

自然流产的细胞遗传学研究进展

罗岚蓉, 李 坚

(首都医科大学附属北京妇产医院计划生育科, 北京 100006)

[摘要] 自然流产是妊娠并发症,指妊娠在28周之前自然终止,其发病率在15%~40%。近年来在辅助生育技术的使用中,同样面临着较高的自然流产率的问题。自然流产的病因十分复杂,除了遗传因素以外,还包括解剖因素、内分泌因素、感染因素、环境因素、免疫因素、血栓前状态以及母体的全身性疾病等等。自然流产的细胞遗传学研究,主要在两个方面,一是胚胎染色体的异常,包括染色体数量异常和结构异常;二是夫妇染色体的异常。在自然流产中胚胎染色体异常的检出率在60%左右,且随着流产次数的增加,染色体异常的比例下降。其中大部分为胚胎染色体数目异常如三体、三倍体及X单体等,较少为染色体结构异常,包括染色体断裂、倒置、缺失和易位等。在自然流产的夫妇中,尤其是反复自然流产的夫妇,其染色体异常的检出率在8%左右,且随着流产次数的增加异常的比例升高。成人染色体的异常多为染色体的平衡易位。随着细胞遗传学的检测技术的发展,从传统染色体核型分析和荧光原位杂交技术到染色体微阵列芯片分析、第二代测序技术即高通量测序技术的相继应用,使得自然流产的遗传学方面的研究更加深入。自然流产的细胞遗传学的研究进展,对于自然流产的病因研究以及生育指导有着非常重要的意义。

[关键词] 自然流产;细胞遗传学;染色体异常

[中图分类号] R169 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2015)06-0065-05

1 前言

自然流产是指妊娠不满28周、胎儿体重不足1 000 g,妊娠自行终止者。妊娠12周之内终止的称为早期流产。自然流产的发生率为15%~40%,而其中80%以上为发生在12周之内的早期流产^[1]。复发性流产(RSA)是指与同一性伴侣连续遭受两次或两次以上的自然流产。临床上,自然流产多表现为胎儿发育的停止,阴道流血的增多,妊娠物部分或全部排出宫腔。但是,有的胚胎或胎儿已经死亡,却一直滞留于宫腔不排出,称之为稽留流产。自然流产的病因十分复杂,除了遗传因素以外,还包括解剖因素、内分泌因素、感染因素、环境因素、免疫因素、血栓前状态以及母体的全身性疾病等。

自然流产的细胞遗传学研究,主要在两个方面,一是胚胎染色体的异常,包括染色体数量异常和结构异常;二是夫妇染色体的异常。当然,除此之外,还有半数的患者原因不明,临床上称之为原因不明的复发性流产。稽留流产的原因不明,有研究认为由于近年来临床上对于妊娠早期的先兆流产症状,采用黄体酮进行保胎,可能是导致稽留流产的原因之一。

2 胚胎染色体的异常

胚胎染色体数目的异常多为三体、三倍体及X单体等,其次为染色体结构异常,包括染色体断裂、倒置、缺失和易位等。杨蕾^[2]对稽留流产的绒毛进行培养后染色体核型分析,发现染色体异常的比例

[收稿日期] 2015-03-18

[作者简介] 罗岚蓉,1971年出生,女,江西南昌市人,副主任医师,研究方向为避孕节育手术并发症及疑难杂症,复发性流产的妊娠管理,流产后生殖健康服务以及危急情况下的生殖健康服务;E-mail:18611750910@163.com

李 坚,1957年出生,女,北京市人,主任医师,博士生导师,研究方向为避孕药械安全使用,节育方法及并发症防治,优生优育与生殖健康;E-mail:ljian02@hotmail.com

为65.6%，其中常染色体三体综合征占到了66.7%，X染色体单体占21.9%，多倍体占6.3%，嵌合体占2.1%，染色体结构异常占4.2%。超声检查胚胎停止发育的孕周最小5周，最大10.2周，平均孕周6.9周，其中发生频率较高的16-三体、X-单体的超声孕周分散在多个孕周，14-三体、三倍体的超声孕周集中在5~7周。王春珺^[9]的研究发现在妊娠12周的稽留流产病人中，染色体异常比例为60.9%，明显高于妊娠>12周的病人染色体异常31.7%发生率。染色体异常的前3位为三倍体、16号染色体三体、X单体，占总异常发生率的32.7%、15.4%和15.4%。

辅助生育技术(ART)现在已经成为许多不孕夫妇生育的重要治疗方法。尽管ART的妊娠成功率基本稳定在40%左右，而分娩率只有20%~30%，其中一个重要的原因就是早期较高的自然流产率^[4,5]。ART治疗早期自然流产率为22%~63%，ART的失败与许多因素相关，遗传的缺陷尤其是胚胎染色体的异常是早期自然流产的主要原因，染色体异常造成的流产占60%的比例^[6-8]。ART与自然妊娠的自然流产META分析表明，ART并不显著增加早期自然流产的染色体异常的比率。Qin^[9]对自然流产妊娠物的细胞遗传学分析(POC)显示48.9%为染色体核型异常，其中71.3%为常染色体三体综合征，7.3%为X染色体单体，3.8%为染色体结构的异常，3.37%为多倍体，2.4%为嵌合体，2.1%为双三体，0.87%为四倍体。这项研究的结果与杨蕾对自然妊娠自然流产胚胎染色体的分析结果一致。因此，染色体数目的异常，即常染色体三体是自然流产胚胎染色体异常最常见的原因。

胎儿染色体异常在单次流产而非复发性流产中起重要的作用；但随着流产次数的增加，胎儿染色体畸变的几率将会降低^[10,11]。徐婉芳指出胚胎早期死亡因染色体数目异常造成的绒毛染色体异常高达90.32%。而在数目异常中，常染色三体异常所占比例最大，约占66%的比例。常染色体三体综合征主要是因为生殖细胞在减数分裂的时候，染色体没有进行分离，染色体增多或者减少。这之中，只有大约20%的21三体可以存活出生，其他常染色体的三体性大多会造成流产。在常染色三体中，16号染色体发生异常的概率最高，占到21%左右。这也可能与16号染色体发生异变频率较高有关系。这也就说明，染色体异常的胚胎流产也是对胎儿的优胜劣汰的过程^[12]。

常染色体三体(trisomy)是指多一条或二条染色体，总数达47条或48条染色体是最常见的染色体异常，其中以13、16、18、21及22条染色体最常见。单体X(monosomyX, 45X)是仅次于三体的较常见的染色体异常，如能存活，足月分娩后形成特纳综合征(Turner syndrome)。非整倍体包括亚二倍体和超二倍体，其形成机制主要是由于在细胞分裂过程中染色体不分离或染色体丢失引起，染色体不分离包括减数分裂不分离和有丝分裂不分离，减数分裂不分离是发生在配子(精子和卵子)形成的减数分裂过程中，所形成的异常配子与正常配子结合后，造成受精卵细胞中某一染色体的三体型或单体型。三倍体常与胎盘的水泡样变性共存。不完全水泡状胎块的胎儿可发育成三倍体或16号染色体三体，流产较早，少数存活稍长亦伴有多发畸形，但未见活婴。四倍体活婴较少，绝大多数极早就流产。四分之三的非整倍体流产在妊娠8周前流产。不分离可以发生在第一次减数分裂也可以发生在第二次减数分裂。不分离发生的时间不同，产生的异常配子比例不同，一般情况下，减数分裂不分离产生的配子受精后形成的单体型胎儿绝大多数不能存活。有丝分裂不分离是染色体数目正常的精子与卵子受精形成的正常受精卵，在卵裂早期发生的姐妹染色体单体不分离时，就将形成具有两种或两种以上细胞系组成的嵌合体。人类个体发育从受精卵发生开始可大致分为配子形成期、合子期、胚胎期、胎儿期及出生后的各期等，每个时期产生的染色体畸变所致的遗传效应不同，一般，在配子形成期或合子期(约在受精后24h内)发生的染色体畸变，将导致整个个体带有畸变的染色体，即形成各种常见的单体、三体、部分单体、部分三体、四体、部分四体等各种类型的染色体病，在胚胎早期的卵裂及桑椹胚期(约受精后3~4天内)发生的染色体畸变，将导致某一个体发育为含有不同百分比核型的嵌合体的染色体病^[13]。

3 夫妇双方染色体异常

夫妇双方染色体异常也是自然流产尤其是复发性自然流产的重要遗传学原因。在对自然流产的夫妇进行细胞遗传学分析时发现，随着自然流产发生次数的增加，染色体异常的比例升高。范先阁报道的210对复发性自然流产的夫妇中，复发性自然流产2、3、4、5次及以上者，异常染色体的检出率

各为3.57%、4.86%、4.29%和13.16%^[14]。李淑芬报道^[15],流产1次者染色体异常率为4.25%,2次者异常率为5.2%,3次者异常率为14.7%,4次以上者异常率为25%。在被调查的夫妇中,总体染色体异常的比例为8.29%,其中罗伯逊易位及相互易位占50%,数目异常及其他结构异常占25%,大Y染色体占25%,是由于Y的长臂DNA重复增加所致,临床上有多次报道,认为大Y有遗传效应可致流产,死胎等临床症状,研究中检测的大Y均引起妻子多次流产、死胎。陶欣^[16]的研究中染色体异常的检出率与李淑芬相符,为8.9%,其中发现结构畸变占65%,包括染色体的倒位、易位,另外染色体变异,占异常的35%,包括Y染色体的变异和常染色体的变异。Y染色体的变异包括大Y以及Yp+。他在研究中发现,9号染色体的倒位异常占到了检出异常染色体的35%,均表现为早期妊娠流产,流产次数在三次以上,说明9号染色体的倒位可能与早期流产有关。在ART中, Ji Won Kim发现ART虽然并不增加染色体异常的风险,但是在ICSI组男性因素导致的不孕夫妇中,有着较高的性染色体异常的比例,因此,这种异常应该是与夫妇双方潜在的染色体异常有关而不是与ICSI本身的操作有关^[17]。

遗传学上,两条不同源的染色体各发生断裂后,互相变位重接而形成两条结构上重排的染色体称相互易位。由相互易位和复杂易位形成的原发性易位,由于基本上无遗传物质的丢失,所以个体的表型正常,对个体的发育一般无严重的影响,故称之为平衡易位。在染色体平衡易位畸变中,一般都没有遗传物质的丢失,为平衡易位携带者。平衡易位携带者可能给后代带来患染色体病的高度风险。在减数分裂时,可发生染色体的缺失和重复。如果两个易位的染色体在一起,两个正常的染色体在一起进入生殖细胞中,将产生平衡配子,因为这样的分离能保证每一个细胞有一套完整的基因。如果一个易位的染色体和一个正常的染色体在一起分离而进入生殖细胞中,将产生不平衡的配子。这些配子在受精形成合子后,造成某个易位节段的缺失或部分三体,破坏了基因之间的平衡,造成流产、死胎等。平衡易位是人类中最的一类染色体结构畸变,平衡易位在普通人群中发生率为1.9%。染色体平衡易位患者流产和生畸形儿的可能性极高,生出健康儿的比例不足1/3。

在夫妇染色体异常中较为多见的罗伯逊易位,

又称着丝粒融合,这是发生于近端着丝粒染色体的一种易位形式。当两个近端着丝粒染色体在着丝粒部位或着丝粒附近部位发生断裂后,二者的长臂在着丝粒处接合在一起,形成一条由长臂构成的衍生染色体;两个短臂则构成一个小染色体,小染色体往往在第二次分裂时丢失,这可能由于其缺乏着丝粒或者是由于其完全由异染色质构成所致。由于丢失的小染色体几乎全是异染色质,而由两条长臂构成的染色体上则几乎包含了两条染色体的全部基因,因此,罗伯逊易位携带者虽然只有45条染色体,但表型一般正常,只在形成配子的时候会出现异常,造成胚胎死亡而流产或出生先天畸形的患儿。

4 遗传学检测研究方法的进展

4.1 常规染色体核型分析

我国常规使用的染色体疾病检测方法是细胞遗传学染色体核型分析,是自然流产查因的首选技术手段,流产绒毛组织细胞培养核型分析,可以准确检出自然流产物或胎儿染色体结构和数目的异常,是明确病因或产前诊断的“金标准”。该技术准确性高,但周期长,对操作者的技术要求较高,而且费时费力,通量低,且存在10%~40%的样本因培养失败、细菌或真菌感染、母血污染等原因而未能给出检测结果。尤其稽留流产的绒毛是胚胎停育后清宫取出的陈旧组织,稽留流产胚胎在宫内滞留时间长,其生长活力差,使绒毛组织培养失败率较高。此外,对染色体小片段缺失无法进行检测^[18]。

4.2 原位荧光杂交技术(FISH)

技术应用多种荧光素标记的不同DNA探针可直接与待测标本进行原位杂交,且可在同一细胞中显示不同颜色的荧光信号,通过对荧光信号的检测,可同时对待测的多种染色体进行定性、定量或相对定位分析,其灵敏度较高,所需细胞量很少,无需细胞培养,省时省力,其技术更容易被掌握,故该技术与传统的细胞遗传学方法相比,具有快速、简便、敏感、特异性强等优点,已成为产前诊断染色体非整倍体的一种新手段。FISH技术的出现虽然弥补了绒毛细胞培养的缺陷,具有对标本要求低,可对污染标本进行快速检测,可弥补“金标准”不足,但目前国内进行自然流产遗传学病因检测的FISH探针仅涉及染色体13、16、18、21、22、X/Y,以上7组探针仅能覆盖染色体数目异常的81.3%,不能检测

全部常染色体和1组性染色体,约有近20%的患者出现漏诊。若FISH探针覆盖22对常染色体和1组性染色体,则其价格将极其昂贵,不适合临床应用及推广。另外目前进行自然流产染色体数目异常检测的FISH探针不能针对染色体结构进行检测,易导致约2%~5%的染色体结构异常的夫妇反复流产病因不明确^[19]。

4.3 高通量基因测序技术

随着分子生物技术的提高,多种芯片技术、测序技术应用到遗传学分析领域,尤其是染色体微阵列芯片分析(CMA)在发育迟缓、智力低下、先天畸形、自闭症等疾病的分子诊断方面有了明显突破。CMA应用到了自然流产绒毛的染色体检测中,相比于传统染色体核型分析和荧光原位杂交技术,能发现更多的染色体片段的微缺失和微重复。第二代测序技术为代表的高通量测序技术,与CMA相比较,拥有更高的通量、准确度和更低的成本,方法更灵活。母体细胞污染(MCC)是在产前遗传学诊断取材中的一大困扰,对实验人员的技术要求较高,在常规染色体核型分析时,经常会受MCC的影响。在实际应用中,高通量测序技术可以通过采集母亲血液验证结果,来排除MCC的影响,在MCC的排除上具有更大优势。对标本要求低,可对污染、绒毛退化标本进行检测,高通量测序技术通过对测序深度的调整能避免更多人为因素的干扰,通过对拷贝数变异(CNV)检测,明显提高了基因组不平衡异常的检测率,可检测到0.5 Mbp以上的染色体片段缺失,打破了疾病研究过程中的通量限制^[20]。刘惠莲应用高通量基因测序技术测定稽留流产胚胎染色体异常的检出率为63.64%,高于古艳等报导的55.56%;可能与全基因检测,能发现包括染色体数目、结构异常和片段缺失有关^[21]。

5 结语

随着细胞遗传学的检测技术的发展,从传统染色体核型分析和荧光原位杂交技术到染色体微阵列芯片分析、第二代测序技术即高通量测序技术的相继应用,使得自然流产的遗传学方面的研究更加深入。自然流产的细胞遗传学的研究进展,对于自然流产的病因研究以及下一步生育的指导是有非常重要的意义。在自然流产的胚胎染色体异常的检出率在60%左右,且随着流产次数的增加,染色体异常的比例下降。胚胎染色体数目的异常多为

三体、三倍体及X单体等,其次为染色体结构异常,包括染色体断裂、倒置、缺失和易位等。在自然流产的夫妇中,尤其是反复自然流产的夫妇,其染色体异常的检出率在8%左右,且随着流产次数的增加异常的比例升高。成人染色体的异常多为染色体的平衡易位。如复发性流产的夫妇之一为易位携带者,如果是常染色体平衡易位及罗伯逊非同源易位携带者可以妊娠,但应做产前诊断,以保证生育正常核型的婴儿。对于罗伯逊同源易位携带者,应劝告其避孕或绝育,以免反复流产或分娩畸形儿。先兆流产保胎前,应参考夫妇双方的核型分析做出是否保胎的决定。不论是胚胎染色体异常还是夫妇染色体异常造成的自然流产,都是人类自然选择的自我保护措施,优胜劣汰,以确保群体的健康繁衍。

参考文献

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2014.
- [2] 杨蕾. 稽留流产中绒毛细胞的染色体核型分析[D]. 广州:中山大学, 2008.
- [3] 王春珺,于晶峰. FISH技术检测稽留流产组织中染色体异常的临床研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2014, 36(1): 16-20.
- [4] Gunby J, Daya S. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2001 results from the Canadian ARTRegister [J]. Fertil Steril, 2005, 84(3): 590-599.
- [5] Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 2001 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry [J]. Fertil Steril, 2007, 87(6): 1253-1266.
- [6] Goddijn M, Leschot N J. Genetic aspects of miscarriage [J]. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000, 14: 855-865.
- [7] Hassold T J. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(5): 723-730.
- [8] Farr S L, Schieve L A, Jamieson D J. Pregnancy loss among pregnancies conceived through assisted reproductive technology [J]. Am J Epidemiol, 2007, 165: 1380-1388.
- [9] Qin Junzhen. Risk of Chromosomal Abnormalities in early spontaneous abortion after assisted reproductive technology: A Meta-Analysis [J/OL]. PLOS ONE, 2013, 8(10): e75953.
- [10] Christiansen O B, Pedersen B. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: Evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage [J]. Hum Reprod, 2002, 17(3): 809.
- [11] Ogasawara M, Aoki K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages [J]. Fertil Steril, 2000, 73(2): 300.
- [12] 徐婉芳. 稽留流产的胚胎绒毛染色体分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(5): 48-50.
- [13] 王萍燕. 荧光原位杂交技术检测176例稽留流产绒毛组织染色体数目异常[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(4): 485-

- 487.
- [14] 范先阁. 210对反复流产夫妇的染色体分析[J]. 中华医学杂志, 1986, 21: 287.
- [15] 李淑芬, 孙多伦, 闫福云, 等. 193对自然流产夫妇细胞遗传学分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(2): 35-37.
- [16] 陶欣, 汤月香, 梅志雄, 等. 复发性流产夫妇的染色体结构异常分析[J]. 生殖与避孕, 2002, 22(1): 58-61.
- [17] Ji Won Kim. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment [J]. BMC Medical Genetics, 2010, 11: 153.
- [18] Xi Y, Formentini A, Nakajima G, et al. Validation of biomarkers associated with 5-fluorouracil and thymidylate synthase in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2008, 19(2): 257-262.
- [19] 宋兰林, 熊丽, 刘思平, 等. FISH技术在快速诊断自然流产胚胎染色体数目异常中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(9): 1605-1607.
- [20] 蔡莉蓉, 戚红, 祝建疆, 等. 高通量基因测序技术在自然流产遗传学分析中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(8): 649-653.
- [21] 刘惠莲, 海峰, 吕发辉, 等. 应用高通量基因测序技术测定稽留流产胚胎染色体异常及临床意义[J]. 吉林医学, 2014, 35(10): 2041-2043.

Advances in cytogenetic study of spontaneous abortion

Luo Lanrong, Li Jian

(Department of Gynaecology, Beijing Obstetrics and Gynaecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China)

[Abstract] Spontaneous abortion is a complication of pregnancy that terminates before 28 weeks of gestations. The incidence is about 15% ~ 40%. In recent years the assisted reproductive technology (ART) is also facing the problem of high incidence of spontaneous abortion. Etiology of spontaneous abortion is very complex. Besides genetic factors, there are anatomical factors, endocrinological factors, infection factors, environmental factors, immunological factors, prethrombotic state and maternal systemic diseases and so on. Cytogenetic studies of spontaneous abortion are mainly in two aspects, one is embryonic chromosomal abnormalities, including the number of chromosome abnormalities and abnormal structure; the second is couple of chromosome abnormalities. In spontaneous abortion the embryonic chromosomal abnormal detection rate is around 60% and this ratio declines with the increase in the number of abortions. Most of the number of embryos abnormalities are trisomy, triploids and X monomer. Less structural chromosomal abnormalities of embryo include chromosomal breakage, inversions, deletions and translocations and so on. In couples with spontaneous abortion, especially recurrent spontaneous abortion couples, the abnormal chromosome detection rate is around 8%. With the number of abortion increases, this proportion increases too. The most common abnormality of chromosome of adult is balanced translocation. Nowadays there are great developments in cytogenetic detection technology. From the traditional chromosome karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization techniques (FISH) to chromosomal microarray chip analysis and the second generation sequencing technology, we can make further research of cytogenetic of spontaneous abortion. These researches have a very important significance in the area of etiology of spontaneous abortion and do great help to guide the couples confused by recurrent spontaneous abortion in their next childbirth.

[Key words] spontaneous abortion; cytogenetics; chromosomal abnormalities