

· 临床检验研究论著 ·

羊水细胞培养技术的临床应用*

王辉林, 蓝慧娟, 麦光兴, 李启运, 熊礼宽[△]

(深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518133)

摘要:目的 探索羊水细胞染色体培养改良方法, 提高培养、收获成功率, 满足临床诊断需要。方法 对 493 例羊水标本进行细胞培养和染色体收获, 并对实验细节进行优化, 建立标准操作程序。结果 羊水培养成功率 99.8% (492/493), 发现 21-三体 6 例、18-三体 2 例、其他异常 2 例。结论 采取严格质量控制; 保留换液后的上清, 解决因收获失败无法诊断的问题; 采取肝素抗凝等, 消除母血细胞干扰, 可使羊水细胞培养成功。

关键词:细胞, 培养的; 核型分析; 产前诊断; 染色体; 羊水

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)18-2374-02

Clinical application of amniotic fluid cell culture technology*

Wang Huilin, Lan Huijuan, Mai Guangxing, Li Qiyun, Xiong Likuan[△]

(Central Laboratory, Bao'an District Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China)

Abstract: Objective To improve the success rate of cell culture and harvesting, by exploring the modified culture methods of amniotic fluid cell, and satisfy the demand for clinical diagnosis. **Methods** Conducting cell culture and chromosome harvest on 493 cases of amniotic fluid specimens, optimizing the experimental details and establishing the standard operation process. **Results** The success rate of amniotic fluid cell culture was 99.8% (492/493), moreover, 6 cases of 21-trisome, 2 cases of 18-trisome and 2 cases of other abnormalities were shown in the tests. **Conclusion** To ensure the success of amniotic fluid cell culture, it is important to take strict quality control, retain the supernatant after substituting medium for solving the undiagnosed problem caused by harvest failure, and eliminate maternal cell interference by heparin anticoagulant.

Key words: cells, cultured; karyotyping; prenatal diagnosis; chromosomes; amniotic fluid

羊水染色体核型分析是产前诊断染色体疾病的金标准。自 1966 年首次报道应用于胎儿染色体疾病的产前诊断以来, 至今, 此项技术仍在产前诊断中起着无可替代的作用^[1]。羊水细胞培养是否成功是进行产前诊断的关键, 该技术存在要求高、难度大、周期长、易污染等特点, 需要经验丰富的专业人员^[2]。无创产前诊断技术进展迅速, 能检出 21、18 和 13 号染色体的数目改变^[3], 无法检出其结构异常, 不能取代核型分析^[4-5]。本实验针对影响羊水培养成功的污染等问题进行了探索分析, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选择自 2011 年 3 月至 2012 年 12 月来深圳市宝安区妇幼保健院产前诊断中心产前咨询门诊的孕 16~22 周的孕产妇羊水标本 493 份, 均在孕妇知情同意后行羊膜腔穿刺术和羊水染色体检查。

1.2 仪器与试剂 德国艾本德公司 Eppendorf541 离心机; 美国 Thermo 公司 CO₂ 培养箱; 德国 Leica 公司倒置显微镜; 德国 Leica 公司 DM2000 显微镜; 广州达晖公司提供 BioAMF 和 Cytogen 羊水培养基; 深圳怡百世公司提供 Corning 25 mL 培养瓶。

1.3 方 法

1.3.1 标本采集及羊水处理 在 B 超引导下, 经腹穿刺抽取羊水 20 mL 左右, 分别装入 2 支一次性无菌离心管中, 标本尽快送实验室接种。正常羊水以 1 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 保留 0.5 mL 羊水上清, 混匀细胞, 接种入 5 mL 羊水

培养基中。

1.3.2 细胞培养和收获 将接种好的羊水细胞培养瓶放入 CO₂ 培养箱中培养 6 d 后, 在倒置显微镜下观察羊水细胞的克隆大小及数目, 达到要求的就可以换液, 第 2 天收获。加入秋水仙素 80 μL (20 μg/mL), 置 CO₂ 培养箱处理 2 h 后收获细胞。采用 0.25% EDTA/胰酶作用 2~5 min, 将细胞消化成单个细胞进行低渗。用 0.4% 柠檬酸三钠:0.4% 氯化钾=1:1, 低渗 2 min 后加入固定液预固定 5 min, 离心后去上清, 固定 15 min 后离心, 重复固定一次后滴片。

1.3.3 核型分析 将玻片放入电热干燥箱 75 ℃ 4 h 后显带。将 G 显带玻片放入显微镜下观察染色体分裂相, 按照人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN2009) 标准进行核型分析。常规计数 20 个, 分析 4 个分散良好、大于 400 条带的染色体核型, 嵌合体核型计数增至 100 个分裂相。

2 结 果

2.1 羊水收获情况 493 例羊水中一次性培养成功 492 例, 失败 1 例, 成功率为 99.8%。所有羊水平均收获时间为 7.5 d, 最短的 5 d 换液收获, 最长的培养时间为 15 d。收获时间长短与个体差异有关。其中有 37 例严重母血污染的羊水, 均培养成功, 培养周期为 9~15 d, 与正常清亮羊水相比, 培养时间略有延长。493 例羊水标本中均未发现污染的羊水标本。

2.2 核型分析情况 收获的所有标本中, 每例制片 4~6 张, 其中 491 例均获得至少 30 个可供分析的核型, 另有 1 例仅获得 21 个可供分析核型。在 492 例羊水细胞培养中, 有正常核

* 基金项目:深圳市宝安区科技计划项目(2010559)。 作者简介:王辉林,男,检验技师,主要从事遗传病诊断及产前诊断。 △ 通讯作者, E-mail:xioglk@sina.cn。

型的 482 例,异常核型 10 例。具体见表 1。

表 1 羊水细胞培养结果的异常染色体核型

病例	年龄(岁)	孕周(周)	临床诊断	染色体核型
1	34	20	21 三体高风险 1:52	47,XY,+21
2	24	21	21 三体高风险 1:100	47,XY,+21
3	32	18	21 三体高风险 1:100	47,XY,+21
4	26	22	21 三体高风险	47,XX,+21
5	38	19	21 三体高风险 1:6	47,XX,+21
6	29	22	18 三体高风险	47,XX,+18
7	34	18	21 三体高风险	46,X,der(X)
8	32	20	21 三体高风险 1:15	47,XX,+21
9	33	20	不良孕产史	46,XY,t(3;12)(p25;q13)mat
10	36	20	中孕,年龄高风险	47,XX,+18

3 讨论

羊膜腔穿刺是损伤性的取样技术,对孕妇和胎儿有造成损伤、感染、流产的潜在危险,流产发生率约 0.5%^[6]。有研究者报道了通过获取孕妇母血中的胎儿 DNA 物质,利用高通量测序技术进行无创产前诊断 21 三体、18 三体和 13 三体,在 1 741 例可分析的标本中检出了其中所有的 15 例非整倍体标本,所有结果均得到了羊水细胞培养后的染色体核型分析证实,认为无创产前检测常见胎儿非整倍体比三联法母血清筛查敏感性更高,尚无法诊断其他染色体数目改变或异常^[7]。羊水细胞主要来源于胎儿的皮肤、消化道、呼吸道等处,大部分是衰老和固缩的脱落细胞,这使羊水细胞培养较其他组织如外周血细胞、皮肤细胞的培养更为困难^[8],一旦培养失败,孕妇难接受第 2 次穿刺取样和脐带穿刺,所以对羊水细胞培养及传代培养的成功率要求很高^[9]。影响羊水细胞培养成功的因素很多,但主要是培养基质量、标本质量、操作程序文件、工作人员操作技术和质量控制。根据本实验室现有条件摸索出一套较为成熟的羊水细胞培养和收获方法,并取得较好的效果,并建立了适合本实验室的程序文件和操作规程,现将优化实验细节分析如下。

(1)培养基的选择。传统的培养基是在 F10 中加入一定比例的胎牛血清,由于营养成分较少,羊水细胞培养所需时间较长,培养成功率低。本实验采用两种商业化培养基(BioAMF 和 Cytogen 培养基),因其营养成分较齐全,省去了添加生长因子等步骤,方便省时、培养效果好,收获效率高。本实验培养成功的羊水标本细胞均生长良好,圆形、双圆形细胞较多。一次性培养成功 492 例,成功率为 99.8%,高于文献^[10]报道的 96.87%。1 例羊水细胞培养失败,是因为仅接收 6 mL 羊水,羊水细胞量少,细胞无法贴壁生长,从而导致培养失败,失败与所送标本量少有关。(2)羊膜腔穿刺时间。羊膜穿刺时间的正确选择,获取高质量的羊水标本,是细胞培养成功的关键之一。本实验采集 16~22 周之间的羊水,其细胞生长良好,形成的圆形、透亮细胞多。16 周之前的羊水中脱落细胞少,贴壁的细胞相对少;22 周后的羊水中胎粪等杂质增多,严重影响活细胞的贴壁生长。(3)严格无菌操作。从羊水的采集到培养,每一步都必须按照严格的无菌操作进行,任何一个微小的操作疏忽都有可能导致污染。(4)双线操作。培养收获中做到双线操作:送检标本为 2 管;接种必须 2 个人接种;使用不同商业化的 2 种羊水培养基;分别在 2 个培养箱中培养;2 个人收获细胞;2 个人阅片,集中审核发报告。这些措施可以避免因人为因素带来的失误和错误导致培养失败。(5)血性羊水处理。本组共有 37 例严重母血污染的羊水,所占比例为 7.5%,高于国内报道的 1.1%^[11]和国外报道的 2%~3%^[12]。研究者采取措施为发现有母血污染的标本,在穿刺后即加入无菌肝素 1 滴,避免红细胞凝集时把羊水细胞也凝集起来,并采取提早换

液及多次换液的方法,尽可能的排除母体细胞对实验结果的干扰,经过处理后的血性羊水均培养成功,并获得可供临床分析的胎儿染色体核型。(6)污染羊水处理。由于抗菌药物在抗菌的同时也抑制了羊水细胞的生长,故尽量不用或少用。如怀疑羊水受细菌、霉菌或支原体污染时,应考虑使用,用量一般与组织培养相同。研究者未曾发现羊水培养的污染情况,与本实验室的无菌条件好,操作规范有关。(7)上清的继续培养。换液后的上清转入另一个新的培养瓶中继续培养,在培养 5~6 d 后可见大量新的细胞贴壁,并形成克隆,能有效防止第一次羊水细胞收集及染色体制备失败。(8)建立收获标准。要收获较多的分裂相,必须在适当的时机收获。研究者在倒置显微镜下观察到下列情况即为以梭形羊水细胞(A F 细胞)为主要类型的生长细胞,形成的细胞克隆覆盖 1 个或 1 个以上的完整视野,培养瓶中有 3 个以上细胞克隆,且每个细胞克隆中存在有 20 个以上的圆形、双圆形或葡萄状透亮细胞。有时细胞克隆中央的细胞即使开始老化,只要克隆周边细胞生长旺盛也可以收获。

综上所述,采用合格的培养基、双线操作、严格质控等可以增加羊水细胞的贴壁、缩短羊水细胞培养时间,能有效保证羊水细胞培养的成功率,满足临床进行唐氏综合征等染色体病的产前诊断需要,具有重要的临床意义和实际应用价值。

参考文献

- [1] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51): 20458-2063.
- [2] Miron PM. Preparation, culture, and analysis of amniotic fluid samples [J]. Curr Protoc Hum Genet, 2012, 8(1): 1002.
- [3] Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21791.
- [4] Chiu RW, Sun H, Akolekar R, et al. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21[J]. Clin Chem, 2010, 56(3): 459-463.
- [5] Fan HC, Quake SR. Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10439.
- [6] 边旭明, 邹玲仟, 姜玉新. 实用产前诊断学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008: 187-188.
- [7] Song Y, Liu C, Qi H, et al. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(7): 700-706.
- [8] Turhan NO, Eren U, Seckin NC. Second-trimester genetic amniocentesis: 5-year experience[J]. Arch Gynecol Obstet, 2005, 271(1): 19-21.
- [9] 许争峰, 胡娅莉, 朱瑞芳. 高效羊水细胞培养技术在产前诊断中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(4): 275.
- [10] Castro Volio I, Sander Mangel K, Vargas Prado M, et al. Cytogenetical prenatal diagnosis by amniocentesis during the II and III gestation trimesters in Costa Rica[J]. Rev Biol Trop, 2001, 49(3/4): 1227-1236.
- [11] Evans MI, Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic procedures [J]. Semin Perinatol, 2005, 29(4): 215-218.
- [12] 林晓娟, 庆梅, 柳素芬. 1180 例羊膜腔穿刺产前诊断的异常染色体检出率及安全性分析[J]. 实用妇产科杂志, 2006, 26(5): 377.