

• 临床检验研究论著 •

新疆 998 例羊水细胞染色体非整倍性的荧光原位杂交分析

桂俊豪¹, 刘鸿春¹, 周瑾², 涂泽荣², 伏建峰¹, 余伍忠^{1△}

(兰州军区乌鲁木齐总医院:1. 全军临床检验诊断中心;2. 妇产科, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 探讨荧光原位杂交(FISH)技术用于产前诊断胎儿非整倍体的价值。方法 对 998 例未经培养的羊水细胞进行 FISH 检测, 荧光显微镜下观察、判读杂交信号, 以脐静脉细胞染色体核型分析结果作为对照。结果 在 998 例羊水细胞样本中, 累计检出 21-三体综合征 8 例, 18-三体综合征 3 例, Turner 综合征 1 例, 克氏综合征 2 例, 13-单体、21-单体和 18-单体胎儿各 1 例。FISH 结果与羊水细胞或脐静脉细胞染色体核型分析结果一致。结论 FISH 技术对于染色体数目异常的临床诊断具有重要意义。

关键词: 荧光原位杂交; 羊水细胞; 非整倍染色体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)22-2997-02

Application of fluorescence in situ hybridization for chromosomal aneuploidy detection in 998 amniotic fluid samples in Xinjiang

Gui Junhao¹, Liu Hongchun¹, Zhou Jin², Tu Zerong¹, Fu Jianfeng¹, Yu Wuzhong^{1△}

(1. Laboratory Diagnosis Center of PLA; 2. Department of Gynecology and Obstetrics,

Urumqi General Hospital of PLA, Lanzhou Military Command, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of using fluorescence in situ hybridization(FISH) for rapid prenatal detection of chromosomal aneuploidy in amniotic fluid samples. **Methods** A total of 998 amniotic fluid samples were detected by FISH. Fluorescence microscope was used to observe and analyze fluorescence signals. As control, umbilical vein blood cell or amniotic cell was subjected to cell culture and karyotyping analysis. **Results** In concordant with the result of karyotyping analysis, 8 cases with trisomy 21, 3 cases with trisomy 18, 1 case with 45,XO, and 2 cases with 47,XXY were successfully identified by FISH in the 998 amniotic fluid samples, respectively. **Conclusion** FISH plays a significant role in accurate detection of common chromosomal aneuploidies of fetus.

Key words: fluorescence in situ hybridization; aneuploidy; prenatal diagnosis

荧光原位杂交技术(FISH)通过荧光标记的 DNA 探针与待检染色体上的互补序列进行杂交, 根据杂交信号的有无及类型诊断染色体病, 是遗传病及染色体病诊断的重要辅助手段^[1]。本文应用 FISH 技术对本地 998 例符合产前遗传学诊断指征的孕妇实施羊水细胞 FISH 检测, 探讨 FISH 技术用于胎儿染色体非整倍性诊断的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 12 月至 2013 年 6 月自本院优生优育门诊纳入符合产前遗传学诊断的孕妇共计 998 例, 平均孕周为 19.0 周(17~22⁺周), 平均年龄为 31.7 岁(26~43 岁)。其中年龄在 35 岁及以上的孕妇 86 例, 唐氏综合征血清学筛查高风险者 876 例, 曾育 21-三体儿孕妇 4 例; 超声检查发现胎儿异常 24 例; 羊水过少或减少 8 例。所有孕妇均签署染色体病产前诊断知情同意书。

1.2 主要试剂 荧光标记的多色 DNA 探针组(GLP-21/GLP-13, CSP-18/CSP-X/CSP-Y)购自北京金菩嘉医疗科技有限公司, 依次靶向 21 号、13 号、18 号、X 和 Y 染色体 21q22、13q14、18p11.1-18q11.1、Xp11.1-Xq11.1 和 Yp11.1-Yq11.1 的特定区域。其中针对 21 号和 13 号染色体的 GLP-21/GLP-13 探针为位点特异探针, 分别用 Rhodamine(红色)和 FITC(绿色)标记。针对 18 号、X 和 Y 染色体的 CSP-18/CSP-X/CSP-Y 探针为染色体着丝粒特异性重复序列探针, 分别用 DE-AC(蓝色)、FITC 和 Rhodamine 标记。

1.3 方法

1.3.1 FISH 检测 FISH 步骤 FISH 操作按照前文所述的本室常规进行^[2-3]:(1)标本处理。取 4~5 mL 羊水, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 留细胞沉淀。加 5 mL 预温的胶原酶 B, 37 °C 水浴 40 min, 期间吹打 4 次以充分消化。1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 留细胞沉淀, 加 0.075 mol/L 的 KCl 低渗 20 min。固定液预固定 1 次, 再固定 2 次。调整悬浮细胞浓度后滴片, 置 56 °C 恒温箱老化 30 min。(2)玻片预处理。于 2×SSC(标准柠檬酸盐)溶液中漂洗 2 次后, 置 37 °C 预温的胃蛋白酶溶液中消化 10 min, 再于 2×SSC 溶液中漂洗两次, 1% 甲醛处理 10 min。依次置于预冷的 70% 乙醇、85% 乙醇、100% 乙醇中各 3 min 进行梯度脱水, 暗处自然干燥玻片。(3)样本变性、杂交和洗脱。玻片在 70% 甲酰胺-2×SSC 变性液中于 78 °C 变性 6 min, 依次置 70%、85% 和 100% (-20 °C 预冷)乙醇中梯度脱水, 自然干燥。避光条件下制备探针混合物(7 μL 杂交缓冲液+1 μL 去离子水+2 μL 探针), 置 78 °C 变性 5 min。滴加探针混合物于玻片细胞区, 盖上盖玻片、封片, 水平置湿盒内, 42 °C 保温箱过夜杂交。移去盖玻片, 玻片置 67 °C 预温的 0.3% NP-40/0.4×SSC 液处理 2 min, 0.1% NP-40/0.4×SSC 液处理 30 s, 最后 70% 乙醇浸泡 3 min, 暗处自然干燥。于细胞区滴加 DAPI 15 μL 复染, 盖上盖玻片置暗处 10~20 min 后待检。(4)信号判读。应用 ECLIPSE 80i 型荧光显微镜(Nikon)观察各通道信号, VideoTest FISH 2.0 软件分析图像。每例样本随机计数至少 50 个细胞, ≥90% 细胞正常提示为正常样本, ≥60% 细胞异常提示为异常样本, 必要时扩大

计数至 100 个细胞。

1.3.2 羊水细胞、脐静脉血细胞培养及染色体核型分析 羊水细胞、脐静脉血细胞培养及 G 带染色体制备按本室常规进行,参照 ISCN 2005 标准进行核型分析。

2 结 果

采用 FISH 技术对羊水细胞中的目标染色体进行杂交,荧光显微镜观察显示羊水细胞核内红、绿、蓝三色杂交信号明确。在 998 例羊水细胞标本中,累计检出 21-三体综合征 8 例、18-

三体综合征 3 例、Turner 综合征 1 例、克氏综合征 2 例,13-单体、21-单体和 18 单体各 1 例,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),5 种常见染色体非整倍性的总体检出率为 1.7%,其中 21-三体综合征的检出率为 0.8%。本研究中,凡是羊水细胞 FISH 杂交信号异常者均同时行羊水细胞或脐静脉细胞染色体核型分析。经核实,FISH 结果与羊水细胞或脐静脉细胞染色体核型分析结果一致,二者符合率为 100%,见表 1。

表 1 17 例 FISH 杂交信号异常孕妇的临床特征及检测结果

序号	孕龄(岁)	孕周	临床特征或产前诊断指针	FISH 探针类型/信号数	核型分析
1	37	17 ⁺³	高龄	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XY,+21
2	41	19 ⁺⁶	高龄	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XY,+21
3	28	18 ⁺²	唐筛高风险:T21	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XX,+21
4	32	12 ⁺¹	颈部透明带增厚(NT=3.2 mm)	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XY,+21
5	27	19 ⁺³	唐筛高风险:T21	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XX,+21
6	30	16 ⁺⁶	无创基因检测高风险:T21	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XY,+21
7	28	18 ⁺⁴	唐筛高风险:T21	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XY,+21
8	32	16 ⁺⁶	胎儿先心病、鼻骨缺损	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/3	47,XX,+21
9	29	17 ⁺²	发育迟缓、肾盂轻度分离	CSP-X/1,CSP-Y/1,CSP-18/3	47,XX,+18
10	26	19 ⁺⁶	唐筛高风险(T18)、心脏畸形	CSP-X/1,CSP-Y/1,CSP-18/3	47,XY,+18
11	28	22 ⁺²	肠道梗阻	CSP-X/1,CSP-Y/1,CSP-18/3	47,XY,+18
12	29	21 ⁺¹	睾丸体积小	CSP-X/2,CSP-Y/1	47,XXY
13	28	16 ⁺⁵	羊水减少	CSP-X/2,CSP-Y/1	47,XXY
14	30	16 ⁺⁵	生长发育迟缓、羊水过少	CSP-X/1,CSP-Y/0	45,XO
15	31	19 ⁺³	生长发育迟缓、羊水减少	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-13/1	45,XY,-13
16	30	18 ⁺⁵	发育迟缓	CSP-X/1,CSP-Y/1,GLP-21/1	45,XY,-21
17	37	17 ⁺¹	高龄	CSP-X/2,CSP-18/1	45,XX,-18

3 讨 论

大量研究表明,21、13、18、X 或 Y 染色体非整倍性约占新生活婴染色体病的 80%~95%。国内外研究显示,染色体非整倍性的发生源于配子形成过程中同源染色体不分离或姊妹染色单体不分离或丢失,也可起源于受精卵早期卵裂过程中发生染色体不分离或丢失^[4]。

从检测技术上看,细胞培养及核型分析是准确检出染色体非整倍性、发现常见染色体结构异常的金标准。然而,羊水细胞培养及核型分析所需周期长,技术要求高,检测成功率很难确保 100%^[5]。欧美发达国家已经将 FISH 技术常规性应用于产前诊断^[6]。本研究引进多色 FISH 技术,对本地区 998 例胎儿成功实施了 5 种染色体非整倍体检测。结果表明,FISH 信号明晰,结果判读直观,累计检出 21-三体综合征 8 例、18-三体综合征 3 例、Turner 综合征 1 例、克氏综合征 2 例,13-单体、21-单体和 18-单体胎儿各 1 例。经核实,FISH 检测结果与传统核型分析符合率为 100%。

本研究中,唐氏综合征的检出率为 0.8%,位列染色体非整倍性发生之首。随着孕妇外周血胎儿循环核酸测序、比较基因组杂交等分子遗传学新技术的发展^[7-9],唐氏综合征等染色体病的产前诊断正朝着无创性、特异性和准确性更高的方向发展,FISH 技术将成为产前筛查的有力工具。在本文中,成功

确认 1 例无创基因检测高风险胎儿。

总之,本文基于唐氏筛查高危、超声信号异常等产前诊断指针,采用 FISH 技术对新疆 998 例羊水细胞 5 种染色体非整倍性实施有效检测,及时避免了染色体非整倍性患儿出生,为降低本地区新生儿出生缺陷率发挥了积极作用。

参考文献

[1] Caine A, Maltby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment[J]. Lancet, 2005, 366(9480): 123-128.

[2] 桂俊豪, 刘鸿春, 王瑞, 等. 多色荧光原位杂交用于胎儿常见非整倍体的快速产前诊断[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6): 76-79.

[3] 刘鸿春, 王瑞, 黄国香, 等. 新疆地区荧光原位杂交产前诊断非整倍体的应用价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(12): 42-43.

[4] 夏家辉. 医学遗传学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 161-162.

[5] Weise A, Liehr T. Rapid prenatal aneuploidy screening by fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Methods Mol Biol, 2008, 444: 39-47.

[6] 魏平, 李运星, 曾兰, 等. 89 份羊水细胞的荧光原位杂交分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(2): 214-216.

[7] Leclercq S, Lebbar A, Grange G, et al. Optimized(下转第 3000 页)

表 2。

表 1 各组 CD64、WBC、Neu%、CRP 检测结果比较

组别	n	CD64 指数	WBC(×10 ⁹ /L)	Neu%	CRP(mg/L)
A 组	22	5.62±2.16	12.06±6.89	72.63±15.32	76.81±29.62
B 组	30	3.48±1.45	8.23±1.36	68.35±12.57	25.43±18.69
C 组	24	1.22±0.23	5.86±1.28	56.27±6.39	6.51±3.29
D 组	32	1.06±0.18	5.03±1.09	54.95±2.09	5.13±1.54

表 2 CD64 指数、CRP、WBC、Neu% 的敏感性和特异性比较

项目	临界值	敏感性(%)	特异性(%)
CD64 指数	1	83.6	90.8
WBC	10×10 ⁹ /L	63.2	61.8
Neu%	75	77.1	76.9
CRP	8 mg/L	87.9	79.1

3 讨论

CD64 相对分子质量为 72 000, 其编码定位于染色体 1q21.2-q21.3^[2], 是 IgG Fc 片段受体 I (FcγRI), 其能够识别免疫球蛋白, 对 IgG 单体具有高亲和力, 在介导体液免疫和细胞免疫间起到桥梁作用, 对感染性疾病具有早期诊断的价值^[3-5]。正常情况下, CD64 主要分布于巨噬细胞、单核细胞及树突状细胞等抗原递呈细胞 (APC) 表面, 中性粒细胞表面 CD64 呈低水平表达, 甚至几乎不表达, 且表达无性别差异^[6]。当患者患感染性疾病时, 受炎症因子细菌细胞壁脂多糖、白细胞介素-12、γ-干扰素等刺激下, 中性粒细胞表面 CD64 表达在 4~6 h 内即可升高^[7-8]。

随着流式细胞仪的普及和应用, 外周血中性粒细胞 CD64 的表达在临床诊断和治疗细菌性感染中越来越多的得到应用。近些年来, 国内很多学者也开始展开对中性粒细胞 CD64 进行了相关研究。许文芳^[9]等报道 CD64 指数可作为诊断细菌感染的敏感指标, 是重症细菌性感染的诊断、判断病情的可靠指标。Livaditi 等^[10]研究发现, 中性粒细胞 CD64 的表达与细菌感染的严重程度和预后具有密切相关, 可依据中性粒细胞 CD64 感染指数将病程划分为脓毒症、重症脓毒症和脓毒性休克, 同时还发现其与患者病死率呈正相关。

本研究通过对不同病原体感染情况分组分析发现, 细菌感染组 (A+B 组) 与非细菌感染组 (C 组) 的 CD64 指数比较, 细菌感染组 CD64 指数明显高于非细菌感染组, $P < 0.05$, 组间具有显著性差异; 细菌感染组的 CD64 指数与 WBC、Neu% 以及 CRP 比较呈正相关, P 均小于 0.05。且 CD64 指数临界值取 1

时, 敏感性为 83.6%, 特异性为 90.8%, 与 Cid 等^[11]报道的中性粒细胞 CD64 表达用于诊断细菌感染的敏感性 79%, 特异性 91% 一致。因此, 以上数据显示, 中性粒细胞 CD64 能够较为准确地显示感染的状态, 特别在细菌性和非细菌性感染的鉴别中有较高的特异性。

综上所述, 中性粒细胞 CD64 在感染性疾病的诊断和治疗中具有重要作用, 同时其敏感性和特异性也较 WBC、Neu% 和 CRP 高。因此对感染的患者进行中性粒细胞 CD64 检测, 能够正确判断和发现感染性疾病, 以及在细菌性感染危重患者的预后和效果评价上具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] 张晓微, 赵丽, 张羿, 等. 中性粒细胞 CD64 检测对感染性疾病的诊断价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2315-2316.
- [2] Takai S, Kasama M, Yamada K, et al. Human high-affinity FcγRI (CD64) gene mapped to chromosome 1q21.2-q21.3 by fluorescence in situ hybridization[J]. Hum Genet, 1994, 93(1): 13-15.
- [3] 李德红, 居军. 诊断感染性疾病的新指标: 中性粒细胞 CD64[J]. 检验医学, 2012, 27(1): 67-69.
- [4] Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, FcγRI, on human mast cells: up-regulation by IFN-γ[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4332-4339.
- [5] Pauksens K, Fjaertoft G, Douhan-Hakansson L, et al. Neutrophil and monocyte receptor expression in uncomplicated and complicated influenza A infection with pneumonia[J]. Scand J Infect Dis, 2008, 40(4): 326-337.
- [6] Elghetany MT, Lacombe F. Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 157-162.
- [7] Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(8): 903-916.
- [8] Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, et al. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: up-regulation by IFN-gamma[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4332-4339.
- [9] 许文芳. CD64、CRP 在重症细菌感染中的诊断价值[J]. 检验医学, 2011, 26(2): 127-129.
- [10] Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis[J]. Cytokine, 2006, 36(5/6): 283-290.
- [11] Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, et al. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis[J]. J Infect, 2010, 60(5): 313-319.

(收稿日期: 2013-05-15)

(上接第 2998 页)

criteria for using fluorescence in situ hybridization in the prenatal diagnosis of common aneuploidies[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(4): 313-318.

- [8] 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): 20458-20463.

- [9] Lapierre JM, Cacheux V, Collot N, et al. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities[J]. Ann Genet, 1998, 41(3): 133-140.

(收稿日期: 2013-05-22)