

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.009

ART 患者早期流产组织染色体异常及相关因素分析*

王 珺 陈书强 赵 男 李 丽 张亨德 李 懋 李 博[△]

(空军军医大学唐都医院妇产科生殖医学中心 陕西 西安 710038)

摘要 目的:分析 ART 患者早期流产组织染色体异常及其相关影响因素。**方法:**回顾性分析 2013-2017 年 ART 患者行早期流产组织染色体检查的 409 例样本,分析胚胎染色体非整倍性发生及其与女方年龄、不孕年限、不孕因素、促排卵指标之间的关系。**结果:**ART 流产患者中,流产组织染色体非整倍性发生率为 57.46%,发生频次以 16 三体占比最高(23.95%),其次是 22 三体(13.45%)及 Turner(9.24%)。流产组织染色体非整倍性患者平均年龄高于染色体整倍性患者($P<0.001$)。16 三体组患者年龄低于 22 三体($P<0.01$)及 Turner 组($P<0.05$)。16 三体组患者平均 Gn 使用量低于 22 三体组($P<0.05$)。16 三体组患者移植 15 天血 HCG 值低于 22 三体($P<0.05$)及 Turner 组($P<0.01$)。**结论:**ART 患者流产组织染色体非整倍性与女方年龄正相关,但 16 三体及 Turner 的发生与女方年龄相关性不大,且 16 三体更容易引发早期流产。

关键词:早期流产;辅助生殖;染色体非整倍性

中图分类号:R-33;R714.21 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)04-647-04

A Study on Chromosome Abnormality and Its Factors in Early Abortion Tissue from ART Patients*

WANG Jun, CHEN Shu-qiang, ZHAO Nan, LI Li, ZHANG Heng-de, LI Mao, LI Bo[△]

(Center for Reproductive Medicine, Department of Gynaecology and Obstetrics, Tang Du Hospital, The air force military medical university, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the chromosome abnormality and its related factors in early abortion tissue from ART patients. **Methods:** A retrospective analysis was performed on the early abortion tissue from 409 cases of ART patients from 2013 to 2017, and the relationship between embryo chromosome aneuploidy and female age, infertility years, infertility factors and ovulation promotion index were analyzed. **Results:** In 409 cases of ART patients, the percentage of embryo chromosome aneuploidy in abortion tissue was 57.46%, in which the top three proportion was 16 trisomy (23.95%), 22 trisomy (13.45%) and Turner (9.24%). The average age of female patients with chromosome aneuploidy embryo was significantly older than that of female patients with chromosome euploidy embryo($P<0.001$). The average age of female patients with 16 trisomy embryo was significantly younger than that of female patients with 22 trisomy embryo ($P<0.01$) and that of female patients with Turner embryo ($P<0.05$). The average gonadotrophindose in patients with 16 trisomy embryo was less than that of patients with 22 trisomy embryo($P<0.05$). The HCG level on the 15th day after transplanting in patients with 16 trisomy embryo undered that in patients with 22 trisomy embryo($P<0.05$) and that in patients with Turner embryo ($P<0.01$). **Conclusions:** The occurrence frequency of embryo chromosome aneuploidy in early abortion tissue from ART patients had a positive correlation with the female age. However, the occurrence frequency of 16 trisomy and Turner embryo showed no correlation. Furthermore, the 16 trisomy embryo was a more likely factor resulting in early abortion.

Key words: Early abortion; ART; Chromosome aneuploidy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R714.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-647-04

前言

近年来,辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的妊娠率得到了极大的提高。但抱婴率却一直徘徊在 20%~30%^[1,2],早期妊娠丢失是 ART 最常见的不良妊娠结局之一,也是低分娩率的主要原因^[3]。有文献报道,在 ART 人群中,

早期流产的发生率为 13.8%-18.6%^[4,5]。流产率高与诸多因素相关,遗传因素尤其是胚胎染色体异常是引起早期流产的主要原因^[6]。本文拟对我中心 ART 患者早期流产组织染色体检测结果做一回顾性分析,探讨 ART 患者早期流产的相关因素,以期早期流产患者的临床遗传咨询提供理论参考。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31640056);陕西省自然科学基金面上项目(2016JM8052)

作者简介:王珺(1980-),硕士,主管技师,主要研究方向:生殖遗传,电话:029-84717132, E-mail:tdhwangjun@163.com

△ 通讯作者:李博,博士,副研究员,主要研究方向:生殖医学,电话:029-84717350, E-mail:lbtn2000@126.com

(收稿日期:2018-06-11 接受日期:2018-07-07)

1 材料和方法

1.1 标本来源

选择 2013 年~2017 年我中心 ART 患者早期自然流产或胚胎停育后行绒毛染色体非整倍性筛查的 409 例患者。

1.2 标本收集和检测方法

早期自然流产患者无菌清宫手术过程中, 取绒毛组织 15~20 mg, 生理盐水清洗绒毛组织至无血液残留, 剔除蜕膜, 将绒毛组织剪碎, 采用 QIAGEN QIAamp DNA mini Kit (Cat.No. 51304) 行绒毛全基因组 DNA 提取, 行检测染色体非整倍性检测 (2013-2014, aCGH CytoChip Focus Constitutional 芯片检测; 2014-2017, IonProton 二代测序技术检测)。

1.3 统计学分析

平均不孕年限以中位数(四分位数)表示, 其他试验数据以 Mean $\pm$ SD 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。对于非正态分布数据用非参数检验, 计数资料数据采用 χ^2 检验; 正态分布数据采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ART 患者早期流产组织染色体异常的相关因素分析

409 例 ART 早期流产患者, 流产组织染色体非整倍性患者 235 例 (57.46%), 流产组织染色体整倍性患者 174 例 (42.54%)。流产组织染色体非整倍性患者女方平均年龄前者极其显著高于流产组织染色体整倍性患者 ($P<0.001$), 且继发不孕的发生率也高于流产组织染色体整倍性患者 ($P<0.05$), 两组各项其他统计指标比较差异无统计学意义(表 1)。

表 1 ART 患者早期流产组织染色体异常相关因素分析

Table 1 The related factors of chromosome abnormality in the early abortion tissue from ART patients

	Euploidy (n=174)	Aneuploidy (n=235)	P
Female average age	30.61 $\pm$ 4.09	32.12 $\pm$ 5.19	< 0.001
Average infertility duration	3(2, 5)	3(2, 5.25)	NS
Type of infertility	Secondary infertility	133(61.29%)	< 0.05
	Primary infertility	97(54.19%)	
Infertility factors	Male	46(60.53%)	NS
	Female	167(56.23%)	
Dose of GnRH (IU)	2023.5 $\pm$ 955.5	2223 $\pm$ 1125.75	NS
Average stimulation days	10.96 $\pm$ 1.78	11.3 $\pm$ 4.88	NS
Average number perovary of oocytes	13.31 $\pm$ 5.85	12.32 $\pm$ 6.37	NS
Normal embryos	9.30 $\pm$ 5.40	8.40 $\pm$ 5.81	NS
Available embryos	5.67 $\pm$ 3.35	5.57 $\pm$ 3.40	NS
Average endometrial thickness	0.96 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.25	NS
HCG in 15th days after transplantation	909.05 $\pm$ 781.68	1012.57 $\pm$ 879.16	NS

2.2 ART 患者流产组织染色体异常的分布情况

在流产组织染色体异常类型中, 除 1 号及 12 号染色体未出现异常之外, 其他各条染色体均出现不同频次的异常。以 16 三体占比最高 (23.95%), 其次是 22 三体 (13.45%) 及 Turner (9.24%)(图 1)。

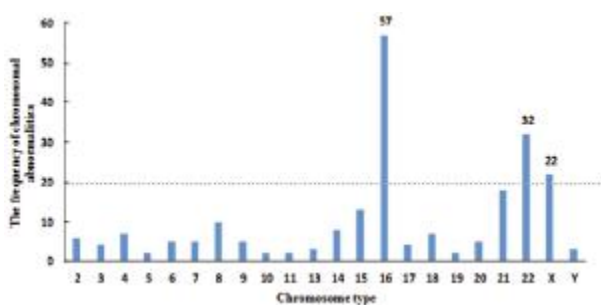
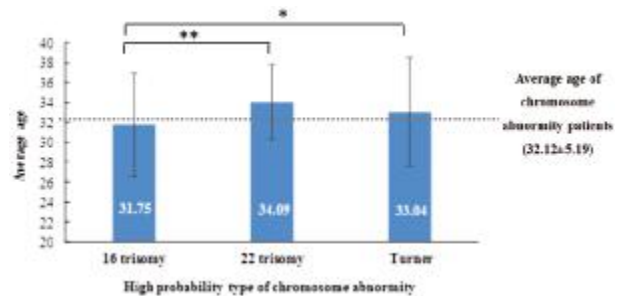


图 1 ART 患者流产组织不同染色体异常频次

Fig. 1 The frequency of chromosomal abnormalities in early abortion tissue from ART patients

2.3 ART 患者流产组织高发染色体异常与年龄的关系

流产组织染色体异常患者平均年龄(32.12 $\pm$ 5.19)岁。其中, 流产组织存在 16 三体、22 三体、Turner 异常的患者, 平均年龄分别为(31.75 $\pm$ 5.21)岁、(34.09 $\pm$ 3.77)岁、(33.04 $\pm$ 5.50)岁。16 三体组平均年龄显著低于 22 三体组 ($P<0.01$) 及 Turner 组 ($P<0.05$)(图 2)。



Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图 2 ART 患者流产组织高发染色体异常与年龄的关系

Fig.2 The relationship between high probability type of chromosome abnormality and female age in early abortion tissue from ART patients

2.4 ART 患者流产组织高发染色体异常与不孕年限的关系

流产组织染色体异常患者平均不孕年限中位数为 3(2, 5.25)年。其中,流产组织存在 16 三体、22 三体、Turner 异常的患者,平均不孕年限分别为 4(2, 7)年、4(1.75, 8.25)年、3(1, 4)年,三组平均不孕年限比较差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。

2.5 ART 患者流产组织高发染色体异常与促排卵的关系

22 三体组 ART 患者平均 Gn 使用量高于 16 三体组 ($P<0.05$);16 三体组移植 15 天血 HCG 值低于 22 三体组($P<0.05$)及 Turner 组($P<0.01$)(表 2)。

3 讨论

大约有一半的早期流产是胎儿染色体异常所致,尤其是染色体的数目异常^[7-9]。有研究报道,由于染色体数目异常引起的自发性流产占 23%-61%^[10-12],我们的研究发现在 409 例 ART 流产组织中,染色体异常 235 例,占 57.46%,这与文献报道相一致^[12,13]。染色体数目的异常大多来源于配子减数分裂染色体

分离异常,只有很小一部分来自受精卵最初几次的有丝分裂分离异常^[14]。

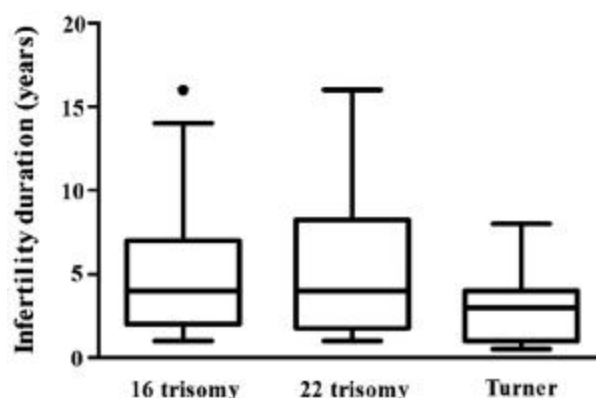


图 3 ART 患者流产组织高发染色体异常与不孕年限的关系

Fig.3 The relationship between high probability type of chromosome abnormality and infertility duration in early abortion tissue from ART patients

表 2 ART 患者流产组织高发染色体异常与促排卵的关系

Table 2 The relationship between high probability type of chromosome abnormality and COH in early abortion tissue from ART patients

	16 trisomy n=57	22 trisomy n=32	Turner n=22
Average dose of GnRH (IU)	2056.5± 986.25	2643± 1350.75*	2390.25± 1151.25
Average stimulation days	11.91± 8.83	11.53± 2.45	11.83± 2.93
Average number perovary of oocytes	12.49± 6.24	11.53± 5.57	14.00± 7.57
Normal embryos	8.51± 5.42	8.09± 3.99	10.43± 7.45
Available embryos	5.33± 3.25	5.26± 2.61	6.65± 4.34
Average endometrial thickness	0.97± 0.12	0.97± 0.18	0.94± 0.16
HCG in 15th days after transplantation	696.38± 531.44	1410.18± 995.53*	1586.83± 804.81**

Note: *Compare with 16 trisomy,* $P<0.05$;** $P<0.01$.

母亲年龄是迄今唯一被证实的与生殖细胞非整倍体发生密切相关因素。大于 35 岁女性卵细胞的染色体非整倍体率明显上升,40-45 岁的女性卵细胞的非整倍体率高达 38-85%,这可能与高龄女性卵细胞减数分裂重组错误、纺锤体聚合检验点蛋白缺陷和 cohesion 蛋白减少等有关^[14,15]。针对<35 岁及≥35 岁的两组人群的 Meta 分析显示高龄组人群胚胎染色体异常的比率明显增加(OR 2.88,95% CI)^[16]。本研究中,流产组织染色体非整倍性的孕妇年龄显著高于流产组织染色体正常的孕妇年龄,差异具有极其显著的统计学意义($P<0.001$),也提示年龄对于胚胎染色体非整倍性形成的关键影响作用。

此外,本研究结果显示:在导致胚胎染色体异常的类型中,除 1 号、12 号染色体之外,其余染色体异常均有发生,以 16 三体、22 三体及 Turner 占比最高。从胚胎染色体非整倍体来源上而言,16 三体的产生完全来源于母方,是卵子形成过程中,减数分裂 I 期同源染色体的分离错误所致;22 三体的产生 97%来源于母方,有 94%的异常是由于卵子形成过程中,减数分裂 I 期同源染色体的分离错误所致^[17]。随着女性年龄增长,卵子生成过程错误风险增加。理论上,16 三体、22 三体所致流产均应与患者年龄增加密切相关,而我们的结果显示:22 三体所致的

流产患者年龄显著高于 16 三体所致的流产患者年龄,16 三体的形成并未体现出与年龄的正相关性,这一趋势与研究报道相一致^[15]。我们推测 16 三体的形成可能存在年龄以外的其他影响因素,但目前尚无文献报道。Turner 的发生 70%是由父方精子生成过程中,由于 X-Y 之间二价体缺少,导致减数分裂 I 期,性染色体不分离所致^[18],因此,有可能与父方的年龄或外环境影响相关联,以流产患者(母方)年龄的分组研究,不同的文献可能会有完全不同的结果。

研究显示胚胎非整倍体形成与超排卵药物剂量相关^[19,20],发生机制可能是超促排卵过程中,生理条件下的激素节律和稳态发生急剧变化,增加卵母细胞形成过程中染色体的分离错误,最终导致受精胚胎发生染色体异常,造成流产率增高^[21]。本研究对 ART 助孕患者辅助生殖过程中促排卵指标进行对比分析,发现流产组织染色体整倍性患者及流产组织染色体非整倍性患者平均 Gn 使用量、平均 Gn 使用天数、平均获卵数、正常胚胎数、可利用胚胎数、平均内膜厚度及移植 15 天血 HCG 值比较均无统计学差异,一定程度上提示我中心并没有因为促排卵不当增加胚胎染色体非整倍性的发生率。

在高发染色体异常流产患者中,个别指标出现统计学差

异。22 三体所致流产患者平均 Gn 使用量大于 16 三体所致流产患者,这与 22 三体所致流产患者年龄较大相关。HCG 是维持早期妊娠的关键激素,妊娠 10 天左右,胎盘开始分泌 HCG,早孕初期 HCG 每 1.7~2.0 天上升 1 倍,妊娠 8~10 周达峰值^[2]。HCG 值的下降与早期流产密切相关,HCG 值越低,流产越容易发生。我们研究显示:发生 16 三体流产的患者移植 15 天的血 HCG 值低于 22 三体流产患者及 Turner 流产患者。虽然在本研究中,这些异常均表现为早期流产,但移植 15 天血 HCG 值的差异,可以解释以往一些临床现象,如:个别 22 三体胎儿可以妊娠到中孕期,甚至出生;1%的 Turner 胎儿可以正常分娩出生等。

参考文献(References)

- [1] Farquhar C, Rishworth JR, Brown J, et al. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 15(7): CD010537
- [2] MAC Baenas, LM Zuchett, RR Bertó, et al. Infertility due to non obstructive azoospermia (NOA): What's the chance of take home baby? [J]. *European Urology Supplements*, 2017, 16(3): e772
- [3] Pinar MH, Gibbins K, He M, et al. Early Pregnancy Losses: Review of Nomenclature, Histopathology, and Possible Etiologies[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2018, 8: 1-19
- [4] Ouyang Y, Tan Y, Yi Y, et al. Correlation between chromosomal distribution and embryonic findings on ultrasound in early pregnancy loss after IVF-embryo transfer [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31 (10): 2212-2218
- [5] Y Qiao, J Wen, F Tang, et al. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2016, 22 (5): 364-372
- [6] JM Page, RM Silver. Genetic Causes of Recurrent Pregnancy Loss[J]. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 2016, 59(3): 498
- [7] Qi H, Xuan ZL, Du Y, et al. High resolution global chromosomal aberrations from spontaneous miscarriages revealed by low coverage whole genome sequencing [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018, 224: 21-28
- [8] J Shen, W Wu, C Gao, et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology [J]. *Molecular Cytogenetics*, 2016, 9 (1): 7
- [9] Coelho FF, Marques FK, Gonçalves MS, et al. Detection of aneuploidies in spontaneous abortions by quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers: a retrospective study[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3)
- [10] Ayed W, Messaoudi I, Belghith Z, et al. Chromosomal abnormalities in 163 Tunisian couples with recurrent miscarriages [J]. *Pan Afr Med J*, 2017, 29(28): 99
- [11] Zhang T, Sun Y, Chen Z, et al. Traditional and molecular chromosomal abnormality analysis of products of conception in spontaneous and recurrent miscarriage[J]. *BJOG*, 2018, 125(4): 414-420
- [12] RF Turki, M Assidi, HA Banni, et al. Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia[J]. *Bmc Medical Genetics*, 2016, 17(1): 69
- [13] Chan Wei Jia, Li Wang, Yong Lian Lan, et al. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors [J]. *Chinese Medical Journal*, 2015, 20(128): 2772-2776
- [14] 史庆华, 许波, 杨庆岭, 等. 非整倍体和人类生殖健康[J]. *中国科学技术大学学报*, 2008, 38(8): 883-889
- [15] 胡晓东, 尹彪, 朱元昌, 等. 女性年龄与早期自然流产胚胎染色体数目异常的关系[J]. *生殖与避孕*, 2014, 34(9): 735-741
- [16] Jun Zhen-qin, Li-Hong Pang, Min Qing Li, et al. Risk of Chromosomal Abnormalities in Early Spontaneous Abortion after Assisted Reproductive Technology: A Meta-Analysis [J]. *PLOS ONE*, 2013, 10 (8): 1-11
- [17] T Hassold, P Hunt. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(4): 280
- [18] 陆国辉, 徐湘民. 临床遗传咨询 [M]. 北京大学医学出版社, 2007: 191
- [19] Taylor TH, Gitlin SA, Griffin DK, et al. Reply: Impact of ovarian stimulation with gonadotrophins on embryo aneuploidy [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(6): 964-965
- [20] A. Karahasanoglu, S. Kahraman. The Impact Of Controlled Ovarian Stimulation Protocol On Embryo Transfer Rate In PGD Cycles For Aneuploidy Testing[J]. *American Society for Reproductive Medicine Meeting*, 2014. P-260
- [21] RS Zhivkova, SM Delimitreva, DI Toncheva, et al. Analysis of human unfertilized oocytes and pronuclear zygotes-Correlation between chromosome/chromatin status and patient-related factors [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007, 130(1): 73-83
- [22] 乐杰. 妇产科学[M]. 人民卫生出版社, 2008: 391