

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.21.029

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200717.1703.024.html\(2020-07-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200717.1703.024.html(2020-07-17))

111 例早期胚胎停育患者绒毛染色体测序分析*

白小青,白 微,周林双,蔡文品[△]

(浙江中医药大学附属温州中医院检验科,浙江温州 325000)

[摘要] **目的** 探讨胚胎停育患者绒毛组织染色体拷贝数变异分布情况及其可能的影响因素。**方法** 选择该院 2018 年 4 月至 2019 年 10 月 111 例确诊为胚胎停育患者的流产绒毛组织,进行高通量测序,统计总异常率、染色体数目异常率、拷贝数变异异常率,同时比较分析不同年龄(≥ 35 、 < 35 岁)组间染色体异常检测率的差异。**结果** 111 例胚胎停育患者中绒毛染色体正常 33 例(29.73%),染色体异常 78 例(70.27%)。78 例染色体异常患者中数目异常 64 例(82.05%),其中染色体三体型有 39 例(60.94%),嵌合体有 9 例(14.06%),三倍体 8 例(12.50%),四倍体 1 例(1.56%),X 染色体缺失 6 例(9.38%),三倍体且三体 1 例(1.56%);14 例(17.95%)染色体结构异常患者中染色体缺失 8 例(57.14%),染色体重复 1 例(7.14%),染色体缺失且重复 5 例(35.71%)。 < 35 岁组 79 例患者中染色体异常 51 例(64.56%), ≥ 35 岁组 33 例患者中染色体异常 27 例(81.82%),两组患者染色体异常率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.282, P < 0.05$)。**结论** 孕妇染色体数目异常是早期胚胎停育的主要原因,高龄是胚胎染色体异常的高危因素。

[关键词] 高通量测序;胚胎停止发育;绒毛;染色体畸变;拷贝数变异**[中图法分类号]** R714.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)21-3634-04

Analysis of sequencing of chorionic chromosome in 111 cases of early embryo damage*

BAI Xiaoqing, BAI Wei, ZHOU Linshuang, CAI Wenpin[△]

(Affiliated Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution situation of chromosomal copy number variation in the chorionic tissue of the patients with embryo damage and its possible influencing factors. **Methods** One hundred and eleven cases of abortion chorionic tissue in the patients with embryo damage in this hospital from April 2018 to October 2019 were selected to conduct the high throughput sequencing and statistics on the total abnormality rate, chromosome number abnormality rate and copy number mutation anomaly rate, meanwhile the differences of chromosome abnormality detection rate were compared between different age groups (≥ 35 , < 35 years old) and analyzed. **Results** Among 111 cases of embryo damage, 33 cases (29.73%) were normal villi chromosome and 78 cases (70.27%) were chromosomal abnormalities, in which, 64 cases (82.05%) were chromosome number anomaly, including 39 cases (60.94%) of trisomy, 9 cases (14.06%) of mosaicism, 8 cases (12.50%) of triploidy, 1 case (1.56%) of tetraploid, 6 cases (9.38%) of X chromosome deletion, and 1 case (1.56%) of triploid with trisomy; among 14 cases (17.95%) of abnormal chromosome structures, including 8 cases (57.14%) of chromosome deletion, 1 case (7.14%) of chromosome duplication, and 5 cases (35.71%) of chromosome deletion with duplication. Among 79 cases in the < 35 years old group, there were 51 cases (64.56%) of chromosomal abnormalities and 27 cases (81.82%) of chromosomal abnormalities among 33 cases in the ≥ 35 years old group, and the difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2 = 4.282, P < 0.05$). **Conclusion** The chromosome number abnormality of pregnant women is the main cause of early embryo damage, and the advanced age is a high risk factor for the embryo chromosomal abnormality.

[Key words] high throughput sequencing; embryonic cessation of development; villus; chromosome aberrations; copy number variations (CNVs)

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019331991);浙江省温州市科技计划项目(Y20180285)。 作者简介:白小青(1992—),检验师,本科,主要从事临床检验诊断学研究。 [△] 通信作者, E-mail: cwp1820@163.com。

胚胎停育是指由于某些原因早期胚胎在 12 周前于宫腔内停止发育,近年来临床上该病发病率明显增加^[1]。胚胎停育的原因包括感染、染色体异常、母胎血型不合、内分泌异常、免疫环境因素等^[2-3],其中染色体异常是引起胚胎停育的主要原因^[4]。高通量测序技术是一种通过对染色体进行全基因组扫描来检测染色数目和结构异常的技术,其高分辨率及高敏感性与其他检测技术相比具有很大优势。作者通过分析本院 111 例胚胎停育患者流产物绒毛组织染色体拷贝数变异情况,以为该疾病病因的探索提供一定的数据基础,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 4 月至 2019 年 10 月在本院以先兆流产收入住院治疗而发生早期胚胎停育的患者 111 例,年龄 22~44 岁,平均(31.91±4.63)岁。111 例患者均自愿选择高通量测序技术检测流产绒毛染色体,且患者在此次孕期均已排除支原体、衣原体及优生五项(TORCH)感染病史,患者均签署知情同意书,本研究获得医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 标本处理

流产绒毛组织经生理盐水反复冲洗漂净后置冰盒送杭州迪安医学检验中心检测,采用广州达瑞生物有限公司配套试剂盒,所有操作严格按照标准操作流程进行。

1.2.2 主要仪器

达安基因测序仪 DA8600,购自中国中山大学达安基因股份有限公司。

1.2.3 分析软件及结果解读

利用染色体非整倍体检测数据分析系统进行数据分析,得到每个测序样本的 R 值,根据参考范围进行结果判断。R 值是每个样本不同染色体区域是否存在差异的一个反应指标。它是通过对每个样本中拷贝数数据进行对数校正,然后使用圆二分法(circular binary segmentation, CBS)直接对校正后的数据寻找差异明显的区域,并根据大量正常样本对结果进行校正,筛选出明确的变异区间,获得 1 个区域的存在拷贝数变异(Copy number variations, CNV)的反应指标。对 88 例已知拷贝数位点区域的样本进行测序结果评估,计算假阳性与假阴性,并分析其特异度、灵敏度,作出受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,最后得出正常样本的 R 值参考范围为-0.2~0.2,超出该范围则存在 CNV。如果 R 值在 0.1~0.2(或者-0.2~-0.1)的区域为灰区,即不能准确判断是否存在 CNV, R 值在-0.1

~到 0.1,该区域无 CNV, R 值高于 0.2(或小于-0.2)则该区域存在 CNV。基因 CNV 的解读遵循美国医学遗传与基因组学学会(American College of medical genetics and genomics, ACMG)指南,仅对片段大于 100 kb 的缺失/重复区域进行分析。根据患者年龄,将样本分为两组,其中,<35 岁组 79 例,≥35 岁组 33 例。

2 结果

2.1 染色体异常情况

111 例胚胎停育患者中绒毛染色体正常者 33 例(29.73%),绒毛染色体异常者 78 例(70.27%)。78 例绒毛染色体异常患者中数目异常 64 例(82.05%),染色体结构异常 14 例(17.95%)。64 例染色体数目异常患者中,染色体三体型有 39 例(60.94%),嵌合体有 9 例(14.06%),三倍体 8 例(12.50%),四倍体 1 例(1.56%),X 染色体缺失 6 例(9.38%),另检出 1 例三倍体且三体(1.56%);14 例染色体结构异常患者中,染色体缺失 8 例(57.14%),染色体重复 1 例(7.14%),染色体缺失且重复 5 例(35.71%)。64 例绒毛染色体数目异常核型结果,见表 1。染色体结构异常为局部染色体缺失或重复,14 例染色体结构异常中检出 CNVs 18 种,查询基因组良性变异数据库(database of genomic variants, DGV)、基因组拷贝数变异疾病数据库(clinical relevance of genes, ClinGen)、人类基因组结构变异数据库(database of chromosomal imbalance and phenotype in human using ensembl resource, DECIPHER),11 种被判定为致病性 CNVs,3 种疑似致病性,4 种致病性未知,见表 2。

表 1 绒毛染色体数目异常核型统计结果[n(%), n=64]

染色体序号	构成	染色体序号	构成
3 号染色体	1(1.56%)	15 号染色体	4(6.25%)
4 号染色体	2(3.13%)	16 号染色体	12(18.75%)
5 号染色体	1(1.56%)	20 号染色体	2(3.13%)
6 号染色体	1(1.56%)	21 号染色体	1(1.56%)
8 号染色体	2(3.13%)	22 号染色体	11(17.19%)
9 号染色体	5(7.81%)	7+21 号染色体	1(1.56%)
10 号染色体	1(1.56%)	X 染色体	8(12.5%)
12 号染色体	1(1.56%)	多倍体	10(15.63%)
14 号染色体	1(1.56%)		

2.2 染色体异常情况与年龄的关系

<35 岁组 79 例患者中染色体异常 51 例,异常率为 64.56%; ≥35 岁组 33 例患者中染色体异常 27 例,异常率为 81.82%。两组患者染色体异常率比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.282, P<0.05$)。

表 2 染色体结构异常 CNVs 统计结果

染色体缺失或重复片段	n	查询公共数据库注释
1q41-q44 区域 30.15 Mb 缺失;14q13.3-q32.33 区域 70.65Mb 重复	1	为致病性 CNVs;为致病性 CNVs
13q32.1-q34 区域 18.75 Mb 缺失;6q23.2-q24.3 区域 8.95Mb 重复	1	为致病性 CNVs;疑似致病 CNVs
7q36.1-q36.3 区域 8.00 Mb 缺失;5p15.32-p15.33 区域 4.75Mb 重复	1	为致病性 CNVs;为致病性 CNVs
18p11.21-p11.32 区域 13.85 Mb 缺失;18q11.1-q23 区域 59.49Mb 嵌合型重复	1	为致病性 CNVs;为致病性 CNVs
13q21.2-q34 区域 54.95 Mb 缺失;11p15.3-p15.5 区域 10.85Mb 重复	1	为致病性 CNVs;为致病性 CNVs
11p11.2-p11.1,q11-q11 区域 6.60 Mb 嵌合型缺失	1	致病性未知 CNVs
16p11.1-p11.1,q11.1-q11.2 区域 11.95 Mb 嵌合型缺失	1	致病性未知 CNVs
5p12-p11,q11.1-q11.1 区域 4.10 Mb 嵌合型缺失	2	疑似致病 CNVs
511p11.2-p11.1,q11-q11 区域 6.50 Mb 嵌合型缺失	1	致病性未知 CNVs
Xq27.1-q27.3 区域 4.79 Mb 嵌合型缺失	1	致病性未知 CNVs
Xq11.1-q21.1 区域 14.80 Mb 嵌合型缺失	1	为致病性 CNVs
18p11.32 区域 1.05 Mb 缺失	1	为致病性 CNVs
Xp22.31 区域 1.65 Mb 重复	1	疑似致病 CNVs

3 讨 论

目前国内传统的染色体检测方法有 G 显带染色体核型分析但耗时长易污染;荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)、微阵列比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybridization, array-CGH)、单核苷酸多态性微阵列(array single nucleotide polymorphism, SNP array)可快速准确的检测染色体数目和结构异常,但上述所有方法并未涵盖所有染色体,只能对有限的已知染色体异常进行诊断^[5-6]。本研究中高通量测序的原理为半导体测序(semiconductor sequencing platform, SSP),操作简便无需细胞培养,测序数据通过生物信息学分析,即可准确分析流产样本染色体数目异常及 100 kb 以上的染色体缺失或重复的异常状况。其利用芯片测序,可在数百万个点上同时阅读测序,将平行处理的思想用到极致且成本相对低廉^[7]。通过这种对样本染色体异常状况进行分析,再结合夫妻双方的遗传背景,即可辅助分析样本的遗传信息,可为后续的预防和诊断治疗提供科学依据。

胚胎停育是指妊娠早期胚胎发育自然终止,通常以稽留流产和不全流产为结局。胚胎停育发病率的逐年增加及其发生的危险因素复杂多样,已经严重影响育龄女性的身心健康。本研究中,绒毛染色体的异常发生率为 70.27%,略高于文献[8]报道,可能和本研究的检测方法有关,本研究采用 SSP 技术进行检测,目前该技术能检测出亚显微结构的微缺失或者微重复,很大程度上提高了绒毛染色体异常检出率。本研究中染色体数目异常有 64 例(82.05%),可见染色体数目异常是胚胎停育的主要原因,异常染色体除 1、2、11、13、17~19 号染色体外均有检出,其中以 16 号

(12 例)、22 号(11 例)染色体最为多见,与文献[9]相符合。本研究检测到 X 染色体缺失 6 例(45,X),另外检出嵌合型 X 染色体缺失(45,X)2 例。X 染色体单体也称为特纳综合征(Turner syndrome, TS),在新生女婴中 TS 的发病率约为 1/5 000,但在自发流产胎儿中为 18%~20%^[10]。本研究检测到三倍体 8 例,在 64 例染色体数目异常中检出率为 12.50%,三倍体危害极大,许多三倍体胎儿在怀孕前三个月易发生自然流产,少数存活的婴儿带有多种如生长迟缓、先天性心脏缺陷、神经管缺如、脊柱裂等缺陷^[11]。本研究还检测到染色体嵌合体 9 例(14.06%),嵌合体是指同一个体内存在两种或两种以上不同的细胞系,是由于细胞有丝分裂不分离或染色体丢失所引起的。还检出染色体结构异常 14 例(17.95%),与文献[12]报道一致,14 例样本中共发现 18 种改变,多数改变在同一样本中既缺失又重复,这些 CNVs 中包含了一些临床意义明确的基因组区域,例如,14q13.3-q32.33 区域中的重复为 Frias 综合征的明确致病区域,该综合征特征是轻度突眼,第二和第三手指之间的近端合并,脚趾宽小和身材矮小等;16q23 的微重复可能导致发育迟缓、自闭症脑积水等^[13];此外本研究检出 5p12-p11,q11.1-q11.1 区域 4.10 Mb 嵌合型缺失 2 例,该 CNV 在 3 个数据库中均无致病性记录,还需要更进一步研究分析和致病性间的关系。本研究数据中缺失长度最大为 54.95 Mb,判定为致病性 CNVs,临床表现为发育迟缓、智力异常等。有研究表明,CNVs 缺失与临床表型之间存在基因的剂量效应,缺失未达到无法补偿的剂量则无临床表现;缺失剂量达到无法补偿剂量则出现临床表现^[14]。缺失或重复的 CNVs 可改变基因结构影响其表达从而引起

相应的病理性表型。

本研究结果表明,年龄升高,是染色异常发生率的重要因素。随着年龄增长,卵母细胞发生凋亡及卵巢周围微环境改变导致卵细胞发生异常^[15],因而高龄是胚胎停育的高危因素之一。

本研究所用的 SSP 原理相对简单,测序偏差较小具有高灵敏度和特异度,测序覆盖均衡度高,费用相对较低廉,所用时间明显优于传统技术。SSP 检测技术用于全基因组水平 CNV 检测,其不足之处在于不能检测染色体平衡易位、倒位、低比例嵌合、点突变情况,不能检测串联重复序列扩增导致的遗传病^[16],也不能检测样本中包含的低于本检测平台极限分辨率的 CNV,不排除有更小的染色体结构或基因片段异常的可能性。随着流产物测序技术手段的发展,人类基因组数据库将不断丰富,可为进一步研究缺失与致病性的关系提供数据基础。

综上所述,染色体数目异常是胚胎停育的主要原因,高通量测序检测胚胎绒毛染色体不仅周期短无需进行细胞培养,并且检测率和分辨率高,可明确患者遗传学病因以避免不必要的检查及治疗,值得临床推广应用,可为患者后续的再生育和优生提供诊断指导。

参考文献

- [1] JONES S. Torture born; representing pregnancy and abortion in contemporary survival-horror[J]. *Sexual Culture*, 2015, 19(3): 426-443.
- [2] 谢金芳,黄艳丽,纪霞. 46 例早期自然流产绒毛组织的改良培养及染色体核型分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(5): 721-723.
- [3] 卓倩,洪安澜,马彩玲. 胚胎停育相关危险因素的研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(2): 5-7.
- [4] 张钊,郝胜菊,张庆华,等. 高通量测序技术进行流产组织染色体拷贝数检测的结果分析[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(10): 43-46.
- [5] 钟韵,偶建,李红. 胎儿染色体检查在复发性流产患者中的应用价值[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2017, 36(1): 61-65.
- [6] 陈俊坤,胡莉琴,杨晶珍,等. 用高通量测序技术检测流产物染色体数目和拷贝数变异的研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018, 35(4): 591-594.
- [7] 曹治家,张家彬,李翠云,等. DA8600 测序平台对 EGFR 基因检测最低 DNA 用量的探讨[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(4): 234-240.
- [8] 吕杰忠,莫晓珊,陈颖,等. 1 713 例早期自然流产胚胎的染色体核型分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(4): 581-583.
- [9] NEUSSER M, ROGENHOFER N, STEPHANIE D, et al. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(5): 1130-1137.
- [10] 张芳,张知新. 特纳综合征诊断与治疗的研究进展[J]. *中日友好医院学报*, 2015, 29(3): 192-194.
- [11] 张林琳,施绍瑞. 三倍体综合征的临床分析及产前诊断探讨[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2018, 26(1): 43-44.
- [12] 张影,向卉芬,徐祖滢,等. 高通量测序技术在复发性流产病因诊断中的应用[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38(2): 127-130.
- [13] AL-ARAIMI M, PAL B, POULTER J A, et al. A new recessively inherited disorder composed of foveal hypoplasia, optic nerve decussation defects and anterior segment dysgenesis maps to chromosome 16q23. 3-24. 1[J]. *Molecular vision*, 2013, 19(8): 2165-2172.
- [14] 张建林,谢娟,姜胜华,等. 高通量测序在自然流产遗传学诊断中的应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34(6): 835-838.
- [15] 刘珊,师娟子. 妇女年龄和卵巢储备与反应的关系[J]. *生殖医学杂志*, 2016, 25(10): 879-883.
- [16] LYU W G, WEI X D, GUO R L, et al. Noninvasive prenatal testing for wilson disease by use of circulating single-molecule amplification and resequencing technology (cSMART)[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 172-181.

(收稿日期:2020-01-28 修回日期:2020-07-15)