

- nal, 2011, 5(3):193-198.
- [23] CHEN Y R, WANG K, LIU Z R, et al. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(9):2319-2327.
- [24] WU J, DONG M L, ZHANG C, et al. Magnetic lateral flow strip for the detection of cocaine in urine by naked eyes and smart phone camera[J]. Sensors (Basel), 2017, 17(6):1286.
- [25] GONG X Q, ZHANG B, PIAO J F, et al. High sensitive and multiple detection of acute myocardial infarction biomarkers based on a dual-readout immunochromatography test strip[J]. Nanomed: Nanotechnol Biol Med, 2018, 14(4):1257-1266.
- [26] WU S J, LIU L H, DUAN N, et al. Aptamer-Based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(8):1949-1954.
- [27] LIU J, ZENG J Y, TIAN Y P, et al. An aptamer and functionalized nanoparticle-based strip biosensor for on-site detection of kanamycin in food samples [J]. Analyst, 2018, 143(1):182-189.
- [28] AHMAD RASTON N H, NGUYEN V, GU M B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of vaspin[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 93:21-25.
- (收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-12-16)

• 综 述 •

脱落滋养层细胞在产前诊断中的应用研究进展^{*}

李 丹 综述, 兰风华 审校

(厦门大学附属东方医院全军检验医学研究所临床遗传与实验医学科, 福建福州 350025)

摘 要: 产前诊断为在出生前预测胎儿是否患有某些遗传性疾病或先天畸形的方法, 又称宫内诊断。诊断时间越早, 操作创伤性越小, 对孕妇及胎儿越有利。通过微创方法收集宫颈脱落滋养层细胞, 对其进行形态学、免疫学、遗传学等分析, 可确定其胎源性来源并实现孕早期胎儿遗传病的诊断, 从而达到产前诊断早期、微创的目的。本文就近年来基于宫颈脱落滋养层细胞的微创性产前诊断进展做一综述。

关键词: 产前诊断; 滋养层细胞; 遗传分析; 先天畸形; 宫颈

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2019. 05. 023 **中图法分类号:**R715. 5

文章编号:1673-4130(2019)05-0597-04 **文献标识码:**A

Advances in the application of transcervical trophoblast cells in prenatal diagnosis^{*}

LI Dan, LAN Fenghua

(Department of Clinical Genetics and Experimental Medicine, PLA Institute of Clinical Laboratory Medicine, Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Prenatal diagnosis is an approach of predicting whether the fetus has certain genetic diseases or congenital malformations before birth, also known as intrauterine diagnosis. The earlier the diagnosis is, the less traumatic the operation is, and the more beneficial to pregnant women and fetuses. By collecting cervical exfoliated trophoblast cells by minimally invasive method and analyzing their morphology, immunology and genetics, we can determine their fetal origin and realize the diagnosis of fetal genetic diseases in early pregnancy, so as to achieve the goal of early and minimally invasive prenatal diagnosis. In this paper, we review the progress of minimally invasive prenatal diagnosis based on cervical exfoliative trophoblast cells in recent years.

Key words: prenatal diagnosis; trophoblast cells; genetic analysis; congenital malformations; cervical

产前诊断是降低遗传缺陷新生儿出生率最重要的方法, 其金标准为羊膜腔穿刺获取羊水中胎儿细胞行产前遗传分析, 但因其操作的有创性、致流产风险和诊断时间位于孕中晚期等原因仍难以为广大孕妇

所接受。通过微创的方式获得胎儿遗传物质及早期的产前诊断技术是该领域研究者追求的目标。宫颈脱落滋养层细胞取材安全、便利, 是产前诊断技术微创化的重要备选来源之一, 且其可将诊断时间提早至

^{*} 基金项目: 福建省科技引导性项目(2016Y0071)。

本文引用格式: 李丹, 兰风华. 脱落滋养层细胞在产前诊断中的应用研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5):597-600.

5 孕周^[1],即在现有的技术能检测出胎儿是否患有先天性疾病之前,在微创性产前诊断领域展示出良好的应用前景。

1 宫颈脱落滋养层细胞的获取

孕早期宫颈脱落滋养层细胞的获取方法有冲洗法(宫腔灌洗和宫颈灌洗)和直接获取法(棉拭子、细胞刷取材法和宫颈黏液抽吸),由于取材方法、孕期、怀孕状态、操作者、检测方法灵敏度等的不同,各研究宫颈滋养层细胞的获取成功率在 40%~90%^[1]。

棉拭子和细胞刷取材法安全性最高,但最易受母体细胞和残留精子及其遗传物质的影响,导致目标细胞获取成功率低,波动范围大,结果可靠性低。国内学者改良的套管拭子以及双取器宫颈毛刷,更易于探入宫颈,取材污染程度相对较低,可将滋养层细胞的获取成功率分别从原来的 37.5%及 40.0%提高至 69.6%及 77.8%^[2-3]。宫颈黏液抽吸法为在超声的定位下借助导管直接吸取宫颈黏液,滋养层细胞的获取成功率为 60.0%左右^[4]。

冲洗法为向宫腔下段或者宫颈管内注射生理盐水后立即回抽获取宫颈黏液标本的方法,该法获取滋养层细胞成功率可达 80%~90%^[5],是目前效率最高的方法。ERGIN 等^[6]在 25 例选择终止妊娠的孕妇中进行宫腔灌洗和宫颈灌洗的方法学比较发现,宫腔灌洗标本目标细胞获取成功率及对胎儿性别的鉴定准确性均高于宫颈灌洗标本,但是两者间的差异无统计学意义。冲洗法所获标本中可见血污染,甚至蜕膜碎片及绒毛碎片,表明该法具有一定的创伤性,且曾报道了 1 例在 7~8 孕周行宫腔灌洗的孕妇于 38 周时产下了四肢严重发育不全的胎儿^[7],以上表明虽然冲洗法目标细胞获取成功率高,诊断准确性好,但是必须正视其侵入性质以及对胎儿潜在的伤害,需要更多的研究对其安全性进行评估。

2 脱落滋养层细胞的分离

滋养层细胞的分离是基于宫颈脱落滋养层细胞进行微创性产前诊断的重要环节,所分离细胞的纯度以及浓度直接影响诊断结果的准确性。国内外所用的方法主要有显微操作法、激光捕获显微切割、免疫磁珠分离、流式细胞术以及差速贴壁培养富集法等。

显微操作法操作简单,在显微镜下直接将标本中形态上具有滋养层组织和绒毛丝特征的细胞团块通过玻璃管吸取出来。有研究利用显微操作后的标本成功鉴定了 152 名胎儿性别、2 例唐氏综合征及 2 例性染色体缺失胎儿^[8],但该方法依赖手工操作,自动化程度较低。

免疫磁珠分离法及流式细胞术基于滋养层细胞表达抗原与其抗体的特异性结合而分离目标细胞。G233 为绒毛外细胞滋养层细胞和中间滋养层细胞表达的人类白细胞抗原 G(HLA-G)的特异性抗体,偶联有该抗体的磁珠与目标细胞结合,在外加磁场的作用

下两者复合物滞留在磁场中从而分离细胞,分离细胞纯度达 90%~100%,每个宫颈黏液标本可获得 500~1 500 个滋养层细胞,分离细胞具有绒毛外滋养层细胞表型和完整核 DNA(>95%)^[9]。流式细胞术利用 HLA-G 的荧光抗体与滋养层细胞结合,分选出高纯度滋养层细胞,该技术也适用于胞质内抗原。这两种方法分离的目标细胞纯度高,但由于抗体高度特异性以及标本前期处理所造成的抗原破坏等因素会导致一定量的目标细胞丢失。

激光捕获显微切割是基于细胞形态和细胞病理特点实现的细胞纯化技术,有研究者切割形态学上具有细胞滋养层细胞或者合体滋养层细胞特点的细胞,经基因型分析确定平均每两个微切割细胞中有一个为滋养层细胞,与免疫组化及原位杂交等技术相结合大大提高了该技术细胞纯化的效率^[10-11],但也应注意因切割精度所带来细胞核及细胞质的损害。

差速贴壁培养法利用滋养层细胞与母体污染细胞在培养时的贴壁速度不同从而去除母体悬浮细胞。袁静等^[12]的研究中,滋养层细胞在差速贴壁培养中的培养成功率为 95%,且成功鉴定了 90%胎儿的性别,直接培养的对照组该细胞的培养成功率为 96%,但是仅正确鉴定了 38%胎儿的性别。该方法很大程度上依赖样本中细胞的活性,宫颈标本中的脱落细胞的活性是限制贴壁培养效率的最大障碍。

3 脱落滋养层细胞的鉴定

分离细胞的胎源性鉴定是利用滋养层细胞进行产前诊断必不可少的步骤。所分离的细胞经形态学、免疫表型以及遗传信息的分析确认其为胎源性细胞,才能进一步利用其进行产前诊断,细胞鉴定方法的准确性是基于滋养层细胞进行产前诊断的关键所在。

形态学方法为在显微镜下观察宫颈标本涂片的苏木精-伊红染色(HE)结果,将滋养层细胞从众多污染母体细胞中识别出来。宫颈滋养层细胞有细胞滋养层细胞、中间滋养层细胞及合体滋养层细胞,其中合体滋养层细胞形态独特,细胞大小形态多变,胞核小且深染,数目不一,大小一致,胞质弱嗜酸性,易于辨别,但形态学鉴定方法主观性强,疑似的细胞需经免疫组化或者遗传分析确定。

利用滋养层细胞表达的特异性抗原表位行免疫组化染色是细胞鉴定的常用方法,常用的鉴定抗体有 G233、抗细胞角蛋白 7(CK-7)抗体、抗人绒毛膜促性腺激素 β (β -hCG)抗体、NDOG5、NDOG1、FT141.1 等。G233、NDOG5 与细胞滋养层细胞特异结合^[13-14];NDOG1 识别合体滋养层细胞^[15];FT141.1 对滋养层细胞均识别^[16]。 β -hCG 为滋养层细胞分泌的特异性蛋白,有研究用其进行分离细胞纯度鉴定^[17];抗 CK-7 抗体特异性低,与高特异抗体联合染色可以抵消由特异性抗体所致的假阴性结果^[18]。抗体自身特异性或者敏感性不足及标本前处理导致的抗原破坏将降低免疫组化

法细胞鉴定的效率,需探索特异度高、敏感度高的抗体组合,或者与分子生物学分析相结合,从而抵消方法学不足。

遗传信息分析方法涉及荧光原位杂交(FISH)、聚合酶链反应(PCR)等,通过识别胎儿细胞区别于母体的遗传信息从而鉴定其胎源性。FISH 用荧光染料标记特定基因,如 Y 染色体上的 DYZ1 卫星Ⅲ和 X 染色体上的 DXZ1 卫星 αDNA^[19],对阳性核进行评估区分胎儿与母体细胞,并可以识别污染精子。与 FISH 相似,PCR 扩增特定基因如性别决定区域 Y (SRY),确定分离细胞的胎源性^[9],BUSSANI 等^[8]研究发现,PCR 与 FISH 鉴定的效率相当^[20],且由于难以区分父源衍生的 X 染色体与母体 X 染色体遗传信息,两者均局限于男性胎儿细胞的胎源性鉴定。由传统 PCR 衍生而来的荧光定量 PCR 基于 DNA 多态性,引入高度多态性标志如短串联重复序列(STR),利用个体的杂合性,与母体细胞的 STR 谱相区别。由于 X 和 Y 染色体长臂假性染色体区域的五核苷酸和次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸-核糖基转移酶 STR 等高度多态性标记的引入使检测不受标本胎儿性别的影响,此外,利用给定 STR 位点荧光峰比例还可进行非整倍体分析^[15]。

4 诊断应用

滋养层细胞分化来源于胎儿组织,与胎儿细胞具有相同的遗传物质,通过对其遗传分析进行产前诊断的方法经研究,现已实现胎儿性别鉴定、多种染色体和单基因遗传病的诊断及不良妊娠结局的预测等。

胎儿性别的诊断对于防止性连锁遗传病患儿的出生尤为重要,1971 年 SHETTLES^[21]通过宫颈黏液标本内的 Y 小体荧光染色准确鉴定出 6 名男性胎儿和 4 名女性胎儿的性别,尽管后续研究结果差异较大,但随着 FISH、PCR 等技术的发展,诊断准确性有了极大的改善。BOLNICK 等^[9]对 5~20 孕周孕妇细胞刷获取的宫颈样本分别进行 FISH、PCR 等检测正确诊断出所有胎儿性别。

染色体疾病是由于染色体结构和数目异常所致的疾病,唐氏综合征以及其他染色体疾病约占全世界新生儿的 0.2%^[19],随着孕妇年龄的增加,胎儿的患病风险增大。基于宫颈脱落滋养层细胞的产前诊断已可实现 21、18、13、X、Y 等染色体异常的诊断^[8,22-23]。SIFAKIS 等^[22]利用细胞刷获取孕 11~13 周孕妇的宫颈黏液,通过 FISH 分析准确诊断出 5 名唐氏综合征的胎儿,单样本中三倍体细胞数最多者可达 27 个。BIRON-SHENTAL 等^[24]加强了对孕早期宫颈滋养层细胞的认识,通过孕早期宫颈样本与胎盘组织的 FISH 杂交结果比较发现,在正常妊娠中,存在由于滋养层细胞的核内复制导致的多倍体细胞的存在,但大多为四倍体,不会导致三倍体的假阳性结果。

单基因疾病超过 7 000 多种,总体发病率达

3.5%,导致约 20%的婴儿死亡,以及 10%的儿童住院率^[25]。该类疾病种类繁多并逐年增加,且不易识别和诊断,是临床诊断最为困难的病种。PFEIFER 等^[11]通过单细胞基因分析成功从 21 名 8~12 孕周的孕妇宫颈样本中筛选出 3 名囊性纤维化及 3 名脊髓性肌萎缩症胎儿。另外研究者们还利用宫颈滋养层细胞数目或者该细胞所表达蛋白的差异进行不良妊娠结局预测^[18,26]。

5 问题与展望

经宫颈获取滋养层细胞进行胎儿遗传信息分析作为微创性产前诊断方法之一,与基于母血中胎儿细胞的产前分析相比,具备目标细胞含量多、母体细胞污染相对少、不易受孕龄影响、与前胎妊娠不重叠等优势。相比于基于母体血浆中游离胎儿 DNA 的产前分析,该方法可以获得完整的胎儿基因组,诊断结果可靠性高,并且不受特殊母体环境下游离肿瘤 DNA 的干扰,是应用前景较广的产前诊断方法,但也存在如下的问题。

首先,虽然样本中母体细胞的污染程度显著少于外周血,但是仍有大量母体细胞的存在,而且由于宫颈标本性质的特殊性,目标细胞的分离仍是棘手的问题。其次,由于分离效率的不足,直接影响后期的鉴定及分析准确性,且目前大多数研究间的分离和鉴定方法没有统一标准,各方法间可比性差,操作主观性强,故可靠性有待证实。再次,当前研究在理论上或一些临床试验证实宫颈取材对继续妊娠没有影响,但研究主要的受试对象为待终止妊娠的孕妇,而无大规模随机对照及产前诊断随访继续妊娠的病例进行比较的数据,故其安全性有待评估。最后,由于大多数研究是在单胎妊娠的情况下进行的,对多胎妊娠进行诊断时,可能存在分析结果与实际不符的现象。异卵双生胎儿的其中之一自发性流失可以干扰正常或非整倍体存活胚胎的 DNA 分析,从而导致假阳性或阴性检测结果^[15],多胎妊娠诊断结果异常时,则必须通过羊膜腔穿刺等有创的方法进行异常的胚胎判别。随着单细胞数字 PCR (dPCR) 和液滴-测序 (Drop-Seq) 技术的发展和引入,上述问题将被逐步解决^[27-28]。

综上所述,基于宫颈滋养层细胞行无创产前诊断应用前景甚广,但目前仍缺乏简单、标准、稳定、安全、可靠的适用于临床常规分析的方法,技术水平上难以大范围应用于临床实验室诊断,因此,需要更多的研究。但其发展为应用于临床的微创性产前诊断方法是未来发展的必然趋势。

参考文献

- [1] IMUDIA A N, KUMAR S, DIAMOND M P, et al. Transcervical retrieval of fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future di-

- rection[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(6):1725-1730.
- [2] 王彩霞,高玉莲. 孕妇生殖道胎儿脱落细胞的免疫组化研究[J]. *中国误诊学杂志*, 2002, 2(4):567-568.
 - [3] 乔云波,史桂芝,王今锦,等. 孕早期子宫颈管脱落滋养细胞的收集与影响因素探讨[J]. *现代妇产科进展*, 2006, 18(1):25-27.
 - [4] FANG C N, KAN Y Y, HSIAO C C. Detection of fetal cells from transcervical mucus plug before first-trimester termination of pregnancy by cytokeratin-7 immunohistochemistry[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2005, 31(6):500-507.
 - [5] CIONI R, BUSSANI C, SCARSELLI B, et al. Detection of fetal cells in intrauterine lavage samples collected in the first trimester of pregnancy[J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22(1):52-55.
 - [6] ERGIN T, BALTACI V, ZEYNELOGLU H B, et al. Non-invasive early prenatal diagnosis using fluorescent in situ hybridization on transcervical cells: comparison of two different methods for retrieval[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001, 95(1):37-41.
 - [7] CHOU M M, LIN S K, HO E S C. Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 weeks' gestation[J]. *Prenat Diagn*, 1997, 17(1):77-80.
 - [8] BUSSANI C, CIONI R, MATTEI A, et al. Prenatal diagnosis of common aneuploidies in transcervical samples using quantitative fluorescent-PCR analysis[J]. *Mol Diagn Ther*, 2007, 11(2):117-121.
 - [9] BOLNICK J M, KILBURN B A, BAJPAYEE S, et al. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) for noninvasive prenatal screening at 5 to 20 weeks of gestation[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(1):135-142.
 - [10] 王文勇,黄晓峰,闫庆国,等. 激光捕获显微切割技术新进展[J]. *诊断病理学杂志*, 2010, 17(3):226-228.
 - [11] PFEIFER I, BENACHI A, SAKER A, et al. Cervical trophoblasts for non-invasive single-cell genotyping and prenatal diagnosis[J]. *Placenta*, 2016, 37:56-60.
 - [12] 袁静,付娟娟,陈薇,等. 宫颈处脱落滋养细胞用于孕早期产前诊断的初步研究[J/CD]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2014, 7(4):6-10.
 - [13] LOKE Y W, KING A, BURROWS T, et al. Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody[J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50(2):135-146.
 - [14] ADINOLFI M, SHERLOCK J. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation[J]. *Hum Reprod Update*, 1997, 3(4):383-392.
 - [15] MANTZARIS D, CRAM D S. Potential of syncytiotrophoblasts isolated from the cervical mucus for early non-invasive prenatal diagnosis: evidence of a vanishing twin[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 438:309-315.
 - [16] KATZ-JAFFE M G, MANTZARIS D, CRAM D S. DNA identification of fetal cells isolated from cervical mucus: potential for early non-invasive prenatal diagnosis[J]. *BJOG*, 2005, 112(5):595-600.
 - [17] BOLNICK J M, KOHAN-GHADR H R, FRITZ R, et al. Altered biomarkers in trophoblast cells obtained noninvasively prior to clinical manifestation of perinatal disease[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:32382.
 - [18] IMUDIA A N, SUZUKI Y, KILBURN B A, et al. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(9):2086-2092.
 - [19] JAIN C V, KADAM L, VAN DIJK M, et al. Fetal genome profiling at 5 weeks of gestation after noninvasive isolation of trophoblast cells from the endocervical canal[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(363):363re4.
 - [20] BUSSANI C, CIONI R, SCARSELLI B, et al. Strategies for the isolation and detection of fetal cells in transcervical samples[J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22(12):1098-1101.
 - [21] SHETTLES L B. Use of the Y chromosome in prenatal sex determination[J]. *Nature*, 1971, 230(5288):52-53.
 - [22] SIFAKIS S, GHATPANDE S, SEPPO A, et al. Prenatal diagnosis of trisomy 21 through detection of trophoblasts in cervical smears[J]. *Early Hum Dev*, 2010, 86(5):311-313.
 - [23] 邓璐莎,陈宝江,朱晓丹. QF-PCR 技术应用于孕早期宫颈脱落滋养细胞产前诊断的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 18(10):20-21.
 - [24] BIRON-SHENTAL T, FEJGIN M D, SIFAKIS S, et al. Endoreduplication in cervical trophoblast cells from normal pregnancies[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012, 25(12):2625-2628.
 - [25] BELL C J, DINWIDDIE D L, MILLER N A, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(65):65ra4.
 - [26] FRITZ R, KOHAN-GHADR H R, BOLNICK J M, et al. Noninvasive detection of trophoblast protein signatures linked to early pregnancy loss using trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(2):339-346.
 - [27] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. *Cell*, 2015, 161(5):1202-1214.
 - [28] YUCHA R W, HOBBS K S, HANHAUSER E, et al. High-throughput characterization of HIV-1 reservoir reactivation using a single-cell-in-droplet PCR assay[J]. *EBioMedicine*, 2017, 20:217-229.

(收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-12-04)