DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.026
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1285-03

论著

胎儿细胞进入孕妇血循环的实验研究

朱 静[1],王亚平[2],康格非[3],张晓平[1] (重庆医科大学:[1]儿科研究所;[2]基础医学院组织胚胎学教研室;[3]检验系,重庆 400014)

提 要:目的 从胎盘组织中寻找胎儿细胞穿越胎盘屏障,进入孕妇外周血的实验室证据,为利用孕妇外周血进行无创性产前基因诊断提供实验依据。方法 分娩胎盘组织22份(男婴的12份,女婴的10份),平行切片,分2组:一组HE染色,光镜观察绒毛中胎儿细胞的分布;另一组用Dig-碱性磷酸酶标记SRY区域(Sex determining region)基因扩增片断制成探针,通过原位杂交鉴定胎盘绒毛内,特别是绒毛间隙胎儿细胞的存在。阳性对照由男性外周血有核细胞涂片经原位杂交提供。结果 HE染色光镜观察:22例胎盘组织切片可见胎儿细胞有穿越绒毛毛细血管内皮和滋养层基膜的现象。胎盘组织原位杂交结果显示:分娩男婴的12份胎盘切片的绒毛毛细血管腔内、绒毛滋养层基膜边缘,以及绒毛间隙,可见阳性信号;分娩女婴的10份胎盘切片均无阳性信号出现;阳性对照涂片杂交后可见清晰阳性信号。结论 胎盘组织切片常规HE染色观察胎儿细胞分布,结合原位杂交技术鉴定绒毛内、绒毛间隙细胞的性质,可以初步反映胎儿微量遗传物质穿越胎盘进入母亲血液循环的过程。

关键词:胎盘;原位杂交;胎儿遗传物质;产前基因诊断
中图法分类号:R446.1;R714.55 文献标识码:A

Experimental study of the fetal cells crossing the placenta into the maternal circulation

ZHU Jing, WANG Ya-ping, KANG Ge-fei, ZHANG Xiao-ping (Research Institute of Pediatrics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the proof of fetal cells passing through the placental barrier into the maternal peripheral blood to provide laboratory data for the non-invasive prenatal gene diagnosis of genetic diseases. Methods A total of 22 samples of placental tissues delivered (male fetus: 12, female fetus: 11) were divided into two groups for parallel section. HE staining was used to find the distribution of fetal cells in chorionic villi. *In situ* hybridization (ISH) technique with SRY DNA probes was used to identify the existence of fetal cells in placental villi, particularly in intervillous space. Results Light microscope examination revealed that there were fetal cells that passed through the capillary endothelium of villi and trophoblast basement membrane in the placental tissue sections of the 22 samples. ISH with SRY DNA probe also revealed that there were positive signals in the capillary of villi, at the edge of trophoblast basement membrane and in intervillous space in the placental tissue sections of the 12 placentas, but no signals were found in 10 female placentas. Conclusion This study demonstrates that the distribution of the fetal cells in the chorionic villi and intervillous space could be identified. The detection of fetal DNA in maternal circulation is one of the candidate approaches for non-invasive prenatal gene diagnosis.

Key words: *in situ* hybridization; placenta; fetal genetic material; prenatal diagnosis

对于我国已经出现的各种遗传性疾病发病率增高的现状,优生工作亟待解决的问题之一是通过什么途径可以实施大范围的产前诊断,为每一对夫妇提供胎儿发育的准确信息。因此,无创性产前基因诊断就成为优生研究领域的热点。本研究以胎儿与母体在胎盘可以进行物质交换,并有微量的胎儿遗传物质穿越胎盘屏障直接进入母体血循为理论前提[1~3],用HE染色观察胎盘绒毛中胎儿细胞的分布状况,再利用男性特异性性别标志(SRY)核酸探针,对平行切取的胎盘组织切片进行原位杂交,以显示胎儿特异的遗传物质进入母体的过程,为无创性产前基因诊断在实际中的应用提供有力的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 检测对象

①22例孕妇足月分娩后的胎盘组织(分娩男婴12例,女婴10例),由重庆医科大学附属第二医院产科提供,采集后立即存于固定液(乙醇:醋酸=3:1),4 ℃冰箱储放。②阳性对照标本:

基金项目:重庆市科委应用基础研究资助项目([2001]54-66)
作者简介:朱 静(1967-),女,四川省内江市人,硕士,主管检验师,主要从事分子遗传方面的研究。电话:(023)63622754
收稿日期:2003-02-17;修回日期:2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

随机抽取 1 名男性静脉抗凝血 1 ml，低渗溶血法制备有核细胞悬液，涂片备用。

1.2 方法

1.2.1 胎盘组织的形态学观察 常规 HE 染色，光镜下观察组织结构、形态以及细胞分布情况，并选择典型视野照相记录。

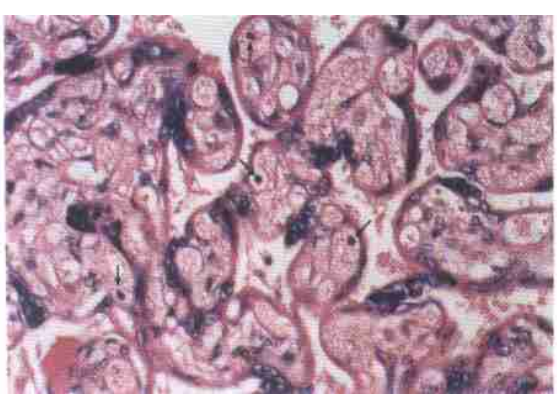
1.2.2 胎盘组织的原位杂交 ① 探针的制备：采用性别 Y 染色体 SRY 基因高保守区特异性引物（由上海细胞生物研究所合成），通过 PCR 特异性地扩增长度为 143 bp 的 DNA 片段，经纯化、测序鉴定、Dig-碱性磷酸酶标记后作为杂交的探针。② 标本的准备：石蜡包埋、切片、脱蜡、消化蛋白（1 μg/ml 蛋白酶 K，37 ℃消化 20～25 min 后用 0.2 mol/L 的甘氨酸，室温 10 min，终止酶反应）、4% 多聚甲醛再固定、乙醇系列脱水、干燥。③ 杂交：先用预杂交液（德国，罗氏公司购置）42℃预杂交 30 min，再加入预温的杂交液（酶标 Dig 探针 1.5 μl 加入预杂交液 500 μl 混匀），硅化盖玻片封片，将切片置于 95 ℃，10 min 变性，迅速置于冰上，最后将切片置于盛有 2XSSC 湿盒内，42 ℃杂交过夜。④显色检查：杂交后经漂洗、封阻、地高辛抗体（1∶5 000）反应，漂洗后 NBT 显色，伊红复染，二甲苯透明，树胶封片，选择典型视野照相记录。

阳性对照，即男性外周血有核细胞涂片，用 SRY 基因 DNA DIG 标记探针作原位杂交；阴性对照，即男性外周血有核细胞涂片，处理程序同于阳性对照，仅不加探针。

2 结果

2.1 分娩胎盘的组织学观察

胎盘组织切片中可见：合体滋养层细胞已转变成一层连续的扁平细胞贴在绒毛表面，细胞滋养层细胞极少，呈扁平形，大部分区域只有残存的细胞束及零散的细胞。绒毛中轴内可见大量扩张的毛细血管，管中有小而圆形的胎儿有核细胞，它们中有的与血管内皮紧贴，有的已穿过毛细血管管壁存在于绒毛中轴的结缔组织中，见图 1，还可见正在穿越滋养层上皮的胎儿细胞，见图 2。这些均提供胎儿细胞穿越胎盘屏障的形态证据。



Arrows show the fetal cells in the chorionic villi

图 1 女性胎儿胎盘组织切片 （HE× 400）

Fig 1 Tissue sections of the placentas (female) （HE× 400）

2.2 核酸探针原位杂交观察

阳性对照涂片：阳性杂交信号呈清晰的深蓝色圆形斑点，见图 3（不用伊红复染），散在分布于涂片上。阴性对照涂片：未见任何阳性信号。胎盘组织切片经原位杂交显示：12 例分娩男婴的胎盘切片有典型的阳性杂交信号显示，均为深蓝色小圆斑点，伊红复染胞浆呈均匀的淡紫红色，阳性信号主要在绒毛中轴毛细血管腔内、结缔组织中，绒毛间隙内有零散分布的杂交信号出现，见图 4；而 10 例分娩女婴的胎盘组织无 1 例出现阳性杂交信号。



Arrows show that the fetal cells are crossing through the capillary and chorionic villi

图 2 男性胎儿胎盘组织 （HE× 400）

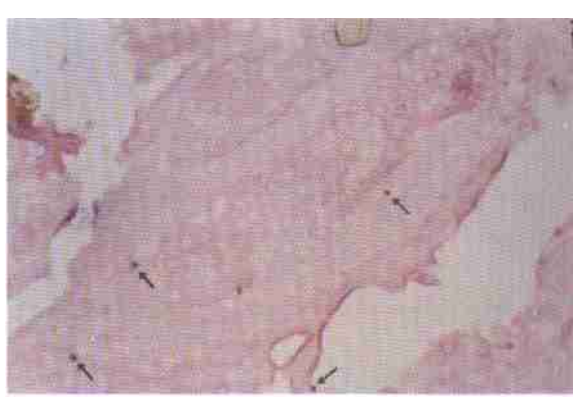
Fig 2 Tissue sections of the placentas (male) （HE× 400）



Arrows show the positive signals

图 3 男性外周血有核细胞涂片原位杂交结果 （ISH× 400）

Fig 3 Results by *in situ* hybridization of the male blood cell slide （ISH× 400）



Arrows show the SRY positive signals in the chorionic villi and some are in the intervillous space

图 4 男婴胎盘组织原位杂交结果 （ISH× 400）

Fig 4 Results by *in situ* hybridization of the male placental tissue （ISH× 400）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

过去的研究已经证明胎盘屏障是一选择性透过膜, 营养物质, 代谢物质, 抗体蛋白可以定向通过, 而有些大分子物质, 尤其是有害物质、细菌、血细胞等一般不能通过。1969 年 Walkknowska 在孕妇外周血中发现核型为46XY 的淋巴细胞, 后续的研究证明: 这些细胞来自于男性胎儿, 推测这些细胞是经胎盘转移到母体循环中的。随着近年来特殊检测手段的提高, 现已基本证实: 在妊娠期内进入母体的胎儿细胞包括滋养层细胞、淋巴细胞、粒细胞和有核红细胞[4,5]。但是, 胎儿细胞是通过怎样的途径进入母体血循环的? 本研究以胎盘组织为研究对象, 通过形态学观察和核酸原位杂交技术鉴定, 寻找胎儿遗传物质通过胎盘屏障的证据, 旨为开展无创性产前基因诊断提供实验依据。

3.1　胎儿细胞穿越胎盘屏障的形态学证据

我们观察了正常分娩的胎盘组织切片, 显示绒毛中轴扩张的毛细血管腔中除充满大量的红细胞外, 还可见小而圆形, 深染的胎儿有核细胞。从理论上讲, 滋养层细胞是可以脱落直接进入母体血循环, 而淋巴细胞、粒细胞和有核红细胞存在于胎儿血循环中[6~11], 它们要进入母体血循环惟一的途径就是穿越胎盘屏障。外周血细胞穿越上皮的生物学行为在成体组织已是存在的事实, 如淋巴细胞穿越小肠的单层柱状上皮, 进入肠腔; 粒细胞穿越血管内皮进入组织, 参与杀灭病原微生物的炎症反应, 这些说明血液细胞穿越上皮进入其它组织是一个普遍存在的细胞生物学行为。而通过我们的形态学观察也说明胎儿细胞穿越胎盘屏障是整体生物学行为的一部分。这一实验证据为我们通过孕妇外周血进行产前基因诊断奠定了理论基础。

3.2　原位杂交分析胎盘绒毛间隙细胞的性质

从 HE 染色的切片中我们在绒毛间隙, 也就是与母体血循环直接相通的部分, 观察到有散在分布的小而圆形深染细胞, 但其中哪些属于胎儿细胞仅凭常规的HE 染色观察是难以定论的。为了确证这一点, 我们采用了核酸原位杂交技术以鉴定其性质。选择男性 Y 染色体性别决定区域(Sex determining region)特定的基因扩增片段 Dig-碱性磷酸酶标记后制备成 DNA 探针, 以男性外周血有核细胞涂片为阳性对照, 进行原位杂交, 有清晰的阳性杂交信号出现, 说明本实验制备的探针有高度的特异性。然后, 我们利用制备的探针对胎盘切片进行同样程序的实验, 结果表明: 12 例分娩男婴的胎盘组织切片有阳性杂交信号出现在绒毛中毛细血管腔内、绒毛中的结缔组织中, 而绒毛间隙也捕获到这种阳性信号。这与我们在光镜形态上观察到的结果互相吻合, 从而直观地显示了少量胎儿细胞是能够穿越胎盘屏障进入母体血循环。

过去的报道都集中在孕妇外周血中微量胎儿遗传信息的检测方法学上的讨论, 而本实验结果为围产期进一步深入研究胎儿遗传信息的传递以及利用孕妇外周血微量的胎儿遗传物质进行产前基因诊断提供了有力的实验室证据。

参考文献:

[1] Lo Y M, Lo E S, Watson N, *et al*. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications[J]. Blood, 1996, 88(11): 4390－4395.

[2] Lo Y M, Corbetta N, Chamberlain P F, *et al*. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485－487.

[3] Lo Y M, Hjelm N M, Fidler C, *et al*. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma[J]. New Engl J Med, 1998, 339(24): 1734－1738.

[4] 李　智, 夏铁安. 孕妇外周血胎儿有核红细胞的分离与检测[J]. 中华医学遗传学杂志, 1998, 15(2): 111－114.

[5] Lo Y M, Tein M S C, Lau T K, *et al*. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768－775.

[6] Lo Y M. Fetal DNA in maternal plasma: application to non-invasive blood group genotyping of the fetus[J]. Transfus Clin Biol, 2001, 8(3): 306－310.

[7] Lo Y M, Leung T N, Tein M S C, *et al*. Quantitive abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia[J]. Clin Chem, 1999, 45(2): 184－188.

[8] Bianchi D W, Williams J M, Sullivan L M, *et al*. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies[J]. Am J Hum genet, 1997, 61(4): 822－829.

[9] Leung T N, Zhang J, Lau T K, *et al*. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour[J]. Lancet, 1998, 352(9144): 1904－1905.

[10] Chan V, Lau K, Yin B, *et al*. Diagnosis of spinal muscular atrophy from fetal normoblasts in maternal blood[J]. Lancet, 1998, 352(9135): 1196－1198.

[11] Smith S C, Baker D N, Symonds E M, *et al*. Placental apoptosis in normal human pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177(1): 57－65.

（编辑　栾　嘉）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net