

# 体外受精-胚胎移植后早期自然流产胎儿中的染色体异常

童珂雅 刘东云 何瑶 王江 朱家红 叶虹 黄国宁

重庆市妇幼保健院遗传与生殖研究所 400013

通信作者:刘东云,Email:dongyunliu@163.com

**【摘要】 目的** 探讨单核苷酸多态性微阵列(single nucleotide polymorphism-array, SNP-array)技术在体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)治疗后早期自然流产绒毛组织遗传学分析中的应用价值。**方法** IVF-ET 治疗后早期自然流产的 96 例患者,清宫术后提取绒毛组织 DNA 进行 SNP-array 检测,分析绒毛染色体异常的相关因素。**结果** (1)IVF-ET 治疗后早期自然流产患者绒毛中 63.54% 为染色体异常,其中非整倍体异常占 78.69%;(2)高龄、原发性不孕以及双亲染色体异常是绒毛染色体异常的高风险因素;(3)绒毛染色体异常患者再次 IVF-ET 治疗后,仍存在妊娠结局不良倾向,包括妊娠率下降、流产率增高、活产率降低。**结论** IVF-ET 治疗后早期自然流产的患者宜行绒毛 SNP-array 检测,有助于分析自然流产原因,指导再次助孕方式的选择,改善助孕结局。

**【关键词】** 早期自然流产; 体外受精-胚胎移植; 单核苷酸多态性微阵列; 胚胎染色体异常

**基金项目:**重庆市卫计委重点科研项目(2012-1-073)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.024

自然流产是常见的妊娠并发症,发生率为 10%~15%,胚胎染色体的异常是引起早期流产的主要因素。体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)是目前治疗不孕症的重要手段,妊娠后仍存在早期自然流产的风险。基于人类基因组中广泛存在的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点进行探针设计的 SNP-array 技术作为一种全新的染色体检测技术,弥补了 G 显带分析和荧光原位杂交的缺陷,已被广泛应用于早期自然流产组织检测、胚胎植入前诊断和产前诊断等领域。本研究中我们通过对 IVF-ET 治疗后早期自然流产患者绒毛组织进行 SNP-array 分析,检测绒毛染色体的异常情况,探讨胚胎染色体的遗传学效应与临床应用价值。

## 1 对象与方法

**1.1 对象** 2014 年 1 月至 2016 年 12 月在重庆市妇幼保健院行 IVF-ET 治疗后,通过检测血清人绒毛膜促性腺激素确定生化妊娠、超声确定为临床妊娠者,在妊娠 12 周内临床诊断为胚胎停止发育,要求行绒毛染色体检查的 96 例早期自然流产患者为研究对象,孕周 6<sup>+</sup>~12 周。本研究获得本院医学伦理委员会审批通过[(2012)-3-2],研究对象均签署了知情同意书。

**1.2 检测方法** SNP-array 技术检测,采用美国 Illumina Human CytoSNP-12 芯片检测,包含约 30 万个单核苷酸多态位点,步骤按照 Illumina Human CytoSNP-12 芯片操作手册进行。ISCAN 扫描系统采集数据,结果用 Karyostudio 软件分析。

**1.3 统计学分析** 数据采用 SPSS 13.5 进行统计分析,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 绒毛染色体异常结果分析** 共检测 IVF-ET 治疗后早期

自然流产患者 96 例,成功检出 96 例,检出率 100%。61 例绒毛染色体异常,异常率为 63.54%。非整倍体异常 48 例,占 78.69%,其中 22 号和 16 号染色体非整倍体异常最为常见(图 1),分别为 24.56% 和 19.30%。染色体结构异常 7 例,占 11.48%;其中大片段缺失/重复 6 例;单亲二倍体 1 例。嵌合体异常 4 例。复杂异常和三倍体异常各 1 例。

**2.2 患者基本情况与绒毛染色体异常的相关性** 96 例患者平均年龄( $32.96 \pm 4.45$ )岁,年龄范围 23~44 岁(表 1),结果显示  $\geq 35$  岁患者的绒毛染色体非整倍体异常率显著高于  $< 35$  岁患者( $P < 0.01$ );原发性不孕患者的绒毛染色体异常率显著高于继发性不孕( $P < 0.05$ ),且女方非输卵管因素原发性不孕组患者的绒毛染色体异常率为 90.91%,显著高于继发性不孕组( $P < 0.05$ ),见表 2。夫妇一方染色体异常可能导致绒毛染色体异常,本研究中 9 例一方染色体异常(异态)患者中,共 6 例绒毛染色体异常(表 3)。

**2.3 患者再次移植后的妊娠结局** 本研究 96 例患者中 45 例继续在我所助孕治疗,根据此次流产胎儿染色体结果将 45 例

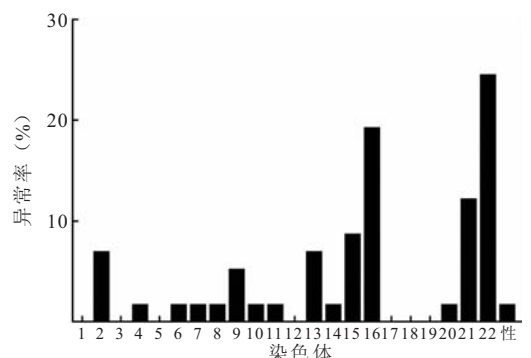


图 1 IVF-ET 治疗后流产患者各染色体的非整倍体异常率

表 1 患者基本情况与绒毛染色体异常分析

项目	例数(n)	绒毛染色体异常率(% ,n)	绒毛染色体非整倍体异常率(% ,n)
年龄因素			
<35岁	64	53.13(34)	37.5(24)
≥35岁	32	84.38(27)	75(24)
P值		0.003	0.001
不孕类型			
原发性不孕	41	75.61(31)	60.98(25)
继发性不孕	55	54.55(30)	41.82(23)
P值		0.034	0.063
助孕方式			
新鲜胚胎	47	63.83(30)	53.19(25)
冻融胚胎	49	63.27(31)	46.94(23)
P值		0.954	0.54

表 3 夫妇染色体的异常/异态与其绒毛染色体的分析

染色体	夫妇染色体核型	女方年龄(岁)	绒毛染色体核型
染色体异常核型	46,XX,inv(8)(p11q22)	29	46,XY,del(8)(p23.3p11),dup(8)(q22q24.3)
	46,XY,t(1;13)(q43;q12)	28	47,XY,+21,dup(13)(q14.2q34)
	46,XY,t(9;13)(q13;p11)	28	46,XX,+9q
	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)	31	46,XX
染色体异态核型	46,XX,14ps+	29	47,XY,+22
	46,XX,inv(9)(p11q12)	39	47,XY,+13
	46,XY,inv(9)(p11q13)	44	47,XY,+16
	46,XY,inv(9)(p11q12)	34	46,XX
	46,XY,inv(9)(p12q13)	32	46,XX

表 4 两组 IVF - ET 治疗后早期流产患者再次移植后的妊娠结局比较

胎儿染色体	例数(n)	妊娠率(%)	自然流产率(%)	活产率(%)
异常组	31	58.06 (18/31)	22.22 (4/18)	45.16 (14/31)
正常组	14	78.57 (11/14)	9.09 (1/11)	71.43 (10/14)

3 讨论

3.1 胚胎染色体异常是 IVF-ET 治疗后早期自然流产的主要原因 IVF-ET 已经成为治疗不孕症的重要手段,尽管其妊娠成功率可达 50%~60%,但分娩率仍不尽人意,与胚胎早期自然流产率有关。文献报道 IVF-ET 后存在 17.14%的自然流产率<sup>[1]</sup>,其中一半以上为胚胎染色体异常所致。本研究中,SNP-array 共检测出 61 例异常绒毛染色体,异常率 63.54%,与文献报道一致<sup>[2-3]</sup>。非整倍体异常占 78.69%,其中 16 号和 22 号染色体非整倍体率最高,可能与 16 号、22 号染色体着丝粒的位置相关,16 号染色体为亚端着丝粒染色体,22 号为端着丝粒染色体,端着丝粒染色体和亚端着丝粒染色体更容易发生非整倍体,而非整倍体的形成机制主要与生殖细胞第一次减数分裂时发生错误分裂,造成染色体的增多或者减少有关。

3.2 患者年龄与胚胎染色体异常 研究表明,高龄妇女接受 IVF-ET 治疗后的胚胎种植率和活产率明显下降<sup>[4]</sup>,与胚胎非整倍体异常有关<sup>[5]</sup>。本研究也证实 ≥35 岁患者的胚胎染色体异常率,尤其是非整倍体率显著高于 <35 岁的患者,与高龄不孕患者卵母细胞数量和质量下降等因素有关。对高龄不孕患者进行胚胎植入前遗传学筛查 (pre-implantation genetic screening, PGS) 可以检测出 32%~85% 的非整倍体<sup>[6]</sup>,因此, PGS 可避免高龄患者移植非整倍体异常胚胎、缩短治疗时间、

患者分为胎儿染色体正常组和异常组,显示再次移植后胎儿染色体异常组的妊娠率、自然流产率、活产率均呈预后不良倾向,差异无统计学意义,见表 4。

表 2 患者不孕病因在两组不孕类型的绒毛染色体异常率比较

不孕病因	例数(n)	绒毛染色体异常率(%)	
		原发性不孕组	继发性不孕组
输卵管因素	62	70(14/20)	59.52(25/42)
女方非输卵管因素	16	90.91(10/11) <sup>a</sup>	40(2/5)
男方因素	7	60(3/5)	50(1/2)
不明原因	11	60(3/5)	50(3/6)

<sup>a</sup> 与继发性不孕组比较, P<0.05

改善妊娠结局。

3.3 不孕类型与胚胎染色体异常 本研究表明,原发性不孕患者 IVF-ET 治疗后早期自然流产的胚胎染色体异常率高于继发性不孕患者。从病因分析,女方非输卵管因素原发性不孕患者的胚胎异常率显著高于继发性不孕,可能与更多的排卵障碍、子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 等因素有关。排卵障碍和 EMs 患者可通过氧化应激、卵子线粒体结构异常和数量的减少、卵泡液的变化等因素导致纺锤丝异常、卵母细胞 ATP 含量减少、卵核不成熟,进而影响卵子和胚胎质量。研究显示 EMs 不孕患者卵母细胞减数分裂 I 期的滞后可能导致卵母细胞减数分裂的异常<sup>[7]</sup>, EMs 患者早期自然流产率也会显著增加<sup>[8]</sup>。

3.4 遗传效应与胚胎染色体异常 平衡易位携带者在配子减数分裂过程可产生不同的分离和结果,不平衡的异常胚胎在早孕期即可因发育停止导致自然流产。因此对 IVF-ET 治疗后自然流产的夫妇,应及早行双方染色体检查。极少数情况下,具有相似染色体带纹区域的平衡易位可能存在 G 显带分析漏诊的风险,而对其自然流产的胚胎进行 SNP-array 分析,更有助于发现平衡易位携带者。近年来更多有关平衡易位携带者经 IVF-ET 治疗的文献报道支持胚胎植入前遗传学诊断有助于降低发生自然流产和胚胎染色体异常的风险<sup>[9]</sup>,减少自然流产给患者带来的痛苦。

Serra 等<sup>[10]</sup>认为 inv(9) 可能干扰减数分裂时染色体的分离,导致配子非整倍体增加。但更多研究结果支持 inv(9) 携带者不会因遗传效应导致不育<sup>[11-12]</sup>。本文中 2 例胚胎非整倍体异常的 inv(9) 携带者均属于高龄孕妇,因此, inv(9) 携带者是否增加配子非整倍体风险还需进一步验证。

**3.5 胚胎移植方式与胚胎染色体异常** 本研究中我们分析了新鲜胚胎移植和冻融胚胎移植两组患者早期自然流产的胚胎染色体异常率,未发现两组存在差异。冻融胚胎经历冷冻和复苏的过程后,虽然可能发生卵裂球的溶解或凋亡、细胞膜和透明带的损伤等,但受损的卵裂球可以被具有全能干细胞功能的复苏卵裂球取代,从而保留胚胎发育潜能<sup>[13]</sup>。

**3.6 IVF-ET 治疗后早期流产患者再次移植后的妊娠结局** 我们对本研究的 96 例患者进行跟踪随访,发现胚胎染色体异常组再次移植后的妊娠率和活产率均低于胚胎染色体正常组,流产率高于正常组,提示 IVF-ET 治疗后早期流产胚胎染色体异常的患者再次移植后的妊娠结局仍有不良倾向,但差异无统计学意义,可能与样本量有关,需进一步积累数据分析。

综上所述,对 IVF-ET 治疗后早期自然流产患者的绒毛组织进行 SNP-array 分析,有助于分析流产原因、提出应对策略,及时发现胚胎染色体的异常,为临床实践提供指导,有助于制定出更适宜的助孕方案。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 梁毓,周丽颖,李颖,等. 体外受精-胚胎移植妊娠早期流产相关因素分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(9):148-149, 168. DOI:10.13404/j.cnki.cjbhh.2014.09.061.  
Liang Y, Zhou LY, Li Y, et al. Related factors of early abortion among pregnancies conceived by *in vitro* fertilization embryo transfer Chinese[J]. J Birth Health Hered, 2014, 22(9): 148-149,168. DOI:10.13404/j.cnki.cjbhh.2014.09.061.

[2] 易翠兴,潘敏,胡舜妍,等. 广州地区 97 例自然流产绒毛细胞培养及核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(9): 41-42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9534.2007.09.018.  
Yi CX, Pan M, Hu SY, et al. 97 cases of chorionic villus cultivation and karyotype analysis for spontaneous abortion[J]. J Birth Health Hered, 2007, 15(9): 41-42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9534.2007.09.018.

[3] 李晶,裴娟,王姝,等. 染色体微阵列技术在辅助生殖妊娠早期自然流产查因中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 12(25), 108-110. DOI:10.13404/j.cnki.cjbhh.2017.12.044.  
Li J, Qiu J, Wang S, et al. The role of chromosomal microarray analysis in the early natural abortion of assisted reproductive technique pregnancy diagnosis[J]. J Birth Health Hered, 2017, 12(25), 108-110. DOI: 10.13404/j.cnki.cjbhh.2017.12.044.

[4] 冯翠娥,姜宏. 40 岁以上高龄妇女体外受精/卵胞质内单精子显微注射-胚胎移植临床结局分析[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(1): 62-66. DOI: 10.7669/j.issn.0253-357X.2015.01.0062.  
Feng CE, Jiang H. Outcomes of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women aged  $\geq 40$  years[J]. Reprod Contracept, 2015, 35(1): 62-66. DOI: 10.7669/j.issn.0253-357X.2015.01.0062.

[5] Demko ZP, Simon AL, Mc Coy RC, et al. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening[J]. Fertil Steril, 2016, 105(5): 1307-1313. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.025.

[6] 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. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.2002.

[7] Da Broi MG, Navarro PA. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility[J]. Cell Tissue Res, 2016, 364(1): 1-7. DOI: 10.1007/s00441-015-2339-9.

[8] 李向尊,马彩虹,杨蕊,等. 子宫内膜异位症与自然流产的相关性分析[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(8): 562-564.  
Li XZ, Ma CH, Yang R, et al. Analysis of the relationship between endometriosis and spontaneous abortion[J]. Reprod Contracept, 2011, 31(8): 562-564.

[9] 吴彤华,尹彪,朱元昌,等. 辅助生殖和自然妊娠中早期自然流产胚胎染色体数目异常的研究[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(10): 658-664. DOI: 10.7669/j.issn.0253-357X.2013.10.0658.  
Wu TH, Yin B, Zhu YC, et al. Study on fetal chromosome numerical abnormalities in spontaneous abortion during the first trimester following assisted reproductive technology and natural conception[J]. Reprod Contracept, 2013, 33(10): 658-664. DOI: 10.7669/j.issn.0253-357X.2013.10.0658.

[10] Serra A, Brahe C, Millington Ward A, et al. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction[J]. Am J Med Genet, 1990, 7: 162-168.

[11] 梁珊珊,潘家坪,滕晓明. 辅助生殖治疗中 9 号染色体倒位的临床意义[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(5):453-455. DOI: 10.7669/j.issn.0253-357X.2013.07.0453.  
Liang SS, Pan JP, Teng XM. Outcome of reproductive treatment to the inversion of chromosome 9 infertile patient[J]. Reprod Contracept, 2013, 33(5): 453-455. DOI: 10.7669/j.issn.0253-357X.2013.07.0453.

[12] Jeong SY, Kim BY, Yu JE. *De novo* pericentric inversion of chromosome 9 in congenital anomaly[J]. Yonsei Med J, 2010, 51(5):775-780. DOI: 10.3349/ymj.2010.51.5.775.

[13] Green MP, Mouat F, Miles HL, et al. Phenotypic differences in children conceived from fresh and thawed embryos in *in vitro* fertilization compared with naturally conceived children [J]. Fertil Steril, 2013, 99(7): 1898-1904. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.02.009.

(收稿日期:2017-11-14)

(本文编辑 张谦)