

优化的羊水细胞培养方法以及培养结果分析

郑娇 李春艳 程璐 徐慧 郭芬芬 徐盈 燕凤 陈必良 张建芳*

(空军军医大学西京医院 妇产科, 陕西 西安 710000)

【摘要】 目的 探讨提高羊水细胞培养成功率的方法。方法 在 B 超引导下羊膜腔穿刺术, 抽取 2772 例羊水, 离心后将沉淀接种于培养瓶中, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。结果 通过进行培养方法的优化, 逐步改善细胞培养环境, 筛选出可提高羊水细胞培养成功率的最佳方法, 培养成功率达 99.9% 以上。结论 快速、及时处理羊水标本, 控制细胞培养环境及条件, 抓住细胞收获时机方可提高羊水培养成功率。

【关键词】 染色体病; 羊水; 细胞培养; 产前诊断

【中图分类号】 R-331 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To study the method of improving the success rate of amniotic fluid cell culture. **Method** Amniocentesis was performed in B-ultrasound, and 2772 cases of amniotic fluid were extracted. After centrifugation, the pellets were inoculated into culture flask and cultured in 37℃ 5% CO₂ cell incubator. **Results** The best way to improve the success rate of amniotic fluid cell culture was to improve the cell culture environment by optimizing the culture method. The success rate was 99.9%. **Conclusions** Rapid and timely treatment of amniotic fluid specimens, control the environment and conditions of culture, accurately grasp the cell harvest time can improve the success rate of amniotic fluid culture.

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

染色体数目异常和结构畸变导致的染色体病是导致出生缺陷的重要原因^[1]。近年来基因芯片、Bops 等产前诊断新技术开展, 使产前诊断与遗传咨询指导更精准更详细, 但羊水细胞染色体分析技术作为最传统的染色体检测发法依旧是产前诊断的金标准, 是诊断染色体病的最重要的手段^[2, 3]。然而, 由于培养条件、羊水质量、孕妇个体差异、宫内环境等诸多方面因素的影响, 羊水细胞培养仍具有一定难度。这直接影响后期染色体制备, 分裂相的多少与优劣, 核型分散度和形态等。经过长期摸索, 以及几种羊水培养方法的比较, 本研究室筛选出一种较优良的羊水培养方法, 研究表明改良的羊水培养方法能显著提高羊水培养成功率, 对提高产前诊断准确率和工作效率都具有

重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 根据知情同意原则应用优化羊水细胞培养方法对 2017 年 1 月至 2017 年 11 月来我院就诊的具有产前诊断指征、自愿行产前诊断的 2772 例孕妇(孕周 16~33 周)的羊水标本进行细胞培养、染色体制片以及和核型分析。

1.2 仪器与试剂 Panasonic 公司培养箱; OLYMPUS 倒置显微镜; 湘仪公司 TDZ5-WS 离心机; BI 公司的 BIOAMF-2 羊水培养基; CHANG Amino 羊水培养基; 广州白云山羊水培养基; Corning 无菌 15ml 离心管; Corning430639 25cm² 细胞培养瓶。

1.3 方法 羊水采集由临床医生在 B 超引导下, 经腹穿刺后用 20ml 注射器抽取羊水 20ml 左右, 放

置于保温包尽快送至实验室进行处理。

1.3.1 接种 羊水快速转移至15ml无菌离心管,15 000rpm离心5分钟,弃上清,余大约0.5~1ml羊水重悬沉淀物,然后接种于装有4.5ml羊水培养基的细胞培养瓶中。轻轻晃动,使液体铺满瓶底,放置于37℃ 5%CO₂培养箱中进行静置培养4~5天后,显微镜下观察或肉眼可见成堆聚集的细胞克隆或是散在的贴壁细胞后方可换液。换液2~3天后,细胞呈大克隆,中期状态细胞较多时可进行收获。加入5μl(10μg/ml)秋水仙素,轻轻摇,放入培养箱继续孵育3小时。

1.3.2 消化 取出培养瓶弃掉培养基,加入2ml 0.25%胰酶于37℃培养箱放置2分钟,加入培养基终止消化,用吸管反复吹打直至细胞从瓶壁脱落且无肉眼可见细胞团,将细胞悬液转移至15ml离心管,2000rpm 8分钟离心。

1.3.3 低渗 弃上清,加入5ml低渗液(2mg/ml氯化钾+2mg/ml柠檬酸钠)重悬后37℃孵育13分钟,加入1ml甲醇:冰醋酸=3:1固定液轻轻混匀后预固定5分钟,1800rpm离心8分钟。

1.3.4 固定 弃上清,加入5ml甲醇:冰醋酸=3:2固定液重悬室温放置30分钟,2000rpm 8分钟离心,弃上清,加入5ml甲醇:冰醋酸=3:2固定液重悬放置于4℃过夜。

1.3.4 制片、干燥及分带 次日取出至恢复室温后2000rpm 8分钟离心,弃上清,加入3~4滴甲醇:冰醋酸=2:1固定液重悬制片,75℃干燥3小时,G显带。

在羊水培养过程中,对于血性羊水、有胎粪污染羊水、孕周偏小或大羊水等几种情况羊水的培养方法如下:①血性羊水的培养:如果离心后有大量血细胞存在,一般采取提前换液的方法。培养3~4天后显微镜下观察是否有贴壁细胞,若有细胞已贴壁,晃动培养瓶并弃掉培养基,加1ml培养基再次晃动培养瓶,冲洗瓶壁上附着的血细胞后再次弃掉培养基,再重新加入5ml新鲜培养基继续培养直到有大量细胞克隆出现。②有胎粪污染羊水的培养:对于有胎粪污染或者是其他杂质较多的羊水,培养4天后显微镜下观察如有细胞贴壁

可冲洗后提前换液;也可以在培养1小时后轻轻取出培养瓶,用吸管轻轻吸出上清(其中包含大量还未贴壁的羊水细胞)重新接种于新的培养瓶中后按正常方法进行培养。③孕周偏小(<18周)羊水的培养:孕周偏小,羊水里游离细胞量较少,活性细胞也较少,离心后可见很少量沉淀,接种后可稍微延长培养时间,较正常细胞晚2~3天换液。④孕周偏大(>26周)羊水的培养:大孕周羊水里细胞较多,但活性细胞较少。可在离心后稀释羊水浓度,分多瓶培养促进羊水细胞贴壁。对于孕周过大且含有大量胎脂羊水,须在培养4天后显微镜下观察,如有细胞贴壁须提前换液。

羊水培养过程中,细胞克隆较少或者克隆过老的情况下需要消化刺激或传代,以下游两种消化方法:①胰酶消化法:弃掉培养基,加入2ml 0.25%胰酶37℃培养箱放置2分钟,加入2ml培养基中止消化并对着瓶壁反复吹打直至贴壁细胞都重悬后转移至15ml离心管1 200rpm离心5分钟,加新鲜培养基重悬后重新种植入培养瓶继续培养。②细胞刮刮细胞法:弃掉培养基,加入2ml新鲜培养基,用细胞刮(NUNC公司)刮细胞,然后用吸管反复吹打后再加入3ml培养基原瓶培养或一传二继续培养。

2 结果

采用上述培养方法,通过对临床采集2017年1月至2017年11月的2772例羊水进行细胞培养,培养结果如表1,结果异常的见表2。

3 讨论

羊水细胞的培养过程中,影响因素较多^[4,5]。首先,羊水细胞的采集、运输、接种一直到后期的培养都需要无菌条件^[6],从采集到运输、接种过程必须快速进行。羊水细胞培养前后几天贴壁时间必须静置,防止挪动,否则直接影响细胞贴壁。细胞培养箱的温度、湿度和CO₂浓度是培养成功的关键,特别是CO₂浓度必须控制在(5±0.5)%,这直接影响到羊水细胞是否能够生长存活的必要条件。羊水培养基的选择也至关重要,建议在培养时两种培养基同

时平行培养,以便对照同时也可以防止意外情况的发生。

表1 2772例羊水细胞培养结果

检查指征	例数(例)	异常例数(例)	异常比例(%)
血清学筛查异常	481	20	4.2
超声异常	1077	47	4.4
高龄	589	21	3.6
无创异常	212	76	35.8
合并两项及以上异常	204	29	14.2
其他	209	11	5.3
合计	2772	204	7.4

表2 2772例水细胞培养中异常结果分类

异常结果分类	例数(例)	
常染色体三体	13-三体	1
	18-三体	17
	19-三体	1
	21-三体	84
性染色体三体	XO	7
	XXX	12
	XXY	8
	XYY	4
	易位	25
重复	9	
缺失	8	
倒位	23	
Mar	2	
嵌合	16	
合计	204	

血性羊水培养成功率低主要是因为血细胞的存在,影响羊水细胞的贴壁和生长。提前换液减少血细胞的影响,同时新鲜培养基可为羊水细胞的增殖提供充足的养分促进生长;对于有胎粪污染或其他杂质含量较多的此类质量较差的羊水,在接种1小时后吸出上清重新接种是由于在1小时内杂质由于重力作用提前沉淀至瓶底,而羊水细胞还未贴壁。故重新接种可有效去除其他方式无法去掉的杂质从而改善羊水生长的微环境。

许多B超结果明显异常、生有异常染色体疾病的患儿、或是夫妻双方自身染色体异常以及夫妻双方携带某种单基因或染色体病的孕妇会在孕周较小的时候来进行遗传咨询,这样抽取羊水的孕周较小

导致活性细胞较少难培养的羊水细胞在培养时可适当减少培养基,人为提高细胞浓度进行培养;也可通过适当延长贴壁时间,晚2~3天换液,保证活性细胞完全贴壁。对于一些在较大孕周才发现B超异常或羊水量异常的孕妇,抽取羊水时间较晚导致羊水中死细胞过多活性细胞过少,含有胎脂等因素导致细胞培养难度增大^[7]。对于此类羊水需人为稀释羊水浓度,多接种一瓶,尤其含有胎脂的羊水必须提前换液,或多次换液^[8]以减少死细胞以及胎脂对羊水贴壁的影响。

羊水细胞在换液后观察若克隆较少(3~4个),直接收获可能导致分裂项偏少,则需要原瓶消化刺激后再培养1~2天待细胞密度达60%~70%再收获。对于细胞克隆较老的羊水,可消化刺激后再进行收获。在细胞传代时,对于克隆少细胞状态良好生长旺盛的羊水细胞建议细胞刮刮细胞法进行;对于细胞克隆较老的羊水细胞建议用胰酶消化的方式进行传代。总体来说,细胞刮刮细胞法对羊水细胞的损伤较小^[9],传代后贴壁时间也较短,是一种比较理想的细胞传代方法。

羊水培养成功是进行染色体核型分析的前提条件,是产前诊断遗传咨询的重要依据^[10],对预防出生缺陷意义重大^[11]。从羊水采集到收获制片过程复杂漫长,每个环节都可能对实验结果造成影响。本实验室用以上所述优化的羊水细胞培养方法培养成功率达99.9%以上,综上所述,羊水细胞的培养需要在操作过程中因个体差异而异,需要根据不同羊水的状态细化操作方能提高培养成功率。

参考文献

- [1] 尤俊岭. 探讨不同的产前诊断指征与胎儿染色体异常的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(2): 91-92.
- [2] 王辉林, 蓝慧娟, 麦光兴, 等. 羊水细胞培养技术的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(18): 2374-2375.
- [3] 张璘, 任梅宏, 宋桂宁, 等. 产前诊断中有关染色体嵌合体的诊断、处理及临床分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(10): 54-57.
- [4] 刘敬华, 隋丽萍, 孟蕾, 等. 羊水细胞培养和染色体制备改良方法分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(10): 59-60.
- [5] 张晶, 李卫凯, 谢志威, 等. 羊水细胞培养成功与失败结果分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2012, 15(6): 801-802.

- [6] 范佳鸣,曾艳,楼永良,等.羊水细胞培养污染危害及避免污染的策略[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(4):80-25.
- [7] 黄曙方,李萍,丁红,等.孕中晚期胎儿细胞遗传学的诊断分析[J].中国全科医学,2013,16(6B):2017-2020.
- [8] 向文秀.改良羊水细胞培养方法在产前诊断中的应用研究[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(6):47-48.
- [9] 郑文婷,尹志军,梁映亮,等.细胞刮刮细胞法和胰酶消化法在羊水培养中的效果比较[J].检验医学与临床,2017,14(11):1653-1655.
- [10] 张欣.羊水细胞培养在产前诊断中的应用价值[J].医学理论与实践,2013,26(22):3043-3044.
- [11] 曹旭,梁玉,郭姗姗,等.孕中期羊膜腔穿刺胎儿染色体核型分析的临床意义[J].蚌埠医学院学报,2016,41(6):779-780.

(收稿日期:2017-11-25)

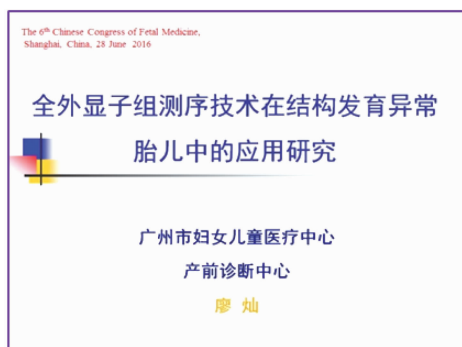
编辑:宋文颖

· 视频导读 ·

全外显子组测序技术在结构发育异常胎儿中的应用研究

廖灿

(广州市妇女儿童医疗中心产前诊断中心)



全外显子组测序技术(whole exome sequencing, WES)已逐渐应用于临床,其优势在于并行一次完成了人类全基因组近 2 万个基因的编码区测序,约占基因组比例 1%,拥有更优的性价比;直接对病例基因组变异进行检测,准确度高;只需要选择少量的家系样本或者单个的散发病例样本。

来自广州市妇女儿童医疗中心的廖灿教授通过讲述中国罕见病的现状、产前诊断遗传性疾病主要技术进展、临床遗传病检测流程、NGS 国际应用指南,并结合广州市妇女儿童医疗中心 WES 在临床实践中的经验向我们详细介绍了“全外显子组测序技术在结构发育异常胎儿中的应用研究”。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2017.04.009