

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.04.005

CNVplex 联合 STR 技术在复发性流产遗传学查因中的应用*

杨 岚¹, 杨月芬², 王俏霞², 许逸琴², 杨灿锋¹, 肖建平^{1△}

(南京医科大学附属无锡妇幼保健院:1. 产前诊断中心;2. 计划生育中心, 江苏无锡 214002)

[摘要] **目的** 运用快速检测绒毛染色体拷贝数变化的方法探讨复发性流产查因途径。**方法** 对 60 例反复自然流产病例的绒毛样本(孕 13 周前)分别进行多重 DNA 拷贝数(CNVplex)和荧光原位杂交(FISH)技术检测,所有样本同时行绒毛培养核型分析验证。**结果** 48 例培养成功的复发性流产病例,染色体异常率为 60.42%。其中 48 例 CNVplex 检测结果与核型分析相一致;包括 20 例染色体正常者、23 例常染色体三体,3 例三倍体和 2 例 45,XO(Turner 综合征);而 FISH 检测结果中与核型分析结果相符的只有 38 例。对于非嵌合体和非结构异常样本,两种方法与细胞遗传学核型分析结果符合率分别为 100%(CNVplex)和 79.17%(FISH)。**结论** 应用 CNVplex 联合短串联重复序列(STR)技术可检测绒毛染色体拷贝数及检测 5 Mbp 以上的重复和缺失异常,利于分析流产病因。

[关键词] 绒毛膜绒毛;流产,习惯性;染色体;非整倍体;核型分析;拷贝数变化**[中图分类号]** R715.5;R711.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)04-0446-04

Application of CNVplex combined with STR assay for genetic etiology exploration in chorionic villus of recurrent spontaneous abortion*

Yang Lan¹, Yang Yuefeng², Wang Qiaoxia², Xu Yiqin², Yang Canfeng¹, Xiao Jianping^{1△}

(1. Prenatal Diagnosis Center; 2. Department of Family Planning, Wuxi Maternal and Child Health Hospital Affiliated Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214002, China)

[Abstract] **Objective** The study is to present a novel assay for rapid detection of fetal aneuploidies in chorionic villus for spontaneous abortion. **Methods** Fetal chorionic villus samples were collected from 60 cases of women diagnosed with recurrent spontaneous abortion (RSA) before 13 weeks gestation. All samples were analyzed using CNVplex (copy number variations multiplex) assay and fluorescence in situ hybridization (FISH) in addition to chromosome analysis. All villi specimens were cell cultured and karyotyped to confirm the fetal chromosomal status. **Results** Among 48 successfully cultured and karyotyped samples, the chromosomal abnormality rate was 60.42%. The results of karyotyping and the CNVplex assay were identical, both yielding 20 cases of euploidies, 23 autosomal aneuploidies, 3 triploidies and 2×monosomies (Turner Syndrome). However, FISH obtained only 38 results identical to karyotyping. Two cases of deletion and duplication of chromosome were also identified by CNVplex but not always by karyotyping. As for non-mosaic and non-structural abnormality samples, the concordance between cytogenetics and genotyping was 100% in CNVplex and 79.17% in FISH. **Conclusion** With CNVplex combined with STR (short tandem repeat) assay, we can detect the aneuploidy abnormalities as effectively as routine karyotyping without the need for cell culture, while also analyzing deletions and duplications (larger than 5 Mbp) that are not always detected by karyotype analysis. Our study demonstrates that CNVplex assay is an efficient, convenient, and accurate method to explore the etiology of miscarriage.

[Key words] chorionic villus; abortion, habitual; chromosome, aneuploidy; karyotyping; copy number variation

自然流产是妇产科的常见病、多发病之一,发生率达全部妊娠的 15%,近年有上升趋势。其原因众多,涉及遗传、解剖、免疫、内分泌、感染、环境及其他未知因素等^[1]。遗传因素尤其是染色体异常通常被认为是最常见的自然流产病因,研究证实,孕早期自然流产染色体异常发生率 50%~60%^[1-2],其中多数为染色体数目异常^[3-6]。因此对早期停育胚胎进行染色体分析十分重要。核型分析虽被认为是判断染色体结果的金标准,但从培养的绒毛细胞获取核型结果需时较长,且有一定的失败率。现今多种方法如 PCR 或 FISH 可用于检测染色体非整倍体异常^[7],其他诸如 QF-PCR、NGS、CMA 等虽都有不需细胞培养和快速诊断的优势^[2,8-9],但尚缺乏兼具低成本、高效、应用范围广泛的分子检测技术。本研究选用多重 DNA 拷贝数(CNVplex)联合短串联重复序列(STR)技术针对复发性流

产组织进行 24 种染色体的拷贝数检测,通过两种方法的阳性符合率比较,旨在探讨 CNVplex 联合 STR 技术在流产组织染色体快速诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014—2015 年经超声诊断胚胎停止发育在本院行清宫手术的孕妇 60 例,患者平均年龄 30.5 岁,排除全身性感染、外力、负重等因素。孕龄为 48~91 d。清宫手术时无菌采集绒毛组织约 10 g,显微镜下挑选绒毛 50 mg 左右,经处理分别按 CNVplex 技术及荧光原位杂交(FISH)法检测,所有样本同时进行绒毛细胞核型分析。

1.2 方法

1.2.1 绒毛细胞培养法 无菌采取清宫术标本放入无菌杯中,按标准方法^[10]用无菌生理盐水洗涤后,于显微镜下挑取优

* 基金项目:无锡市医管中心面上项目(YGZXMI510);江苏省妇幼保健重点资助项目(F201315);无锡市科技发展基金项目(CSE31N1511)。

作者简介:杨岚(1979—),副主任医师,硕士,主要从事产前筛查、产前诊断及研究。△ 通信作者,E-mail:jianpinx999@126.com。

质绒毛组织,切成碎片,接种于羊水培养基的培养瓶中,置 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养。静置 6~7 d 后,在倒置显微镜下观察,见到梭形细胞克隆后给予换液;继续培养 2~3 d,当出现较多圆形细胞时给予收获。

1.2.2 染色体制备与核型分析 将秋水仙素(10 g/mL)加入培养瓶中继续培养 4 h 后弃培养液,加入低渗液进行低渗处理 20 min,再进行预固定、固定、制片,80 ℃ 老化 2 h。常规 G 显带、姬姆萨染色。镜下计数 20 个核型。分析 5 个显带良好分裂相,嵌合体则增加中期相计数。

1.2.3 FISH 检测 FISH 根据 13、16、21、22 号染色体的单一序列探针,18,X,Y 着丝粒探针来分析分裂中期的绒毛染色体。根据说明书进行杂交、洗涤、复染、荧光显微镜分析。7 种不同的染色体荧光信号被用来分析每个样本的 100 个细胞,按操作规范进行结果分析。

1.2.4 CNVplex 和 STR 检测 (1)样本 DNA 提取:按常规提取方式对绒毛样本进行 DNA 提取(浓度不能低于 20 ng/ μ L);(2)连接反应:各反应管加入总量 150 ng 的相应体积的 DNA 样本,灭菌蒸馏水补至 8 μ L,阴性对照加 8 μ L 洗脱液。按说明书配制预混合液体系:混匀后每管分装 12 μ L 到反应孔中,置 PCR 仪上(ABI 2720 PCR 仪)进行如下反应:98 ℃ 2 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 3 h 5 个循环;60 ℃ 保存。连接反应共 15 h,反应结束后加入 10 μ L“终止液”终止反应并混匀;(3)连接产物多重荧光 PCR 扩增:对连接探针产物,进行多重 PCR 扩增。按说明书配制预混合液体系:混匀后每管分装 19 μ L,加入 1 μ L 连接产物,置 PCR 仪上进行扩增:95 ℃ 5 min;5 \times (94 ℃ 20 s,62 ℃-1 ℃/cycle 40 s,72 ℃ 1.5 min);94 ℃ 20 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,27 个循环;68 ℃ 1 h;保存于 4 ℃;(4)扩增产物荧光毛细管电泳分离:取 1 μ L 扩增产物稀释液与

0.1 μ L LIZ500,8.9 μ L Hi-Di 混匀,95 ℃ 变性 5 min 后置 ABI 测序仪(PRISM 3130XL)检测。数据由 Gene Mapper ID 4.0 (Applied Biosystems),CNVplex Converter (GeneSky)及 CNV Reader 1.0 (GeneSky)软件自动分析;(5)拷贝数计算;(6)结果判断:如果连续 5 个以上目标区的拷贝数值为 0.8~1.2,代表 1 个 CNV 拷贝;1.75~2.25 代表 2 个 CNV 拷贝;2.7~3.3 代表 3 个 CNV 拷贝;3.6~4.4 代表 4 个 CNV 拷贝。如果连续 3 个以上目标区的拷贝数值偏离正常拷贝数,并且至少 2 个检测值的拷贝数为 1,则这些探针决定区域判定为缺失(0~0.1或 0.8~1.2)或重复(2.7~3.3)。如果一染色体上至少连续 3 个探针的拷贝数值在 2.25~2.7,则提示可能为嵌合体或母血污染样本。(8)STR 检测:选取染色体 2、4、5、7、8、10、11、12、13、15、16、18、X、Y 上高杂合度的 17 个位点设计引物,对母血及绒毛组织样本分别进行 17 个 STR 位点的检测,同时对 17 个多重荧光 PCR 产物进行毛细管电泳分析,通过比较检测到的两者位点来源判断绒毛组织有无母血污染。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计处理,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 核型分析结果 在 60 例绒毛培养病例中,培养成功率 80%(48/60),其中阳性率为 60.42%(29/48),异常结果中,最常见的是 16(20.69%),21(13.79%),22(10.34%)号三体,三倍体(10.34%);其次为 X 单体,15,13 三体(均为 6.9%);最少见的是 3,7,10,11,12,和 20 号三体。同时笔者发现 2 例常染色体三体同时伴有 9 号臂间倒位;1 例 12 三体伴有 8 号染色体短臂末端缺失,见表 1。

表 1 应用 CNVplex,FISH 和核型分析检测的胎儿染色体结果

样本号	绒毛核型结果	CNVplex 结果	FISH 检测结果	CNVplex 与核型结果符合率(%)	FISH 与核型结果符合率(%)
1~19	46,XY/46,XX	46,XY/46,XX	normal	100	100
20	46,XX	46,XX(8p23.1:del;8q24.13:dup)	normal	100(数目一致)	100
21	47,XY,+16	47,XY,+16	Trisomy 16	100	100
22	47,XY,+16	47,XY,+16	Trisomy 16	100	100
23	47,XY,+16	47,XY,+16	Trisomy 16	100	100
24	47,XX,+16	47,XX,+16	Trisomy 16	100	100
25	47,XX,+16	47,XX,+16	Trisomy 16	100	100
26	47,XX,+16	47,XX,+16	Trisomy 16	100	100
27	47,XX,+21	47,XY,+21	Trisomy 21	100	100
28*	47,XY,+21	47,XY,+21	46,XY,60%/47,XY,+21,40%	100	部分
29	47,XX,+21	47,XX,+21	Trisomy 21	100	100
30	47,XX,+21	47,XX,+21	Trisomy 21	100	100
31	47,XX,+22	47,XX,+22	Trisomy 22	100	100
32	47,XY,+22	47,XY,+22	Trisomy 22	100	100
33	47,XY,+22	47,XY,+22	Trisomy 22	100	100
34	45,X	45,X	45,X	100(数目一致)	100
35	45,X	45,X	45,X	100	100
36	69,XXY	69,XXY	69,XXY	100	100
37	69,XXX	69,XXX	69,XXX	100	100
38*	69,XXX	69,XXX	69,XXX,40%/46,XX,60%	100	部分

续表 1 应用 CNVplex, FISH 和核型分析检测的胎儿染色体结果

样本号	绒毛核型结果	CNVplex 结果	FISH 检测结果	CNVplex 与核型结果符合率(%)	FISH 与核型结果符合率(%)
39	47,XX,+13	47,XX,+13	Trisomy 13	100	100
40	47,XY,+13,inv(9)	47,XY,+13	Trisomy 13	100(数目一致)	100(数目一致)
41	47,XX,+15	47,XX,+15	normal	100	0
42	47,XY,+15	47,XY,+15	normal	100	0
43	47,XY,+3	47,XY,+3	normal	100	0
44	47,XX,+11	47,XX,+11	normal	100	0
45	47,XY,+20	47,XY,+20	normal	100	0
46	47,XX,+10	47,XX,+10	normal	100	0
47	47,XY,+7,inv(9)	47,XY,+7	normal	100(数目一致)	0
48	47,XY,+12,8pter- 47,XY,+12;(8p23.3:del;18p11.21:dup)	47,XY,+12;(8p23.3:del;18p11.21:dup)	normal	100(数目一致)	0
异常率(%)	58.33	60.42	41.67	100(数目一致)	79.17 ^a

*:由 mini-STR assay 检测到的母血污染样本;^a: $\chi^2=11.16, P<0.01$,与 CNVplex 比较。

2.2 FISH 检测结果 在 48 例培养成功的绒毛样本中, FISH 检测成功率(100%)。其中包括 6 例 16 三体, 4 例 21 三体, 3 例 22 三体, 3 例三倍体, 13 三体和 X 染色单体各 2 例, 以及 28 例整倍体。与核型分析结果比较, FISH 检测的异常率为 41.67%(20/48), 另外 8 例三体征样本由于 FISH 探针的限制未能检出。FISH 检出两例嵌合体(46,XY,60%/47,XY,+21,40%;69,XXX,40%/46,XX,60%), 但最后被核型分析排除。与核型分析结果相比, FISH 检测总的符合率为 79.17%(38/48)。

2.3 CNVplex 检测结果 CNVplex 检测和核型分析获得了 47 个样本的一致结果, 包括 19 例正常整倍体, 23 例常染色体三体, 3 例三倍体, 2 例 X 染色单体。此外, CNVplex 还检出了 1 例 12 三体伴 8p23.1:del(34 Mbp); 18p11.21:dup(6 Mbp), 见图 1。1 例 46,XX 伴 8p23.1:del(5 Mbp); 8q24.13:dup(7 Mbp), 但这 2 例重复和缺失没有全部被核型分析所检出。在 CNVplex 方法中, 在染色体数目异常的结果符合率为 100%。同时, 联合 STR 检测两例绒毛样本被证实有母血污染, 见表 1, 图 2, 3。综上, CNVplex 对绒毛样本的检测成功率为 100%, 结果异常率为 60.42%(29/48)。

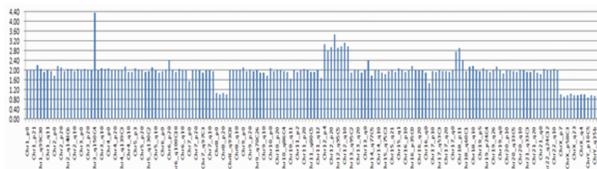
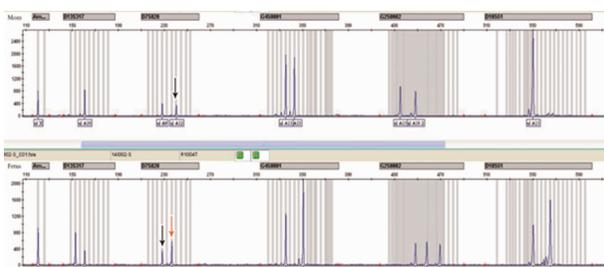
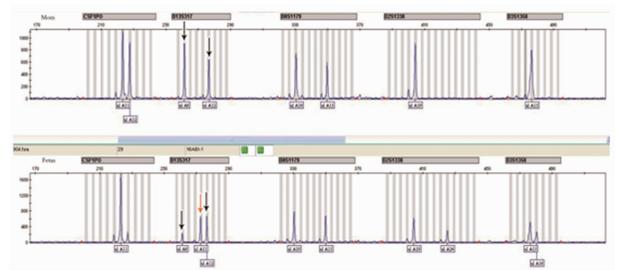


图 1 病例 47,XY,+12;(8p del;18p dup) 的 CNVplex 拷贝数检测结果示意图



STR 对 D7S820 位点的分型检测提示该绒毛样本的双等位基因 A11, A9 分别遗传其父母。

图 2 STR 检测的无母血污染的样本



STR 对 D13S317 位点的分型检测提示该绒毛样本一等位基因 A11 系遗传其父亲, 而另外与其母相同的 A8, A12 等位基因均在绒毛中检测到, 含母血污染。

图 3 STR 检测的有母血污染的样本

3 讨论

CNVplex 高通量基因拷贝数检测技术(以下简称 CNVplex 技术)是在多重连接探针扩增技术(MLPA)基础上改进的一个新技术, 它与 MLPA 比较, 优势在于探针分布广, CNVplex 每条染色体设计 5~8 个探针, 24 种染色体共计 170 个探针, 保证了染色体覆盖的广度和深度, 同时配以质控探针, 使检测结果更精准, 其操作更简便, 快捷, 通量高。该技术除可检测 24 种染色体数目异常, 还可检测 5 Mbp 以上的缺失或重复, 同时对可疑母血污染的绒毛及母血样本的 DNA 采用 STR 技术可检测个体识别位点而明确样本是否受母血干扰, 也可检出比较基因组杂交(CGH)技术不能检出的多倍体异常。准确的遗传学检测可减少异常流产患者不必要的额外检查, 减轻其心理压力^[11-12]。比较本研究两种方法与核型分析结果的符合率 [(79.17%(FISH) vs. 100%(CNVplex)], 对于非嵌合体和非常结构异常样本, 本研究结果显示 CNVplex 技术可快速、准确地检测所有染色体数目异常, 与 FISH 技术相比显得更有效($P<0.01$)。虽然 FISH 技术可通过分析更多细胞对嵌合体提供较传统核型分析更精确的估计^[13], 但本研究采用的 FISH 探针仅能检出 7 种染色体异常, 且无法排除母血污染。经 FISH 检测出的两例嵌合体 46,XY,60%/47,XY,+21,40% 和 69,XXX40%/46,XX,60%, 最终由核型分析分别验证为 47,XY,+21 和 69,XXX, 该结果由 STR 检测发现为母血污染所致。对于 FISH 技术, 尽管对于 13, 16, 18, 21, 22 三体, X 单体, 三倍体等数目异常的检测灵敏度是 100%, 但如不加以核型分析, 会有 28.6% 的数目异常病例漏检。如需检测所有染色体,

将极大增加 FISH 探针的试验成本,也不适于临床的广泛应用。

虽然细胞遗传学核型检查是诊断的金标准,能在较低分辨率下分析所有染色体的数目和结构异常,但由于流产绒毛的性状问题等有较高的培养失败率^[8,14],易出现漏诊。核型分析可检测平衡重排如易位、倒位等结构异常,本研究虽发现 2 例常染色三体伴 9 号染色体臂间倒位,但臂间倒位并非异常流产的主要原因,因而不影响 CNVplex 技术在产前检测绒毛染色体异常的临床应用。此外,CNVplex 发现两例缺失、重复异常(片段大小 5~7 Mbp),其中 1 例为 46,XX:8p23.1:del(5 Mbp);8q24.13:dup(7 Mbp),查询 OMIM 和 Decipher 基因数据库,8p23.1 区域包含 GATA4 基因,文献报道该基因的拷贝数异常可能影响胎儿心脏发育和导致胚胎停育^[15]。对该病例,虽没有染色体数目异常,但该区域缺失很可能是引起胚胎停育的主要因素。该异常在核型分析由于分辨率低而未能检出。因而,CNVplex 技术除了无需细胞培养、可快速检测所有染色体数目异常,还能检测核型分析无法检出的 5 Mb 左右的结构异常,可潜在地作为替代侵入性核型分析的一种产前诊断胚胎染色体异常的检测技术。

近年来,产前检测胎儿非整倍体疾病的分子诊断技术陆续涌现,如 Illumina 测序平台、ACGH、染色体微阵列分析技术(CMA)^[16-18]。虽然这些方法有较高的分辨率和准确度,但其检测成本远高于 CNVplex,此外,这些方法对生物信息学分析有着较高要求,且 ACGH 无法检测三倍体。而 QF-PCR 也可检测主要的三体征^[8,19],并能对产前样本的母血污染检测作出初步评估,但它无法检测染色体结构异常。CNVplex 的结果就非整倍体而言与核型分析结果都相一致,显示了在流产绒毛遗传检测中的良好诊断价值。但其不足之处是无法判断绒毛组织嵌合体样本的比例,这可通过核型分析进一步明确。

本研究显示复发性流产胚胎的非整倍体比例为 60.42%,其中三体征最常见,占比 79.3%(23/29),与之前的报道相符^[6,20],其次为三倍体 10.3%(3/29),单体征 6.9%(2/29)。对于染色体异常的咨询意见:对绒毛染色体数目异常,多数研究已报道为受精卵形成过程中染色体不分离所致,如双亲染色体正常,在排除内分泌、免疫、感染、解剖因素后,可在优生指导下自然受孕,如反复出现流产,可采取胚胎植入前诊断来筛选正常胚胎;对于胚胎染色体结构异常者,可进一步检查双亲,从而明确胚胎染色体结构异常的遗传来源,再根据双亲染色体结果对下次受孕进行咨询指导。而对于染色体正常样本,其病因可能与接触有害物质等环境因素有关^[21,22],或由某些特定基因的多态性或基因的插入/缺失导致^[23-25]。这些亚显微结构的遗传学病因,需应用 PCR-RFLP 或基于单核苷酸多态性(SNP)的微阵列分析技术进一步加以明确^[25-26],这有待于我们进一步探讨。

综上,本研究表明 CNVplex 技术是一种快速、准确、低成本的可检测流产组织染色体异常的新方法。准确提供遗传学检查结果不仅可有效减少异常流产患者的心理压力,同时有助于临床医师进行有效的遗传咨询,在优生遗传学领域有着重要的应用价值。

参考文献

[1] Alonso López AG, Bermejo Huerta S, Hernández Galván R, et al. Cytogenetic diagnosis of first trimester spontaneous abortion[J]. Ginecol Obstet Mex, 2011, 79(12): 779-

784.

- [2] Wang BT, Chong TP, Boyar FZ, et al. Abnormalities in spontaneous abortions detected by G-banding and chromosomal microarray analysis (CMA) at a National reference laboratory[J]. Mol Cytogenet, 2014, 7(7): 33-38.
- [3] Rolnik DL, Carvalho MH, Catelani AL, et al. Cytogenetic analysis of material from spontaneous abortion[J]. Rev Assoc Med Bras, 2011, 56(6): 681-683.
- [4] 熊丽, 刘杰, 邓康, 等. 早期自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(1): 64-67.
- [5] Andrews WW. What is new in stillbirth: Important recent articles[J]. Obstet Gynecol, 2015, 125(1): 160-161.
- [6] Suciu N, Plaiasu V. A time stamp comparative analysis of frequent chromosomal abnormalities in Romanian patients[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014, 27(1): 1-6.
- [7] Grimshaw GM, Szczepura A, Hultén M, et al. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities[J]. Health Technol Assess, 2003, 7(10): 1-146.
- [8] Donaghue C, Mann K, Docherty Z, et al. Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis[J]. Prenat Diagn, 2010, 30(2): 133-137.
- [9] Deng YH, Yin AH, He Q, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(4): 641-646.
- [10] Smidt-Jensen S, Christensen B, Lind AM. Chorionic villus culture for prenatal diagnosis of chromosome defects: reduction of the long-term cultivation time[J]. Prenat Diagn, 1989, 9(5): 309-319.
- [11] Nikcevic AV, Tunkel SA, Kuczmierczyk AR, et al. Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1999, 106(8): 808-813.
- [12] Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, et al. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages[J]. Hum Reprod, 2005, 20(5): 1235-1243.
- [13] Haoud K, Mellali S, Gouas L, et al. Prevalence of aneuploidies in products of spontaneous abortion: interest of FISH and MLPA[J]. Morphologie, 2014, 98(320): 40-46.
- [14] McClelland LS, Allen SK, Larkins SA, et al. Implementation and experience of an alternative QF-PCR and MLPA diagnostic strategy to detect chromosomal abnormalities in fetal and neonatal pathology samples[J]. Pediatr Dev Pathol, 2012, 14(6): 460-468.
- [15] Yu S, Zhou XG, Fiedler SD, et al. Cardiac defects are infrequent findings in individuals with 8p23.1 genomic duplications containing GATA4[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(6): 620-625.
- [16] Xie W, Tan Y, Li X, et al. Rapid detection of aneuploidies on a benchtop sequencing platform[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(3): 232-237.

Res, 2003, (3): 243-247.

- [3] Latessa V, Fotis T. Ultrasound-guided thrombin injection for treatment of iatrogenic femoral pseudo-aneurysm: a nursing protocol[J]. *J Vasc Nurs*, 2013, 31(4): 165-171.
- [4] Coley BD, Roberts AC, Fellmeth BD, et al. Postangiographic femoral artery pseudo aneurysms: further experience with US-guided compression repair[J]. *Radiology*, 1995, 194(2): 307-311.
- [5] Lumsden AB, Miller JM, Kosinski AS, et al. A prospective evaluation of surgically treated groin complications following percutaneous cardiac procedures[J]. *Am Surg*, 1994, 60(2): 132-137.
- [6] Kuma S, Morisaki K, Kodama A, et al. Ultrasound-guided percutaneous thrombin injection for post-catheterization pseudoaneurysm[J]. *Circ J*, 2015, 79(6): 1277-1281.
- [7] Kleczynski P, Rakowski T, Dziewierz A, et al. Ultrasound-guided thrombin injection in the treatment of iatrogenic arterial pseudoaneurysms: single-center experience[J]. *J Clin Ultrasound*, 2014, 42(1): 24-26.
- [8] Santos MB, Silva S, Bettencourt V, et al. Ultrasound-guided thrombin-gelatin injection is effective for the treatment of iatrogenic femoral artery pseudoaneurysms: initial results. [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2013, 81(2): 303-307.
- [9] Dzijan-Horn M, Langwieser N, Groha P, et al. Safety and efficacy of a potential treatment algorithm by using manual compression repair and ultrasound-guided thrombin injection for the management of iatrogenic femoral artery pseudoaneurysm in a large patient cohort[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2014, 7(2): 207-215.
- [10] Pezzullo JA, Dupuy DE, Cronan JJ. Percutaneous injection of thrombin for the treatment of pseudoaneurysms after

catheterization: an alternative to sonographically guided compression[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2000, 175(4): 1035-1040.

- [11] Krueger K, Zaehring M, Strohe D, et al. Postcatheterization pseudoaneurysm: results of US-guided percutaneous thrombin injection in 240 patients[J]. *Radiology*, 2005, 236(3): 1104-1110.
- [12] Kleczynski P, Rakowski T, Dziewierz A, et al. Ultrasound-guided thrombin injection in the treatment of iatrogenic arterial pseudoaneurysms: single-center experience[J]. *J Clin Ultrasound*, 2014, 42(1): 24-26.
- [13] Stone PA, AbuRahma AF, Flaherty SK, et al. Femoral pseudoaneurysms[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2006, 40(2): 109-117.
- [14] Vlachou PA, Karkos CD, Bains S, et al. Percutaneous ultrasound-guided thrombin injection for the treatment of iatrogenic femoral artery pseudoaneurysms[J]. *Eur J Radiol*, 2011, 77(3): 172-174.
- [15] Yalcin MU, Gurses KM, Kocyigit D, et al. Expect the unexpected: acute and subacute coronary stent thrombosis following percutaneous thrombin injection for treatment of femoral pseudoaneurysm[J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(12): 1732.
- [16] 晋军, 黄岚, 覃军, 等. 超声下凝血酶注射治疗假性动脉瘤[J]. *重庆医学*, 2007, 36(12): 205-208.
- [17] Jacek K, Marcin S, Agnieszka J. Complications of percutaneous thrombin injection in patients with postcatheterization femoral pseudoaneurysm [J]. *J Clin Ultrasound*, 2015, 79(6): 1277-1281.

(收稿日期: 2016-09-21 修回日期: 2016-10-19)

(上接第 449 页)

- [17] Viaggi CD, Cavani S, Malacarne M, et al. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH[J]. *J Appl Genet*, 2013, 54(3): 353-359.
- [18] Dhillon RK, Hillman SC, Morris RK, et al. Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities in miscarriage: a systematic review and meta-analysis[J]. *BJOG*, 2014, 121(1): 11-21.
- [19] 胡婷, 刘洪倩, 朱红梅, 等. 多重定量荧光 PCR 在胎儿常见染色体非整倍体快速诊断中的应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(2): 214-218.
- [20] Jenderny J. Chromosome aberrations in a large series of spontaneous miscarriages in the German population and review of the literature[J]. *Mol Cytogenet*, 2014, 7: 38-46.
- [21] Zhang BY, Wei YS, Niu JM, et al. Risk factors for unexplained recurrent spontaneous abortion in a population from southern China[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2010, 108(2): 135-138.
- [22] Pan X, Liu X, Li X, et al. Association between environ-

mental dioxin-related toxicants exposure and adverse pregnancy outcome: systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Fertil Steril*, 2015, 8(4): 351-366.

- [23] 何淼, 康冰, 廖世秀, 等. 河南地区汉族人群原因不明复发性流产与 HLA-DRB1 等位基因多态性的相关性[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(4): 504-507.
- [24] Zong C, Sha Y, Xiang H, et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphism and the risk of recurrent spontaneous abortion in Chinese Han population[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(3): 379-382.
- [25] Levy B, Sigurjonsson S, Pettersen B, et al. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis[J]. *Obstet Gynecol*, 2014, 124(2 Pt 1): 202-209.
- [26] Naderi-Mahabadi F, Zarei S, Fatemi R, et al. Association study of forkhead box P3 gene polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *J Reprod Immunol*, 2015, 110: 48-53.

(收稿日期: 2016-09-24 修回日期: 2016-10-22)