

# 孕早期经宫颈采集脱落滋养细胞的研究

付娟娟 丛林\* 袁静 方慧琴

(安徽医科大学第一附属医院,安徽 合肥 230022)

**【摘要】** 目的 探讨孕早期经宫颈获取滋养细胞的适宜方法和适当孕周。方法 选取要求终止妊娠的60名早孕妇女,采用宫颈管棉拭子法、宫颈内口黏液吸引法、细胞刷法经宫颈采集脱落细胞,并选取20名未孕的妇女,行宫腔灌洗采集的脱落细胞标本作为对照组。用HE染色及细胞角蛋白-7(CK-7)免疫细胞化学染色检测滋养细胞。结果 HE染色法和免疫细胞化学染色法均显示细胞刷法采集到滋养细胞的阳性率及细胞数明显高于另两种方法,差异有统计学意义。结论 细胞刷法经宫颈取材是一种较好的微创取材方法。

**【关键词】** 脱落细胞;产前诊断;早期妊娠;CK-7

**【中图分类号】** R446.19 **【文献标志码】** A

**【Abstract】 Objective** To explore the path through the comparison of several methods for obtaining fetus trophoblastic cells through the cervix in the first trimester. **Method** Sixty pregnant women who want to request termination of pregnancy were recruited to the study. After informed these pregnant women, transcervical cell samples were collected from women whose fetuses were between 6 and 10 weeks' gestation. These women were divided into three groups on random, 20 cases in one group: Group A used cervical canal cotton swab, Group B used endocervical mucus aspiration and Group C used cytobrush sampling of the endocervix. As the control group, the cells were collected from 20 non-pregnant women by uterine lavage. These samples were stained by HE and immunocytochemistry, then were observed under the microscope to watch the presence of trophoblast cells and to count the cells. We used monoclonal antibodies cytokeratin -7 (CK-7) which is a specific maker on the trophoblast cells to count the positive expression cells under the microscope. **Results** The method of brush get the largest quantity number of positive cells by HE stained and Immunocytochemical stained. The amount positive cells of the cytobrush group compared with the other group were statistically significant. **Conclusions** It is feasible to obtain the trophoblastic cells through the cervix in the first-trimester pregnancy.

**【Key words】** trophoblastic cells; prenatal diagnosis; early pregnancy; cytokeratin 7

产前诊断可以减少新生儿畸形和遗传性疾病的发生率。目前临床上产前诊断的时限一般是在孕中期和孕晚期,如果发现胎儿异常,妊娠终止的时间较晚,且诊断技术均依赖于有创性操作,具有一定的风险性。在早孕期用无创或微创的技术获得标本用于诊断,无疑是产前诊断工作者必须思考和探究的。

在以往的相关研究中,有学者通过棉签、宫腔灌洗等各种办法尝试取材,但综合结果均不太满意。滋养细胞的检测可以较早地应用技术检测胎儿遗传物质,若能较好地取出早孕期的滋养细胞,可以使得产前诊断的时间相对提早。本研究中用3种方法获取脱离滋养细胞,观察何种较为可行。

基金项目:安徽省2008年科技攻关项目(08010302181)安徽省临床医学应用技术项目(2008A003)

\* 通讯作者:丛林, E-mail: conglin1957@163.com

## 1 材料与方法

1.1 标本来源及分组 选择2009年4月至2009

年11月在安徽医科大学第一附属医院门诊就诊要求终止妊娠的早期妊娠妇女60例为研究对象,实验组妊娠妇女符合以下条件:①要求终止妊娠;②超声确定为宫内妊娠,测量胚芽头臀长并结合末次月经确诊为孕6~10周;③禁性生活5天以上;④妇科检查可排除生殖器官炎症;⑤无阴道流血等先兆流产症状。

以随机数表对研究对象进行编号后随机分组,将研究对象分为3组:宫颈管棉拭子法(A组)、宫颈内口黏液吸引法(B组)、细胞刷法(C组),每组20例。另选择20名未孕的育龄期妇女(来我院门诊要求进行输卵管通水等手术,排除生殖器官炎症和停性生活5天以上,同意参与研究)在其手术之前行宫腔灌洗法采集的细胞悬液作为对照组(D组)。有学者研究显示,宫腔冲洗与其他方法相比,可获得较多的胎儿细胞,但安全性存在一定的争议<sup>[1]</sup>,故将宫腔灌洗作为对照组。

## 1.2 实验方法

1.2.1 主要用品及试剂 无菌棉拭子、一次性细胞刷(南京微创公司,套管直径2 mm)、胚胎移植软管(Cook公司)、无菌15 ml离心管、低速离心机、胶原酶B(美国, Sigma)、4%多聚甲醛、苏木素-伊红染料、多聚赖氨酸、1%曲拉通-100、小鼠抗人细胞角蛋白7(CK-7)单克隆抗体、过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)染色试剂盒、DAB显色液(以上均购于北京中杉)。

1.2.2 经宫颈取样方法 妇女取膀胱截石位,常规消毒外阴铺巾,暴露并消毒阴道和宫颈外口,用无菌干纱布擦净宫颈外口处黏液。

1.2.2.1 无菌的宫颈管棉拭子在宫颈管内(不超过内口)旋转5圈,然后将棉签放置在装有3 ml PBS液的无菌试管中充分涮洗。

1.2.2.2 宫颈内口黏液吸引是用胚胎移植软管伸入宫颈管,刚过宫颈内口时将内管向前推出0.5~1 cm左右,移植管后端接有5 ml注射器,用适当力量回抽注射器,负压吸引后将内管退入外管中再推出宫颈,移至装有3 ml PBS液的无菌试管,充分涮洗。

1.2.2.3 细胞刷法使用套管刷伸入宫颈,伸入时毛

刷未伸出塑料软管,当套管刷头达到但未超过宫颈内口时,向前推动手柄1 cm,将毛刷伸出使得毛刷一部分刚过宫颈内口处,转动2圈后,拉动手柄将毛刷退入套管中再取出,移至3 ml PBS液的无菌试管充分涮洗。

1.2.2.4 宫腔灌洗法是使用无菌的胚胎移植软管(直径2 mm),小心伸入宫颈管中,达到并刚过宫颈内口,尾端接有装有5 ml无菌生理盐水的注射器,轻轻将生理盐水推入宫腔,推完后立即回抽注射器,将回抽得到液体装入3 ml PBS液的无菌试管,并充分涮洗软管。

1.2.3 样本处理 所取样本均获得细胞悬液,经离心机1400转/分,离心10分钟,弃上清,肉眼下若见有黏液,可用胶原酶B在37℃水浴锅中消化10分钟,1400转/分,离心10分钟,弃上清。所有标本均制成0.5 ml的细胞悬液,混匀后吸取10 ul滴到多聚赖氨酸包被过的载玻片上,晾干,过夜备用。

1.2.4 HE染色和免疫细胞化学染色 抗CK-7作为一抗进行免疫细胞化学染色。同时行HE染色,镜下观察是否存在滋养细胞及CK-7表达阳性的细胞。标本经染色后,请病理科医师行细胞鉴定。

1.3 统计学处理 所有数据采用SPSS11.5统计软件包处理。计数资料中组与组之间的率的比较采用 $\chi^2$ 检验;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组均数之间的比较采用两个独立样本之间的 $t$ 检验,多组之间的比较用方差分析(one-way ANOVA);数据不符合正态分布时或方差不齐时,采用秩和检验。取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < \alpha$ 时说明有统计学意义。

## 2 结果

2.1 3种取材方法获得滋养细胞的阳性率 3种方法采集的细胞标本经HE染色后,光镜下均可及典型的合体滋养细胞(见图1)。滋养细胞是来源于胎儿的细胞,形态上一般分为合体滋养细胞和细胞滋养细胞。合体滋养细胞体积较大,核小而深染,胞浆丰富,染色质聚集在核的周围,胞核间无明显细胞界限而呈多核合体状。细胞滋养细胞较小,一般很难识别。对照组未见滋养细胞。数据行卡方检验后,A组的滋养细胞获得率与B组比较差异无统计学

意义( $P>0.05$ ),C组的滋养细胞获得率较A组和B组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(见表1)

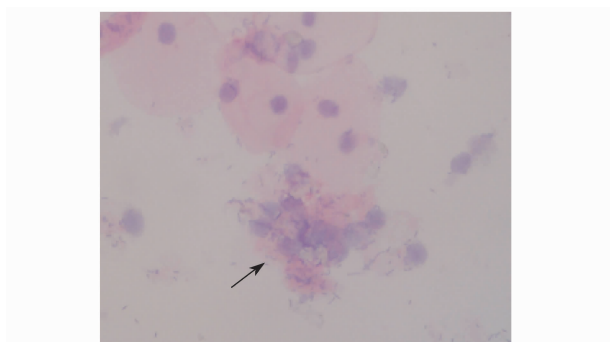


图1 HE染色玻片  
黑箭头所示为合体滋养细胞

CK-7在滋养细胞上表达,阳性细胞为镜下结构清晰,胞膜和胞浆均可及棕黄色着色(见图2)。3种方法采集的细胞标本经免疫细胞化学染色后,光镜下可见阳性表达的细胞。对照组中未见阳性表达的细胞。对其数据行卡方检验后,A组和B组之间的阳性细胞获得率比较无统计学差异( $P>0.05$ ),C组的阳性细胞获得率较A组和B组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(见表1)



图2 免疫细胞化学染色染色玻片中可见棕黄色着色的细胞

表1 HE染色和免疫组化方法获得滋养细胞的阳性率

组别 (HE染色)	取材方法	例数	见滋养细胞的例数	未见滋养细胞的例数
实验组	A组	20	8(40%)	12(60%)
	B组	20	11(55%)	9(45%)
	C组	20	18(90%)	2(10%)
对照组	D组	20	0(0)	20(100%)
组别 (免疫组化)	总例数	阳性细胞例数	未见阳性细胞例数	
实验组	A组	20	2(10%)	18(90%)
	B组	20	5(25%)	15(75%)
	C组	20	18(90%)	2(10%)
对照组	D组	20	0(0)	20(100%)

2.2 2种染色方法鉴定3种取样方法采集的细胞标本中滋养细胞的计数及量的比较 HE染色方法中,光镜下观察玻片上每个视野的滋养细胞的量,宫颈管棉拭子(A组)、宫颈内口黏液吸引(B组)和细胞刷(C组)3种方法得到的细胞量分别是  $193.25 \pm 111.60$  个/ml,  $227.27 \pm 100.91$  个/ml,  $419.44 \pm 150.63$  个/ml。分别进行3组间的两两比较,检验水准调整为  $\alpha=0.05/3=0.017$ ,经秩和检验细胞刷法取得的细胞量分别与宫颈管棉拭子组和宫颈内口黏液吸引组比较,其差异有统计学意义( $P=0.002$ )。而宫颈管棉拭子组采集的细胞的量与宫颈内口黏液吸引组相比,其差异无统计学意义( $P=0.605$ ),故细胞刷法取得的细胞量最多。

免疫细胞化学染色方法中,光镜下观察玻片上每个视野的阳性细胞的量。宫颈管棉拭子(A组)得到阳性细胞的例数为2,样本量太少无法与其他2组比较。宫颈内口黏液吸引(B组)和细胞刷(C组)方法得到的细胞量差异有统计学意义( $140.00 \pm 41.83$  个/ml vs  $316.67 \pm 154.35$  个/ml,  $P=0.000$ )。(见表2)

表2 运用2种染色方法鉴定3种取样方法采集的细胞标本中阳性细胞的量

	宫颈管棉拭子(A组)	宫颈内口黏液吸引(B组)	细胞刷(C组)
HE染色	$193.25 \pm 111.60$ 个/ml	$227.27 \pm 100.91$ 个/ml	$419.44 \pm 150.63$ 个/ml
免疫细胞化学染色	/	$140.00 \pm 41.83$ 个/ml	$316.67 \pm 154.35$ 个/ml

2.3 获得滋养细胞量与孕周的关系(见表3)

表3 滋养细胞获得情况与孕周之间的关系

孕周	标本例数	HE染色		免疫细胞化学染色	
		见滋养细胞的标本数	玻片上滋养细胞的平均数	见滋养细胞的标本数	玻片上滋养细胞的平均数
5 <sup>+</sup> 1~6	2	0(0)	0	0(0)	0
6 <sup>+</sup> 1~7	8	3(37.5%)	5	2(25%)	2
7 <sup>+</sup> 1~8	25	15(60%)	7	10(40%)	5
8 <sup>+</sup> 1~9	18	14(77.8%)	8	9(50%)	6
9 <sup>+</sup> 1~10	7	5(71.4%)	8	4(57.1%)	7
合计	60	37(62%)	30	25(42%)	21

### 3 讨论

目前经宫颈管获取胎儿细胞的方法共有5种:

宫腔内冲洗、宫颈内冲洗法、棉拭子法、宫颈黏液抽取法和宫颈细胞刷取材法。文献报道几种取材方法成功率为40%~90%不等,并已成功进行了胎儿性别、异常染色体和单基因病的产前诊断<sup>[2-5]</sup>。

采集细胞的成功率和采集到的细胞量往往与多种因素有关,例如取样方法、孕周、操作者的熟练程度、检测方法的敏感度。有研究表明早在孕5周时就可于宫颈处采集到滋养细胞<sup>[6]</sup>,但是目前还缺少大量的临床资料说明采集细胞的合适时间、采集细胞的合适方法。为了在取样时尽量避免母体细胞,并采集到更多的胎儿细胞,本实验尝试使用了纤支镜的取样的细胞刷,在经宫颈内口取样时尽量避免宫颈处的细胞。Imudia AN等<sup>[7]</sup>研究发现经宫颈细胞刷法取材的成功率高达95%,而且对后期的继续妊娠不会产生直接的负面影响。本实验使用宫颈管棉拭子、宫颈内口黏液吸引和宫颈内口处细胞刷的取样方法,经鉴定后发现宫颈内口细胞刷法取材的成功率明显高于另2组,且采集到的滋养细胞数量也明显多于另2组。但本实验中样本量偏小,在采集标本的适宜孕周方面探讨上,需更进一步的实验研究和验证,可能存在一定的误差。若比较出较适宜的取样孕周对实验的成功率及准确率上无疑是具有一定的推动作用。与Imudia AN的研究结果相似,考虑经宫颈细胞刷法较适合于经宫颈取样,因其细胞量采集较多更适合于后期的产前诊断。实验中,发现用棉拭子在宫颈内取样时容易出现细胞被卷入棉纤维中,因而不从棉签中脱落而造成取样的劣势,本实验中使用的包被较好的用于早产检测的无菌棉签可减少细胞的卷入。怀孕后宫颈处形成黏液栓以阻挡外界病原,用软管吸引宫颈内口黏液时容易因为黏液粘稠而不易吸出,可能会影响取样的成功率和细胞量。宫腔灌洗和经宫颈细胞刷2种方法采集的细胞数量均较多,但宫腔灌洗法的侵袭性较大,Chou等<sup>[8]</sup>报道在早孕期行宫腔灌洗易造成胎儿肢体缺陷,故本实验未采用此方法作为实验组。

CK-7是一种分子量54 kD的碱性细胞角蛋白,对3种类型滋养细胞均有表达,在间质细胞上不表达,但是因为CK-7在子宫腺上皮上也有明显的抗原表达,所以不适用于宫腔灌洗液样本中滋养细胞

的鉴定。因其敏感性较高,可作为经宫颈取样富集滋养细胞的初筛指标。HE染色鉴别滋养细胞虽然在临床工作中是可行的,但是主观性较强,且特异性不高,故选用CK-7较适合于细胞筛选。

通过我们的初步研究发现使用宫颈细胞刷法收集脱落滋养细胞的方法较其他方法能获得较多的细胞。可以用抗CK-7抗体等识别胎儿源性的滋养细胞,但是还需要寻找其他对滋养细胞更特异性更敏感的单克隆抗体。在取材中尽量选择损伤小又采集量多的方法,或者可以在超声引导下进行操作,从而使得早孕期产前诊断的可靠性和实用性会越来越高。

#### 参 考 文 献

- [1] 唐冬生,李晓杰,陈志华,等. 染色体异态性与早期生殖障碍[J]. 生殖与避孕, 2003, 23(1): 53-55.
- [2] Adinolfi M, Sherlock J, Tutschek B, et al. Detection of fetal cells in transcervical samples and prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities[J]. Prenat Diagn, 1995, 15(10): 943-949.
- [3] Bussani C, Cioni R, Scarselli B, et al. Strategies for the isolation and detection of fetal cells in transcervical samples[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(12): 1098-1101.
- [4] Cioni R, Bussani C, Scarselli B, et al. Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(3): 198-202.
- [5] Cioni R, Bussani C, Scarselli B, et al. Fetal cells in cervical mucus in the first trimester of pregnancy[J]. Prenat Diagn, 2003, 23(2): 168-171.
- [6] Cioni R, Bussani C, Bucciantini S, et al. Fetal cells in a transcervical cell sample collected at 5 weeks of gestation[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2005, 18(4): 271-273.
- [7] Imudia AN, Suzuki Y, Kilburn BA, et al. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study[J]. Hum Reprod, 2009, 24(9): 2086-2092.
- [8] Chou MM, Lin SK, Ho ES. Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 weeks' gestation[J]. Prenat Diagn, 1997, 17(1): 77-80.

编辑:郁君

(收稿日期:2013-01-25)