

· 临床研究 ·

611例双胎孕妇羊水染色体核型结果分析

韦世录,余奇松,侯伟,丘玉铃,陈萍*

广西医科大学生命科学研究院,广西 南宁 530021

[摘要] 目的:分析双胎孕妇羊水细胞染色体核型结果。方法:2010年1月—2019年8月于广西医科大学第一附属医院行羊膜腔穿刺的309例双胎妊娠孕妇,抽取双胎羊水进行产前细胞遗传学诊断,分析双胎羊水染色体核型结果。结果:618例双胎羊水标本成功培养611例,培养成功率为98.87%。共检出染色体异常核型39例,检出率为6.38%,其中数目异常占17.95%(7/39)、结构异常43.59%(17/39)、嵌合体30.77%(12/39)和标记染色体7.69%(3/39)。染色体多态性18例,检出率为2.95%,涉及1、15、16、22、Y号染色体。结论:双胎孕妇通过羊水细胞培养进行染色体检查是双胎产前诊断的可靠方法,能有效减少双胎染色体异常患儿的出生。

[关键词] 双胎;孕妇;羊水染色体

[中图分类号] R714.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)08-1202-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20200822

双胎妊娠指的是一次妊娠同时有2个胎儿,其发生率在不同国家、地区、人种之间存在一定的差异。根据受孕方式不同,分为自然受孕和辅助受孕。自然双胎是小概率事件,有家族遗传倾向性,同时受饮食、药物等因素的影响。辅助生殖技术的出现与发展,给不孕不育夫妇带来了希望,且辅助受孕双胎明显增多^[1]。孕妇呈现高龄化趋势,尤其是辅助受孕的孕妇。双胎孕妇因高龄行羊膜腔穿刺进行染色体产前诊断的情况越来越多,还有唐氏筛查高危、超声异常及夫妇染色体异常也是双胎孕妇的主要产前诊断指征之一。本实验室于2010年1月开展单胎、双胎羊水细胞染色体检查,为染色体产前诊断提供可靠的证据,现将双胎羊水细胞染色体核型结果分析总结如下。

1 对象和方法

1.1 对象

选择2010年1月—2019年8月于广西医科大学第一附属医院行羊膜腔穿刺术的双胎妊娠孕妇309例,年龄17~46岁,孕周17~24周,无羊膜腔穿刺

术禁忌证。术前由遗传咨询医师告知羊水染色体检查的意义及手术并发症,并签署手术知情同意书。羊膜腔穿刺指征包括:①唐氏筛查高风险:年龄<35岁的双胎孕妇于15~20⁺周期间,空腹抽取肘静脉血进行中孕期血清学筛查,结果为21-三体或18-三体高风险;②高龄孕妇:预产年龄≥35岁;③B超异常:孕早期颈项透明层(nuchal translucency, NT)增厚、鼻骨缺失、孕中期提示双胎或双胎之一有结构异常;④夫妇一方为染色体异常携带者;⑤不良接触史:孕早期接触过可能导致胎儿先天缺陷的物质如药物、X线、有毒有害物质等;⑥不良孕产史:曾生育21-三体、18-三体、13-三体患儿,或分娩过有出生缺陷患儿,或多次不明原因的流产。本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 羊水标本的采集与培养

孕妇排空膀胱,取仰卧位,实时B超引导下羊膜腔穿刺术,每胎各抽取羊水20 mL送检。培养室设置有层流净化,于超净工作台内分装至2管15 mL无菌离心管,2 000 r/min × 8 min离心后弃上清,每管加GBICO完全培养基5 mL,分别接种于50 mL培养瓶,放入37℃、5% CO₂培养箱进行细胞培养。培养第7天时于倒置显微镜下观察羊水细胞生长情况,若每个培养瓶中羊水细胞克隆区达到5个以上,可换液。

[基金项目] 中国医学科学院地中海贫血防治研究重点实验室(2019PT310012);广西科技基地和人才专项(桂科AD17129061);广西重点实验室建设项目(19-185-20)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cping62@hotmail.com

1.2.2 羊水细胞染色体制备

换液次日加入适量秋水仙素,2.5 h后收获细胞,然后经低渗、预固定、固定、滴片、烤片等处理,再常规G显带处理,获得羊水染色体载玻片标本,并进行编号。

1.2.3 染色体核型分析

应用德国Zeiss公司全自动染色体图像扫描分析系统对羊水染色体载玻片标本进行全自动扫描、拍照,获取羊水细胞中期分裂相染色体图片。应用染色体分析软件对中期分裂相染色体进行计数与核型排列,计数20个,核型分析7个,若发现嵌合体,则增加计数和分析。

2 结果

2.1 羊水细胞培养成功率

618例双胎羊水标本中,首次培养成功率为98.54%(609/618),首次培养失败的9例标本中,2例选择重抽羊水再次细胞培养,5例改做脐血染色体检查,2例选择放弃。故双胎羊水细胞培养总成功611例,成功率为98.87%(611/618)。

2.2 双胎染色体核型对比与分析

将双胎分别称为F₁胎和F₂胎,按两胎染色体核型是否相同及正常,对所有双胎染色体进行分类分析,结果见表1。

表1 F₁、F₂胎染色体核型对比

分类(F ₁ 胎/F ₂ 胎)	例数	构成比(%)
46,XX/46,XX	192	31.42
46,XY/46,XY	202	33.06
46,XX/46,XY	144	23.57
异常/异常	18	2.95
异常/多态性	4	0.65
正常/异常	32	5.24
正常/多态性	2	0.33
多态性/多态性	16	2.62
46,XX/培养失败	1	0.16

2.2.1 双胎均正常

F₁胎/F₂胎染色体均为正常核型有538例,占88.05%(538/611)。其中46,XX/46,XX占31.42%(192/611);46,XY/46,XY占33.06%(202/611);46,XX/46,XY占23.57%(144/611)。

2.2.2 双胎至少一胎为异常或多态性

F₁胎/F₂胎至少一胎为异常或多态性有72例。F₁胎/F₂胎为“异常/异常”有18例,其中18-三体综合征、相互易位、嵌合体、标记染色体分别为2例、12例、

2例和2例;F₁胎/F₂胎为“异常/多态性”有4例,为相互易位/多态性、嵌合体/多态性各2例;F₁胎/F₂胎为“正常/异常”有32例,其中正常/21-三体6例、正常/18-三体4例、正常/嵌合体14例、正常/相互易位2例、正常/9号臂间倒位6例;F₁胎/F₂胎为“正常/多态性”有2例,均为正常/小Y染色体;F₁胎/F₂胎为“多态性/多态性”有16例,其中F₁胎和F₂胎均为1qh+、15psk+、16qh+、22psk+、Yqh-分别有2例、2例、6例、2例和4例。

2.2.3 培养不成功

其中1对双胎,F₂胎培养失败,F₁胎培养成功,核型为46,XX。

2.3 染色体异常核型及类型分布

611例双胎羊水染色体检查中共检出染色体异常核型39例,检出率为6.38%,其中数目异常占17.95%(7/39),结构异常43.59%(17/39),嵌合体30.77%(12/39)和标记染色体7.69%(3/39)。染色体多态性18例,检出率为2.95%,涉及1、15、16、22、Y号染色体。染色体异常核型及多态性分布情况见表2。

表2 双胎羊水染色体异常核型及多态性分布

染色体核型及分类	例数
数目异常	
47,XN,+21	3
47,XN,+18	4
结构异常	
45,XN,der(13;14)(q10;q10)	1
45,XN,der(14;15)(q10;q10)	1
46,XN,inv(9)(p11q13)	15
嵌合体	
45,X/46,XY	5
45,X/46,XX	1
46,XX/46,XY	2
45,XY,der(13;14)(q10;q10)[29]/46,XX[19]	1
46,XN,add(17)(p13)[5]/46,XN[137]	1
47,XN,+20[5]/46,XN[65]	1
48,XN,+17,+18[5]/46,XN[68]	1
标记染色体	
47,XN,1qh+,der(21)t(21;21)(p11;q11),+mar	2
47,XN,+mar	1
多态性	
46,XN,1qh+	3
46,XN,15ps+	2
46,XN,16qh+	7
46,XN,22ps+	2
46,X,Yqh-	4

注:N=X或Y。

3 讨论

近年来,随着辅助生殖技术的发展和国家放开二胎的政策,双胎妊娠的发生率呈明显上升趋势。Vink等^[2]研究显示,双卵双胎染色体非整倍体异常的发生率是单卵单胎的2倍,单卵双胎染色体非整倍体异常的发生率与单卵单胎相近,但两者出现结构异常的风险均高于单卵单胎。与单胎妊娠相比,双胎妊娠面临更高的结构异常和染色体非整倍体的风险^[3-4]。然而,关于双胎妊娠染色体非整倍体的产前诊断,文献相对报道很少。曾有研究者^[5]对23对双胎羊水染色体检查结果进行分析显示,双胎羊水培养成功率为97.83%,羊水染色体异常率为6.67%,本研究结果(双胎羊水培养成功率为98.87%,羊水染色体异常率为6.38%)与之相近。

目前,高龄是临床上羊水产前诊断的主要适应证之一^[6],随着我国就业人口结构和生育观念的改变,高龄孕妇正逐年增加。高龄孕妇的卵巢逐渐老化,生殖细胞染色体易发生减数分裂不分离或染色体畸变,导致染色体三体或结构异常。当前国内主要通过唐氏综合征筛查、无创产前筛查(non-invasive prenatal testing, NIPT)、产前超声筛查对胎儿进行产前筛查评估。唐氏综合征筛查高风险,应进行羊水染色体检查,以确定是否有染色体异常。针对双胎妊娠是否还做唐氏综合征筛查,目前仍有争议。法国对11 040例双胎妊娠的唐氏综合征筛查结果进行了分析,发现双胎的假阳性率确实较高,为10.8%^[7]。NIPT是近几年发展起来的新技术,其原理是利用新一代DNA测序技术对孕妇外周血浆中的游离DNA片段(包含胎儿游离DNA)进行测序,并将测序结果进行生物信息分析,从中获得胎儿的遗传信息,从而检测胎儿是否患染色体非整倍体疾病。母体血浆中含有胎儿游离DNA,为该技术提供现实依据。胎儿染色体异常会带来母体中DNA含量微量变化,通过深度测序及生物信息可分析检测到该变化,为技术提供理论依据。目前NIPT已广泛应用于单胎妊娠胎儿染色体非整倍体疾病的产前筛查,国内外均有大量研究表明NIPT在单胎妊娠染色体非整倍体21、18、13-三体检测中,具有较高的准确性^[8-11]。针对双胎或多胎妊娠的NIPT报道相对较少,难点在于无法区分每个胎儿对胎儿游离DNA的贡献比例,胎儿比例是决定双胎或多胎NIPT准确性的重要因素。国内有学者进行了双胎NIPT进行了研究,结果显示其检测效果明显优于传统筛查方

法^[12-13]。尽管如此,基于目前有限的数据,双胎NIPT仍具有检出率偏低、失败率较高的问题,需要更深入的研究及更大量的数据积累。

随着三维及四维超声在临床上的普及,产前超声诊断越来越受到大家的重视。胎儿畸形、鼻骨缺如、NT增厚、侧脑室增宽、双肾集合分离、心脏畸形、单脐动脉、羊水过多过少等胎儿异常均可通过超声检查发现,而染色体的异常常伴有躯体结构的异常^[14],因此超声异常后,应进行染色体诊断,避免染色体病患儿的出生。

孕早期服用可能致畸的药物、接触有毒有害物质、X线照射等不良接触史,均可致胎儿的先天缺陷。有不良孕产史如多次不明流产、胚胎停育,尤其是染色体异常患儿孕产史者,再次妊娠时,发生染色体异常的风险会明显增加。染色体数目异常和拷贝数变异在自然流产患者中的发生率高于正常人群^[15]。夫妇染色体异常大多数为染色体平衡易位,涉及2条染色体的平衡易位携带者理论上可形成18种不同的配子,只有1种正常配子和1种平衡易位的配子,其余16种配子均为不平衡状态。当这18种不同的配子与正常配子结合,形成18种不同的合子,其中有16种为染色体不平衡状态,将导致自然流产、胚胎停育、胎儿畸形等。本研究有2对双胎的亲代有染色体平衡易位,4例胎儿染色体仅1例正常,可见亲代染色体平衡易位携带者常常遗传至胎儿,胎儿染色体非平衡或平衡易位的可能性较大。故凡夫妇其中之一为染色体平衡易位携带者,不管孕妇是否为双胎妊娠,都应进行细胞遗传学产前诊断。

嵌合体指的是一个个体内同时存在2种或2种以上核型的细胞系,羊水染色体嵌合体是羊水细胞染色体产前诊断的重点与难点。羊水细胞来源于胎儿消化及泌尿系统自然脱落的上皮细胞,经植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)催化,重新贴壁,分裂增殖,形成羊水细胞克隆区。若某些羊水细胞在刚开始贴壁分裂增殖之初或者已贴壁的羊水细胞在分裂增殖的过程中,染色体发生异常,且异常的细胞没有凋亡,而是有分裂增殖能力,新生长出来的细胞也将是染色体异常,导致某一克隆区的部分或全部的羊水细胞染色体出现异常,这是羊水细胞假性嵌合体的由来。临床上,为了明确羊水细胞真假嵌合体的诊断,建议孕妇进行脐血染色体检查,避免假性嵌合体胎儿被引产。

目前,针对胎儿常见染色体非整倍体异常即21-

三体、18-三体、13-三体,多采用NIPT,该检测仅需抽取孕妇外周血,采样简单快捷,安全性好,准确性高,与染色体核型分析相比,检测周期更短,可减轻孕妇及家属的精神负担。孕12周即可进行NIPT检测,而羊膜腔穿刺至少需要孕16周以上,NIPT可更早地检测,发现异常可及时处理。但NIPT的缺点是:①仪器设备较昂贵,筛查所用的芯片及试剂成本也较高;②只能筛查染色体数目异常,无法筛查染色体结构异常,NIPT结果为高风险时,仍需进行羊水染色体检查,以明确诊断;③极少数情况下,胎盘染色体核型与胎儿染色体核型存在不一致,有一定的假阴性和假阳性率,而且无法消除。羊水染色体检查是细胞学诊断性实验,可同时诊断胎儿染色体数目异常及结构异常,是诊断胎儿常见染色体非整倍体异常即21-三体、18-三体、13-三体的金标准。但羊膜腔穿刺术是有创性产前检查,存在胎儿流产和孕产妇宫腔感染的风险,有手术禁忌证,如先兆流产患者、有盆腔或宫腔感染征象、体温高于37.4℃、有出血倾向者。

随着双胎妊娠的日益增多,双胎胎儿的健康状态也应受到更多重视。鉴于唐氏综合征筛查双胎有较高的假阳性率及NIPT在双胎或多胎检测中的局限性,羊水染色体检查是双胎产前诊断的可靠方法,能减少双胎的出生缺陷。本研究对双胎羊水染色体核型结果进行了分析与总结,具有一定的参考价值,对于产前诊断门诊的遗传咨询及实验室的细胞遗传学诊断工作具有一定帮助。

[参考文献]

- [1] 刘丰,刁飞扬,凌秀凤,等. 辅助生殖多胎妊娠的影响因素研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(5):762-768
- [2] VINK J, WAPNER R, D'ALTON M E. Prenatal diagnosis in twin gestations[J]. *Semin Perinatol*, 2012, 36(3): 169-174
- [3] LEWIS L, GUCCIARDO L, VAN MIEGHEM T, et al. Monochorionic diamniotic twin pregnancies: natural history and risk stratification[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2010, 27(3): 121-133
- [4] AUDIBERT F, GAGNON A, Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, et al. Prenatal screening for and diagnosis of aneuploidy in twin pregnancies [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2011, 33(7):754-767
- [5] 李晓洲,史云芳,琚端,等. 孕中期羊水染色体检查双胎23对[J]. 中华医学遗传学杂志,2013,30(6):759-760
- [6] 中华人民共和国卫生部. 胎儿常见染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准 第2部分: 胎儿常见染色体异常的细胞遗传学产前诊断技术标准 WS 322.2-2010[S]. 北京: 中国标准出版社,2010:10
- [7] GARCHET-BEAUDRON A, DREUX S, LEPORRIER N, et al. Second-trimester down syndrome maternal serum marker screening: a prospective study of 11 040 twin pregnancies [J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(12): 1105-1109
- [8] SENTILHES L, SALOMON L J, VAYSSIÈRE C. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(26): 2581-2582
- [9] TAYLOR-PHILLIPS S, FREEMAN K, GEPPERT J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2016, 6(1): e010002
- [10] 王丹,张勇. 1166例无创产前基因检测结果分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2016,33(3):428-429
- [11] 马婷婷,刘华平,侯朝晖,等. 无创DNA检测技术对胎儿染色体非整倍体疾病的筛查效果[J]. 空军医学杂志,2015,31(4):235-239
- [12] 于文倩,吕远,尹少尉,等. 无创产前检测技术在双胎染色体非整倍体疾病筛查中应用研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2016,32(10):986-989
- [13] 王佳燕,陈敏,吴莉. 无创产前基因检测双胎21、18和13-三体综合征的应用研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2017,33(5):497-501
- [14] 顾京红,蒋荣珍,沈国芳,等. 598例妊娠中晚期胎儿超声异常与染色体异常的关系[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(2):139-142
- [15] 杨岚,钱芳波,陆牡丹,等. 自然流产绒毛染色体畸变率与复发性流产次数的关系探讨[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(8):1220-1225

[收稿日期] 2019-10-16