

• 短篇论著 •

荧光原位杂交技术检测 130 例自然流产绒毛染色体结果的观察与分析

秦爽 肖青 钟卓慧 董涛威 王凤华 牛会林

【摘要】 目的 应用荧光原位杂交技术(FISH)对 130 例自然流产患者的绒毛染色体进行检测,探讨并评估 FISH 在诊断自然流产绒毛染色体异常中的价值。**方法** 采用 13、21 和 16、22 及 18、X、Y 三组染色体探针,对 130 例自然流产患者的绒毛标本进行 FISH 检测。**结果** 130 例自然流产的绒毛染色体 FISH 检测中,检测成功 129 例,检测成功率 99.2%,其中异常染色体细胞数 > 10% 者 65 例,核型异常率为 50.3%。**结论** FISH 技术不受标本污染限制,能快速、准确地诊断自然流产绒毛染色体数目畸变,与常规染色体核型分析相结合,可为临床自然流产的病因探讨提供更为准确的依据。

【关键词】 流产,自然; 原位杂交,荧光; 绒毛染色体数目

胚胎染色体异常是自然流产(natural abortion)最常见的病因^[1]。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术采用具有特殊荧光素标记的染色体 DNA 探针,对未经培养的绒毛组织进行原位杂交,经免疫反应显色,可诊断染色体异常。近年来,临床上逐渐应用 FISH 技术诊断孕早期胚胎常见的三体型和性染色体非整倍体异常,具有快速、简便、敏感、特异性强等优点^[2]。本研究采用 13、21 和 16、22 及 18、X、Y 三组特异性 DNA 探针,对 130 例自然流产绒毛标本进行 FISH 检测,并对其结果进行分析,探讨 FISH 技术在分析自然流产病因中的临床应用价值。

一、对象与方法

1. 研究对象:选取 2010 年 11 月至 2011 年 10 月到广州市妇女儿童医疗中心生殖免疫妇科门诊及住院部就诊的自然流产患者 130 例,年龄 21~44 岁,平均年龄 30 岁。所有患者超声提示胚胎停止发育,并根据末次超声测定的孕囊及胚芽大小,估算胚胎停止发育的孕周介于 5~16 周。其中流产次数 ≥ 2 次者 14 例,占 10.8%;伴有下腹痛者 39 例,占 30%;伴有阴道出血者 72 例,占 55.4%,阴道出血时间最短 1 d,最长间断出血 35 d,平均 6 d。

2. 方法:(1)所有研究对象均签署知情同意书。对上述病例采用直接低渗法,将绒毛组织用生理盐水洗净,去除蜕膜组织及血块等杂质,剪碎后离心收集细胞沉淀。加入 5 ml 预热至 37 °C 的 0.075 mol/L KCl 溶液,低渗 20 min。预固定后离心去上清液,缓慢加入固定液(甲醇:冰乙酸 = 3:1)吹打混匀,固定 10 min 后在 1100 × g 相对离心力下离心。10 min 后去上清液,加入 1 ml 的 60% 冰醋酸解离 1~2 min,加入 3 ml 甲醇终止反应。再次在 1100 × g 相对离心力下离心 10 min,去上清,根据细胞量加适量固定液混匀后滴片。室温下过夜或 56 °C 烤片至少 2 h,室温干燥保存。

(2)主要试剂和仪器:13、21 和 16、22 及 18、X、Y 三组 DNA FISH 荧光标记探针(着丝粒探针、位点特异性探针,采用红/绿/青荧光标记,北京金菩嘉医疗科技有限公司);探针位点:CSP18/

CSPX/CSPY (CSP18: 18p11.1 ~ q11.1; CSPX: Xp11.1 ~ q11.1; CSPY: Yp11.1 ~ q11.1), GLP13/GLP21 (GLP13: DLEU2, 13q14; GLP21: DSCR2, 21q22), GLP16/GLP22 (GLP16: CBF, 16q22; GLP22: BCR, 22q11.2); 荧光显微镜 OLYMPUS BX51 (100 瓦汞); FISH 染色体核型分析系统(VT-FISH 2.0, 根据 ISCN 国际体制,提供核型标准模式图,自动选择参照显示); 低温离心机 (Sigma 3K15); 恒温水浴箱(苏泰药管械, 420-B 型)。

3. FISH 检测:玻片预处理:将标本放入 2XSSC (pH 7.0) 溶液中漂洗玻片 5 min 后,置于 37 °C 下终浓度 0.08 mg/ml 胃蛋白酶工作消化 5 min,用浓度分别为 70%、85%、100% 的乙醇脱水各 3 min,自然干燥。

杂交变性:分别配制 13、21 和 16、22 及 18、X、Y 三组染色体探针。将探针混合物各 10 μl 滴加于玻片杂交区域,立即加盖盖玻片,用橡皮胶封边。置 75 °C 热平台上变性 5 min,置于湿盒中杂交 16 h。

玻片洗涤:移除盖玻片,立即放入 46 °C 水浴锅 2 × SSC 溶液中漂洗 10 min,振荡 1~3 s;再将玻片置于 46 °C 水浴锅 0.1% NP-40/2 × SSC 溶液中,漂洗 5 min,振荡 1~3 s;70% 乙醇中漂洗 3 min,自然干燥。DAPI 复染后盖上盖玻片。暗处放置 10~20 min 后观察。

在荧光显微镜下通过三色滤色块分别观察绒毛标本杂交信号,每组探针随机计数 100 个细胞核,并记录与探针相应的荧光信号,判断每个细胞核染色体的类型并计算其百分率,分别统计 > 60% 以及 > 10% 的核型。

4. 统计学方法:用 SPSS 14.0 统计软件进行统计处理,计数数据用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

二、结果

1. 异常阳性率:对 130 例自然流产的绒毛染色体进行 FISH 检测,其中有 1 例因组织自溶未获得理想的分散良好的分裂象, FISH 检测失败。另检测成功 129 例,成功率 99.2%。129 例检测成功的病例中,分别统计染色体异常数 > 60% 以及 > 10% 的核型。其中异常染色体计数 > 60% 者 62 例,核型异常率为 48.0%,异常染色体计数 > 10% 者 65 例,核型异常率 50.3%。见图 1~5。

2. 染色体异常类型:在本研究中,以异常染色体计数 > 10% 者为阳性统计,染色体异常的类型以常染色体三体居多,占异常

表 1 129 例自然流产患者胎儿绒毛染色体的异常染色体类型

类别	染色体异常	例数
性染色体单体	X 单体	9
性染色体三体	X 三体	1
XXY	XXY	1
常染色体单体	21 单体	2
常染色体三体	13 三体	3
	16 三体	18
	18 三体	2
	21 三体	8
	22 三体	7
常染色体复合三体	13, 21, 16, 22 三体	1
三倍体	69, XXY	7
	69, XYY	3
四倍体	92, XXYY	3

表 2 14 例反复流产患者的异常染色体列举

类别	染色体异常	例数
常染色体单体	21 单体	1
常染色体三体	13 三体	1
	16 三体	4
三倍体	69, XXY	2

表 3 不同年龄段自然流产患者的异常染色体对比

年龄段	例数	异常染色体 (例)	异常染色体 百分比 (%)	异常核型 最多类型
21 ~ 29 岁	68	31	45.6 ^{ab}	16 三体
30 ~ 35 岁	41	23	56.1 ^c	16, 22 三体
35 ~ 45 岁	20	11	55.0	16 三体

注:与 30 ~ 35 岁组相比, ^a $\chi^2 = 0.38, P > 0.05$; 与 35 ~ 45 岁相比, ^b $\chi^2 = 0.19, P > 0.05$; ^c $\chi^2 = 0.00, P > 0.05$

核型的 58.5% (38/65), 其次为三倍体, 占 15.4% (10/65), 性染色体单体占 13.8% (9/65)。常染色体中, 以 16 三体异常最多, 占常染色体异常的 47.4% (18/38), 见表 1。所有染色体核型分析参照 ISCN1995 标准。

3. 反复流产患者的染色体分析结果: 129 例自然流产患者中, 有 14 例流产次数 ≥ 2 次。其中, 8 例染色体异常, 核型异常率为 57.1%, 大于本研究中首次自然流产患者的核型异常率 49.6% (57/115), 但差别无统计学意义 ($\chi^2 = 0.09, P > 0.05$)。8 例异常染色体以 16 三体最多 (4 例), 其次为三倍体 (2 例), 见表 2。

4. 不同年龄段染色体异常率: 研究按年龄分组, 分别统计各组染色体异常数及其百分比。统计发现, 30 ~ 35 岁和 35 ~ 45 岁组染色体异常率大于 21 ~ 29 岁组, 但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

三、讨论

近年来, 自然流产的发病率逐渐上升。研究表明, 胚胎染色

体异常是早期自然流产最常见的原因, 约占 50% ~ 60%, 其中 13、18、21、X 和 Y 染色体畸变约占 80%^[3]。绒毛细胞因为具有与胎儿组织相同的遗传性状, 因此临床上通常通过绒毛细胞检测胎儿染色体异常来诊断流产病因。但由于流产绒毛通常是胚胎停育后通过阴道自然排出的陈旧组织, 其绒毛标本通常不具备无菌条件, 并且染色体的制备常受到标本质量的影响, 给诊断带来困难。

FISH 是快速染色体异常检测技术 (rapid aneuploidy detection, RAD) 中的一种, 可直接采用多种荧光素标记的不同染色体 DNA 探针, 与待测标本的中期分裂象或间期核细胞进行原位杂交, 对待测的多种染色体进行分析。由于 FISH 对染色体检测可在 48 h 内完成, 无需细胞培养, 不受组织是否污染影响, 近年来临床应用越来越广泛。本研究采用 FISH 技术对 130 例自然流产患者的绒毛染色体进行检测, 除一例因组织自溶未得到 FISH 结果, 检测成功 129 例, 检测成功率 99.2%, 远高于传统绒毛细胞培养的成功率^[4]。

在统计异常核型细胞的过程中, 通常异常染色体细胞计数 > 60% 者判定为阳性, 纳入绒毛染色体异常的统计。但实际上, 异常染色体细胞计数 > 10% 者已有阳性意义^[5]。本研究分别对染色体异常数 > 60% 以及 > 10% 的细胞进行统计, 其中异常染色体细胞计数 > 60% 者 62 例, 核型异常率为 48.0%, 异常染色体细胞计数 > 10% 者 65 例, 核型异常率 50.3%, 后者更接近于文献报道的早期流产胚胎染色体异常发生率。因此, 建议对异常染色体细胞计数 > 10% 判定为阳性。

本研究中, 异常核型以常染色体三体最常见, 约占 15.4% (10/65), 与文献相符^[6], 说明染色体的非整倍体是造成早期胚胎低着床率和丢失的一个重要原因。导致这一现象的主要原因是双亲之一的配子形成时或妊娠初期受精卵卵裂时出现了某号染色体不分离, 致使该染色体增多或减少一条, 形成三体性或单体性。常染色体中, 以 16 三体异常最多, 占常染色体异常的 47.4%。这可能与 16 号染色体带随体染色体的变异频率较高相关, 因此 16 号染色体发生三体性的频率较高。异常核型中, 三倍体占 15.4%, 性染色体单体占 13.8%。这一结果也提示流产对有染色体异常的胚胎或胎儿来说是一种重要的自然淘汰过程。

在对 14 例流产次数 ≥ 2 次的病例研究中发现, 有 8 例染色体异常, 核型异常率 (57.1%) 大于本研究中首次自然流产患者的核型异常率 (49.6%), 但差别无统计学意义, 提示自然流产次数与胚胎染色体异常的发生率无明显相关性, 因此, 在临床上应该对首次自然流产的患者就进行绒毛染色体检测, 及早指导下一次怀孕, 为正常怀孕进一步争取时间, 该研究结果与 Carp 等^[7] 及 Pal 等^[8] 研究相似。但本次试验样本量过小, 可以在获取大量首次自然流产患者的临床样本后再行进一步分析。在对不同年龄段患者进行分组统计中发现, 30 ~ 35 岁和 35 ~ 45 岁组染色体异常率大于 21 ~ 29 岁组, 但组间差异无统计学意义, 提示年龄可能并不是导致染色体畸变的主要原因。

虽然采用异常染色体细胞 > 10% 的阳性判定标准, 但是本研究中自然流产的绒毛染色体异常率仍然只有 50.3%, 与文献相符^[8], 但仍低于传统绒毛细胞染色体培养法得到的异常核型率^[9]。这可能与 FISH 只能诊断染色体数目异常, 对于染色体的结构异常不能检测, 以及 FISH 使用成本高, 临床上仅对 13、16、18、21、22、X 和 Y 这 7 对染色体进行检测的原因有关。因此, 虽然 FISH 与传统细胞遗传学方法相比具有快速、简便、灵敏的优

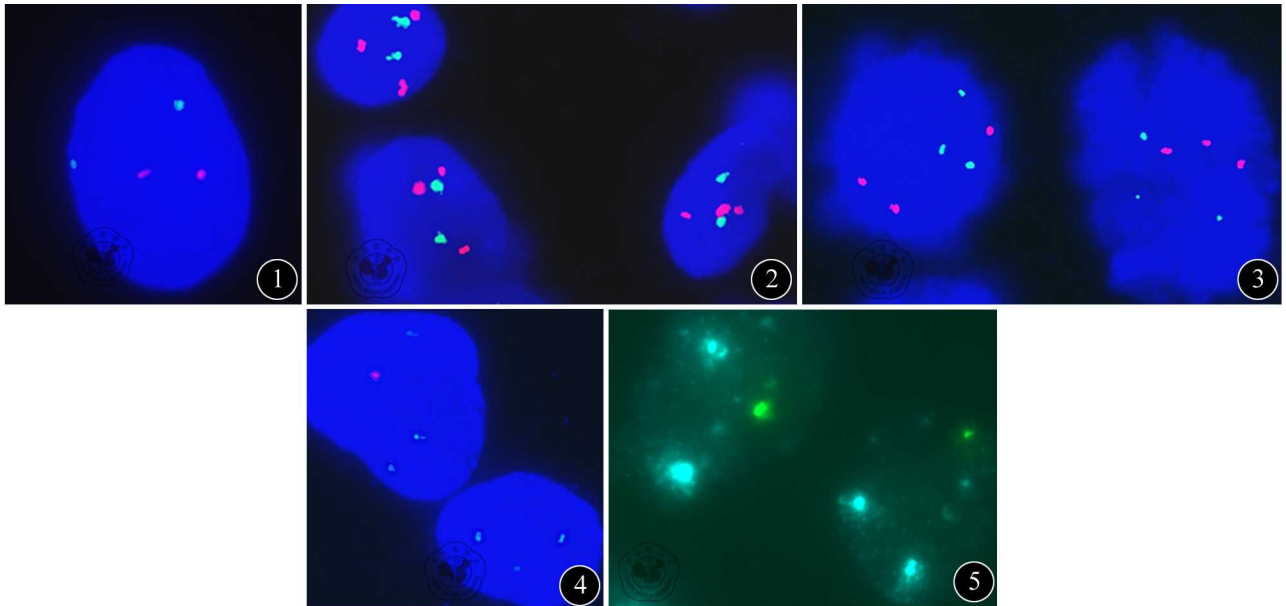


图1 探针组: GLP13/GLP21; 正常染色体(阴性结果)为2个红色信号、2个绿色信号 图2 探针组: GLP13/GLP21; 异常染色体(阳性结果)为其他信号种类; 如图所示16-三体 图3 探针组: GLP16/GLP22正常染色体(阴性结果)为2个红色信号、2个绿色信号(同图1); 异常染色体(阳性结果)为其他信号种类; 如图所示16, 22常染色体复合三体 图4 探针组: CSP18/CSPX/CSPY; 正常细胞(阴性结果)CSP18/CSPX/CSPY探针在正常男性细胞核中显示1个红色信号, 1个绿色信号和2个蓝色信号, 在正常女性细胞核中显示2个绿色信号和2个蓝色信号; 如图所示正常男性细胞核图 图5 探针组: CSP18/CSPX/CSPY; 异常细胞(阳性结果)为其他信号种类; 如图所示X-单体; 红、绿信号肉眼可见, 计数至少100个细胞, 当异常细胞比例>10%, 提示该指标异常; 当正常细胞比例>90%, 提示该指标无异常

点,避免了培养失败率高等问题,但 FISH 自身的局限性以及高成本限制了 FISH 在临床中的使用。另外,制备探针需了解待测区域,某些基因区域的特异探针尚不能获得。因此,FISH 尚不能完全取代传统细胞学遗传学方法来通过绒毛细胞染色体检测诊断自然流产的病因。但若在临床实践中将 FISH 与常规染色体核型分析联合应用,就可为临床自然流产的病因诊断提供更为准确的依据。近年来,多重连接探针扩增法(MLPA)亚端粒探针分析(subtelomere assay),以及新近发展起来的微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)都使得染色体检测进入到新的阶段^[10]。如何降低成本,开发可适用的商品化探针,是将新兴技术应用于临床绒毛染色体检测的下一个关键。

参 考 文 献

- [1] 胡桂英. 自然流产//乐杰. 妇产科学. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2004:89.
- [2] 雷琼,王琼,周灿权. 不同分子遗传学方法用于自然流产绒毛细胞遗传分析的效果. 中华妇产科杂志, 2009, 44: 253-256.
- [3] 梁永昌,陈敏,刘严德光. 产前诊断中常见染色体异常的快速检测与核型分析技术的应用. 中华妇产科杂志, 2007, 42: 348-350.
- [4] 陈欣,陈慧,杜涛,等. 自然流产夫妇 262 例染色体核型分析[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5: 871-873.
- [5] 邵雨,伍俊萍. 用荧光原位杂交技术检测难免流产绒毛组织及葡萄胎组织性染色体数目异常. 上海医学, 2004, 27: 636-638.
- [6] 易翠兴,潘敏,胡舜妍. 广州地区 97 例自然流产绒毛细胞培养及核型分析. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15: 41-42.
- [7] Carp H, Toder V, Aviram A. Karyotyp of the abortus in reourant miscarriage. Fertil Steril, 2001, 75: 678-682.
- [8] Pal S, Ma SO, Norhasimah M. Chromosomal abnormalities and reproductive outcome in Malaysian couples with miscarriages. Singapore Med J, 2009, 50: 1008-1012.
- [9] Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, et al. Evidence for High Frequency of Chromosomal Mosaicism in Spontaneous Abortions Revealed by Interphase FISH Analysis. J Histochem Cytochem, 2005, 53: 375-380.
- [10] 雷琼,王琼,周灿权. MLPA 联合 FISH 检测自然流产绒毛组织中染色体嵌合现象. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16: 94-95.

(收稿日期:2012-01-06)

(本文编辑:戚红丹)