

- [10] ALPERIN M, ELLISON R, MEYN L, et al. Two-year outcomes after vaginal prolapse reconstruction with mesh pelvic floor repair system[J]. Female Pelvic Med Reconstr Surg, 2013, 19(2): 72-78.
- [11] NICHOLAS D, ELVIS I, ROBERT T, et al. Long-term outcomes of laparoscopic repair of cystocele[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2015, 55(6): 588-592.
- [12] MOHAMED M H, ALAA E H E, WAEL I A, et al. E-

ring paravaginal support defects: a comparative trial[J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 288(6): 1341-1348.

- [13] METTU J R, COLACO M, BADLANI G H. Evidence-based outcomes for mesh-based surgery for pelvic organ prolapse[J]. Curr Opin Urol, 2014, 24(4): 370-374.

- [14] 杨阳, 谢静燕. 老年女性盆底手术治疗的相关进展[J]. 实用老年医学, 2016, 30(4): 275-278.

(收稿日期: 2020-09-23 修回日期: 2021-01-12)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.030

外周血淋巴细胞染色体 G 显带制备方案优化研究*

谢晓贞, 陈颖[△], 杜涛, 张嘉宁, 吕杰忠, 吴夏龙, 彭玉婷, 李慧妍, 林丽婷
中山大学孙逸仙纪念医院产前诊断中心, 广东广州 510120

摘要:目的 采用一管法、同步法、一管法+同步法进行人外周血淋巴细胞培养+染色体核型分析, 与目前的外周血染色体 G 显带制备方法进行优化, 以期获得更理想的方法。方法 随机选取 2018 年 12 月至 2020 年 6 月在该院就诊的 100 例患者作为研究对象, 同时进行常规法、一管法、常规法+同步法、一管法+同步法 4 种方法制备外周血染色体, 比较染色体的制备过程、数量和质量。结果 4 种检测方法在培养成功率、收获细胞数、有丝分裂指数方面比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 但使用同步法制备过程, 染色体 G 显带 550 条带以上的染色体中期分裂相数目获得率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 4 种检测方法在制备染色体过程中均比较稳定, 采用一管法+同步法可弥补常规方法的不足, 可有效获得高分辨率染色体, 适合在临床实践中推广使用。

关键词: 外周血; 淋巴细胞; 染色体; G 显带; 同步法; 高分辨率

中图分类号: R446.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)10-1452-03

自 MOORHEAD 等^[1]在 1960 年建立人外周血淋巴细胞培养技术后, 外周血染色体检测已成为细胞遗传学研究的重要基础, 染色体 G 显带长度和带型丰富程度成为诊断染色体结构异常的关键。常规染色体培养技术存在过程操作繁琐、技术要求高、耗时费力、显带不理想、分辨率不高等问题^[2], 鉴于此, 本研究在以往学者的基础上, 将已经比较稳定、成熟的一管法、同步法、一管法+同步法联合使用, 以期弥补常规方法的不足, 以期获得更理想的结果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2018 年 12 月至 2020 年 6 月在本院就诊的 100 例(包含成人与婴幼儿)患者作为研究对象, 采集静脉血检测。每份标本同时采用常规法、一管法、常规法+同步法、一管法+同步法 4 种方法进行比较。

1.2 仪器与试剂 Chromosome Dispersion System 染色体分散仪、Leica Cytovision GSL station 自动扫描显微镜和图像分析系统、二氧化碳培养箱、淋巴细胞培养瓶、RPMI1640 培养管、细胞预处理试剂盒、秋水仙碱 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、胰酶。

1.3 细胞接种+培养 分别将 0.5 mL 肝素钠抗凝血无菌接种于编号 1(常规法)、编号 2(一管法)、编号 3(常规瓶法+同步法)、编号 4(一管法+同步法)的培养瓶/管中, 每组接种 1 支, 摇匀后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱。

1.4 分组

1.4.1 常规法 常规培养 72 h, 加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水仙碱 25 μL , 作用 2.5 h 取出, 将血液标本转移到编号 1 的离心管中并离心。

1.4.2 一管法 常规培养 72 h, 加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水仙碱 25 μL , 作用 2.5 h 取出后直接离心, 不需要开瓶盖和转移血液标本。

1.4.3 常规法+同步法 培养 48 h 后, 无菌条件下加入细胞预处理试剂盒中 CS-A 试剂 100 μL 并摇匀, 静置培养 17 h 后, 在无菌条件下加入 CS-B 试剂并摇匀, 静置 5 h 后加入秋水仙碱作用 2.5 h 取出, 将血液标本转移到编号 3 的离心管中并离心。

1.4.4 一管法+同步法 培养 48 h 后, 无菌条件下加入细胞预处理试剂盒中 CS-A 试剂 100 μL 并摇匀, 静置培养 17 h 后, 在无菌条件下加入 CS-B 试剂并摇匀, 静置 5 h 后加入秋水仙碱作用 2.5 h, 取出后直接

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030310064); 中山大学临床医学研究 5010 计划(2012006)。

[△] 通信作者, E-mail: YingZ1221@163.com。

本文引用格式: 谢晓贞, 陈颖, 杜涛, 等. 外周血淋巴细胞染色体 G 显带制备方案优化研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(10): 1452-1454.

离心,不需要开瓶盖和转移血液标本。

1.5 细胞收获与制片 经常规低渗、预固定、固定、制片、吉姆萨染色,全自动染色体扫描仪选取、拍摄核型,按《人类细胞遗传学国际命名体制 ISCN(2016)》分析和诊断染色体核型。每组每份常规制作 2 张玻片。

1.6 观察指标

1.6.1 有丝分裂指数 每份标本计数 200 个细胞(含 M 期细胞),分别计数分裂期和非分裂期细胞,计算细胞分裂指数。细胞分裂指数 = 分裂期细胞数 / 全部细胞数 × 100%。

1.6.2 G 显带 ≥ 320 带可供分析中期分裂相 工作站扫片后统计,每张玻片观察 100 个分裂相,计数 ≥ 320 带染色体中期分裂相数目,以及不同显带细胞数所占比例。质量评价条带的选取:参照《人类细胞遗传学国际命名体制 ISCN2016》Fig. 5 所示的染色体核型示意图选取 12 条质评条带,质评条带可见最低分辨率以 400 和 550 条带水平为主^[3]。对同一标本的核型分析及质量评价均由固定的 2 名专业技术人员完成。

1.6.3 收获细胞数 以可制片数量评价。

1.6.4 培养成功率 存在 20 个可供计数染色体核型,5 个以上可供分析核型。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数

据分析处理。计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

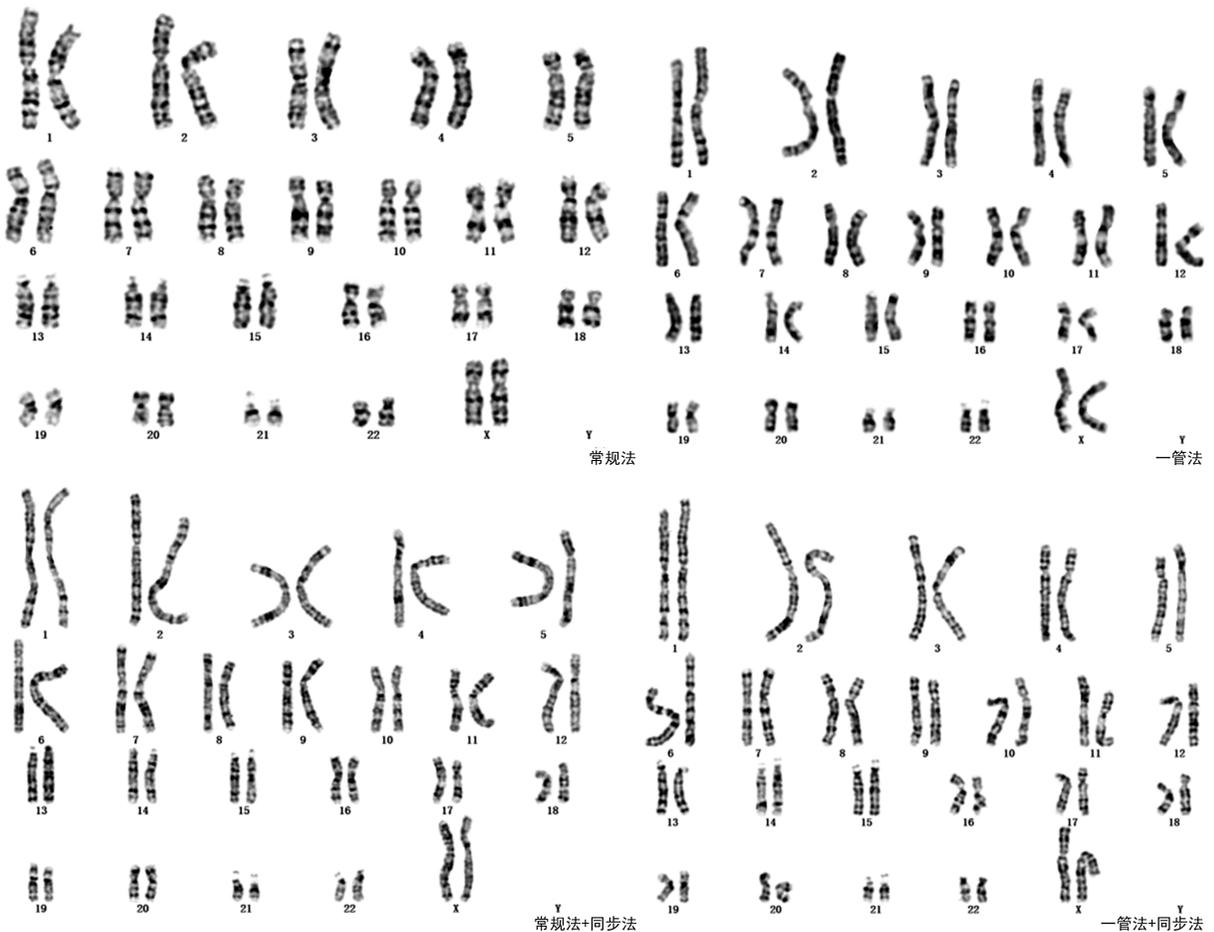
2 结果

2.1 4 种检测方法有丝分裂指数、收获细胞数、培养成功率比较 一管法、常规法 + 同步法、一管法 + 同步法有丝分裂指数、收获细胞数、培养成功率与常规法比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 中期分裂相比较 一管法与常规法显带细胞数量和质量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);常规法 + 同步法 G 显带 ≥ 320 带的染色体中期分裂相数目均数较常规法明显增加, > 400 ~ 550 带核型占比达到 51.1%,并且发现 23.9% 的 > 550 带的高分辨率核型,与常规法以上项目比较,差异也均有统计学意义($P < 0.05$);一管法 + 同步法与常规法以上项目比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

表 1 4 种检测方法细胞有丝分裂指数、可制片数量和成功率比较

检测方法	有丝分裂指数 (%)	收获细胞数 (个)	培养成功率 (%)
常规法	7.35	>10	100
一管法	7.65	>8	100
常规法+同步法	5.75	>10	100
一管法+同步法	6.05	>8	100



注:组 1 为常规法 G 显带核型图;组 2 为一管法 G 显带核型图;组 3 为常规法 + 同步法 G 显带核型图;组 4 为一管法 + 同步法 G 显带核型图。

图 1 示例 6 染色体核型

表 2 4 种检测方法获得 G 显带 ≥ 320 带染色体分析

检测方法	G 显带 ≥ 320 带染色体中期分裂相数目均数(<i>n</i>)	320~400 带占比(%)	>400~550 带占比(%)	>550 带占比(%)
常规法	51	57.4	42.6	0.0
一管法	47	50.6	49.4	0.0
常规法+同步法	88*	25.0	51.1*	23.9*
一管法+同步法	82*	22.9	61.7*	15.4*

注:与常规法比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

3.1 人外周血淋巴细胞培养+染色体核型分析是细胞遗传学研究的重要手段 染色体核型分析结果的准确性取决于染色体的质量、显带及染色体的长度。染色体越长,带纹越丰富,分辨率越高。因此,本研究对目前外周血染色体 G 显带制备方法进行优化,以期获得质量更高的制备外周血染色体的方法。

3.2 传统淋巴细胞培养 传统淋巴细胞培养是在有铝盖的玻璃瓶中进行,收获时需用工具撬开铝盖,方能将标本转移到做好标记的离心管中。在此过程中,撬开瓶盖的过程费时、费力,且容易造成工作人员损伤,转移过程还有可能导致标本混淆,造成医疗差错。因此,选用一管法代替常规法,省去开盖的步骤,不需要转移培养液,杜绝了这些步骤潜在的风险,可简化过程,提高效率^[4-5]。同时,本研究对一管法与常规法在有丝分裂指数、G 显带 ≥ 320 带染色体中期分裂相数目、收获细胞数、培养成功率等进行比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明一管法能够获得稳定、理想的染色体结果。

3.3 外周血染色体常规制备法 G 显带标准为 320~400 条带,但常常会造成一些异常结构的误诊和漏诊^[6]。

高分辨率染色体正中期显示 400 条带,早中期显示 400~550 条带,前中期显示 550~800 条带,晚前期显示 850~1 250 条带。虽然带纹越多越有利于进行遗传学分析,但带纹越长操作越繁琐,染色体交叉越多,也难以辨识。按照国际标准分析,500~550 条带的染色体核型已能满足常规临床应用。

要尽可能多地获得显带条数多、交叉较少的染色体,需要有较多分裂相及大量处于细胞分裂早中期的细胞,这在普通培养条件下难以实现。已经有兄弟单位摸索出同步化方法处理后,使大量细胞处于分裂早期,就可以根据实验需要获得不同显带标准的染色体,使大多数分裂相均为 500 条带左右,但又不至于过长^[7]。目前这一方法愈发成熟,并且已商品化。

本研究使用的是已商品化的细胞预处理试剂盒,

分为 CS-A 和 CS-B 两种试剂,CS-A 主要包含胸腺嘧啶核苷,其可逆地抑制 DNA 合成,将大多数细胞同步于 S、G₁/S 期的边界。CS-B 主要包含脱氧胞苷,加入 CS-B 后,CS-A 阻滞释放,细胞同步进行有丝分裂,在适当的时候加入秋水仙碱,可获得早中期分裂相。

常规染色体制备,仅通过秋水仙碱处理,无法获得足够的 G 显带达到 500 条带的染色体核型。用同步化方法制备染色体,不仅获得了足够的 500 条带甚至 550 条带以上的 G 显带染色体,而且制备出的染色体条带清晰,外形完整。

本研究发现,一管法、同步法均已经相当稳定、成熟,因此,如果在染色体制备中采用一管法和同步法联合使用,既不互相干扰,又可获得二者的优势,可以在临床实践中推广使用。

参考文献

- [1] MOORHEAD P S, NOWELL P C, MELLMAN W J, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood[J]. Exp Cell Res, 1960, 20: 613-616.
- [2] 郭莉,何轶群,钟银环,等.改良高分辨 G 显带技术在复杂染色体重排携带者中的应用[J].热带医学杂志,2019,19(5):591-595.
- [3] 胡亮,罗小金,丛潇怡,等.外周血淋巴细胞 G 显带高分辨染色体制片效果量化分析[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2019,38(1):53-55.
- [4] 刘天盛,郑茜,郑陈光,等.一管法制备染色体临床对照研究[J].中国实用妇科与产科杂志,2014,30(8):619-622.
- [5] 张建林,杨益梅,王珊珊,等.外周血淋巴细胞培养及改良同步化无水乙醇乙酸染色体制备技术[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(4):77-78.
- [6] 张凤芹,丁红炜,石庆芳,等.关于外周血染色体制备方法的改进[J].中国误诊学杂志,2009,9(8):1198.
- [7] 吴菁,尹爱华,傅文婷,等.改进同步化法制备外周血染色体 500 条 G 显带技术的临床应用研究[J].中华医学遗传学杂志,2013,30(3):377-378.

(收稿日期:2020-09-16 修回日期:2021-01-02)