

• 综 述 •

无创产前筛查扩展性检测临床研究进展*

徐玉婵 综述,严提珍[△]审校

(柳州市妇幼保健院医学遗传科/柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室/
柳州市生殖与遗传研究所,广西 柳州 545001)

[摘 要] 随着高通量测序技术的发展,获取孕妇外周血胎儿游离 DNA 进行胎儿染色体非整倍体评估的无创产前筛查(NIPT)技术已在国内外广泛应用。21、18、13-三体综合征是目前 NIPT 的主要检测目标,但已有许多学者提出了将 NIPT 技术用于性染色体、双胞胎妊娠,以及对染色体微缺失、微复制,单基因遗传病等其他范围扩展检测的可能性。

[关键词] 无创产前筛查; 扩展性检测; 双胞胎妊娠; 微缺失微重复; 单基因遗传病; 综述
DOI:10. 3969/j. issn. 1009-5519. 2023. 02. 025 **中图法分类号:**R394. 2;R714. 55
文章编号:1009-5519(2023)02-0295-05 **文献标识码:**A

Advances in clinical research of expanded noninvasive prenatal testing in screening*

XU Yuchan, YAN Tizhen[△]

(Department of Medical Genetics, Liuzhou Maternity and Child Healthcare Hospital/Liuzhou Key
Laboratory of Birth Defects Prevention and Control/Liuzhou Institute of Reproduction
and Genetics, Liuzhou, Guangxi 545001, China)

[Abstract] With the development of high-throughput sequencing technology, noninvasive prenatal testing (NIPT) technology for fetal chromosome aneuploidy evaluation by extracting fetal free DNA from maternal peripheral blood has been widely used in clinical practice at home and abroad. At present, the main detection targets of NIPT are 21, 18 and 13-trisomy syndrome. However, many scholars have proposed the possibility of applying NIPT technology in sex chromosomes, twin pregnancy, chromosomal microdeletion, microduplications, monogenic disease and other range extended testing.

[Key words] Noninvasive prenatal testing; Extended testing; Twin pregnancy; Microdeletion and microduplication; Monogenic disease; Review

中国出生缺陷发生率为 5.6%, 年均新增出生缺陷患者高达 90 万例^[1]。染色体异常是导致新生儿出生缺陷最常见的遗传疾病,在新生儿中的发生率约为 1/160。13、18、21-三体综合征是最主要的常染色体非整倍体疾病,特别是 21-三体综合征在新生儿中的发生率较高,每 800 名活产婴儿中就有 1 例患有唐氏综合征(DS)^[2]。目前,广泛开展的唐氏筛查准确性低、假阳性率高^[3],因而对高风险孕妇仍需进行有创性产前诊断,如抽吸绒毛、羊水、脐血等对染色体核型进行分析,进而增加了胎儿额外的流产风险^[4]。香港中文大学卢煜明博士等于 1997 年首次报道了利用聚合酶链反应(PCR)扩增获得母体外周血中 Y 染色体的特异 DNA 序列,进而证实孕妇外周血的血浆中具有胎

儿游离 DNA(cffDNA),为无创产前筛查(NIPT)提供了科学基础^[5]。2011 年以来对新生儿非整倍体异常的 NIPT 得到一系列的临床研究证实,并被广泛用于临床^[6-7]。现将 NIPT 在性染色体非整倍体(SCA),双胞胎妊娠,染色体微缺失、微重复,单基因遗传病等临床检测中的研究进展综述如下。

1 NIPT 的扩展性检测

1.1 SCA SCA 总发生率为 1/500^[8],最常见者包括特纳综合征(45, X)、超雌综合征(47, XXX)、Klinefelter 综合征(47, XXY)、超雄综合征(47, XYY)和 SCAs 嵌合体。SCA 的临床表型差异较大,患者大多数表现为性器官发育不良、性腺功能下降、不育或不孕等,但在智能与运动功能方面尚可。传统血清学

* 基金项目:柳州市科学研究与技术开发计划项目(2014G02044、2018AF10501);广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20180044、Z20210767、Z-B20221587)。

[△] 通信作者, E-mail: 439078813@qq. com。

产前筛查主要针对 21、18-三体综合征和神经管缺陷的检测,并没有针对包括特纳综合征、克氏综合征等在内的性染色体异常的风险评估。有学者认为,在有 DS 筛查的国家 SCA 检出率低于 50%,用于检测 DS 的方法不能扩展到检测 SCA^[9]。超声检查发现,颈部水囊状淋巴管瘤及胎儿颈后皮下透明层增厚与 45,XO 有关^[10],但目前对其他 SCA 的产前筛查没有特异度较高的方法。许多研究表明,NIPT 可能是一种潜在的 SCA 筛查方法,但该技术尚有待于进一步研究。ZHANG 等^[11]对 10 275 例参加 NIPT 的孕妇进行分析表明,对 NIPT 所监测孕妇的染色体变异的总体阳性预测值(PPV)为 54.55%(18/33),检测特纳综合征(45,X)的总体 PPV 为 29.41%(5/17)。说明 NIPT 可通过大规模并行基因组测序分析 cfDNA 鉴定胎儿性染色体异常,但对特纳综合征(45,X)的准确性尚有待于提高。美国一项大型临床试验研究表明,在 69 794 例单胎妊娠孕妇中检出 1 359 例(1.95%)NIPT 高风险结果,其中 SCA 的 PPV 为 69.0%^[12]。BEVILACQUA 等^[13]评估有关筛查 SCA 患者选择和影响该选择的因素发现,3 162 名孕妇中 61.9%选择了 SCA 筛查。118 例(73.3%)筛查高风险的随访数据表明涉及 X 染色体的 SCA 的 PPV 低于涉及 Y 染色体的 SCA。其中 5 例 47,XXY 病例均被正确识别,PPV 为 100%;47,XXY 病例 PPV 为 63.33%(19/30);47,XXX 和 45,X 的 PPV 分别为 22.73%(5/22)和 24.59%(15/61)。在中国湖南 22 2107 名孕妇参与的一项大规模研究结果也显示,NIPT 筛查 X 单体的真实阳性率较低,而其他 SCA 的预测相对准确^[14]。X 染色体变异的孕妇也可能会影响 cfDNA 产前检测结果,从而产生假阳性或假阴性。常家祯等^[15]在发现的 SCA 高危病例中与侵入性产前诊断结果并不相符的 74 例患者中有 19 例母体基因拷贝数变异(CNV-seq)检测出现母体 X 染色体变异,占 SCA 假阳性病例的 25.68%(19/74)。另一项研究结果显示,母体因素是 NIPT 性染色体异常高假阳性的主要因素,使用 cfDNA(ChrX)/cfDNA 比例可暂时区分异常游离 DNA 的母源或胎儿来源^[16]。当比率大于 2 时所有胎儿的核型均正常,而 75.00%(6/8)的母亲 X 染色体异常;比率小于或等于 2 时只有 10.00%(4/40)的母亲有 X 染色体 CNV 改变,而 32.50%(13/40)的胎儿有性染色体 CNV 异常。值得强调的是,当产前诊断结果与 NIPT 结果不一致时建议检测母体外周血 CNV-seq 找出假阳性或阴性结果的原因,并且不建议对已知 X 染色体变异的孕妇进行 NIPT。

1.2 双胎妊娠 自然双胎发病率大约为 1/90,但由于国家“二孩”,甚至“三孩”政策的铺开,辅助生殖技

术的需求量逐渐增加,双胎妊娠发生率也相应上升。目前,在中国双胎妊娠发生率已达到 2%。双胎妊娠新生儿染色体非整倍体病的风险远比单胎妊娠高^[17],并且筛查受各种因素的影响,是临床研究的热点和难点。双胎妊娠单纯使用母体血清学筛查存在一定的局限性,因检测的假阳性率高导致需进行双胎羊膜腔穿刺检查的可能性增大,最高可达 18.3%^[18],进而提高了由于侵入性产前诊断导致的孕妇流产概率,所以,一般并不建议对双胎妊娠单纯开展血清学检查。NIPT 技术在自然单胎妊娠中的筛查研究现已获得应用,但在双胎妊娠中使用的文献报道却极少见。因没有大样本的调查,检测的准确率尚不清楚,双胎妊娠在国内孕妇外周血 cfDNA 产前筛查和诊断技术规范中属“慎用人群”。SARNO 等^[19]研究表明,417 例双胎妊娠中 21-三体检出率为 100%(8/8),18-三体或 13-三体检出率为 60.00%(3/5),假阳性率为 0.25%(1/404)。一项纳入 35 项 NIPT 相关研究的 meta 分析结果显示,在双胎妊娠中对 21-三体综合征的筛查发现,共有 24 例 21-三体和 1 111 例非三体性 21 号染色体异常,总检出率为 100%(95%可信区间:95.2~100.0),假阳性率为 0(95%可信区间:0.000~0.003)^[20]。双胎妊娠母亲血浆中具有 2 个胎儿的游离 DNA,但不能识别,且影响因素较复杂。有研究表明,双胎妊娠 NIPT 检测的准确性与 cfDNA 水平,即“胎儿分数”有关^[21]。单卵双胎在 cfDNA 总数约为 4%后即可达到测定条件,且遗传物质水平与单胎一致。而双卵双胎染色体核型通常并不相同,如异常 cfDNA 少而正常 cfDNA 水平高,检测结果可能因正常胎儿“掩盖”了异常胎儿而提示为低风险造成假阴性。YU 等^[22]发现,双胎之一死亡是引起 NIPT 假阳性的主要因素,异常胎儿死亡后孕妇外周血中仍存在着死亡胎儿的游离 DNA,该影响至少持续 7~8 周,但不超过 12~14 周,所以,双胎之一死亡消失时建议直接产前诊断而不是产前筛查。另有研究表明,双胎妊娠中 cfDNA 与母亲血浆 DNA 比率远不及单胎妊娠,中位数分别为 8.0%、11.0%;而 NIPT 检测中双胎妊娠重采率也比单胎高,第 1 次抽样后失败率双胎和单胎分别为 9.4%、2.9%^[19]。NIPT 检测双胎、辅助生殖助孕胎儿 21、18、13-三体综合征具有一定的可行性,但仍存在假阳性,筛查高风险需进一步进行介入性产前诊断,且双胎妊娠检测失败率,以及筛查低风险孕妇死胎、流产等异常妊娠结局发生率均高于单胎妊娠,因而检测的后续处理和遗传咨询尤为重要^[23]。

1.3 染色体微缺失、微重复 染色体微缺失/微重复综合征是一类由于 CNV-seq 所致的具有复杂表型的

综合征性病症,是造成新生儿出生缺陷的主要遗传性原因之一。据统计,在不明病因的儿童智力下降、多发畸形和生长/发育延迟中约有 12% 是由染色体中的微缺失/微重复引起的。2011 年 PETERS 等^[24] 在新英格兰杂志报道了 1 例通过 NIPT 方法检出的在 12p11.22-p12.1 之间 4.2 Mb 的微缺失,并通过介入性产前诊断证明了该胎儿的染色体微缺失遗传自其患有 Asperger's 综合征的母亲,可导致生长/发育迟缓和多发畸形的临床表型。说明 NIPT 不仅对常见染色体非整倍性,而且对 CNV 的检测均具有潜在意义,但这种最新方法仍处于起步阶段。一项纳入 42 910 例单胎妊娠的研究结果显示,NIPT 检测染色体微缺失/微重复的 PPV 为 28.99%,其中 CNV $\leq$ 5 Mb 的 PPV 为 20.83%,5~10 Mb 的 PPV 在 50.00% 以内,>10 Mb 的 PPV 为 27.27%^[25]。另有研究采用 NIPT 检查了 8 141 例单胎妊娠,结果显示,51 例(0.63%)染色体微缺失或微重复的筛查高风险病例,但只有 13 例(36.11%)经产前诊断确诊为阳性病例^[26]。有学者利用算法优化以增加分析的灵敏度,如 CHEN 等^[27] 开发了一种实用的胎儿 CNV 分析方法,通过低覆盖全基因组测序(约 0.08 倍)检测大于 10 Mb 的胎儿染色体缺失/重复,在 1 311 例样本中检测到 4 个样本的缺失/重复,范围为 9.01~28.46 Mb,检测大于 10 Mb 染色体缺失/重复的灵敏度和特异度分别为 100%、99.92%。WAPNER 等^[28] 则针对目标区域基于单核苷酸多态性技术的 NIPT 方法对 358 例孕妇血浆样本检测了 5 种微缺失综合征,其中胎儿 22q11.2 缺失的检出率为 97.8%,假阳性率为 0.76%,其余 4 种综合征(1p36 缺失、Cri-du-chat 综合征、Angelman 综合征、Prader-Willi 综合征)的检出率均为 100%。此后国内外多家机构扩展了 NIPT 的分析技术领域,增加了 CNV-seq 检测,即 NIPT-Plus。近期中国一项共有 94 085 名单胎妊娠妇女参加的大型 NIPS-Plus 临床研究结果显示,对已知微缺失/微重复综合征(32 例)、DiGeorge 综合征的 PPV 为 93%,22q11.22 微重复的 PPV 为 68%,Prader-Willi/Angelman 综合征的 PPV 为 75%,Cri-du-Chat 综合征的 PPV 为 50%;对剩余的全基因组微缺失/微重复综合征(88 例)组合的 PPV 为 32%(CNV $\geq$ 10 Mb)和 19%(CNV<10 Mb)^[29]。可见,NIPS-Plus 对 DiGeorge 综合征具有较高的 PPV,对其他染色体微缺失/微重复综合征的 PPV 则没有那么高。

1.4 单基因遗传病 单基因遗传病是由于一对等位基因突变引起且遗传上遵循孟德尔遗传定律的病症,因而也称为孟德尔遗传病。截至 2020 年,人类孟德尔遗传数据库在线上公布的表型和分子机制已知的

单基因遗传病为 5 947 种。国外统计数据显示,出生缺陷中染色体异常占 6%,而单基因遗传病占 7.5%,所有单基因遗传病的累积发病率高达 1%,是出生缺陷的主要原因。检查新生儿单基因遗传性疾病最直接的手段就是对胎儿组织或细胞的检查,如通过羊水穿刺或绒毛层取样进行有创性产前诊断。目前,通过 cfDNA 对单基因遗传病进行检测的技术开展受到限制,主要由于以下 3 种原因:(1)孕妇血浆中存在大量母源 DNA 信息的干扰,若 cfDNA 水平又偏低则胎儿 DNA 信息将因母源性变异而无法检测;(2)母体外周血中 cfDNA 水平很低,导致无法检出结果或造成假阴性与假阳性结果;(3)由于不同型单基因病致病原因的复杂程度不同,因而检测的策略各有差异,大多数单基因遗传病的无创检测均需依赖于先证者样本构建胎儿单倍体型。从检测技术上看,基于 cfDNA 的单基因病检测其发展大致经历了从 PCR、荧光定量 PCR、数字 PCR、低深度二代测序到现在的高深度二代测序过程。目前,对利用 cfDNA 检查胎儿单基因病变的研究重点主要聚焦于对常染色体遗传疾病及其 X-连锁病变的检测,主要研究的疾病涉及地中海贫血、软骨发育不良、强直性肌肉营养不良、亨廷顿舞蹈症等 14 种人群患病率较高的病症。英国在单基因病无创产前诊断技术向临床转化方面做了许多工作并取得了成效,目前,已针对软骨损伤发育缺陷、致死性骨生长/发育缺乏、阿佩氏综合征、囊性纤维化、成纤维细胞生长因子受体基因相关的颅缝过早闭合症等建立了无创产前诊断临床服务^[30]。国内近期有研究表明,通过靶向捕获测序和单倍型辅助分析方法可实现无创产前诊断胎儿地中海贫血的基因型^[31]。LI 等^[32] 采用 SHAPEIT 软件构建了亲代单倍型,并对新生儿与遗传的父亲之间的单倍体型剂量应用相应定量分析的方法推断胎儿突变的遗传状态,成功构建了 5 个 β -地中海贫血家庭的亲本单倍型并检测了遗传的亲本突变。

2 小 结

NIPT 可能是一种潜在的 SCA 筛查方法,筛查 X-染色体单体的真实阳性率较低,而对其他 SCA 的预测相对准确。X-染色体变异的孕妇可能会影响 cfDNA 产前筛查结果,因而不建议对已知 X-染色体变异孕妇进行 NIPT。按规范标准管理方法和规范操作进行,NIPT 的双胎 21、18、13-三体综合征存在一定的有效性,但因没有大量的临床使用结果,其应用价值尚有待于进一步研究。根据目前的研究进展和指南意见分析,以 NIPT 的方式筛查研究结果较明确的 5 Mb 以上的胎儿 CNV 存在一定可行性,适用于 NIPT 的临床检测范围有望拓展至 21、18、13-三体综

合征以外的染色体病。目前,单基因遗传病的 NIPT 研发总体仍处在科研探讨中,但各种方法仍需经过更大规模临床数据的检验,因此,测试方法及对整个测试系统的品质监管与监控均须进一步明确与细化方可用于临床研究。卢煜明博士队伍最近的研究结果显示,孕妇血浆中存有新生儿染色体外环状 DNA,具有较强的生物稳定性和独特的分子特征,或将可能为迅速发展的 NIPT 研发领域创造出一个全新的生物标志物^[33-34]。相信未来由于检测成本的下降和科技的提升,NIPT 在产前检测领域将具备更加明显的技术优势和广泛的发展前景。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告 (2012) [R]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.
- [2] GRANE F M, LYNN F, BALFE J, et al. Down syndrome: Parental experiences of a postnatal diagnosis[J]. J Intellect Disabil, 2022.
- [3] DUAN Y, LI Y, XUE Q. Serological prenatal screening and diagnosis for Down syndrome [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014, 41 (5): 572-574.
- [4] BAKKER M, BIRNIE E, DE MEDINA P R, et al. Total pregnancy loss after chorionic villus sampling and amniocentesis: A cohort study [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2017, 49 (5): 599-606.
- [5] LO Y M, CORBETTA N, CHAMBERLAIN P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. Lancet, 1997, 350 (9076): 485-487.
- [6] ALBERRY M S, AZIZ E, AHMED S R, et al. Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2021, 258: 424-429.
- [7] GADSBØLL K, PETERSEN O B, GATINOIS V, et al. Current use of noninvasive prenatal testing in Europe, Australia and the USA: A graphical presentation[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2020, 99 (6): 722-730.
- [8] WANG Y, LI S, WANG W, et al. Cell-free DNA screening for sex chromosome aneuploidies by non-invasive prenatal testing in maternal plasma[J]. Mol Cytogenet, 2020, 13: 10.
- [9] VIUFF M H, STOCHHOLM K, ULDBJERG N, et al. Only a minority of sex chromosome abnormalities are detected by a national prenatal screening program for Down syndrome[J]. Hum Reprod, 2015, 30 (10): 2419-2426.
- [10] GRATI F R, BAJAJ K, ZANATTA V, et al. Implications of fetoplacental mosaicism on cell-free DNA testing for sex chromosome aneuploidies[J]. Prenat Diagn, 2017, 37 (10): 1017-1027.
- [11] ZHANG B, LU B Y, YU B, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood[J]. J Int Med Res, 2017, 45 (2): 621-630.
- [12] GUY C, HAJI-SHEIKHI F, ROWLAND C M, et al. Prenatal cell-free DNA screening for fetal aneuploidy in pregnant women at average or high risk: Results from a large US clinical laboratory[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7 (3): e545.
- [13] BEVILACQUA E, ORDÓÑEZ E, HURTADO I, et al. Screening for sex chromosome aneuploidy by cell-free DNA testing: Patient choice and performance[J]. Fetal Diagn Ther, 2018, 44 (2): 98-104.
- [14] LU Y, ZHOU S, LINPENG S, et al. Cell-free DNA screening for sex chromosome abnormalities and pregnancy outcomes, 2018-2020: A retrospective analysis[J]. J Pers Med, 2022, 12 (1): 48.
- [15] 常家祯, 戚庆炜, 周希亚, 等. 孕妇 X 染色体异常对其外周血游离 DNA 产前筛查的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55 (2): 100-105.
- [16] ZHANG B, ZHOU Q, CHEN Y, et al. High false-positive non-invasive prenatal screening results for sex chromosome abnormalities: Are maternal factors the culprit[J]. Prenat Diagn, 2020, 40 (4): 463-469.
- [17] SPARKS T, NORTON M, FLESSEL M, et al. Observed rate of down syndrome in twin pregnancies [J]. Obstet Gynecol, 2016, 128 (5): 1127-1133.
- [18] 严焕琛, 李南, 陈敏. 加拿大妇产科学会指南“双胎妊娠非整倍体的产前筛查及诊断”解读[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35 (9): 669-672.
- [19] SARNO L, REVELLO R, HANSON E, et al. Prospective first-trimester screening for triso-

- mies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47(6):705-711.
- [20] GIL M M, ACCURTI V, SANTACRUZ B, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: Updated meta-analysis[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017, 50(3):302-314.
- [21] HEDRIANA H, MARTIN K, SALTZMAN D, et al. Cell-free DNA fetal fraction in twin gestations in single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening[J]. *Prenat Diagn*, 2020, 40(2):179-184.
- [22] YU T, LI S, ZHAO W, et al. False positive non-invasive prenatal testing results due to vanishing twins [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2019, 36(4):327-330.
- [23] 徐玉婵, 罗世强, 崖娇练, 等. NIPT 在双胎及 ART 妊娠胎儿染色体非整倍体的检测效能和影响因素分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2020, 28(12):1527-1531.
- [24] PETERS D, CHU T, YATSENKO S A, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(19):1847-1848.
- [25] CHEN Y, YU Q, MAO X, et al. Noninvasive prenatal testing for chromosome aneuploidies and subchromosomal microdeletions/microduplications in a cohort of 42,910 single pregnancies with different clinical features[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1):60.
- [26] GUY C, HAJI-SHEIKHI F, ROWLAND C M, et al. Prenatal cell-free DNA screening for fetal aneuploidy in pregnant women at average or high risk: Results from a large US clinical laboratory[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(3):e545.
- [27] CHEN S, LAU T K, ZHANG C, et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(6):584-590.
- [28] WAPNER R J, BABIARZ J E, LEVY B, et al. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: Detection of fetal microdeletion syndromes[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(3):332.e1-9.
- [29] LIANG D, CRAM D S, TAN H, et al. Clinical utility of noninvasive prenatal screening for expanded chromosome disease syndromes [J]. *Genet Med*, 2019, 21(9):1998-2006.
- [30] JENKINS L A, DEANS Z C, LEWIS C, et al. Delivering an accredited non-invasive prenatal diagnosis service for monogenic disorders, and recommendations for best practice[J]. *Prenat Diagn*, 2018, 38(1):44-51.
- [31] WANG W, YUAN Y, ZHENG H, et al. A pilot study of noninvasive prenatal diagnosis of alpha-and beta-thalassemia with target capture sequencing of cell-free fetal DNA in maternal blood[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2017, 21(7):433-439.
- [32] LI H, DU B, JIANG F, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of β -thalassemia by relative haplotype dosage without analyzing proband [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(11):e963.
- [33] SIN S T K, JIANG P, DENG J, et al. Identification and characterization of extrachromosomal circular DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(3):1658-1665.
- [34] MA M L, ZHANG H, JIANG P, et al. Topologic analysis of plasma mitochondrial DNA reveals the coexistence of both linear and circular molecules[J]. *Clin Chem*, 2019, 65(9):1161-1170.

(收稿日期:2022-06-14 修回日期:2022-10-15)