

文章编号:1674-7054(2014)02-0174-05

50例稽留流产绒毛染色体分析和实验方法的改进

何旺,陈鑫苹,符生苗

(海南省人民医院 医学检验中心 海南 海口 570311)

摘要:为改进绒毛组织细胞培养方法和染色体制备方法,探讨染色体改变与稽留流产的关系,对50例稽留流产绒毛组织进行培养。每例分为实验组和对照组。两组标本均先用胰酶消化后再培养5~10 d,对照组按常规法收获细胞,实验组将细胞传代后采用改良方法进行收获。两组细胞染色体制片完成后进行G显带分析,分别计算并比较分裂指数。结果表明,实验组细胞收获方法步骤简便易于操作,分裂指数较对照组高,染色体形态和分散程度均较对照组好。50例绒毛组织染色体分析发现常染色体异常14例,性染色体异常8例,染色体结构异常3例,三倍体1例,正常核型24例。

关键词:稽留流产;绒毛组织;长期培养;染色体分析

中图分类号: R 446.8

文献标志码: A

稽留流产又称过期流产(Missed abortion, MA),指胚胎停止发育或胎儿死亡后未及时排除而稽留于宫腔内,是自然流产的一种类型。据文献报道,在造成自然流产的原因中染色体异常约占50%。目前绒毛染色体检测通常采用长期培养法^[1],然而绒毛组织细胞相比于外周血淋巴细胞,其污染率大,分裂指数不高,染色体常扭曲、互相缠绕堆叠,形态往往不佳。笔者对50例胚胎停止发育的人工流产绒毛组织进行培养,对培养条件及收获技术进行了改进,争取最大程度地增加和保留中期细胞数量,改善染色体形态,并对结果进行分析,旨在探讨染色体改变与稽留流产的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 2013年4—10月在海南省人民医院诊断为胚胎停止发育的患者50例(孕周为5~12周,患者年龄18~42岁),张氏羊水培养液 $w=0.25\%$ 的Trypsin-EDTA(GIBCO),双抗溶液(青霉素链霉素溶液)(HyClone),甲醇,冰醋酸 $0.075\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液,无菌生理盐水 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素。

1.2 标本处理 对以上50例稽留流产患者行清宫术后,无菌条件下采集绒毛并浸泡于无菌生理盐水中送检,标本采集到标本处理的时间控制在30 min内,以保证细胞有较高存活率。

1.2.1 对照组绒毛染色体的制备 在无菌条件下将绒毛标本置于直径为10 mL的培养皿中,用灭菌的眼科小剪和镊子小心地从绒毛组织中剥离出绒毛小枝并剪断,收集黄豆大小的绒毛小枝。准备3个盛有10 mL生理盐水的培养皿,分别加入500,300,100 μL 的双抗溶液,按双抗溶液浓度从高到低依次在这3个培养皿中漂洗干净,然后置于新的培养皿中,用一次性灭菌手术刀片尽量将其剁碎,直到接近于浓稠的流体状为佳。此时加入1 mL预热到37 $^{\circ}\text{C}$ $w=0.25\%$ 的Trypsin-EDTA,将培养皿冲刷干净并将剁碎的绒毛组织转移到培养瓶中,让胰酶作用并不断摇晃,每隔1 min用无菌吸管轻轻吹吸5次(勿吹起泡沫),5

收稿日期:2014-02-09

基金项目:海南省自然科学基金项目(808213)

作者简介:何旺(1987-),男,海南省人民医院医学检验中心检验师, E-mail: aan91655@163.com

通信作者:陈鑫苹,女,副主任技师, E-mail: chenxinping52@126.com

min 后加入 2 mL 预热到 37 ℃ 的张氏培养基并混匀,置 CO₂ 培养箱培养 24 h 后可见大量贴壁绒毛块和从绒毛块中游离出来的细胞。此时将培养基倒去并加入 5 mL 新鲜的张氏培养基继续培养 5~7 d,当细胞沿着贴壁的绒毛块周围呈放射状生长,在倒置显微镜下观察圆亮细胞较多时收获细胞。

加入质量浓度为 20 mg · L⁻¹ 的秋水仙素 100 μL 继续培养 2 h,将培养基移至离心管中,在培养瓶内加入 2 mL 预热到 37 ℃ 的胰酶,37 ℃ 水浴 5 min,镜下观察细胞全部脱壁后,将离心管中的培养基倒入培养瓶中并混匀以终止胰酶作用,此时将全部培养物移至离心管中,2 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 后去上清,加入 8 mL 预热到 37 ℃ 的 0.075 mol · L⁻¹ 氯化钾溶液低渗 12 min,加入 1 mL 固定液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$)并晃动使其混匀进行预固定,混匀后离心去上清,加入 8 mL 固定液再离心去上清,滴片,80 ℃ 烤片 4 h 后进行 G 显带。

1.2.2 实验组绒毛染色体的制备 当对照组方法中观察到细胞沿着贴壁的绒毛块周围呈放射状生长且圆亮细胞较多时,倒去培养基并加入预热到 37 ℃ 的胰酶 1 mL,不断摇晃培养瓶约 5 min,在倒置显微镜下观察到细胞全部脱壁之后,加入 2 mL 预热到 37 ℃ 的新鲜培养基继续培养 12 h 后,倒去培养基再次加入 5 mL 预热到 37 ℃ 的新鲜培养基,继续培养 3~4 d,显微镜下观察有大量处于旺盛分裂状态的圆亮或双圆形细胞均匀地布满整个培养瓶时(见图 1)收获细胞。

加入质量浓度为 20 mg · L⁻¹ 的秋水仙素 100 μL 继续培养 2 h,将培养基弃去,在培养瓶内加入 1 mL 预热到 37 ℃ 的胰酶,置 37 ℃ 水浴 5 min。镜下观察细胞全部脱壁后,直接再加入 10 mL 预热的 37 ℃ 0.075 mol · L⁻¹ 氯化钾低渗 12 min(此时镜下可见细胞均胀大变圆),加入 1 mL 固定液预固定,余下步骤同对照组。

1.2.3 细胞分裂指数统计及形态观察 常规制备染色体 G 显带后,选取 30 个病例,每个病例在镜下计数 1 000 个细胞中分裂相的数量,最后根据公式:细胞分裂指数 = 细胞分裂相数/细胞总数(1 000) × 100%,计算出对照组和实验组分裂指数并比较。

2 结果与分析

2.1 细胞分裂指数 由表 1 可知,改良绒毛染色体制备方法结果显示细胞平均分裂指数(3.19%)较对照组(1.74%)明显增高。染色体形态较好,多数染色体为笔直状态且带纹清晰,较少出现扭曲、堆叠状的染色体(见图 2)。

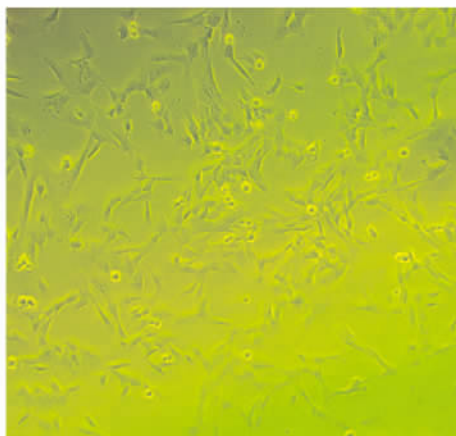


图 1 实验组细胞分布均匀,生长旺盛

Fig. 1 The cells in the experiment group growing well and evenly distributed



图 2 实验组染色体形态较直,缠绕少,带纹清晰

Fig. 2 The chromosomes morphologically straight, less twined, with clear bands

表 1 绒毛染色体对照组与实验组平均分裂指数的比较

Tab. 1 Comparison of average mitotic index between the control and experiment groups

病例 Case	对照组 Control group	实验组 Experiment group
1	(1.7%) 17/1 000	(3.2%) 32/1 000
2	(1.0%) 10/1 000	(1.9%) 19/1 000
3	(1.5%) 15/1 000	(2.6%) 26/1 000
4	(1.5%) 15/1 000	(2.7%) 23/1 000
5	(1.5%) 15/1 000	(1.7%) 17/1 000
6	(1.2%) 12/1 000	(2.6%) 26/1 000
7	(0.9%) 9/1000	(2.3%) 23/1 000
8	(2.5%) 25/1000	(4.8%) 48/1 000
9	(1.4%) 14/1 000	(3.0%) 30/1 000
10	(2.2%) 22/1 000	(4.9%) 39/1 000
11	(3.3%) 33/1 000	(5.1%) 51/1 000
12	(2%) 20/1 000	(3.1%) 31/1 000
13	(2.2%) 22/1 000	(4.2%) 42/1 000
14	(1.4%) 14/1 000	(2.9%) 29/1 000
15	(1.8%) 18/1 000	(2.8%) 28/1 000
16	(2.9%) 29/1 000	(4.4%) 44/1 000
17	(1.8%) 18/1 000	(3.1%) 31/1 000
18	(1.7%) 17/1 000	(2.6%) 26/1 000
19	(1.9%) 19/1 000	(3.5%) 35/1 000
20	(2.1%) 21/1 000	(3.8%) 38/1 000
21	(1.4%) 14/1 000	(2.8%) 28/1 000
22	(1.7%) 17/1 000	(3.7%) 37/1 000
23	(2.5%) 25/1 000	(4.7%) 47/1 000
24	(2.3%) 23/1 000	(3.9%) 39/1 000
25	(0.8%) 8/1 000	(1.6%) 16/1 000
26	(1.4%) 14/1 000	(3%) 30/1 000
27	(1%) 10/1 000	(1.9%) 19/1 000
28	(1.6%) 16/1 000	(2.9%) 29/1 000
29	(1.5%) 15/1 000	(3.3%) 33/1 000
30	(1.5%) 15/1 000	(2.5%) 25/1 000
平均分裂指数 Average mitotic index	1.74%	3.19%

2.2 染色体异常核型 50 例胚胎停止发育的患者中,异常染色体核型为 26 例(占 52%),正常染色体 24 例(占 48%)(见表 2)。

表 2 50 例胚胎停育患者绒毛染色体异常核型统计

Tab.2 Chromosome abnormal karyotypes of villi from 50 cases of patients with embryo diapause

类别 Category	核型 Karyotype	例数 Number of cases
数目异常 Numerical abnormalities of chromosomes		
单体型 Monosomy	45 ,X	8
三体型 Trisomy	47 ,XX + 5	1
	47 ,XY + 7	1
	47 ,XX + 16	1
	47 ,XY + 16	3
	47 ,XY + 18	2
	47 ,XY + 20	2
	47 ,XY + 21	3
三倍体 Triploid	69 ,XXY	1
亚二倍体 Hypodiploid	44 ,XX - 7 - 20	1
结构异常 Chromosomal structural abnormality	47 ,XY + 21 ,inv (9) (p12q21)	1
	47 ,XY + 21 ,inv (9) (p13q21)	1
46 ,XX ,add (18) (q23)	1	
异常核型总例数 The total number of cases with abnormal karyotype		26
正常核型 Normal karyotype	46 ,XX 或 46 ,XY	24

3 讨 论

绒毛组织细胞培养后进行核型分析是诊断 MA 的主要方法 ,但 MA 绒毛组织多数不新鲜 ,易污染 ,培养成功率不高 ;另外 ,染色体异常的妊娠组织往往生长不良 ,造成染色体制备分裂相少 ,染色体形态欠佳等缺陷。笔者对绒毛组织细胞的培养方法和收获方法进行了改良 ,即首先用双抗溶液清洗绒毛枝 ,降低污染概率。其次在培养前先用胰酶消化剪碎后的绒毛组织块 ,使一部分细胞从绒毛组织块中游离出来 ,也让更多的细胞暴露于绒毛组织块表面。然后加入 2 mL 培养液 ,尽量使瓶内液面降低 ,加快了绒毛组织块的贴壁 ,再经过 12 ~ 24 h 短期培养 ,镜下观察可见大量贴壁的绒毛组织细胞。

实验组细胞的传代应选择在细胞生长旺盛时进行 ,密度过高会造成中期细胞数量减少 ,密度过低则细胞生长缓慢 ,实验耗时长。传代后细胞生长速度快 ,分裂相增多 ,细胞生长速度一致。对照组细胞未经传代培养 ,由于细胞总是沿着绒毛块辐射状生长 ,外围细胞生长旺盛时内围细胞往往已老化 ,细胞生长速度不一致 ,分裂指数也较低 (见表 1)。实验组在收获细胞时经胰酶消化之后 ,加入 10 mL 低渗液 ,稀释了胰酶浓度使细胞免受损伤。低渗后可直接加入固定液进行预固定 ,整个预固定过程在培养瓶内完成且不需离心。该法不仅缩短了实验耗时 ,且避免了吹打和离心造成的细胞损伤 ,滴片后分裂相多 (30 例实验组平均分裂指数为 3.19%) ,弯曲状染色体数量较少 ,显带后带纹清晰。而对照组在收获细胞过程中 ,多次离心和吹打可能造成细胞损伤 ,染色体形态易受影响 ,不但耗时较长 ,且多次吹打会损伤细胞 ,从而造成分裂相减少 (30 例对照组平均分裂指数为 1.74%)。

在 26 例异常核型中 ,常染色体异常 14 例 (57.7%) ,性染色体异常占 8 例 (38.5%) ,染色体结构异常 3 例 (11.5%) ,三倍体 1 例 (3.8%)。根据以往的研究^[2-4] ,绒毛染色体三体核型以 13 ,15 ,16 ,18 ,21 号多见。在本研究的三体核型中 ,16 号占 15.4% ,18 号和 20 号各占 7.7% ,21 号占 11.5% ,均为常见异常三

体核型。核型 45,X 比例为 30.8% ,高于文献报道的 10%^[5]。形成三体的原因多为生殖细胞在减速分裂时有一方染色体不分离所致,常染色体三体或丢失引起遗传物质失衡,从而造成孕妇的早期流产。而多倍体核型造成遗传物质严重失衡,往往在胚胎早期就已经停育。

自然流产的影响因素较多,常见有遗传因素、环境饮食、激素水平、免疫因素、孕妇的生理和心理因素等。其中由遗传因素导致的染色体异常是主要原因,且 50% 左右的自然流产原因为染色体异常^[6]。陈雪等^[7]报道的比例更高,这可能是方法学的局限性所致。因此,多次流产史的患者应结合夫妻双方外周血淋巴细胞和流产绒毛染色体检查以排除染色体异常引起的流产,也有助于指导再次妊娠。

参考文献:

- [1]张颖新,刘雨生,何国平,等. 51 例稽留流产胎儿绒毛染色体分析[J]. 临床输血与检验杂志, 2011, 13:157-159.
- [2]STEPHONSON M D, AWARTANI K A, ROBINSON W P. Cytogenetic analysis of miscarriage from couples with recurrent miscarriage: a case-control study[J]. Hum. Re. prod., 2002, 17(2):446-451.
- [3]马玲利,丛林,袁静,等. 100 例早孕胚胎停育绒毛染色体核型分析[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26:4104.
- [4]李书平. 62 例复发性流产夫妇受孕后流产绒毛染色体核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(6):37-38.
- [5]CARRERA M, RIBAS I, TORRENTS M, et al. Spontaneous repeat abortions and numerical chromosome anomalies: genetic diagnosis before preimplantation alternative diagnosis[J]. Prog. Diagn. Prenat., 1996(8):342.
- [6]REECE A E, HOBBS J, eds. Clinical obstetrics: The fetus and the mother[M]. Oxford: Blackwell Publishing, 2007:143.
- [7]陈雪. 自然流产的遗传因素及诊断[J]. 国外医学妇产科分册, 2004(6):340.

Chromosome Analysis of Chorionic Villi in 50 Cases of Missed Abortions and Improvement of an Experiment Method

HE Wang, CHEN Xinping, FU Shengmiao

(Central Laboratory, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China)

Abstract: Chorionic villi tissues from 50 cases of missed abortions were sampled and cultured to improve methods for tissue culture and chromosome preparation and to analyze the relationship between the chromosome change and the missed abortion. All the samples are divided into both control and experiment groups each. They were cultured for 5~10 days after trypsin digestion. The cells from the chorionic villi tissues in the control group were harvested by using the conventional method, while the cells in the experiment group were then subcultured and harvested by using a modified method. The cells from these two groups were analysed by G-banding after their chromosomes were prepared, and their mitotic indexes were calculated and compared. The results showed that the harvesting method in the experiment group is simple and easy to operate and produces higher mitotic indexes and better chromosome morphology and dispersion than the conventional method in the control group. Analysis of the chorionic villi from these 50 cases of missed abortions showed that 14 cases are of autosomal anomalies, 8 cases of sex chromosome abnormalities, 3 cases of chromosomal structural abnormality, 1 case of triploid, and 24 cases of normal karyotypes.

Key words: missed abortion, chorionic villi tissue; long-term culture; chromosome analysis