

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.01.0070

论著

两种方法检测先天性心脏发育异常胎儿的染色体结果分析

赵丹阳¹, 杨微微², 王文靖², 鞠明艳², 任晨春²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市中心妇产科医院检验科, 天津 300199)

摘要 目的:探讨拷贝数变异测序(CNV-seq)技术和染色体核型分析技术检测先天性心脏发育异常(CHD)胎儿染色体的应用价值。方法:以2019年2月至2022年8月天津市中心妇产科医院经超声科诊断胎儿CHD的60例孕妇为研究对象,并根据是否伴发心外异常分为独立性CHD组和伴心外结构/软指标异常CHD组,所有孕妇行羊水穿刺进行核型分析及CNV-seq检测,统计分析两种方法对异常染色体的检出率。结果:两种方法检测共发现染色体异常患者20例,异常染色体检出率为33.3%,其中核型分析检出染色体异常例数为13例,CNV-seq检测异常CNVs例数为18例,两种方法结果均异常者11例,核型独立检出平衡易位2例,CNV-seq独立检出微缺失/微重复7例。伴心外结构/软指标异常CHD组染色体异常检出率略高于独立性CHD组,两组间比较差异无统计学意义[37.8%(14/37) vs. 26.1%(6/23), $\chi^2=1.76$, $P>0.05$]。结论:联合应用核型分析和CNV-seq检测技术,可以进一步明确诊断由染色体异常引发的胎儿CHD。

关键词 胎儿先天性心脏病;核型分析;拷贝数变异;二代测序;产前诊断

中图分类号 R714

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)01-0070-04

Analysis of the chromosomal results in fetus with congenital cardiac dysplasia detected by two methods

ZHAO Danyang¹, YANG Weiwei², WANG Wenjing², JU Mingyan², REN Chenchun²

(1.Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Clinical Lab, Tianjin Central Hospital of Gynecology Obstetrics, Tianjin 300199, China)

Abstract Objective: To evaluate the value of copy number variation sequencing (CNV-seq) and karyotype analysis in the detection of fetal chromosomes in congenital cardiac dysplasia (CHD). **Methods:** A total of 60 pregnant women with fetal CHD diagnosed by the ultrasound at Tianjin Central Obstetrics and Gynecology Hospital from February 2019 to August 2022 were selected. They were divided into independent CHD group and CHD group with abnormal cardiac structure/soft indicators according to whether they were accompanied by extra cardiac abnormalities. All pregnant women received amniocentesis and karyotype analysis, at the same time underwent CNV-seq. The detection rate of chromosome abnormality using both methods was analyzed statistically. **Results:** A total of 20 patients with chromosomal abnormalities were detected by the two methods, and the detection rate of abnormal chromosomes was 33.3%. Among them, 13 cases of chromosomal abnormalities were detected by karyotype analysis, and 18 cases of abnormal CNVs were detected by CNV-seq. The results of both methods were abnormal in 11 cases, 2 cases of balanced translocation were detected by karyotype, and 7 cases of microdeletion and microduplication were detected by CNV-seq. The chromosome abnormality rate in CHD group with abnormal extra cardiac structures/soft index was slightly higher than that in independent CHD group, and there was no significant difference between the two groups [37.8%(14/37) vs. 26.1%(6/23), $\chi^2=1.76$, $P>0.05$]. **Conclusion:** The combination of karyotype analysis and CNV-seq can further confirm the diagnosis of fetal CHD caused by chromosome abnormality.

Key words fetal congenital heart disease; chromosome karyotype analysis; copy number variation; next-generation sequencing; prenatal diagnosis

先天性心脏发育异常(CHD)是最常见的人类先天性畸形之一^[1],是新生儿发病和死亡的主要原因。随着超声诊断技术和外科技术的提高,越来越多的胎儿期CHD得到早期诊断和治疗,如何尽早确定胎儿CHD的病因,进行个性化处理是产前诊

断面临的主要问题。虽然CHD的病因存在异质性,但仍有大约20%的CHD可以归因于染色体异常、单基因缺陷或环境因素^[2]。本研究探讨拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)技术联合核型分析技术在产前诊断胎儿期CHD染色体异常的应用价值,为临床决策提供技术支持。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2019年2月至2022年8月

基金项目 天津市卫生健康委员会科技项目(zc20117)

作者简介 赵丹阳(1978-),女,主治医师,硕士在读,研究方向:产科;

通信作者:任晨春, E-mail: rccxqy@163.com。

在超声科诊断为胎儿 CHD 的单胎孕妇 60 例,孕妇年龄 18~45 岁,平均年龄(30.58±4.97)岁,孕周 18~24 周,平均孕周为(21.70±2.25)周。所有孕妇均接受羊膜腔穿刺,对胎儿进行核型分析,同时行 CNV-seq 检测。纳入标准:(1)超声科由一名具有副高及以上职称的专业医师进行超声心动检查,检测房室与大血管的关系,提示胎儿存在心脏及大血管结构异常。(2)夫妻双方均在医院产前诊断门诊进行遗传咨询,了解有创产前诊断的风险并签署知情同意书。(3)术前进行血常规、血生化、血凝及传染病病原体筛查,无穿刺禁忌证。此项目经院级专家伦理委员会审批通过,伦理编号为 2020KY080。

1.2 研究方法

1.2.1 羊膜腔穿刺术 严格遵循无菌操作,在超声引导下行羊膜腔穿刺术,分别抽取 2 管 10 mL 羊水和 1 管 3 mL 羊水。

1.2.2 胎儿羊水细胞培养及核型分析 将获得的 2 管 10 mL 羊水,1 500×g 离心 10 min 后分离羊水细胞,留取 1 mL 沉淀混匀后分别接种于两瓶含 3 mL 培养基的培养瓶中,7~9 d 后换液,继续培养 48 h,加入 0.3 mL 秋水仙素(20 μg/mL),培养 2 h 后采用胰酶消化法收获,进行 G 显带染色,必要时进行 C 显带或者 N 显带,按照 ISCN2020 版标准,计数 30 个,分析 5 个分散好、中等长度的中期分裂相。

1.2.3 胎儿羊水细胞 CNV-seq 检测 将抽取的 1 管 3 mL 羊水,使用北京贝瑞和康公司提供的科安试剂盒,按照标准流程进行操作:DNA 提取→酶反应→纯化→文库纯化→文库质控→测序→生物信息分析。结果判读参照人类基因组 hg19 版本和 DGV、DECIPHER、OMIM、UCSCS 及 PubMed 等数据库,判定为良性 CNVs、可疑良性 CNVs、临床意义不明的 CNVs(VOUS)、可疑致病性 CNVs 和致病性 CNVs。对检测到亚显微结构异常的致病性 CNVs 和可疑致病的 CNVs,建议胎儿父母行 CNV-seq 检测,以明确变异的遗传性质及相关临床意义。

1.3 统计学处理 对于临床数据采用 SPSS 25 软件分析,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胎儿超声检测结果 60 例 CHD 胎儿中,23 例是独立性 CHD,其中 10 例为室间隔缺损;37 例不仅有 CHD,还伴有心外结构/软指标异常,其中合并脑部异常 10 例,泌尿系统异常 3 例,消化系统异常 2 例,其他畸形包括合并唇腭裂、长骨短小、多指/趾或并指/趾共 16 例,单脐动脉 6 例(表 1)。

表 1 60 例 CHD 胎儿超声结果分类表

Tab.1 Ultrasound results of 60 fetuses with CHD

异常类型	例数	构成比(%)
独立性 CHD	23	38.3
伴心外结构/软指标异常	37	61.7

注:CHD:先天性心脏病

2.2 两种方法检测 CHD 胎儿染色体结果分析 60 例 CHD 胎儿均行核型分析和 CNV-seq 检测,发现染色体异常 20 例,染色体异常检出率 33.3%。其中核型分析与 CNV-seq 结果一致检出 11 例,包括 9 例数目异常和 1 例衍生染色体及 1 例嵌合体;两种方法检出不一致 9 例,其中核型分析检出 2 例平衡性结构异常,CNV-seq 未能检出;7 例 CNV-seq 检出为微缺失/微重复综合征,核型分析未见明显异常(表 2)。

表 2 两种方法检测染色体异常 CHD 胎儿结果分析

Tab.2 Analysis of the results of chromosome abnormality of fetus with CHD by two methods

异常类型	核型分析检出(例)	CNV-seq 检出(例)
21 三体综合征	4	4
18 三体综合征	3	3
45,X	1	1
47,XXY	1	1
平衡易位	2	0
衍生染色体	1	1
嵌合体	1	1
微缺失/微重复	0	7
总数	13	18

核型分析检出染色体异常例数为 13 例,其中数目异常 9 例,包括 4 例 47,XX/XY,+21,3 例 47,XX/XY,+18,1 例 45,X,1 例 47,XXY;结构异常 4 例,包括罗氏易位 45,XY,der(14;21)(q10;q10)1 例,平衡易位 46,XY,t(8;15)(p10;q10)1 例,衍生染色体 1 例,核型为 46,XY,der(18)dup(18)(q11.2-q23),嵌合体 1 例,47,XY,+mar[16]/46,XY[19]。

CNV-seq 检测异常 CNVs 例数为 18 例,其中数目异常 9 例,同核型结果一致。存在微缺失/微重复异常 9 例,1 例核型结果为衍生染色体的患者 CNV-seq 检测结果为 dup(18)(q11.2q23)6.7 Mb;1 例核型分析为 47,XY,+mar[16]/46,XY[19]嵌合体,经 CNV-seq 证实为 dup(22)(q11.1q11.21)1.7 Mb,确定了核型分析中 marker 来源于 22 号染色体;7 例核型分析结果正常的患者 CNV-seq 表现为微缺失/微重复,分别为 dup(18)(q23)1Mb,dup(1)(p36.13)1.1 Mb,dup(22)(q11.21)2.55 Mb,4 例为 del(22)(q11.21)2.65-2.7 Mb。所有 CNVs 结果通过检索

UCSC、DECIPHER、OMIM、Clin Var、DGV、PUB –MED 数据库,发现致病性 CNVs 6 例,可疑致病性 CNVs 3 例(表 3)。

表 3 7 例 CNV-seq 微缺失/微重复患者临床表现

Tab.3 Clinical manifestations of CNV-seq microdeletion/microduplication in 7 patients

编号	CNV-seq	核型分析	心脏超声表现	心外超声表现
9	dup(18)(q23) 1 Mb	未见明显异常	三尖瓣狭窄、 肺动脉瓣闭锁	-
11	dup(1)(p36.13) 1.1 Mb	未见明显异常	左心发育不良	-
14	dup(22)(q11.21) 2.55 Mb	未见明显异常	三尖瓣狭窄	脉络丛囊肿
16	del(22)(q11.21) 2.7 Mb	未见明显异常	左室流出道异常	单脐动脉
17	del(22)(q11.21) 2.65 Mb	未见明显异常	永存动脉干、 房室间隔缺损、唇腭裂 肺动脉瓣狭窄	
18	del(22)(q11.21) 2.65 Mb	未见明显异常	法洛氏四联症	胎儿发育迟缓
20	del(22)(q11.21) 2.7 Mb	未见明显异常	法洛氏四联症	脉络丛囊肿、 单脐动脉

2.3 不同类型 CHD 胎儿的染色体异常结果分析
伴心外结构/软指标异常 CHD 组染色体异常率高于独立性 CHD 组,但两组间比较差异无统计学意义 [37.8%(14/37) vs. 26.1%(6/23), $\chi^2=1.76$, $P>0.05$], 见表 4。

表 4 两组 CHD 胎儿染色体异常检出率比较

Tab.4 Comparison of detection rates of fetal chromosomal abnormalities in CHD between the two groups

分类	染色体异常(例)	染色体正常(例)	总数
独立性 CHD	6	17	23
CHD 伴心外结构/软指标异常	14	23	37
χ^2		1.76	
P		>0.05	

注:CHD:先天性心脏发育异常

23 例独立性 CHD 中 6 例有染色体异常:4 例表型为室间隔缺损,染色体结果分别为 2 例 21 三体,1 例罗氏易位,1 例平衡易位;1 例左心发育不良,染色体结果为 1p36.13 存在 1.1 Mb 重复;1 例三尖瓣狭窄、肺动脉瓣闭锁,染色体结果为 18q23 存在 1 Mb 重复。

37 例 CHD 合并心外结构/软指标异常中 14 例有染色体异常:染色体数目异常占 7 例,染色体结果分别为 18 三体 3 例,21 三体 2 例,45,X 和 47,XXY 各 1 例,这 7 例中 5 例表现为神经系统异常(脉络丛囊肿或脑积水),2 例为消化系统畸形。染色体结构异常 7 例,1 例核型 46,XY,der(18)dup(18)(q11.2q23),胎儿表型为复杂性先心病,同时合并肾

囊肿;1 例核型 47,XY,+mar[16]/46,XY[19],CNV-seq 证实为 dup(22)(q11.1q11.21)1.7 Mb,结合核型分析结果,考虑 marker 为 2 倍的 22q11.1q11.21 结合后形成的新的染色体片段,表型为室间隔缺损伴消化系统畸形;其余 5 例中 4 例为 22q11.2 微缺失综合征,心脏畸形均为圆锥动脉干异常,心外异常表现为脉络丛囊肿/脑积水、唇腭裂、长骨短小、单脐动脉,1 例为 22q11.2 微重复综合征,重复片段大小为 2.55 Mb,CHD 类型为三尖瓣狭窄,心外异常为脉络丛囊肿。

3 讨论

CHD 胎儿染色体异常率在 10%~30%^[3-4]。本研究中胎儿 CHD 染色体异常率为 33.3%(20/60)。染色体异常包括数目异常和结构异常。其中 21 三体、18 三体和 13 三体是造成 CHD 的染色体数目异常最常见病因,其他常见病因还包括染色体微缺失/微重复综合征等^[5-6]。

本研究 CHD 胎儿检出染色体异常共 20 例,其中核型分析与 CNV-seq 结果一致检出 11 例,包括 9 例数目异常、1 例衍生染色体及 1 例嵌合体;两种方法检出不一致 9 例,其中核型分析独立检出 2 例平衡性结构异常,CNV-seq 独立检出 7 例微缺失/微重复综合征。两种方法检出率不一致与其方法局限性有关。在胎儿染色体检测方面,核型分析是检测的“金标准”,对染色体数目异常和大片段结构缺失或重复有较高的诊断率,特别是可以检出易位、倒位、插入等平衡性结构异常,相对于分子诊断具有绝对性优势^[7]。但是核型分析也存在很多短板,比如检测周期长,无法检测 5~10 Mb 以下微缺失/微重复,存在羊水培养失败可能,受到从业人员经验水平限制,存在一定的误差。而 CNV-seq 作为第二代低深度高通量测序技术检测样本范围广,无需培养,可发现小片段微缺失/微重复,2 周左右即可出具报告,节约时间成本。所以 CNV-seq 技术是核型分析的有效补充,提高染色体异常的检出率。

本研究 60 例 CHD 胎儿中,分为伴心外结构/软指标异常 CHD 组和独立性 CHD 组,染色体异常率在两组间差异没有统计学意义,可能与本研究选取样本量过小相关。23 例独立性 CHD 中染色体异常 6 例,2 例为 21 三体,1 例为罗氏易位,1 例平衡易位,另外 2 例微重复综合征,通过 CNV-seq 检测得出。37 例 CHD 合并心外结构/软指标中 14 例有染色体异常,核型检出率为 64.3%(9/14),明显低于 CNV-seq 检出的检出率 100%(14/14)。其中值得注意的是,1 例核型结果为 18 号染色体的衍生染色

体,核型为46,XY,der(18),通过CNV-seq检测确定是18号染色体的重复,重复片段为q11.2q23。1例核型分析存在低比例嵌合,并发现标记染色体,核型47,XY,+mar[16]/46,XY[19],CNV-seq结果为22q11.1q11.21长度为1.7 Mb的微重复,通过核型嵌合比例结合CNV-seq结果,可推测该患儿marker染色体为2倍的22q11.1q11.21片段重合组成,该片段包含TUBA8、PEX26、USP18等16个蛋白编码基因或基因片段,其中6个OMIM morbid基因,该重复片段与猫眼综合征有关,该综合征临床表型多种多样,如双眼虹膜下方垂直性缺损、白内障、脉络膜缺损、视网膜发育不全、类似猫眼、双眼距离增宽、睑裂小而斜、小眼球、斜视、轻度智力低下、心脏缺陷、肛门闭锁等,确定为致病性CNVs。虽然核型分析较CNV-seq在大片段结构变异中更为直观,但CNV-seq较核型分析断裂位点定位更为精确,两者在胎儿CHD患者病因诊断中相互结合,能够有效提高CHD的确诊率,明确染色体异常类型和断裂位点,为临床做出进一步诊疗提供依据。

本研究有4例CHD胎儿存在22q11.2微缺失,22q11.2微缺失综合征被认为是与CHD最相关的微缺失/微重复综合征。它的表型变异谱比较宽,携带相同异常片段的个体表型不尽相同,可以从正常到生长发育迟缓、智力障碍、自闭症、先天性心脏病、唇腭裂、小头畸形、肌张力减弱等,片段缺失大小与表型之间不存在正相关,其外显率约21.9%^[8-11]。Thomas等^[12]报道,22q11.2微缺失综合征在胎儿CHD核型结果正常者中占6.4%。王瑾等^[13]报道64%的22q11.2微缺失综合征患者有CHD表型,以圆锥动脉干畸形最为多见。这4例CHD胎儿心脏表型主要为永存动脉干、房室间隔缺损、肺动脉瓣狭窄、法洛氏四联症,心外表现为唇腭裂、单脐动脉、脉络丛囊肿和胎儿发育迟缓。它们父母表型正常,经CNV-seq检测均为正常,证实胎儿为新发突变。除微缺失综合征以外,本研究经CNV-seq检测发现1例22q11.2微重复综合征,表型为三尖瓣狭窄,伴有心外异常(脉络丛囊肿)。由此可见22q11.2微缺失/微重复是胎儿CHD的另一主要病因。

综上所述,两种方法在检测CHD胎儿染色体异常中各有利弊,联合应用可提高染色体异常检出率,

从而明确胎儿CHD的病因,为后续的遗传咨询提供可靠的病因学依据,指导患儿家庭做出最优选择。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部.中国出生缺陷防治报告(2012)[EB/OL]. [2021-02-24].http://www.gov.cn/gzdt/2012-09/12/content_2223371.htm.
- [2] GILLIAN M B, EDWIN P K, GARY F S, et al. Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance[J]. Med J Aust, 2012, 197(3): 155-159.
- [3] MARY E P, MARTINA B, WENDY K C, et al. Genetic basis for congenital heart disease: Revisited; a scientific statement from the American Heart Association [J]. Circulation, 2018, 138(21): e653-e711.
- [4] MAEVE K H, LORRAINE D, JEFFREY A K. Congenital heart disease: prenatal diagnosis and genetic association[J]. Obstet Gynecol Surv, 2019, 74(8): 497-503.
- [5] LUO S H, MENG D, LI Q, et al. Genetic testing and pregnancy outcome analysis of 362 fetuses with congenital heart disease identified by prenatal ultrasound[J]. Arq Bras Cardiol, 2018, 111(4): 571-577.
- [6] 彭亚琴, 徐晶晶, 胡月, 等. 核型分析联合拷贝数测序在颈项透明层增厚胎儿染色体异常中的应用研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(6): 706-710.
- [7] JOSEPH T G, ALEXANDER G B, KAORU I, et al. Increased frequency of de novo copy number variations in congenital heart disease by integrative analysis of SNP array and exome sequence data [J]. Circ Res, 2014, 115(10): 884-896.
- [8] SHI X, TANG H, LU J, et al. Prenatal genetic diagnosis of omphalocele by karyotyping, chromosomal microarray analysis and exome sequencing[J]. Ann Med, 2021, 53(1): 1285-1291.
- [9] JILL A R, BRADLEY P C, EVAN E E, et al. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy number variations [J]. Genet Med, 2013, 15(6): 478-481.
- [10] CAMPENHOUT S V, DEVRIENDT K, BRECKPOT J, et al. Microduplication 22q11.2: a description of the clinical, developmental and behavioral characteristics during childhood[J]. Genet Couns, 2012, 23(2): 135-148.
- [11] LAN L, SHE L, ZHANG B, et al. Prenatal diagnosis of 913 fetuses samples using copy number variation sequencing[J]. J Gene Med, 2021, 23(5): e3324.
- [12] THOMAS N S, MIRANDA D, GEMMA P, et al. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11[J]. Eur J Hum Genet, 2006, 14(7): 831-837.
- [13] 王瑾, 赵燕, 金华, 等. 应用单核苷酸多态性微阵列芯片分析胎儿圆锥动脉干畸形基因组拷贝数的变异[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35(3): 347-350.

(2023-07-05 收稿)