

- [11] 李杰,严宝霞. pH 指示剂吸收度比值法测定人工肾透析液中的醋酸钠[J]. 中国药理学杂志, 1993, 28(1): 29-30.
- [12] 中华人民共和国卫生部药政局. 中国医院制剂规范: 西药制剂[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 1995, 1: 232.
- [12] 廖淑君. 一阶导数光谱法测定血液透析用浓缩物中醋酸根含量[J]. 生命科学仪器, 2012, 10(1): 32-34.
- [13] 林燕璇, 叶夏. 明兴纳克中醋酸钠含量测定方法的改进[J]. 国际

医药卫生导报, 2008, 14(1): 70-72.

- [14] 国家食品药品监督管理局. 中华人民共和国医药行业标准: YY0598-2006 血液透析及相关治疗用浓缩物[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2006.

(收稿日期: 2012-11-01)

• 检验技术与方法 •

绒毛染色体制备方法及其在产前诊断中的应用

谢志威, 张 晶, 李卫凯

(江门市中心医院检验科细胞遗传室, 广东江门 529023)

摘 要:目的 探讨绒毛活检的适宜操作方法及其应用于产前诊断的临床意义。方法 无菌条件, B 超引导下经腹取绒毛组织进行培养后, 收获染色体, G 显带, 显微镜下分析核型。结果 2011 年间培养绒毛标本 37 例, 成功率为 97.3%(36/37), 其中异常核型 3 例, 限制性胎盘染色体嵌合(CPM)1 例。结论 绒毛细胞长期培养法和染色体制备方法简单、技术稳定、结果可靠, 可用于胎儿染色体疾病的产前诊断。

关键词:绒毛膜绒毛; 染色体; 核型分析; 产前诊断

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 05. 034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0591-02

目前国内产前细胞遗传学诊断多为中孕期(孕 16~22 周)羊膜腔穿刺术后进行羊水细胞培养和分析染色体核型, 一旦发现胎儿染色体异常, 终止妊娠相对较晚, 引产对孕妇造成损伤较大, 在等待产前诊断的过程中, 孕妇的心理压力大。而绒毛活检由于诊断时机更早, 临床应用的意义更大, 本院产前诊断中心于 2011 年开展绒毛染色体培养, 对符合产前诊断指征的孕妇, 于早孕期(孕 7~13 周)行 B 超引导下经腹取绒毛组织进行培养, 取得良好的效果。现将本院开展的情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年, 来本院产前咨询门诊就诊, 具有明确产前诊断指征的早孕期孕妇 37 例, 妊娠 7~13 周, 均为单胎妊娠。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 临床医生在无菌条件, B 超引导下经腹壁抽取绒毛膜组织置于装有 5 mL 生理盐水的无菌试管中, 立刻送实验室培养。

1.2.2 绒毛培养 (1)以吸管吸弃原混有血液的生理盐水, 注意勿丢失绒毛; 加入备好的生理盐水, 吹打冲洗绒毛, 尽量洗净黏附于绒毛上的血丝。(2)将绒毛移入准备好生理盐水的无菌平皿中, 挑选绒毛。注意绒毛与蜕膜组织相区别, 分辨不清时可置显微镜下观察, 绒毛一般有血管, 而蜕膜组织没有。(3)将挑选好的绒毛移入另一个无菌平皿中, 吸弃液体成分, 取手术刀片将绒毛组织切碎, 大致成糊状即可。(4)取无菌注射器吸取培养基 10 mL, 将培养基部分注入平皿中冲吸切碎之绒毛组织, 全部吸入后轻轻晃动针筒将绒毛组织混匀于培养基中。将上述培养基绒毛混合液注入培养瓶中, 每瓶 5 mL, 每份绒毛标本培养两瓶。标记上姓名、编号、日期。置 37 ℃培养箱内静止培养, CO₂ 浓度为 5%。(5)培养 6~7 d 后在倒置显微镜观察绒毛细胞贴壁生长情况, 如细胞贴壁状况好, 于 10 倍物镜下见到占一个以上视野克隆数超过 3~5 个, 则将旧培养液保留约 0.5 mL, 其余弃掉, 再加 5 mL 张氏全培养液, 每天观察细胞生长情况, 如果绒毛细胞达到生长数量, 增长旺盛, 则直接收获。(6)如果绒毛细胞数量未达到收获要求则进行传代: 将培养管

内的培养液弃尽, 用巴氏滴管加胰酶液(GBICO 公司生产)约 0.5 mL, 漱洗培养瓶 2 次并弃去, 再加胰酶液 4 滴, 放入 37 ℃培养箱培养箱 3~5 min, 见细胞收缩变圆后轻拍培养瓶, 使大部分绒毛细胞由瓶底脱落, 然后加 5 mL 张氏全培养液, 放培养箱中继续培养, 每天观察细胞生长情况, 绒毛细胞达到生长数量, 增长旺盛时进行收获。

1.2.3 细胞收获 培养第 9 天早上 11:00, 于每只培养瓶中加入秋水仙素(25 μg/mL)1 滴, 混匀后放回培养箱, 3 h 后收获: 将绒毛培养液标本倒入离心管, 核对姓名和编号, 在培养瓶中加入生理盐水 1 mL 左右漱洗培养瓶 1 次并弃去, 再加胰蛋白酶液 4 滴和 37 ℃预温的生理盐水约 2 mL, 消化 5 min。显微镜下观察绒毛细胞变圆后, 轻拍使细胞脱落后吸入离心管, 再用生理盐水漱洗培养瓶 2~3 次, 一并吸入离心管中。以 1 200 r/min, 离心 10 min, 吸去上清液, 留下沉淀物。向离心管中加入 2 mL 预温(37 ℃)的 0.075 mol/L 氯化钾低渗液并吹匀, 水浴(37 ℃)6 min 后加入固定液约 0.5 mL(甲醇: 冰乙酸=3: 1, 新鲜配制), 轻轻吹匀, 在室温下放置 7 min, 以 1 200 r/min, 离心 10 min 后吸去上清液, 加入固定液 8 mL, 轻轻混匀, 固定 30 min。再重复以上固定步骤一次, 加盖拧紧后置 4 ℃冰箱贮存。

1.2.4 制片、显带、染色方法 制片: 标本 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入新配制的适量固定液(0.5~1 mL), 用吸管轻轻吹打细胞团, 制成细胞悬液, 吸取 2~4 滴细胞悬液滴于预冷的洁净载玻片上, 每人制 2~3 片, 标记姓名及编号立即用口吹散, 将制备的染色体标本片置鼓风干燥箱内 75 ℃ 3 h, 取出后自然冷却至室温。显带染色同羊水细胞染色体制备^[1]。

1.6 核型分析 核型选择染色体折叠、挤压、团聚、变形总数不超过 5 条, 带纹清楚、深浅带反差明显、染色为桃红色、细胞核膨大、无蓝色背景。计数 20 个核型, 分析 3 个分裂相。异常核型由 2 人以上确定。异常核型, 根据异常种类不同, 计数 50~100 个核型, 分析 10 个分裂相。染色体结构异常病例必须复查一次并争取复查父母核型进行对照染色体检查报告由专人签发, 15 个工作日出结果。

2 结 果

37 例标本中,一例由于绒毛取材量不足,最终导致培养失败,其余 36 例标本均培养成功,培养成功率为 97.3%,平均培养时间为 6~9 d,培养过程中细菌污染率为 0,发现异核型 3 例,限制性胎盘染色体嵌合 1 例,核型:47,XY,+3/46,XY。见表 1。

表 1 36 例绒毛核型分布

核型	n
46,XX	17
46,XY	15
47,XX,+21	1
47,XX+18	1
46,XX,t(1;15)(q21;p11)	1
47,XY,+3/46,XY	1
总计	36

3 讨 论

自从 1983 年意大利学者 Simoni 等^[2]首次采用绒毛细胞直接制备染色体以来,国内外学者对绒毛细胞体外培养方法进行了许多探索,主要是直接培养法、长期培养法、悬浮培养法等^[3-4],这其中长期培养法所制备的染色体较直接培养法的质量好,数量多。我中心借鉴羊水细胞传代法培养的经验,经过改良应用于绒毛组织的培养,相对于孕中、晚期的羊膜腔穿刺、脐带穿刺术,B 超引导下经腹取绒毛组织进行培养,能做到早期诊断,早期处置,因此在细胞遗传学、分子生物学等产前诊断领域有着广泛的应用前景。

母体细胞污染是绒毛取样过程中常见的现象,约占全部绒毛细胞培养病例的 1.9%^[5],为避免或减少母体细胞的污染,应进行绒毛的挑选和净化。本室在取材后置倒置镜下,把来源于母体的表面光滑的蜕膜从绒毛组织中分离出来,弃掉,将血凝块和其他杂质清除掉,挑选绒毛短、分支多,有微绒毛的部分,以获得高质量的绒毛细胞。通常每例要求的纯净绒毛量大于 10 mg。此外,绒毛要新鲜,有活性,则绒毛细胞培养时间简短,反之培养时间长,效果差。总之获得高质量的绒毛细胞染色体分裂相是准确进行细胞遗传学分析的前提条件。2011 年间培养标本 37 例标本中,有一例取材失败。这位孕妇为前位胎盘,由于角度问题导致取材量太少,最终培养失败。因此,在做绒毛取样,绒毛染色体检查时,还应注意胎盘的位置,选择正确的取材方法。

37 例标本中 36 例培养成功,培养成功率为 97.3%,36 例标本中胎儿染色体异常检出率为 8.33%(3/36),其中三体型占 66.7%(2/3, 18 三体和 21 三体各一例)为主要的异常核型,说明染色体三体仍是胎儿最常见的异常核型,比国内外报道稍高^[6]。三体儿的产生多数是由于减数分裂同源染色体不分离所致。对三体胎儿的处理:说明其后果的危害性,劝孕妇必须终止妊娠。平衡易位是主要的胎儿染色体结构异常,新生儿发生率为 1‰~2‰^[7]。由于没有遗传物质的丢失或者丢失不多而未引起表型改变,个体发育一般无严重影响,表型正常。本研究发现的 1 例平衡易位者核型为 46,XX,t(1;15)(q21;p11),属父母遗传,曾有习惯性流产的不良产史,对检出的平衡

易位胎儿,向家属说明情况,如果保留胎儿,对下一代的生育应进行指导,告诉他们应该做产前染色体检查,避免染色体异常的胎儿出生。

绒毛细胞培养和染色体制备中 1%~2% 的病例会出现限制性胎盘染色体嵌合(CPM)现象,这是一种组织特异性、在胎盘中发现的非整倍体细胞系嵌合体,这种异常通常在胎儿中是不存在的,即滋养层细胞核型与胎儿真实核型不一致^[8]。本院的 36 例中发现 1 例 CPM,占 2.78%,略高于国外文献报道,这可能和本组病例较少有关。发生机理主要是合子形成后,体细胞有丝染色体不分离,这各现象只发生在分化为胎盘组织的细胞系,异常核型只能出现在胎盘组织,而胎儿其他组织细胞核型均正常。限制性胎盘染色体嵌合是近几年提出的新概念,主要引起胎儿宫内发育迟缓,胎儿死亡为主的非畸形效应,其原因认为是含异常基因的胎盘组织影响了胎盘的正常发育功能。进而影响了胎儿的生长发育。绒毛短期培养法培养的绒毛细胞主要为细胞滋养层细胞,将来发育为胎盘,所获得的核型更能反映胎盘的核型,长期培养法培养的细胞主要为胚外中胚层间质细胞,将来发育为胎儿部分,所获得的核型更能反映胎儿的核型,因此,对绒毛同时进行短期和长期培养,才能对 CPM 作出更加准确的判断,从而作出更加准确的产前诊断^[9]。但在临床操作中,由于受到取材量的限制,无法对绒毛同时进行短期和长期培养,因此,建议若绒毛染色体核型发现标记染色体或其他异常核型的嵌合体,并非终止妊娠的指征,应行羊膜腔穿刺或脐静脉穿刺,分析胎儿染色体核型,排除 CPM 的可能性,以进一步明确诊断。

参考文献

[1] 郝娜,许和,戚庆炜,等. 平皿盖玻片羊水细胞培养法[J]. 中华围产医学杂志,2002(3):57-59.

[2] Simoni G,Brambati B,Danesino C,et al. Efficient direct chromosome analysis and enzyme determinations from chorionic villi samples[J]. Hum Genet,1983,63(4):349-357.

[3] 许飞,耿金花,王峻峰. 267 例自然流产患者绒毛染色体分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2004,12(2):29.

[4] 黄莉,谢丹尼,吕福通,等. 孕早期绒毛膜细胞原位培养和染色体制备方法的初步研究[J]. 中国计划生育学杂志,2006,14(1):43-45.

[5] 陆国辉. 产前遗传病诊断[M]. 广州:广东科技出版社,2002:175-180.

[6] Donner C,Rypens F,Paquet V,et al. Cordocentesis for rapid karyotype:421 consecutive cases[J]. Fetal Diagn Ther,1995,10(3):192-199.

[7] 杜传书,刘祖洞. 医学遗传学[M]. 2 版. 北京:北京人民卫生出版社,1992:175-205.

[8] Stetten G,Escallon CS,South ST,et al. Reevaluating confined placental mosaicism[J]. Am J Med Genet A,2004,131(3):232-239.

[9] van den Berg C, Van Opstal D, Brandenburg H, et al. Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi[J]. Prenat Diagn, 2000, 20(12): 956-969.

(收稿日期:2012-10-02)