

胚胎植入前遗传学筛查技术在复发性流产中的应用*

肖育红

(沈阳市解放军第 202 医院 优生优育中心, 辽宁 沈阳 110003)

[摘要] **目的:** 探讨胚胎植入前遗传学筛查技术在复发性流产中的应用价值。**方法:** 将 53 例复发性流产患者随机分为对照组 19 例和观察组 34 例, 对照组采用常规体外受精-胚胎移植, 观察组在体外受精后对胚胎进行高通量测序胚胎植入前遗传学筛查, 分析观察组患者高通量测序 PGS 检出染色体整倍体囊胚和非整倍体囊胚数量, 比较观察组和对照组患者的胚胎着床率和早期流产率。**结果:** 观察组复发性流产患者共取 76 枚胚胎, 高通量测序 PGS 共检出染色体整倍体囊胚 37 枚(48.68%), 非整倍体囊胚 39 枚(51.32%); 观察组胚胎着床率明显高于对照组, 而早期流产率较对照组低, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 高通量测序胚胎植入前遗传学筛查整倍体囊胚, 可增加复发性流产患者胚胎着床率, 同时降低早期流产率。

[关键词] 高通量测序; 胚胎植入; 遗传学筛查技术; 复发性流产; 着床率

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)06-0730-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.024

Application of Preimplantation Genetic Screening in Recurrent Spontaneous Abortion

XIAO Yuhong

(ShenYang 202 Hospital of PLA Eugenics Center, Liaoning Shenyang 110003)

[Abstract] **Objective:** To investigate the value of preimplantation genetic screening in recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods:** 53 patients with RSA treated in our hospital from December 1, 2015 to December 1, 2017 were selected and randomly divided into two groups according to the principle of informed consent. 19 cases in the control group was treated with conventional in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) procedures, while 34 cases in the observation group underwent preimplantation genetic screening for high throughput sequencing embryos after in vitro fertilization. Then the high-throughput sequencing results and clinical pregnancy outcomes of the two groups were analyzed. **Results:** A total of 37 euploid blastocysts (48.68%) were detected by high-throughput preimplantation genetic screening, and 39 aneuploid blastocysts (51.32%) were detected. The embryo implantation rate in the observation group was significantly higher than that in the control group (67.65% vs 36.84%); The early abortion rate in the observation group was lower than that of the control group (4.35% vs 42.85%), and the difference between the two groups was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** High-throughput sequencing preimplantation genetic screening of euploid blastocysts can increase the embryo implantation rate in patients with RSA and reduce the early abortion rate, which can be used as a way to avoid recurrent miscarriage in patients with pregnancy defective birth.

[Key words] high-throughput sequencing; preimplantation; genetic screening; recurrent spontaneous abortion; implantation rate

*[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目资助(201602754)

网络出版时间: 2018-06-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180618.1502.021.html>

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指同个性伴侣遭受至少连续 2 次的自然流产或胚胎停育现象, 是育龄妇女常见疾病^[1]。在育龄妇女群体中 RSA 发生率约 2% ~ 5%, 并且随着流产次数增加, 复发风险越高^[2]。导致 RSA 发生的原因有很多, 常见有遗传、免疫、内分泌、感染、解剖和环境等因素^[3-5]。胚胎植入前遗传学筛查 (preimplantation genetic screening, PGS) 是在体外受精、胚胎培养的过程中, 对卵母细胞第一、二极体或早期胚胎的染色体数量和结构进行检测, 筛选出染色体正常胚胎植入宫腔, 从而降低流产率, 增加体外受精 - 胚胎移植临床妊娠率^[6-7], 本研究探讨 PGS 技术在复发性流产中的应用价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 12 月 ~ 2017 年 12 月复发性流产患者 53 例, 随机分为观察组 34 例和对照组 19 例。对照组采用常规体外受精 - 胚胎移植, 23 ~ 46 岁、平均 (27.36 ± 3.26) 岁, 伴侣 22 ~ 49 岁、平均 (28.69 ± 4.12) 岁, 流产次数 2 ~ 6 次、平均 (2.36 ± 0.05) 次, 妊娠时间 12 周以内、平均 (4.36 ± 0.23) 周。观察组在体外受精后对胚胎进行高通量测序 PGS, 23 ~ 45 岁、平均 (28.32 ± 3.49) 岁, 伴侣 21 ~ 47 岁、平均 (28.99 ± 4.76) 岁, 流产次数 3 ~ 5 次、平均 (2.43 ± 0.12) 次, 妊娠时间 12 周以内、平均 (4.68 ± 0.52) 周。两组患者年龄、流产次数、单次妊娠时间以及配偶年龄等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 有可比性。纳入标准: (1) 连续发生至少 2 次自然流产, 且妊娠时间在 12 周以内, (2) 孕妇及性伴侣双方染色体核型正常, (3) 患者催乳素、卵泡刺激素、黄体生成素、孕酮、雌二醇以及睾酮等激素水平均处于正常范围, (4) 盆腔超声以及子宫输卵管造影排除生殖道器质性病变, (5) 宫颈分泌物检查明确无沙眼衣原体、解脲支原体等感染以及近期感染, (6) 自身抗体检测 (-), (7) 性伴侣精液常规检查无异常或异常经治疗后正常, (8) 夫妇双方均表示自愿参与本次研究, 本研究经医院医学伦理委员会审核批准。排除标准: (1) 不符合上述纳入标准者, (2) 病例资料不完整者, (3) 排除严重精神疾病以及不愿配合者。

1.2 方法

1.2.1 仪器和材料 Life Technologies 公司 Ion

Proton 测序仪、定量 PCR 仪、普通 PCR 仪、核酸定量仪、蔡司倒置显微镜、激光破膜仪、显微操作系统、高速离心机。

1.2.2 培养方法 观察组 (1) 体外受精胚胎培养: 患者均采用常规促性腺激素释放激素激动剂长方案控制性超促排卵, 在注射 hCG 后 38 ~ 40 h 行卵胞质内单精子注射, 16 ~ 18 h 后检查受精情况, 胚胎采用卵裂胚培养液作培养基微滴法培养, 每天观察胚胎生长发育情况。(2) D3 卵裂球胚胎及囊胚滋养外胚层细胞活检: 选择细胞数大于 7, 碎片小于 20% 的 D3 卵裂球胚胎置于胚胎活检液, 使用激光对胚胎透明带进行打孔, 通过活检针取出 1 ~ 2 个透明带内的卵裂球细胞, 并将胚胎置于囊胚培养液中继续培养, 在 5 ~ 6 d 时选择 4 期以上的囊胚实施囊胚外滋养层细胞活检; 借助激光在囊胚内细胞团对侧打孔, 其后于培养液中培养 4 ~ 6 h, 采用活检针取 4 ~ 8 个滋养外胚层孵出细胞, 取出的卵裂球细胞和滋养外胚层细胞均置于 PBS 中冷冻保存, 用于全基因组扩增。(3) 单细胞全基因组扩增: 将获取的细胞依次用体外受精专用胚胎培养液和 PBS 清洗后置于 PCR 管, 采用基因组扩增试剂盒对细胞进行全基因组扩增, 并通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物的完整性进行检测。(4) 高通量测序: 采用经生物素标记的寡核苷酸引物将 mRNA 逆转录合成 cDNA, 将 cDNA 经酶切、纯化后制成 cDNA 模板, 并将其与直径为 5 μm 的微球体相连, 在限制性内切酶的作用下将 cDNA 模板消化成含有 4 个碱基末端的 cDNA 模板, 去掉寡核苷酸连接接头后对 cDNA 模板进行测序。(5) 囊胚移植: 在胚胎发育的第 5 ~ 6 天, 根据胚胎发育结果选择 1 ~ 2 个形态发育较好, 且染色体无整倍体异常的胚胎移植入母体宫腔。对照组 体外受精后, 选择形态发育正常的胚胎植入宫腔内。

1.3 观察指标

分析观察组患者高通量测序 PGS 检出染色体整倍体囊胚和非整倍体囊胚数量, 比较观察组和对照组患者的胚胎着床率和早期流产率。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理。计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验; 计数资料用 $n(\%)$ 描述, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序 PGS

观察组 34 例复发性流产患者共取 76 枚胚胎,高通量测序 PGS 共检出染色体整倍囊胚 37 枚(48.68%),非整倍体囊胚 39 枚(51.32%),见表 1。

表 1 各年龄段观察组 RSA 患者体外胚胎高通量测序 PGS 结果

Tab.1 PGS results of *in vitro* embryonic high-throughput sequencing in RSA patients of each age group

年龄段 (岁)	<i>n</i>	获取 胚胎数	整倍体胚 胎数(<i>n</i> ,%)	非整倍体胚 胎数(<i>n</i> ,%)
23~30	19	51	26(50.98)	25(49.02)
31~40	8	17	6(35.29)	11(64.71)
>40	7	8	5(62.50)	3(37.50)
总计	34	76	37(48.68)	39(51.32)

2.2 临床妊娠结局

观察组胚胎着床率明显高于对照组,而早期流产率较对照组低,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 RSA 患者临床妊娠结局(%)

Tab.2 Clinical pregnancy outcomes of RSA patients in the two groups

妊娠结局	观察组	对照组	χ^2	<i>P</i>
胚胎着床率	67.65(23/34)	36.84(7/19)	4.709	0.03
早期流产率	4.35(1/23)	42.85(3/7)	6.887	0.009

3 讨论

随着人类辅助生殖及遗传学分析等技术的快速发展,胚胎植入前的遗传学筛查已经广泛应用于临床胚胎染色体检测,通过检测是否为非整倍体染色体,以剔除发育不良的胚胎,早期改善体外受精-胚胎移植临床妊娠结局^[9-11]。目前临床已经应用的测序方法,如单分子测序、二代高通量测序以及 PGM 测序等方法均取得一定效果,随第二代测序技术的迅猛发展,高通量测序技术已经被认为是目前辅助生殖领域重要的检查手段^[12]。染色体的异常主要包括染色体数目异常和染色体结构异常两种情况,染色体异常的患者可在原始生殖细胞进行减数分裂时形成精子或卵子,继而形成异常配

子,而大量异常配子可能直接导致不孕,若异常配子形成了受精卵,也将面临极大流产或出生缺陷的风险。所以早期进行染色体遗传学筛查,能够极大程度上降低流产率,避免缺陷儿的出生^[13-15]。植入前遗传学诊断主要是通过获取 5 或 6 日囊胚 3~10 个滋养层细胞进行相关分析,以获取遗传学正常的胚胎植入宫腔,继而培育健康的下一代。虽然取得一定成果,但其仅能检测少数几条染色体的情况。而新一代的高通量测序技术可一次性检测 46 对染色体,同时结合生物信息学分析,继而全面地对胚胎全部染色体异常情况进行检测,克服了传统植入前遗传学诊断技术基因测序技术的局限性,同时筛检出全部异常的染色体,从而确保最终植入染色体正常的胚胎^[16]。基于这一优点,目前高通量测序技术已经广泛应用于生物医药等领域,特别是妇产科临床中的产前筛查。

胚胎植入前遗传学筛查技术目前国内属于先进技术,该技术的开展是产前诊断的延伸。其用于高龄产妇及高危产妇产前诊断科有效避免遗传性疾病新生儿的出生,还可有效避免传统产前检查的缺陷,减少中期妊娠遗传诊断以及终止妊娠等情况给孕妇造成的痛苦及危害。胚胎植入前遗传学筛查技术可检测出携带有遗传病基因的胚胎,阻止携带疾病基因的纵向传递,以降低遗传病发生率^[17-19]。本院自建院以来已经有开展辅助生殖技术 10 余年的经验,已能够进行囊胚培养、囊胚滋养层活检、囊胚冷冻、单细胞全基因组扩增等相关技术,且本院为首批获准开展无创 DNA 筛查的医疗机构,具有一定的高通量测序的基础,为开展新一代测序技术应用于胚胎植入前遗传学诊断提供必要的条件。加之目前有关胚胎植入前遗传学筛查技术在复发性流产中的应用价值相关研究较少,为此,特针对 2015 年 12 月~2017 年 12 月收治入院的复发性流产患者 53 例展开研究。本结果显示,采用高通量测序胚胎植入前遗传学筛查技术共筛查染色体整倍囊胚 37 枚(48.68%),非整倍体囊胚 39 枚(51.32%)。既往研^[20]究采用高通量测序技术检测复发性流产患者,平均每个周期检出囊胚(2.8±2.04)个,其中 47.62% 染色体为整倍体囊胚,且该研究发现,胚胎植入前经高通量测序筛查组患者胚胎着床率较未进行胚胎植入前遗传学筛查组患者明显升高,而早期流产率明显降低,提示复发性流产患者经高通量测序胚胎植入前遗传学筛查后,可有效提高胚胎着床率,降低早期流产率,

继而降低遗传疾病发生的风险。井宣等人^[8]也证实了胚胎植入前遗传学筛查技术在复发性流产患者产前筛查中的应用。

综上所述,胚胎植入前遗传学筛查整倍体囊胚,可增加复发性流产患者胚胎着床率,同时降低早期流产率,可作为避免复发性流产患者再次妊娠缺陷儿的出生。

4 参考文献

[1] 海溧, 王晓红. 胚胎植入前遗传学筛查技术在高龄妇女助孕中的应用[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(11):9-13.

[2] 杨岚, 杨月芬, 王俏霞, 等. CNVplex 联合 STR 技术在复发性流产遗传学查因中的应用[J]. 重庆医学, 2017, 46(4):446-449.

[3] 孙莹璞. 重视植入前遗传学诊断及筛查技术的安全性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016, 32(3):213-215.

[4] 赵雪, 张玲. 胚胎培养液中游离 DNA 应用于植入前遗传学筛查中的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2017, 36(4):323-326.

[5] 钟韵, 偶建, 李红. 胎儿染色体检查在复发性流产患者中的应用价值[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2017, 36(1):61-65.

[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] MEKA A, REDDY B M. Recurrent spontaneous abortions: An overview of genetic and non-genetic backgrounds. [J]. International Journal of Human Genetics, 2016, 6(2):109-117.

[8] 井宣, 崔向荣, 霍凯, 等. 高通量测序胚胎植入前遗传学筛查在复发性流产患者中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016(9):89-91.

[9] MULLER A, WAGNER J, HODZIC A, et al. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes is a risk factor for idiopathic recurrent spontaneous abortion:[J]. Croatian Medical Journal, 2016, 57(6):566-571.

[10] ARJMAND F, GHASEMI N, MIRGHANIZADEH S A, et al. The balance of the immune system between HLA-G

and NK cells in unexplained recurrent spontaneous abortion and polymorphisms analysis [J]. Immunologic Research, 2016, 64(3):785-790.

[11] LI Y, WANG X Q, ZHANG L, et al. A SNP in pri-miR-10a is associated with recurrent spontaneous abortion in a Han-Chinese population:[J]. Oncotarget, 2016, 7(7):8208-8222.

[12] MARKOFF A, KURAHASHI H, GRANDONE E, et al. Annexin A5 haplotype M2 is not a risk factor for recurrent spontaneous abortion in Northern Europe: is there sufficient evidence? [J]. Reproductive Biomedicine Online, 2016, 32(5):469-473.

[13] CHEN J L, YANG J M, HUANG Y Z, et al. Clinical observation of lymphocyte active immunotherapy in 380 patients with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. International Immunopharmacology, 2016, 40:347-350.

[14] 谢美娟, 杨学习, 李明等. 下一代测序技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017,9(5):353-357.

[15] 孙贻娟, 曹英, 张硕, 等. 植入前遗传学筛查用于几种适应症的效率初探[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(4):308-312.

[16] ZHANG C. A ssociation betw een Serum TN F-alpha Levels and Recurrent Spontaneous M iscarriage :A M eta-analysis[J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(2):86-93.

[17] 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):676-681.

[18] ZHANG T. A ntithrom botic Treatm ent for Recurrent M iscarriage;B ayesian N etw ork M eta-A nalysis and System atic R eview [J]. Medicine (Baltim ore), 2015, 94(45):e1732.

[19] 井宣, 崔向荣, 霍凯, 等. 高通量测序胚胎植入前遗传学筛查在复发性流产患者中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(9):89-74.

[20] 黄伟伟, 卢建, 董云巧等. 应用 aCGH 技术建立胚胎植入前遗传学筛查[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2016, 8(3):21-24.

(2018-02-07 收稿, 2018-05-27 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森