

困难,影响胚胎的植入。目前研究多推荐对冷冻复苏胚胎进行辅助孵化,以提高胚胎的种植率和妊娠率。

## 6 植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing, PGT) 技术的改进

随着分子生物学检测技术的不断完善,PGT 的应用也逐渐发展,目前不仅可以检测单基因遗传病、染色体疾病和胚胎非整倍体的发生情况,还可应用于研究人类基因,特别是特殊遗传缺陷基因在发育早期的表达。但是,目前活检多通过极体、卵裂球或囊胚滋养层细胞等有创伤性的显微操作,活检的安全性和活检取材的偏差及局限性等尚缺乏长期的评估,且有动物研究发现有可能会影响神经等方面的发育,因此,PGT 迫切需要非侵入性的操作简单的筛查技术。随着多种二代测序技术的革新与发展,人类已经实现了胎儿期由胎儿释放到母体外周血中的游离 DNA 进行非整倍体和单基因遗传病的非侵入性产前检测 (non-invasive prenatal testing, NIPT),并于 2013 年也发现在 D2 胚胎的培养液中也存在由胚胎发育过程中释放出的游离 DNA,由此诞生了无创胚胎染色体筛查 (non-invasive chromosome screening, NICS) 技术,利用培养液中的游离 DNA,结合二代测序技术,已在临床工作上初步应用,与活检技术来源的结果进行比较,NICS 的结果精确度较高,对胚胎不造成任何损伤。但是,NICS 这项技术还需要进一步的优化和改进,尽量避免来自卵丘细胞或粘附在透明带上的精子的污染,通过激光打孔使囊胚皱缩使 DNA 释放量增加等。

优生、生殖安全要从实验室做起,作为胚胎学家,更要严谨、认真对待每一步标准化的操作步骤,也要投入更多关注于实验室技术的改进,为保护配子和胚胎的发育潜能提供更优的环境和条件,将 ART 技术推向更高层次的研究并持续发展。

(收稿日期:2020-01-31)

文章编号:1003-6946(2020)04-0251-03

## 以辅助生殖技术为基础的 临床新技术的发展

应 琰,刘见桥

(广州医科大学附属第三医院生殖医学中心,广东 广州 510150)

中图分类号:R321-33

文献标志码:B

快速发展的当今社会,晚婚晚育、不孕不育、出生缺陷等问题可能面临着越来越严峻的形势,人们对人

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81701518)

通讯作者:刘见桥,E-mail:ljq88gz@163.com

类辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 的期望值也会越来越高,对于生殖和产前诊断领域的专业人员来说,不断探索新的技术和治疗方法以提高妊娠率和活产率,是辅助生殖领域的重要挑战之一,胚胎质量是影响 ART 成功率的关键因素。近年来,研究人员尝试开发新技术来挑选最具潜能的胚胎用于移植,然而,能够用于临床的胚胎评估手段并没有实质性进展,胚胎学家仍在使用趋于主观的形态评分系统。母体年龄依然是 ART 领域的难题之一,高龄标志着卵子数量和质量的下降,卵子质量差导致妊娠失败的主要原因包括:减数分裂出错(非整倍体增加)和线粒体功能异常。针对上述问题,在 ART 技术上发展起来的新技术,包括线粒体移植、植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing, PGT)、无创 PGT 以及基因编辑等,这些技术在当今或者在未来可能发挥巨大作用。

### 1 线粒体移植

1.1 异体线粒体移植 1982 年 Muggleton-Harris 等<sup>[1]</sup>首次将健康卵子的卵胞浆移植入异常卵子后可阻断胚胎发育停滞。随后研究者们将供体卵胞浆移植到具有异常发育倾向的卵子,以获得高质量的胚胎,适用人群包括高龄、卵巢反应差、反复体外受精 (IVF) 失败等患者。

异体线粒体移植包括部分胞浆移植、全部胞浆移植和纺锤体移植,该技术一直备受争议,包括:①由于重建卵含有供者和患者的线粒体,带来重建卵的线粒体异质性问题(纺锤体移植的胞浆带出率 < 6%);②争议也来自技术上的不足,例如,纺锤体移植使用电融合方法来促使膜融合、阻断病毒蛋白质传递和诱导卵母细胞活化,但是有研究发现电融合可能引起非整倍增加。也有研究者采取电融合方法后未发现小鼠重建卵非整倍增加,况且,重建卵的质量问题可能来自于受者卵本身。

此外,纺锤体移植也可用于卵裂期胚胎停滞的问题,近期有学者提出原核移植也能解决线粒体疾病以及更罕见的导致植入前胚胎死亡的情况。现有数据表明纺锤体移植出生子代的线粒体变异均来自供者,而非生物学母亲,提示线粒体移植除了伦理和技术问题,还有来自供者的潜在线粒体遗传缺陷的风险。

1.2 自体线粒体移植 2004 年 Johnson 等<sup>[2]</sup>报道了雌性哺乳动物卵原干细胞 (Oogonial stem cells, OSCs) 的存在,并假设在某种调节下卵巢有能力产生新的卵泡。后续的研究也确证了 OSCs 有能力产生有潜力的卵子和健康的子代。Guo 等<sup>[3]</sup>进一步验证了出生后卵巢内存在活跃的生殖干细胞,生理状态下它们是实

际卵泡池的后备军。

随后研究者发现 OSCs 线粒体与卵子线粒体相似,利用 IVF 患者自身 OSCs 来源线粒体,结合卵胞浆内单精子注射(ICSI)技术,可避免异体胞浆移植带来的线粒体异质性问题。通过注入具有巨大能量潜能的自体 OSCs 来源的线粒体以提高卵母细胞质量的想法,推动了自体生殖系线粒体能量移植(autologous germline mitochondrial energy transfer, AUGMENT)的概念形成。

虽然 OSCs 和卵母细胞具有相同的线粒体群体,但由于其处于休眠状态,代谢率低,DNA 损伤因此远低于卵巢内其他细胞。此外,有研究比较了人类 OSCs、人胚胎干细胞、人胚胎源性体细胞干细胞、人来源多能干细胞、骨髓来源间充质干细胞等体外产生三磷酸腺苷(ATP)能力,结果发现 OSCs 生物能量促进能力最大。

AUGMENT 应用的主要局限:①作为 OSCs 分化“基地”的卵巢皮质组织的来源受限,虽临床上使用自体组织细胞最佳,但随着年龄增长,卵巢内环境可能不足以支撑 OSCs 分化;②OSCs 来源的卵子与内源性卵子有多种潜能的不同,如代谢和孤雌的风险。

因为 AUGMENT 可以避免异体胞浆移植类似的伦理争议,避免线粒体疾病遗传的风险,似乎可以改善 IVF 结局。但目前相关研究极少,仅一项质量不高的研究支持这一直观的想法,唯一一项随机对照试验(RCT)未证实其有效性。基于目前的证据,AUGMENT 不被支持作为一种卵子再生技术应用于反复 IVF 失败患者。此外,胚胎潜能与多种因素有关,不是单靠一个线粒体来衡量。但是 mtDNA 在 IVF 领域仍然富于吸引力,亟待更多的研究来为此开疆辟土。

## 2 PGT

1967 年 ART 先驱 Edwards 等<sup>[4]</sup>对兔囊胚的 X-染色体分析开辟了 PGT 可行性的初次尝试,1985 年随着 PCR 技术诞生才为 PGT 的临床实践创造可能性,1990 年一对 X-性连锁疾病夫妇通过 PGT 诞下世界上第 1 例健康女婴。尽管 PGT 技术有了显著改进,但其面临的现状、局限性以及未来的挑战,值得关注。

2.1 PGT 已成为辅助生殖和遗传学领域既定的临床治疗项目 PGT 通过筛选出无染色体/基因异常的胚胎植入子宫,不仅可以避免一个遗传缺陷子代出生,与传统的产前诊断方法相比,减少了孕中期发现异常后进行治疗性引产带来的对患者家庭和社会的伤害。PGT 技术经过不断创新,已经成为生殖医学和遗传学领域公认的阻断遗传性疾病的有效治疗方法。

2.2 PGT 适应证范围在拓宽 PGT 适应证已从传统的与产前诊断相似的适应证,扩展到从未被产前诊断

覆盖的边缘适应证,包括有遗传倾向的迟发性常见疾病和植入前人白细胞抗原(HLA)配型。目前,PGT 已用于治疗越来越多的具有遗传倾向的疾病,包括不同类型的癌症和心脏病。有研究者报道了 24 种不同的遗传性癌症和二十多种易感基因突变决定的十多种不同的心脏病的 PGT 治疗,癌症相关基因主要是 BRCA1 和 BRCA2;二十多种心脏病易感基因携带者也均有健康无易感基因携带的后代出生。

但由于人类各种基因的交互作用及环境因素的影响等,并非所有易感基因携带者都会发病,且由于发病年龄不确定,因此 PGT 是否适用于这组疾病仍存在争议。从现有的经验来看,越来越多的患者倾向于选择 PGT,让他们有机会从一开始就避免了携带易感基因的子代出生,因此,此类患者应在进入 PGT 周期前需通过肿瘤、遗传咨询及生殖科等多学科协作(multidisciplinary team, MDT)门诊充分知情同意。

2.3 PGT 技术升级,临床获益的同时也面临新挑战

2.3.1 活检技术改进和 PGT 临床流程优化 过去几年内,PGT 程序改进主要体现在从卵裂球活检转变为囊胚滋养层细胞活检或极体活检,活检后囊胚玻璃化冷冻,在随后的非刺激周期移植冻融胚胎。程序改进后优势在于:活检多个细胞进行检测,遗传信息更多,可重复性更好;在随后的非卵巢刺激周期进行胚胎移植,有充分时间进行基因检测,同时摒除促排卵周期高雌激素对子宫内膜容受性的影响,提高了种植率和妊娠率,降低流产率。

2.3.2 PGT-M 据报道,目前运用 PGT-M(PGT for monogenic disorders)治疗的遗传性疾病种类已逾 400 种,不仅可用于遗传性疾病,还可用于新增突变。PGT-M 在现有的 PGT 治疗流程中准确率高达 99%,已成为高度可靠的诊断及治疗技术。

2.3.3 PGT-A PGT-A(PGT for aneuploidy)的一个重要进展是从只能检测少数染色体的 FISH 技术转变为能够检测全部 46 条染色体的二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)。NGS 的引入使妊娠率和着床率显著提高,流产率显著降低。此外,NGS 的运用还揭示了亚染色体变异(sub-chromosomal variations)和嵌合现象,但是,由于没有充分的数据来阐明其潜在的不良影响,给临床咨询带来了新的挑战。

2.3.4 PGT 联合方案 全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)技术,允许同一份活检样本同时进行 PGT-M 和 PGT-A,或 PGT-SR(PGT for structural rearrangements)和 PGT-A。有数据表明,与单独 PGT-M 周期相比,PGT-M 联合 PGT-A 可显著提高妊娠率并降低流产率。此外,通过微阵列比较基因组杂交(array-CGH)或 NGS 技术,PGT-SR 联合 PGT-A 较单

独 PGT-SR,妊娠率提高 2 倍,自然流产率降低 2 倍,表明 PGD-SR 联合 PGT-A 的实用价值。

基于 PGT 发展现状,前景和挑战可能包括但不限于:①新的高分辨率技术的应用也探测到一些新的遗传变异,其生物学和临床意义仍不明确;②对于最有可能达到活产的胚胎选择,遗传检测仍然存在局限性,需要开辟新方法来进行进一步优化选择程序;③开发一种通用 PGT 技术,可以同时检测多种疾病,尽量包括可以在生命周期中各阶段的疾病,主要是目前缺乏症状前诊断和(或)治疗方法;④活检程序从卵裂期向囊胚期的转变,加上玻璃化冷冻技术的应用,极大地促进了 PGT 生殖结局的改善,但仍不能完全避免活检过程中潜在的损伤,因此未来应尽可能开发无创 PGT 方法。

### 3 无创 PGT

现行 PGT 作为一种有创技术,虽然现有数据未发现活检胚胎出生儿童的患病率和先天畸形与自然妊娠出生儿童之间存在显著差异,但是,基于活检损伤和子代健康角度考虑,探索有效的无创评估体系来挑选最具发育潜能的胚胎进行单胚胎移植,也是近年来胚胎学研究的方向。

cell-free DNA 在 1948 年首次在成人血液中发现,直到 1997 年在孕妇外周血中成功分离胎儿来源 cell-free DNA,刷新了产前非整倍体筛查历史,现已成为无创产前检测的主要遗传信息来源。近几年人类胚胎被证明能将 DNA 片段释放到环境中,从囊胚腔液和废培养基中提取到了游离 DNA,但其对胚胎基因组的意义尚未完全阐明。结合 NGS 技术,对这些核酸的识别可能是无创 PGT 取得重大突破的关键点。但是目前对于胚胎游离 DNA 来源和释放机制尚无充分认识,而且游离 DNA 产量低、完整性较差,进一步限制了其临床运用,亟待更多的科学研究深入探索。

### 4 基因编辑技术

基因编辑首次直接在人类胚胎上运用的报道是在 2015 年 3 月,虽然研究中所用的是废弃的 3PN 胚胎,但是在社会各界引起强烈反响,甚至呼吁暂停所有人类胚胎基因编辑。2015 年 12 月在华盛顿举行了人类基因编辑国际高峰论坛,美国国家科学院(NAS)和美国国家医学院(NAM)成立工作组,负责审议人类基因组编辑有关的科学、伦理和社会问题。会议报告于 2017 年 2 月发表,该准则在国际范围内被广泛认

同,并指出能够用于人类健康研究的以下 3 种情况:①作为人类细胞或胚胎的基础研究工具,帮助了解正常发育、模拟人类疾病和开发新的治疗方法[genome editing for basic research, including embryos(在现有监管程序下进行)];②用于体细胞的基因编辑,无论体外或体内,以治疗或预防疾病[somatic gene editing to treat serious diseases(在现有监管程序下进行)];③在配子或胚胎中进行基因编辑,目的是纠正子代中引起疾病的基因突变,即所谓的生殖系基因编辑[germline editing to treat serious genetic diseases where no reasonable alternative exists(在严格监管下谨慎行事)]。CRISPR/Cas9 基因编辑目前禁用于:禁止将人类基因编辑,扩展到治疗或预防严重疾病之外的基因增强策略,无论是体细胞还是生殖系[somatic or germline editing for enhancement purposes(目前禁止进行)]。并呼吁在全球范围内监管有关基因编辑的科研进展、伦理和管理规范。

尽管 IVF 已被普遍应用于不孕症治疗,但我们对与人类胚胎植入前发育、植入和早期胎盘形成的分子机制知之甚少,多数相关的研究都来自以小鼠为主的研究系统,尚有种属的差异。CRISPR 及其相关方法从基础研究到临床应用,因受到样本、技术、伦理和法律的约束,可能还需要很长的路要走,许多备受争议的问题亟需积极探讨解决。

总之,ART 技术的出现,让人类有机会直接接触到以配子开始的各阶段生殖细胞的细胞器结构和遗传信息的读取,与人类生殖相关的部分新技术也逐渐脱离研究阶段,应用于临床,造福人类。但各新技术在临床的应用上,多数仍需要临床前更有说服力的验证数据。

### 参 考 文 献

- [1] Muggleton-Harris A, Whittingham DG, Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse[J]. *Nature*, 1982, 299(5882):460-462.
- [2] Johnson J, Canning J, Kaneko T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary[J]. *Nature*, 2004, 428(6979):145-150.
- [3] Guo K, Li CH, Wang XY, et al. Germ stem cells are active in postnatal mouse ovary under physiological conditions[J]. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22(5):316-328.
- [4] Edwards RG, Ri G. Sexing of live rabbit blastocysts[J]. *Nature*, 1967, 6(214):576-577.

(收稿日期:2020-02-01)