

论著·临床研究

人类辅助生殖技术受孕的稽留流产患者绒毛组织染色体异常结果分析

杨明雪, 翟俊英, 钮红丽

(南阳市第一人民医院生殖医学科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的 分析不同辅助生殖技术助孕的稽留流产患者绒毛组织染色体异常结果。方法 选取 2019 年 7 月至 2023 年 7 月该院收治的接受辅助受孕的稽留流产患者 260 例作为辅助受孕组, 再根据接受的不同辅助生殖技术分为体外受精(IVF)组(135 例)、人工授精(AIH)组(45 例)和卵胞质内单精子显微注射(ICSI)组(80 例), 并选取自然受孕的稽留流产患者 42 例作为对照组, 采集各组患者绒毛组织, 采用高通量测序法进行绒毛组织染色体检测, 观察各组患者染色体拷贝数变异(CNV)和数目异常情况。结果 辅助受孕组患者染色体异常检出率、CNV 异常率、数目异常类型与对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。IVF 组患者染色体异常检出率、CNV 异常率、数目异常类型与 AIH 组、ICSI 组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。辅助受孕组患者中染色体数目异常者三体中以 16/22/21-三体异常染色体为主, 双三体异常以 48, XX+3, +18, 48, XXY, +21 为主, X 单体异常均为 45, X; 三倍体异常患者中 5 例患者为 69, XXY, 2 例患者为 69, XXX。各组患者染色体异常核型分布情况比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 辅助生殖技术不会增加染色体异常风险, 且异常染色体核型分布情况与辅助生殖技术方式无关, 可根据患者的整体情况进行辅助受孕方式的选择。

[关键词] 辅助生殖技术; 稽留流产; 绒毛组织; 染色体

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.09.017

中图法分类号: R714.21

文章编号: 1009-5519(2024)09-1516-05

文献标识码: A

Analysis of chromosomal abnormalities in villi tissues in patients with missed abortion conceived by human assisted reproductive technology

YANG Mingxue, ZHAI Junying, NIU Hongli

(Department of Reproductive Medicine, Nanyang First People's Hospital, Nanyang, Henan 473000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the chromosomal abnormalities in villus tissue of missed abortion patients with different assisted reproductive techniques. **Methods** A total of 260 missed abortion patients admitted to the hospital from July 2019 to July 2023 who received assisted conception were selected as the assisted conception group. According to the different assisted reproductive techniques, they were divided into the in vitro fertilization(IVF) group(135 cases), the artificial fertilization(AIH) group(45 cases) and the intracytoplasmic sperm injection(ICSI) group(80 cases). And a total of 42 missed abortion patients with natural conception were selected as the control group, and the chorionic tissue of the patients in each group was collected. The chromosome copy number variation(CNV) and abnormal number of chromosomes were observed by high-throughput sequencing. **Results** There was no significant difference in chromosome abnormality detection rate, CNV abnormality rate and number abnormality type between the assisted conception group and the control group($P > 0.05$). There was no significant difference in chromosome abnormality detection rate, CNV abnormality rate and number abnormality type in the IVF group compared with the AIH group and the ICSI group($P > 0.05$). In the assisted conception group, 16/22/21-trisomy abnormalities were predominant in the patients with abnormal chromosome numbers, while ditrisomy abnormalities were predominant in 48, XX+3, +18, 48, XXY, +21, and X monomer abnormalities were all 45, X. Among the patients with triploid abnormalities, five patients were 69, XXY and two patients were 69, XXX. There was no significant difference in the distribution of abnormal karyotypes among all the groups($P > 0.05$). **Conclusion** Assisted reproductive technology does not increase the risk of chromosomal abnormalities, and the distribution of abnormal chromosome karyotypes has nothing to do with the assisted reproductive technology method, and the assisted conception method can be selected according to the overall situation of the patient.

[Key words] Assisted reproductive technology; Missed abortion; Villus tissue; Chromosome

自然流产是常见的妊娠并发症,是指妊娠不到 28 周、胎儿体重不足 1 000 g、胎儿及其附属物脱离母体而自然中止者,发生率为 15%左右^[1]。稽留流产是自然流产中的一种特殊类型,指胎儿死亡数天或数周滞留宫腔内未能自然排出者。稽留流产的发生均与胚胎因素、母体因素、环境因素、免疫功能异常等相关,其中以胚胎因素中的染色体异常最为常见,发生率可达 50%以上^[2-4]。故而对稽留流产的绒毛组织进行染色体检测对再次妊娠具有重要的指导意义。近年来,随着辅助生殖技术的不断发展,衍生出了多种辅助技术,如体外受精(IVF)、人工授精(AIH)、卵胞质内单精子显微注射(ICSI)等,均可辅助不孕症和复发性流产患者受孕,为难以妊娠的家庭提供了帮助,目前在临床上也被广泛应用^[5]。但近年来也有研究表明,辅助生殖技术有 25%~50%的流产率^[6-7],引发不少学者关注了辅助生殖技术的安全性。目前,虽然有学者进行了相关研究,但对不同辅助生殖技术助孕患者染色体异常结果分析的研究报道尚少见,本研究对辅助生殖技术助孕妊娠稽留流产与自然妊娠稽留流产孕妇的绒毛组织进行了染色体检测,并对不同辅助生殖

技术助孕的稽留流产患者绒毛组织染色体异常结果进行了对比分析,以探讨绒毛染色体异常与辅助生殖技术致妊娠稽留流产的相关性,为临床诊疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 选取 2019 年 7 月至 2023 年 7 月本院收治的接受辅助受孕的稽留流产患者 260 例作为辅助受孕组,再根据接受的不同辅助生殖技术分为体外受精(IVF)组(135 例)、人工授精(AIH)组(45 例)和卵胞质内单精子显微注射(ICSI)组(80 例),并选取自然受孕的稽留流产患者 42 例作为对照组。辅助受孕组患者年龄、自然流产次数、身体质量指数(BMI)、抗苗勒管激素水平与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);辅助受孕组患者不孕年限大于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。IVF 组患者年龄、自然流产次数、BMI、抗苗勒管激素水平与 AIH 组、ICSI 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。本研究经医院伦理会审批通过(伦理批号:20210219)。

表 1 辅助受孕组、对照组患者一般资料比较

组别	n	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	不孕年限 ($\bar{x}\pm s$,年)	自然流产次数[n(%)]			BMI ($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	抗苗勒管激素水平 ($\bar{x}\pm s$,μg/L)
				1 次	2 次	>2 次		
对照组	42	29.57±2.25	1.25±0.29	32(76.19)	7(16.67)	3(7.14)	22.98±2.65	4.75±1.59
辅助受孕组	260	30.21±2.17	2.20±0.19	151(58.08)	66(26.38)	43(16.54)	22.83±2.37	4.33±1.26
t/χ ²	—	1.764	9.441		5.190		0.374	1.928
P	—	0.079	<0.001		0.075		0.708	0.055

注:—表示无此项。

表 2 IVF 组、AIH 组、ICSI 组患者一般资料比较

组别	n	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	不孕年限 ($\bar{x}\pm s$,年)	自然流产次数[n(%)]			BMI ($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	抗苗勒管激素水平 ($\bar{x}\pm s$,μg/L)
				1 次	2 次	>2 次		
IVF 组	135	30.21±2.16	2.19±0.17	89(65.93)	26(19.26)	20(14.81)	22.73±2.32	4.36±1.21
AIH 组	45	30.23±1.98	2.21±0.29	21(46.67)	16(35.56)	8(17.78)	22.82±2.28	4.28±1.16
ICSI 组	80	30.19±2.32	2.20±0.15	41(54.25)	24(30.00)	15(18.75)	22.99±2.53	4.31±1.39
F/Z/χ ²	—	0.005	0.205		5.797		0.300	0.084
P	—	0.995	0.815		0.055		0.741	0.920

注:—表示无此项。

1.1.2 纳入标准 (1)符合稽留流产诊断标准^[8],且在本院行清宫术;(2)年龄 22~42 岁;(3)孕周 7~12 周;(4)对本研究内容知情了解且签署知情同意书。

1.1.3 排除标准 (1)夫妻一方或双方存在染色体异常;(2)疾病因素所致流产。

1.2 方法

1.2.1 辅助受孕

1.2.1.1 IVF 经促排卵后取优质卵泡,提取男方活

力最强的精子在体外进行受精,体外培育成早期胚胎,移植患者子宫内,完成受孕。

1.2.1.2 AIH 在体外对男方精液进行加工和优化后去除杂质及不活跃的精子,在排卵期注射至患者宫腔内,进行自然受孕。

1.2.1.3 ICSI 经促排卵后取优质卵泡,提取男方活力最强的精子,利用显微操作技术将精子注射到卵细胞的细胞质内,使卵子受精,体外培育成早期胚胎,

移植患者子宫内,完成受孕。

1.2.2 染色体测序 在无菌条件下采集整个绒毛组织,尽可能去除组织周围血块,以免对母体细胞造成污染,用无菌生理盐水反复冲洗干净后放置在无菌的容器中送检。采用高通量测序法(NGS)进行染色体检测。采用 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取:取 5~10 g 绒毛组织,加入蛋白酶 K 进行血细胞裂解,去除细胞内其他成分,再用 1 根吸附柱来吸附 DNA;重复清洗(3 次),添加洗脱剂,在离心试管中采集 DNA,用紫外线(UV)-光分光光度计计算 DNA 的总量,保证其浓度在 30 μg/L 以上。将样品 DNA 打碎分割至 250 bp 大小的片段。末端修复为在 3'端添加 A 碱基,使 DNA 片断可与 3'端添加 T 碱基的特定接合点结合,利用磁性微球筛选出需要回收的片断。末端带连接物的 DNA 片段采用聚合酶链反应技术进行扩增(10 个循环)。通过 Agilent 2100 BioAnalyzer 和实时荧光定量聚合酶链反应对所建立的文库进行验证后将一定数量的文库以等价数量进行混合,并在 BGISEQ-500 上进行测序。在此基础上利用 SOAP 比较软件,将测序得到的各测序碱基与人类基因组参考序列进行比对,并利用比较得到的测序数据对染色体异常进行分析。结果判读为染色体异常主要有单倍体、三体、四体等,当发现有染色体丢失或重复的片段在 4 Mb 以下时则可判断为染色体丢失/复制,并记录其拷贝数变异(CNV)和数目异常。

1.3 统计学处理 双人核对进行数据整理和录入,应用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率或构成比表示,采用独立样

本 *t* 检验、单因素方差分析、Bonferroni 检验、非参数检验、 χ^2 检验、Fisher 确切概率法等。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 辅助受孕组、对照组患者染色体异常检出率、异常类型比较 辅助受孕组患者染色体异常检出率 [57.69% (150/260)] 与对照组 [52.38% (22/42)] 比较,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.416, P = 0.519$)。辅助受孕组、对照组患者 CNV 异常率、数目异常类型比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.2 不同辅助生殖技术助孕组患者染色体异常检出率、异常类型比较 IVF 组染色体异常检出率 [55.56% (75/135)] 与 AIH 组 [55.56% (25/45)]、ICSI 组 [62.50% (50/80)] 比较,差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 1.094, P = 0.579$)。不同辅助生殖技术助孕组患者 CNV 异常率、数目异常类型比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),均以三体异常染色体多见。见表 4。

2.3 绒毛组织染色体 CNV 异常分布情况 IVF 组患者中 7 例 CNV 异常患者分别为 3 例 del(15)(q25.3q26.3)dup(17)(q25.1q25.3)、2 例 del(15)(q25.3q26.3)dup(8)(p23.3p12)、2 例 del(7)(p22.3p11.2)dup(7)(q11.21q36.3); AIH 组患者中 1 例 CNV 异常患者为 del(15)(q25.3q26.3)dup(8)(p23.3p12); ICSI 组患者中 4 例 CNV 异常建筑分别为 3 例 del(8)(p23.3p11.21)(p11.21924.3)、1 例 del(15)(q25.3q26.3)dup(8)(p23.3p12)。IVF 组患者 CNV 异常分布情况与 AIH 组、ICSI 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 辅助受孕组、对照组患者染色体异常类型比较[n(%)]

组别	n	CNV 异常	数目异常			
			三体	双三体	X 单体	三倍体
对照组	42	2(4.76)	15(35.71)	1(2.38)	3(7.14)	1(2.38)
辅助受孕组	260	12(4.62)	90(34.62)	17(6.54)	24(9.23)	7(2.69)
χ^2 /Fisher 确切概率法	—	—	0.019	—	—	—
P	—	1.000	0.890	0.485	1.000	1.000

注:—表示无此项。

表 4 不同辅助生殖技术助孕组患者染色体异常类型比较[n(%)]

组别	n	CNV 异常	数目异常			
			三体	双三体	X 单体	三倍体
IVF 组	135	7(5.19)	42(31.11)	7(5.19)	14(10.37)	5(3.70)
AIH 组	45	1(2.22)	16(35.56)	4(8.89)	3(6.67)	1(2.22)
ICSI 组	80	4(5.00)	32(40.00)	6(7.50)	7(8.75)	1(1.25)
χ^2 /Fisher 确切概率法	—	0.712	1.775	0.932	0.584	—
P	—	0.701	0.412	0.627	0.747	0.686

注:—表示无此项。

2.4 绒毛组织染色体数目异常分布情况 辅助受孕 组患者染色体数目异常患者三体中以 16/22/21-三体

异常染色体为主,分别占 28.89%(26/90)、30.00%(27/90)、13.33%(12/90)。双三体异常以 48,XX+3,+18,48,XXY,+21 为主,占 29.41%(5/17),X 单

体异常均为 45,X;三倍体异常为 5 例 69,XXY、2 例 69,XXX。各组建筑染色体异常核型分布情况比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 5、6。

表 5 绒毛组织染色体三体分布情况[n(%)]

核型	IVF 组(n=42)	AIH 组(n=16)	ICSI 组(n=32)	χ^2 /Fisher 确切概率法	P
47,XX/XY,+22	12(28.57)	7(43.75)	8(25.00)	1.094	0.579
47,XX/XY,+16	15(35.71)	1(6.25)	10(31.25)	5.031	0.081
47,XX/XY,+21	2(4.76)	4(25.00)	6(18.75)	5.367	0.068
47,XX/XY,+15	4(9.52)	1(6.25)	2(6.25)	—	0.878
47,XX/XY,+13	2(4.76)	1(6.25)	1(3.12)	—	1.000
47,XX/XY,+9	1(2.38)	0	2(6.25)	—	0.582
47,XX/XY,+18	3(7.14)	0	2(6.25)	—	0.711
47,XX/XY,+7	2(4.76)	1(6.25)	0	—	0.405
47,XX/XY,+3	1(2.38)	1(6.25)	1(3.12)	—	0.765

注:—表示无此项。

表 6 绒毛组织染色体双三体分布情况[n(%)]

核型	IVF 组(n=7)	AIH 组(n=4)	ICSI 组(n=6)	Fisher 确切概率法	P
48,XXY,+21	2(28.57)	1(25.00)	2(33.33)	—	1.000
48,YYY,+18	1(14.29)	0	2(33.33)	—	0.568
48,XX,+4,+14	2(28.57)	1(25.00)	1(16.67)	—	1.000
48,XX,+3,+18	2(28.57)	2(40.00)	1(16.67)	—	0.661

注:—表示无此项。

3 讨论

胚胎或胚胎染色体异常是造成胚胎停止、流产的主要因素^[9]。NGS 是近年来出现的一种快速、准确、灵活的新型检测技术,能对染色体数量异常及 100 kb 以上的染色 CNV 进行检测,相对于传统染色体核型分析技术,具有更低的成本、更少的时间、更高的分辨率及检测成功率,因而在全国各地大型医院中得到广泛使用^[10-11]。

随着临床辅助受孕技术的不断发展,帮助了无数不孕家庭顺利妊娠,得到了临床医护人员及患者的认可。目前,已有多种助孕技术为患者提供了更多的选择和妊娠机会,但不同的辅助生殖技术是否对稽留流产的发生有影响尚未明确。本研究利用 NGS 对不同妊娠方式稽留流产患者的绒毛组织进行了染色体检测,旨在为临床诊疗提供参考依据。

本研究结果显示,对照组、辅助受孕组患者染色体异常检出率分别为 52.38%、57.69%,表明染色体异常是导致流产发生的主要因素。因此,对复发性流产患者应建议其进行染色体检测,以明确流产因素,指导妊娠。本研究辅助受孕组患者染色体异常检出率与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示辅助受孕并不增加染色体异常的风险,与既往研究结论一致^[12-13]。本研究进一步对染色体异常情况进行分析结果显示,辅助受孕组患者 CNV 异常率、数目异

常类型与对照组比较,差异也均无统计学意义($P>0.05$),再次证实辅助受孕并不增加染色体异常的风险。异常的染色体非整倍体主要是由卵细胞在首次减数分裂中的分裂错误所致^[14],而辅助生殖技术在体位进行配子选择,可有效降低染色体发生异常的风险^[15],因此,虽然在流产风险方面高于自然受孕者,但并不增加染色体异常的风险。

本研究结果显示,IVF 组、AIH 组、ICSI 组患者染色体异常检出率分别为 55.56%、55.55%、61.90%,IVF 组患者染色体异常检出率与 AIH 组、ICSI 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),IVF 组患者 CNV 异常率、数目异常类型与 AIH 组、ICSI 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),表明无论使用何种辅助生殖技术均不增加染色体异常的风险,有研究表明,ICSI 可能会增加染色体异常发生率^[16]。可能是由于 ICSI 直接将精子注射至卵浆中以辅助精卵结合,达到受孕的目的,在此期间未对配子进行高度选择,易增加染色体异常发生率。本研究结果显示,ICSI 组患者染色体异常率最高,但与其他 2 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),与上述研究结果有差异,可能是由于样本量过少的原因,也可能确无影响,今后仍需深入研究。

本研究结果显示,辅助受孕组患者绒毛组织染色体异常主要以数目异常为主,以染色体三体居多,16、

22、21-三体异常多见,与既往研究结果相吻合^[17-19]。其中 16-三体占比最大(28.89%),大部分的非整倍体均会造成细胞功能的紊乱,常常不能形成有功能的囊胚,进而造成胚胎早期死亡,通常在孕周 12 周会终止妊娠^[20]。只有少数非整倍体,如 21-三体等可继续发育至足月分娩,但会存在智力障碍、发育异常等表现^[21]。本研究结果也显示,稽留流产胚胎组织中检测出的 X 单体异常所占比例也较高,染色体核型均为 45,X,也称为 Turner 综合征,多见于女性胎儿,此型胎儿流产风险较高,但也有概率可发育至足月分娩,但因缺乏 X 染色体,导致单倍剂量不足,不仅影响正常生理发育,对其孕育功能也具有较大影响,其自然流产率和死胎率均较高,且对子代患染色体畸变的风险率也高,继而说明染色体检测在妊娠过程中的重要性。本研究结果显示,各组患者异常染色体核型分布情况比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),再次说明辅助生殖技术不增加染色体异常的风险,且异常染色体核型分布情况与辅助生殖技术方式无关。

综上所述,辅助生殖技术不增加染色体异常的风险,且异常染色体核型分布情况与辅助生殖技术方式无关,可根据患者的整体情况进行辅助受孕方式的选择。

参考文献

[1] 张建林,张俊荣,杨益梅,等. 226 例早期自然流产绒毛组织的细胞遗传学分析[J]. 中国妇幼保健,2018,33(17):3958-3960.

[2] CHU J J,DEVALL A J,BEESON L E, et al. Mifepristone and misoprostol versus misoprostol alone for the management of missed miscarriage (MifeMiso): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2020, 396(10253):770-778.

[3] 孙诗雨,陈小丽,王晓娅,等. 孕早期稽留流产绒毛细胞遗传学分析[J]. 检验医学与临床,2022,19(17):2385-2388.

[4] 黄晓珍,刘明星,许培,等. 早期胚胎停育患者中绒毛染色体异常的相关因素分析[J]. 实用医学杂志,2020,36(21):2937-2941.

[5] 田莉峰,夏雷震,伍琼芳. 体外受精/卵胞质内单精子显微注射-胚胎移植早卵泡期长效方案助孕最佳获卵数的探索[J]. 中华生殖与避孕杂志,2019,39(10):797-802.

[6] 邢慧琴,李艳梅,孔庆萍,等. 辅助生殖技术治疗后自然流产相关因素分析探究[J]. 山西医药杂志,2018,47(22):2687-2688.

[7] 张孝东,邓成艳,黄学锋,等. 中华医学会生殖医学分会:2019 年辅助生殖技术数据报告[J]. 生殖医学杂志,2022,31(8):1015-1021.

[8] 谢幸,苟文丽. 妇产科学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社,2018:71-72.

[9] 王游声,张翠翠,蔡婵慧,等. 高龄孕妇年龄与胎儿染色体异常的相关性分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2021,38(1):96-98.

[10] 闫静,刘玉环. 高通量基因测序技术在稽留流产遗传学检测中的应用[J]. 中国医刊,2021,56(12):1357-1360.

[11] XU J,CHEN M,LIU Q Y, et al. Detecting trisomy in products of conception from first-trimester spontaneous miscarriages by next-generation sequencing (NGS) [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(5):e18731.

[12] 刘丽,邸建永,王媛媛,等. 辅助生殖技术患者孕早期流产绒毛染色体异常分析[J]. 实用妇产科杂志,2018,34(11):868-870.

[13] 荆霞,马天仲,李云清,等. 借助辅助生殖技术妊娠的不孕症早期流产患者与自然妊娠早期流产患者绒毛染色体异常核型比较[J]. 山东医药,2019,59(24):27-30.

[14] 聂辉,张译文,李佳宁,等. 减数分裂联合复合体异常与不孕不育相关性研究进展[J]. 遗传,2021,43(12):1142-1148.

[15] VIOTTI M. Preimplantation genetic testing for chromosomal abnormalities: Aneuploidy, mosaicism, and structural rearrangements [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(6):602.

[16] 慕铭坤,孙思敏,郑威,等. 辅助生殖技术助孕女性稽留流产绒毛组织各型染色体异常发生率的研究[J]. 中华生殖与避孕杂志,2021,41(6):538-542.

[17] 王珺,陈书强,高玲霞,等. 1 317 例早期流产患者绒毛染色体检测结果分析[J]. 生殖医学杂志,2019,28(1):7-11.

[18] 辛淑文,王晓斌. 高通量测序技术检测自然流产绒毛样本的染色体拷贝数变异情况[J]. 中华生殖与避孕杂志,2018,38(10):842-846.

[19] 龙则平,邓波,陈玉礼. 孕早期稽留流产绒毛染色体异常结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2020,28(8):952-953.

[20] 曾秋伊,朱素优. 绒毛染色体核型分析在产前诊断及自然流产中的临床应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2019,27(6):679-681.

[21] 孙永清,吴青青,阴赆宏,等. 孕 11+0~13+6 周颜面部超声指标筛查 21-三体综合征胎儿的研究进展[J]. 中华超声影像学杂志,2022,31(1):85-90.