

## 自然妊娠和 ART 妊娠早期流产绒毛细胞遗传学检查的临床应用价值

张燕<sup>1</sup>,张凤<sup>2</sup>,周亚东<sup>2</sup>,丁卫<sup>1</sup>,钱晓乔<sup>1</sup>,王炜<sup>1</sup>,冒韵东<sup>1\*</sup>,刘嘉茵<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院生殖医学科,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>南京医科大学生殖医学实验室,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨自然妊娠和辅助生殖技术(assisted reproductive technology,ART)妊娠时早期妊娠流产绒毛细胞遗传学检查的临床应用价值。方法:门诊107例自然妊娠和ART妊娠早期流产患者,无菌下取108份绒毛组织进行绒毛细胞培养及染色体核型分析,成功培养106份,分为2组:46份自然妊娠早期流产组(N组);60份ART妊娠早期流产组(ART组),其中7份为宫腔内人工授精,53份为体外受精和胞浆内单精子注射。结果:①108份早期流产绒毛培养成功率为98.15%(106/108)。②N组正常核型为28例,异常核型18例;ART组正常核型为41例,异常核型19例。异常核型共计37例,其中数目异常检出率为33.96%(36/106),结构异常为0.94%(1/106)。③异常核型以数目异常为主97.2%(36/37),并以三体征75.68%(28/37)最常见。N组:三倍体1例,性染色体数目异常1例,常染色体异常16例。ART组:三倍体2例,四倍体2例,罗伯逊易位1例,性染色体数目异常2例,常染色体异常12例。④男性胚胎占47.17%(50/106),女性胚胎占52.83%(56/106),男女性别比例无显著性差异;染色体异常的胚胎中男性占48.65%(18/37),女性占51.35%(19/37),异常胚胎在两种性别中的比例无显著性差异。⑤N组患者平均年龄为(29.61±3.60)岁,ART组患者平均年龄为(31.98±4.38)岁,两组年龄上差异有统计学意义。结论:胚胎染色体数目异常是导致早期胚胎停育流产的重要原因;早期流产绒毛细胞进行细胞遗传学检查,可为临床病因诊断和下次妊娠治疗和评估提供重要理论依据。

**[关键词]** 流产;绒毛细胞;染色体;辅助生殖技术

**[中图分类号]** R714.56

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-937-05

## Clinical value of chorionic villus cell cytogenetic analysis in early spontaneous abortion between natural and assisted reproductive technology pregnancy

ZHANG Yan<sup>1</sup>,ZHANG Feng<sup>2</sup>,ZHOU Ya-dong<sup>2</sup>,DING Wei<sup>1</sup>,QIAN Xiao-qiao<sup>1</sup>,WANG Wei<sup>1</sup>,MAO Yun-dong<sup>1\*</sup>,LIU Jia-yin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Clinical Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the clinical value of chorionic villus cell cytogenetic analysis in early spontaneous abortion between natural and assisted reproductive technology (ART) pregnancy. **Methods:** Total 108 chorionic villus specimens that were obtained from 107 cases of early spontaneous abortion were cultured for karyotype analysis. Chorionic villus was successfully cultured in 106 cases, with 46 cases of natural pregnancy group (N group) and 60 cases of ART group, in which there were 7 cases of intrauterine insemination and 53 cases of *in vitro* fertilization coupled with intracytoplasmic sperm injection. **Results:** ①The success culture rate were 98.15%(106/108). ②The normal karyotypes were identified in 28 cases of N group and 41 cases of ART group. The abnormal karyotypes were identified in 18 cases of N group and 19 cases of ART group. The abnormal karyotypes detection rate were 34.91%(37/106) in all cases. The type of numerical abnormalities was counting for 33.96%(36/106) and the type of structural abnormalities accounting for 0.94%(1/106). ③The majority type of abnormal karyotypes was numerical abnormalities, counting for 97.3%(36/37), and trisomies for chromosomes were common, counting for 75.68%(28/37). In N group, there was 1 case of triploids, 1 case of sexual chromosome number abnormalities, and 16 cases of autosomal abnormality. In ART group, there were 2 cases of triploids, 2 cases of tetraploids, 1 case of robertsonian translocation, 2 cases of sexual chromosome number abnormalities, and 12 cases of autosomal abnormality. ④ Males embryo were found 47.17%(50/106), females embryo were found 52.83%(56/106), there was no

**[基金项目]** 国家973课题(2012CB944902);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);江苏省卫生厅项目(H200905)

\*通讯作者, E-mail: drmaoyd@yahoo.com.cn; jyliu-nj@126.com

significant difference in sexuality ratio; In chromosome abnormalities, males embryo were found 48.65% (18/37), females embryo were found 51.35% (19/37), there was no significant difference in sexuality ratio of chromosome abnormality. ⑤ Mean ages of patients were (29.61 ± 3.60) years old in N group and (31.98 ± 4.38) years old in ART group, with significant differences between 2 groups. **Conclusion:** Chromosome abnormalities are important factors of early spontaneous abortion, and analysis of chorionic villus chromosome provides an important theoretical basis for clinical etiological diagnosis and next pregnancy treatment.

[Key words] abortion; chorionic villus; chromosome; assisted reproduction technique

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 937-941]

流产是一种常见的妊娠并发症,自然流产的发生率在15%~40%,发生在妊娠12周前的早期流产约占62%,因亚临床自然流产难以估测,实际发生率会更高<sup>[1]</sup>,已危害女性生殖健康,是不孕症的常见病因。辅助生殖技术(assisted reproduction technique, ART)有效治疗不孕症,临床现已广泛应用。它是运用医学技术和方法对配子、合子、胚胎进行人工操作,以达到受孕目的一系列治疗措施,包括宫腔内人工授精(intrauterine insemination, IUI)、体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)和胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)等技术<sup>[2-3]</sup>。但成功生育率却在20%~30%左右徘徊,高流产率是重要原因。流产与遗传、解剖、免疫和环境等因素相关,早期流产与胚胎染色体异常的遗传因素,一直被人们所关注。为了解自然妊娠和ART妊娠早期流产的病因和指导妊娠治疗,本研究对自然妊娠和ART妊娠中107例早期流产患者进行胎儿绒毛培养和染色体核型分析,以其探讨早期流产绒毛细胞遗传学检查的临床应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 对象

2011年1月~2011年10月在生殖医学科门诊对107例自然妊娠和ART妊娠早期流产患者无菌下取绒毛组织进行细胞培养及染色体核型分析。患者年龄21~43岁,妊娠38~90 d, B超检查胚胎停止发育,未见胚芽和心管搏动,门诊排除感染及有害物质接触史等因素,签署知情同意书并行清宫术。因1例为双胞胎妊娠,故共取得绒毛组织108份,成功培养106份,根据绒毛组织来源分为自然妊娠早期流产组(N组)46份, ART妊娠早期流产组(ART组)60份,其中7份来源于IUI, 53份来源于IVF/ICSI。

#### 1.1.2 仪器与试剂

离心机(Universal 320, 德国Hettich公司); CO<sub>2</sub>培养箱(Hanau D-63450, 德国Kendro Laboratory

Products公司);超净台(SW-CT-ZF, 苏州安泰空气技术有限公司产品)。绒毛膜细胞培养试剂盒为杭州宝荣科技有限公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 绒毛标本采集

在B超引导下清宫术,术中无菌负压吸引管吸取绒毛组织5~25 mg,生理盐水浸泡,立刻送入实验室。

#### 1.2.2 绒毛组织原代培养与染色体核型分析

生理盐水冲洗绒毛组织,至绒毛发白,剪碎移至含胰酶和胶原酶溶液中消化,离心,生理盐水洗涤,加入绒毛膜细胞培养液至37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱培养4~6 d后换液,8 d左右收获细胞,常规烤片,G显带染色分析。

### 1.3 统计学方法

数据资料来源于江苏省临床生殖医学管理系统(CCRM),选用SPSS16.0统计软件进行分析,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验,组间均数的比较用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 绒毛培养率

108份早期流产绒毛组织细胞培养成功106份,培养成功率为98.15%(106/108)。

### 2.2 N组与ART组绒毛染色体核型

异常核型共计37例,异常核型检出率为34.91%(37/106)。N组绒毛细胞正常核型为28例,异常核型18例,异常率为39.13%(18/46)。ART组绒毛细胞正常核型为41例,异常核型19例,异常率为31.67%(19/60)。两组异常率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表1)。

### 2.3 N组与ART组绒毛结构异常核型和数目异常核型的比较

所有早期流产患者的绒毛组织细胞中,数目异常检出率为33.96%(36/106);结构异常检出率

为 0.94%(1/106), 数目异常与结构异常比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。异常核型当中以数目异常为主, 占 97.2%(36/37), 并以三体型 75.68%(28/37) 最常见。N 组绒毛细胞中三倍体 1 例, 性染色体数目异常 1 例, 常染色体异常 16 例: 6 号三体 1 例, 10 号三体 1 例, 14 号三体 1 例, 15 号三体

1 例, 16 号三体 9 例 (其中嵌合体 16 三体 1 例), 22 三体 3 例。ART 组绒毛细胞中三倍体 2 例, 四倍体 2 例, 罗伯逊易位 1 例, 性染色体数目异常 2 例, 常染色体异常 12 例(4 号三体 1 例, 13 三体 1 例, 15 号三体 2 例, 16 号三体 4 例, 18 三体 1 例, 21 三体 2 例, 22 三体 1 例, 表 2)。

表 1 两组绒毛组织细胞相应的临床资料比较

Table 1 Comparison of clinical data in chorionic villus cells of two groups

组别	n	患者年龄(岁)	正常核型(例)		异常核型(例)		三体征(例)	染色体异常率[n(%)]
			男	女	男	女		
N 组	46	29.61 ± 3.60	16	12	9	9	16	18(39.13)
ART 组	60	31.98 ± 4.38*	16	25	9	10	12	19(31.67)
合计	106	30.94 ± 4.21	32	37	18	19	28	37(34.91)

与 N 组的年龄比较, \* $P < 0.05$ 。

表 2 两组绒毛染色体核型分析结果

Table 2 The result of chorionic villus chromosome karyotype analysis in two groups

染色体类型		N 组		ART 组		
		核 型	例数	核 型	例数	
数目异常(n = 36)	三倍体	69,XXX	1	69,XXY	2	
	四倍体			92,XXYY	2	
	性染色体数目异常	48,YYY,+15	1	45,XO	1	
	常染色体三体		47,XX,+6	1	47,XXY	1
			47,XY,+10	1	47,XX,+4	1
			47,XX,+14	1	47,XX,+13	1
			47,XX,+15	1	47,XY,+18	1
			47,XX,+16	1	47,XX,+15	2
			47,XX,+16	3	47,XX,+16	2
			47,XY,+16	5	47,XY,+16	2
			46,XX/47,XY,+16	1	46,XO,+21	1
			47,XX,+22	2	47,XX,+21	1
			47,XY,+22	1	47,XX,+22	1
结构异常(n = 1)*			45,XX,rob(15;21)	1		
正常核型(n = 69)		46,XX	12	46,XX	25	
		46,XY	16	46,XY	16	

与染色体数目异常组比较, \* $P < 0.01$ 。

#### 2.4 胚胎性别与染色体核型异常的关系

男性胚胎占 47.17%(50/106), 女性胚胎占 52.83%(56/106), 男女性别比例无显著性差异; 染色体异常的胚胎中男性占 48.65%(18/37), 女性占 51.35%(19/37), 异常胚胎在两种性别中的比例差异无统计学意义(表 3)。

表 3 胚胎性别与染色体核型异常的关系

Table 3 The relationship between embryo sexuality and chromosome abnormality (n)

组别	n	正常核型(例)	异常核型(例)
男胚	50	32	18
女胚	56	37	19

#### 2.5 患者年龄与染色体异常率的关系

N 组患者平均年龄为(29.61 ± 3.60)岁, ART 组患者平均年龄为(31.98 ± 4.38)岁, 两组年龄上比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。因 N 组 ≥ 35 岁例数仅为 3 例, 故两组合并一起以高龄 ≥ 35 岁和低龄 < 35 岁统计染色体异常率, 而在两组组间以 > 30 岁和 ≤ 30 岁分别计算 N 组和 ART 组的染色体异常率。染色体异常率在各高龄组与低龄组间差异均无统计学意义(表 4)。

### 3 讨论

ART 技术的早期流产率与女性年龄密切相关。

表4 两组绒毛组织来源的患者年龄与绒毛染色体核型异常的关系

Table 4 The relationship between pregnant age and chromosome abnormality in two groups

组别	正常核型(例)	异常核型(例)	核型异常率[%( <i>n</i> / <i>N</i> )]
N组			
≤30岁	18	12	40.00(12/30)
>30岁	10	6	37.50(6/16)
ART组			
≤30岁	18	5	21.74(5/23)
>30岁	23	14	37.83(14/37)
总计			
≥35岁	13	7	35.00(7/20)
<35岁	56	30	34.88(30/86)

近几十年来,ART的技术操作不断完善成熟,越来越多的研究显示,与自然妊娠相比,ART可能会引起表观遗传改变而造成不利的妊娠结局,如流产、早产、出生缺陷、低出生体质量、围生儿发病率高并发症,并提示引起这些不良妊娠结局的原因可能发生在早期胚胎围着床期。与此有争议的观点认为,ART相关不良妊娠结局与ART本身技术无关,可能是由于不孕患者自身因素引起的<sup>[4-5]</sup>。随着女性年龄增加,不孕年限增加,外部环境污染机会增多,出现卵子质量下降,导致胚胎非整倍体发生率增加。本研究数据显示染色体异常率在各年龄组均无差异,且N组较ART组有增高趋势,一方面证实ART技术的安全可靠性,另一方面可能由于ART组患者术前常规遗传学检查,选择优质胚胎移植,排除形态差、多原核异常受精的胚胎,若夫妇有染色体异常还会行植入前胚胎遗传学筛查等,故ART组染色体异常率低。

胚胎染色体异常是导致早期胚胎停育流产的重要原因。染色体异常有多倍体、单倍体、三体型等数目异常和易位、断裂、缺失、倒位等结构异常,早期流产绒毛染色体异常主要为数目异常,多见非整倍体,其中三体型尤为多见。这种染色体畸变主要源自双亲之一方的配子形成时或受精卵卵裂时出现染色体不分离,导致该染色体增多或减少1条,即产生三体性或单体性。国内外研究均发现,因染色体异常增高而产生胚胎停止发育约占50%~60%,较计划人流组明显增高<sup>[6]</sup>。本研究结果示早期流产胚胎染色体数目异常明显高于结构异常;常染色体畸变高于性染色体畸变,其中以常染色体三体型为主要畸变,占75.68%,与文献报道一致。1例结构异常(罗伯逊易位)发生在ART组,是女方使用药物促

排卵还是夫妇自身不孕不育等因素造成,尚有待研究。目前除1号染色体三体型未被发现外,其余三体均可出现;且21、13、18、22三体型可见存活,其余三体型因遗传缺陷大,致死性高,多无法存活导致流产,本研究以16、22三体型多见,与文献报道一致<sup>[4]</sup>。本研究1例核型46,XX/47,XY,+16,分析可能是胚胎自身染色体异常或是绒毛组织陈旧,形态色泽改变,混有母源细胞污染等原因造成。故适时取材,选取新鲜组织,洗涤彻底,培养方法上尽量排除母体细胞,是绒毛成功培养的关键。本研究培养率为98.15%,2例培养失败均与绒毛变性坏死有关。

本研究N组与ART组在早期自然流产胎儿男女性别比例上无差异,两者染色体异常发生率也无差异。但也有观点认为女性胚胎自然流产率高于男性胚胎<sup>[7]</sup>,是否女性胚胎存在诱发自然流产的重要机制,还是母源污染,尚有争议。研究发现精母细胞同源染色体联会异常合并Y微缺失的男性患者,非整倍体配子发生概率将会增加,以致畸形儿及反复流产等疾病出现<sup>[8]</sup>。研究发现约13.5%的绒毛染色体存在微缺失、微重复等亚显微结构变异导致流产<sup>[9]</sup>,随着微阵列比较基因组杂交技术(Array-CGH)、微卫星标记、全基因组测序等技术应用,流产的病因有待进一步的揭示。自然流产是自然界人类优胜劣汰的重要选择机制,外在环境因素对遗传的影响也不容忽视。饮食生活习惯、环境有害因素接触等会影响胎儿遗传变化,孕前3个月和孕初3个月补充叶酸可增加5-甲基四氢叶酸水平,降低血中同型半胱氨酸的浓度,减少叶酸代谢障碍引起的胚胎异常<sup>[10]</sup>。对有既往核型异常流产史的患者应结合年龄、核型异常类型等因素进行遗传病的风险评估,对下次妊娠进行指导<sup>[11]</sup>。

总之,胚胎染色体异常是导致早期胚胎停育流产的重要原因,尤以染色体数目异常为主;对早期流产绒毛细胞进行细胞遗传学检查,有利于查明流产原因,为临床病因诊断和下次妊娠治疗和评估提供重要理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学(上册)[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2004:352
- [2] 张燕,陈小青,杨晓玉,等. 供精人工授精的临床应用价值[J]. 中华男科学杂志,2010,16(1):20-23
- [3] 张燕,陶淑贞,丁卫,等. 主动免疫治疗对体外受精-胚胎移植的反复性自然流产患者的临床应用价值[J].

- 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(12):1810-1812
- [4] Steel AJ, Sutcliffe A. Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI [J]. *Hum Fertil Camb*, 2009,12(1):21-27
- [5] Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A, et al. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: population-based cohort study [J]. *Lancet*, 2008, 372(9640):737-743
- [6] 郭 莉, 吴 菁, 傅文婷, 等. 早期自然流产绒毛染色体核型分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27(6):720-721
- [7] 熊 丽, 刘 洁, 邓 康, 等. 早期自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析 110 例 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(1):64-67
- [8] 张秋芳, 黄 翔, 闫丽盈, 等. 非梗阻性无精子症的精母细胞同源染色体联合会分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(3):399-402
- [9] Zhang YX, Zhang YP, Gu Y, et al. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and array CGH [J]. *Clin Genet*, 2009, 75(2):133-40
- [10] 张菁菁, 季修庆, 林 颖, 等. 不良孕产史与 MTHFR 基因 677 和 1298 位点多态性的相关性[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(12):1811-1814
- [11] 蒋 涛, 孙 云, 张晓娟, 等. 南京地区孕早期产前筛查指标中位数建立和临床意义探讨 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(1):71-75
- [收稿日期] 2012-03-31



## Journal of Biomedical Research (生物医学研究杂志)简介

Journal of Biomedical Research (生物医学研究杂志), 是一本生物医学专业的英语杂志, 全球发行, 目前已经被 Scopus、哥白尼和荷兰文摘等数据库收录, 在中国南京和美国加州戴维斯市设有办事处。本刊是一本综合性期刊, 欢迎多学科尤其是交叉学科的来稿。本刊接受综述(以约稿为主)、论著和病例报道, 不收取版面费, 欢迎广大作者来稿。

地 址: 江苏省南京市汉中路 140 号 2 号楼 352 室

电 话: 025-86862036

邮 箱: jbr@njmu.edu.cn

主 页: <http://www.jbr-pub.org>

投稿网址: <http://mc03.manuscriptcentral.com/jbrint>