

# 染色体微阵列分析技术在 2600 例流产物中的应用

彭继苹<sup>1</sup>, 袁海明<sup>2</sup>

1. 北京金域医学检验实验室有限公司, 北京 100010

2. 广州金域医学检验中心有限公司, 广州 510330

**摘要:** 染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)是一种通过对染色体进行全基因组扫描来筛查染色体数目和结构异常的检测技术,是儿科和产前遗传诊断的常规工具,已被应用于流产病因分析。本研究应用 CMA 技术在全基因组水平分析引起流产的染色体异常情况,并评估该技术在临床流产中的应用价值。对收集的 2600 例流产样本进行 CMA 技术检测,成功检测了 2505 例,成功率高达 96.3%,其中 1021 例用 CytoScan Optima 芯片进行检测,1211 例用 CytoScan 750K 芯片进行检测,273 例用 CytoScan HD 芯片进行检测。利用这 3 种芯片共检出 967 例(38.60%)样本发生染色体异常,其中通过 CytoScan Optima 芯片检出 506 例(50.00%),CytoScan 750K 芯片检出 388 例(32.00%),CytoScan HD 芯片检出 73 例(26.74%)。在 967 例染色体异常中,有 801 例(82.83%)发生染色体数目异常,94 例(9.72%)发生染色体结构异常,56 例(5.79%)发生嵌合体,16 例(1.65%)检出纯合区域。本研究结果表明,CMA 可应用于临床流产物的遗传学诊断,是一种可靠、稳定、高分辨的技术,其检测结果能够对再生育风险评估提供指导。

**关键词:** 流产; 染色体微阵列分析; 染色体数目异常; 染色体结构异常; 嵌合体; 染色体纯合区域

## Application of chromosomal microarray analysis for a cohort of 2600 Chinese patients with miscarriage

Jiping Peng<sup>1</sup>, Haiming Yuan<sup>2</sup>

1. Beijing Kingmed Center for Clinical Laboratory, Beijing 100010, China

2. Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou 510330, China

**Abstract:** Chromosomal microarray analysis (CMA) is a technique for screening numerical and structural abnormalities of chromosomes at the whole genome level. It is a routine tool for pediatric and prenatal genetic diagnoses. It has also been applied to investigate the genetic etiologies of miscarriages. In our study, we used the CMA technology to analyze the chromosomal variations of fetuses from miscarriages at the whole genome level, and to evaluate its clinical applications in studies of miscarriages. The CMA analyses were performed on 2600 miscarriage specimens, of which 2505 specimens (96.35%) were successfully analyzed. Among them, 1021 specimens were analyzed with CytoScan Optima chip; 1211 specimens were analyzed with CytoScan 750K chip; and 273 cases were analyzed with CytoScan HD chip. Chromosomal

收稿日期: 2018-06-29; 修回日期: 2018-08-03

作者简介: 彭继苹, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: pengjiping0419@163.com

DOI: 10.16288/j.yczz.18-120

网络出版时间: 2018/8/6 9:22:48

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180806.0922.003.html>

abnormalities were identified in 967 specimens (38.6%) by these 3 kinds of chips, of which 506 specimens (50.00%) were detected with CytoScan Optima chip; 388 specimens were detected by CytoScan 750K chip (32.00%); and 73 cases (26.74%) were detected in CytoScan HD chip. Among the 967 cases of chromosomal abnormalities, 801 cases (82.83%) were numerical chromosomal abnormalities; 94 cases (9.72%) were structural abnormalities; 56 cases (5.79%) were mosaicisms; and 16 (1.65%) were regions of homozygosity. Our research suggests that CMA is a reliable, robust, and high-resolution technology for genetic diagnosis of miscarriage in clinical practice, which can also provide results as guidance for the risk assessment of assisted fertility.

**Keywords:** miscarriage; chromosomal microarray analysis; numerical chromosomal abnormalities; structural chromosomal abnormalities; mosaicism; regions of homozygosity

自然流产是指妊娠不到 28 周、胎儿体重不足 1000 g、胎儿及其附属物脱离母体而妊娠自行终止者。妊娠 12 周之内终止者称为早期流产,临床上自然流产多表现为胎儿发育的停止。据统计,自然流产的发生率为 15%~40%,而其中 80%以上为发生在 12 周之内的早期流产<sup>[1]</sup>。复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指与同一性伴侣连续遭受两次或两次以上的自然流产。并且复发性自然流产约占妊娠总数的 1%<sup>[1]</sup>。引起自然流产的因素大致分为胚胎因素、母体因素、环境因素和免疫功能异常,以及其他一些尚不明确的自然流产原因。胚胎因素中染色体异常是最常见的自然流产原因,其中 50%~60%流产与胚胎的染色体异常相关<sup>[2,3]</sup>。染色体异常中有 86%为染色体数目异常(包括非整倍体和多倍体),6%为结构异常(包括染色体断裂、重复、缺失和易位等),8%为嵌合体等其他染色体异常<sup>[4]</sup>。目前发现染色体结构异常高达 1 万多种,除性染色体异常或部分染色体三体患者能存活下来,其他染色体数目异常患者均以死胎及流产告终,而染色体片段易位、缺失、重复为导致新生儿缺陷的重要因素,其也可导致胎儿的自然流产<sup>[5]</sup>。为区别基因突变,一般将染色体结构变异称为基因拷贝数变异(copy number variants, CNVs),而产前早期诊断和发现 CNVs 是产前临床诊断的难点和热点<sup>[5]</sup>。

早期传统的流产物检测手段包括核型分析与荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)。核型分析分辨率低,仅可检测大于 5 Mb 的遗传物质改变,但无法对许多具有致病性的染色体亚显微结构变异(如染色体微缺失和微重复)进行检测。此外,

核型分析需要对绒毛组织和羊水进行培养,耗时长且容易被母体细胞污染;并且一些活性较差的细胞生长将受到抑制,或母体细胞过度生长,这些因素均会导致无法得到精准的核型;另外,临床获得的部分流产物由于细胞活性丧失,会导致细胞培养失败,而无法进行核型分析检测<sup>[4,6]</sup>。对流产物进行 FISH 检测尽管可以省去细胞培养,然而因其现有探针仅能对 13、18、21、X、Y 染色体数目进行检测,而不能对全基因组进行检测,并且只能检测已知致病基因或可疑位点,不能区分正常和倒位、平衡易位携带者的胚胎;且一次检测,仅能对少数位点进行分析,缺乏整体性,不适用于全基因组的筛查,因此可能存在假阴性<sup>[7-9]</sup>。近年来,随着第二代测序技术和基因芯片技术的快速发展,它们也已经被应用于流产物病因筛查,并显示出明显检测优势,因此传统的检测方法也渐渐被其所替代。

染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)技术可在全基因组范围内同时检测染色体的数目异常、结构异常(包括微缺失、微重复等)、嵌合体和纯合区域(regions of homozygosity, ROHs)等染色体异常类型。CMA 技术无需进行细胞培养,具有周期短、高通量、高分辨率、高准确性等优点,通过一次杂交实验就能对整个基因组范围内的染色体非平衡变异进行扫描,将某一 DNA 序列变异准确定位到染色体上,将染色体病的诊断提高到基因水平上,弥补了核型、FISH 检测技术的缺陷<sup>[10-12]</sup>。本研究应用 CMA 技术的 3 种不同芯片类型(CytoScan HD、CytoScan 750K 和 CytoScan Optima)对 2600 例流产物样本进行了检测,在全基因组水平分析引起

流产的染色体异常情况, 并评估该技术在临床流产中应用价值。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象

2600 例流产样本(浸泡于生理盐水中保存运输)送检至广州金域医学检验中心。所有患者均签署了知情同意书。

### 1.2 CMA 分析

使用德国 QIAGEN 公司生产的组织提取试剂盒提取基因组 DNA。应用美国 Affymetrix 公司生产的 CytoScan HD 芯片(195 万 CNV 探针+75 万 SNP 探针)、CytoScan 750K (55 万 CNV 探针+20 万 SNP 探针)芯片和专注产前领域的 CytoScan Optima 芯片对流产产物样本进行检测, 所得原始数据均应用 Affymetrix Chromosome Analysis Suite Software 进行分析。参照国际基因组 CNVs 多态性数据库 Decipher、UCSC Genome Browser、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)、ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays)、DGV (Database of Genomic Variants)等多个权威数据库以及相关文献来评估 CNVs 的致病性。

### 1.3 CMA 结果评估

检测报告严格按照美国医学遗传学会指南<sup>[13]</sup>, 将 CNVs 分为 4 个等级: (1)致病性 CNVs; (2)可能致病性 CNVs; (3)临床意义不明 CNVs; (4)良性 CNVs。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种芯片比较分析

本研究应用 3 种芯片对流产产物样本进行检测, 其中 CytoScan HD 芯片包含 270 万多个拷贝数分析标记(195 万 CNVs 探针+75 万 SNP 探针), 具有无偏向的全基因组覆盖, 跨越整个基因组的卓越性能, 覆盖了 RefSeq、OMIM<sup>TM</sup>、ClinGEN 和 DECIPHER/DDD 遗传基因区域以及 Sanger 癌基因区域, 其可用

于检测整个人类基因组中已知和新的染色体畸变。CytoScan 750K 芯片包含 75 万多个拷贝数分析标记(55 万 CNVs 探针+20 万 SNP 探针), 这些探针都精选于 CytoScan HD 芯片的探针, 同时针对遗传疾病和肿瘤相关基因增加探针密度, 另外也覆盖了 RefSeq、OMIM<sup>TM</sup>、ClinGEN 和 DECIPHER/DDG2P 遗传基因区域以及 Sanger 癌基因区域, 使其更适合临床诊断的细胞遗传学检测。虽然这 2 种芯片含有的探针数不同, 但它们均可在遗传性疾病、癌症、干细胞和神经发育领域中研究各类样品的染色体变异。CytoScan Optima 芯片中的探针是从 CytoScan HD 芯片精选出来的, 共包括 31 万多个拷贝数分析标记, 除了包含 18 018 个 CNVs 探针和 148 450 个 SNP 探针外, 还重点加密了既往产前和围产期研究相关的 396 个基因区域的探针, 使其更好的应用于产前和围产期诊断。

### 2.2 CMA 检出的染色体异常结果

在 2600 例流产样本中, 成功检测 2505 例, 成功率达 96.35%。未成功检测的样本主要原因为流产产物母体组织污染(每个样本及其母血都先做 STR (short tandem repeat)连锁分析)、样本已腐败致无法提取 DNA 和 DNA 样本质量太差, 导致不能完成 CMA 检测。经 3 种芯片检测, 2505 例流产产物样本中有 967 例检出染色体异常, 检出率为 38.60%; 其中 1021 例用 CytoScan Optima 芯片进行检测, 有 506 例检出染色体异常, 其检出率为 50.00%; 1211 例用 CytoScan 750K 芯片进行检测, 有 388 例检出染色体异常, 其检出率为 32.00%; 273 例用 CytoScan HD 芯片进行检测, 有 73 例检出染色体异常, 其检出率为 26.74% (表 1)。根据检出的染色体异常类型, 可分为染色体数目异常、染色体结构异常、嵌合体(图 1)和纯合区域 4 大类。

### 2.3 染色体数目异常

3 种 CMA 芯片在 2505 例流产产物样本中共检出 801 例染色体数目异常, 占有染色体异常的 82.83%; 其中 CytoScan Optima 芯片检出 401 例, 占该芯片检出染色体异常的 80.63%; CytoScan 750K 芯片检出 331 例, 占该芯片检出染色体异常的

表 1 不同芯片检出的染色体异常情况

Table 1 Chromosomal abnormalities detected by different chips

染色体异常类型	具体异常情况	3 种芯片共 检出例数(%)	CytoScan Optima 芯片检出例数(%)	CytoScan 750K 芯片检出例数(%)	CytoScan HD 芯片检出例数(%)
染色体数目异常	染色体非整倍体				
	染色体三体	585 (60.50)	309 (61.07)	228 (58.76)	48 (65.75)
	染色体单体	81 (8.38)	43 (8.50)	33 (8.51)	5 (6.85)
	性染色体异常	6 (0.62)	3 (0.59)	3 (0.77)	0 (0)
	18 四体	1 (0.10)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)
	三倍体	128 (13.24)	53 (10.47)	66 (17.01)	9 (12.33)
染色体结构异常	染色体部分缺失/重复	94 (9.72)	55 (10.87)	33 (8.51)	6 (8.22)
染色体嵌合体	嵌合三体	48 (4.96)	30 (5.93)	17 (4.38)	1 (1.37)
	嵌合单体	8 (0.83)	2 (0.40)	5 (1.29)	1 (1.37)
纯合区域	整套染色体单亲二倍体	7 (0.72)	5 (0.99)	0 (0)	2 (2.74)
	单条染色体单亲二倍体	2 (0.21)	1 (0.20)	0 (0)	1 (1.37)
	单条染色体 ROHs	4 (0.41)	2 (0.40)	2 (0.52)	0 (0)
	多条染色体 ROHs	3 (0.31)	3 (0.59)	0 (0)	0 (0)
总例数		967	506	388	73
检出率(%)		38.60	50.00	32.00	26.74

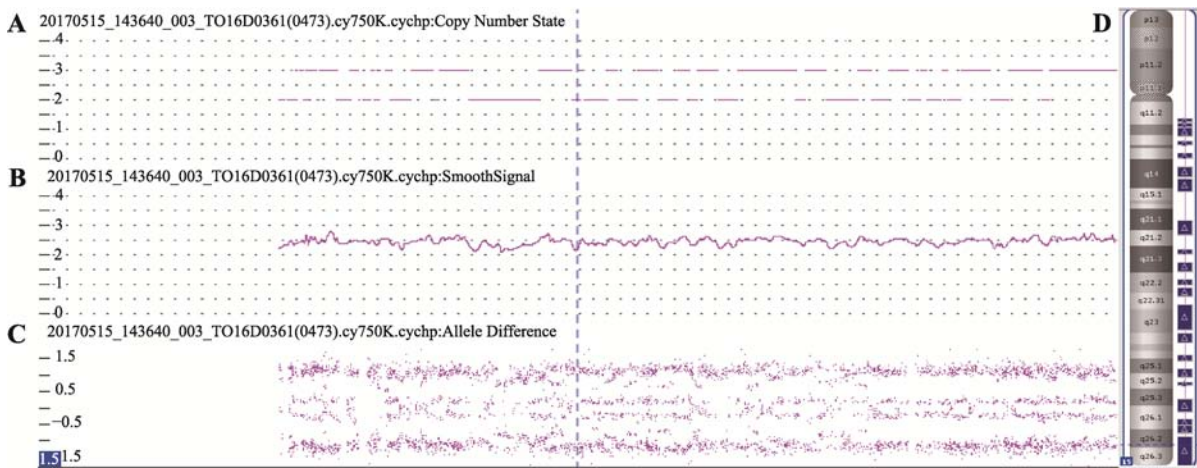


图 1 流产组织发生嵌合体

Fig.1 Mosaicism of miscarriage specimens

A : Copy Number State 是 CMA 检测出的 CNV 片段的拷贝数, 正常常染色体 DNA 拷贝数是 2, 当片段拷贝数为 1 或 0 时表示发生缺失, 当片段拷贝数为 3 或 4 时表示发生重复, 图中 DNA 拷贝数是 2 或 3, 表示嵌合三体。B : Smooth Signal 是拷贝数的真实反映, 即患者的 15 号染色体的 DNA 拷贝数为 2.5。C : Allele Difference 是 DNA 等位基因分布图, 正常应该是 3 条信号带, 分别在 0、-1、1 对应的位置, 图中出现了 4 条信号带, 中间 2 条信号带的位置分别在 0~0.5 和 0~-0.5 之间, 而发生三体变异类型时中间 2 条信号带应该在 0.5 和 -0.5 处; 所以此图表示染色体发生嵌合体时拷贝数和等位基因分布图的具体情况。D : 从染色体层面直观反映嵌合重复的现象。

85.31% ; CytoScan HD 芯片检出 62 例, 占该芯片检出染色体异常的 84.93%。由此可见, 染色体数目异

常是导致流产和胚胎停育的主要遗传因素。在 801 例染色体数目异常中, 16 三体例数最多, 共 155 例,

所占比例高达 16.03%；其中 CytoScan Optima 芯片检出 16 三体 78 例；CytoScan 750K 芯片检出 63 例 16 三体 ;其中 CytoScan HD 芯片检出 16 三体 14 例。此外，检测过程中也发现了较多的三倍体，共 128 例，占其中的 13.24%；检出 81 例发生了 22 三体，所占比例为 8.38%；77 例为 Turner 综合征(45,X)，所占比例为 7.96%；40 例发生了多条染色体三体，所占比例为 4.14%。在检出的染色体数目异常中，除了 1 号染色体没有出现三体的外，其余染色体均出现了三体的情况(表 2)。

表 2 不同芯片检出的染色体数目异常具体情况  
Table 2 Numerical chromosomal abnormalities detected by different chips

染色体数目异常	染色体	3 种芯片共 检出例数(%)	CytoScan optima 芯片检出例数(%)	CytoScan 750K 芯片检出例数(%)	CytoScan HD 芯片检出例数(%)
单条染色体三体	Chr.2	9 (0.93)	7 (1.38)	1 (0.26)	1 (1.37)
	Chr.3	12 (1.24)	7 (1.38)	4 (1.03)	1 (1.37)
	Chr.4	9 (0.93)	6 (1.19)	2 (0.52)	1 (1.37)
	Chr.5	3 (0.31)	2 (0.40)	0 (0.00)	1 (1.37)
	Chr.6	5 (0.52)	1 (0.20)	3 (0.77)	1 (1.37)
	Chr.7	13 (1.34)	5 (0.99)	7 (1.80)	1 (1.37)
	Chr.8	20 (2.07)	11 (2.17)	9 (2.32)	0 (0.00)
	Chr.9	13 (1.34)	4 (0.79)	8 (2.06)	1 (1.37)
	Chr.10	14 (1.45)	10 (1.98)	4 (1.03)	0 (0.00)
	Chr.11	7 (0.72)	4 (0.79)	2 (0.52)	1 (1.37)
	Chr.12	7 (0.72)	2 (0.40)	5 (1.29)	0 (0.00)
	Chr.13	31 (3.21)	16 (3.16)	11 (2.84)	4 (5.48)
	Chr.14	21 (2.17)	9 (1.78)	10 (2.58)	2 (2.74)
	Chr.15	46 (4.76)	23 (4.55)	18 (4.64)	5 (6.85)
	Chr.16	155 (16.03)	78 (15.24)	63 (16.24)	14 (19.18)
	Chr.17	6 (0.62)	4 (0.79)	2 (0.52)	0 (0.00)
	Chr.18	26 (2.69)	12 (2.37)	11 (2.84)	3 (4.11)
	Chr.19	3 (0.31)	1 (0.20)	2 (0.52)	0 (0.00)
	Chr.20	12 (1.24)	10 (1.98)	1 (0.26)	1 (1.37)
	Chr.21	52 (5.38)	29 (5.73)	19 (4.90)	4 (1.37)
	Chr.22	81 (8.38)	42 (8.30)	33 (8.51)	6 (8.22)
多条染色体三体		40 (4.14)	26 (5.14)	13 (3.35)	1 (1.37)
性染色体异常	47, XXX	1 (0.10)	1 (0.20)	0 (0.00)	0 (0.00)
	47, XXY	3 (0.31)	2 (0.40)	1 (0.26)	0 (0.00)
	47, XYY	1 (0.10)	0 (0.00)	1 (0.26)	0 (0.00)
	48, XYYY	1 (0.10)	0 (0.00)	1 (0.26)	0 (0.00)
染色体单体	45, X	77 (7.96)	40 (7.91)	32 (8.25)	5 (6.85)
	21 单体	4 (0.41)	3 (0.59)	1 (0.26)	0 (0.00)
18 四体		1 (0.10)	0 (0.00)	1 (0.16)	0 (0.00)
三倍体		128 (13.24)	53 (10.47)	66 (17.01)	9 (12.33)
数目异常总例数		801 (82.83)	408 (80.63)	331 (85.31)	62 (84.93)
检出率(%)		31.98	39.96	27.33	22.71

## 2.4 染色体结构异常

在 967 例染色体异常中有 94 例是染色体结构异常, 占其中的 9.72% (94/967), 其中 68 例在染色体末端发生缺失和或重复, 其长度介于 1.0~104 Mb 之间, 涉及大量功能基因, 可导致胚胎严重发育迟缓、多发畸形、先天性心脏病等, 且多为致死性。临床资料显示这些样本的孕妇多发生反复流产, 提示夫妻双方可能发生相应片段的染色体平衡易位, 再发风险高。在 26 例流产样本中发现了致病性染色体微缺失、微重复, 检出率为 1.04% (26/2505), 其中有 4 种再发性 CNVs, 包括 22q11.2 微缺失、7q11.23

微缺失、17q11.23 微缺失和 22q13.3 微缺失, 其中 22q11.2 微缺失可导致 Di-George 综合征, 7q11.23 微缺失与 Williams-Beuren 综合征有关, 22q13.3 微缺失常出现在神经发育障碍的患者中。

## 2.5 染色体嵌合体

2505 例流产物样本中共检出 56 例染色体嵌合体, 占有染色体异常的 5.79%, 其中 46 例发生了单条染色体嵌合三体, 22 嵌合三体最多, 共 10 例; 8 例为嵌合单体, 均为 X 嵌合单体; 还有 2 例同时发生 2 条染色体嵌合, 包括 1 例携带 18 和 22 嵌合三体, 另 1 例携带 15 和 22 嵌合三体(表 3)。

表 3 不同芯片检出的染色体嵌合体类型

Table 3 Mosaicism detected by different chips

染色体嵌合体	染色体	3 种芯片共 检出例数	CytoScan optima 芯片检出例数	CytoScan 750K 芯片检出例数	CytoScan HD 芯片检出例数
单条染色体嵌合三体	Chr.2	4	1	3	0
	Chr.3	1	1	0	0
	Chr.4	3	3	0	0
	Chr.5	1	1	0	0
	Chr.7	3	1	2	0
	Chr.8	1	0	1	0
	Chr.9	1	1	0	0
	Chr.10	1	0	1	0
	Chr.11	1	1	0	0
	Chr.13	1	1	0	0
	Chr.14	1	0	1	0
	Chr.15	3	2	1	0
	Chr.16	5	4	0	1
	Chr.17	1	1	0	0
	Chr.18	1	0	1	0
	Chr.19	1	1	0	0
	Chr.20	2	1	1	0
	Chr.21	2	0	2	0
	Chr.22	10	8	2	0
	Chr.X	3	3	0	0
多条染色体嵌合三体	Chr.18 & 22	1	0	1	0
	Chr.15 & 22	1	0	1	0
嵌合单体	(X)×1-2	7	1	5	1
	(X)×1-2, (Y)×1	1	1	0	0
嵌合体总例数		56	32	22	2
检出率(%)		2.24	3.13	1.82	0.73



## 2.6 检出的染色体纯合区域

本研究检出 7 例样本发生全染色体单亲二倍体(uniparental disomy, UPD), 可能是导致其胎儿停止发育而流产的原因, 但是目前并没有充分的证据证明整条染色体的单亲二倍体(UPD)会导致胚胎的停育或流产, 只能提示胎儿隐性遗传病的发病风险增加。2 例出现单条染色体的单亲二倍体——UPD(3)和 UPD(4); 4 例检出单条染色体大片段纯合区域(ROHs): 3p13q21.3 区域发生 56.7 Mb 大小的 ROHs, 7p14.3q11.22 区域发生 37.2 Mb 大小的 ROHs, 17q-12q25.1 区域发生 37 Mb 大小的 ROHs, 1p36.33-p36.21 和 1q32.1q43 区域分别发生了 13.0 Mb、37.7 Mb 大小的 ROHs; 3 例在染色体多处发生 ROHs, 其总长度分别为 129.8 Mb、132.4 Mb、241.9 Mb, 均大于常染色体总长度的 4.6%, 提示夫妻双方为四级亲缘关系以上, 这增加了隐性遗传病的发病风险。

## 3 讨论

CMA 技术是近几年兴起的分子遗传学诊断技术, 其最大的特点在于一次检测就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, 能精确定位变异区段的位置, 清楚显示目标片段内的基因含量, 并能够对基因型—表型关系进行分析, 在基因水平上解释患者的临床表现和评估预后, 在染色体非平衡变异检测中具有其他染色体分析技术所无法比拟的优越性<sup>[14-17]</sup>。

本文用 CMA 技术的 3 种类型芯片对 2600 例自然流产样本进行了检测, 成功率高达 96.3%, 这远高于传统核型分析对流产物检测的成功率<sup>[18, 19]</sup>, 从而可对更多不明原因的自然流产和停育做出明确诊断。染色体异常是自然流产的常见原因, 占早期流产原因的 50% 左右<sup>[2, 3, 20, 21]</sup>。本研究用 CMA 技术的 3 种芯片共检出 967 例染色体异常, 总阳性率为 38.60%; 其中 CytoScan Optima 芯片的阳性率为 50.00%, CytoScan 750K 芯片的阳性率为 32.00%; CytoScan HD 芯片检出 73 例染色体异常, 其阳性率为 26.74%, CytoScan 750K 和 CytoScan HD 芯片的阳性率比既往相关研究的检出率偏低(50.1%、55.1%)<sup>[6, 22]</sup>, 这可

能是由芯片探针设计公司不同、芯片类型不同、芯片探针分布不同、数据分析软件不同等多种技术因素, 或者是既往相关研究的样本量(500 左右)比本研究的少很多, 而造成阳性率的差异。本研究中 CytoScan Optima 芯片的阳性率与之基本相符(50.1%、55.1%)<sup>[6, 22]</sup>, 这可能与 CytoScan Optima 芯片是专门针对产前和围产期诊断设计的芯片类型有关。本研究中 CytoScan 750K 和 CytoScan HD 芯片的阳性率比 CytoScan Optima 芯片偏低的重要原因可能是前两种芯片并不是用于流产物检测的最佳方法。

967 例染色体异常中有 801 例是染色体数目异常, 占其中的 82.83%, 与既往文献报道(86%)基本一致<sup>[4, 23]</sup>, 也证实了染色体数目异常是导致胚胎流产的主要原因<sup>[4, 24, 25]</sup>。绝大多数染色体非整倍体具有胚胎期致死性, 其中 16 三体所占比例最高(16.3%), 其次是三倍体(13.24%), Turner 综合征(45,X)和 13、15、21、22 三体也占较大的比例, 而其他染色体三体所占比例较低。绝大多数染色体非整倍体为新生突变, 而 D 组(13、14、15 号)染色体和 G 组(21、22 号)染色体易发生罗伯逊易位<sup>[26]</sup>, 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。大多数人认为孕妇年龄为染色体数目异常的高危因素, 而本研究结果显示, 各个年龄段的孕妇均有发生染色体数目异常导致流产的情况, 801 例染色体数目异常的流产物中有 92 例来自 16~25 岁的孕妇, 281 例来自 26~30 岁的孕妇, 175 例来自 31~35 岁的孕妇, 179 例来自 36~40 岁的孕妇, 74 例来自 40 岁以上的孕妇, 由此可见对染色体数目异常的筛查不应只关注高龄孕妇, 各个年龄段的孕妇均需要染色体非整倍体的筛查。2007 年美国妇产科医师学会提出, 所有年龄段的孕妇均应进行非整倍体筛查<sup>[27]</sup>。然而, 对于流产物染色体异常分析, 孕妇年龄和孕周是两个最重要因素, 但本研究由于各种原因未能获得全部孕妇年龄和孕周的相关资料, 因此不能完成孕妇年龄和孕周的分层分析, 从而不能对孕妇年龄和孕周与自然流产的关系进行分析, 这是本研究的不足和遗憾之处。

染色体结构变异也是自然流产的重要因素<sup>[4, 21]</sup>, 本研究共检出 94 例染色体结构异常, 占 9.72%, 高于既往相关研究(6%)<sup>[4]</sup>, 这可能是由于传统核型分

析分辨率低以及 FISH 只限于靶向检测,而对染色体结构异常的检出率低于 CMA。其中有 68 例在染色体末端发生缺失和/或重复,其长度介于 1.0~104 Mb 之间,涉及大量功能基因,这些可导致胚胎严重发育迟缓、多发畸形、先天性心脏病等,且多为致死性。临床资料显示,这些样本的孕妇多发生在孕早期,且为反复流产患者,提示夫妻双方可能发生相应片段的染色体平衡易位,再发风险高<sup>[4, 28, 29]</sup>。然而由于各种原因,未能完成这些夫妻双方是否发生染色体片段的平衡易位的检测。既往文献报道显示,亚显微结构拷贝数变异存在于 0.6% 和 0.78% 的自然流产样本中<sup>[30, 31]</sup>,本研究在 26 例流产样本中发现了致病性染色体微缺失、微重复,检出率为 1.04% (26/2505),其中有 4 种再发性 CNVs,包括 22q11.2 微缺失、7q11.23 微缺失、17q11.23 微缺失和 22q13.3 微缺失。22q11.2 微缺失可导致 Di-George 综合征,其主要临床表现包括先天性心脏病,多发畸形,宫内发育迟缓和神经发育障碍等<sup>[32]</sup>。本研究共有 5 例流产样本携带 22q11.2 微缺失,检出率为 0.20% (5/2505),这与既往流产物相关研究检出率相符 (0.05%~0.8%)<sup>[30, 32, 33]</sup>,但这比正常出生婴儿中 22q11.2 微缺失发生率 (0.013%) 高很多<sup>[34]</sup>。本文的研究结果也进一步证实 22q11.2 微缺失可能与自然流产有关,22q11.2 微缺失导致胎儿心血管系统畸形可能是其致流产的潜在机制。7q11.23 微缺失与 Williams-Beuren 综合征有关,其主要表型为面部畸形、心血管异常、结缔组织异常、高钙血症和一种独特的神经行为表现等<sup>[35]</sup>。同时,本研究在 1 例样本中还发现了 17q11.23 微缺失,检出率为 0.04% (1/2505),这与既往研究结果基本相符 (0.05%)<sup>[30]</sup>,但比正常出生婴儿中 17q11.23 微缺失发生率 (0.013%) 高<sup>[36]</sup>,这表明 17q11.23 微缺失可能与流产有关。22q13.3 微缺失常在神经发育障碍的患者中被检出,本研究中其检出率为 0.04% (1/2505),这远远低于既往神经发育障碍相关研究的检出率 (1.7%)<sup>[37]</sup>,该变异在既往流产物相关研究中并未被发现过,这提示 22q13.3 微缺失与流产的相关性有待进一步研究。本研究中发现的其他亚微观的 CNVs,之前均没有报道过的,其与流产的相关性现在还不确定,需要进行更大规模的研究来证实这些 CNVs 是否为流产的原因。染色

体微缺失/重复的胚胎致死性没有染色体数目异常强,仅在表型比较严重时才会导致胎儿致死,这是受到遗传外显率和表现度不同的影响。传统核型分析无法检测此类微缺失/重复,而 CMA 则能够更有效地检出由于染色体结构异常导致的流产,并通过夫妻双方相应位点的检测,可对再生育进行遗传风险评估。

本研究共检出嵌合体 56 例,占有染色体异常的 5.79% (56/967),比以往研究结果 (8%) 偏低<sup>[4]</sup>,其中 22 嵌合三体和 X 嵌合体所占比例较多,分别占 17.86% (10/56) 和 14.29% (8/56)。值得注意的是,有 2 例样本同时携带 2 条染色体嵌合三体:1 例为 18 和 22 嵌合三体,另 1 例为 15 和 22 嵌合三体,较为罕见。同时还检出 7 例全染色体组 UPD,这是由孤雄生殖或孤雌生殖导致的。母系 UPD 将表现为畸胎瘤,而父系 UPD 则表现为葡萄胎,二者均可导致流产<sup>[38, 39]</sup>。3 例样本出现多条染色体多处大片段 ROHs,其总长度均大于常染色体总长度的 4.6%,提示夫妻双方为四级亲缘关系或以上,这导致隐性遗传病的发病风险增加<sup>[40]</sup>,然而由 ROHs 所致流产的病例未被报道过,核型分析和 FISH 均无法检测该类变异,从而显示出 CMA 技术独特的优势。

综上所述,CMA 是一种全新的现代化分子核型分析技术,其有效克服了传统染色体诊断技术的缺点,能够快速、准确地对流产物全基因组进行分析,从而检测出常规核型分析能发现的非平衡染色体变异和数目异常,以及核型分析技术无法检测到的 CNVs (<5 Mb) 和 ROHs,将染色体病的诊断水平提高到基因层面上。CMA 是一种可以应用于临床流产物遗传学诊断的可靠、稳定、高分辨的技术,检测结果能够对再生育风险评估提供指导。

## 致谢

感谢广州金域医学检验中心有限公司的陈婉华、张玉华、唐荣熹、卜晓玲、杨娟等 CMA 平台技术人员为本研究提供高质量的检测数据。

## 参考文献(References):

- [1] Muttukrishna S, Jauniaux E, Greenwold N, McGarrigle H,



- Jivraj S, Carter S, Elgaddal S, Groome N, Regan L. Circulating levels of inhibin A, activin A and follistatin in missed and recurrent miscarriages. *Hum Reprod*, 2002, 17(12): 3072–3078. [DOI]
- [2] van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(12): 1951–1959. [DOI]
- [3] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*, 2006, 368(9535): 601–611. [DOI]
- [4] Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14(5): 855–865. [DOI]
- [5] Meng JL. Application of chromosome microarray analysis in the diagnosis of prenatal genetic diseases. *Prog Obstet Gynecol*, 2015, 24(5): 390–393.  
孟金来. 染色体微阵列分析技术在产前遗传性疾病诊断中的应用进展. 现代妇产科进展, 2015, 24(5): 390–393. [DOI]
- [6] Wang Y, Cheng Q, Meng L, Luo C, Hu H, Zhang J, Cheng J, Xu T, Jiang T, Liang D, Hu P, Xu Z. Clinical application of SNP array analysis in first-trimester pregnancy loss: a prospective study. *Clin Genet*, 2017, 91(6): 849–858. [DOI]
- [7] Shearer BM, Thorland EC, Carlson AW, Jalal SM, Ketterling RP. Reflex fluorescent in situ hybridization testing for unsuccessful product of conception cultures: a retrospective analysis of 5555 samples attempted by conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization. *Genet Med*, 2011, 13(6): 545–552. [DOI]
- [8] Haoud K, Mellali S, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Moulassehouli S. Prevalence of aneuploidies in products of spontaneous abortion: interest of FISH and MLPA. *Morphologie*, 2014, 98(320): 40–46. [DOI]
- [9] Warren JE, Turok DK, Maxwell TM, Brothman AR, Silver RM. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation. *Obstet Gynecol*, 2009, 114(5): 1093–1102. [DOI]
- [10] Dhillon RK, Hillman SC, Morris RK, McMullan D, Williams D, Coomarasamy A, Kilby MD. Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities in miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, 2014, 121(1): 11–21. [DOI]
- [11] Reddy UM, Page GP, Saade GR, Silver RM, Thorsten VR, Parker CB, Pinar H, Willinger M, Stoll BJ, Heim-Hall J, Varner MW, Goldenberg RL, Bukowski R, Wapner RJ, Drews-Botsch CD, O'Brien BM, Dudley DJ, Levy B, NICHD Stillbirth Collaborative Research Network. Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. *N Engl J Med*, 2012, 367(23): 2185–2193. [DOI]
- [12] Gao J, Liu C, Yao F, Hao N, Zhou J, Zhou Q, Zhang L, Liu X, Bian X, Liu J. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. *Mol Cytogenet*, 2012, 5(1): 33. [DOI]
- [13] Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*, 2011, 13(7): 680–685. [DOI]
- [14] Brady PD, Vermeesch JR. Genomic microarrays: a technology overview. *Prenat Diagn*, 2012, 32(4): 336–343. [DOI]
- [15] Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, Shaw C, Lupski JR, Beaudet A, Patel A, Cheung SW, Van den Veyver I. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn*, 2012, 32(4): 351–361. [DOI]
- [16] Robberecht C, Schuddinck V, Fryns JP, Vermeesch JR. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genet Med*, 2009, 11(9): 646–654. [DOI]
- [17] Choy KW, Setlur SR, Lee C, Lau TK. The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. *BJOG*, 2010, 117(4): 391–398. [DOI]
- [18] Lee CN, Lin SY, Lin CH, Shih JC, Lin TH, Su YN. Clinical utility of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG*, 2012, 119(5): 614–625. [DOI]
- [19] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5): 749–764. [DOI]
- [20] McNamee K, Dawood F, Farquharson RG. Evaluation of array comparative genomic hybridization in recurrent miscarriage. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2013, 74(1): 36–40. [DOI]
- [21] Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of develop-

- pmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod*, 2003, 18(8): 1724–1732. [DOI]
- [22] Yuan HM, Chen MF, Deng XY, Lv fen. Application of chromosomal microarray analysis for a cohort of Chinese patients with spontaneous miscarriage. *Chin J Med Genet*, 2016, 33(34): 442–446.  
袁海明, 陈梦帆, 邓小燕, 吕芬. 染色体微阵列技术在自然流产病因诊断中的应用. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(4): 442–446. [DOI]
- [23] Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Müntefering H, Rehder H. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9(7): 539–547. [DOI]
- [24] Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med*, 2005, 7(4): 251–263. [DOI]
- [25] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod*, 2012, 27(8): 2297–2303. [DOI]
- [26] Ko DS, Cho JW, Lee HS, Kim JY, Kang IS, Yang KM, Lim CK. Preimplantation genetic diagnosis outcomes and meiotic segregation analysis of robertsonian translocation carriers. *Fertil Steril*, 2013, 99(5): 1369–1376. [DOI]
- [27] ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol*, 2007, 109(1): 217–227. [DOI]
- [28] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril*, 2004, 81(2): 367–373. [DOI]
- [29] Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic factors as a cause of miscarriage. *Curr Med Chem*, 2010, 17(29): 3431–3437. [DOI]
- [30] Levy B, Sigurjonsson S, Pettersen B, Maisenbacher MK, Hall MP, Demko Z, Lathi RB, Tao R, Aggarwal V, Rabinowitz M. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstet Gynecol*, 2014, 124(2 Pt 1): 202–209. [DOI]
- [31] Sahoo T, Dzidic N, Strecker MN, Commander S, Travis MK, Doherty C, Tyson RW, Mendoza AE, Stephenson M, Dise CA, Benito CW, Ziadie MS, Hovanes K. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. *Genet Med*, 2017, 19(1): 83–89. [DOI]
- [32] Delio M, Guo T, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Herman S, Kaminetzky M, Higgins AM, Coleman K, Chow C, Jalbrzikowski M, Bearden CE, Bailey A, Vangkilde A, Olsen L, Olesen C, Skovby F, Werge TM, Templin L, Busa T, Philip N, Swillen A, Vermeesch JR, Devriendt K, Schneider M, Dahoun S, Eliez S, Schoch K, Hooper SR, Shashi V, Samanich J, Marion R, van Amelsvoort T, Boot E, Klaassen P, Duijff SN, Vorstman J, Yuen T, Silversides C, Chow E, Bassett A, Frisch A, Weizman A, Gothelf D, Niarchou M, van den Bree M, Owen MJ, Su'fer DH, Andreo JR, Armando M, Vicari S, Digilio MC, Auton A, Kates WR, Wang T, Shprintzen RJ, Emanuel BS, Morrow BE. Enhanced maternal origin of the 22q11.2 deletion in velocardiofacial and DiGeorge syndromes. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(3): 439–447. [DOI]
- [33] Rosenfeld JA, Tucker ME, Escobar LF, Neill NJ, Torchia BS, McDaniel LD, Schultz RA, Chong K, Chitayat D. Diagnostic utility of microarray testing in pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 46(4): 478–486. [DOI]
- [34] Goodship J, Cross I, LiLing J, Wren C. A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child*, 1998, 79(4): 348–351. [DOI]
- [35] Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Fusco C. Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet*, 2010, 128(1): 3–26. [DOI]
- [36] Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol*, 2002, 17(4): 269–271. [DOI]
- [37] Gong X, Jiang YW, Zhang X, An Y, Zhang J, Wu Y, Wang J, Sun Y, Liu Y, Gao X, Shen Y, Wu X, Qiu Z, Jin L, Wu BL, Wang H. High proportion of 22q13 deletions and SHANK3 mutations in Chinese patients with intellectual disability. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34739. [DOI]
- [38] Gogiel M, Begemann M, Spengler S, Soellner L, Göretzlehner U, Eggermann T, Strobl-Wildemann G. Genome-wide paternal uniparental disomy mosaicism in a woman with Beckwith-Wiedemann syndrome and ovarian steroid cell tumour. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21(7): 788–791. [DOI]
- [39] Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Cytrynbaum C, Chen YA, Steele L, Shuman C, Ray PN, Weksberg R. Mosaicism for genome-wide paternal uniparental disomy with features of multiple imprinting disorders: diagnostic and management issues. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(1): 13–20. [DOI]
- [40] Kearney HM, Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med*, 2011, 31(4): 595–613, ix. [DOI]