

文章编号: 1004-0374(2010)12-1200-08

“试管婴儿”技术30年——回顾和展望

林 戈^{1,2}, 卢光琇^{1,2*}

(1 中南大学生殖与干细胞工程研究所, 长沙410078; 2 中信湘雅生殖与遗传专科医院, 长沙410008)

摘要: 1978年第一例试管婴儿诞生以及随后近30多年来该领域不断取得的突破性进展, 促进了以体外受精为基础的辅助生殖技术在临床的广泛应用, 并取得了很好的疗效。本文将系统回顾近30多年来辅助生殖技术在临床和实验室两方面建立的包括: 控制性超排卵、序贯培养、精子胞浆内注射以及植入前遗传学诊断和筛查等主要技术突破, 并对医源性多胎、新技术的安全性等目前存在的主要问题及可能的解决方案进行探讨。

关键词: 体外受精; 控制性超排卵; 胚胎培养; 精子胞浆内注射; 植入前遗传学诊断/筛查; 玻璃化冷冻; 多胎

中图分类号: Q321+.1

文献标识码: A

30 years of “test-tube baby” technology: retrospect and prospect

LIN Ge^{1,2}, LU Guangxiu^{1,2*}

(1 Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078, China; 2 Reproductive & Genetic Hospital of CITIC-Xiangya, Changsha 410008, China)

Abstract: Since the birth of the first “test-tube baby” in 1978, numerous achievements have been made on assisted reproductive technology (ART) in recent 30 years, which promotes its broad and successful clinical application. Here, we systematically review the important advancements in *in vitro* fertilization treatment, including controlled ovarian hyperstimulation, sequential embryo culture, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis and screening, etc. We will also discuss the major challenges nowadays in ART, including multiple gestation, safety issue of newly developed technology.

Key words: *in vitro* fertilization; controlled ovarian hyperstimulation; embryo culture; ICSI; PGD/PGS; multiple pregnancy

“试管婴儿”是体外受精—胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)技术的俗称, 意指将人类发育的早期阶段, 即从精卵结合到植入前(受精后5~6天内)胚胎发育的过程转移至体外进行, 随后再将胚胎重新移植到女性子宫内以辅助不孕夫妇获得妊娠的技术。不孕症在育龄夫妇当中的发病率是10%~15%, 其中女性因素引起的不孕占40%, 而输卵管性不孕又是其中一个重要的病因(具体比例)。在20世纪70年代, 当时的医疗技术对于该疾患是束手无策的。IVF技术诞生的早期主要是为了解决女性因素导致的不孕, 尤其是输卵管不通导致精卵结合障碍所面临的临床治疗困境。

Robert Edwards是人类IVF治疗技术的开拓者。早期从事小鼠胚胎发育和体外受精的研究使其意识到IVF有可能是解决不孕症患者痛苦的一个有效途径。20世纪50年代末期, 他开始了人类IVF相关技术的不懈探索。在攻克了人类卵母细胞体外成熟时间的确定、体外精子获能、体外受精和早期胚胎培养等一系列技术障碍之后, Robert Edwards与英

收稿日期: 2010-12-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)
(2007CB948103)

*通讯作者 E-mail: lgxdirector@yahoo.com.cn

国著名的产科医生及腹腔镜先驱Patrick Steptoe合作,开始了IVF技术的临床应用。经历了百余次尝试的失败后,世界首例试管婴儿Louis Brown于1978年顺利降生。此后30余年来,IVF技术不断的成熟和发展,并在全世界范围内广泛的应用,成为治疗不孕的一项重要的常规手段。时至今日,全球已有超过400万试管婴儿的降生,并且长期的流行病学调查研究显示IVF技术是基本安全的。此外,基于IVF技术发展起来的治疗手段也层出不穷,例如:单精子胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)为男性不育治疗提供了的新手段。IVF技术与遗传学和现代分子生物学手段的结合促成了植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)的开展,为避免遗传性疾病的子代传递提供了可能;冷冻技术的进展使人们可以在配子到胚胎的不同时期进行生殖保险,等等。而不孕症有关的研究正逐渐演变成为包括胚胎学、遗传学、生殖内分泌学、妇产科学和免疫学等多学科交叉的新兴学科——生殖医学。以上这些都离不开早期人类IVF技术的开创性研究,它不仅给无数不孕患者带来希望,也给医学界带来了巨大影响。因此,2010年度的诺贝尔生理学及医学奖被当之无愧地授予了试管婴儿技术的先驱Robert Edwards^[1],这不仅是对其在人类IVF研究领域贡献的肯定,也是对在IVF基础上发展起来的辅助生殖技术(assisted reproduction technology, ART)近30多年临床贡献的充分肯定。

本文将简要回顾IVF技术近30年来所取得的主要成就,并对目前存在的主要问题以及可能的发展趋势进行探讨。

1 IVF临床相关技术的主要进展

1.1 控制性超排卵(controlled ovary hyperstimulation, COH)

女性卵泡发育是受下丘脑—垂体—卵巢轴调控,下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH)作用于垂体,垂体分泌卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)作用于卵巢卵泡内的颗粒细胞和卵泡膜细胞以合成雌激素,并促进卵泡的生长和发育。雌激素则进一步刺激子宫内膜增生为妊娠做准备。在自然周期中,体内FSH和LH的浓度可以保证1~2个主导卵泡的生长成熟但不足以维持多个卵泡的发育。如果在自然周期行IVF,能够成功取卵、受精、发育成优质胚胎并最终妊娠的几率不高。为了提高妊

娠的几率,需要使用COH来提高体内促性腺激素水平,即使用外源性FSH和LH制剂来促使多个卵泡发育,由此可以获得更多的胚胎来进行移植以提高妊娠机会。在Edwards和Steptoe早期的IVF治疗中曾经采用COH方案,他们利用从绝经期妇女尿液中提取的人绝经期促性腺激素(hMG,含等量的FSH和LH)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)来诱导多个卵泡发育和成熟,但由于当时不能很好的解决促排卵所带来的黄体功能缺陷,致使早期百余例患者全部失败,其中许多是已经成功生化妊娠后早期流产的。在重新采用自然月经周期进行IVF后,黄体功能正常,治疗30余例患者获得4例临床妊娠,其中就包括了世界上第1例试管婴儿Louis Brown的诞生^[2]。直到1981年,Garcia等^[3]才建立应用hMG联合hCG进行诱导排卵的标准方法。至此,全世界开始广泛利用COH技术进行IVF治疗,常用的药物包括了克罗米芬、hMG和尿液提纯的FSH。后来,人们发现COH中无法避免晚卵泡期内源性LH峰的出现,卵泡期高LH水平会导致卵泡质量下降并增加了IVF治疗周期的取消率。因此,1984年Porter等^[4]引入了促性腺激素释放激素类似物(GnRH-a)进行垂体降调节。GnRH-a可以竞争性地结合垂体GnRH受体,阻断下丘脑内源性GnRH的作用,造成垂体脱敏的效应,可以有效抑制内源性LH的发生,并且使卵泡的发育完全依赖于外源性促性腺激素的作用,发育更加同步。GnRH-a的应用有效降低了周期取消率,显著提高了卵子质量和临床妊娠率。并且,根据患者病因不同调整GnRH-a的使用时间而出现的GnRH-a超长方案、长方案、短方案和超短方案等增加了临床个体化用药的可选择性。目前,基于GnRH-a的降调节方案仍是IVF治疗最常使用的COH方案。GnRH-a降调方案的不足是其对垂体抑制作用长,剥夺了内源性促性腺激素的作用,致使COH药物用量大并且需要有效的黄体支持。此后面世的GnRH拮抗剂在开始COH方案后使用,可直接阻断内源性GnRH对垂体的作用,抑制内源性LH峰出现,使得外源性促性腺激素用量减少,停药后垂体功能恢复迅速、不需黄体支持,其起效迅速,有效性及安全性可与GnRH-a媲美^[5]。近几年,GnRH拮抗剂方案使用逐渐增多,是对GnRH-a降调方案的一个很好补充。此外,IVF治疗中一些常用药物也在向药效更稳定、患者依从性更好的方向发展,例如:近10年基因重组技术在制药业的广泛应用,导致基因重组的外源性促性腺激素(FSH和LH)制剂产

生, 相比于传统从尿液中提纯的产品, 批间效果更加稳定; 近期, 更有改良的长效FSH制剂出现, 一次注射可维持COH作用达7天, 将有效增加患者的治疗依从性。类似的还有黄体酮注射液已被改进成阴道黄体酮栓剂等。

1.2 超声影像学

20世纪80年代的发展对IVF治疗也有巨大的推动作用。经腹部和阴道的超声检查可以很方便、直观地反映盆腔内卵泡以及子宫内膜的生长情况^[6]。现今, 在超排的后期会每日进行常规的B超监测, 以便更准确的评估COH效果并及时调整用药剂量和方案, 这对于IVF治疗是至关重要的。多普勒超声还可以提供对子宫血流灌注情况的评估, 为了解子宫内膜是否适宜妊娠提供了指导^[7]。早期复杂的开腹取卵和经腹腔镜取卵术也早已被更简便、对患者创伤小的经阴道B超引导下穿刺取卵术所取代^[8], 这促进了IVF治疗像门诊诊疗方式的过渡, 极大地推动了IVF治疗更为广泛的开展。

2 实验室技术的主要发展

2.1 胚胎培养体系

由于受精和植入前发育过程都转移到体外, 如何更好的模拟体内环境是构建成功IVF培养体系的关键。就培养基而言, 早期IVF采用并非专为胚胎设计的组织培养用培养基, 例如Ham F10。在20世纪80年代和90年代, 类似的简单或复杂成份的培养基被广泛用于IVF卵裂期胚胎培养并获得较好的效果。但在延长培养后, 胚胎虽然能发育到囊胚并成功妊娠, 但是囊胚形成率及种植率低下。随后, 有的研究人员尝试利用共培养来提高囊胚发育率获得了较好的效果^[9]。在体内, 早期胚胎是在输卵管内发育到囊胚阶段才进入子宫腔等待种植, 随着对输卵管和子宫腔液的成份分析以及胚胎新陈代谢研究的推进, 研发出了针对卵裂期胚胎和囊胚不同的营养需求分别采用不同培养基的序贯培养体系: 配子至8细胞期的培养基含有与输卵管液相同的碳水化合物以及早期分裂期胚胎必需的非必需氨基酸、谷氨酰胺和乙二胺四乙酸(EDTA); 8细胞期至囊胚培养则采用了碳水化合物含量与子宫相同, 含有必需与非必需氨基酸并去除了抑制内细胞团发育和囊胚形成的含EDTA的培养基^[10]。此外, 在体外培养过程中, 保证类似母体内稳定的温度(37~37.5°C)、湿度(95%饱和湿度)以及合适的CO₂和O₂张力十分重要。合适的CO₂分压(5%)对于

保证培养基处于合适的pH环境是很关键的, 而近期的研究更发现接近体内组织O₂分压(5%)的环境能减少胚胎受到氧自由基的损伤, 更加有利于囊胚的形成。因此, 目前大多数IVF中心均采用带有O₂控制系统的三气调节CO₂培养箱或者是直接灌注混合气(5%CO₂, 5%O₂和90%N₂)的桌面型培养箱用于胚胎培养。培养基和培养体系的改进使得囊胚形成率明显改善, 而囊胚种植率更可以达到40%以上, 推动了囊胚培养和移植在IVF治疗中的广泛应用。近期, 更有采用微流体设计的小型培养箱面世, 能持续进行培养基的缓慢更换, 便于随时带走培养体系中的代谢废物, 更好的维持体外培养环境中胚胎的活力^[11]。相信随着人们对早期胚胎发育的了解不断加深, 目前的培养系统仍然存在改进的空间。

2.2 筛选具有发育潜能胚胎的方法

已经发现IVF治疗过程中获得的卵裂期胚胎具有较高的发育阻滞率, 约有50%以上的胚胎不能发育至囊胚阶段。这是体外培养条件所导致还是在体内自然状况下就具有的正常现象仍不清楚。不过, 近30年来人们已经建立了一系列较为准确的指标来帮助筛选最具有发育潜能的胚胎。最为常用的是形态学的评分系统。对于原核期合子而言, Scott和Tesarik分别提出了以原核和核仁的排列以及胞浆晕的出现为基础的评分体系, 他们发现核仁前体的数目和分布可以预见胚胎的种植潜能^[12, 13]。对于卵裂期胚胎, 则以卵裂率、卵裂球形态对称与否以及碎片多少和分布等为指标来评判胚胎的质量。卵裂球中出现多核的情况也预示着胚胎的染色体存在异常, 被认为会严重削弱胚胎的种植潜能^[14]。随着囊胚培养技术的成熟, 延长培养时间以选择发育快、内细胞团清晰、外胚滋养层细胞多的优质囊胚^[15]进行移植成为了筛选的最佳方案, 种植率可以达到60%以上。不过, 种植率明显提高的原因除了通过囊胚培养筛选去除发育阻滞的胚胎以外, 囊胚移植更加符合自然妊娠的情况, 胚胎在合适的时间被移植到了子宫腔内可能是另一重要因素。除了形态学指标以外, 人们还发现胚胎的糖酵解等代谢活性与胚胎发育潜能相关, 因此出现了通过检测胚胎培养液中代谢底物水平来预测胚胎发育潜能的无创性新方法^[16]。以上描述的各种无创性筛选方法各有特点, 目前应用的趋势是尽可能多的结合不同时间点的评判指标来综合筛选。一个更完美的解决方案是采用实时摄像系统纪录单个胚胎的发育行为来更准确评估胚胎的发育潜能^[17, 18]。

2.3 冷冻技术

在 IVF 的 COH 治疗周期中, 患者平均可以获得 6~10 枚胚胎适合移植, 即使在移植 2~3 枚胚胎后, 仍有较多的胚胎剩余。通过建立高效的冷冻保存技术来避免胚胎的浪费就成为了 IVF 不可缺少的一部分。由此, 患者可以在刺激周期失败后再行解冻胚胎移植, 最大限度提高了每次促排卵周期的可供移植次数, 可获得更高的累积妊娠率。在 1983 年, Trounson 等^[19]首先将慢速冷冻-解冻技术用于 IVF, 成功获得妊娠。此后, 这项技术不断改进, 取得了长足的进步, 胚胎复苏率由早期的 19% 上升到 87%^[20]。慢速冷冻法是目前从合子、卵裂期胚胎到囊胚均广泛采用并且较为成功的冷冻方法, 但使用该技术在冷冻卵子和囊胚的尝试中效果不佳。近些年来, 冷冻方法在逐渐向玻璃化冷冻技术转移。与慢速冷冻在缓慢降温过程中逐渐使细胞脱水不同, 玻璃化采用高浓度的冷冻保护剂在冷冻前进行预处理, 置换胞浆内的大部分水分子, 冷冻时快速投入液氮后, 迅速形成玻璃样固体, 有效排除了细胞内外冰晶形成造成的冷冻损伤。由于玻璃化冷冻需要极快的降温速度并尽量减少高浓度的冷冻保护剂的毒性作用, 目前多采用微型载体, 如 Cryoloop 和电镜铜珊等, 通过极度缩小含胚胎玻璃化溶液的体积(1~2 μ l) 来实现“即时玻璃化”, 使降温速率提高到 20000 °C/min 以上, 有效避免了细胞内冰晶形成, 提高了冷冻效率^[21]。采用玻璃化冷冻技术冷冻各个发育阶段的胚胎以及卵子, 均取得了良好的临床效果。不过, 高浓度冷冻保护剂的应用对胚胎和配子是否会构成远期的安全性威胁仍有待进一步观察。

2.4 体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM)

IVM 是指从未刺激的卵巢中获取大量不成熟卵母细胞, 在体外培养成熟后再行 IVF 的方法。其目的是希望在不刺激卵巢的情况下, 获得类似 COH 后的多个成熟卵子。IVM 是在 20 世纪 90 年代逐渐发展起来的技术, 对常规的 IVF 治疗是一个重要的补充。最初其主要针对的是多囊卵巢综合征患者: 该类患者卵巢存在多个小卵泡, 但常无法形成优势卵泡排卵。如果给予促性腺激素诱导, 很容易发生卵巢过度刺激综合征, 严重者出现胸、腹水和血液高凝状态等危及生命的情况。或者是针对某些不能使用促排药物的患者, 例如: 需要接受放化疗的有生育要求的乳腺癌患者, 由于此类肿瘤是雌激素依赖性, 若行 COH 产生大量雌激素会导致肿瘤病情恶

化。在这种情况下, 可在最大卵泡小于 10~12 cm 时给予 hCG 注射, 36 h 后经阴道超声取卵往往能获得多个不成熟卵母细胞, 随后在体外培养 24~48 h 后, 约有 80% 可以成熟用于 ICSI 受精, 获得与常规 IVF 相当的受精率。IVM 技术已经尝试了数十年的时间, 早期由于无法获得合适的培养基(因为对葡萄糖、氨基酸以及维生素等特殊要求知之甚少), 成功率很低。直到近年来, 高效的 IVM 培养基研发成熟及商品化, 人们才取得了较高的成功率。而 IVM 的适应症也逐渐拓宽, 目前还用于治疗卵巢刺激反应低下和多次 IVF 胚胎质量差的患者。尽管 IVM 在临床和实验室技术方面取得长足的进步, 但 IVM 后的妊娠率还是略低于 IVF 的成功率, 可能的原因是 IVM 的卵均取自未充分生长的卵泡中, 使用 hCG 会促进卵母细胞的核成熟, 但胞质的成熟度与 IVF 中充分发育卵泡中获得的卵母细胞还是存在差别的。这会不会对出生子代存在长期的影响还不能确定。IVM 作为一项新技术, 开展应用的时间较短, IVM 出生的婴儿数量较少, 妊娠结局数据缺乏。迄今为止的两份报道资料显示, IVM 后患者的产科、围生期和新生儿期不良结局未见明显增加^[22, 23]。尽管如此, 对待该技术仍需谨慎, 有必要长期随访 IVM 出生婴儿, 了解未知的影响。

2.5 精子胞浆内注射(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)

ICSI 是将单个精子通过机械方法直接注入到卵细胞浆中, 从而完成受精过程。ICSI 主要用于男性因素引起的不育, 也可用于传统 IVF 或其他辅助受精方式失败的患者。ICSI 技术可以说是 IVF 技术后的又一次革命性的突破。在 ICSI 时代到来之前, 对于一些严重男方因素导致不孕症的夫妇, 常规 IVF 的效果不理想, 精子计数极低、活力受损和/或精子形态学不良是造成助孕失败的主要原因。而对于睾丸功能损伤或排精管道梗阻造成的重度少、弱、畸精症甚至是无精症, 常规 IVF 无能为力。为提高常规 IVF 的受精率, 生殖学家做了很多改进和尝试, 从部分透明带切割技术(PZD), 到透明带下受精技术(SUZI), 最后改进到 ICSI。1992 年 ICSI 获得首例成功妊娠^[24]。由于 ICSI 单精受精率高、对精子浓度和形态要求不高, 胚胎着床率高等优点而很快为人们所接受。即使在精液质量极差的情况下, ICSI 技术也能够获得与那些非男性不育症而采用常规 IVF 技术得到的受精率和受孕率相似的结果。目前, ICSI 已成为 IVF 中心治疗严重男性因

素不育的常规技术。但是 ICSI 技术带有创伤性,其绕开了任何自然选择机制及可能导致基因异常的精子(或卵子)受精,对后代的安全性是否存在影响仍然受关注。Bonduelle 等^[25]追踪比较了 2 955 例 IVF 和 2 840 例 ICSI 新生儿结局和孕期及出生时先天性畸形的发病率。结果表明:ICSI 应用过程中,自然流产、出生缺陷、低出生体重以及早熟等问题并没有呈现相关性增加,智力发育异常也没有出现明显增加。但在另一项调查研究中^[26],1 586 例 ICSI 新生儿中,性染色体非整倍体(0.6% vs. 0.2%)和常染色体结构异常(0.4% vs. 0.07%)有轻微增加,且有显著性差异。因此,有必要对 ICSI 后妊娠所生儿童的发育进行持续随访。与传统 IVF 相比,非男性因素不孕情况下 ICSI 技术并未显著提高受孕率。因此,除非确有必要,否则不一定要应用 ICSI 技术。

2.6 PGD / 植入前遗传学筛查

IVF 技术提供了在体外对卵母细胞和早期胚胎进行进一步操作的可能性。PGD 即是利用 IVF 的平台,对从卵母细胞到植入前各个阶段的胚胎进行遗传病的诊断,以帮助患有遗传疾病的夫妇选择正常的胚胎移植,避免遗传病妊娠的发生。相比传统的产前遗传学诊断必须在妊娠建立后才能进行,一旦异常母亲还需承担流产的痛苦和风险而言前进了一大步,具有重要的临床价值。PGD 的概念最早于 1967 年由 Edwards 提出,1968 年 Edwards 和 Gardner 在显微操作下对兔囊胚进行活检,取出少量滋养外胚层细胞分析染色质来选择雌性胚胎。1989 年 Handyside 等首次采用 PCR 技术对有高风险 X-连锁隐性遗传病的夫妇成功地进行了 PGD,并于 1990 年诞生了世界上首例经 PGD 的健康婴儿^[27],标志着 PGD 由技术探索进入临床应用阶段。进入 20 世纪 90 年代后期,PGD 开始走向普及,并可常规用于 40 多种遗传病的诊断^[28]。PGD 活检的细胞可以是卵母细胞的极体,卵裂期胚胎的卵裂球或囊胚的滋养层细胞。极体是卵母细胞成熟分裂的产物,既不参与胚胎的发育,又无任何已知的功能。故取第一极体作为活检材料对胚胎发育的影响最小。极体活检适用于女性遗传病患者的 PGD,但也存在不能准确反映胚胎遗传组成的缺陷,往往需要继续进行卵裂期 PGD 进一步诊断。卵裂期胚胎的卵裂球是全能的,实验证明 8 细胞期胚胎活检 1~2 个卵裂球不影响胚胎的发育。现在绝大多数 PGD 中心,都采用卵裂期胚胎活检进行 PGD 诊断。囊胚的滋养外胚层活检是

潜在的发展方向,滋养外胚层活检可获 6 个或更多个细胞,克服了极体和卵裂球活检只有单个细胞用于遗传学分析的缺点,提高了诊断的成功率和正确率。由于只对能发育到囊胚的胚胎进行诊断,避免了一些无效的检测。但囊胚期 PGD 对实验室要求较高,必须具备稳定的囊胚培养和冻存的经验。活检后的遗传学诊断则根据遗传疾病的类型而采用不同的方法,例如单基因疾病主要采用不同形式的多聚酶链反应 (PCR) 来诊断,而染色体病(包括数目和结构异常)则采用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术诊断。鉴于单基因诊断可因不完善的 DNA 扩增引起的等位基因缺失和 DNA 污染等现象出现误诊,而 FISH 可能出现杂交失败及在中期相不易看到全部染色体等原因出现误诊,PGD 诊断后还需进行产前羊水诊断或者绒毛活检以排除诊断错误。

与 PGD 针对特定的遗传学疾病进行诊断不同,植入遗传学筛查 (preimplantation genetic screening, PGS) 是指在 IVF 形成的胚胎移植到子宫前对其染色体分析,将整倍体胚胎移植到待孕妇女的子宫。染色体拷贝数的不平衡是影响胚胎生存力的主要因素。非整倍体的发生是引发 IVF 中受精失败和胚胎体外发育受阻,以及妊娠后自然流产的重要原因。因此,利用 PGS 技术对植入前胚胎进行染色体非整倍体筛查,将有效地降低流产率,提高 IVF 正常妊娠率,在出生缺陷预防以及提高辅助生殖技术安全性方面具有重要意义。长期以来,PGS 主要借助于 FISH 技术,选择常见的几条染色体进行检测,能够有效筛选出遗传正常的胚胎。最早是使用 FISH 检测 13、18、21、X 和 Y 染色体,这 5 条染色体的非整倍体是可存活胎儿中最常见的染色体数目异常,占总数目异常的 95% 以上^[29]。目前已有商业探针可供临床使用。但在自然流产和导致胚胎发育受阻的原因中,其它染色体非整倍体亦是常见的。而一个胚胎至多可承受三轮的洗脱重杂交标记不同荧光信号。因而在标准的多色 FISH 中,最多可对一个胚胎进行 12 条染色体的检测。但即便如此,通过 FISH-PGS 检测的染色体数目仍然有限,仍有可能因移植了未检测到的染色体非整倍体胚胎而导致植入失败或者自然流产。比较基因组杂交是在 FISH 基础之上发展起来的一种新的分子细胞遗传学技术,与 FISH 技术相比,该技术可以在不制备中期染色体的情况下检测所有染色体^[30]。通过结合应用全基因组扩增 (whole genome amplification, WGA)

技术,CGH得以应用于植入前胚胎。1999年即有学者成功扩增了胚胎单卵裂球的全基因组,发现约60%的胚胎带有完全或部分的非整倍体^[31]。CGH-PGS应用于临床最早是在2001年,Wilton等^[32]报道了首例经单卵裂球CGH的成功妊娠,经筛查冷冻后选择移植46、XX的胚胎,出生了健康女婴。2003年Wilton等^[33]将单细胞CGH应用到反复植入失败患者的PGS中,对比应用CGH与FISH两种方法,发现单细胞CGH-PGS的植入率与妊娠率均高于FISH。有研究使用囊胚滋养层细胞活检取代8细胞期的卵裂球活检进行PGS。因为大多非整倍体及嵌合体胚胎在到达囊胚之前即发育停滞或发生退化,且囊胚滋养层细胞的获取不影响内细胞团的发育且能够提供较多的细胞进行检测,囊胚活检相对卵裂球活检更安全稳妥。该方法的应用也有成功出生健康婴儿的报道^[34]。但滋养层细胞不一定与发育成胚体的内细胞团核型一致,因而也带有误诊的风险。近期的研究热点集中于引进更为快捷、高通量且高灵敏度的技术实现PGS,即微阵列技术。目前应用较多的微阵列分为两类。一种为在CGH基础上衍生的微阵列-CGH,它与传统CGH原理相同,但标记DNA片段杂交的对象是排列在玻片上的DNA探针,而非固定在玻片上的中期染色体。对于红绿荧光比的分析简单而且易于自动化操作^[35]。同样的结合WGA技术后,细菌人工染色体微阵列被制成芯片,实现了芯片-CGH单卵裂球水平的首次临床应用^[36],该研究在6个ET周期中有5个获得了成功妊娠。微阵列-CGH缺陷在于同样无法检出整倍性的异常。另一种新技术应用的是单核苷酸多态(single nucleotide polymorphisms, SNPs)技术,称之为SNP-微阵列。该技术的优势在于检出非整倍体的同时也能检出整倍体异常,而通过特定单核苷酸位点的分析,对于单基因病及单亲二体等现象也能进行筛查。2007年,Treff等^[37]使用未移植的胚胎进行SNPs研究,在单卵裂球水平成功检出了多种非整倍体,随后获得了成功的临床应用。然而在非整倍体的SNP-PGS获得肯定的同时仍有多数学者质疑其在单基因病的诊断及胚胎指纹信息提供中的可靠性^[38]。目前微阵列技术诊断精确性仍有待提高,而其高昂的成本,使得仅有少数实验室能够开展,暂时无法普及。

3 目前存在的主要问题和展望

3.1 ART技术的长期安全性仍有待明确

ART技术的安全性问题涉及母亲和子代。IVF

技术在诞生初期曾饱受大众甚至科学界的质疑,认为经体外培养后出生的婴儿是不正常的。30多年过去,早期出生的一批试管婴儿已成人并大多自然生育健康后代。而大量有关接受IVF和ICSI治疗后出生婴儿的流行病学调查研究也显示ART技术是基本安全的。和自然妊娠相比,IVF不会导致先天畸形和染色体异常后代发生比率增加^[39,40]。ICSI治疗出生后代总体而言畸型率相似于IVF和自然妊娠,但有轻微增加的尿道下裂等畸形^[41]和染色体异常比例^[42]。而这往往是与行ICSI治疗的男性患者本身造成不育的相关遗传缺陷有关。进一步追踪研究IVF和ICSI后代生长发育情况,发现ART后代在体格、运动和认知能力等方面与自然受孕儿童无差异^[43,44]。但以上结论尚不能排除ART技术对子代的影响是细微和晚现的,因此保持对ART子代更为长期的追踪十分重要。此外,ART技术的进展日新月异,例如本文所提及的PGD、IVM、囊胚培养、配子和胚胎的玻璃化冷冻等诸多新技术均是在动物实验证明有效的情况下就迅速推向了临床,较少的技术有像新药研发一样有经过严格的动物实验验证安全性后再实施的。由此也带来了对ART技术安全性新的顾虑,体外培养时间的延长,培养体系和培养基成分的改变,显微操作的使用,快速的温度改变以及在液氮中的开放式储存等都可能对配子和胚胎产生潜在的不利影响。因此,如何建立有效的ART治疗周期注册登记制度,并开展全球范围内的信息合作以便及时汇总有关新技术的子代安全性结果,将对整个ART行业的健康发展有重要意义。此外,IVF/ICSI治疗对女性患者健康的影响也不容忽视。尤其是COH治疗导致女性体内雌激素水平显著升高,是否会造成某些雌激素敏感的肿瘤,如卵巢癌或乳腺癌的发病率增高颇受关注。从已有的流行病学数据来看^[45],卵巢刺激不会直接导致癌症,但长期的影响有待进一步追踪明确。

3.2 如何控制医源性多胎的发生

IVF/ICSI与自然妊娠相比,妊娠并发症(如妊娠高血压综合征、糖尿病、胎盘早剥)和新生儿疾病(如呼吸窘迫综合征、高胆红素血症、感染等)发生率相似,但早产、低出生体重婴儿发生率增高。目前已经明确,多胎妊娠是造成IVF妊娠负面结局的主要因素。尤其是在广泛采用COH后,大部分中心会常规移植2~3枚胚胎以提高单次移植的妊娠率,同时也造成IVF/ICSI的多胎妊娠率达到15%~40%不等,远高于自然妊娠多胎率(1%~2%)。多

胎妊娠不仅给母婴带来额外的风险, 过多双胎的出现也对社会和家庭观念带来冲击。医源性多胎发生的实质是缺乏有效的胚胎评估体系来选择出具有种植和继续发育潜能的胚胎, 为了保证一定的妊娠率只能增加移植胚胎数目。单胚胎移植是一个很好的解决方案。而目前阶段, 单个囊胚移植已显示了一定的可行性。在移植 1 枚优质囊胚的情况下可以获得 50%~60% 以上的临床妊娠率^[46]。然而, 囊胚培养和移植并不适合所有人群, 约有 40% 的患者将不能形成囊胚供移植。目前, 尚不能确定是否体外培养时不能形成囊胚的胚胎早期移植后一定不能建立妊娠。此外, 囊胚培养时延长的体外培养时间对子代的影响还有待明确。如果行早期卵裂期胚胎的单胚胎移植, 与单囊胚移植的结果对比显示^[47], 卵裂期胚胎的单胚移植妊娠率要明显低于单囊胚移植, 不过加上随后的冻胚移植周期后, 累积妊娠率甚至高于单囊胚组。但是, 期待依靠反复冻融周期的单胚胎移植来保证妊娠率, 对于那些 ART 治疗费用不享受保险支付的人群显然不可行。因此, 建立有效的胚胎筛选体系, 能够在不同时期选择出最具活力的胚胎, 形成与多胚胎移植等效的单胚胎移植方案会是未来努力的方向。

[参 考 文 献]

- [1] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2010/
- [2] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978, 2: 366
- [3] Garcia JE, Jones GS, Acosta A, Wright G. Human menopausal gonadotropins/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981. *Fertil Steril*, 1983, 39: 167-173
- [4] Porter RN, Smith W, Craft IL. Induction of ovulation for in vitro fertilization using busserelin and gonadotropins. *Lancet*, 1984, 2: 1284
- [5] Al-Inany H, Aboulghar M. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted conception [Cochrane review]. *The Cochrane Library*, 2002, 1: 1-2
- [6] Siebel MM, McArdle CR, Thompson IE, et al. The role of ultrasound in ovulation induction—a critical appraisal. *Fertil Steril*, 1981, 36: 573-6
- [7] Goswamy RK, Steptoe PC. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. *Hum Reprod*, 1988, 6: 721-6
- [8] Wikland M, Enk L, Hamberger L. Transvesical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by the use of ultrasound. *Ann NY Acad Sci*, 1985, 442: 683-9
- [9] Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M. Improved methods for blastocyst formation and culture. *Hum Reprod*, 1998, 13 (Suppl 4): 20
- [10] Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod Update*, 1997, 3: 367-82
- [11] Suh RS, Phadke N, Ohl DA, et al. Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidic. *Hum Reprod Update*, 2003, 9(5): 451-61
- [12] Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*, 1998, 13: 1003-13
- [13] Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*, 1999, 14: 1318-23
- [14] Kligman I, Benadiva C, Alikani M, et al. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod*, 1996, 11: 1492-8
- [15] Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, 2000, 73: 1155-8
- [16] Gott AL, Hardy K, Winston RML, et al. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 1990, 5: 104-10
- [17] Cohen J, Inge KL, Suzman M, et al. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril*, 1989, 51: 820
- [18] Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotech*, 2010, 28(10): 1115-21
- [19] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 1983, 305: 707-9
- [20] Testart J, Lassalle B, Allart JB, et al. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril*, 1986, 46: 268
- [21] Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 2004, 9(2): 164-70
- [22] Mikkelsen AL, Ravn SH, Lindenberg S. Evaluation of newborns delivered after *in vitro* maturation. *Hum Reprod*, 2003, 18 (Suppl 1): 0-018
- [23] Buckett WM, Chian RC, Barrington K, et al. Obstetric, neonatal and infant outcome in babies conceived by in vitro maturation (IVM): initial five year results 1998-2003. *Fertil Steril*, 2004, 82 (Suppl 2): 5133
- [24] Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 340: 17-8
- [25] Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod*, 2002, 17: 671-94
- [26] Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum*

- Reprod, 2002, 17: 2600-14
- [27] Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, et al. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(10): 767-72
- [28] Sermon KD, Michiels A, Harton G, et al. ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod*, 2007, 22(2): 323-36
- [29] Gayane A, Amander TC. Aneuploidy and early human embryo development. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: R10-5
- [30] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992, 258: 818-82
- [31] Voullaire L, Wilton L, Slater H, et al. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridisation. *Prenat Diagn*, 1999, 19: 846-51
- [32] Wilton L, Williamson R, McBain J, et al. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridisation. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1537-41
- [33] Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, et al. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril*, 2003, 80(4): 860-8
- [34] Sacha AK, Ruth BL, Barry B, et al. Normal pregnancy after tetraploid karyotype on trophectoderm biopsy. *Fertil Steril*, 2009, 92(3): 1169. e9-10
- [35] Cedric LC, Claudia S, Karen S, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(9): e68(1-12).
- [36] Handyside AH, Harton G, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome crossovers between parental haplotypes wide analysis of genetic disease based on mapping. *J Med Genet*, 2010, 47(10): 651-8
- [37] Treff NR, Su J, Mavrianos J, et al. Accurate 23 chromosome aneuploidy screening in human blastomeres using single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays. *Fertil Steril*, 2007, 88: S1
- [38] Harper JC, Coonen E, De Rycke M, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee. *Hum Reprod*, 2010, 25: 821-3
- [39] Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, et al. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in vitro fertilization. *Hum Reprod*, 2002, 17(5): 1391-1398.
- [40] Anthony S, Buitendijk SE, Dorrepaal CA, et al. Congenital malformations in 4224 children conceived after IVF. *Hum Reprod*, 2002, 81: 2089-95
- [41] Ludwig M, Katalinic A. Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online*, 2002, 5(2): 171-8
- [42] Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 2002, 346(10): 725-30
- [43] Hahn CS, DiPietro JA. In vitro fertilization and the family: quality of parenting, family functioning, and child psychosocial adjustment. *Dev Psychol*, 2001, 37(1): 37-48
- [44] Place I, Englert Y. A prospective longitudinal study of the physical, psychomotor, and intellectual development of singleton children up to 5 years who were conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with children conceived spontaneously and by in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2003, 80(6): 1388-97
- [45] Potashnik G, Lerner-Geva L, Genkin L, et al. Fertility drugs and the risk of breast and ovarian cancers: results of a long-term follow-up study. *Fertil Steril*, 1999, 71(5): 853-9
- [46] Stillman RJ, Richter KS, Banks NK, et al. Elective single embryo transfer: a 6-year progressive implementation of 784 single blastocyst transfers and the influence of payment method on patient choice. *Fertil Steril*, 2009, 92(6): 1895-906
- [47] Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, et al. Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod*, 2009, 24(5): 1051-8