CNV-seq 应用于产前诊断及流产物检测意外发现 DMD 基因变异临床分析

吴秋华，石凤蕊，王 瑞，刘 瑗，王 林，娄 超，强 荣
（西北妇女儿童医院医学遗传中心，陕西 西安 710061）

[摘 要]**目的** 探讨全基因组拷贝数变异测序技术(CNV-seq)应用在产前诊断及流产物检测中发现 Duchenne 型肌营养不良症(DMD)的重要价值。**方法** 本研究使用 CNV-seq 技术对 2019 年 9 月至 2020 年 7 月来西北妇女儿童医院进行产前诊断的羊水样本和流产胎儿样本共 784 例进行检测，对 DMD 基因变异样本进一步采用多重连接依赖性探针扩增(MLPA)方法进行验证。**结果** 本研究意外发现 3 例样本存在 DMD 基因的缺失或重复，同时 MLPA 验证了这些突变。3 例均为女胎，胎儿 1 为 DMD 基因 64-79 号外显子重复，胎儿 2 为 DMD 基因 1-7 号外显子重复，这两例羊水样本的变异为新发突变；流产胎儿 3 的变异遗传自母亲，母亲检测为 DMD 基因 45-51 号外显子缺失。**结论** CNV-seq 技术应用于产前诊断及流产物不仅能检测染色体片段缺失或重复，还有助于发现基因重复或缺失所致的单基因疾病，提高了染色体及基因异常疾病的检出率，从而为临床诊断和遗传咨询提供更全面的理论依据。

[关键词]全基因组拷贝数变异测序技术；Duchenne 型肌营养不良症；产前诊断；流产物
Doi：10.3969/j.issn.1673－5293.2024.06.012
[中图分类号]R173 [文献标识码]A [文章编号]1673－5293(2024)06－0075－08

Clinical analysis of accidental discovery of DMD gene variations in prenatal diagnosis and detection of abortus by CNV-seq

WU Qiuhua，SHI Fengrui，WANG Rui，LIU Yuan，WANG Lin，LOU Chao，QIANG Rong
（*Center of Medical Genetics，Northwest Women and Children's Hospital，Shaanxi Xi'an* 710061，*China*）

[**Abstract**] **Objective** To explore important value of copy number variation sequencing (CNV-seq) technology in identifying Duchenne muscular dystrophy (DMD) in prenatal diagnosis and abortus detection. **Methods** The amniotic fluid and abortus samples of 784 pregnant women who received prenatal diagnosis in our hospital from September 2019 to July 2020 were examined using CNV-seq technology，and those samples with DMD gene variations were validated further by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). **Results** DMD gene deletions or duplication in three samples were accidentally discovered，and they were all validated by MLPA. All three samples were female fetuses. The Fetus 1 had duplication of exons 64-79 of the DMD gene and the fetus 2 had duplication of exons 1-7 of the DMD gene. The variations of the DMD gene in the two amniotic fluid samples were De novo (novel) mutations. The variation of the DMD gene in aborted fetus 3 was deletion of exons 45-51 of the DMD gene which inherited from the mother. **Conclusion** Application of CNV-seq technology in prenatal diagnosis and abortus examination can not only detect deletion or duplication of chromosome segments，but also contribute to identification of monogenic diseases caused by gene duplication or deletions，which improves detection rate of chromosome or gene abnormalities，and thus provides more comprehensive theoretical basis for clinical diagnosis and genetic consultation.

[**Key words**] copy number variation sequencing；Duchenne muscular dystrophy；prenatal diagnosis；abortus

Duchenne 型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy，DMD)是由位于染色体 Xp21.1 的抗肌萎缩蛋白的基因(DMD 基因)突变和肌营养不良蛋白缺失引起的 X 连锁隐性遗传疾病。大多数 DMD 患者为男性，女性一般为致病基因携带者，在活产男孩中的发病率约 1/3 500[1]。DMD 基因是人类基因组中最大的基因，其外显子加内含子总长超过 2.2Mb，编码的肌营养不良蛋白缺乏导致肌纤维膜脆性和坏

[收稿日期]2023－06－26
[基金项目]国家自然科学基金(82201865)；陕西省重点研发计划项目(2023-YBSF-305)；西北妇女儿童医院院内科研项目(2020ZD03)
[作者简介]吴秋华(1984—)，女，主管技师，主要从事遗传检验相关研究。
[通讯作者]强 荣，主任医师。

死，最终引起肌肉退行性变[2]。DMD在儿童早期表现为行走困难，在青少年时期发展为不能行走，并在成年早期导致死亡[3]。约1/3的DMD病例没有家族史，为基因新发突变，通常在出生前无法被发现[4]。全基因组拷贝数变异测序技术（copy number variation sequencing，CNV-seq）作为近几年新兴发展的技术，与传统核型技术相比能检测到更多的染色体异常，然而关于该技术发现单基因疾病的报道甚少。我们通过CNV-seq检测羊水和流产物样本，意外发现了3例DMD基因外显子重复或缺失病例，然后经多重连接依赖性探针扩增（multiplex ligation-dependent probe amplification，MLPA）方法验证使DMD得到了确诊。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究使用CNV-seq技术对2019年9月至2020年7月来西北妇女儿童医院进行产前诊断的784例羊水样本和流产胎儿样本进行检测，发现3例样本存在DMD基因的缺失或重复，同时经MLPA验证了这些突变。其中2例孕妇分别因血清学唐氏筛查异常和无创提示高风险选择羊水穿刺产前诊断；1例孕妇因无创提示21三体高风险及B超提示胎儿严重异常选择引产，进行流产胎儿CNV检测。3例孕妇均无DMD家族史。孕妇基本情况见表1。所有孕妇均签署书面知情同意书。

表1　孕妇基本情况

Table 1　General information of the three pregnant women

病例	年龄（岁）	孕周（周）	孕产史	现病史	样本类型
孕妇1	26	23^{+1}	G1P0	唐筛高风险（1∶227）	羊水
孕妇2	35	21^{+6}	G2P1	无创提示胎儿性染色体异常	羊水
孕妇3	25	23	G1P0	1.无创提示胎儿21三体高风险； 2.胎儿全身皮肤水肿、胸腹腔积液、双侧足内翻	流产胎儿皮肤组织

1.2 DNA提取

检测样本包括羊水、流产胎儿皮肤组织及孕妇的外周血。提取羊水基因组DNA和流产胎儿皮肤组织中DNA试剂盒分别为德国Qiagen公司的PureGene组织提取试剂盒、DNeasy组织试剂盒。外周血DNA由北京天根生产的血液基因组DNA试剂盒提取。为了确保结果的准确性，使用江苏苏州阅微公司生产的荧光标记短片段串联重复序列（short tandem repeats，STR）复合扩增检测试剂盒对孕妇外周血及其羊水或流产物样本中的DNA样品进行扩增，以分析待检样本中是否存在母体细胞污染。

1.3 CNV-seq检测及分析

使用北京贝瑞和康公司提供的CNV检测试剂盒KR0040进行文库构建，方法参考已有文献[5]：通过限制性内切酶水解50ng DNA，获得平均大小为200bp的DNA片段，并通过小DNA片段末端填充、连接接头和PCR扩增建立DNA文库。在美国Illumina公司生产的NextSeq CN500高通量测序平台上测定所有序列。将测序结果与人类基因组数据库hg19进行比较。参考DGV、DECIPHER、ISCA、OMIM、ClinVar、PubMed等公共和实验室数据库针对≥100kb的CNVs片段进行致病性分析。

1.4 MLPA检测及分析

DMD基因检测试剂盒由荷兰MRC-Holland公司生产，含有SALSA MLPA P034/P035两个探针，可检测DMD基因的79个外显子是否存在缺失或者重复。检测方法参考已有文献[6]。使用美国Thermo Fisher Scientific公司的ABI 3500DX测序仪进行毛细管电泳，使用Coffalyser软件（http//www.mlpa.com）用于数据分析。探针相对峰面积增加或减少30%分别提示DMD基因外显子的重复或缺失。

2 结果

2.1 母源污染检测结果

所有羊水和流产胎儿皮肤组织样本均无肉眼可见性母血污染。经STR检测，3例样本中均无母源污染，可用于后续检测。

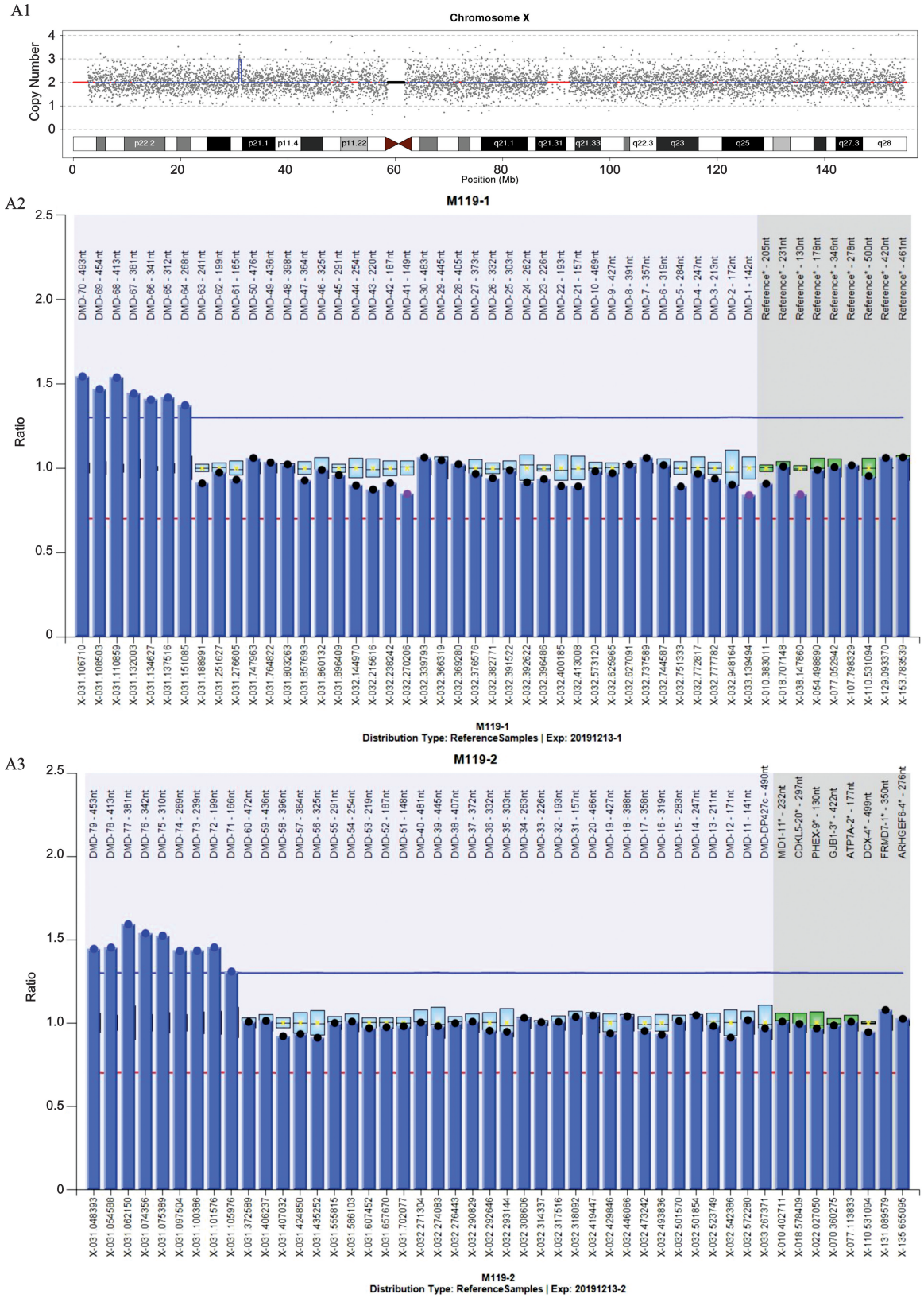
2.2 CNV-seq及MLPA检测结果

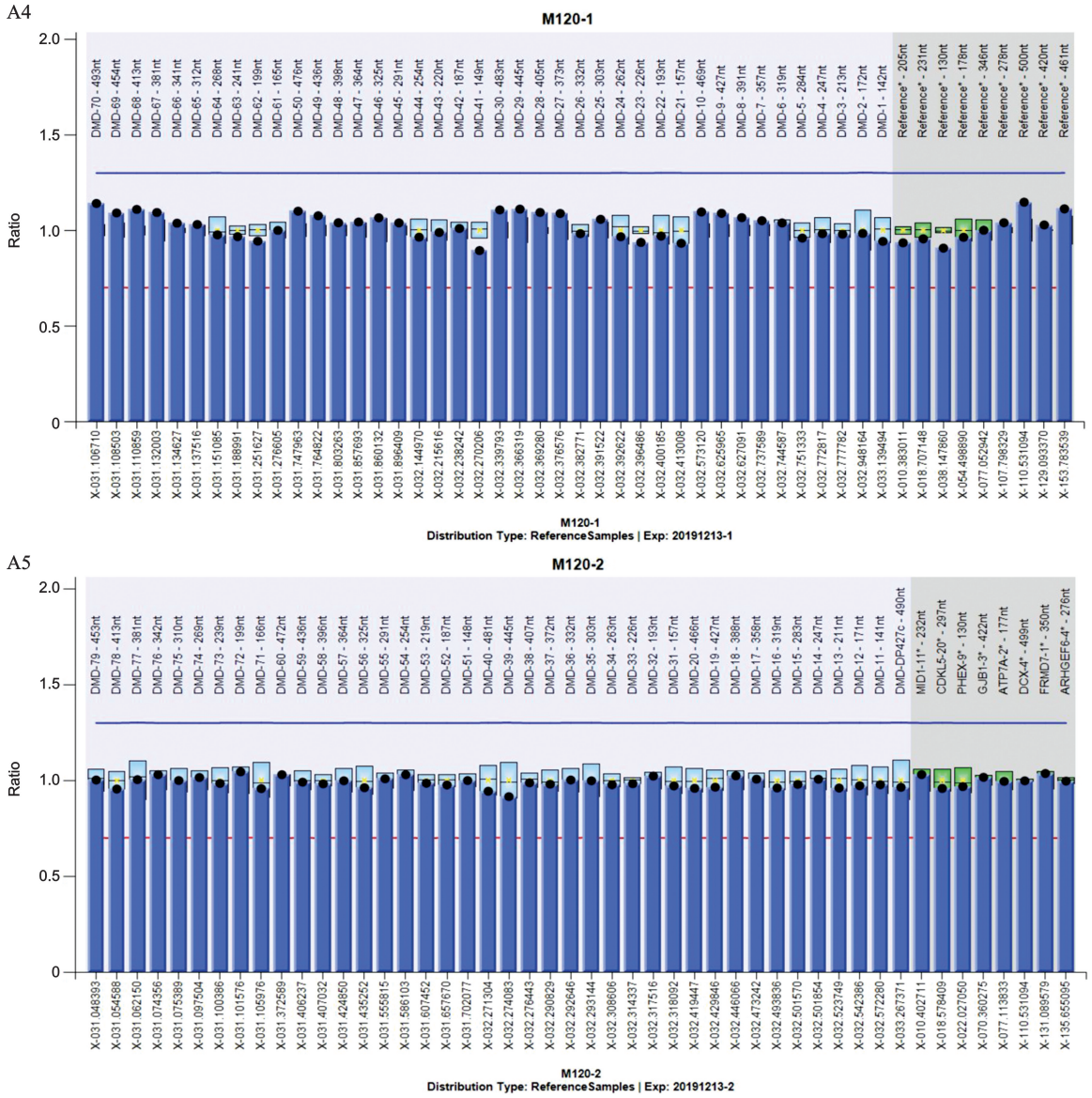
胎儿1：女胎，CNV-seq提示Xp21.2（30860000-31260000）×3（重复约0.40Mb），MLPA提示DMD基因64-79号外显子重复；孕妇1 MLPA未检测出

DMD 基因变异，见图 1。

胎儿 2：女胎，Xp21.1(32820000-33560000)×3（重复约 0.74Mb），MLPA 提示 DMD 基因 1-7 号外显子重复；孕妇 2 MLPA 未检测出 DMD 基因变异，见图 2。

流产胎儿 3：女胎，21q11.2q22.3(14300000-48129895)×3（为 21-三体综合征），Xp21.1(31760000-32000000)×1（缺失约 0.24Mb），流产胎儿未做 MLPA 检测；孕妇 3 MLPA 提示 DMD 基因 45-51 号外显子缺失，见图 3。





注：(A1)胎儿 CNV-seq：seq[hg19]Xp21.2(30860000-31260000)×3；(A2)和(A3)胎儿 MLPA：DMD 基因 64-79 号外显子重复；(A4)和(A5)孕妇 1 MLPA 未见 DMD 基因缺失或重复。

图 1　孕妇 1 及其胎儿 CNV-seq、MLPA 检测结果

Fig.1　CNV-seq and MLPA detection results of the pregnant woman 1 and her fetus

2.3 妊娠结局

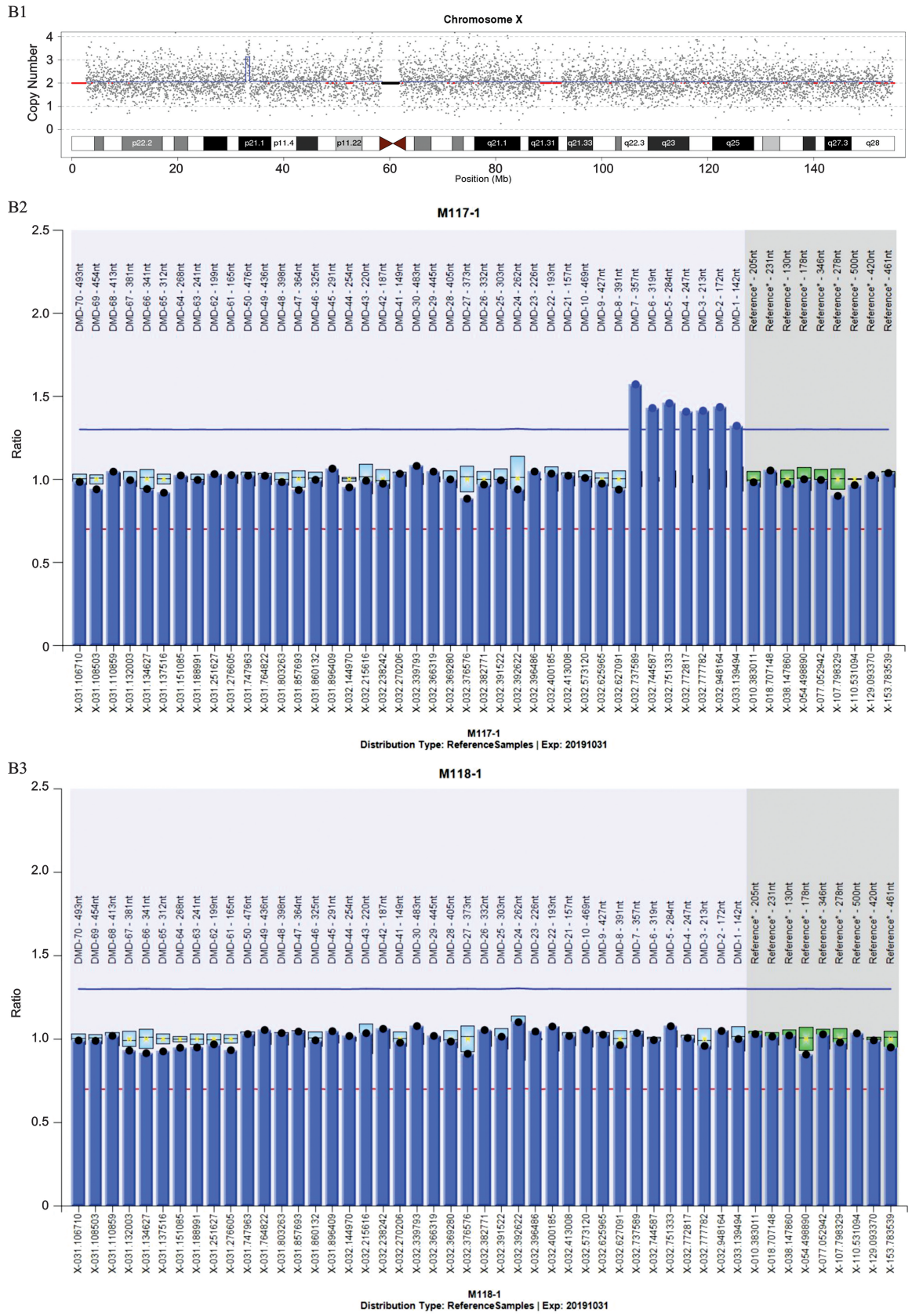
孕妇 1 经遗传门诊咨询和慎重考虑后选择终止妊娠。孕妇 2 继续妊娠，我们随访至女婴出生后 1 年，体检提示体格及智力发育正常。检测结果及妊娠结局见表 2。

表 2　3 例样本检测结果及妊娠结局

Table 2　Test results and pregnancy outcomes of the three specimens

病例	样本类型	胎儿性别	CNV-seq 结果	MLPA 结果	是否遗传	妊娠结局
1	羊水	女	seq[hg19]dup(X)(p21.2) chrX:g.30860000_31260000	DMD 基因 E64-79 重复	否	终止妊娠
2	羊水	女	seq[hg19]dup(X)(p21.1) chrX:g.32820000_33560000	DMD 基因 E1-7 重复	否	出生，随访一切正常
3	皮肤组织	女	seq[hg19]del(X)(p21.1) chrX:g.31760000_32000000 seq[hg19]dup(21)(21q11.2q22.3)(chr21:g.14300000_48129895)	DMD 基因 E45-51 缺失	是	/

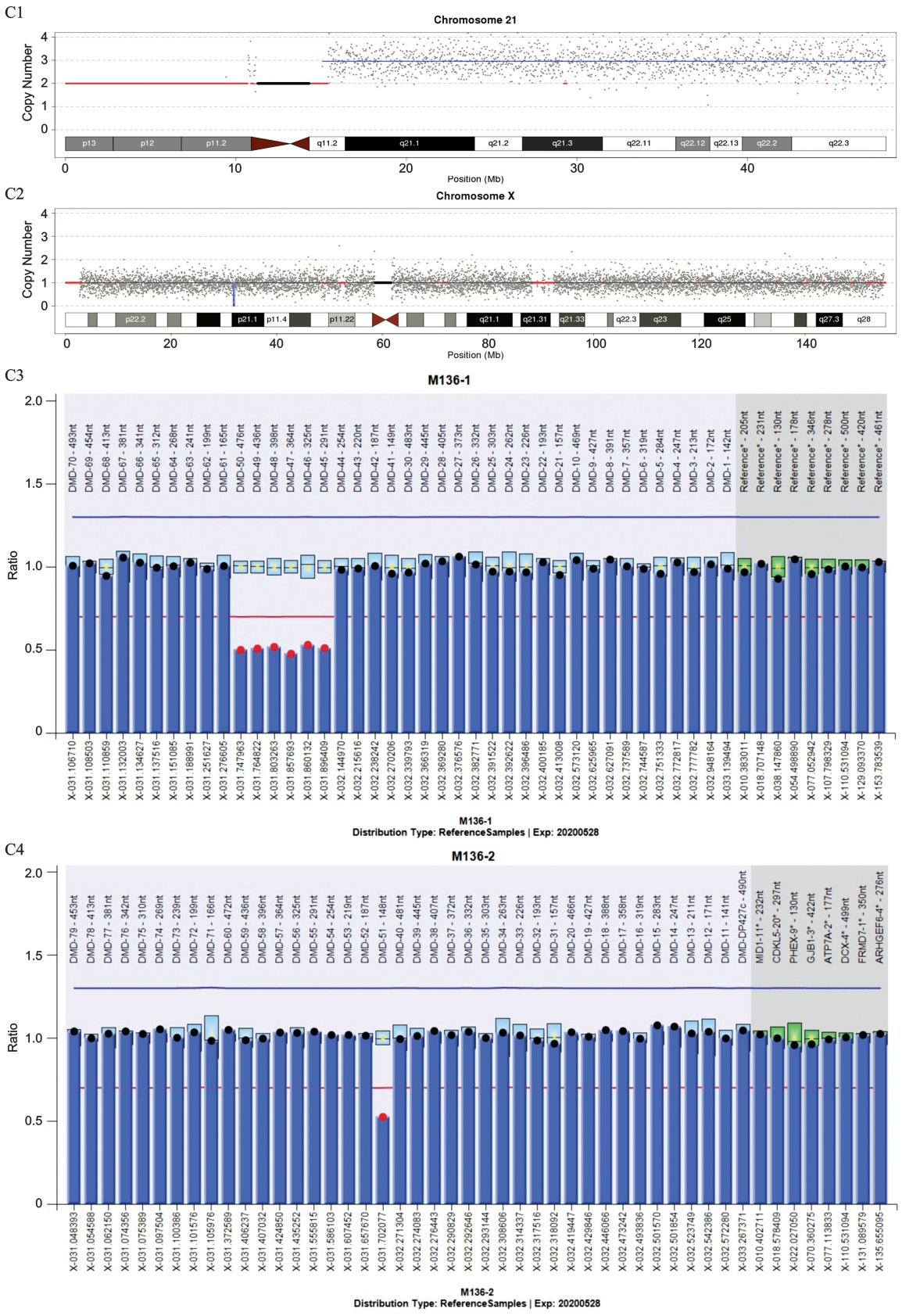
注："/"表示流产。



注：(B1)胎儿 CNV-seq：seq[hg19]Xp21.1(32820000-33560000)×3；(B2)胎儿 MLPA：DMD 基因 1-7 号外显子重复；(B3)孕妇 2 MLPA 未见 DMD 基因缺失或重复。

图 2　孕妇 2 及其胎儿 CNV-seq、MLPA 检测结果

Fig.2　CNV-seq and MLPA detection results of the pregnant woman 2 and her fetus



注：(C1)胎儿 CNV-seq：seq[hg19]21q11.2q22.3(14300000-48129895)×3，为 21 三体；(C2)胎儿 CNV-seq：seq[hg19]Xp21.1(31760000-32000000)×1；(C3)和(C4)孕妇 3 MLPA：DMD 基因 45-51 号外显子缺失。

图 3　孕妇 3 及其胎儿 CNV-seq、MLPA 检测结果

Fig.3　CNV-seq and MLPA detection results of the pregnant woman 3 and her fetus

3 讨论

3.1 DMD 的研究现状

DMD 是一种致命的遗传性肌病，至今尚无特异性治愈方法。尽管国内外报道了各种治疗手段，如基因治疗、细胞治疗和药物治疗等，但也只能暂时减缓疾病进程[7-8]。因此在出生前及时发现并终止妊娠是阻止 DMD 患儿出生、降低出生缺陷率的关键。DMD 女性携带者一般表型正常，没有 DMD 家族史的女性一般不会主动进行 DMD 基因的筛查，这使得 DMD 患者尤其是新发病例通常在出生前无法被发现。目前产前诊断仍是防止 DMD 患者出生的主要手段。

3.2 CNV-seq 在染色体及基因疾病诊断中的应用价值

在临床中，可通过产前筛查并对筛查高危人群进行产前诊断来避免染色体病患儿的出生[9]。随着高通量测序技术的不断发展，CNV-seq 已广泛应用于临床疾病诊断中。向萍霞等[10]提出可将 CNV-seq 作为高危孕妇的一线产前诊断方法，并作为羊水细胞染色体核型分析的补充诊断工具。CNV-seq 可明显提高羊水染色体嵌合体的诊出率，并广泛应用于平衡易位携带者的产前诊断中[11-12]。虽然 CNV-seq 可识别常规核型分析无法检测到的微缺失和微复制[13]，但关于该技术发现单基因疾病的报道甚少。本研究中，3 例孕妇均存在高危因素，分别为血清学筛查高风险、无创高风险及无创高风险伴 B 超指标异常，3 例胎儿均无 DMD 相关指征，然而 CNV-Seq 却意外检测出了 3 例样本的染色体 Xp21.2 或 Xp21.1 区域存在小片段的缺失或重复，此区域覆盖了 DMD 基因的外显子部分片段，MLPA 技术验证结果与之一致。其中流产胎儿还被检测出 21q11.2q22.3 区域的重复(即 21-三体综合征)。因此，当孕妇存在产前诊断指征时及时进行羊水染色体和基因诊断，也许会有意想不到的发现。

3.3 DMD 的遗传咨询

DMD 通常影响男性，然而在极少数情况下，女性也会受到影响，约 8%的女性 DMD 携带者患有肌无力和心肌病[14]。Takeshita 和 Chen 等[15-16]报道了关于女性携带者患 DMD 的病例。本研究中孕妇 1 的女性胎儿 Xp21.2 处存在 DMD 基因的 16 个外显子重复，重复范围比较大，经遗传门诊咨询和慎重考虑后，该孕妇选择了终止妊娠。孕妇 2 则选择了继续妊娠，胎儿出生后一切正常。由于女性携带者的发现与咨询对于 DMD 的预防非常重要，本研究对比了胎儿和其母亲的 DMD 基因，孕妇 1 和孕妇 2 的胎儿为新发突变，考虑两例孕妇均存在生殖腺嵌合的可能性。孕妇 3 为 DMD 携带者。高值等[17]提出如果女性存在生殖腺嵌合，再孕时胎儿仍有可能发生 DMD 基因变异。因此对于有 DMD 患者妊娠史或生育史的女性，即使本人未携带 DMD 基因变异，我们仍建议其再孕时选择合适的诊断技术如 CNV-seq 进行 DMD 产前诊断。

综上所述，CNV-seq 作为近年来新兴发展的技术，应用于羊水及流产物检测有助于发现包括非整倍体在内的染色体异常，还可能检测出意想不到的染色体片段缺失或重复所致的单基因病，提高了染色体异常疾病的检出率，为全面评估胎儿提供理论依据，同时有助于临床医生给有再孕需求的不良孕产史妇女提供更好的生殖遗传咨询。

[参考文献]

[1]Fortunato F，Farnè M，Ferlini A.The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin[J].Neuromuscul Disord，2021，31(10)：1013-1020.

[2]Keegan N P.Pseudoexons of the DMD Gene[J].J Neuromuscul Dis，2020，7(2)：77-95.

[3]Nascimento O A，Medina C J，Camacho S A，et al.Consensus on the diagnosis，treatment and follow-up of patients with Duchenne muscular dystrophy[J].Neurologia (Engl Ed)，2019，34(7)：469-481.

[4]杨李，许晓燕，朱静，等.Duchenne 肌营养不良家系临床表型及遗传学分析[J].中国当代儿科杂志，2020，22(8)：867-873.

[5]马韵翼.孕早期自然流产组织基因组拷贝数变异分析[D].郑州：郑州大学，2019.

[6]徐晓昕，徐志勇，王勤，等.结合多重连接探针扩增技术与第二代测序技术建立假性肥大型肌营养不良产前诊断技术平台[J].中华检验医学杂志，2018，41(1)：70-72.

[7]Elangkovan N，Dickson G.Gene therapy for Duchenne

muscular dystrophy[J].J Neuromuscul Dis,2021,8(s2):S303-S316.

[8]Hanson B,Wood M J A,Roberts T C.Molecular correction of Duchenne muscular dystrophy by splice modulation and gene editing[J].RNA Biol,2021,18(7):1048-1062.

[9]朱若男,时盼来,赵军红,等.20 038 例羊水染色体核型与不同产前诊断指征关系的分析[J].中华医学遗传学杂志,2021,38(3):300-302.

[10]向萍霞,刘翎,胡晞江,等.CNV-seq 在高危孕妇产前诊断中的应用价值[J].中华医学遗传学杂志,2023,40(1):17-20.

[11]高明雅,柴玉琼,王亚男.核型分析联合 CNV-seq 技术在羊水染色体嵌合体检测中的应用[J].检验医学与临床,2022,19(15):2082-2085,2090.

[12]屈素真,时盼来,张田园,等.CNV-seq 与染色体核型分析在平衡易位携带者产前诊断中的应用[J].中华医学遗传学杂志,2022,39(4):366-369.

[13]Luo S,Chen X,Yan T,et al.Application of copy number variation sequencing in genetic analysis of miscarriages in early and middle pregnancy[J].Cytogenet Genome Res,2020,160(11-12):634-642.

[14]Silva T H D,Anequini I P,Fávero F M,et al.Functional performance and muscular strength in symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy[J].Arq Neuropsiquiatr,2020,78(3):143-148.

[15]Takeshita E,Minami N,Minami K,et al.Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions[J].Neuromuscul Disord,2017,27(6):569-573.

[16]Chen J,Zheng H,Wang Z,et al.A female carrier of a novel DMD mutation with slightly skewed X-chromosome inactivation shows a suspected case of Becker muscular dystrophy in a Chinese family[J].Mol Genet Genomics,2021,296(3):541-549.

[17]高值,刘莉娜,王艳丽,等.中原地区 67 个 DMD 家系产前诊断结果的分析[J].中华医学遗传学杂志,2022,39(7):669-673.

[专业责任编辑:童国庆]

[中文编辑:郭乐倩;英文编辑:杨周岐]