

- fractures without neurological deficit[J]. Spine, 2001, 26(9): 1038-1045.
- [4] MAHAR A, KIM C, WEDEMEYER M, et al. Short-segment fixation of lumbar burst fractures using pedicle fixation at the level of the fracture[J]. Spine, 2007, 32(14):1503-1507.
- [5] GUVEN O, KOCAOGLU B, BEZER M, et al. The use of screw at the fracture level in the treatment of thoracolumbar burst fractures[J]. J Spinal Disord Tech, 2009, 22(6):417-421.
- [6] 丁旭明, 赵智. 通过上下相邻椎体高度测量计算病椎原始高度的可靠性[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(6):522-523.
- [7] 王翔, 瞿东滨, 蔡毅, 等. 胸腰椎骨折内固定术后伤椎椎体中央高度恢复的影像学研究及临床意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26(12):1087-1092.
- [8] VERLAAN J, DHERT W J A, ONER F C. Intervertebral disc viability after burst fractures of the thoracic and lumbar spine treated with pedicle screw fixation and direct end-plate restoration [J]. Spine J, 2013, 13(3):217-221.
- [9] 王雷, 夏天, 田纪伟, 等. 后路短节段固定联合伤椎置钉治疗胸腰段单椎体骨折[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(13):886-889.
- [10] 廖旭昱, 马维虎, 刘观焱, 等. 伤椎螺钉的空间位置对AO分型A型胸腰椎骨折椎体高度的影响分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2021, 23(7):564-570.
- [11] 纪木强, 欧阳敏仪, 李伟强, 等. 基于日常生活活动能力评定的骨质疏松性椎体压缩骨折老年患者3年结局随访[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(1):77-80.
- [12] 张琰, 刘晓东, 蔡丰, 等. 后路内固定联合伤椎球囊扩张植骨预防胸腰段爆裂性骨折术后矫正度丢失的远期疗效评价[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(16):1441-1444.
- [13] ALANAY A, ACAROGLU E, YAZICI M, et al. Short-segment pedicle instrumentation of thoracolumbar burst fractures: Does transpedicular intracorporeal graft prevent early failure [J]. Spine, 2001, 26(2):213-217.

100例稽留流产的病因分析

闵爱萍, 许洪梅, 冯欣, 罗晓, 梁琼华 (乐山市人民医院妇产科, 四川乐山 614000)

摘要: 目的 分析稽留流产的病因。方法 收集100例稽留流产的胚胎或绒毛组织行高通量测序技术检测, 分析导致稽留流产原因。结果 100例样本中染色体数目异常52.0%, 结构异常2.0%; 染色体非整倍体率为96.3%(52/54), 以染色体结构重复为主, 缺失次之; 夫妻染色体异常导致的胚胎染色体异常为18.5%(10/54); 微重复(<10 Mb)占16.7%(9/54); 拷贝数变异(CNV)84例, 致病CNV有65个(占77.4%)。在其他影响因素中, 以病原微生物感染、高纤维蛋白原血症、高同型半胱氨酸血症较多。结论 稽留流产最常见原因是胚胎染色体异常。

关键词: 稽留流产; 染色体; 高通量测序技术

中图分类号: R 714.21

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2022)02-0222-04

Etiology of 100 missed abortion cases

MIN Ai-ping, XU Hong-mei, FENG Xin, LUO Xiao, LIANG Qiong-hua (Department of Obstetrics and Gynecology, Leshan People's Hospital, Leshan 614000, China)

Abstract: Objective To analyze the causes of missed abortion. Methods The embryo or villus tissue of 100 missed abortion cases underwent high-throughput sequencing. The causes of missed abortion were analyzed. Results The abnormal number and structure of chromosomes were 52.0% and 2.0%. The chromosomal aneuploidy was 96.3% (52/54), with duplication and deletion being the most. Chromosomal abnormalities in embryos caused by marital chromosomal abnormalities and microduplications (<10 Mb) were 18.5%(10/54) and 16.7% (9/54), respectively. The copy number variation (CNV) were seen in 84 cases, of which 65 CNVs (77.4%) were pathogenic. Among other influencing factors, pathogenic infections, hyperfibrinogenemia and hyperhomocysteinemia were more common. Conclusion Chromosomal abnormalities in embryos are the most common causes of missed abortion.

Key words: missed abortion; chromosome; high-throughput sequencing

收稿日期: 2020-10-12

基金项目: 四川省医学科研青年创新课题项目(Q16036)

作者简介: 闵爱萍(1978—), 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: map5198@163.com

胚胎停育是指妊娠早期胚胎因某种原因所致发育停滞,B超表现为妊娠囊内胎芽或胎儿形状不整,无胎心搏动,或表现为枯萎囊。胚胎停育的病因和发病机制都与流产相似,临床称之为稽留流产(MAB)又称过期流产,指胚胎或胎儿已死亡滞留宫腔内未能及时自然排出^[1],约占临床的15%~20%,导致弥散性血管内凝血(DIC)的风险增加,可发生多次成为复发性流产(RSA),严重影响孕妇身心健康。常见病因有胚胎染色体异常、解剖异常、内分泌异常、感染因素、自身免疫因素等^[2]。目前检测胚胎染色体异常的方法众多,染色体微阵列(CMA)是一种先进的遗传学检测方法,已被国际细胞遗传协作组推荐为检测先天性发育障碍以及先天畸形的首选方法。本研究采用高通量测序技术(NGS)检测稽留流产胚胎及绒毛组织染色体DNA拷贝数,同时收集患者的一般资料和相关原因,旨在对再次妊娠者采取针对性的孕前优生指导^[3]。

1 资料和方法

1.1 一般资料

收集2015年12月—2020年1月在我院稽留流产患者流产组织样本100例,其中1次稽留流产者37例,≥2次者63例。纳入标准:(1)流产或引产前B超检查提示胚胎或胎儿停止发育;(2)超声提示无胎心搏动;(3)孕周<37周;(4)经医院科技委员会(No.[2016]11号)和伦理委员会(No.[2016]38号)通过;(5)患者知情同意并签署知情同意书。排除标准:(1)已知有家族性基因遗传疾病;(2)计划不再生育者;(3)样本不合格;(4)患者及家属放弃检测。患者年龄为20~42岁,平均年龄(29.0±4.84)岁,胚胎停育孕周为孕6⁺⁵~36⁺⁵周。收集夫妻双方一般资料,包括婚育史、孕产史、不良妊娠史、月经情况、孕期保胎药物使用情况、有毒有害物质接触情况、周围环境情况、孕期心理情绪等。

1.2 收集指标

胚胎或胎儿NGS染色体结果,患者口腔黏膜细胞叶酸代谢关键酶基因[5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因C677T位点和A1298C位点,甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)基因A66G位点]、血清同型半胱氨酸(HCY)、凝血与纤溶指标、甲状腺功能、性激素、免疫相关抗体、TROCH[几种病原微生物的英文名称缩写,其中T(*Toxoplasma*)是弓形虫,O(*Others*)是其他病原微生物,如梅毒螺旋体、带状疱疹病毒、细小病毒B19、柯萨奇病毒等,R(*Rubella Virus*)是风疹病毒,C(*Cytomegalo Virus*)是巨细胞病毒,H(*Herpes Virus*)即是单纯疱疹I/II型]。夫妻外周血G显带核型分析

结果,丈夫精液检查等相关指标。

1.3 统计学处理

使用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流产样本特征

有效样本100例。患者年龄:20~25岁25例,26~30岁40例,31~35岁26例,≥36岁9例;孕周:<12周94例,12~28周5例,>28周1例;流产次数:1次53例,2次40例,≥3次7例。

2.2 年龄与染色体异常发生率的关系

将孕期胚胎停育流产组织样本依年龄分为4组,其中20~25岁13例,26~30岁21例,31~35岁13例,≥36岁7例,4组染色体异常发生率差异无统计学意义($\chi^2=2.292, P>0.05$)。

2.3 流产次数与染色体异常发生率的关系

稽留流产1次者37例,其中胚胎染色体异常20例(54.1%);稽留流产≥2次患者63例,其中胚胎染色体异常34例(54.0%),两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 流产组织NGS检测结果

100例送检样本染色体数目异常52例(52.0%),结构异常2例(2.0%);染色体非整倍体率为96.3%(52/54)。常染色体三体37例,以16、4、22、13、X号染色体高发。13-三体并21-三体并22-三体1例,8-单体并22-三体1例,1-单体并3-三体1例。性染色体数目异常6例,结构异常1例,常染色体合并性染色体异常2例,嵌合体5例,三倍体5例,其中1例72,XXX三倍体,无染色体数目异常,仅有结构异常。1例92XXXX四倍体除外其余均检测出非整倍体,染色体片段≤5 Mb的结构异常发生率占阳性标本比例为3.7%(2/54),其中以染色体结构重复为主,缺失次之。

2.5 胚胎与夫妻染色体异常情况

100例稽留流产样本中54例胚胎染色体异常,其中42对夫妻进行染色体核型检查,显示染色体核型异常的妻子有6例、丈夫有3例,夫妻双方染色体核型均异常的有1例,由夫妻染色体异常导致的胚胎染色体异常比例低,仅为18.5%(10/54)。见表1。

2.6 拷贝数变异(CNV)与致病性情况

检索染色体变异已知综合征和病例数据库(ClinGen、Decipher数据库)、遗传病、性状和基因的数据库(OMIM数据库)、正常人染色体拷贝数数据库(DGV数据库)。共检出微重复(<10 Mb)9例,占

表1 胚胎染色体异常与夫妻染色体异常情况

序号	胚胎染色体异常	妻子染色体核型	丈夫染色体核型
1	3号重复,5号缺失	46,XX	46,XY,t(3;5)(p25;q31.3)
2	未见异常	46,XX	46,XY,14pss
3	XXY综合征	46,XX	46,X,Yqh-
4	16号三体	46,XX,t(16:22)(q12.1;q11.2)	46,XY
5	XXY三倍体	46,XX,1qh+,21pss	46,XY
6	16号三体	46,XX,? Inv(18)(p11.2q11.2)	46,XY
7	22号三体	45,X[4]/48,XXXXX[3]/46,XX[93]	46,XY,15ps+
8	未见异常	46,XX,22pss	46,XY
9	8号单体,22号异常	46,XX,t(8;22)(q24.1;q13)	46,XY
10	16号三体	46,XX,? Inv(18)(p11.2q11.2)	46,XY

16.7%(9/54)。拷贝数变异(CNV)84例,致病CNV有65个(占77.4%)。

2.7 其他影响因素

收集100例孕妇的相关病史和资料,其他影响因素有:不良环境因素82例,丈夫精液异常12例占60%(仅有20例男性精液检测),TPOCH43例,纤维蛋白原增高32例,HCY>8的31例,叶酸代谢关键酶基因异常27例,甲状腺功能异常12例,自身免疫异常10例,解剖因素9例,葡萄糖耐量异常8例,铁蛋白低下7例,内科合并症4例,多囊卵巢综合征3例,内异症、地中海贫血与卵巢功能减退均为2例,腮腺炎1例。

3 讨论

3.1 染色体因素

胚胎染色体异常是稽留流产最常见的原因,是生殖细胞受到干扰导致染色体不分离或突变引起的^[4],不一定是垂直遗传。胚胎死亡和自然流产是优胜劣汰的自然选择,80%以上发生在妊娠12周前,流产发生越早,其胚胎染色体异常的发生率越高^[5],大多数为染色体数目异常,少部分为染色体结构异常^[6]。目前没有任何一种染色体检测方法是完美的。近年来NGS技术用于检测流产组织的非整倍体和CNV,能发现未知改变,为临床精准诊疗提供了新的思路和方法^[7],被广泛推崇,但不能发现染色体平衡易位、倒位或点突变及染色体整倍体。

本研究运用NGS技术对100例稽留流产患者的流产组织进行了检测,结果显示≤30岁稽留流产发生率占65%,发生在孕12周前自然流产发生率占94%,从本组数据得出首次稽留流产与≥2次稽留流产患者胚胎染色体异常比例相当(54.1% vs 54.0%)($P>0.05$)。本研究三体型与单体型发生率与既往文献报道基本

相符^[7],最常见的三倍体主要发生在16、4、22、X、13号染色体上,首次稽留流产胚胎X染色体单体和三倍体占比相等,与文献报道基本一致^[8]。组织样本中检测出1号与19号染色体非整倍体异常,检测出此两种染色体异常的文献报道尚少^[9]。在染色体异常造成的异常流产性疾病中,主要以染色体结构重复为主,结构缺失次之,与文献报告不一致^[10]。由夫妻双方染色体异常导致的胚胎染色体异常比例低,仅为18.5%(10/54)。检索文库得出84个致病CNV,可明显提高异常检出率^[11]。检测出样本微重复(<10 Mb)9例,检索数据库了解相关的致病基因和可能导致的疾病,这在常规染色体核型分析中很难或不能被发现,具有重大临床意义。

3.2 叶酸代谢关键酶基因和HCY

叶酸是胚胎发育过程中不可缺少的营养素,可降低自发性流产。叶酸缺乏将会导致染色体的损伤、断裂、姐妹染色体交换频率增加,脆性位点表达,可致突变和癌变,导致出生缺陷和影响妇女生殖健康。多种酶参与了叶酸的转运和代谢,这些酶基因位点突变可引起酶活性的改变,造成叶酸代谢异常,使活性叶酸水平及同型半胱氨酸升高。高同型半胱氨酸血症可引起血管内皮损伤,影响胎盘部位的血管网络形成,导致胚胎停育;同时血液处于高凝状态,与RSA的发生密切相关^[12]。叶酸代谢障碍还可形成甲硫氨酸血症,抑制DNA甲基化,造成染色体不分离引起胎儿畸形^[13]和各种染色体缺陷病。国内外研究表明,叶酸代谢障碍和高同型半胱氨酸血症的妇女RSA的发生率较高^[14]。

本研究对患者口腔黏膜细胞进行叶酸代谢关键酶基因[5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因C677T位点和A1298C位点,甲硫氨酸合成酶还原酶

(MTRR)基因A66G位点]进行检测,同时查血清同型半胱氨酸(HCY),发现27%患者存在以上基因异常,31%患者存在HCY>8,证实叶酸缺乏和叶酸代谢关键酶基因异常是导致稽留流产的因素之一。

目前人们还是按照传统方式补充叶酸,且依从性差。对于有叶酸代谢障碍的个体在每天400 μg叶酸制剂的基础上增加剂量或许可以弥补该代谢障碍带来的危害,如目前有探索对于MTHFR基因和MTRR基因高风险人群建议叶酸的补充从孕前3个月开始服用800 μg/d,并补充维生素B12 2.6 μg/d,持续至妊娠结束,对于曾经妊娠过神经管畸形的患者叶酸服用需4~5 mg/d。

3.3 血栓前状态

目前血栓前状态引起自然流产越来越受到重视。普遍认为,妊娠期高凝状态使子宫胎盘部位血流状态改变,易形成局部微血栓甚至引起胎盘梗死,血液供应下降,胚胎和胎儿缺血缺氧,导致流产。遗憾的是,存在血栓前状态的妇女并没有明显的临床表现,目前尚缺乏充足的数据支撑血栓前状态血液指标的诊断标准。本研究发现有32例(32.0%)患者存在纤维蛋白原增高的现象,为今后对该领域的研究提供方向和参考。

3.4 内分泌因素

内分泌因素也是导致稽留流产的原因之一。本研究发现12%患者合并甲状腺功能异常,以甲状腺功能低下为主;其他内分泌因素包括葡萄糖耐量异常(8.0%)、多囊卵巢综合征(3.0%)、内异症(2.0%)、卵巢功能减退(2.0%)等。本研究常规检查患者的内分泌情况,进一步明确导致稽留流产的病因,更好指导治疗。

3.5 TROCH

生殖道各种病原体感染以及TROCH感染与流产的发生虽有一定的相关性,但不一定存在因果关系。本研究显示43.0%患者存在TROCH抗体异常。

3.6 免疫因素

生殖免疫研究表明,流产与免疫功能紊乱有关。不同因素导致流产的免疫病理变化不尽相同。目前,对同种免疫型导致的流产仍处于研究阶段。郑玫等^[15]研究显示稽留流产患者血清中IL-6、HIF-1 α 和VEGF水平明显低于对照组,而TNF- α 水平明显高于对照组,他们认为血清IL-6、HIF-1 α 、VEGF、TNF- α 水平可能作为监测稽留流产的潜在标志。本研究显示有10%患者存在自身免疫异常。

3.7 其他

不良相关因素,包括环境因素和心理因素,如电

脑、粉尘、宠物、手机辐射、办公电子设备、烟酒、放射线、甲醛、不良情绪等,甚至孕妇的年龄及肥胖也是导致自然流产的高危因素。本研究详细采集患者的基本信息,发现82%孕妇存有不良环境因素,患者再次妊娠时应指导其尽量避免不良因素的干扰。

参考文献:

- [1] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015:47-51.
- [2] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(1):3-9.
- [3] 李磊磊. 染色体多态性与男性不育、配偶自然流产的关系探讨[D]. 吉林: 吉林大学, 2014.
- [4] 郭玲仟, 张学. 医学遗传学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016:21.
- [5] OGASAWARA M, AOKI K, OKADA S, et al. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages [J]. Fertil Steril, 2000, 73(2):300-304.
- [6] 李亚丽, 余小平, 王方娜, 等. 复发性流产患者流产组织物的遗传学分析[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(3):536-538.
- [7] 张建林, 谢娟, 姜胜华, 等. 高通量测序在自然流产遗传学诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(6):835-838.
- [8] TAN Y, YIN X, ZHANG S, et al. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing[J]. Gigascience, 2014, 3(1):30.
- [9] 高鹏, 蓝惠华, 金丹丹, 等. NGS技术对325例自然流产组织染色体异常检测结果分析[J]. 国际医药卫生导报, 2018, 24(13):1920-1923.
- [10] 王燕侠, 毛宝宏, 李静, 等. NGS技术检测复发性流产组织染色体异常的临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(11):47-49.
- [11] 张钊, 郝胜菊, 张庆华, 等. 高通量测序技术进行流产组织染色体拷贝数检测的结果分析[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(10):962-965.
- [12] WILCKEN B, BAMFORTH F, LI Z, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR): Findings from over 7000 newborns 16 areas world wide[J]. J Med Genet, 2003, 40(8):619-625.
- [13] GIROUARD J, GIROUARD J, MOUTQUIN J M, et al. Previous hypertensive disease of pregnancy is associated with alterations of markers of insulin resistance[J]. Hypertension, 2007, 49(5):1056-1062.
- [14] 闵爱萍, 罗晓, 冯欣, 等. 乐山市育龄女性叶酸代谢关键酶基因多态性与不良孕产相关性研究[J]. 中国计划生育和妇产科, 2020, 12(2):69-71.
- [15] 郑玫, 谢文玲, 黄峰. 稽留流产患者血清中IL-6、TNF- α 、HIF-1 α 和VEGF表达[J]. 广东医科大学学报, 2018, 36(2): 180-182.