

# 单核苷酸多态性微阵列芯片技术在稽留流产伴复发性流产诊断中的应用

何文凤, 姜艳华, 黄红丽, 苏贞文, 杨晶

深圳市罗湖区妇幼保健院, 广东 深圳 518019

**摘要:** **目的** 探讨单核苷酸多态性微阵列芯片技术(single nucleotide polymorphism array, SNP array)在稽留流产伴复发性流产病因诊断中的应用价值。 **方法** 选择 2018 年 3 月—2019 年 6 月于本院临床诊断的稽留流产患者 105 例,根据有无复发性流产分为单纯稽留流产组(对照组,48 例)和稽留流产伴复发性流产组(观察组,57 例)。采用 STR-PCR 检测染色体异常,进一步通过 SNP array 检查并分析绒毛组织染色体核型异常情况,结合数据库对染色体致病基因进行分析。 **结果** 观察组患者平均孕周小于对照组,且孕次 $\geq 3$ 次比例、合并内科疾病率高于对照组( $P < 0.05$ )。观察组患者共检出染色体异常 33 例(57.89%, 33/57),其中染色体核型异常 29 例,染色体结构异常 4 例。对照组共检出染色体异常 25 例(52.08%, 25/48),均为染色体核型异常。两组在染色体异常方面差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。但进一步分析不同异常核型分布两组存在一定差异,观察组异常核型 47, XN, +16 (12/29, 41.38%)比例高于对照组(3/25, 12.00%),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外,4 例存在染色体结构异常的患者均为观察组。 **结论** 染色体异常可能是导致稽留流产的重要原因,其中 47, XN, +16 核型异常多表现为稽留流产伴复发性流产。SNP array 技术在检测染色体结构和核型异常方面有一定优势,有助于明确稽留流产病因,对提供合理的遗传咨询并指导下一次良好妊娠有积极意义。

**关键词:** 核苷酸微阵列技术;稽留流产;复发性流产;染色体异常;诊断

**中图分类号:** R714.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2020)08-1001-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.08.031

稽留流产又称过期流产,是指胚胎或胎儿已死亡滞留在宫腔内未能及时排出,是临床上较为常见的一种流产类型。在临床诊断的怀孕女性中约 8%~20%会发生稽留流产,且近年来其发病率逐年增加<sup>[1]</sup>。复发性流产是指连续发生两次及以上的自然流产。这两种特殊类型的流产都与以下原因有关:早期的遗传因素缺陷导致的胚胎染色体异常、免疫缺陷、内分泌紊乱、黄体功能不全、子宫形态异常、孕妇凝血异常等。其中,胚胎染色体异常被认为是最重要的原因之一<sup>[2-4]</sup>。研究显示,稽留流产中胚胎染色体异常率高达 50%~60%<sup>[5-7]</sup>,而复发性流产患者中绒毛组织染色体异常率为 29%~60%<sup>[8-11]</sup>。因此采取有效规范的技术对流产绒毛的细胞遗传学特征进行检测以明确病因,用以指导生育与妊娠有十分重要的意义。

单核苷酸多态性微阵列芯片技术(single nucleotide polymorphism array, SNP array)是在全基因组范围内检测遗传物质,已被广泛用于染色体的微缺失、微重复检测,甚至可以发现变异程度极小的微缺失

与异常重复。本课题组前期研究中已经运用该技术对复发性流产染色体的数目和形态等进行分析<sup>[4]</sup>。本研究通过采用 SNP array 技术检测分析不同类型的稽留流产的绒毛组织,探讨单纯稽留流产和稽留流产伴复发性流产患者绒毛染色体异常方面的差别,为遗传咨询及优生优育提供更多的依据。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选择 2018 年 3 月—2019 年 6 月在深圳罗湖区妇幼保健院妇产科门诊和病房临床诊断的 105 例稽留流产患者为研究对象,年龄 25~40 岁,平均(31.67 $\pm$ 5.68)岁。其中单纯稽留流产患者 48 例(对照组),稽留流产伴复发性流产患者 57 例(观察组)。

**纳入标准:** (1)明确诊断为稽留流产(可能同时包含复发性流产的诊断);(2)无明确诊断的胎儿畸形病史;(3)宫内单胎妊娠,胚胎无胎心搏动,滞留宫腔内未能及时自行排出需接受手术治疗;(4)患者有完善的 TORCH(即弓形虫、巨细胞病毒、风疹病毒和单纯疱疹病毒 2 型等多种病原体的感染)血清检查结果、阴道分泌物检测结果;(5)患者妊娠期没有使用禁用、慎用类药物,无不良嗜好和有害物质接触史;(6)患者有检测绒毛染色体要求,经医院伦理委员会批准,并取得知情同意,夫妇双方签署知情同意后,行人工流产

**基金项目:** 深圳科技计划基础研究项目(JCYJ20170303153653 766)

**作者简介:** 何文凤(1971-),女,本科,副主任医师,主要从事妇科相关疾病方向的研究工作。

**通信作者:** 姜艳华, E-mail: chuanqx16@126.com。

时留取绒毛组织送检。排除标准:①多胎妊娠;②临床病例资料不全者。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 收集患者流产的典型绒毛组织或胚胎组织,取 100 g 左右,加入生理盐水漂洗至无血液成分,放入 EP 管内,提取 DNA,4 ℃ 冰箱保存。使用分光光度计定量标准化稀释样本浓度值至 50 ng/L,样本用于染色体异常及核型分析。

1.2.2 短串联重复序列聚合酶链反应技术 (STR-PCR) 检测染色体异常 选取典型绒毛组织或胚胎组织,通过 QIAGEN 试剂盒提取全基因组 DNA,同时提取患者外周血的 DNA,进行 STR-PCR 反应。采用遗传分析仪 (ABI 310) 进行电泳分析,并使用 Gene Scan 3.1 软件定量数据分析。

1.2.3 SNP array 检测染色体核型 严格按照质控标准应用 Affymetrix CytoScan HD (探针密度为 250 万,其中 195 万 CNV 探针 + 75 万 SNP 探针)、CytoScan Optima 芯片和 CytoScan 750K 芯片 (55 万 CNV 探针 + 20 万 SNP 探针) 对样本进行检测。利用 Affymetrix Chromosome Analysis Suite 软件采用隐马尔可夫模型算法确定全基因组染色体区域的重复和缺失。结果判读查询人类染色体不平衡和表型数据库 (DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>)、PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)、ClinGen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/index.shtml>)、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM, <https://www.omim.org>) 和基因组变异数据库 (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) 等。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表述,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以 (*n*,%) 表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较 研究期间因稽留流产在本院共完成 105 例胚胎绒毛检测,其中单纯稽留流产患者 (对照组) 48 例 (45.71%),稽留流产伴复发性流产患者 (观察组) 57 例 (54.29%)。观察组平均孕周小于对照组,孕次≥3 次以及合并内科疾病者比例高于对照组,差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。两组患者在年龄、子宫形态异常率、合并阴道炎率以及体外受精-胚胎移植 (IVF) 妊娠率之间差异均无统计学意义 (*P*>0.05),见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较

一般资料	观察组 ( <i>n</i> =57)	对照组 ( <i>n</i> =48)	$\chi^2$ 或 <i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	32.33±4.72	30.91±5.51	1.424	0.158
平均孕周 (周, $\bar{x} \pm s$ )	11.35±2.01	13.27±2.75	4.017	0.000
孕次 ≥ 3 次 ( <i>n</i> , %)	36 (63.16)	16 (33.33)	9.272	0.002
子宫形态异常 ( <i>n</i> , %)	19 (33.33)	19 (39.58)	0.441	0.507
合并阴道炎 ( <i>n</i> , %)	16 (28.07)	17 (35.42)	0.653	0.419
合并内科疾病 ( <i>n</i> , %)	15 (26.32)	5 (10.42)	4.272	0.039
IVF 妊娠 ( <i>n</i> , %)	1 (1.75)	3 (6.25)	0.472	0.492

注: 内科合并症包括贫血、高血压、糖尿病和甲状腺功能紊乱,子宫形态异常包括疤痕子宫、子宫发育异常、子宫肌瘤和宫腔粘连。

2.2 染色体异常分布情况 STR-PCR 检测结果显示,观察组患者检出染色体异常 33 例 (57.89%, 33/57),其中染色体核型异常 29 例;结构异常 4 例。对照组检出染色体异常 25 例 (52.08%, 25/48),其中染色体核型异常者 25 例、结构异常 0 例。两组患者在染色体核型和结构异常方面差异无统计学意义 (*P*>0.05),见表 2。

表 2 两组患者染色体异常分布情况 (*n*,%)

指标	观察组 ( <i>n</i> =57)	对照组 ( <i>n</i> =48)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
染色体异常	33 (57.89)	25 (52.08)	0.356	0.562
染色体核型异常	29 (50.88)	25 (52.08)	0.015	0.902
三体型	22 (38.60)	17 (35.42)	0.113	0.737
X 单体	2 (3.51)	6 (12.50)	1.852 <sup>a</sup>	0.174
三倍体	5 (8.77)	2 (4.17)	0.302 <sup>a</sup>	0.582
染色体结构异常	4 (7.02)	0 (0.0)	1.849 <sup>a</sup>	0.174

注: a 校正  $\chi^2$  检验。

2.3 SNP array 检出的染色体核型异常分析结果 观察组患者核型异常检出 29 例,检出率为 50.88%;对照组患者核型异常检出 25 例,检出率为 52.08%,两组检出率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.015$ , *P* = 0.902)。图 1 和图 2 分别为观察组和对照组染色体图谱 21 号染色体重复区域示例。进一步分析具体检出类型,观察组异常核型 47,XN,+16 (12/29,41.38%) 比例高于对照组 (3/25,12.00%),差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 5.776$ , *P* = 0.031)。此外观察组异常核型 69,XXX (5/29,17.24%) 比例高于对照组,而对照组异常核型 45,X (6/25,24.00%) 比例高于观察组 (2/29,6.90%),但因样本量较少,未发现具有统计学意义的结果,见表 3。

表 3 SNP array 检出的染色体核型异常分析结果 (*n*,%)

异常核型	观察组 ( <i>n</i> =29)	对照组 ( <i>n</i> =25)	<i>P</i> 值 <sup>a</sup>
47,XN,+16	12 (41.38)	3 (12.00)	0.031
47,XN,+22	3 (10.34)	2 (8.00)	0.572
47,XN,+21	3 (10.34)	2 (8.00)	0.572
47,XN,+20	1 (3.45)	0	0.537
47,XN,+18	0	1 (4.00)	0.463
47,XN,+17	0	1 (4.00)	0.463
47,XN,+15	0	1 (4.00)	0.463
47,XN,+14	1 (3.45)	1 (4.00)	0.716
47,XN,+13	1 (3.45)	3 (12.00)	0.251
47,XN,+10	1 (3.45)	0	0.537
47,XN,+9	0	1 (4.00)	0.463

续表 3

异常核型	观察组 (n=29)	对照组 (n=25)	P 值 <sup>a</sup>
47,XN,+4	0	1(4.00)	0.463
47,XN,+2	0	1(4.00)	0.463
69,XXX	5(17.24)	2(8.00)	0.277
45,X	2(6.90)	6(24.00)	0.084

注：a 采用 Fisher 确切概率法。

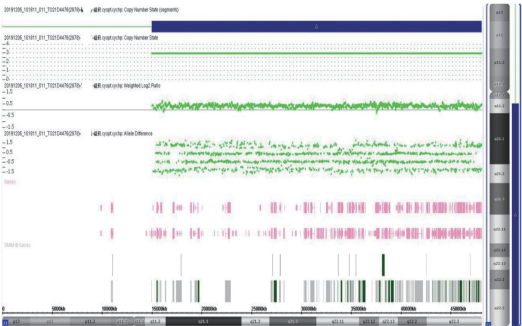


图 1 观察组患者染色体图谱 21 号染色体重复区域细节图(蓝色代表重复)



图 2 对照组患者染色体图谱 21 号染色体重复区域细节图(蓝色代表重复)

表 4 稽留流产伴复发性流产患者胚胎绒毛染色体亚二倍体结构异常核型分析

例号	样本	指征	异常类型	异常核型描述	解释
1	绒毛	稽留流产伴复发性流产	部分缺失	chr4q35.1q35.2 区域发生 4.9 Mb 片段缺失	包含 UFSP2、CYP4V2 等功能基因,与 4q 末端缺失综合征相关。临床表现为轻度到中度的智力低下、发育迟缓、先天性心脏病、腭裂、特殊面容、小颌畸形、骨骼肌肉系统发育异常、四肢畸形、泌尿生殖系统发育异常等。
2	绒毛	稽留流产伴复发性流产	部分缺失	chr13q14.2q34 区域发生 66.2 Mb 缺失	基因组发生严重失衡,是导致本次流产的主要原因。
3	绒毛	稽留流产伴复发性流产	部分重复	chr22q11.21 区域发生约 2.8 Mb 片段重复	含大量功能基因,与 22q11.2 重复综合征相关。主要临床症状包括精神运动发育迟缓、智力低下、肌张力减退、先天性心脏病、特殊面容、腭咽闭合不全、泌尿系统异常、骨骼发育畸形等。
4	绒毛	稽留流产伴复发性流产	同时有片段缺失和重复	chr7q21.11q36.3 区域发生约 75.6 Mb 拷贝数重复;chr13q33.3q34 区域发生约 5.5 Mb 拷贝数缺失	基因组发生严重失衡,是导致本次流产的主要原因

3 讨论

自然流产是指非人为原因发生的流产及自发性流产。研究表明<sup>[12]</sup>在所有临床确认的妊娠中,自然流产的发生率约为 15%。虽然稽留流产和复发性流产属于自然流产,二者都有相似的发病原因,但是近半数病因不明。前者易造成感染、继发不孕等,后者因反复妊娠失败给患者带来严重的身心损害。因此,无论是稽留流产还是复发性流产进行孕前干预是极其必要的。

本研究发现,单纯稽留流产与伴有复发性流产的稽留流产患者在孕周、孕次和合并内科疾病方面,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中伴有复发性流产的稽留流产患者表现为孕周更短、孕次更多及合并内科疾病

者比例更高。染色体异常是胚胎发育异常及自然流产的重要原因。文献报道称,稽留流产染色体异常率高达 50%~60%<sup>[5-7]</sup>,本研究中 105 例流产患者绒毛组织共检出染色体异常 58 例,占 55.2%,与报道较为一致。其中观察组患者检出染色体异常 33 例(57.89%,33/57),其中染色体核型异常 29 例,结构异常 4 例。对照组检出染色体异常 25 例(52.08%,25/48),均为染色体核型异常。两组患者在染色体核型和结构异常方面差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

既往研究显示,稽留流产患者染色体核型异常率高达 82.61%,结构异常率为 17.39%。核型异常患者中,以三体型发生率最高,达 89.47%<sup>[13]</sup>。三体型指的



是胚胎细胞内有 47 条染色体,在临床染色体疾病中较常见,有导致胚胎早期停止发育可能,本研究发现,观察组 29 例染色体核型异常者中三体型 22 例,占 75.9%,对照组 25 例染色体核型异常者中三体型 17 例,占 68.0%,观察组异常核型以 47,XN,+16 最多见,发生率高于对照组( $P<0.05$ )。本研究还检出三倍体 7 例,其中观察组 5 例,对照组 2 例,三倍体即比正常二倍体多了一套单倍体,共 69 条染色体,胎儿严重发育障碍,早期即发生自然流产。本研究还检出 X 染色体单体 8 例,其中观察组 2 例,对照组 6 例,X 染色体单体患者通常表现为身材矮小、性腺发育不良、胚胎早期停育等。本研究发现,观察组三倍体比例高于对照组,而对照组 X 染色体单体比例高于观察组,但因样本量较少,未发现具有统计学意义的结果,后续仍需进一步研究。

本研究发现,观察组中有 4 例染色体结构异常的患者,且在对照组中未检出染色体结构异常者,推测染色体结构异常可能与复发性流产伴稽留流产有密切关系,但是因为样本量较少,尚不能得出确切的结果,需要扩大样本量进行后续的研究。染色体结构异常主要以新发为主,家族性染色体结构异常再发风险约 10%~15%<sup>[14-15]</sup>。因此对于流产存在再发风险的患者,再次妊娠前进行父母双方染色体检测也是非常必要的。

传统的检测流产物染色体等遗传物质的方法有核型分析与荧光原位杂交,然而其分辨率低,仅适用于大于 5~10 Mb 遗传物质的检测,而且核型分析耗时长,结果不精准<sup>[16-17]</sup>。随着测序技术以及基因芯片相关技术的不断发展,其在疾病病因分析中的应用得到推广。染色体微阵列可以分析全基因组范围内的染色体异常,解决了传统检测技术的局限性,其在染色体核型异常、结构异常、嵌合体和纯合区域等多种染色体异常类型检测中的应用价值良好,而且检测无需长时间的细胞培养,有耗时短、分辨率和准确率高的优点<sup>[4]</sup>。

综上所述,染色体异常可能是导致稽留流产的重要原因,其中 47,XN,+16 核型异常多表现为稽留流产伴复发性流产。SNP array 技术在检测染色体结构和核型异常方面有一定优势,有助于明确稽留流产病因,对

提供合理的遗传咨询并指导下一次良好妊娠有积极的意义。

#### 参考文献

- [1] Chen BA, Creinin MD. Contemporary management of early pregnancy failure[J]. Clin Obstet Gynecol, 2007, 50(1): 67-88.
- [2] 吴佩蔚,胡旭,崔莹,等. 复发性流产与夫妇染色体异常及多态性的关系[J]. 实用预防医学, 2020, 27(1): 78-80.
- [3] 蔡娜,辛淑文,娄超,等. 720 例孕早期自然流产胚胎的异常核型临床分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(12): 1485-1488.
- [4] 黄红丽,何文凤,姜艳华,等. 染色体微阵列技术用于复发性流产病因诊断中的价值评价[J]. 中国医学创新, 2019, 16(30): 132-135.
- [5] 秦文娜,夏宝国,毕淑娜,等. 稽留流产的胎儿绒毛染色体异常及相关因素分析[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(8): 610-612.
- [6] Islam MM, Bakheit CS. Advanced maternal age and risks for adverse pregnancy outcomes: a population-based study in Oman[J]. Health Care Women Int, 2015, 36(10): 1081-1103.
- [7] 宋杰,郑林媚,王玲,等. 61 例孕早期稽留流产绒毛应用高通量测序技术染色体检测结果分析[J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(11): 846-848.
- [8] 张影,向卉芬,徐祖滢,等. 高通量测序技术在复发性流产病因诊断中的应用[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(2): 127-130.
- [9] 王文华,王晨阳,姜李乐,等. 复发性流产染色体异常及影响因素分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2018, 19(4): 303-306.
- [10] Ozbilgin K, Karaca F, Turan A, et al. The higher heparin-binding epidermal growth factor(HB-EGF) in missed abortion[J]. Taiwanese J Obstet Gynecol, 2015, 54(1): 13-18.
- [11] Chen H, Deng X, Yang Y, et al. Expression of GRIM-19 in missed abortion and possible pathogenesis[J]. Fertil Steril, 2015, 103(1): 138-146.
- [12] Nybo AA, Wohlfahrt J, Christens P, et al. Is maternal age an independent risk factor for fetal loss? [J]. West J Med, 2000, 173(5): 331.
- [13] 秦文娜,夏宝国,毕淑娜,等. 稽留流产的胎儿绒毛染色体异常及相关因素分析[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(8): 610-612.
- [14] 陆国辉. 临床遗传咨询[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2007, 181-209.
- [15] 高雪峰. 胎儿染色体结构和数目异常的遗传咨询和处理决策[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(8): 614-618.
- [16] 黄伟伟,胡蓉,杨曦,等. 应用 SNP array 检测流产物三倍体[J]. 中国产前诊断杂志(电子), 2019, 11(1): 1-5.
- [17] 徐从红,邱吉刚,李华锋,等. 单核苷酸多态微阵列技术在早期自然流产组织中的应用[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2017, 39(6): 449-454.

收稿日期:2020-03-15