

Cytogenetic Analysis of 499 Cases of Chorionic Villus in Abortion

Yueting Zhu, Hongchang Li, Wenjie Jiang, Juanjuan Lu, Junhao Yan*

Department of Reproductive Genetics, Reproductive Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan Shandong
Email: yyy306@126.com

Received: Jul. 15th, 2018; accepted: Jul. 24th, 2018; published: Jul. 31st, 2018

Abstract

Objectives: To analyze the chromosome of chorionic villus in spontaneous abortion, and to explore the relationship between chromosomal abnormalities of villus cells and spontaneous abortion in early pregnancy. **Methods:** The villus tissues of 499 cases of spontaneous abortion in early pregnancy were collected, and karyotype analysis was performed by Array-CGH. **Results:** 499 cases of villus were successfully obtained array-CGH examination results, and the detection success rate was 100.0%. 251 cases of chromosomal abnormalities were detected by array-CGH, and the abnormal rate was 50.30% (251/499), including 211 cases (84.06%) of single chromosome number abnormality, 14 cases (5.58%) of two chromosomes, 1 case (0.40%) of triploid and 25 cases (9.96%) of deletion or repetition. **Conclusion:** Fetal chromosomal abnormality is an important cause of early spontaneous abortion. The array-CGH detection method is high resolution, accurate and rapid. It is a reliable method to diagnose the genetics of abortion and has high clinical value.

Keywords

Spontaneous Abortion in Early Pregnancy, Cytogenetics, Chromosomal Abnormality, Array-CGH

499例流产绒毛细胞遗传学分析及总结

朱月婷, 李鸿昌, 姜文杰, 鲁娟娟, 颜军昊*

山东大学附属生殖医院生殖遗传科, 山东 济南
Email: yyy306@126.com

收稿日期: 2018年7月15日; 录用日期: 2018年7月24日; 发布日期: 2018年7月31日

*通讯作者。

摘要

目的: 分析自然流产的绒毛染色体情况, 探讨绒毛细胞染色体异常与孕早期自然流产间的临床关系。**方法:** 收集499例妊娠早期自然流产患者的绒毛组织, 采用Array-CGH进行核型分析, 分析流产绒毛染色体异常情况。**结果:** 本组499例绒毛组织均成功获得Array-CGH检查结果, 检测成功率100.0%。Array-CGH检出染色体异常251例, 异常率50.30% (251/499), 包括单条染色体数目异常211例(84.06%), 两条染色体数目异常14例(5.58%), 三倍体1例(0.40%), 缺失或重复25例(9.96%)。**结论:** 胚胎染色体异常是早期自然流产的重要原因, Array-CGH检测方法分辨率高、准确快速, 是诊断流产组织遗传学的可靠方法, 具有较高的临床应用价值。

关键词

孕早期自然流产, 细胞遗传学, 染色体异常, Array-CGH

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近几年来, 孕妇流产不断呈现上升趋势, 流产不仅给患者造成精神上的痛苦, 也给家庭带来极大的不安定因素。自然流产的病因很多, 如染色体异常、TORCH感染、精子异常、激素水平不足等, 甚至精神压力过大、环境因素、母体的不良习惯都会造成流产[1][2], 其中由于胚胎基因或染色体异常引起的流产一般认为可占自然流产病例的50%以上[3]。绒毛细胞是胚胎外胚层细胞, 具有与胚胎组织一样的遗传性状, 是检测胎儿染色体异常的主要标本[4]。我们采用微阵列比较基因组杂交技术(array-based comparative genomic hybridization, array-CGH)对499例自然流产的绒毛染色体进行了分析及总结, 旨在探讨绒毛细胞染色体异常与孕早期自然流产间的临床关系, 现报告如下。

2. 资料与方法

2.1. 病例选择

选取2016年1月~2016年12月在山东大学附属生殖医院就诊诊断为妊娠早期自然流产的499例孕妇作为研究对象, 孕妇年龄22~45岁, 平均年龄(32.04 ± 4.97)岁, 孕周6~12w, 平均(9.65 ± 2.13)周, 不区分孕次胎次, 经B超检查证实为宫内妊娠, 可见孕囊但不能见心管搏动; 排除感染、有害物质接触史、停经时间 ≥ 13w、近期有性生活等因素。本课题研究提交山东大学附属生殖医院伦理委员会审核通过, 所有入组患者均签署知情同意书。

2.2. 方法

2.2.1. 自然流产组织的采集

采用手术治疗的孕妇, 通过负压吸引术收集绒毛组织, 组织经无菌生理盐水清洗后送检, 吸引时负压最高不超过500 mmHg, 术者均经过专业培训; 采用药物治疗的孕妇, 通过联合服用米非司酮及米索前列醇排出绒毛组织, 无菌生理盐水清洗后送检, 药物服用均经过医师指导, 口服米索前列醇后住院留

观, 标本采集由医护人员完成。两种治疗方式由患者自主选择, 医师完善相关辅助检查并排除相应禁忌后应用。

2.2.2. 标本处理

无菌条件下, 用无菌生理盐水反复冲洗绒毛组织, 去除红细胞及蜕膜组织; 然后吸净生理盐水, 置于解剖显微镜下挑取分芽多、末端粗钝、呈鹿角状的优质绒毛组织, 小心剪取 15~20 mg, 置于无菌盐水中, 待检。

2.2.3. Array-CGH 检测方法

1) 采用德国 QIAGEN 公司 QIAamp DNA mini Kit 提取绒毛组织 DNA; 2) 采用 Cy3/Cy5 标记 DNA, 37°C 孵育 16~20 h 后用 Autoseq G50 柱纯化; 3) 标记后的待检 DNA 与对照 DNA 等量混合、浓缩, 将标记好的 DNA 溶液点至盖玻片上, 再将芯片盖上, 置于杂交盒内, 47°C 孵育 16~21 h (按照 Array CGH Constitutional Focus 标准流程操作); 4) 芯片洗涤甩干后采用 InnoScan900 扫描仪扫描芯片, 保存图像; 5) 使用 BlueFuseMuti 对扫描图像进行分析, 得到标本的分子核型。

3. 结果

3.1. 染色体异常检出率

本组 499 例绒毛组织均成功获得 array-CGH 检查结果, 检测成功率 100.0%。array-CGH 检出染色体异常 251 例, 异常率 50.30% (251/499), 其中, 单条染色体数目异常 211 例(84.06%, 211/251), 两条染色体数目异常 14 例(5.58%, 14/251), 三倍体 1 例(0.40%, 1/251), 缺失或重复 25 例(单一位点缺失或重复 19 例, 两个位点缺失或重复 6 例), 占 9.96% (25/251), 具体分类见表 1。

3.2. 单条染色体非整倍体异常检出情况

211 例单条染色体数目异常病例共 179 例三体(其中包括 2 例嵌合体)分布于除 1 号与 12 号染色体外的其他染色体中, 其中以 16 号染色体和 22 号染色体三体最多, 分别为 52 例(24.64%)和 22 例(10.43%); 单体以性染色体单体最多, 为 23 例(包含 2 例嵌合单体), 还发现 3 例 21 号染色体单体、3 例 19 号染色体单体(包含 2 例嵌合单体), 分布见图 1。

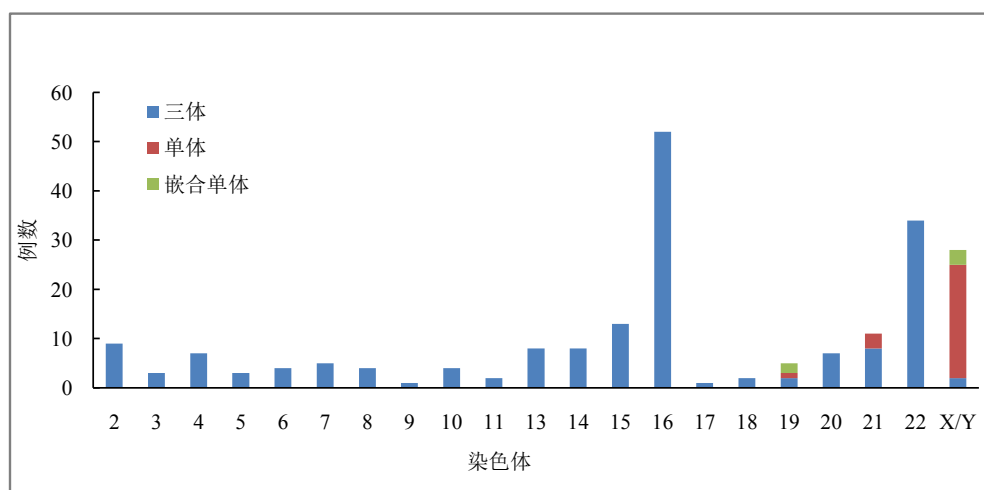


Figure 1. Abnormal distribution of aneuploid of single chromosome

图 1. 单条染色体非整倍体异常分布

Table 1. Classification of abnormal results detected by Array-CGH in 499 cases**表 1.** 499 例流产物绒毛 Array-CGH 检出异常结果分类

分类	异常核型分类	例数(n)	比例(%)
单条染色体非整倍体	47, XN, +2	9	3.59
	47, XN, +3	3	1.20
	47, XN, +4	7	2.79
	47, XN, +5	3	1.20
	47, XN, +6	4	1.59
	47, XN, +7	5	1.99
	47, XN, +8	4	1.59
	47, XN, +9	1	0.40
	47, XN, +10	4	1.59
	47, XN, +11	2	0.80
	47, XN, +13	8	3.19
	47, XN, +14	8	3.19
	47, XN, +15	13	5.18
	47, XN, +16	52	20.72
	47, XN, +17	1	0.40
	47, XN, +18	2	0.80
	47, XN, +19	5	1.99
	47, XN, +20	7	2.79
	47, XN, +21	11	4.38
	47, XN, +22	34	13.55
	47, XNN	28	11.16
两条染色体非整倍体	48, XN, +16, +7	1	0.40
	48, XN, +9, +21	1	0.40
	48, XN, +7, +10	1	0.40
	48, XO, +8	1	0.40
	48, XN, +13, +14	1	0.40
	48, XN, +4, +21	1	0.40
	48, XO, +22	1	0.40
	48, XN, +2, +8	1	0.40
	48, XN, +16, +22	1	0.40
	48, XO, +8	1	0.40
	48, XN, +11, +18	1	0.40
	48, XN, +9, +13	1	0.40
	48, XN, +15, +20	1	0.40
	48, XN, +3, +8	1	0.40
三倍体	69, XNN	1	0.40
单一位点缺失或重复		19	7.57
两个位点缺失或重复		6	2.39

3.3. 两条染色体非整倍体异常

本组发现两条染色体数目异常 14 例, 其中两条常染色体三体 11 例、8 号染色体三体并性染色体嵌合单体 1 例、8 号染色体嵌合三体并性染色体嵌合单体 1 例、22 号染色体三体并 Y 染色体缺失 1 例。

3.4. 单一位点缺失或重复染色体检出情况

19 例单一位点缺失或重复样本中, 14 例为缺失, 其中性染色体缺失 3 例, 4 号、18 号和 22 号各缺失 2 例, 1 号、2 号、5 号、9 号和 19 号各缺失 1 例; 5 例重复中, 5 号、6 号、15 号、16 号和 Y 染色体各有 1 例。

3.5. 两个位点缺失或重复染色体检出情况

6 例两个位点缺失或重复染色体样本中有 4 例表现为一条染色体重复、另一条染色体缺失; 1 例表现为两条染色体均重复; 1 例为 1 号染色体短臂缺失但长臂重复, 核型为-1 (p36.21-pter); +1 (q42.3-qter)。

4. 讨论

自然流产是妊娠期最普遍的并发症之一, 且多数为妊娠 12 周前的早期流产。自然流产发生的原因很多, 主要有遗传、免疫、内分泌、子宫病变、环境诱发等, 其中遗传因素是导致自然流产的最重要原因, 而在引起自然流产的遗传因素中, 胚胎染色体异常又是最常见的[5]。因此, 检测分析流产胚胎组织的染色体, 有助于明确流产的原因, 为再次妊娠的风险评估提供依据。

目前, 自然流产的遗传学诊断的“金标准”是常规绒毛培养染色体核型分析法, 但该技术有明显的局限性, 如细胞培养耗时长、标本取材要求高、培养失败率高、易污染、分析过程复杂、重复性差、对嵌合体的诊断不精确及无法检测染色体的微缺失等[6]。荧光原位杂交(FISH)技术是近年来以分子生物学为基础飞速发展起来的一项自动化新技术, 具有快速方便、无需细胞培养、敏感性高、特异性强等优势[7]。但绒毛染色体 FISH 检测所用试剂盒的探针不能涵盖所有的染色体, 只是针对样本中 13/16/18/21/22/X/Y 染色体数目异常, 因此对于这 7 条染色体之外的其它染色体数目异常及所有染色体结构异常不能检测[8]。array-CGH 技术是新近发展起来的一种高效分子核型分析技术, 其优势在于避开中期染色体, 直接在 DNA 水平上进行诊断及分析, 可得到高分辨率的全染色体基因拷贝数的分布[9]; 同时, 由于探针在基因组上的定位是已知的, 故 array-CGH 能直接将检测到的基因组拷贝数变异在基因组上定位, 从而精确的描述染色体畸形及定位[10]; 此外, 由于 array-CGH 不需要细胞培养, 检测周期明显缩短。本研究采用 array-CGH 技术对 499 例自然流产的绒毛染色体进行了分析及总结, 结果显示, 499 例绒毛组织均成功获得 array-CGH 检查结果, 检测成功率 100.0%; array-CGH 检出染色体异常 251 例, 异常率 50.30%, 包括单条染色体数目异常 211 例, 两条染色体数目异常 14 例, 三倍体 1 例, 缺失或重复 25 例。

综上所述, 胚胎染色体异常是早期自然流产的重要原因, 对流产组织进行染色体检测可为病因诊断及指导优生提供依据。array-CGH 检测方法分辨率高、准确快速, 是诊断流产组织遗传学的可靠方法, 具有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 胡秀侠, 申亚军, 王秀英, 等. 激活素 A 和抑制素 A 与复发性自然流产妊娠预后的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(27): 3933-3935.
- [2] Kumar, S. (2011) Occupational, Environmental and Lifestyle Factors Associated With Spontaneous Abortion. *Reproductive Sciences*, 18, 915-930. <https://doi.org/10.1177/1933719111413298>

- [3] Huang, Z., Tang, W., Liang, Z., *et al.* (2017) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Polymorphism Confers a Genetic Contribution to the Risk of Recurrent Spontaneous Abortion: An Updated Meta-Analysis. *Reproductive Sciences*, **24**, 1551-1560. <https://doi.org/10.1177/1933719117702013>
- [4] 钟福春, 涂向东, 兰风华. 自然流产胚胎绒毛非整倍体检测的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2015, 38(4): 231-236.
- [5] Rabiega-Gmyrek, D., Olejniczak, T., Niepsuj-Biniaå, J., *et al.* (2015) Chromosomal Aberrations—The Cause of Spontaneous Abortions. *Ginekologia Polska*, **86**, 357-361. <https://doi.org/10.17772/gp/2422>
- [6] Shaffer, L.G., Bejjani, B.A., Torchia, B., *et al.* (2010) The Identification of Microdeletion Syndromes and Other Chromosome Abnormalities: Cytogenetic Methods of the Past, New Technologies for the Future. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, **145C**, 335-345. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30152>
- [7] Zneimer, S.M. (2014) *Cytogenetic Abnormalities: Chromosomal, FISH, and Microarray-Based Clinical Reporting*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781118412602>
- [8] 付娟娟, 杨晨晨, 胡小萍. FISH 检测孕早期胚胎停育和自然流产绒毛染色体异常的应用研究[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(5): 612-614.
- [9] Cohen, K., Tzika, A., Wood, H., *et al.* (2015) Diagnosis of Fetal Submicroscopic Chromosomal Abnormalities in Failed Array CGH Samples: Copy Number by Sequencing as an Alternative to Microarrays for Invasive Fetal Testing. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, **45**, 394-401. <https://doi.org/10.1002/uog.14767>
- [10] 楚艳, 吴东, 侯巧芳, 等. 微阵列比较基因组杂交技术在自然流产遗传学分析中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(8): 592-596.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org