

## 156 例自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析

郑文婷 尹志军 黄雪珍

作者单位: 528415 广东中山, 南方医科大学附属小榄医院检验科

通信作者: 郑文婷, Email: 247090480@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.01.017

**【摘要】** 目的 探讨染色体核型分析在自然流产查因中的应用。方法 选择 2019 年 1—12 月于南方医科大学附属小榄医院就诊的 156 例自然流产患者作为研究对象, 对所有患者进行绒毛细胞培养与 G 显带核型分析, 计算培养成功率, 分析染色体异常检出率及主要异常类型。结果 156 例自然流产孕妇中绒毛培养成功 144 例, 培养成功率为 92.3%, 其中 28~34 岁和 35~40 岁年龄段患者的标本培养成功率分别为 96.1% (98/102) 和 85.2% (46/54); 9 例因染菌导致培养失败, 3 例因胚胎停育时间过长、标本活性差、细胞不贴壁导致培养失败。检出染色体异常 70 例, 异常检出率为 48.6%, 其中常染色体非整倍体 44 例、性染色体非整倍体 16 例、三倍体 7 例、四倍体 1 例、染色体结构异常 2 例, 异常核型以 X 单体 [22.9% (16/70)]、16 三体 [20.0% (14/70)]、22 三体 [15.7% (11/70)]、21 三体 [10.0% (7/70)] 和三倍体 [10.0% (7/70)] 为主。结论 染色体异常是导致自然流产的重要原因, 对流产绒毛进行染色体核型分析有助于查明自然流产的原因, 以便指导患者以后的生育并进行必要的产前诊断。

**【关键词】** 自然流产; 绒毛; 核型分析; 细胞培养

### Cell culture and karyotype analysis of spontaneous abortion villi in 156 cases

Zheng Wenting, Yin Zhijun, Huang Xuezheng. Clinical Laboratory, Xiao Lan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528415, Guangdong, China

Corresponding author: Zheng Wenting, Email: 247090480@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the application of karyotyping in detection of the causes for spontaneous abortion. **Methods** 156 patients of spontaneous abortion villi admitted in Xiao Lan Hospital Affiliated to Southern Medical University from January to December 2019 were selected as research objects. The villus cell culture and G-banding karyotype analysis were performed in all patients, the success rate of culture was calculated, the detection rate of chromosomal abnormalities and main types of abnormalities were analyzed. **Results** In 156 patients of spontaneous abortion, 144 cases of villus culture were successful, the success rate was 92.3%. Nine cases failed due to infection of bacteria, 3 cases failed due to prolonged embryo suspension, poor specimen activity and non adherent cell culture. The success rates of specimen culture of 28–34 year old and 35–40 year old patients were 96.1% (98/102) and 85.2% (46/54). Forty-four cases were detected as autosomal aneuploidy, 16 cases were sex chromosome aneuploidy, 7 cases were triploidy, 1 case was tetraploid and 2 cases were structural abnormality. The abnormal karyotypes were mainly X monomer [22.9% (16/70)], 16 trisomy [20.0% (14/70)], 22 trisomy [15.7% (11/70)], 21 trisomy [10.0% (7/70)] and triploid [10.0% (7/70)]. **Conclusions** Chromosomal abnormality is an important cause for spontaneous abortion. Karyotype analysis of abortion villi is helpful to identify the causes of spontaneous abortion and guide the patients who will be pregnant again and to make necessary prenatal diagnosis.

**【Key words】** Spontaneous abortion; Villi; Karyotyping; Cell culture

自然流产是指妊娠不足 28 周、胚胎 / 胎儿体重不足 1 000 g 的宫内妊娠自然终止, 分为早期自然流产 (<12 周) 和晚期自然流产 (12~28 周)。约 25% 的女性在生育年龄会经历至少 1 次自然流产, 且流产的发生率随孕妇年龄增长而升高。约 10%~15% 的临床可识别妊娠会发生自然流产, 其中绝大部分发生在妊娠早期<sup>[1]</sup>。自然流产的病因复杂, 主要涉及胚胎因素、环境因素、母体因素、免疫因素等异常

改变<sup>[2]</sup>。胚胎异常因素主要为胚胎遗传物质的改变, 其中最常见的是染色体异常 (包括染色体数目异常和结构异常)。目前有研究显示, 孕早期发生的自然流产约 50% 是由胚胎 / 胎儿遗传因素异常引起的<sup>[3-5]</sup>, 其他致病因素主要包括抗磷脂抗体综合征、致畸药物、母体因素等。对流产绒毛行 G 显带核型分析是在自然流产查因中最常见的实验室方法。本研究拟通过对 156 例自然流产孕妇行绒毛细

胞培养和 G 显带核型分析,计算培养成功率,分析染色体异常检出率及主要异常类型,旨在探讨染色体核型分析在自然流产查因中的应用。

### 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 选择 2019 年 1—12 月因自然流产和胚胎停育来本院查因的 156 例患者作为研究对象,年龄 28~40 岁,平均(32.4±2.0)岁;停经 7~13 周,平均孕周(11.2±0.2)周;所有患者均行清宫术。在患者知情同意下,流产胚胎送实验室行绒毛细胞培养和染色体 G 显带核型分析。

### 1.2 检测方法

**1.2.1 绒毛细胞培养** 挑选 3~4 根绒毛置于一次性平皿内,用生理盐水反复漂洗绒毛组织 2~3 次去除血液。将漂洗后的绒毛组织置于 1.5 mL 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)冻存管中,使用灭菌眼科手术剪将绒毛组织剪碎(约 80 次),将剪碎的绒毛组织吸到 15 mL 无菌离心管中,加入 2 mL 已预温的 0.25% 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)胰酶消化液(广州达晖生物技术股份有限公司),大力吹打 80 下左右,盖好盖子后置于培养箱中培养 2~3 min,加入 1 mL 胎牛血清(广州蕊特生物科技有限公司)终止消化,离心弃上清后加入 10 mL 羊水培养基(广州达晖生物技术股份有限公司),混匀后平均分装到两个培养瓶中,分别放置在两个二氧化碳培养箱(日本松下 MCO-18AIC)中于 37℃ 培养 7 d,观察绒毛细胞生长情况,可见有大量成纤维细胞或上皮样细胞生长后更换培养液传代,1~2 d 后在显微镜下观察细胞,每个细胞之间有接触又连接不是很紧密时即可收获<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 细胞收获** 使用秋水仙碱处理并用 75 mol/L 氯化钾进行低渗处理,8~10 min 后加入固定液,预固定 10 min,以 1 500 r/min(离心半径为 9 cm)离心 10 min,弃去上清液并固定 30 min。

**1.2.3 制片** 根据细胞沉淀,对光检查细胞悬液,调至合适浓度滴片,使用相差显微镜观察滴片情况。

**1.2.4 烤片** 将滴片放入 58~60℃ 烘箱过夜。

**1.2.5 显带** ① 准备显带试剂:将胰酶消化液、胎牛血清终止液、吉姆萨染色液置于 37℃ 水浴箱中预热。② 试片:选择核型较好、片数较多的标本试片,初始胰酶消化时间选择可参考前次试验,胎牛血清终止液浸洗 10 s,进行吉姆萨染色,马上用水冲净后吹干。③ 推片:在相差显微镜下观察核型及显带情况,适时调整胰酶消化时间和吉姆萨染色时间。

继续试片直至成功显带,固定显带条件。

**1.2.6 染色体核型分析** 在莱卡 GSL120 染色体图像分析系统中计数 30 个核型,分析 5 个核型,如遇到嵌合体则计数 100 个核型。

**1.3 伦理学** 本研究符合医学伦理学标准,经本院医学伦理委员会批准(审批号:20210316),对患者的检测均获得过患者或家属的知情同意。

### 2 结果

**2.1 自然流产绒毛细胞培养情况** 156 例自然流产孕妇中绒毛细胞培养成功 144 例,9 例因染菌培养失败,3 例因胚胎停育时间过长造成标本活性差、细胞不贴壁而培养失败,培养成功率为 92.3%。见表 1。

表 1 自然流产绒毛细胞培养情况

年龄段(岁)	例数(例)	培养成功(例)	成功率(%)	培养失败(例)	
				染菌	胚胎停育时间过长
28~34	102	98	96.1	3	1
35~40	54	46	85.2	6	2
合计	156	144	92.3	9	3

**2.2 绒毛细胞异常核型检测** 检出异常核型 70 例,检出率为 48.6%(70/144),其中常染色体非整倍体 44 例、性染色体非整倍体 16 例、三倍体 7 例、四倍体 1 例、染色体结构异常 2 例;异常核型以 X 单体、16 三体、22 三体、21 三体为主。见表 2,图 1~4。

表 2 自然流产绒毛细胞 G 显带核型分析检出的异常核型

异常核型	例数(例)	构成比(%)	异常核型	例数(例)	构成比(%)
16 三体	14	20.0	X 单体	16	22.9
22 三体	11	15.7	三倍体	7	10.0
21 三体	7	10.0	四倍体	1	1.4
18 三体	5	7.2	46,XY,der(1)		
13 三体	5	7.2	t(1;16)(q25;q13)	1	1.4
2 三体	1	1.4	47,XX,+der(7)t		
20 三体	1	1.4	(1;7)(q32;q32)	1	1.4
			合计	70	100.0

### 3 讨论

自然流产大部分是由于胎儿染色体异常引起的,随着二孩政策的放开,高龄孕妇越来越多,导致胎儿染色体异常的概率上升,自然流产率也随之上升,给优生优育工作带来很大压力。绒毛细胞与胎儿来源于同一个受精卵,通过对流产胚胎绒毛细胞的核型分析可以获得胎儿的核型信息,从而了解自然流产是否为胎儿染色体异常造成的。

流产绒毛是从自然流产后清宫取出的组织中挑

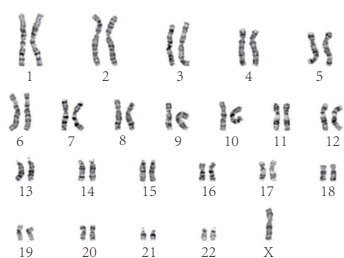


图 1 异常核型 X 单体

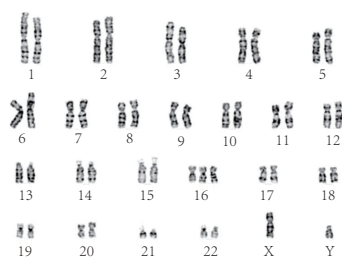


图 2 异常核型 16 三体

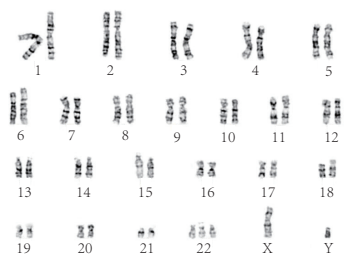


图 3 异常核型 22 三体

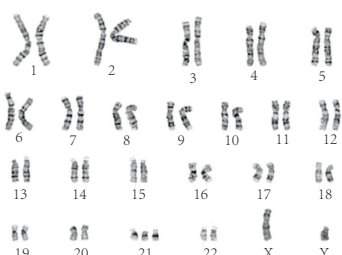


图 4 异常核型 21 三体

选出来的,部分标本由于胚胎停育时间过长而活性较差,培养时不容易贴壁生长;标本取材时要经过阴道,可能会接触阴道而被污染;上述原因都会导致绒毛细胞培养失败。本研究中流产绒毛细胞的培养成功率为 92.3%,有 9 例因染菌培养失败,3 例因标本活性差、细胞不贴壁而培养失败。

本研究表明,自然流产绒毛的染色体异常最常见的是常染色体非整倍体、性染色体非整倍体和多倍体,异常核型以 X 单体、16 三体、22 三体、21 三体和三倍体为主。染色体非整倍体数目异常的主要原因是减数分裂时染色体不分离或染色体丢失,形成多一条或少一条染色体的配子,再与正常配子结合形成多一条或少一条染色体的受精卵;次要原因是正常受精卵在有丝分裂过程中发生了染色体不分离或染色体丢失,最终都会造成遗传物质不平衡,导致胎儿自然流产。三倍体的产生是由于双雄(或双雌)受精,比正常的二倍体多了一套染色体组,遗传物质增加一半,最终导致胎儿自然流产。四倍体是由核内复制或核内有丝分裂造成的,染色体在一个细胞内复制了一次却没有分裂成两个细胞,造成遗传物质成倍增加,属于新发突变。染色体结构异常大部分是因为双亲之一为染色体平衡性结构异常携带者(如双亲一方为染色体平衡易位、倒位、插入或罗氏易位),由双亲中的携带者遗传给胎儿的,也有少数是新发的。染色体非整倍体数目异常、三倍体和四倍体均属于新发突变,主要与有自然流产史夫妇双方的年龄、环境、辐射接触、药物接触等多种因

素相关,属于偶然事件,有自然流产史夫妇双方的染色体一般为正常,再发风险不会增加很多。当绒毛细胞染色体检出结构异常时,应对夫妇双方行染色体核型分析,从而使患者了解受孕的概率,指导其以后生育并进行必要的产前诊断<sup>[7-9]</sup>。本研究中有 2 例染色体结构异常的流产绒毛,对这两对自然流产夫妇行外周血染色体核型分析,发现两对夫妇中均有一人存在染色体平衡易位,理论上他们有 1/18 的概率生育正常胎儿和 1/18 的概率生育异常基因携带者,其余 16/18 的概率均会生育染色体不平衡(部分三体、部分单体或单体)的胎儿,而他们本次怀孕正是因为胎儿染色体不平衡而导致自然流产。

综上所述,胎儿染色体异常是导致自然流产的重要原因,对流产绒毛细胞行染色体核型分析有助于查明自然流产的原因,以便指导患者以后的生育并且进行必要的产前诊断。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- 1 SAHOO T, DZIDIC N, STRECKER M N, et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges [J]. *Genet Med*, 2017, 19 (1): 83-89. DOI: 10.1038/gim.2016.69.
- 2 李木祺. 血清甲胎蛋白及  $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素检测在早期先兆流产预测中的应用分析 [J]. *实用检验医师杂志*, 2020, 12 (1): 10-12. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.01.004.
- 3 WANG Y, CHENG Q, MENG L, et al. Clinical application of SNP array analysis in first-trimester pregnancy loss: a prospective study [J]. *Clin Genet*, 2017, 91 (6): 849-858. DOI: 10.1111/cge.12926.
- 4 李奉瑾, 姚欣雨, 张玉萍. 高通量测序技术在稽留流产绒毛组织染色体检测中的应用分析 [J]. *中国药物与临床*, 2020, 20 (3): 348-350. DOI: 10.11655/zgywylc.2020.03.005.
- 5 朱晓芳, 伍丽. 4 200 例自然流产患者染色体回顾性分析 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13 (4): 531-532. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.041.
- 6 胡惠彬. 不同方法对羊水细胞培养成功率的影响 [J]. *实用检验医师杂志*, 2020, 12 (1): 7-9. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.01.003.
- 7 李志毅, 刘欣燕, 彭萍, 等. BoBs 分子诊断技术在早期自然流产遗传学分析中的应用及评价 [J]. *中华妇产科杂志*, 2018, 53 (5): 308-312. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2018.05.005.
- 8 张华坤, 罗福薇, 耿茜, 等. 252 例稽留流产者绒毛细胞遗传学分析及环境因素初探 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28 (5): 575-578. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.05.024.
- 9 何文凤, 姜艳华, 黄红丽, 等. 核苷酸微阵列技术在复发性流产发病机制及潜在致病位点中的应用研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35 (6): 1144-1146. DOI: 10.19829/j.zgybj.issn.1001-4411.2020.06.056.

(收稿日期: 2020-10-20)

(本文编辑: 邵文)