

## 自然流产绒毛染色体非整倍体探讨

段程颖,王 玮\*,陈 瑛,孙 健,刘敏娟,丁 杨,李 红

(南京医科大学附属苏州市立医院生殖与遗传中心,江苏 苏州 215002)

**[摘要]** 目的:探讨自然流产绒毛染色体中非整倍体对流产的影响。方法:对 100 例自然流产绒毛用常规染色体核型分析联合多重连接依赖的探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification,MLPA)分析。结果:核型分析成功 84 例,异常核型 48 例,其中非整倍体 34 例;16 例无核型的绒毛用 MLPA 分析,异常 8 例,非整倍体 4 例;非整倍体占异常核型的 67.9%。结论:染色体发生非整倍体突变是胚胎早期自然流产的重要原因;常规染色体核型分析还是诊断非整倍体的主要方法,应用 MLPA 方法能对染色体核型分析失败和核型正常的标本作进一步检测。

**[关键词]** 自然流产;绒毛;非整倍体;多重连接依赖的探针扩增

**[中图分类号]** R714.21

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2012)06-855-04

散发性的早期胚胎丢失占临床妊娠的 10%~20%。怀孕头 3 个月流产约 50%是由于胎儿-胎盘染色体异常导致的。大部分是染色体数目异常,只有小于 10%是因为结构异常或者其他的异常机制。但是数目异常总的再发风险是比较低的,上次怀孕胚胎染色体是非整倍体孕妇再生三体婴儿的风险是 1%~2%<sup>[1]</sup>。就自然流产来说,早期停育的胚胎进行染色体检测对再次生育具有一定的指导意义。本研究对 100 例自然流产绒毛用常规染色体核型分析联合多重连接依赖的探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification,MLPA)分析,以探讨自然流产绒毛染色体中非整倍体对流产的影响。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

选择 2010 年 1 月~2011 年 4 月因胚胎停止发育行手术清宫的孕妇 100 例,年龄 21~40 岁,平均 31 岁。孕龄为 5~15 周。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 绒毛细胞培养法

无菌采取刮宫术或清宫术标本放入无菌杯中,用无菌生理盐水洗涤后,于解剖显微镜下挑取优质绒毛组织,并用手术刀片切成细小碎片,接种于羊水培养基的培养瓶中,置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。静置 6~7 d 后,取出在倒置显微镜下观察,见到梭形

细胞克隆后给予换液;继续培养 2~3 d,当出现较多圆形细胞时给予收获。

##### 1.2.2 染色体制备与核型分析

直接把秋水仙素(10 μg/ml)加入培养瓶中继续培养 4 h,然后培养液倒掉,加入低渗液进行低渗处理 20 min,再进行预固定、固定,把细胞刮下制成悬液,滴片,80℃老化 2 h。常规 G 显带、姬姆萨染色。镜下计数 20 个核型,分析 5 个显带良好分裂相,嵌合体则增加中期相计数。

##### 1.2.3 绒毛 DNA 的提取

挑取流产绒毛约 15 mg,采用德国 Qiagen 试剂盒提取 DNA。用 ND-1000 测定 DNA 浓度和  $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$  比值,并将 DNA 稀释至 25 ng/μl。

##### 1.2.4 MLPA 反应

依照 MLPA 试剂盒(荷兰 MRC-Holland 公司生产的 SALSA P290-B1)的操作说明,取 5 μl 浓度为 25 ng/μl 的 DNA 于 98℃ 预变性 15 min,25℃ 条件下加入 1.5 μl P290 探针混合液和 1.5 μl 的 MLPA 缓冲液,95℃ 变性 5 min 后于 60℃ 下杂交 16 h,再加入连接混合液 32 μl,54℃ 连接 15 min 后 98℃ 5 min 使连接酶失活。冷却后每 10 μl 连接产物加入 30 μl 的 PCR 混合液 1,60℃ 反应 5 min 后快速加入 10 μl PCR 混合液 2,PCR 反应条件为 95℃ 变性 5 min,95℃ 30 s,60℃ 退火 30 s 及 72℃ 延伸 1 min 共 30 个循环,最后 72℃ 20 min,4℃ 保存。

##### 1.2.5 MLPA 产物分析

1 μl MLPA 的 PCR 产物与 9 μl HiDi 及 0.2 μl liz500 混合均匀,95℃ 变性 6 min 后立即置冰上冷

**[基金项目]** 苏州市科技发展计划项目(SS08019)

\*通讯作者,E-mail:ww126626@163.com

却,用 ABI3130 基因分析仪 (美国 ABI 公司)进行毛细管电泳,用 Genemarker 软件分析 MLPA 产物的毛细管电泳结果。

## 2 结果

### 2.1 自然流产标本染色体异常情况

100 例自然流产绒毛中 84 例流产绒毛有核型分析结果,异常染色体 48 例 (表 1),其中三体占 48%(23/48),三体中最常见的是 16 号三体(图 1)。

### 2.2 MLPA 检测结果

16 例无核型结果的绒毛标本,用 MLPA 检测出 8 例异常,其中 4 例非整倍体,1 例 21 号三体,1 例 22 号三体(图 2),2 例特纳综合征。

表 1 异常核型类型及例数

异常核型类型	例数
16 号三体	6
2 号三体	3
4 号三体	2
22 号三体	2
双三体	2
其他三体	8
特纳	7
四倍体	3
三倍体	1
嵌合体(三体嵌合)	10(4)
易位	3
其他	1
总计	48

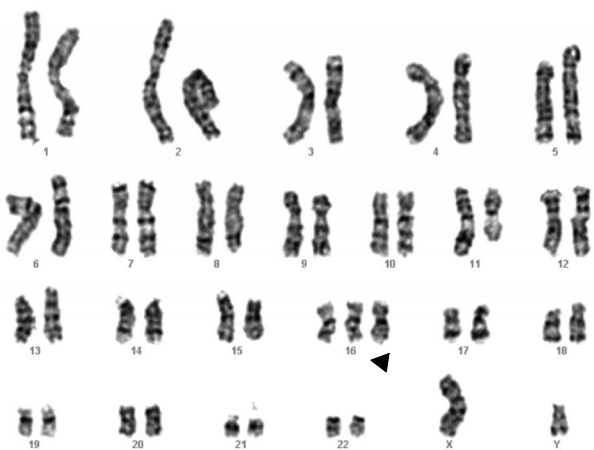
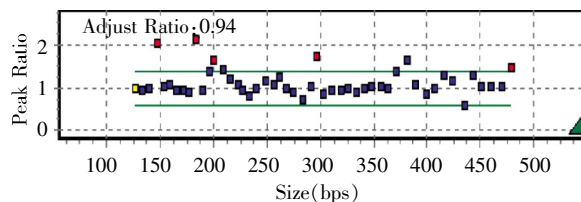


图 1 染色体核型分析为 47,XY,+16

### 2.3 流产绒毛非整倍体情况

非整倍体检出 38 例 (核型分析 34 例,MLPA 4 例),占异常染色体标本的 67.9%。其中单三体最多见有 23 例,双三体 2 例,三体嵌合和 X 单体分别为 7 例和 9 例(表 2)。



22 号染色体探针信号增加,提示 22-三体。

图 2 染色体 MLPA 分析为 47,XX,+22

表 2 非整倍体类型及临床情况

异常类型	例数	平均年龄(岁)	平均孕周(周)
三体	23	30.4 ± 3.6	9.7 ± 1.6
双三体	2	41.0 ± 1.4	9.1 ± 1.7
三体嵌合	7	29.1 ± 2.7	9.4 ± 1.8
X 单体	9	28.0 ± 3.6	12.3 ± 1.9

## 3 讨论

如果体细胞中的染色体不是整倍体,而是比二倍体少 1 条(2n-1)或多 1 条(2n+1)甚至多条、少几条染色体,这样的细胞或个体即称非整倍体。染色体非整倍体是引起新生儿先天性发育缺陷的重要原因,也是造成胚胎移植失败、流产和妊娠失败的主要原因之一<sup>[2]</sup>。

染色体数目少于二倍体数,称亚二倍体。缺失 1 条的那对染色体将构成单体,最常见的是 45,X,本研究检测到的有 9 例。因为单体个体的细胞中缺少 1 条染色体造成基因组严重失衡,所以常染色体单体中,即使是最小的 21、22 号染色体单体病例也难以成活。45,X 核型的特纳综合征病例虽有少数可以存活,但绝大多数在胚胎期流产。相比其他非整倍体异常,其妊娠周数较大,本组检测到的均大于 10 周才发生流产。

染色体数目多于二倍体数,即 1 对同源染色体不是 2 条,而是 3 条、4 条,称超二倍体。多出的 1 条染色体便构成三体。三体是最常见的非整倍体类型且三体的类型也很多,常染色体病中,除 17 号尚未有三体型的病例核型报道外,其余的常染色体均存在三体,而且少数可以存活至出生。但绝大多数三体核型只见于早期流产的胚胎或自然流产的胎儿。引起自发流产最多的是 16 号三体,其次是 21 号三体和 22 号三体<sup>[3]</sup>。本研究结果 16 号三体最多 6 例,其次是 22 号和 2 号。相比其他胎儿不能存活三体型,新生儿中最常见的是 21 号三体和性染色体三体型。性染色体三体型比常染色体三体型有较大的“耐受性”。例如 47,XXX 综合征的女性,可以有正常的表型,但有的也会表现出一定效应,如月经

失调或闭经。在性染色三体型的男性患者中,增加的性染色体对其影响较大,可能严重影响睾丸的发育,引起性征、体征和性格的改变。

对于近年来研究热点双三体,本组也检测到 2 例,占自然流产的 2%(2/100),与文献报道双三体现在自然流产中的比例(0.2%~2.8%)基本一致<sup>[4]</sup>。核型异常导致自然流产的孕周一般在 4~24 周,双三体的平均怀孕周数是(8.7 ± 2.2)周<sup>[5]</sup>,本组测到的双三体的平均孕周为(9.1 ± 1.7)周,也与报道基本相同,但本组的例数较少,且双三体孕妇流产的孕周小于单三体孕妇流产的孕周。母亲的年龄是最重要的风险因素,发生在卵子的减数分裂导致了多个非整倍体的发生。大多数报道双三体的母亲年龄是(34.1 ± 5.7)岁,甚至有报道达(39.7 ± 3.4)岁<sup>[6]</sup>。

异常染色体占不孕卵子的 20%,而只占精子的 2%~5%<sup>[7]</sup>。尽管形成单一三体的原因主要是母亲第一次减数分裂(meiosis I, M I)时期染色体不分离,但是大多数三体几乎包括了任何一个 D 和 G 组染色体(13~15, 21 和 22),还有 16 号染色体也是在 M I 期出错的<sup>[8]</sup>。18 号三体大多数是发生在第二次减数分裂(meiosis II, M II)时期。只有 5%~15%的三体(15, 18, 21)是有丝分裂起源的<sup>[9]</sup>。完全的减数分裂起源的 8 号三体只在早期的自发流产中发现,一般不能够继续妊娠。相比之下,有丝分裂起源的 8 号三体有活产的报道。父系的减数分裂起源相对较少。不到 10%的减数分裂错误包含在 D 和 G 组染色体。并且,父系起源的 16 号三体还未见报道,仅有很少见的 18 号三体报道<sup>[10]</sup>。不同的染色体不分离可以出现在不同的细胞分裂期。除了母亲的年龄和减数分裂重组,近年来有学者推测性腺的嵌合可能也是发生非整倍体的原因之一<sup>[11]</sup>。

发生在第一次减数分裂时期的两种不分离模式已经被证实。卵子第二次减数分裂时引起的不平衡分离可能有两种:①整条染色体不分离,两条同源染色体未分别向两极移动,却同时进入 1 个子细胞中,结果细胞所形成的子细胞染色体数目 1 个是超二倍体,1 个是亚二倍体;②姐妹染色单体的过早分离,姐妹染色单体在连接处 M I 期异常丢失,这样在卵子中形成增加 1 条单体或减少 1 条单体。另外,很多研究报道在卵子的 M II 期发现来自二价染色体的被分离的姐妹染色单体。这两种机制被大多数学者认为可以引起人类卵子非整倍体的发生<sup>[12]</sup>。

流产的胚胎进行细胞遗传学研究时细胞培养失败率较高,可能因为污染或者是绒毛碎片生长不

良,并且如果混入母体细胞,导致正常的男性核型出现误差。分子技术的主要优点在于,DNA 很容易从怀孕产物中提取出来,而不一定要用活细胞。比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)已经被证实可以检测数值染色体不平衡甚至是经过石蜡包埋的流产组织<sup>[13]</sup>,它可以分辨 10~100 kb 大小片段<sup>[14]</sup>。QF-PCR 可以确认胎儿的组织来源,也可以测定非整倍体发生在细胞的哪个间段,通过对比对父母和胎儿 DNASTR 标记物来研究染色体的遗传特性<sup>[15]</sup>。Array-CGH 可以揭示经典细胞遗传学不常见的染色体异常,包括双三体和常染色体单体。关于 MLPA 技术,它已经被证实在产前诊断的羊水和绒毛细胞中可以检测大多数的非整倍体,但是应用在自然流产中的报道还比较少<sup>[16]</sup>。这主要是因为它仅需要 20 ng 基因组 DNA 就可以检测每一条染色体的非整倍体。本研究应用的 MLPA 试剂盒有其局限性,仅对 13、18、21、X、Y 5 条染色体进行非整倍体的检测,同时对常见 14 种染色体微缺失情况进行检测,检测到 4 例非整倍体。这样对那些培养失败的标本和极早期自然流产后绒毛非常少不能达到培养标准的标本都可以 MLPA 来检测单个或双重非整倍体。

研究表明非整倍体是造成早期自然流产的重要原因,母亲卵子在减数分裂时期出现错误引起的染色体不分离导致了非整倍体的发生。对于自然流产的患者,即使是第一次流产,我们建议进行细胞遗传学和分子学检测,因为这样可以为再次怀孕提供重要的遗传咨询。另外应用分子技术不但可以判断其父母起源和非整倍体在哪个时期出错,而且可以更好地理解人类非整倍体病因和生物学机制。

#### [参考文献]

- [1] Ogasawara M, Aoki K, Okada S, et al. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriage[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(2):300-304
- [2] Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(4):280-291
- [3] Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage [J]. *Am J Hum Genet*, 1990, 47(4):656-663
- [4] Diego-Avarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21

(4):958-966

[5] Reddy KS Double trisomy in spontaneous abortions[J]. Hum Genet, 1997, 101(3):339-345

[6] Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, et al. Parental origin and cell stage of non-disjunction of double trisomy in spontaneous abortion[J]. Congenit Anom, 2005, 45(1): 21-25

[7] Martin RH, Ko E, Rademaker A. Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes [J]. Am J Med Gen, 1991, 39(3): 321-331

[8] Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, et al. Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction [J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(3):669-675

[9] James RS, Jacobs PA. Molecular studies of the aetiology of trisomy 8 in spontaneous abortions and the liveborn population[J]. Hum Genet, 1996, 97(3):283-286

[10] Robinson WP, Bernasconi F, Lau A. Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment [J]. Am J Med Genet, 1999, 84(1): 34-42

[11] Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M, et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome[J]. Mol Cytogenet, 2008, 18(1):21-23

[12] Rosenbusch B. The contradictory information on the distribution of non-disjunction and pre-division in female gametes[J]. Hum Reprod, 2006, 21(11):2739-2742

[13] Bell KA, Van Deerlin PG, Feinberg RF, et al. Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization [J]. Fertil Steril, 2001, 75(4):374-379

[14] Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, et al. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages [J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(6):1168-1174

[15] Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, et al. MArray-comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow *in vitro* [J]. Prenat Diagn, 2005, 25(10):894-900

[16] Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, et al. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) [J]. Eur J Hum Genet, 2004, 13(2):171-175

[收稿日期] 2012-01-23

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
 审理情况。