

131例早期自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析*

朱蕊¹, 曾爱群¹, 杜晶春^{2**}

(1. 广州医科大学附属第一医院 妇产科, 广东 广州 510120; 2. 广州医科大学 金域检验学院, 广东 广州 510182)

[摘要] 目的: 分析早期自然流产患者的绒毛细胞染色体异常核型分布。方法: 取早期自然流产孕妇绒毛组织, 用胶原酶和胰蛋白酶消化后于 CO₂ 培养箱中培养 7 d, 贴壁细胞加秋水仙素处理后用 G-显带方法观察染色体核型, 分析染色体数目和结构异常情况、性别比例及与孕妇的年龄关系。结果: 131 例绒毛细胞标本中, 129 例标本培养成功, 其中染色体核型异常标本 61 例, 异常核型中三体占 52.4%, 其次是单体 (18%) 和三倍体 (16.4%); 流产胚胎中女性 > 男性 ($P < 0.05$), 但是男性或女性胚胎中正常核型和异常核型比较差异无统计学意义; 从 35 岁以上孕妇获取的标本中染色体核型异常比例显著高于 35 岁及以下孕妇 ($P < 0.05$)。结论: 绒毛细胞染色体核型分析可初步判断早期自然流产患者的流产病因, 对该孕妇此后的成功妊娠有指导意义。

[关键词] 自然流产; 绒毛; 染色体核型; Giemsa 染色; 胚胎; 妊娠

[中图分类号] R714.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)10-1179-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.10.015

Cell Culture and Karyotype analysis of 131 Cases of Early Spontaneous Abortion

ZHU Rui¹, ZENG Aiqun¹, DU Jingchun²

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics of the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, Guangdong, China; 2. Kingmed Inspection Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze chromosomal abnormalities of chorionic villus cell in patients with early spontaneous abortion. **Methods:** The chorionic villus tissues of women with early spontaneous abortion were digested by collagenase as well as trypsin and cultured in CO₂ incubator for 7 days. The karyotype was observed by Giemsa staining method after adherent cells were treated with colchicines. The chromosome number, structural abnormalities, sex ratio and age of the pregnant women were analyzed. **Results:** In 131 cases of villus samples, 129 specimens were successfully cultured. Among them, there were 61 cases of abnormal karyotypes; trisomy in abnormal karyotype was 52.4%; the monomer was 18%; the triploid was 16.4%. The majority of aborted embryos were female, but the sex difference was no statistical significance in normal karyotypes and abnormal karyotypes. The proportion of chromosome abnormalities in the specimens obtained from women over 35 years was significantly higher than that of women under 35 years ($P < 0.05$). **Conclusion:** Chorionic villus karyotype analysis can be used to determine the cause of miscarriage in early spontaneous abortion, which is instructive to the successful pregnancy of the pregnant woman.

[Key words] spontaneous abortion; chorionic villus; karyotype; Giemsa staining; embryo; gestation

*[基金项目] 广州市科技计划项目 (201607010397)

** 通信作者 E-mail: hndjc@aliyun.com

网络出版时间: 2017-10-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171017.2231.028.html>

自然流产是妇产科的一种常见疾病,其发生率占妊娠总数的 10% ~ 15%,其中早期流产(妊娠于 12 周前终止)又约占自然流产总量的 80% 以上。自然流产的病因有很多,包括遗传因素如染色体异常和单基因突变、母体因素如子宫解剖异常、内分泌因素如孕激素分泌不足和甲状腺功能低下,感染因素如 TORCH 感染(TORCH 是指一组病原体:T 即刚地弓形虫,O 即 others,比如乙型肝炎病毒、HIV 病毒、梅毒螺旋体等;R 即风疹病毒,C 即巨细胞病毒,H 即单纯疱疹病毒),免疫因素如封闭抗体缺乏等,在众多因素之中,遗传因素之一的染色体异常是引起早期自然流产的主要原因^[1]。来自胚胎外胚层的绒毛细胞具有与胎儿组织相同的遗传性状,因此利用流产标本中的绒毛细胞可以实现对胎儿染色体核型进行分析,从而明确孕妇流产是否与染色体异常有关,还可对再次成功妊娠起到重要的指导作用。本文对 2013 年 1 月 ~ 2015 年 8 月早期自然流产孕妇的流产标本进行绒毛细胞培养和染色体核型分析,同时分析早期自然流产患者中的胚胎性别比例,并分析染色体数量和结构异常与流产孕妇年龄特点的关系,为临床诊断和指导下次妊娠提供依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

2013 年 1 月 ~ 2015 年 8 月早期自然流产的患者 131 例,21 ~ 45 岁,孕周 8 ~ 12 周,经超声检查确定胚胎停育后,向患者交待病情并签署知情同意后行刮宫术,手术过程中留取流产绒毛标本至无菌标本采集管,并立即送本院妇产科实验室进行后续处理。

1.2 方法

1.2.1 绒毛细胞的培养 超净工作台上用生理盐水冲洗绒毛标本 2 ~ 3 次后,在培养皿或无菌杯中挑取干净无血绒毛枝,选取不同部位绒毛,共剪取大约黄豆大小(8 mg 左右)的绒毛组织转移至干净 15 mL 离心管中,用生理盐水再次冲洗后,在培养皿或无菌杯中剪切至更小组织块后再用由胶原酶和胰酶组成的混合酶溶液在 37 ℃ 作用 5 min,加培养液终止酶反应。生理盐水冲洗并收集标本,1 200 r/min 离心 5 min 后,用培养液悬浮沉淀后接种到 25 cm² 培养瓶中,于 CO₂ 培养箱中培养 5 ~ 7 d 后换液,待细胞融合度达到 80% 左右(一般需 1

~ 2 d)后可进入下一步操作。

1.2.2 制备处于分裂中期的绒毛细胞和 Giemsa 染色 收获细胞前加入 0.1% 秋水仙素溶液处理 2 h 后,用胰酶消化液(GIBCO)处理细胞 5 ~ 10 min,离心收集细胞,弃上清后,用由氯化钾溶液和柠檬酸钠溶液按 1:1 比例制备的低渗液处理 5 min,再加入冰乙酸和甲醇按 1:3 比例制备的固定液 1 mL 预固定后离心,固定液再次固定 1 次后滴片,80 ℃ 烤箱中烤片 2 h,用 Giemsa 染液显带后,显微镜下观察染色体异常情况,多于或少于 46 条皆为染色体数目异常,出现缺失或易位等皆为染色体结构异常,每个标本总共计数 20 个核型,并选出 3 个核型分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计数资料用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绒毛膜细胞培养

131 例标本中 129 例培养成功,有 2 例失败,其中 1 例怀疑标本污染,1 例无贴壁细胞故无法进行核型分析,标本培养成功率达到 98.5%。

2.2 核型鉴定

129 例培养成功的标本中,正常核型 68 例,异常核型 61 例,异常率 47.3%;异常核型中结构异常 2 例,数目异常 59 例,数目异常占 96.7%;数目异常核型中单体 11 例,三体 36 例,多倍体 11 例,嵌合体 1 例,染色体异常核型主要是三体型,占 52.4%,其次是单体和三倍体,见表 1。

2.3 流产胚胎的性别特征

129 例培养成功的流产标本中,女性胚胎(62.8%)所占比例高于男性胚胎(37.2%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。但是男性或女性胚胎在正常核型和异常核型标本中的分布比例经统计学分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.4 早期自然流产患者年龄和流产胚胎核型特征

在 129 例自然流产标本中 35 岁以下的病例有 111 例,其中流产胚胎异常核型 49 例,占 44.1%;35 岁以上高龄的病例有 18 例,但流产胚胎核型异常者有 12 例,占 66.7%,其流产胚胎异常比例明显高于 35 岁以下患者组,见表 3。

表 1 61 例染色体异常标本的核型结果分析
Tab. 1 The karyotype analysis of 61 cases of chromosomal abnormalities

异常核型类型	<i>n</i>	占异常核型(%)
结构异常		3.3
46,xx,del(18)(q22)	1	
46,XY,del(14)(q13q24)	1	
单体		18.0
45,X	11	
三体		52.4
3,5,6,13,14 三体(各 1 例)	5	
4,12,15,20 三体(各 2 例)	8	
18 三体	3	
2 三体	4	
16,22 三体(各 6 例)	12	
双重三体		6.5
48,XXY,+13	1	
48,XY,+6,+20	1	
48,XY,+22,+15	1	
48,XY,+5,+15	1	
三倍体		16.4
67,XXY,-6,-13	1	
68,XX	2	
69,XXX	2	
69,XXY	5	
四倍体		1.6
93,XXXX+12	1	
嵌合体		1.6
45,XX-19/45,X/46,XX	1	

表 2 自然流产胚胎性别与染色体核型分布
Tab. 2 The distribution of sex and karyotype in spontaneous abortion embryos

核型	核型分布(<i>n</i> ,%)	
	男	女
正常	22(45.8)	46(56.8)
异常	26(54.2)	35(43.2)
合计	48(37.2)	81(62.8) ⁽¹⁾

⁽¹⁾与男性比较, $P<0.05$

表 3 流产患者年龄和流产胚胎染色体核型分布
Tab. 3 The distribution of age and karyotype in abortion patients

流产胚胎	<35 岁组	≥35 岁组	合计
正常核型(<i>n</i>)	62	6	68
异常核型(<i>n</i>)	49	12	61
合计(<i>n</i>)	111	18	129
异常比例(%)	44.1	66.7 ⁽¹⁾	47.3

⁽¹⁾与<35 岁组比较, $P<0.05$

3 讨论

绒毛细胞由受精卵发育分化的滋养层细胞及绒毛间质中的胚外中胚层细胞组成,与胎儿组织同源,通过绒毛的检测可反映胎儿情况。近年来随着生活环境和生活方式的改变,临床上自然流产的病
例越来越常见,对自然流产原因的深入分析和探究对于临床诊断和指导下一次的成功受孕有着重要意义。染色体异常导致的流产是早期自然流产的一个主要原因,目前国内外常规的针对自然流产的检查项目是直接对夫妻双方的外周血染色体进行核型分析,但是本研究 and 同行的报道结果提示该方法的阳性率仅有 3.9%~10.5%^[2-3],相反绒毛细胞染色体核型分析能够很好地反映早期自然流产是否与染色体异常相关^[4-5]。绒毛细胞染色体的制备方法一般分为直接法和培养法两种^[6],本研究的结果表明,传统的直接法虽然快速且不易污染,但是所得细胞核型太少且形态不佳,因此要花费很长的时间来分析和判定核型,因此不能作为通用的标准方法。关于细胞培养的方法,与绒毛剪切后直接进行细胞培养法相比,如果在绒毛剪切后再进行短暂的酶消化处理则可以大大提高绒毛细胞的贴壁数量和细胞成活率,获得的细胞核型形态好,从而有利于提高后续的读片效率和保证检测报告的质量,另外核型质量还与绒毛的新鲜程度和终止妊娠的时间长短有关。

本研究中共统计了 129 例自然流产绒毛标本的染色体核型情况,其中染色体核型异常的标本数量达 61 例,占 47.3%,相对于其他文献报道的 50% 以上稍微低一些^[7-9],这可能跟所收集的标本数量多少有一定的关系。在异常核型中,以三体核型异常为主,占 52.4%,在三体核型中多达 13 种染色体异常类型可见,而其中又以 16 号和 22 号染色体三体相对较多,各有 6 例,与其他文献报道一致^[9-10],另外本研究还发现 2 号染色体三体有 4 例,其数量仅次于 16 号和 22 号异型,这在其他文献中未见报道^[9-10]。另外染色体的结构异常情况并不多见,129 例标本中仅发现 2 例,占 3.3%,这一结果一方面可能跟该分析方法的分辨率低,不容易发现染色体的结构异常有关,另一方面可能跟生殖细胞减数分裂过程以及合子早期卵裂过程中的染色体异常行为有关,三倍体的出现则更多与受精过程和合子在有丝分裂时染色体的分离失调相关^[4,11]。

本研究流产的胚胎标本中,女性胚胎占 62.8%,男性胚胎占 37.2%,女性胚胎明显高于男性胚胎,这与其他文献报道相一致^[6,12],对于该现象目前学界还没有科学合理的解释,但是女性胚胎数量在正常核型和异常核型标本中的比例并无显著性差异。另外值得临床医生进一步关注的是这 129 例流产标本多数来自 35 岁以下的女性(111 例,占 86.0%),在 35 岁以下流产孕妇中,核型异常的比例只占 44.1%,这反映了其它因素如免疫因素和生活方式等可能是引起该年龄段孕妇自然流产的主要因素;而在 35 岁以上的高龄流产孕妇中,核型异常的比例占 66.7%,与 35 岁以下年龄段的相比,二者之间有显著性统计学差异,这在一定程度上反映了年龄因素有可能是引起染色体核型异常并最终导致高龄孕妇自然流产的关键因素之一,相信在未来一段时间内随着我国二胎政策的全面实行,流产绒毛标本中的染色体核型异常的比例可能会有一定比例的升高。

综上所述,染色体的核型异常是引起早期自然流产的主要原因之一,绒毛细胞的染色体核型筛查可以帮助临床医生和患者分析和判定流产的原因,从而对下一次的成功妊娠有着重要指导作用。

4 参考文献

[1] 张晓薇,朱壮彦. 妇产科学[M]. 北京:人民军医出版社, 2013:97-99.

- [2] 朱晓芳,伍丽. 4200 例自然流产患者染色体回顾性分析[J]. 检验医学与临床, 2016(4): 531-532.
- [3] 朱蕊,曾爱群,杜晶春. 780 例遗传咨询者外周血染色体核型分析[J]. 海南医学, 2016(14): 2249-2251.
- [4] 陆国辉. 产前遗传病诊断[M]. 广州:广东科技出版社, 2002:90-97.
- [5] 王思慧,傅萍,姜萍. 629 例难免流产患者绒毛染色体分析及病因研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013(11): 34-37.
- [6] 易翠兴,潘敏,胡舜妍,等. 广州地区 97 例自然流产绒毛细胞培养及核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007(9):41-42.
- [7] 熊丽,刘洁,邓康,等. 早期自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析 110 例[J]. 南方医科大学学报, 2009(1):64-67.
- [8] 刘玉昆,刘颖琳,杜涛,等. 早期妊娠自然流产患者的超声表现与绒毛染色体核型分析[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2013(1):94-98.
- [9] 李远眺,邹燕,李勇. 112 例妊娠早期自然流产患者绒毛细胞培养及核型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014(17):2319-2320.
- [10] 李凡,温庆荣,郑胤强,等. 79 例自然流产绒毛的染色体分析[J]. 赣南医学院学报, 2009(3):376-377.
- [11] 李阳洋,章勤. 自然流产绒毛染色体核型分析的研究现状[J]. 实用妇产科杂志, 2012(6):431-434.
- [12] 潘观玉. 早期妊娠自然流产的绒毛细胞培养及染色体核型分析 156 例[J]. 广州医科大学学报, 2015(3):41-44.

(2017-05-09 收稿,2017-08-13 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 乐 萍