

·临床研究·

罗式易位携带者胚胎植入前遗传学诊断的研究

方 丛, 庄广伦, 徐艳文, 舒益民, 周灿权, 李 洁, 钟依平

(中山医科大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】应用荧光原位杂交(FISH)技术对罗式易位携带者进行胚胎植入前遗传学诊断。【方法】分别用化学打洞法及机械打洞法对3例罗式易位 t(13q14q) 患者的体外受精的胚胎活检, 用 Vysis LSI 13q14, Tel Vysion 14q 探针针对卵裂球进行 FISH 分析, 选取正常或平衡的胚胎移植入子宫腔。【结果】3个周期共获卵 23 个, 受精率 79%。活检 14 个胚胎, 其中化学打洞法活检 9 个胚胎, 活检后胚胎继续分裂率 67%; 机械打洞法活检 5 个胚胎, 活检后胚胎继续分裂率为 40%。2 个周期分别有 1 个胚胎显示正常或平衡, 进行移植, 其中 1 例获得妊娠, 妊娠 20 周时经羊水细胞核型分析证实为正常。【结论】对罗式易位携带者进行胚胎植入前遗传学诊断, 可以解决患者的生育障碍。

关键词: 荧光原位杂交; 罗式易位; 植入前诊断/方法

中图分类号: R321-33

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2001)03-0202-03

Preimplantation Genetic Diagnosis for Robertsonian Translocation Carrier

FANG Cong, ZHUANG Guang-lun, XU Yan-wen, SHU Yi-min, ZHOU Can-quan, LI Jie, Zhong Yi-ping

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

Abstract:【Objective】To perform preimplantation genetic diagnosis by using dual color fluorescent in-situ hybridization (FISH).【Methods】The chemical and mechanical division methods were used to perform embryo biopsy in 3 cases of Robertsonian translocation t(13q14q). Vysis LSI 13q14 and Tel Vysion 14q probes were used to detect the blastomeres biopsied from the IVF embryos of the patients. FISH analysis was performed to select normal or balanced karyotype embryos, which then were transferred into the uterus.【Results】Total of 23 oocytes were retrieved in 3 treatment cycles. Fertilization rate was 79%. 14 embryos were available for embryo biopsy. Among them, 9 embryos were biopsied by chemical division method, with further cleavage rate of 67%; 5 embryos were biopsied by mechanical division method, with further cleavage rate of 40%. Single embryo was diagnosed as normal karyotype or balanced respectively in 2 treatment cycles. Both of them were transferred into the uterus. One clinical normal on-going pregnancy was achieved, the diagnosis was confirmed by amniocyte karyotype analysis.【Conclusion】Preimplantation genetic diagnosis can be used to resolve the problem of fertility for Robertsonian Translocation Carriers.

Key words: fluorescence in situ hybridization; robertsonian translocation; preimplantation diagnosis/methods

罗式易位是一种涉及 2 条近端着丝粒染色体 (D 组和 G 组染色体) 的易位类型, 其断裂发生在着丝粒部位或着丝粒附近, 整个染色体臂发生了相互易位, 形成 2 条中着丝粒染色体, 其中由染色体短

臂形成的小染色体往往丢失, 虽然染色体数目减少了 1 条, 但由于个体的主要基因没有丢失, 个体的表型是正常的。罗式易位是常见的染色体结构异常, 在新生儿中的出现率约 1/1 000^[1], 理论上人类

收稿日期: 2000-10-10

作者简介: 方 丛(1970-), 女, 河南郑州人, 博士, 主治医师, 专长生殖医学。

中应该有15种不同的罗式易位,不同类型的罗式易位的发生率差别很大,其中最常见的是13号和14号染色体之间发生的罗式易位(占74%)。罗式易位携带者产生6种配子,其中一种正常的和一种平衡的配子,其它4种为非平衡配子,因而罗式易位携带者常常表现反复自然流产,男性携带者还常表现为生精障碍而导致不育。对这些有生育障碍的罗式易位携带者进行胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)可以选择正常或平衡的胚胎移植,帮助他们获得正常妊娠达到优生优育的目的。本文应用双色荧光原位杂交(fluorescence in-situ hybridization, FISH)方法对3例t(13q14q)罗式易位携带者进行胚胎植入前遗传学诊断的研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2000年3月至2000年10月,在本中心就诊的3对罗式易位患者夫妇,第1例和第2例女方为罗式易位携带者,第3例男方为罗式易位携带者。男方为罗式易位携带者夫妇表现为原发不育,男方精液检查示少弱精,外周血核型分析为45,XY,-13,-14,+t(13q14q);另2例女性患者则表现为反复自然流产4~5次,均于孕60d左右自然流产,内分泌检查正常,外周血染色体核型分析为45,XX,-13,-14,+t(13q14q)。在进行PGD前,与患者签订同意书。

1.2 方法

1.2.1 体外受精和培养 用本中心常规超排卵方案^[2],当主导卵泡径线达18mm时注射10000 IU人类绒毛膜促性腺激素,36h后经阴道B超介导下取卵。取卵后4~6h用常规方法(第1例)或卵子胞浆内单精子显微注射受精(第2、3例,因精子数少),16~18h观察受精情况,胚胎用IVF-20培养液培养。取卵后第3天观察胚胎发育情况,记录胚胎细胞数目和碎片情况。

1.2.2 胚胎的活检及固定 可活检胚胎的标准为正常受精并发育到4细胞以上,碎片<20%。发育到6细胞以上的胚胎取2个卵裂球,个别情况下如活检取出的卵裂球固定后未见有核,则可能取第3个卵裂球。其中例1和例3的胚胎活检的方法^[3]为化学透明带打洞法即用酸性Tyrode液消化透明

带,用平口针缓慢吸出卵裂球。例3的胚胎活检方法为机械透明带打洞法^[4],方法为用显微穿刺针在透明带上切出一个呈“十”字型的活瓣性切口,然后用平口针吸出卵裂球。用Tween-20/HCL固定卵裂球于玻片上,固定时观察核的形态并记录核的位置。然后玻片在磷酸盐缓冲液中洗5min,再依次用体积分数70%、85%、100%的酒精脱水。

1.2.3 探针 选用Vysis LSI 13q14(绿色标记),Tel Vysion14q(橙色标记)探针,在7μL杂交缓冲液内分别加1.0μL LSI 13q14和Tel Vysion14q探针,振荡、离心后备用。

1.2.4 FISH步骤 ①玻片置于73℃70%的甲酰胺中变性5min,依次于体积分数70%、85%、100%乙醇中脱水,凉干。②备好的探针在73℃变性5min,然后冰浴。③在变性后的标本上加已变性的探针,加盖玻片,封口,放入湿盒内。④37℃杂交4h。⑤去盖玻片后,将玻片置于73℃0.4×SSC/0.3%乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40)中2min,室温下2×SSC/0.1%NP-40中1min洗脱非特异性杂交。⑥加10μL 1.25μg/L的4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)复染10min。⑦奥林巴斯BX650荧光镜下观察结果。每个诊断周期均用正常人的外周血淋巴细胞作对照。每个卵裂球核显示2个红色和2个绿色信号为正常或平衡的胚胎;1个红色信号和2个绿色信号为14单体;2个红色信号和1个绿色信号为13单体;3个红色信号和2个绿色信号为14三体,依此类推。如胚胎中的每个细胞的FISH结果与其它的细胞的结果都不同,则为无规律分裂胚胎(chaotic division)。

1.2.5 胚胎移植及妊娠诊断 FISH有结果后选择2个卵裂球均有正常信号的胚胎移植。剩余胚胎均经固定后用FISH分析。临床妊娠标准为移植胚胎后14d验尿妊娠试验阳性,5周后B超检查见胎心搏动。

2 结果

2.1 体外受精和胚胎情况

3个周期共取卵23个,成熟卵子19个,受精15个,以成熟卵子计受精率为79%,可供活检的胚胎14个,其中第1例6个,第2例5个,第3例3个。

2.2 胚胎活检情况

采用两种不同的透明带打孔活检方法,所有活

检后的胚胎均存活。第 1 例和第 3 例采用化学方法透明带打孔, 第 2 例采用机械法透明带打孔。两

种方法的活检时间、活检后胚胎继续分裂情况见表 1。

表 1 两种方法的胚胎活检结果

Table 1 Result of embryo biopsy by two methods

Case	Method	Embryos biopsied		Time consuming		Further cleavage	
		<i>n</i>		<i>t</i> / min		<i>n</i>	(%)
1	Chemical	6		90		4 ¹⁾	(67)
2	Mechanical	5		110		2 ²⁾	(40)
3	Chemical	3		40		2 ³⁾	(67)

1) among 4 further cleavage embryos 2 were biopsied 2 cell, another 2 were biopsied 1 cell; 2) both 2 further cleavage embryos were biopsied 2 cell; 3) 1 was biopsied 2 cell, 1 was biopsied 3 cell

2.3 FISH 及胚胎移植结果

3 例患者中, 例 1 和例 2 分别有 1 个胚胎的 2 个卵裂球 FISH 结果显示正常信号而移植, 例 1 移植后 14 d 验尿 HCG (+), 孕 7 周 B 超检查见胎心搏动, 诊为宫内单活胎, 并于妊娠 20 周时行羊膜腔穿刺取羊水细胞核型分析为 46, XY, 并于 2000 年 12 月 21 日顺产一健康男婴 (妊娠 36 周⁺¹)。例 2 未妊娠。例 1 及例 2 移植的胚胎均为活检后继续分裂胚胎。例 3 FISH 结果显示所有胚胎均为异常, 因而无胚胎移植。所有剩余胚胎均经固定后 FISH 分析。各例患者不正常胚胎的结果是: 例 1 有 1 个 14 单体, 5 个胚胎为无规律分裂; 例 2 有 1 个 13 单体, 1 个为嵌合型, 2 个为无规律分裂; 例 3 为 2 个 14 单体, 1 个无规律分裂。

3 讨论

3.1 用 FISH 进行染色体结构异常的 PGD 的可行性及意义

PGD 使选择正常的胚胎进行移植成为可能, 这项技术可用于有遗传缺陷的患者, 避免了反复流产的精神上和生理上的痛苦。自 1990 年 Handy-side^[3] 报道第一例植入前性别诊断婴儿的出生, 该项技术已用于 X-连锁疾病、单基因遗传病、非整倍体的植入前诊断。我院也于 1999 年成功地用 FISH 技术对部分遗传病进行了植入前胚胎性别诊断^[5], 之后进一步发展该技术, 将其应用于对染色体结构异常患者的 PGD。

用胚胎活检获得的单细胞作 FISH 分析方法较简单, 而且适用于男女双方的遗传缺陷。1998 年, Munn^[6] 使用个体特异性探针针对 4 例平衡易位

患者进行了 5 个周期的 PGD, 分析的 33 个胚胎中 75.8% 不正常, 最后获得 1 例临床妊娠。Coon 等^[7] 对 2 例罗氏易位患者进行了 5 个周期的 PGD 治疗, 共活检了 33 个胚胎, 被分析的胚胎中 13% 正常或平衡 (未获妊娠)。本研究采用了用卵裂球 FISH 方法进行 PGD, 其中 1 个周期移植 1 个正常或平衡的胚胎并成功获得临床妊娠, 表明该方法的有效性。

3.2 胚胎活检的安全性

在人类胚胎, 于 8 细胞期胚胎取 1/4 的细胞并不影响胚胎的发育^[3]。本研究中移植的胚胎为取 2 个细胞的胚胎, 其中 1 例能成功妊娠, 其它活检的胚胎继续分裂的占 40% ~ 67%, 也表明了胚胎活检的安全性。本研究中应用了两种不同的透明带打孔活检方法, 化学法是目前应用最广的方法, 此方法酞若酸可能会对胚胎有酸化作用而影响胚胎的活性与着床后进一步发育, 但 Santalo 等^[8] 的研究表明化学法打孔活检后胚胎的存活率与无活检的胚胎无显著差异, 认为此法是安全的。机械法的优点是避免了化学法可能存在的对胚胎的化学损伤, 但对显微操作技术要求较高。本研究中两种活检方法活检后胚胎均存活, 化学法活检后胚胎的继续分裂率为 67%, 机械法的活检后胚胎继续分裂率为 40%, 但由于例数少, 在此不宜下结论。

3.3 罗氏易位携带者胚胎的无规律分裂

本研究中, 无规律分裂胚胎的比例为 33% ~ 71%, 造成这种 DNA 复制和细胞分裂失控的机制尚不明, 但有学者认为可能是在胚胎分裂早期没有正常的细胞周期检测所导致的^[9]。这种胚胎细胞无规律分裂现象以前已有学者注意到^[10], 并且在

(下转第 208 页)

必作输血治疗。供者新生儿期, 婴儿期生长发育情况的追踪表明: 其生后 1~9 个月的身高、体重、营养状况和动作能、语言能、应人、应物能均符合同龄正常儿水平, 生后 1、6、9 个月的血红蛋白分别为 129 g/L、116 g/L、119 g/L。因此, 本例采集新生儿供者外周血是安全的, 提示适量抽取新生儿供者的外周血以获得更多的造血干细胞是一条“补充”性策略。

3.3 新生儿外周血可能有加快造血重建的作用

Gluckman 等^[5] 报告, 当患者获得脐带血的有核细胞数 $\geq 3.7 \times 10^7/\text{kg}$ 时, 植入成功率为 62%, 若有核细胞数 $< 3.7 \times 10^7/\text{kg}$ 则其植入率仅 42%, 且平均植入时间分别为 25 d 和 35 d, 差异显著。因此, 使患儿行脐血移植时获得的有核细胞数 $\geq 3.7 \times 10^7/\text{kg}$ 有利于移植术的成功和加快患儿的造血重建速度。本文中患儿仅得到脐带血有核细胞数 $2.61 \times 10^7/\text{kg}$, 针对新生儿外周血富含造血干/祖细胞的特点, 采集了 28 mL, 使受者获得的总有核细胞数为 $5.7 \times 10^7/\text{kg}$, 为争取脐血移植的成

功和缩短重建造血的时间提供了细胞数的基础。

参考文献:

- [1] 黄绍良, 方建培, 周敦华, 等. 脐血造血干细胞移植治疗重型 β -地中海贫血[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(11): 671.
- [2] Harrison D E, Astle C M. Short and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: models for human umbilical cord blood [J]. *Blood*, 1997, 90(1): 174.
- [3] Li K, Li C K, Fok T F, *et al.* Neonatal blood: a source of hematopoietic stem cells for transplantation [J]? *Lancet*, 1998, 351(9103): 647.
- [4] Chan K W, Galimski J L, Supkis D, *et al.* Use of minors as bone marrow donors: current attitude and management, a survey of 56 pediatric transplantation centers [J]. *Pediatrics*, 1996, 128(5): 644.
- [5] Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, *et al.* Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors [J]. *N Eng J Med*, 1997, 337(6): 373.

(编辑 关淡庄)

(上接第 204 页)

其中 1 项对 7 个 X-连锁疾病患者的 PGD 研究中^[10] 发现, 胚胎无规律分裂有个人特异性。染色体异常的胚胎和发育缓慢的胚胎中嵌合率和无规律分裂现象更常见, 提示无规律分裂现象与染色体异常也有关。Coon 等^[7] 对 2 例罗氏易位患者进行的 5 个周期的 PGD 治疗中, 87% 染色体异常, 其中 36% 为非整倍体或非整倍体嵌合体, 51% 为无序分裂。这一现象也进一步说明了胚胎活检时取 2 个卵裂球, 在 2 个卵裂球均正常情况下才选择移植以减少误诊的必要性。

参考文献:

- [1] Jacobs P A, Melville M, Ratcliffe S, *et al.* Cytogenetic survey of 11 680 newborn infants [J]. *Ann Hum Genet*, 1974, 37(5): 359.
- [2] 庄广伦, 顾正田, 周灿权. Buserelin 在体外受精中的应用及其对排卵前卵泡液类固醇的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 1992, 28(1): 15.
- [3] Handyside A H, Kontogianni E H, Hardy K, *et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification [J]. *Nature*, 1990, 344(10): 768.
- [4] Verlinsky Y, Kuliev A. An atlas of preimplantation ge-

netic diagnosis [M]. New York: The Parthenon Publishing Group Inc, 2000. 28~29.

- [5] 徐艳文, 庄广伦, 李 满, 等. 荧光原位杂交技术在胚胎植入前性别诊断中的应用 [J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(8): 465.
- [6] Munr  S, Fung J, Cassel M J, *et al.* Preimplantation genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis [J]. *Hum Genet*, 1998, 102(9): 663.
- [7] Coon C M, Harper J C, Winston R M L, *et al.* Infertile couples with Robertson translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions [J]. *Hum Genet*, 1998, 102(2): 117.
- [8] Santalo J, Veiga A, Calafell J M, *et al.* Evaluation of cytogenetic analysis for clinical preimplantation diagnosis [J]. *Fertil Steril*, 1995, 64(1): 44.
- [9] Delhanty J D A, Handyside A H. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo [J]. *Hum Reprod Update*, 1995, 1(3): 201.
- [10] Delhanty J D A, Harper J C, Ao A, *et al.* Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients [J]. *Hum Genet*, 1997, 99(10): 755.

(编辑 关淡庄)