



早孕期经宫颈细胞中寻找胎儿细胞及免疫细胞化学研究

遗传性疾病和先天性疾病约占人口总数的0.6% [1], 对于大部分疾病尚无有效治疗方法, 目前主要处理是进行遗传咨询, 在妊娠期确诊胚胎或胎儿患病, 终止妊娠, 杜绝患儿的出生。产前诊断技术正从有创性向无创或微创性方向发展, 尽早确诊疾病, 实施人工流产, 可减轻孕妇痛苦, 为下一步诊疗争取时间。近年来, 从经宫颈细胞中寻找胎儿细胞的研究已获得相当程度的发展。国外已有学者报道经宫颈细胞中胎儿细胞的存在, 并用FISH或PCR诊断部分染色体数目异常遗传病和部分单基因疾病, 如地中海贫血等。本研究对4种不同的经宫颈细胞取材方法进行了比较, 探讨用于产前诊断的微创取材方法及适合进行取材的时机。

1 资料和方法

1.1 标本来源

选择南方医院2005年11月~2006年1月间门诊要求终止妊娠的早孕、无生殖器官炎症、终止妊娠前5d内无性生活史的妇女80例, 分成两组: HE染色组(I)和免疫细胞化学组(II)。对照组选择通水术中输卵管通畅的健康妇女80例, 分为两组: HE染色组(III); 免疫细胞化学组(IV)。I、II组孕妇妊娠在35~77d之间。

1.2 实验方法

1.2.1 用品及试剂 碘伏棉球、酒精棉球、窥阴器、宫颈钳、无菌棉拭子、人工受精导管、注射器、生理盐水、硅化防脱玻片、离心机。一抗: 鼠抗人HLA-G单克隆抗体浓缩液由英国SEROTEC公司购得; 二抗: LHK611(抗小鼠)+DAB显色液由深圳晶美生物工程有限公司购得。

1.2.2 取材方法 实验组及对照组妇女排空膀胱后, 取膀胱截石位。常规消毒铺巾, 暴露并消毒宫颈, 取材方法如下, (1) 无菌棉拭子术: 无菌棉拭子伸入宫颈内口, 旋转数周后缓慢取出。(2) 宫颈粘液吸引术: 人工受精导管进入宫颈内口, 未超出宫颈内口, 将宫颈分泌物尽可能吸出。(3) 宫颈管灌洗术: 人工受精导管插入宫颈外口, 未超出宫颈内口, 注入无菌生理盐水5~8 ml, 停留片刻后缓慢吸出, 无菌标本瓶保存。(4) 宫腔内灌洗术: 人工受精导管插入宫颈内口, 超过宫颈内口约3~4 cm, 注入无菌生理盐水2~5 ml, 停留片刻后缓慢吸出, 无菌标本瓶保存。

1.2.3 玻片制备 无菌棉拭子术、宫颈粘液吸引术所得标本直接涂片于硅化防脱玻片上; 宫颈管灌洗术、宫腔内灌洗术所得细胞悬液离心后涂于硅化防脱玻片上。室温放置30 min晾干。

1.2.4 HE染色及细胞形态观察 I组和III组标本经室温干燥后, 95%酒精固定10 min, 常规HE染色, 封片干燥后在光镜下计数合体滋养细胞数。

1.2.5 免疫细胞化学染色及观察 II组和IV组标本经室温干燥后, 冷纯丙酮固定10 min后常规免疫细胞化学染色后, 光镜下观察阳性细胞数。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验。

2.1 实验组(I)与对照组(III)HE染色获得合体滋养细胞情况

除无菌棉拭子术和宫颈粘液吸引术所得滋养层细胞阳性率差异无统计学意义外($P>0.05$), 其余各取材方法之间所得滋养层细胞阳性率差异均有统计学意义($P<0.05$), 以宫腔内灌洗术所得阳性率最高, 无菌棉拭子术所得阳性率最低。合体滋养层细胞大, 胞质丰富致密, 嗜酸性, 多个重叠但不变形的核, 核小而深染, 细粒状染色质, 染色质聚集在核的周围如钟面, 胞核之间无细胞界限而呈多核合体状, 核仁不明显(图1)。细胞滋养层细胞仅极少数可被识别, 为圆形细胞, 边界清楚, 染色质过深, 多不规则。

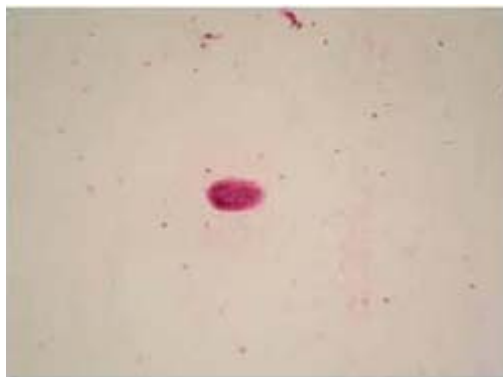


图1 宫腔内灌洗术取样涂片

Fig.1 Sample collected by lavage of the intrauterine cavity (HE staining, original magnification: $\times 400$)

2.2 实验组(II)与对照组(IV)免疫细胞化学所得胎盘滋养细胞情况

除无菌棉拭子术和宫颈粘液吸引术, 宫颈管灌洗术和宫腔内灌洗术之间所得滋养层细胞阳性率差异无统计学意义外($P>0.05$), 其余各取材方法之间所得滋养层细胞阳性率差异均有统计学意义($P<0.05$), 以宫腔内灌洗术/宫颈管灌洗术所得阳性率较高, 无菌棉拭子术所得阳性率最低。免疫细胞化学染色阳性结果见图2。

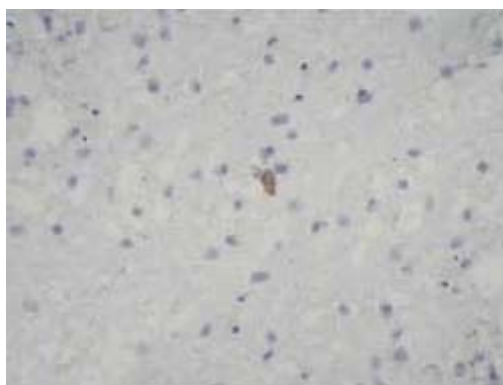


图2 宫腔内灌洗术取样涂片

Fig.2 Sample collected by lavage of the intrauterine cavity (Immunocytochemistry, original magnification: $\times 400$)

2.3 不同孕龄获得胎盘滋养细胞情况

免疫细胞化学实验组(II)中在不同孕龄所得阳性例数及阳性细胞的胞核个数见表1。获得标本滋养层细胞阳性率较高的时期在妊娠50~79 d, 获得滋养层细胞核数量较多的时期在妊娠40~79 d。

表 1 免疫细胞化学实验组(II)获取滋养细胞与孕龄的关系

Age of gestation (d)	Case	Positive case	Trophoblast cell nuclei in positive samples	Positivity rate (%)	Average trophoblast cells nuclei
30-39	7	1	2	14.3	2
40-49	48	8	15	16.7	2
50-59	32	12	19	37.5	2
60-69	10	6	16	60.0	3
70-79	3	2	6	66.7	3

3 讨论

妊娠早期可在宫腔下段检测到滋养层细胞,其出现期从妊娠5~7周到妊娠13~15周,此后子宫腔消失,为羊膜腔所占据[2][3][4]。因此可能在妊娠5~15周从经宫颈细胞标本中获得滋养层细胞,作为胎儿遗传信息的来源,进行产前诊断。

3.1 胎儿细胞鉴定

经宫颈所得细胞标本有3种来源:胎儿来源、母亲来源和父亲来源。HE染色从形态上初步鉴定合体滋养细胞,其主观性较大,特异性低,仅可用来初步估计胎儿细胞数量的多少。胎盘组织外绒毛滋养层细胞不表达经典的HLA I类分子,使这些细胞易感于NK细胞的攻击,但由于表达非经典的MHC I类分子HLA-G可以防止NK细胞识别这些细胞。HLA-G抗原是一种非经典的MHC I类分子,它仅在母胎界面胎儿胎盘组织上表达,该处却不表达经典的MHC I类及II类抗原。HLA-G蛋白质结构可能分为HLA-G1~4膜结合型及HLA-G1~2可溶型6种,采用RT-PCR分析,这6种HLA-G的异构体均存在于妊娠前3个月的滋养层细胞及足月胎盘上,在滋养层细胞的主要转录形式是HLA-G1[5]。HLA-G基因蛋白产物仅表达在胎盘外绒毛滋养层细胞及滋养层来源的两种肿瘤细胞系Bewo及JEG-3。用抗HLA-G作为一抗进行免疫细胞化学法染色所得阳性结果特异性高,但敏感性降低,可能造成较高的假阴性率。但抗HLA-G与特异的滋养层细胞发生阳性反应,为分离和纯化滋养层细胞奠定基础。

3.2 取材方法

国内外学者对4种取材方法获得胎儿细胞的效率各不相同。有报道灌洗术(包括宫颈管灌洗术和宫腔内灌洗术)标本阳性率达80%~90%[6];另有学者报道宫腔内灌洗术获得胎儿细胞的率为4%~97%[7];有报道宫颈粘液吸引术获得的标本阳性率为50%~70%;而有学者却报道妊娠的宫颈粘液中不能发现胎儿细胞[8];无菌棉拭子细胞损失少,但获得的胎儿细胞也少。宫腔内灌洗术能够持续获得胎儿细胞,而宫颈粘液吸引术则效果欠佳,这一结论为将前者应用于临床提供支持[9]。本研究证明在相同实验条件下,无菌棉拭子术和宫颈粘液吸引术所得的胎儿细胞极少,不适合用来取材。宫颈管灌洗术和宫腔内灌洗术所得标本胎儿细胞阳性率分别为43.3%~83.3%和53.3%~86.7%,与文献报道相一致,是较好的取材方法。宫颈管灌洗术和宫腔内灌洗术比无菌棉拭子术和宫颈粘液吸引术获得的滋养层细胞阳性率高,但损伤也相对增加,避免反复冲洗是必要的。在取材前5 d内无性生活,基本可以排除精液污染,且宫腔下部不易被精液污染,这给诊断性连锁疾病提供了良好的取样环境[1]。

3.3 取材时机

本研究结果提示滋养层细胞阳性率较高的时期在妊娠50~79 d。经宫颈取材进行产前诊断,应选择在绒毛完全退化之前,脱落细胞较多时,妊娠50~79 d正处在这一时期,是取材的最佳时期。妊娠40 d左右取材,宫颈内口较紧,不易操作。

综上所述,早孕妇女生殖道中存在胎儿细胞,在妊娠50~79 d用宫颈灌洗术或宫腔内灌洗术取材,是一种可行的微创的产前诊断技术。

参考文献:

- [1]高玉莲, 崔满华, 郭朝晖. 孕妇生殖道滋养细胞存在情况及免疫组化研究[J]. 实用妇产科杂志, 2000, 16(1): 21-3.
- [2]Adinolfi M. Detection of fetal cells present in transcervical samples[J]. Fetal Maternal Med Rev, 1996, 8(1): 1-10.
- [3]Adinolfi M, Sherlock J. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation[J]. Hum Reprod, 1997, 3: 383-92.
- [4]Adinolfi M, Rodeck C. Detection of fetal cells in transcervical samples in early pregnancy[M]//Rodeck C. Fetal Medicine. London: Churchill livingstone, 1999: 473-80.
- [5]韩子英. HLA-G结构与功能研究进展[J]. 国外医学: 免疫学分册, 2000, 23(2): 115-8.
- [6]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): 52-5.
- [7]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): 1098-101.
- [8]Cioni R, Bussani C, Scarselli B, et al. Fetal cells in cervical mucus in the first trimester of pregnancy[J]. Prenat Diagn, 2003, 23(2): 168-71.
- [9]Cioni R, Bussani C, Scarselli B, et al. Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(3): 198-202.