DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.31.007
文章编号： 1005-8982（2018）31-0037-05

染色体微阵列技术在复发性流产病因诊断中的应用 *

熊佳丽[1]，王晶[2]，董一善[1]，刘建兵[2]，虞斌[2]，顾建东[1]
（南京医科大学附属常州妇幼保健院 1. 妇产科，2. 实验室，江苏 常州 213000）

摘要：目的 探讨自然流产与胚胎遗传学异常的关系以及染色体微阵列（CMA）技术在复发性流产病因诊断中的应用价值。**方法** 选择 2015 年 9 月 -2017 年 6 月南京医科大学附属常州妇幼保健院就诊的自然流产患者 61 例，流产次数≥ 2 次，收集其胚胎绒毛组织样本进行 CMA 遗传学检测。**结果** 全部 61 例组织样本均成功获得 CMA 遗传学检测结果，其中染色体异常者 36 例（59.0%），包括 31 例染色体数目异常（86.1%），4 例染色体结构异常（11.1%），1 例单亲二倍体（2.7%）。**结论** CMA 技术可以快速、简便地检测出流产组织染色体异常，其应用可为流产物检测提供更全面的信息，为患者的病因诊断和再生育风险评估提供指导。

关键词： 复发性流产；染色体微阵列分析；染色体异常；遗传
中图分类号： R714.21 **文献标识码：** A

Application of chromosomal microarray analysis in etiological diagnosis of recurrent spontaneous abortion*

Jia-li Xiong[1], Jing Wang[2], Yi-shan Dong[1], Jian-bing Liu[2], Bin Yu[2], Jian-dong Gu[1]
(1. Department of Obstetrics and Gynecology, 2. Clinical Laboratory, Changzhou Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between spontaneous abortion and embryo genetic abnormalities and the value of chromosome microarray analysis (CMA) in the diagnosis of recurrent spontaneous abortion. **Methods** There were 61 cases with recurrent spontaneous abortion (≥ 2) accepted in Changzhou Maternity and Child Health Care Hospital from September 2015 to June 2017. Chorionic villi were collected from embryos for CMA. **Results** CMA results were successfully obtained in all 61 cases of abortion samples. There were 36 cases of chromosome abnormality (59.0%), of which 31 cases had abnormal chromosome number (86.1%), 4 cases had abnormal chromosome structure (11.1%), and 1 case had uniparental diplont (2.7%). **Conclusions** CMA technique can quickly and easily detect chromosomal abnormalities of abortion tissues. It can provide more comprehensive information for abortion detection, and provide guidance for the etiological diagnosis and fertility risk assessment.

Keywords: spontaneous abortion; chromosome microarray analysis; chromosome abnormalities; inheritance

自然流产在妊娠人群中的发生率达 10% ~ 15%[1]，多为妊娠 12 周前的早期流产。复发性流产指同一性伴侣连续发生 3 次及 3 次以上的自然流产。复发性流产患者随着流产次数的增加，月经失调、宫腔粘连、继发不孕的发生风险不断增加，患者及其家庭的悲伤、焦虑等不良情绪显著增加，故目前普遍认为连续发生 2 次流产即应当重视并进行评估。自然流产常见的原因包括胚胎染色体异常、免疫失衡、内分泌

收稿日期：2018-03-06
* 基金项目：江苏省常州市卫生和计划生育委员会重大项目（No：ZD201613）
[通信作者] 顾建东，E-mail：119432665@qq.com；Tel：15951205661

异常、血栓形成倾向、生殖道畸形或发育不良、生殖道感染及宫颈机能不全等，其中胚胎染色体异常率在早期自然流产中约占 50% ~ 60%[2-3]。因此，胚胎或绒毛组织的染色体检测分析对本次自然流产的病因诊断具有重要意义，为今后的生育指导提供重要信息。

染色体微阵列分析（chromosomal microarray analysis, CMA）是一项新兴的以微阵列为基础的染色体分析技术，对全基因组进行扫描，可检出拷贝数变异（copy number variation, CNV）<1 kb 的微缺失和微重复，突破了以往的细胞核型分析只能发现 5 mb 以上遗传物质改变的技术局限性，且无需组织或细胞培养，避免母体污染，故而将 CMA 技术应用在自然流产的病因诊断中是很有指导意义的。本研究采用 CytoScan 750K 基因芯片（美国 Affymetrix 公司）对 61 例自然流产患者（流产次数≥ 2 次）的胚胎绒毛组织进行 CMA 检测分析，探讨 CMA 技术在复发性流产病因诊断中的临床应用价值，并对夫妻双方再次生育进行遗传风险评估和指导，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 9 月 –2017 年 6 月南京医科大学附属常州妇幼保健院妇科就诊，自然流产次数≥ 2 次，经阴道超声确认胚胎停止发育需行清宫术的孕妇 61 例，选取无菌清宫术取出的胚胎绒毛组织进行 CMA（芯片）检测。患者年龄 22 ~ 42 岁，平均 29.9 岁；孕周 6.43 ~ 13 周，平均 8.86 周；流产次数 2 ~ 4 次。所有患者均签署 CMA（芯片）检测知情同意书。

1.2 材料与试剂

人类组织 DNA 提取试剂盒（德国 Qiagen 公司），Nsp Ⅰ酶、T4 连接酶、PCR 纯化试剂盒、片段化及标记试剂盒、CytoScan 750K（55 万个 CNV 探针 +20 万个 SNP 探针）芯片试剂盒（美国 Affymetrix 公司），PCR 扩增试剂盒（美国 Clontech 公司）。

1.3 仪器与设备

杂交仪 Genechip hybridization oven 645、洗涤工作站 GeneChip®Fluidics Station、扫描仪 GeneChip® Scanner GCS 3000Dx v.2 System 均采用美国 Affymetrix 公司生产。

1.4 实验方法

无菌清宫术中获取的新鲜胚胎组织，经生理盐水冲洗后，用清洁、锋利的手术剪剪取绒毛组织约 20 ~ 100 mg，置于装有生理盐水的 1.5 ml 离心管中，并于 1 h 内送实验室检测。所有胚胎绒毛组织采用人类组织 DNA 提取试剂盒提取全基因组 DNA。CMA 检测均严格按照 Affymetrix 公司提供的标准流程进行，具体步骤简列如下：取 250 ng 胚胎绒毛组织 DNA 经 Nsp I 酶消化为短片段，将 Nsp Ⅰ消化产物末端补齐后经 T4 连接酶连接上共同引物，并进行 PCR 扩增、纯化，经片段化及标记后与杂交液混合均匀，变性后加载于 Cyto Scan 750K 芯片并置于杂交仪中 50℃ 60 r/min，杂交 16 ~ 18 h；经洗涤工作站洗脱染色后用扫描仪捕获图像，获取原始数据。

1.5 结果判读

CMA 获得的原始数据应用 Affymetrix Chromosome Analysis Suite Software 进行分析。参照国际基因组 CNV 多态性数据库 DGV（http：//dgv.tcag.ca/dgv/app/home）、OMIM（http://www.omim.org）、DECIPHER（http：//decipher.sanger.ac.uk）、ISCA（http：//clinicalgenome.org）等数据库以及相关文献判读 CNVs。CMA 结果解读报告严格按照美国医学遗传学会对基因芯片拷贝数变异结果解读指南[5]，将 CNV 分为 3 个等级：①致病性 CNV；②不确定临床意义的 CNV；③非致病性 CNV。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件，计数资料采用频数及率表示，比较采用 χ^2 检验或者 Fisher 确切概率法，P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色体异常的类型及各类型分布

筛选入组的 61 例自然流产患者胚胎绒毛组织样本进行 CMA 检测，均获得诊断结果，检测成功率为 100%，其中 36 例样本 CMA 检测发现异常结果，阳性率 59.0%，包括染色体数目异常 31 例（86.1%），染色体结构异常 4 例（11.1%），整套染色体单亲二倍体 1 例（2.7%）。首先，在 31 例染色体数目异常结果中发现常染色体三体 23 例、性染色体数目异常 3 例、嵌合体 3 例及三倍体 2 例。本研究中发现的常染色体数目异常中以 16 三体最为多见，其次为 9 三体、21 三体及 22 三体；3 例性染色体数目异常均为 X 单体。其次，本研究中发现 4 例染色体结构异常，包括猫叫

综合征 1 例、Y 染色体微缺失 1 例及 2P24.3 微重复 1 例，另有 1 例 12q 微重复（780 kb）经数据库查询临床意义不确定，该例患者共自然流产 3 次，前两次孕 2 个月经阴道 B 超均未探及胎心。见表 1。

表 1　36 例自然流产患者胚胎绒毛组织 CMA 检测异常结果

分类	结果	例数
染色体数目异常		31
常染色体三体		23
7 三体	47，XN，+7	1
9 三体	47，XN，+9	2
13 三体	47，XN，+13	1
15 三体	47，XN，+15	1
16 三体	47，XN，+16	12
20 三体	47，XN，+20	1
21 三体	47，XN，+21	2
22 三体	47，XN，+22	2
21、22 三体	48，XN，+21，+22	1
性染色体数目异常		3
Turner 综合征	45，X	3
嵌合体		3
7，8 三体，XO 嵌合 XY	47，X，+7，+8[51%]/48，XY，+7，+8[49%]	1
15，22 三体嵌合	48，XN，+15，+22[44%]/47，XN，+22[56%]	1
三体嵌合	69，XXY/69，XXX	1
三倍体		2
	70，XXX，+3	1
	69，XXX	1
染色体结构异常		4
染色体微缺失 / 微重复		3
猫叫综合征	arr[hg19] 5p15.33p15.2（113 576–10 720 924）× 110 607 kb arr[hg19]11p15.5p15.4（230 680–9 273 889）× 39 043 kb	1
Y 染色体微缺失	arr[hg19] Yq11.223（24 217 299–24 660 114）× 443 kb	1
2P24.3 微重复	arr[hg19] 2p24.3（13 503 730–14 344 227）× 3 804 kb	1
临床意义不确定性 CNVs	arr[hg19] 12q21.31（82 796 171–83 575 993）× 4 780 kb	1
整套染色体单亲二倍体	arr[hg19]（1–22，X）× 2，hmz	1

2.2　染色体异常在不同孕周中的分布情况

61 例样本中，以 8 周前的复发性流产最为多见，占 34.4%，经 CMA 检测，其异常率也最高，达 85.7%。同时，流产时间发生越早，胎儿染色体异常率呈增高的趋势。见表 2。

表 2　不同孕周染色体异常分布情况

孕周	样本	异常样本	异常率 /%	*P* 值
≤ 8 周	21	18	85.7	0.010†
8^{+1} ~ 9 周	16	10	62.5	
9^{+1} ~ 10 周	10	4	40.0	
10^{+1} ~ 11 周	6	2	2/6	
11^{+1} ~ 12 周	5	1	1/5	
>12 周	3	1	1/3	
总数	61	36	59.0	

注：†2 个单元格最小理论频数 >5，采用 Fisher 确切概率法

2.3　不同年龄阶段的染色异常情况

高龄妇女流产组织染色体数目异常率高达 81.8%，高于低龄妇女（81.8% vs 26.0%）（P <0.05）。见表 3。

2.4　流产次数与染色体异常分布情况

61 例样本中，流产次数为 2 次的患者共 46 例、3

表 3 不同年龄阶段染色体异常比较

组别	染色体数目		染色体结构	
	正常	异常	正常	异常
<35 岁（n =50）	37（74.0）	13（26.0）	46（92.0）	4（8.0）
≥ 35 岁（n =11）	2（18.2）	9（81.8）	11（100.0）	0（0.0）
χ^2 值	9.883†		0.089†	
P 值	0.002†		0.766†	

注：† 最小理论频数 >5，采用校正 χ^2 检验

次为 13 例、4 次为 2 例。其中以 2 次流产中出现染色体异常最为多见，异常率达 60.9%，随着流产次数的增加，异常率呈逐渐下降趋势。见表 4。

表 4 不同流产次数与染色体核型异常分布情况

流产次数 / 次	样本数	异常核型数	异常率 /%	P 值
2	46	28	60.9	0.878†
3	13	7	53.8	
4	2	1	50.0	
合计	61	36	59.0	

注 :†2 个单元格最小理论频数 >5，采用 Fisher 确切概率法

3 讨论

CMA 这一遗传学诊断技术，最大特点的就是一次检测即能够对整个基因组拷贝数进行高通量、高分辨率、高敏感性扫描和分析，能够精确定位变异区段的位置、清除显示该区段的内的基因含量，并能够对基因进行分析，在基因水平上解释患者的临床表现，并评估预后，故 CMA 能够较其他染色体分析技术，能更有效地检出由于染色体导致的流产，并通过对夫妻双方相应位点的检测，对再次生育进行遗传风险评估，具有其他染色体分析技术所无法比拟的优越性 [6]。

本研究对 61 例流产样本进行了 CMA 检测，成功率达 100%。发现染色体异常 36 例，阳性率为 59.0%，其中数目异常 31 例，占 86.1%，是导致胚胎流产的主要原因。绝大多数染色体非整倍体为胚胎期致死性，其中 16 三体所占比例最高，其次为 Turner 综合征，9、22 和 21 三体也占较大的比例，而其他染色体三体所占比例较低。非整倍体多数在孕早期发生流产，16 三体一般在孕早期流产，少数 9、21 三体及 Turner 综合征病例流产可发生于孕中期甚至晚期 [2-3, 7]。若流产胚胎存在非整倍异常，那么这将是导致流产的根本原因。绝大多数染色体非整倍体为新发或者偶发，因此建议患者自然妊娠，做好常规检查、早中孕筛查、产前诊断。而 13、15 号染色体和 21、22 号染色体有发生罗伯逊易位的可能，再发风险高，故建议夫妻双方做核型分析，以排除罗伯逊易位，对再发风险进行评估 [8]。孕妇年龄常为染色体数目异常的高危因素，而本组患者年龄 >35 岁发生染色体数目异常共 21 例。因此对染色体数目异常的筛查不应该仅仅关注高龄人群，因为这些异常应该是由于非年龄因素所致。

本研究共检出 4 例染色体结构异常，占 13.8%，远高于以往研究 6% 的结论 [9]，其原因为核型分析分辨率低，对染色体结构异常的检出率远低于 CMA。2 例样本在染色体发生部分缺失和（或）重复。其中 1 例检测结果显示：① arr[hg19]5p15.33p15.2（113 576–10 720 924）×110 607 kb 致病性变异；② arr[hg19]11p15.5p15.4（230 680–9 273 889）×39 043 kb 致病性变异。该患者染色体在 5p15.33p15.2 区段有 10 607 kb 片段缺失，内含 8 个致病基因，11p15.5p15.4 区段有 9 043 kb 片段重复。其临床表现为：出生后尖锐的猫叫样哭声，智力低下，整体发育迟缓，小头畸形及异常面容，语言发育迟缓，生长发育迟缓，并可能伴有先天性心脏病、神经及肾脏相关的异常和畸形 [10–11]。针对此类患者，考虑为流产儿父母双方一方可能为 4 号、9 号染色体的平衡易位的携带者。故建议双方均需行染色体检查，以此来确认胎儿异常的来源并为再次妊娠提供产前诊断依据。

综上所述，CMA 技术用于自然流产胚胎组织的染色体分析成功率高，分辨率高，>5 Mb 的 CNV 亦能检测出，在常规染色体核型分析中很难或不能被发现而导致漏诊；其次 CMA 检测对标本取材要求远低于传统染色体核型分析技术，不需要活细胞，可以直接提取流产绒毛及死胎组织，能够提供快速、准确的流产物全基因组分析，能够检测染色体数目异常、结构异常、嵌合体等，且无需标本培养。其有效克服了现有其他染色诊断技术的缺点，准确地检验出常规核型能发现的非平衡染色体变异，以后核型技术无法检测到的拷贝数变异，将染色体的诊断水平提高到基因水平，在遗传学分析中表现出明显优势，可以让那些发生复发性流产的患者减少不必要的检查和治疗，为流产病因分析和对夫妻双方再次生育指导提供更有价值的信息。

参 考 文 献：

[1] RAI R, REGANL. Recurrent miscarriage[J]. Lancet, 2006, 368(9535): 601-611.

[2] PHILIPP T, PHILIPP K, REINER A, et al. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies[J]. Hum Reprod, 2003, 18(8): 1724-1732.

[3] 乐杰 , 谢幸 , 林仲秋 , 等 . 妇产科学 [M]. 第 7 版 . 北京 : 人民卫生出版社 , 2009: 134.

[4] DHILLON R K, HILLMAN S C, MORRIS R K, 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.

[5] KEARNEY H M, THORLAND E C, BROWN K K, et al. American college of medical genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants[J]. Genet Med, 2011, 13(7): 680-685.

[6] American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis[J]. Obstet Gynecol, 2013, 122(6): 1374-1377.

[7] WARREN J E, SILVER R M. Genetics of pregnancy loss[J]. Clin Obstet Gynecol, 2008, 51(1): 84-95.

[8] KO D S, CHO J W, LEE H S, et al. Preimplantation genetic diagnosis outcomes and meiotic segregation analysis of robertsonian translocation carriers[J]. Fertil Steril, 2013, 99(5): 1369-1376.

[9] GODDIJN M, LESCHOT N J. Genetic aspects of miscarriage[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000, 14(5): 855-865.

[10] ZHANG X, SNIJDERS A, SEGRAVES R, et al. High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(2): 312-326.

[11] CHEN K J, LIU Y M, LI C H, et al. Prenatal diagnosis of paternal duplication of 11p15.5→14.3: Its implication of Beckwith-Wiedemann syndrome[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2016, 55(6): 877-880.

（张西倩　编辑）