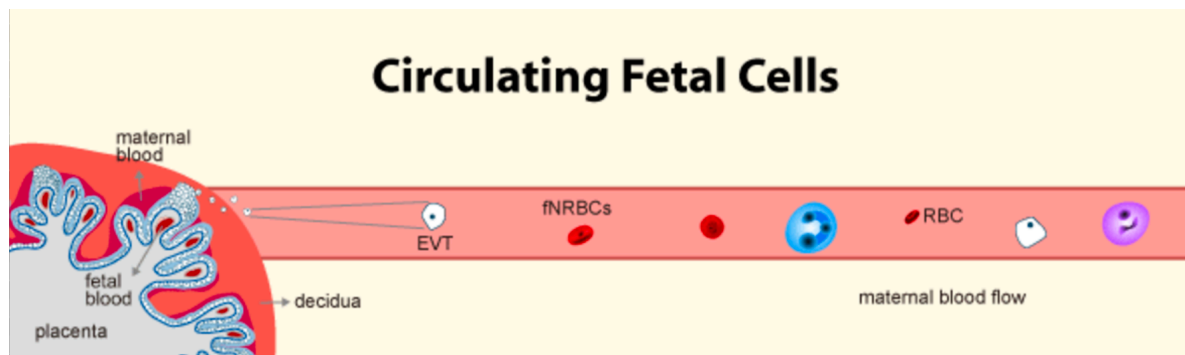
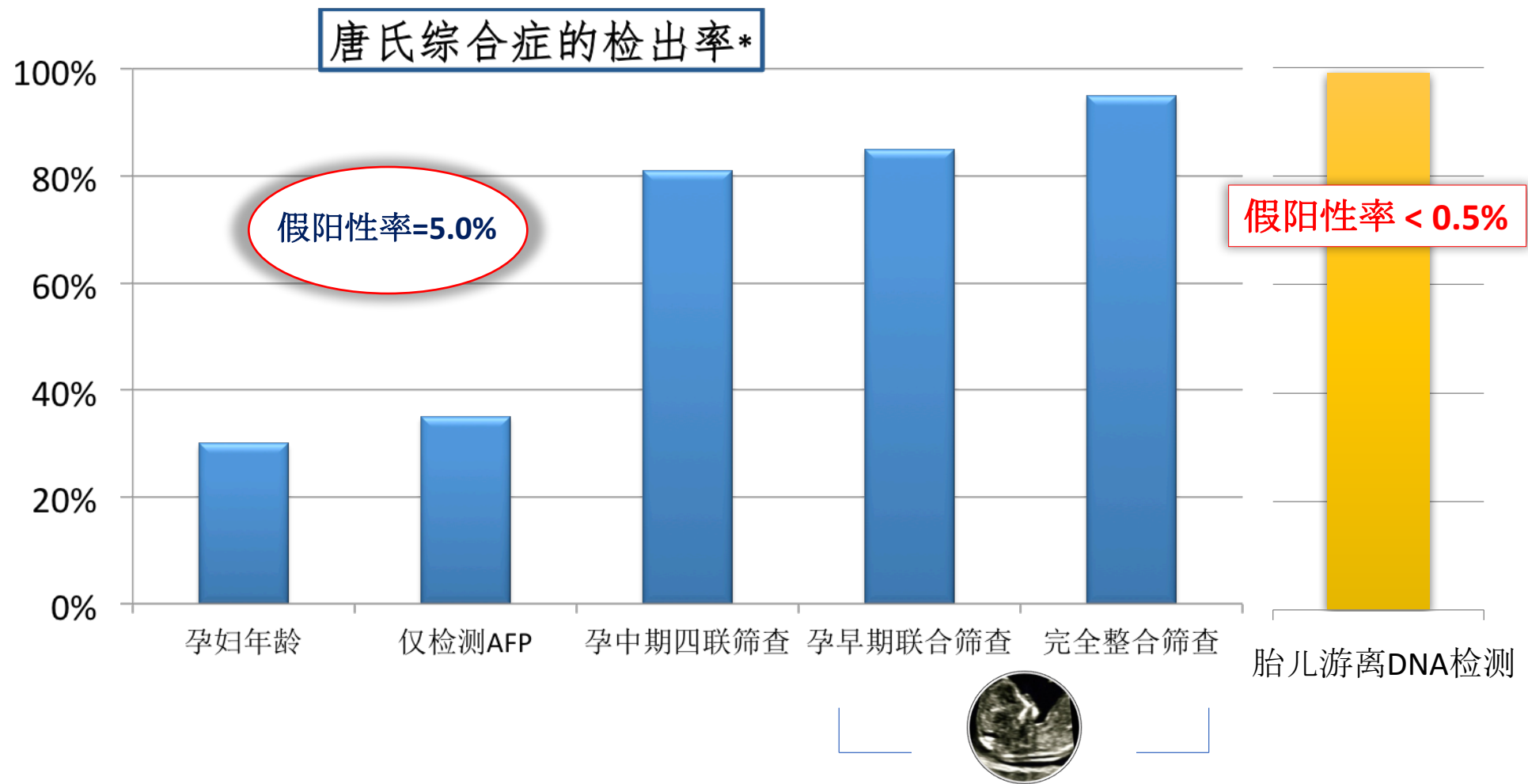


## 母血中胎儿细胞的检测在产前诊断中的应用



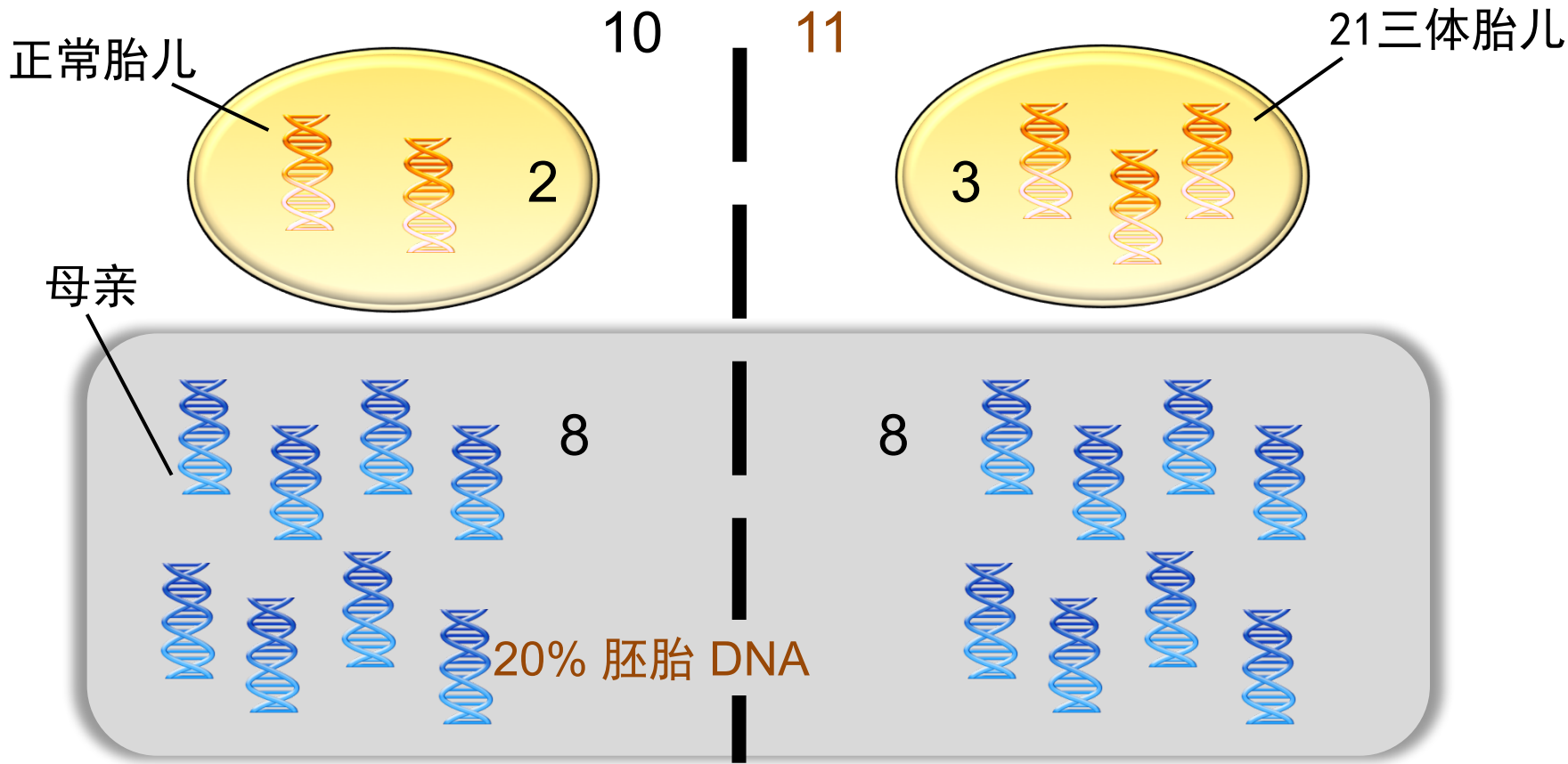
北京协和医院妇产科 蒋宇林

## 针对胎儿游离DNA检测带来胎儿非整倍体产前筛查的整体进步



\*ACOG practice bulletin no. 77, Obstet Gynecol 2007;109:217-27.

检测母血浆中来自21号染色体的总游离DNA含量变化来进行胎儿染色体异常的推测

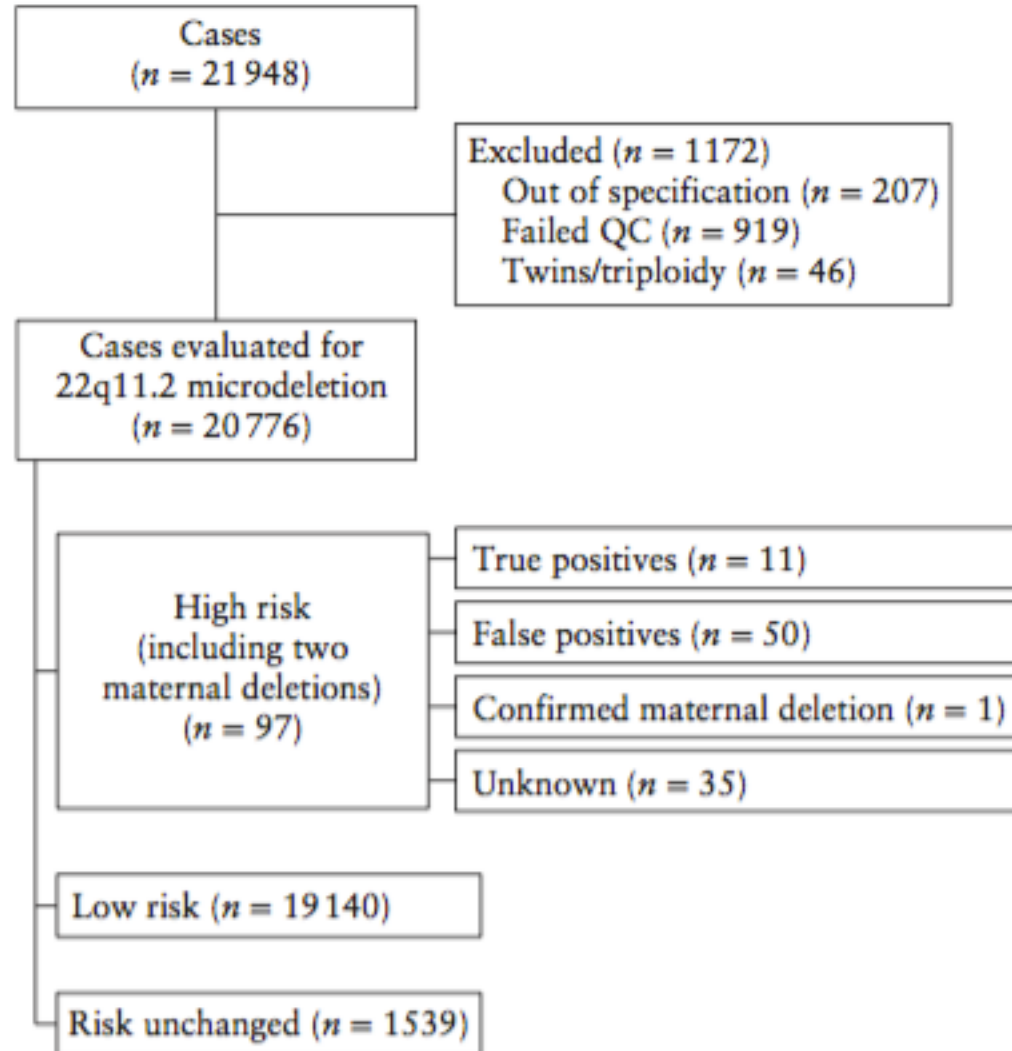


## 目前NIPTI临床应用的主要局限性

- 目标疾病仅为T21/18/13，但是需要全基因组进行测序，大量无效的测序工作带来海量的无效数据
- 针对胎盘来源的滋养层细胞检测检测，无法真正检测胎儿自身的染色体结构
- 无法针对胎儿游离DNA进行深入测序，无法发现片段过小的胎儿染色体异常（无法诊断胎儿微缺失微重复综合征）
- 由于大量混杂有来自母亲的游离DNA，造成单基因病特别是隐性遗传病的诊断难度



# 针对22q11.2微缺失综合征 — 20776例产前筛查研究



## 研究部分结论

- 筛查的阳性率0.46%
- 筛查阳性预测值18% (11.6-47.7%)
- 不合并超声检测异常的高危病例PPV仅4.9%
- 22q11.2微缺失的发生率约为1/1087左右

## 目前仍不适合大规模进行微缺失/微重复综合征NIPT筛查

- 筛查的阳性率及阳性预测值较低 (20-30%以下)
- 筛查的检出率, 假阳性率, 阴性预测值不明
- 微缺失的表型多样, 甚至可以相对正常
- 部分胎儿微缺失综合征是由于母体携带而来
- 目前NIPT测序深度要达到染色体小片段改变的检出是困难的

# 关于NIPT假阴性病例

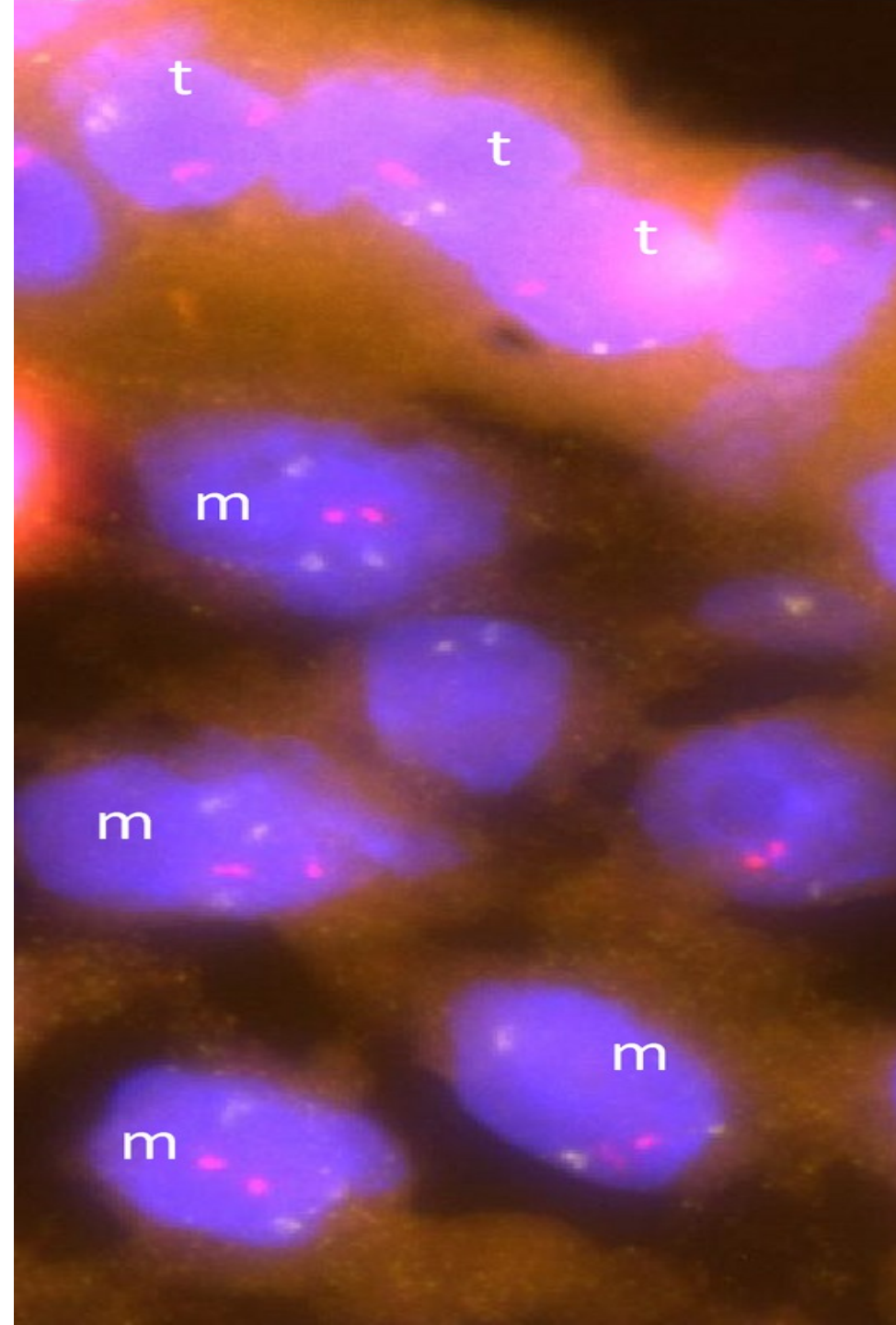
- 薛某，33岁。宫内孕27周
- 我院早孕期NT测定1.2mm，中孕期唐氏筛查T21/T8均低风险 ( $<1/1000$ )
- 中孕期超声提示双侧脉络膜囊肿，双手握拳姿势可疑
- 自行外送两家较大检测机构检测NIPT Z值为-1.4及3.3
- 25周我院行脐穿胎儿为47, XN, +18
- 引产后胎儿外观略符合18三体外观，病理解剖提示存在主动脉瓣口的增厚和狭窄
- 多点留取胎盘/脐带进行病理及遗传检测



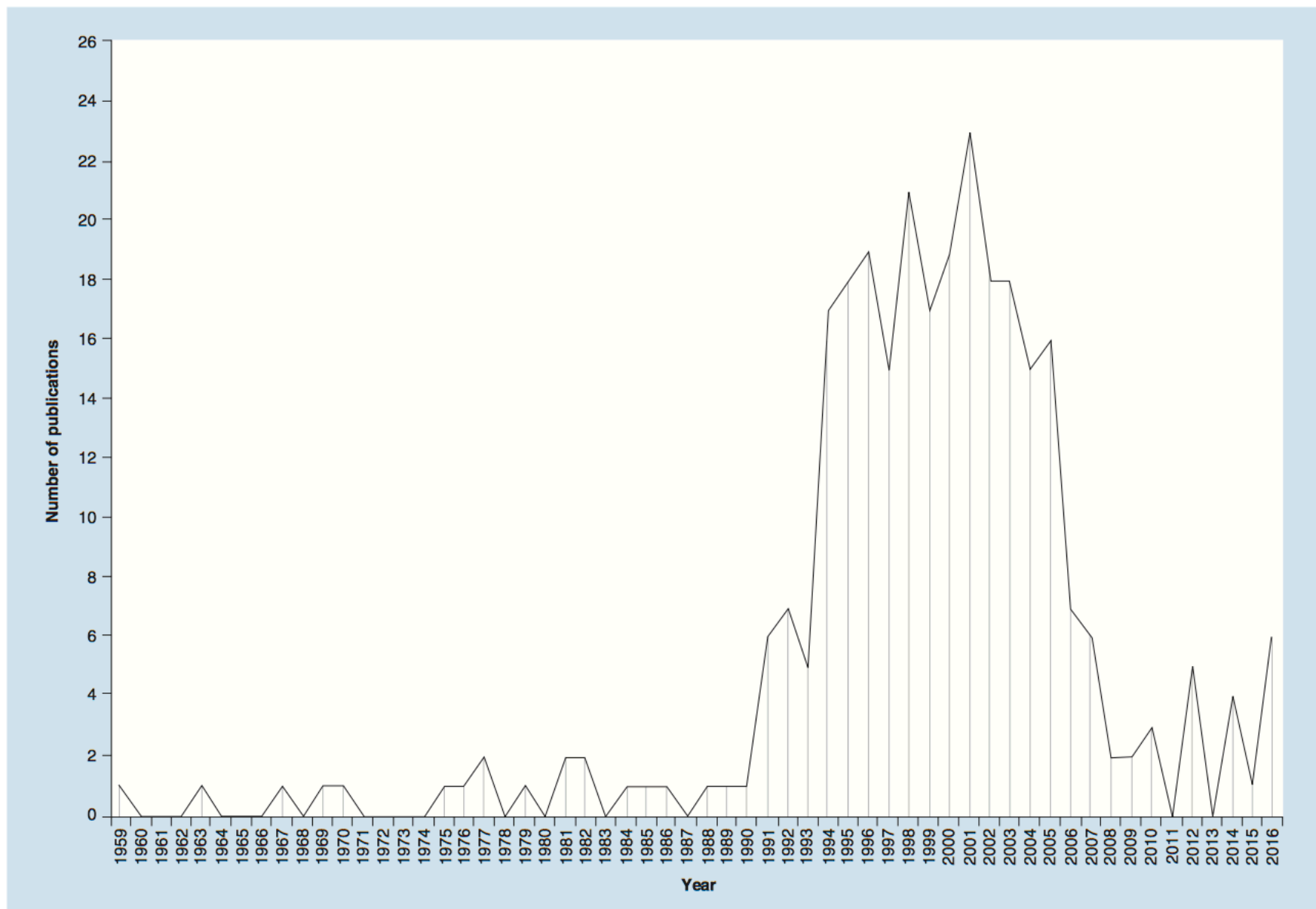
胎儿典型的握拳姿势



胎儿典型的握拳姿势



## 关于胎儿细胞用于产前诊断的研究文献统计

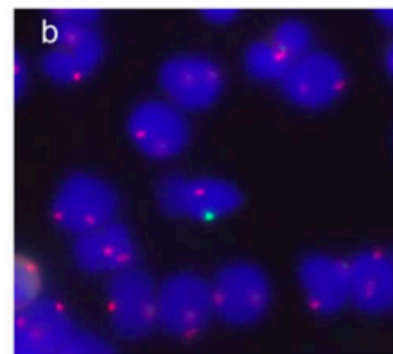
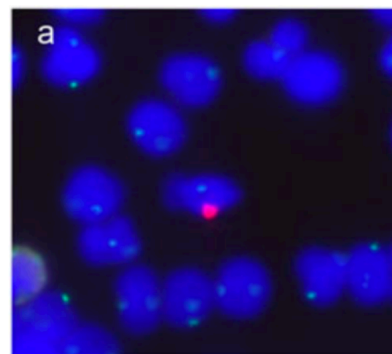
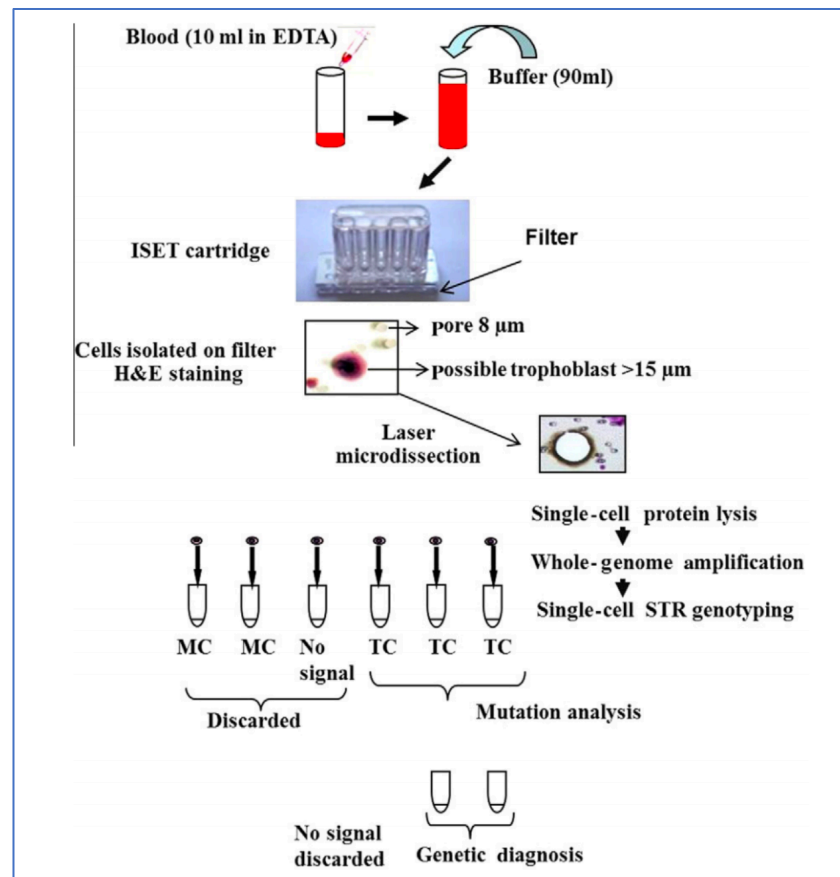


# 能够在母血中检测到的胎儿细胞

细胞种类	主要特点
滋养层细胞	最早能检测的胎儿细胞，但清除快，没有特异性抗原，有嵌合性
胎儿淋巴细胞	可在外周血中长期存在，不易区分是哪次妊娠的细胞
胎儿中性粒细胞	缺乏特异性抗原，不易与母体的中性粒细胞分辨
胎儿有核红细胞	目前认为最有价值的研究对象，但含量较低，不易捕获

# 胎儿滋养层细胞

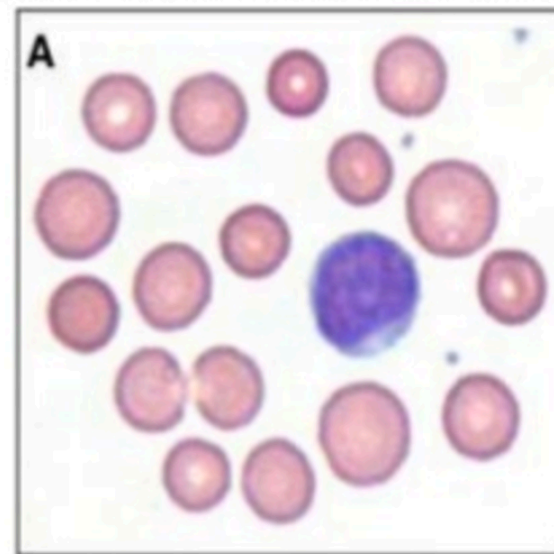
- 近些年受到普遍重视的细胞种类
- 细胞数量较多
- 形态上容易和其他母体细胞区分
- 但缺乏较好的特异性选择性抗体
- GB17及GB25，抗人白细胞抗原G都有过报道，但效果不佳
- 目前主要通过细胞大小选择，去除母体白细胞及红细胞后进行鉴定
- 对于男胎会有较高的特异性，女胎不易很好的鉴别
- 会有极少量的前次妊娠的细胞影响
- 有1%的局限性嵌合异常的干扰



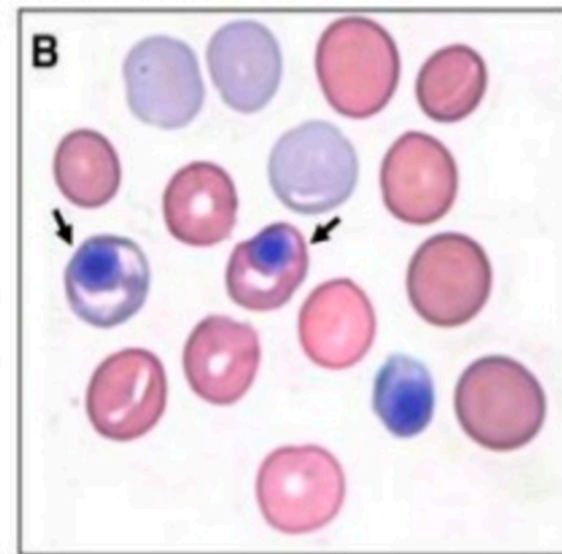


# 胎儿有核红细胞

- 目前比较受到重视的细胞种类
- 特异性的来自胎儿本身
- 除外母体血液疾病以外，孕妇外周血中有核红细胞绝大多数来自胎儿
- 妊娠结束后很快被清除
- 主要的问题在于孕妇外周血中含量非常少（1个 / ml）
- 所以细胞的富集是最关键的问题
- 有较好的特异性选择抗体，需要组合使用





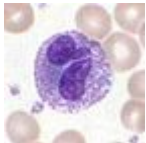
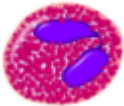
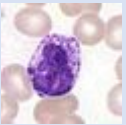
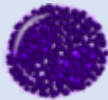


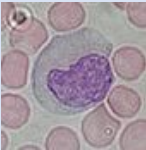

A. Maternal RBCs



B. Fetal RBCs (nucleated)

# 1 有核红细胞的形态观察

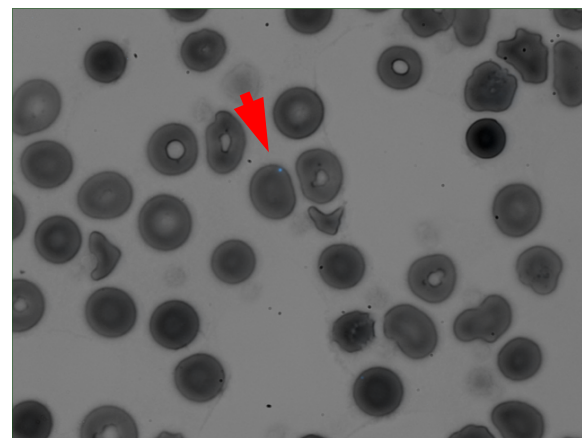
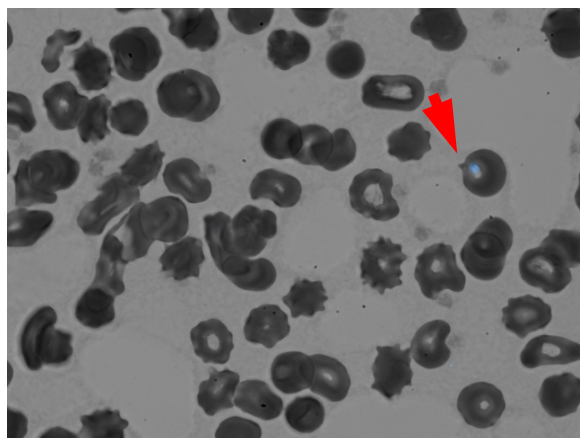
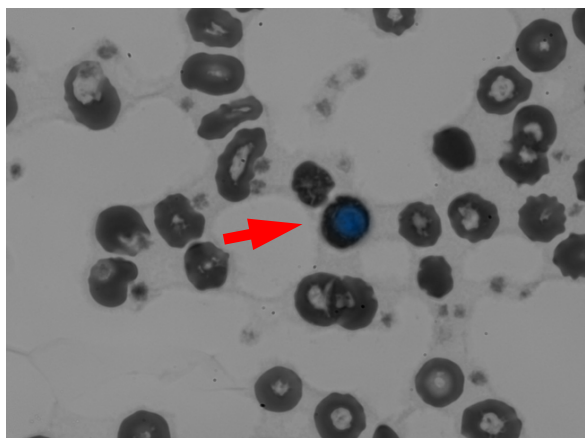
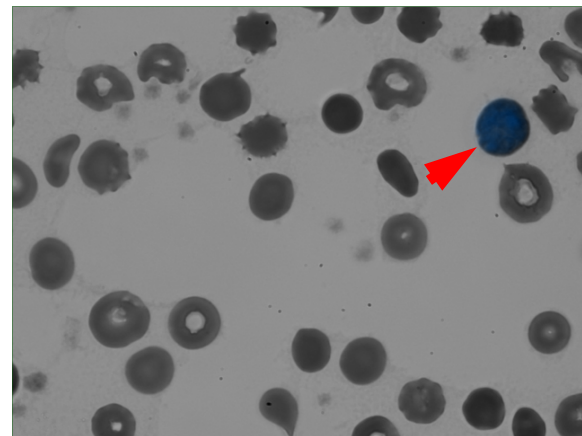
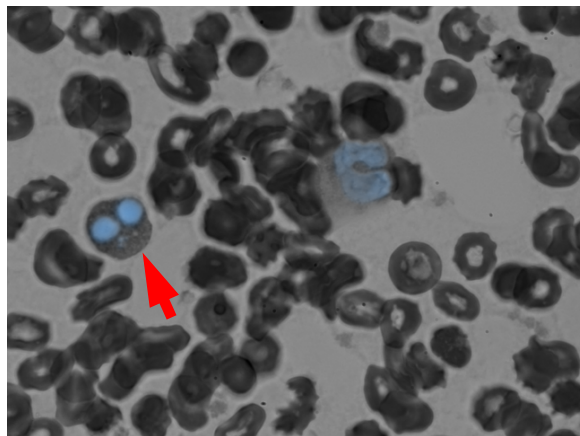
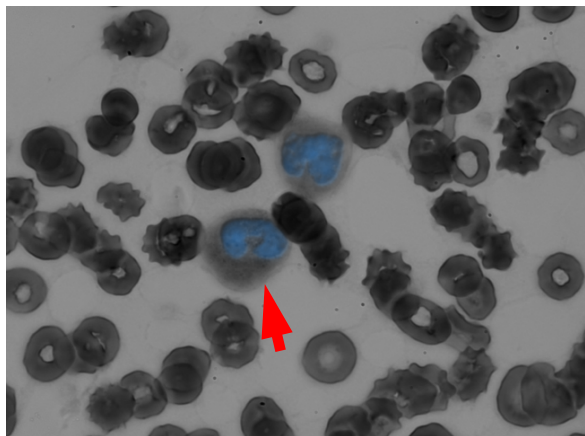
1.1 形态上，胎儿有核红细胞除与母体有核红细胞区分外，还要注意与母体的小淋巴细胞进行区别

Type	Microscopic appearance	Diagram	Approx. % in adults	Diameter (μm)
嗜中性粒细胞 Neutrophil			62%	10–12
嗜酸性粒细胞 Eosinophil			2.3%	10–12
嗜碱性粒细胞 Basophil			0.4%	12–15
淋巴细胞 Lymphocyte			30%	<b>Small lymphocytes 7–8</b> Large lymphocytes 12–15
单核白细胞 Monocyte			5.3%	15–30



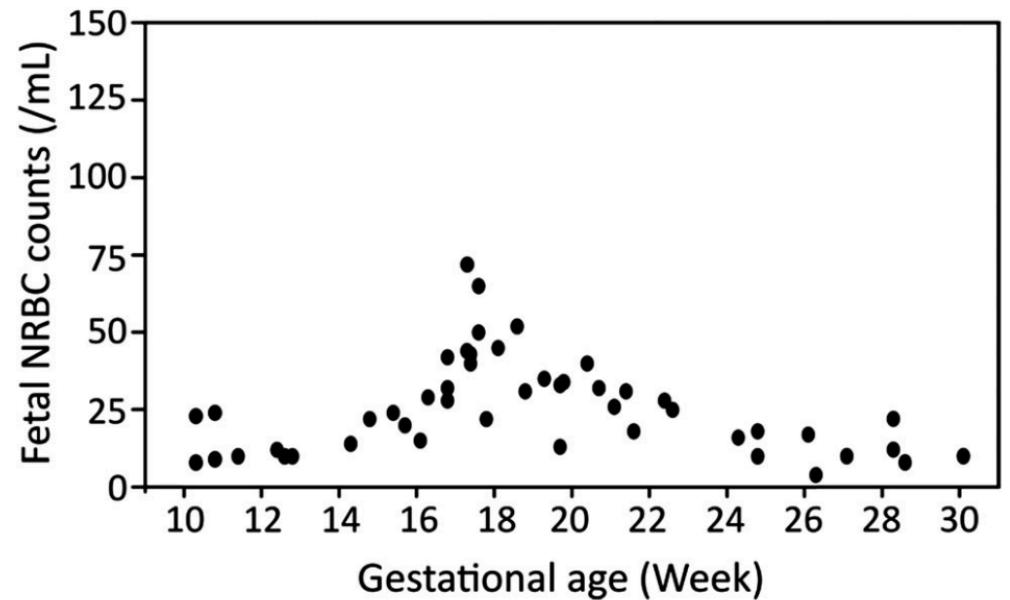
# 1 对胎儿有核红细胞进行形态观察

## 1.2 胎儿有核红细胞的形态观察（脐血）



## 胎儿有核红细胞应该是产前诊断最有前途的靶细胞

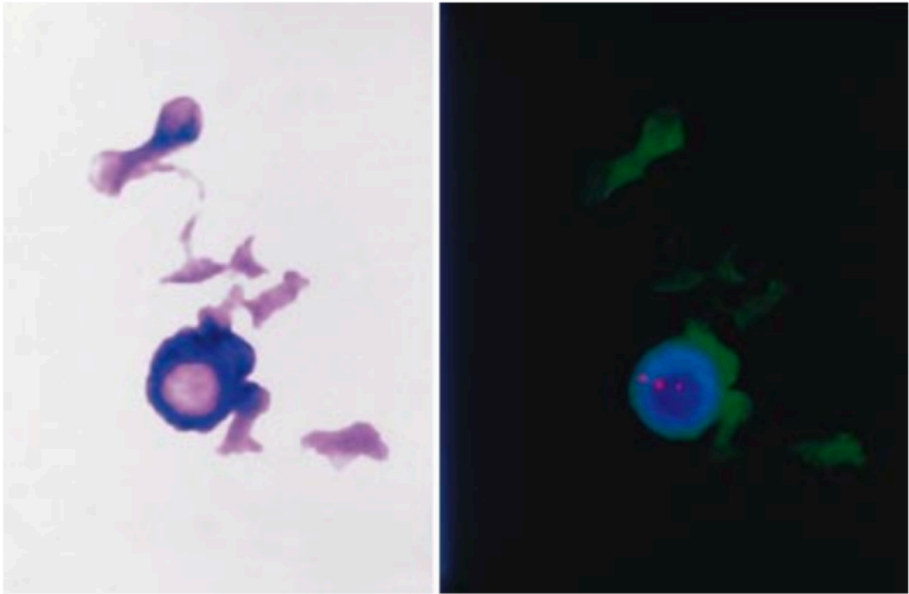
- 正常人的外周血中不存在有核红细胞
- 含有胎儿完整基因组，便于遗传学和分子生物学分析
- 具有较多且相对特异的抗原成份如CD71、CD36、GPA、珠蛋白（包括Hb $\gamma$ 、Hb $\epsilon$ 和Hb $\zeta$ ）和半乳糖残基等；
- 妊娠早期大量出现，整个妊娠期持续存在，产后约90天在母体外周血中消失，用于诊断时不受前次妊娠影响



# 胎儿有核红细胞的特异性抗体 — CD71

- 胎儿血红蛋白染色法（HbF staining）
- CD71：转铁蛋白受体
  1. 存在于早期红细胞、网状红细胞以及活化的淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞的细胞膜上，成熟的红细胞和未活化的淋巴细胞上不存在
  2. 孕妇外周血中淋巴细胞较非孕妇女高。由于活化的淋巴细胞也分泌CD71，并与FNRBCs竞争结合CD71抗体，影响效果
  3. 在成熟的幼红细胞表达最好

TRISOMY 13 IN FETAL CELLS FROM MATERNAL BLOOD



Spots (chromosome 13 probe)	0	1	2	3	4
Case 503 (42 cells)	14%	12%	26%	48%	0
Control (40 cells)*	5%	3%	85%	7%	0
X/Y result	X0	XX	XY	Y0	
Case 503 (66 cells)	52%	1%	47%	0%	

# 胎儿有核红细胞的特异性抗体 — GPA / $\epsilon$ 链珠蛋白抗体

- GPA，即血型糖蛋白A（glycophorin A），是一种红细胞系特异性唾液糖蛋白，在红细胞膜上大量表达，在白细胞上不存在
- 有研究发现，GPA抗体容易引起母体无核红细胞的凝集，改变FNRBCs的光散射和荧光特性，进而影响流式细胞仪的分离效果和后续的FISH分析
- 一般与CD71联合应用
- $\epsilon$ 链珠蛋白抗体是针对胎儿血红蛋白链的特异性抗体
- $\epsilon$ 链珠蛋白在妊娠早期的后期和妊娠中期的开始阶段表达量较高，到妊娠中期的后期变少，10周左右是最佳时期

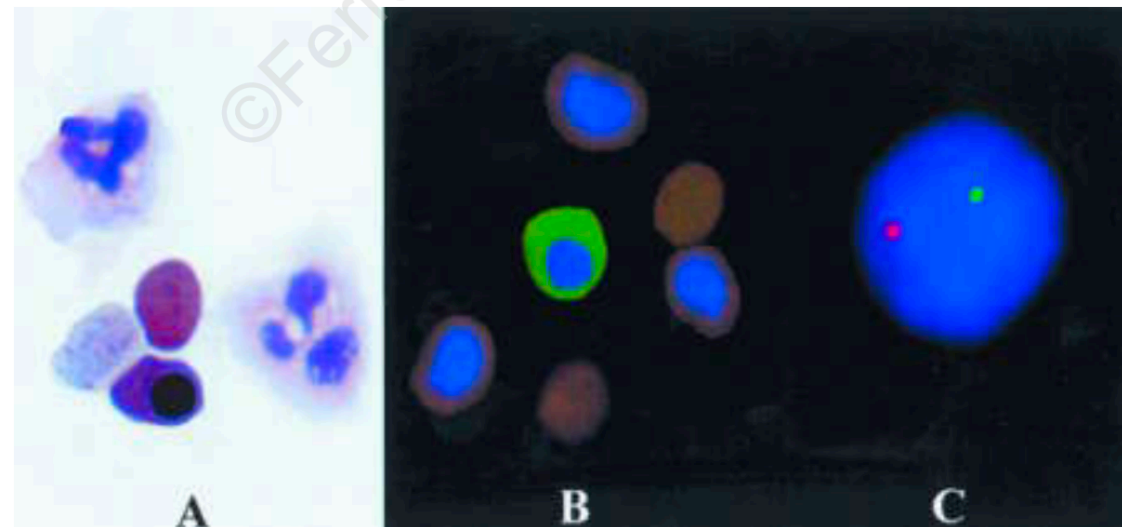
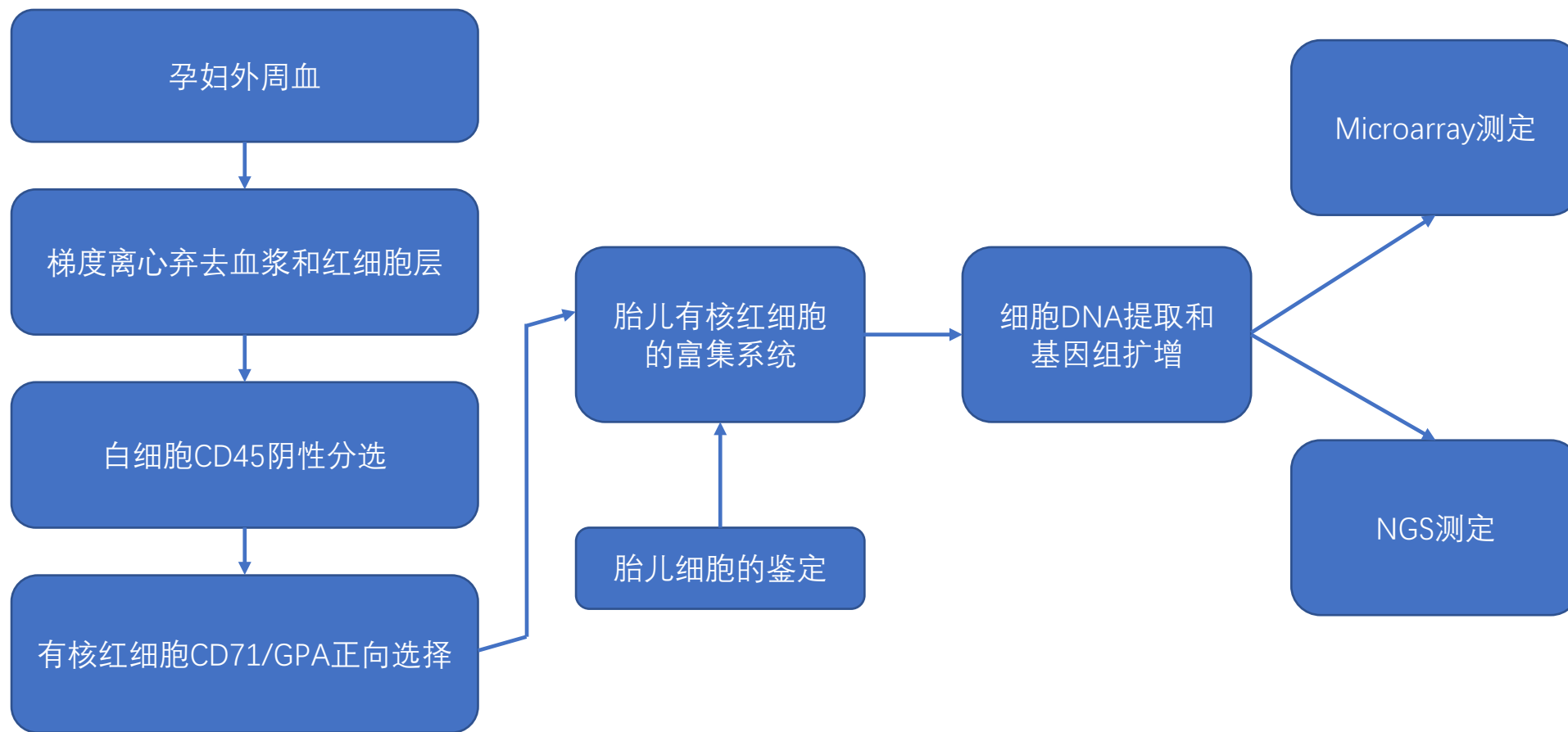


Figure 1. Fetal erythroblasts in maternal blood demonstrated by (A) Kleihauer-Giemsa staining, (B)  $\epsilon$ -hemoglobin green fluorescent stain, and (C) FISH for X and Y-signals (red = Y-chromosome, green = X chromosome).

CD45，CD14，CD32是目前应用比较多的孕妇白细胞特异性抗体，往往作为有核红细胞的反向选择方法

## 富集分离胎儿有核红细胞的基本流程示意图

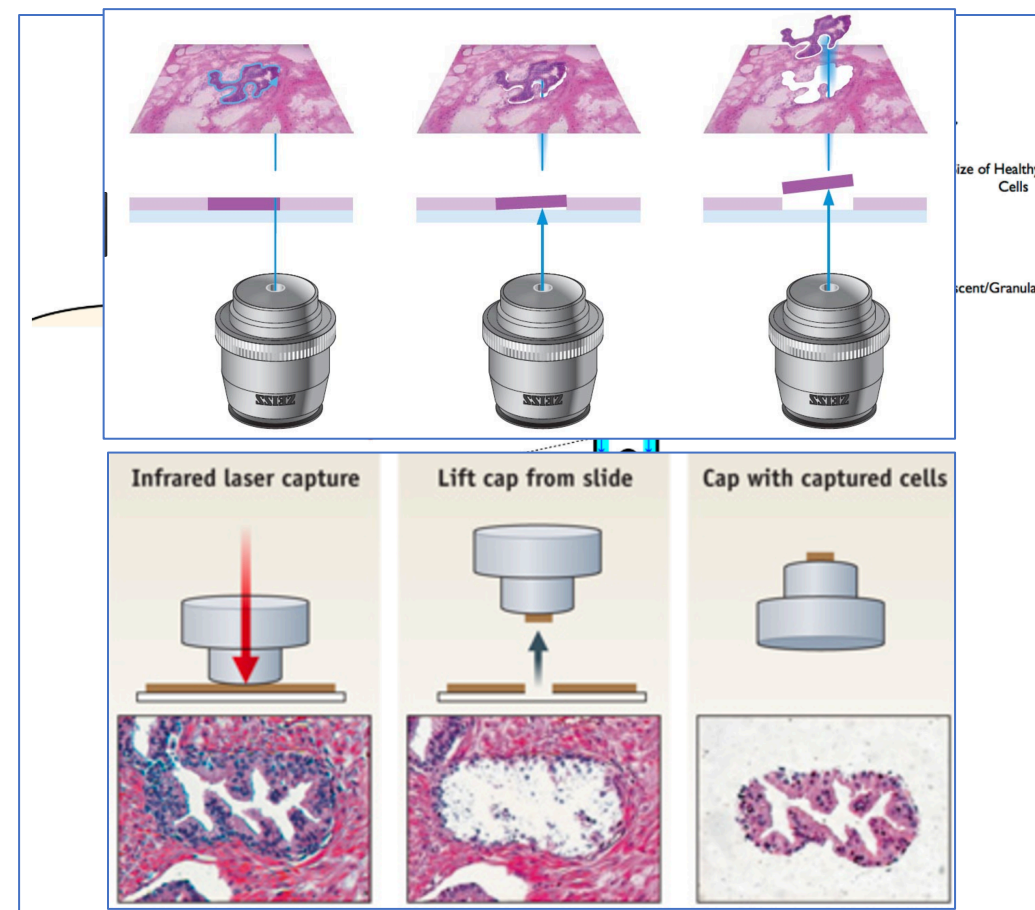


# 什么样的技术平台可以用于胎儿细胞的分离和产前诊断

- 必须针对某一特定的细胞类型
- 所使用的分选抗体必须是针对靶细胞有特异性和敏感度的
- 必须建立完善的操作流程和各种参数设定，包括标本采集，保存，前期处理等
- 富集鉴定以后需要能够很好的洗脱或转移进行后续的遗传诊断
- 富集到的靶细胞纯度必须足够高，目前考虑应大于90-95%
- 富集到的细胞数量必须要足够用于后续CMA或NGS的检测，尽量减少扩增带来的误差

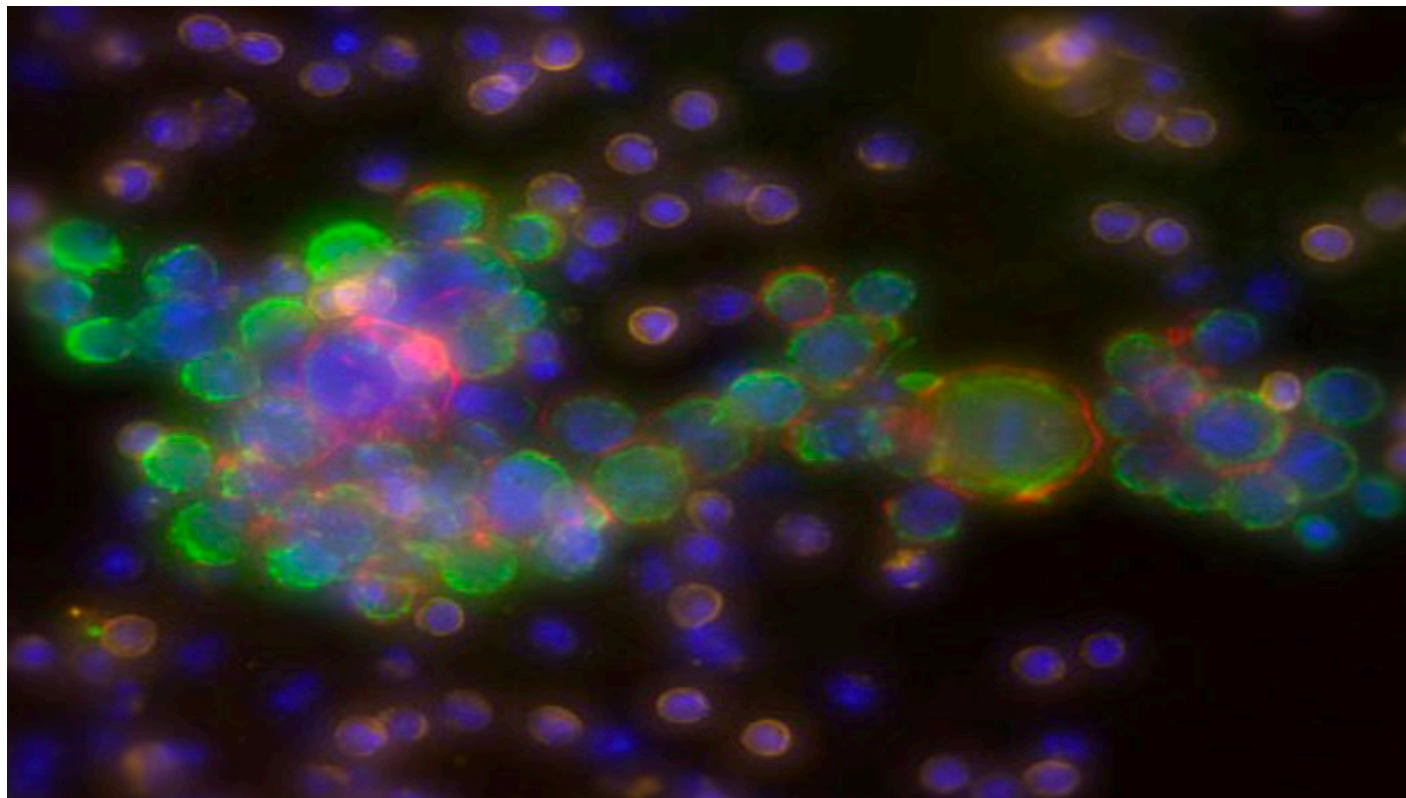
# 常用的一些胎儿细胞的富集分离方法

- 流式细胞仪分选 (flow cytometer, FCM)
  - 效果不错, 但需要大型的设备和专业人员
- 磁激活细胞分选法 (magnetic activated cell sorting, MACS)
  - 是一种免疫磁性分离技术, 利用结合磁性微粒的单克隆抗体标记细胞, 在外加磁场的作用下, 将所需要的阳性细胞分离出来, 结合微流控技术可以很好的实现细胞的分选
- 密度梯度离心法
  - 即利用母血细胞与FNRBCs的细胞密度差异进行分离的方法, 分离介质为聚蔗糖-泛影葡胺。密度梯度离心法操作简便, 费用较低, 所需时间较短, 但获得的FNRBCs纯度较低, 往往用于前期的处理, 不能直接用于产前诊断
- 单细胞显微操作分离法
  - 将密度梯度离心富集的孕妇外周血细胞置于显微镜下, 利用FNRBCs形态学的特征, 用微显微操纵器将其逐个地挑选出来。





## 自动化的细胞扫描和分选系统





拿到这些胎儿细胞我们可以做什么？

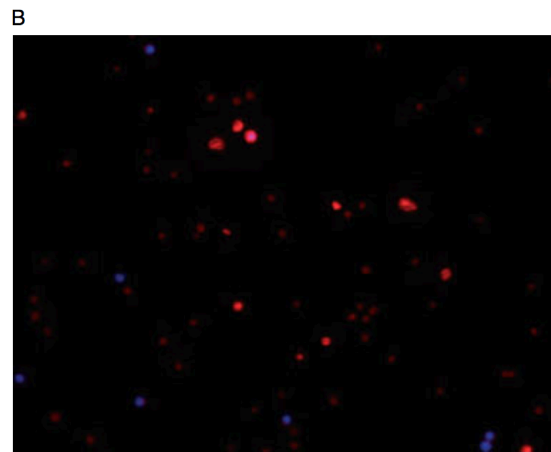
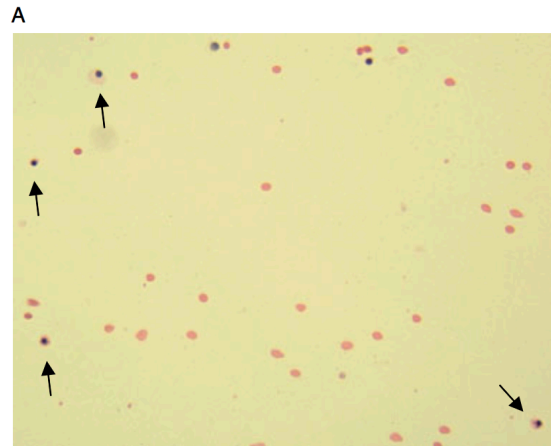
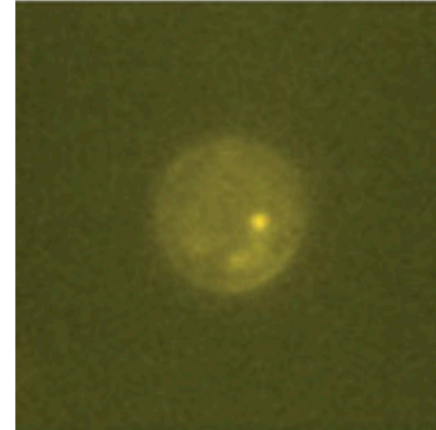
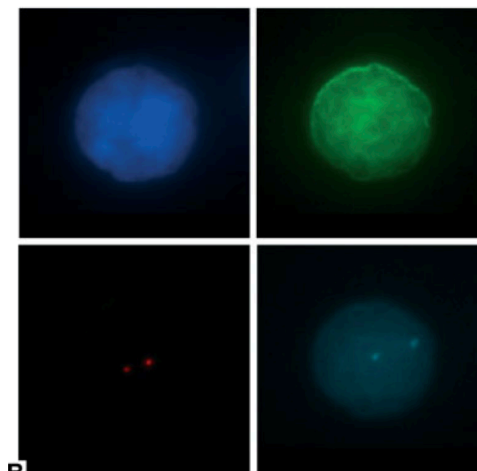
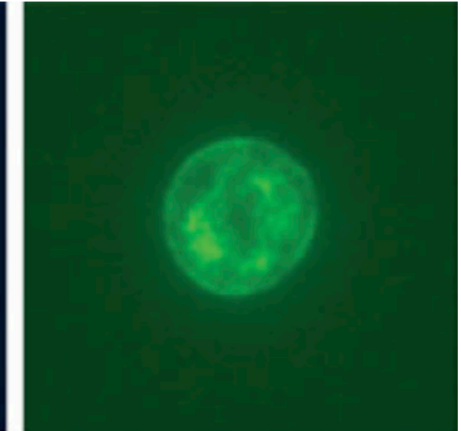
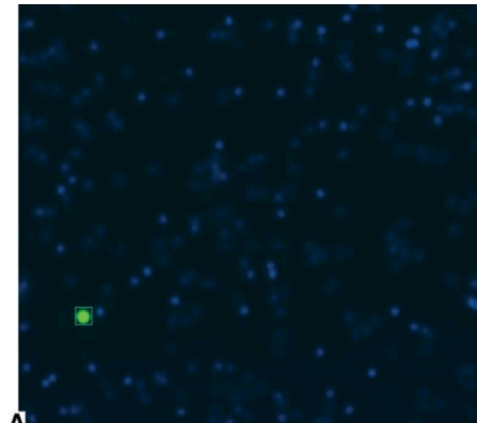


Figure 3—(A) H&E stained blood smear from blood of an 11-week fetus with nucleated red cells indicated by arrows. (B) Selective immunostaining of fetal blood smear with an antibody specific for the  $\epsilon$ -chain of fetal hemoglobin



B

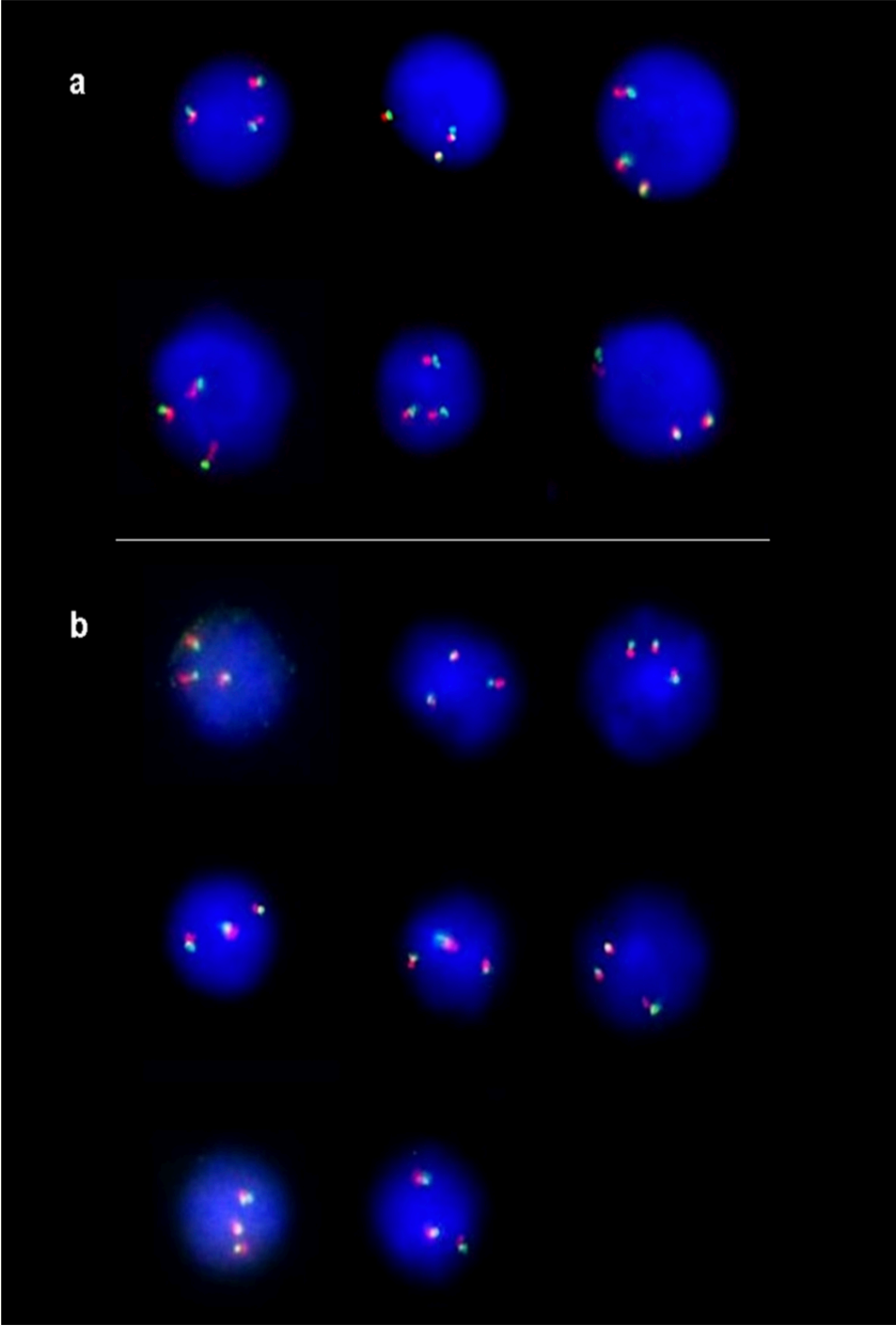
Figure 2—A single  $\epsilon$ -globin positive XY cell detected by analysis of ten maternal PBS. Channel-specific images of the DAPI-stained nucleus,  $\epsilon$ -chain antibody signal, Y and X FISH signals are shown at top left, top right, bottom left and bottom right, respectively

# 密度梯度离心后的富集细胞进行FISH鉴定

- 172例孕妇，采集24ml外周血
- 密度梯度离心处理富集胎儿细胞
- FISH双探针（21或18号染色体上分别两个探针）标记所有细胞

	正常胎儿	异常胎儿
T21	<1.7/1000cell	>3.8/1000cell
T18	<1.8/1000cell	>3.8/1000cell

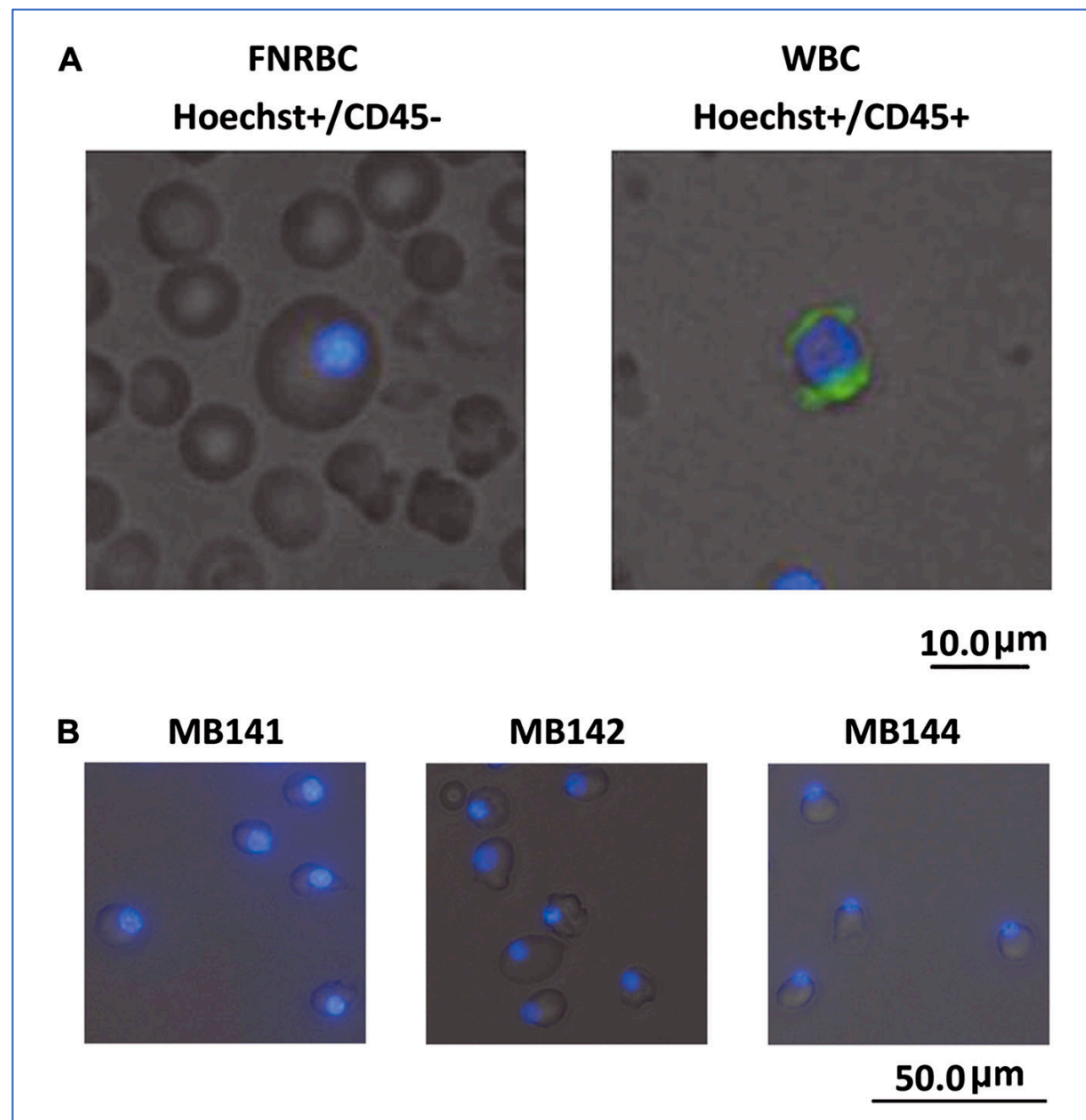
- 存在一例假阴性，检出率87.5%（7/8）



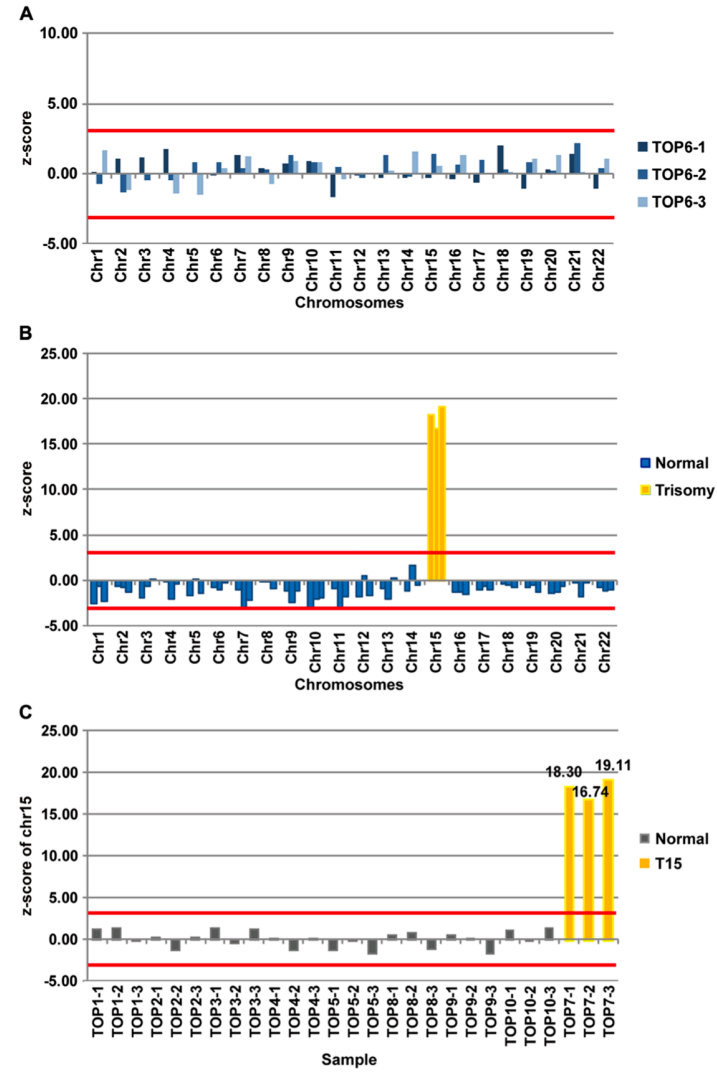
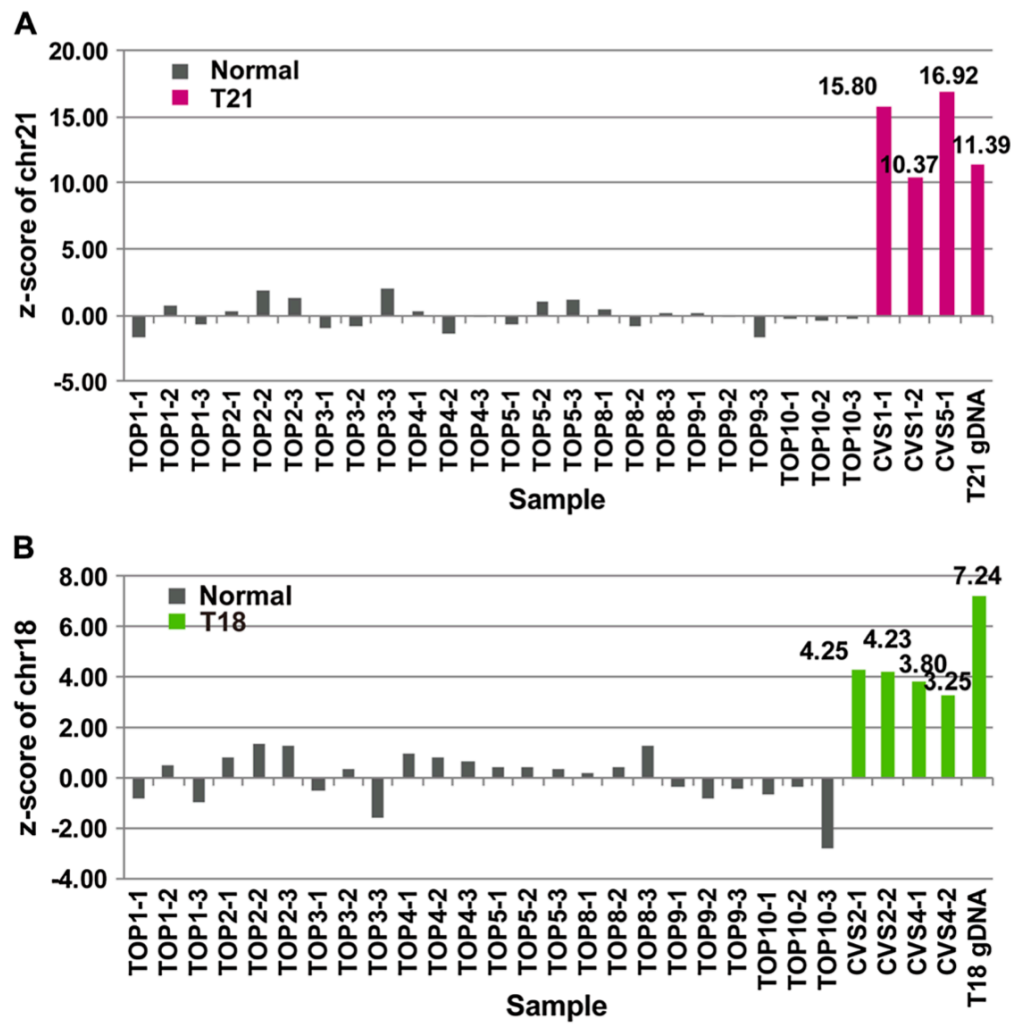
# 利用胎儿有核红细胞进行全基因测序诊断

- 利用10例早孕期胎儿畸形行流产的孕妇病例进行诊断
- 利用CD45反向选择以及镜下形态学判断进行手动富集
- 全基因扩增，低分辨率的全基因组测序
- 与核型分析结果比对

Rui Hua et al. Prenatal Diagnosis 2015, 35, 637–644



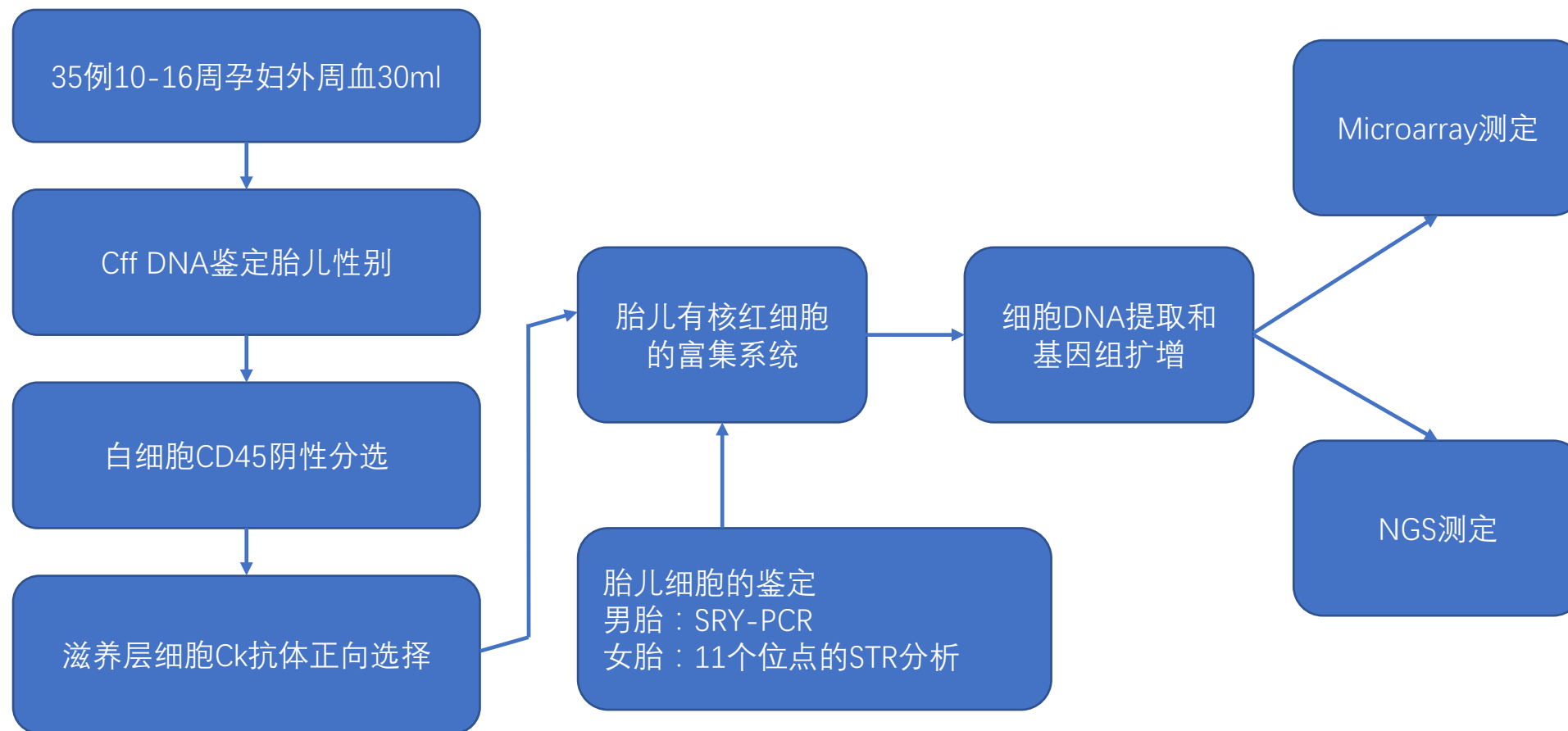
# 利用胎儿有核红细胞富集进行全基因组测序诊断



47, XY,  
t(15;18)(p10;q10),+18[4]  
/46, XY[16]

47, XY, +15

## 美国Baylor遗传实验室的研究：针对胎盘滋养层细胞进行产前诊断

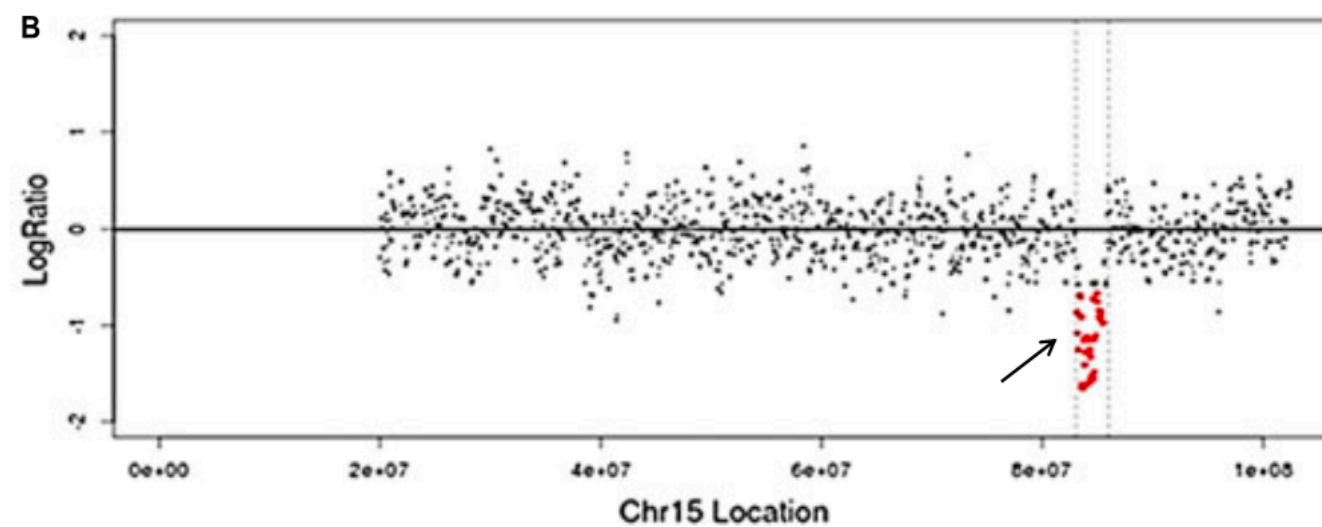
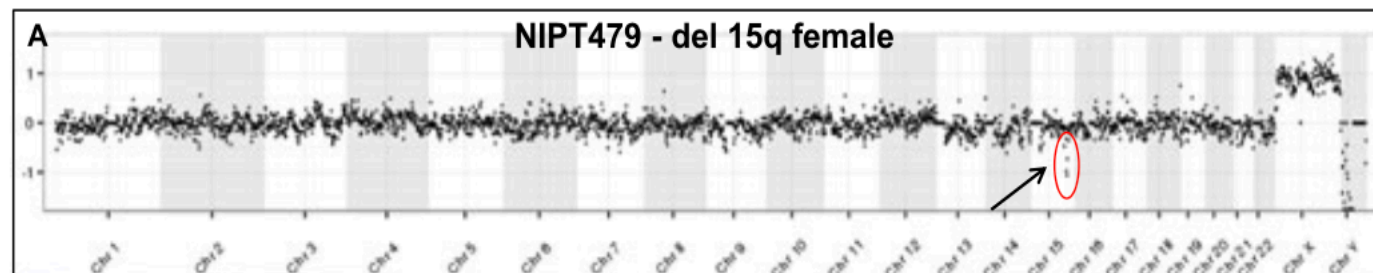


# 研究结果

- 35例其中有6例为女性胎儿
- 获得了30个以上的正常男性胎儿细胞
- ✓ 1例 47，XXY的细胞
- ✓ 1例 18三体胎儿
- ✓ 1例 21三体的细胞（9个细胞来自一例21三体的胎儿）
- ✓ 1例 局限性胎盘嵌合的病例中3个正常细胞和1个13三体细胞，1例 2个15号染色体2.7Mb缺失的细胞，
- ✓ 未检出一例（4个来源于同一例胎儿细胞）1q21.1q21.2的1.2Mb的缺失
- 其余通过确诊性诊断胎儿染色体异常的病例都在外周血胎儿细胞检测中得到了一致的诊断
- 平均每例孕妇每毫升外周血能获得0.74个胎儿细胞
- 展示的病例均至少发现一个或以上的胎儿细胞

Patient ID	GA	Gender	Depletion	Absolute counts	Counts (cells/mL)	F - M - I/N	Single cell array/ NGS result (cells)	Invasive array/ Chromosome result
NIPT319	13W0D	Male	No	6 cells/6 mL	1.00	1 - 0 - 5	NL male (1)	NL male
NIPT319	13W0D	Male	Yes	6 cells/6 mL	1.00	3 - 0 - 3	NL male (1)	NL male
NIPT327	10W0D	Male	Yes	9 cells/18 mL	0.50	3 - 0 - 6	ND	ND
NIPT342	13W3D	XXY	Yes	2 cells/9 mL	0.22	1 - 1 - 0	XXY (1)	XXY
NIPT344	15W5D	Female	Yes	5 cells/18 mL	0.28	2 - 0 - 3	ND	ND
NIPT353	12W0D	Male	Yes	8 cells/21.5 mL	0.37	5 - 0 - 3	ND	ND
NIPT359	16W0D	Male	Yes	4 cells/17.5 mL	0.23	4 - 0 - 0	NL male (4)	1.2 Mb del 1q
NIPT365	12W0D	Male	Yes	8 cells/18 mL	0.67	5 - 0 - 3	NL male (4)	ND
NIPT375	13W5D	Female	Yes	3 cells/18 mL	0.17	1 - 1 - 1	Trisomy 18 (1)	Trisomy 18
NIPT386	12W5D	Male	Yes	3 cells/6 mL	0.50	1 - 0 - 2	ND	ND
NIPT392	11W2D	Male	Yes	7 cells/6 mL	1.00	5 - 0 - 2	ND	ND
NIPT402	12W2D	Male	Yes	1 cell/6 mL	0.17	1 - 0 - 0	ND	ND
NIPT414	13W2D	Male	Yes	4 cells/17 mL	0.24	2 - 0 - 2	ND	NL male
NIPT418	12W0D	Male	Yes	3 cells/6 mL	0.50	1 - 0 - 2	ND	ND
NIPT419	10W3D	Male	Yes	1 cell/6 mL	0.33	1 - 0 - 0	ND	ND
NIPT422	12W2D	Male	Yes	3 cells/6 mL	0.50	1 - 0 - 2	ND	ND
NIPT447	13W5D	Male	Yes	5 cells/24 mL	0.21	2 - 2 - 1	Trisomy 21 (2)	Trisomy 21
NIPT476	13W0D	Male	Yes	1 cell/24 mL	0.04	1 - 0 - 0	ND	ND
NIPT479	16W0D	Female	Yes	2 cells/23.5 mL	0.09	2 - 0 - 0	2.7 Mb del 15q (2)	2.7 Mb del 15q
NIPT483	14W1D	Female	Yes	4 cells/24 mL	0.13	2 - 1 - 1	NL female (2)	NL female
NIPT485	13W0D	Male	Yes	1 cell/18 mL	0.06	1 - 0 - 0	ND	ND
NIPT488	11W4D	Female	Yes	1 cell/18 mL	0.06	1 - 0 - 0	Trisomy 21 (1)	Trisomy 21
NIPT490	12W1D	Male	Yes	3 cells/6 mL	0.50	3 - 0 - 0	ND	ND
NIPT493	12W4D	Male	Yes	4 cells/25 mL	0.16	3 - 1 - 0	ND	ND
NIPT495	11W3D	Male	Yes	5 cells/18 mL	0.28	2 - 1 - 2	ND	NL
NIPT497	12W4D	Female	Yes	9 cells/24 mL	0.38	1 - 0 - 8	NL (3)/Trisomy 13 (1)	NL (NIPT Trisomy 13)
NIPT508	16W0D	Male	Yes	3 cells/18 mL	0.17	2 - 0 - 1	NL male (2)	NL male
NIPT511	13W0D	Male	Yes	15 cells/18 mL	0.83	11 - 2 - 2	Trisomy 21 (11)	Trisomy 21
PRI036	12W2D	Male	No	5 cells/4 mL	1.20	5 - 0 - 0	NL Male (2)	ND
PRI041	12W3D	Male	No	2 cells/5 mL	0.50	1 - 0 - 1	ND	ND
PRI042	12W3D	Male	No	3 cells/2.6 mL	1.14	2 - 0 - 1	ND	ND
PRI045	13W2D	Male	No	5 cells/6 mL	0.83	3 - 0 - 2	ND	ND
PRI052	14W0D	Male	Yes	4 cells/5 mL	0.80	2 - 0 - 2	ND	ND
PRI054	12W4D	Male	Yes	2 cells/12 mL	0.17	2 - 0 - 0	ND	ND
PRI37	12W2D	Male	No	2 cells/5 mL	0.40	2 - 0 - 0	NL male (2)	ND
PRI40	11W0D	Male	No	1 cell/7.5 mL	0.13	1 - 0 - 0	NL male (1)	ND





# 总结

*Thank you*

- 针对胎儿细胞的研究其实从来没有停止
- 目前通过相关技术的共同发展已经在临床应用的领域看到曙光
- 可获得胎儿数量的不足，以及纯度的不够还是目前主要的障碍
- 检测的成本也是临床应用的一个困难
- 但这一切问题我相信会在3-5年的时间内得到解决
- 将来胎儿细胞的应用将会主要用在染色体微小片段的异常检测，胎儿单基因病无创性产前诊断方面