

网络出版时间: 2018-11-5 15:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.029.html>

胚胎植入前遗传学筛查在复发性流产及高龄患者中的应用

韩慧敏^{1,2}, 舒明明^{2*}, 揣云海², 陈梦楠^{1,2}, 郝镁娟¹, 商微², 封志纯³

摘要 目的 探讨胚胎植入前遗传学筛查(PGS)在高龄和复发性流产(RSA)患者中的应用价值。方法 选择91例行PGS治疗的高龄和RSA患者作为研究对象,用单细胞全基因组扩增(WGA)结合二代测序技术(NGS)对胚胎23对染色体进行筛查,选择染色体正常的胚胎进行移植,观察其临床结局。结果 行PGS检测的526枚胚胎,染色体异常率为67.49%(355/526),其中RSA患者染色体异常率为65.96%(217/329),临床妊娠率(CPR)为56.00%(28/50);高龄患者染色体异常率为72.84%(177/243),CPR为57.14%(16/28)。结论 高龄和RSA患者胚胎异常率较高,通过PGS可改善其妊娠结局。

关键词 胚胎植入前遗传学筛查; 复发性流产; 高龄

中图分类号 R 321-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1951-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.029

2018-07-26 接收

基金项目: 首都临床特色应用研究与成果推广(编号: Z151100004 015214)

作者单位: ¹ 安徽医科大学海军临床学院, 北京 100048

² 中国人民解放军海军总医院, 北京 100048

³ 陆军总医院全军优生优育技术研究所, 北京 100007

作者简介: 韩慧敏, 女, 硕士研究生;

商微, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shang.wei@163.com;

封志纯, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: Zhichunfeng81@163.com

* 对本文具有同等贡献

胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)也称胚胎植入前非整倍性筛查即对行体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)发育到第3天或第5天的胚胎进行染色体非整倍性筛查,选择整倍性染色体胚胎移植,以提高临床妊娠率(clinical pregnancy rate, CPR),降低早期流产率。育龄妇女初次妊娠的自然流产率约为5%~13%,而2次自然流产后再次流产的发生率约为24%~29%^[1]。美国生殖医学学会(ASRM)^[2]和美国妇产科医师学会(ACOG)^[3]将复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)定义为2次或者2次以上的妊娠丢失。RSA的病因复杂,包括遗传学因素、解剖学因素、内分泌因素、感染因素、免疫功能异常、抗磷脂综合征及获得性血栓前状态等,其中大部分RSA的发生都与胚胎的非整倍体状态相关,有研究^[4]显示RSA中胚胎非整倍体率超过50%。该文通过分析行PGS的高龄和RSA患者染色体的异常发生率及其临床结局,一是提高上述两种情况的活产率;二是为PGS技术的进一步推广提供临床数据支持。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 G1、G2培养基购自瑞典Vitrolife公司; Covaris S2系统超声购自美国Covaris公司; Qiagen纯化试剂盒购自德国Qiagen公司; DNA建库试剂盒购自美国New England Biolabs公司; HiSeq2500系统购自美国Illumina公司。

for individuals (55.6%, 5/9) infected *via* homosexual transmission ($P < 0.001$). Six point one percent (6/98) of the first sexual partners for the subjects were Burmese, and 3.1% (3/98) were Vietnamese. For those infected with HIV *via* heterosexual transmission, the proportion having foreign sexual partners was 35.3% (6/17). 38.9% (37/95) of HIV-infected individuals used condoms during the whole sexual activity with their first sexual partners, and 28.0% (7/25) used condoms during the whole sexual activity with their second sexual partners among 25 participants with two or more sexual partners. **Conclusion** In some of the border areas of Yunnan, the newly reported HIV-infected people are characterized by low education degree, multiple sexual partner, foreign sexual partner, frequent sexual activity, and low proportion of condom use, which means a potential increase of risk for HIV transmission and specific interventions should be taken into account in the border areas.

Key words Yunnan; border area; newly reported HIV-infected individuals; sexual behavior-related characteristics

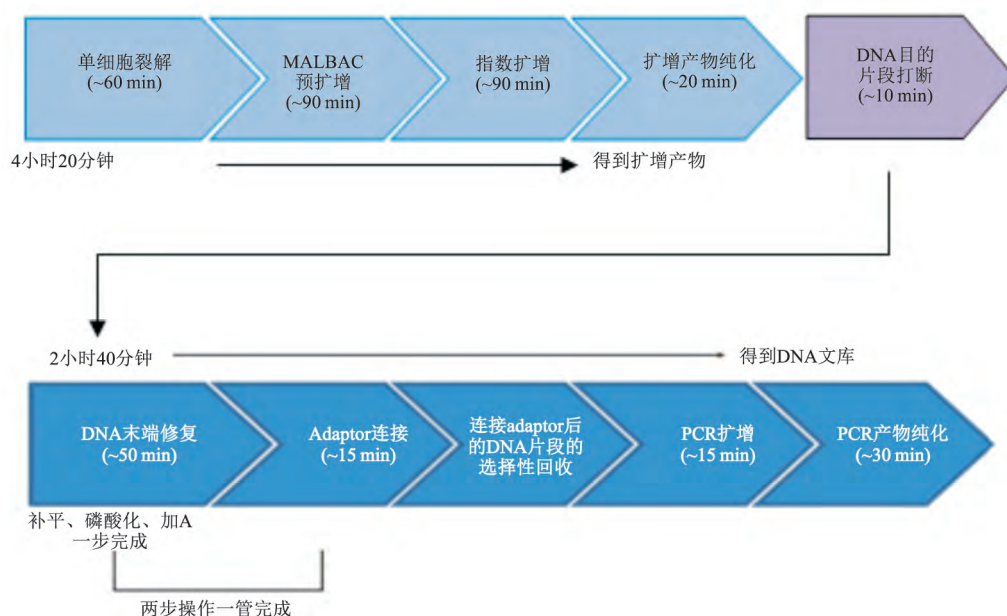


图1 单细胞染色体高通量测序检测流程

1.2 研究对象和方法

1.2.1 病例资料 回顾性分析 2014 年 12 月 ~ 2017 年 3 月在中国人民解放军海军总医院生殖医学中心行 PGS 91 例患者 125 个周期的临床资料,患者年龄 25 ~ 45 (34.06 ± 5.20) 岁,体质指数 (21.34 ± 3.0) kg/m^2 ,基础促卵泡生成素 (7.95 ± 4.1) mIU/ml 。其中 RSA 患者 54 例,均有 2 次或 2 次以上的自然流产史;高龄患者 47 例 (>35 岁),最大年龄为 45 岁;其中高龄的 RSA 患者 10 例。所有患者行 PGS 前签署知情同意书。

1.2.2 胚胎培养、活检 MII (Metaphase II) 期卵母细胞采用单精子胞浆内注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 方式进行体外受精, G1 培养基中进行培养, 48 h 后卵裂胚转移至 G2 培养基中继续培养 48 ~ 72 h。对卵裂期或囊胚期的胚胎进行活检。一般活检单个卵裂球细胞或 4 ~ 8 个囊胚滋养层细胞,活检后的胚胎行玻璃化冷冻,液氮中长期保存。

1.2.3 全基因组扩增及测序 所有活检标本的单细胞全基因组扩增均采用多次退火环状循环扩增技术 (multiple annealing and looping-based amplification cycle, MALBAC)。首先,扩增是通过将 DNA 退火到一个随机引物库中,与由 27 个通用核苷酸序列和 8 个简并碱基组成的随机引物结合,然后进行线性预扩增和指数扩增,最终产生 2 μg 的全基因组 DNA 用于高通量测序。用 Covaris S2 系统超声将 400 ng

纯化好的 DNA 扩增产物打断成 150 ~ 250 bp 片段,再用 Qiagen 纯化试剂盒进行纯化, DNA 建库试剂盒进行建库 (图 1), HiSeq2500 系统进行上机测序。

1.2.4 数据分析 HiSeq 2500 平台全基因组扩增后的每个样本产生约 2 Mb reads 的数据量,高质量的 reads 与 hg19 参考基因组进行比对。染色体拷贝数分析按以下方法进行:整个参考基因组分为若干个 1 Mb 大小不重叠的窗口,计算每个窗口的 Reads 数目,通过 R 语言对每个窗口 GC 含量校正后的 Reads 数目进行作图,使拷贝数变异可视化。

1.2.5 胚胎移植 活检后的胚胎行玻璃化冷冻, PGS 检测结果正常的胚胎将在复苏周期中移植入宫腔,并进行个体化黄体支持。

1.3 分析指标及判定标准 本研究的主要观测指标为胚胎染色体异常率、CPR,持续妊娠率 (ongoing pregnancy rate, OPR),流产率 (miscarriage rate, MR)。异常胚胎率 (%) = 检测回报异常的胚胎数目 / 送检胚胎数 $\times 100\%$, CPR (%) = B 超下可见孕囊的周期数 / 移植周期数 $\times 100\%$, OPR (%) = 持续妊娠周期数 / 移植周期数 $\times 100\%$, MR (%) = 流产周期数 / 妊娠周期数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率 (%) 表示,采用 Fisher 精确检验检验与 χ^2 检验,检验标准取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

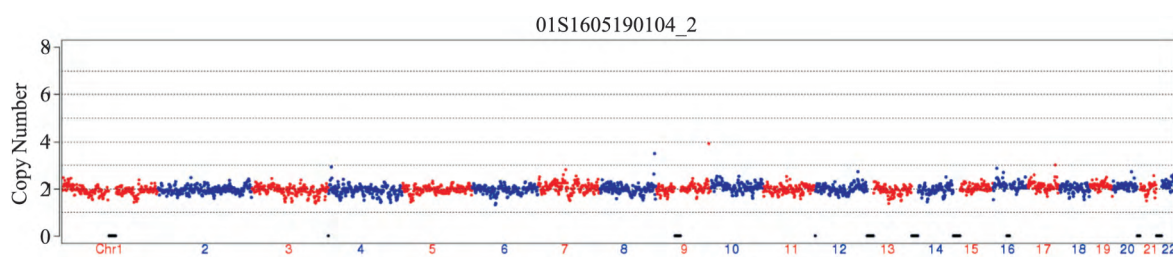


图2 染色体整倍性胚胎(46, XN)

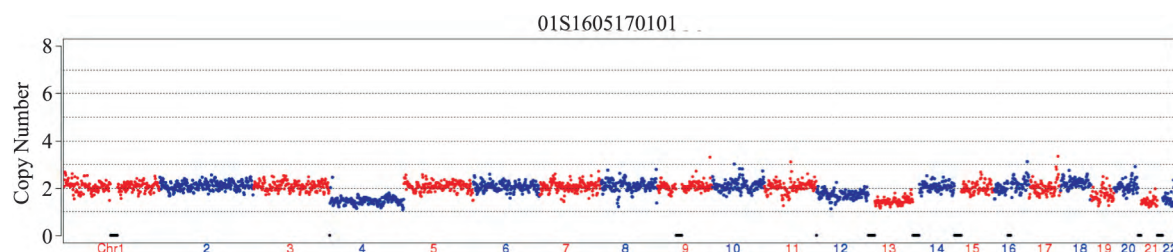


图3 多条染色体异常的胚胎[46, XN, -4(×1, mos*), 13(×1, mos*), -21(×1, mos*), -22(×1, mos*)]

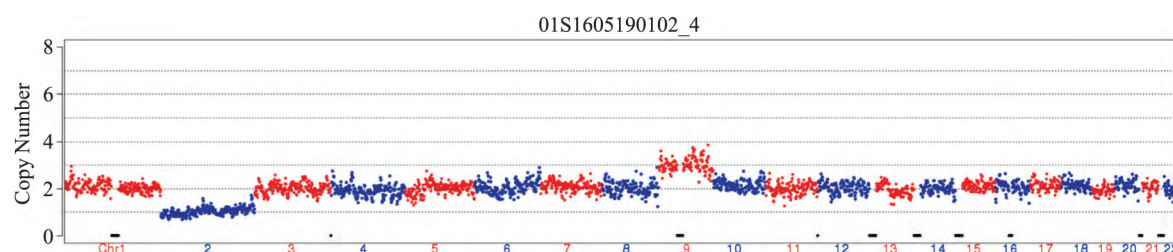


图4 2号染色体单体,9号染色体三体的胚胎[46, XN, -2(×1), +9(×3)]

2 结果

2.1 胚胎异常率 本研究共对 91 例患者 125 个取卵周期的 526 枚胚胎进行 PGS, 其中卵裂胚 74 枚, 囊胚 452 枚, 526 枚胚胎检测结果显示有 355 枚胚胎为染色体异常, 胚胎染色体异常率为 67.49% (355/526)。RSA 患者 83 个 PGS 周期共检测胚胎 329 枚, 217 枚胚胎为染色体异常, 染色体异常率为 65.96% (217/329); 高龄患者 79 个 PGS 周期共检测胚胎 243 枚, 177 枚胚胎为染色体异常, 染色体异常率为 72.84% (177/243), 合并 RSA 和高龄的患者 10 例, 共 37 个取卵周期。见表 1。本研究主要筛查出的染色体异常包括微小缺失、与重复 (10 Mb 以上的片段缺失和重复) 和非整倍体 (mosaic, mos) 表示嵌合疑似, 图 2~4 分别为其中 3 类染色体拷贝数检测结果图, 其中图 2 为整倍体胚胎, 可用于移植, 图 3 为多条染色体异常的胚胎, 图 4 为 2 号染色体单体、9 号染色体三体的异常胚胎, 这两类胚胎

均不可用于移植。

表 1 患者的染色体异常率与临床妊娠结局 [% (n/n)]

项目	所有行 PGS 患者	RSA 患者	高龄患者
胚胎异常率	67.49 (355/526)	65.96 (217/329)	72.84 (177/243)
CPR	56.76 (42/74)	56.00 (28/50)	57.14 (16/28)
OPR	55.41 (41/74)	54.00 (27/50)	53.57 (15/28)
MR	2.38 (1/42)	3.57 (1/28)	6.25 (1/16)

2.2 PGS 的妊娠结局 本研究 91 例行 PGS 助孕患者共实施 74 个单胚胎冻融移植周期, 临床妊娠 42 例, CPR 为 56.76% (42/74); 自然流产发生 1 例, MR 为 2.38% (1/42); 持续妊娠 41 例, OPR 为 55.41% (41/74)。其中符合 RSA 患者共进行了 50 个解冻移植周期, 临床妊娠 28 例, 其 CPR 为 56.00% (28/50); 持续妊娠 27 例, OPR 为 54.00% (27/50); 自然流产发生 1 例, MR 为 3.57% (1/28)。高龄患者共进行了 28 个解冻移植周期, 高龄患者的临床妊娠 16 例, CPR 为 57.14% (16/28); 持

续妊娠 15 例, OPR 为 53.57% (15/28); 自然流产 1 例, MR 为 6.25% (1/16)。其中有 10 例患者合并有高龄和 RSA, 共行 4 次解冻移植周期, 其中 2 例患者在持续妊娠中, 1 例流产, 1 例未孕。两组分组中均纳入了这 10 例患者。见表 1。将高龄患者进一步分为 35~40 岁组和 >40 岁组观察其临床结局。35~40 岁组患者送检胚胎 145 枚, 其中胚胎染色体异常 95 枚, 胚胎异常率为 65.51% (95/145)。35~40 岁组患者共进行了 22 个解冻移植周期, 临床妊娠 14 例, CPR 为 63.63% (14/22); 自然流产 1 例, MR 为 7.14% (1/14)。>40 岁组患者送检胚胎 98 枚, 其中胚胎染色体异常 82 枚, >40 岁组的胚胎异常率为 83.67% (82/98)。>40 岁组患者共进行了 6 个解冻移植周期, 临床妊娠 2 例, CPR 为 33.33% (2/6), 其中 >40 岁组胚胎异常率明显高于 35~40 岁组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), >40 岁组的 CPR 和 MR 均低于 35~40 岁组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 两组高龄患者临床结局 [% (n/n)]

指标	35~40 岁组	>40 岁组	χ^2 值	P 值
胚胎异常率	65.51 (95/145)	83.67 (82/98)	9.744	0.002
CPR	63.63 (14/22)	33.33 (2/6)	/	0.35
MR	7.14 (1/14)	0 (0/2)	/	0.88

3 讨论

人类胚胎的染色体异常率在 40%~60%, 40 岁以上女性染色体异常率可达 80%。有报道表明 <35 岁的女性胚胎着床率约为 30%, 而 40 岁以上女性胚胎着床率仅为 6%^[5], 患者高龄及移植了非整倍体胚胎是导致 IVF 过程中胚胎着床率降低的主要原因。PGS 是早于产前筛查及产前诊断的遗传学筛查方式, 可通过筛查出染色体正常的胚胎改善 IVF 妊娠结局, 在我国主要用于高龄、反复种植失败、RSA 及携带异常染色体的不孕患者^[6]。

近年来随着全基因组扩增技术的应用和发展, 比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH), 第二代基因测序技术 (next generation sequencing, NGS) 因可进行全基因组的染色体筛查, 渐取代了早前的荧光原位杂交技术, 本研究中对所采取的 MALBAC-NGS-PGS 技术是一种新的 PGS 技术, 具有均一性好、等位基因脱口率低、扩增成功率

高等特点, 已经成功应用于单细胞全基因组扩增, 及单个卵母细胞和精子测序^[7], 与 CGH 相比在检测异常染色体敏感性和准确性上并无差别, 但只需要 0.04 x 的测序深度就可以进行全染色体筛查, 且通量高, 速度快, 成本低, 利于 PGS 在临床推广使用^[8]。

本研究采用 MALBAC-NGS-PGS 技术对高龄及 RSA 患者 125 个周期 526 枚胚胎进行 PGS 检测, 结果显示, RSA 和高龄患者 (>35 岁) 胚胎染色体异常率分别达 65.96% 和 72.84%, 其中 40 岁以上患者的胚胎异常率高达 83.67%。RSA 及高龄患者行 PGS 后, 选择染色体正常的单胚胎移植 CPR 可达 56.76%, MR 仅为 2.38%, 进一步证实通过 PGS 可以有效筛查出高龄和 RSA 患者的非整倍体胚胎, 降低因胚胎染色体数量异常导致的流产的风险, 有效改善这两类患者的妊娠结局。另外, 还进一步将高龄人群以年龄 40 岁为界分为两组进行比较。结果表明 40 岁以上组的患者非整倍体胚胎率明显高于 35~40 岁组 ($P < 0.05$), 进一步验证了 Kuliev et al^[9] 和 Pellestor et al^[10] 之前的研究, 即认为女性年龄与胚胎染色体异常发生率成正相关的观点。但是本研究中 35~40 岁组和 >40 岁组之间的 CPR 和 MR 差异均无统计学意义, 这可能是由于本研究中 >40 岁组患者的移植周期数相对较少有关, 因此还需进一步扩充样本量, 完善研究。

但 PGS 的临床应用仍存在许多局限性, 如 PGS 检测是一种侵入性检查, 可能会在一定程度上降低胚胎质量和发育潜能^[11]; 人类胚胎活检的长期生物安全性尚未得到证实, 有研究^[12-13] 表明胚胎活检可对动物胚胎神经和肾上腺发育产生负面影响; 此外 PGS 需具备昂贵的仪器设备以及受过特殊训练和经验丰富的胚胎学家, 增加患者的经济成本^[14], 但随 PGS 技术的进一步完善和经济成本的下降, 将在改善高龄、RSA 患者及染色体异常携带者 IVF 结局方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Stephenson M D. Management of recurrent early pregnancy loss [J]. J Reprod Med, 2006, 51(4): 303-10.
- [2] American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin: management of recurrent pregnancy loss [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2002, 78(2): 179-90.
- [3] Practice Committee of American Society for Reproductive Medi-

- cine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1): 63.
- [4] Ogasawara M, Aoki K, Okada S. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(2): 300–4.
- [5] Munné S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization [J]. *Curr Genomics*, 2012, 13(6): 463–70.
- [6] 岳佳, 李永刚. 胚胎植入前遗传学筛查技术的应用进展 [J]. *生殖医学杂志*, 2015, 24(8): 676–81.
- [7] Zong C, Lu S, Chapman A R et al. Genome-wide detection of single nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1622–6.
- [8] Huang J, Yan L, Lu S, et al. Validation of a next-generation sequencing based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(6): 1532–6.
- [9] Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, et al. Chromosomal abnormalities in a series of 6 733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies [J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 6(1): 54–9.
- [10] Pellestor F, Andreo B, Arnal F et al. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from *in vitro* unfertilized human oocytes [J]. *Hum Genet*, 2003, 112(2): 195–203.
- [11] Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi F M et al. The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis [J]. *Bio Med Res Int*, 2016, 2016: 7193075.
- [12] Wu Y, Lv Z, Yang Y et al. Blastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 271(9): 1761–74.
- [13] Zhao H C, Zhao Y, Li M et al. Aberrant epigenetic modification in murine brain tissues of offspring from preimplantation genetic diagnosis blastomere biopsies [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(5): 117.
- [14] Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for *in vitro* fertilization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(42): 11907–12.

Application of preimplantation genetic screening in recurrent spontaneous abortion and elderly patients

Han Huimin^{1,2}, Shu Mingming², Chuai Yunhai² et al

(¹Navy Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048; ²In Vitro Fertility Center, Dept of Obstetrics & Gynecology, PLA Navy General Hospital, Beijing 100048)

Abstract Objective To investigate the value of preimplantation genetic screening (PGS) in elderly women and recurrent spontaneous abortion (RSA) patients. **Methods** 91 elderly and RSA patients who received PGS in our hospital were selected as the study objects. Single cell whole genome amplification combined with next-generation sequencing technique was used to screen 23 pairs of chromosome by embryo biopsy. The embryos with normal chromosome karyotype were selected for transfer and the clinical outcomes were followed-up. **Results** Total 526 biopsy embryos in 91 patients were performed PGS. The abnormal chromosome karyotype rate was 67.49%. The rate of abnormal karyotype in RSA and elderly patients were 65.96% and 72.84%, respectively, while the clinical pregnancy rate in RSA and elderly patients were 56.00% and 57.14%, respectively. **Conclusion** There are higher occurrence of aneuploidy embryos in RSA and/or elderly patients, whose pregnancy outcome can be improved by preimplantation genetic screening.

Key words preimplantation genetic screening; recurrent spontaneous abortion; elderly