

羊水细胞培养与染色体制备的方法探讨

张朝晖, 何美锐, 李小山

(桂林市妇幼保健院遗传代谢实验室 广西 桂林 541001)

【摘要】目的:探讨产前诊断中羊水细胞的培养与染色体的制备方法。**方法:**选取2021年1—12月桂林市妇幼保健院产科门诊进行产前诊断的孕妇羊水标本928例,进行羊水细胞培养及染色体制备。**结果:**928例标本全部培养并且染色体制备成功,羊水培养成功率为100.00%。共发现异常核型(不包括染色体多态性改变)38例(4.09%),其中常染色体数目异常15例(1.62%),性染色体数目异常8例(0.86%)、染色体结构异常8例(0.86%)、嵌合体7例(0.75%)。**结论:**羊水细胞的培养与染色体制备与实验人员操作经验和实验条件密切相关,应制定适合的操作规则,以提高产前诊断结果的准确性和工作效率

【关键词】羊水细胞培养; 染色体制备; 染色体核型分析; 产前诊断

【中图分类号】R596.1

【文献标识码】A

【文章编号】2095-1752 (2024) 13-0119-03

染色体病是染色体数目或结构的异常所致的疾病,是新生儿缺陷发生的最主要因素之一^[1]。染色体核型分析是临床上常用的确诊染色体异常的方法,是诊断染色体异常的“金标准”^[2-3]。羊水细胞培养是检查染色体异常最有效的手段,也是产前诊断的重要组成部分^[4]。羊水染色体分裂相的多少、分散的好坏及显带是否清晰是染色体核型分析准确性的前提。羊水多来源于外、中、内三个胚层的脱落细胞,活细胞少,培养难度高^[5]。因此羊水细胞培养及染色体制备过程较复杂,涉及到羊水细胞的采集、接种、培养、观察、收获及制片等诸多环节。此外,由于羊水细胞来源多样、活细胞少,培养过程复杂,存在培养难度大、周期长、易被污染等挑战^[6]。本研究旨在探讨产前诊断中羊水细胞的培养与染色体的制备方法,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2021年1—12月桂林市妇幼保健院产科门诊进行产前诊断的孕妇羊水标本928例。孕妇年龄18~46岁,孕16~26周。所有孕妇均签署知情同意书。

纳入标准:高龄、血清学筛查高风险、B超异常者、夫妇一方有染色体异常及其他需要抽取羊水检查的情况。**排除标准:**先兆流产、有出血倾向及有盆腔或宫腔感染征象等其他有羊膜腔穿刺术禁忌证者。

1.2 仪器与试剂

羊水细胞培养基100 mL/瓶(广州达晖批号S83S210918等和广州白云山批号20210702等)、20 μg/mL秋水仙素(广州达晖)、胰酶(上海乐辰)、Giemsa染液(上海乐辰)、0.25% Trypsin-EDTA(美国gibco)、倒置显微镜(德国Leica)、细胞培养瓶(美国FALCON)、CO₂培养箱(美国Thermo)、全自动染色体核型扫描分析系统(德国ZEISS)。

1.3 方法

(1) 羊水细胞接种:在B超引导下经腹选取穿刺点进行穿刺,抽取羊水约20 mL,分别置于2支15 mL的一次性无菌离心管中,送检后进行双人双线单独培养。以1 500 r/min的速度离心10 min,弃上清保留0.5 mL沉淀物。充分混匀后吸入含3.5 mL培养基的细胞培养瓶中,放入37℃ 5% CO₂浓度培养箱中进行培养。(2) 羊水细胞培养换液:一般在接种培养后第7天在倒置显微镜下观察羊水细胞的克隆大小及数目。如细胞生长旺盛,在贴壁细胞层(有较好的梭形细胞克隆)的背景下出现圆形细胞并有一定数量克隆时即可换液。换液时将原瓶培养液吸入至另一新培养瓶中进行培养,原瓶加入3 mL培养基继续培养。(3) 羊水细胞收获及制片:原瓶换液后继续培养1~2 d,当贴壁细胞背景下出现大量圆形透亮细胞时即可加秋水仙素进行收获。加入秋水仙素(2 mL注射器针头垂直加入4~5滴)继续培养1 h后取出。先将培养液吸入到离心管中,在瓶中加入2 mL 0.25% Trypsin-EDTA继续放入培养箱中10 min。取出后用吸管吹打下瓶中细胞吸入离心管,以2 000 r/min速度离心10 min后取沉淀加入预温至37℃ 0.075 mol/L氯化钾溶液6 mL进行低渗处理。然后加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)依次进行预固定1次,固定2次,最后根据细胞沉淀多少加入固定液调制成浓度适宜的细胞悬液。在室内合适的环境中滴片2~3张,75℃烤片3 h后用已配置好的0.025%胰酶消化显带,Giemsa染液染色。收获时间大多数为培养第8~9天,最长为15 d。若标本培养不成功,应立即通知临床医师和受检者。(4) 核型分析及结果发放:制备好的标本用全自动染色体核型扫描分析系统进行扫描,得到图像后进行分析。计数分析的细胞来自2个独立的细胞培养系统,所分析的细胞的染色体显带分辨率应达到320条带水平^[7],每例计数20个中期分裂相,分析5个核型。如遇嵌合体,则增加

计数分析。核型结果以（ISCN2016）人类细胞基因组学国际命名体系命名，并在产前诊断制度管理要求下严格发放。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 25.0 统计软件进行数据处理。计数资料用例数和百分率 [n (%)] 表示。

2 结果

928 例标本全部培养并且染色体制备成功，羊水培养成功率为 100.00%。共发现异常核型（不包括染色体多态性改变）38 例（4.09%），其中常染色体数目异常 15 例（1.62%），性染色体数目异常 8 例（0.86%）、染色体结构异常 8 例（0.86%）、嵌合体 7 例（0.75%），见表 1。

表 1 928 例标本染色体异常核型统计表

羊水异常 标本类型	核型	例数	合计 [n (%)]
常染色体 数目异常	47,XN,+21	11	15 (1.62)
	47,XN,+18	3	
	47,XN,+13	1	
性染色体 数目异常	47,XXY	3	8 (0.86)
	47,XXX	2	
	47,XYY	2	
	48,XXYY	1	
染色体结构 异常	46,XN,t(11;22)(q25;q13)	1	8 (0.86)
	46,XN,t(1;12)(q42;q24.1)	1	
	46,XN,t(7;8)(p10;p10)	1	
	46,XN,t(3;13)(p21;q34)	1	
	46,XN,t(6;11)(q25;p11.2)	1	
	46,XN,t(5;7)(q13;q22)mat	1	
	46,XN,inv(3)(p13p25)	1	
	46,X,del(X)(q24)	1	
	嵌合体	45,X[10]/46, XX[40]	
45,X[5]/46, XX[86]		1	
45,X[14]/46, XY[80]		1	
45,X[22]/47,XXX[1]/46,XX[71]		1	
46,X,del(X) (q26)[19]/46,XX[31]		1	
47,XN,+mar[30]/46,XN[30]		1	
47,XN,+ider(12)(p10)		1	
[37]/46,XN[13]			
合计		38 (4.09)	

3 讨论

羊水培养因素分析。本实验抽取羊水时间一般为孕 18 ~ 22 周。孕周过小采集时，羊水中的脱落细胞数量较少，活性细胞亦较稀少。孕周过大采集时，虽然脱落细胞较多，但其中的活性细胞减少，且羊水中血脂等杂质增多，可能严重影响细胞的生长。标本应及时送检，实验人员在收到后应先观察羊水的表现性状，并做好记录。接种时应无菌操作，采用双人双线（即同一孕妇的

羊水，编号相同，分成 1、2 两线，采用不同品牌的培养基，各自单独培养箱，从接种到阅片，均由 2 名实验人员单独完成）。羊水细胞在接种过程中极易受到污染，一旦发生污染现象，就无法进行补救^[8]。因此，接种操作应在经过紫外线消毒后的超净台上酒精灯火焰区进行。对于血性羊水，由于其中的血细胞会影响羊水细胞的附着，所以培养收获较一般时间长，应勤于观察细胞贴壁情况并及时换液。如果血性羊水离心后血细胞沉淀较多，可小心吸取沉淀物上层羊水细胞层进行培养，以减少血细胞的比例，促进羊水细胞贴壁生长。高质量的羊水培养基、无菌的操作环境、适宜稳定的温度、湿度以及 CO₂ 浓度都是培养成功的关键。

羊水收获制片因素分析。羊水收获的时机很重要，通常在贴壁细胞背景下，当出现大量圆形透亮细胞时收获效果最佳。染色体制备与培养液中秋水仙素的最终浓度与处理时间有关。若浓度过低或者处理时间过短，制作出的分裂相少，染色体细长；相反，如果浓度过高或者处理时间过长，分裂相虽多，但染色体缩得太短，以至形态模糊，难以获得优良的显带标本而不容易观察。因此加秋水仙素时应同时需要考虑这两方面。此外，低渗液的化学组成、吹打的力度、低渗温度和处理时间都会影响低渗效果。本实验采用的低渗液为 0.075 mol/L 氯化钾溶液，低渗处理的方法为吹打后 37 ℃ 水浴 10 ~ 15 min。低渗处理时间过长会引起染色体肿胀而导致形态模糊甚至丢失，低渗处理时间不足则会导致染色分散不佳。固定这一步的吹打也要适度，固定液需使用前临时配制，否则会影响固定效果，造成染色体形态不好，周围有胞质背景。载玻片要洁净，否则影响滴片时染色体分散。此外，细胞悬液制备不可过浓或过稀，需根据细胞量决定，悬液浓度过高会造成滴片时染色体分散不好。实验室室内温度、湿度会对滴片效果有影响。既往研究表明，在滴片操作过程中将温度控制在 25 ℃ 左右，湿度控制在 50% 左右，更加有利于获得分散良好的染色体^[9]。本实验滴片均在实验室室内环境中进行，发现湿度的变化影响更明显。当湿度介于 50% ~ 60% 时，染色体分散较好。烤片时间要适宜，片子的老化程度与消化显带相关，需根据环境变化而调整，如遇雨季或者潮湿天气可适当增加烤片时间。显带过程中胰蛋白酶溶液需调整 pH 值呈弱碱性，羊水水中的染色体对胰酶的耐受性较差，因此消化时间短于外周血标本。在显带过程中，如果染色体边缘发毛，说明显带过度；如果未出现带纹，说明显带不足。如果在试片过程中发现染色体显带不好，可根据具体情况适当延长或缩短消化和染色时间。

（下转第 123 页）

- from healthcare individuals [J/OL]. J Clin Lab Anal, 2019,33 (9): e22997. <https://doi.org/10.1002/jcla.22997>
- [4] KNEZEVIC C E, NESS M A, TSANG PHT, et al. Establishing hemolysis and lipemia acceptance thresholds for clinical chemistry tests [J]. Clin Chim Acta, 2020,510: 459-465.
- [5] NOUGIER C, JOUSSELME E, SOBAS F, et al. Effects of hemolysis, bilirubin, and lipemia interference on coagulation tests detected by two analytical systems[J]. International Journal of Laboratory Hematology, 2020,42 (1): 88-94.
- [6] ISGRÒ M A, BOTTONI P, SCATENA R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects [J]. Adv Exp Med Biol, 2015,867: 125-143.
- [7] 陈敬, 王艳, 董青悦. 血清 CYFRA21-1、NSE、IL-6 检测在肺癌辅助诊断中的价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023,15 (8): 1431-1434,1439.
- [8] MASTROIANNI A, PANELLA R, MORELLI D. Invisible hemolysis in serum samples interferes in NSE measurement [J]. Tumori, 2020,106 (1): 79-81.
- [9] TOLAN N V, VIDAL-FOLCH N, ALGECIRAS-SCHIMNICH A, et al. Individualized correction of neuron-specific enolase (NSE) measurement in hemolyzed serum samples [J]. Clin Chim Acta, 2013,424: 216-221.
- [10] SIMUNDIC A M, BAIRD G, CADAMURO J, et al. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2020,57 (1): 1-21.
- [11] 向燕君, 周瑶, 冯兰英, 等. 溶血对神经元特异性烯醇化酶检测结果的影响及样本溶血影响因素分析 [J]. 现代肿瘤医学, 2022,30 (12): 2233-2237.

(上接第 120 页)

4 总结

随着分子生物学技术的发展,不断涌现许多新的遗传诊断技术,但染色体核型分析仍是诊断染色体异常的金标准,因为其对易位、倒位、嵌合等染色体异常具有无可替代的重要作用^[10]。产前诊断中羊水检查属于创伤取样,标本制备有难度,孕妇难以接受二次羊水穿刺,因此羊水细胞的一次性成功培养非常重要^[11]。产前诊断中羊水细胞培养和染色体核型制备过程中,从羊水采集到收获制片过程复杂漫长。细胞培养过程中的每一个环节对实验的成功都具有重要的影响^[12],高质量染色体可以提高核型分析的准确率。综上所述,羊水细胞的培养与染色体制备与实验人员操作经验和实验条件密切相关,因此应制定适合的操作规则,以提高产前诊断结果的准确性和工作效率。

【参考文献】

- [1] 徐晶娜. 妊娠中晚期羊水细胞培养与染色体核型分析在产前诊断中的应用 [J]. 当代医学, 2020,26 (29): 162-163.
- [2] 邓国生. 染色体核型分析联合快速 MLPA 非整倍体技术在产前诊断中的应用 [J]. 中国实验诊断学, 2020,24 (4): 628-630.
- [3] 陈亚军, 彭正科. 无创产前检测与有创染色体核型分析在产前诊断中联合应用的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2018,26 (7): 35-37,140.
- [4] 胡惠彬. 不同方法对羊水细胞培养成功率的影响 [J]. 实用检验医师杂志, 2020,12 (1): 7-9.
- [5] 杨益梅, 王珊珊, 张建林, 等. 羊水细胞原瓶传代培养在产前诊断中的应用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2020,28 (9): 1068-1069,1071.
- [6] 周玉春, 王华, 黄定梅, 等. 改良羊水细胞染色体制备法在产前诊断中的效果分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2005 (4): 476-477.
- [7] 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.
- [8] 杜升辉, 黄宪霞, 王红梅. 改良羊水细胞培养方法在产前诊断中的应用 [J]. 中外医疗, 2021,40 (2): 29-31.
- [9] 刘颖慧, 阳敏, 周明星, 等. 羊水细胞培养及染色体制备的经验交流 [J]. 医学理论与实践, 2016,29 (7): 947-949.
- [10] 候舒文, 陈薇, 严雅兰, 等. 比较羊水细胞原位培养法和胰酶消化法在产前诊断染色体检查中的应用价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2023,44 (5): 526-530.
- [11] 韩学波, 于欣, 王妮, 等. 某细胞培养室污染调查及污染源鉴定结果分析 [J]. 医学信息, 2014,27 (20): 108.
- [12] 韩美艳, 俞冬熠, 姜楠, 等. 影响羊水细胞培养成功率因素的分析 [J/CD]. 中国产前诊断杂志 (电子版), 2014,6 (3): 42-45.