

植入前遗传学诊断和筛查的最新进展

李剑¹ Gábor Vajta^{1,2} 杜玉涛¹

(1. 深圳华大基因研究院, 广州 深圳 518083; 2. 中央昆士兰大学, 澳大利亚 罗克汉普顿)

【摘要】 植入前遗传学检测发展早期受技术局限性以及伦理等问题影响, 发展缓慢。近年来, 随着人类胚胎学和人类基因组学的快速发展, 一系列诸如囊胚活检, 玻璃化冻存, 芯片检测技术以及第二代测序等高新技术的应用, 很大程度上解决了早期限制其应用的各种问题, 为其应用和推广打开了崭新的局面, 但同时又带来新的问题。本文从胚胎学家的视角回顾了植入前遗传学检测的历史, 发展过程中涉及的关键因素以及新技术应用可能带来的影响及局限性。

【关键词】 植入前遗传学诊断; 植入前遗传学筛查; 囊胚; 玻璃化冻存; 高通量测序

【中图分类号】 R711.51 **【文献标识码】** A

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.02.010

1 植入前遗传学检测及其历史

植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)和植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)是针对体外培养的胚胎在植入母体前开展的一项遗传学检测。PGD 和 PGS 的检测样本主要来源于胚胎的活检, 根据体外胚胎所处发育时期不同, 活检一般会取单个(胚胎卵裂期)或者少数几个细胞(囊胚期)。活检过程会对胚胎造成创伤, 最近有研究尝试用胚胎囊胚液来替代传统活检样本用于 PGD 检测^[1], 但其临床应用有待进一步研究。PGD 是直接靶向已知致病遗传因素的检测, 其目的是阻断相关遗传病在家系内的进一步传递; PGS 的筛查内容不局限于特定致病遗传因素, 其最终目的是提高试管婴儿(in vitro fertilization, IVF)的整体成功率, 需要从同批体外培养的胚胎中挑选出最合适的胚胎去移植。因此, PGD 主要针对有遗传病家族史的少数患者, 其检测内容(从各种染色体病到各种单基因遗传病)因人而异; 而 PGS 的目标人群更广, 包括大量高龄不孕不育患者和 IVF 反复失败患者等, 但其筛查内容基本都是相同的, 当前主要以筛查染色体非整倍体为主。虽然 PGS 与 PGD 在目标人群和检测内容上有所差别, 但随着技术的发展, 胚胎的各种染色体异常, 单

基因遗传突变甚至新发(de novo)突变都可同时检测出来, 两者在技术层面最终将逐渐趋同。

1990 年, 世界首例 PGD 由 Handyside 团队^[2]完成。接受治疗的是两对携带不同 X 连锁隐性遗传病的夫妇。研究人员通过扩增 Y 染色体特异性重复序列的方法, 对从体外培养胚胎上分离的单细胞进行性别鉴定, 性别鉴定为女性的细胞对应的胚胎被植入母亲子宫内, 最终两位母亲都成功受孕, 分别生了一对健康双胞胎女儿。随后, 囊性纤维化(cystic fibrosis)的 PGD 也取得了成功, 与 X 连锁遗传病不同的是, 囊性纤维化的发生涉及到相关基因内部的突变, PGD 要求的检测精度更高^[3]。上述的成功理应加速 PGD 的发展, 但在接下来的 10 年, PGD 推广缓慢, 究其原因至少有以下 4 点: ①当时 IVF 的整体成功率低; ②当时许多遗传病的遗传机理尚未发现; ③基于 PCR 的检测方法效率低下; ④单细胞 DNA 量太少, 直接用做 PGD 模板经常导致检测失败^[4]。随后荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)技术的应用, PGD 技术的准确性和整体效率有所提高^[5], 但 FISH 单次检测的染色体种类有限, 即使用多色荧光 FISH 技术也不能实现同时检测所有 24 种染色体。PGD 技术的低效和误诊风险引起了专家和公众的担忧, 与此同时, 关于 PGD 的伦理问题争议不断, 最终导致许多

国家立法明确限制 PGD 的应用。为了避免伦理问题,在有些对胚胎选择有着严格法律限制的国家例如德国,研究人员利用生物学上无用但相对容易获取的卵子第一极体和第二极体做 PGD 材料^[6]。这虽然规避了伦理问题,但针对极体的检测只能提供胚胎遗传自母方的遗传信息,而且类似的操作在精子上不可复制,因此不能完整的评估胚胎的遗传学状况。除此之外,常规 PGD 操作时将遇到的困难,在利用极体做 PGD 材料时同样会遇到,且有些困难会较用卵裂球细胞做 PGD 材料时加重。

2 植入前遗传学检测发展的关键因素

2.1 基因组学新成果和新技术的应用 从 20 世纪 90 年代末到本世纪头 10 年期间,人类基因组学领域取得了一系列重大的成果。这些成果无意中解决了前面提及的限制 PGD 应用的各种问题,为 PGD 和 PGS 的应用和推广打开了崭新的局面,对辅助生殖医学领域影响深远。在这些成果中,人类基因组图谱的构建、第二代测序技术的发明以及生物信息技术的进步加速了人类了解自身疾病背后隐藏的遗传因素的步伐,越来越多疾病和遗传因素的关系被发现,虽然很多研究工作还需要进一步深入,但现有的成果已经为辅助生殖医学的发展打下了良好的基础;同时,以全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)^[7]、比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)、基于芯片的比较基因组杂交(Array CGH)^[8-10]、单核苷酸多态性芯片(single nucleotide polymorphisms array, SNP Array)^[11-13]以及实时定量 PCR^[14]等基因组扩增和分析新技术的应用克服了先前 PGD 技术中的缺陷,为 PGD 的应用和推广提供了有效的技术支持。最值得关注的是,随着新一代高通量测序技术(Next Generation Sequencing, NGS)的快速发展,测序时间和测序成本的急剧下降,加上测序作为基因检测的金标准这一内在特点,NGS 已经成为其他 PGD 相关技术的有力竞争者,并很有可能将来成为占统治地位的技术^[15,16]。全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)有可能为 PGD 提供终极解决方案的设计,如今正在慢慢成为现实。

2.2 胚胎培养新技术的突破 同样在过去的 10 多年中,与基因组学高速发展同步的还有人类胚胎学,特别是人类胚胎培养技术取得了长足进步。新型配方简化的胚胎培养基的引入,无论是单一培养基(single media)还是顺序培养基(sequential media)^[17],都极大地提高了体外培养胚胎的发育率,同时把胚胎体外可培养的时间延长到体外受精后的第 5 到第 6 天,即胚胎的囊胚期。虽然现在人们还缺乏对这一重大技术突破意义的普遍认识,延缓了该技术的推广应用,但该技术对辅助生殖技术的意义是毋庸置疑的。对于同批体外培养的胚胎来说,延长培养时间,通过自然选择可获得数目更少,却更适合移植的胚胎。在预后良好的病人中,已经证实延长胚胎体外培养时间可以获得与常规操作相同甚至更高的怀孕成功率^[18]。另外,延长培养时间还有助于解决多胎妊娠的问题。在接受辅助生殖时,孕妇的多胎妊娠在许多国家都被认为是一种并发症,因为它将大大增加生育过程中孕妇和胎儿的风险,给家庭和社会带来额外的经济负担;通过延长培养时间选择植入潜能更强的囊胚进行单胚移植的方法有望缓解这一问题。据美国生殖医学协会(American Society for Reproductive Medicine)执委会和辅助生殖技术协会(Assisted Reproductive Technology)调查显示,囊胚培养现在已经成为发达国家辅助生殖中心的优先选择项。

囊胚培养技术的出现为 PGD/PGS 提供了新的样本获取途径。囊胚滋养层细胞最终发育成胚外组织,安全性更高;新方法利用激光切开囊胚的透明带,再分离 5~15 个左右的滋养层细胞用于后继的检测^[19]。早先关于囊胚滋养层细胞与内细胞团细胞可能在基因组层面上存在差异的担忧目前被证明是没有必要的,研究结果显示,滋养层细胞的遗传学检测结果可以代表整个胚胎的遗传学状况。同时,利用滋养层细胞进行 PGD 的优势是毋庸置疑的。一方面,因为囊胚活检可以获得多个滋养层细胞,因此与一般只能获得单细胞的卵裂球活检相比,其 PGD 过程中,等位基因丢失(allele dropout, ADO)的情况更少,由胚胎嵌合导致的误诊(同样的研究发现嵌合胚胎中大多数细胞都存在各种染色体异常情

况)的概率越低,因此检测结果也更准确;另一方面,体外培养时,受精卵发育成囊胚较发育到8卵裂球期长大约2天(第3~5天),在这期间通过自然选择,最终能够由卵裂球发育成囊胚且形态学合格的胚胎数目会进一步减少,因此需要进行PGD检测的样本数也相应减少,减轻了患者的经济负担;另外,囊胚活检要通过切割分离紧密相连的细胞,虽然其操作看上去很具破坏性,但实际上囊胚活检并不会对胚胎发育的潜能造成影响,而且对胚胎发育造成的伤害也较卵裂球活检小。研究表明,大约40%经过活检的卵裂球丧失了植入子宫或者继续发育的能力^[20-22]。虽然关于胚胎从卵裂期(D3)发育到囊胚期(D5)这段时间内可能存在的胚胎自发性排除非整倍体细胞的研究结果还存在争议^[7,23,24],但是一个业内普遍接受的事实是,受精卵体外培养至囊胚期不会对其基因组质量产生影响。虽然囊胚取样较卵裂球取样复杂,但在越来越多的人类IVF实验室,它已经成为了一项常规操作。

2.3 玻璃化冻存的应用 对于PGD/PGS囊胚取样来说,最大的问题是活检后胚胎的冻存。D3卵裂期胚胎活检后还可以继续培养至D5或者D6,在移植之前还有2~3天的检测时间;但对于D5囊胚取样来说,如果不对活检后的囊胚进行冻存,那要求检测在最短(不能超过1天)时间内完成,否则不能满足胚胎移植的时间要求。虽然某些技术可以满足PGD/PGS 24小时内发检测报告的要求^[12,14,25,26],但其能检测的内容有限;而能够对样本进行全面深入检测的技术的检测周期较长,例如测序,通常需要几天。除此之外,相关仪器设备昂贵,且需要熟练的专业人员才能操作,单个IVF中心的条件很难满足这些要求,而如果选择送样到附近有条件的IVF中心去检测将会进一步缩短可用于检测的时间,一般情况下,也很难在活检后24小时内发出诊断报告。

玻璃化冻存技术解决了囊胚冻存的问题。与卵裂期胚胎的深低温保存不同,传统的慢速冷冻法(slow-rate freezing)不适合囊胚冻存,而这也一定程度上阻碍了囊胚培养和囊胚移植技术的推广。经过不懈的努力,人们找到了一种全新的深低温保存方法——玻璃化(Vitrification)冻存,该方法很好

地解决了囊胚冻存的问题。虽然早在大约40年前玻璃化冻存技术就被应用于胚胎学领域^[27],但直到20年后第一篇关于人类囊胚玻璃化冻存的,具有可信结果的文献才出现^[28]。玻璃化冻存不需要昂贵的化学试剂,不需要大量的仪器设备,只需简单的操作工具即可。囊胚玻璃化冻存后,与对照组未冻存的囊胚相比,基本没有差别,其复苏成功率和进一步发育率都接近100%。令人惊讶的是,也许是因为在刺激(stimulated)与非刺激周期(unstimulated cycle)时子宫内膜容受性的差别,经过玻璃化冻存的囊胚,移植后的怀孕成功率和出生率与鲜胚移植(fresh transfer)的结果相当,甚至结果更好。因此,更多生殖中心在胚胎移植时在考虑“全部深低温保存”(cryopreserve all)的策略。在深低温保存活检后的囊胚方面玻璃化冻存也获得了成功。囊胚活检过程是有创的,但活检似乎对囊胚影响很小,不影响其在体内和体外的发育潜能。研究表明,玻璃化冻存前,人工皱缩囊胚腔和透明带打孔辅助孵化对胚胎的发育是有利的,可以提高IVF的临床妊娠率和出生率^[29-31];而囊胚活检过程本身就包括透明带打孔和人工皱缩囊胚腔等操作,因此即使在不进行PGD的情况下,囊胚活检也可能提高IVF的临床妊娠率和出生率。

3 植入前遗传学检测的现状 & 植入前胚胎筛查新方法

关于PGD/PGS(胚胎活检和冻存)安全性的担忧并没有被证实,相关研究(虽然数目有限)没有发现经PGD/PGS出生的小孩在出生畸形率或其他缺陷方面有明显的增加^[32-35]。

虽然早在20世纪90年代,人类胚胎学和人类基因组学还处在发展初期的时候,PGD的价值就被证明了,但关于PGS的效果却是充满争议的。PGS并没有像预期中的那样提高IVF临床妊娠率,与此相反,一些研究甚至显示PGS显著地降低了IVF临床妊娠率^[36-39],其中原因除了当时PGS所采用技术本身的缺陷外,Gleicher和Barat^[40]的研究显示不恰当的PGS病人入选标准也是重要原因。

选择合适的患者可能是PGS成功的关键。虽

然 PGS 的主要对象是高龄患者,但有研究发现患者年龄在 26~30 岁之间时胚胎非整倍体的风险更低,因此该年龄段的患者接受 PGS 的成功率最高^[41]。另外,统计表明,超过 50% 以上的卵裂期胚胎存在染色体异常,而当患者年龄超过 40 岁时该异常比例甚至高达 80%^[7]。尽管通过选择性植入染色体核型正常的胚胎可以获得与低龄患者相似的植入成功率和妊娠率^[42],但需要指出的是如果患者有卵巢储备功能不良等病症,PGS 的效果可能会适得其反,因为患者的胚胎可能因为质量不佳,在 D3 活检后无法继续生长或者在 D3 培养到 D5 时得不到足够的胚胎从而降低移植率^[40]。

最新研究结果显示,囊胚滋养层细胞取样结合新的全染色体分析和囊胚冻存的 PGS 新方案取得了令人惊叹的结果^[9,13,43,44]。另外,甚至不用冻存,D3^[45]或 D5^[25,26,46,47]取样的胚胎样本经过全染色体非整倍体筛查再进行鲜胚移植的临床妊娠率和出生率都有明显上升。虽然 PGS 新方案的最终价值和受益人群还可能需通过大量前瞻性的随机试验来验证^[40],但“植入前遗传学筛查还活着并且活得很好”这篇文章^[48]的题目恰如其分地反映了辅助生殖领域科学家们看待 PGS 的观点。

IVF 花费不低,PGD/PGS 同样价格不菲,IVF-PGD/PGS 的高价格让其饱受争议。一方面,对于商业公司和私营诊所而言,追逐利润是他们的天性,对 PGS/PGD 操作的每一个环节,包括胚胎活检,样本检测和深低温冻存等,他们都希望获得更大的利润,以至于他们有时会夸大技术效果,导致患者预期过高,这些做法是不道德的并且将导致人们对 PGD/PGS 认识混乱^[40]。另一方面,对整个社会而言,通过对常见遗传病(比如囊性纤维化病)携带者人群进行 IVF-PGD 干预的方式来防止遗传病患儿的出生,与不采取 IVF-PGD 干预导致患儿出生后终生所需的大量治疗和照料费用相比,前者更为经济^[49]。另外,对于 PGS 适用人群而言,PGS 可以增加他们在更短的时间、更少的 IVF 周期内怀孕的几率,同样可能降低患者家庭的经济支出。

针对早期临床实践中发现的 PGS 效果不佳的问题,以及可能出现的 PGD 和 PGS 应用不规范的

问题,辅助生殖领域内的权威机构包括美国生殖医学协会(ASRM)及欧洲人类生殖和胚胎学协会(ESHRE)专门做了声明,并给出了指导意见^[50,51],随后被许多国家的辅助生殖机构所参考。以高通量测序为代表的 PGD/PGS 新技术的应用带来了一系列更深层次的技术和伦理问题,这其中包括如何界定“最适合胚胎”的选择标准、如何处理可能出现的非医疗原因的胎儿性别及遗传性状筛选等^[52-55]。近期由 ESHRE 与欧洲人类遗传学协会(ESHG)联合发布的一份报告显示,各国加快了对辅助生殖领域包括 PGD/PGS 认证标准、指南和建议等方面的立法速度,似乎有意为 PGD/PGS 新技术的应用提供明确法律规范^[56]。

不得不提的是,PGD/PGS 传统技术的局限性及其高价格,让医生和患者在选择时都很为难。对于 PGS 而言,其主要目的是选择最具发育潜能、可供移植的胚胎,其检测内容基本都是统一的,但 PGD 是针对明确致病突变的检测,大多数患者所携带的致病突变各不相同,难以想象需要进行个体化检测的工作量有多大。近些年来,除了传统的胚胎形态学评分方法外,其他新方法如呼吸测量法、双折射测量法、代谢组和蛋白质组方法都被用于 PGS 当中。而这其中应用最广且最具前景的方法是利用延时摄像技术(time-lapse-imaging)对胚胎形态和动力学进行连续观察的方法^[57,58]。Campbell 等^[59]的研究显示延时摄像技术可用于胚胎非整倍体风险评估,从而部分取代 PGS 的功能,但有研究者质疑其研究结果不足以支持他们的研究结论^[60]。最近发表的一篇文章也强调,虽然不能忽视延时成像技术的价值,但针对胚胎活检样本的 PGS(全套染色体筛查)仍然是目前最可靠的植入前胚胎染色体异常筛查的方法^[61]。

4 最新进展

NGS 技术被应用于 PGD/PGS,对囊胚的染色体异常情况进行筛查^[16]。其中活检得到的胚胎样本,经过全基因组扩增,全基因组测序(测序深度可视检测精度要求调节),专业软件处理,得到胚胎的染色体异常的检测结果。该研究发现与传统技术相

比,NGS的结果准确且检测分辨率更高。随后,利用相同方法针对41对随机挑选的夫妇开展的PGD/PGS临床研究结果显示,整倍体的囊胚占总数的47.3%,共33对夫妇有可供移植的染色体正常且形态学合格的囊胚,玻璃化冻存的相应囊胚经过复苏,植入母体后正在妊娠率(发稿时)为58.5%,并成功诞生了7个健康的婴儿^[16],这其中就包括利用基于NGS的PGD/PGS技术诞生的全球首个婴儿。截止当前,利用该技术诞生了24个健康的婴儿。NGS当前已被广泛地应用于胎儿非整倍体的无创产前诊断^[62],同样有望于广泛地应用于PGD/PGS领域,理论上,通过NGS人们可以获得基因组的全部信息,因此通过不同的检测和分析策略,完全有可能实现对植入前胚胎从染色体异常,到单基因突变甚至是de novo突变等各个层面的检测/筛查,为PGD/PGS领域打开新的篇章。

虽然经常被忽略,但胚胎实验室建设这块,包括高效(接近100%)、稳定的胚胎培养、活检、冻存和复苏体系的建立^[63,64],合适的仪器设备以及合格的操作人员的配备同样是PGD/PGS获得成功的关键因素之一。操作过程中,其中任意环节出现了问题都将可能影响整个检测流程,导致检测结果不可信,白白浪费大量金钱。理想的状况是胚胎实验室建设这块和PGD/PGS分析这块有机的结合起来,然而现实是,在很多辅助生殖机构这两者都是脱节的,特别是涉及到当前新的PGD/PGS分析技术时。因此,对胚胎学家和IVF机构技术人员进行包括胚胎实验室建设和PGD/PGS分析方法相关的各方面内容的培训,加强胚胎操作人员与PGD/PGS分析人员的对相互专业的了解,对整个PGD/PGS技术准确性和稳定性的提高以及新技术的推广和应用是有益的。

5 总 结

通过大量的临床实践,植入前遗传学检测早已证明了其存在的价值。虽然早期技术的局限性和公众认知的滞后限制了其应用和推广,但随着技术的完善,相关科学知识的普及和民众认可度的提高,其临床需求正快速增加。在满足日益增加的临床需求

的同时,保证临床服务质量尤为重要,这要求辅助生殖中心从业人员从整体上把握好植入前遗传学检测的各环节,特别是当各环节在不同机构完成的情况下。技术的进步同时也带来一系列新的伦理问题,怎样面对这些问题,是我们共同面临的挑战。

致谢 本文的英文版稿由Gábor Vajta教授完成,其他作者翻译了英文版的内容,并对内容进行了少量补充和完善。感谢张现东、甄贺富、李尉、李金良、刘赛军、张爱萍和张彩芬在校稿和投稿过程中提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] Palini S, Galluzzi L, De SS, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid[J]. *Reprod Biomed Online*, 2013,26(6): 603-610.
- [2] Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification[J]. *Nature*, 1990,344(6268): 768-770.
- [3] Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, et al. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 1992,327(13): 905-909.
- [4] Handyside AH, Xu K. Preimplantation genetic diagnosis comes of age[J]. *Semin Reprod Med*, 2012,30(4):255-258.
- [5] Griffin DK, Handyside AH, Penketh RJ, et al. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes[J]. *Hum Reprod*, 1991,6(1): 101-105.
- [6] Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, et al. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis[J]. *Prenat Diagn*, 1992,12(2): 103-110.
- [7] Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization[J]. *Curr Genomics*, 2012,13(6): 463-470.
- [8] Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure[J]. *Fertil Steril*, 2010,94(3):875-887.
- [9] Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(5):1700-1706.
- [10] Scott RT Jr, Ferry K, Su J, et al. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos; a prospective, blinded, nonselection

- study[J]. *Fertil Steril*, 2012,97(4):870-875.
- [11] Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, et al. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(5):1786-1788.
- [12] Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study[J]. *Mol Cytogenet*, 2012, 5(1):24.
- [13] Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, et al. Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients [J]. *Fertil Steril*, 2011,96(3):638-640.
- [14] Treff NR, Tao X, Ferry KM, et al. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(4): 819-824.
- [15] Martin J, Cervero A, Mir P, et al. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening[J]. *Fertil Steril*, 2013,99(4): 1054-1061.
- [16] Yin X, Tan K, Vajta G, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophoctoderm cells of human blastocysts[J]. *Biol Reprod*,2013, 88(3): 69.
- [17] Vajta G, Rienzi L, Cobo A, et al. Embryo culture: can we perform better than nature? [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(4), 453-469.
- [18] Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007,(4):CD002118.
- [19] McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, et al. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts[J]. *Fertil Steril*,2005,84(6): 1628-1636.
- [20] Scott RT Jr. , Upham KM, Forman EJ, et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial[J]. *Fertil Steril*, 2013,100(3):624-630.
- [21] Scott KL, Hong KH, and Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing [J]. *Fertil Steril*, 2013,100(3):608-614.
- [22] Xu K and Montag M. New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? [J]. *Semin Reprod Med*,2012, 30(4): 259-266.
- [23] Baart EB, Van OD, Los FJ, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(3): 685-693.
- [24] Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, et al. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(9): 1954-1958.
- [25] Scott RT, Jr. , Upham KM, Forman EJ, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial [J]. *Fertil Steril*, 2013,100(3): 697-703.
- [26] Forman EJ, Upham KM, Cheng M, et al. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer[J]. *Fertil Steril*, 2013,100(3), 718-724.
- [27] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification[J]. *Nature*, 1985, 313(6003):573-575.
- [28] Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005,11(5): 608-614.
- [29] Feng GX, Zhang B, Shu JH, et al. Effects of artificial shrinkage of blastocoeles before vitrification on pregnancy outcome[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*,2010, 45(11): 838-842.
- [30] Iwayama H, Hochi S, and Yamashita M. In vitro and in vivo viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011,28(4):355-361.
- [31] Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing [J]. *Hum Reprod*, 2003,18(7): 1504-1511.
- [32] Beukers F, van der Heide M, Middelburg KJ, et al. Morphologic abnormalities in 2-year-old children born after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with preimplantation genetic screening: follow-up of a randomized

- controlled trial[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(2): 408-413.
- [33] Desmyttere S, De RM, Staessen C, et al. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(1): 288-293.
- [34] Desmyttere S, Bonduelle M, Nekkebroeck J, et al. Growth and health outcome of 102 2-year-old children conceived after preimplantation genetic diagnosis or screening [J]. *Early Hum Dev*, 2009, 85(12): 755-759.
- [35] Desmyttere S, De SJ, Nekkebroeck J, et al. Two-year auxological and medical outcome of singletons born after embryo biopsy applied in preimplantation genetic diagnosis or preimplantation genetic screening[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(2): 470-476.
- [36] Platteau P, Staessen C, Michiels A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(2): 393-397.
- [37] Staessen C, Platteau P, Van AE, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(12): 2849-2858.
- [38] Twisk M, Mastenbroek S, Hoek A, et al. No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy[J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(12): 2813-2817.
- [39] Hardarson T, Hanson C, Lundin K, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial[J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(12): 2806-2812.
- [40] Gleicher N, Barad DH. A review of, and commentary on, the ongoing second clinical introduction of preimplantation genetic screening (PGS) to routine IVF practice[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(11): 1159-1166.
- [41] Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(3): 656-663.
- [42] Harton GL, Munne S, Surrey M, et al. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(6): 1695-1703.
- [43] Lathi RB, Massie JA, Gilani M, et al. Outcomes of trophectoderm biopsy on cryopreserved blastocysts: a case series[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(5): 504-507.
- [44] Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3): 615-619.
- [45] Keltz MD, Vega M, Sirota I, et al. Preimplantation genetic screening (PGS) with Comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(10): 1333-1339.
- [46] Scott RT, Tao X, Taylor D, et al. A prospective randomized controlled trial demonstrating significantly increased clinical pregnancy rates following 24 chromosome aneuploidy screening: biopsy and analysis on day 5 with fresh transfer[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94: S2.
- [47] Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, et al. Obstetrical and neonatal outcomes from the BEST Trial: single embryo transfer with aneuploidy screening improves outcomes after in vitro fertilization without compromising delivery rates[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2013, 210(2): 157.e1-6.
- [48] Meldrum DR. Introduction: Preimplantation genetic screening is alive and very well. *Fertil Steril*[J], 2013, 100(3): 593-594.
- [49] Tur-Kaspa I, Aljadeff G, Rechitsky S, et al. PGD for all cystic fibrosis carrier couples: novel strategy for preventive medicine and cost analysis[J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(2): 186-195.
- [50] Harper J, Sermon K, Geraedts J, et al. What next for preimplantation genetic screening? [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23: 478-480.
- [51] Harper J, Coonen E, De RM, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(4): 821-823.
- [52] Dondorp W, De WG, Pennings G, et al. ESHRE Task Force on ethics and Law 20: sex selection for non-medical reasons [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(6): 1448-1454.
- [53] Hens K, Dondorp W, Handyside AH, et al. Dynamics and ethics of comprehensive preimplantation genetic testing: a review of the challenges[J]. *Hum Reprod Update*, 2013, 19(4): 366-375.
- [54] Hens K, Dondorp WJ, Geraedts JP, et al. Comprehensive embryo testing. Experts' opinions regarding future directions:

- an expert panel study on comprehensive embryo testing[J]. Hum Reprod, 2013,28(5): 1418-1425.
- [55] Hens K, Dondorp W, de Wart G. Embryos without secrets; an expert panel study on comprehensive embryo testing and the responsibility of the clinician [J]. Eur J Med Genet, 2013,56(2): 67-71.
- [56] Harper JC, Geraedts J, Borry P, et al. Current issues in medically assisted reproduction and genetics in Europe: research, clinical practice, ethics, legal issues and policy. European Society of Human Genetics and European Society of Human Reproduction and Embryology[J]. Eur J Hum Genet, 2013, 21 Suppl 2: S1-21.
- [57] Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, et al. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring[J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(4), 533-536.
- [58] Chen AA, Tan L, Suraj V, et al. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application[J]. Fertil Steril,2013, 99(4): 1035-1043.
- [59] Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, et al. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS[J]. Reprod Biomed Online, 2013,27(2): 140-146.
- [60] Ottolini C, Rienzi L, Capalbo A. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging [J]. Reprod Biomed Online, 2014,28(3):273-275.
- [61] Swain JE. Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS? [J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(8): 1081-1090.
- [62] Lau TK, Chen F, Pan X, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012,25(8):1370-1374.
- [63] Ly KD, Agarwal A, and Nagy ZP. Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? [J]. J Assist Reprod Genet, 2011,28(9):833-849.
- [64] Vajta G. Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress[J]. Reprod Fertil Dev,2013, 25(5): 719-727

编辑:宋文颖

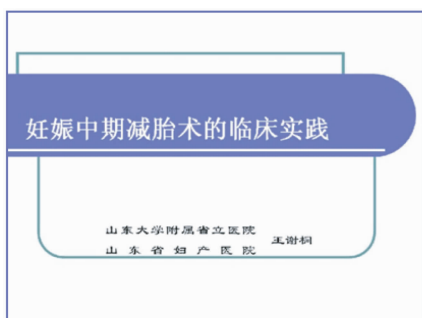
(收稿日期:2014-05-09)

视频导读

妊娠中期减胎术的临床实践

王谢桐

(山东大学附属省立医院)



随着辅助生殖技术的发展,多胎妊娠的发生率也随之升高。妊娠中期的减胎的目的除了减少胎儿的数目之外,更多的是旨在减灭异常胎儿、降低妊娠期并发症合并症以及改善多胎妊娠结局。

在该视频中,王谢桐教授向我们详细介绍了妊娠中期减胎术的方法、指证、减胎时机、目标胎儿的选择等广大医生感兴趣的内容,值得大家学习探讨。

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.02.011