

唐氏综合征高危孕妇血浆中 游离胎儿 DNA 的 Y 染色体微缺失筛查*

何敏¹, 郭华², 张海洋², 王娅宁¹, 赵院利²

(1. 延安大学西安创新学院, 西安 710100; 2. 陕西省人民医院, 西安 710068)

摘要:目的 利用孕妇血浆中游离胎儿 DNA 在孕早期进行 Y 染色体微缺失筛查, 诊断男性胎儿无精子症因子(AZF)缺失情况。方法 留取 2013 年 6 月~2014 年 8 月参加产前检测的 16~34 孕周唐氏综合征筛查高危孕妇的外周血标本 89 例, 提取出全血基因组 DNA 后利用 Y 染色体微缺失检测试剂盒检测 AZF 微缺失。结果 86 例孕妇妊娠至胎儿出生, 其中男胎孕妇 45 例, 女胎孕妇 41 例。妊娠女性胎儿的孕妇血浆 DNA 仅扩增出 ZFX/ZFY 对照基因, 而妊娠男性胎儿的孕妇血浆 DNA 同时扩增出 SRY, ZFX/ZFY 对照基因, 且有 3 例样本检测出 AZF 基因微缺失。结论 通过提取孕妇血浆中游离胎儿 DNA 能够检测出胎儿是否伴有 AZF 基因微缺失, 从而提前预测胎儿今后罹患生精障碍的风险。

关键词:唐氏综合征; 产前诊断; 游离胎儿 DNA; Y 染色体微缺失; 无精子症因子

中图分类号: R722.11; R394.33 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)02-039-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.012

Screening the Y Chromosome Microdeletion of Free Fetal DNA in Plasma in Maternal with High-risk Down's Syndrome

HE Min¹, GUO Hua², ZHANG Hai-xiang², WANG Ya-ning¹, ZHAO Yuan-li²

(1. Xi'an Greeting College of Yan'an University, Xi'an 710100, China;

2. Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** Using maternal free fetal DNA to screen Y chromosome microdeletion in early pregnancy and to diagnose the AZF deletions in male fetus. **Methods** 89 cases peripheral blood samples were collected from high-risk Down's syndrome pregnant women in 16th~34th week of gestation in June 2013 to August 2014, and the whole blood genomic DNA was extracted to detect the AZF gene by using Y chromosome microdeletions detection Kit. **Results** 45 cases male fetus and 41 cases female fetus were born in 86 cases pregnant women. There were only ZFX/ZFY control genes in female fetal DNA, while the SRY, ZFX/ZFY genes could be amplified from male fetal DNA, and AZF microdeletion were detected in three male fetal DNA. **Conclusion** Extracting the DNA in maternal plasma will be able to detect free fetal DNA and then identify whether the fetus is AZF gene deletions, thus predicting the potential risk of azoospermia for fetus in the future.

Keywords: down's syndrome; prenatal diagnosis; free fetal DNA; Y chromosome microdeletions; azoospermia factor

近年来随着分子生物学、遗传学等科学技术的不断发展, 产前筛查和产前无创诊断在国内外逐渐受到越来越多的关注和研究, 已经成为提高人口素质, 进行出生缺陷干预的重要措施之一^[1]。从孕妇外周血检测胎儿游离 DNA 为无创性产前诊断和妊娠并发症的筛查和诊断开辟了新途径, 具有准确快速、简便易行的优点, 已经被广泛应用在唐氏综合征、性连锁遗传疾病等产前无创诊断和筛查方面^[2~4]。

无精子症因子(azoospermia factor, AZF)是 Y 染色体长臂上存在的与精子发生相关的基因, AZF 分为 AZFa, AZFb, AZFc 三个相互独立的区域。任何一个区域的微缺失都会导致精子生成的障碍,

引起少精子症或无精子症。Y 染色体 AZF 区域的微缺失是导致男性不育的重要遗传学因素, 可以通过自身遗传和辅助生育技术传递给下一代, 对男性不育患者进行 Y 染色体微缺失的检测, 可查明部分不育患者的病因, 并为临床辅助生殖提供指导和依据^[5~7]。而如果能够在胎儿时期就检测出 AZF 缺陷, 就可以在患者成长过程中对症治疗, 或者及早干预, 节省大量的医疗费用和患者精力^[8]。本文通过对唐氏综合征高危孕妇血浆中游离胎儿 DNA 的 Y 染色体 AZF 基因进行筛查, 探讨 Y 染色体 AZF 基因检测在胎儿遗传病产前无创诊断中应用的可行性。

1 材料与方法

* 基金项目: 陕西省科技攻关项目(2014K11-03-09-05), 陕西省科技攻关项目(2014K12-04)。

作者简介: 何敏(1984—), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向: 公共卫生, Tel: 18709247752。郭华(1977—), 女, 大学本科, 主管检验师, 主要从事分子生物检测工作, 同为第一作者。

通讯作者: 张海洋, 男, 高级工程师, E-mail: dream1121@sohu.com。

1.1 研究对象 选取2013年6月~2014年8月在陕西省人民医院门诊参加产前检测的单胎孕妇,经过检测血清中甲胎蛋白(AFP)、游离 β -人绒毛膜促性腺激素(F- β hCG),同时结合孕妇年龄、民族、体重、是否患有胰岛素依赖性糖尿病、是否有过21-三体不良孕史、是否吸烟等因素,采用配套软件计算唐氏综合征风险率,筛查出高危孕妇89例,年龄20~43岁,平均年龄30.8岁;孕周16~34周,平均孕周 19.2 ± 3.6 周,其中孕周12~16周的占17.92%,16~24周的占76.27%, ≥ 24 周的占5.81%。对筛查出的高危孕妇进行遗传咨询,建议进行游离胎儿DNA检测或羊水穿刺,研究经医院伦理委员会批准和参检孕妇知情同意后,抽取其10 ml外周血,进行游离胎儿DNA检测。

1.2 仪器与试剂 ABI Prism 7500 荧光定量PCR仪(ABI公司),NaNoDrop 2000c 核酸测定仪(Thermo Scientific),2720 Thermal Cycler 扩增仪(ABI公司)。血浆DNA提取试剂盒 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen公司);Y染色体微缺失检测试剂盒,国械注准20153400024(上海透景生命科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 游离DNA提取:收集的外周血样本采用柱分离法提取DNA,按血浆DNA提取试剂盒[QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)]说明书中提取方案进行血浆游离DNA提取,将洗脱液置EP管 -20°C 低温冰箱保存备用。

1.3.2 PCR检测:①PCR试剂配置:将PCR相关试剂从冰箱中取出,室温下放置30 min,使试剂完全融解;依次做好阳性对照(正常男性)、阴性对照(正常未孕女性)和样品的标记;每个标本做两管PCR反应,组别A和组别B,A/B PCR反应的体系为A/B组PCR预混液22.5 μl ,核酸模板(样品)、阴性对照、质控品各2.5 μl ,根据实验检测的样品数量计算所需PCR预混液的用量,移液枪温和地混合均匀,按照每管22.5 μl 分装到各个PCR反应管中。②加样:将样品按照2.5 μl /管的量逐

一加入相应的PCR反应管中,混匀后2 000 r/min离心10 s。③PCR扩增:将PCR反应管放入PCR仪,设定好热盖功能。扩增反应按照: 50°C 2 min,1个循环; 95°C 5 min,1个循环; 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s,38个循环; 72°C 5 min,1个循环。在第三阶段 60°C 时收集FAM/VIC/ROX/Cy 5信号,并保存相关文件。

1.3.3 结果判定:四个检测通道的相应检测指标及判断,见表1。内参Ct值应 < 32 ,Ct值 ≥ 32 表示实验失败,应改善条件后重新检测。Ct值 < 32 表示STS位点存在,Ct值 ≥ 32 表示缺失。

表1 仪器检测通道设置(FAM/VIC/ROX/Cy5)

组别	荧光染料	检测位点	备注
Group A	FAM	SRY	对照
	VIC	sY84	AZF ^a
	ROX	sY127	AZF ^b
	Cy5	sY255	AZF ^c
Group B	FAM	ZFX/ZFY	对照
	VIC	sY86	AZF ^a
	ROX	sY134	AZF ^b
	Cy5	sY254	AZF ^c

2 结果 ①受试样本中,有3例胎儿经诊断因18-三体综合征、先天性神经管缺陷和Turner综合征放弃继续妊娠,86例妊娠至胎儿出生,其中男胎孕妇45例,女胎孕妇41例。出生男婴和男性对照组DNA模板均能同时扩增出SRY,ZFX/ZFY内对照基因,有明显的S型扩增曲线且Ct值 < 32 ;而出生女婴和正常未孕女性DNA模板全部仅扩增出ZFX/ZFY内对照基因,有明显的S型扩增曲线且Ct值 < 32 ,见图1和2。

②在扩增出SRY,ZFX/ZFY内对照基因的45例男胎孕妇中,有2例样本AZF^c区STS位点缺失,1例样本为AZF^b+c区存在缺失,缺失率6.7%,见图3和4。

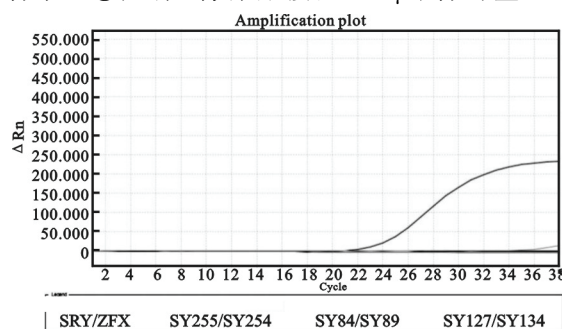


图1 正常女性

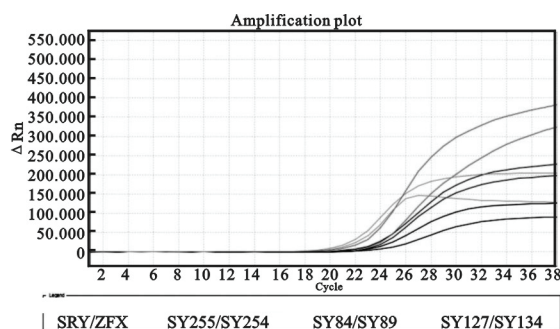


图2 正常男性

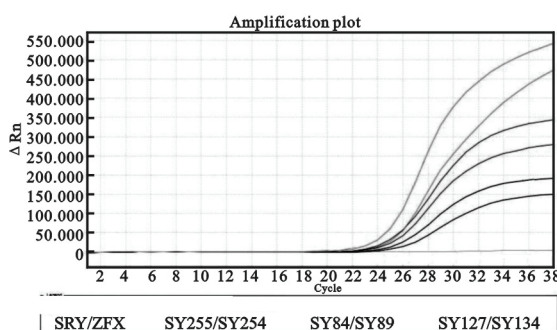


图3 AZFc 缺失

3 讨论 世界卫生组织统计,全球约有10%~15%的夫妇患有不育症,而男性不育占一半。不育患者中30%具有遗传学异常,这部分患者采用药物治疗是无效的。男性Y染色体上有三个与生精功能相关区域,分别为AZFa, AZFb 和 AZFc; AZF 基因微缺失与严重的生精功能障碍密切相关,会导致男性特发性无精子症和重度少精子症,是男性不育的主要原因之一^[9,10]。AZFa 区域的基因主导精母细胞的增生,其确切功能还未阐明。AZFa 的缺失比较少见,整个 AZFa 区域的缺失通常表现为支持细胞综合症(SCOS),为绝对的无精子症; AZFb 缺失的患者表现为生精阻滞,精子生成被阻滞在精母细胞阶段,所以睾丸内仍可见精原细胞和初级精母细胞,但没有精子生成; AZFc 区域缺失是临床上最常见的缺失,是引起生精障碍的一个重要原因^[11,12]。一般来说, AZFc 缺失患者尚存精子生成能力,因此 AZFc 缺失者可以通过辅助生育手段进行治疗,但是会将 AZFc 缺失遗传给男性后代^[5]。

大多数原发性无精子症和原发性严重少精子症病人的Y染色体大体上是完整的, AZF 缺失并非一概不育,但若存在Y染色体 AZF 微缺失,可引起严重生精障碍,药物治疗一般无效。同时, AZFa, AZFb 或 AZFc 位点的存缺决定着治疗与否及具体的方案对策。因此,产前遗传缺陷筛查比事后诊断不但节约费用,而且能尽早提示风险,帮助医生指导生育,为患者避免一些不必要的药物及手术治疗,减少病患负担^[8]。AZF 微缺失检测成为诊断遗传性不育的重要技术手段。由于本病呈Y染色体连锁遗传方式,可通过检测孕妇血浆中胎儿DNA进行无创产前诊断。

利用孕妇外周血作为检测材料,克服了传统产前诊断技术在取材及检测时间等方面的缺陷,可用于鉴定胎儿性别和Rh血型、性连锁遗传性疾病和地中海贫血等基因病的诊断和染色体异常的筛查,并为一些遗传性疾病的产前治疗提供依据,因此具有重要的临床意义^[13]。孕妇血浆中的游离胎儿DNA来源于以下三种途径:即母体血浆中的胎儿

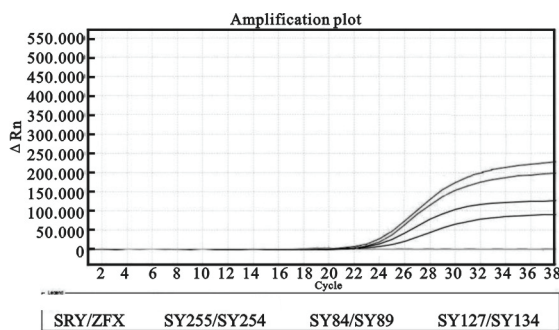


图4 AZFb+c 缺失

有核细胞、凋亡的胎儿组织细胞和胎盘滋养细胞,它具有含量丰富,浓度较高;在母血中出现早,孕早期即可检测;片段较小,代谢十分迅速,半衰期短,分娩后可迅速被清除,不受以往妊娠的影响等特点。胎儿游离DNA用于孕早期无创产前诊断已成为近年来的研究热点,并迅速应用于临床^[2~4,14,15]。

本研究中,通过Y染色体微缺失检测可以准确地判断出受试孕妇胎儿的DNA缺失情况,这就为伴性遗传缺陷疾病的无创产前诊断提供了重要的依据。同时,实验结果显示,唐氏综合征高危孕妇45例男胎中有2例AZFc完全缺失,有1例发生AZFb+c缺失,胎儿发生AZF微缺失的比例为6.7%,提示唐氏综合征高危孕妇与胎儿Y染色体AZF微缺失可能存在一定的相关性,但由于实验样本量较少,尚需进一步研究。

总之,利用孕妇血浆中游离胎儿DNA进行Y染色体微缺失检测来无创性诊断胎儿可能发生的生精障碍等伴性遗传缺陷疾病,其取样简便、操作风险较低,而且方法准确率高、假阳性率极低、特异性强,是完善现有产前诊断体系的一种切实有效的产前筛查方法。

参考文献:

- [1] 姜萍,张风琴,苍金荣.唐氏综合征和神经管畸形筛查实验的临床应用[J].现代检验医学杂志,2007,22(5):106-108.
Jiang P, Zhang FQ, Cang JR. The clinical application of Down's syndrome and neural tube defects screening experiment[J]. J Mod Lab Med, 2007, 22(5): 106-108.
- [2] 米阳,李志斌,贺同强,等.孕妇外周血浆中小片段游离胎儿DNA在无创性唐氏综合征检测中的应用[J].中国妇幼保健,2014,29(30):4997-4998.
Mi Y, Li ZB, He TQ, et al. Application of the small and medium-sized pieces of free fetal DNA in pregnant women peripheral blood plasma in the noninvasive down's syndrome detection[J]. Maternal and Child Health Care of China, (下转45页)

- rect immunofluorescence assay in the diagnosis of the infection of the vagina Gardiner [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34(18): 2437-2439.
- [3] 王 华, 苍金荣, 任健康, 等. 念珠菌类细菌样变异株形态学特征[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3): 61-64.
Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Study on morphology of mutable *Candida* like bacteria[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(3): 61-64.
- [4] Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, et al. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal eco-systems[J]. Clin Infect Dis, 2001, 33(7): 1022-1027.
- [5] van Belkum A, Koeken A, Vandamme P, et al. Development of a species-specific polymerase chain reaction assay for *Gardnerella vaginalis* [J]. Molecul Cell Probes, 1995, 9(3): 167-174.
- [6] Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K, et al. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 894-900.
- [7] Madico G, Quinn TC, Rompalo A, et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(11): 3205-3210.
- 收稿日期: 2015-11-13 修回日期: 2015-11-29
-
- (上接 41 页) 2014, 29(30): 4997-4998.
- [3] 林秀玲. 小片段游离胎儿 DNA 检测 Y 染色体性别决定区的临床意义[J]. 中外医疗, 2009, 28(34): 39.
Lin XL. The clinical significance about small fragments of free fetal DNA tests sex-determining region of Y-chromosome[J]. China Foreign Medical Treatment, 2009, 28(34): 39.
- [4] 朱金玲, 张玉萍, 张淑红, 等. 利用孕妇血浆中游离胎儿 DNA 进行胎儿性别诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(11): 23, 35.
Zhu JL, Zhang YP, Zhang SH, et al. Use of pregnant women free fetal DNA in plasma for the diagnosis of fetal sex[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2006, 14(11): 23, 35.
- [5] Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. State of the art 2004[J]. Int J Androl, 2004, 27(4): 240-249.
- [6] Stahl PJ, Masson P, Mielnik A, et al. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia[J]. Fertil Steril, 2010, 94(5): 1753-1756.
- [7] Clement P, Lohmann L, Minz M. Screening for Y chromosome microdeletions in assisted reproductive techniques[J]. Gynecol Obstet Ferti, 2008, 36(3): 318-324.
- [8] 熊 进, 邓 锴, 张昌军, 等. 性别相关的母血中游离胎儿 DNA 的 Y 染色体微缺失筛查的探索研究[J]. 中国性科学, 2014, 23(11): 93-95.
Xiong J, Deng K, Zhang CJ, et al. Screening the sex-related Y chromosome microdeletion of free fetal DNA in maternal blood[J]. Chinese Journal of Human Sexuality, 2014, 23(11): 93-95.
- [9] 宋春生, 赵家有. 《EAU 男性不育症指南(2012 年版)》解读[J]. 中国性科学, 2012, 21(10): 13-16, 23.
Song CS, Zhao JY. Introduction to EAU male infertility Guidelines (2012) [J]. Chinese Journal of Human Sexuality, 2012, 21(10): 13-16, 23.
- [10] Vogt PH, Bender U. Human Y chromosome microdeletion analysis by PCR multiplex protocols identifying only clinically relevant AZF microdeletions[J]. Methods Mol Biol, 2013(927): 187-204.
- [11] Pandey LK, Pandey S, Gupta J, et al. Loss of the AZFc region due to a human Y-chromosome microdeletion in infertile male patients[J]. Genet Mol Res, 2010, 92(6): 1924-1933.
- [12] Ravel C, Chantot-Bastard S, El Houate B, et al. Y-chromosome AZFc structural architecture and relationship to male fertility[J]. Fertil Steril, 2009, 92(6): 1924-1933.
- [13] 朱 燕, 徐克前, 王晓春. 孕妇血浆中游离胎儿 DNA 在产前诊断中的初步应用[J]. 检验医学, 2012, 27(3): 159-162.
Zhu Y, Xu KQ, Wang XC. Primary application of free fetal DNA from maternal plasma in prenatal diagnosis[J]. Laboratory Medicine, 2012, 27(3): 159-162.
- [14] 孙宏跃, 袁 路, 徐广立. 孕妇中期唐氏筛查联合外周血游离胎儿 DNA 检测的临床意义[J]. 中外医学研究, 2014, 12(12): 57-58.
Sun HY, Yuan L, Xu GL. Clinical significance of combined detection of Down's Screening and free fetal DNA investigation [J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2014, 12(12): 57-58.
- [15] 王 靖, 陈汉平. 唐氏综合征高危孕妇血浆游离胎儿 DNA 的检测[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(7): 33-34, 83.
Wang J, Chen HP. Detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma of the women with pregnancy, who have high-risk of carrying a Down's fetus in Down's syndrome screening[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2011, 19(7): 33-34, 83.
- 收稿日期: 2015-07-25