

宫腔冲洗法收集妊娠早期滋养细胞的可行性研究

李冬煊^{1,2} 苏放明^{1,2*} 赵跃宏^{1,2}

(1. 暨南大学第二临床医学院; 2. 广东省深圳市人民医院产科, 广东 深圳 518020)

【摘要】 目的 探讨宫腔冲洗法收集妊娠早期滋养细胞的安全性和有效性。方法 选择妊娠 35~ 76 天拟行人工流产术的妇女行宫腔冲洗,以不孕症妇女输卵管通液回收液作阴性对照,人流后的绒毛组织作阳性对照,对回收的冲洗液涂片进行免疫组织化学染色,并观察两种单克隆抗体抗 HLA-G、抗 CK-7 对冲洗液中滋养细胞的识别情况,同时记录回收液的血污程度,观察受试对象的流产率。结果 92 例早孕妇女行宫腔冲洗,有 86 例收集到冲洗液,回收率 93.5%;其中可见中重度血细胞污染者 61 例,血细胞污染率 70.9%;86 例宫腔冲洗样本中,有 63 例发现滋养细胞,阳性率为 73.3%;抗 HLA-G、CK-7 抗体识别孕早期宫腔冲洗液中滋养细胞的敏感度分别为 59.5%、88.5%,特异度 92.3%、10%;观察 1 周后再行人工流产的 25 例受试对象的流产率为 0%。结论 妊娠早期宫腔冲洗可获取一定数量的滋养细胞,单用抗 HLA-G 或 CK-7 抗体无法高效识别宫腔冲洗液中的滋养细胞,而宫腔冲洗样本质量不影响滋养细胞的检测,该法不失为一种安全、有效的产前诊断取材方法。

【关键词】 宫腔冲洗; 妊娠早期; 滋养细胞; 产前诊断

Feasibility study on Acquisition of fetal trophoblasts by means of intrauterine lavage in early pregnancy

Li Dong-huan, Su Fang-ming^{*}, Zhao Yue-hong.

(Department of Obstetrics, The Second medical college of Ji Nan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China)

【Abstract】 **Objective** Approach the safety and efficiency of transcervical sampling by the means of intrauterine lavage (IUL) in early pregnancy. **Methods** The subjects were selected from pregnant women between 35 and 76 day of gestation age by means of IUL, immediately before elective termination of pregnancy (TOP), at which time the transcervical cell (TCC) samples from infertile women who did hydrotubation were also obtained as negative control, while positive control was villus collected after TOP. Those samples were made into smears and tested by immunocytochemistry staining (ICC) with anti-HLA-G or anti-cytokeratin 7 monoclonal antibody (Mab). Observe their recognition status of trophoblasts from the IUL samples. Simultaneously blood contamination of IUL sample was evaluated and recorded. Abortion rate of cases was also observed. **Results** There were 86 cases in 92 early pregnant women (93.5%) successfully retrieved the intrauterine fluid, 70.9% (61 cases) of all samples were contaminated significantly with blood. The detection rate of trophoblasts from IUL specimens was 73.3%. The sensitivity of anti-HLA-G or anti-CK-7 Mab recognised the trophoblast in the TCC samples was 59.5%、88.5%, specificity was 92.3%、10%. Abortion rate of 25 cases who scheduled of TOP after one week was 0%. **Conclusion** We can collect a certain number of trophoblasts by IUL sampling. But Efficient identification of trophoblasts from IUL samples was impossible using only anti-HLA-G or anti-CK-7 Mab. While detection of trophoblasts was not influenced by the quality of IUL samples. So the sampling method

* 通讯作者: 苏放明. 深圳市人民医院产科, 广东省深圳市东门北路 1017 号

电话: 0755-25533018 2061 邮编: 518020 E-mail: sfmlxq@163.com

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B35930007)

was safe and effective enough for prenatal diagnosis.

【Keywords】 Intrauterine lavage; First trimester; Trophoblast; Prenatal diagnosis

出生缺陷的干预目前仍主要依赖于产前筛查和产前诊断,而产前诊断则往往需要获取胎儿样本,目前常用的胎儿取材技术主要包括绒毛活检、羊膜腔穿刺和脐带穿刺,均为有创性操作,具有一定的流产风险。因而,发展一种无创或微创性取材技术,具有临床实用价值。经宫颈收集携带胎儿遗传信息的滋养细胞有望成为早期无创或微创性产前诊断取材的新途径。

本文选择拟行人工流产的早孕妇女,通过宫腔冲洗法收集脱落的滋养细胞,进行免疫细胞化学染色,探讨宫腔冲洗法的安全性和有效性,同时观察抗HLA-G、CK-7两种单克隆抗体对孕早期宫腔冲洗液中滋养细胞的识别情况。

1 材料与方 法

1.1 受试对象及分组 选择2007年6月至2008年3月,在本院门诊要求终止妊娠的早孕妇女92例为受试对象,经医院伦理委员会同意,并签署知情同意书,排除先兆流产征象及妇科炎症,未服用子宫收缩药物或前列腺素类似物。受试对象的妊娠天数统一用经腹超声测量的胚芽大小或头臀长来确定,孕龄在35~76天之间。以80例不孕症妇女输卵管术后回抽收集到的液体作阴性对照,阳性对照则为人流术后新鲜的绒毛组织。

1.2 实验方法

1.2.1 主要用品及试剂 人工授精导管、硅化防脱载玻片、低速离心机(Labnet International, Inc.)、倒置显微镜(日本Olympus)、新鲜细胞标本固定液、抗人白细胞抗原G单克隆抗体(Monoclonal Antibody to HLA-G Purified Antibody, 克隆号:4H84,由捷克Exbio购得),鼠抗人细胞角蛋白7免疫组化单克隆抗体(Mouse Anti-Human Cytokeratin 7 Monoclonal Antibody, 克隆号:OV-TL 12/30+ 72.2)、即用型快捷免疫组化MaxVision™试剂盒(鼠)、DAB显色试剂盒等(均由福州迈新生物技术开发有限公司购得)。

1.2.2 宫腔冲洗取样 实验组妇女取膀胱截石位,常规消毒铺巾,暴露并消毒阴道、宫颈,用无菌纱布擦净宫颈外口处黏液,在腹部B超指引下,将连接10 ml注射器的人工授精导管(长10 cm,直径2 mm)伸入并

越过宫颈内口约2~3 cm,缓慢注入10 ml无菌生理盐水,然后让患者抬高臀部,停留10秒钟,即用适当力量回抽注射器,导管边旋转边退出,并将反流至窥器后叶上的液体回收,置于14 ml的无菌离心管中,同时记录回收液量(0~8 ml不等),并采用半定量的方法判定血污染的程度:轻或无血细胞污染(0~<100个红细胞/400倍高倍镜);中度(100个~满视野红细胞/高倍镜);重度(满视野红细胞/高倍镜)。冲洗宫腔后的大多数受试对象立即进行负压吸宫术终止妊娠,其中25例在征得同意,1周后行人工流产,以了解宫腔冲洗后有无流产发生。

1.2.3 样本处理 将收集的宫腔冲洗液洗涤、离心后保留细胞底液,样本有中重度血细胞污染者加低渗处理。人流术后新鲜绒毛组织匀浆制作的细胞悬液(阳性对照)和未孕妇女输卵管通液检查的回收液(阴性对照)亦经过上述处理。用移液枪吸头将上述底液吹打混匀后,吸取适量底液,在硅化防脱载玻片上进行涂片,每个样本涂片1~3张,并在倒置显微镜下调节细胞浓度,然后放置室温下风干。待涂片完全干燥后,加入适量细胞标本固定液,室温固定后,遂由磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗干净。

1.2.4 免疫细胞化学染色 目前尚无公认的对滋养细胞高度敏感的特异性标记物。从文献报道中筛选出两种对滋养细胞识别率较高的单克隆抗体,即抗HLA-G^[1]、抗CK-7^[2]作为一抗进行免疫细胞化学染色(immunocytochemistry, ICC),然后请病理科的两名细胞学专家阅片,结合阳性对照及阴性对照,并参照2002年陈乐真主编的《妇产科诊断病理学》中的细胞学诊断标准,以明确宫腔冲洗液涂片中是否存在滋养细胞,并比较两种抗体对滋养细胞的识别率。

1.3 统计学处理 采用SPSS 14.0统计软件包的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 不同孕龄获得胎儿滋养细胞情况 92例早期妊娠妇女进行了宫腔冲洗,其中6例因严重血污或

未收集到冲洗液致取材失败,回收成功率93.5%;86例宫腔冲洗液标本中共有63例发现滋养细胞(每例出现滋养细胞的数目 ≥ 1 个),检出率73.3%。发现胎儿滋养细胞样本集中在40~69天之间。不同孕龄所得阳性例数见表1。

表1 宫腔冲洗液涂片中滋养细胞检出率与孕龄的关系

孕龄(天)	病例数	获取滋养细胞病例数	阳性率(%)
35-39	3	1	33.3
40-49	40	32	80.0
50-59	28	21	75.0
60-69	11	7	63.6
70-76	4	2	50.0

2.2 不同单抗检测到滋养细胞情况 以抗 HLA-G、CK-7 单克隆抗体作为特异性指标对 86 例宫腔冲洗液标本进行随机的 ICC 研究,阳性细胞为镜下组织结构清晰,胞浆及胞膜内有棕黄色颗粒沉着,胞核呈浅蓝色,染色明显高于背景。光镜下显示宫腔冲洗液涂片中抗 HLA-G 抗体可见滋养细胞特异性染色,而抗 CK-7 抗体对滋养细胞及子宫腺上皮细胞均呈阳性染色。根据细胞形态学鉴定标准,抗 HLA-G、CK-7 抗体识别早期宫腔冲洗液涂片上滋养细胞的敏感度分别为 59.5%、88.5%,特异度为 92.3%、10%。经四格表资料 χ^2 检验, $\chi^2 = 6.29$, $P = 0.012$,按 $\alpha = 0.05$ 水准,可以认为这两种单克隆抗体对宫腔冲洗液涂片中滋养细胞的识别率差别有统计学意义,具体见表 2。

表2 抗 HLA-G、CK-7 单抗对早孕宫腔冲洗液涂片中滋养细胞识别率的比较

单抗	有效	无效	合计	识别率(%)
抗 HLA-G	22	15	37	59.5
抗 CK-7	23	3	26	88.5
合计	45	18	63	71.4

2.3 收集细胞样本质量 宫腔冲洗液一次回收成功率为93.5%,平均回收液量3.2 ml,86例冲洗液回收标本中,受到中重度血细胞污染的有61例(占70.9%),发现滋养细胞的情况见表3。经 χ^2 检验, $\chi^2 = 0.503$, $P = 0.778$,按 $\alpha = 0.05$ 水准,可以认为不同血污程度的细胞样本滋养细胞的检出率无统计学意义。

表3 不同血污程度的细胞样本检出滋养细胞情况

血污程度	例数	获取滋养细胞例数	阳性率(%)
无或轻度	25	17	68.0
中度	32	24	75.0
重度	29	22	75.9

2.4 随访观察 25 例行宫腔冲洗后未即时进行人工流产的受试对象,观察 1 周,无一人出现发热、腹痛或阴道流血等症状。1 周后均进行了负压吸宫术。

3 讨论

妊娠早期胚胎绒毛退化脱落至宫腔下段,并可到达宫颈部位的设想已被证实,而利用早期经宫颈获取的胎儿细胞进行产前诊断研究的方法也受到广泛关注。在研究水平上已成功地运用宫腔脱落滋养细胞判断胎儿性别、RhD 核型,并用于诊断 21-三体、18-三体、13-三体等非整倍体和部分单基因遗传病如地中海贫血、镰状细胞贫血等^[3]。但目前,经宫颈取样的时机和方法尚无统一标准,其安全性及有效性仍存在较多争议。而本研究重点探讨宫腔冲洗法收集早期滋养细胞的安全性及有效性,并检测单克隆抗体对滋养细胞的识别率,以期找到一种分离富集滋养细胞的有效方法。

3.1 取材时机 晚期囊胚着床后,滋养层细胞迅速分裂增殖,并沿绒毛和绒毛外两个方向分化,最终形成绒毛滋养细胞(villus trophoblast, VT)及绒毛外滋养细胞(extravillus trophoblast, EVT)。在早期叶状绒毛膜变成平滑绒毛膜的过程中,滋养细胞可从胎盘外绒毛退化脱落至孕子宫腔下段再到达宫颈管,并持续存在至 13~15 孕周,包蜕膜与真蜕膜逐渐融合、宫腔消失而羊膜腔形成。理论上在妊娠 5~7 孕周及 13~15 孕周之间经宫颈取样,均应收集到携带有胎儿遗传信息的滋养细胞,但要用于产前诊断研究,应选择在绒毛完全退化之前,脱落细胞较多的时候取样,而妊娠 40~69 天正是处于这一时期,这与本研究结果以及大多数学者的观点一致。只有 Fang 等^[4]对不同孕周收集滋养细胞进行了统计分析,得出了孕周越大,样本中的胎儿滋养细胞越少的结论。但孕 40 天前取样,宫颈内口紧,不易操作,而孕 70 天后取样,若需终止妊娠,则对母亲有较大损伤,故取材在 40~69 天为宜。

3.2 宫腔冲洗法的安全性及有效性 经宫颈取样的方法有多种,如拭子法、吸取宫颈黏液、细胞刷、宫颈管或宫腔冲洗等,收集到滋养细胞的成功率不等(40%~90%),主要取决于孕周、收集方法、术者的熟练程度和检验方法的敏感度。本试验采用宫腔冲洗法,该法于1977年开始运用,其获取滋养细胞阳性率高达85%^[5]。本研究中73.3%的病例收集到滋养细胞,而中重度血细胞污染标本占取材成功病例的70.9%。这可能会使人们对该法的安全性、有效性提出质疑,曾有人将孕早期宫腔冲洗与一例少见的胎儿肢体缺陷联系起来,但Zhao等^[6]观察了30例行宫腔冲洗收集滋养细胞并继续妊娠的妇女,随访研究中未见母亲和胎儿出现并发症。本文短期观察的25例受试对象,亦没有出现感染及流产征象。较绒毛穿刺取样(chorionic villi sampling, CVS)而言,宫腔冲洗法的创伤性明显降低,本研究在B超引导下进行宫腔冲洗,相应减少了操作的盲目性及对母儿的风险,亦增加了回收的冲洗液量,且细胞样本质量与滋养细胞检出率差异无统计学意义($P > 0.05$),这与Cioni R^[7]的研究结论一致。对血细胞污染标本加低渗处理,并不影响滋养细胞的检测。通过宫腔冲洗法获取早期滋养细胞的数量也可以满足产前诊断的需要。

3.3 滋养细胞标记物的选择 目前无论用何种取样方法,收集到的早孕宫颈细胞样本中都混有大量母体细胞。利用一种或几种直接与滋养细胞特异性结合的单克隆抗体,可以将经宫颈取样的标本中的胎儿滋养细胞筛选出来,进行后续产前诊断研究^[8]。故选用对滋养细胞敏感、特异的标记物至关重要。

HLA-G是一种非经典MHC I类分子,特异性作用于母胎界面的滋养层细胞,试验选用的抗体4H84识别宫腔冲洗液标本中滋养细胞的特异性可达92.3%,而其敏感度仅为59.5%。据Blaschitz等的报道,4H84仅能检测出绒毛外滋养细胞及羊膜上皮细胞内的HLA-G蛋白^[9],故需联合其他敏感指标,方能有效识别胎儿滋养细胞。而CK-7是一种分子量54KDa的碱性细胞角蛋白,对三种类型滋养层细胞均有表达,在间质细胞上不表达。因为CK-7在子宫腺上皮上也有明显的抗原表达,抗CK-7抗体识别宫腔冲洗液样本中滋养细胞的敏感度为88.5%,而特异性仅为10%,故单用抗CK-7抗体无法富集高纯度的滋养细胞,但CK-7的敏感性较高,

可作为经宫颈取样富集滋养细胞的初筛指标。而同时应用这两种单克隆抗体或联合其他指标,对滋养细胞进行阳性选择,会相应提高宫腔冲洗液中滋养细胞的检测效率。

总之,宫腔冲洗法可以收集到早期脱落的胎儿滋养细胞,单用抗HLA-G或CK-7抗体均无法高效识别宫腔冲洗液中的滋养细胞,还需寻找其他对滋养细胞更特异更敏感的单克隆抗体;最佳取材时机为妊娠40~69天,收集细胞样本的质量不影响胎儿滋养细胞的检测,1周内无一例观察对象发生流产,故该法不失为一种安全、有效的经宫颈取样方法。

参考文献

- [1] Y W Loke, A King, T Burrous, et al. Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody[J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50: 135-146.
- [2] Juan Maldonado-Estrada, Elisabeth Menu, Pierre Roques, et al. Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 286: 21-34.
- [3] Cirigliano V, Sherlock J, Petrou M, et al. Transcervical cells and the prenatal diagnosis of haemoglobin (Hb) mutations [J]. *Clin Genet*, 1999, 56: 357-361.
- [4] Fang CN, Kan YY, Hsiao CC. Detection of fetal cells from transcervical mucus plug before first trimester termination of pregnancy by cytokeratin 7 immunohistochemistry [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2005, 31: 500-507.
- [5] 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: 1098-1101.
- [6] Xi Zhao X, Suzumori K, Sato T. Prenatal diagnosis of triple X using fetal cells obtained by endocervical lavage [J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23: 549-551.
- [7] Cioni R, Bussani C, Conti E, et al. The presence of trophoblastic cells in intrauterine lavage samples: lack of correlation with maternal and obstetric characteristics [J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28: 1064-1067.
- [8] Bulmer JN, Rodeck C, Adinolfi M. Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy [J]. *Prenat Diagn*, 1995, 15: 1143-1153.
- [9] Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, et al. Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening [J]. *Placenta*, 2000, 21: 733-741.

(收稿日期: 2009-05-08)