

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.003

229 例流产绒毛染色体核型分析及两种长期培养方法比较 *

刘海波 王慧慧 郑育红 王 鼎 孙筱放[△]

(广州医科大学附属第三医院 广东省产科重大疾病实验室 广东 广州 510150)

摘要 目的:探讨早期自然流产绒毛染色体核型分析在自然流产病因检测中的应用价值,并比较两种长期培养方法的差别。**方法:**选择孕早期自然流产的孕妇 229 例,在无菌条件下,从宫腔内取出绒毛,同时或单独经胰酶消化法与切碎贴壁法进行细胞培养,传代之后常规进行 G 显带,在显微镜下做核型分析。**结果:**229 例流产胎儿绒毛,培养成功 206 例,成功率为 89.96%。异常核型 105 例,异常率为 50.97%,数目异常者 101 例,占异常核型的 96.19%,以 16 三体最为多见。胰酶消化法的培养成功率及收获时间都显著优于直接贴壁法,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**自然流产绒毛染色体核型分析对流产查因具有实用价值。胰酶消化法较切碎贴壁法对流产绒毛长期培养及染色体核型分析更具实用性。

关键词:自然流产;绒毛;染色体核型分析;细胞培养

中图分类号:R714.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5410-04

Cytogenetic Study on the Chorionic Villi in 229 Cases of Early Spontaneous Abortus and Comparison of two Long-term Culture Methods*

LIU Hai-bo, WANG Hui-hui, ZHENG Yu-hong, WANG Ding, SUN Xiao-fang[△]

(Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510150, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the application of karyotypes of chorionic villi in the first trimester abortus and compare trypsin digestion method with minced adherence method in the isolation and culture of chorionic villi samples in spontaneous abortions. **Methods:** A total of 229 cases of abortus were collected in sterile condition. Trypsin digestion method and minced adherence method were used respectively in chorionic villi cells isolation and the culture of these abortus. These chorionic villi cells were subcultured. Their karyotypes were analysed by G band. **Results:** There were 105 cases with chromosomal abnormalities in the 206 successful cultured abortus over all 229 cases. There were 101 cases with chromosomal numerical abnormality, accounting for 96.19% of chromosomal abnormality. Trisomy 16 was the most common abnormality. Trypsin digestion method had higher success rate and shorter harvest time than minced adherence method ($P < 0.05$). **Conclusion:** Karyotype analysis of abortus villi was benefit to identify the abortion reason and could guide the next pregnancy. Trypsin digestion method used in cytogenetic study of chorionic villi samples in spontaneous abortions was more practicable and efficient.

Key words: Spontaneous abortion; Chorionic villus; Karyotype analysis; Cell culture

Chinese Library Classification(CLC): R714.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5410-04

前言

随着工业化的发展与人们生活方式的改变,不孕不育与生殖健康愈来愈成为困扰育龄夫妇的问题。自然流产是严重影响生殖健康的疾病之一,大约 10%~15%的临床可识别的妊娠以自发流产告终^[1]。进行流产胎儿绒毛组织的核型分析,对查找自然流产病因及优生优育具有重要指导意义。本文总结分析了近一年来广州地区 299 例孕早期自然流产绒毛的异常核型种类和比例,并比较了两种不同绒毛细胞长期培养方法的优劣。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2012 年 11 月至 2013 年 10 月,在广州医科大学附属第三医院就诊,因妊娠后首次出现胚胎停止发育及阴道流血要求终止妊娠而行手术清宫孕妇 228 例(其中双胎妊娠 1 例),且满足以下条件:①平素月经规则;②无内分泌性疾病史;③孕母血清检查 TORCH 感染为阴性;④孕期未使用过激素和避孕药;⑤B 超检查均提示为“胎儿停止发育”或临床检查确诊为“难免流产”。孕妇年龄 21~44 岁,中位年龄 30 岁,孕龄 6~12 周。

1.2 仪器与试剂

CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;染色体分析仪购自德国蔡司公司,ikaros 染色体核型分析软件

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81302079);广州医科大学青年基金项目(2012C10);

广州医科大学附属第三医院青年基金项目(2012Y15)

作者简介:刘海波(1973-),女,博士,主管技师、讲师,主要研究方向细胞遗传学,

电话:020-81292662, E-mail: 122424498@qq.com

△ 通讯作者:孙筱放, E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

(收稿日期:2014-02-27 接受日期:2014-03-21)

购自德国 metasystems 公司;Amniomax 培养基及胰酶购自美国 Gibco 公司;秋水仙素及姬姆萨染液购自广州市达晖生物技术公司。

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集 清宫手术中,在无菌操作下从宫腔内取出绒毛,用无菌生理盐水冲洗表面附带的血液,置于无菌痰杯中,即刻送实验室。

1.3.2 绒毛细胞培养 229 例绒毛样本,皆采用胰酶消化法进行培养。其中 40 例样本,各取等量绒毛组织,同时采用胰酶消化法与切碎贴壁法进行培养。

A. 胰酶消化法 无菌操作条件下,用 PBS 冲洗绒毛组织,去除红细胞及蜕膜组织,置于直径 60 mm 的培养皿中,在体视镜下,挑选 5~6 支树枝状的绒毛组织,称重,用无菌刀片尽量切碎后,加入 0.05%胰酶 2 mL,将胰酶与组织小块收集于 15 mL

的离心管中,置于 37℃ 水浴箱中消化 10 分钟,轻敲混匀两次。将离心管从水浴箱中取出,加入含 10%胎牛血清的 1640 培养基 3 mL 终止消化,1000 rpm 离心 5 分钟,去除上清,加入 0.5 mL Amniomax 培养基,轻柔混匀沉淀,将组织均匀地平铺在培养瓶中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。第 2 天,小心地吸出培养基及未贴壁组织,加入 3 mL 新鲜的 Amniomax 培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养,第 6~7 天换液,倒置显微镜下观察,见到较多的圆而亮的克隆细胞时进行传代,传代细胞长至 50~70%满度时收获。

B. 切碎贴壁法 除不加胰酶之外,其他处理步骤同胰酶消化法。

1.3.3 染色体收获、制片与 G 显带 待细胞长至 50~70%满度时,在培养瓶中加入 25 μg/mL 秋水仙素 30 μL,至终浓度 0.25 μg/mL,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 3.5 小时后取出

表 1 206 例孕早期自然流产绒毛染色体核型

Table 1 Chromosomal karyotype of chorionic villus in 206 miscarriages

Chromosomal karyotype	Number	Percentage	Chromosomal karyotype	Number	Percentage
Total case number	206		Total abnormality number	105	50.97%
Normal karyotype	101	100%	Monosomies	13	6.31%
46,XX	53	49.03%	45,X	12	
46,XY	48		-4	1	
Viable autosomal trisomies	10		Triploidy	6	2.91%
21	6	4.85%	69,XXY	3	
18	1		69,XXX	3	
13	3		Tetraploidy	2	0.97%
Other autosomal trisomies	69		92,XXYY	1	
+2	2	33.50%	92,XXXX	1	
+3	2		Multiple abnormalities	11	5.34%
+4	3		69,XXX,-9,+18	1	
+6	1		49,XXY,+16,+21	1	
+7	3		48,XY,+8,+12	1	
+10	1		48,XY,+2,+13	1	
+11	2		48,XY,+15,+17	1	
+12	1		48,XY,+12,+21	1	
+13	3		48,XXY,+21	1	
+14	1		48,XX,+8,+8	1	
+15	6		48,XX,+2,+20	1	
+16	13		48,XX,+14,+21	1	
+17	3		48,XX,+13,16	1	
+18	1		Structural abnormalities	4	1.94%
+20	8		inv(4)(p14q31.3)	2	
+21	6		15p+	1	
+22	12		46,XY,der(15;21)	1	
47,XXY	1		(q10;q10),+21		

培养瓶。0.05%胰酶消化,收集细胞。1000 rpm 离心 5 分钟,去上清,加入 0.4%枸橼酸钠与 0.4% KCL 按 1:1 新鲜配制的低渗液 1 mL,轻柔混匀细胞沉淀,于 37℃ 水浴中低渗 5 分钟之后,加入冰醋酸: 甲醇 =1:3 的固定液 0.4 mL 进行预固定、1000 rpm 离心 5 分钟,去上清,加入 4 mL 固定液固定 40 分钟,离心后再次加入 2 mL 固定液固定 20 分钟。1000 rpm 离心 5 分钟,留取 0.5 mL 固定液,混匀沉淀,冰片滴片,每个样本滴片 4 张。在 65℃ 的烤箱中老化过夜。第二日常规进行胰酶消化, Giemsa 染色。

1.3.4 核型分析 显带后油镜下至少计数 15 个分散良好的中期分裂相,同时分析至少 5 个染色体带纹清晰的细胞,如果发现嵌合体,至少计数 100 个分裂相,并收获第二瓶细胞再次进行染色体分析。诊断标准按照人类细胞遗传学国际命名(ISCN2009)标准进行。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS13.0 软件进行分析,两组间率的比较采用配对设计下两组频数的卡方检验(McNemar 检验),两组间计量资料的比较采用配对样本资料的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 绒毛组织的培养成功率

229 例绒毛标本中,206 例培养成功,能够收获足够数量且带纹清晰可用于核型分析的分裂相,成功率为 89.96%。培养失败的 23 例病人中,17 例由于标本污染,6 例未见活性细胞贴壁生长。

2.2 孕早期自然流产绒毛染色体核型的种类及比例

在培养成功的 206 例绒毛组织中,正常核型 101 例,异常核型 105 例,异常率为 50.97%。在异常核型中,数目异常者 101 例,占异常核型的 96.19%。结构异常者仅 4 例,占异常核型的 3.81%。在数目异常核型中,以三体最多见,共 79 例,占数目异常的 78.22%,其中可存活三体 (21 三体、18 三体、13 三体)10 例,其他三体 69 例。在三体征中,最常见的染色体异常是 16 三体(13 例),其次为 22 三体,20 三体,21 三体和 15 三体(分别为 12,8,6,6 例)。除了三体之外,另外比较常见的异常核型为 45, X(12 例)和三倍体(6 例)。另有 11 例核型存在着两种以上的异常。异常核型及比例见表 1。

2.3 胰酶消化法与切碎贴壁法的比较

2.3.1 培养成功率的比较 40 例早期流产绒毛样本,各取等量 40mg 绒毛组织,同时采用胰酶消化法与直接贴壁法进行培养并收获制片。采用胰酶消化法培养成功至能进行核型分析的样本为 36 例,成功率为 90.00%;采用切碎贴壁法培养成功至能进行核型分析的样本为 27 例,成功率 67.50%。采用配对设计下两组频数的卡方检验(McNemar 检验),结果显示胰酶消化法的成功率显著高于直接贴壁法,差别具有统计学意义(χ^2 值 =7.1, $P < 0.05$)。两种方法都培养失败的 4 例病人中,3 例由于标本污染,1 例由于胎儿宫内稽留过久,未见活性细胞贴壁生长。

2.3.2 收获时间的比较 比较两种方法皆培养成功的 27 例绒毛组织的收获时间。胰酶消化法的培养时间为 9~11 天,平均为 (9.26 ± 0.53) 天;直接贴壁法的培养时间为 10~13 天,平均为

(11.41 ± 0.69) 天。采用配对样本资料的 t 检验进行比较,胰酶消化法培养流产绒毛组织的收获时间明显快于直接贴壁法,差异具有统计学意义(t 值为 20.912, $P < 0.001$)。27 例绒毛样本应用两种方法进行培养的染色体收获时间见图 1。

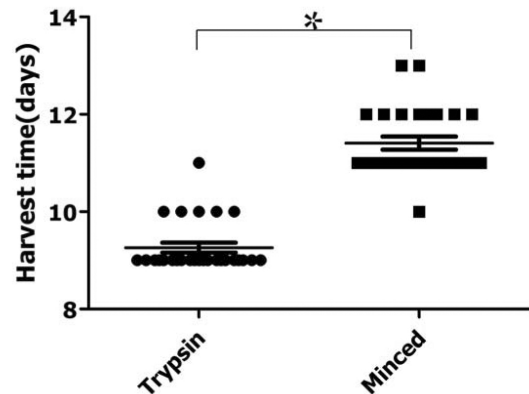


图 1 胰酶消化法与切碎贴壁法用于流产绒毛组织培养的染色体收获时间的比较

Fig.1 Comparison of the chromosomes harvest time between two long-term culture methods

注:两种绒毛长期培养方法染色体收获时间比较,胰酶消化法明显早于切碎贴壁法。*: $P < 0.001$ 。

Notes: To compare the chromosomes harvest time of two long-term culture methods, trypsin digestion methods have obviously shorter chromosomes harvest time than minced method. *: $P < 0.001$.

3 讨论

自然流产是指妊娠不足 28 周,胎儿体重不足 1000g,胚胎或胎儿因某种原因脱离母体而排出者;如流产发生在妊娠 12 周以前称为早期流产,发生在 12 周以后称为晚期流产。大约 10%~15%的临床可识别的妊娠以自发流产告终,其中大多数发生于妊娠 12 周以前^[1]。早期流产的主要原因是胚胎染色体异常,发生率约为 50~60%^[2,3],Carp 等报道其中约 96%为数目异常^[4]。复发性流产占妊娠的 1%~5%,关于复发性流产与初次自然流产的异常率,各家报道不一^[5,6]。Sullivan 报道的 133 例初次自然流产胎儿的染色体异常率为 42.1%^[7],高于 25.4%的复发性流产胎儿的染色体异常率。我们研究分析了一年来广州地区 229 例孕早期初次自然流产胎儿的染色体核型。在本研究中,初次流产绒毛核型异常的检出率为 50.97%,数目异常占异常核型的 96.19%,16 三体是自然流产中最常见的异常核型,其次是 22 三体和 45,X。三倍体是自然流产中整倍体最多见的异常类型。与以往的报道相似^[4,8,9]。研究表明,几乎所有的 16 三体都发生在母亲生殖细胞的第一次减数分裂。80%的 45,X 病例是由父性染色体丢失造成,90%以上的 45,X 病例在妊娠早期流产,少数存活的 45,X 病例妊娠晚期 B 超检查显示囊性水囊瘤和全身水肿。三倍体异常主要由双雄受精或双雌受精所致,与不完全性葡萄胎存在一定的联系^[10]。

自然流产的病因多种多样,涉及遗传因素、免疫因素、内分泌异常、感染、环境中有害因素影响、孕妇的高凝状态和解剖结构异常等多个方面^[11]。复发性流产主要与子宫因素、染色体异

常、血栓形成、免疫因素、生活方式和母体感染、多基因遗传疾病等有关^[12]。而晚期流产,主要与胎儿发育过程中母体因素的异常有关^[13]。早期流产绒毛的形态学研究显示胎盘绒毛的滋养细胞壳较薄,滋养细胞侵袭能力较差和母体动脉的不完全堵塞导致母血进入绒毛间隙过多和过早。在伴有或不伴有染色体异常的早期流产中都存在着绒毛间隙的氧分压过高,从而引起绒毛重塑缺陷及滋养层细胞凋亡增多^[14]。同时,伴有 E-cadherin、IGFI、MAPK1、MAPK8 等蛋白的表达失调^[15]。流产机制的阐明,需要我们对绒毛组织培养及进一步研究的基础上进行。

绒毛来自于胚外中胚层,具有与胎儿相同的遗传物质,孕早期的绒毛活检可以用于产前诊断^[16]。而在流产病例,早期胚胎死亡后一定时间内,绒毛中仍存留相当数量的活细胞,可以用于细胞培养及染色体核型分析。目前,绒毛细胞的检测方法分为直接法和培养法两种^[17]。直接法简单快捷,但成功率低,获得的细胞分裂相少,染色体形态欠佳不利于核型分析及嵌合体的诊断。培养法获得的细胞分裂相多,形态佳,且出现胎盘局限性嵌合体现象明显少于直接制备法^[18]。短期培养法培养的绒毛细胞主要为细胞滋养层细胞,因其将来发育为胎盘,母体细胞污染的可能性有所增加^[19]。因此,本研究采用长期培养法进行流产绒毛染色体制备,获得了较高的成功率(89.96%)。流产绒毛染色体检测成功率与绒毛标本的形态、新鲜程度及终止妊娠的时间等有密切关系^[20]。在本研究中,23 例培养失败的绒毛中,6 例没有足够数量的细胞贴壁生长,都是来自于终止妊娠时间过久的样本。另外,取材过程中的无菌操作极为重要,本研究的 23 例培养失败的绒毛,17 例由于样本污染引起,如果能进一步改善宫内取材过程的无菌操作,将进一步提高培养的成功率。同时,在绒毛组织的挑取过程中,要注意挑选管状的绒毛组织,以尽量避免母体组织的污染。

长期培养法可使用直接贴壁法和胰酶消化法接种,本研究比较了两种接种方法的优劣。结果表明,胰酶消化法接种,无论是在培养成功率,还是收获时间方面,都明显优于直接贴壁法。由于流产绒毛组织已发生了部分降解,不需要胶原酶的作用,胰酶即可以消化出部分单个细胞,使细胞更易于贴壁生长,并有效减少了坏死组织的干扰,因此在临床上是一种更实用的绒毛培养方法。

综上所述,胰酶消化法是绒毛细胞培养用于核型分析的一种实用方法。胚胎染色体异常是导致早期自然流产的重要原因。对孕早期自然流产绒毛进行培养及核型分析有利于查明流产原因,并对下次妊娠有较好的指导意义。

参考文献(References)

- [1] Sanchez JM, F ranzi L, Colia F, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analys is of villi[J]. Prenat Diag, 1999, 19(7): 601-603
- [2] Ljunger E, Cnattingius S, Lundin C, et al. Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84 (6): 1103-1107
- [3] Kim JW, Lee WS, Yoon TK, et al. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment [J]. BMC Medical Genetics, 2010, 11: 153-162
- [4] Carp H, Toder V, Aviram A. Karyotyp of the abortus in recurrent miscarriage[J]. Fertil & Steril, 2001, 75 (4): 678-682
- [5] 韦红卫,杜娟,陈科,等. 自然流产胚胎染色体数目异常的临床研究 [J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(12): 1820-1822
- Wei Hong-wei, Du Juan, Chen Ke, et al. Clinical research on chromosomal numerical abnormality in embryos of spontaneous abortion [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2012, 27(12): 1820-1822
- [6] 曹芳,虞斌,张晓青,等. 反复自然流产夫妇染色体核型分析 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 24(10): 4707-4709
- Cao Fang, Yu Bin, Zhang Xiao-qing, et al. Karyotype analysis on couples with recurrent spontaneous abortion [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 24(10): 4707-4709
- [7] Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, et al. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage [J]. Obstet Gynecol, 2004, 104(4): 784-788
- [8] 刘玉昆,刘颖琳,杜涛,等. 早期妊娠自然流产患者的超声表现与绒毛染色体核型分析[J]. 中山大学学报, 2013, 34(1):94-98
- Liu Yu-kun, Liu Ying-lin, Du Tao, et al. Karyotype analysis on chorionic villus of early pregnancy loss in relation to different ultrasound findings[J]. Journal of Sun Yat-Sen University, 2013, 34(1):94-98
- [9] 李阳洋,章勤. 自然流产绒毛染色体核型分析的研究现状[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(6):431-433
- Li Yang-yang, Zhang Qin. Research status of karyotype analysis on chorionic villus in first trimester spontaneous abortions [J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2012, 28(6):431-433
- [10] Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going [J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(2): 203-208
- [11] Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, et al. New insights into mechanisms behind miscarriage [J]. BMC Med, 2013, 26 (11): 154-159
- [12] 谷春会,梁文君,付璐璐,等. 复发性自然流产危险因素的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(8):758-762
- Gu Chun-hui, Liang Wen-jun, Fu Lu-lu, et al. Risk factors of recurrent spontaneous abortion [J]. Journal of Andrology, 2013, 19(8): 758-762
- [13] Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic factors as a cause of miscarriage[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(29): 3431-3437
- [14] Yurdakan G, Ekem TE, Bahadır B, et al. Expression of adhesion molecules in first trimester spontaneous abortions and their role in abortion pathogenesis [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2008, 87(4): 775-782
- [15] Forbes K, Westwood M, Baker PN, et al. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta[J]. Am. J. Physiol. Cell Physiol, 2008, 294(7): 1313-1322
- [16] 陈蔚瑜,睦建忠,黄沛清,等. 绒毛活检技术在孕早期产前诊断中的应用[J]. 实用医学杂志, 2013, 28(16): 2710-2712
- Chen Wei-yu, Sui Jian-zhong, Huang Pei-qing, et al. Chorionic villus sampling in the prenatal diagnosis [J]. Journal of Practical Medicine, 2013, 28(16): 2710-2712
- [17] Simoni G, Brambati B, Danesino C, et al. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy [J]. Hum Genet, 1983, 63(6): 349-356

- [9] Ionescu Popescu C, Giuscã SE, Liliac L, et al. E-cadherin expression in molecular types of breast carcinoma [J]. Rom J Morphol Embryol, 2013,54(2):267-273
- [10] Xin HW, Yang JH, Nguyen DM. Sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor requires e-cadherin in esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma[J]. Anticancer Res, 2013,33(6):2401-2408
- [11] Zhang X, Zhang Y, Li Y. β -elemene decreases cell invasion by upregulating E-cadherin expression in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2013,30(2):745-750
- [12] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. J Clin Oncol, 2006, 24: 2137-2150
- [13] Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, et al. Asia Pacific Working Group on Gastric Cancer. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice[J]. Lancet Oncol, 2008,9(3):279-287
- [14] Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2012,3(2):117-136
- [15] Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Sci, 2012, 125:4417-4422
- [16] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. Nat Rev Cancer, 2013,13(2): 97-110
- [17] 赵俊卿, 李云峰, 杨之斌. 肿瘤细胞发生细胞上皮间质转变机制的研究[J]. 肿瘤, 2010, 30(10):890-893
Zhao Jun-qing, Li Yun-feng, Yang Zhi-bin. The mechanisms for epithelial -mesenchymal transition in malignant cells [J]. Tumor, 2010, 30(10):890-893
- [18] Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells [J]. Pathobiology, 2012,79 (4): 195-208
- [19] Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, et al. Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2012,1826(12):297-311
- [20] Guo Y, Yin J, Zha L, et al. Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor B, platelet-derived growth factor receptor- β , and E-cadherin expression in gastric carcinoma [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2013,17(2):150-155
- [21] Yoshii T, Miyagi Y, Nakamura Y, et al. Pilot research for the correlation between the expression pattern of E-cadherin- β -catenin complex and lymph node metastasis in early gastric cancer [J]. Tumori, 2013,99(2):234-238

(上接第 5413 页)

- [18] 胡娅莉, 陈雪, 陈蕾蕾, 等. 两种不同遗传学分析方法用于诊断自然流产组织的比较[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 148-151
Hu Ya-li, Chen Xue, Chen Lei-lei, et al. Two different genetic analysis of spontaneous aborted specimen[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2006, 41(3): 148-151
- [19] 程丽村, 赵欣荣, 俞青, 等. 绒毛染色体检测在分析稽留流产原因中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14 (2): 27-29
Cheng Li-cun, Zhao Xin-rong, Yu Qing, et al. Application of karyotype analysis on chorionic villus in missed abortion [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2006, 14(2): 27-29
- [20] 胡舜妍, 廖灿, 潘敏, 等. 绒毛细胞长期培养法在产前诊断及早孕和早中孕期自然流产病因检测中的应用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(7): 35-36
Hu Shun-yan, Liao Can, Pan Min, et al. Application of chorionic villus cells long-term culture in prenatal diagnosis and etiological analysis of early spontaneous abortion[J]. Heredity and Eugenics in China, 2010, 18(7): 35-36