

· 综述 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.15.034

基于高通量测序的拷贝数变异检测技术在产前诊断中的临床应用*

吕康琪^{1,2}, 陈大洋², 阚丽娟², 熊丹²综述, 张秀明^{1,2△} 审校

1. 新乡医学院, 河南新乡 453000; 2. 深圳市罗湖医院集团医学检验实验室/深圳大学第三附属医院检验科, 广东深圳 518001

关键词: 基因组拷贝数变异测序; 拷贝数变异; 产前诊断; 致病性解读**中图分类号:** R715.2**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)15-2142-04

我国是出生缺陷高发国家之一, 出生缺陷发生率高达 5.6%, 每年新增出生缺陷患儿约 900 000 例, 出生时临床可见缺陷患儿数高达 250 000 例, 这一严重现象给家庭和社会都带来了巨大压力^[1]。其中 80% 以上的出生缺陷由染色体畸变引起, 在染色体结构变异中最主要的变异类型是拷贝数变异 (CNV)^[2]。CNV 是指染色体上 DNA 片段大小范围从 1 kb 到几个 Mb 的亚显微水平的基因组变异, 包括缺失和重复两种类型^[3]。由 CNV 导致的疾病目前没有有效的治疗方法, 及时进行产前诊断是防治出生缺陷的重要手段。传统的产前诊断方法, 如染色体核型分析、超声检查等因通量低、分辨率低、检测周期长等原因无法满足临床需求^[4]。近几年, 基于下一代测序 (NGS) 技术的 CNV-seq 为 CNV 的检测提供了新手段, 美国妇产科医师学会 (ACOG) 已推荐 CNV-seq 作为胎儿结构异常时诊断评估的一线检测方法^[5]。

1 检测方法

CNV-seq 采用 NGS 技术对标本 DNA 进行低深度全基因组测序, 再通过生物信息分析受检标本中是否存在 CNV^[6]。目前, 序列深度法检测 CNV 是临床上广泛使用的检测手段, 该方法根据 CNV 重复或缺失变异产生的测序深度信号来进行统计分析, 若拷贝数发生重复变异, 会显示较高的读取深度, 若发生缺失, 则出现较低的读取深度^[7], 见图 1。序列深度法的检测流程主要有 5 步, (1) 数据比对: 将质量合格的下机序列映射到人类参考基因组上进行比对; (2) 窗口划分: 为基因组测序统计检验设定统计单位^[8]; (3) GC 含量校正: 在 DNA 双链结构中, GC 碱基对含 3 个氢键, 高 GC 区域结构更加稳定, DNA 不容易被打断, 此稳定结构会影响测序片段深度变化而造成结果假阳性, 为了使窗口深度更均一, 需要对 GC 含量进行校正^[8]; (4) 断点分割: 通过统计学方法分析序列深度, 发现异常序列深度的窗口, 对变异断点进行合并, 找出变异区域; (5) 可视化: 通过展示条带分布与染色

体核型标准图对全基因组的序列分布进行可视化。

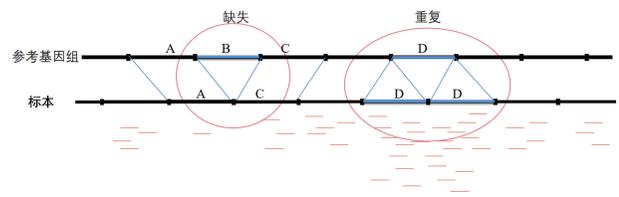


图 1 序列深度法检测 CNV 时缺失和重复的深度信号

由于 CNV-seq 技术局限、基因组自身特征、遗传复杂性等因素可能会造成 CNV 测序结果的假阳性, 因此需要对检测出的 CNV 片段进行过滤^[9]。过滤的具体原因包括以下几点, (1) 染色体 N 区: 技术局限导致染色体 N 区遗传信息无法检测, 造成序列深度较低, 可能引起假阳性; (2) 染色体着丝粒附近: 染色体着丝粒由高度重复 DNA 序列组成, 影响序列深度异常变化, 可能引起假阳性^[10]; (3) 低于检测阈值数据: CNV-seq 主要针对 100 kb 以上 CNV 造成的疾病, 而对于 <100 kb 的 CNV 需要过滤。基于低深度测序技术原理, CNV-seq 检测不能排除多倍体、单亲二倍体、染色体平衡易位、倒位、环状、低比例嵌合体等原因造成的疾病, 但其具有通量高, 成本低, DNA 需求量低, 操作简便, 可检测低至 5% 的染色体非整倍体嵌合等优点, 提高了变异检出率和临床适用性^[2]。

2 致病性 CNV 解读考虑因素

需要注意的是检出的 CNV 并不都意味着异常或有临床意义。目前临床基因组资源中心 (ClinGen) 数据库收录的具有明确致病性的 CNV 共有 2 817 个, 仅占据全基因组 CNV 的一小部分。应用 CNV-seq 技术可以检测到大量变异, 但真正具有致病性的十分罕见, 大部分变异因解读信息有限, 只能被定义为临床意义未明, 因此需要更多的研究确定其临床意义。为了明确实验室对 CNV 结果的评价分类并促进解读结果的一致性, 国际上 2019 年美国医学遗传学与基

* 基金项目: 广东省深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZSM201601062); 深圳市医学重点学科建设经费 (SZXK054); 广东省深圳市科创委项目 (201908123000612)。

△ 通信作者, E-mail: zxm0760@163.com。

因组学学会 (ACMG) 和 ClinGen 联合发表了 CNV 解读和报告指南^[11], 国内专家在 2020 年发表了《产前遗传学诊断拷贝数变异和纯合区域的数据分析解读及报告规范化共识》^[12]。ACMG 指南实现了 CNV 致病性的量化分类, 将 CNV 分为 5 类: 致病性、可能致病、临床意义未明、可能良性、良性。《产前遗传学诊断拷贝数变异和纯合区域的数据分析解读及报告规范化共识》对 CNV 的数据分析流程、报告标准和报告内容进行了规范^[12]。尽管国内外都出台了相关指南和专家共识, 但具体细节仍存在差异, 特别是在解读报告的透明性、一致性上, 各个临床实验室间差别较大。因此, 对 CNV 的解读需考虑以下几个因素。

2.1 CNV 包含的基因 分析 CNV 涉及区域内的基因是解读 CNV 最常考虑的因素。首先应对 CNV 涉及的基因组构成进行讨论。考虑 CNV 中是否包含独特的、富含基因的序列或重复元件, 分析 CNV 的重复或缺失片段是否包含蛋白质编码基因或其他已知功能的重要元件, 若包含则 CNV 会对蛋白编码产生影响, 造成临床表型异常, 引起致病性^[13]; 若仅涉及部分基因的拷贝数增加或缺失, 则会造成基因断裂或编码序列改变, 而涉及内含子序列的变异会对基因功能产生影响, 使致病风险增加^[14]。然而, 若检测到的 CNV 未包含明确致病性基因而无法判断其临床意义时, 应查询数据库或检索 PubMed 对基因进行评估。其次, 应对 CNV 涉及的基因数量进行讨论, 若包含的基因数量过多, 则致病风险增加, 如当拷贝数缺失区域包含 35 个及以上蛋白编码基因时, 该 CNV 定义为可能致病; 若包含基因数量少, 则致病风险降低; 需要明确的是, 如果该变异区域包含的基因数量很少, 但含有明确致病性基因, 此 CNV 则被定义为致病性^[15]。

2.2 数据库 可用于解读 CNV 的数据库主要分为 3 大类: 第 1 类为疾病人群变异数据库, 主要收集临床表型、明确致病性基因等, 包括 ClinGen、DECIPHER、在线人类孟德尔遗传 (OMIM)、HGMD 数据库等; 第 2 类为健康人群变异数据库, 主要收集变异在自然人群中的分布频率、族群信息等, 包括基因组变异体数据库 (DGV)、gnomAD 数据库等; 第 3 类主要收集基因组学注释信息, 包括基因内含子、外显子、5' 端或 3' 端重要元件等, 主要是 UCSC、GeneBank 数据库。

2.3 文献查询 可以通过检索是否有相似 CNV 或变异区域所涉及基因的文献报道, 帮助临床分析, 为 CNV 解读提供新思路。常用的检索平台是 PubMed、Web of Science、中国知网、万方数据知识服务平台等。

2.4 家族遗传 在许多情况下, 若检测到临床意义未明的 CNV 时, 对父母进行基因组测序是十分必要的。当变异来自表型健康父母时, 该变异致病性可能

较低, 若变异为新发, 则致病性可能较高。在特殊情况时, 可能还需要其他的家族标本 (如兄弟姐妹) 来确定特定的 CNV 是否与家族中的染色体变异相关。遗传异质性和遗传外显率也是影响基因型和表型关系的重要因素。低外显率是指外显率为 5%~10%, 这种基因组变异的临床表现很难被精准预测, 且外显率会受到多种因素的影响, 如种族、家族史、额外的 CNV 等^[16]。

3 CNV-seq 在产前诊断领域的应用现状

3.1 CNV-seq 与染色体核型分析的联合应用 20 世纪 70 年代以来, 传统的染色体核型分析是评估高危孕妇胎儿染色体异常的“金标准”。此技术可以检测胎儿染色体数目异常、染色体非整倍体、倒位、平衡或非平衡易位等结构异常^[17]。染色体核型分析技术的分辨率为 5~10 Mb, <5 Mb 的异常很难被准确检出, 而 CNV-seq 不能检出平衡易位、罗氏易位等结构异常, 因此染色体核型分析与 CNV-seq 联合检测可以克服两种技术中存在的缺陷, 为产前提供更可靠更全面的遗传诊断^[18]。魏友华等^[19]采用以上两种方法对 905 例羊水标本进行检测, 均发现 70 例染色体数目异常、9 例染色体嵌合体异常、7 例染色体非平衡性结构异常, 染色体核型分析额外检测到由罗氏异位引起的染色体数目异常, CNV-seq 额外检测到 10 例明确致病性的染色体微缺失/微重复, 两者联合应用将染色体异常阳性率从 11.27% 提升至 12.38%。彭亚琴等^[20]对 164 例孕妇进行检测, 核型分析检出 24 例染色体核型异常, CNV-seq 检出 29 例已知致病性和可疑致病性 CNV, 使致病性 CNV 检出率提高了 3.05%, 但 CNV-seq 未能检出 3 例染色体核型分析诊断为平衡易位、罗氏异位的异常。上述研究表明, 核型分析和 CNV-seq 联合应用可以显著提高染色体异常检出率, 有利于临床产前咨询评估, 可为孕妇是否继续妊娠提供更加全面客观的依据。

3.2 CNV-seq 与染色体微阵列分析技术 (CMA) 的对比应用 CMA 是一种已成熟运用于临床的高分辨率全基因组 CNV 分析技术, ACMG 推荐 CMA 作为胎儿染色体异常时诊断评估的辅助手段^[21], 但该技术存在培养周期长、成本高、通量低、探针更新停滞等问题^[22]。MA 等^[23]对 67 例嵌合体孕妇进行 CNV-seq 和 CMA 检测, CNV-seq 的检出率为 6%~92%, CMA 的检出率为 20%~72%。WANG 等^[24]对 1 023 例孕妇进行检测, CMA 检出 121 例染色体异常 (11.8%), CNV-seq 不仅检测到了上述所有异常, 并且额外检出了 17 例染色体异常。以上研究证明, CNV-seq 较 CMA 对嵌合体有更高的分辨率和灵敏度。据上述研究分析原因发现, CMA 未检出异常的原因是平台靶区探针覆盖不足或探针覆盖不到。

3.3 CNV-seq 在不同临床指征中的应用

3.3.1 CNV-seq 在超声结果异常中的应用 超声诊断是临床应用最广泛、最常见、公认无损伤性、可反复进行的医学成像技术,也是胎儿生长发育情况的重要判定指标之一^[25]。对超声结果异常的病例进行 CNV-seq 检测,不仅可以帮助产前确定变异类型,而且有利于分析遗传原因。张秀群等^[26]对 137 例超声检查提示胎儿结构异常的孕妇进行 CNV-seq 检测,发现有 15 例异常,其中 8 例为已知致病性 CNV,超声结果分别是 6 例提示颈项透明层(NT)增厚或侧脑室增宽,1 例提示胎儿尺骨缺如、左肾缺如、心室内多发强光斑,1 例提示胎儿生长发育受限。CNV-seq 不仅可以在超声结构异常病例中分析遗传变异,还可以在超声发现软指标的病例中探索病因,帮助临床深入分析病例特征,提升诊断价值。胎儿超声软指标多见于 NT 增厚,针对 NT 增厚,已有研究对临床病例进行了 CNV-seq 检测,发现在 NT 增厚的 139 例病例中检出 45 例 CNV,除了 33 例是 >5 Mb 的染色体异常,余下的 12 例均是染色体微缺失/微重复^[27]。

3.3.2 CNV-seq 在高龄孕妇中的应用 随着三孩政策放开,高龄(≥ 35 岁)孕产妇的数量明显增加,研究表明胎儿染色体异常的发生率与孕妇年龄密切相关,因此为高龄孕妇提供产前诊断是减少出生缺陷儿的有效手段^[28]。王游声等^[29]对孕妇年龄和染色体异常的相关性进行了研究,发现在 35 岁以上的 7 个年龄组中,从 38 岁起随着孕妇年龄增长,染色体异常率逐渐升高。一项研究发现,31 例引产孕妇中单纯因高龄而发现胎儿异常导致引产的病例有 10 例,占 32.26%,因此相对而言,高龄孕妇更容易生育异常胎儿^[30]。以上研究证明,高龄与染色体异常密切相关,可以通过 CNV-seq 技术检测染色体异常,从而降低出生缺陷的发生率,有助于我国出生缺陷的防治。

3.3.3 CNV-seq 在无创产前检测(NIPT)高风险中的应用 NIPT 指通过检测母体血浆中游离 DNA 片段而判断胎儿是否存在染色体非整倍体异常或其他遗传性疾病,主要用于筛查 21、18、13 三体综合征^[31]。有研究对 563 例 NIPT 筛查为三体综合征的孕妇进行 CNV-seq 检测,发现 489 例孕妇羊水检出 CNV,分析 74 例出现假阳性结果的原因是由于母体 CNV 的干扰,因此若 NIPT 提示高风险时,仍需要进行 CNV-seq 检测确认,排除母体干扰^[32]。另有研究对 45 773 例孕妇进行 NIPT 筛查,314 例检出性染色体非整倍体,经羊膜穿刺术验证,58 例病例检出 CNV,结果仍有很高的假阳性率^[33]。以上研究说明,对于 NIPT 高风险的孕妇,可以进行 CNV-seq 检测验证。NIPT 只是一种筛查测试,因此可能出现假阳性或假阴性的情况。2016 年我国国家卫生健康委员会发布了《孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断技术规范》,明确指出对于 NIPT 高风险人群,应转诊至产前遗传咨询

医师处进行检测和咨询^[34]。

4 小 结

在过去的几年,我国有效防治出生缺陷的方法是进行产前诊断,而 CNV-seq 为产前诊断提供了新途径。在 CNV-seq 的检测原理方面,序列深度法已获得临床认同;在临床应用方面,该技术不仅实现了与其他传统技术的联合运用,而且也被应用到不同指征病例中,实现了优势互补,提升了我国产前诊断领域的检测能力,提高了检测效率;在解读方面,从包含的基因、数据库、文献查询和家族遗传这 4 个方面进行总结,然而由于明确致病性的基因或区域数量有限,很多检测结果无法给出具有临床意义的解释,且 CNV 结果解读流程复杂、专业性强,尽管国内外已出台了相关指南和专家共识,但具体细节仍存在差异,特别是在解读报告的透明性、一致性和标准化方面,各个临床实验室之间差别较大。因此,CNV-seq 结果解读仍存在很多问题,需要进一步探索 CNV 致病性评估,推动 CNV-seq 在产前诊断领域的发展。

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)》问答[J].中国实用乡村医生杂志,2012,19(20):3-5.
- [2] 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组,中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会,中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组.低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(4):293-296.
- [3] POS O,RADVANSZKY J,BUGLYO G,et al. DNA copy number variation: main characteristics, evolutionary significance,and pathological aspects[J]. Biomed J,2021,44(5):548-559.
- [4] HAO M,LI L,ZHANG H,et al. The difference between karyotype analysis and chromosome microarray for mosaicism of aneuploid chromosomes in prenatal diagnosis[J]. J Clin Lab Anal,2020,34(12):e23514.
- [5] Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No. 682: microarrays and next-generation sequencing technology: the use of advanced genetic diagnostic tools in obstetrics and gynecology[J]. Obstet Gynecol,2016,128(6):262-268.
- [6] LAUER S,GRESHAM D. An evolving view of copy number variants[J]. Curr Genet,2019,65(6):1287-1295.
- [7] ALKAN C,COE B P,EICHLER E E. Genome structural variation discovery and genotyping[J]. Nat Rev Genet,2011,12(5):363-376.
- [8] MILLER C A,HAMPTON O,COARFA C,et al. ReadDepth: a parallel R package for detecting copy number alterations from short sequencing reads [J]. PLoS One,2011,6(1):e16327.
- [9] ABYZOV A,URBAN A E,SNYDER M,et al. CNVna-

- tor: an approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing[J]. *Genome Res*, 2011, 21(6):974-984.
- [10] MCKINLEY K L, CHEESEMAN I M. The molecular basis for centromere identity and function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(1):16-29.
- [11] RIGGS E R, ANDERSEN E F, CHERRY A M, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen) [J]. *Genet Med*, 2020, 22(2):245-257.
- [12] 广东省精准医学应用学会遗传病分会, 广东省医学会妇幼保健分会产前诊断学组, 广东省妇幼保健协会产前诊断技术专家委员会, 等. 产前遗传学诊断拷贝数变异和纯合区域的数据分析解读及报告规范化共识[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(7):701-708.
- [13] MARIAN A J. Clinical interpretation and management of genetic variants[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2020, 5(10):1029-1042.
- [14] NOWAKOWSKA B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome[J]. *J Appl Genet*, 2017, 58(4):449-457.
- [15] GROSS A M, AJAY S S, RAJAN V, et al. Copy-number variants in clinical genome sequencing: deployment and interpretation for rare and undiagnosed disease[J]. *Genet Med*, 2019, 21(5):1121-1130.
- [16] MAYA I, BASEL-SALMON L, SINGER A, et al. High-frequency low-penetrance copy-number variant classification: should we revise the existing guidelines? [J]. *Genet Med*, 2020, 22(7):1276-1277.
- [17] 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.
- [18] ZHANG J, TANG X, HU J, et al. Investigation on combined copy number variation sequencing and cytogenetic karyotyping for prenatal diagnosis[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2021, 21(1):496.
- [19] 魏友华, 朱文娟, 张延霞, 等. 高通量基因测序检测染色体拷贝数变异与染色体核型分析在产前诊断中联合应用的价值[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(10):1191-1193.
- [20] 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.
- [21] Society for Maternal-Fetal Medicine, DUGOFF I, NORTON M E, et al. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 215(4):B2-B9.
- [22] XU L, ZHANG M, HUANG H, et al. The comprehensive comparison of bacterial artificial chromosomes (BACs)-on-beads assay and copy number variation sequencing in prenatal diagnosis of southern chinese women[J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(11):1324-1332.
- [23] MA N, XI H, CHEN J, et al. Integrated CNV-seq, karyotyping and SNP-array analyses for effective prenatal diagnosis of chromosomal mosaicism[J]. *BMC Med Genomics*, 2021, 14(1):56.
- [24] WANG H, DONG Z, ZHANG R, et al. Low-pass genome sequencing versus chromosomal microarray analysis: implementation in prenatal diagnosis[J]. *Genet Med*, 2020, 22(3):500-510.
- [25] FELICE V, ABHYANKAR A, JOBANPUTRA V. Prenatal diagnosis by whole exome sequencing in fetuses with ultrasound abnormalities [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1885:267-285.
- [26] 张秀群, 麦富巨, 徐丹芬, 等. 联合运用染色体核型分析与 CNV 检测在超声结构异常胎儿中的应用价值[J]. *中国医学创新*, 2020, 17(29):128-132.
- [27] LAN L, WU H, SHE L, et al. Analysis of copy number variation by sequencing in fetuses with nuchal translucency thickening[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(8):e23347.
- [28] KANMAZ A G, INAN A H, BEYAN E, et al. Effect of advanced maternal age on pregnancy outcomes: a single-centre data from a tertiary healthcare hospital[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2019, 39(8):1104-1111.
- [29] 王游声, 张翠翠, 蔡婵慧, 等. 高龄孕妇年龄与胎儿染色体异常的相关性分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2021, 38(1):96-98.
- [30] 杨舒婷, 赵亚丽, 汤欣欣, 等. 染色体微阵列分析技术在高龄孕妇产前诊断中的应用价值[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2021, 38(2):101-107.
- [31] 刘俊涛. 无创产前检测国际指南与中国规范[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2017, 33(6):564-567.
- [32] ZHOU X, SUI L, XU Y, et al. Contribution of maternal copy number variations to false-positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(4):318-322.
- [33] LU X, WANG C, SUN Y, et al. Noninvasive prenatal testing for assessing foetal sex chromosome aneuploidy: a retrospective study of 45 773 cases[J]. *Mol Cytogenet*, 2021, 14(1):21-28.
- [34] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 国家卫生计生委办公厅关于规范有序开展孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断工作的通知[EB/OL]. (2016-10-27) [2021-11-05]. http://www.nhfp.gov.cn/fys/s3581/201611/0e6fe5bac1664ebda8bc28ad0ed68389_shtml.