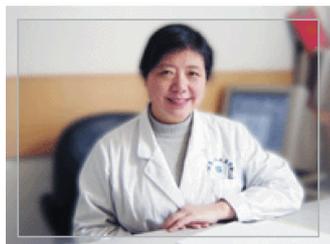


胚胎植入前遗传学诊断进展

刘嘉茵

(江苏省人民医院,江苏 南京 210029)



刘嘉茵,医学遗传学博士,妇产科学教授、主任医师、博士生导师。现任南京医科大学第一附属医院临床生殖中心主任,生殖医学国家重点实验室副主任。从事妇产科临床工作30年,主攻生殖内分泌学和生殖医学专业。1994~1996年作为访问学者,在美国辛辛那提大学学习生殖内分泌专业。创建了江苏省临床生殖医学中心,致力于男女性不孕不育、辅助生殖技术、和生殖遗传学的研究和临床。担任中华医学会生殖医学学会常务委员,中华医学会儿科学分会委员,中华妇产科学会内分泌学组副组长,中国医师学会妇产科分会委员,江苏省医学会遗传学分会主任委员,江苏省医学会妇产科学会委员。

生育学会委员,中华妇产科学会内分泌学组副组长,中国医师学会妇产科分会委员,江苏省医学会遗传学分会主任委员,江苏省医学会妇产科学会委员。

胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)是产前诊断的一种早期形式,在胚胎期通过遗传检测技术选择正常的或没有发病风险的胚胎,避免怀上有家族遗传疾病的胎儿,减少反复流产的发生。因为PGD检测的标本在胚胎卵裂期仅为1~2个单细胞,在囊胚期为几个滋养层细胞,因此,在基因扩增和检测技术上有较高的难度。目前,PGD技术经过20年的发展,逐渐发展成为产前胚胎期遗传学诊断的常规项目。现代分子遗传学技术,包括生物芯片、二代测序等高通量全基因组的检测技术,也进入该领域的临床应用。目前的PGD助孕技术前仍需要对风险夫妇或其家系进行准确的遗传诊断,包括染色体检测和基因检测,未来技术的研发,有可能会使其并非必须。

在辅助生殖技术的研究中发现,部分高风险夫妇的胚胎易于出现染色体数目异常,造成不孕、反复流产、胎儿畸形等缺陷。针对这些夫妇双方未知的染色体水平的遗传缺陷,对胚胎进行植入前的染色体筛查,称之为胚胎植入前非整倍体筛查(preimplantation genetic diagnosis for aneuploid screening, PGD-AS),也称为胚胎植入前筛查(preimplantation genetic screening, PGS),PGS的临床应用意义目前尚存在争议,有待于更多的临床随机对照研

究来证实其是否具有积极的临床意义。近年来在PGD诊断技术的主要进展包括如下方面:

1 植入前样本的活检

在PGD过程中,精子和卵子通过卵胞浆内单精子注射法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)受精,再通过显微操作对胚胎活检取样供遗传检测,称之为胚胎活检(embryo biopsy)。胚胎活检的时期主要有3个,即受精前后(第一、第二极体活检)、8细胞卵裂期(卵裂球活检)和囊胚期(滋养外胚层活检)。

1.1 极体活检 是对卵母细胞的活检,可以是减数分裂后的第一极体和(或)受精后的第二极体活检,样本能够反映母源遗传因素,活检后遗传诊断的时间比较充裕,但是不能反映父源遗传因素,目前临床应用尚不普及。

1.2 卵裂球活检 通常于精卵受精后第3天卵裂期胚胎,吸取1~2个卵裂球。该时期活检取样能够同时反映父母源遗传因素,目前被广泛使用,但缺点在于卵裂球的嵌合状态可能影响诊断的准确性,以及对胚胎发育的潜能可能存在不利影响。

1.3 囊胚活检 在受精后第5~6天,吸取胚胎滋养外胚层细胞团。囊胚活检的样本量一般为4~10

个细胞,充足的细胞数能够提高遗传诊断的准确性,并且该时期活检对胚胎发育潜能影响较小。其缺点是胚胎成囊率较低,而且因检测不能在囊胚孵出期前完成,需要冷冻胚胎,等待以后的自然周期或人工周期再行移植。随着囊胚培养技术、胚胎冷冻和复苏技术、以及检测技术的日益成熟,囊胚活检将是PGD/PGS发展的趋势。

2 目前PGD/PGS采用的遗传诊断技术

2.1 荧光原位杂交技术 荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)技术在PGD的应用已经有20年的历史,主要适用于染色体异常以及性别选择。该技术需根据不同病人易位的染色体不同选择特定的2~3个荧光探针,经过探针和玻片共变性、杂交、洗片、复染等步骤,在显微镜下观察荧光信号,判断胚胎染色体是否平衡或者胚胎性别。该技术长期以来一直被用于PGD临床,临床妊娠率约在28%~35%/每移植周期。在以往的PGS研究中,利用多色、多轮杂交可以同时分析5~12条染色体的数目异常。但是该技术在PGS中的临床意义已经被多项随机对照研究所否认。其原因除了胚胎的生理因素(如嵌合体)外, FISH技术本身也存在内在的缺陷,如杂交失败、信号模棱两可、分析的染色体数目有限等,这也限制了FISH在PGD/PGS中的进一步应用。

2.2 聚合酶链式反应技术 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),是最早用于PGD进行性别选择的技术,其后在性别选择PGD的应用中被相对简单、准确的FISH技术取代。目前PCR在PGD中的应用主要是针对单基因病的诊断。PCR具有高敏感性,能够精确分析到单个碱基的改变。PCR结合限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、微测序(mini-sequencing)常被用于点突变的快速、直接检测。由于单细胞PCR存在扩增失败、污染、等位基因脱扣(allelic drop out, ADO)、优势扩增等问题,临床检测中常常采用多重PCR(multiplex polymerase chain reaction, M-PCR)同时分析多个短串联重复序列(short tandem repeat, STR)进行连锁分析以

提高诊断的准确性。荧光PCR(fluorescent polymerase chain reaction, F-PCR)结合毛细管电泳分析因具有更高的敏感性和分辨率已经广泛应用于单基因病PGD中。

2.3 单细胞全基因组扩增技术 单细胞直接PCR能够检测的遗传位点有限,且只有一次扩增机会。单细胞全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)能够将单细胞中的单拷贝DNA进行全基因组扩增放大, DNA的量由pg级放大到 μg 级,能够为下游的遗传检测提供充足的样本。常用的WGA技术主要有:①基于PCR原理的WGA技术,如简并寡核苷酸引物PCR(degenerate oligonucleotide primer PCR, DOP-PCR)、扩增前引物延伸反应(primer extension preamplification, PEP)等;②非基于PCR原理的WGA技术,如多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)、基于引物酶的全基因组扩增(primase-based whole genome amplification, pWGA)。最近,美国自然杂志介绍了一种全新的WGA方法——多次退火环状循环扩增技术(multiple annealing and looping based amplification cycles, MALBAC),能够为单细胞提供高保真的全基因组扩增,具有覆盖率高、扩增偏倚小的特点,具有巨大的应用前景。

2.4 微阵列比较基因组杂交技术 微阵列比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybridization, aCGH)是一种高通量的分子细胞遗传学检测技术,近些年随着WGA技术的发展,开始应用于染色体异常PGD及PGS诊断。aCGH技术是将待检样本和标准参考品标记不同的荧光信号后,与芯片上的微阵列分布的探针进行竞争杂交,通过分析两者的信号强度,来判断染色体组的缺失和重复。aCGH在染色体异常PGD中的应用优势在于为不同患者不同染色体异常提供了一种通用的检测方法,不需要针对不同个体设计不同的探针,大大节约了实验室的工作时间和简化了实验室工作流程,与此同时还可以全面地分析胚胎其它染色体的异常。

2.5 单核苷酸多态微阵列技术 单核苷酸多态微阵列芯片技术(single nucleotide polymorphism-

based array, SNP array)的基本原理是应用已知的核苷酸序列作为探针与荧光标记的靶核苷酸序列进行杂交,通过对信号的检测进行 SNP 定性定量分析。SNP array 与 aCGH 比较,在染色体异常 PGD 上具有相似的检测效能,目前 SNP array 和 aCGH 均已开始渐进取代 FISH 技术,越来越多的用于染色体异常 PGD 和 PGS。值得注意的是,SNP array 可以通过对胚胎样本及家系进行 SNP 分型,建立 SNP 单体型图,从而可以作为单基因病 PGD 的通用检测手段,这也是 SNP array 的一个潜在的应用前景。

3 PGS 的临床应用价值

对高龄、反复种植失败、习惯性流产、既往有非整倍体胚胎形成史等患者,过去采用 FISH 方法,对胚胎卵裂球染色体组进行杂交,筛查出染色体数目的异常,以提高妊娠率和种植率。但是经过对国际多个中心的资料分析,发现该技术并不能真正提高临床妊娠率和活产率,并因为患者的胚胎数目和评

分较低,取消率较高,2006 年的美国生殖年会基本否定了该技术的临床应用价值。但是近年来,经过数个独立研究的数据证明,经过 PGS 的胚胎其临床妊娠率和活产率均有显著提高。

特别是近年来在临床推广应用的 aCGH 技术,同时能筛查 24 条染色体的数目,大大提高了 PGS 的准确性和临床妊娠率,而并不降低原 FISH 技术诊断的可移植胚胎数目。在本中心的小样本研究中,对有多次反复种植失败和流产史的 7 名患者的 PGS 检测中,有 6 名获得移植,其中 4 名获得持续妊娠和活产。提示该项技术的发展可能在临床上有一定的应用价值。

PGD 的发展伴随着分子遗传诊断技术的发展,各种遗传诊断技术都有其适用范围及优缺点,稳定的、准确的、高通量的分子遗传诊断技术是 PGD 的发展趋势,目前 aCGH/SNP array 已经在 PGD 中取得良好的应用成果。最近,单细胞高通量测序技术一经出现,即表现出前所未有的应用前景,并成为 PGD 的一个巨大的潜在的检测手段。

读者 · 作者 · 编者

重要声明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊已建立数字化期刊,被国内外文献索引、文摘、全文数据库和出版网站收录,并与合作机构通过光盘、网络、手机等数字载体传播本刊论文。如作者对著作权使用有异议,请在来稿时向本刊声明,本刊将做适当处理。

欢迎来稿 欢迎订阅

地址:上海市长乐路 536 号中国产前诊断杂志编辑部(200040)

电话:021-54030916 网上投稿:www.chinjpd.com