

孕妇外周血中游离胎儿DNA浓度与不良妊娠结局的关系

白小艺, 冯俏丽, 韩振艳, 侯红瑛
(中山大学附属第三医院产科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨游离胎儿DNA浓度(FF)与不良妊娠结局的关系。【方法】对2017年1月至2018年10月在中山大学附属第三医院产科行无创产前检测并住院分娩的中国籍产妇1 231例进行回顾性分析,其中妊娠期高血压病(HDP)组、胎儿生长受限(FGR)组及早产组分别为84、57和59例作为病例组;将无妊娠并发症的孕妇1 031例作为对照组。分析FF与年龄、采血孕周、体质量指数(BMI)的相关性,比较病例组与对照组FF的差异。【结果】行NIPT的1031例正常孕妇中,外周血的游离胎儿DNA浓度(FF)为 $(12.03 \pm 3.64)\%$,FF与孕妇BMI存在负相关($r_s = -0.079, P < 0.05$)。HDP组(84例)、FGR组(57例)及早产组(59例)的FF分别为 $(11.21 \pm 2.60)\%$ 、 $(12.48 \pm 3.92)\%$ 和 $(11.66 \pm 3.34)\%$ 。HDP组与对照组相比,FF的差异具有统计学意义,OR = 0.926(95%置信区间:0.859 ~ 0.997; $P = 0.043$)。FGR组、早产组的FF与对照组相比,差异均无统计学意义。【结论】HDP的孕妇血浆中游离胎儿DNA的浓度降低,低FF是HDP发生的危险因素;尚未发现FF与胎儿生长受限、早产的发病有关。

关键词:游离胎儿DNA浓度;妊娠期高血压疾病;胎儿生长受限;早产

中图分类号: R714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2020)06-0917-07

Association between Fetal Fraction of Cell-free DNA in Maternal Plasma and Adverse Pregnancy Outcomes

BAI Xiao-yi, FENG Qiao-li, HAN Zhen-yan, HOU Hong-ying

(Department of Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630, China)

Correspondence to: HOU Hong-ying; E-mail: gdgzhyy@163.com

Abstract: 【Objective】To investigate the association between fetal fraction (FF) of cell-free DNA and adverse pregnancy outcomes. 【Methods】A retrospective case-control study was conducted in 1 231 Chinese pregnant women who underwent non-invasive prenatal testing and gave birth to their children in the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University during January 2017 to October 2018, including HDP group ($n = 84$), FGR group ($n = 57$) and preterm birth group ($n = 59$) as case groups, and the pregnant women without pregnancy-related complications were included in the control group ($n = 1 031$). The correlation between FF and maternal age, gestational weeks, body mass index (BMI), and comparison of FF difference in different groups were analyzed. 【Results】In 1 031 normal pregnant women performed NIPT, the plasma FF was $(12.03 \pm 3.64)\%$, FF and maternal BMI were negatively correlated ($r_s = -0.079, P < 0.05$). FF in HDP, FGR, preterm birth group were $(11.21 \pm 2.60)\%$, $(12.48 \pm 3.92)\%$, $(11.66 \pm 3.34)\%$, respectively. Compared with control group, FF in HDP group was statistically lower, OR = 0.926, 95% CI: 0.859-0.997, $P = 0.043$. FF in FGR group and preterm birth group were not statistically different compared with control group. 【Conclusions】Low FF is a risk factor of HDP, and we may apply FF of cell-free DNA to predict the risk of HDP in further research. The correlation of FF and FGR, preterm birth have not been found yet.

Key words: fetal fraction of cell-free DNA; hypertension disorders of pregnancy; fetal growth restriction; preterm birth

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(6): 917-923]

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 广州市科技计划项目(201604020104)

作者简介: 白小艺, 硕士研究生, 住院医师, E-mail: 872824137@qq.com; 侯红瑛, 通信作者, 主任医师, E-mail: gdgzhyy@163.com

1997年,Lo等^[1]通过实时荧光PCR发现在妊娠妇女血浆中存在游离胎儿DNA (cell-free fetal DNA, cfDNA)。从此,以cfDNA为基础的无创产前检测 (noninvasive prenatal test, NIPT) 在全球范围内被快速应用于临床。cfDNA主要来源于胎盘滋养层细胞的凋亡/坏死。在妊娠过程中,只有当胎盘组织存在,我们才能在母体血浆中测到cfDNA的存在^[2]。游离胎儿DNA浓度 (fetal fraction, FF) 是指来源于胎儿的cfDNA在母体血浆的游离DNA中所占的比例。当胎盘形成发育(增殖、迁移、侵袭和分化)过程中出现问题,胎盘的细胞组成、调节分子的产生及细胞转换发生变化,这些都有可能直接影响进入母体循环的胎盘滋养层细胞的类型和水平^[3-4],从而影响cfDNA的释放和母体的炎症反应,导致FF的变化。FF可能作为反映胎盘功能及病变的潜在指标。本研究拟探讨FF与不良妊娠结局的关系,以期发现FF对预测妊娠并发症的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

回顾性收集2017年1月至2018年10月在中山大学附属第三医院产科行无创产前检测并住院分娩的中国籍孕妇作为研究对象。纳入标准:①单胎妊娠;②我院行无创产前检测并住院分娩;③采血孕周为12⁺⁰~26⁺⁶周。排除标准:①流产、引产的孕产妇;②临床信息不完整;③胎儿存在染色体异常或接受宫内治疗者;④行体外受精-胚胎移植孕妇。

根据上述标准共纳入1 231例并对其进行回顾性分析,其中妊娠期高血压病组(HDP组)、胎儿生长受限(FGR)组及早产组分别为84例、57例和59例,作为病例组;将无妊娠并发症的孕妇作为对照组1 031例。收集入选孕妇的完整临床资料,包括孕妇年龄、采血孕周、体质量指数(BMI)等。所有患者签署知情同意书。本研究获本院伦理委员会批准免除申报。

1.2 实验方法

入选孕妇留取10 mL全血标本,24 h内进行血浆分离,采用金麦格血浆游离DNA提取试剂盒(GenMagBio, 中国),按照商品说明进行操作,从血浆中提取DNA片段。每个血浆样品采用 Ion Plus

Fragment Library Kit (Life Technologies, 美国),按照使用指引构建测序文库,采用Qubit2.0 (Life Technologies, 美国)和2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 美国)分别进行DNA初步浓度和片段大小检测。将文库样本稀释到100 pmol/L,取等量混合在一起,制备测序微球,采用Proton测序仪(Life Technologies, 美国)进行上机测序。根据测序数据中DNA片段的分布情况,分别确定出主要分属于胎儿大致序列长度分布($C_{bp} \sim D_{bp}$)和母体本身的大致序列长度分布($E_{bp} \sim F_{bp}$),确定胎儿序列片段的占比,及游离胎儿DNA浓度:

$$\text{Fetal Fraction (FF)} = \frac{\text{Count} (C_{bp} \sim D_{bp})}{\text{Count} (E_{bp} \sim F_{bp})}$$

1.3 统计学方法

采用IBM SPSS Statistics 20软件进行数据的统计分析。计量资料符合正态分布的以均数±标准差($\bar{x} \pm s$),不符合正态分布的以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 描述。将正常孕妇中的游离胎儿DNA浓度与年龄、孕周及BMI进行Spearman秩相关分析。病例组与对照组的基本资料分析采用Kruskal-Wallis H 检验,差异有统计学意义时采用Bonferroni法进行病例组与对照组两两比较。对照组与病例组的FF差异采用无序多分类logistic回归。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常孕妇的采血孕周与FF的分布情况

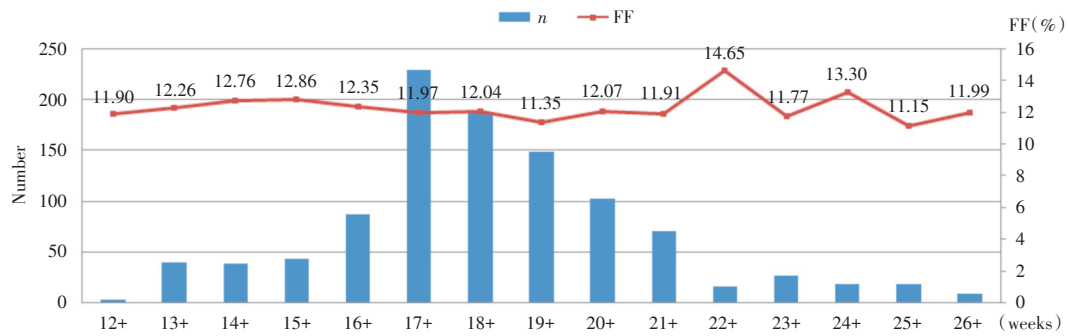
行NIPT的1 031例正常孕妇中,外周血的游离胎儿DNA浓度范围为(5.05 ~ 35.39)%,均值±标准差为(12.03 ± 3.64)%;采血孕周范围12⁺⁰ ~ 26⁺⁶周,采血孕周92%(946/1 031例)集中在13⁺⁰ ~ 21⁺⁶周,FF在总体上趋于平稳(图1)。

2.2 正常孕妇的FF与基本资料的相关性

行NIPT的1 031例正常孕妇中,将游离胎儿DNA浓度(FF)与孕妇的年龄、采血孕周及BMI进行Spearman秩相关分析,结果表明,FF与孕妇BMI存在负相关($r_s = -0.079, P < 0.05$),FF与采血孕周、孕妇年龄不存在相关关系($P > 0.05$;表1,图2)。

2.3 行NIPT的对照组与病例组的基本资料比较

本研究共纳入行NIPT的孕产妇1 231例,其中妊娠期高血压疾病组(HDP组)、FGR组及早产组分别为84、57和59例,对照组1 031例,对临床



FF: distribution of fetal fraction

图1 行NIPT的正常孕妇的采血孕周与FF分布

Fig.1 Distribution of fetal fraction of different gestational weeks in normal pregnancy

表1 行NIPT的正常孕妇中FF与基本资料的相关性

Table 1 Correlation between FF and general characteristics in normal pregnancy

Factors	M(P ₂₅ ~P ₇₅)	r _s	P
Age/years	32.0(28.0~35.0)	0.002	0.94
Gestational weeks/weeks	18.0(17.0~19.9)	-0.049	0.11
BMI/(kg/m ²)	21.48(19.91~23.42)	-0.079	0.011

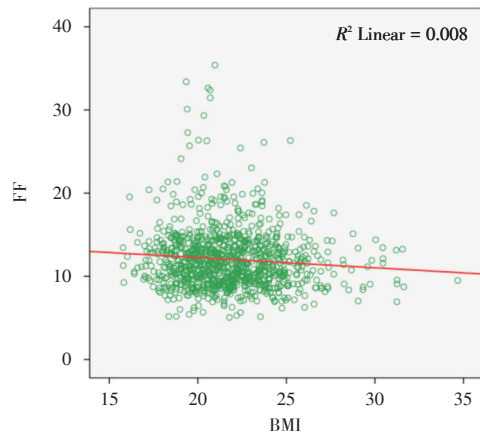


图2 行NIPT的正常孕妇中FF与BMI的相关性

Fig.2 Correlation of FF and BMI innormal pregnancy

基本资料进行统计分析。结果显示,HDP组的年龄、BMI大于对照组,早产组的年龄大于对照组,差异有统计学意义;FGR组的年龄、BMI及早产组的BMI与对照组差异没有统计学意义,对照组与病例组的采血孕周差异没有统计学意义(表2)。

2.4 行NIPT的病例组与对照组的FF分布比较

本研究中对照组1 031例,FF均值为(12.03±3.64)%,HDP组(84例)、FGR组(57例)及早产组(59例)的FF分别为(11.21±2.60)%、(12.48±3.92)%和(11.66±3.34)%。采用无序多分类logistic回归进行分析,结果显示,HDP组与对照组相比,

FF的差异具有统计学意义,OR = 0.926,95%CI:(0.859,0.997),P = 0.043,低FF是发生HDP的危险因素;而FGR组及早产组的FF差异均无统计学意义(表3)。

3 讨论

无创产前检测(NIPT)是一种快速改变产前筛

表2 行NIPT的对照组与病例组的基本资料比较

Table 2 Comparison of general characteristics between case and control groups

Groups	Age/years	H	P	Gestational weeks/weeks	H	P	BMI/(kg/m ²)	H	P
Control	32.0(28.0~35.0)	12.2	0.007	18.0(17.0~19.9)	0.69	0.88	21.48(19.91~23.42)	42.0	<0.001
HDP	33.0(30.0~36.0)		0.016 ¹⁾	18.1(16.9~19.7)			23.44(21.39~26.90)		<0.001 ¹⁾
FGR	31.0(29.0~36.0)		0.68 ¹⁾	17.6(17.0~19.9)			20.55(18.86~23.78)		0.038 ¹⁾
Preterm Birth	34.0(31.0~37.0)		0.007 ¹⁾	18.0(17.1~19.6)			21.91(20.81~24.22)		0.20 ¹⁾

1)compared with control; The different was statistically significant(P<0.017)

表3 行NIPT的病例组与对照组的FF的比较
Table 3 Comparison of FF between case and control groups

Groups	Parameters	B	S.E.	Wald χ^2	P	OR	95%CI
HDP	Constant	-1.61	0.44	13.18	< 0.001	-	-
	FF	-0.08	0.04	4.11	0.043	0.926	(0.859, 0.997)
FGR	Constant	-3.28	0.44	54.34	< 0.001	-	-
	FF	0.03	0.03	0.83	0.36	1.032	(0.965, 1.102)
Preterm Birth	Constant	-2.48	0.49	25.34	< 0.001	-	-
	FF	-0.03	0.04	0.62	0.43	0.968	(0.894, 1.049)

Reference: control group

查模式的新技术,随着我们在临床实践中对它的了解进一步加深,游离胎儿DNA在产前检测中的应用逐步扩大,因此进一步探讨游离胎儿DNA的相关影响因素及其与妊娠并发症的关系是必要的。在母体循环总的游离DNA分子中,母体的游离DNA分子主要来源于造血细胞,而胎儿游离DNA分子主要来源于胎盘发育过程中的滋养层细胞凋亡释放,母体本身的因素对FF有重要影响。

目前NIPT广泛应用于胎儿染色体非整倍体性的筛查,FF的测量是其中必不可少的。对于单胎孕妇,为确保NIPT的准确性,要求胎儿游离DNA浓度高于4%,否则容易出现假阴性结果^[5-6]。本研究中,正常孕妇外周血的游离胎儿DNA浓度范围为(5.05 ~ 35.39)%,达到了NIPT对FF的要求。此外,本研究发现,FF与孕妇BMI存在负相关,即孕妇BMI越大,FF水平越低,与国内外研究结果一致^[7-8]。2018年,Rolnik等^[9]对4317例孕妇的数据进行分析,发现FF随孕妇的BMI增加而下降,Krishna等^[10]也在其队列研究中得到同样的结论,特别对于BMI > 35 kg/m²的孕妇,FF下降更为明显。这可能由于在肥胖的孕妇中,母体的游离DNA分子除了来源于造血细胞,还有部分来源于脂肪和间质血管组织的凋亡与破坏^[11],导致母体背景的游离DNA增多,从而使FF下降。因此,对于肥胖症的孕妇,行NIPT时若FF浓度达不到要求,可通过游离胎儿DNA的富集,提高胎儿DNA浓度,减少母体背景因素的干扰,为NIPT的数据分析提供更可靠的基础。

妊娠妇女外周血中的游离胎儿DNA主要来源于胎盘滋养层细胞的凋亡/坏死,而妊娠并发症,如妊娠期高血压疾病,胎儿生长受限,早产等,

虽然病理生理机制众多,但通常最终由于对胎盘形成不可逆的影响而导致临床症状的发生和发展,如胎盘炎性因子的释放或胎盘血管异常导致胎盘灌注不足等。因此国内外多个研究致力于探索游离胎儿DNA浓度与妊娠并发症的相关性,探讨FF在预测病理妊娠中的价值。

妊娠期高血压疾病,是妊娠与血压升高并存的一组疾病,以伴或不伴蛋白尿、器官系统损害为特征的妊娠特有疾病,严重影响母婴健康,是孕产妇和围产儿病死率升高的主要原因。疾病的确切的病理机制尚不明确,目前倾向于滋养层细胞分化受损导致“胎盘浅着床”和子宫螺旋动脉重铸不足有关。近年来联合多个生物学指标及超声指标对其进行筛查及预测的研究成为热点^[12]。目前多项研究对患妊娠期高血压疾病,特别是子痫前期孕妇的cffDNA的水平进行检测,试图了解其在疾病发展中的关系。研究发现在子痫前期的孕妇中,cffDNA的水平比正常孕妇升高2 ~ 10倍^[13-14],更重要的是,cffDNA水平在疾病的临床症状发生前就已有所增加。Levine等^[15]在一项由120位患PE的孕妇及120位正常孕妇作为对照组成的大型研究中,发现患PE的孕妇血浆中的cffDNA水平呈双相升高模式,在孕17 ~ 28周及临床症状出现前3周cffDNA水平升高明显。这种结果被认为可能是胎盘形成异常导致cffDNA释放增加及母体终末器官受损,母体肝肾脏器对于cffDNA清除减少的组合效应。但是,cffDNA绝对值水平不等于游离胎儿DNA浓度(FF)。FF在妊娠期高血压病,特别是子痫前期妊娠人群中相对于正常孕妇明显下降。Suzumori及其团队在纳入5 582例孕妇的病例对照队列研究中发现,早孕期FF较低的孕妇

随后发生妊娠期高血压病的风险更高^[16],随后 Rolnik 等^[17]也在他们的研究中证明对于早发型子痫前期患者,总的游离胎儿DNA水平升高,而FF下降。本研究中,HDP组的FF相较于对照组降低,低FF是HDP发生的危险因素,与Suzumori及Rolnik等的研究结果一致。cffDNA的绝对值升高而FF降低,这个矛盾性的结果可以从三个方面进行解释:①HDP的孕妇胎盘体积小,一项近期的研究显示发展为HDP的孕妇早孕期的胎盘体积多比正常孕妇小^[18];②BMI较大的妊娠妇女循环中母体脂肪细胞凋亡释放的游离DNA较正常妊娠孕妇多;③母体全身炎症因子激活增加。正常妊娠孕妇母体来源的游离DNA分子主要来自于造血系统,而在妊娠期高血压病孕妇中,母体的全身炎症反应增强^[19],血管内皮细胞损伤及终末器官受损均可引起母体来源的游离DNA分子增多。

胎儿生长受限(FGR)是由多种不同病因发展而成的复杂性妊娠合并症,其中胎盘功能不全是主要病因之一。目前FGR尚缺乏有效的预防干预措施,国内外逐步开展早中孕期联合生物学指标及超声指标对FGR进行预测及筛查的相关研究,但该类筛查模型灵敏度低,假阳性率高,仍需更进一步的研究建立更优化的筛查及预测模型。关于cffDNA水平与FGR发病的相关研究较少。2003年,Sekizawa等^[20]通过小样本研究(FGR组9例,对照组20例)发现cffDNA的量在两组间水平相近,无明显差异。随后,Smid及其同事^[21]证明cffDNA水平在患FGR的孕妇血浆中有所升高。此结果也在后续研究中得到验证^[22],考虑胎盘功能障碍导致cffDNA释放增多占据其中部分原因,也有研究表示在FGR患者中,由于胎儿缺氧刺激胎儿循环中促红细胞生成素的产生,使循环胎儿有核红细胞的数量增加,凋亡或裂解后释放更多的cffDNA^[23]。关于FF与FGR的关联性,Rolnik等^[24]在其大样本研究中发现,FGR高风险孕妇在早孕期的FF较正常对照组偏低;Morano等^[25]也证实早发型FGR孕妇组中FF下降,而在晚发型FGR组中FF与正常对照组无明显差异。本研究的

FGR组的FF与对照组相比无明显差异,与Rafaeli等^[26]的研究结果相一致。FGR孕妇相对于正常孕妇来说,母体外周血白细胞活化增强,但低于PE患者,进一步支持PE为全身性的母体炎症反应,而FGR患者通常仅轻度激活炎症系统^[26]。因此,母源性的游离DNA分子及胎儿来源的游离DNA分子的升高水平相近,从而使FF在FGR孕妇中的变化不明显。

早产是指妊娠满28周但不足37周的分娩,由多因素病因共同引起子宫收缩导致宫颈进行性改变,是围产儿及婴幼儿死亡及病残的重要原因之一,早产的预测在提高早产儿生存率、降低家庭及社会负担方面具有重要意义。关于cffDNA与早产相关性的研究也受到广泛关注,但结论具有争议性。Hoesli等^[27]在47例孕产妇的病例对照研究中发现cffDNA水平在早产组及对照组中并无差异。而Farina等^[28]发现在自发性早产中的孕妇血浆中cffDNA水平升高。Illanes^[29]则认为cffDNA水平在孕20~24周的妊娠人群中未因早产的发生而与正常孕妇有所差异,不能预测宫颈缩短导致的早产。cffDNA的释放来自临产前胎盘屏障的破坏,是临产启动的结果,难以作为预测指标。2016年美国一项回顾性队列研究对10~20周非整倍体高风险的单胎孕妇进行cffDNA检测,发现早孕组FF的升高与早产率并无关联,而中孕组FF升高与早产发生率显著相关^[30],表明cffDNA的增加与早产之间可能存在相关性,但仍需要进一步的研究来了解cffDNA的具体定量,并根据不同孕周建立一个正常范围。本研究中,早产组的FF与对照组相比无明显差异,与Quezada等^[31]的研究结果相一致。早产的发生发展受众多因素共同影响,胎盘病变可能并不占据主导作用,故cffDNA浓度在早产的孕妇中变化不显著,尚需进一步分析研究。

综上,本研究发现患妊娠期高血压疾病的孕妇血浆中游离胎儿DNA的浓度降低,低FF是HDP发生的危险因素,尚未发现FF与胎儿生长受限、早产的发病有关,但本研究的病例组数目仍较小,可继续扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [2] Guibert J, Benachi A, Grebille AG, et al. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(8):1733-1736.
- [3] 旷文佳, 陈美华, 董晨. 妊娠中期妇女超甲基化 RASSF1A 基因表达水平与子痫前期的关系 [J]. *新医学*, 2015, 46(7):444-447.
- Kuang WJ, Chen MH, Dong C. Relationship between pre-eclampsia and maternal expression of the hypermethylated RASSF1A gene during the second trimester [J]. *J New Med*, 2015, 46(7):444-447.
- [4] Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease [J]. *Placenta*, 2014, 35(Suppl):S64-S68.
- [5] Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(7):667-674.
- [6] Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy [J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126(3):e31-e37.
- [7] Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31(4):237-243.
- [8] Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(7):662-666.
- [9] Rolnik DL, Da SCF, Lee TJ, et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 52(6):722-727.
- [10] Krishna I, Badell M, Loucks TL, et al. Adverse perinatal outcomes are more frequent in pregnancies with a low fetal fraction result on noninvasive prenatal testing [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(3):210-215.
- [11] Haghiaç M, Vora NL, Basu S, et al. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2012, 20(11):2213-2219.
- [12] Roberge S, Nicolaides K, Demers S, et al. The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2017, 216(2):110-120.
- [13] Leung TN, Zhang J, Lau TK, et al. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(1):137-139.
- [14] Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2002, 21(1):77-83.
- [15] Levine RJ, Qian C, Leshane ES, et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(3):707-713.
- [16] Suzumori N, Sekizawa A, Ebara T, et al. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018, 224:165-169.
- [17] Rolnik DL, O'Gorman N, Fiolna M, et al. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of pre-eclampsia [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(1):106-111.
- [18] Arakaki T, Hasegawa J, Nakamura M, et al. Prediction of early- and late-onset pregnancy-induced hypertension using placental volume on three-di-

- mensional ultrasound and uterine artery Doppler[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(5):539-543.
- [19] Rafaeli-Yehudai T, Imterat M, Douvdevani A, et al. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e200360.
- [20] Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(2):480-484.
- [21] Smid M, Galbiati S, Lojaco A, et al. Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies[J]. *Prenat Diagn*, 2006, 26(9):785-790.
- [22] Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, et al. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 200(1):91-98.
- [23] Al-Mufti R, Lees C, Albaiges G, et al. Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(1):218-221.
- [24] Rolnik D L, Da S C F, Lee T J, et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 52(6):722-727.
- [25] Morano D, Rossi S, Lapucci C, et al. Cell-Free DNA (cfDNA) Fetal Fraction in Early- and Late-Onset Fetal Growth Restriction[J]. *Mol Diagn Ther*, 2018, 22(5):613-619.
- [26] Rafaeli-Yehudai T, Imterat M, Douvdevani A, et al. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e200360.
- [27] Hoesli I, Danek M, Lin D, et al. Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor [J]. *Obstet Gynecol*, 2002, 100(5 Pt 1):992-996.
- [28] Farina A, Leshane ES, Romero R, et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(2):421-425.
- [29] Illanes S, Gomez R, Fornes R, et al. Free fetal DNA levels in patients at risk of preterm labour [J]. *Prenat Diagn*, 2011, 31(11):1082-1085.
- [30] Dugoff L, Barberio A, Whittaker PG, et al. Cell-free DNA fetal fraction and preterm birth [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 215(2):231.
- [31] Quezada MS, Francisco C, Dumitrascu-Biris D, et al. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(1):101-105.

(编辑 余 菁)