

引用本文:张羽,刘琰,李兰兰,等.稽留流产绒毛染色体高通量测序技术检测235例结果分析[J].安徽医药,2022,26(1):73-76.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.01.017.

◇临床医学◇



稽留流产绒毛染色体高通量测序技术检测235例结果分析

张羽¹,刘琰¹,李兰兰¹,李丽²

作者单位:¹西北妇女儿童医院生殖妇科,陕西 西安 710000;

²延安大学附属医院产科,陕西 延安 716000

通信作者:李丽,女,副主任医师,硕士生导师,研究方向为围产医学方向,Email:51983217@qq.com

基金项目:陕西省卫生计生科研基金项目(2016D076)

摘要: 目的 探究染色体异常类型与年龄、妊娠方式及既往流产次数之间的关系。方法 回顾性分析2018年8月至2019年8月西北妇女儿童医院因稽留流产行高通量测序技术检测绒毛染色体的病人235例,对其结果进行细分比较、统计分析。结果 235例稽留流产病人绒毛染色体中,异常染色体有165例(70.21%),其中染色体数目异常占50.2%(118/235),并以三体为主占46.7%(77/118),且16-三体最为高发;染色体结构异常中,已知致病性的基因拷贝数高于未知致病及多态性。染色体正常组年龄(30.19±3.62)较异常组年龄(32.08±4.52)偏低($t=-3.11, P<0.05$),且年龄≥35岁组的染色体异常率(83.92%)明显高于<35岁组(65.92%) ($\chi^2=6.61, P<0.05$),且双重三体组年龄明显高于三体组($P<0.05$);妊娠方式及流产次数对染色体异常发生率无明显影响($P>0.05$)。结论 早期流产的病因以染色体异常为主,年龄是影响胚胎染色体的重要因素,而妊娠方式及既往流产次数并未见明显影响作用。高通量基因测序技术染色体检测方法可明显增加染色体的异常检出率,更加准确地为明确稽留流产病因提供理论依据,继而可更好地指导下一次优良妊娠。

关键词: 流产,稽留; 多位点测序分型; 高通量核苷酸序列分析; 绒毛; 染色体异常

Chromosome analysis on chorionic villus samples from missed abortions in 235 cases by next-generation sequencing

ZHANG Yu¹, LIU Yan¹, LI Lanlan¹, LI Li²

Author Affiliations:¹Department of Reproductive Gynecology, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an, 710000, China;²Department of Obstetrics, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, 716000, China

Abstract: **Objective** To explore the relationship between chromosome abnormalities and age, pregnancy mode and previous abortion times. **Methods** A retrospective analysis was performed on 235 patients with villous chromosomes detected by high-throughput sequencing technology in Northwest Women and Children's Hospital from August 2018 to August 2019, and the results were subdivided, compared and statistically analyzed. **Results** One hundred and sixty-five (70.21%) with abnormal chromosomes were identified among 235 samples. Among them, the chromosome number abnormality accounted for 50.2% (118/235), and trisomy accounted for 46.7% (77/118), and trisomy 16 was the most common. Among the structural chromosome abnormalities, the CNVs of known pathogenicity were higher than that of unknown pathogenicity and polymorphism. The average age of normal chromosome group (30.19±3.62) was lower than that of abnormal chromosome group (32.08±4.52) ($t=-3.11, P<0.05$). An increase in the frequency of chromosomally abnormal miscarriages was observed in the group of women above 35 (83.92%) when compared to groups of women under 35 (65.92%) ($\chi^2=6.61, P<0.05$), and maternal age of multiple aneuploidies was significant higher than that of trisomies. No difference in frequencies of chromosomal abnormalities in CVSs of the different conception way and reproductive history was observed. **Conclusions** Chromosomal abnormality is the main cause of early abortion. Age is an important factor affecting the chromosome while the mode of pregnancy and the number of previous abortions are not. NGS can significantly increase the detection rate of chromosomal abnormalities, provide more accurate theoretical basis for the cause of missed abortion, and then give a better guide for the next pregnancy.

Key words: Abortion, missed; Multilocus sequence typing; High-throughput nucleotide sequencing; Villus; Chromosome abnormalities

稽留流产(missed abortion, MA)指胚胎或胎儿死亡后滞留于宫腔未能及时排出的一种流产类

型^[1]。其病因复杂多样,包括染色体、内分泌、感染、免疫、解剖等因素的影响,且仍有50%病因不明。

在不明原因自然流产中,染色体异常可达50%~85%^[2]。本研究回顾性分析我院稽留流产病人绒毛染色体基因拷贝数检测(genomic copy number variations, CNVs)及核型分析结果,进一步明确流产病因,从而更好地做出遗传学咨询、改善妊娠结局。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析2018年8月至2019年8月西北妇女儿童医院生殖妇科稽留流产病人235例。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。其纳入标准:年龄范围20~45岁,孕龄7~12周,此次妊娠经B超动态监测为空孕囊或未见胎心搏动或胎心搏动消失者诊断为稽留流产,且妊娠期间无感染,无放射线、毒物接触史,无生殖系统结构异常,无高血压、糖尿病等内外科合并症。所有病人签署知情同意书。

1.2 研究方法 稽留流产病人流产后收集绒毛组织10 mg,用生理盐水冲洗残留血液、剔除其他组织。采用Qiagen Blood & Tissue(德国Qiagen GmbH)进行绒毛DNA提取,随后进行文库制备(EZ-GALO),最后采用高通量测序仪(NextSeq CN 500)进行测序。最后,将所测结果与人类基因组数据库进行匹配比较。

1.3 统计学方法 应用SPSS 18.0进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绒毛高通量测序染色体检测结果 235例稽留流产病人绒毛染色体检测结果中,有70例(29.79%)结果正常,165例(70.21%)存在异常现象。其中染色体数目异常有118例(71.5%),染色体结构异常有47例(24.48%)(表1)。

表1 稽留流产病人235例绒毛染色体检测结果/%

类别	例数	占总	占异常组	类别	例数	占总	占异常组
数目异常	118	50.2	71.5	结构异常	47	19.9	28.5
三体	77	32.8	46.7	重复	30	3.4	4.9
双重三体	6	2.6	3.6	缺失	8	3.4	4.9
单体	7	2.9	4.2	重复+缺失	9	3.8	5.4
嵌合体	28	11.9	16.9				

2.1.1 染色体数目异常结果 在染色体数目异常中($n=118$),以非整倍体为主,其中三体所占比例最高——46.7%($n=77$),以16、22、21、15-三体最为高发。而所有的双重三体均为21或22-三体合并其他三体(表2)。性染色体非整倍体包含1例三体(47,XN,+X)

及7例单体(均为45,X)。嵌合体包含三体嵌合体、单体嵌合体、两性嵌合体,其中三体嵌合体可见不等数量的3、17、18、20-三体。在235例病人中,除了1、19-三体未发现,其余编号染色体均可见三体存在。

表2 6例染色体双重三体详情

编号	核型	年龄/岁	流产次数	妊娠方式
1	48,XN,+21,+22	41	0	ART
2	48,XN,+21,+22	41	0	ART
3	48,XN,+22,+X	33	0	ART
4	48,XN,+22,+18	40	2	NC
5	48,XN,+21,+10	40	0	ART
6	48,XN,+21,+8	37	0	ART

注:ART为人类辅助生殖技术,NC为自然妊娠。

2.1.2 染色体结构异常结果 47例染色体结构异常的位点不同、拷贝数大小不等,导致其致病性不同。经查询对比DGV、DECIPHER、OMIM、UCSC以及PubMed公共数据库资源可得,未知致病性占55.32%($n=26$)、多态性占25.53%($n=12$)与已知致病性19.15%($n=12$),其中已知致病详情见表3。

所有未知致病性的异常拷贝数范围为0.12~3.64 Mb,多态性为0.28~1.06 Mb,已知致病性为0.24~99.42 Mb。

2.2 染色体异常与病人年龄、妊娠方式及流产次数的关系 与三体组年龄(32.55 ± 4.65)相比,双重三体组年龄(38.67 ± 3.14)明显偏高($t=4.41$, $P < 0.05$)。而染色体正常组年龄较异常组偏低($P < 0.05$),且年龄 < 35 岁组染色体异常发生率明显低于年龄 ≥ 35 岁组($P < 0.05$);染色体的异常率与病人妊娠方式及既往流产次数无关($P > 0.05$)。见表4。

3 讨论

稽留流产发病率高,且病因不明、复杂多样^[3],检测稽留流产病人染色体异常情况,有助于寻找流产原因,最终缓解病人及其家庭身心压力^[4]。

有数据报道,早期流产中胚胎染色体异常率可达50%~60%^[5-8]。常规的G带核型分析被用作检测染色体非整倍性和不平衡的金标准,但此方法失败率较高、易受母体细胞污染、只能检测特定的染色体异常^[9],可造成结果偏差^[10]。而高通量测序技术作为第二代测序的代表,拥有高通量、高精度、低成本、易操作等优势^[11],因而应用广泛。并且范宝光等^[12]指出,高通量基因测序技术能发现稽留流产绒毛染色体的微缺失或重复,为检测染色体结构异常开辟了新的途径,有望成为稽留流产绒毛染色体检测的主要手段。

本研究正是采用高通量测序技术检测235例稽留流产病人绒毛染色体异常情况及基因拷贝

表3 已知致病性染色体结构异常病人9例详情

异常类型	主要临床表征
22q11.21del2.6 Mb	先天性心脏病、腭裂及其他特殊面容,免疫缺陷和自身免疫病等
22q11.21-q13.33dup29.38 Mb	特殊面容,注意缺陷多动障碍,发育迟缓,学习障碍,全身性强直性癫痫等
22q11.1-q11.21dup1.80 Mb	重度发育迟缓,重度智力障碍,癫痫发作,小头畸形,视神经发育不全,胼胝体发育不全,枕角扩大畸形等
10p15.3-p14del11.16 Mb	发育迟缓,身材矮小,特殊面容,喂养困难等
16q22.1-24.3dup21.18 Mb	幽门狭窄,阑尾发育不良,胃食管反流病,卵圆孔未闭,单侧腹股沟疝等
8p23.3-p11.22del38.62 Mb	生长发育迟滞,智力低下,特殊面容,精神运动发育迟滞,先天性心脏病,语言发育迟缓,癫痫,行为异常等
8q11.1-q24.3dup99.42 Mb	身材矮小,关节活动受限,关节僵硬,慢性关节疼痛,骨骼过度生长,手指畸形,脚趾畸形等
16p11.2del0.24 Mb	主早发性肥胖和发育迟缓,部分病人表现出特殊面容,癫痫,行为异常,轻度学习障碍,肌张力低下等
8p23.3-p12dup30.7 Mb	轻度至中度生长发育迟滞和(或)学习障碍,先天性心脏病和轻度特殊面容,注意缺陷多动障碍,癫痫,异常面容等
15q11.2-14dup15.84 Mb	自闭症,智力障碍,共济失调,癫痫,发育迟缓,行为问题等
9p24.3-p23del12.4 Mb	轻度发育迟缓,特殊面容,小头畸形等
22q11.21del0.42 Mb	重度运动和认知障碍,脊柱裂,脊柱侧弯,巨头畸形,脑积水,小脑发育不全,特殊面容等,其母亲携带此缺失片段,无明显的临床表征
7q11.23del1.42 Mb	覆盖了 Williams-Beuren Syndrome (WBS) 约 99.8% 的区域,主要临床表征:轻度至中度智力障碍或学习困难,特殊面容,结缔组织异常,内分泌异常,个性和性格特殊,身材矮小,生长缓慢,具有婴儿特发性高钙血症和心脏缺陷
11q23.3-q25del16.02 Mb	主要临床表征:智力障碍,发育迟缓,巨头畸形,特殊面容,指畸形,髓鞘化延迟,运动及语言延迟等

表4 稽留流产235例绒毛染色体异常相关因素分析

组别	例数	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	年龄分组/例		妊娠方式/例		流产次数/例		
			<35岁	≥35岁	NC	ART	1次	2次	≥3次
正常	70	30.19±3.62	61	9	34	36	26	12	5
异常	165	32.08±4.52	118	47	85	80	45	36	8
$\chi^2(t)$ 值		(-3.11)	6.61		0.17			1.99	
P值		0.018	0.01		0.68			0.37	

注:NC为自然妊娠,ART为人类辅助生殖技术。

数,最终可得染色体异常率为70.21%,与Jurkovic D等^[2]报道相近。

染色体异常包括数目与结构的异常,其中以染色体数目异常为主^[13]。本研究结果中,染色体数目异常占71.5%(包括双重三体及嵌合体),其中非整倍体可达染色体异常的54.55%。有文献表明,大多数非整倍体的发生是因为卵母细胞第一次减数分裂错误所致^[3]。而非整倍体改变中以染色体三体为主,并以16-三体出现频次最高。与本研究一致:16-三体所占比例最高(33.77%),紧随其后的有22-三体(19.48%)、21-三体(15.58%)、15-三体(5.19%)。但与大多数非整倍体发生原因不同的是,16-三体的发生可能与父系第一次减数分裂未分离关系更加密切^[14]。虽然16-三体在早期流产中所占比例极高,但并不能完全说明16-三体是导致流产的主要因素。因其他染色体的异常可能会直接导致胚胎不着床而降低检出率,或其异常染色体并不致死,可持续至孕中、晚期。此外,本研究所出现的77例三体中,除了1、19号染色体未发现三体外,其余编号染色体均存在染色体三体现象^[15],且大部分文献均未见1-三体报道^[16]。

本研究所有嵌合体占异常总数的16.9%,且嵌合类型不一。其中7例单体均为45,X(Turner综合

征),占非整倍体的7.8%。Turner综合征在新生女婴中发病率约达1/5 000,临床病例多见,常表现为身材矮小、性腺发育不良^[17]。由于正常与异常细胞系比例不定,此结果不一定反映真实水平。

染色体结构异常包括重复、缺失、异位、倒位、插入等,本研究中数目异常与重复、缺失、重复与缺失并存。因高通量测序技术准确率、灵敏度均较高,可检测100 kb以上片段大小。此235例样本中发现了0.12~99.42 Mb大小不等的异常片段,拥有较高的染色体异常检出率,增加了诊断的准确性。如上所述,基因异常的位点及大小不同,导致的致病性亦不同;但未知致病性及多态性的异常片段相对较小,易于得到基因补偿而无临床特殊症状表现。

年龄是影响妊娠的一大重要因素,年龄越大、流产率越高^[18]。女性随着年龄的增长,卵子质量会相应下降,且高龄会增加染色体不分离现象,从而导致非整倍体的发生。本研究进一步证明,染色体异常组病人年龄(32.08±4.52)明显高于正常组(30.19±3.62),且年龄≥35岁组染色体异常率(83.92%)较正常组(65.92%)偏高。而表2显示,双重三体病人的年龄(38.5±3.27)异常偏高,考虑高龄更易导致双重三体的发生。而妊娠方式与染色体异常率并无相关关系,这与一项Meta分析结果相一致^[19]。且本研究表明流产次数与染色体的异常率亦无明显必然联系。虽在6例双重三体中,除了1例病人为自然妊娠,其余均为人类辅助生殖技术助孕,分析其原因可能为样本数较小,且病人有不孕史、年龄偏大,因此采取了人类辅助生殖技术。

综上所述,早期流产的主要原因仍以胚胎染色体异常为主。高龄可增加胚胎染色体的异常风险,

但妊娠方式及既往流产次数对胚胎染色体并无明显影响。高通量测序技术可准确、快速地检出染色体异常率及异常情况。

参考文献

[1] FU M, MU S, WEN C, et al. Whole-exome sequencing analysis of products of conception identifies novel mutations associated with missed abortion[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2):2027-2032.

[2] JURKOVIC D, OVERTON C, BENDER-ATIK R. Diagnosis and management of first trimester miscarriage[J]. *BMJ*, 2013, 346: 3676-3683.

[3] TURTORRES MH, GARRIDOGIMENEZ C, ALIJOTASREIG J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 42:11-25.

[4] PYLYP LY, SPYENENKO LO, VERHOGLYAD NV, et al. Chromosomal abnormalities in products of conception of first-trimester miscarriages detected by conventional cytogenetic analysis: a review of 1 000cases[J]. *J Asist Reprod Genet*, 2018, 35:265-271.

[5] SHEN J, WU W, GAO C, et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology[J]. *Mol Cytogenet*, 2016, 9:7.

[6] GUG C, RA IU A, NAVOLAN D, et al. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in miscarriage samples: a retrospective study of 330 cases[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2019, 158(4):171-183.

[7] COLLEY E, HAMILTON S, SMITH P, et al. Potential genetic causes of miscarriage in euploid pregnancies: a systematic review[J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(4):452-472.

[8] 赵炜, 李朔, 苗艳, 等. 染色体微阵列和高通量测序技术在流产胚胎检测中的应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2019, 36(7):676-681.

[9] 赵利娟. 荧光原位杂交在快速产前诊断中的应用[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018, 39(5):789-792.

[10] 司徒梅, 杨树法, 王昕, 等. 荧光原位杂交技术与染色体核型分析在产前诊断中的应用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(1): 55-56.

[11] GALLO ML, LOZY F, BELL DW. Next-generation sequencing [M]// *Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017: 119-148.

[12] 范宝光, 张玥红, 王宾红, 等. 高通量基因测序检测稽留流产绒毛染色体异常的价值分析[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(1):55-56.

[13] 杨春风, 张建平. 复发性流产相关染色体异常问题[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31(9):876-880.

[14] NEUSSER M, ROGENHOFER N, DURL S, et al. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(5): 1130 - 1137.

[15] SOLER A, MORALES C, MADEMONT-SOLER I, et al. Overview of chromosome abnormalities in first trimester miscarriages: a series of 1, 011 consecutive chorionic villi sample karyotypes [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2017, 152(2): 81 - 89.

[16] 王珺, 陈书强, 高玲霞, 等. 1317例早期流产患者绒毛染色体检测结果分析[J]. *生殖医学杂志*, 2019, 28(1): 7-11.

[17] RÍOS ORBAÑANOS I, VELA DESOJO A, MARTINEZ-INDART L, et al. Turner syndrome: from birth to adulthood[J]. *Endocrinol Nutr(English Edition)*, 2015, 62(10):499-506.

[18] 徐丹芬, 赵卓姝, 温倩敏. 168例高龄孕中期高风险胎儿发育畸形患者的羊水细胞染色体核型检测分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27(11):1329-1332.

[19] QIN JZ, PANG LH, LI MQ, et al. Risk of chromosomal abnormalities in early spontaneous abortion after assisted reproductive technology: a meta-analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75953. DOI:10.1371/journal.pone.0075953.

(收稿日期:2019-11-01, 修回日期:2020-01-11)

引用本文:刘晓明,刘寒松,王二玲,等. 颅脑外伤术后血清神经生化标志物及其脑脊液中P73、P38蛋白表达的意义[J]. *安徽医药*, 2022, 26(1): 76-81. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.01.018.

◇ 临床医学 ◇



颅脑外伤术后血清神经生化标志物及其脑脊液中P73、P38蛋白表达的意义

刘晓明^a, 刘寒松^b, 王二玲^a, 冯娟^a, 郑春雷^a, 赵新玲^a, 张宝营^a

作者单位: 郑州大学附属郑州中心医院高新分院,^aICU, ^b普通外科, 河南 郑州 450007

通信作者: 刘寒松, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为普通外科, Email: xiaogangliu2007@sina.com

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191053)

摘要: 目的 探讨颅脑外伤术后血清神经生化标志物及其脑脊液中肿瘤蛋白P73(P73)、P38丝裂原活化蛋白激酶(P38)蛋白表达的意义。方法 选取2017年5月至2019年7月郑州大学附属郑州中心医院收治的101例颅脑外伤术后病人作为观察组, 选取同期体检中心101例健康体检者作为对照组。比较两组、不同预后病人血清中枢神经特异性蛋白(S100β)、人脑髓鞘碱性蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平及脑脊液中P73、P38蛋白表达情况。采用Pearson分析各指标与格拉斯哥预后评分(GOS)的相关性, 采用接收者操作特征(ROC)曲线分析血清神经生化标志物、脑脊液中P73、P38蛋白预测不良预后的价