

• 临床检验研究论著 •

# 1 016 例孕中期孕妇羊水细胞的培养及染色体核型分析

黎永鉴, 闫丽琼, 庞义坚

(梧州市妇幼保健院, 广西梧州 543002)

**摘要:**目的 探讨羊水细胞培养和染色体核型分析在产前诊断中的应用价值。方法 对 1 016 例孕中期孕妇, 在 B 型超声波检查的监护下行羊膜腔穿刺术, 对抽出的羊水进行细胞培养及染色体核型分析。结果 1 016 例孕妇中, 一次性羊水穿刺、细胞培养成功 1 011 例(99.5%)。胎儿染色体异常核型检出率为 10.3%(105/1 016), 其中, 结构异常 8.3%(85/1 016); 数目异常 2.0%(20/1 016)。856 例接受随访。结论 羊水细胞培养及染色体核型分析是安全、可靠的产前诊断方法。

**关键词:** 产前诊断; 羊膜腔穿刺术; 羊水; 细胞培养技术; 染色体核型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1138-03

## Amniotic cell culture and karyotype analysis of 1 016 pregnant women in second trimester

Li Yongjian, Yan Liqiong, Pang Yijian

(Wuzhou Maternal & Child Health Hospital, Wuzhou, Guangxi 543002, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the application value of amniotic cell culture and karyotype analysis in prenatal diagnosis. **Methods** 1 016 pregnant women in second trimester were subject to amniocentesis under the guidance of B-type ultrasonic inspection, and the cell culture and karyotype analysis were performed on the amniotic fluid which had been drawn out. **Results** Among 1 016 pregnant women, 1 011(99.5%) succeeded in the first operation of amniocentesis and cell culture. The detection rate of fetal chromosomal abnormal karyotype was 10.3% (105/1 016), in which 8.3% (85/1 016) of structural abnormality and 2.0% (20/1 016) of quantity abnormality. 856 cases were received follow-up. **Conclusion** Amniotic fluid cell culture and karyotype analysis is a safe and reliable method for prenatal diagnosis.

**Key words:** prenatal diagnosis; amniocentesis; amniotic fluid; cell culture techniques; karyotype

染色体病是导致出生缺陷的最常见原因之一, 染色体病目前无有效的治疗方法。妊娠中期在超声引导下经腹进行羊膜腔穿刺抽取羊水进行羊水细胞培养及核型分析不但是细胞遗传学产前诊断的主要手段, 也是细胞遗传学金标准。因此, 通过产前诊断避免染色体病患儿出生、对提高人口素质有重要意义。本研究对梧州地区 1 016 例孕中期的孕妇行羊膜腔穿刺术, 进行羊水细胞培养及染色体核型分析, 探讨羊水细胞培养和染色体核型分析在细胞遗传学产前诊断中的应用价值。现进行回顾性总结。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2010 年 3 月至 2013 年 3 月于本院优生遗传咨询门诊及产科门诊就诊的孕妇 1 016 例, 纳入标准: 因各种产前诊断指征而接受羊膜腔穿刺术进行羊水细胞培养与染色体核型分析的孕妇。年龄 16~46 岁, 孕 17~24 周。均签署知情同意书并记录联系方式进行随访。产前诊断指征: (1) 唐氏高危及 13、18 三体高风险; (2) 高龄孕妇( $\geq 35$  岁); (3) 夫妇一方有明显致畸因素接触史, 不良孕、产史; (4) 夫妇一方有染色体异常病史及家族史; (5) 超声检查发现胎儿畸形及病毒感染等。

**1.2 主要仪器** 阿洛卡 ALOK SSD-1000 多普勒超声诊断仪(日本 Aloka 公司)、Thermo Forma-3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司)、Olympus CKX31/41 倒置相差荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、染色体核型分析系统(上海北昂医疗技术

有限公司)。

**1.3 羊膜腔穿刺** 孕妇经适当活动, 在 B 型超声波(B 超)检查的监护下经母腹行羊膜腔穿刺术, 选择腹正中线或脐与脐前上棘连线的中点处, 常规腹部皮肤消毒铺洞巾, 用 6 号腰穿长针头经皮行羊膜腔穿刺术, 无菌抽取羊水 20 mL 分装于 2 支 15 mL 无菌离心管中, 立即送检。

**1.4 检测方法** 抽出羊水离心后, 每管留取 0.5 mL 羊水沉渣接种于 T25 细胞培养瓶中, 每瓶加 Amnio Max 培养液(美国 Gibco 公司)3.5 mL, 置于 37 ℃、100% 湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 7 d 后开始观察细胞生长情况。当显微镜下见 5~6 个羊水细胞克隆, 每个克隆有 50~200 个细胞, 且细胞克隆中有较多圆形、折光性强的分裂细胞时, 即收获细胞; 若羊水细胞经过换液、延长培养时间处理后, 贴壁生长仍不佳, 或羊水细胞在收获、制片、染色过程中因操作失误而失败时, 将羊水细胞作传代培养。吸取培养上清液至一新离心管, 加入 1 mL 0.25% 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 胰酶和 2.5 mL 生理盐水, 37 ℃ 消化 3~5 min, 再转至原离心管, 1 500 r/min 离心 8 min, 弃上清液, 加入 0.075 mol/L KCl 低渗液于 37 ℃ 处理 15 min, 用 3:1 甲醇/冰醋酸预固定和固定后, 滴片, 行常规 G 显带核型分析。

**1.5 核型分析** 显微镜下常规计数分散良好、形态适中、显带清楚的 20~30 个中期分裂相细胞, 采用染色体核型分析系统采集核型图像, 分析 5 个或以上核型; 对异常核型则增加细胞

计数检测。出具报告,提供遗传咨询意见。

2 结 果

1 016 例孕妇中,一次性羊水穿刺、细胞培养成功 1 011 例(99.5%),5 例(0.5%)第 2 次穿刺后培养成功,术后无一例妊娠丢失现象。胎儿染色体异常核型检出率为 10.3%(105/1 016),其中,结构异常 8.3%(85/1 016);数目异常 2.0%(20/1 016)。856 例接受随访。细胞遗传学产前诊断指征分布和染色体核型分析见表 1。羊水细胞染色体核型分析见表 2。

表 1 1 016 例孕妇细胞遗传学产前诊断指征分布及染色体核型分析[n(%)]

产前诊断指征	指征检出	染色体核型异常
血清学筛查高风险 <sup>a</sup>	418(39.6)	49(11.7)*
高龄(≥35 岁)	353(33.5)	25(7.1)
不良孕、产史 <sup>b</sup>	30(2.8)	3(10.0)
孕早期用药史	6(0.6)	0(0.0)
B 超发现胎儿畸形	11(1.0)	3(27.3)
其他 <sup>c</sup>	237(22.5)	26(11.0)
合计 <sup>d</sup>	1 055(100.0)	105(10.3)

<sup>a</sup>:包括 13、18、21 三体高危;<sup>b</sup>:包括染色体异常儿、低智儿、畸形儿;<sup>c</sup>:夫妇双方地中海贫血检测呈阳性且没进行血清学筛查的孕妇;<sup>d</sup>:交叉统计;\* :有 1 例与高龄孕妇项重叠。

表 2 1 016 例羊水细胞的染色体核型分析

种类	异常核型 [n(%)]	妊娠结局与随访
数目异常		
13-三体	1(1.0)	孕 29 周停育
18-三体	3(2.9)	引产,脐血和羊水核型相符
21-三体	11(10.4)	引产,脐血和羊水核型相符
45,X	4(3.8)	引产,脐血和羊水核型相符
47,XXY	1(1.0)	失访
结构异常		
46,X,i(xq)	1(1.0)	异地引产
平衡易位	1(1.0)	合并 β 地贫,异地引产
罗伯逊易位	3(2.9)	3 例足月生产,外观无异常
倒位	33(31.3)	30 例足月生产,外观无异常;3 例失访
多态性*	47(44.7)	43 例足月生产,外观无异常;4 例失访
合计	105(100.0)	

\* :包括大 Y 小 Y、随体增减、可变量增大等。

3 讨 论

机体内、外因素改变会导致导致胎儿先天性染色体数目异常或结构畸变,由此而引起的疾病称为染色体病。活产婴儿中,染色体畸变发生率为 0.5%~0.7%,自然流产儿约 50%有染色体异常<sup>[1]</sup>。染色体病患儿均有生长发育迟缓、智力低下、先天性多发畸形等特点。羊水细胞培养与染色体核型分析能在妊娠中期对胎儿染色体结构和数目异常作出产前诊断,及时发现异常胎儿并终止妊娠,对优生优育,提高人口素质具有重要意义。

本研究的一次性羊水穿刺培养成功率为 99.5%,与文献[2]报道相符,术后无一例妊娠丢失现象,由此可见,B 超介导下行羊水穿刺术进行羊水细胞培养与染色体核型分析是一种成功率高、安全可靠的产前诊断法<sup>[3-4]</sup>。

血清学筛查经济、快速、简便、安全,为大多数孕妇接受,但其存在 5%的假阳性率和 20%~40%的漏诊率。近年来通过检测母体外周血中游离胎儿 DNA,开展了关于染色体非整倍体(T21、T18、T13)的无创 DNA 产前检测技术,具有安全、准确、快速、早期诊断的优点。但由于该项目只能对 13、18、21 三倍体和部分性染色体进行检测,且价格昂贵,还不能广泛普及。因此,在血清学筛查高风险的提示下进行染色体产前诊断仍是当前主要手段。

孕妇随着年龄的增长,尤其是中年以后卵子和纺锤丝逐渐老化,卵细胞减数分裂过程中易导致染色体异常分离,造成胎儿染色体数目异常的概率明显增高,其中以先天愚型最为常见和危害性最大<sup>[5-6]</sup>。有统计显示:<35 岁、35~<40 岁、40~<45 岁、≥45 岁这 4 个年龄组孕妇生育先天愚型胎儿的发生率分别为 0.125%、0.400%、1.000%及 2.000%<sup>[7-8]</sup>。

本研究中,具不良孕、产史指征的孕妇中异常染色体发生率为 10%(3/30),提示既往有不良孕、产史的孕妇再次妊娠出现胎儿染色体异常的概率明显增高。B 超检查发现胎儿畸形常提示胎儿染色体异常的可能<sup>[9]</sup>,对产前诊断具有重要意义。在 237 例夫妇双方地中海贫血检测呈阳性且没进行血清学筛查而要求进行胎儿染色体检查的孕妇中,胎儿染色体异常发生率高达 10.97%(26/237),此类孕妇与胎儿染色体异常的发生有无关联值得进一步研究。

染色体数目异常主要以三体综合征为主。一般认为,三体产生的主要原因是卵子在减数分裂时染色体不分离,导致异常卵子受精。本研究 1 016 例羊水检出常染色体和性染色体数目异常 20 例。

本研究中,染色体平衡异位发生率为 0.39%(4/1 016),高于一般人群的 0.19%<sup>[10]</sup>。染色体平衡异位会导致携带者的生育问题<sup>[11]</sup>,但有研究表明,染色体平衡异位携带仍有机会生育正常后代<sup>[12]</sup>。目前,世界范围内已报道的染色体倒位有 24 种,其中 9 号臂间倒位最为常见,人群中的发生率 1%<sup>[13]</sup>。本研究发现染色体倒位 33 例。由于倒位无染色体丢失,故倒位携带者一般表型正常,倒位携带者与正常人婚育,其染色体可能在倒位节段发生同源配对的交换,理论上可形成 4 种配子,分别为正常、倒位携带、缺失及重复。因此,倒位携带者再生育时,子代染色体畸形儿的发生率高<sup>[14-15]</sup>。染色体多态性主要表现在一对同源染色体之间出现形态结构、带纹宽窄度、着色强度等的明显差异,同时这些微小、恒定的变异又按孟德尔方式遗传,通常没有明显表型效应和病理学意义。也有研究表明,多态性的发生与自然流产、死胎、不孕不育、生育畸形儿等有关<sup>[16-17]</sup>。本研究 1 016 例羊水中检出染色体多态性 47 例(4.62%),远大于人群染色体多态性的发生率(2.6%)。

1 016 例孕妇中 856 例接受随访,随访率较低。除部分孕妇不愿接受随访外,信息收录不全、孕妇更换手机号或停机为主要原因。在今后的工作中,应加强随访机制,加强医患双方的随访意识,提高随访率。

3 讨 论

ICU 患者多伴有严重的基础疾病,免疫力低下,易发生各种类型的感染。本研究 668 株病原菌中,从痰液标本中分离的菌株最多,占 65.0%;其次来自尿液(13.0%)和血液(12.0%)。提示呼吸系统感染在 ICU 患者中多发,与相关文献报道一致<sup>[1]</sup>。真菌感染也以呼吸系统为主,痰液的真菌分离率为 80.7%,由于上呼吸道存在真菌的定植,痰液中检出的真菌不排除定植菌的污染。另外,中段尿、咽拭子和血液中也有少量真菌的检出,与痰液相比,这些部位检出的真菌更具诊断价值。

从感染的病原菌种类来看,革兰阴性菌居多[387(57.9%)];其次为真菌[172(25.8%)],革兰阳性菌[109(16.3%)],这与相关报道类似<sup>[2]</sup>。免疫抑制剂的长期使用使 ICU 患者易发生真菌感染,本研究痰标本中白色念珠菌的分离率较高,仅次于鲍氏不动杆菌,与相关文献的报道有所不同<sup>[3]</sup>,说明 ICU 患者呼吸系统的真菌感染不容忽视,应引起临床医师的重视。血液标本分离的病原菌以凝固酶阴性的葡萄球菌居多,尤其是表皮葡萄球菌,后者是导管相关感染的最常见病原菌,提示 ICU 患者由于各种插管操作,发生导管相关的血源性感染,同时也不能排除因采样污染而导致的凝固酶阴性葡萄球菌检出率增高。ICU 患者尿路感染常见的病原菌为肠杆菌,其中大肠埃希菌的分离率最高,占 19.3%,与非 ICU 患者尿路感染的病原菌分布情况相似。

ICU 患者感染病原菌的耐药情况是值得关注的问题。鲍氏不动杆菌是分离率最高的革兰阴性菌,其对常用抗菌药的耐药率普遍较高<sup>[4-6]</sup>,对头孢呋辛、头孢唑林、呋喃妥因及头孢替坦的耐药率均达 100%,对阿米卡星的耐药率最低,为 30.8%,其原因可能在于,阿米卡星具有一定的肾毒性,这限制了它的临床使用。与其他抗菌药相比,肠杆菌科细菌对碳氢酶类抗菌药的耐药率相对较低,对美洛培南和亚胺培南的耐药率分别为 10.7%和 10.9%。铜绿假单胞菌是院内感染主要病原菌<sup>[7]</sup>,是本院 ICU 分离率位居第二的革兰阴性菌,呈现多药耐药的趋势,对头孢呋辛、头孢唑啉等 8 种抗菌药的耐药率达

100%,对哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星的耐药率较低,均在 20%以下。革兰阳性菌中,葡萄球菌和肠球菌对利奈唑胺、替加环素和万古霉素的敏感性很好,未出现相应的耐药株。未检出对奎奴普丁/达福普汀耐药的葡萄球菌,后者对呋喃妥因也保持了较高的敏感性,耐药率仅为 1.3%;对青霉素和环丙沙星的耐药率最高,分别为 98.7%和 88.9%。肠球菌对青霉素、红霉素、左氧氟沙星、庆大霉素及环丙沙星的耐药率高,均超过 90%,仅分离到 1 株对万古霉素耐药的肠球菌。

ICU 患者病情复杂,易发生感染且感染病原菌对常用抗菌药呈多药耐药趋势,耐药率普遍较高。因此,加强对 ICU 病原菌分布及耐药情况的监测,合理使用抗菌药,将有助于控制耐药菌的传播。

参考文献

[1] 沈黎,周宏,姜亦虹,等. 140 所医院 ICU 医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(21):4900-4902.  
[2] 骆玉乔. ICU 病原菌的耐药性及控制措施分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(23):5399-5401.  
[3] 叶帮芬,袁翊. ICU 下呼吸道医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(18):4160-4162.  
[4] 刘亚新,王亚霞,高惠惠. ICU 医院获得性鲍氏不动杆菌的临床分布及耐药变迁[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(19):4354-4356.  
[5] 李玉珊,于超,杜享亨,等. ICU 与普通病房鲍氏不动杆菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(20):4630-4632.  
[6] 李红,王学涵. 鲍氏不动杆菌在 ICU 的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(18):4142-4144.  
[7] Maraki S, Mavros MN, Kofteridis DP, et al. Epidemiology and antimicrobial sensitivities of 536 multi-drug-resistant gram-negative bacilli isolated from patients treated on surgical wards[J]. Surg Infect(Larchmt), 2012,13(5):326-331.

(收稿日期:2014-02-24)

(上接第 1139 页)

参考文献

[1] 王培林,傅松滨. 医学遗传学[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2011.  
[2] 郭茗,杨惠珠,陆建英,等. 2679 例羊水细胞培养及染色体核型结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2008,16(2):33-44.  
[3] 林晓娟,孙庆梅,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,2010,26(5):377-380.  
[4] 朱瑞芬,许争峰,胡亚莉,等. 1005 例羊水细胞染色体分析在产前诊断中的应用价值[J]. 中国优生与遗传杂志,2005,13(3):39-40.  
[5] 夏家辉. 医学遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004.  
[6] Kong CW, Leung TN, Leung TY, et al. Risk factors for procedure-related fetal losses after mid-trimester genetic amniocentesis[J]. Prenat Diagn, 2006,26(10):925-930.  
[7] 张璘,张晓红,任梅宏,等. 1981 例高龄孕妇的产前细胞遗传学诊断[J]. 中国妇产科临床杂志,2010,11(4):261-264.  
[8] 杜传书,刘祖洞. 医学遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社,1992.  
[9] 贺方华,李琳,李华锋,等. 临沂地区 285 例孕中期羊水细胞染色

体核型分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(9):950-951.  
[10] 夏家辉,李麓芸. 染色体病[M]. 北京:科学出版社,1989.  
[11] 贾蓓,宋兰林,曾嵘,等. 染色体平衡易位反复自然流产六例[J]. 中华医学遗传学杂志,2010,27(6):718-719.  
[12] 扶梅妹,李英,徐两蒲,等. 27 例染色体平衡异位携带者产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志,2010,27(1):105-106.  
[13] 张璘,任梅宏,张晓红. 276 例染色体多态性引起生殖异常分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2010,27(1):103-104.  
[14] 孟西娜,耿金花. 75 例 9 号染色体臂间倒位遗传效应的分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2008,16(5):42-43.  
[15] 张芳,蓝信强,李文波,等. 荣成地区 1881 例遗传咨询者细胞遗传学分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2010,27(5):591-592.  
[16] 戴美珍,钟倩怡,朱敏. 染色体多态性与临床效应的探讨[J]. 中国优生与遗传杂志,2006,14(8):38-39.  
[17] 张建芳,陈必良,赵海波,等. 328 对不良孕产史夫妇染色体核型分析[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(6):125-127.

(收稿日期:2014-01-08)