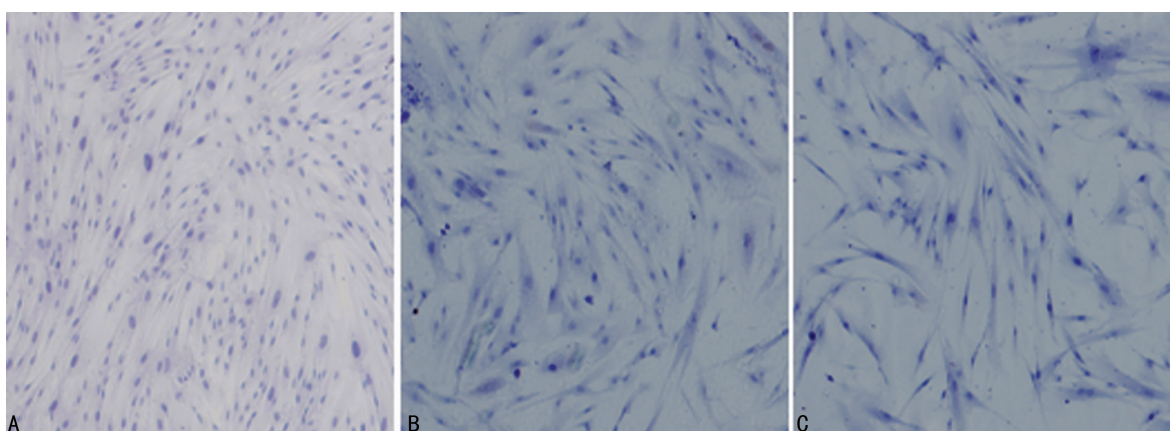


A: α -SMA 在 NFs 的阴性表达; B: α -SMA 在 AFs 的阳性表达; C: α -SMA 在 CAFs 的阳性表达。

图 3 α -SMA 在三种食管间质成纤维细胞的表达(IHC, $\times 100$)



A: CK 在 NFs 的阴性表达; B: CK 在 AFs 的阴性表达; C: CK 在 CAFs 的阴性表达。

图 4 CK 在 3 种食管间质成纤维细胞的表达(IHC, $\times 100$)

2.3 3 种食管间质成纤维细胞的 Vimentin、 α -SMA 基因表达 从NFs \rightarrow AFs \rightarrow CAFs, Vimentin 的表达无明显变化, α -SMA 的表达逐渐增强, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 5~6。

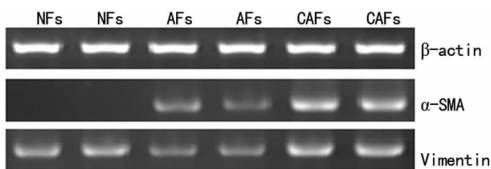


图 5 Vimentin、 α -SMA 在 3 种食管间质成纤维细胞的表达

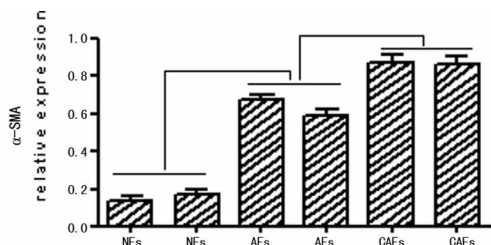


图 6 3 种食管间质成纤维细胞 mRNA α -SMA 的测定

3 讨 论

肿瘤间质微环境已经成为肿瘤研究热点之一。CAF 存在于肿瘤间质微环境中的活化纤维母细胞^[1]。与正常成纤维细胞相比, CAFs 已发生表型改变, 主要表现为间质成纤维细胞 CD34 的表达缺失, 取而代之的是 α -SMA、波形蛋白(vim-

entin)、成纤维细胞活化蛋白、成纤维细胞特异蛋白等表面蛋白的阳性表达。关于多种实体肿瘤的 CAFs 研究证实: α -SMA 阳性表达是高发事件^[2-4]。由静止的正常成纤维细胞发展到活化的 CAFs 期间是否存在半活化的状态, 尚未得到证实。

关于癌旁纤维母细胞的起源学者们意见不一, 有的学者认为 CAFs 是由肿瘤细胞经上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)而来, 血管平滑肌细胞和周细胞也可能是 CAFs 来源之一, 大多数的观点认为 CAFs 是由间质既存的成纤维细胞活化而来^[5-6]。本组免疫研究结果显示, 正常组 α -SMA 表达为阴性, 而进展期癌组中的 α -SMA 表达率高达 76%, 明显高于正常组。值得一提的是, 本研究中的癌前病变也出现了 α -SMA 的阳性染色, 表达率为 26%, 镜下可观察到, 紧邻异型细胞的间质成纤维细胞更容易出现 α -SMA 阳性, 呈丝带状分布。本研究对从正常组、癌前病变组、进展期癌组分离、提取、培养的间质成纤维细胞进行了 α -SMA 免疫染色和 mRNA α -SMA 的半定量检测, 结果发现: NFs 中 α -SMA 染色近乎阴性, mRNA 检测量极低, 而 AFs 和 CAFs 的 α -SMA 染色均为阳性, mRNA 检测值呈逐渐增高的趋势。以上结果提示: 在食管癌进程中, 正常的食管间质成纤维细胞是处于静止期的, 而在食管上皮受到外界刺激而基因突变时, 间质被动的做出应答, 与恶变上皮细胞临近的间质成纤维细胞逐步发生了活化, 不典型增生纤维细胞与癌旁纤维母细胞 mRNA α -SMA 的表达越来越强, 肿瘤间质中的成纤维细胞可能是由最初的静止期正常成纤维细胞经半活化的不典型增生间质成纤维细胞而来。研究证实, 肿瘤间质成纤维细胞(下转第 3782 页)

高通量基因测序对血清学筛查临界风险孕妇的应用价值*

周琴,郑芳秀,陈英苹,张晓青,张玟,黄瑞萍,陆蓓亦,缪婷婷,袁珮[△],虞斌
(南京医科大学附属常州妇幼保健院/常州市产前诊断中心,江苏常州 213003)

[摘要] **目的** 探讨对于血清学筛查临界风险的孕妇应用高通量基因测序价值。**方法** 选择 2012 年 5 月至 2015 年 5 月在常州市妇幼保健院产前诊断中心就诊的 1 066 例血清学筛查临界风险的孕妇,在知情同意的原则下抽取孕妇外周血,提取血浆中胎儿游离 DNA,制备文库,采用 Illumina NextSeq500 测序平台对其进行测序分析,对测序提示的染色体异常患者行羊膜腔穿刺,羊水细胞培养后染色体 G 显带核型分析。**结果** 1 066 例样本中,高通量基因测序提示 15 例染色体非整倍体异常,经知情同意,13 例孕妇自愿接受羊水产前诊断,其中 7 例羊水 G 带核型结果与测序结果一致,包括 4 例 21 三体,1 例 18 三体,1 例 47,XXX,1 例 47,XXY,其余 6 例 G 带核型正常。**结论** 高通量基因测序可作为血清学筛查临界风险孕妇的有效补充检测手段。

[关键词] 产前诊断;DNA;高通量测序;临界风险;无创产前筛查

[中图分类号] R175

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)27-3780-03

Application of high-throughput sequencing in pregnant women with critical risk of serological screening*

Zhou Qin, Zheng Fangxiu, Chen Yingping, Zhang Xiaoqing, Zhang Bin,
Huang Rui ping, Miao Tingting, Yuan Pei[△], Yu Bin

(Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital, the Affiliated Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital of Nanjing Medical University/Changzhou Prenatal Diagnosis Center, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical value of the application high-throughput sequencing for the detection of fetal chromosome in pregnant women with critical risk. **Methods** A total of 1 066 pregnant women with critical risk of serological screening were collected from May 2012 to May 2015 at our center. The peripheral venous blood from the pregnant women was drawn, plasma DNA was extracted, and the sequencing library was prepared. High-throughput sequencing procedure was carried out on Illumina NextSeq500 platform. The cases of sex chromosomal abnormalities were advised to accept prenatal fetal chromosomal karyotype analysis of amniotic fluid cells using G-banding technique. **Results** High-throughput sequencing revealed 15 cases of sex chromosomal aneuploidies in 1 066 pregnant women. After receiving informed consent, 13 cases of pregnant women voluntarily received amniotic fluid prenatal diagnosis, of which 7 cases were consistent with the sequencing results, including four cases of Trisomy21, one cases of Trisomy18, one cases of 47,XXX and one cases of 47,XXY, while the other six cases were confirmed to be normal karyotype. **Conclusion** High-throughput sequencing can be used as an effective method for the detection of critical pregnant women with critical risk.

[Key words] prenatal diagnosis;DNA;high-throughput sequencing;critical risk;non-invasive prenatal testing

产前筛查和诊断是减少出生缺陷有效的预防手段之一。目前,大多机构采用孕中期母体血清 AFP+βHCG 的二联产前筛查,而后对高危人群进行羊水产前诊断。国内外研究显示,这种筛查模式胎儿非整倍体染色体异常检出率仅为 60%~70%^[1-2]。国内学者提出了临界风险的概念,希望能够加强此部分孕妇的管理,减少漏诊病例的发生。

随着分子生物学技术和医学遗传学的发展,应用高通量基因测序技术检测母血中胎儿游离 DNA 进行无创产前筛查(non-invasive prenatal testing, NIPT)逐渐应用于临床。我国将临界风险孕妇作为该技术适用人群,但迄今为止尚缺少相关的临床数据。本文回顾性分析本中心接受 NIPT 检测的临界风险孕妇结果,探讨该技术用于临界风险孕妇检测胎儿染色体非整倍体的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2012 年 5 月至 2015 年 5 月,在常州市妇幼保健院因唐氏筛查临界风险就诊,经知情同意自愿选择 NIPT 的 1 066 例单胎孕妇,孕龄 16~24 周,年龄 16~40 岁。

1.2 判断标准 血清学筛查临界风险:即 $1/1\ 000 \leq 21$ 三体综合征(简称 21 三体)风险值小于 1/300, $1/1\ 000 \leq 18$ 三体综合征(简称 18 三体)风险值小于 1/350。

1.3 方法

1.3.1 孕中期血清学筛查 经末次月经或 B 超确定孕周,所有对象抽取肘静脉血 3 mL,室温静置 30 min 后离心分离血清,如在 24 h 内不能及时测定,则放置 -20℃ 冰箱内保存。采用时间分辨免疫荧光分析法(Wallac1235 全自动时间分辨荧光免疫分析仪,美国 PE 公司)检测孕妇血清 AFP 和 f-βHCG 浓度。结合孕妇年龄、孕周、体质量、有无糖尿病等因素,应用 Lifecycle 软件计算风险值,包括神经管缺陷(NTD)风险值、唐氏综合征(DS)风险值、18-三体风险值。对临界风险者及时召回进行遗传咨询^[3]。

1.3.2 无创基因检测 孕妇知情同意后,使用 Streck 公司生产的 cell-free DNA BCT 采血管抽取孕妇外周血 10 mL,室温保存,48 h 内分离血浆,4℃ 条件下 $1\ 600 \times g$ 离心 10 min,取上清液血浆 $16\ 000 \times g$ 离心 10 min,分离上清液血浆至 EP 管

中,得到至少 1.2 mL 血浆。按 Shaw 等^[4]的方法进行高通量测序检测,主要包括:提取血浆中胎儿游离 DNA,构建文库。采用 Illumina NextSeq cn500 测序平台(美国 Illumina 公司)对其进行测序,获得不低于 400 M 的有效 reads 数,平均每个样本不低于 4 M 的 reads。运行序列比对软件 BWA map 将测序所得序列比对至人类基因组参考序列图谱。使用自有软件 BGD v2.0.1 针对比对结果进行每条染色体序列个数统计。计算每条染色体 reads 所占比例(%hrN),sample 代表需检测的样品,mean%ChrNreference 和 S. D. % ChrNreference 分别代表参照样品组平均值和变异系数,并利用以下公式计算各个染色体 Z 值。利用 Z 值来评估样本的实际患病情况(cutoff:|Z|=3)。

1.3.3 羊水细胞培养和核型分析 对 NIPT 提示胎儿染色体非整倍体异常孕妇,进行产前遗传咨询,经知情同意后于孕 18~24 周在超声引导下羊膜腔穿刺术,细胞培养、制片、阅片过程均按本实验室常规操作进行^[3]。

1.4 随访 采用病例查询和电话的方式对妊娠结局进行随访,重点关注新生儿健康状况。

2 结 果

2.1 无创基因检测和羊水细胞核型分析结果 血清学筛查提示临界风险孕妇经知情同意有 1 066 例自愿接受 NIPT 进一步产前筛查,经高通量基因测序和生物信息学分析,提示有 15 例胎儿染色体非整倍体高风险,高风险率 1.41%(15/1 066),包括 4 例 21 三体,2 例 18 三体,1 例 18 单体,3 例 47,XXX,2 例 47,XXY,3 例 45,XO。NIPT 提示高风险孕妇均及时召回进一步产前遗传咨询,13 例孕妇自愿接受羊膜腔穿刺术,经羊水细胞培养 G 显带染色体核型分析,发现 7 例结果与 NIPT 结果一致,包括 4 例 21 三体,1 例 18 三体,1 例 47,XXX,1 例 47,XXY。6 例样本羊水染色体核型分析均为正常核型,即 NIPT 为假阳性。见表 1。

虽经充分产前咨询,仍有 1 例孕妇 NIPT 提示 18 单体,拒绝羊膜腔穿刺,出生后随访家属自述正常。另 1 例孕妇 NIPT 提示 18 三体,因胎儿 B 超提示胎儿多发畸形引产。

表 1 临界风险中 NIPT 高危与产前诊断结果对比

例号	NIPT 指征	NIPT 结果	羊水染色体核型结果
1	DS 1/590	47,XN,+21	47,XN,+21
2	DS 1/340	47,XN,+21	47,XN,+21
3	DS 1/550	47,XN,+21	47,XN,+21
4	DS 1/796	47,XN,+21	46,XN,rob(14;21),+21
5	Ds 1/320	47,XN,+18	B 超示胎儿多发畸形后引产
6	DS 1/440;ES 1/490	47,XN,+18	47,XN,+18
7	ES 1/520	45,XN,-18	未产前诊断,出生后随访: 外表无异常
8	DS 1/352	47,XXX	47,XXX
9	DS 1/480	47,XXX	正常
10	DS 1/489	47,XXX	正常
11	DS 1/450	47,XXY	正常
12	DS 1/320	47,XXY	47,XXY
13	DS 1/459	45,XO	正常
14	DS 1/38	45,XO	正常
15	DS 1/480	45,XO	正常

2.2 高通量基因测序应用于染色体非整倍体产前检查的准确性 1 066 例血清学产前筛查临界风险孕妇,经 NIPT 后羊水

细胞核型分析确诊 7 例胎儿染色体非整倍体异常,发生率为 0.66%(7/1 066),应用高通量基因测序技术检测染色体非整倍体异常的阳性预测值为 53.85%(7/13)。其中,21 三体及 18 三体的阳性预测值均为 100%(5/5)。性染色体异常的阳性预测值为 25.00%(2/8),性染色体异常假阳性率为 75.00%(6/8)。

3 讨 论

孕中期进行母体血清学筛查,对筛查高风险孕妇进一步产前诊断,这是目前常用的产前筛查与诊断模式。经大量临床数据证实,在出生缺陷防控方面起到巨大作用,但由于技术本身的局限性,筛查检出率有待进一步提高。同时,以羊膜腔穿刺方法获取胎儿遗传物质进行染色体核型分析是产前诊断的金标准,但该方法为有创性、费时长,对实验要求高,孕妇接受程度不高。在实际工作中,回顾性分析本中心的假阴性病例,发现绝大多数漏诊病例均为临界风险孕妇。国内其他研究也显示,临界风险孕妇存在相当比例的漏诊可能,包括风险值临界风险和单纯 MoM 值异常^[5]。因此,如果能够进一步加强临界风险孕妇的管理,将有效提高产前筛查的效能,提高出生人口素质。然而,是否需要将临界风险孕妇全部纳入羊水产前诊断值得进一步商榷。

近年来,随着分子生物学的发展,高通量基因测序产前筛查项目逐步应用于临床,国内外诸多报道均已证实,NIPT 对 T21、T18 和 T13 的高敏感度、特异度、阳性预测值及正确率,与染色体核型分析技术有较高的一致性,并有无创性、高准确性和高通量等优势^[6-10]。此方法的漏诊率较低,并且具有非介入性的优势,可作为介入性产前诊断资源不足情况下的一种有效补充。为了进一步提高筛查效率,国内专家特别将临界风险孕妇作为该技术适用人群,希望通过“高级”筛查技术减少漏诊的发生。与此同时,国际产前诊断协会 2015 年更新了 NIPT 专家共识,提出 NIPT 可以用于中风险人群,以减少漏诊的发生^[11]。为进一步探讨该技术用于临界风险孕妇胎儿染色体非整倍体检测的应用价值,本文回顾性分析了本中心接受 NIPT 检测的临界风险孕妇结果。

本研究中,1 066 例临界风险样本中,NIPT 提示 15 例染色体非整倍体异常,除 1 例孕妇拒绝做羊膜腔穿刺,1 例孕妇因胎儿超声示多发畸形引产,13 例样本经染色体核型分析验证,7 例与测序结果一致,其余 6 例为正常核型。应用高通量基因测序技术检测染色体非整倍体异常的阳性预测值为 53.85%(7/13)。其中,21 三体及 18 三体的阳性预测值均为 100%(5/5),性染色体异常的阳性预测值为 25.00%(2/8)。可见使用高通量测序作为无创产前检测技术对 21 三体及 18 三体的准确率较高,而对于性染色体异常的准确性相对较低,可能与该技术本身存在一定的技术劣势有关^[12]。其数据分析部分对算法的依赖太大,给出的是一个统计分析的结果,故不能排除小概率事件的发生。上述结果由于样本例数偏少,有待进一步积累病例资料研究分析。

本研究中出现 6 例假阳性,NIPT 均提示性染色体高风险,可能与母体因素、胎盘滋养层细胞、性染色体互换等因素有关。而随访过程中,6 例孕妇均拒绝做进一步检测,故无法得知假阳性产生的确切原因。另外本研究中 1 例 NIPT 提示 18 三体的孕妇因胎儿 B 超提示胎儿多发畸形直接引产。据研究报告,超过 90% 的 18 三体胎儿中晚期可发现超声影像改变,故推测该例样本进行羊水诊断证实为 18 三体的可能性大^[13]。另 1 例 NIPT 提示 18 单体的孕妇拒绝羊水穿刺,出生后随访,家属自述正常,但未做外周血染色体诊断,无法确诊。

目前本单位获得了国家高通量基因测序 NIPT 临床试点资质, 将加大该技术的规范应用, 同时也会加强临床应用的研究, 以得出更科学的临床数据。

综上所述, 本研究中有 7 例孕妇因唐氏筛查检测结果为临界中风险进而选择 NIPT, 最终确诊胎儿为染色体数目异常。此类孕妇若按之前的产前诊断指导方案极有可能漏诊, 若等患儿出生时才发现异常, 不仅会给这些家庭带来巨大的精神和经济压力, 更会给社会造成巨大的负担。因此, 本课题组认为, NIPT 可做为唐氏筛查临界风险孕妇的有效补充检测手段。

参考文献

- [1] Weisz B, Pandya P, Chitty L, et al. Practical issues drawn from the implementation of the integrated test for Down syndrome screening into routine clinical practice [J]. *BJOG*, 2007, 114(4): 493-497.
- [2] 边旭明, 戚庆炜. 染色体异常产前筛查和诊断工作任重而道远[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2010, 26(12): 889-891.
- [3] 张晓青, 韩小亚, 孙达成, 等. 常州地区 2005~2009 年孕中期产前筛查结果分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(10): 1258-1260, 1263.
- [4] Shaw SW, Hsiao CH, Chen CY, et al. Noninvasive prenatal testing for whole fetal chromosomal aneuploidies: a multicenter prospective cohort trial in Taiwan[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2014, 35(1): 13-17.
- [5] 王挺, 文萍, 李琼, 等. 产前血清学筛查 MoM 低值和临界风险在染色体异常诊断中的应用[J]. *江苏医药*, 2013, 39(16): 1942-1944.
- [6] 向萍霞, 刘翎, 冷培, 等. 游离胎儿 DNA 高通量基因测序

技术在产前筛查的临床应用[J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(10): 777-780.

- [7] 马京梅, 潘虹, 付杰, 等. 高危孕妇外周血胎儿游离核酸无创性产前检测的前瞻性研究[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(11): 849-852.
- [8] Gil MM, Quezada MS, Revello R, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(3): 249-266.
- [9] Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(17): 1589-1597.
- [10] Zhang H, Gao Y, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146, 958 pregnancies [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(5): 530-538.
- [11] Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(8): 725-734.
- [12] Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening [J]. *New Eng J Med*, 2014, 370: 799-808.
- [13] 许争峰, 徐倩君, 曹荔, 等. 中晚孕期 18 三体综合征胎儿的超声特征[J]. *现代妇产科进展*, 2008, 17(9): 647-650.

(收稿日期: 2016-02-22 修回日期: 2016-04-26)

(上接第 3779 页)

胞 α -SMA 的表型获得与转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 密切相关, TGF- β 1 能下调纤维细胞 CD34 的表达, 促进 α -SMA 的表达, 诱导 CD34 细胞凋亡可能是其机制之一, 而 TGF- β 1 是可以由肿瘤细胞和癌旁纤维母细胞大量分泌的^[7-9]。

肿瘤的发生机制目前尚不完全清楚, 普遍认为, 在癌变过程中上皮细胞的基因突变是主动的, 间质反应只是被动地做出应答。以往有研究将已经发生了癌前病变的口腔上皮组织去掉, 将其黏膜下层结缔组织与正常的口腔上皮组织贴合后发现, 正常的口腔上皮会发生异型性改变, 可见间质成纤维细胞在肿瘤的发生中扮演的不仅是被动的角色, 本研究中间质成纤维细胞在癌前病变时即可发生活化的现象也恰恰证实了这一观点。由此可见食管癌变进程中中间质成纤维细胞的表型变化具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment [J]. *Trends Genet*, 2009, 25(1): 30-38.
- [2] 王瑞芬, 黄坊, 孙和国, 等. α -SMA 和 MMP-9 在乳腺癌中的表达及意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2013, 20(2): 91-93, 96.
- [3] 李青, 纪捷, 张静敏, 等. 宫颈鳞状上皮内瘤变及鳞状细胞癌中间质细胞 CD34、 α -SMA 的表达及意义[J]. *临床与*

实验病理学杂志, 2007, 23(6): 669-672.

- [4] 王瑞芬, 王正彩, 王健, 等. 胃癌间质中肿瘤相关纤维母细胞 CD34 和 SMA 的表达及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2007, 23(4): 412-415.
- [5] Catalano V, Turdo A, Di Franco S, et al. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(6B): 522-532.
- [6] Xue Z, Wu X, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells promote epithelial to mesenchymal transition and metastasis in gastric cancer through paracrine cues and close physical contact [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(4): 618-627.
- [7] 肖光, 熊小亮, 罗达亚, 等. 非小细胞肺癌中 TGF- β 1 与肿瘤相关纤维母细胞 α -SMA 及 CD34 表达的相关性和意义[J]. *广东医学*, 2011, 32(14): 1866-1869.
- [8] 莫立根, 罗元, 党阳, 等. TGF- β 1、CD34 和 α -SMA 在鼻咽癌中的表达及其意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(2): 185-188.
- [9] 王立峰, 王瑞芬, 郝兆星, 等. 胃癌中肿瘤相关纤维母细胞蛋白表达改变及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(20): 2263-2267.
- [10] 崔晓梅, 章魁华. 癌前病变结缔组织对正常粘膜上皮的作用[J]. *中华口腔医学杂志*, 1992, 27(5): 266-269.

(收稿日期: 2016-03-11 修回日期: 2016-05-26)