

羊水细胞的荧光原位杂交用于胎儿染色体 非整倍体的产前诊断

黄 珈, 游泽山, 陈宝江, 罗艳敏, 朱沃棠
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】应用染色体特异性探针针对羊水间期细胞进行 FISH 分析。【方法】对 78 例有产前诊断指征的孕妇进行羊水间期细胞的 FISH 分析及细胞核型分析。【结果】71 例二倍体羊水样本, FISH 诊断与细胞培养核型分析相符; 染色体数目异常 7 例, FISH 诊断出其中 6 例。间期细胞 FISH 的杂交率与探针类型、靶细胞种类及孕周有关。孕晚期羊水样本、母血污染的样本和快速杂交的样本, 以及长时间放置的样本, FISH 分析结果与核型分析完全符合。针对特异探针而言, 染色体非整倍体的诊断准确率达 100%。【结论】应用染色体特异性探针针对羊水间期细胞进行 FISH 分析可用于胎儿染色体非整倍体的产前诊断, 该方法简便快速、结论可靠。

关键词: 荧光原位杂交; 羊水间期细胞; 染色体疾病; 产前诊断

中图分类号: R 715.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0579-05

Prenatal Diagnosis of Chromosome Aneuploidies Using Fluorescence in Situ Hybridization in Uncultured Amniocytes

HUANG Jia, YOU Ze-shan, CHEN Bao-jiang, LUO Yan-min, ZHU Wo-tang

(Department of Obstetric and Gynecology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To make prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by FISH analysis of chromosome-specific probes in interphase amniocytes. 【Methods】 A total of 78 patients with indications were performed amniocentesis or cordocentesis with karyotyping. Simultaneously, interphase FISH with X, Y, 18, 21 chromosome-specific probes was done on them. 【Results】 Our FISH results showed 6 out of 7 abnormal aneuploid cases. 71 cases showed normal karyotype, which were consistent with FISH results. Hybridization efficiency of interphase FISH was associated with the type of probes, target cells, and gestational age. Informative FISH results on the trimester samples, the bloody samples, and the stored samples were recorded. The accurate results with ultra-rapid FISH using CEP X/Y and CEP18 were recorded. Compared to G-banding analysis, the accuracy of FISH with specific probes was 100% in this study. 【Conclusion】 FISH analysis of chromosome-specific probes on interphase amniocytes can be used in the prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies. This method is rapid, easy to perform, and credible.

Key words: fluorescence in situ hybridization; interphase amniocyte; chromosome disease; prenatal diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):579-583]

“将胎儿视为病人”是当今世界医学潮流之一^[1]。目前国外胎儿染色体核型的检查,首选中期的羊膜腔穿刺羊水细胞培养。但该诊断的取材时间受限,培养耗时长(6~10 d),效率低,技术较难掌握。近年来建立的荧光原位杂交 (fluorescent in

situ hybridization, FISH)技术,将分子生物学和细胞遗传学技术相结合,将其应用于未培养的羊水间期细胞,大大地提高了诊断效率,缩短了诊断时间,可应用于染色体综合症的筛查。

收稿日期: 2006-04-11

基金项目: 广东省计划生育委员会基金资助项目(200105)

作者简介: 黄 珈(1979-)女, 广东江门人, 硕士, 医师. E-mail: plantegg@21cn.com

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象来源于 2003 年 8 月至 2004 年 4 月在中山大学附属第一医院妇产科就诊的孕妇共 78 例。产前诊断指征: 高龄孕妇、血清学筛查异常、Down s 高风险、胎儿畸形、不良孕产史。在抽脐带血染色体分析的同时抽 3-5 mL 左右羊水行荧光原位杂交。

1.2 研究方法

1.2.1 羊水细胞 FISH 选用美国 Vysis 公司的染色体计数探针 (chromosome enumeration probe, CEP) 和区位特异识别探针 (Locus specific identifier probe, LSI): CEPX/Y 双色探针, CEP18 探针, LSI21 探针。羊水细胞的处理: 标本离心 低速固定 硅化玻片滴片 风干 消化(0.05 g/L 胃蛋白酶消化 13 min) PBS 漂洗 梯度脱水。羊水细胞的 FISH: 羊水玻片 变性(700 mL/L 甲酰胺在 73 °C 变性 5 min) 梯度脱水 加入已变性的探针杂交(37 °C 孵育 12-16 h) 洗脱非特异性杂交 暗处风干 复染 看片(Leica DMLB 荧光显微镜下分别用罗丹明、异硫氰酸荧光素滤光片观察结果)。

1.2.2 结果观察 荧光显微镜下观察^[2], 每个杂交区至少数 50 个信号强、无重叠的杂交细胞。CEPX/Y 探针区域: 当细胞同时出现一红、一绿两个信号, 记为 XY; 出现两个绿色信号, 记为 XX。CEP18 探针区域: 出现两个绿色信号, 记为 18 二倍体。LSI21 探针区域: 出现两个红色信号, 记为 21 二倍体。

1.2.3 计算杂交率 镜下统计出现杂交信号的细

胞的比率。而某种核型在杂交核里的出现的比率则定义为显示率。镜下观察若 >60% 的核显示非整倍体信号则该样本判断为非整倍体。若 10%~60% 的核显示非整倍体信号则有可能为嵌合体。所有病例均在盲法设计下, 与染色体核型分析结果比较。

1.3 统计学处理

数据处理用 SPSS 10.0 软件包。计数资料用 t 检验, 计量资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 染色体核型分析结果

78 例染色体核型中有异常者 9 例, 其中数目异常有 7 例, 结构异常有 2 例。此外, 染色体常态变异有 4 例。见表 1 (前 9 例为染色体核型异常, 后 4 例为染色体常态变异)。核型分析见图 1 (由胎儿医学中心提供)。

表 1 核型分析结果

Table 1 Results of karyotype analysis

Karyotype	n
47xy, +18	2
47xx, +18	1
47xy, +21	1
47xx, +21	1
47xyy	1
46xy, +13 der(13; 14)(q10; q10)	1
46xx, inv(9)(p13q13)	2
46xx, 1qh+	1
46xx, 16qh+	1
46xyqh+	1
46xy, 21pstk+	1

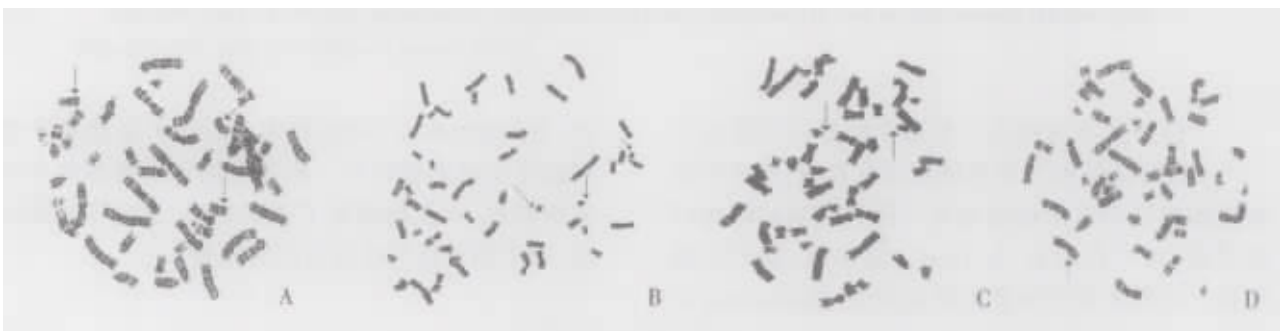


图 1 核型分析结果

Fig.1 Results of karyotype analysis

(A) 47xy, +18 from fetal lymphocyte; (B) 47xx, +21 from amniocyte; (C) 47xyy from fetal lymphocyte; (D) 46xy, +13 der(13; 14)(q10; q10) from fetal lymphocyte

2.2 FISH 结果

2.2.1 羊水样本杂交率 78 例羊水标本量 3-8 mL (3.7 ± 0.8) mL。FISH 结果均在 24 h 内可完成。每例样本均用 CEP X/Y、LSI 21、CEP 18 三种探针杂交, 总的平均杂交率为 83.6% ± 8.0%。CEP X/Y 的平均杂交率 88.9% ± 6.1%。LSI 21 的平均杂交率 76.5% ± 5.9%。CEP 18 的平均杂交率 85.3% ± 6.3%。CEP 探针比 LSI 探针杂交率高, 差异有统计学意义 ($F=117.03, P<0.01$)。78 例羊水平均孕周 (25.4 ± 4.9) 周, 其中 <24 周有 32 例, 占 41.0%; 24 周有 37 例, 占 47.4%; 32 周有 9 例, 占 11.5%。24 周前的平均杂交率 86.7% ± 6.6%, 24 周后的杂交率 83.6% ± 6.8%, 32 周后的杂交率 72.4% ± 7.1%。随孕周增大, 杂交率呈下降趋势, SNK 法分析, 差异有统计学意义 ($F=117.03, P<0.01$)。

2.2.2 非整倍体核型 7 例非整倍体, FISH 诊断出其中 6 例, 另 1 例罗伯逊易位型 13 三体因没有 13 号染色体探针而未能诊断。见表 2。FISH 荧光信号见图 2。

表 2 FISH 诊断结果
Table 2 FISH diagnosis results

Aneuploidies		FISH results
Karyotype	n	
47xy, +18	2	47xy, +18
47xx, +18	1	47xx, +18
47xy, +21	1	47xy, +21
47xx, +21	1	47xx, +21
47xyy	1	47xyy
46xy, +13der(13; 14)(q10; q10)	1	46xy



图 2 FISH 荧光信号

Fig.2 FISH signal

(A) Trisomy 21 of interphase amniocyte; (B) Trisomy 18 of interphase amniocyte; (C) XYY of interphase amniocyte

2.2.3 母血污染的羊水标本 78 例羊水中 10 例肉眼有母血污染, 占 12.8%。均能成功进行 FISH 分析。其中 6 例男性, 4 例女性。FISH 结果与细胞培养核型分析一致。

2.2.4 超快速 FISH 我们选择 3 例 18 三体、1 例 XYY、6 例正常二倍体的羊水样本 (3 例男性, 3 例女性, 这 6 例是随机抽取的), 用 CEP 探针进行超快速 FISH, 杂交孵育时间缩短为 30 min (杂交温度仍为 37 ℃)。CEPX/Y 探针的平均杂交率 87.8% ± 4.8%; CEP18 探针的平均杂交率 81.5% ± 3.3%。与杂交过夜标本的杂交率相比, 差异无统计学意义 ($t_{xy}=1.285, P>0.05; t_{18}=2.143, P>0.05$)。

2.2.5 留置羊水标本的 FISH 随机选取 12 例样本均另留置 2.5 mL 羊水, 置 4 ℃ 冰箱保存 2 周, 外观羊水澄清淡黄色。每例样本均以 X/Y、21 号探针进行同样方法杂交。X/Y 双色探针平均杂交率为 83.6% ± 7.3%, 21 号探针平均杂交率为 71.5% ± 6.7%。配对检验分析, 留置羊水样本与新鲜羊水样本在杂交率上无统计学差异 ($t_{xy}=1.32, P_{xy}>0.05; t_{21}=0.48, P_{21}>0.05$)。两者杂交信号显示的核型结果完全一致。

2.3 FISH 诊断效能

78 例胎儿中, 7 例染色体非整倍体畸变, 其中 6 例染色体数目异常, FISH 均能准确诊断。余下的二倍体 71 例, FISH 均诊断为正常, 无一例假阳性。FISH 敏感性 85.7% (6/7), 特异性 100% (71/71), 阳性预测值 100%, 阴性预测值 98.6%, 准确率 98.72%。针对所用的 X, Y, 18, 21 探针来说, 敏感性、特异性、准确率均达 100%。

表 3 FISH 诊断效能
Table 3 FISH diagnostic efficiency

FISH	+	-	Total
+	6	0	6
-	1	71	72
Total	7	71	78

3 讨 论

3.1 羊水间期 FISH 用于胎儿染色体疾病诊断的技术优势

在染色体病导致出生缺陷的患儿中, 80% ~ 95% 是由于 13 号、18 号、21 号、X 与 Y 染色体的非整倍体造成的^[3]。FISH 技术优点是应用特异性染色体探针在间期细胞快速检出非整倍体, 整个实验过程在 24 h 内即可完成, 适应临床对快速诊

断的需要。运用 X/Y、18 号探针进行更快速的诊断, 加入 CEP 探针后杂交 30 min, 获得与常规 FISH 同样的杂交效果。对于那些常规筛查结果阳性而很焦虑的孕妇, FISH 结果阴性会立即缓解她们的顾虑^[4-6]。

3.2 FISH 的有效性、准确性

本组实验 FISH 技术的诊断效能显示: 针对特定染色体数目异常, 敏感性和特异性均达 100%, 显示我们建立的 FISH 方法运用于临床胎儿 X、Y、13、18、21 染色体非整倍体异常的诊断, 有很大的应用前景。对 FISH 的一个多中心回顾分析, 随着探针技术不断发展, FISH 假阳性率为 0.003%, 而针对 13、18、21、X、Y 这五个染色体的实验假阴性率为 0.024%^[7]。

3.3 应用羊水间期细胞 FISH 的新体会

本研究中, 32 周后的羊水间期核杂交率明显低于前两组 ($P < 0.05$)。有学者^[8,9]认为孕周大的羊水含有较多退化衰老的上皮细胞、胞浆丰厚, 使杂交率下降、信号显示欠佳。我们认为, 尽管 32 周后的杂交率下降, 但不影响 FISH 结果判断。要把握以下几个环节: 处理羊水样本时, 多次换固定液以去除杂质; 滴片时要保证细胞悬液浓度, 使获得足够杂交细胞; 越到妊娠晚期, 羊水细胞核越固缩、胞浆也越厚, 适当延长胃蛋白酶消化时间有利于改善通透性, 但不宜超过 25 min; 变性、杂交的操作须严格把握, 变性液浓度、pH 值要准确, 变性温度不宜过高, 时间不能过久, 以 73、5 min 为宜。

一般 24~28 孕周后的羊水细胞培养很难成功, 此时必须行脐穿, 但脐带穿刺并发症多, 所以孕晚期未培养羊水 FISH 为产前诊断提供另外一个安全的方法, 突破传统技术取材时间的限制。本实验中有 9 例 >32 周, FISH 结果与脐血核型分析结果符合, 说明孕晚期羊水间期 FISH 的可行性 (国内尚未有类似报道)。当妊娠大于 32 周时, 在紧急情况下, 对决定分娩方式有指导价值。对于一些 FGR、前置胎盘、羊水过多、重度妊高征或妊娠期糖尿病的孕妇, 在决定剖宫产分娩前, 行羊水穿刺判断胎儿肺成熟的同时, 留 3~5 mL 羊水行 FISH, 排除 13、18、21、X、Y 染色体非整倍体畸形, 避免不必要的剖宫产。本实验 78 例羊水中 10 例肉眼有母血污染, 这么高的污染率可能与我们同时进行脐带穿刺有关。对于这些样本, 显微镜下胎

儿上皮细胞与母血细胞很容易辨别, 只要选择计数上皮细胞中的杂交信号, 就能正确进行 FISH 分析。

张锡然等^[10]报道, 羊水细胞存放时间久, 杂交率降低会影响结果。我们将同一标本在 4℃ 冰箱保存 2 周, 经处理后也能得到好的杂交率, 说明与标本的新鲜程度无关。我们还对 5 例存放 1 个月的样本进行 FISH 分析, 均得到满意的杂交效果。由于样本保存要求条件不高, 可存放时间长, 使暂无条件的基层医院可以将穿刺得的羊水转送上级医院行 FISH 检查, 有利于产前诊断中心收集羊水标本集中 FISH 检查。或者万一羊水培养失败, 而孕妇拒绝再次穿刺, 可用留置的羊水行 FISH 检查作为补救。

随着分子生物学技术和探针技术的发展^[11], FISH 用于分裂中期细胞能识别未知标记的染色体、辨别复杂的染色体结构重组, 提高了羊水细胞产前诊断的准确率, 具有高度敏感性和可靠性, 有助于对常规染色体检查发现疑问的病例作出进一步的诊断。

参考文献:

- [1] ORLANDI F, DAMIANI G, JAKIL C, et al. The risks of early cordocentesis (12-21 weeks): analysis of 500 procedures[J]. *Prenat Diagn*, 1990, 10(7): 425-428.
- [2] WATSON M S, BUCHANAN P D, COHEN M M, et al. Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations[J]. *Genet Med*, 2000, 2(6): 356-361.
- [3] LEBO R V, FLANDERMEYER RR, DIUKMAN R, et al. Prenatal diagnosis with repetitive in situ hybridization probes[J]. *Am J Med Genet*, 1992, 43(5): 848-854.
- [4] EIBEN B, TRAWICKI W, HAMMANS W, et al. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis[J]. *Prenat Diagn*, 1998, 18(9): 901-906.
- [5] CHEONG LEUNG W, CHITAYAT D, SEAWARD G, et al. Role of amniotic fluid interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in patient management[J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(4): 327-332.
- [6] LIU J, ZHENG X Z, BARAMKI TA, et al. Ultrarapid detection of sex chromosomes with the use of

- fluorescence in situ hybridization with direct label DNA probes in single human blastomeres, spermatozoa, amniocytes, and lymphocytes[J]. *Fertil Steril*, 1998, 70(5): 927- 932.
- [7] TEPPERBERG J, PETTENATI M J, RAO P N, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2- year multi- center retrospective study and review of the literature [J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(4): 293- 301.
- [8] D ALTON M E, MALONE F D, CHELMOW D, et al. Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1997, 176(4): 769- 776.
- [9] WEREMOWICZ S, SANDSTROM D J, MORTON C C, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases[J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(4): 262- 269.
- [10] 张锡然,潘淑娟,张坚宣,等. 应用间期荧光原位杂交技术进行快速产前诊断 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 1998, 6(3) :35- 37.
- [11] LEV D, DANIELY M, ZUDIK A, et al. Automatic scanning of interphase FISH for prenatal diagnosis in uncultured amniocytes[J]. *Genet Test*, 2005, 9(1):41- 47.

(编辑 张恩健)

(上接第 578 页 from page 578)

- Comparison of nasal immunohistology in patients with seasona rhinoconjunctivitis treated with topical steroids or specific allergen immunotherapy [J]. *Allergy*, 2005, 60(5):643- 649.
- [2] BACHERT C, VAN- CAUWENBERGE P. The WHO ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) initiative [J]. *Chem Immunol Allergy*,2003, 82:119- 126.
- [3] 中华医学耳鼻喉科学分会, 中华耳鼻喉科杂志编辑委员会. 变应性鼻炎诊治原则和推荐方案(2004 年, 兰州)[J]. *中华耳鼻喉科杂志*,2005,40(3):166- 167.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会. 支气管哮喘防治指南 [J]. *中华结核和呼吸杂志*,1997,20(5):261- 267.
- [5] 吴 浩, 李建国, 喻永鸿, 等. 变应性鼻炎患者血清 IgE 的检测及临床意义[J]. *中山大学学报: 医学科学版*,2004,25 (1) :176- 177.
- [6] JUTEL M, AKDIS M, BUDAK F, et al. IL- 10 and TGF- beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(5):1205- 1214.
- [7] FERREIRA M B, SANTOS A S, SANTOS MC,et al. Nasal ECP patterns and specific immunotherapy in mite- allergic rhinitis patients[J]. *Allerg Immunol (Paris)*, 2005, 37(3):96- 102.
- [8] SELNES A, DOTTERUD L K. No association between serum eosinophil cationic protein and atopic dermatitis or allergic rhinitis in an unselected population of children[J]. *J Eur Acad Dermatol Venerol*, 2005,19(1): 61- 65.
- [9] HALKEN S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2004,15 Suppl 16:4- 5, 9- 32.
- [10] PFAAR O, HORMANN K, KLIMEK L. The value and possibilities of immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis[J]. *MMW Fortschr Med*, 2006, 148(5): 28- 32.
- [11] MAROGNA M, SPADOLINI I, MASSOLO A, et al. Rhinitis and asthma co- morbidity in respiratory allergy due to house dust mite: results of an observational open controlled parallel group study in real- life setting [J]. *Allerg Immunol (Paris)*, 2005, 37(4):135- 142.

(编辑 刘清海)