

· 论著 · 罕见病 ·

羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术在唐氏综合征产前筛查中的应用研究*

孙冬冬^{1,*} 刘杨¹ 郑雯¹ 海迪¹ 于秀杰²

1.商丘市第一人民医院遗传与产前诊断中心(河南 商丘 476000)

2.郑州大学河南医学院(河南 郑州 450052)

【摘要】目的 探讨羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术在唐氏综合征产前筛查效果。**方法** 选取2021年8月至2024年8月在我院妇女儿童保健医院医学遗传科进行羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术具有产前诊断高风险指征的孕妇120例作为研究对象,以胎儿游离DNA检测技术为金标准,分析羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术的诊断效能。**结果** 以胎儿游离DNA检测技术为金标准,通过胎儿游离DNA检测技术检出唐氏综合征19例(19%),染色体核型分析技术检出唐氏综合征16例(16%),准确率为84.21%(16/19);19例唐氏综合征的染色体分型中,单纯型有12例(63.16%),易位型有5例(26.32%),嵌合型有2例(10.52%);染色体核型分析技术在诊断唐氏综合征的ROC曲线下的AUC值为0.814,灵敏度和特异度分别为78.90%和87.73%,唐氏综合征孕妇具有较高风险的产前诊断指征,包括超声NT值增厚、年龄大于35岁、NIPT异常和唐氏筛查高风险,结合上述指征,染色体核型分析检出数量为16例。**结论** 羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术在唐氏综合征产前筛查中具有较高的诊断效能,包括较高的准确性、灵敏度和特异度,值得临床推广使用。

【关键词】 羊水穿刺羊水细胞培养; 染色体核型分析技术; 唐氏综合征; 产前筛查; 诊断效能

【中图分类号】 R714.53

【文献标识码】 A

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81650010)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2026.3.003

Application of Amniotic Fluid Cell Culture and Chromosome Karyotype Analysis in Prenatal Screening of Down Syndrome*

SUN Dong-dong^{1,*}, LIU Yang¹, ZHENG Wen¹, HAI Di¹, YU Xiu-jie².

1.Genetics and Prenatal Diagnosis Center, Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu 476000, Henan Province, China

2.Henan Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Abstract: Objective To investigate the effect of amniotic fluid cell culture and chromosome karyotype analysis in prenatal screening of Down syndrome.

Methods A total of 120 pregnant women with high risk of prenatal diagnosis who underwent amniotic fluid cell culture and chromosome karyotype analysis in the Medical Genetics Department of Women and Children's Health Hospital of our Hospital from August 2021 to August 2024 were selected as the study objects, and fetal free DNA detection technology was used as the gold standard. To analyze the diagnostic efficiency of amniotic fluid cell culture and chromosome karyotype analysis. **Results** Using fetal free DNA detection technology as the gold standard, 19 cases (19%) of Down syndrome were detected by fetal free DNA detection technology, and 16 cases (16%) were detected by chromosome karyotype analysis, with an accuracy of 84.21% (16/19). There were 12 simple types (63.16%), 5 translocations (26.32%) and 2 chimeric types (10.52%) in 19 cases of Down syndrome. The AUC value of chromosome karyotyping under the ROC curve for the diagnosis of Down syndrome was 0.814, and the sensitivity and specificity were 78.90% and 87.73%, respectively. Pregnant women with Down syndrome had high risk of prenatal diagnosis indicators, including ultrasound thickening of NT value, age greater than 35 years, abnormal NIPT, and high risk of Down's screening. Combined with the above indications, 16 cases were detected by karyotype analysis. **Conclusion** Amniocentesis amniotic fluid cell culture and chromosome karyotype analysis have high diagnostic efficacy in prenatal screening of Down syndrome, including high accuracy, sensitivity and specificity, and are worthy of clinical application.

Keywords: Amniocentesis Amniotic Fluid Cell Culture; Chromosome Karyotype Analysis Technique; Down's Syndrome; Prenatal Screening; Diagnostic Efficiency

唐氏综合征(down's syndrome, DS), 又称21三体综合征, 是新生儿中最常见的染色体非整倍体, 发病率约为1/7001, 其发病率随产妇年龄的增加而增加, 这种遗传疾病经常导致流产、死胎和胎儿结构异常。活产新生儿临床表现为面部特征明显、智力障碍、生长发育迟缓、多器官异常等, 给家庭和社会带来巨大的心理压力和经济负担^[1]。鉴于目前对这类先天性缺陷和相关病症的医疗干预存在局限性, 通过产前筛查和诊断实施二级预防和控制是降低染色体异常儿童出生率的有效策略。

产前诊断被广泛认为是预防胎儿出生缺陷的基本措施, 染色体核型分析被用作检测胎儿染色体疾病的细胞遗传学诊断的“金标准”, 随着技术的进步, 羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术在产前诊断领域的应用越来越广泛, 特别是对超声结构异常胎儿的诊断^[2]。羊水(amniotic water, AF)作为胎儿生长发育的环境, 含有来自胎盘和胎儿的物质, 可以避免因母体血液污染样本而导致假阳性结果的发生, 是识别胎儿病理的重要潜在生物标志物来源^[3]。遗传学的最新进展在染色体和结构异常的筛查和诊断方面取得了重大突破。过去, 染

【第一作者】 孙冬冬, 女, 主治医师, 主要研究方向: 产前筛查。E-mail: sun_dongdong298@163.com

【通讯作者】 孙冬冬

染色体异常的筛查几乎完全基于唐氏综合症, 仅以年龄为依据, 35~50岁的孕妇被认为是“高风险”或“高龄产妇”, 鉴于妊娠早期和妊娠中期筛查将无法检测出5%~20%的唐氏综合症, 在大多数情况下, 羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析应该是唐氏综合症的有效筛查。本研究选取了2021年8月至2024年8月在我院妇女儿童保健医院医学遗传科进行羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术具有产前诊断高风险指征的孕妇120例作为研究对象, 从而探讨羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术在唐氏综合症产前筛查效果, 以期为提高唐氏综合症的诊断率奠定理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择2021年8月至2024年8月在我院妇女儿童保健医院医学遗传科进行羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术具有产前诊断高风险指征的孕妇120例作为研究对象, 年龄20~45岁, 妊娠周16~18周。

纳入标准: 血清学筛查高危、高龄、超声异常、无创产前检查(NIPT)异常、夫妻核型异常、有不良妊娠结局史的; 自然单胎妊娠; 孕妇临床资料完整。排除标准: 有传染病的; 有精神系统疾病的; 羊水过少的。本研究经我院伦理委员会审核批准, 且所有孕妇均提供遗传前咨询, 所有参与者都被充分告知羊水穿刺和核型分析的优缺点。所有孕妇在羊膜穿刺术前均接受详细的遗传咨询并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 胎儿游离DNA检测技术 收集孕妇5mL外周静脉血样本, 放入含有EDTA的管中, 所有血样在8h内用离心处理得到血浆。取200 μ L母体血浆, 用BGISP-300(华大基因, 中国, 深圳)和核酸提取试剂盒(华大基因, 中国, 深圳)提取cfDNA。DNA提取后, 在37 $^{\circ}$ C 10min和65 $^{\circ}$ C 15min的循环条件下, 加入末端修复酶进行末端修复, 然后在23 $^{\circ}$ C 20min下, 用标签适配器和连接酶连接接头。在末端修复和接头连接后, 在以下循环条件下进行PCR扩增, 通过基因测序仪分析DNA片段序列与样本染色体非整倍体异常情况, 其中染色体拷贝数增加伴21三体染色体非整倍体异常为阳性, 染色体相关拷贝数正常为阴性^[4]。

1.2.2 羊水穿刺羊水细胞培养 羊水的收集和活细胞的分离: 在超声定位下对孕妇进行羊膜腔穿刺术, 抽取羊水20mL, 收集后, 将液体保存在4 $^{\circ}$ C直到处理, 羊水样品通过70 μ m和40 μ m细胞滤网, 转移到50mL管中, 在4 $^{\circ}$ C下300r/min离心10min, 丢弃上清, 向细胞中加入5mL羊水细胞培养基(广州白云山生物制药有限公司)放入37 $^{\circ}$ C体积分数为5% CO₂培养

箱中培养, 6~7d后细胞贴壁后可更换培养基, 继续培养1~2d后, 在显微镜下观察到圆形透亮的细胞, 且数量较多时可收获细胞进行后续研究^[5]。

1.2.3 染色体核型分析 从超声引导的羊膜穿刺术中收集羊水(30mL, 两管), 并根据标准细胞遗传学方案进行羊膜细胞培养。采用GSL-120自动扫描仪对培养羊膜细胞进行ISCN2016诊断标准分析。简单地说, 将30mL羊水分成两个15mL的离心管, 以1200r/min离心, 丢弃上清, 沉淀物每管重悬于羊水细胞培养基(广州白云山生物制药有限公司)4mL中, 分别接种于2个细胞培养瓶中。于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中培养细胞, 定期更换培养基。融合后收获细胞, 胰酶消化制备载玻片, 然后根据国际人类细胞遗传学命名系统(ISCN, 2016)对异常核型进行描述^[6]。

1.2.4 指标分析 以胎儿游离DNA检测结果作为本研究的金标准, 通过羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术分析筛查唐氏综合症, 结合工作特征曲线(ROC)分析羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术的诊断价值, 计算ROC曲线下面积(AUC)、敏感度以及特异度。

1.3 统计学方法 本研究中数据全部采用SPSS 20.0统计分析软件(美国IBM公司)进行处理; 计量资料采用“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 代表差异存在统计学意义。绘制ROC曲线分析曲线下面积, 进一步分析羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术的诊断价值。

2 结果

2.1 染色体核型分析技术与胎儿游离DNA检测技术筛查唐氏综合症比较分析 以胎儿游离DNA检测技术为“金标准”, 通过胎儿游离DNA检测技术检出唐氏综合症19例(19%), 染色体核型分析技术检出唐氏综合症16例(16%), 准确率为84.21%(16/19), 见表1。

2.2 唐氏综合症染色体核型分析 19例唐氏综合症的染色体分型中, 单纯型有12例(63.16%), 易位型有5例(26.32%), 嵌合型有2例(10.52%), 见表2。

2.3 染色体核型分析技术诊断唐氏综合症的价值 染色体核型分析技术在诊断唐氏综合症的ROC曲线下的AUC值为0.814, 灵敏度和特异度分别为78.90%和87.73%, 略低于胎儿游离DNA检测技术, 见表3。

2.4 不同产前诊断指征孕妇唐氏综合症检出数量对比 唐氏综合症孕妇具有较高风险的产前诊断指征, 包括超声NT值增厚、年龄大于35岁、NIPT异常和唐氏筛查高风险, 结合上述指征, 染色体核型分析检出数量为16例, 见表4。

表1 染色体核型分析技术与胎儿游离DNA检测技术筛查唐氏综合症比较分析(例)

筛查技术	胎儿游离DNA检测技术		合计	
	阳性	阴性		
染色体核型分析技术	阳性	16	4	20
	阴性	3	97	100
	总计	19	101	120

表2 唐氏综合征染色体核型分析(n=19)

类型	染色体核型	例数
单纯型	47, XY(XX), +21	5
	47, XY(XX), inv(9)(p12q13), +21	3
	47, X, Yqh-, +21	2
	47, X, Yqh+, +21	1
	47, XY, t(8;16)(p10;q24)pat, +21	1
易位型	46, XY(XX), der(14;21)(q10;q10), +21	2
	46, XY(XX), der(15;21)(q10;q10), +21	2
	46, XY, der(21;21)(q10;q10), +21	1
嵌合型	46, XY, der(21;21)(q10;q10), +21/[51]	1
	46, XY[34]/47, XY, +21[66]	1

表3 染色体核型分析技术诊断唐氏综合征的价值

筛查技术	AUC	95% CI	灵敏度(%)	特异度(%)
染色体核型分析	0.814	0.745~0.928	78.90	87.73
胎儿游离DNA检测技术	0.823	0.719~0.956	83.42	98.75
t	3.425	5.614	4.987	5.034
P	0.012	0.009	0.014	0.006

表4 不同产前诊断指征孕妇唐氏综合征检出数量对比(n=19)

产前诊断指征	例数	染色体核型分析检出数量
超声NT值增厚	5	4
孕妇高龄(>35岁)	4	3
NIPT提示异常	7	7
唐氏筛查高风险	3	2
共计	19	16

3 讨论

羊水穿刺术是指从子宫腔中经腹腔抽出羊水进行产前诊断的检测^[7]。自20世纪60年代以来,这一程序一直是获取胎儿遗传信息的常规方法,由于唐氏综合征的发育特点,或对产前检查的必要性认识不足,或由于医疗水平有限,错过了最佳的筛查诊断时间,在妊娠中后期仍有一些胎儿异常被发现。在我们的研究中,出于安全考虑,大多数孕龄在24~32周之间的准妈妈要求进行羊膜穿刺术而不是脐带穿刺术。事实上, Toti等学者^[8]比较了三种有创产前诊断技术,发现脐带穿刺术的并发症风险确实比经腹绒毛膜绒毛取样和羊膜穿刺术有统计学意义。

本研究发现:以胎儿游离DNA检测技术为“金标准”,通过胎儿游离DNA检测技术检出唐氏综合征19例(19%),染色体核型分析技术检出唐氏综合征16例(16%),准确率为84.21%(16/19);19例唐氏综合征的染色体分型中,单纯型有12例(63.16%),易位型有5例(26.32%),嵌合型有2例(10.52%);染色体核型分析技术在诊断唐氏综合征的ROC曲线下的AUC值为0.814,灵敏度和特异度分别为78.90%和87.73%,唐氏综合征孕妇具有较高风险的产前诊断指征,包括超声NT值增厚、年龄大于35岁、NIPT异常和唐氏筛查高风险,结合上述指征,染色体核型分析检出数量为16例,本研究的结果反映了一些胎儿结构异常的性质也有助于羊膜诊断。同样的,刘奕平等学者也发现^[9],在580例常规羊膜穿刺术组中,核型分析检测唐氏综合征为14.1%,胎儿游离DNA检测技术检出唐氏综合征为15.7%,与本研究的研究结果比较接近。Zhang

等发现^[10],在羊膜穿刺术晚期组,5.1%的孕妇染色体核型分析检测出临床显著结果,这些报道表明,在晚期母亲、父母焦虑和血清筛查阳性的患者中,染色体核型分析的诊断率提高了1.7%,即核型分析方法有效提高了染色体异常的检出率。在核型正常的产前诊断样本中,羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术可诊断出约1%的结构正常妊娠和6%的结构异常妊娠存在具有临床意义的亚染色体缺失或重复,此外,一项基于10614例胎儿的早期研究分析表明^[11],由亚显微畸变引起的原发性综合征障碍的患病率为1:270,当亚显微镜下异常的风险加上个体的显微镜下染色体畸变风险时,所有孕妇发生相关染色体畸变的风险大于1/180,这意味着亚显微异常对于产前诊断是必不可少的,且可以通过染色体核型分析检测到^[12]。

我们的数据还表明,核型分析可以发现胎儿游离DNA检测技术难以检测到的染色体平衡易位或嵌合,胎儿游离DNA检测技术的工作原理是将样本DNA与正常对照进行比较,这意味着平衡重排不会被胎儿游离DNA检测技术单独检测到。同时,染色体核型分析技术可以检测到可能导致出生缺陷的染色体片段的重复或缺失,这是胎儿游离DNA检测技术难以发现的。因此,染色体核型分析技术对不明原因发育迟缓/智力残疾、自闭症谱系障碍或多重先天性(MCA)的基因检测的检出率(15~20%),远高于胎儿游离DNA检测技术,强调了羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术在产前诊断中的重要作用^[13]。

综上所述,如果有必要,对24~32孕周的妇女进行羊水穿刺羊水细胞培养和染色体核型分析技术是安全可行的,可提高唐氏综合征的检出率,包括较高的准确性、灵敏度和特异度,值得临床推广使用。

参考文献

- [1] 梁文昱, 龚蔚蔚, 侯显良, 等. 唐氏综合征神经系统发育障碍疾病模型的构建及发病机制的研究进展[J]. 广西医学, 2022, 44(6): 650-653.
- [2] 韩雪, 闻柳, 宛杨. 唐氏筛查临界或高风险孕妇羊水染色体核型和基因组拷贝数变异结果分析[J]. 检验医学, 2023, 38(6): 548-552.
- [3] Santos FDRP, Kawata BA, Oliveira Heinzmann TR, et al. De-epithelization of the human amniotic membrane using a system involving ozonated water and ultrasound[J]. Bioengineering (Basel), 2024, 11(10): 987.
- [4] Zhang J, Wu Y, Chen S, et al. Prospective prenatal cell-free DNA screening for genetic conditions of heterogenous etiologies[J]. Nat Med, 2024, 30(2): 470-479.
- [5] 温丹霞, 曹南阳, 洪钦明, 等. 孕中期羊水细胞培养及染色体核型分析的应用研究[J]. 实用医技杂志, 2021, 28(2): 144-146.
- [6] Zhang L, Xiang J, Li J, et al. Karyotype analysis of Quasipaaspinosia David, 1875 (Anura, Dicroglossidae) with conventional cytogenetic techniques[J]. Comp Cytogenet, 2024, 18: 97-103.
- [7] 郑磊, 张雪瑞, 顾颜, 等. 高龄孕妇唐氏综合征筛查与羊水穿刺结果分析[J]. 当代医学, 2020, 26(7): 115-117.
- [8] Toti MS, Zannarichi L, Pasquini L, et al. Asymptomatic CMV infection at birth following maternal primary infection despite valacyclovir treatment and a subsequent negative amniocentesis. Case report[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2023, 291: 128-130.
- [9] 刘奕平, 周艳彬, 陈晓芳. 11460例羊水染色体核型分析在产前诊断中的应用价值分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2024, 32(8): 1718-1721.
- [10] Zhang LC, Yang XC, Jiang YH, et al. Screening and predictive biomarkers for Down syndrome through amniotic fluid metabolomics[J]. Prenat Diagn, 2024, 31, PMID: 39482571.
- [11] Chen CP, Wu FT, Pan YT, et al. Low-level mosaic trisomy 21 at amniocentesis and cordocentesis in the second trimester in a pregnancy associated with positive non-invasive prenatal testing for trisomy 21, perinatal progressive decrease of the trisomy 21 cell line and a favorable fetal outcome[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2024, 63(3): 391-393.
- [12] 刘建生. 染色体微阵列技术在胎儿遗传学诊断中的应用[J]. 罕少疾病杂志, 2023, 30(6): 100-101.
- [13] 赖晓敏, 刘桂英, 黄敏红. 闽西地区羊水细胞染色体核型及产前诊断指征分析[J]. 罕少疾病杂志, 2024, 31(7): 102-121.

(收稿日期: 2024-05-30)
(校对编辑: 韩敏秋)
(排版编辑: 刘淮嘉)