

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.04.017

染色体核型分析联合 CNV-Seq 检测在高龄孕妇产前诊断中的应用

马海霞¹, 冯丽云², 郭苑青², 何丽梅^{1△}

上海市长宁区妇幼保健院; 1. 检验科; 2. 产筛中心, 上海 200051

摘要:目的 探讨染色体核型分析与全基因组拷贝数变异测序(CNV-Seq)技术在高龄孕妇产前诊断中联合应用的意义。方法 对2020年1月至2022年12月该院收治的723例高龄孕妇的羊水细胞染色体核型分析、CNV-Seq检测结果进行回顾性分析。结果 723例高龄孕妇中检出染色体异常共29例,异常检出率为4.0%。723例高龄孕妇中检出核型异常21例,异常检出率为2.9%,其中染色体非整倍体13例,包括21-三体7例,18-三体1例,性染色体非整倍体5例;染色体嵌合3例,包括性染色体嵌合2例,常染色体嵌合1例;染色体结构异常5例,包括染色体倒位3例,染色体易位2例;检出CNV-Seq异常24例,异常检出率为3.3%,其中染色体非整倍体13例,包括21-三体7例,18-三体1例,性染色体非整倍体5例;染色体嵌合3例,包括性染色体嵌合2例,常染色体嵌合1例;致病性染色体拷贝数变异8例,包括染色体微重复1例,染色体微缺失7例。其中染色体非整倍体异常中染色体核型分析和CNV-Seq检测结果一致。结论 染色体核型分析联合CNV-Seq检测可提高染色体异常检出率,两种方法各自有独特的优势,可以相互验证,互补不足,染色体核型分析可比较直观地检测出染色体结构变异,而CNV-Seq可检测出染色体微缺失、微重复。

关键词: 染色体核型分析; 全基因组拷贝数变异测序; 高龄; 孕妇; 产前诊断

中图分类号: R446.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)04-0507-04

Application of chromosome karyotype analysis combined with CNV-Seq detection in prenatal diagnosis of elderly pregnant women

MA Haixia¹, FENG Liyun², GUO Yuanqing², HE Limei^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Screening Center, Shanghai Changning District Maternal and Child Health Hospital, Shanghai 200051, China

Abstract: **Objective** To explore the significance of the combined application of chromosome karyotype analysis and whole genome copy number variation sequencing (CNV-Seq) in the prenatal diagnosis of amniotic fluid in elderly pregnant women. **Methods** The chromosome karyotype and CNV-Seq detection results of amniotic fluid cells of 723 elderly pregnant women admitted to Shanghai Changning District Maternal and Child Health Hospital from January 2020 to December 2022 were analyzed retrospectively. **Results** Chromosome abnormalities were detected in 29 of 723 elderly pregnant women, with an abnormal detection rate of 4.0%. Among 723 elderly pregnant women, 21 cases were found with abnormal karyotype, the abnormal detection rate was 2.9%, including 13 cases of chromosome aneuploidy, including 7 cases of trisomy 21, 1 case of trisomy 18 and 5 cases of sex chromosome aneuploidy. There were 3 cases of chromosome mosaicism, including 2 cases of sex chromosome mosaicism and 1 case of autosomal mosaicism. There were 5 cases of chromosome structure abnormality, including 3 cases of chromosome inversion and 2 cases of chromosome translocation. CNV-Seq abnormalities were detected in 24 cases, with an abnormal detection rate of 3.3%, including 13 cases of chromosome aneuploidy, including 7 cases of trisomy 21, 1 case of trisomy 18 and 5 cases of sex chromosome aneuploidy. There were 3 cases of chromosome mosaicism, including 2 cases of sex chromosome mosaicism and 1 case of autosomal mosaicism. There were 8 cases of pathogenic chromosome copy number variation, including 1 case of chromosome microduplication and 7 cases of chromosome microdeletion. The results of chromosome karyotype analysis and CNV-Seq detection in chromosome aneuploidy were consistent. **Conclusion** Chromosomal karyotype analysis combined with CNV-Seq detection can improve the detection rate of chromosomal abnormalities. Each method has unique advantages and can mutually verify complementary deficiencies. Chromosomal karyotype analysis can intuitively detect chromosomal structural variations, while CNV-Seq can detect chromosomal microdeletions and microduplications.

Key words: chromosome karyotype analysis; whole genome copy number variation sequencing; elderly; pregnant woman; prenatal diagnosis

高龄孕妇是指年龄 ≥ 35 岁的孕妇。孕妇高龄是胎儿染色体异常的重要因素之一^[1]。胎儿染色体异常可引起胎儿组织、器官发育异常等。高龄可造成卵子老化、卵巢功能衰退,从而增加受精卵或生殖细胞减数分裂时染色体不分离的风险^[2]。一直以来传统的染色体核型分析技术作为实验室产前诊断的金标准,除了可以检测出染色体数目异常外,还可以检测出大片段的结构异常,但同时也存在耗时、耗力、培养周期长、只能检测 5 Mb 以上的异常等缺点^[3]。近年来,随着二代测序技术的快速发展,低深度全基因组拷贝数变异测序(CNV-Seq)被广泛应用于产前诊断领域,与传统的染色体核型分析技术相比,其有检测范围广、精准、通量高、成本低、操作简便等诸多优势,为染色体畸变及染色体拷贝数变异(CNV)检测提供了新的手段,但只能检测总体染色体数目的改变而不能检测结构的重排。本研究回顾性分析 2020 年 1 月至 2022 年 12 月本院 723 例高龄孕妇的羊水细胞染色体核型及 CNV-Seq 检测结果,探讨二者在高龄孕妇产前诊断中联合应用的意义,以期为临床医生提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月至 2022 年 12 月本院产前诊断中心就诊的 723 例高龄孕妇为研究对象。纳入标准:(1) 孕妇年龄 ≥ 35 岁;(2)均为单胎妊娠。排除标准:(1) 既往有不良孕产史;(2) 孕期接触过有毒、有害物质。所有孕妇孕周 18~26 周,年龄 35~44 岁,孕妇均签署知情同意后书后进行羊膜腔穿刺术,同时进行染色体核型分析和 CNV-Seq 检测。

1.2 方法

1.2.1 羊膜腔穿刺 B 超定位下严格无菌操作,经腹壁进行羊膜腔穿刺术,每例孕妇均抽取 3 试管羊水,每管 10 mL,共 30 mL,其中 2 管进行细胞培养染色体核型分析,1 管进行 CNV-Seq 检测。

1.2.2 染色体 G 显带染色体核型分析 2 管羊水分装于两支 15 mL 无菌离心管中,1 500 r/min 离心 10 min,留取 0.5~1.5 mL 沉淀,加 5 mL Gibco 培养基混匀后,进行细胞接种,培养 7 d 后观察细胞是否贴壁,如贴壁进行换液,当贴壁细胞生长旺盛可见 5~8 个大克隆时,加入 10 μ g/mL 秋水仙素 60 μ L,作用 3.0~3.5 h 后收获细胞制片并进行 G 显带,按照人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN2016) 标准进行分

析诊断,嵌合体通常计数 100 个细胞,必要时做 C 带分析。

1.2.3 CNV-Seq 检测 抽取 10 mL 羊水,送至华大基因公司完成分析。实际检测中主要针对染色体非整倍体变异和 100 kb 以上的 CNV,方法如下:按照试剂盒说明书从羊水细胞中提取分离并纯化基因组 DNA,并以此作为起始模板,构建 DNA 文库,进行测序。使用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,并通过检索 ISCA、Decipher、Clinvar 等数据库,参照美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 遗传变异分类标准与指南^[4]对检测到的 CNV 的致病性进行评估。结果分为 5 类:致病、可能致病、临床意义未明、可能良性、良性。

1.3 统计学处理 采用 Excel 2007 软件进行数据处理及统计分析。

2 结果

723 例高龄孕妇中检出染色体异常共 29 例,异常检出率为 4.0%。723 例高龄孕妇中,染色体核型分析检出核型异常 21 例,异常检出率为 2.9%,CNV-Seq 检测结果异常 24 例,异常检出率为 3.3%;核型异常中包括染色体非整倍体 13 例,染色体嵌合体 3 例,染色体结构异常 5 例;CNV-Seq 检测结果异常包括染色体非整倍体 13 例,染色体嵌合 3 例,致病性染色体拷贝数变异(pCNVs)8 例。

723 例高龄孕妇中检出染色体非整倍体 13 例,包括 21-三体 7 例,18-三体 1 例,性染色体非整倍体 5 例,其中 47,XXX 2 例、47,XYY 2 例、47,XXY 1 例,染色体核型分析结果与 CNV-Seq 结果均一致。见表 1。723 例高龄孕妇中检出染色体嵌合 3 例,包括性染色体嵌合 2 例,常染色体嵌合 1 例。染色体核型分析结果与 CNV-Seq 检测结果在嵌合比例上均不一致。见表 1。

723 例高龄孕妇中检出染色体结构异常 5 例,包括染色体倒位 3 例,染色体易位 2 例。染色体核型分析结果与 CNV-Seq 检测结果均不一致,其中 CNV-Seq 检测结果均未见异常。见表 1。

723 例高龄孕妇中检出 pCNVs 8 例,包括染色体微重复 1 例,染色体微缺失 7 例。染色体核型分析结果与 CNV-Seq 检测结果均不一致,其中染色体核型分析结果均未见异常。见表 1。

表 1 723 例高龄孕妇中羊水染色体核型分析异常与 CNV-Seq 检测结果比较

类别	染色体核型分析结果	CNV-Seq 检测结果	两种检测结果一致性	例数 (n)
染色体数目异常	47,XN,+21	seq[GRCh37]dup(21p13q22.3)48.13 Mb	一致	7
	47,XN,+18	seq[GRCh37]dup(18p11.32q23)78.08 Mb	一致	1
	47,XXX	seq[GRCh37]dup(Xp22.33q28)155.27 Mb	一致	2

续表 1 723 例高龄孕妇中羊水染色体核型分析异常与 CNV-Seq 检测结果比较

类别	染色体核型分析结果	CNV-Seq 检测结果	两种检测结果一致性	例数 (n)
染色体嵌合	47, XYY	seq[GRCh37]dup(Yp11.32q12)59.37 Mb	一致	2
	47, XXY	seq[GRCh37]dup(Xp22.33q28)155.27 Mb	一致	1
	45, X[3]/46, XX[52]	seq[GRCh37]del(Xp22.33q28)155.27 Mb 嵌合比例 19%	不一致	1
染色体结构异常	46, X, i(X)(q10)[81]/45, X[19]	seq[GRCh37]del(Xp22.33p11.21)54.26 Mb	不一致	1
	47, XY, +9[45]/46, XY[55]	seq[GRCh37]dup(9)(p24.3q34.3)141.21 Mb, 嵌合比例 18%	不一致	1
	45, XY, der(13;14)(q10;q10)	未见异常	不一致	1
染色体微重复	46, XX, inv(10)(q11.2q23)mat	未见异常	不一致	1
	46, XY, t(1;11)(q25;q13) pat	未见异常	不一致	1
	46, XY, inv(2)(p11.2q13)	未见异常	不一致	1
染色体微缺失	47, XX+21, inv(2)(q21q44)	未见异常	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]dup(4q22.1q22.1)	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]del(15q13.2q13.3)	不一致	1
染色体核型分析异常	未见异常	seq[GRCh37]del(16p12.2p11.2)	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]del(15q11.2q11.2)550.3 kb	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]del(15q11.2q11.2)1.03 Mb	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]del(6)(q27q27)3.87 Mb	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]del(20)(p12.2p12.2), 1.44 Mb	不一致	1
	未见异常	seq[GRCh37]del(14)(q12q12), 4.69 Mb	不一致	1
	未见异常			

3 讨 论

近年来,伴随“三孩”政策的落地,高龄孕妇比例不断增多。《低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识》^[5]为 CNV-seq 技术在产前诊断中的规范应用提供了指导建议。本研究通过回顾性分析 723 例高龄孕妇产前诊断中胎儿染色体核型分析及 CNV-Seq 异常检出情况,探讨二者联合检测在高龄孕妇产前诊断中的临床应用价值,为临床医生提供参考依据。

染色体非整倍体异常可引起严重的出生缺陷,是产前诊断中最为常见的胎儿染色体异常,染色体核型分析与 CNV-Seq 都可提示胎儿染色体非整倍体异常,二者联合应用可相互验证。本研究中 723 例高龄孕妇中检出染色体非整倍体 13 例,包括 21-三体 7 例,18-三体 1 例,性染色体非整倍体 5 例,染色体核型分析和 CNV-Seq 检测结果一致,提示染色体核型分析和 CNV-Seq 都可以准确地检测胎儿染色体的非整倍体异常。同时使用两种原理不同的检测技术可以相互验证其结果的准确性,以最大限度地降低缺陷儿的出生,减少漏诊、误诊。

本研究中 723 例高龄孕妇中检出染色体嵌合 3 例,包括性染色体嵌合 2 例,常染色体嵌合 1 例,但嵌

合比例核型与 CNV-Seq 检测结果均不一致。性染色体嵌合中 1 例核型分析结果为 45, X 嵌合比例为 5.5%,而 CNV-Seq 检测结果为 45, X, 嵌合比例为 19%, 1 例核型分析结果为 45, X 和 46, X, i(X)(q10) 的嵌合比例分别为 19%和 81%,而 CNV-Seq 检测结果为 X 染色体短臂缺失, 1 例常染色体嵌合中核型分析结果为 47, XY, +9 的嵌合比例为 45%,而 CNV-Seq 检测结果为 9 号染色体, 嵌合比例为 18%。提示由于染色体核型分析和 CNV-Seq 原理不同,在染色体嵌合体诊断中及嵌合比例分析中存在差异。有研究报道, CNV-Seq 联合染色体核型分析可弥补单一检测方法诊断嵌合体出现误诊的不足^[6], CNV-Seq 可检测低至 5%的嵌合体^[7]。染色体核型分析和 CNV-Seq 检测结果不一致的标本可通过荧光原位杂交(FISH)、多重连接依赖式探针扩增技术(MLPA)等第 3 种方法进行验证,为临床提供最准确的依据。

染色体核型分析可以检测染色体倒位、易位及罗伯逊易位的类型, CNV-Seq 可以检测有无致病性遗传物质的增多或减少,二者联合应用可明确胎儿染色体大片段重排的类型及意义。本研究中 723 例高龄孕妇中染色体核型分析检出染色体结构异常 5 例,包括染色体倒位 3 例,易位 2 例,而 CNV-Seq 检测结果未

见异常。有研究表明产前诊断标本中染色体罗氏易位和相互易位占比约为 0.89%和 1.82%^[8],若胎儿易位或倒位来自父母双亲之一,且没有总遗传物质的丢失或增加,则不影响胎儿的表型和智力发育^[9],孕妇可继续妊娠。若新发易位或倒位在发生重排的同时发生其他拷贝数变异,涉及致病性遗传物质的增多或减少,则孕妇需进行相应的遗传咨询决定是否继续妊娠。因此,倒位或相互易位的胎儿携带者需联合 CNV-Seq 检测确定染色体在发生重排的同时总体遗传物质是否发生了改变,以提高产前诊断的精准度,减少误诊、漏诊。

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,可通过改变分辨率、调整测序深度检测不同大小的 CNV,其优势主要包括操作简便、检测范围广、分辨率高、周期短、所需 DNA 样本量低^[10],WANG 等^[11]报道该技术与染色体核型分析比较,对致病性或可能致病的 CNV 检出率由 1.8%提高至 2.8%,可靠性和准确性较好,且适用性较好。本研究中所用的方法分辨率为 100 kb,可很好地弥补染色体核型分析分辨率低的不足。本研究 723 例高龄孕妇中 CNV-Seq 检出 pCNVs 8 例,包括染色体微重复 1 例,染色体微缺失 7 例,染色体核型分析均未见异常。CNV-Seq 检测可额外诊断染色体微缺失/微重复综合征,发病率为 1/50 000~1/400^[12]。染色体微缺失/微重复综合征会导致一些复杂临床表型,如智力发育异常、生长发育迟缓、内分泌异常、内脏器官畸形等,是染色体疾病中的常见类型,目前已发现 67 种染色体微缺失/微重复综合征。研究证实 CNV-Seq 能明显提高致病性染色体微缺失/微重复的检出率,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染色体核型分析和 CNV-Seq 有很重要的临床意义^[13-15]。

综上所述,在对高龄孕妇实施产前诊断时,染色体核型分析和 CNV-Seq 检测两种方法各自有独特的优势,联合使用可以相互验证,互补不足,染色体核型分析可比较直观地检测出染色体结构变异,而 CNV-Seq 可检测出染色体微缺失、微重复,有效提高染色体异常检出率,减少遗传缺陷患儿的出生,为临床的产前咨询提供有效、可靠的依据。

参考文献

[1] 林晓娟,唐中锋,宋筱玉,等. 甘肃地区 1 701 例高龄孕妇产前诊断结果临床分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2019,27(10):1196-1198.

[2] 张娜,颜梅珍,王元白,等. 高龄孕妇羊水染色体核型分析及拷贝数变异分析[J]. 西南医科大学学报,2021,44(2):

144-149.

[3] 修霞,张胜利,曾杰,等. 染色体畸变检测在自然流产绒毛组织染色体核型分析中的应用价值[J]. 中国综合临床,2016,32(10):950-953.

[4] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424.

[5] 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组,中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会,中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组. 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):293-296.

[6] 邓新娥,黄杏玲,王远流,等. 拷贝数变异测序在胎儿先天性心脏病产前遗传学诊断中的应用[J]. 中国生育健康杂志,2020,31(2):137-142.

[7] WANG Y, CHEN Y, TIAN F, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing[J]. Clin Chem, 2014, 60(1): 251-259.

[8] 代鹏,孔祥东. 355 例产前胎儿羊水细胞易位染色体核型分析及遗传咨询[J]. 中国优生与遗传杂志,2019,27(5): 560-563.

[9] KAIHUI Z, YAN H, RUI D, et al. Familial intellectual disability as a result of a derivative chromosome 22 originating from a balanced translocation(3;22) in a four generation family[J]. Mol Cytogenet, 2018, 11: 18.

[10] 刘洪倩,刘俊涛,邬玲仟,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):293-296.

[11] WANG J, CHEN L, ZHOU C, et al. Prospective chromosome analysis of 3 429 amniocentesis samples in China using copy number variation sequencing[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 219(3): 287. e1-287. e18.

[12] 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: 215-244.

[13] 汪菁,徐晶晶,陈玲,等. CNV-Seq 在高龄孕妇产前诊断中的应用[J]. 安徽医科大学学报,2019,54(10):1659-1662.

[14] 唐艳,卢守莲,王珏. 染色体核型分析联合 CNV-Seq 检测在高龄孕妇产前诊断中的临床应用[J]. 系统医学,2022,7(15):164-168.

[15] 冯暄,郝胜菊,张庆华,等. CNV-seq 技术在 1395 例高龄孕妇产前诊断中的临床应用评价[J]. 临床检验杂志,2022,40(3):190-193.