

· 综述 ·

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

梁卉^{1,2} 陈国杰³ 于燕⁴ 熊礼宽^{1,2}

【摘要】 母体外周血中分离的胎儿有核红细胞(fNRBCs)包含胎儿完整的遗传信息,可用于无创产前诊断。fNRBCs的分离和富集方法主要分为三类:物理分选法、抗原-抗体结合分离法和增殖法。不同的方法获得的fNRBCs的数量和纯度不同,多种方法联合使用可以提高富集产物中fNRBCs的纯度和数量。本文就母体外周血中fNRBCs的分离和富集方法进行综述。

【关键词】 胎儿; 有核红细胞; 外周血; 无创产前诊断; 分离; 富集

Progress in isolation and enrichment of fetal nucleated red blood cells from maternal peripheral blood Liang Hui^{1,2}, Chen Guojie³, Yu Yan⁴, Xiong Likuan^{1,2}. ¹Central Laboratory, Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Jinan University, Shenzhen 518100, China; ²Shenzhen Key Laboratory of Birth Defects, Shenzhen 518100, China; ³Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; ⁴Department of Obstetrics, Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Jinan University, Shenzhen 518100, China

Corresponding author: Xiong likuan, Email: xionglk@sina.cn

【Abstract】 Fetal nucleated red blood cells (fNRBCs) from maternal peripheral blood have the whole genetic information of fetal, which could be used for non-invasive prenatal diagnosis. There are three sorts of methods for isolation and enrichment of fNRBCs: physical separation methods, antigen-antibody-dependent methods, and proliferation methods. The yield and purity vary from different methods. Combination of several methods could improve yield and purity of fNRBCs. In this review, we describe the progress in isolation and enrichment of fNRBCs from maternal peripheral blood.

【Key words】 Fetal; Nucleated red blood cells; Peripheral blood; Non-invasive prenatal diagnosis; Isolation; Enrichment

Walknowska 等^[1]在1969年就发现母体中存在胎儿细胞,与胎儿游离DNA和RNA相比,胎儿细胞含胎儿完整的遗传信息,被认为可用于胎儿染色体非整倍体异常和遗传性疾病等的无创产前诊断(non-invasive prenatal diagnosis, NIPD)。胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood cells, fNRBCs)是母体外周血中常见的胎儿细胞之一,由于其具有特异性标志物、生命周期短等特点,目前被认为是NIPD的最佳原材料。但是fNRBCs在母体外周血中的含量极低,在分子诊断前需进行分离和富集。本文将从fNRBCs应用于NIPD的优势以及不同的分离和富集方法进行综述。

一、母体外周血中的胎儿细胞

母体外周血中的胎儿细胞包括滋养层细胞、淋巴细胞、粒细胞、造血干细胞(haematopoietic stem cells, HMCs)和fNRBCs。滋养层细胞并不常见,且缺少特异性标志物,很难被富集。此外还存在嵌合,约1%的滋养层细胞来源于母体^[2]。胎儿淋巴细胞在母体外周血中可超过27年,不适用于检测当前妊娠的胎儿信息^[3]。粒细胞生命周期短,且不易被检测到。虽然可通过CD34⁺抗体富集HMCs^[4],但是无法区分母体或胎儿来源,且从母体外周血中的分离出的CD34⁺细胞经过细胞培养后,所获得的克隆(1523和1674个克隆)中均未发现胎儿来源细胞^[5]。因此,这些胎儿细胞不适用于NIPD。

二、母体外周血中fNRBCs的特点

fNRBCs是一种单个核细胞,分化良好,具有以下优点:(1)包含胎儿的全部遗传物质;(2)最早出现在孕6周,早、中孕期的fNRBCs的计数随着孕周的增加而增加;(3)有一定的增殖能力,生命周期短(≤90天),在母体外周血中仅存在25~35d;(4)可代表当前妊娠胎儿的遗传信息。在分娩

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2018.01.010

基金项目: 深圳市三名工程(SZSM201406007); 深圳市出生缺陷研究重点实验室(ZDSYS201504301707152); 深圳市知识创新计划基础研究项目(JCYJ20130402151000856); 深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(2013063, 2014067, 2017JD001)

作者单位: 518100, 暨南大学附属深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室¹, 产科⁴; 518100, 深圳市出生缺陷研究重点实验室²; 450052, 郑州大学附属第一医院消化内科³

通信作者: 熊礼宽, Email: xionglk@sina.cn

后或终止妊娠后3个月,母体外周血中检测不到fNRBCs;(5)具有独特的形态学特征和细胞内容物,可与其他有核细胞区分;(6)具有独特的物理特性和特异性表面标志物,可用于细胞的分离和富集。基于上述优点,fNRBCs被认为是NIPD的最佳原材料^[6]。

fNRBCs在孕母体外周血中的含量低,大约为 $1/10^5 \sim 1/10^9$,且受成人有核红细胞(adult NRBC, aNRBCs)的干扰,1个fNRBCs可能混杂有1~100 aNRBCs,在无创产前中的应用受到极大的限制^[7]。即使是通过显微操作技术捕获的单个细胞中,也约有30%~50%的细胞为aNRBCs。fNRBCs的有效分离面临巨大的挑战。

三、fNRBCs的分离和富集方法

fNRBCs的分离和富集方法主要分为三类。第一类是物理分离法:根据fNRBCs的固有物理形态和特征进行分离,如细胞的大小、密度、可变形和染色等特征,包括离心法、显微镜下单细胞分离术、选择性红细胞溶胞术(selective erythrocyte lysis)、基于NRBCs固有特性和流体特性的微流控技术、电荷流分离法(charge flow separation, CFS)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLP)。第二类是抗原-抗体结合分离法:根据fNRBCs表面特异性抗原特性进行分离富集,包括磁激活细胞分选术(magnetic activated cell sorting, MACS)、荧光激活细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)、基于凝集素的有核红细胞分离法(lectin-based erythroblast isolation, LBEI)和MACS结合微流控技术。第三类是增殖法,包括体外增殖法和体内增殖法。为了提高分离和富集产物中fNRBCs的纯度,常两种或两种以上的方法联合使用,如离心法+MACS/FACS+显微捕获。

(一)基于NRBCs的固有物理形态和特征的物理分离法

1. 离心法:离心法是利用细胞物理特征的差异进行分离的方法,分为密度梯度离心法和速率沉淀离心法。而密度梯度离心法分为:单密度离心法(single density enrichment, SDG)、双密度离心(double density enrichment, DDG)和三密度离心法(triple density enrichment, TDG)。密度梯度离心法是利用有核细胞具有不同的密度进行分离的方法,用于去除母体外周血中的成熟红细胞和白细胞(中性粒细胞的密度为 $1.084 \sim 1.088 \text{ g/ml}$),常作为NRBCs分离和富集的第一步^[8]。NRBCs的细胞密度多变,在外周血中检测到的密度为 $1.065 \sim 1.093 \text{ g/ml}$,不同密度下离心获得的NRBCs的数量不同。研究发现,SDG富集NRBCs时,密度越高,分离到的有核红细胞的数量越多^[9]。Smits等^[10]比较了 $1.075 \sim 1.107 \text{ g/ml}$ 不同密度Percoll液下,发现在 $1.075 \sim 1.098 \text{ g/ml}$ 密度下,NRBCs的富集数量随着Percoll液密度的增加而增加。另一项研究比较了 1.090 g/ml 和 1.119 g/ml Histopaque液,发现 1.119 g/ml 密度下可获得3倍数量的Hb-r⁺细胞。Troeger等^[11]在对比了不同密度的Ficoll淋巴细胞分离液

($1.077, 1.098, 1.110, 1.119 \text{ g/ml}$),发现 1.119 g/ml Ficoll液可获得更多更纯的NRBCs,在20 ml母体外周血中平均分离到11756.75个NRBCs。随后的SDG的研究多采用 1.119 g/ml Ficoll液^[9]。由于细胞的密度与细胞的体积有关,不同渗透压下,细胞的体积可能发生改变,也可能影响NRBCs的富集效果。Cheng等^[12]利用尿素干预膜K-Cl同向转运体(K^+/Cl^- cotransporter, KCC)改变红系细胞容积,进行NRBCs分离富集的研究,发现在高渗体系、高浓度尿素(400 mmol/L)和一定的时间(10 min)下,结合SDG, NRBCs富集率达到69.9%,是传统富集效率的5倍。Kwon等^[13]比较了不同渗透压下不同密度($1.077 \text{ g/ml}: 250 \sim 390 \text{ mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}; 1.119 \text{ g/ml}: 500 \sim 650 \text{ mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$)两种淋巴细胞分裂液(Percoll和Histopaque液)对NRBCs的富集效果,发现 1.077 g/ml ($280 \text{ mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$)和 1.119 g/ml ($520 \text{ mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$)的Percoll液获得的细胞数量最多且纯度最高。但是由于淋巴细胞($1.054 \sim 1.077 \text{ g/ml}$)和淋巴母细胞($1.050 \sim 1.073 \text{ g/ml}$)与NRBCs的细胞密度重叠,因此,仅进行密度梯度离心获取的细胞纯度很低。基于淋巴细胞($4.9 \sim 6.0 \text{ mm/h}$)和NRBCs($5.1 \sim 7.4 \text{ mm/h}$)的细胞大小存在差异导致的沉降速率不同, Sitar等^[14]在 1.077 g/ml 密度梯度离心后进行速率沉淀离心,进一步富集和纯化NRBCs,在骨髓样本中,将纯度从15%提高到70%。

由于血液中的幼稚细胞处于分化阶段,同一类细胞的大小和密度介乎一个区域,SDG采用单个固定的密度,对NRBCs的富集效能有限,仅能富集到固定密度下的NRBCs(NRBCs的丢失率为30%~60%),因此,研究者开发了DDG和TDG,将样本通过不连续密度的混合分离液,收集所有对应液面的细胞,尽量减少NRBCs的丢失。在比较了SDG(Histopaque- 1.077 g/ml), DDG(Histopaque- 1.109 g/ml 和 1.077 g/ml)和TDG(Histopaque- $1.119 \text{ g/ml}, 1.107 \text{ g/ml}$,和 1.077 g/ml)后, Andrews等^[15]发现,在DDG的下层中和在TDG的中层中,细胞数量和纯度高。Al-Mufti等^[16]也发现TDG较SDG可获得更多的NRBCs。

2. 显微镜下单细胞分离术:显微镜下单细胞分离术既可独立使用,可也与化学染色或荧光标记结合使用。未染色的NRBCs在光学显微镜下具有独特的形态学特征:直径为 $12 \sim 16 \mu\text{m}$,低核质比和细胞核偏向一侧^[17]。Giambona等^[18]在40X的光学显微镜下,用直径为 $45 \mu\text{m}$ 的玻璃微量吸液管成功捕获单个NRBCs。化学染料染色后, NRBCs的细胞形态更为明显:低核质比,小且深染,正色以及无颗粒细胞质。Watanabe等^[19]和Sekizawa等^[20]分别用活检移液器或玻璃毛细移液器成功捕获了Pappenheim染色和Giemsa染色后的单个NRBCs。但上述方法无法区分aNRBCs和fNRBCs。Kleihauer抗酸染色后, fNRBCs细胞质深染,而aNRBCs染淡红色或不着色,利用这种差异, Liu等^[21]在显微镜下用玻璃针成功挑选出fNRBCs。此外,使用光散射光谱,在 > 600

nm 波长下,可利用细胞核大小、细胞核/细胞质体积比、细胞器大小和密度特征来区分 aNRBCs 和 fNRBC^[7],但由于未进行母体外周血中 NRBCs 的区分,其在临床中的应用前景还有待检测。此外,荧光标记胎儿血红蛋白链(HbF 或 Hb-ε)和胎儿性别标记物(X- 和 Y-)后,也可分选单个 fNRBCs^[22]。

虽然在显微镜和微量移液器的帮助下,可成功捕获单个 NRBCs 或 fNRBCs,但是手工操作对操作者的专业要求高,且耗费大量的人力。Oosterwijk 等^[23]建立了自动化显微镜图像分析系统和捕获系统,识别荧光标记的 HbF⁺、X- 和 Y-细胞,相对于手工操作,自动化减少了捕获的工作量,获得了更多的胎儿细胞。该系统并未推广,目前仅有 Oosterwijk 实验室在进行研究,其优缺点有待进一步研究的评估。

激光显微切割及光压反弹取样系统(Laser microdissection and pressure catapulting, LMPC)是一种有效的、自动化获取单个细胞的方法。通过显微镜下的紫外激光切割,然后给予激光弹射作用,单个细胞反弹,落入收集装置中,避免了交叉污染,也几乎不造成细胞的损伤。PALM MicroBeam 系统的 LMPC 可以对图像进行自动处理、样本识别和高通量处理。获得的单个细胞可进行进一步的分子检测。Kolialexi 等^[24]利用 LMPC 在 22 个孕妇外周血中分离到 224 个单个 NRBCs,用于地中海贫血的产前诊断,但是由于 PCR 扩增不佳,仅一半的细胞进行了基因分型研究。LMPC 可进行自动化的 NRBCs 的分离,但是细胞丢失过多,且获取的细胞质量可能较差,导致后续的分型效能不足。

3. 选择性红细胞溶胞术:由于 fNRBCs 具有较低的碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)活性,对 NH₄Cl/HCO₃ 介导的细胞溶解不敏感,当一定剂量的 CA 抑制剂(如乙酰唑胺)作用下,胎儿细胞不易被溶解,但具有较高 CA 活性的成人细胞易被溶解。Collarini 等^[25]在脐血和母体外周血中加入一定浓度的 CA 用于去除成熟红细胞的污染。但是细胞溶解过程无有效的控制手段,细胞溶解后还需要离心收集胎儿细胞。但在离心过程中细胞溶解仍继续进行,可导致胎儿细胞的丢失。此外,由于母体外周血对于 fNRBCs 是高渗环境,因此, fNRBCs 在母体外周血中存在一段时间后,可能更易溶解。综上,选择性红细胞溶胞术并不适用于 fNRBCs 的富集。

4. 微流控技术:微流控技术是利用 NRBCs 的物理特征或表面抗原来分离 NRBCs。Mohamed 等^[26]和 Huang 等^[27]基于 NRBCs 的细胞大小、可变形和在流体中的侧向位移,分别设计了不同孔径的微流控装置用于 NRBCs 的分离,每毫升外周血中可捕获 0.37 ~ 274.36 个 NRBCs,是其他方法的 10 ~ 20 倍。但通量(0.35 ml/h)^[26]和纯度(混有 5 000 000 个 RBCs 和 ~ 8000 ~ 8 000 000 个 WBCs)^[27]均较低,也可能存在芯片堵塞^[26]。Lee 等^[28]采用第三代微流控技术进一步去除了 46.5% 的混杂成熟红细胞,富集到 74.0% 的 NRBCs,提

高了 NRBCs 的纯度。为进一步纯化 NRBCs,Byeon 等^[29]通过白细胞表面抗原 CD45 和 CD66b 建立了磁珠阴选微流控技术,结合二次 RBC 超聚合技术(阳选),将 NRBCs 的分离纯度提高到 87.8% ± 5.3% (20% ~ 100%)。利用该方法,每毫升母体外周血中可分离到 1 ~ 396 个 NRBCs,仅混有 0 ~ 6 个白细胞, NRBCs 的丢失率仅为 6.02%。二次 RBC 超聚合技术结合磁珠阴选微流控技术是目前所有 NRBCs 分离富集方法中可获得的最多数量和最纯细胞的方法。

5. 电荷流分离法:CFS 是基于细胞在电场中的迁移速率不同而建立的方法。在母体外周血中,不同细胞表面的电荷密度不同,在逆梯度缓冲液中迁移的速率不同,给予一定强度和时间的电场后,可以实现细胞的分离。CFS 具有自动化、快速的优点,可获得比抗原-抗体依赖分离富集法更多的细胞,富集到的细胞中约 30% 为胎儿细胞,但该方法研究较少,需要更多的研究证实其优势^[30]。

此外,在基于双向电泳的芯片实验平台(dielectrophoresis-based lab-on-chip platforms, DEP)上改变电场强度和频率,使得细胞朝向或远离高电势的方向运动。DEP 对细胞的影响小,分离的细胞具有活性,可用于进一步的分子学研究^[31]。但是该技术目前还未用于 NRBCs 的分离。

6. 高效液相色谱法:fNRBCs 中高表达 HbF,而仅有 1% 成人红细胞表达 HbF, Huber 等^[32]基于此原理,使用 HPLC 成功分离了 fNRBCs。该方法快速,流速为 1.3 ml/min,但是细胞丢失过多,分离到的 NRBCs 数量小于整体数量的 20%。

(二) 抗原-抗体结合分离法

有核红细胞表面抗原常用于细胞的分离,包含转铁蛋白受体(CD71)、血型抗原(ABO, R, MN 等),血小板反应蛋白(CD36),红细胞生成素受体(GPA)和 HLA-G。胎肝是早期的造血器官,胎肝表面抗原 HAE9, FB3-2, H3-3 可作为 NRBCs 的特异性抗原。将相应的特异性单克隆抗体包被在载体上后,可用于 NRBC 的阳选。Troeger 等^[11]比较了 GPA, CD36, CD71, HAE9 和 i 抗原对于 NRBC 的富集效率,发现 GPA 可获得更多的 NRBC,其次为 HAE9 和 CD71。

目前所有获得的表面抗原并非 NRBCs 的特异性抗原。如 CD36 表达于单核细胞、血小板和红细胞表面;CD71 在红系和粒系的增殖细胞均有表达;即使是使用仅在红系分化的细胞表面高度表达 GPA 相应的抗体,也无法获得纯的 fNRBCs。因此,更为特异性的 fNRBCs 表面抗原还有待开发。有学者曾使用中孕期胎肝组织分离的 fNRBCs 作为免疫原注射小鼠腹腔,诱导产生 NRBC 膜抗体(monoclonal antibodies, mAbs),其中有 4 种抗体(mAb 2E11.3, mAb 2B7.4, mAb 4B2.1 和 mAb 2F6.3c,可识别至少转铁蛋白受体中的两种敏感型抗原表型)不与白细胞结合,可获得更纯的 NRBCs;其中,利用 mAb 2B7.4 可分离富集的 NRBCs 数量

最多,在78例检测的孕妇外周血中均分离到NRBCs(3~336个/25 ml),且90%的孕妇分离出10个以上NRBCs。Zimmermann等^[33]使用fNRBCs免疫小鼠,诱导产生4B8和4B9为fNRBCs的新的抗体,该抗体不同于已知的抗体,且不能与aNRBCs结合。此外混杂细胞特异性膜表面抗原也被用于筛选。如表达于所有白细胞表面的CD45和存在于单核细胞、巨噬细胞表面的CD14。

fNRBCs在母体外周血中数量少,单独利用表面特异性抗原进行分离富集并非高效之举,因此,寻找fNRBCs表面特异性抗原进行阳选和阴选,联合其他细胞的特异性膜表面抗原进行筛选,以及联合应用其他实验技术方法进行组合,将有希望高效便捷地富集出临床级的fNRBCs用于下一步的诊断。

1. 磁激活细胞分选术:MACS是将特异性抗体包被在磁珠上,与细胞混合孵育后,磁珠上的抗体与细胞表面的特异性抗原结合,在磁场的作用下分离细胞。最初的研究先将特异性抗体与NRBCs表面的膜抗原相结合,然后加入包被抗IgG二抗的磁珠捕获细胞,随后的研究发现可将特异性抗体直接包被在磁珠上,精简了实验过程。根据包被抗体磁珠的大小,可分为maxiMACS分选法和miniMACS分选法,研究发现miniMACS法获得的NRBCs的纯度高于maxiMACS,后续的研究绝大多数使用miniMACS分选法。根据包被在磁珠上的抗体,MACS还可分为阳选和阴选,阳选时磁珠上包被anti-CD71抗体或anti-GPA抗体等,捕获结合磁珠的细胞;阴选时磁珠上包被anti-CD45抗体等,收集未结合磁珠的细胞。阴选可减少抗体和磁珠对靶细胞膜表面的刺激,对NRBCs的影响较少。使用MACS分离富集NRBCs时,使用单次阳选MACS(CD71⁺)^[24]或MACS(GPA⁺)^[34],或者单次阴选MACS(CD45⁻)^[35]或MACS(CD45⁻和CD14⁻),称为一步法;也可阳选和阴选相结合,先进行MACS(CD45⁻和/或CD14⁻)阴选,再进行MACS(CD71⁺和/或GPA⁺)阳选,称为两步法,Jansen等^[36]发现一步法(16%)获得的fNRBCs的细胞数量是两步法(8%)的2倍,提示在fNRBCs的富集过程中,多步操作会导致细胞的丢失。但是Pongsritasana等^[37]发现二步法可获得更多的NRBCs。

2. 荧光激活细胞分选术:FACS也被称为流式细胞术,其原理是荧光标记抗体结合的细胞悬液通过流式细胞仪的细胞分选器时,根据单个细胞携带的荧光标记的不同,将特殊的细胞从细胞群中分离或计数^[38]。与MACS相比,FACS可获得更纯的NRBCs,但需要特殊的仪器,且荧光标记价格昂贵,因此,在实际研究中,FACS的使用频率低于MACS。与MACS不同,FACS可在一个细胞上同时标记多个阴选和阳选荧光抗体,且除了可标记抗细胞表面抗原的抗体外,还可标记细胞内特殊蛋白如HbF、Hb或Hb- γ 链等^[39]。D'Souza等^[40]比较了FACS(CD45⁻/HbF⁺/GPA⁺)和FACS(CD45⁻/HbF⁺/CD71⁺)对fNRBCs的富集效能,前者可捕获更多数

量的fNRBCs,后者可获得更纯的fNRBCs。不同抗体组合富集到的fNRBCs的纯度不同,FACS(CD71⁺/CD36⁺/GPA⁺细胞)为(4.6 \pm 1.5)%,而FACS(CD45⁻/HbF⁺/GPA⁺)细胞为0.0001%~2.03%^[41]。

3. 基于凝集素的NRBCs分离法:凝集素可与红系前体细胞表面高表达的半乳糖上的糖链相结合,在不损伤细胞的前提下分离细胞。基于上述原理,使用大豆凝集素(soybean agglutinin, SBA)共轭结合NRBCs表面糖蛋白的半乳糖糖链,用于有核红细胞的富集。SBA用于有核红细胞的捕获有以下特点:(1)低浓度的SBA优先与有核红细胞结合,实验研究最适的SBA浓度为50 μ g/ml;(2)不与白细胞结合,降低了母源白细胞的污染;(3)可获得更多的有核红细胞,是MACS/CD71细胞数的8倍^[42];(4)与磁珠相比,LBEI获得的细胞更好的保留了细胞形态,利于后期的形态学观察和分析^[42];(5)与其他富集方法需要单克隆抗体或荧光标记抗体相比,凝集素更为廉价,其基质使用聚苯乙烯,无需购置特殊的仪器和设备。与其他有核红细胞分离的方法一样,LBEI富集的有核红细胞中有大量的母源细胞污染,其纯度低于MACS方法^[42]。使用Y特异性探针检测发现捕获的NRBCs中,仅7.5%~43.5%细胞为胎儿来源,大部分样本的胎儿来源NRBCs占比为30%左右^[39],还需要结合其他方法进一步去除混杂的母体细胞。多个研究使用LBEI方法进行有核红细胞的富集,发现该法还存在以下缺点:(1)SBA可与成熟红细胞结合,导致其过度消耗而影响与NRBCs的结合;(2)脐血模型(脐血:外周血=1:50)和外周血中NRBCs的占比和状态不同,通过脐血模型确定的SBA的最佳浓度并不能直接用于外周血中NRBCs的富集;(3)常规LBEI实验耗时,富集一个样本约需要3~6 h,但与显微捕获技术相结合,可在84 min内获得足够检测的细胞数。

(三) 细胞增殖

虽然通过各种分离方法,可以获得fNRBCs。但是由于数量较少,纯度较低,用于后续的分析还很困难。随后有研究者考虑将胎儿细胞增殖,以保证足够的细胞数量用于分子诊断。细胞增殖的方法分为两种,一种是体外细胞增殖法,也叫细胞培养;另外一种是在体内细胞增殖法。

在小鼠胎肝、卵黄囊、成人骨髓、人绒毛、人脐血和新生儿外周血中分离的NRBCs前体细胞加入促红细胞生成素(erythropoietin, Epo)均可获得一定数量的增殖细胞,加入分裂原(如美洲商路 pokeweed)可提高细胞的增殖能力。Han等^[43]建立了双期液态培养系统,收集母体外周血单个核细胞后,先进行4~5 d Epo非依赖培养,收集非贴壁细胞,再进行3~4 d Epo依赖培养(加入10 ng/ml SCF和1 U/ml Epo),最终获得纯度为90%的 1.3×10^6 个/ml的CD71⁺/GPA⁺细胞,其中HbF⁺细胞占比13.5%。随后,Huber等^[44]用该方法,将去除成熟红细胞的母外周血细胞培养2周后,也获得的数量为 8×10^8 个/ml纯度接近100%的NRBCs。但是

PCR 或 FISH 检测分析发现, 这些母体 - 胎儿细胞共培养获得的 NRBCs 中并没有任何胎儿来源的细胞。Zheng 等^[34]将绒毛膜穿刺样本和母体外周血中 NRBCs 纯化富集后, 再进行培养, 也仅获得 7 % 和 1 % 的胎儿 NRBCs 细胞。此外, Huang 等^[45]设想使用 NRBCs 的显微分离操作和微滴培养技术, 在显微镜下使用 20 μm 直径的微量吸液管吸取单个原始 fNRBCs (primitive foetal erythroblasts, pFEs), 并将获取的单个 pFEs 置于 10 μl 的微滴中进行培养, 但是缺少后续的实验验证, 无法证实该方法的可行性。综上, 细胞培养并不能获得足够数量和纯度的胎儿细胞, 且操作繁琐, 对操作人员要求高, 因此, 细胞培养并非为 fNRBCs 富集的最佳手段。

当母体出现侵入性刺激时, 母体外周血中的 fNRBCs 数量会增加。研究发现, 孕妇进行绒毛膜穿刺后^[46]、羊水穿刺^[47]和终止妊娠后^[48]手术后, 母体外周血中的 fNRBCs 数量是术前的 3 倍。侵入性检查本身已可获取更多和更纯的胎儿样本, 无需再进行母体外周血中的 fNRBCs 的分离。

四、展望

虽然有多种方法可以用于 fNRBCs 的分离富集, 但是目前仍无有效方法获得满足临床要求的 fNRBCs^[50]。fNRBC 在孕母体外周血中的含量低, 在母体血液中存在时间短, fNRBCs 的特异性膜抗原鉴定困难等难点限制了该领域的发展。尽管多学科方法的联合应用, 科学家已经取得了一定成功, 但更为自动化和便捷操作的方法还需要进一步研发。

参 考 文 献

- 1 Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer[J]. *Lancet Lond Engl*, 1969, 1(7606):1119-1122.
- 2 Breman AM, Chow JC, U'ren L, et al. Evidence for feasibility of fetal trophoblastic cell-based noninvasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(11):1009-1019.
- 3 Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(2):705-708.
- 4 Belay E, Hayes BJ, Blau CA, et al. Human cord blood and bone marrow CD34⁺ cells generate macrophages that support erythroid islands[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0171096.
- 5 Manotaya S, Elias S, Lewis DE, et al. Evaluation of a culture system for enrichment of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells present in maternal blood[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2002, 17(2):90-96.
- 6 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.
- 7 Lim KH, Salahuddin S, Qiu L, et al. Light-scattering spectroscopy differentiates fetal from adult nucleated red blood cells: May Lead to noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Opt Lett*, 2009, 34(9):1483-1485.
- 8 Kaur I, Zulovich JM, Gonzalez M, et al. Comparison of two methodologies for the enrichment of mononuclear cells from thawed cord blood products: The automated Sepax system versus the manual Ficoll method[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(3):433-439.
- 9 Emad A, Drouin R. Evaluation of the impact of density gradient centrifugation on fetal cell loss during enrichment from maternal peripheral blood[J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(9):878-885.
- 10 Smits G, Holzgreve W, Hahn S. An examination of different Percoll density gradients and magnetic activated cell sorting(MACS) for the enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2000, 263(4):160-163.
- 11 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.
- 12 Cheng N, Liu F, Zhang LA, et al. Enrichment of nuclear red blood cells by membrane KCC transporter with Urea intervention[J]. *J Clin Lab Anal*, 2011, 25(1):1-7.
- 13 Kwon KH, Jeon YJ, Hwang HS, et al. A high yield of fetal nucleated red blood cells isolated using optimal osmolality and a double-density gradient system[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(13):1245-1250.
- 14 Sitar G, Manenti L, Farina A, et al. Characterization of the biophysical properties of human erythroblasts as a preliminary step to the isolation of fetal erythroblasts from maternal peripheral blood for non invasive prenatal genetic investigation[J]. *Haematologica*, 1997, 82(1):5-10.
- 15 Andrews K, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, et al. Enrichment of fetal nucleated cells from maternal blood: model test system using cord blood[J]. *Prenat Diagn*, 1995, 15(10):913-919.
- 16 Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, et al. Assessment of efficacy of cell separation techniques used in the enrichment of foetal erythroblasts from maternal blood: triple density gradient vs. single density gradient[J]. *Clin Lab Haematol*, 2004, 26(2):123-128.
- 17 Boskabadi H, Zakerihamidi M, Sadeghian M H, et al. Nucleated red blood cells count as a prognostic biomarker in predicting the complications of asphyxia in neonates[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2017, 30(21):2551-2556.
- 18 Giambona A, Damiani G, Leto F, et al. Embryo-fetal erythroid cell selection from celomic fluid allows earlier prenatal diagnosis of hemoglobinopathies[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(4):375-381.
- 19 Watanabe A, Sekizawa A, Taguchi A, et al. Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency by using a single nucleated erythrocyte from maternal blood[J]. *Hum Genet*, 1998, 102(6):611-615.
- 20 Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, et al. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood[J]. *Neurology*, 1996, 46(5):1350-1353.
- 21 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.
- 22 Nagy GR, Bán Z, Sipos F, et al. Isolation of epsilon-haemoglobin-chain positive fetal cells with micromanipulation for prenatal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25(5):398-402.
- 23 Oosterwijk JC, Kneplé CF, Mesker WE, et al. Strategies for rare-event detection: an approach for automated fetal cell detection in maternal blood[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(6):1783-1792.
- 24 Kolialexi A, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of beta-thalassaemia using individual fetal erythroblasts isolated from maternal blood after enrichment[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(13):1228-1232.
- 25 Collarini EJ, Cain CA, Gammon D, et al. Comparison of methods for erythroblast selection: application to selecting fetal erythroblasts from maternal blood[J]. *Cytometry*, 2001, 45(4):267-276.
- 26 Mohamed H, Turner JN, Caggana M. Biochip for separating fetal cells from maternal circulation[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1162(2):187-192.
- 27 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.
- 28 Lee D, Sukumar P, Mahyuddin A, et al. Separation of model mixtures of epsilon-globin positive fetal nucleated red blood cells and anucleate erythrocytes using a microfluidic device[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(11):1862-1866.
- 29 Byeon Y, Ki CS, Han KH. Isolation of nucleated red blood cells in maternal blood for Non-invasive prenatal diagnosis[J]. *Biomed Microdevices*, 2015, 17(6):118.
- 30 Wachtel SS, Sammons D, Twitty G, et al. Charge flow separation: quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy[J]. *Prenat Diagn*, 1998, 18(5):455-463.
- 31 Borgatti M, Bianchi N, Mancini I, et al. New trends in non-invasive prenatal diagnosis: applications of dielectrophoresis-based Lab-on-a-chip platforms to the identification and manipulation of rare cells[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(1):3-12.
- 32 Huber K, Wolf H, Van Lindern M, et al. Development of a rapid means of estimating the haemoglobin F content of candidate fetal cells isolated from maternal blood using HPLC[J]. *Prenat Diagn*, 1996, 16(11):1011-1019.
- 33 Zimmermann S, Hollmann C, Stachelhaus SA. Unique monoclonal antibodies specifically bind surface structures on human fetal erythroid blood cells[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(17):2700-2707.
- 34 Zheng SX, Tong XH, Wu LM, et al. A comparison of in vitro culture of fetal nucleated erythroblasts from fetal chorionic villi and maternal peripheral blood for noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 32(3):194-200.
- 35 Kanda E, Yura H, Kitagawa M. Practicability of prenatal testing using lectin-based enrichment of fetal erythroblasts[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2016, 42(8):918-926.
- 36 Jansen MW, von Lindern M, Beug H, et al. The use of in vitro expanded erythroid cells in a model system for the isolation of fetal cells from maternal blood[J]. *Prenat Diagn*, 1999, 19(4):323-329.
- 37 Pongsritasana T, Wongratanchewin S, Prasertcharoensuk V, et al. Isolation of fetal nucleated red blood cell from maternal blood using immunomagnetic beads for prenatal diagnosis[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2006, 24(1):65-71.
- 38 Giambona A, Leto F, Damiani G, et al. Identification of embryo-fetal cells in celomic fluid using morphological and short-tandem repeats analysis[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(10):973-978.
- 39 D'souza E, Sawant PM, Nadkarni AH, et al. Evaluation of the use of monoclonal antibodies and nested PCR for noninvasive prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in India[J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 130(2):202-209.
- 40 D'souza E, Ghosh K, colah R. A comparison of the choice of monoclonal antibodies for recovery of fetal cells from maternal blood using FACS for noninvasive prenatal diagnosis of hemoglobinopathies[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, 76(3):175-180.
- 41 D'souza E, Kulkarni S, Colah RB, et al. An improved flow cytometric approach for isolation of fetal cells from maternal blood for non invasive prenatal diagnosis of hemoglobinopathies[J]. *Hemoglobin*, 2007, 31(1):39-48.
- 42 Babochkina T, Mergenthaler S, Lapaire O, et al. Evaluation of a soybean lectin-based method for the enrichment of erythroblasts[J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(3):329-330.
- 43 Han JY, Je GH, Kim IH, et al. Culture of fetal erythroid cells from maternal blood using a two-phase liquid system[J]. *Am J Med Genet*, 1999, 87(1):84-85.
- 44 Huber K, Bittner J, Worofka B, et al. Quantitative FISH analysis and in vitro suspension cultures of erythroid cells from maternal peripheral blood for the isolation of fetal cells[J]. *Prenat Diagn*, 2000, 20(6):479-486.
- 45 Huang Z, Fong CY, Gauthaman K, et al. Novel approaches to manipulating foetal cells in the maternal circulation for non-invasive prenatal diagnosis of the unborn child[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(6):1475-1485.
- 46 Ai-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, et al. Distribution of fetal erythroblasts in maternal blood after chorionic villous sampling[J]. *BJOG*, 2003, 110(1):33-38.
- 47 Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, et al. Enrichment of NRBC in maternal blood: a more feasible method for noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2006, 26(6):545-547.
- 48 Ponnusamy S, Mohammed N, Ho SS, et al. *In vivo* model to determine fetal-cell enrichment efficiency of novel noninvasive prenatal diagnosis methods[J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(6):494-502.
- 49 Fournier D, Simard C, Cloutier M, et al. Implementing a routine flow cytometry assay for nucleated red blood cell counts in cord blood units[J]. *Transfusion*, 2015, 55(3, SI):49A-50A.
- 50 Beaudet AL. Using fetal cells for prenatal diagnosis: history and recent progress[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2016, 172(2, SI):123-127.

(收稿日期:2018-01-09)

(本文编辑:陈媛媛)

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/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2018, 8 (1): 53-58.