

论著·临床研究

联合应用 3 种技术对复发性流产组织进行细胞遗传学分析*

刘 璇,代文成[△],魏 洁,古丽娜孜·米吉提,李 好

(新疆维吾尔自治区妇幼保健院产前诊断中心,新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 评估荧光原位杂交(FISH)检测、染色体核型分析联合染色体拷贝数变异检测在复发性流产组织检测中的应用价值。方法 采用 FISH 检测、染色体核型分析和染色体拷贝数变异检测对 220 例复发性流产组织进行检测,计算染色体异常结果。结果 FISH 检测成功率为 100.0%(220/220),染色体异常率 35.9%(79/220);仅 28.2%(62/220)的流产组织能进行细胞培养,培养成功率为 91.9%(57/62),染色体核型分析成功率为 77.5%(48/62);染色体拷贝数变异检测成功率为 90.6%(29/32),染色体异常率为 48.3%(14/29)。结论 FISH 检测仍然是复发性流产组织合适的检测手段,染色体核型分析并不适合流产组织的大规模检测,染色体拷贝数变异检测作为补充检测手段,能够提高流产组织染色体异常的检出率。

关键词:复发性流产; 荧光原位杂交; 染色体异常; 细胞遗传学分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.18.002 中图法分类号:R715.5

文章编号:1673-4130(2018)18-2212-03 文献标识码:A

Cytogenetic analysis of three types of techniques for recurrent spontaneous abortion*

LIU Xuan, DAI Wencheng[△], WEI Jie, GULINAZI · Mijiti, LI Yu

(Prenatal Diagnose Center of Xinjiang Maternal and Child Health Hospital, Urumuqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: Objective To evaluate the value of fluorescence in situ hybridization (FISH), chromosome karyotype analysis and chromosome copy number variation in the detection of abortion tissue. **Methods** Totally 220 cases of recurrent abortion were detected by FISH, chromosome karyotype analysis and copy number variation, chromosomal abnormalities were counted. **Results** The success rate of FISH detection were 100.0% (220/220), the rate of chromosomal abnormalities were 35.9% (79/220); only 28.2% (62/220) recurrent abortion were cultured, the success rate of culture were 91.9% (57/62), and the success rate of chromosome karyotype analysis were 77.5% (48/62); the success rate of copy number variation detection were 90.6% (29/32), the rate of chromosomal abnormalities were 48.3% (14/29). **Conclusion** FISH is still the most suitable method for detecting recurrent abortion tissues. Chromosome karyotype analysis is not suitable for large-scale detection of abortion tissues. Chromosome copy number variation detection can improve the detection rate of chromosomal abnormalities in abortion tissues.

Key words: recurrent abortion; fluorescence in situ hybridization; chromosome abnormality; cytogenetic analysis

复发性流产是指 2 次以上的自然流产,对复发性流产的育龄夫妇进行病因学研究和妊娠丢失评价是非常有必要的^[1],75%的复发性流产是由染色体异常导致^[2]。目前对流产组织进行细胞遗传学分析的主要手段有荧光原位杂交(FISH)检测^[3]和细胞培养染色体核型分析。但 FISH 探针检测范围有限,流产组织易污染,不易进行细胞培养,故不能完全满足临床检测的需求。染色体微阵列分析(CMA)和染色体拷

贝数变异(CNV-seq)等新技术的出现,可以对 FISH 检测和染色体核型分析结果阴性的样本进行全基因组拷贝数异常检测,从而能够提高样本的阳性检出率。联合运用多种遗传学检测技术对流产组织进行检测,能够为遗传咨询及后期妊娠指导提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2012 年 1 月至 2016 年 12 月在本

* 基金项目:乌鲁木齐市卫生和计划生育委员会科学技术计划资助项目(201410);乌鲁木齐市科学技术计划资助项目(Y141310055)。
作者简介:刘璇,女,主管检验师,主要从事临床产前筛查及产前诊断方向的研究。 △ 通信作者,E-mail:474285825@qq.com。
本文引用格式:刘璇,代文成,魏洁,等.联合应用 3 种技术对复发性流产组织进行细胞遗传学分析[J].国际检验医学杂志,2018,39(18): 2212-2214.

院就诊的 220 例复发性流产患者的流产组织进行相应的细胞遗传学检测。

1.2 纳入、排除标准 纳入标准:(1)流产次数≥2 次;(2)孕周小于 14 周。排除标准:排除意外怀孕人流和 B 超畸形胎儿的样本。

1.3 方法

1.3.1 流产组织的 FISH 检测 采用金菩嘉公司的 13/21/16/22/18/X/Y 非整倍体检测试剂盒,实验步骤按试剂盒说明书进行,计数 100 个细胞内 FISH 的杂交信号。用冷光 CCD 照相系统分别记录荧光信号,并且进行图像合成、保存。

1.3.2 流产组织的细胞培养及染色体核型分析 对培养成功的流产组织细胞进行收获、常规制片、G 显带和染色体核型分析。染色体核型分析诊断标准参

考 2013 年人类细胞遗传学国际命名体系(ISCN)。

1.3.3 流产组织的全基因组拷贝数检测 经患者知情同意后,对 FISH 检测及细胞培养核型分析结果阴性的标本,采用 Illumina CN500 测序平台进行 CNV-seq 检测, Affymetrix 750K 芯片平台进行 CMA 检测。

2 结 果

2.1 流产组织的 FISH 检测结果 FISH 检测成功率为 100.0%(220/220)。其中染色体三体综合征 56 例,染色体单体综合征 7 例,染色体三倍体综合征 13 例,染色体四倍体综合征 3 例;染色体异常检出率为 35.9%(79/220),未见异常 141 例,见表 1。异常样本中,染色体非整倍体改变 63 例,多倍体改变 16 例,见表 2。

表 1 220 例流产组织的 FISH 检测、染色体核型分析及 CNV 检测结果(n)

检测方法	样本数	三体综合征	单体综合征	三倍体综合征	四倍体综合征	微缺失/微重复	未见异常	其他异常	检测失败	培养失败	核型分析失败
FISH 检测	220	56	7	13	3	—	141	—	—	—	—
染色体核型分析	62	12	2	2	0	3	27	2	—	5	9
CNV 检测	32	4	1	1	0	5	15	3	3	—	—

注:—表示此项无数据

表 2 异常染色体分类及例数(n)

异常类别	结果描述	FISH 检测	核型分析	CNV 检测
染色体非整倍体异常	16 三体综合征	10	2	—
	18 三体综合征	9	8	—
	21 三体综合征	2	2	—
	22 三体综合征	26	—	—
	XXY 综合征	5	—	—
	XYY 综合征	4	—	—
	14 三体综合征	—	—	1
	9 三体综合征	—	—	1
	20 三体综合征	—	—	1
	15 三体综合征	—	—	1
染色体单体异常	X 单体综合征	7	2	—
	14 单体综合征	—	—	1
染色体三倍体异常	69,XXX 综合征	8	—	1
	69,XXY 综合征	2	—	—
	69,XYY 综合征	3	2	—
染色体四倍体异常	92,XXYY 综合征	1	—	—
	92,XXXX 综合征	2	—	—
染色体微缺失/微重复	46,XX,del(1)	—	1	—
	46,XX,del(4)	—	1	—
	46,XX,der(18)	—	1	—
	19 号重复(202 kb)	—	—	2
	17 号重复(1.5 Mb)	—	—	1
	22 号缺失(3.6 Mb)	—	—	1
染色体其他异常	5 号重复(485 kb)	—	—	1
	多条染色体 UPD	—	—	3
	9 号染色体倒位	—	2	—
合计		79	21	14

注:—表示此项无数据

2.2 流产组织的细胞培养及染色体核型分析结果 染色体核型分析成功率为 77.5%(48/62)。5 例标本培养失败,9 例标本因染色体分裂相过少导致染色体核型分析失败。其中染色体三体综合征 12 例,染色体单体综合征 2 例,染色体三倍体综合征 2 例,染色体微缺失/微重复 3 例,其他染色体异常 2 例,见表 1。仅 28.2%(62/220)的流产组织可以进行细胞培养,培养成功率为 91.2%(57/62),染色体核型异常率为 43.7%(21/48),见表 2。

2.3 流产组织的全基因组拷贝数变异检测结果 对其中 32 例 FISH 检测及细胞培养核型分析结果阴性的样本进行全基因组拷贝数检测,流产组织的全基因组拷贝数检测成功率为 90.6%(29/32),3 例标本因 DNA 浓度低及降解检测失败。其中染色体拷贝数异常 14 例,异常率为 48.3%(14/29),见表 1;FISH 检测和细胞培养及染色体核型分析合计异常检出率为 38.1%(84/220),CMA 检出 3 例多条染色体大片段杂合性缺失,见表 2。

3 讨 论

复发性流产的发生率近年来有不断增高的趋势,已经成为临床妇产科中最常见的疾病之一^[4],流产组织的 FISH 检测和细胞培养染色体核型分析应用于复发性流产是比较成熟的技术^[5]。由于检测平台搭建简单,人员培训相对容易,FISH 检测是复发性流产遗传学检测的首选方案^[6]。由于 FISH 检测探针位点有限,仅能对常见的染色体数目进行检测,不能对全

部 46 条染色体数目进行检测,也不能对微缺失/微重复、易位和倒位等异常进行检测^[7]。在本研究中, FISH 检测成功率为 100.0%,检出 79 例异常,异常检出率仅为 35.9%(79/220),远低于文献报道 60%~70% 的异常率^[1,8],推测是由于本研究的主要对象是复发性流产,对夫妻双方染色体平衡易位或新发突变导致的染色体结构异常病例未纳入其中,另外 FISH 检测探针的范围有限, FISH 检测阴性不能完全代表流产组织的细胞遗传学检测结果正常。此外, FISH 检测发现三倍体 13 例,结合病理科免疫组织化学的结果^[9],此 13 例葡萄胎均为部分性葡萄胎。当进行流产组织标本的病理学检测时,应当重视流产组织的细胞遗传学检测,以便更好地找到复发性流产的病因,为后续的治疗和再生育指导提供依据^[10]。

流产组织的细胞培养及染色体核型分析能够检测全部 46 条染色体的数目异常及大片段的结构异常,但对小于 6 Mb 的微缺失/微重复无法检测到^[11]。流产组织易污染,不易进行细胞培养,本研究中仅 28.2%(62/220)的流产组织可以进行细胞培养,培养成功率为 91.2%(57/62),染色体核型分析异常率为 43.7%(21/48),故细胞培养染色体核型分析并不适合流产组织的大规模检测。

FISH 检测和细胞培养染色体核型分析总计检测出染色体异常 84 例,异常率为 38.2%(84/220),其中异常率最高的是 22 三体综合征和 16 三体综合征,这是导致复发性流产最常见染色体异常,胎儿通常表现为胎儿宫内生长受限,先天性心脏缺损,导致胚胎难以成活,孕早期就会导致流产^[12]。本研究中染色体的单体综合征有 8 例,其中 X 染色体单体综合征 7 例, 14 号染色体单体综合征 1 例,因性染色体的异常胚胎具有较大的“耐受力”,常染色体的单体却难以成活,大多数在胚胎发育初期就发生流产^[12]。

本研究对 FISH 检测和细胞培养染色体核型分析结果阴性的其中 32 例标本进行全基因组拷贝数变异进行检测,流产组织的全基因组检测成功率为 90.6%(29/32),染色体异常率为 48.3%(14/29),其中检出 5 例 FISH 检测未覆盖到的染色体非整倍体改变, CMA 检出 3 例多条染色体大片段杂合性缺失,由于患者检测后失访,无法和临床表型相印证。并非检测出的所有染色体微缺失/微重复都与此次流产相关^[13]。本研究中 CNV-seq 检出的 2 例 19 号染色体重复, 1 例 17 号染色体重复及 CMA 检出的 1 例 5 号染色体重复,报告中给出相关片段与生长发育及神经发育相关,并不是流产的致病原因。

无论何种检测技术检出的遗传学变异都要与临床资料结合分析,才能找到科学的、证据充足的复发性流产的细胞遗传学病因。

4 结 论

除 FISH 检测和细胞培养染色体核型分析外,全基因组拷贝数变异检测在流产组织中的应用越来越多,检测分辨率大幅度提高,意味着全基因组拷贝数变异检测能发现更多与临床相关的染色体微重复/微缺失。因此,对于复发性流产的患者进行必要的遗传咨询,选择适宜、有效的细胞遗传学检测手段是明确其病因并给予再生育指导的关键。

参考文献

- [1] 马韵,郑梅玲. 不明原因复发性流产发病机制研究进展[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版),2016,12(2):237-240.
- [2] 李亚梅,王燕侠,毛宝宏,等. NGS 技术检测复发性流产组织染色体异常的临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2017(11):47-49.
- [3] 胡婷,刘洪倩,朱红梅,等. 多重定量荧光 PCR 在胎儿常见染色体非整倍体快速诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志,2014,31(2):214-218.
- [4] 李付贵,苏年华. 染色体 FISH 检测技术在早孕期自然流产诊断中的临床意义[J]. 中国当代医药,2016(18):15-18.
- [5] 刘青,李静,郝胜菊,等. 自然流产的相关遗传学因素研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,22(6):1-3.
- [6] 陈广新,沈菲,张成芳,等. 应用 FISH 技术对孕早期胚胎停育及自然流产的遗传学因素分析[J]. 黑龙江医学,2017,46(2):153-154.
- [7] 欧阳宁. 单核苷酸多态微阵列技术在检查流产绒毛与以往的流产绒毛染色体培养的比较研究[J]. 吉林医学,2014,53(32):7207.
- [8] 甘峰,刘华,程晓娥,等. 偶发与复发自然流产产物细胞遗传学异常发生率的临床研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,23(5):73-74.
- [9] 沈丹华,陈永峰,薛荣,等. P57 免疫组化结合 CEP17 倍体分析在葡萄胎鉴别诊断中的作用[J]. 中国妇幼保健研究,2016,12(11):1353-1356.
- [10] 万小云. 葡萄胎的研究进展[J]. 现代妇产科进展,2008,17(1):4-7.
- [11] 肖建平,杨岚,杨月芬,等. CNVplex 联合 STR 技术在复发性流产遗传学查因中的应用[J]. 重庆医学,2017,46(4):446-449.
- [12] 林桂先,叶海明. 稽留流产的遗传学研究现状[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,23(10):3-4.
- [13] 修霞,黄晓庆. 高通量基因测序技术在自然流产胚胎染色体检测中的应用:2017 年度《中国组织化学与细胞化学》杂志临床研究研讨会论文集(二)[C]. 武汉:武汉出版社,2017.