doi:10.11659/jjssx.02E019005

·综 述·

人类辅助生殖技术的研究进展

付景丽,丁秋霞,黄 燕 (陆军军医大学第二附属医院生殖与遗传医学中心,重庆 400037)

[摘 要] 人类辅助生殖技术(ART)包括人工授精(AI)和体外受精-胚胎移植(IVF-ET)及其衍生技术。近年不孕不育患者比例有升高趋势,此外因二胎政策的开放,有生育需求的高龄患者比例有所增加,ART 技术现已成为治疗不孕不育患者的重要方式。随着科技的发展,许多衍生技术的应用,包括卵母细胞的体外成熟培养、时差成像系统、精子微量冷冻、代谢组学评估胚胎发育潜能等,弥补了 ART 技术的不足,使 ART 技术更完善,更准确地满足患者的需求。但是,新技术的应用仍然存在一些问题,在临床实施过程中,需要不断改进、更新和完善。

[关键词] 人类辅助生殖技术;人工授精;体外受精-胚胎移植

[中图分类号] R321.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-02-02

Research progress of assisted reproductive technology

FU Jing-li, DING Qiu-xia, HUANG Yan (Reproductive and Genetic Medicine Center, Second Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Human assisted reproductive technology (ART) includes artificial insemination (AI) and in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) and their derivatives. In recent years, the proportion of infertility patients has increased. In addition, with the opening of the second child policy, the proportion of elderly patients with fertility needs has increased. ART technology has become an important way to treat infertility patients. With the development of science and technology, many derivative technologies, including oocyte maturation in vitro, time-laps system, sperm micro-freezing, metabolomics assessment of embryonic development potential, make up for the shortcomings of ART technology, which make ART technology more perfect, and more accurately meet the needs of patients. However, there are still some problems in the application of new technology. In the actual implementation process, the new technology need to constantly improve, update and complete.

Keywords: assisted reproductive technology; artificial insemination; in-vitro fertilization embryo transfer

人类辅助生殖技术(assisted reproductive technology,ART)是运用医学技术和方法对配子、合子、胚胎进行人工操作,以达到受孕目的的技术[1]。ART 包括人工授精(artificial insemination,AI)和体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer,IVF-ET)及其衍生技术,俗称“试管婴儿”技术。世界上首例试管婴儿诞生于 1978 年 7 月 25 日;10 年后,中国的第 1 例试管婴儿于 1988 年 3 月 10 日在北京大学第三医院诞生。随着我国二胎政策的开放,越来越多的高龄夫妇有了生育二胎的意愿,但近年来因高龄及各种原因导致的不孕不育症发病率逐步上升,约为 15%[2]。ART 技术已成为治疗不孕不育的重要方式。随着科学技术的不断发展与提高,IVF-ET 技术的临床妊娠率也在稳步升高,胚胎植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing,PGT)已成为切实可行的方式。生殖生物学新方法、新技术的不断研发与优化,帮助更多不孕不育患者实现了生育梦想。

1 人类辅助生殖技术现状

人类辅助生殖技术经过 40 年的发展,从常规的助孕技术,包括人工授精、体外受精-胚胎移植、卵胞浆内单精子注射,到日渐成熟的植入前遗传学诊断/筛查,以及卵母细胞质置换、线粒体移植等新技术,均在不孕症治疗和杜绝生育缺陷方面取得显著成果。新技术的出现,对不断弥补 ART 技术助孕领域的空白、进一步提高成功率、让更多的不孕不育患者能够拥有一个健康的后代等具有重要意义。

1.1 人工授精技术

人工授精是采用人工方式将优化处理后的精液注入女性子宫、宫颈、阴道内或输卵管内使卵子授精、女方受孕的一种方法。根据精液来源不同,人工授精分为夫精人工授精(artificial insemination by husband semem,AIH)和供精人工授精(artificial insemination by

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81502690)

[通信作者] 黄 燕,E-mail:286894630@qq.com

donor semem,AID)。宫腔内人工授精(intrauterine insemination,IUI)为较常用的方法。这种方法相对简单,治疗周期较短,费用低,患者无需忍受手术痛苦,精子与卵子的结合以及胚胎的发育都是在患者体内完成。夫精 IUI 的成功率在 13.5% 左右,而供精 IUI 的成功率略高,约 22.3%[3-4]。

1.2 体外受精-胚胎移植及其相应衍生技术

1.2.1 体外受精-胚胎移植技术 俗称"第一代试管婴儿"技术。该技术主要应用于女性某些生殖系统疾病导致的不孕症。实施这种方法首先要求男性精子必须达到一定条件。生殖医生会根据患者的个人情况,采取针对性的促排卵方案,利用药物使一批卵子同步生长并发育成熟;然后在 B 超引导下,经阴道穹窿穿刺,将卵子取出,与丈夫优化后的精子放置在培养皿中共孵育;经过一段时间培养后发育为受精卵,后逐步卵裂发育为胚胎;再选择优质胚胎放置于女方的子宫中,最终发育为胎儿。根据精子和卵子的孵育时间不同,可分为常规体外受精(过夜受精)和短时体外受精(4~6 h)。英国 Robert G. Edwards 博士通过该技术帮助不孕患者得到了世界上第 1 例"试管婴儿",并获得了诺贝尔生理学或医学奖。随着超促排卵技术的不断优化和胚胎实验室全面质量管理体系日渐成熟,IVF-ET 的成功率已经超过了 50%[5-7]。

1.2.2 卵胞浆内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection,ICSI) 俗称"第二代试管婴儿"技术。ICSI 解决了男性因重度或极度少、弱、畸精症导致的不育问题。此外,当体外受精-胚胎移植技术无法使卵母细胞受精时,还可再采取 ICSI 技术,使卵母细胞受精,获得胚胎,最终获得后代。1992 年,Palermo 等[8]在显微镜下将单个精子直接注射到卵细胞胞浆内,并获得世界上首例卵细胞浆内单精子注射婴儿。若男方为无精子症,或手淫取精没有取到活精子,可以通过睾丸穿刺技术进行精子采集,借助 ICSI 技术就可能获得胚胎,得到自己的后代。在此过程中男方需要进行外周血检查,排查染色体核型异常的情况,避免遗传病的发生,但即使如此,ICSI 技术也不能完全排除子代患有遗传疾病的可能。

1.2.3 胚胎植入前遗传学检测 俗称"第三代试管婴儿"技术。该技术是对体外受精-胚胎移植技术和卵胞浆内单精子注射技术的进一步补充,解决了因染色体异常导致的不孕不育,或基因突变导致胎儿缺陷的问题。检测方法是通过活检操作获取早期胚胎的部分细胞,再进行遗传学分析、筛查,将从基因层面优选后的胚胎移植入女方宫腔,从而有效地防止遗传病患儿或有缺陷胎儿的妊娠及出生,这对胎儿及其家庭有着极为重要的意义。胚胎植入前遗传学检测主要包括两种策略,即胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis,PGD)和胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening,PGS)。两者均需要通过胚胎活检获得检测样本。胚胎活检可在卵裂期或囊胚期进行,目前主流方法是在囊胚期进行活检,该方法具有较高的检测准确率和对胚胎损伤小的特点[9-12]。PGD 适应证包括单基因病、X-连锁遗传病、HLA 配型等;而 PGS 适用于反复流产、反复移植失败和高龄妇女等人群。PGT 发展初期多使用的方法有聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)和荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization,FISH);PCR 主要用于单基因遗传疾病的诊断,FISH 则主要用于染色体异常和 X-连锁遗传病[13-14]。目前应用于临床的 PGT 方法有:比较基因组杂交(comparative genomic hybridization,CGH)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)芯片、二代测序(next generation sequencing,NGS)技术、全基因组扩增(whole genome amplification,WGA)及其下游技术。2016 年 4 月,国内研究团队报道并验证了一种新的无创染色体筛查方法(noninvasive chromosome screening,NICS)。该方法基于对游离到囊胚培养液中的 DNA 进行基因测序,通过 MALBAC 全基因组扩增后,再进行高通量测序,证实了囊胚培养液与对应胚胎的染色体异常检测结果具有高度一致性[15]。该方法避免了以往活检胚胎细胞产生的胚胎损伤,具有高度的准确性和无创性,显著增加了安全性和在临床中广泛应用的前景。植入前遗传学检测新方法在临床中的成功应用,推动着 PGT 技术在人类辅助生殖技术中的迅速发展,为阻断出生缺陷起着重要的作用。

1.2.4 卵母细胞胞浆置换技术 俗称"第四代试管婴儿"技术,该技术主要适用于具有排卵功能,但卵子质量不佳的女性。通过显微操作技术将卵子的卵胞浆与另一女性的健康卵胞浆置换,以增强卵子活力,使受孕成功率提高[16-17]。2016 年 Zhang 等[18]通过原核移植的方法,使连续两次 IVF-ET 助孕治疗中发生胚胎停育的患者获得了可用胚胎,最终妊娠。由于供卵者卵细胞浆中线粒体 DNA 被带入受卵细胞,引起全世界的广泛争议,在没有明确该技术的确切影响之前应该谨慎,多数国家包括我国目前禁止该技术的临床应用。

2 人类辅助生殖技术相关衍生技术的发展与应用

ART 相关衍生技术包括胚胎实验室内不成熟卵

子体外培养成熟、时差成像系统、微量精子冷冻、代谢组学评估胚胎发育潜能等技术,目前均相继得以发展并应用。

2.1 不成熟卵体外培养成熟(in vitro maturation, IVM)技术

IVM 技术是模拟体内卵母细胞生长环境,从卵巢获取未成熟的卵母细胞,体外培养成熟,用于体外受精-胚胎移植,该技术克服了控制性超排卵药物诱发的卵巢过度刺激综合征和激素依赖性肿瘤发生的风险,同时可用于卵巢反应低下的 ART 患者和肿瘤患者等人群的卵巢生殖能力保存[19-21]。

2.2 时差成像系统

时差成像系统是在培养箱内安装内源性摄像装置,对每一枚胚胎间隔一定时间自动进行摄像。此系统将培养箱与成像系统相结合,在培养箱内即可完成对胚胎的摄像,同时保证了胚胎稳定的生长环境,避免了传统方法对胚胎造成干扰。通过每个时间点不同焦距采集数张照片,获得不同层面的影像,对胚胎的观察更加快速、细致、全面。时差成像系统可以记录胚胎发育过程的动态变化,改进了胚胎选择的方法,可提高临床妊娠率[22]。时差成像系统的应用还可以避免存在异常分裂事件的胚胎被当成可用胚胎[23]。

2.3 微量精子冷冻技术

对于一些不孕不育夫妇,辅助生殖治疗所用精子标本十分珍贵。为了避免反复取精对男性生殖器官造成损伤,对取精困难的患者通过手术获得附睾或者睾丸精子,且近年来采用微量精子冷冻方法,可以有效保存极少量的精子。微量冷冻方式主要有:液滴玻璃化冷冻、冷冻环玻璃化冷冻、透明带包装冷冻、塑料毛细管包装冷冻等[24]。

2.4 代谢组学评估胚胎发育潜能

研究表明胚胎代谢与胚胎发育潜能相关[25-27]。代谢组学是一种新兴、无创的胚胎潜能预测技术,通过检测培养液中胚胎的代谢产物,再结合胚胎形态学评级进行优选胚胎。胚胎代谢物主要包括丙酮酸、葡萄糖、脂肪酸、氨基酸等。检测由于细胞破损而泄露的代谢物,能够客观、无创、全面地反映胚胎的生长发育情况,可作为无创胚胎质量评估系统的内容之一。

3 人类辅助生殖技术带来的一些问题

虽然辅助生殖技术对于家庭的幸福与社会的稳定有着非常重要的意义,但随着技术的广泛应用,也带来法律、道德、伦理、传染病和遗传病等一系列问题。实施辅助生殖技术时,如果机构对于精子没有严格的把关,精子的来源不明确,就无法保证胎儿质量,这对于辅助生殖技术的发展会造成极大的影响。试管婴儿也会增加人身风险,如多胎妊娠的产妇会出现诸多并发症,其早产发生率以及围产期死亡率均呈现出较高的水平。即使是足月单胎,低出生体重儿和极低出生体重儿发生率都较高,为自然妊娠婴儿的 2 倍多[28-30]。有较多动物实验研究发现 ART 相关配子,胚胎体外操作或培养会引起子代表观遗传修饰改变[31]。另外,试管婴儿的成本较高,对普通家庭是极大的开销。

4 结论

人类辅助生殖技术对维护家庭和社会的发展有着极为重要的作用,该技术不断揭示人类在生育发展过程中的奥秘,使人类能够主动控制和调节生育过程。ART 在不孕症治疗中的应用也越来越广泛,特别是对特殊人群如卵巢储备功能不良,需要进行 PGD 的患者,临床有效性逐渐增大。然而人类辅助生殖技术仍不能完全解决不孕不育患者生育健康孩子的问题。为了更好地实现试管婴儿技术的应用效果,尚待更大规模样本的随访、观察、统计;同时还应加强法制建设,将辅助生殖技术的整个应用过程纳入法制化轨道中,在预先制定的规则下实施,并不断规范,真正实现优生优育的目标。

[参考文献]

[1] 乔 杰. 人类辅助生殖技术新进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2008,24(1):33-34. doi:10.3969/j.issn.1005-2216.2008.01.014.

[2] 马黔红. 辅助生殖技术的新进展[J]. 中国计划生育和妇产科,2017,9(1):4-7. doi:10.3969/j issn.1674-4020.2017.01.02.

[3] Merviel P,Heraud MH,Grenier N,et al. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination:an analysis of 1038 cycles and a review of the literature[J]. Fertil Steril,2010,93(1):79-88. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.09.058.

[4] 张 玉,甄英贤,李晓茜,等. 影响供精人工授精临床妊娠率的多因素分析[J]. 生殖医学杂志,2018,27(8):765-769. doi:10.3969/j.issn.1004-3845.2018.08.014.

[5] Mehtap P,Gurkan B,Hakan Y. Best protocol for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive technologies:fact or opinion?[J]. Semin Reprod Med,2014,32(4):262-271. doi:10.1055/s-0034-1375178.

[6] 胡琳莉,孙莹璞. 辅助生殖临床技术的全面质量管理[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2018,34(6):581-583. doi:10.19538/j.fk2018060102.

[7] 廉 颖,刘 平,乔 杰. 辅助生殖技术实验室的质量控制体系. 中华生殖与避孕杂志,2018,38(8):636-639. doi:10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2018.08.007.

[8] Palermo G,Joris H,Devroey P,et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte[J]. Lancet,1992,340:

17 - 18. doi. org/10. 1016/0140 - 6736(92)92425 - F.

[9] Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis[J]. Hum Reprod, 2012,27(1):97 - 105. doi:10. 1093/humrep/der382.

[10] Scott RT, Upham KM, Forman EJ, et a1. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial[J]. Fertil Steril,2013,100(3):624 - 630. doi:10. 1016/j. fertnstert. 2013. 04. 039.

[11] Xu K, Montag M. New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? [J]. Semin Repro Med,2012,30(4):259 - 266. doi: 10. 1055/s - 0032 - 1313905.

[12] Huang A, Adusumalli J, Patel S, et al. Prevalence of chromosomal mosaicism in pregnancies from couples with in fertility[J]. Fertil Steril, 2009,91(6):2355 - 2360. doi:10. 1016/j. fertnstert. 2008. 03. 044.

[13] Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, et al. Technical update: preimplantation genetic diagnosis and screening[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2015,70(9):557 - 558. PMID:26168107.

[14] Chen CK, Yu HT, Soong YK, et al. New perspectives on preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening[J]. Taiwan J Obstet Gynecol,2014,53(2):146 - 150. doi:10. 1016/j. tjog. 2014. 04. 004.

[15] Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2016,113(42):11907 - 11912. doi:10. 1073/pnas. 1613294113.

[16] Gómez-Tatay L, Hernández-Andreu JM, Aznar J. Mitochondrial modification techniques and ethical issues[J]. J Clin Med,2017,6(3):25 - 27. doi:10. 3390/jcm6030025.

[17] Lane A, Nisker J. "Mitochondrial Replacement" technologies and human germline nuclear modification[J]. J Obstet Gynaecol Can,2016, 38:731 - 736. doi:10. 1016/j. jogc. 2016. 03. 002.

[18] Zhang J, Zhuang GL, Zeng Y, et al. Pregnancy derived from human zygote pronuclear transfer in a patient who had arrested embryos after IVF[J]. Reprod Biomed Online, 2016, 33(4): 529 - 533. doi: 10. 1016/j. rbmo. 2016. 07. 008.

[19] Eppig JJ, Brien MJ, Wigglesworth K, et al. Effect of in vitro maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring[J]. Human Reproduction, 2009, 24: 922 - 928. doi: 10. 1093/humrep/den466.

[20] Kavrut M, Kahrama S. Comparison of two doses of recombinant hcg for oocyte maturation in obese women (BMI > or = 30) undergoing assisted reproductive techniques[J]. Ginekol Pol,2013,84(7):603 - 608.

[21] Filali M, Hesters L, Fanchin R, et al. Retrospective comparison of two media for in-vitro maturation of oocytes[J]. Reprod Biomed Online, 2008,16(2):250 - 256.

[22] 王世凯,薛林涛,何 冰,等. 胚胎动力学参数与胚胎发育潜能关系的初步研究[J]. 中国临床新医学,2016,9(9):763 - 766. doi: 10. 3969/j. issn. 1674 - 3806. 2016. 09. 01.

[23] 刘 丽,徐凤琴,王媛媛,等. 应用时差成像技术选择优质胚胎移植[J]. 中国妇幼保健,2016,31(20):4227 - 4229. doi:10. 7620/zgfybj. j. issn. 1001 - 4411. 2016. 20. 47.

[24] 马 超,胡明广,王赞滔,等. 封闭式薄片法对人类微量精子超快速玻璃化冷冻的研究[J]. 现代妇产科进展,2015,24(10):762 - 764. doi:10. 13283/j. cnki. Xdfckjz. 2015. 10. 011.

[25] Pfeifer S, Fritz M, McClure R, et al. Multiple gestation associated with infertility therapy: an American Society for Reproductive Medicine Practice Committee opinion[J]. Fertil Steril, 2012 ,97(4):825 - 834. doi:10. 1016/j. fertnstert. 2011. 11. 048.

[26] 宋 蕊,王树玉. 代谢组学在预测胚胎发育潜能中的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,24(10):7 - 9. doi:10. 13404/j. cnki. cjbhh. 2016. 10. 003.

[27] 赵庆红,杨 著. 代谢组学研究及其在胚胎早期发育潜能中的应用[J]. 生殖医学杂志,2013,22(6):468 - 472. doi:10. 3969/j. issn. 1014 - 3845. 2013. 06. 020.

[28] Yin L, Hang F, Gu LJ, et al. Analysis of birth defects among children 3yeaes after conception through assisted reproductive technology in China[J]. Birth defects Res ACI in Mol Teratol,2013,97(11):744 - 749. doi:10. 1002/bdra. 23116.

[29] Chen Y, Wu L, Zhang W, et al. Delivery modes and pregnancy outcomes of low birth weight infants in China[J]. J Perinatol,2016,36(1):41 - 46. doi:10. 1038/jp. 2015. 137.

[30] 李 静,毛宝宏,李亚梅,等. 辅助生殖技术治疗后单胎出生低体重儿风险性研究[J]. 中国妇幼保健,2018(2):391 - 394. doi:10. 7620/zgfybj. j. issn. 1001 - 4411. 2018. 02. 51.

[31] Trapphoff T, ElHajj N, Zechner U, et al. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified preantral follicles[J]. Hum Reprod,2010, 25:3025 - 3042. doi:10. 1093/humrep/deq278.

(编辑:陈庆利)