· 临床检验研究论著 ·

112 例妊娠早期自然流产患者绒毛细胞培养及核型分析

李远眺,邹　燕,李　勇
(广西医科大学第四附属医院检验科遗传室,广西柳州 545005)

摘　要:目的　探讨绒毛细胞染色体异常与妊娠早期自然流产间的临床关系。**方法**　对 112 例妊娠早期自然流产患者绒毛细胞进行短期培养、染色体制备及核型分析。**结果**　成功检测绒毛标本 105 例,占 93.75%(105/112)。其中,检出正常核型 50 例,占 47.62%(50/105);异常核型 55 例,占 52.38%(55/105)。异常核型中以数目异常为主,其中三体型最为常见(33 例),三倍体 6 例,四倍体及复合三体各 1 例,嵌合体 2 例,性染色单体 1 例,结构异常 6 例,另有染色体正常变异 5 例;正常核型中男性 20 例,女性 30 例。**结论**　胚胎染色体异常是导致妊娠早期自然流产的重要因素之一,临床上开展流产绒毛染色体检查有利于判断本次流产原因,合理指导下次妊娠。

关键词:绒毛细胞;　核型分析;　自然流产
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.022　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2014)17-2319-02

Villus cell culture and its karyotype analysis for 112 women who had spontaneous abortion in early pregnancy

Li Yuantiao, Zou Yan, Li Yong
(*Genetics Test Department of Clinical Laboratory, the Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi* 545005, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the clinical relationship between villus cells chromosome abnormality and spontaneous abortion in early pregnancy. **Methods**　Villus cells from 112 women who just had spontaneous abortion in early pregnancy were cultured and prepared for karyotype analysis. **Results**　105 specimens were analyzed successfully which accounted for 93.75%(105/112). Among them 50 specimens were normal karyotype which accounted for 47.62%(50/105), 55 cases were abnormal karyotype accounted for 52.38%(55/105). Abnormal number was the major type of abnormal karyotype. Among them there were 33 cases of trisomy which were most common, 6 cases of triploid, 1 case of tetraploid and 1 case of compound, 2 cases of chimera, 1 case of sexual chromatids and 6 cases of structural abnormalities. In the specimens with normal karyotype, 20 cases were from male, 30 cases were from female. **Conclusion**　Embryo chromosome abnormality is one of the factors causing early pregnancy spontaneous abortion. Conduct villus chromosome examination in clinical treatment is useful to determine the reasons of abortion and to guide the next pregnancy.

Key words: villus cells;　karyotype;　spontaneous abortion

自然流产的发生率约占临床妊娠的 10%～20%,其发生涉及遗传、免疫、感染、内分泌,甚至环境及其他众多未知因素等[1]。其中胚胎染色体发生畸变是自然流产中最常见的原因,在早期自然流产胚胎中约占 50%～60%。本研究通过绒毛细胞短期培养法获得了较好质量的染色体,就胚胎染色体畸变与妊娠早期自然流产相关性进行研究,现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取 2009 年 5 月至 2013 年 10 月于本院妇产科门诊就诊的自然流产患者,经超声检查提示胚胎停育,年龄 17～42 岁,平均 28.84 岁,5～15 孕周。无菌条件下行清宫术取出绒毛组织,置无菌生理盐水培养皿中立即送检。

1.2　方法　绒毛组织标本用无菌生理盐水清洗 2～3 次,去除血丝及蜕膜。选取淡黄色、枝芽粗壮、质量较好的绒毛,用眼科剪细剪成小碎屑状,加入 1640 培养基中。同时加入 100 μg/mL 的秋水仙胺 2 滴(皮试用 1.0 mL 注射器竖滴),至 37 ℃培养箱培养 60 min。将培养后的标本移入离心管中,弃去上清液,加入已预温至 37 ℃的 0.075 mol/L 氯化钾低渗液 6～8 mL,低渗条件下作用 10～15 min。然后,加入固定液 2 mL(甲醇和冰醋酸按 3∶1 配制)进行预固定,而后弃去上清液,加入 60%的冰醋酸 1～2 mL 进行酸化,酸化 1～2 min 后加入约 6 mL 甲醇进行固定。固定后弃去绒毛组织,将细胞悬液 2 000 r/min,离心 6 min,弃去上清液,再加入固定液约 6 mL,固定后离心。离心之后弃去上清液,用固定液将细胞悬液调至适当浓度,滴于冰玻片上,立即置于 80 ℃烤箱中烤片 3～4 h,然后消化、G 显带,计数所见分裂相,并对染色体进行分析、拍照保存。

2　结　　果

2.1　绒毛细胞培养情况　共 112 例流产患者进行了绒毛染色体检测。其中,成功 105 例,失败 7 例,培养成功率为 93.75%。7 例失败标本中,3 例因为操作不当引起的污染,余 4 例因绒毛组织陈旧而失败。

2.2　异常检出率　105 例培养成功样本中,检出异常核型 55 例,核型异常率为 52.38%(55/105)。异常类型以常染色体三体型居多,占异常核型 60%(33/55)。其次是结构异常 6 例,占 10.91%(6/55)。三倍体 6 例占 10.91%(6/55);嵌合体 2 体占 3.63%(2/55);四倍体、复合三体及性染色单体各占 1.81%(1/55);另有 5 例属染色体正常变异,占 9.09%(5/55)。具体核型见表 1。

2.3　流产胚胎性别与染色体核型间的关系　在 105 例已知核型样本中,女性胚胎 61 例,占 58.10%,男性胚胎 44 例,占 41.90%。55 例异常染色体核型异常胚胎中,女性 31 例,占 56.36%(31/55),男性 24 例,占 43.63%(24/55)。具体分布情况见表 2。

作者简介:李远眺,女,主管检验师,主要从事医学遗传学方面的研究。

表 1　55 例绒毛细胞染色体异常核型分析结果

类别	染色体核型	n	构成比(%)
常染色体数目异常			
16 三体	46,XY(XX),+16	11	20.00
22 三体	46,XY(XX),+22	8	14.55
14 三体	46,XY(XX),+14	3	5.45
21 三体	46,XY(XX),+21	3	5.45
12 三体	46,XY(XX),+12	3	5.45
18 三体	46,XY(XX),+18	2	3.64
15 三体	46,XY(XX),+2	2	3.64
13 三体	46,XX,+13	1	1.82
三倍体	69,XXX	5	9.09
	69,XXY	1	1.82
四倍体	92,XXYY	1	1.82
常染色体复合三体	49,XXY,+8,+16	1	1.82
嵌合体	46,XX/47,XXX	1	1.82
	46,XY/92XXYY	1	1.82
性染色单体	45,X	1	1.82
结构异常			
	46,XY,add(1P35),? t(1;?)	1	1.82
	47,XY,+mar	1	1.82
	70,XXY,+mar	1	1.82
	96,XXY,inv(9)(p12q13),+mar(1-4)	1	1.82
	46,XX,del(18)(q21)	1	1.82
罗伯逊易位	46,XX/46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)	1	1.82
染色体正常变异			
	46,XX(XY),inv(9)(p11q13)	4	7.27
	46,XY,22ps+	1	1.82

?:核型不确定。

表 2　胚胎性别与染色体核型间的关系(n)

类型	女性胚胎	男性胚胎
常染色体数目异常	20	13
整倍体(三、四倍体)	4	3
结构异常	3	3
染色体正常变异	2	3
其他异常*	2	2

*:包括性染色单体、嵌合体、常染色体复合三体。

3　讨　　论

妊娠早期自然流产的发病率近年来呈上升趋势,是一种病因复杂的常见病。绒毛细胞染色体检查有助于临床医生了解胚胎细胞的遗传特点,为查找流产病因提供理论依据。在引发自然流产的众多病因中,排在第一位的仍是染色体异常[2]。本研究培养成功的 105 例绒毛细胞样本中,检出异常核型 55 例,异常检出率为 52.38%。与熊丽等[3]报道的 50.05%、刘玉昆等[4]报道的 59.6%相近。

染色体核型异常包括数目异常及结构异常,在可识别的特别是早孕前 3 个月的流产中,胚胎染色体数目发生畸变是最常见原因。此种染色体数目发生畸变主要源自双亲之一的配子形成时或妊娠初期受精卵卵裂时发生了某号染色体不分离现象,致该号染色体增多或减少一条,即导致三体型或单体型胚胎的形成。此类胚胎又因所携带基因严重过剩或缺失而具有致死性从而导致流产的结局。在染色体数目异常的胚胎中,常染色体三体型最为多见。本研究共检出常染色体三体型 33 例,占异常核型的 60%,与肖青等[5]的报道相近,涉及 16、22、14、21、12、18、15、13 号染色体。出现频率较高的有:16 三体 11 例,占异常核型的 20%;22 三体 8 例,占 14.55%;14、21、12 三体各 3 例,占 5.45%。文献[6]报道三体型出现频率最高的染色体是 16、21、18、13、15、22,本研究中 16 号染色体三体出现频率亦为最高,其余染色体均有涉及,只是出现频率略有不同。这可能与地域差异及样本大小有关。值得注意的是,虽然涉及所有染色体的三体型均曾被发现过,但并非随机分布,而是表现为具体类型相对集中的趋势。16 号染色体三体型的高发生率,是否提示 16 号染色体在细胞减数分裂期更容易出现染色体不分离现象?作者提出此观点,仅供同行探讨。另外,除三体型外,本文还检出了 6 例三倍体和 1 例四倍体。此种染色体数目异常可源自新发突变,或来自双亲之一的配子形成过程中异常的有丝分裂,以及精母细胞或卵母细胞减数分裂过程中的异常,亦可源自双受精等[7]。

本研究中,染色体结构异常 6 例,占异常核型的 10.91%,这一结果与文献[8]的报道有所不同。此现象是否提示本地区为胚胎染色体结构异常的高发生地带,可能具有一定的地域独特性或是人群差异。因条件所限,本文无法深入研究,此观点尚需更多流行病学资料的印证。

此外,在本研究中另一值得注意的现象是性别差异。此类性别倾斜现象的机制尚未明了,有学者认为女性胚胎中可能存在诱发自然流产的重要机制[3]。当然,由于本实验室采用的是细胞遗传学分析方法(即核型分析法),无法完全排除母源性污染可能。其发生率约为 25%。作者注意到在本组实验中有两例嵌合体,嵌合了"46,XX"的核型。此种结果是否存在被部分母源细胞污染的可能尚不能完全排除。

综上所述,胚胎染色体异常是导致妊娠早期自然流产的重要原因,但就目前国内大多数医院而言,针对自然流产的夫妻只进行了外周血染色体检查,而未进行流产绒毛染色体检查。胚胎染色体畸变是多发生在减数分裂过程中的偶然事件,绝大多数起源于母体生殖细胞减数分裂 1 期。因此,流产绒毛染色体核型的异常检出率要远远高于流产夫妇的外周血异常核型检出率。鉴于这一因素,笔者倡议在各大中型综合医院应广泛开展针对妊娠早期自然流产的绒毛组织染色体检查。

参考文献

[1] Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss[J]. Hum Reprod, 2002, 8(4): 333-343.

[2] 龚祝萍,青国婷,郝丽娟. 血清绒毛膜促性腺激素、孕酮、泌乳素与早期妊娠结局的关系分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(14): 1411-1412.

[3] 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, 29(1): 64-67.

[4] 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, 34(1): 94-98.

[5] 肖青,秦爽,符芳,等. 134 例首次稽留流产患者的胎儿绒毛染色体分析[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6(3): 792-793.

[6] Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study[J]. Hum Reprod, 2002, 17(2): 446-451.

[7] 李阳洋. 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, 28(6): 431-434.

[8] 梁彩红,榴洁甜,汤丽霞,等. 早期自然流产胎儿绒毛细胞培养及染色体核型分析[J]. 广西医学, 2011, 33(6): 691-693.

(收稿日期:2014-04-18)