

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00089

• 综述 •

唐氏综合征产前筛查方法研究进展

刘 晓, 仲人前*

第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003

[摘要] 唐氏综合征作为一种常染色体疾病, 对其进行产前筛查具有十分重要的临床意义。近年来, 血清学筛查标记物的临床应用越来越广泛, 虽然在一定程度上提高了唐氏综合征的检出率, 但唐氏综合征检出率仍只能达到 60% 左右。而通过新一代测序技术进行直接核酸分析, 筛查胎儿染色体非整倍体检测, 能更精确地检出唐氏综合征患儿。本文对唐氏综合征产前筛查手段的历史进行了回顾和分析, 对现行的筛查技术, 特别是新型血清标记物和新一代测序技术的原理、筛查性能等进行了综述。

[关键词] 唐氏综合征; 产前诊断; 生物学标记; DNA 序列分析

[中图分类号] R 714.55 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0089-05

Prenatal screening for Down's syndrome: recent progress

LIU Xiao, ZHONG Ren-qian*

Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] Down's syndrome is an autosomal disease and its prenatal screening is particularly important. In recent years, clinical application of serological screening markers has been widely used, which improved the detection rate of Down's syndrome, but still remained at about 60%. The new generation of sequencing technology for direct analysis of nucleic acids, which can be used for fetal chromosomal aneuploidy detection, can detect Down's syndrome more accurately. In this paper, we compared the prenatal screening methods for Down's syndrome in recent decades, and reviewed the new screening markers based on proteomics and bioinformatics technology for clinical application.

[Key words] Down syndrome; prenatal diagnosis; biological markers; DNA sequence analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1): 89-93]

唐氏综合征(Down's syndrome, DS)又称 21-三体综合征, 是一种常见的常染色体畸变所导致的出生缺陷类疾病, 总发病率约为 1/800^[1]。DS 的发病风险与孕妇年龄密切相关, 33 岁以上的孕妇产下 DS 患儿的风险随着年龄的增长成倍增加, 40 岁以上的孕妇产下 DS 患儿的风险更高达 1/32, 英国国家 DS 细胞遗传注册委员会指出, 1989 年至 2008 年, 由于缺乏更准确的筛查方法导致英国的 DS 患儿数量又增加了 48%^[2]。近年来, 通过常规产前筛查后, 高风险的孕妇会选择有创的侵入性检测如羊膜腔穿刺术或者绒毛膜绒毛取样来获得明确诊断。然而, 这些有创检查可能会导致 1% 的流产率^[3-4]。因此, 对于特异性更高、敏感性更好的无创产前筛查的需求就变得尤为迫切。目前的无创产前筛查是利用新一代的测序技术进行非整倍体筛查, 从而提高 DS 患儿的

检出率。本文主要就 DS 产前筛查技术作一综述。

1 传统筛查方法

1.1 现状概述 20 世纪 80 年代初, 孕妇的年龄被认为是最有效的 DS 筛查手段, 所有 35 岁以上的孕妇都要接受有创诊断, 而这些检查也仅限于 35 岁以上孕妇及有家族史的人群^[5]。其实这是非常不合理的, 首先, 以孕妇的年龄作为单一判定标准的准确率低于 35%, 这说明大部分 35 岁以上孕妇接受的有创检查为无效检测, 同时也导致许多低龄孕妇的 DS 患儿被漏检^[6]。其次, 生活水平提高后妇女的生育年龄普遍推后, 使得人们不得不去考虑这种筛查模式的经济学问题。此后, 为提高 DS 筛查的敏感性, 引入了生物化学及超声的筛查方法, 结合已有的孕妇年龄筛查方法从而提高风险性评估的准确性。

[收稿日期] 2013-08-28

[接受日期] 2013-10-29

[作者简介] 刘 晓, 硕士生, E-mail: roseliuxiao@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886077, E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

1.2 血清学标记物 1984年,研究者发现孕妇血清中甲胎蛋白(AFP)降低(下降约25%)与胎儿基因非整倍体性相关^[7-9]。AFP是由卵黄囊和胎儿肝脏产生的一类血清糖蛋白,在成人体内发挥着与白蛋白同样的功能^[10]。DiMaio等^[11]认为这一发现有效地降低了35岁以下孕妇接受有创检测的风险。因此,AFP被作为重要的DS血清学筛查指标。此后,研究人员对一系列妊娠母体血清学标记物与DS的相关性进行了实验评估,人绒毛膜促性腺激素(hCG)、雌三醇、抑制素A和妊娠相关血浆蛋白A(PAPP-A)几种血清标记物也进入了筛查方案。hCG是一种激素,最初由胚胎分泌,随后由合体细胞滋养层分泌,其功能是保证孕激素的分泌。1987年,Bogart等^[12]发现,孕妇血清中hCG水平异常升高(为正常值的2倍以上)与DS有相关性,在孕期15~20周时,将AFP与hCG联合检测,风险阈值为1:250,DS患儿检出率为60%左右。在1990年,雌三醇也被加入到筛查方案,称为三联标记方案,而hCG也被游离 β -hCG($f\beta$ -hCG)所替代,从而提高了DS筛查的准确性,检出率达到67%^[13-15]。但在应用过程中发现,三联法较二联法在筛检阳性率方面并没有很大提高,也没有降低假阳性率,而筛查费用却增加。研究发现抑制素A水平在DS妊娠妇女血清中明显升高,随后将其纳入筛检方案,称为四联标记组合方案,其阳性检出率提高到75%^[16]。上述的二联、三联和四联标记方案组阳性检出率均优于单一以孕妇年龄作为筛检依据的方案,但其缺陷是只能在孕中期进行检查。如能有更好的孕早期筛查标记物,则可以明显减轻孕妇在孕中期发现DS患儿后所承受的痛苦。1991年,研究者发现50%的DS妊娠孕妇血清中PAPP-A水平降低,并且这项指标的变化可在妊娠8周左右即被检出^[13,17],已作为孕早期DS的筛检方案之一。

由于以上血清学标记物有较高的假阳性率,作为产前筛查手段可能会导致5%甚至更多的孕妇需要进行有创检测以发现DS患儿,DS患儿的发现率约为60%,同时也会造成一部分非DS患儿流产^[18-19]。

1.3 超声检测 除了上述生化指标,超声成像技术也应用于DS产前筛查。1992年,Nicolaides等^[19]将颈部透明带(NT)应用于超声筛查项目。NT是孕

11~13周胎儿颈部脊柱软组织与皮肤之间的皮下透明层,在接受调查的1273名孕妇中,当NT值 ≥ 2.5 mm时,胎儿DS患病率为84%^[19]。

2 新的筛查方法

2.1 新血清学标记物 1997年,研究人员发现在母体的血浆中存在着胎儿游离DNA(cffDNA),为新的产前筛查方案提供了方向^[20]。最新研究发现的在母体血清中非表观遗传学及表观遗传学筛查标记物都有可能增加到目前的筛查方案中,甚至替代目前的方案,以提高筛查的精确性及灵敏度。目前已发现的标记物包括:胎盘生长因子(PIGF)、解整合素样金属蛋白酶12(ADAM12)、CA-153、CA-199、唐氏综合征细胞黏附分子(DSCAM)、双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶1A(DYRK1A)、磷酸二酯酶9A(PDE9A)、唐氏综合征危象区基因4(DSCR4)、丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制因子5(SERPINB5)等^[20-29]。

表观遗传学检测方案是在大量的母体DNA片段(约占总DNA的90%)中鉴别出胎儿DNA分子。母体和胎儿DNA甲基化差异是目前DS产前检测的主要标记^[30]。确定了胎儿的特异性标记物,随后就可以根据染色体检测来确定DS,从而可以提高目前筛查方案的敏感性。PIGF及ADAM12标记物的检测需在怀孕10周前完成,10周后这2个标记物几乎就无法检测到。如将PIGF作为孕早期联合检测项目,可以将阳性检出率提高4%~7%^[31]。Kamyab等^[25]发现DSCAM及DYRK1A联合检测的特异性可达96%,灵敏度达80%。PDE9A在母体血液中已完全甲基化,而在胎盘中为未甲基化,Lim等^[26]发现其在DS妊娠中阳性检出率为77.8%,假阳性率为5%,由此证明PDE9A可以作为孕早期无创筛查DS的有效标记物。在未来开展对这些生化标记物的进一步验证实验,将有助于改善我们目前的筛查方案。

2.2 新一代测序技术 当发现母体血浆中含有cffDNA^[20]后,就开始研究无创产前诊断DS和其他非整倍体疾病,如18-三体综合征、13-三体综合征。与产前筛查不同,无创产前诊断得出的是确切的诊断而非患DS的风险系数。目前无创产前诊断还可以用于血型检查,以及一些单基因病,如镰状细胞贫血症^[32]。近年来研究发现,通过数字PCR及大规模

平行测序(MPS)可以从母体血浆中检测出染色体异常情况^[3,33]。由于孕妇血浆中只含有10%左右的cffDNA,而要判断DS患儿就需要在21号染色体上检测到5%DNA序列发生变异。常规的实时定量PCR相差一个循环阈值相当于拷贝数2倍的差异,要在10%的总DNA中检测到1.5倍拷贝数的差异是十分困难的^[34]。而数字PCR技术可以轻松检测到小于2倍的拷贝数变化,对于这类低比例的DNA序列后续检测十分有利。数字PCR微流体芯片比传统RT-PCR具有更好的精密度和准确性^[35]。Lun等^[36]成功地用PCR微流体芯片检测到了胎儿的Y染色体,比非数字实时定量PCR显示出更高的灵敏度和更高的准确性。2007年,Lo等^[37]将数字PCR应用于DS的无创检查,即用数字PCR技术确定胎盘特异表达基因4(PLAC4)mRNA上的单核苷酸多态性不平衡性,而PLAC4是一种当孕妇孕有DS患儿时,定位于21号染色体上的由胎盘表达的转录物,其DS检出率大约为95%,假阳性率约为5%。

母体血浆中含有cffDNA的发现推动了无创产前筛查的发展,目前最为可信的方法是通过高通量测序技术中的MPS检测cffDNA非整倍体性,即从母体血浆中获取cffDNA,对数以百万计的DNA序列进行测序,通过与正常人类染色体基因组对比进行数据分析,从而准确辨别出变异的染色体^[38]。高通量测序技术已成功地运用到了胎儿染色体非整倍体无创产前检测中,使DNA测序成本大大降低,因此相关检测目前在国内外都已商业化,比如Sequenom公司、华大基因等。经过近年来大量的临床研究,其DS的阳性检出率和特异性大于99%^[39]。

美国Aria Diagnostics公司在MPS基础上开发出了多通路MPS分析,是对靶向染色体进行测序,称为“指定区域数字分析”(DANSR)。在Sparks等^[40]的研究中,DANSR作为一种运算方式,用来检测胎儿三染色体性的风险优化分数(FORTE),其结合了年龄相关风险和样本中cffDNA检测得到的三染色体性单一风险得分。在母体血浆中,低比例的cffDNA可能导致胎儿染色体失衡难以定量,使结果不准确,而FORTE是通过结合多因素的计算方法得到胎儿非整倍体性的危险系数。但如果有足够的cffDNA时,就可以轻易检测出三倍体与二倍体的差异,无须依赖FORTE就可诊断出三染色体性^[40]。

Ashoor等^[41]结合DANSR和FORTE这两种检测方法对400例孕妇进行检测,其中300例为整倍体(正常孕妇)、50例为18-三体综合征(爱德华综合征)、50例为DS,其阳性检出率为100%,假阳性率为0%。不过这项研究的检测对象是高危孕妇,但未来可用此种检测方法为所有的孕妇提供高精度的产前筛查^[42]。Chui等^[39]认为如果能较好地参考测序结果,98%的有创诊断检查如羊水穿刺等可以被避免。

3 小 结

DS的筛查手段已经从单一的以年龄作为主要的筛查手段,发展到以一些新的生化标记物及超声检查作为常规产前筛查手段,提高了检测的灵敏度并减少了假阳性率。目前的研究重点是通过无创技术,如数字PCR和新一代测序技术进行产前筛查。英国的最新研究报道:对孕早期胎儿通过无创产前检测进行三染色体性筛查,其21-三体综合征阳性检出率大于99%,假阳性率为0.1%,而18-三体综合征的阳性检出率也达到了85%~90%,假阳性率为5%^[43]。总之,相较于常用的血清学筛查方法及羊水穿刺、脐静脉穿刺等有创产前检测方法,无创产前检测无论在灵敏度、准确性还是安全性方面均具有明显优势,相信随着检测方案及检测技术的不断完善,无创产前检查有望成为DS产前筛查和确诊的有效方法,在预防DS患儿的出生中发挥更为重要的作用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 胎儿常见染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准[S]//第1部分:中孕期母血清学产前筛查. 北京:中国标准出版社,2010:1-9.
- [2] Morris J K, Mutton D E, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome[J]. J Med Screen, 2002, 9: 2-6.
- [3] Chiu R W, Cantor C R, Lo Y M. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies[J]. Trends Genet, 2009, 25: 324-331.

- [4] Ferguson-Smith M A. Placental mRNA in maternal plasma: prospects for fetal screening [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 4360-4362.
- [5] Haddow J E, Palomaki G E, Knight G J, Williams J, Pulkkinen A, Canick J A, et al. Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers [J]. *N Engl J Med*, 1992, 327: 588-593.
- [6] Benacerraf B R, Gelman R, Frigoletto F D Jr. Sonographic identification of second-trimester fetuses with Down's syndrome [J]. *N Engl J Med*, 1987, 317: 1371-1376.
- [7] Merkatz I R, Nitowsky H M, Macri J N, Johnson W E. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1984, 148: 886-894.
- [8] Cuckle H S, Wald N J, Lindenbaum R H. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome [J]. *Lancet*, 1984, 1: 926-929.
- [9] Fuhrmann W, Wendt P, Weitzel H K. Maternal serum-AFP as screening test for Down syndrome [J]. *Lancet*, 1984, 2: 413.
- [10] Gillespie J R, Uversky V N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1480(1-2): 41-56.
- [11] DiMaio M S, Baumgarten A, Greenstein R M, Saal H M, Mahoney M J. Screening for fetal Down's syndrome in pregnancy by measuring maternal serum alpha-fetoprotein levels [J]. *N Engl J Med*, 1987, 317: 342-346.
- [12] Bogart M H, Pandian M R, Jones O W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities [J]. *Prenat Diagn*, 1987, 7: 623-630.
- [13] Canick J A, Kellner L H. First trimester screening for aneuploidy: serum biochemical markers [J]. *Semin Perinatol*, 1999, 23: 359-368.
- [14] Crossley J A, Aitken D A, Connor J M. Second-trimester unconjugated oestriol levels in maternal serum from chromosomally abnormal pregnancies using an optimized assay [J]. *Prenat Diagn*, 1993, 13: 271-280.
- [15] Ryall R G, Staples A J, Robertson E F, Pollard A C. Improved performance in a prenatal screening programme for Down's syndrome incorporating serum-free hCG subunit analyses [J]. *Prenat Diagn*, 1992, 12: 251-261.
- [16] Aitken D A, Wallace E M, Crossley J A, Swanston I A, van Pareren Y, van Maarle M, et al. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334: 1231-1236.
- [17] Brambati B, Macintosh M C, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, et al. Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1993, 100: 324-326.
- [18] Buckley F, Buckley S. Wrongful deaths and rightful lives-screening for Down syndrome [J]. *Downs Syndr Res Pract*, 2008, 12: 79-86.
- [19] Nicolaides K H, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy [J]. *BMJ*, 1992, 304: 867-869.
- [20] Lo Y M, Corbetta N, Chamberlain P F, Rai V, Sargent I L, Redman C W, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350: 485-487.
- [21] Hill L M. The sonographic detection of trisomies 13, 18, and 21 [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 1996, 39: 831-850.
- [22] Stoll C, Dott B, Alembik Y, Roth M P. Evaluation of routine prenatal ultrasound examination in detecting fetal chromosomal abnormalities in a low risk population [J]. *Hum Genet*, 1993, 91: 37-41.
- [23] Akinlade F, Cowans N J, Kisanga M C, Spencer K. Maternal serum CA 19-9 and CA 15-3 levels in pregnancies affected by trisomy 21 [J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32: 644-648.
- [24] Kagan K O, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides K H. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21 [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009, 34: 14-18.
- [25] Kamyab A R, Shahrokhi F, Shamsian E, Hayat Nosaied M, Dibajnia P, Hashemi M, et al. Determination of sensitivity and specificity of a novel gene dosage assay for prenatal screening of trisomy 21 syndrome [J]. *Clin Biochem*, 2012, 45: 267-271.
- [26] Lim J H, Kim S Y, Park S Y, Lee S Y, Kim M J, Han Y J, et al. Non-invasive epigenetic detection of fetal trisomy 21 in first trimester maternal plasma [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27709.
- [27] Maslen C L, Babcock D, Robinson S W, Bean L J, Dooley K J, Willour V L, et al. CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome [J]. *Am J Med Genet A*,

- 2006,140:2501-2505.
- [28] Tsui D W, Chan K C, Chim S S, Chan L W, Leung T Y, Lau T K, et al. Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27:1212-1218.
- [29] Chim S S, Tong Y K, Chiu R W, Lau T K, Leung T N, Chan L Y, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:14753-14758.
- [30] Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides K. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation: an observational study [J]. *Lancet*, 2001, 358:1665-1667.
- [31] Donalson K, Turner S, Morrison L, Liitti P, Nilsson C, Cuckle H. Maternal serum placental growth factor and α -fetoprotein testing in first trimester screening for Down syndrome[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33:457-461.
- [32] Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma[J]. *Lancet*, 2000, 356:1170.
- [33] Ehrlich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan J A, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 204:205. e1-e11.
- [34] Papageorgiou E A, Patsalis P C. Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: new technologies and clinical applications[J]. *Genome Med*, 2012, 4:46.
- [35] Zimmermann B G, Grill S, Holzgreve W, Zhong X Y, Jackson L G, Hahn S. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? [J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28:1087-1093.
- [36] Lun F M, Chiu R W, Allen Chan K C, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo Y M. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2008, 54:1664-1672.
- [37] Lo Y M, Lun F M, Chan K C, Tsui N B, Chong K C, Lau T K, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:13116-13121.
- [38] Abstracts of the ISPD 16th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy. Miami, Florida, USA. June 3-6, 2012 [J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(Suppl 1):1-128.
- [39] Chiu R W, Akolekar R, Zheng Y W, Leung T Y, Sun H, Chan K C, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study [J]. *BMJ*, 2011, 342:c7401.
- [40] Sparks A B, Struble C A, Wang E T, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 206:319. e1-e9.
- [41] Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides K H. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18 [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 206:322. e1-e5.
- [42] Chitty L S, Hill M, White H, Wright D, Morris S. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy-ready for prime time? [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 206:269-275.
- [43] Nicolaides K H, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 207:374. e1-e6.

[本文编辑] 商素芳