

早孕期经宫颈细胞中寻找胎儿细胞及免疫细胞化学研究

黄莺莺,余艳红(南方医科大学南方医院妇产科,广东 广州 510515)

摘要:目的 研究早孕妇女生殖道中胎儿细胞的存在情况,用免疫细胞化学法确证胎儿细胞来源,寻找无创或微创的产前诊断取材方法及时机。方法 将健康早孕妇女宫颈取材标本分为两组:HE染色组(I)和免疫细胞化学组(II);选择通术中输卵管通畅的健康妇女为对照,分为两组:HE染色组(III)和免疫细胞化学组(IV)。无菌棉拭子术、宫颈粘液吸引术、宫颈管灌洗术和宫腔内灌洗术采集标本,HE染色和免疫细胞化学染色后观察滋养细胞存在情况。结果 (1)早孕妇女经宫颈细胞中存在可代表胎儿细胞的滋养细胞;(2)宫颈管灌洗术和宫腔内灌洗术取材方法较好,获得胎儿细胞较多;(3)取材时机为妊娠50~79d。结论 早孕妇女生殖道中存在胎儿细胞,在妊娠50~79d用宫颈灌洗术或宫腔内灌洗术取材,是一种较为安全有效的产前诊断技术。

关键词:早孕期;无创产前诊断;经宫颈细胞;胎儿细胞;免疫细胞化学

中图分类号:R714.1 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)11-1571-03

Acquisition of fetal cells from transcervical cells in early pregnancy and immunocytochemical study

HUANG Ying-ying, YU Yan-hong

Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the presence of trophoblast cells in the lower uterus in early pregnancy, identify fetal cells by immunocytochemistry, and determine the best timing for sample collection. **Methods** Samples from healthy gravida in early pregnancy were divided into HE group (I) and immunocytochemistry group (II), and those from healthy nonpregnant women were also divided into HE group (III) and immunocytochemistry group (IV). Four different methods (usage of a cotton swab, aspiration of the cervical mucus, lavage of the endocervical canal, and lavage of the intrauterine cavity) were employed for collecting the samples, which were tested with HE staining or immunocytochemistry, and the presence of fetal cells was observed under optical microscope. **Results and Conclusion** Fetal cells were detected in the genital tract of the gravida in early pregnancy. Utilization of the lavage of the endocervical canal or the lavage of the intrauterine cavity allowed greater amount of fetal cell acquisition, and sampling of the fetal cells between 50 days and 79 days of gestational age yielded optimal results. These sampling methods may provide safe and effective means for prenatal diagnosis with minimal invasiveness.

Key words: early pregnancy; non-invasive prenatal diagnosis; transcervical cells; fetal cells; immunocytochemistry

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SERO TEC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。

收稿日期:2006-05-20

基金项目:广东省重大社会问题联合攻关项目(ZKB04701S)

Supported by grant for Important Social Problem Research of Guangdong Province (ZKB04701S)

作者简介:黄莺莺(1980-),女,E-mail:kakikutak@hotmail.com

通讯作者:余艳红,女,教授,博士生导师,电话:020-61641017

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 结果

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。

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。

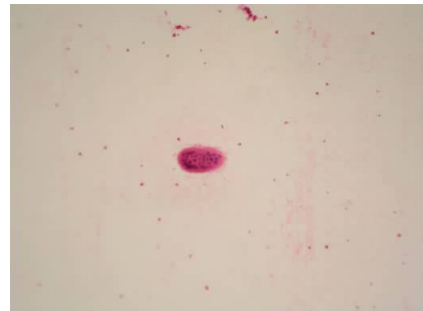


图 1 宫腔内灌洗术取样涂片

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

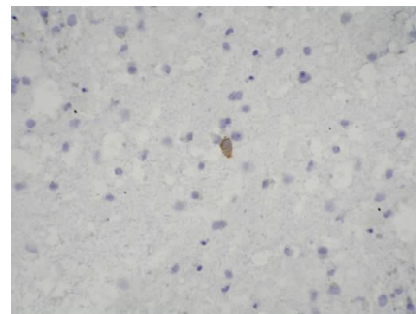


图 2 宫腔内灌洗术取样涂片

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

Tab.1 Anti-HLA-G immunocytochemical study of the relationship between collected trophoblast cells and gestation age (group II)

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^[24]。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,脱落细胞较多的时候,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.