

影响羊水细胞培养成功率因素的分析

韩美艳 俞冬熠 姜楠 任慧颖*

(青岛市妇女儿童医院 遗传科, 山东 青岛 266034)

【摘要】 目的 分析影响羊水细胞培养成功率的因素并探索提高成功率的方法。方法 以方法改进时间为界将羊水细胞培养结果分为两组, 对比两组羊水细胞培养方法及培养成功率的差异。结果 改进前组的 515 例羊水病例中失败 32 例, 失败率为 6.21%。改进后组的 6736 例羊水病例中仅有 18 例失败, 失败率为 0.27%。结论 及时、正确处理羊水标本以及控制影响细胞培养成功的各个环节, 可提高羊水细胞培养的成功率。

【关键词】 羊水; 细胞培养; 产前诊断

【中图分类号】 R394.2 **【文献标识码】** A

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.03.011

【Abstract】 **Objective** To Analysis the factors affecting the success rate of amniotic fluid cell culture and to investigate the methods to improve the success rate. **Method** By the time of improving the method, amniotic fluid cell culture results were divided into two groups. We compared the differences of the two groups of amniotic fluid cells culture method and the success rate. **Results** In the first group of 515 cases of amniotic fluid, 32 cases of amniotic fluid cell culture failed, the failure rate is 6.21%. In the improved group of 6736 cases of the amniotic fluid, only 18 cases failed, the failure rate is 0.27%. **Conclusions** Timely and correctly handle the amniotic fluid specimens and control each link effect the success of the cell culture, can improve the success rate of amniotic fluid cell culture.

【Key words】 amniotic fluid; cell culture; prenatal diagnosis

通过羊水细胞培养进行染色体检测是产前诊断的重要手段^[1-3], 但羊水细胞培养一直存在着标本难以复得、培养周期长、易污染、分裂象少等问题^[4-6], 细胞培养过程中的每一个环节对实验的成功都具有重要的影响。因此, 分析影响羊水细胞培养成功率的因素并探索提高成功率的方法, 对防止严重的遗传病具有十分重要的现实意义。近几年, 我们就影响羊水细胞培养成功率的因素进行了探索, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 2003 年 1 月至 2006 年 12 月, 符合产前诊断适应证如唐氏筛查高风险、年龄 ≥ 35 周岁、不良孕产史及 B 超合并畸形的孕妇 515 名进行了羊膜腔穿刺, 孕周为 20~24 周, 年龄 20~50 岁。该组为羊水细胞培养方法改进前组。

1.1.2 2007 年 1 月至 2013 年 12 月, 上述符合产前诊断适应证的孕妇 6737 人, 孕周为 19~25 周, 年龄为 20~53 岁。该组为羊水细胞培养方法改进后组。

1.2 主要仪器和试剂 CO₂ 培养箱(美国 Forma), 羊水细胞培养基(美国 GIBCO 培养基和张氏培养基)。

1.3 研究方法 通过比较两组羊水细胞培养方法及培养成功率的差异, 分析影响羊水细胞培养成功

* 通讯作者: 任慧颖, E-mail: renhuiying7812@126.com

率的因素。

1.3.1 改进前羊水细胞培养方法

1.3.1.1 羊水的抽取与接种 无菌条件下,B超引导定位,抽取羊水30 ml,分别接种于2个培养瓶中,置于37℃、5.5%二氧化碳培养箱中,静置培养。

1.3.1.2 羊水细胞收获 弃上清后,将培养瓶中加入37℃预温的1%的柠檬酸三钠低渗液约3 ml,置37℃水浴中低渗30分钟加入新鲜配置(甲醇:冰醋酸3:1)固定液1.5 ml预固定,静置5分钟后用滴管轻轻吹打,移入离心管中,离心,去上清,重复固定2次。

1.3.1.3 制片、G显带及核型分析制片 细胞沉淀中加入0.5 ml固定液,制成细胞悬液滴于玻片后,用力吹一口气,将液面吹开,并快速在酒精灯外焰加热,固定细胞。75℃烤箱中烤片2小时后放入37℃恒温箱存放。

G显带用0.025%胰酶消化后,Giemsa染液染色,流水冲洗,空气自然干燥后,即可在显微镜下观察染色体分裂象。

1.3.2 羊水细胞培养改进措施 自2007年始,我们对羊水细胞的培养过程进行了以下改进:①更换注射器,将抽取羊水用的注射器由带有黑色橡皮塞的普通注射器改为BD公司生产的没有黑色橡皮塞的注射器。②细胞培养收获方式的改进,2007年前采用双线培养单线收获方式,即将羊水细胞接种于2个独立的培养瓶中,但收获、制片和核型分析时未能坚持独立的双线。2007年后我们采用严格双线培养双线收获方式,即每例羊水标本分为两份,分别交由两位技术人员,使用不同的培养基,分别置于2个培养箱进行培养,并独立完成从细胞的接种、收获、制片、分析到出具报告的全过程。③建立量化收获标准:当细胞生长旺盛,形成中等大小且含有较多圆形细胞的克隆数达到10个或以上时,即可收获。④制片方式的改进:制片时不再用酒精灯外焰加热,而是将细胞悬液滴在倾斜的玻片上,放入75℃烤箱,待玻片干燥后取出编号。⑤混血羊水标本的处理:当羊水标本中混有大量血细胞时,离心后小心吸取沉淀底部血细胞层上面的羊水细胞进行培养。同时延长换液时间,约8~9天后换液,用F10溶液冲

洗后,加入新鲜培养基继续培养,等克隆数达到收获标准时进行收获。

核型分析按照《中华人民共和国卫生行业标准》中的《胎儿染色体异常的细胞遗传学产前诊断技术标准》进行计数、分析。计数时至少计数在2个以上独立培养的培养瓶中平均分布的20个细胞,记录染色体数目或结构异常。分析时至少分析在2个以上独立培养的培养瓶中的5个细胞,所分析的细胞应达到320条带水平。按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2005)标准进行核型分析诊断。

2 结果

改进前组的515例羊水标本中培养失败32例,失败率为6.21%。改进后组的6736例羊水病例中仅有18例失败,失败率为0.27%。两组的培养结果对比情况详见表1。

改进前组中,2006年的2批羊水穿刺共22例羊水标本中,有20例羊水细胞未贴壁,培养失败,经查找原因及文献检索^[2],发现是由于注射器的批号改变,可能是黑色胶塞或残余的有害物对细胞的毒性作用导致细胞不贴壁。另外,4例为技术人员操作不当,引起污染,羊水细胞培养失败;8例为羊水标本严重混血,羊水细胞贴壁克隆少,收获后未能获得足够的分裂中期细胞,实验失败。

改进后组中,18例失败的病例中,1例是因为羊水细胞培养后,贴壁细胞形态异常,梭形羊水细胞量少,两个培养体系未能收获到形态良好的分裂中期细胞,实验失败;8例为技术人员操作不当引起污染,羊水细胞培养失败;6例为存在陈旧性出血的羊水标本,羊水呈现黄绿色或深棕褐色,混有大量小块儿状沉淀,培养后羊水细胞贴壁克隆量少,未能收获到染色体核型;3例为严重混血的羊水标本,且在羊水标本离心前已发生凝集反应,大量的羊水细胞被凝集在凝块中,导致贴壁细胞减少,培养失败。

3 讨论

通过羊水细胞培养进行产前诊断是目前广泛应用的技术,但是要获得羊水需进行羊膜腔穿刺,这项技术对孕妇及胎儿仍存在一定的风险,可造成孕妇

表1 羊水细胞培养情况统计表(例)

分组	总羊水细胞培养例数	培养失败例数					培养失败率
		注射器污染	混有新鲜血液标本	陈旧性出血标本	标本污染	沉淀量少	
改进前	515	20	8		4		6.21%
改进后	6736		3	6	8	1	0.27%

注: $\chi^2=243.07, P<0.05$

和胎儿的损伤、感染,流产发生率为0.2%^[7,8]。羊水细胞主要来源于胎儿皮肤、消化、呼吸道等脱落细胞,细胞大部分是衰老和固缩的,脱落细胞中活性细胞数量较少,体外培养相对困难^[7]。羊水产前诊断的关键技术是细胞的培养和染色体的制备,影响羊水细胞培养成功率的因素很多^[9],但主要是培养基的质量和羊水中存活细胞的数目以及制片技术影响获得染色体核型的质量和数量,因此,提高羊水细胞染色体产前诊断的成功率和准确性的关键在于增加存活羊水细胞的数量和提高制片技术^[8]。为确保羊水培养成功,避免导致孕妇行第2次穿刺,我们通过不断探索和改良,根据本实验室现有条件逐渐摸索出了一套较为成熟的羊水培养方法,并在实践中得到验证。

3.1 器械和耗材 采集抽取羊水标本所用的容器必须保证无细胞毒性,以免降低细胞活性,影响羊水细胞的贴壁生长。BD公司的注射器不带有黑色胶塞,所以没有细胞毒性,而且包装的一侧为纸质,有利于消毒剂环氧乙烷的挥发,和普通的20 ml注射器相比,大大减少了对细胞活性的影响。更换为BD公司的注射器后,6737例羊水培养实验中,未出现因容器对羊水细胞的毒性作用导致的实验失败。

3.2 构建两个独立、平行的培养收获体系 每例羊水标本分为两份,分别交由两位技术人员,使用不同的培养基,分别置于2个培养箱中进行培养,并独立完成从细胞的接种、收获、制片、分析到出具报告的全过程。这样可以避免因单人操作不当而导致培养失败的发生,提高实验的成功率。同时两个独立、平行的培养收获体系相当于双盲对照,有助于及时发现差错,提高诊断的准确性。而且,只有构建两个独立、平行的培养收获体系才能对羊水细胞核型的真假嵌合进行合理有效的判定。

3.3 制片 滴片后猛吹一口气会导致染色体核型

的大量丢失;再在酒精灯外焰加热,个体操作难以标准化,进而导致G显带中胰酶处理时间的差异较大,增加实验失败的风险。将细胞悬液滴于倾斜的玻璃片上,液体下滑的同时,染色体可以分散、延伸,从而能得到分散较好的染色体核型,且染色体核型丢失较少。置于75℃烤箱干燥过程易于标准化,G显带中胰酶处理时间的差异不大,有利于提高实验的成功率。

3.4 血性羊水标本的处理 混血的羊水标本进行培养时,大量的血细胞沉淀于瓶底,会影响羊水细胞的贴壁^[10-15],离心后弃去沉淀底部的红细胞,吸取沉淀上层的羊水细胞进行培养,可以减少培养体系中的血细胞,同时延长换液时间,约8~9天后换液,用F10溶液冲洗,更换新鲜的培养基,可以进一步去除残余血细胞,有利于羊水细胞的贴壁生长。

3.5 量化收获标准 要收获较多的分裂象应该选择适当的收获时机。10倍目镜和10倍物镜下观察:以梭长形羊水细胞(AF细胞)为主要类型的生长细胞,形成的细胞克隆覆盖1个或1个以上的完整视野,定义为一个中型克隆,当一个培养瓶中有10个以上中型克隆,细胞克隆中央的细胞开始老化,克隆周边细胞生长旺盛,且每个细胞克隆中存在20个以上的圆形、双圆形或葡萄状透亮细胞时,可进行收获,可以获得较多的染色体分裂中期细胞。

参 考 文 献

- [1] 窦蓉,朱祖华.羊水绒毛染色体检查在胎儿产前诊断中的临床应用[J].中国优生与遗传杂志,2005,13(4):38.
- [2] 黄荷凤.现代辅助生殖技术[M].北京:人民军医出版社,2003:195-198.
- [3] 孙明强,许继秀,孙立宁,等.提高羊水细胞培养成功率的方法[J].中国优生与遗传杂志,2007,15(6):45-46.
- [4] 洪英姿,王元白,陈幼莲,等.孕中期产前筛查与产前诊断分析[J].中国妇幼保健,2012,27(8):1194-1195.

[5] 赵振. 孕中期羊水染色体检测及妊娠结局分析[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(6): 360-362.

[6] 孙淑湘, 凌颖聪. 提高羊水细胞染色体培养成功率研究[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(10): 1422-1423.

[7] 季刚, 朱键生, 王朝红, 等. 羊水细胞培养技术在产前诊断中的初步应用[J]. 安徽医学, 2007, 28(5): 396-397.

[8] 杨灿峰, 陈道祯, 耿金花, 等. 中孕羊水细胞培养和染色体制备方法的分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(3): 55-56.

[9] 许争峰, 胡娅莉, 朱瑞芳. 高效羊水细胞培养技术在产前诊断中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(4): 275.

[10] 陈铁峰, 毛倩倩, 邹波, 等. 1848 例妊娠中期羊水细胞染色体核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(3): 39-41.

[11] 周玉春, 黄定梅, 雷花香, 等. 一种改良的羊水细胞染色体制备方法[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, (2): 11-12.

[12] 剡红民, 强荣, 陶囡, 等. 羊水培养技术在产前诊断的应用

[J]. 实用医技杂志, 2006, 23: 35-37.

[13] 李从青, 丛林, 姚洁, 等. 117 例羊水细胞培养结局及影响因素的探讨[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(6): 769-770.

[14] Riesco E, Tessier S, Pérusse F, et al. Impact of walking on eating behaviors and quality of life of premenopausal and early postmenopausal obese women [J]. Menopause, 2010, 17(3): 529.

[15] Taveras EM, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, et al. Maternal short sleep duration is associated with increased levels of inflammatory markers at 3 years postpartum [J]. Metabolism, 2011, 60(7): 982-986.

(收稿日期: 2014-07-18)

编辑: 邹刚

(上接第 41 页)

特别是需要做臀位外倒转术或者胸膝卧位纠正胎位时, 超声检查如果发现脐带绕颈是需要提示临床医生的。因为在臀位外倒转术或者胸膝卧位纠正胎位时, 如果胎儿有脐带绕颈可能会增加胎儿宫内窘迫的风险^[11-13]。在晚孕期(36 周后), 脐带绕颈应作为评价胎儿宫内情况的观察指标, 尤其是出现相应临床表现时, 如临产后胎头不入盆、宫缩时胎心减慢、胎监变异减速等更要提示。

综上所述, 超声对孕晚期胎儿脐带绕颈有较高的诊断符合率, 且具有操作简便、安全、可靠等优点, 能为临床医师观察胎儿的宫内情况及选择恰当的分娩方式提供重要依据。

参 考 文 献

[1] 徐晓红, 李英勇, 刘锋, 等. 彩色多普勒超声对脐带绕颈诊断结果易变性的研究[J]. 中国超声医学杂志, 2005, 21(5): 379-381.

[2] 肖春华, 黄燕, 张俊. 彩色多普勒超声诊断胎儿脐带绕颈及其临床价值[J]. 中国医学影像学杂志, 2004, 12(05): 224-225.

[3] Gembruch U, Baschat AA. True knot of the umbilical cord; transient constrictive effect to umbilical venous blood flow

demonstrated by Doppler sonography[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2012, 8(1): 53-55.

[4] Shrestha NS, Singh N. Nuchal cord and perinatal outcome [J] Kathmandu Univ Med J, 2007, 5(3): 360.

[5] 陈常配, 陆兆龄, 陈欣林, 等. 围生期超声多普勒诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 155.

[6] 吴乃森. 彩色多普勒超声检测脐带绕颈位置异常和预测胎儿窘迫的意义[J]. 中国超声医学杂志, 2009, 11(9): 670-671.

[7] Odendaal HJ. Influence of umbilical cord entanglement on fetal heart rate[J]. S Afr Med J, 2010, 50(49): 1966-1967.

[8] 张又方, 邓红梅, 李冬梅. 脐带绕颈对分娩方式的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 15(7): 278.

[9] 朱爱芳. 脐带绕颈对妊娠结局的影响[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(5): 871-872.

[10] 李洁, 孙凤英, 赵霞, 等. 臀围外倒转术的成功率及其影响因素[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17(3): 169-172.

[11] 郭培奋, 周新力, 宋天容, 等. 胸膝卧位纠正胎位对脐带异常的影响[J]. 武警医学, 2005, 04: 252-254.

[12] 陈彦红, 许春梅, 严思萍, 等. 超声在胎儿脐带绕颈宫内干预方法中的价值探讨[J]. 中国超声医学杂志, 2009, 25(7): 694-696.

(收稿日期: 2014-08-21)

编辑: 陈萍