

母体血浆中胎儿游离 DNA 的研究现状及进展

邹昕,杜娟 综述,卢光琇 审核

(中南大学生殖与干细胞工程研究所,湖南 长沙 410078)

[中图分类号] R714.7 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)10-0862-04

据统计,我国每年约有 100 万缺陷儿出生,不但影响了人口素质,也给社会和家庭带来了沉重的经济和精神负担。进行产前筛查和诊断是减少和避免出生缺陷的有效干预手段。传统的产前诊断取材主要包括绒毛、脐血和羊水等,这些胎儿样本均要通过有创性技术获得,增加了感染、流产、早产甚至胎儿宫内死亡的风险。近年来的研究发现在妊娠母体的血浆中存在游离胎儿 DNA (cell-free fetal DNA) 且含量相对丰富,这一发现为开展无创性的产前诊断提供了新的途径。本文将针对母体血浆中胎儿游离 DNA 的生物学特性,尤其是在遗传性疾病产前诊断中的研究新进展作一综述。

1 胎儿游离 DNA 的发现

二十世纪中叶以来,陆续有科学家以肿瘤患者为研究对象,证实了循环血中存在游离核酸。根据这些启示,Lo 等^[1]在 1997 年以妊娠男性胎儿孕妇为研究对象,直接利用母亲血浆 DNA 扩增出 Y 染色体上的 DYS14 序列,首次证实了母体血浆中存在胎儿游离 DNA,且含量随孕周的延长而增加^[2]。自此,作为一种新的资源,母体血浆中的胎儿游离 DNA 在产前诊断的应用研究拉开了序幕。

2 胎儿游离 DNA 的生物学特性

2.1 来源

目前胎儿游离 DNA 的来源和释放机制尚无定论,可能的来源有:①来源于胎儿细胞。透过胎盘屏障进入母体循环的部分胎儿细胞受到母体免疫攻击而破裂,DNA 释放入母体血浆^[1]。②来源于胎盘滋养层细胞。Watanagawa 等^[3]证实胎儿游离 DNA 的

含量与胎盘的体积不相关,而是与胎盘细胞凋亡的程度有关,提示凋亡的胎盘细胞是又一重要来源。Tjoa 等^[4]通过胎盘离体实验证实了这一结论。Hui 等^[5]观察到顺产孕妇产后即时血浆胎儿游离 DNA 较剖宫产孕妇含量高,认为在孕妇顺产过程中更多的胎盘滋养层细胞进入到母体血浆中,提高了胎儿游离 DNA 的含量。③也可能与孕妇清除胎儿 DNA 的能力下降有关。

2.2 含量及动力学变化

相比母血浆中的胎儿细胞,胎儿游离 DNA 的含量相对丰富,并且与母血浆中含量较少的有核细胞无数量相关性^[6]。胎儿游离 DNA 的含量随孕周的延长而增加,孕 7 周时的平均浓度为血浆总 DNA 浓度的 3.4%,到孕晚期出现剧增,平均每周增加 29.3%,含量达到 6.2% 左右^[2,7],但在分娩后很快被母体清除。

2.3 构成

由于母体血浆中胎儿游离 DNA 主要来源于凋亡细胞,故这些胎源 DNA 分子的片段长度较小,长度 > 193 bp 的片段仅占 20%,并且大部分不超过 300 bp。而母源性 DNA 分子片段长度 > 201 bp 的 57%^[8],平均长度在 1 000 bp 左右。

3 胎儿游离 DNA 的分离提取和检测

一般选择采集母亲外周血样,离心提取血浆 DNA 再针对胎儿 DNA 进行检测的策略。有报道表明离心速度过快、样本放置时间过长都会导致母血细胞破坏和凋亡,增加了背景母血 DNA 量,间接稀释了胎儿 DNA^[9]。胎儿游离 DNA 较稳定,在 -20℃ 情况下至少能保存 4 年^[10]。

目前国内外多采用 QIAGEN 公司的 DNA 提取

[收稿日期] 2009-01-13; [修回日期] 2009-03-30
[作者简介] 邹昕,女,硕士研究生。主攻方向:遗传病产前诊断。

试剂盒或 Roche 公司的高纯度 PCR 模板提取试剂盒等通过手工过柱法进行血浆 DNA 的提取。由于胎儿游离 DNA 在母血浆含量较少,因此在提取 DNA 的过程尽可能富集胎儿 DNA 是一个比较关键的步骤。有报道通过琼脂糖电泳对母体血浆游离 DNA 进行分级分选,根据胎儿游离 DNA 多小于 300 bp 的特性收集 100~300 bp 的 DNA 片段作为富集的胎儿游离 DNA 分子进行检测,研究者认为这种分选可提高胎儿游离 DNA 的相对含量,提高检出率^[11]。2005 年, Huang 等^[12]提出利用 Roche 公司的 MagNA Pure LC instrument 系统进行自动化的 DNA 提取,不但可以方便同时处理大量样本,更重要的是能够针对性地提高胎儿 DNA 的产量和纯度,以及随后的 PCR 扩增效率。

以往胎儿游离 DNA 的检出多采用 PCR 技术检测男胎 Y 染色体上的特异序列,且准确率逐步提高,目前已近 100%^[1,2,13]。鉴于这种方法的性别局限性,学者们开始寻找通用的胎儿游离 DNA 特异标记。Chim 等^[14]发现 maspin 基因启动子区的甲基化程度在胎儿细胞中较孕妇外周血细胞中低,可用于检测胎儿游离 DNA 且不受胎儿性别和遗传多态性的影响。而 RASSF1A 是一种新的胎儿 DNA 的表观遗传标记。它与 maspin 正好相反,母源性 RASSF1A 是非甲基化的,胎源性的则为高甲基化。利用甲基化特异性酶消化掉母源性非甲基化的 RASSF1A,即可检测到胎源性高甲基化 RASSF1A^[15]。该方法较检测 maspin 更简单,准确率更高。

4 胎儿游离 DNA 在产前诊断中的应用

4.1 性别鉴定

利用胎儿游离 DNA 进行性别鉴定,可选择性预防性连锁遗传病患儿的出生。Rijnders 等^[16]利用实时定量 PCR 扩增母体血浆中 SRY 基因序列,为 15 名 7~16 周孕龄的高危孕育 X-性连锁遗传病患儿的孕妇进行了胎儿性别鉴定。结果显示 6 名胎儿为 SRY 阳性,9 名为阴性,临床符合率 100%。Zimmermann 等^[17]检测 Y 染色体上多拷贝的 DYS14 序列,消耗样本较少、灵敏性更高,最早在孕 5 周就检测出胎儿游离 DNA。

无创性胎儿性别鉴定还可以为某些遗传病的宫内治疗提供依据。如先天性肾上腺皮质增生症的宫内治疗方案依胎儿性别有所差异。Rijnders 等^[16]对高危生育该遗传病患儿的孕妇进行胎儿游离 DNA 的 SRY 基因扩增。确定胎儿为女性则继续用地塞

米松治疗,若为男性则中断治疗以避免激素治疗的副作用。

对胎儿游离 DNA 的 Y 染色体特异性 STR 位点的检测也在逐渐应用到妊娠男性胎儿孕妇的无创性产前亲子鉴定中^[18],并可作为性别鉴定 PCR 扩增成功与否的可靠参照^[19]。

4.2 胎儿血型检测

2005 年, Brojer 等^[20]利用胎儿游离 DNA 对 RhD 阴性孕妇的胎儿 RHD 基因进行检测,准确率达 99.6%。由于西方人群中 RhD 阴性血型者比例较高,目前英国等欧洲国家已经将该项检查列入了常规产前诊断项目。Li 等^[21]采用胎儿游离 DNA 检测 KEL1 基因,排除 KEL-1 阳性胎儿与 KEL-1 阴性母亲产生的溶血风险,准确率达 94%。

4.3 染色体非整倍体综合征

妊娠染色体三体胎儿孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的浓度较正常孕妇高, Farina 等^[22]运用胎儿游离 DNA 检测技术联合常规产前血清学筛查诊断 21-三体综合征胎儿,检出率达到 86%,表明胎儿游离 DNA 对某些染色体病的检出有一定意义。

4.4 单基因遗传病

近几年,运用胎儿游离 DNA 进行单基因遗传病的产前诊断已经从性别鉴定逐渐趋于直接检测胎儿是否携带致病基因。

4.4.1 常染色体显性遗传病 对于常染色体显性遗传病,可直接检测胎儿是否携带突变,是否有患病风险。

软骨发育不全症是一种点突变为主的常染色体显性遗传病,99% 的病人是 FGFR3 基因发生了 G1138A 突变。2007 年 Li 等^[23]应用单等位基因碱基延伸反应(SABER)和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)法以及 hME(homogeneous mass-extend)法对 2 名孕妇进行产前诊断,均检测到了 G1138A 突变,并且认为 SABER 法的特异性优于 hME 法。

强直性肌营养不良症和亨廷顿病都是由于致病基因内三核苷酸重复序列异常扩增所致。Amicucci 等^[24]采用巢式 PCR 和狭缝分子杂交对一名孕 10 周孕妇血浆中胎儿游离 DNA 进行检测,结果显示胎儿遗传了父亲的致病基因,为强直性肌营养不良症患者。González-González 等^[25]为一名孕妇分析胎儿游离 DNA 中亨廷顿病致病基因内 CAG 序列的重复数,结果仅检测到正常重复数目的父源基因,提示胎儿不是患者。这些结果与绒毛膜取样结果吻合。

4.4.2 常染色体隐性遗传病 主要是检测胎儿是否遗传了父源性的致病基因,这样可使部分孕妇免受有创性产前诊断的痛苦。

β -地中海贫血症是研究较多的疾病,早期多采用对胎儿游离 DNA 进行 PCR 扩增并结合酶切分析。2004 年,Ding 等^[26]联合运用 SABER 法和质谱分析检测 4 种常见的 β -珠蛋白基因突变,为 12 名胎儿中的 6 名排除了罹患重症的风险。SABER 法能有效抑制母源性等位基因扩增干扰,提高特异性和检出率^[23,26],Ding 等^[26]运用此方法成功检出了 2 例在常规碱基延伸反应检测中呈阴性结果的病例,避免了漏诊。2005 年,Li 等^[27]发展了利用胎儿游离 DNA 研究 β -珠蛋白基因点突变的新方法。他们在 PCR 中加入肽核酸(PNA),PNA 可以和 DNA 高亲和,且不被 Taq 酶扩增,能有效钳制母源性等位基因。这种方法的灵敏性达 100%,特异性也达到了 93.8%,一例假阳性的出现作者认为可能是由于胎儿游离 DNA 量过少导致扩增不稳定所致。Lazaros 等^[28]应用巢式 PCR 和变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测了 37 名孕 7~9 周孕妇血浆中胎儿游离 DNA,结果显示其中有 25 例胎儿 DNA 出现了父源性突变。与羊膜腔穿刺检查结果相比,该方法的特异性为 100%,灵敏度为 96%。一例假阴性的出现可能与孕周过早、胎儿游离 DNA 量过少以及扩增片段(637 bp)过大有关。最近陈熙等^[29]针对该基因 CD17(A-T)突变分别设计了野生型和突变型的 cycling 探针,应用实时 PCR 技术对 6 名孕 23~26 周的孕妇(与丈夫携带不同突变)血浆 DNA 进行了检测,其中 3 例胎儿游离 DNA 中出现了与父亲相同的 CD17(A-T)突变,证明胎儿遗传了父亲的突变,至少是 β -地中海贫血症携带者。

先天性肾上腺皮质增生症是由 CYP21 基因突变引起。Chiu 等^[30]检测了一名有 CAH 患儿生育史的孕 11 周孕妇血浆中的胎儿游离 DNA。研究者选用了三组标记,包括 CYP21 基因内的 SNP 位点 IVS2 564 和 IVS2 588、基因外 STR 位点 D6S273 和 D6S299 和人类白细胞抗原(HLA)经典二类分子多态位点 DRB1,最终有 4 个标记提示检出的父源性等位基因是正常的,从而排除了胎儿罹患该种遗传病的危险。

囊性纤维化是白种人中最常见的致死性常染色体隐性遗传病,致病基因为 CF 基因。Bustamante-Aragones 等^[31]采用单碱基延伸 SNP 分型技术(SNaPshot)对 3 名孕 12 周孕妇的血浆胎儿游离 DNA 进行了父源性突变的检测。其中有两例出现

了父源性突变峰,结果与后续的绒毛活检结果完全吻合。这一新型的小测序技术简单易操作,并且在检测微量突变时灵敏度很高。

部分 Leber 先天性黑蒙症为常染色体隐性遗传,致病基因为 CRB1 基因。Bustamante-Aragones 等^[32]对一位曾生育过 Leber 先天性黑蒙患儿的孕 12 周孕妇进行了胎儿游离 DNA 的变性高效液相色谱(dHPLC)检测,结果显示存在突变峰,即胎儿遗传了父源性突变。dHPLC 技术在检测低含量的突变时有较大优势,当胎儿游离 DNA 占血浆总 DNA 的比例低至 2%时,仍能检测到父源性突变^[35]。

4.4.3 性连锁遗传病 如前所述,性连锁遗传病可以通过性别鉴定来减少风险患儿出生,同样也可以通过胎儿游离 DNA 检测胎儿是否携带致病突变来预防患儿的出生。视网膜色素变性是一种遗传方式多样的遗传病,其中以 X-连锁隐性型最为严重,致病基因是位于 X 染色体上的 RP2 基因。Bustamante-Aragones 等^[33]对一名丈夫携带 RP2 基因 Q314X 突变的孕妇进行了血浆胎儿游离 DNA 的 PCR 和酶切检测,并最终检出了父源性的 Q314X 突变。研究者还对 PCR 扩增产物进行了测序分析,发现孕 19 周采集的血浆 DNA 能清晰地检测到突变,而孕 10 周的则检测不到。说明孕早期的胎儿游离 DNA 浓度低,应采用合适的方法进行检测避免漏诊。

5 结论与展望

产前诊断的基本要求有安全、准确、早期和高效,无创性产前诊断将是今后产前诊断的发展趋势。母体血浆中胎儿游离 DNA 为无创性产前诊断提供了新的材料。虽然某些关键问题仍有待解决,如有效避免母源性 DNA 的干扰,提高胎儿游离 DNA 的总量,建立优化的实验条件避免漏诊错诊等,我们相信随着研究的深入,利用胎儿游离 DNA 进行产前诊断的技术将日益成熟,无创性产前诊断技术将取得新的突破,从而更好地为临床服务。

[参考文献]

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076):485-487.
- [2] Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4):768-775.
- [3] Wataganara T, Metzenbauer M, Peter I, Johnson KL, Bianchi

- DW. Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(2):496-500.
- [4] Tjoo ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(2):400-404.
- [5] Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation[J]. *Prenatal Diagn*, 2008, 28(4):304-308.
- [6] Hyodo M, Samura O, Fujito N, Tanigawa M, Miyoshi H, Fujiwara H, et al. No correlation between the number of fetal nucleated cells and the amount of cell-free fetal DNA in maternal circulation either before or after delivery[J]. *Prenatal Diagn*, 2007, 27(8):717-721.
- [7] Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM, et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(4):678-680.
- [8] Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(1):88-92.
- [9] Dukes KA, Sullivan LM, Lewis D, Johnson KL, Bianchi DW, Simpson JL, et al. The effect of the elapsed time between blood draw and processing on the recovery of fetal cells from maternal blood[J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2004, 11(3):154-165.
- [10] Koide K, Sekizawa A, Iwasaki M, Matsuoka R, Honma S, Farina A, et al. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women[J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25(7):604-607.
- [11] Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report[J]. *Prenat Diagn*, 2004, 24(11):896-898.
- [12] Huang DJ, Zimmermann BG, Holzgreve W, Hahn S. Use of an automated method improves the yield and quality of cell-free fetal DNA extracted from maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(12):2419-2420.
- [13] Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation[J]. *Hum Genet*, 2005, 117(2-3):243-248.
- [14] Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(41):14753-14758.
- [15] Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(12):2211-2218.
- [16] Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma[J]. *Obstet Gynecol*, 2004, 103(1):157-164.
- [17] Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(9):1598-1604.
- [18] Deng Z, Wu G, Li Q, Zhang X, Liang Y, Li D, et al. Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR[J]. *Prenat Diagn*, 2006, 26(4):362-368.
- [19] Wagner J, Dzijan S, Pavan-Jukic D, Wagner J, Lauc G. Analysis of multiple loci can increase reliability of detection of fetal Y-chromosome DNA in maternal plasma[J]. *Prenatal Diagn*, 2008, 28(5):412-416.
- [20] Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma[J]. *Transfusion*, 2005, 45(9):1473-1480.
- [21] Li Y, Finning K, Daniels G, Hahn S, Zhong X, Holzgreve W. Noninvasive genotyping fetal Kell blood group(KEL1) using cell-free fetal DNA in maternal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Prenatal Diagn*, 2008, 28(3):203-208.
- [22] Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, et al. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(2):239-242.
- [23] Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Noninvasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(1):11-17.
- [24] Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(2):301-302.
- [25] González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Diaz-Recasens J, et al. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR[J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23(3):232-234.
- [26] Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(29):10762-10767.
- [27] Li Y, Di Maro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma[J]. *JAMA*, 2005, 293(7):843-849.
- [28] Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Makrydimas G, Dalkalitsis N, Stefos T, et al. Non-invasive first-trimester detection of paternal beta-globin gene mutations and polymorphisms as predictors of thalassemia risk at chorionic villous sampling[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 140(1):17-20.
- [29] 陈熙,任景慧,郭辉,林秋华,姚秋璇.实时PCR和cycling probe技术检测母血浆游离胎儿DNA筛选重型 β 地中海贫血胎儿[J].南方医科大学学报,2008,28(7):1210-1213.
- [30] Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study[J]. *Clin Chem*, 2002, 48(5):778-780.
- [31] Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, et al. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma[J]. *J Cyst Fibros*, 2008, 7(6):505-510.
- [32] Bustamante-Aragones A, Vallespin E, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Diego-Alvarez D, et al. Early noninvasive prenatal detection of a fetal CRB1 mutation causing Leber congenital amaurosis[J]. *Mol Vis*, 2008, 14:1388-1394.
- [33] Bustamante-Aragones A, Garcia-Hoyos M, Rodriguez DE Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, et al. Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing[J]. *Ann N Y Acad*, 2006, 1075:108-117.

(本文编辑:王庆红)