

植入前遗传学诊断周期中染色体易位对胚胎发育的影响

李妍, 徐建, 徐艳文, 李涛, 丁晨晖, 曾艳红, 王静, 周灿权*

(中山大学附属第一医院生殖中心//广东省生殖医学重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨植入前遗传学诊断(PGD)周期中染色体相互易位、罗氏易位对种植前胚胎发育的影响及可能机制。【方法】回顾性分析了2010年6月至2012年12月期间中山大学附属第一医院生殖中心进行的31个罗伯逊(罗氏)易位周期及48个相互易位周期中染色体正常/平衡胚胎和异常胚胎的发育情况,选择 α -地中海贫血周期作为对照。同时比较了性别和近端着丝粒染色体对正常/平衡胚胎率和胚胎发育的影响。【结果】取卵后第3天(D3)正常/平衡胚胎与异常胚胎的优质胚胎率无统计学差异,罗氏易位组分别为79.5%和71.1%,相互易位组为77.3%和72.0%;而正常/平衡胚胎的D5/6囊胚形成率显著高于异常胚胎,罗氏易位组分别为76.9%和53.5%,相互易位组为75.0%和55.6%,差异有统计学意义($P < 0.0001$)。将染色体易位组按性别或将相互易位组按包含近端着丝粒染色体分亚组,比较各亚组的正常/平衡胚胎率,未发现显著差异;D3优质胚胎率和D5/6囊胚形成率在相互易位的两个亚组也未发现显著差异($P > 0.05$)。【结论】染色体易位对早期胚胎发育影响不大,对染色体不平衡胚胎的清除可能在囊胚阶段已经开始;性别和相互易位中染色体的类型对正常/平衡胚胎率影响不大,亦不是影响胚胎发育的重要因素。

关键词: 胚胎发育; PGD; 囊胚; 罗氏易位; 相互易位

中图分类号: R321; R394

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)06-0877-06

Effect of Chromosomal Translocations on Embryo Development in PGD Cycles

LI Yan, XU Jian, XU Yan-wen, LI Tao, DING Chen-hui, ZENG Yan-hong, WANG-Jing, ZHOU Can-quan*

(Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of chromosomal translocations on the embryo development and the possible mechanism. 【Methods】 31 Robertsonian and 48 Reciprocal PGD cycles conducted in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University during June 2010 to December 2012 were included. Embryos' development in normal/balanced group and abnormal group were retrospectively analyzed, compared with α -thalassemia PGD cycles. Embryos' development in different gender and translocation group were also measured. 【Result】 No significant difference was found between normal/balanced and unbalanced embryo group in terms of D3 high-quality embryo percentage, 79.5% vs 71.1% in Rob and 77.3% vs 72.0% in REC, respectively. The percentage of blastocyst at D5-D6 was significantly higher in the normal/balanced group, 76.9% vs 53.5% in Rob and 75.0% vs 55.6% in REC ($P < 0.0001$). No significance was found about the embryo development in different subgroups divided by gender and acrocentric chromosome. 【Conclusion】 Unbalanced chromosome has little effects on early embryos' development. A self-elimination mechanism may exist during the blastulation stage. Gender and acrocentric chromosome may have little effects on the rates of normal/balanced embryos and their development.

Key words: embryo development; preimplantation genetic diagnosis; blastocyst; robertsonian translocation; reciprocal translocation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(6): 877-882]

染色体平衡易位是最常见的染色体结构异常,包括罗氏易位和相互易位,是造成不孕和流产

的重要原因,约0.6%的不孕夫妇和9.2%的习惯性流产夫妇存在染色体平衡易位^[1]。平衡易位一般

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 广东省自然科学基金(52012010009176); 卫生行业科研专项(2010020113)

作者简介: 李妍, 硕士研究生, E-mail: xuyifendou@163.com; * 通信作者: 周灿权, 教授, 博士生导师, E-mail: drzhoucanquan@163.com

发生在两条非同源染色体的片段互换(相互易位)或两条非同源近端着丝粒染色体的长臂融合(罗氏易位)。由于遗传物质没有或很少丢失,大多易位携带者的表型正常。但是配子产生过程中染色体的错误分离可能致使遗传物质丢失或增加,从而导致不孕、流产、异常患儿的出生。 α -地中海贫血(简称 α -地贫)是由于 α -珠蛋白基因的缺失或功能障碍导致 α -珠蛋白肽链缺如或合成不足所引起的遗传性血液病,属常见的单基因疾病,重型 α -地贫患儿常在子宫内或出生不久死亡^[2]。植入前遗传学诊断(Pre-implantation genetic diagnosis, PGD)是建立在体外受精-胚胎移植技术基础上,并通过对植入前胚胎进行遗传病的筛选,达到优生的目的。利用PCR或FISH技术诊断包括单基因疾病、性连锁疾病以及常染色体平衡易位等遗传缺陷。同时PGD的应用也为分析人类易位染色体对配子分离及胚胎发育的影响提供了机会,目前大多研究集中在配子分离方式上^[3-5],而易位对早期胚胎和囊胚发育的影响尚存在争议^[6-8]。本文以 α -地贫为对照组,旨在分析罗氏和相互易位对早期胚胎和囊胚发育的影响,同时研究了性别和近端着丝粒染色体对正常/平衡胚胎率和胚胎发育的可能影响,可为相关领域提供更多的胚胎发育资料,为临床PGD咨询提供更多信息。

1 材料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析了2010年6月至2012年12月期间中山大学附属第一医院生殖中心93个平衡易位PGD周期(其中相互易位59个,罗氏易位34个)的胚胎培养记录和FISH诊断资料,以31个周期的 α -地贫作为对照组,只要具备明确的FISH诊断和囊胚培养资料均可纳入分析。

1.2 研究方法

1.2.1 控制性超排卵 采用本中心常规的体外受精-胚胎移植长方案或短方案进行控制性超排卵。至少有一个卵泡径线达到18 mm,或至少两个卵泡径线达到17 mm时,给予人绒毛膜促性腺激素(HCG)6 000~10 000 U诱发卵子最终成熟。HCG注射后34~36 h,行超声引导下经阴道穿刺取卵术,并记录获卵数。

1.2.2 胚胎培养和胚胎活检 ICSI后16~18 h

观察受精情况,观察到2PN(2 pronuclei, 2PN)为正常受精。观察原核后将胚胎培养在G1(Vitrolife)微滴中,取卵后第3天上午进行胚胎活检。选择细胞数 ≥ 5 的胚胎进行活检,均采用机械法。活检后的胚胎转移到G2(Vitrolife)囊胚培养液中采用序贯培养直至第5或6天根据FISH结果进行囊胚移植。

1.2.3 细胞固定和FISH 应用端粒探针和着丝粒探针检测胚胎易位染色体。探针由英国Cytocell或美国的Vysis公司提供。FISH步骤见文^[9]探针信号的判读根据常规标准^[10]。

1.2.4 胚胎分类及分级 根据已经建立起来的标准,当每个探针信号观察到为清楚的两个时,该胚胎定义为正常/平衡胚胎;当活检的卵裂球显示出异常时,将其定义为异常胚胎。定义D3优质胚胎为6到8个卵裂球,碎片少于30%;根据Gardner评分系统,定义第5或6天(D5/6)3BB以上为优质囊胚。

1.2.5 胚胎移植和随访 根据FISH结果,选择正常/平衡胚胎在取卵后第5或6天进行囊胚移植,移植术后常规进行黄体支持。患者出现子宫内膜欠佳或HCG注射日孕酮升高等不适合新鲜移植的因素时采取将胚胎延长体外培养至囊胚全冻的策略,行解冻周期移植囊胚。若无正常可移植胚胎则取消该周期。

1.2.6 相对指标计算方法 受精率为2PN数/MII卵子数;卵裂率为移植当天有卵裂的胚胎数/正常受精卵子数;种植率为5~7周B超所见孕囊数/移植胚胎数;累积妊娠率为新鲜胚胎移植和(或)冷冻胚胎移植获得继续妊娠的周期数/取卵周期数。正常/平衡胚胎率为FISH诊断正常和(或)平衡胚胎数/有FISH诊断结果的胚胎数;D3优质胚胎率为D3优质胚胎数/D3胚胎总数;囊胚形成率为D3胚胎形成囊胚数/D3胚胎总数;优质囊胚率为优质囊胚数/D3胚胎总数。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0进行统计学分析。连续型变量根据分布情况采用独立样本 t 检验或非参数检验,率的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGD周期的总体临床结局

2.1.1 一般情况比较 相互易位、罗氏易位组分别和地贫组比较,女性和男性的平均年龄均无统计学差异,取卵数在相互和罗氏易位组明显高于地贫组(表 1)。24 名男性罗氏易位携带者中有 21 名为少弱精症患者;32 名男性相互携带者中有 19 名少弱精症患者。纳入胚胎发育分析的 59 个相互易位周期中有 11 个周期因无正常可移植胚胎取消移植,11 个周期选择解冻移植,罗氏易位有 1 个取消周期和 6 个解冻周期。

2.1.2 早期胚胎发育情况和临床结局比较 与地贫组相比,易位的两组受精率和卵裂率均无差异($P>0.05$,表 1),但相互易位组每移植周期胚胎数显著减少,种植率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。临床妊娠率和累积妊娠率 3 组间比较并无统计学差异。

2.2 囊胚发育情况

分别在 3 组中比较正常/平衡胚胎和异常胚胎的 D3 优质胚胎率,均无明显统计学差异 ($P>$

表 1 比较染色体易位组和地贫组的 PGD 资料和妊娠结局

Table 1 Comparison of PGD data and pregnancy outcome in chromosomal translation and thalassemia groups

cases or $\bar{x} \pm s$ or $n/N(\%)$			
Clinical data	REC translation	ROB translation	α -thalassemia
Number of patients	48	31	31
Male age/years	$34 \pm 5^{1)}$	$32 \pm 4^{1)}$	34 ± 4
Female age/years	$31 \pm 3^{1)}$	$30 \pm 3^{1)}$	32 ± 4
Number of cycles	59	34	31
Number of fresh-transfer cycles	37	27	22
Number of canceled cycles	11	1	1
Number of frozen-thawed cycles	11	6	8
Oocytes retrieved	$19 \pm 8^{2)}$	$18 \pm 6^{2)}$	15 ± 7
Fertilization rate/%	78.90 ³⁾	78.42 ³⁾	82.34
Cleavage rate/%	97.54 ³⁾	95.56 ³⁾	96.67
Transferred embryos	$1.5 \pm 0.6^{4)}$	2.1 ± 0.7	2.0 ± 0.6
Implantation rate/%	7/55 (12.73) ⁵⁾	31.58(18/57)	15/43(34.88)
Clinical pregnancy rate/%	5/37 (13.51)	44.44(12/27)	8/22(36.36)
Cumulative pregnancy rate/%	13/48 (27.08)	16/33(48.48)	13/30(43.33)

REC: Reciprocal translocation; ROB: Robertsonian translocation; compared with thalassemia group, student's *t*-test: 1) $P>0.05$; 2) $P=0.02$; 4) $P=0.04$, chi-square test; 3) $P>0.05$; 5) $P=0.023$

表 2 染色体易位和 α -地中海贫血携带者的胚胎发育特点

Table 2 Embryos development characteristics of chromosomal translocation and α -thalassemia group

Category	High-grade D3 embryos	D5/6 blastulation	D5/6 high-grade blastocysts
ROB translocation			
Normal/Balanced embryos	93/117(79.5) ¹⁾	90/117(76.9) ²⁾	30/117(25.6)
Abnormal embryos	162/228(71.1)	122/228(53.5)	45/228(19.7)
REC translocation			
Normal/Balanced embryos	99/128(77.3) ¹⁾	96/128(75) ²⁾	36/128(28.1) ³⁾
Abnormal embryos	368/511(72.0)	284/511(55.6)	100/511(19.6)
α -thalassemia			
Normal embryos	90/132(68.2) ¹⁾	91/132(68.9) ⁴⁾	45/132(30.1)
Abnormal embryos	68/91 (74.7)	62/91 (68.1)	26/91(28.6)

Chi-square test, compared with relative abnormal embryos: 1) $P>0.05$; 2) $P<0.0001$; 3) $P=0.04$; 4) $P>0.05$

表 3 地贫组和染色体易位组不同性别的 PGD 诊断结果

Table 3 The PGD diagnosis in chromosomal translation and thalassemia groups of different sex

Categories	Embryos biopsied	Embryos of valid FISH result		Normal/balanced embryos	
		Numbers	Ratio/%	Numbers	Ratio/%
α-thalassemia	263	222	84.4	132	59.5
ROB translocation	390	372	95.4	128	34.4
Male carriers	328	312	95.1	113	36.2 ¹⁾
Female carriers	62	60	96.8	15	25.0
REC translocation	613	595	97.1	111	18.7
Male carriers	305	299	98.0	62	20.7 ²⁾
Female carriers	308	296	96.1	49	16.6

Chi-square test; 1) compared with female ROB carriers, $P = 0.104$; 2) compared with female REC carriers, $P = 0.207$

0.05,表 2)。但在罗氏易位和相互易位组中,正常/平衡胚胎的 D5/6 囊胚形成率明显高于异常胚胎($P < 0.0001$),相互易位组中正常/平衡胚胎的优质囊胚形成率也明显高于异常胚胎($P = 0.04$),而地贫组中,正常胚胎的囊胚形成率与异常胚胎比较,无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 性别、易位染色体类型与配子分离和胚胎发育

根据 FISH 结果,D3 正常/平衡胚胎率在相互易位组为 18.7%,罗氏易位组 34.4%,地贫组 59.5%,相互易位组最低(表 3)。分别比较罗氏易位和相互易位组中不同性别的正常/平衡胚胎率,无统计学差异($P > 0.05$,表 3)。分别比较相互易位包含和不含近端着丝粒染色体两个亚组的正常/平衡胚胎率,也无统计学意义($P > 0.05$,表 4)。

2.3.1 相互易位染色体类型和胚胎发育 正常/平衡胚胎的 D3 优质胚胎率、囊胚形成率在包含和不含近端着丝粒染色体的两个相互易位亚组中无明显统计学差异($P > 0.05$,表 4)。

3 讨 论

3.1 易位染色体对早期胚胎发育的影响

染色体罗氏易位可产生 6 种配子,染色体相互易位可产生 18 种配子。尽管染色体易位携带者自身表型正常,但可将不平衡的染色体传给子代,导致流产、死胎、畸形儿或不孕不育等,大部分核型异常的胚胎在足月之前死亡。易位对人种植前胚胎发育的影响时间和机制并不明确,动物易位模型的研究发现异常胚胎在 2 细胞阶段停滞^[11]。Findikli 等^[6]发现异常胚胎的受精率(54.4%)较对

表 4 不同类型相互易位的 PGD 诊断结果和胚胎发育特点

Table 4 The PGD diagnosis and embryo development characteristics of different reciprocal translation type

	ACR	Non ACR
Number of cases	22	37
Embryos with valid FISH results	224	371
Normal /balanced embryos/%	21.4 (48/224) ¹⁾	17.0 (63/371)
Normal/Balanced embryos		
High-grade D3 embryos/%	75.0(36/48) ¹⁾	73.0 (46/63)
D5/D6 blastulation/%	75.0(36/48) ¹⁾	74.6(47/63)
Abnormal embryos		
High-grade D3 embryos/%	72.7 (128/176)	70.1 (216/308)
D5/D6 blastulation/%	56.8 (100/176)	53.9 (166/308)

ACR: acrocentric chromosome(s) involved; NonACR: no acrocentric chromosome (s) involved;compared with Non ACR,Chi-square test;1) $P > 0.05$

照组(71.0%)显著降低,从受精后第 2 天开始,罗氏和相互易位的胚胎均发育速度缓慢。

因为胚胎活检和女性年龄是胚胎发育的影响因素,所以本研究选择同样接受了活检操作的 α-地贫作为对照,且易位组和地贫组相比,女性年龄均无统计差异性。我们之前的研究认为易位会对第 4 天基因组激活后的胚胎发育速度产生影响^[12]。同样,本研究发现和地贫组相比,易位组的受精率和卵裂率并不降低。因此,我们推测对不平衡胚胎的清除主要发生在囊胚发育阶段。

3.2 易位染色体对囊胚发育的影响

本研究分别比较了 3 组中异常胚胎和正常/平衡胚胎的 D3 胚胎发育情况,发现异常胚胎的

D3 优质胚胎率并无降低,而罗氏易位和相互易位组异常胚胎的 D5/6 囊胚形成率明显下降,差异有统计学意义,在相互易位组中异常胚胎的优质囊胚形成率也明显低于正常/平衡胚胎,但地贫组的囊胚形成率在正常/平衡胚胎和异常胚胎无统计学差异。因为本研究平衡了活检和女性年龄在易位组和地贫组的差异,可以推测易位造成非平衡染色体的组成是影响囊胚发育的主要因素。本研究与 Jin 等^[7]的研究结果相一致,他们发现罗氏易位的异常胚胎囊胚形成率显著下降。

在 2-8 细胞阶段,胚胎基因组尚未大规模激活转录,从胚胎形态并不容易区分出染色体异常与否,非平衡染色体可能在基因组激活后对胚胎发育产生较大影响,囊胚培养有助于清除染色体异常的胚胎,很多异常胚胎在体外培养至桑葚胚阶段停滞^[13]。目前已证实染色体异常会影响胚胎基因组激活以后的囊胚发育^[14],但需要注意的是,除了女性年龄、体外培养条件等导致胚胎染色体错误分离的因素之外,本研究中的异常胚胎还来源于易位染色体的错误分离。而染色体间相互作用(interchromosomal effect, ICE)的存在也可能导致除易位染色体之外的其他非整倍体异常。有研究表明,在减数分裂和有丝分裂过程中均可能产生 ICE,造成易位患者的卵裂期胚胎非整倍体率增加,而这种 ICE 造成的非整倍体率增加现象在囊胚阶段并不明显,提示相当一部分染色体异常胚胎或非整倍体细胞在胚胎基因组激活后可能通过启动凋亡或其他过程被迅速清除^[4]。

但 Evsikov 等^[8]认为易位对胚胎的选择作用主要存在于囊胚植入后,因为相当一部分不平衡的胚胎可以发育至优质囊胚,本研究中也观察到这种现象。可能的解释为易位染色体对胚胎的影响在囊胚发育阶段已经开始,但这个过程持续而缓慢;且平衡易位涉及的染色体和断裂点各不相同,导致遗传物质不平衡胚胎所涉及的基因性质和数量会不同,对异常胚胎发育的影响也可能不同。

3.3 性别、易位染色体类型与配子分离和胚胎发育

相互易位有 4 种配子分离方式,即对角分离、邻近 1 分离、邻近 2 分离或 3:1 分离,罗氏易位也有 3 种配子分离方式。其中相互易位的对角分离和罗氏易位的交互分离能够产生正常/平衡配子。由于近端着丝粒染色体在减数分裂和有丝分裂过

程中的不稳定性,相互易位可根据是否包含近端着丝粒染色体分为两种类型。

目前,大多研究对性别和近端着丝粒染色体是否影响配子分离方式还存在争议^[3,5]。本研究中正常/平衡胚胎率在不同性别以及相互易位的两种类型中并未发现显著差异,说明配子的正常分离未受到上述因素的影响,这和以往研究^[5]结果一致。正常/平衡胚胎的 D3 优质胚胎率和囊胚形成率也未发现受到近端着丝粒不稳定性的影响。可以推测,易位携带者的性别、相互易位的类型对正常/平衡胚胎率以及胚胎发育的关系不大,这可为易位患者提供相关的 PGD 临床咨询。

本研究的主要缺陷来自 FISH 的误诊,FISH 本身的错误(核分裂、重叠、信号丢失等)和胚胎的嵌合现象都可能导致误诊^[15],这在一定程度上影响了本研究的准确性。国际上误诊率大都在 5%以内,本中心的误诊例数较少,误诊率在 0.1%左右。

综上所述,染色体罗氏易位和相互易位中染色体不平衡分离可能对胚胎早期发育影响不大,对染色体不平衡胚胎的清除可能在囊胚阶段已经开始;性别和相互易位中染色体的类型对正常/平衡胚胎率影响不大,亦不是影响胚胎发育的重要因素。

参考文献:

- [1] Stern C, Pertile M, Norris H, et al. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure [J]. Hum Reprod, 1999, 14(8): 2097-2101.
- [2] Weatherall D. The molecular basis for phenotypic variability of the common thalassaemias [J]. Mol Med Today, 1995, 1(1): 15-20.
- [3] Yilmaz A, Zhang XY, Chung JT, et al. Chromosome segregation analysis in human embryos obtained from couples involving male carriers of reciprocal or Robertsonian translocation [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46046.
- [4] Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, et al. Embryos of Robertsonian translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development [J]. PLoS Genet, 2012, 8(10): e1003025.
- [5] Ye Y, Qian Y, Xu C, et al. Meiotic segregation analysis

- of embryos from reciprocal translocation carriers in PGD cycles[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(1): 83–90.
- [6] Findikli N, Kahraman S, Kumtepe Y, et al. Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases [J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 7(5): 563–571.
- [7] Jin H, Ying L, Jie Q, et al. Characteristics of embryo development in Robertsonian translocations' preimplantation genetic diagnosis cycles [J]. *Prenat Diagn*, 2009, 29(12): 1167–1170.
- [8] Evsikov S, Cieslak J, Verlinsky Y, et al. Effect of chromosomal translocations on the development of preimplantation human embryos in vitro [J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(4): 672–677.
- [9] Alves C, Sousa M, Silva J, et al. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of Robertsonian translocations: the Portuguese experience [J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22(12): 1153–1162.
- [10] Munne S, Marquez C, Magli C, et al. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21 [J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(9): 863–870.
- [11] Sonta S. Transmission of chromosomal abnormalities: participation of chromosomally unbalanced gametes in fertilization and early development of unbalanced embryos in the Chinese hamster [J]. *Mutat Res*, 2002, 504(1–2): 193–202.
- [12] 徐艳文, 周灿权, 曾艳红, 等. 植入前遗传学诊断100个周期临床分析[J]. *中华妇产科杂志*, 2011, 46(4): 255–259.
- Xu YW, Zhou CQ, Zeng YH, et al. Clinical analysis of 100 preimplantation genetic diagnosis cycles [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2011, 46(4): 255–259.
- [13] Munne S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 12(2): 234–253.
- [14] Munne S, Chen S, Colls P, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 14(5): 628–634.
- [15] DeUgarte CM, Li M, Surrey M, et al. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(4): 1049–1054.

(编辑 徐杰)