

α -地中海贫血种植前基因诊断妊娠成功

李晓红¹, 庄广伦¹, 周灿权¹, 程 钢², 舒益民¹, 曾瑞萍²

(中山大学 1. 附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080; 2. 中山医学院遗传教研室, 广东 广州 510089)

摘 要:【目的】探讨种植前基因诊断的临床应用。【方法】对 1 例夫妇均为东南亚缺失型 α -地中海贫血携带者, 经超排取卵、卵母细胞单精子显微注射受精及胚胎细胞活检, 吸取的单个卵裂球采用针对 α -SEA 基因的 gap-PCR 引物和荧光探针用荧光定量 PCR 技术进行诊断, 将诊断为不致病的 3 个胚胎进行宫腔内移植。【结果】胚胎移植后 7 周 B 超诊断单胎妊娠, 18 周羊膜腔穿刺产前诊断证实为不致病胎儿。【结论】应用成熟的显微操作技术进行胚胎细胞活检, 活检的单个卵裂球用荧光定量 PCR 技术进行诊断, 获得国内首例 α -地中海贫血胚胎种植前基因诊断后妊娠成功。

关键词: α -地中海贫血; 植入前诊断; 聚合酶链反应; 胚胎活检; α -SEA 基因

中图分类号: R596; R714.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)04-0268-02

Preimplantation Genetic Diagnosis of Human Embryos with α -Thalassemia LI Xiao-hong¹, ZHUANG Guang-lun¹, ZHOU Can-quan¹, CHENG Gang², SHU Yi-min¹, ZENG Rui-ping². (1. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital; 2. Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To study the clinical implementation of preimplantation genetic diagnosis. 【Methods】One couple (1 cycle) with deletional α -thalassemia of the Southeast Asian type (α -SEA) received preimplantation genetic diagnosis. Ovarian stimulation was achieved and transvaginal ultrasound-guide oocyte collections were done 36 hours after HCG injection. Mature oocytes were selected for ICSI. Embryos were biopsied and the removed single blastomere was amplified by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) with the gap α -SEA gene primers and probes. Transcervical uterine transfer of 3 selected normal embryos was carried out after DNA analysis. 【Results】Pregnancy was confirmed by the demonstration of one gestation sacs on ultrasonic examination 7 weeks after transfer. Prenatal diagnosis was done at the 18th week and unaffected fetus was identified. 【Conclusion】Embryo biopsy can be successfully applied. Single blastomere can be amplified by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). This study represents the first successful application of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for α -thalassemia in China.

Key words: α -thalassemia; preimplantation diagnosis; polymerase chain reaction; embryo biopsy; α -SEA gene

1990 年 Handyside 等报道了世界首例性连锁疾病种植前性别诊断后试管婴儿妊娠成功, 随后一些国家相继报道了这一技术的应用^[1]。本研究采用荧光定量 PCR 技术, 选择跨越断裂点的 PCR (gap-PCR) 引物扩增单个胚胎卵裂球 16 号染色体上的 SEA 基因, 首次对曾经两次妊娠 Bart's 水肿胎儿的 α -地中海贫血 (简称地贫) 携带者夫妇进行种植前基因诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 即获成功。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本文的治疗对象夫妇均为东南亚缺失型 (SEA) α -地贫携带者。分别于 1994 年及 1996 年因妊娠 Bart's 水肿胎儿被迫引产。1999 年 10 月在本中心接受 α -地贫的 PGD。

1.2 方 法

1.2.1 超排取卵和卵胞浆内单精子显微注射受精 (ICSI) 控制性超排卵, 阴道 B 超介导下取卵。取卵后 4~6 h 进行 ICSI, 60~72 h 观察卵裂。当胚胎发育到 6~8 细胞时进行胚胎活检^[2]。

1.2.2 胚胎细胞活检 在显微镜下观察胚胎的每个卵裂球, 用固定针固定胚胎, 注射针向透明带注少量的酸性 Tyrodes 液, 然后样品针吸取卵裂球, 一旦卵裂球从胚胎中吸出, 随即将其从样品针中推出。活检一完成, 就将卵裂球移入 0.2 mL Eppendorf 管中直至诊断。活检后的胚胎置于新鲜的 IVF-50 培养液中, 继续培养^[3]。

1.2.3 单个胚胎卵裂球的基因分析 单个胚胎卵裂球的荧光定量 PCR 扩增反应总体积为 50 μ L, 体系中含 Taq DNA 聚合酶, 超纯水, 10 \times PCR 缓冲液, 4 种 dNTP (50 μ mol/L), α -SEA gap 引物 (序

收稿日期: 2002-04-26

基金项目: 中国博士后基金资助项目 (中博基 1999-10); 广东省自然科学基金资助项目 (990122)

作者简介: 李晓红 (1965-), 女, 湖南长沙人, 博士后, 现在北京大学第一医院生殖与遗传研究所任副所长。庄广伦, 导师。

列: 5'-aac tgc gtc gtc ccc act gtc gtc-3'; 5'-taa gcg tat tgg aag cgt gta-3'; 5'-gat aca ctt cca gac cca tat at-3')及探针(正常序列: 5'-gcc ttg ggg agg ttc tag ccc ctg agc acc-3'; 缺失序列 5'-tcc agg agt tca agg ctg cag taa gcc atg-3'). 混合好的反应液加到含单个卵裂球的 Eppendorf 管中,放入 7700 全自动 FQ-PCR 仪进行扩增,通过电脑 Sequence detector V1.7a 软件分析直接给出结果。

1.2.4 胚胎移植 观察活检胚胎继续发育情况

取卵后 80 h 经阴道宫腔内移植诊断为正常的胚胎 2 个和不致病的杂合子胚胎 1 个,剩余的胚胎冷冻。移植后 2 周妊娠试验检查,7 周 B 超检查。

2 结果

活检、基因诊断及胚胎移植结果见表 1。移植后 2 周妊娠试验阳性,7 周 B 超示单胎妊娠,18 周羊膜腔穿刺产前诊断为不致病胎儿(杂合子)。

表 1 活检、基因诊断及胚胎移植结果

Table 1 Results of biopsy, genetic diagnosis and embryo transfer

Embryo No.	Before biopsy		14h after biopsy		Results of FQ-PCR			Embryo Transferred
	Cell(n)	Fragment(%)	Cell(n)	Fragment(%)	Normal FAM	Mutant TET	Diagnosis	
1	8	< 10	8	< 10	+	+	Heterozygous	+
2	7	< 10	6	20		+	Homozygous	
3	8	< 10	6	30			No diagnosis	
4	6	20	6	20		+	Homozygous	
5	5	< 10	5	30	+		Normal	+
6	6	< 10	8	< 10		+	Homozygous	
7	8	< 10	6	30	+		Normal	+
8	7	< 10	6	20		+	Homozygous	
9	5	20	3	50	+		Normal	
10	5	< 10	6	< 10		+	Homozygous	

FAM: 6-carboxy-fluorescein; TET: 4, 7, 2', 7'-tetrachloro-6-carboxyfluoreicein

3 讨论

3.1 PGD 在 α -地中海贫血中的应用

PGD 是以体外受精-胚胎移植技术为基础,结合显微操作技术和分子生物学研究特别是单细胞 DNA 分析技术发展起来的崭新技术。PGD 既避免了被动地妊娠遗传患儿给夫妇带来的痛苦,又避免了产前诊断过程中可能的胎儿流产的风险,使人类有可能主动地控制自身的生殖活动,生育健康的后代。地贫的 PGD 仅见于 1998 年及 1999 年 Kuliev 等^[4,5]的连续报道,采用巢式 PCR 技术仅对人 β -地贫几个突变位点进行极体的诊断,未能建立对 α 地贫及 β 地贫其它突变类型的诊断;他们采用的方法的缺陷是只能对母源遗传基因进行检测,且常规 PCR 产生假阳性结果的风险甚大。本研究在建立了稳定可靠的 α -地贫 PGD 的新方法后,应用于临床获得成功,为 α 地贫的预防提供了一个可供选择的方法。

3.2 胚胎细胞活检及单个细胞的基因分析

PGD 技术的难点之一是对体外培养的胚胎进行活检并保持其发育潜能。胚胎细胞活检较理想的是在 6~10 细胞期进行。因这时期移去两个细胞不影响胚胎的继续发育,而且胚胎各细胞膜间的紧密连接还未发生。本研究中胚胎活检后 14~18 h 胚胎能继续发育,移植后获种植成功。

我们选用了荧光定量 PCR^[6]进行单个细胞的基因分析,其体系中的荧光探针直接起到了 DNA 探针杂交的作用,由于闭管操作,且省去了 PCR 产物的后处理,有效防止了污染的发生,特异性和灵敏度大大提高。我们对 SEA 型 α 地贫,采用 gap-PCR 技术结合荧光定量的新型设计进行 PGD,这时通过单个卵裂球的检测,能明确区分正常、杂合子和纯合子 3 种基因型,双亲的正常与突变等位基因的出现与否均可被证实,等位基因脱扣 (allele drop out, ADO) 也可很容易地检测到。避免了 ADO

(下转第 276 页 to page 276)

本研究中产后 5 d 抑郁组 P 高于对照组 ($P < 0.05$), 产后 5 d P 水平与产前的差值抑郁组低于对照组, 说明产后 5 d 抑郁组 P 下降较对照组缓慢。正常妊娠孕晚期 P 值达高峰, 分娩胎盘剥离后 P 水平应迅速下降。本研究中抑郁组 P 下降缓慢, 临床出现的焦虑不安、情绪变化等症状是否与 P 下降缓慢有关, 以及产后 P 的延迟下降是否导致产后抑郁, 还有待以后进一步研究。

3.4 E₂ 与产后抑郁症

有流行病学研究表明, 女性抑郁患病率高于男性, 生殖年龄女性抑郁症发病率高于青春期以前及绝经后女性, 绝经后雌激素和孕激素水平很低, 无周期性变化, 因此人们推测雌激素的周期性变化可部分解释上述抑郁症的患病率差异。本研究结果中产前 E₂ 抑郁组高于对照组 ($P < 0.05$); 产后两组间比较, 差异无统计学意义, 并不能说明雌激素变化与产后抑郁无关; 因产后 5 d, 42 d E₂ 水平与产前的差值, 抑郁组高于对照组 ($P < 0.05$), 说明抑郁组 E₂ 下降过快, 这可能是产后抑郁的病因之一, 因妊娠时雌激素逐渐升高, 孕晚期达最高值(较非孕时高几百倍), 随着分娩胎盘剥离后, 雌激素水平迅速下降, 致脑内和内分泌组织的儿茶酚胺的作用减弱, 从而导致相应的情绪和行为的改变^[6,7]。雌激素具有多种神经调节功能, 包括直接作用和递质调节, 雌激素可增强神经生长因子及其受体的表达, 还可以通过调节血清素及其一些信使

而发挥抗抑郁治疗作用。此外, 也有舌下含服雌二醇治疗产后抑郁症痊愈的报道^[8]。

总之, 产后妇女血清中 E、P 及 PRL 的变化过快, 可能对产后抑郁症的发生有一定影响。

(感谢凌莉老师在统计方法上的指导)

参考文献:

- [1] 段得琬, 王临虹. 妇产科身心学[M]. 北京: 中国人口出版社, 1993. 207~215.
- [2] Cox J L, Holden J M, Sagovsky R. Detection of postnatal depression-development of the 10 item Edinburgh postnatal depression scale[J]. Br J Psychiat, 1987, 150(7): 782.
- [3] Bergant A M, Heim K, Ulmer H, et al. Early postnatal depressive mood; associations with obstetric and psychiatry factors[J]. Psychosom Res, 1999, 46(4): 391.
- [4] Galler J R, Brook R, Harrison R. Maternal moods predict breastfeeding in Barbados[J]. J Dev Behav Pediatr, 1999, 20(2): 80.
- [5] Morritt D F. Hyperprolactinemia and depression[J]. JAMA, 1991, 266(14): 2004.
- [6] Abou-saleh M T, Ghubash R, Karim L. Hormonal aspects of postpartum depression[J]. Psychoneuroendocrinology, 1998, 23(5): 465~475.
- [7] Sichel D A, Cohen L S, Robertson L M, et al. Prophylactic estrogen in recurrent postpartum affective disorder[J]. Biol Psychiatry, 1995, 38(12): 801.
- [8] Ahokas A J, Kaukoranta J, Wahlbeck K. Estrogen deficiency in severe postpartum depression; successful treatment with sublingual physiologic 17 beta-estradiol; a preliminary study[J]. J Clin Psychiatry, 2001, 62(5): 332.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 269 页 from page 269)

引起的误诊。在本研究中 1/10 的卵裂球未明确诊断, 分析可能的原因: 一是来自胚胎本身的因素, 如胚胎有一定比例的退化变性的细胞或活检时卵裂球的溶解; 二是卵裂球处理不当或转送过程中的丢失; 三是 PCR 扩增失败。

总之, 地贫 PGD 的研究还刚开始, α -地贫携带者 PGD 后获临床妊娠成功, 为进一步的 PGD 基础研究及临床应用打下了基础。

参考文献:

- [1] Verlinsky Y, Kuliev A. Progress in preimplantation genetics[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(1): 9.

- [2] 李蓉, 庄广伦, 张敏芳. 卵母细胞单精子显微注射治疗男性因素及不明原因不育[J]. 中华妇产科杂志, 1997, 32(4): 32.
- [3] 李晓红, 庄广伦, 李满. 单细胞 PCR 对种植前胚胎的性别鉴定[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 11.
- [4] Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, et al. Preimplantation diagnosis of thalassemias[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(5): 219.
- [5] Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, et al. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of thalassemias[J]. J Assist Reprod Genet, 1999, 16(4): 207.
- [6] Livak K J, Flood S J A, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. PCR Methods Applic, 1995, 4(6): 357.

(编辑 张恩健)