

荧光原位杂交技术在自然流产胚胎组织染色体分析中的应用探讨

周裕林 曾寰 柴冬宁 罗振宇 胡美英 李健*

(厦门市妇幼保健院 产前诊断中心,福建 厦门 361003)

【摘要】 目的 探讨荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)在自然流产胚胎组织中染色体分析的应用价值。方法 运用 FISH 技术对临床 102 例自然流产胚胎组织进行检测,并对其 24 例标本同时进行细胞培养和核型分析。结果 FISH 检测共发现 46 例染色体异常,异常率为:45.09%(46/102);异常类型有:单体型、三体型、三倍体型及其嵌合体、性染色体异常嵌合体。24 例染色体核型分析结果中,17 例(70.83%)与 FISH 结果相符,另外检出 FISH 方法所不能覆盖的染色体异常 7 例(29.17%),分别为三体型 5 例、染色体结构异常 2 例。结论 大部分的自然流产胚胎组织异常染色体结果可通过 FISH 技术检出,该技术具有检测速度快,实验成功率高等优点。但基于 FISH 技术探针检测区域的局限,研究中仍有部分流产胚胎组织异常染色体结果需通过核型分析检出,提示核型分析在有关研究中仍具重要作用。

【关键词】 自然流产;胚胎组织;FISH;核型分析;染色体异常

Study on Chromosome Abnormalities in Spontaneous Abortions by Fluorescence in Situ Hybridization

Zhou Yu-lin, Zeng Huan, Chai Dong-ning, Luo Zhen-ning, Hu Mei-ying, Li Jian*

(Xiamen Maternity & Child Health Care Hospital, Xiamen, Fujian 361003 P. R. China)

【Abstract】 Objective To explore the use of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques for chromosome analysis of products of conception (POCs) in spontaneous abortions. **Methods** 102 POCs were analyzed by FISH, and simultaneously, 24 samples out of 102 were analyzed by G-banding karyotyping after cell culture. **Results** Haploid, aneuploid, triploid and sex chromosome mosaic or chimera were detected in 46/102 (45.09%) POC samples by FISH test. Among the 24 samples analyzed both by FISH and karyotyping, 17 cases (70.83%) G-banding results were coincidence with FISH results, whereas the rest 7 cases G-banding results were different from FISH results. Among which, 5 were trisomy and 2 were chromosome structure abnormal. **Conclusion** Chromosome abnormalities are one of the main reasons responsible for spontaneous abortion. FISH technique can detect the majority of chromosome abnormalities in spontaneous abortion with fast, less examination fail. But it is really some abnormalities can not be detected by FISH due to the limited available, G-banding is still helpful skill in chromosome analysis of spontaneous abortions.

【Key words】 spontaneous abortion; POC(product of conception); chorionic villus; fetus tissue; FISH; karyotyping; chromosome abnormality

基金项目:中华医学会课题(项目编号:CAMB012010)和福建省自然科学基金(项目编号:2009D18)资助。

* 通信作者:李健. Email:zhou_yulin@126.com

染色体数目和结构异常是引发自然流产的重要因素之一。多项研究表明,自然流产(包括稽留流产)的病例中,约有 50.5%~66%是染色体异常造

成的^[1-4]。检测流产物胎儿的染色体情况,对于明确当次流产的原因,指导下一胎妊娠具有一定的意义。

本文拟采用包含7种染色体探针(13、16、18、21、22、X和Y)的荧光原位杂交(FISH)技术,对102例自然流产的胚胎组织进行染色体分析,部分结果同时与常规染色体核型分析结果进行比较,探讨FISH技术在临床流产物的染色体分析中应用的可能性及优缺点,为异常妊娠结局细胞遗传学研究提供新的研究手段。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 收集本院2010年8~11月期间的稽留流产(包括空孕囊)引产标本共102例,其中绒毛标本86例,胚胎组织标本16例。孕早期(孕周 \leq 13周)标本90例,孕中期(13周 $<$ 孕周 \leq 27周)的标本12例,最大孕周为20周。102例孕妇中,年龄 $<$ 35岁的孕妇95例,年龄为35~41岁的孕妇7例。每个病例都经超声影像证实胚胎停育(无心管搏动或空孕囊未见胚芽),孕周数以超声影像估算的孕周数为准。

1.2 方 法

1.2.1 临床取材 孕周 $<$ 10周的,直接清宫取绒毛200 mg以上;孕周 $>$ 10周的胚胎停育孕妇,口服米非司酮,每12小时一次,每次100 mg。后清宫术无菌取绒毛或(和)胎儿组织,或者再服用米索前列醇600 μ g,任胚胎自行排出。取材前均告知孕夫妇并签署知情同意书。取出后胎儿组织放入盛有含有青、链霉素及硫酸庆大霉素的无菌1640培养液中,送交实验室做FISH和培养用。

1.2.2 绒毛及胎儿组织细胞标本制备 取流产物绒毛或取胎儿肌肉组织样本,用生理盐水漂洗至发白。绒毛样本在倒置显微镜下,剔除蜕膜组织避免母体细胞污染。剪碎挑出来的绒毛或胎儿肌肉组织,加入5 ml 预热至37 $^{\circ}$ C的0.075 M KCl低渗液,轻吹打悬浮细胞,37 $^{\circ}$ C水浴20分钟。预固定:缓慢加入2 ml 固定液(甲醇:冰乙酸为3:1)于试管中,轻吹混匀。1 000~1 500 rpm离心10分钟。去上清,加入5~6 ml 固定液,混匀,静置10分钟固定,期间吹打1次,1 000~1 500 rpm,离心10分钟。重复一

次。去上清,于离心沉淀物中加1~2 ml 冰醋酸,消化约1分钟,促使单个细胞从未剪碎的组织中分离出来,随即加入3~6 ml 甲醇终止消化,吹匀,离心去上清。再加入固定液调成适合浓度的细胞悬液滴片,FISH杂交备用。

1.2.3 杂交前预处理 片龄在22天之内的绒毛或取胎儿肌肉组织玻片标本,2XSSC(PH 7.0)溶液中平衡5~10分钟,随后置于胃蛋白酶液中(0.01 M HCL 40 ml, 20 mg/ml 胃酶储液 160 μ l, 37 $^{\circ}$ C。)处理10分钟,2XSSC(PH 7.0)溶液(37 $^{\circ}$ C)再次漂洗5~10分钟,70% 85%、100%酒精逐级脱水,每缸2分钟。

1.2.4 荧光原位杂交(FISH) 参照探针生产商金菩嘉公司推荐的方法,结合本实验室的条件进行,步骤如下:探针工作液的配制:探针原液与交缓冲液按2:8的比例配制,加入到微量离心管中充分混匀,快速离心1~3秒。将10 μ l 探针工作液滴加于有绒毛或胎儿组织细胞的玻片区域,立即加盖盖玻片,用橡皮胶封边。尽可能避免盖玻片与玻片之间产生气泡,减少漏杂交区。共变性:可用全自动杂交仪,也可用病理制片用的烤片机代替杂交仪。共变性条件:75 $^{\circ}$ C, 5分钟。杂交:湿盒,避光,42 $^{\circ}$ C, 16小时。杂交后洗片,湿盒中取出杂交玻片,轻轻揭去盖玻片,立即放入46 $^{\circ}$ C 50%甲酰胺/2 \times SSC快速涮片数秒至1分钟,将玻片置于46 $^{\circ}$ C 2 \times SSC溶液中,漂洗2~3分钟,振荡洗片缸1~3秒;玻片转入46 $^{\circ}$ C 0.1%NP-40/2 \times SSC(V/V=1/1)溶液中,振荡漂洗1~2分钟,随后迅速过70%乙醇,随即取出,避光处气干。干燥后滴加10 μ l DAPI复染剂滴加于杂交区域位置,立即盖上盖玻片。玻片于暗处-20 $^{\circ}$ C放置20分钟后,室温下平衡温度,荧光显微镜(OLYMBUS BX5.1)下选用对应的滤波片组观察杂交结果。imi tech CCD, FISH Images 软件。

共使用7种染色体探针,分为3组,即13/21组、16/22组和18/X/Y组,前2组都为GLP探针(Gene Locus probe),13/21组的探针分别标记于13q14(绿色)和21q22(红色)处,16/22组探针的位置则分别定位于16q22(红色)和22q11.2(绿色);18/X/Y探针组为CSP探针(Centromeric sites

probe), 探针分别定位于 18, X, Y 的 p11.1~q11.1 区域, 按顺序分别标记水蓝色(Aqua)、绿色、红色。上述的绿色指荧光染料 FISH 标记, 红色为 Rhodamine 标记, 水蓝色即用 DEAC 标记。

1.2.5 结果判读 选择 100 个形态规整的间期核阅读杂交信号。正常信号方式(signal pattern)细胞的比例达到 90% 以上即可定为正常; 某种异常信号方式细胞的百分比达到 60% 以上, 则可为异常; 正常信号方式细胞的百分比达不到 90% 的, 而同时, 某种异常信号方式细胞的比例在 10%~60% 之间的, 则称为中间异常类型。对于中间异常类型, 需要计数 150~200 个间期细胞, 以获得确定的结果。一个间期核中见到 2 个小小的同色信号, 并且连个信号之间的距离小于单个信号颗粒的直径时, 视为一个信号。若核中只见一个大而亮的信号, 信号直径明显大于普通信号, 则视为信号重叠, 这类情况不计数。

1.2.6 染色体核型分析 无菌取材的绒毛或胎儿组织, 经无菌生理盐水洗涤后, 无菌眼科剪剪成细小块组织, 组织块中加入杭州博圣生物公司出品的组织处理液(分 A 液和 B 液分开包装, 临用前解冻等量混合)消化, 37 °C 水浴 1~1.5 小时, 期间每隔 20~30 分钟取出观察消化程度, 至肉眼可见的块状物消失, 悬液呈混浊状时, 加入含血清培养液终止消化。离心, 1 000 rpm 10 分钟, 弃上清, 保留沉淀物即绒毛细胞或胎儿组织细胞, 遂用羊水细胞全培养液(AmmnioMax- II complete, GIBCO)或组织全培养液, 将细胞配制成一定浓度的细胞悬液, 37 °C 培养箱培养(CO₂ 浓度为 5%), 使其贴壁生长, 至一定程度, 传代继续培养至足够数量的细胞。经培养、收获、显带, 染色体长度为 450~550 分带水平, 每病例显微镜下分析 3~5 个核型, 计数 20~100 个细胞中期分裂相, 按国际人类染色体命名系统 ISCN2005 做出诊断报告。

1.2.7 统计学方法 数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 FISH 技术检出流产物染色体结果 102 例自

然流产物标本中, FISH 技术共检出染色体异常的 46 例, 包括 2 例中间异常病例(均为 X/XX 嵌合体), 合计异常比例为 45.09%(46/102), 见表 1。异常类型中, 共有单体型、三体型、三倍体及嵌合体等共 9 种类型。图 1 示 1 例 22 三体 FISH 结果图。

表 1 FISH 技术检出 102 例流产物标本染色体异常结果

染色体异常类型	异常例数(%)
22-三体	12(11.76%)
三倍体	9(8.8%)
13-三体	6(5.9%)
16-三体	6(5.9%)
45,X	6(5.9%)
21-三体	2(1.96%)
X/XX 嵌合体	2 ^a (1.96%)
XX/XY 嵌合体	2 ^b (1.96%)
三倍体伴 XXX/XX 嵌合	1 ^c (0.98%)
合计 Total	46(45.09%)

注: a: 2 例嵌合比例分别为 X[36]/XX[64] 和 X[23]/XX[78];
b: 2 例嵌合体嵌合比例分别为 XX[33]/XY[67], XX[70]/XY[30];
c: 69, XXX[56]/46, XX[44]。

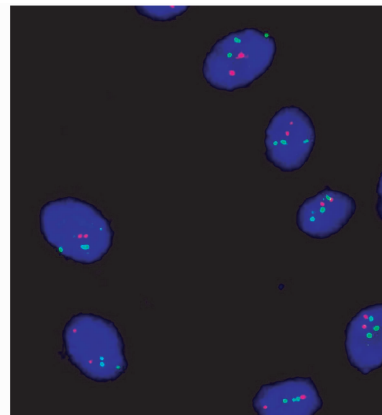


图 1 1 例 22-三体 FISH 检测结果。绿色信号代表 22 号染色体, 红色信号为 16 号染色体

2.2 24 例流产物标本染色体核型分析结果 102 例标本中, 35 例标本进行细胞培养及核型分析, 24 例标本培养成功, 培养成功率为 68.56%。对 24 例培养成功的标本进行核型分析, 发现染色体异常 19 例, 染色体正常 5 例, 其中 17 例标本(12 例染色体正常和 5 例染色体异常)核型分析结果与 FISH 检测结果一致, 占比 70.83%。另有 7 例 FISH 检测正常的标本通过核型分析发现染色体异常, 包括染色体数目异常 5 例(核型分别为: 47, XY, +2; 47, XX, +2; 47, XX, +14; 47, XX, +15 和 47, XX,

+15[23]/46,XX[4]各 1 例),结构异常 2 例(核型分别为: 46, XX, del(8)(p21)和 46, XX, 18 q + [17]/46, XX[12]),图 2、3 分别示 1 例 47, XY, +2 和 1 例 46, XX, del(8)(p21)核型图。单独检出的 7 例都为 35 周岁以下的孕妇及孕早期的胚胎。将 24 例流产物标本核型分析与 FISH 结果合并统计, 102 例流产物标本染色体异常总例数为 53 例, 异常率为 51.96%。

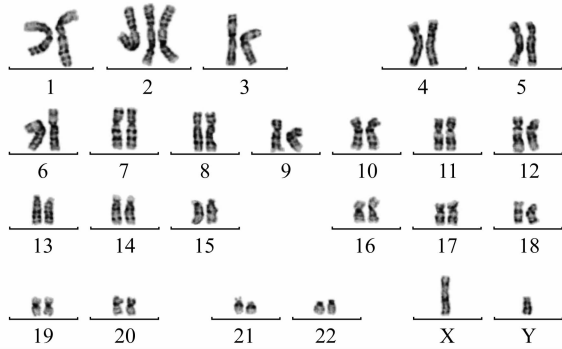


图 2 体外培养的绒毛细胞染色体核型分析结果,示(47,XX,+2)核型

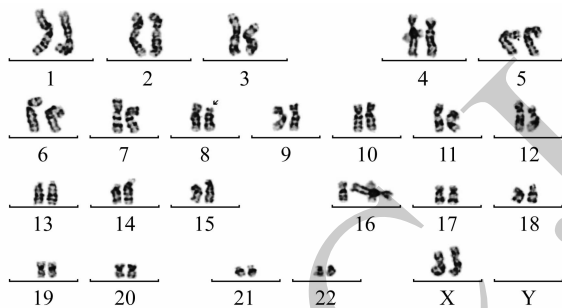


图 3 体外培养的绒毛细胞染色体核型分析结果,示 46, XX, del(8)(p21)核型

2.3 染色体异常结果在不同孕期、年龄段和胎儿性别的分布 102 例流产物标本中,早孕期(孕周 \leq 13 周)标本 90 例, FISH 技术和核型分析共检出染色体异常 48 例,异常率为 53.33%;中孕期(13 周 $<$ 孕周 \leq 27 周)标本 12 例,染色体异常 5 例,异常率为 41.7%。两组染色体异常率无显著性差异。

流产物标本按孕妇年龄分析, 35 岁以下孕妇标本为 95 例,染色体异常标本 49 例,异常率为 51.57%;35~41 岁孕妇标本为 7 例,4 例染色体异常,异常率为 57.1%。统计未发现显著性差异。

102 例标本中,除 2 例 XX/XY 嵌合体外,共检测出女性胚胎(性染色体为 X, XX 及 XXX 记为女

胎)59 例,男性胎儿(性染色体为 XY 和 XXY 记为男胎)41 例。女胎中染色体异常 31 例,异常率 52.54%;男胎中染色体异常 20 例,异常率 48.78%。两者未见显著性差异。

2.4 孕妇流产次数与流产物染色体异常的关系 按孕妇流产次数分组,流产次数为一次的标本 78 例,39 例染色体异常,异常率为 50%;流产次数在两次和两次以上的标本 24 例,14 例染色体异常,异常率为 58.33%,表 2。两者未见显著性差异。

表 2 流产物染色体异常与孕妇流产次数的关系

孕周	标本数(%)	异常病例数(%)	X^2	P
自然流产一次	78	39(50.00%)		
流产两次以上	24	14(58.33%)		
合计	102	53(51.96%)	0.511	0.47

单独考察 7 例染色体核型分析与 FISH 检测结果不一致的病例与孕妇流产物的关系,7 例标本中,流产次数为一次的病例为 4 例,流产次数 2 次的为 2 例,流产次数 2 次以上的为 1 例。

3 讨论

3.1 胚胎染色体异常是自然流产的重要病因,如果能对自然流产物进行染色体分析,将有助于临床了解本次流产的原因,并有针对性地指导下一次受孕。染色体核型分析是流产物胚胎染色体分析的常规技术,其可分析每条染色体的数目及结构,全面了解胎儿染色体的情况。但该技术具有检测时间长(一般出具报告需 2~4 周),通量低,要求无菌取材,对实验条件的要求高(存在培养失败的可能)等缺陷,一直制约了该技术在自然流产胚胎组织染色体分析中的临床应用。荧光原位杂交(FISH)技术为近些年来新发展的基于荧光标记 DNA 探针的细胞分子遗传学技术。该技术在染色体分析中具有快速、标本不需体外培养、检测成功率高等优点^[1,2]。

本文采用包含 7 种染色体探针(13、16、18、21、22、X 和 Y)的荧光原位杂交(FISH)技术,对 102 例自然流产的胚胎组织进行染色体分析,检出包含单体型、三体型、三倍体、嵌合三倍体、性染色体嵌合等异常染色体 46 例,异常率为 45.09%。异常率与既

往多项流产物染色体分析结果相近^[1-7]。提示本研究采用的 FISH 技术可靠,其包含的检测探针应可检测大部分染色体异常类型。

本文同时采集 35 例标本进行细胞培养及核型分析,24 例标本培养成功,培养成功率为 68.56%,低于既往国内多项研究^[3-5]。其一方面可能与本研究中部分标本胚胎停育时间过长,体外培养难以成功有关;另一方面,可能与临床医生无菌采集标本不够规范有关。对 24 例培养成功的标本核型分析,发现染色体异常 19 例,染色体正常 5 例,其中 17 例标本(12 例染色体正常和 5 例染色体异常)核型分析结果与 FISH 检测结果一致,占比 70.83%。这一方面说明,对自然流产物进行染色体分析,常规的细胞培养和核型分析难以确保成功,有待 FISH 等新技术的应用;另一方面说明,本研究采用的 FISH 试剂,在探针选择和染色体异常检出率上,尚有待改进和提高。

合并统计核型分析与 FISH 结果,102 例流产物标本染色体异常总例数为 53 例,异常率为 51.96%,与既往研究结果相符。

3.2 102 例自然流产病例中,FISH 技术检出的 46 例染色体异常中,占第一位的染色体异常为 22-三体,共 12 例,异常率 11.76%;其次为三倍体及其嵌合类型,有 10 例,异常率为 9.8%;13-三体、16-三体及嵌合体与 X-单体型各有 6 例,异常率为 5.9%;其余异常类型均不超过 2 例。同时培养成功的 24 例样本中,有 7 例 FISH 检测正常的标本通过核型分析发现染色体异常,包括染色体数目异常 5 例,具体为:2 例 2-三体、1 例 14-三体、2 例 15-三体(核型分别为:47,XY,+2、47,XX,+2、47,XX,+14、47,XX,+15 和 47,XX,+15^[23]/46,XX^[4]各 1 例),结构异常 2 例(核型分别为:46,XX,del(8)(p21)和 46,XX,18q+^[17]/46,XX^[12])。关于流产物的 15-三体核型,国内外均有报道^[2-6],本文报告 2 例。推测 15-三体型在核型分析中不难见到。2-三体相对少见,仅见广州和深圳两地的病例报道^[3,5],该异常核型是否具有地域独特性分布,需要大量的流调资料支持证实^[1]。本文 2 例孕妇 1 例来自福建省厦门市,另 1 例来自福建省南安市。14-三体近年来

曾有易翠星等^[4]报告 1 例及熊丽等^[3]报告 1 例 48,XY,+7,+14 的复合三体,本文检出 1 例。结合本文结果,提示上述 3 种三体核型是不容忽视的、可导致自然流产的核型,当采用 FISH 技术用于流产物染色体分析时,需考虑将针对此 3 种染色体的探针纳入,以提高异常染色体检出率。基于 FISH 技术的局限性,本文中 2 例核型分析染色体结构异常病例不能通过 FISH 技术发现,说明如需全面了解流产物染色体异常情况,核型分析尚为不可或缺的检测手段。

有趣的是,本文研究中,102 例自然流产物中,除核型分析检出 1 例 18 号染色体长臂重复嵌合体外,53 例染色体异常类型中,没有发现 18-三体型。我们知道,新生儿中,18-三体是仅次于 21-三体的非整倍体染色体数目异常。染色体数目异常多由于配子形成过程染色体不分离有关,额外的染色体导致胚胎遗传物质不平衡而具有致死性,最终导致自然流产包括稽留流产。本研究采集的标本孕周均小于 20 周,这些标本中未检出 18-三体,而同期本实验室产前诊断 1 419 例(羊水和脐血)标本发现 17 例 18-三体患儿,其确诊时孕周平均达到 24⁺⁴ 周。提示 18-三体患儿在宫内的存活时间较长,一般在大孕周流产,因此在小孕周的流产物组织中,较少 18-三体。

3.3 102 例自然流产物中,按孕周、孕妇年龄分组,中孕期(13 周<孕周≤27 周)标本染色体异常率为 41.7% 低于早孕期(孕周≤13 周);35 岁以下孕妇标本染色体异常率为 51.57% 低于 35~41 岁孕妇组。统计学分析均不具显著性差异。比较流产物组织男胎与女胎的比例及不同流产次数与染色体异常率的关系,同样未发现显著性差异。以上结果与既往部分研究结果一致^[2,3,8,9]。但也可能与本文分析的标本数量不够多有关。

综上所述,染色体异常是自然流产的一个重要病因。FISH 技术可快速、准确地完成大部分标本的染色体分析,但限于该技术自身局限性,如想全面了解染色体情况,传统的核型分析技术不可或缺。临床可根据具体需要,选择合适的研究手段。

致谢 本文部分实验工作得到福建金菩嘉公司付晶毅、彭建华两位技术员的协助。

参 考 文 献

- [1] Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, et al. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions[J]. Hum Reprod, 2002, 17(5):1166-1170.
- [2] Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis [J]. J Histochem Cytochem. 2005, 53(3):375-380.
- [3] 熊丽,刘洁,邓康,等.早期自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析 110 例[J]. 南方医科大学学报,2009,29(1):64-67.
- [4] 易翠兴,潘敏,胡舜妍,等.广州地区 97 例自然流产绒毛细胞培养及核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007,15(9):41-42.
- [5] 古艳,谢建生,罗福薇,等. 220 例稽留流产者绒毛组织细胞遗传学分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(12):38-39.
- [6] 佟丹. 72 例早期自然流产绒毛染色体分析[J]. 实用医技杂志, 2008,15(7):863.
- [7] Carrera M, Ribas I, Torrents M, et al. Spontaneous repeat abortions and numerical chromosome anomalies: genetic diagnosis before preimplantation alternative diagnosis[J]. Prog Diagn Prenat, 1996, 8:342-347.
- [8] Carph, Toder V, Aviram A. Karyotypes of the abortus in recurrent miscarriage[J]. Fertil & Steril, 2001, 75(4):678-682.
- [9] Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, et al. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage [J]. Obstetri Gynecol, 2004, 104(4):784-788.

编辑:杨春艳

(收稿日期:2011-06-21)

视频导读

侵入性产前诊断技术

孙路明

(同济大学附属第一妇婴保健院)



产前诊断技术分临床和实验室技术两个方面,两者相辅相成,缺一不可。临床方面主要是指各种侵入性产前诊断技术,即在尽可能保证孕妇和胎儿安全性的前提下,通过各种途径,获取胎儿的组织,对这些组织进行分析,可以对胎儿进行细胞遗传学分析、DNA 分析和酶学分析,从而对染色体病、单基因病和先天性代谢病进行产前诊断。比较常见的侵入性产前诊断技术包括早孕期经腹 B 超引导下绒毛活检技术、羊膜腔穿刺技术、脐血取样技术及胎儿镜检查等。

孙路明医生是中国大陆在北美完成正规母胎医学专家培训的临床医生,培训期间系统地接受胎儿超声、侵入性产前诊断技术、临床遗传、母体合并症诊治等培训,是既从事产科临床工作又从事超声形态学产前诊断的胎儿医学专家。本讲座中,她结合自己的正规受训经历和临床工作经验,对绒毛活检技术和羊膜腔穿刺技术从背景、适应证、操作及并发症和风险评估等诸方面进行了系统讲解。