



评述

21-三体综合征产前筛查及诊断技术的研究进展

王坦¹, 蔺春茂², 尹焕才³, 殷建^{3*}

1. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250000;

2. 济南国科医工科技发展有限公司, 济南 250101;

3. 中国科学院苏州生物医药工程技术研究所, 苏州 215000

* 联系人, E-mail: yinjc@sibet.ac.cn

收稿日期: 2023-11-14; 接受日期: 2024-01-11; 网络版发表日期: 2024-06-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 22176208)和苏州市基础研究试点项目(批准号: SJC2021018)资助

摘要 21-三体综合征(Down syndrome, DS)是目前最为常见的染色体异常疾病,是胎儿流产、畸形、发育异常及夭折的主要原因之一。由于目前尚无有效治疗手段,仅可通过引流终止妊娠,因此提前检测至关重要。研究者已开发出多种产前筛查与诊断技术,并将其中部分推广为临床诊断中的必备方案,但其灵敏度、准确度及成本仍需进一步优化。与此同时,深入探索21-三体综合征发病机制与分子生物学特征,建立无创、高灵敏、高准确性的检测方案,并确定其适用孕期,应成为21-三体综合征产前筛查与诊断技术发展的未来方向。

关键词 21-三体综合征, 染色体异常, 产前筛查, 产前诊断, 检测技术

21-三体综合征, 又称唐氏综合征(Down syndrome, DS), 是21号染色体异常导致的疾病, 也是临床上最常见的出生缺陷疾病之一。根据其发生机制不同, DS可分为三类: 标准型、易位型及嵌合型。其中, 标准型最为常见, 该类型患儿体细胞中的染色体数为47条, 比正常人多一条21号染色体; 易位型21-三体患儿约占DS患儿总数的2.5%~5%, 其体细胞中染色体总数为46条, 但是21号染色体长臂与一条近端着丝粒染色体长臂形成易位, 称罗伯逊易位, 也称着丝粒融合; 嵌合型是指唐氏患者体内同时存在正常细胞和21-三体细胞, 临床表现与三体细胞所占比例有关, 所占比例越高, 患者临床表现越突出^[1]。据调查显示, DS发病率约为1/800~1/600^[2], 且该几率随产妇年龄升高而增大, 40

岁怀孕的女性怀有DS胎儿的概率已达到1%。

DS患儿普遍身体畸形、发育缓慢、智力不全、极易发生夭折, 且临床上尚无针对DS的有效治疗方法, 患儿一旦出生, 必然给家庭及社会带来沉重的心理和经济负担。因此, 在女性妊娠期间进行精准的产前筛查与产前诊断, 进而判断是否需通过人工终止妊娠的方式避免三体胎儿的出生, 就显得尤为重要。为此, 研究者不断努力, 探索DS胎儿相关血液学及分子生物学指标, 并据此开发出一系列产前筛查及产前诊断的方法。

1 产前筛查

产前筛查是指通过一系列的非侵入性检查方法,

引用格式: 王坦, 蔺春茂, 尹焕才, 等. 21-三体综合征产前筛查及诊断技术的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1173–1182

Wang T, Lin C M, Yin H C, et al. Current progress in the detection technologies for prenatal screening and diagnosis of trisomy 21 (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1173–1182, doi: 10.1360/SSV-2023-0262

对孕妇是否怀有DS胎儿的可能性进行初步的风险评估,以决定是否需要进一步进行产前诊断.常见的产前筛查方法包括血清学筛查、超声软指标筛查和无创DNA筛查(表1).因其可避免非必要羊水穿刺造成的孕妇损伤,是目前临床上应用最为广泛的检测技术.

1.1 血清学筛查

血清学筛查是DS最常见的筛查方式,通过在妊娠中期,采集孕妇空腹外周血,测定其中的特定生化指标含量,并结合孕妇的年龄、体重及胎次给出风险判断.经过长期探索,妊娠相关血浆蛋白(pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、游离-β亚基-促绒毛膜性腺激素(free human chorionic gonadotropin, free β-HCG)、游离雌三醇(unconjugated estriol, uE3)、抑制素-A(Inhibin A, Inh A)、解整合素-金属蛋白酶12(a dis-integrin and metalloprotease 12, ADAM12)及胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)等被发现可作为DS风险的标志物.临床上往往对这些指标进行组合检测,以实现更准确的风险预测.目前临床上常用的检测方法包括早期二联筛查、中期三联筛查及四联筛查等,且由于指标特性不同,适用的筛查时间也有所不同(表2).

妊娠早期二联筛查的指标为PAPP-A和free β-HCG,一般在妊娠10~14周进行.妊娠相关血浆蛋白(PAPP-A)是一种大分子糖蛋白,由胎盘和蜕膜合成和分泌.妊娠早期,蜕膜能够分泌大量PAPP-A并释放至

血液中,使其血含量升高,若胎儿染色体核型异常,胎盘生长受抑,则导致血清中PAPP-A水平降低^[3].HCG属于胎盘合体滋养层细胞后产生的糖蛋白激素,其包含α,β两个亚基,在受精后母血中free β-HCG的浓度迅速增加,然后缓慢降低,最终在第20周左右趋于稳定^[4].DS患儿由于胚胎发育异常,导致胚胎产生的free β-HCG含量与正常胎儿相比明显增加.当前,医疗机构多采用化学发光技术检测PAPP-A和free β-HCG含量,并结合孕妇年龄、妊娠周期及体重等因素进行风险判断^[5].在妊娠早期单独进行二联筛查检出率约为60%,且假阳性率较高,存在漏诊及误诊的情况.

三联筛查是孕中期的主流筛查,常在妊娠15~22周进行,除free β-HCG外,增加AFP和uE3. AFP主要来源于肝脏和卵黄囊,其在孕妇血清中的含量在14~20周呈线性上升,在20周后缓慢下降.研究发现,当DS发生时,胎儿发育不成熟可能导致AFP低于正常值,但具体原因尚不明确^[6].近期研究发现,AFP的变异体,AFP-L2和AFP-L3也可作为检测标志物,利用AFP-L2, AFP-L3结合free β-HCG对DS进行筛查,其结果比现有的二联筛查更加准确且检出率更高^[7]. uE3是一种来自胎盘的类固醇激素,其含量随着妊娠周期不断增长.由于DS胎儿发育迟缓,导致uE3合成受到抑制.因此,与正常孕妇相比,怀有DS胎儿的孕妇血清中uE3含量较低.沙德顺等人^[8]研究显示三联筛查对DS的检出率为70%~78%,假阳性率为5%.

Inh A主要由胎盘和黄体分泌,是一种常见的异二聚体糖蛋白,对妊娠期母体内分泌的调节具有重要

表 1 当前临床上常用的产前筛查技术

Table 1 Prenatal screening techniques commonly used in clinical practice

项目	检测时间 (周)	检出率 (%)	假阳性率 (%)	相关指标	适用人群	优势	局限性
血清学筛查	9~22	60~90	5~10	甲胎蛋白、游离-β亚基-促绒毛膜性腺激素、游离雌三醇、血清相关妊娠蛋白、抑制素A等	所有孕妇	成本低,无创伤	假阳性率高,影响风险评估的因素多,质控空难
超声筛查	11~14	70~80	5	颈部的透明层厚度、鼻骨、脏器	所有孕妇	安全无创,实时观察胎儿各部位,脏器的形态	设备要求、医生诊断水平有较高要求
无创DNA检测	12~22	99	0.1~0.3	无创DNA检测技术的检测线、阈值线	适用绝大部分孕妇,多胎妊娠、有基因遗传病家族史、接受移植手术、干细胞治疗等孕妇不建议	安全无创,准确率高	结构异常无法检出

表 2 当前临床上常用的血清学筛查技术

Table 2 Serological screening techniques commonly used in clinical practice

血清学筛查方式	检测时间(周)	相关指标	检出率(%)
二联筛查	10~14	妊娠相关血浆蛋白、游离-β亚基-促绒毛膜性腺激素	60
三联筛查	15~22	甲胎蛋白、游离-β亚基-促绒毛膜性腺激素、游离雌三醇	70~80
四联筛查	15~22	甲胎蛋白、游离-β亚基-促绒毛膜性腺激素、游离雌三醇、抑制素-A	80~90
其他联合筛查	9~13	妊娠相关血浆蛋白、解整合素-金属蛋白酶12或妊娠相关血浆蛋白、解整合素-金属蛋白酶12、胎盘生长因子	90

作用, 在产前筛查中, 怀有DS胎儿的母体血清中, 抑制素-A水平明显升高. 有研究表明, Inh A相对独立, 不受其他血清筛查标志物影响^[9]. 单独使用此项标志物来筛查DS, 检出率可达62%, 在妊娠中期(15~22周)联合三联筛查的指标, 即四联筛查可将检测率提高10%, 且假阳性率不增加^[10]. 然而, 四联筛查的检测项目较多且费用较高, 目前尚未真正普及.

ADAM12也是高效的产前筛查血清标志物, 它是一种多结构域的蛋白酶, 属于细胞膜结合糖蛋白家族成员, 且只能在妊娠期的妇女血中检出. ADAM12具有两种亚型结构, 一种膜结合性ADAM12-L(长链), 它具备较为完整的ADAM家族结构; 另一种则是分泌性ADAM12-S(短链), 缺乏膜结合构域和细胞质结构域. 研究发现, 在妊娠早期(≤10周), ADAM12-S的浓度伴随着妊娠周期而升高. 三体孕妇的绒毛组织可能发育不良, 造成滋养层细胞对于ADAM12-S的分泌减少, 继而导致ADAM12-S含量低于正常孕妇^[11]. Laigaard等人^[12]利用ADAM12与PAPP-A筛查DS, 检出率高达91%, 在此基础上, 再联合free β-HCG和颈项透明层厚度(nuchal translucency, NT), 检出率进一步提高, 达到97%, 假阳性率为5%. 叶波等人^[13]将ADAM12, PAPP-A与三联筛查相结合, 检出率可达到94.29%, 高于传统的三联筛查, 且假阳性率也仅为1.17%.

PLGF属血管内皮生长因子家族成员之一, 可调控血管生成, 助于母体螺旋动脉的滋养细胞发育^[14]. 在正常孕妇的血清和胎盘中表达水平较高, 但在未妊娠女性和男性血清中难以检测出^[15]. 研究表明, 在妊娠早期, 胎盘发育尚不成熟处于缺氧状态, PLGF水平较低, 而在妊娠中期, 随着胎盘绒毛间隙的血流增加, 母体血容量的增加, PLGF也随之增加^[16]. 张星磊等人^[17]发现, 在妊娠早期, PLGF的表达在DS高危孕妇和正常孕妇中存在明显差异, 但AFP, PAPP-A水平未见明显

差异, 这表明在妊娠早期, PLGF可能成为DS早期筛查的有效指标. 利用PLGF独立筛查DS, 其检出能力有限, 但将其与PAPP-A, free β-HCG的指标相联合, 检出率可达88%, 假阳性率低至2.6%^[18]. 韩毓等人^[19]将PLGF, ADAM12, PAPP-A作为妊娠早期筛查DS的指标, 得到三项指标的临床临界值, 为临床研究提供借鉴.

1.2 超声软指标筛查

DS患儿的心脏、头、面部等特征在形态和结构上与正常胎儿存在差异, 在超声筛查中部分软指标呈现异常, 因此超声软指标对DS的筛查有重要价值. 常用于DS筛查的软指标包括NT和鼻骨. NT是指胎儿颈椎水平矢状切面皮肤至皮下软组织之间的厚度. 妊娠第10~14周, 胎儿颈部淋巴管与颈静脉窦之间出现短暂回流障碍, 存在少量淋巴液, 超声检测表现为透明层. 14周后, 正常胎儿的左右淋巴管与颈静脉窦相通, 透明层变薄, 而DS胎儿颈部淋巴液仍会聚集, 导致NT增厚^[20]. 在妊娠第15周时, DS患儿的NT厚度超过3 mm, 而正常胎儿的NT厚度小于2.5 mm.

DS患儿的鼻骨与染色体异常存在密切关系, 在鼻骨缺失或发育异常的胎儿中, DS的检出率明显高于正常胎儿, 可达89.6%^[21]. Sun等人^[22]利用超声测量胎儿的面部特征, 计算胎儿的鼻前厚度和鼻骨长度以及额颌面角和额鼻面角等角度, 从而预测胎儿患病概率, 预测准确率达92.2%. 此外, 有研究人员对比正常胎儿和DS胎儿的“脑角”, 发现当“脑角”大于94°时, DS的发生率达到97.8%^[23], 并提出其可作为DS筛查的潜在指标.

1.3 整合筛查

SURUSS的研究结果表明, 将超声筛查和血清学筛查结合使用, 能在提高DS检出率的同时降低假阳性率^[24]. 周妍等人^[25]通过超声检测NT和鼻骨长度, 并联合

合 β -HCG和抑制素-A, 对DS的筛查特异性为91.1%, 灵敏度为85%; 张利等人^[26]利用超声NT联合血清标志物uE3和Inh A对DS进行筛查, 其特异性及灵敏度为100%和90%, 显著高于单项检测. Sablok等人^[27]发现, 采用超声结合四联筛查可以达到和染色体核型分析近似的结果, 从而避免了不必要的羊膜穿刺. 整合检测相较于单项检测, 误诊率明显降低, 能同时有效避免DS胎儿的出生, 对于未来DS筛查技术的发展具有重要意义.

1.4 产前无创筛查

1997年, 卢煜明教授团队^[28]发现母体血浆中存在胎儿游离DNA(cell-free fetal DNA, cfDNA). cfDNA来源于凋亡的滋养层细胞^[29], 其浓度和孕周密切相关并以一定比例(3%~13%)稳定存在于母体外周血中, 且随孕妇分娩而快速消失. 这一发现极大地推动基于胎儿游离DNA筛查DS技术的发展.

(1) 测序技术. DS患儿与正常胎儿相比, 21号染色体上的基因丰度更高. 研究者可利用DNA测序技术对胎儿游离DNA片段进行检测, 将测序结果进行生物信息分析, 获得胎儿21号染色体基因的相对丰度, 从而判断其是否为DS胎儿. Qi等人^[30]利用NGS对2267名孕妇展开DS筛查, 确定出10例高危DS, 且该结果与核型分析结果完全一致. Fu等人^[31]通过NGS筛查DS, 其结果显示, NGS技术筛查DS的敏感性和特异性均为100%, 同时其结果表明20岁以下的孕妇也可能是DS的高发群体. Palomaki等人^[32]研究发现, NGS筛查DS能够使羊水穿刺及胎儿流产率降低95%. 毛国华等人^[33]对近三年新疆地区无创筛查的结果进行分析, 发现其对阴性样本的筛查率为100%, 阳性样本的筛查率则为91.14%, 显著高于血清学10.19%的阳性筛查率.

由于预测精准, 基于二代测序的无创产前诊断技术(non invasive prenatal testing, NIPT)已在临床上获得推广应用, 并成为35岁以上高风险产妇的常规检查项目. 但需要注意的是, 受NGS自身技术的限制, NIPT仍存在一些不足. 首先NIPT成功与否取决于胎儿DNA含量(fetal fraction, FF). 有研究表明, NIPT的FF最低检测限为4%^[34], 较低的FF值则易导致假阴性结果的出现. 由于在妊娠第5周即可在母体外周血中检测到cfDNA, 且其含量随着胎龄而稳定增加, 第10周可达10%, 因此NIPT的检测时间一般要求为10~16周. 与此同时, FF还被发现受到一系列母体、胎儿、实验及其

他多种因素影响, 导致其结果发生偏差.

(i) 就母体因素而言, 母体体重是影响FF的重要因素, 母体体重过大, 可造成脂肪细胞的炎症和坏死, 母体游离DNA含量增加, 导致FF降低. 与此同时, 母体的受精方式也影响FF, 体外受精的FF低于自然受精. 孕妇在妊娠期间服用低分子肝素或依诺肝素这类药物, 也会导致母体细胞凋亡, 进而降低FF比例^[35]. 此外, 母体存在一定比例的染色体嵌合, 会增大相应染色体来源的游离DNA比例, 影响血浆中真实胎儿DNA含量占比, 从而造成与核型分析不一样的结果.

(ii) 就胎儿因素而言, 双胎妊娠中FF较单胎妊娠高, 且每个胎儿的FF并不均等, 其含量相差甚至可达2倍^[36]. 在性别上, 女性胎儿的FF普遍比男性胎儿高; 更重要的是, 部分胎儿存在胎盘嵌合现象, 即胎盘内同时存在多种细胞系, 造成胎儿有效DNA含量降低, 不能真实反映胎儿自身DNA情况: 当细胞滋养层中存在异常细胞系而羊水结果为正常核型时, 导致测序结果为假阳性, 当滋养层细胞正常而羊水结果异常, 则为假阴性^[37].

(iii) 实验因素主要涉及样本的采集、运输、储存过程. 这些过程中若操作不慎, 会造成母体细胞破裂, 释放出母体游离DNA, 同样可导致FF降低.

此外, 在NGS文库构建时, PCR扩增会导致产生重复序列; 当目标片段GC含量过高($\geq 65\%$)或过低($\leq 40\%$)时, 均会显著降低测序深度^[38]; 此外, NGS检测出某些异常染色体片段, 但在临床上并未显示相关性, 这反而干扰分析人员的判断; 更重要的是, NGS较高的检测成本(1000元以上)和长周期(2周)加重产妇家庭的负担. 因此进一步降低检测成本及提高效率依然是产前诊断技术发展的亟需方向.

(2) 聚合酶链式反应. 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是一项成熟的分子生物学检测技术, 因其成本适当, 检测灵敏度高, 也被尝试用于21-三体检测中. 研究人员通常利用Q-PCR对21号染色体上特定区域上的基因进行扩增, 同时监测所产生的荧光信号, 通过与标准曲线对比, 计算出目标基因的表达量, 从而确定DS与否. Zhang等人^[39]选择母体和胎儿的差异性甲基化位点HLCS与RASSF1A, 利用甲基化敏感限制性内切酶清除低甲基化的母体基因, 通过Q-PCR技术测定甲基化比值, 从而评估胎儿21号染色体的相对丰度, 判断其是否为DS患儿. 也有研究者从

Q-PCR的扩增曲线和熔解曲线进行分析, 通过设计PNA探针与目标染色体和参考染色体的不同片段进行杂交, 分析扩增曲线和熔解曲线, 并计算两者的高度比, 从而判断是否为整倍体, 结果显示, 这种检测方法的灵敏度和特异性均为100%^[40]. 但是Q-PCR检验重复性差, 每次实验Ct结果变化范围较大, 存在假阴性的可能, 对于嵌合体型难以做出准确诊断.

数字PCR是对Q-PCR的进一步改进和提升, 并将分子检测的相对定量发展为绝对定量. 该技术将模板分散至几万个油包水微滴中, 使每个微滴中仅包含单拷贝模板, 通过独立扩增, 将弱信号从背景信号中分离出来, 从而实现了对目的基因的绝对定量. Jean-Michel Dupont等人^[41]排除多重探针之间的干扰, 证实多重数字PCR检测DS的可能性, 发现该方法的特异性为98%, 敏感性为94%. 在此基础上, Tan等人^[42]设计20对探针, 结合数字PCR来检测DS, 发现以18号染色体作为参照染色体, 其检测准确度达95%; 更有研究人员利用21号、18号及13号染色体互为目标染色体和参考染色体, 构建多重数字PCR检测技术, 可同时反映3种染色体疾病, 其灵敏度和特异性均显著优于血清学筛查^[43]. 与此同时, 研究者也在致力于数字PCR技术的优化, 新开发出的UltraPCR(Ultra polymerase chain reaction)技术可通过离心将混合物甩至PCR管进行扩增, 生成超过300万个孔室, 进一步提升的微滴数可确保模板DNA的充分分散, 提高分子检测灵敏度. 研究者利用该技术对DS进行检测, 敏感性及准确性都达到100%, 且胎儿DNA含量的检测限降至为2%, 低于目前测序的最低标准4%^[44]. 但是, 数字PCR仪器昂贵, 试剂通用性差, 限制其广泛应用, 此外较高的假阳性也是数字PCR进入临床应用的主要障碍. 有鉴于此, 已有研究者将商用PCR芯片等与自主设计的荧光检测系统相结合, 研发出价格更低且应用范围更广的数字PCR系统^[45], 但其在DS筛查中的应用仍有待于开发.

2 产前诊断

产前诊断是在筛查结果显示可能存在异常风险后, 通过侵入性手段对胎儿进行详细的检测, 以明确是否患有DS. 产前诊断能提供准确可靠的结果, 但也伴随一定的风险, 即有0.5%~1%的几率会造成孕妇流产, 并导致孕妇痛苦^[46]. 一般而言, 医务人员会根据孕妇

的妊娠周期选择合适的穿刺方式获取胎儿样本, 如绒毛活检、羊水穿刺和脐带穿刺(表3). 并在获得样本后, 通过核型分析、荧光原位杂交技术或染色体微阵列技术进行检测分析.

2.1 核型分析

染色体核型分析是当前DS诊断的“金标准”及最终方案. 孕妇经产前筛查被认定高风险后, 临床医生会采取该方法进行进一步确认. 具体过程为: 医生经穿刺手术获得羊水细胞后, 培养至有丝分裂中期, 此时染色体的数目和形态最易辨认. 利用秋水仙素使细胞停止分裂, 并对细胞进行染色, 令染色体呈现特定的条纹形态, 然后在显微镜下观察染色体的数目及形态结构. 核型分析能够检测整个染色体组的异常, 直观地反映染色体的数量与结构, 为临床诊断DS提供重要依据. 然而核型分析的分辨率较低, 通常只能检测到大于5 Mb的染色体片段^[47], 不能够观测到微重复或微缺失的异常. 与此同时, 核型分析检测过程耗时较长, 给孕妇造成压力, 且细胞培养以及镜下观察对操作者技术水平均有较高的要求(表4).

2.2 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术是以DNA探针与目标序列互补配对为原理, 结合荧光标记进行21-三体诊断的一种方法. 研究者首先对样本细胞固定脱水, 保持细胞的形态结构, 将荧光标记的DNA探针溶液加入至样本中, 给予较高的温度, 促进探针与目标序列互补配对, 然后洗去未发生杂交的探针及其他杂质, 减少背景干扰, 在杂交和洗涤完成后, 使用染色剂对细胞核进行染色, 然后在荧光显微镜下捕捉荧光信号. 通常21号染色体的特异性DNA探针用绿色荧光染料标记, 参考染色体的特异性探针标记为红色, 在正常二倍体中, 可观测到两个绿色和两个红色信号, 而DS患者中可观测到三个绿色信号和两个红色信号. FISH技术省去细胞培养的过程, 整个检测过程可在数小时内完成, 并且该方法能够分辨 ≥ 300 kb的染色体异常片段^[48]. 因此, 英国临床细胞遗传协会已将FISH技术作为产前诊断的推荐方法^[49]. 但需要注意的是, 针对DS检测的FISH探针种类有限, 只能检测特定的序列. 与此同时, 该技术仅能反映染色体数目, 对染色体结构异常则无法判断^[50].

表 3 当前临床上常用的3种穿刺技术

Table 3 Three puncture techniques commonly used in clinical practice

穿刺方式	穿刺窗口期(周)	抽取量	胎儿丢失率(%)	影响胎儿丢失的危险因素	术后可能的并发症	适宜人群
绒毛穿刺	妊娠早期(10~13)	绒毛≥5 mg	0.2~2	妊娠周期不足	阴道出血、绒毛膜羊膜炎	曾生育过染色体异常患儿 早期血清学指标(甲胎蛋白)明显高于正常妊娠者
羊水穿刺	妊娠中期(16~24)	羊水15~30 mL	0.1~1	子宫肌瘤、孕妇BMI>40、阴道炎	宫内感染、羊水渗漏、胎儿马蹄足	35岁以上高龄孕妇 DS筛查高危孕妇 夫妻中有一位染色体异常 孕妇有过特殊生育史或血清异常 女性是性连锁遗传疾病携带者
脐血穿刺	妊娠中晚期(20~38)	脐血2~4 mL	1~2	操作者经验	脐带出血、胎儿心动过缓	怀疑胎儿畸形、贫血、 先天性血小板缺失 错过绒毛穿刺和羊水穿刺的时间

表 4 产前诊断技术比较

Table 4 Comparison of prenatal diagnostic techniques

项目	分辨率	优势	局限性
染色体核型分析	5~10 Mb	直观反映染色体数量、结构特点	分辨率有限, 检测周期长, 对操作人员要求高
FISH	100~200 kb	无需细胞培养, 结果快速	受限于探针数量, 仅限于检测特定的染色体异常
CMA	10~100 kb	可检测微重复、微缺失, 结果准确, 高通量	无法检出平衡性结构变异, 费用较高
OGM	0.5 kb	分辨率高, 基因组的结构变异可全面检测	无法检出染色质区域的结构, 如: 罗氏易位

2.3 染色体微阵列分析

染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)包括比较基因组杂交微阵列(array comparative genomic hybridization, aCGH)和单核苷酸多态性微阵列(single nucleotide polymorphism array, SNP array), 其主要在全基因组层面上进行分析, 并能够检测出染色体的微重复和微缺失。aCGH将待检测的DNA样本与参考样本进行染色处理, 一般待检DNA为绿色, 参考DNA为红色, 混合后与固定在芯片上的探针进行杂交, 洗涤去未结合的DNA, 扫描芯片上的荧光信号, 对比荧光强度, 若绿色荧光信号更强, 则代表该区域拷贝数重复, 若是红色信号更强, 对应区域则拷贝数缺失。aCGH通量高, 能够分析整个基因组的表达情况, 但是该技术无法检测出平衡易位。SNP array与aCGH不同之处在于固定在芯片上的探针使用的是短序列核酸组成的单核苷酸探针, 长度为25~60 bp, 因此可以检测到基因组中单个碱基的变化且分辨率更高, 并可同时分析多个SNP位点。吴箐等人^[51]利用SNP array 技术对二胎高龄孕妇进行产前诊断, 阳性检出率为

39.4%, 显著高于核型分析结果。CMA作为新兴的产前诊断技术, 通量高且分辨率准确, 可为产前诊断提供可靠帮助, 2016年, 在美国母胎医学大会上, 有专家建议超声检测中发现的有重大结构异常的胎儿, 可将染色体微阵列分析作为遗传分析的第一环节^[52]。但是CMA较为依赖参考基因组, 若是待测基因组与参考基因组存在显著差异, 则会导致错误结果。此外, 与其他基因组分析技术相比, CMA技术成本更高。

2.4 光学基因组图谱技术

近年来, 光学图谱技术(optical genome mapping, OGM)发展起来, 并被发现在DS诊断中具有显著的优势。该技术通过提取细胞内的长链染色体DNA, 并对特定重复序列进行荧光标记。DNA样品注入芯片后, 芯片的纳米孔通道将DNA分子拉直, 每个DNA分子被线性化展开, 进行超长单分子高分辨率荧光成像, 最终再将得到的目的基因图谱与参照基因图谱比较, 获得其中的倍体差异及易位突变等信息^[53]。代鹏等人^[54]对比染色体核型分析、FISH及OGM技术的检测结果, 发现OGM与染色体核型分析、FISH检测的结果基本相

同. 且相对于后两者仅反映5~10 Mb的结构变异, OGM可检测到30 kb的变化, 极大程度上提高异变检测的精度. 尽管如此, OGM技术的应用仍以科研为主, 实际临床应用仍需进一步提升其稳定性及操作简便性.

3 总结与展望

随着晚婚晚育的盛行, 我国不良妊娠的发生率居高不下, DS检测已成为产前筛查与诊断的关键环节. 尽管国内外DS筛查和诊断的技术发展迅速, 但仍有其局限性. 就筛查技术而言, 血清学筛查假阳性率较高;

超声技术仅可提供间接结果; 基于测序的产前无创筛查技术特异性及灵敏度优异, 但是费用高且对实验人员具有一定技术要求. 对于诊断技术而言, 核型分析目前被认为是临床诊断的“金标准”, 但该方法对孕妇造成不可避免的创伤. 伴随着生物技术的进步及精准医疗的发展, OGM技术帮助人们更好理解和研究基因组结构, 在揭示结构变异方面具有重要意义, 但其临床应用仍有待进一步探索. 未来, 深入探索DS发生机制及分子生物学特征, 建立高灵敏、高准确及无创的组合检测技术, 并确定其适用孕期, 应成为DS产前筛查与诊断技术的重要发展方向.

参考文献

- Wang Y F. Research on prenatal screening and diagnosis technology of Down syndrome (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Xiamen: Xiamen University, 2020 [王亚芳. 唐氏综合征产前筛查与诊断技术的研究. 硕士学位论文. 厦门: 厦门大学, 2020]
- Qi Q W, Sun N Y. Introduction to prenatal Down syndrome screening (in Chinese). Practical J Obstetrics Gynecol, 2008, 1: 4–7 [戚庆伟, 孙念怙. 产前唐氏综合征筛查概论. 实用妇产科杂志, 2008, 1: 4–7]
- Zhou J H, Liu L Y. Application value of serum indexes CA125 and PAPP-A combined with Doppler ultrasound in the screening of placental abruption (in Chinese). Chin J Sexual Sci, 2020, 29: 66–69 [周金华, 刘兰云. 血清指标CA125和PAPP-A联合多普勒超声在胎盘早剥筛查中的应用价值. 中国性科学, 2020, 29: 66–69]
- Xing Y Y, Dai T Y, Yang X Y, et al. Research progress on prenatal screening and diagnosis of Down syndrome (in Chinese). Chin J Reprod Health, 2022, 33: 499–502 [邢祎祎, 代天怡, 杨晓月, 等. 唐氏综合征产前筛查及诊断研究进展. 中国生育健康杂志, 2022, 33: 499–502]
- Jia X Y, Zhang X, Jia C W. Research progress of non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 21 (in Chinese). Diagnostics Theory Pract, 2013, 12: 474–477 [贾兴元, 张学, 贾婵维. 无创产前检测胎儿21-三体的研究进展. 诊断学理论与实践, 2013, 12: 474–477]
- Penrose L S. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. J Genet, 2009, 88: 9–14
- Chen Y, Chen Y, Ning W, et al. Diagnostic value of maternal alpha-fetoprotein variants in second-trimester biochemical screening for trisomy 21 and 18. Sci Rep, 2022, 12: 13605
- Sha D S, Qi L M. Comparison of the efficacy of maternal serological triple screening and quadruple screening in the second trimester (in Chinese). Chin Med Guide, 2017, 15: 21–23 [沙德顺, 齐立民. 中孕期母血清学三联筛查与四联筛查的效能对比. 中国医药指南, 2017, 15: 21–23]
- Li J N, Diao H D, Guan X. The value of inhibin A, Activin A, and β -hCG combined detection in the early diagnosis and treatment of ectopic pregnancy (in Chinese). China Maternal and Child Health Care, 2017, 32: 5264–5266 [李江宁, 刁海丹, 关鑫. Inhibin A, Activin A, β -hCG联合检测在异位妊娠早期诊断和治疗中的价值. 中国妇幼保健, 2017, 32: 5264–5266]
- Wald N J, Rodeck C, Hackshaw A K, et al. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). Health Technol Assess, 2003, 7
- Cheng J M, Tian X X, Rao Y H, et al. The value of integrin-metalloproteinase 12-S in the diagnosis of ectopic pregnancy in pregnant women (in Chinese). Chin J Biochem Med, 2014, 34: 161–163+166 [程锦梅, 田祥学, 饶永红, 等. 解整合素-金属蛋白酶12-S在孕妇早期异位妊娠诊断中的价值. 中国生化药物杂志, 2014, 34: 161–163+166]
- Laigaard J, Sørensen T, Fröhlich C, et al. ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. Prenatal Diagnosis, 2003, 23: 1086–1091
- Ye B, Li H, Liao Z Y, et al. Application value of serum ADAM12 and PAPP-A level detection in prenatal screening and diagnosis of Down syndrome in the first and second trimesters (in Chinese). Chin J Eugenics Genet, 2021, 29: 696–699 [叶波, 李红, 廖志勇, 等. 血清ADAM12与PAPP-A水平检测在孕早中期唐氏综合征产前筛查诊断中的应用价值探究. 中国优生与遗传杂志, 2021, 29: 696–699]

- 14 Odibo A O, Ghidini A. Role of the second-trimester ‘genetic sonogram’ for Down syndrome screen in the era of first-trimester screening and noninvasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis*, 2014, 34: 511–517
- 15 Zaragoza E, Akolekar R, Poon L C Y, et al. Maternal serum placental growth factor at 11–13 weeks in chromosomally abnormal pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009, 33: 382–386
- 16 Wald N J, Bestwick J P, Huttly W J. Improvements in antenatal screening for Down’s syndrome. *J Med Screen*, 2013, 20: 7–14
- 17 Zhang X L, Wang J H. A preliminary study on the application of serum placental growth factor combined with other serological detection indexes in the screening of Down syndrome in early pregnancy (in Chinese). *Chin J Family Planning*, 2019, 27: 780–782 [张星磊, 王敬华. 血清胎盘生长因子联合其他血清学检测指标在孕早期唐氏筛查中应用初探. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27: 780–782]
- 18 Pandya P, Wright D, Syngelaki A, et al. Maternal serum placental growth factor in prospective screening for aneuploidies at 8–13 weeks’ gestation. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31: 87–93
- 19 Han Y, Cheng H, Du Z J. Serum PAPP-A, PLGF and ADAM12 detection in screening for Down syndrome in early pregnancy (in Chinese). *Chin J Family Plan*, 2021, 29: 1213–1215+1220 [韩毓, 程虹, 杜就旧. 血清PAPP-A, PLGF和ADAM12检测在孕早期唐氏综合征筛查. *中国计划生育学杂志*, 2021, 29: 1213–1215+1220]
- 20 Wang X, Shang L X. Research progress on prenatal screening and diagnosis (in Chinese). *People’s Mil Med*, 2021, 64: 679–683 [王心, 尚丽新. 产前筛查及诊断相关研究进展. *人民军医*, 2021, 64: 679–683]
- 21 He L Y, Li Y Q, Chen Y G, et al. Correlation analysis of abnormal ultrasound performance in the second trimester. *Huaxia Med*, 2020, 33: 126–130 [何林炎, 黎雅倩, 陈阳广, 等. 孕中期超声表现异常的相关性分析. *华夏医学*, 2020, 33: 126–130]
- 22 Sun Y, Zhang L, Dong D, et al. Application of an individualized nomogram in first-trimester screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2021, 58: 56–66
- 23 Karlı M F, Çakmak B, Şen C. Novel method for trisomy 21 screening in the first trimester of pregnancy: fetal brain angle. *J Perinat Med*, 2021, 50: 82–86
- 24 Xu T, Liu T, Xu T, Liu T. Research progress on prenatal screening for Down syndrome (in Chinese). *Chin J Practical Gynecol Obstet*, 2019, 35: 247–250 [徐婷, 刘彤. 唐氏综合征产前筛查研究进展. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35: 247–250]
- 25 Zhou Y, Wang Q Y, Xu H. Application of ultrasound detection of fetal nuchal translucency thickness and nasal bone length combined with free human chorionic gonadotropin and inhibin A detection in prenatal screening of fetal Down syndrome (in Chinese). *China Maternal Child Health Care*, 2018, 33: 2148–2151 [周妍, 王齐媛, 徐徽. 超声检测胎儿颈项透明层厚度、鼻骨长度联合游离人绒毛膜促性腺激素、抑制素A检测在胎儿唐氏综合征产前筛查中的应用. *中国妇幼保健*, 2018, 33: 2148–2151]
- 26 Zhang L, Chen Y M, Ma Y, et al. Significance of ultrasound NT combined with serum uE₃ and Inhibin-A detection in pregnant women for screening of trisomy 21-syndrome (in Chinese). *China Maternal Child Health Care*, 2019, 34: 3603–3606 [张利, 陈咏玫, 马瑶, 等. 超声NT检查联合孕妇血清uE₃, Inhibin-A检测用于21-三体综合征筛查的意义. *中国妇幼保健*, 2019, 34: 3603–3606]
- 27 Sablok A, Sharma A, Ahmed C S, et al. Performance of second-trimester maternal biochemistry screening (quadruple test vs. triple test) for trisomy 21: an Indian experience. *Ind J Med Res*, 2021, 154: 716
- 28 Lo Y M D, Corbetta N, Chamberlain P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350: 485–487
- 29 Wataganara T, Chen A Y, LeShane E S, et al. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertility Sterility*, 2004, 81: 638–644
- 30 Qi Q G, Tuo Y, Liu L X, et al. Amniocentesis and next generation sequencing (ngs)-based noninvasive prenatal dna testing (NIPT) for prenatal diagnosis of fetal chromosomal disorders. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 1811–1817
- 31 Fu X, Li M, Wen P. High-throughput sequencing of plasma free DNA in the second trimester for non-invasive prenatal testing of 21-Trisomy syndrome. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, 2019, 612: 022089
- 32 Palomaki G E, Deciu C, Kloza E M, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med*, 2012, 14: 296–305
- 33 Mao G H, Jiang C L. Analysis of prenatal screening results of Down syndrome in Kuqa City from 2019 to 2021 (in Chinese). *Chin J Prev Med*, 2023, 24: 737–742 [毛国华, 蒋晨丽. 2019–2021年库车市唐氏综合征产前筛查结果分析. *中国预防医学杂志*, 2023, 24: 737–742]
- 34 Canick J A, Palomaki G E, Kloza E M, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal Diagnosis*, 2013, 33: 667–674
- 35 Burns W, Koelper N, Barberio A, et al. The association between anticoagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to

- a low fetal fraction. *Prenatal Diagnosis*, 2017, 37: 1125–1129
- 36 Leung T Y, Qu J Z Z, Liao G J W, et al. Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Prenatal Diagnosis*, 2013, 33: 675–681
- 37 Esfandiari N, Bunnell M E, Casper R F. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33: 1439–1444
- 38 Qian Y, Liu Y, Yan K, et al. Noninvasive prenatal screening for common fetal aneuploidies using single-molecule sequencing. *Lab Invest*, 2023, 103: 100043
- 39 Zhang R, Yin Y, Zhang S, et al. Application of differentially methylated loci in clinical diagnosis of trisomy 21 syndrome. *Genet Testing Mol Biomarkers*, 2019, 23: 246–250
- 40 Hong S, Lee S M, Oh S, et al. Simple and rapid detection of common fetal aneuploidies using peptide nucleic acid probe-based real-time polymerase chain reaction. *Sci Rep*, 2022, 12: 150
- 41 Khattabi E, Sciellour R C, Tessier L D, et al. Could digital PCR be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: a proof of concept study. *PLoS ONE*, 2017, 11
- 42 Tan C, Chen X, Wang F, et al. A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies. *Analyst*, 2019, 144: 2239–2247
- 43 Dai P, Yang Y, Zhao G, et al. A dPCR-NIPT assay for detections of trisomies 21, 18 and 13 in a single-tube reaction-could it replace serum biochemical tests as a primary maternal plasma screening tool? *J Transl Med*, 2022, 20: 269
- 44 Shum E Y, Lai J H, Li S, et al. Next-generation digital polymerase chain reaction: high-dynamic-range single-molecule DNA counting via ultrapartitioning. *Anal Chem*, 2022, 94: 17868–17876
- 45 Wang K, Li B, Guo Y, et al. An integrated digital PCR system with high universality and low cost for nucleic acid detection. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 947895
- 46 Litton C, Stone J, Eddleman K, et al. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *Mount Sinai J Med*, 2009, 76: 521–528
- 47 Zhang X H, Bi W M. The development of chromosome detection technology and its application in the diagnosis of genetic diseases (in Chinese). *J Med Res*, 2011, 40: 4–8+3 [张秀慧, 毕为民. 染色体检测技术的发展及其在遗传病诊断中的应用. 医学研究杂志, 2011, 40: 4–8+3]
- 48 Luo Y H, Huang J W. Advances in the application of cytogenetic and molecular diagnostic techniques in the detection of chromosomal diseases (in Chinese). *Chin J Eugenics Genet*, 2020, 28: 1167–1169 [罗颖花, 黄际卫. 细胞遗传及分子诊断技术在染色体病检测中的应用进展. 中国优生与遗传杂志, 2020, 28: 1167–1169]
- 49 Zhu R F, Zhu X Y, Yang Y, et al. Application of different technologies for distinguishing true and pseudo mosaicisms during prenatal diagnosis (in Chinese). *Chin J Med Genet*, 2014, 31: 636–640 [朱瑞芳, 朱湘玉, 杨滢, 等. 在产前诊断中判读真假嵌合体的方法分析. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31: 636–640]
- 50 Wang Q, Wang G J, Chen Y P, et al. Clinical application of FISH technology for rapid diagnosis of Down syndrome (in Chinese). *J Ningxia Med Univ*, 2015, 37: 293–295 [王青, 王贵杰, 陈耀平, 等. FISH技术快速诊断唐氏综合征的临床应用. 宁夏医科大学学报, 2015, 37: 293–295]
- 51 Wu J, Yin A H, Lu J, et al. Array-CGH technology is used for prenatal diagnosis of suspected fetal chromosomal abnormalities (in Chinese). *Chin J Eugenics Genet*, 2013, 21: 56–58+2 [吴菁, 尹爱华, 卢建, 等. Array-CGH技术用于产前诊断可疑胎儿染色体异常. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21: 56–58+2]
- 52 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. *Obstet Gynecol*, 2016, 128: e262–e268
- 53 Zheng Y T. Prenatal diagnosis and genetic analysis of facioscapulohumeral muscular dystrophy type 1 (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020 [郑玉婷. 面肩肱型肌营养不良1型的产前诊断及遗传学分析. 硕士学位论文. 郑州: 郑州大学, 2020]
- 54 Dai P, Zhu C F, Zhao G Y, et al. Application of genome optical mapping technology in the diagnosis of 16p11.2-p12.2 microdeletion (in Chinese). *Chin J Med Genet*, 2020, 37: 1167–1171 [代鹏, 朱朝锋, 赵干业, 等. 基因组光学图谱技术在16p11.2-p12.2微缺失诊断的应用. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37: 1167–1171]

Current progress in the detection technologies for prenatal screening and diagnosis of trisomy 21

WANG Tan¹, LIN ChunMao², YIN HuanCai³ & YIN Jian³

1 Collage of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250000, China;

2 Jinan Guoke Medical Technology Development Co. Ltd, Jinan 250101, China;

3 Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215000, China

Trisomy 21 (Down syndrome, DS) is one of the most common chromosomal abnormalities, which is considered as a major cause of fetal abortion, malformation, abnormality, and death. So far, there is no effective way for the treatment of children with DS, abortion is the only acceptable method. Therefore, prenatal detection would be necessary. Researchers have developed a variety of prenatal screening and diagnostic techniques, and some of these have been applied in clinical detection, but their sensitivity, accuracy, and costs require further optimization. At the same time, investigating the pathogenic mechanism and biological characteristics of DS and establishing non-invasive diagnostic methods with high sensitivity and high accuracy for DS would be necessary in the future.

Down syndrome, chromosome abnormality, prenatal screening, prenatal diagnosis, detection techniques

doi: [10.1360/SSV-2023-0262](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0262)