

荧光原位杂交在产前诊断中与无创 DNA 检测的对比研究

钱丽波¹ 王珏² 钱源² 肖雪² 郭知² 杨建林² 杨继青² 张兰² 马润玫²

(1. 云南省红河州第三人民医院 产科, 云南 个旧 661000; 2. 昆明医科大学 妇产科细胞遗传实验室, 云南 昆明 650032)

【摘要】 目的 研究荧光原位杂交技术与无创 DNA 检测在快速诊断胎儿染色体数目异常的价值。**方法** 使用荧光原位杂交技术(FISH),应用特异性探针对包含 5 例无创 DNA 确诊异常病例的 372 例胎儿羊水细胞进行荧光原位杂交。**结果** 荧光原位杂交共检出染色体数目异常 20 例,异常率为 5.4%,包括唐氏患儿 14 例,占全部异常数的 70%,18-三体综合征 3 例,45,X2 例,XXY1 例,其中无创 DNA 送检的 5 例异常病例中有 4 例均为唐氏患儿,比例为 80%,荧光原位杂交检测结果与羊水细胞核型分析结果相比较,在染色体数目异常方面两者符合率为 95.2%(20/21)。**结论** FISH 技术用于快速诊断羊水细胞 13、18、21、X、Y 染色体数目时具有较高的临床价值,但不能作为单独的方法检测染色体异常,而无创 DNA 检验可作为产前筛查新技术向特定孕妇推广。

【关键词】 荧光原位杂交技术; 无创 DNA 检测; 产前诊断; 染色体异常

【中图分类号】 R394 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate the clinical value of fluorescence in situ hybridization(FISH) and noninvasive prenatal testing(NIPT) in rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy of fetus. **Method**

With FISH technique, chromosome-specific DNA probe were used to detected 372 uncultured amniotic fluid samples included 5 abnormal samples detected by NIPT. **Results** 20 cases of chromosome abnormal have been detected, the ratio is 5.4%, included 14 cases of Down syndrome(DS), 3 cases of trisomy 18 syndrome, 2 cases of 45,X and 1 cases of XXY. The 5 abnormal cases send by NIPT have detected 4 cases of DS, the ratio is 80%. The coincidence rate of diagnosis between FISH and conventional cytogenetics was 95.2%(20/21). **Conclusions** FISH technique has high clinical value for rapid detecting of fetus chromosome aneuploidy, but it can't be taken to detect chromosome abnormalities alone, and the NIPT can be a new prenatal screening to popularize.

【Key words】 FISH; NIPT; prenatal diagnosis; chromosomal abnormality

染色体异常是造成新生儿缺陷的一类常见病,发生率约 1/120,其中约 50% 导致生长发育迟缓、智力落后、多发畸形及性发育异常等临床表征。由于缺乏合适的治疗方法,目前唯一的预防方法只有通过产前诊断来避免此类患儿的出生。较为普遍的胎儿染色体产前诊断方法是细胞遗传学染色体核型分析,该技术需要对处于分裂中期的细胞进行,准

确性高,但需细胞培养后进行染色体制备,由于其操作过程长且技术复杂,结果一般需要 2 周甚至更长的时间。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是一种非放射性原位杂交技术,利用特殊的荧光素标记 DNA 探针进行 DNA 杂交,经免疫荧光显色,可检测细胞内特异 DNA 存在与否,能快速、准确地确定细胞分裂间期核染色体非整倍体畸变^[1]。胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产

前检测(noninvasive prenatal testing, NIPT),是利用大规模平行测序技术(massively parallel sequencing, MPS)对母体外周血中的游离 DNA 进行深度测序,获取胎儿染色体信息的方法。由于该方法不需羊水穿刺等有创方法来获得胎儿细胞,而且检测时间较短,可在孕早期进行检测,目前正处于快速的发展阶段,随着大规模的临床试验的验证,有望代替侵入性的产前诊断方法。本研究使用国产试剂盒对 372 例羊水样本的染色体数目异常进行快速诊断,并同时使用羊水培养进行常规染色体核型分析,由于羊水样本中有 5 例是 NIPT 确诊异常送检,可同时比较三者结果以此探讨其临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择本院自 2012 年 6 月至 2014 年 5 月期间进行羊膜腔穿刺的妊娠妇女共 372 名,其中 5 例为 NIPT 确诊染色体异常送检。所有羊水均培养成功进行核型分析。孕妇年龄 21~43 岁,孕周为 18~24 周。

1.2 研究方法

1.2.1 羊水采集 在 B 超引导下,用 21G PTC 穿刺针经腹壁抽取羊水 25ml,置于无菌注射器中。留取 5ml 用于 FISH 检测,其余用于细胞培养。

1.2.2 羊水细胞 FISH 检测步骤包括制片、杂交、洗脱和镜检部分。详细操作参考金菩嘉公司操作手册,并结合本实验室的条件。共使用 5 种染色体探

针,分为 2 组,即 13/21 组和 18/X/Y 组。13/21 组的探针分别标记位于 13q14(绿色)和 21q22(红色)处。18/X/Y 探针分别定位于 18, X, Y 的 p11.1-q11.1 区域,分别标记水蓝色、绿色和红色。

1.2.3 NIPT 送检 本实验中 5 例 NIPT 送检结果分别由贝瑞何康公司送检 4 例,深圳华大基因公司送检 1 例,具体实验操作参考其公司操作手册。

1.2.4 结果判读 本实验中 FISH 结果判读时,每张羊水玻片至少计数 50 个细胞。若正常细胞数 $\geq 85\%$ 则判为异常,若异常细胞数 $\geq 65\%$ 则判为异常,若异常细胞数 $> 15\%$, 并且 $< 60\%$, 则需要加倍计数到 100 个细胞。

2 结果

采用 13/21 号和 18/X/Y 染色体荧光探针检测 372 例羊水间期核细胞。检出染色体异常 20 例,唐氏患儿 14 例,占全部异常数的 70%,18-三体综合征 3 例,45,X2 例,XXY1 例,检测结果与培养后羊水细胞核型检测结果一致。详见表 1。

采用羊水细胞核型分析检测 372 例羊水细胞,全部培养成功,其中检出染色体异常 21 例,除一例为 46,XX[14]/47,XX,+mar[21]外,其余结果均与 FISH 检测的染色体结果一致。在诊断染色体数目异常上,FISH 检测结果与羊水细胞核型分析的符合率为 95.2%。

表 1 FISH 实验结果和细胞遗传学实验结果对照表(共 21 例异常)

产前诊断指标	例数(n)	FISH 检测异常结果	核型分析异常结果
孕妇年龄 ≥ 35 岁	40	0	染色体未检出明显异常
DS 筛查阳性	166	5,21-三体 4 例 18-三体 1 例	5,21-三体标准型(47,xy,+21) 4 例,18-三体 1 例
NT 增厚	134	7,21-三体 3 例,18-三体 1 例, 45,X2 例,XXY1 例	8,21-三体 3 例,18-三体 1 例,45, X2 例,XXY1 例,46, XX[14]/47,xx,+mar[21]1 例
唐氏儿生育史	2	0	染色体未检出明显异常
不良分娩史 (死胎、死产、畸胎引产)	2	0	染色体未检出明显异常
单纯 B 超异常	23	4,21-三体 3 例,18-三体 1 例	4,21-三体 3 例,18-三体 1 例
无创 DNA 阳性	5	4,21-三体 4 例	4,21-三体 4 例

3 讨论

唐氏综合征是最常见的染色体非整倍体疾病^[2],其他比较常见的染色体非整倍体疾病包括18-三体、13-三体、Turner综合征。目前诊断胎儿染色体非整倍体疾病唯有通过侵入性产前诊断操作,如绒毛活检、羊膜腔穿刺获得样本。传统的羊水细胞培养检测方法细胞培养周期较长,容易给孕妇带来焦虑感,也给临床带来不便。FISH检测技术通过用已知的单链核酸探针,与标本中未知单链核酸结合,形成可检测的杂交双链核酸,不需要经过细胞培养阶段,因其快速、准确、灵敏度高、特异性强的突出特点弥补了长期以来仅依靠细胞遗传学产前诊断的不足和局限性,一定程度上避免了培养失败的缺陷,实现了快速诊断染色体异常的可能。

由于侵入性操作可能会带来的流产风险,目前利用血清学生物标记物、超声等对普通妊娠人群进行筛查,筛选出进一步行产前诊断的高危人群显得尤为重要^[3]。但是经过传统的筛查方法大约仍有5%的孕妇需要行侵入性操作,且仅有30%的胎儿会发现异常^[4]。即使经过数十年的努力,联合筛查方法的应用能使检出率提高90%以上,但仍要有3%~5%的人群需行侵入性操作^[5]。自从1997年,香港中文大学的卢煜明教授等^[6]首先在母血浆中发现了胎儿游离DNA(cell free fetal DNA,cffDNA),在正常妊娠过程中cffDNA几乎全部来源于胎盘的滋养层细胞。由于cffDNA在孕7周胎儿胎盘循环建立后,就可以一定比例稳定的存在于母体外周血中,且其半衰期只有16.3分钟,在正常分娩2小时后在母体外周血中已检测不到。因此cffDNA检测不受孕周与年龄的限制,这使无创产前诊断成为可能。目前,随着MPS的飞速发展,国内外研究人员进行了大量的临床试验。Palomaki等^[7,8]的研究验证了MPS对高危妊娠母体血浆胎儿T21的检测拥有近99%的灵敏度和特异度。随后该小组又发表一项研究显示,MPS全基因组随机测序技术对T18检测的灵敏度为100%,假阳性率为0.28%,对T13检测的灵敏度为91.7%,假阳性率为0.97%。同时NIPT还可检测其他染色体非整倍体,包括易位型

三体及嵌合型三体,对特纳综合征(45X)检测的灵敏度为93.8%,特异度为99.8%。

本研究中羊水FISH检测结果与羊水培养成功的372例结果相比,在检测13号,18号,21号,X,Y染色体异常上,20例结果相符,所有唐氏患儿均被检出。FISH漏检一例46,XX[14]/47,xx,+mar[21]。FISH漏检是因为易位区域或倒位在探针检测范围之外,这些染色体结构异常会被遗漏,是FISH实验的主要局限性。FISH应该与羊水细胞遗传学检测即染色体核型分析相结合,才能全面地诊断胎儿染色体疾病,FISH技术能否单独作为产前诊断的方案供临床选择,值得商榷。

而对于NIPT送检的5例样本,其中有4例经检测均为唐氏患儿,与其送检的检测报告相符。而其中一例送检时检测报告为45,X,经FISH和细胞遗传学检测均为正常,未发现其他异常。由此我们可以看出NIPT对于21号染色体具有较高的灵敏度的特异度,而对于非整倍体的X的检出目前特异度还不是很理想,尚需进一步的研究和验证。

相比于其他的筛查手段,我们可以看出NIPT技术在灵敏度和特异度方面有无可比拟的优势,但是由于现在MPS技术尚未大规模普及而且成本偏高,我们仍然不支持所有孕妇为了避免有创的羊水穿刺而选择NIPT。目前国内的产前诊断技术专家组于2012年就NIPT进行了论证,边旭明等指出,该检测技术是一种“近似于诊断水平”、“目标疾病指向精确”的产前筛查新技术,目前其临床适用人群包括:①有介入性产前诊断禁忌证者(先兆流产、发热、有出血倾向、感染未愈等);②产前筛查高危或临界高危孕妇;③珍贵儿,知情后拒绝介入性产前诊断的孕妇;④对介入性产前诊断极度焦虑的孕妇;⑤就诊时处于较大孕周、超出目前产前筛查范围的孕妇^[9]。

随着将来测序技术的进一步发展,NIPT的检测成本将不再成为该技术广泛应用的瓶颈。而更大规模的NIPT临床试验也将进一步提高其准确性,NIPT的加入会极大的减少孕妇不必要的羊水穿刺,从而有效的提高我国产前筛查和产前诊断水平,也为孕妇们带来福音。

参 考 文 献

- [1] Witters I, Devriendt K, Legius E, et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH) [J]. Prenat Diagn, 2002, 22(1): 29-33.
- [2] Sherman SL, Allen E G, Bean LH, et al. Epidemiology of Down syndrome [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2007, 13(3): 221-227.
- [3] Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VL, et al. Down syndrome--recent progress and future prospects [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(R1): R75-R83.
- [4] Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome [J]. N Engl J Med, 2005, 353(19): 2001-2011.
- [5] Wald NJ, Huttly WJ, Hackshaw AK. Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test [J]. Lancet, 2003, 361(9360): 835-836.
- [6] Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications [J]. Clin Chem, 2000, 46(12): 1903-1906.
- [7] Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study [J]. Genet Med, 2012, 14(3): 296-305.
- [8] Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations [J]. Prenat Diagn, 2012, 32(8): 730-734.
- [9] 边旭明. 胎儿染色体非整倍体的无创 DNA 产前检测 [J]. 实用妇产科杂志, 2013, 5: 330-333.

(收稿日期: 2015-02-21)

编辑: 宋文颖

读 者 · 作 者 · 编 者

本刊对参考文献格式的要求

参考文献按 GB771487《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录,依参考文献在正文中首次出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号以角码注明,并按引用先后顺序排列于文末,一般不超过 15 篇。

各条项目之间的符号(“,”和“.”等)必须按要求使用(见下面的例子),三个以上作者保留 3 位再加“,”等”(中文文献)或“,” et al”(英文文献);

期刊文献的格式举例:

- [1] Brantigan JW, Cunningham BW, Warden K, et al. Compression strength of donor bone for posterior lumbar fusion [J]. Spine, 1993, 18: 1213-1221.
- [2] 张喆人,蔡春林,叶圣诞,等. 110 例 75 岁以上老年人老年腹部手术的临床分析 [J]. 中华老年医学杂志, 1995, 14: 336-338.

注:页码之间连接用“-”(半字线),不能用“~”;起止页码注写完整,不能用“1213-21”的形式;题目后加“[J]”表示来源于期刊文献,注意各条项目之间的标点符号书写正确。

专著文献的格式举例:

- [1] Khan MG. Cardiac drug therapy [M]. 4th ed. London: WB Saunders Company, 1995.
- [2] 罗瑞德. 传染病讲座 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 25-27.

注:需加出版地项目,二版和二版以上加版次,页码之间连接用“-”(半字线),不能用“~”;起止页码注写完整,不能用“1213-21”的形式,如参考全书可不加页码项目;题目后加“[M]”表示来源于专著文献,注意各条项目之间的标点符号书写正确。