

## 临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003167

## 基于免疫磁珠法的不同筛选方案对胎儿有核红细胞富集效果的比较

唐苗苗<sup>1</sup>, 宾雅棣<sup>2</sup>, 赵蓝波<sup>2</sup>, 李奇灵<sup>1</sup>, 孙超<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学第一附属医院妇产科, 西安 710000; 2. 西安交通大学医学部, 西安 710000)

**【摘要】目的:**将密度梯度离心(density gradient centrifugation, DGC)与免疫磁珠法(magnetic-activated cell sorting, MACS)相结合,应用4种不同的筛选方案,对脐血中的胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cells, FNRBC)进行分离,评估不同策略富集FNRBC的效果。**方法:**对10例脐血标本(12 mL/例)按4种不同方案进行筛选:DGC; DGC+MACS 阴性筛选(CD45<sup>-</sup>); DGC+MACS 阳性筛选(CD71<sup>+</sup>); DGC+MACS 阴性/阳性筛选(CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)。通过细胞计数板计数, K-B 染色后显微镜下人工FNRBC 计数, 从获得总细胞量、FNRBC 量和 FNRBC 比例经 *t* 检验后评估不同方案富集 FNRBC 的效果。**结果:**①与其他3组相比, DGC 方案可获得的总细胞量( $0.95 \times 10^7/\text{mL}$ )最多, FNRBC 数量(39.87/mL)最多, FNRBC 比例最低(0.004‰), 差异均具有统计学意义(均  $P=0.000$ ); ②与其他3组相比, DGC+MACS 阴性/阳性筛选(CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)组合法所获得的总细胞量最少( $0.81 \times 10^6/\text{mL}$ ), 获得 FNRBC 数量也最少(7.47/mL), 差异均具有统计学意义(均  $P=0.000$ ); ③DGC+MACS 单种抗体筛选方案中, DGC+MACS 阳性筛选(CD71<sup>+</sup>)所获得总细胞量为  $1.99 \times 10^6/\text{mL}$ , 较 DGC+MACS 阴性筛选(CD45<sup>-</sup>)( $2.56 \times 10^6/\text{mL}$ )低, 差异有统计学意义( $P=0.000$ ), 而两方案所得 FNRBC 数量之间差异无统计学意义( $P=0.910$ ); ④DGC+MACS 阴性筛选(CD45<sup>-</sup>), DGC+MACS 阳性筛选(CD71<sup>+</sup>), DGC+MACS 阴性/阳性筛选(CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)所得 FNRBC 比例之间差异无统计学意义( $P=0.030, 0.050, 0.210$ )。**结论:**DGC 方案获得 FNRBC 数量最多; DGC+MACS 阴性/阳性筛选(CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)方案去除混杂细胞能力最强。在不降低获取目标细胞数量基础上, DGC+MACS 阳性筛选(CD71<sup>+</sup>)方案富集 FNRBC 效果最好。

**【关键词】**胎儿有核红细胞; 密度梯度离心; 免疫磁珠筛选**【中图分类号】**R714**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-01-03

## The comparison of enrichment effects of different screening schemes for fetal nucleated red blood cells from maternal blood by magnetic-activated cell sorting

Tang Miaomiao<sup>1</sup>, Bin Yadi<sup>2</sup>, Zhao Lanbo<sup>2</sup>, Li Qiling<sup>1</sup>, Sun Chao<sup>1</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University;

2. Health Science Center, Xi'an Jiaotong University)

**【Abstract】Objective:** To isolate fetal nucleated red blood cells (FNRBC) from maternal umbilical cord blood through density gradient centrifugation (DGC) and magnetic-activated cell sorting (MACS) by four different screening schemes, and to evaluate the screening effect of different methods. **Methods:** Ten samples of umbilical cord blood (12 mL/case) were collected. Each sample was divided into 4 groups: Group 1: DGC; Group 2: DGC+MACS negative screening (CD45<sup>-</sup>); Group 3: DGC+MACS positive screening (CD71<sup>+</sup>); Group 4: DGC+MACS negative/positive screening (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>). After screening, the number of cells was counted, and the *t*-test was carried out to evaluate the enrichment efficiency of each method. K-B staining was used to identify FNRBC count, and then the number and the proportion of FNRBC were calculated. **Results:** ① Compared with the other three groups, DGC method had the largest total cell number ( $0.95 \times 10^7/\text{mL}$ ), the largest FNRBC number (39.87/mL) and the lowest proportion of FNRBC (0.004‰), with statistically significant differences ( $P=0.000$ ); ② DGC+MACS negative / positive screening (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>) method got the least total cells number ( $0.81 \times 10^6/\text{mL}$ ) and the least FNRBC number (7.47/mL), with statistically significant differences ( $P=0.000$ ); ③ In the DGC+MACS single antibody screening method, the total number of cells ( $1.99 \times 10^6/\text{mL}$ ) obtained by DGC+MACS positive screening (CD71<sup>+</sup>) was lower than that by DGC+MACS negative screening (CD45<sup>-</sup>) ( $2.56 \times 10^6/\text{mL}$ ). The difference was statistically significant ( $P=0.000$ ). However, there was no significant difference in the number of FNRBC between the two methods ( $P=0.910$ ); ④ There was no significant difference in the proportion of FNRBC between DGC+MACS negative screening (CD45<sup>-</sup>), DGC+MACS positive screening

作者介绍: 唐苗苗, Email: maiowuash@163.com,

研究方向: 产前诊断和妇科肿瘤相关研究。

通信作者: 孙超, Email: sunch5945@163.com。

基金项目: 陕西省科技厅基础研究面上资助项目(编号: 2020JQ-530)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1046.r.20230220.1811.014.html>

(2023-02-21)

(CD71<sup>+</sup>) and DGC+MACS negative/positive screening (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>) ( $P=0.030, 0.050, 0.210$ ). **Conclusion:** The number of FNRBC obtained by DGC is the largest. DGC+MACS negative/positive screening (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>) has the strongest ability to remove mixed cells. The effect of enriching FNRBC by DGC+MACS positive screening (CD71<sup>+</sup>) is the best without reducing the number of target cells.

**[Key words]** fetal nucleated red blood cell; density gradient centrifugation; magnetic-activated cell sorting

孕妇外周血胎儿有核红细胞 (fetal nucleated red blood cells, FNRBC) 的存在已被国内外众多研究结果证实<sup>[1-5]</sup>。FNRBC 不仅包含胎儿的全部遗传信息,且生命周期短(90 d),在产后孕妇外周血中很快消失,表面抗原相对稳定,易于识别;而母体来源的有核红细胞在外周血中相对罕见<sup>[6-7]</sup>。因此国内外学者均认为 FNRBC 是无创产前检查和诊断最理想的靶细胞<sup>[8-10]</sup>。

多种 FNRBC 的富集技术被发表,如密度梯度离心 (density gradient centrifugation, DGC)<sup>[11-13]</sup>、荧光活化细胞筛选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)<sup>[8]</sup>、磁活化细胞筛选 (magnetic-activated cell sorting, MACS)<sup>[3,13]</sup>、电荷流分离法<sup>[14-15]</sup>、芯片过滤技术<sup>[16]</sup>、凝集素分离法<sup>[17]</sup>等。但由于目前并无 FNRBC 绝对特异性标记物被报道,因此上述方法也均处于探索阶段。

目前最常用的 FNRBC 富集技术是 FACS 和 MACS。FACS 技术<sup>[8]</sup>曾被视为胎儿细胞筛选的金标准,其优点是富集的纯度高,可将胎儿细胞富集 1 000 倍,同时存在耗时长、设备昂贵、技术复杂、需专业技术人员操作且分离的细胞量少等缺点。近年来大部分学者认为 MACS 法优于 FACS 法<sup>[18]</sup>,MACS 法<sup>[3]</sup>的优点是用时短,费用相对低廉,可同时分离多个样本,所得细胞量较多。

由于特异性抗体的缺失,若单一阳性抗体标记筛选所得细胞纯度并不高。多个标记的联合应用虽然增加了 FNRBC 的分离效率及纯化率,但同时也难以避免在筛选过程中细胞的丢失,增加假阴性的可能性。

本研究的目的是将 DGC 与 MACS 联合;应用 4 种不同的筛查策略,对脐血中的胎儿有核红细胞进行分离,评估不同的策略富集 FNRBC 的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 伦理声明

本研究经西安交通大学第一附属医院伦理委员会批准 (XJTU1AF-CRS-2015-001)。所有研究方案均符合《赫尔辛基医学研究宣言》中涉及人体的研究伦理原则。充分告知研究方案及风险后,所有参与者均签署知情同意。

### 1.2 研究对象

研究对象 1: 孕妇脐带血采自 2019 年 10 月至 2020 年 3

月来西安交通大学第一附属医院产科分娩的孕妇,排除妊娠合并有引起外周血母体有核红细胞增多的疾病(地中海贫血、严重的缺铁性贫血、骨髓转移瘤、白血病),均为第一次妊娠或与上次妊娠间隔 1 年以上,未作侵入性检查。足月分娩时脐静脉血标本 12 mL,共 10 例,所有血样均用乙二胺四乙酸 (ethylene dia mine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝。并用 PBS (pH7.2, 中国上海君瑞生物公司) 等倍稀释至 24 mL, 2 h 内进行细胞分离。

每份稀释后样本被平均分为 4 组 (每组 6 mL), 分别按以下 4 种方案进行筛选:

方案 1: DGC;

方案 2: DGC+MACS 阴性筛选 (CD45<sup>-</sup>);

方案 3: DGC+MACS 阳性筛选 (CD71<sup>+</sup>);

方案 4: DGC+MACS 阴性/阳性筛选 (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)。

研究对象 2: 孕妇脐带血采自 2022 年 3 月 28 日至 4 月 8 日来西安交通大学第一附属医院妇产科门诊就诊的早中孕期孕妇,排除妊娠合并有引起外周血母体有核红细胞增多的疾病(地中海贫血、严重的缺铁性贫血、骨髓转移瘤、白血病),均为第一次妊娠或与上次妊娠间隔 1 年以上,未作侵入性检查。孕妇外周血标本 9 mL,共 4 例,所有血样均用 EDTA 抗凝。并用 PBS (pH7.2, 中国上海君瑞生物公司) 等倍稀释至 18 mL, 2 h 内进行细胞分离。

根据脐带血 FNRBCs 分选策略的检验结果,选择方案 3 (DGC/CD71<sup>+</sup>) 对孕期外周血 FNRBCs 进行筛选,并通过 K-B 染色鉴定 FNRBCs,评估该方法筛选孕妇外周血 FNRBCs 的有效性。

### 1.3 研究方法

1.3.1 密度梯度离心 将稀释后的血标本 6 mL 缓置于 3 mL 密度梯度液上 (Ficoll 密度 1.077 g/mL, 美国 Sigma 公司), 室温 22℃, 1 500 r/min × 30 min 离心。在密度离心液界面上,可见呈白膜状的细胞层面,此层面富含单个核细胞。收集白膜层及其上方的血浆 3 ~ 3.5 mL。PBS/0.1% BSA (pH7.2, 德国美天旌公司) 洗涤细胞 2 次 (22℃, 1 500 r/min × 5 min 离心) 后收集细胞沉淀。并加入 PBS/0.1% BSA 5 mL 重新悬浮细胞,吹匀。

1.3.2 MACS 筛选 FNRBC CD45 阴性筛选: 在 5 mL 离心后样本中加入 40 μL CD45 免疫磁珠 (美天旌, 德国), 混匀; 4℃, 避光孵育 15~30 min。组装 mini-MACS 系统 (型号: 130-091-632, 美天旌, 德国)。以 500 μL PBS/0.1% BSA 润洗 mini-MACS 筛选柱, 待流空后, 将筛选的细胞上柱, 收集流出液。PBS/0.1% BSA 洗涤细胞沉淀 2 次 (22℃, 1 500 r/min × 5 min 离心) 后收集细胞沉淀。并加入 PBS/0.1% BSA 1 mL 重新悬浮细胞, 吹匀。

CD71 阳性筛选: 5 mL 离心后样本中加入 40 μL CD71 免疫磁珠 (美天旌, 德国); 或 1 mL CD45 阴性筛选后样本中加

入 4  $\mu\text{L}$  CD71 免疫磁珠,混匀,4℃避光孵育 15~30 min。组装 mini-MACS 系统。以 500  $\mu\text{L}$  PBS/0.1%BSA 润洗 mini-MACS 筛选柱,待流空后,将筛选的细胞上柱,取 1 mL PBS/0.1%BSA 加入筛选柱,拿离磁场,冲洗入试管内,标记为阳性细胞。PBS/0.1% BSA 洗涤细胞沉淀 2 次(22℃,1 500 r/min  $\times$  5 min 离心)后收集细胞沉淀。并加入 PBS/0.1% BSA 1 mL 重新悬浮细胞,吹匀。

1.3.3 细胞涂片 Kleihauer-Betke(K-B)染色鉴定 制备涂片:将 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液取样滴于载玻片上,自然干燥 1 h。

固定:用 80% 乙醇固定,水洗室温晾干。

酸洗脱:将固定后的涂片放 37℃ 的酸性缓冲液中(pH 3.3  $\pm$  0.2, 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 12.3 mL; 0.1mol/L 柠檬酸 37.7 mL),保温 10 min,水洗后室温晾干。

染色:苏木素染液(中国上海凡生生物公司)中染白细胞 45 s,并用流水冲洗 2 min;伊红染液(中国上海凡生生物公司)染 1 min,再水洗 3 min,晾干后,镜检。镜下识别标准:FNRBC 直径介于淋巴细胞和中性粒细胞之间,细胞呈圆形或椭圆形,核圆形深染,偏在,核浆比 1:2;胞质深红色<sup>[19]</sup>。

1.3.4 细胞板细胞计数 取 2  $\mu\text{L}$  重悬液样本加入 198  $\mu\text{L}$  PBS 中(稀释 100 倍),于细胞计数板上,计数 4 个大方格内的细胞总数,重复 1 次,计数公式如下:单核细胞浓度(细胞数/mL 细胞悬液)=(4 个大方格内细胞总数/4)  $\times$  10<sup>4</sup>  $\times$  2(稀释倍数)。

人工 FNRBC 计数:FNRBC 计数由 2 个实验员(A 和 B)计数 200 个白细胞建立。两个实验员(A/B)计数 FNRBC 比例差异须低于 10%,具体 FNRBC 比例公式如下:[FNRBC 总数(A+B)]/(FNRBC 总数(A+B)+400WBC)  $\times$  100。细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ /涂片 $\times$ 10 张。

FNRBC 比例计算:FNRBC 比例(‰)=FNRBC 总数/细胞总数(同一样本)/1 000。

所有数据输入计算机经 SPSS10.0 进行统计分析。所得到的数值均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。文中数据采用 *t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 脐带血样本患者基本特征

本脐带血研究共纳入 10 名足月分娩孕妇,均为单胎

妊娠,平均年龄 32.4 岁,平均孕周 38.1 周,平均出生体质量 3 244 g,详见表 1。

### 2.2 基于脐带血不同筛选方案细胞计数结果

经过 4 种不同方案筛选后,所获得细胞计数结果见表 2。同方案 2、3、4 相比,方案 1 所获得的总细胞量最多(1.07  $\times$  10<sup>7</sup>/mL),差异均具有统计学意义( $t=9.680$ ,  $P_1=0.000$ ,  $t=4.770$ ,  $P_2=0.000$ ,  $t=10.600$ ,  $P_3=0.000$ )。方案 4 所获得总细胞量最少(0.81  $\times$  10<sup>6</sup>/mL),差异具有统计学意义( $t=10.600$ ,  $P_3=0.000$ ,  $t=9.620$ ,  $P_5=0.000$ ,  $t=10.600$ ,  $P_6=0.000$ )。与 DGC+MACS 阴性筛选(CD45<sup>-</sup>)相比(2.56  $\times$  10<sup>6</sup>/mL),DGC+MACS 阳性筛选(CD71<sup>+</sup>)所获得总细胞量较少(1.99  $\times$  10<sup>6</sup>/mL),差异有统计学意义( $t=4.770$ ,  $P_4=0.000$ )。

### 2.3 脐带血不同筛选方案 K-B 染色计数结果

脐带血经过 4 种不同方案筛选后,所获得样本 K-B 染色,镜下 FNRBC 计数结果见表 2。同方案 2、3、4 相比,方案 1 可获得较高数量的 FNRBC(39.87/mL),差异均具有统计学意义( $t=7.710$ ,  $P_{1a}=0.000$ ,  $t=9.520$ ,  $P_{2a}=0.000$ ,  $t=18.760$ ,  $P_{3a}=0.000$ )。方案 4 所获得 FNRBC 数量最少(7.47/mL),差异具有统计学意义( $t=18.760$ ,  $P_{3a}=0.000$ ,  $t=6.280$ ,  $P_{5a}=0.000$ ,  $t=6.220$ ,  $P_{6a}=0.000$ )。而方案 2(18.13/mL)和方案 3(18.2/mL)所得 FNRBC 数量之间差异无统计学意义( $t=0.030$ ,  $P_{4a}=0.910$ )。

### 2.4 脐带血不同筛选方案所得 FNRBC 比例

FNRBC 比例结果见表 2。同方案 2、3、4 相比,方案 1 所得 FNRBC 比例最低(0.004‰),差异均具有统计学意义( $t=4.310$ ,  $P_{1b}=0.000$ ,  $t=4.750$ ,  $P_{2b}=0.000$ ,  $t=3.300$ ,  $P_{3b}=0.000$ )。方案 2 所得 FNRBC 比例为 0.007‰,方案 3 所得 FNRBC 比例为 0.009‰,方案 4 所得 FNRBC 比例为 0.011‰,三者之间差异无统计学意义( $t=2.030$ ,  $P_{4b}=0.030$ ,  $t=1.950$ ,  $P_{5b}=0.050$ ,  $t=0.750$ ,  $P_{6b}=0.210$ )。

### 2.5 基于孕妇外周血 FNRBCs 筛选后细胞计数结果

将分选后的全部样本涂片,行 K-B 染色鉴定并计数 FNRBCs。结果见表 3。

表 3 中数据进行非配对样本 *t* 检验;  $P_a$  为本实验组与 Wang JY 等<sup>[20]</sup>的实验结果进行 *t* 检验结果;  $P_b$  为本实验组与 Ganshirt-Ahlert D 等<sup>[21]</sup>等的实验结果进行 *t* 检验结果。

本实验通过 DGC/CD71<sup>+</sup>组合法筛选孕 12~16 周孕妇外周血的 FNRBCs,经 K-B 染色鉴定并细胞计数。与 Wang JY

表 1 脐带血样本-纳入患者基本特征

编号	年龄/岁	孕周/周	分娩方式	胎数	新生儿体质量/g	妊娠合并症
1	27	37	剖宫产	单胎	2 760	瘢痕子宫
2	35	38	剖宫产	单胎	4 050	妊娠期糖尿病
3	28	38	剖宫产	单胎	3 100	瘢痕子宫
4	32	40	剖宫产	单胎	2 690	胎膜早破
5	35	37	剖宫产	单胎	3 270	妊娠期高血压疾病
6	30	37	顺产	单胎	3 280	无
7	40	39	剖宫产	单胎	3 440	瘢痕子宫
8	29	38	顺产	单胎	2 580	无
9	29	37	剖宫产	单胎	2 880	羊水过少
10	39	40	剖宫产	单胎	4 390	妊娠期糖尿病
平均值	32.4	38.1	-	-	3 244	-



表2 4种不同方案筛选后,细胞计数、FNEBC计数、FNEBC比例结果

编号	方案1:DGC			方案2:DGC+MACS阴性 (CD45 <sup>-</sup> )			方案3:DGC+MACS阳性 (CD71 <sup>+</sup> )			方案4:DGC+MACS阴性/阳性 (CD45 <sup>-</sup> /CD71 <sup>+</sup> )		
	总细胞量/ (10 <sup>7</sup> ·mL <sup>-1</sup> )	FNRBC 量/mL	FNRBC 比例/‰	总细胞量/ (10 <sup>6</sup> ·mL <sup>-1</sup> )	FNRBC 量/mL	FNRBC 比例/‰	总细胞量/ (10 <sup>6</sup> ·mL <sup>-1</sup> )	FNRBC 量/mL	FNRBC 比例/‰	总细胞量/ (10 <sup>6</sup> ·mL <sup>-1</sup> )	FNRBC 量/mL	FNRBC 比例/‰
1	0.72	40.67	0.006	2.48	19.33	0.008	2.00	17.33	0.009	0.57	5.33	0.009
2	0.95	39.33	0.004	2.77	22.00	0.008	1.80	10.67	0.006	0.93	9.33	0.010
3	0.82	43.33	0.005	2.65	26.67	0.010	1.82	26.00	0.001	0.89	8.67	0.010
4	1.22	32.67	0.002	2.74	10.67	0.004	1.89	18.67	0.010	0.91	6.00	0.007
5	1.08	34.00	0.003	2.07	16.00	0.008	1.90	10.00	0.005	1.04	8.67	0.008
6	0.63	28.67	0.005	2.25	12.00	0.005	1.63	19.33	0.001	0.25	6.00	0.024
7	0.89	38.67	0.004	2.36	20.00	0.008	2.00	18.00	0.009	0.77	10.67	0.001
8	1.34	55.33	0.004	3.06	22.67	0.007	2.37	20.67	0.009	1.17	5.33	0.005
9	0.79	42.00	0.005	2.46	18.00	0.007	2.33	24.67	0.001	0.89	6.67	0.007
10	1.07	44.00	0.004	2.70	14.00	0.005	2.17	16.67	0.008	0.65	8.00	0.012
平均值	0.95	39.87	0.004	2.56	18.13	0.007	1.99	18.20	0.009	0.81	7.47	0.011
标准差	0.29	7.36	0.009	0.73	5.04	0.002	0.55	5.14	0.003	0.28	1.85	0.005
P值	$P_1:0.000$			$P_{1a}:0.000$			$P_2:0.000$			$P_3:0.000$		
							$P_{2a}:0.000$			$P_{2b}:0.000$		
							$P_4:0.000$			$P_{4a}:0.910$		
							$P_{4b}:0.030$			$P_5:0.000$		
										$P_{5a}:0.000$		
										$P_{5b}:0.050$		
										$P_6:0.000$		
										$P_{6a}:0.000$		
										$P_{6b}:0.210$		

注:上述结果进行 *t* 检验。总细胞量 *t* 检验结果: $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$  分别为方案1与方案2、3、4检验结果; $P_4$ 、 $P_5$  为方案2与方案3、4检验结果; $P_6$  为方案3与方案4检验结果;FNRBC量 *t* 检验结果: $P_{1a}$ 、 $P_{2a}$ 、 $P_{3a}$  分别为方案1与方案2、3、4检验结果; $P_{4a}$ 、 $P_{5a}$  为方案2与方案3、4检验结果; $P_{6a}$  为方案3与方案4检验结果;FNRBC比例 *t* 检验结果: $P_{1b}$ 、 $P_{2b}$ 、 $P_{3b}$  分别为方案1与方案2、3、4检验结果; $P_{4b}$ 、 $P_{5b}$  为方案2与方案3、4检验结果; $P_{6b}$  为方案3与方案4检验结果

表3 外周血样本:FNRBCs细胞计数结果与比较

编号	本实验方案:DGC/CD71 <sup>+</sup>		Wang JY等 <sup>[20]</sup> 方案:DGC/CD45 <sup>-</sup>		Ganshirt-Ahlert D等 <sup>[21]</sup> 方案:DGC/CD71 <sup>+</sup>	
	孕周/周	细胞计数/个	孕周/周	细胞计数/个	孕周/周	细胞计数/个
1	12	8	12	4	18	8.7
2	13	7	17	1	16	7
3	16	9	19	1	—	—
4	15	7	12	5	—	—
5	—	—	12	2	—	—
平均值	14	7.75	14.4	2.6	17	7.85
标准差	1.58	0.83	3.36	1.82	1.41	1.2
P值			0.001		0.460	

等<sup>[20]</sup>和 Ganshirt-Ahlert D 等<sup>[21]</sup>的筛选结果对比,进行 *t* 检验。检验结果显示,本实验方案(DGC/CD71<sup>+</sup>)筛选所得到的FNRBCs数量明显高于Wang JY等<sup>[20]</sup>等方案(DGC/CD45<sup>-</sup>),差异有统计学意义( $t=5.150$ ,  $P<0.01$ );与Ganshirt-Ahlert D等<sup>[21]</sup>(DGC/CD71<sup>+</sup>)的筛选结果无差异,无统计学意义( $t=0.090$ ,  $P>0.05$ )。

## 2.6 形态学观察

图1A为脐带血涂片K-B染色,图1B为外周血涂片K-B染色,镜下可见大量无核红细胞,呈双凹圆盘状;同时可见散在的中性粒细胞,核呈分叶状或杆状,淋巴细胞,体积较中性粒细胞小,核圆形深染,此2种细胞胞质着色均浅或不着色。FNRBC细胞直径(9~12  $\mu\text{m}$ )介于小淋巴细胞(5~8  $\mu\text{m}$ )和中性粒细胞(10~20  $\mu\text{m}$ )之间<sup>[14]</sup>,呈圆形或椭圆形,核圆形深染,偏在;胞质红色深染。

筛选后的样本分别涂片K-B染色后,镜下均可见到FNRBC。图2A为脐带血单纯密度梯度离心后细胞K-B染色,视野中可见大量残留的无核红细胞,淋巴细胞和中性粒细胞;图2B为脐带血经DGC+MACS阴性筛选(CD45<sup>-</sup>)筛选后细胞涂片,染色后可见大量中性粒细胞剩余,FNRBC散在其中;图2C为脐带血经DGC+MACS阳性筛选(CD71<sup>+</sup>)筛选后细胞涂片,染色后可见涂片中混有大量淋巴细胞和部分中性粒细胞;图2D为脐带血经DGC+MACS阴性/阳性筛选(CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)筛选后的细胞涂片,背景中未见明显的淋巴细胞、中性粒细胞等残余。图2E为孕妇外周血经DGC/CD71<sup>+</sup>筛选后所得的细胞样本涂片染色。视野中细胞数量明显减少,未见母体红细胞,偶可见淋巴细胞,FNRBCs呈圆形或椭圆形,核圆形深染,偏在;胞质较多,深红色。所受试6例样本经染色均可见到FNRBCs。

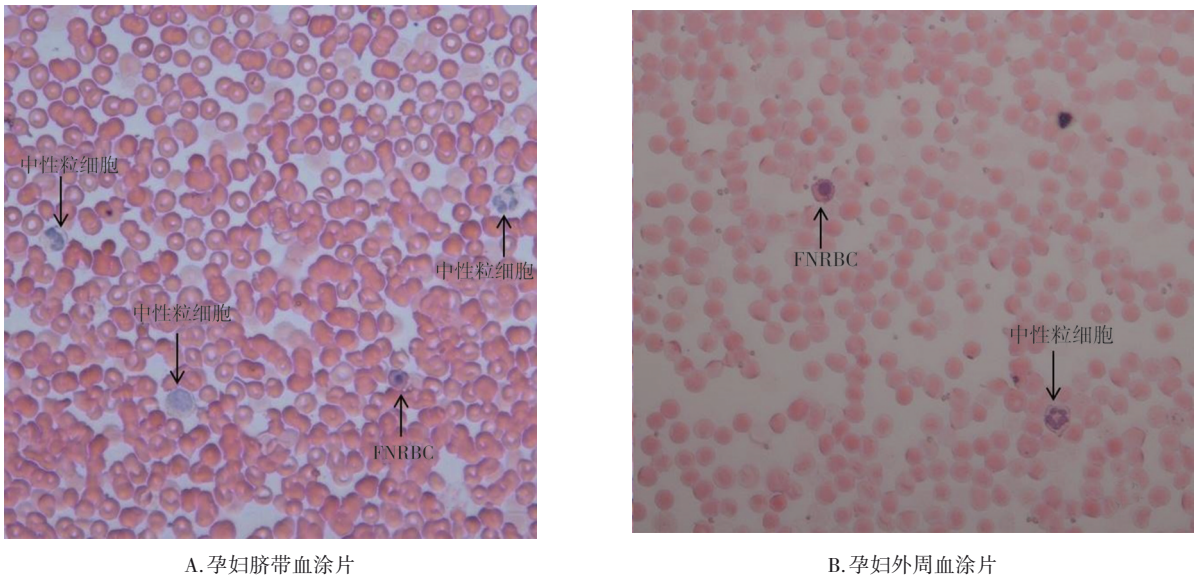


图1 脐带血、外周血涂片K-B染色结果

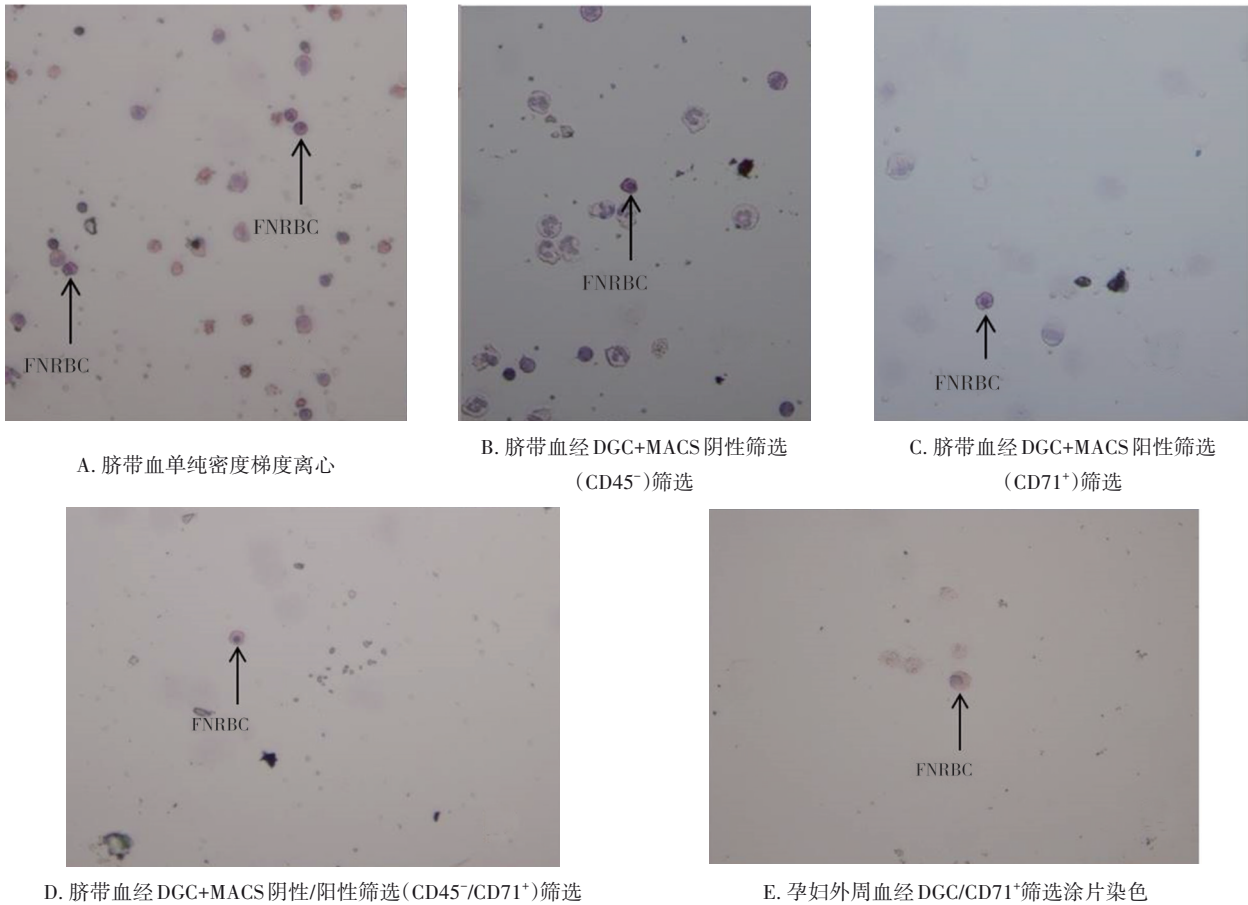


图2 脐带血FNRBC、外周血FNRBC筛选富集后K-B染色结果

3 讨论

本研究采用孕妇脐带血进行FNRBC筛选方法学探讨,在10例标本经不同筛选方案后全部都成功

收集到FNRBC,阳性率达到100%。经DGC+MACS阴性/阳性筛选(CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>)筛选的样本,所得总细胞量、FNRBC数量明显少于其他3组,经K-B染色后背景中混杂淋巴细胞、中性粒细胞等较少,但

所获得 FNRBC 比例较 DGC+MACS 单一抗体筛选减少。DGC+MACS 阴性筛选 (CD45<sup>-</sup>) 和 DGC+MACS 阳性筛选 (CD71<sup>+</sup>) 所获得的 FNRBC 数量、比例之间无差异,但 DGC+MACS 阴性筛选 (CD71<sup>+</sup>) 方案且 K-B 染色后背景中混杂细胞量少。因此,三者相比,在不降低 FNRBC 获得数量的基础上,DGC+MACS 阳性筛选 (CD71<sup>+</sup>) 去除混杂有核细胞 (非 FNRBC) 的能力更强,即富集效果更佳。

本研究基于孕妇脐带血进行,所得 FNRBC 阳性率达到 100%。既往关于 MACS 的 FNRBC 筛选大多基于孕妇外周血进行,但外周血 FNRBC 含量较低,Simpson JL 等<sup>[22]</sup>报道,20 mL 母血中含 1~20 个胎儿细胞,即胎儿细胞与母血中细胞的比例为 1:10<sup>6</sup>,因此筛选后所得 FNRBC 阳性率不高。张旋等<sup>[23]</sup>的研究发现,经 CD71<sup>+</sup> 阳性标记的 MACS 筛选方法所得阳性率为 57.14%。Reading JP 等<sup>[1]</sup>运用 MACS 法将 CD45、CD14 与 CD71 联合,进行筛选,可达到 87% 的阳性率;阴性率的出现可能会给筛选结果带来偏倚。因此采用脐带血进行筛选方法学探讨,脐带血内 FNRBC 含量高,阳性率为 100%,减少因筛选结果未阴性所带来的偏倚,使得结果更具备说服力。

本研究第一次提出,与 DGC+MACS 阴性/阳性筛选 (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>) 筛选、DGC+MACS 阴性筛选 (CD45<sup>-</sup>) 相比,在不降低获取目标细胞数量基础上,DGC+MACS 阳性筛选 (CD71<sup>+</sup>) 方案富集 FNRBC 效果最好。且在早中孕期孕妇外周血 FNRBCs 富集中获得了 100% 阳性 (平均 7.2 个/例) 结果。目前用于 FNRBC 分离、富集的相对特异性抗原有 CD34<sup>[24]</sup>、CD36<sup>[25]</sup>、CD71<sup>[26-27]</sup>、GPA<sup>[28]</sup>、HbF<sup>[24]</sup> 等,阴性标记主要有 CD45<sup>[29]</sup> 或 CD14<sup>[1]</sup>。CD71<sup>[26-27]</sup> 在早、中期的有核红细胞表面表达,是一种细胞膜表面特异表达的一种转铁蛋白受体;此外,在母体活化的淋巴细胞、血小板和网织红细胞表面也存在一定程度的表达。学者们常常采用 CD71 作为 FNRBC 的阳性筛选标记<sup>[3,30]</sup>,Thilaganathan B 等<sup>[31]</sup> 报道大概有 95% 的 FNRBC 会表达 CD71,因此使用 CD71 筛选 FNRBC 可以保证富集数量。与本研究结果相似,Christensen B 等<sup>[32]</sup> 研究显示,基于外周血 CD71 单独筛选比 CD45<sup>-</sup>/14<sup>+</sup> 联合筛选或 CD45<sup>-</sup>/14<sup>+</sup>/71<sup>+</sup> 联合筛选所得 FNRBC 阳性率更高。但目前并无 CD45、CD71 抗体单独或联合筛选的相关方法学探讨,本研究结果为 FNRBC 的筛选方法选择提供了新的依据。

因此,采用 DGC+MACS 阳性筛选 (CD71<sup>+</sup>) 方

案,既可以排除 DGC 法、DGC+MACS 阴性筛选 (CD45<sup>-</sup>) 去除混杂细胞能力差的缺点;又可以克服 DGC+MACS 阴性/阳性筛选 (CD45<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>) 所造成的获得 FNRBC 数量少的问题。且 DGC+MACS 阳性筛选 (CD71<sup>+</sup>) 方案在外周血 FNRBCs 筛选验证中结果均为阳性,筛选效果与 Gänshirt-Ahlert D 等<sup>[21]</sup> (DGC/CD71<sup>+</sup>) 效果一致,明显优于 Wang JY 等<sup>[20]</sup> 方案 (DGC/CD45<sup>-</sup>) 效果。此外该方法快速、准确和节约成本,显示出未来临床应用的巨大潜力。MACS 法中所选用的抗体磁珠大约 10 nm,不影响标记细胞的生理和生化活性<sup>[18,33]</sup>。因此经 CD71<sup>+</sup> 阳性标记 MACS 筛选后 FNRBC 的生理和生化活性不受影响,保存胎儿全部遗传信息,为后续单细胞培养、扩增,单细胞微切,全基因组测序等奠定基础。

本研究还存在一定的局限性,FNRBC 的识别选择 K-B 染色后镜下人工识别,后续将继续补充 STR 测序,FISH 等方法从基因水平证实结果的准确性。

## 参 考 文 献

- [1] Reading JP, Huffman JL, Wu JC, et al. Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells in enriched populations[J]. Mol Hum Reprod, 1995, 1(7): 362-367.
- [2] Hennerbichler S, Kroisel PM, Zierler H, et al. Fetal nucleated red blood cells in peripheral blood of pregnant women: detection and determination of location on a slide using laser-scanning cytometry[J]. Prenat Diagn, 2003, 23(9): 710-715.
- [3] Gänshirt D, Smeets FW, Dohr A, et al. Enrichment of fetal nucleated red blood cells from the maternal circulation for prenatal diagnosis: experiences with triple density gradient and MACS based on more than 600 cases[J]. Fetal Diagn Ther, 1998, 13(5): 276-286.
- [4] 梁 卉, 陈国杰, 于 燕, 等. 母体外周血中胎儿有核红细胞的分离和富集方法的研究进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志 (电子版), 2018, 8(1): 53-58.
- [5] Liang H, Chen GJ, Yu Y, et al. Progress in isolation and enrichment of fetal nucleated red blood cells from maternal peripheral blood[J]. Chin J Cell Stem Cell Electron Ed, 2018, 8(1): 53-58.
- [6] 高 松, 蒋 刘, 戴 朴. 孕妇外周血中胎儿有核红细胞的分离和富集[J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29(4): 389-392.
- [7] Gao S, Jiang Y, Dai P. Separation and enrichment of fetal nucleated red blood cells in peripheral blood of pregnant women[J]. Chin J Reproductive Health, 2018, 29(4): 389-392.
- [8] Huang CE, Ma GC, Jou HJ, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidy by circulating fetal nucleated red blood cells and extravillous trophoblasts using silicon-based nanostructured microfluidics[J]. Mol Cytogenet, 2017, 10: 44.
- [9] Chen F, Liu P, Gu Y, et al. Isolation and whole genome sequencing of fetal cells from maternal blood towards the ultimate non-invasive pre-



- natal testing[J]. Prenat Diagn, 2017, 37(13): 1311–1321.
- [8] Sohda S, Arinami T, Hamada H, et al. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: stimulation by FACS analysis[J]. Prenat Diagn, 1997, 17(8): 743–752.
- [9] Xu XY, Chen HP. Fetal nucleated red blood cells in maternal peripheral blood and gestational age[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2004, 87(2): 143–144.
- [10] Zou L, Ye XJ, Xu KS, et al. Isolation of fetal nucleated red blood cells from maternal blood[J]. J Tongji Med Univ, 2000, 20(2): 169–171.
- [11] Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A, et al. Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications[J]. Prenat Diagn, 2007, 27(2): 150–153.
- [12] Kovalak EE, Dede FS, Gelisen O, et al. Nonreassuring fetal heart rate patterns and nucleated red blood cells in term neonates[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(5): 1005–1009.
- [13] 罗欣, 杜颖颖, 张进, 等. 密度梯度离心和免疫磁珠分选相结合分离脐血中胎儿有核红细胞[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2010, 2(3): 4–7.
- Luo X, Du YY, Zhang J, et al. Density gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting combined separation of fetal nucleated red blood cells from cord blood[J]. Chin J Prenat Diagn Electron Version, 2010, 2(3): 4–7.
- [14] Mohamed H, Turner JN, Caggana M. Biochip for separating fetal cells from maternal circulation[J]. J Chromatogr A, 2007, 1162(2): 187–192.
- [15] Huang R, Barber TA, Schmidt MA, et al. A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells (NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(10): 892–899.
- [16] Chen PJ, Teng PC, Zhu YZ, et al. Noninvasive prenatal diagnostics: recent developments using circulating fetal nucleated cells[J]. Curr Obstet Gynecol Rep, 2019, 8(1): 1–8.
- [17] Wada S, Kitagawa M. Method of separation and concentration of fetal nucleated red blood cells in maternal blood and its application to fetal diagnosis[J]. Congenit Anomalies, 2004, 44(2): 72–78.
- [18] Fang L, Ye YH, Li ES, et al. Magnetic-activated cell sorting (MACS) versus density gradient centrifugation (DGC) for the selection of human sperm in assisted reproductive techniques[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2018, 98(40): 3263–3267.
- [19] Liu WY, Jin CL, Liu LY, et al. Detection of fetal nucleated red blood cells in the maternal circulation by Kleihauer test[J]. Yi Chuan, 2007, 29(3): 289–292.
- [20] Wang JY, Zhen DK, Falco VM, et al. Fetal nucleated erythrocyte recovery: fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection[J]. Cytometry, 2000, 39(3): 224–230.
- [21] Gänshirt-Ahlert D, Börjesson-Stoll R, Burschik M, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting[J]. Am J Reprod Immunol, 1993, 30(2/3): 194–201.
- [22] Simpson JL, Lewis DE, Bischoff FZ, et al. Isolating fetal nucleated red blood cells from maternal blood: the Baylor experience; 1995[J]. Prenat Diagn, 1995, 15(10): 907–912.
- [23] 张旋, 刘志强, 谢世营, 等. 应用密度梯度离心结合免疫磁珠法富集孕妇外周血中胎儿 NRBC 的实验研究[J]. 江西医学检验, 2007, 25(4): 307–308, 324.
- Zhang X, Liu ZQ, Xie SY, et al. Enrichment of fetal nucleated red blood cells from maternal peripheral blood by using density gradient centrifugation and magnetically activated cell sorting[J]. Jiangxi J Med Lab Sci, 2007, 25(4): 307–308, 324.
- [24] Choolani M, Mahyuddin AP, Hahn S. The promise of fetal cells in maternal blood[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012, 26(5): 655–667.
- [25] Zhang L, Wang Y, Liao AH. Quantitative abnormalities of fetal trophoblast cells in maternal circulation in preeclampsia[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(12): 1160–1166.
- [26] Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(7): 609–615.
- [27] Lewis DE, Schober W, Murrell S, et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry[J]. Cytometry, 1996, 23(3): 218–227.
- [28] Choi JH, Ogunniyi AO, Du M, et al. Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving[J]. Biotechnol Prog, 2010, 26(3): 888–895.
- [29] Yang YH, Kim SH, Yang ES, et al. Prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 from maternal peripheral blood[J]. Yonsei Med J, 2003, 44(2): 181–186.
- [30] Tao D, Shen Y, Feng X, et al. The application of CD71 and Hoechst33258 to staining method for sorting fetal nucleated red blood cells in the peripheral blood of pregnant women[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2000, 17(5): 352–354.
- [31] Thilaganathan B, Meher-Homji NJ, Stagiannis K, et al. Transferrin receptor expression in fetal blood mononuclear cells[J]. BJOG Int J Obstet Gynaecol, 1993, 100(4): 395–396.
- [32] Christensen B, Philip J, Kølvrå S, et al. Fetal cells in maternal blood: a comparison of methods for cell isolation and identification[J]. Fetal Diagn Ther, 2005, 20(2): 106–112.
- [33] Troeger C, Holzgreve W, Hahn S. A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythroblasts by MACS[J]. Prenat Diagn, 1999, 19(6): 521–526.

(责任编辑:唐秋姗)