离心，控制时间为 10min，分装上清到多个 2ml 离心管中。（2）4℃ 低温 16000g 下离心管离心，控制时间为 10min，将上清转入干净的 2ml 离心管中，进行编号，并将其置于 -80℃ 低温冰箱中进行保存。

血浆游离 DNA 提取。用于提取游离 DNA 的血浆总量应 ≥ 2 ml，使用配套试剂盒进行 DNA 提取，并对其浓度进行计量。样本检验完成后需要保存与 -20℃ 冰箱中，提取的游离 DNA 用于测序文库制备。

高通量测序。所有 DNA 样本检验合格后，应经过文库制备、测序簇生成后完成 36bp 单端深度为 0.06 $\times$ 的高通量测序。若检测结果为阳性，则需要进行羊水穿刺或脐带穿刺，以此获得胎儿细胞，分析染色体核型并验证；若检测结果为阴性，则通过电话随访方式了解其胎儿出生后情况。

1.3 观察指标

对各组孕妇无创 DNA 检测结果以及羊水染色体核型进行分析，详细记录结果。

1.4 统计学分析

收集、整理实验数据，采用 SPSS22.0 或以上统计学软件统计，计数资料采用 [n (%)]，分类变量运用 检验，等级资料比较采用秩和检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 孕妇外周血浆游离 DNA 胎儿非整倍体检测结果

本次研究中完成游离 DNA 胎儿染色体非整倍体检测共计三组(840 例)孕妇。检测结果表明，存在染色体异常 14 例。具体情况如表 1：

表 1 孕妇外周血浆游离 DNA 胎儿非整倍体检测结果

异常类别	唐筛高危组 (n=538)	高龄组 (n=252)	其他因素组 (n=50)	合计 (n=840)
21- 三体综合征	5	1	1	8
18- 三体综合征	1	0	0	1

13- 三体综合征	1	0	0	1
45, X	1	1	0	2
47, XXN	0	0	1	1
其他染色体异常	1	0	0	1

2.2 有创前诊断结果对比

840 例孕妇外周血游离 DNA 胎儿染色体非整倍体检测结果异常者共计 14 例，其中 12 例进行羊水或（和）脐带血产前诊断。

8 例 21- 三体综合征阳性者中，进行产前诊断例数为 7，6 例核型为 47, XN, + 21, 1 例核型为 21、21,21- 三体综合征检测符合率为 100%。

1 例 18- 三体综合征阳性患者，进行产前诊断，核型为 47, XN, +18。18- 三体综合征检测符合率为 100%。

1 例 13- 三体综合征阳性患者，未进行产前诊断，随访，流产。

2.3 阴性检测者随访情况

本次研究中，840 例接受无创 DNA 检测的孕妇中，结果阴性者 826 例。研究期间进行随访，新生儿并无异常情况。

3 讨论

我国出生缺陷率较高，每年出生的缺陷儿约有 100 万左右，在我国出生人口中占据较大比例。为了有效降低出生缺陷率，产前诊断是十分重要的一种手段。近年来，我国主要是通过母亲血清学标志物的检查，以及胎儿超声形态学检查，使用风险计算方法对胎儿罹患染色体疾病的风险进行计算，进而决定是否从采取侵入性产前诊断 [3]。诊断的染色体异常主要包括 21- 三体综合征、18- 三体综合征、13- 三体综合征、性染色体异常、三倍体等。然而，长期临床实践表明，常规血清学筛查、超声技术的敏感性与特异性并不十分理想，而传统侵入性产前诊断方式存在引发流产、感染等风险的可能，直接影响到产前诊断依从性。随着医疗技术不断进步，新一代测序技术逐渐应用与对孕妇进行外周血血浆有利 DNA 的检测，该方式通过非侵入性方法就能够完成对胎儿 13、18、21、X、Y 等染色体的检测，丰富了产前诊断方式。本文则以我院接收孕妇外周血血浆有利 DNA 检测的孕妇进行相关调查，对其其诊断价值进行评估。

13- 三体综合征、18- 三体综合征、21- 三体综合征、特纳综合征、克氏综合征在产前遗传疾病中占据较大比重，其中最为常见的是 21- 三体综合征。实际上，通过有效的产前筛查，经过检测孕妇血清中相关血浆蛋白 A、甲胎蛋白、人绒毛膜促性腺激素、游离雌三醇等相关指标，并进行计算分析，是能够对胎儿罹患 18- 三体综合征、21- 三体综合征、神经管缺陷风险的概率进行评估的。然而，受到技术的限制，存在较高的假阳性与漏诊几率。所以，临床中依然将创伤性方法作为产前诊断的主要方式。尽管实时荧光定量 PCR 技术、荧光原位杂交技术等方式可以较为快速的对部分染色体三体进行产前诊断，且准确率比较理想，但是羊膜腔穿刺、脐带血穿刺、绒毛活检等方式在取材时存在引发早产、

胎儿宫内死亡、羊膜腔内感染、羊水栓塞的可能^[4]。这些风险的存在会导致孕妇及其家属产生较大心理负担,而且筛查技术本身也存在假阳性的可能,导致产前诊断依从性降低。

新一代测序技术的无创 DNA 产前检测是一种较为科学的检验方式。由于孕妇血浆中的游离胎儿 DNA 具有含量高、半衰期短、提取容易等优点,所以称为临床中有效的胎儿基因物质来源。胎儿染色体非整倍体无创基因检测,主要是指对母体外周血血浆中提取的游离 DNA 片段进行高通量、大规模平行基因组测序,并以生物统计学为基础对测序结果进行信息分析,进而对胎儿染色体是否存在非整倍性变化进行分析,完成产前检测。需要注意的是,孕早期、孕中期是胎儿染色体非整倍体无创基因检测的最佳时期,具有灵敏度高、准确度高、无创取样、无流产风险的优势。羊水穿刺、脐血穿刺、绒毛穿刺等方式是临床产前诊断技术中较为常用的方式,在染色体核型分析中具有较高准确率,是临床中的金标准。

产前遗传病中,13- 三体综合征、18- 三体综合征、21- 三体综合征是占比是比较大的,因此为主要诊断内容。但产前筛查体系中假阳性率依旧是比较高的。对母体中孕期血清筛查出高风险的人群进行羊水穿刺,约有 2% 被检测出染色体异常发生率。除此之外,对于逐渐增加的高龄孕妇产前细胞遗传学诊断工作也需要重视,进而在一定程度上增加了产前诊断工作量^[5]。而且,从现有卫生资源情况来看,产前筛查后续诊断相关需要无法完全满足。本次研究中,对 840 例孕妇外周血游离胎儿 DNA 进行检测,并与

羊水或(和)脐带血产前诊断结果进行对比,18- 三体综合征、21- 三体综合征检出符合率为 100.00%。由此表明,可将新一代测序技术的无创 DNA 产前检测作为传统产前诊断的有效辅助方式。然而经过长期相关临床研究表明,该检测方式在其他染色体非整倍体异常的筛查中存在一定局限,无法对染色体结果异常情况进行有效筛查。为了确诊非整倍体、染色体结构异常情况,依然需要采用传统的羊水穿刺、脐带血穿刺等方式进行核型分析。因此,新技术在一定程度上存在不确定风险。经过对目前无创 DNA 检测在性染色体及其他染色体异常检测中的价值进行分析,准确性并不十分理想。分析可知,与母体自身染色体嵌合体、胎盘局限性嵌合体、测序深度不够等原因有很大联系,也有可能受到生物信息学分析过程中算法的影响,因此,有必要进一步改进相关算法。从目前无创 DNA 检测的情况来看,尽管依旧存在较多不足指出,但与传统产前筛查方式相比假阳性率高、侵入性检测带来创伤等不足相比,可以实现对胎儿染色体非整倍体疾病的无创检验,且灵敏度、准确度较为理想,可以作为传统产前诊断技术的辅助干预方式,具有较高临床使用价值。而且随着医疗技术的不断进步,生物信息算法也在不断优化,产前检测使用无创 DNA 方式也能够得到更为准确的染色体异常结果,临床中具有较好的应用前景。

综上所述,在产前诊断胎儿染色体非整倍体疾病中,使用新一代测序技术的无创 DNA 产前检测方式,结果较为准确,效果较为理想,对于促进优生,将滴出生缺陷率具有积极意义,值得在临床中进一步推广与使用。

参考文献:

- [1] 卢虞夫,赵靖,雷榆,韦思佳,张兢之,王正蓉,潘卫. 无创 DNA 产前检测对胎儿染色体非整倍体疾病筛查的临床意义[J]. 贵州医科大学学报,2022,47(05):598-603+620.
- [2] 钟艳娟,卢建,陈剑虹,闫梅,黄紫娟. 无创 DNA 产前检测在胎儿染色体非整倍体疾病及染色体拷贝数变异筛查中的研究[J]. 现代医药卫生,2022,38(03):494-497.
- [3] 吴寅,胡晓玲,何鑫,薛青霞. 无创产前 DNA 筛查联合颈项透明层厚度检测在胎儿染色体非整倍体疾病诊断中的应用[J]. 中国基层医药,2022,29(11):1639-1643.
- [4] 曾兰,邓艺,魏萍,邓光明,陈春,严梦珈,汪雪雁,李运星. 四川地区 58113 例无创 DNA 产前检测胎儿染色体非整倍体及其妊娠结局分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2021,29(05):658-663.
- [5] 王鹏,王金俏,顾丽泽,王亿,方媛,顾茂胜. 无创产前基因检测筛查胎儿染色体非整倍体疾病结果分析[J]. 中国校医,2021,35(11):830-832+835.