

[文章编号] 1671-587X(2012)01-0127-04

荧光原位杂交技术在稽留流产和死胎组织染色体检测中的应用

梁 雨, 李 娜, 徐红梅, 何 津

(吉林大学第一医院妇产科, 吉林 长春 130021)

[摘 要] 目的: 采用荧光原位杂交 (FISH) 技术检测稽留流产和死胎组织中的染色体, 探讨染色体数目异常与稽留流产、死胎的关系。方法: 收集 107 例稽留流产及死胎组织, 应用 FISH 技术检测 13、16、18、21、22、X 及 Y 染色体数目异常。结果: 107 例样本中有效样本 99 例, 结果异常样本 21 例, 异常比例为 21.2%。常染色体数目异常以 16、21 号染色体三体的发生率最高 (8/21), 其次为 18 (7/21)、22 (7/21)、13 (6/21) 号染色体三体。在性染色体中, XXY 发生率最高 (6/21)。染色体异常在不同性别组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 染色体异常在孕早期、中期即可引起胚胎组织发育异常, 导致胚胎停止发育或引起胎儿死亡, 发生率与胚胎性别无关; 应用 FISH 技术对早期妊娠及中期妊娠孕妇行染色体检查, 对有不良孕产史、高危产妇有临床指导意义。

[关键词] 稽留流产; 死胎; 染色体异常; 荧光原位杂交

[中图分类号] R34 [文献标志码] B

Application of FISH technique in chromosome detection for missed abortion and dead fetus tissues

LIANG-Yu, LI-Na, XU Hong-mei, HE Jin

(Department of Obstetrics and Gynecology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract; Objective To detect the chromosome in missed abortion and dead fetus tissues with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and study the relationship between number abnormality of chromosomes and missed abortion, dead fetus. **Methods** 107 cases of missed abortion or dead fetus were detected and the number abnormalities of 13, 16, 18, 21, 22, X, Y chromosomes were detected by FISH. **Results** Among 107 cases of samples, the number of useful cases was 99, there were 21 cases of abnormal results, the abnormal ratio was 21.2%. Trisomy of chromosome 21 and 16 had the highest incidence (8/21) among autosomal samples, followed by trisomy of chromosome 18 (7/21), 22 (7/21) and 13 (6/21). XXY had the highest incidence (6/21) among sex chromosome abnormalities. There was no significant difference in the chromosome abnormalities between different sexes ($P > 0.05$). **Conclusion** Chromosome abnormality can cause the abnormal development of embryo tissue in the early and middle pregnancy, and lead to embryo stop growing or cause fetal death; and the occurrence rate has no relationship with sex. So it has clinical guiding significance to make targeted chromosome examination in early and middle pregnancy with FISH technique when the woman has the history of abnormal pregnancy or high risk pregnancy.

Key words: missed abortion; dead fetus; chromosome abnormality; fluorescence *in situ* hybridization

稽留流产是指胚胎或胎儿已死亡仍滞留在宫腔内尚未自然排出者。死胎是指妊娠 20 周后胎儿在

[收稿日期] 2011-09-04

[基金项目] 中华医学会分子生物学临床应用研究专项资金资助课题 (CAMB012010)

[作者简介] 梁 雨 (1986-), 女, 吉林省辽源市人, 在读医学硕士, 主要从事围产医学研究。

[通信作者] 何 津 (Tel: 0431-88782183, E-mail: hejin1204@163.com)

子宫内死亡。稽留流产、死胎的发生与母体、环境、免疫及染色体等多方面因素均有着重要关系,其中染色体异常是不良孕产史发生的重要原因。对不同地区、不同阶层及不同年龄人群统计显示:自然流产的发生率为15%~40%^[1]。在与自然流产及新生儿出生缺陷相关的染色体异常中,13、18、21及X和Y染色体数目异常占80%~95%^[2],上述5条染色体异常均有活婴报道,甚至可发育至成人。而16、22号染色体异常极少有活婴报道,推测该2条染色体的发育异常可有致死性畸形的改变,导致胚胎早期死亡。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术是目前国际上较为先进的检测染色体的方法,可直接对流产绒毛及死胎组织进行检测,无需细胞培养,实验周期短,可检测到与临床表型有关的片段大小为50~200 kb的遗传位点改变,更精确的检测染色体的缺失和复制,高效诊断常见染色体异常。本研究应用13和21,16和22,18和X、Y 3组探针对107例稽留流产及死胎标本行FISH检测,了解染色体数目异常的发生情况,为临床工作提供一定的指导。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择2010年8月—2011年2月吉林大学第一医院产科门诊及住院的稽留流产或死胎、并以适当方式终止妊娠107例,根据孕周不同分别取绒毛及胎儿组织行FISH检测,记录孕妇的年龄、孕产史、身体健康情况及本次孕周。

1.2 标本玻片制备 将标本清洗干净,研磨、剪碎,去上清液;应用甲醇:冰乙酸(3:1)2 mL预备固定,轻吹混匀,离心,去上清液;甲醇:冰乙酸(3:1)5 mL一次固定,离心,去上清液;甲醇:冰乙酸(3:1)5 mL二次固定,离心;冰醋酸1 mL消化1 min,甲醇3 mL终止消化,离心,去上清液;加固定液调成 1×10^6 mL⁻¹浓度的细胞悬液滴片。

1.3 标本玻片预处理 室温下于 $2 \times$ SSC(saline sodium citrate)缓冲液(pH 7.0)中漂洗5 min;37℃新鲜胃酶工作液40 mL消化;称取20 mg胃酶(粉剂)溶于1 mL的去离子水中,取160 μ L加入到37℃预热的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 40 mL,混匀;室温下于 $2 \times$ SSC(pH 7.0)中漂洗5 min;依次置于70%乙醇、85%乙醇、100%乙醇中各3 min脱水,自然干燥。

1.4 FISH操作步骤 探针配制:室温下将杂交缓冲液7.0 μ L、去离子水1.0 μ L、探针(北京金菩嘉公司提供)2.0 μ L加入微量离心管中,离心;将10 μ L探针混合物滴加于玻片杂交区域,加盖盖玻片,橡皮胶封边;准备杂交仪器;46℃,将玻片置于 $2 \times$ SSC溶液中,漂洗10 min,振荡1~3 s;46℃,将玻片置于0.1%NP-40/ $2 \times$ SSC缓冲溶液中,漂洗5 min,振荡1~3 s;将玻片浸泡在70%乙醇中,漂洗3 min,自然干燥。将15 μ L DAPI复染剂滴加于杂交区域位置,盖上盖玻片。暗处放置10~20 min后,用荧光显微镜(奥林巴斯公司)观察杂交信号,每组探针各计数100个细胞信号。

1.5 结果判定标准 用天蓝色荧光标记常染色体,红色荧光标记性染色体Y,绿色荧光标记性染色体X。结果若显示2个绿色信号,提示2条X染色体存在;分别显示1个绿色信号和1个红色信号,提示1条X和1条Y染色体存在;仅显示1个绿色信号,而未见红色信号,则提示1条X染色体存在;显示3个天蓝色信号提示常染色体三倍体。细胞信号异常 $>10\%$ 为异常样本。

1.6 统计学分析 采用SPSS 10.0统计软件对数据进行分析处理,染色体异常的性别构成比组间比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 标本的分布 在107例标本中,8例标本(稽留流产1例,死胎7例)因胎儿在宫内死亡时间过长或其他因素未能检测到细胞视为无效样本。有效标本99例,其中稽留流产92例,死胎7例,异常标本21例,异常比例为21.2%,均为稽留流产。

2.2 稽留流产、死胎孕妇孕周分布 有效样本99例分为3组,早期妊娠(小于12周)67例,占67.7%;中期妊娠(12~28周)30例,占30.3%;晚期妊娠(大于28周)2例,占2.0%。99例有效样本中异常样本21例,其中早期妊娠14例,占66.7%;中期妊娠7例,占33.3%;无妊娠晚期标本。18号染色体和X、Y染色体的FISH检测结果见图1(封三),图1A显示有3条18号染色体,2条X染色体,1条Y染色体;图1B为正常女性18号染色体。

2.3 不同孕期异常标本中染色体数目异常标本频数分布 在21例异常样本中,每例异常样本均存在2种以上的染色体异常,各染色体异常在不同孕

期的分布及占异常标本数比例见表 1。

2.4 染色体异常的性别分布 99 例有效标本中男性胚胎 43 例, 女性胚胎 56 例, 分别占总数的 43.4% 和 56.6%。21 例异常染色体标本中, 男性

胚胎 11 例, 女性胚胎 10 例, 分别占总数的 52.4% 和 47.6%。两组性别构成比差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.8683$, $P > 0.05$)。

表 1 不同孕期异常标本中染色体数目异常标本频数分布

Tab.1 The frequency distribution of specimens with chromosome number abnormalities in abnormal specimens at different gestational periods [n(%)]

Group	Trisomy of chromosome					Tetraploid of chromosome					Sex chromosome		
	13	16	18	21	22	13	16	18	21	22	XX	XXY	XO
Early pregnancy	6(28.6)	8(38.1)	7(33.3)	8(38.1)	7(33.3)	3(14.3)	1(4.8)	2(9.5)	2(9.5)	1(4.8)	1(4.8)	6(28.6)	1(4.8)
Middle pregnancy	5(23.8)	4(19.1)	3(14.3)	4(19.1)	3(14.3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(4.8)	1(4.8)	1(4.8)	0(0)
Late pregnancy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3 讨论

随着细胞遗传学的不断发展, 由染色体异常引起的自然流产、胎儿畸形、死胎及死产越来越受到重视。现在普遍的观点认为: 早期自然流产中约 50% 存在胚胎染色体异常; 也有学者^[3]认为: 染色体异常的实际情况可能明显高于这个比例, 只是常规细胞遗传学方法检出率偏低。目前国内常规使用的染色体检测方法是取父母双方外周血进行染色体核型分析, 而有相关文献^[4]报道: 外周血染色体核型分析只能为 2.4%~5.0% 的自然流产患者找到病因。本研究通过 FISH 直接对流产绒毛及死胎组织进行检测, 可避免母体来源的污染, 并且多色 FISH 通过在同一个核中显示不同的颜色可同时检测多种序列, 结果直接, 准确性高。本研究结果显示: 早期妊娠标本数最多, 且异常染色体数目也较中、晚期妊娠高, 说明染色体异常在孕早期即可引起胚胎组织发育异常, 阻碍胚胎正常发育, 导致胚胎停止发育或引起胎儿死亡, 亦呈现流产发生的越早, 胎儿染色体异常率越高的趋向。有学者^[5]认为: 大约 25% 死胎与染色体因素有关, 而 75% 的死胎原因现不明确。本组 107 例标本中, 死胎样本共 14 例, 其中 8 例标本有明确的死因, 如母亲因素包括 ABO 溶血、羊水过少、糖尿病、梅毒感染、巨细胞感染、纵膈子宫; 胎儿因素包括脐带打结、胎儿先天性心脏病; 6 例样本通过试验未检测出染色体异常或因其他因素未能检测到细胞。本组资料显示: 造成死胎的主要因素为外界因素及母体因素, 而与染色体因素无明显关联。染色体异常分为数目异常和结构异常, 而染色体异常导致的流产

多为染色体数目异常, 其次为染色体结构异常。染色体数目异常分为非整倍体、多倍体及嵌合体。染色体结构异常分为缺失、重复、倒位、互换。目前大多数报道^[3]显示: 染色体异常发生率分布类似, 三体占 50%~52%, X 单体占 15%~25%, 三倍体占 15%~22%, 四倍体占 2%~7%, 结构异常占 4%~8%。近端着丝粒在短臂处的集结的异常可能是形成三体流产儿的重要原因^[6]。染色体着丝粒部位由重复上万次的 α 卫星重复序列组成, 仅需扩增着丝粒区域的数百个碱基长度的 DNA 片段并进行荧光标记即可获得明确而特异的着丝粒区域的荧光信号。通过 FISH 针对着丝粒的探针可在 2 组染色体上均显示出荧光信号^[7]。在本研究中所有异常样本均存在 2 种以上的染色体异常, 可见由于染色体异常所导致的稽留流产并非为某一特定的染色体所致, 而是多条异常染色体异常共同作用的结果。本组资料显示: 在所检测的染色体中各异常染色体在早期妊娠中所占的比例均高于中期妊娠及晚期妊娠, 而在所有染色体数目异常样本中, 常染色体以 16 号、21 号染色体三体的发生率最高, 占染色体异常总数的 38.10% (8/21), 18 号染色体三体 (7/20)、22 号染色体三体 (7/21)、13 号染色体三体 (6/21) 也较常见, 上述结果与既往所研究调查的结果相似。性染色体数目的异常, 导致卵巢发育不良或睾丸发育不全或两性畸形, 临床表现大多为第二性征发育不全、不孕不育, 并可伴有轻度的智力发育不良。除了 21 号染色体三体 (唐氏综合征) 有活婴娩出外, 13 号染色体三体及 18 号染色体三体也有少数活婴报道, 即 Patau 综合征、Edwards 综合征, 出生的活婴各脏器均有不同程度

的畸形并伴有智力发育障碍, 出生后平均寿命较短。13号染色体三体患儿的畸形和临床表现要比21号染色体三体严重^[8]。16号、22号染色体三极少有活婴报告, 推测该2种染色体发育异常可有致死性畸形的发生, 导致胚胎早期死亡。相关文献^[9]结果显示: 16号染色体次缢痕异染色质区是易发生自发和诱发断裂的部位, 其增加或减少也可能影响到着丝粒-动粒复合体, 减数分裂时引起染色体的不分离导致染色体异常。47, XXY综合征(克氏综合征) 又称“先天性睾丸发育不全”, 主要为性染色体不分离所致, 导致男性染色体核型中增加了一个X染色体, 父母双方分别占40%和60%^[10]。45, XO综合征(Turner综合征) 是性染色体发生数量或结构畸变所致, 特征是身材矮小、原发性闭经、第二性征发育不全。该病在女性中发病率为1/2 500, 大部分在妊娠早期即发生自然流产, 仅1/50以活产娩出^[11-12]。47, XXX患者没有明显的外表特征, 所有的患者皆为女性, 身材一般略高于正常女性平均高度, 正常智力发展水平, 但是智商平均值较同龄人低; 单纯的47, XXX患者通常没有特征性的生理缺陷^[13-14], 这也可能是其发生流产率低的原因。染色体数目异常可能因为母体生殖细胞在减数分裂过程中发生异常, 干扰染色体的正常运动和分离, 导致染色体缺失、增多或重排等异常改变, 从而影响细胞分裂, 发生遗传错误, 致使不孕、流产、胚胎停止发育、死胎或子女染色体异常。本研究结果显示: 染色体异常的性别构成比差异无统计学意义, 与余世璐等^[15]报道流产儿染色体异常与性别无关相符合。目前国内对于胎儿性别与稽留流产、死胎关系的报道尚不一致, 其发生机制尚不明确, 有待于进一步研究。

综上所述, 染色体异常是早期妊娠、中期妊娠导致胚胎发生稽留流产或死胎的重要原因, 因此对有不良孕产史、高危产妇进行产前诊断, 对防止异常儿出生、提高人口素质具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 张建平, 林其德, 李大金, 等. 复发性流产的诊断与治疗 [J]. 现代妇产科进展, 2006, 15 (7): 481-492.
- [2] Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, et al. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2000, 20 (3): 215-220.
- [3] 陈雪, 胡娅莉. 自然流产的遗传因素及诊断 [J]. 国外医学: 妇产科分册, 2004, 31 (6): 340-343.
- [4] Makino T, Hara T, Oka C. Survey of 1120 Japanese women with a history of recurrent spontaneous abortion [J]. Eur J Obstet Gynecol Biol, 1992, 44 (2): 123-130.
- [5] Wapner RJ, Lewis D. Genetics and metabolic causes of stillbirth [J]. Semin Perinato, 2002, 26 (1): 70-74.
- [6] 马赛. 自发流产夫妇的细胞遗传学研究 [J]. 国外医学: 遗传学分册, 1984, 7 (6): 295-299.
- [7] 滕奔琦, 章钧, 范建辉, 等. 标记21和13号染色体双色FISH探针及其在快速产前诊断中的应用 [J]. 中山大学学报: 医学版, 2010, 31 (6): 884-888.
- [8] Feldman B, Aviram-Goldring A, Evans MI. Interphase FISH for prenatal diagnosis of common aneuploidies [J]. Methods Mol Biol, 2002, 204 (part III): 219-241.
- [9] 庞丽红, 余其松. 染色体多态性的临床效应 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18 (3): 3-5.
- [10] 曹玲, 段玲, 罗德梅. 新生儿克氏综合症47, XXY二例 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18 (6): 56.
- [11] 马金元, 范建华, 王琳琳, 等. 45, XO/46, Xi (Xq) 型Turner综合征四例报告 [J]. 遗传与疾病, 1988, 5 (2): 106.
- [12] 邹玉兰, 龙卓君, 张文勤, 等. 45, XO/46, X, i (Xq) 嵌合型Turner综合征1例报告 [J]. 中国优生与遗传杂志, 1995, 3 (1): 28-48.
- [13] 潘思塑, 李伟. 47, XXX综合征的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2007, 2 (34): 77-80.
- [14] 辛暨丽, 刘睿智, 李哲, 等. 自然流产、无精症和先天愚型患者外周血染色体核型分析 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2003, 29 (5): 570-572.
- [15] 余世璐, 栾树清, 罗文, 等. 314例早期自然流产绒毛的染色体分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2000, 8 (3): 48-50.