

流产患者绒毛组织检测技术研究进展

李龙花¹, 石升元¹, 李红梅^{2*}

¹延安大学医学院, 陕西 延安

²延安大学附属医院产科, 陕西 延安

收稿日期: 2023年2月14日; 录用日期: 2023年3月8日; 发布日期: 2023年3月15日

摘要

流产是一种常见的产科并发症, 指妊娠不足28周, 胎儿体重不足500 g而终止妊娠者。稽留流产(missed abortion)是其特殊情况的一种, 指胚胎或胎儿已死亡并滞留在子宫腔内, 未能及时自然排出者, 临床上根据孕周分为早期稽留流产和中期稽留流产, 早期稽留流产是指妊娠 ≤ 12 周。其不仅容易影响女性的心理健康与生活质量, 并且可能导致女性继发生育障碍。据报道, 流产的发生率为10%~15%, 其发生原因复杂多样, 其中染色体异常在早期流产中最为常见, 约占早期妊娠流产的50%, 其他因素如母体内分泌异常、生殖道畸形、易栓症、感染、免疫性疾病、或者母亲的年龄、生活方式、环境因素等均可引起流产。随着国家经济的不断发展和社会压力的增加, 自然妊娠及行辅助生殖助孕后不明原因稽留流产的人数越来越多, 人们对于染色体原因的需求越来越深, 但随着流产物绒毛组织检测技术的发展, 就其不同技术的适用范围的认识尚有不足。

关键词

稽留流产, 染色体异常

Research Progress of Villus Tissue Detection in Abortion Patients

Longhua Li¹, Shengyuan Shi¹, Hongmei Li^{2*}

¹Medical School of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

²Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

Received: Feb. 14th, 2023; accepted: Mar. 8th, 2023; published: Mar. 15th, 2023

Abstract

Abortion is a common obstetric complication, which refers to pregnancy less than 28 weeks, fetal

*通讯作者。

文章引用: 李龙花, 石升元, 李红梅. 流产患者绒毛组织检测技术研究进展[J]. 医学诊断, 2023, 13(1): 51-55.

DOI: 10.12677/md.2023.131010

weight is less than 500 g and termination of pregnancy. Missed abortion is one of the special cases, which refers to the embryos or fetuses that have died and remained in the uterine cavity without timely natural discharge. Clinically, missed abortion can be divided into early missed abortion and middle missed abortion according to gestational age, and early missed abortion refers to gestation ≤ 12 weeks. It is not only easy to affect women's mental health and quality of life, but also may lead to subsequent female fertility disorders. It is reported that the incidence of abortion is 10%~15%, the causes of which are complex and diverse, among which chromosome abnormality is the most common in early abortion, accounting for about 50% of early pregnancy abortion, other factors such as maternal endocrine abnormalities, reproductive tract abnormalities, thrombosis, infection, immune diseases, or the mother's age, lifestyle, environmental factors can cause abortion. With the continuous development of national economy and the increase of social pressure, the number of unexplained missed abortion after natural pregnancy and assisted reproduction is increasing, and people's demand for chromosomal causes is getting deeper and deeper. However, with the development of the technology of villus tissue detection of flow products, there is still insufficient understanding of the scope of application of different technologies.

Keywords

Missed Abortion, Chromosome Abnormality

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

多年来,随着检测技术方法的不断发展,从染色体核型分析到原位荧光杂交,芯片到测序技术的使用,使得对染色体识别精确率逐步提高,但不同技术均有其各自优缺点,本文就胚胎组织染色体的组成,染色体核型技术、染色体检测技术等遗传学因素的研究进展进行综述。

2. 人类细胞遗传学基础

正常人类体细胞含有 46 条染色体,按其形态结构两两配对形成 23 对同源染色体。第 1~22 对是男女相同的常染色体,第 23 对是性染色体,在女性体细胞中为 XX,在男性体细胞中为 XY。将细胞内的染色体按其形态、大小、着丝粒位置等特征按一定顺序排列起来所构成的图像即为核型。个体的核型可通过对其自身细胞的核型进行分析获得[1]。一旦细胞内的染色体发生了数目、形态、结构上的改变,与正常细胞相比产生了不同,称为染色体畸变。染色体畸变的类型较多,常见的有染色体数目畸变和染色体结构改变。

染色体数目畸变源自双亲之一方的配子形成时或妊娠初期受精卵卵裂时出现了某号染色体不分离[2],使得正常二倍体生物细胞内染色体数目的增减或染色体整个染色体组的增减,包括整倍体性的三倍体、四倍体,非整倍体性的单体型、三体型、多体型及结构或数目异常的嵌合型。

染色体结构畸变是由于某些因素导致细胞内染色体发生断裂,而错误的修复,可以造成断裂片段的位置改变、缺失、重复等异常,包括缺失、倒位、易位(相互易位、罗伯逊易位)、重复、环状染色体、插入、双着丝粒染色体及等臂染色体等。研究表明胚胎早期流产的最主要原因是数目异常,可能由于数目异常的胚胎遗传缺陷大、致死性高。并且在数目异常的病例中三倍体异常最常见,周娜[3]等的研究也证

实了这一点。

3. 胚胎染色体分析技术

绒毛膜是由滋养层和胚外中胚层构成的膜，在胚胎植入过程中，滋养层细胞迅速增生并分化为内层的细胞滋养层和外层的合体滋养层，分别执行分裂生长作用和内分泌功能，妊娠早期胚胎通过绒毛来进行物质交换，获取母体中血液的营养物质和排出代谢产物[4]。绒毛与胎儿一样都源自受精卵，因此在孕早期临床上可以通过绒毛采样来获得胎儿的遗传信息，从而利用这一技术进行遗传学检测。目前我国检测流产的绒毛染色体的方法主要是传统的细胞核型分析技术，这是染色体异常检测的金标准，被广泛用于流产及产前诊断的遗传学检测。

细胞核型分析技术需要进行染色体制备。针对流产绒毛组织样本，其染色体制备方法主要有细胞培养法和直接制备法。培养法又分为短期培养法、长期培养法和原位培养法。研究表明培养法获得的细胞分裂相多形态佳，且出现胎盘局限性嵌合体现象明显少于直接制备法[5]，但耗时较长，且临床流产组织样本在采集和送检过程易受污染，故细胞培养成功率较低。直接制备法简单快捷但获得的细胞分裂指数低、染色体形态欠佳，不利于核型分析及嵌合体的诊断。

随着分子生物学技术的飞速发展，新的分子遗传学技术使得能够在不需要绒毛组织培养的情况下进行检测，分子遗传学技术是指在分子水平上研究分子生物学变异与遗传的一种技术。目前，荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)、染色体微阵列分析(Chromosomal Microarray Analysis, CMA)、和二代测序等技术已广泛应用于临床[6] [7]。2005年以后二代测序技术应用范围由生物医学领域逐渐过渡到临床诊断，并进入到一个新阶段，其中最具代表性的为高通量测序技术(Next-generation sequencing, NGS)。该技术原理应用[7]是基于 PCR 扩增原理，利用高密度寡核苷酸探针芯片技术，互相隔离同步平行对 DNA 分子进行测序，可对结构变异、插入、缺失单个碱基改变、异常的染色体数目准确检出。该技术是一种精确度高、速度快、高通量的诊断方法，且操作简便，不需要进行细胞培养，避免了细胞培养过程中带来的母体细胞污染，同时能够通过母亲血液采集排除母源性污染因素的干扰，当前已经在检测流产组织中取得较理想效果。NGS 具有较高分辨率，对整个基因组具有全面的开放阅读能力，可以对大于 100 kb 片段微重复、微缺失进行准确诊断，同时可准确了解 CMA 技术与 FISH 技术测位点没有覆盖的染色体状况，以及目前公开的遗传数据库不能解释的染色体异常，对自然流产病因分析具有重要意义。此外，NGS 可以以比芯片技术更低的成本检测受污染和冷冻的标本[8] [9]。

荧光原位杂交技术(FISH)是用已知单链 DNA 序列作为探针，利用核酸分子互补配对的原则，将特异性探针结合到特定的基因序列上，再利用荧光报告基团在荧光显微镜下检测，即可观察和计数荧光原位杂交信号，从而分析靶点基因是否存在及位置、数量等信息。荧光原位杂交技术无需细胞培养，可以直接检测间期细胞核，需要少量标本即可检测，检测步骤简便，在 24~48 小时即可得到检测结果。应用不同的探针，一次可以检测多个位点，且具有高度的特异性，敏感性高，检测成功率高等特点[10]。FISH 技术除了以上优点，也存在一些不足，目前 FISH 技术用于流产组织的检测，只有 13, 16, 18, 21、X 和 Y 染色体这 7 种计数探针，因此无法检测 7 种染色体以外的染色体数目异常，也无法检测染色体结构异常，另外 FISH 检测试剂成本也较高，限制了该技术的大量应用[1]。

染色体微阵列分析技术(CMA) [11]是以微阵列为基础，将一定数量的探针固定于支持物上，与带荧光标记的 DNA 分子进行杂交，通过检测每个探针的杂交信号强度，对全基因组进行扫描，拷贝数变异小于 100 kb 的微缺失及重复都能被其检出，进而获得样品中核酸序列的分子数目和序列信息的高通量方法。因其高效、稳定、分辨率高的特征及其对被检测样本要求较低的优势，CMA 被广泛应用于自然流产组织染色体检测。

单核苷酸多态性微阵列(Single nucleotide polymorphism array, SNP-array)是目前国际领先的新一代基因芯片技术,是一种新型的染色体微阵列分析技术。应用 DNA 微阵列与检测的样本 DNA 进行杂交,随后洗脱芯片上未互补结合的片段,再对基因芯片进行激光共聚焦扫描,应用数据处理分析软件将不同的荧光信号强度转化成不同基因的丰度,推算出待测样品中各种基因的信息,分析全基因组的拷贝数变异(pathogenic copy number variations, pCNVs),谢晓蕊[12]利用此技术对 82 例稽留流产患者绒毛组织进行分析并与传统核型检测相比较,得出 SNP-array 基因芯片技术检测成功率明显高于细胞培养染色体核型分析,与既往研究结果相一致。由于部分的流产绒毛组织由于胚胎细胞活性差或停止发育时间较长,导致组织机化,使培养后细胞未贴壁或者细胞克隆生长不佳,未能收获到可供分析的染色体核型分裂象而导致检测失败,无法获得流产绒毛组织的遗传学诊断结果。而 SNP-array 技术则打破了这种局限,只需通过组织提取少量的 DNA,对于被污染或细胞活性差、组织机化、无法贴壁生长的流产组织也能进行检测,得到全基因组的拷贝数变异信息,是流产绒毛特别是培养失败的组织标本核型分析强有力的补充[12]。

拷贝数变异(Copy number variation, CNV)指人类基因组中广泛存在的缺失、插入、重复和复杂位点的变异,长度为 1 kb 以上,突变率远高于单核苷酸多态性(SNP) [13],低深度全基因组测序(CNV-seq)是基于二代测序技术对 DNA 样本进行低深度测序,测序结果与人类参考基因组进行比对,通过生物信息学分析以发现受检样本可能存在的染色体相关异常,获取准确的基因组变化信息[11]。在相对较低成本下得到高分辨率、高准确率的基因组异常信息,逐渐成为流产物遗传学诊断的常用技术[14]。CNVplex 是一种基于多重连接探针扩增技术(MLPA)原理基础上发展的高通量多重基因组拷贝数检测新技术,利用四色荧光标记的两组通用引物,可同时检测多达 240 个位点的基因组拷贝数异常[15]。

微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)通常被推荐用于产前诊断,但它不能检测诸如多倍体(如三倍体),对嵌合体的检出有困难,而多倍体和嵌合体在流产绒毛中并不少见。它与 FISH、多重连接探针扩增技术(MLPA)等技术一样均不能排除母体细胞污染的影响。QF-PCR 虽然可以检测到母体细胞污染,但其实验影响因素比普通 PCR 多,导致准确率下降,且需要制备高成本的荧光探针。因此,有研究者认为,在临床实践中,将经典细胞遗传学方法与分子遗传学方法相结合,才能够提供较为完整的遗传学检测结果。

4. 小结与展望

随着测序技术的不断发展,产前诊断技术从外周血游离 DNA 检测,到流产组织、羊水细胞测序的 CNV 检测,到应用母体外周血测序测胎儿序列的 CNV 检测、单基因病检测,到单细胞植入前遗传学筛查、诊断、肿瘤游离 DNA 检测等广泛运用,测序技术用于流产物分析既可分析导致流产的遗传物质的改变原因,又可积累新染色体疾病的发现,还可用于促进生殖领域的发展。测序技术用于胚胎植入前遗传学筛查(PGS)可有效提高成功率[16] [17]。综上所述,联合各种检测技术可以有效提高诊断成功率及染色体异常检出率,在早期流产妊娠物核型分析中具有显著优越性,可为流产夫妇进行遗传学病因分析,从而为再次妊娠提供指导,有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 冯琦. 994 例流产组织细胞遗传学分析[D]: [硕士学位论文]. 洛阳: 河南科技大学, 2020.
- [2] 袁思敏, 徐霞, 廖灿, 等. 335 例早期自然流产患者胚胎绒毛染色体分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2020, 31(9): 1190-1198.
- [3] 周娜, 樊进军, 董阳, 等. 染色体微阵列分析在自然流产、死胎病因诊断中的应用[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2021, 8(9): 78-80.
- [4] 朱旗. 孕早期胚胎停育绒毛组织病理学变化及 miRNA 在胎盘异常发育中的作用[D]: [博士学位论文]. 北京: 北

- 京协和医学院, 2018.
- [5] 李伟, 郝娜, 周京. 胚胎停育绒毛染色体培养与分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(10): 48-50.
- [6] Popescu-Hobeanu, G., Riza, A.L., Streață, I., *et al.* (2022) Cytogenetic Analysis of Sporadic First-Trimester Miscarriage Specimens Using Karyotyping and QF-PCR: A Retrospective Romanian Cohort Study. *Genes*, **13**, Article No. 2246. <https://doi.org/10.3390/genes13122246>
- [7] 陈诚星. 高通量测序技术在孕早期自然流产组织染色体异常检测中的应用[D]: [硕士学位论文]. 衡阳: 南华大学, 2021.
- [8] Zhang, X., Fan, J., Chen, Y., *et al.* (2021) Cytogenetic Analysis of the Products of Conception after Spontaneous Abortion in the First Trimester. *Cytogenetic and Genome Research*, **161**, 120-131. <https://doi.org/10.1159/000514088>
- [9] Ong, F.S., Lin, J.C., Das, K., Grosu, D.S. and Fan, J.B. (2013) Translational Utility of Next-Generation Sequencing. *Genomics*, **102**, 137-139. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.04.012>
- [10] Fauzdar, A., Chowdhry, M., Makroo, R. N., *et al.* (2013) Rapid-Prenatal Diagnosis Through Fluorescence *in Situ* Hybridization for Preventing Aneuploidy Related Birth Defects. *Indian Journal of Human Genetics*, **19**, 32-42. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.112881>
- [11] 沈晔, 尹婷婷, 袁文博, 钱芳波. 染色体微阵列分析和低深度高通量全基因组测序技术在流产遗传学诊断中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(3): 313-318.
- [12] 谢晓蕊. 单核苷酸多态性微阵列技术(SNP-array)在自然流产遗传学诊断中的应用[D]: [硕士学位论文]. 福州: 福建医科大学, 2018.
- [13] 陈新周, 王明珠, 何丹, 等. 微阵列比较基因组杂交技术与二代基因测序检测拷贝数变异的对比[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(6): 385-388.
- [14] 梅瑾, 王昊, 王敏, 何茶英. 二代测序技术在流产物染色体拷贝数改变检测中的应用[J]. 浙江医学, 2020, 42(2): 114-117.
- [15] 王皖骏, 朱湘玉, 朱瑞芳, 等. 早孕期自然流产绒毛组织的遗传学检测方法比较[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(12): 19-21.
- [16] 王林玉, 施文韬, 黄梦楠, 师娟子. 不同指征患者胚胎植入前非整倍体筛查的比较[J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(12): 1552-1556.
- [17] 谭跃球. 二代测序与 PGS [C]//浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江省医学会医学遗传学分会. 2015 年浙江省医学遗传学学术年会暨高通量基因测序产前筛查与诊断技术研讨会: 2015 年卷. 2015: 56-65.