

# 无创胚胎培养液检测新进展及临床应用价值探讨

连文昌<sup>1</sup> 焦淑静<sup>1</sup> 刘珍<sup>1</sup> 唐莉<sup>2</sup> 马誉如<sup>2\*</sup> 王华伟<sup>2\*</sup>

(1. 苏州亿康医学检验有限公司 医学遗传学部, 江苏 苏州 215021; 2. 昆明医科大学第一附属医院 生殖遗传科, 云南 昆明 650032)

**【摘要】** 采用形态学指标结合胚胎植入前遗传学检测技术评价、挑选排除明确可能致病因素的胚胎进行移植,是临床预防出生缺陷的重要途径之一。然而,开展胚胎植入前遗传学检测技术(preimplantation genetic testing, PGT)需要通过对胚胎进行活检取样,是一种有创性操作,且对操作者也有较高的技术要求,但该技术可能存在潜在的安全风险,也会存在无可用于移植胚胎等情况的发生,限制了该技术的推广和应用。因此,亟须开发一种无创的技术对胚胎开展植入前遗传学评估,帮助临床医师进行胚胎筛选,以提高生殖中心的助孕成功率。无创胚胎植入潜能筛查(non-invasive capacity screening, NICS)是一种全新的筛查胚胎染色体的方法,它不需要对胚胎进行活检,直接利用胚胎培养液中游离DNA进行全基因组扩增,并结合高通量测序和人工智能分析的方法,对胚胎进行植入潜能评估和优选,为指导临床胚胎移植提供参考,有助于提高辅助生殖助孕成功率。本文针对该技术的最新研究进展,结合团队的实践经验,对该技术的应用价值进行探讨,以期为促进该技术的临床应用提供参考与借鉴。

**【关键词】** 无创;胚胎培养液;NICS;新进展

**【中图分类号】** R715.5 **【文献标识码】** A

## 1 无创胚胎潜能筛查技术是应出生缺陷防控需求而产生的新技术

胚胎染色体异常是导致妊娠失败和自然流产的主要病因之一。辅助生殖助孕和自然怀孕均面临着相当高比例的胚胎染色体异常风险,其中体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)方式获得的胚胎有40%~60%存在染色体异常<sup>[1-2]</sup>。其中高龄妇女、反复流产及多次IVF种植失败患者是胚胎染色体异常的高风险人群。传统的形态学观察无法判断胚胎染色体异常情况,即形态学正常的胚胎不等同于胚胎染色体正常。植入前胚胎染色体遗传学筛查技术能够有效区

分正常和异常染色体数目的胚胎,选择移植染色体数目正常的胚胎进行有助于提升胚胎移植的临床妊娠率、降低流产率<sup>[3]</sup>。然而,目前临床采用的胚胎植入前染色体非整倍体检测(preimplantation genetic testing for aneuploidy, PGT-A)技术需要对胚胎进行滋养层细胞活检取材,这种取材方式是一种有创伤性操作。虽然常规认为囊胚外滋养层将来发育为胎盘组织,对外滋养层进行细胞活检取材不会影响胎儿健康,然而PGT-A技术毕竟出现时间相对较短,故胚胎活检对个体长期乃至终生的健康影响仍有待观察。近期研究提示有创性的活检取材方法可能对胚胎发育存在潜在的影响:①无论是卵裂期活检或囊胚期活检,都有可能对胚胎质量和发育水平有潜在影响<sup>[4]</sup>。②动物实验表明,有创性的活检可能会对胚胎发育的后代造成神经退行性病变,表现为胚胎各节点时间的延长,表观遗传修饰的异常,后代卵巢功能异常等<sup>[5-7]</sup>。③另外,胚胎活检本身对

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2024.04.009

基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学联合专项面上项目(202301AY070001-087);昆明医科大学2024年度大学生创新训练计划项目(2024CYD236和2024CYD240)

\*通信作者:马誉如, E-mail: mayuru2009@126.com; 王华伟, E-mail: wanghuawei99@163.com

操作技能要求很高,存在着操作失败的潜在风险。④胚胎外滋养层活检对胎盘相关的孕期并发症,如先兆子痫,绒毛膜病变等的影响目前尚缺乏深入研究。故胚胎活检的安全性问题尚存在较大争议。因此,国家医疗监管部门对 PGT-A 检测资质的发放把控甚严,造成这一新技术在临床的推广和应用比较缓慢。此外,以胚胎活检为基础的有创性 PGT-A 检测尚不能排除其他潜在风险可能。

建立无需胚胎活检的无创 PGT-A 检测技术,既可以达到对胚胎进行染色体数目检测的目的,同时也避免了活检对胚胎造成损伤的风险,因此,研发无创 PGT-A 技术(NICS)迫在眉睫。通过收集 326 份囊胚培养液(spent culture media, SCM)进行基因组 DNA(genomics DNA, gDNA)检测发现,63% (205/326)的胚胎 SCM 中含有 gDNA,含量从 41pg 到 1.8ng 不等,首次证明了 SCM 中存在细胞游离 DNA(Cell free DNA, cfDNA)<sup>[8]</sup>。随后,也有研究者从 SCM 中检测到线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)和 gDNA<sup>[9]</sup>;且第三天胚胎 SCM 中 mtDNA 与 gDNA 的比例与囊胚形成率呈正相关<sup>[10]</sup>。上述研究提示胚胎培养液可以作为 PGT-A 检测的潜在材料。

## 2 NICS 检测 DNA 来源和准确性

2.1 SCM 中 DNA 的来源 SCM 中是存在 cfDNA,而 cfDNA 来源和 cfDNA 是否能够代表早期发育胚胎发育过程对进一步落实 SCM 中 cfDNA 能否作为 PGT 检测材料是至关重要的。早前研究提示,植入前的胚胎虽被透明带,即保护性糖蛋白膜所包围,但它具有很高的渗透性,即使相对较大的大分子也可以通过,这为核酸顺利从胚胎进入培养液提供了可能<sup>[10-13]</sup>。然而,胚胎 DNA 释放的潜在机制仍不清楚。早期研究主要集中在胚胎分泌到培养基中的各种成分,如代谢物、蛋白质、白介素及 microRNA,和上述成份是否可能作为预测胚胎发育潜能的靶标等问题<sup>[14-16]</sup>。Bolton 等人通过小鼠胚胎证实胚胎发育过程中内细胞团中非整倍体细胞会通过凋亡方式被消除<sup>[17]</sup>;动物学实验也发现非整倍体细胞可能通过 p53 介导的自噬和凋亡进行胚

胎的自我校正<sup>[18]</sup>;而这一现象在人胚胎发育过程中也有被证实,即人类胚胎发育过程中不仅会排出或消除完整的异常卵裂球,也会同时排除异常细胞的碎片和片段<sup>[19]</sup>;此外,也有研究认为 cfDNA 可能来源于辅助生殖对胚胎进行操作造成的胚胎损伤,如激光脉冲打孔、胚胎活检等操作<sup>[20]</sup>;以及胚胎有丝分裂过程中的 DNA 释放<sup>[21]</sup>。上述研究结果进一步证实了胚胎培养液中的 cfDNA 可能来源于正常胚胎发育阶段的凋亡细胞、非整倍体细胞分泌出来的异常片段或碎片及有丝分裂过程中释放的 DNA,提示胚胎培养液中 cfDNA 来源广泛,并且包含了整个胚胎核酸物质,因此,通过对培养液进行 cfDNA 检测可以预测胚胎移植潜能。NICS 技术应运而生,成为近年来辅助生殖领域的研究热点。采用囊胚培养液中的 cfDNA 为检测对象,利用多次退火环状循环扩增技术(multiple annealing and looping based amplification cycles, MALBAC)对样本进行快速扩增,结合二代高通量测序技术,检测培养液中 cfDNA,判断胚胎染色体异常与否,并结合 AI 技术对胚胎的移植潜能进行分级评估,帮助临床医生筛选染色体整倍体胚胎进行移植,用于指导临床,提高辅助生殖助孕成功率<sup>[22]</sup>。

2.2 NICS 技术的准确性评价 证实 NICS 技术中胚胎遗传物质的准确性是将 NICS 技术在临床进行推广和应用的前提。近年来,先后有不同的团队对 NICS 技术检测结果的准确性进行了评估。通过对 194 份 SCM 标本进行微量 DNA 甲基化组测序(post-bisulfite adaptor tagging-based single-cell whole-genome DNA methylation sequencing, scBS-seq),并与该团队前期报道的植入前胚胎的单细胞 DNA 甲基化组图谱进行系统分析发现培养液中 cfDNA 中颗粒细胞是母源 DNA 污染的来源<sup>[5, 23]</sup>。为进一步分析 NICS 技术是否可以有效区分母源、父源污染问题,有研究人员利用 25 个 IVF 周期患者的 161 份 SCM 样本进行验证,研究结果证实没有发现父源性污染,但在 29.8%(48/161)的 SCM 样本中发现了母源污染,仅有 2.5%(4/161)样本的污染率 $\geq 50\%$ ,整体而言,与 TE 活检相比,161 个常规 IVF 胚胎和 122 个 ICSI 胚胎的 NICS

检测结果差异无统计学意义( $P>0.05$ ), IVF 和 ICSI 方法的 NICS 结果与核型分析结果比较, 整倍性一致率分别为 75% 和 74.6%, 提示 NICS 技术可以排除父源污染, 同时用于整倍性的检测<sup>[24]</sup>。此外, 以 265 个捐赠胚胎为研究对象, 分析 NICS 结果与传统的滋养外胚层(TE)活检的 PGT 结果, 发现 NICS 的灵敏度、特异性、阴性预测值(NPV)及阳性预测值(PPV)在两组间结果呈现高度一致性, 提示 NICS 技术具有与 PGT-TE 相似的检测效率<sup>[25]</sup>。

### 3 NICS 与 PGT 技术融合创新改善妊娠结局

基于 NICS 技术对胚胎进行评级和优选具有重要价值。按照形态学优选复苏冻存囊胚并于约 10 微升单微滴培养 6~8h 后收集培养液行 NICS 检测, 比较形态学和形态学结合 NICS 组的临床妊娠率、持续妊娠率、流产率、活产率, 提示后者更具优势<sup>[22]</sup>。而基于培养液单细胞全基因组扩增、CNV 测序及 AI 智能分析模型进行胚胎整倍体概率预测, 发现基于 NICS 结合 AI 技术的三分类法较单纯利用培养液的二分法整倍体胚胎利用率由 57.9% 提升至 78.8%, 可有效避免胚胎利用率下降问题<sup>[26]</sup>。

将 NICS 与 PGT-A 技术结合, 可以改善临床妊娠率。基于 TE 和 NICS 筛选胚胎, 患者妊娠率达 52.9%, 较前者(16.7%)提升将近 3 倍, 提示 NICS 技术进行染色体整倍性筛查具有较好的临床应用价值<sup>[27]</sup>。基于 NICS 技术对反复种植失败、反复流产和染色体异常等生育困难人群进行单中心前瞻性临床研究发现, NICS 技术可以使得上述患者群体的临床妊娠率达到 58%, 最终获得 27 例活产婴儿<sup>[28]</sup>, 进一步支持了 NICS 技术的广泛应用前景, 而这一结果在 300 名流产 $\geq 2$  次或 1 次流产且流产物染色体异常患者、植入失败 $\geq 3$  次的患者的回顾性研究中被进一步证实<sup>[29]</sup>。此外, 也有研究发现 NICS 技术可以帮助染色体平衡易位、无精子症或者反复流产的夫妇进行胚胎染色体筛查, 提高临床妊娠率<sup>[30]</sup>。上述结果提示 NICS 技术在胚胎植入前遗传学筛查方面具有重要临床应用价值。

在胚胎嵌合体评估方面, 通过对 41 枚嵌合胚胎

进行二次活检及培养液检测发现 85.36%(35/41) 胚胎检测结果为整倍体, 而基于 NICS 检测可以发现其中 70.73%(29/41) 胚胎为整倍体胚胎, 提示培养液检测可使得 70% 左右的嵌合胚胎重新获得一致性可能的结果, 有效避免胚胎的浪费, 也进一步支持 NICS 技术可以应用于胚胎染色体整倍体筛查<sup>[31]</sup>。

在单基因诊断方面, 利用胚胎培养液进行无创植入前单基因病筛查, 通过 7 对  $\beta$  地中海贫血患病风险夫妇捐献的 88 个胚胎进行 *HBB IVSII654* 突变位点的诊断发现, 与 TE 结果相比, 活检细胞和培养液进行全基因组扩增效率、染色体整倍性分析及 *HBB* 基因 *IVS-II654* 位点检测, 发现两组结果高度一致, 提示 SCM 开展无创胚胎单基因病遗传学检测与活检细胞是一致性<sup>[32]</sup>, 但需要进一步扩大样本量和多中心研究以优化和验证其准确性。

上述研究提示, NICS 在无创胚胎植入前遗传学筛查和诊断方面具有较好的应用价值, 具有相对较高的灵敏性、准确性、阳性预测值及阴性预测值, 可以排除特定来源的污染, 用于胚胎分级评估、整倍性检测及单基因遗传病检测, 可以用于复发流产患者、单基因遗传病患者及染色体疾病患者的筛查, 提高上述患者的临床妊娠率, 具有较好的临床应用前景。

### 4 NICS 技术的取样策略及实验注意事项

4.1 NICS 技术的取样策略 基于 NICS 技术可对胚胎进行 PGT-A 检测, 具有比外滋养层细胞活检(TE)更高的准确性<sup>[33]</sup>; 也有团队通过 MALBAC-Inst 技术证明基于 SCM 可以进行 PGT-SR 检测用于规避染色体结构异常的问题传递<sup>[18, 31]</sup>, 上述情况进一步拓展了 NICS 的应用范围。

因此, 基于 SCM 的 NICS 技术对 SCM 具有较高的要求, 可以基于不同时间段和不同培养体系下 SCM 的收集并评估胚胎染色体整倍性。前期研究发现, Vitrolife、Sage、Life Global、Irvine 四种培养液基于单一或序贯培养方式和不同采样时间的 SCM 在 D4 换液后的培养液检测结果一致性为 80% 左右, 不同培养基之间无显著性差异, 提示

NICS 技术不受培养液种类影响<sup>[34]</sup>。但该结论和前期研究存在有一定争议<sup>[25, 27]</sup>, 这需要后期基于大量样本来源的多中心随机研究进行进一步验证。结合前期研究和团队实践发现, 基于 D4 更换培养液后行 SCM 收集和检测更为有利。基于标准化的采集和分析流程发现, D4 下午以 25 $\mu$ l/滴培养液进行换液后单囊胚的培养可有效提升扩增成功率; 以 10 $\mu$ l/滴培养液于 D5 上午对囊胚的培养的胚胎进行换液, 且在收 SCM 前进行激光皱缩将囊腔液全部释放后再行检测, 也能够提升检测成功率<sup>[35]</sup>。

目前无创检测流程相关的研究报道, 结合公司和团队的研究经验详细总结了胚胎培养液检测样本收集流程, 为 NICS 在临床推广应用提供一定的参考和借鉴。首先, 准备 3 根内径大小不同的巴斯德管制作拆卵针, 或直接购买商业化产品待用。用透明质酸酶消化颗粒细胞后, 再按照从大到小依次用

3 根拆卵针拆卵, 反复吹吸至颗粒细胞拆除干净。待剥除干净颗粒细胞后行显微镜下卵胞浆内单精子注射(ICSI), 务必避免混入多余精子。ICSI 后, 18~20h 内观察胚胎受精情况, 于 D2 和 D3 观察胚胎卵裂情况, 正常卵裂期胚胎可继续进行囊胚培养。IVF 受精的胚胎需在受精成功后, 于授精 14h<sup>+</sup> 行颗粒细胞完全剥除。如发现 IVF 或 ICSI 授精胚胎颗粒细胞剥除不干净需在 D3 继续剥除(图 1)。颗粒细胞拆除操作为: 准备培养皿、清洗皿、囊胚培养皿, 在囊胚培养皿中制作一个空液滴, 每个胚胎对应 3 个清洗液滴。用拆卵针拆除 D3 胚胎的颗粒细胞, 反复吹吸后, 仔细观察确保颗粒细胞拆除干净(图 2)。将无颗粒细胞的胚胎转入空白清洗液滴中继续培养。D3 将胚胎放入 25 $\mu$ l 囊胚培养液培养滴于在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

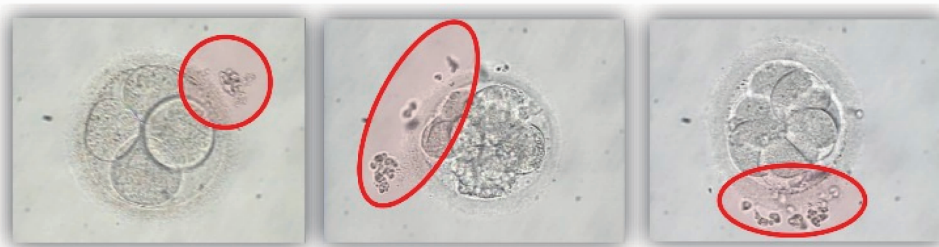


图 1 胚胎残余颗粒细胞示意图

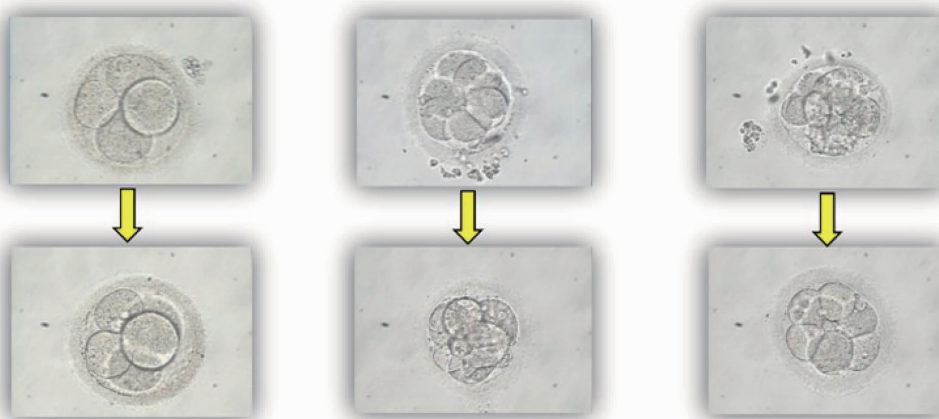


图 2 颗粒细胞拆除干净的胚胎示意图

SCM 标本采集方案: ①方案一: 序贯培养方式时, 培养至 D4 下午的胚胎进行清洗和换液, 行单微滴培养。用对应编号的玻璃细管吸取少量清洗培养皿中的对应液滴, 浸润和清晰玻璃吸管, 吸取无颗粒

细胞的 D4 胚胎, 尽量少带液体, 将胚胎转入清洗皿对应编号的空白清洗液滴中依次清洗 3 次, 再转移至标记好的囊胚培养皿中, 每个胚胎对应一根移卵针, 为避免胚胎间的交叉污染, 每个胚胎使用一个专

用玻璃细管和3个专用清洗液滴,不可交叉使用。将换液后的胚胎放置培养箱中继续培养,当囊胚发育到4期(一般为D5/D6)以上,囊胚充分扩张的胚胎,收集培养液。②方案二:在囊胚培养皿中准备10-15 $\mu$ l的液滴,平衡过夜后待用。对培养至D5上午胚胎进行换液清洗,用3个液滴对每个胚胎进行清洗,转移到标记好的囊胚培养皿继续培养。为避免污染,每个胚胎使用1个专用玻璃细管和3个专用清洗液滴,不可交叉使用。培养至少4-6h后将胚胎转移至高倍镜下观察,当胚胎发育到4期以上囊胚或培养到D6时,于原培养液中进行激光皱缩,待腔液释放完全后取出囊胚并转移入另一平衡好的囊胚培养皿内,等待冷冻,剩余培养液用于标本收集。每个胚胎准备1个专用玻璃细管用于胚胎转移,不可交叉使用。用移液器在液滴里反复吹吸3次后,采集全部培养基,转移入对应标记好的采集管中,将样本放置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中等待检测。

4.2 无创胚胎培养液检测注意事项 SCM存在样本量小,且不可多次重复性特性。因此,在进行SCM取样时需要特别注意避免污染。根据团队经验,需特别注意以下几点:①胚胎培养液污染的来源分析和操作注意事项。污染的可能来源包括操作过程中引入培养液中的血清白蛋白HSA是主要的污染源,源于卵丘细胞或极体,源于精子细胞父源污染,实验室人员等的外源DNA污染及IVF期间培养皿中的微生物污染等。SCM取样过程中为避免过多母源污染影响,建议进行多次颗粒细胞去除;采用ICSI方式授精或采用IVF授精方式和后续采用MALBAC的WGA扩增方式检测可避免父源污染检出;注意采集过程中实验人员防护到位避免其他污染可能性,如佩戴手套、头套、口罩等。②样品采集时间和胚胎发育阶段均对标本DNA浓度有影响。较小体积的培养基中进行培养避免过度稀释胚胎释放的DNA,最大限度减少抑制性培养基成分。通过单个胚胎囊腔液和培养液中DNA共同收集增强培养液的检测性能。冷冻保存会破坏细胞膜,可能会增加胚胎细胞将其内含物释放到培养液中,可提高扩增用模板浓度,但会因胚胎冷冻和解冻带来的胚胎培养费用和胚胎损伤风险增加。鲜胚受母源

颗粒细胞污染可能性大于冻胚,建议采用冻胚复苏再采集SCM行无创胚胎培养液检测。③采集后样本需单独保存于含有防止DNA降解的保存液中。采集培养液和保存液保持一定体积比例,样本体积远大于保存液体积大会降低保存液效果,造成样本质量下降,影响检测结果的准确性。常温或者4-8 $^{\circ}$ C保存会降低培养液的质量,影响PCR扩增效率,故采集后的样本应尽快扩增或冻存于-80 $^{\circ}$ C以下环境,尽量避免不适宜存储或长时间处于运输环境。④扩增方式选择至关重要。MALBAC、Sureplex、Modiffed、PicoPLEX、MDA等均可有效进行WGA扩增,扩增效率范围在80%~100%之间。但MDA扩增后CNV检测成功率低,故对SCM样本检测时不建议采用MDA扩增方法进行CNV检测。⑤通过不同比较标准,对培养液检测准确性判别会有很大差异体现。建议在开展研究时对培养液与整胚结果进行对比,而非与TE活检结果进行比较。

## 5 结语

利用胚胎培养液检测是实现无创胚胎检测的有益探索,具有重要的理论价值和应用前景。NICS技术是胚胎植入前非整倍体筛查项目的重要补充,同时在胚胎染色体结构异常和单基因遗传病诊断应用方面也有一定的价值,但因受制于技术标本本身的局限性,在临床应用方面仍需要不断探索。在当前的研究和应用探索过程中需重视相关实验细节以提高检测结果的准确性。目前本项技术临床应用的局限性主要在以下几个方法:①外源DNA的污染,特别是颗粒细胞对于NICS检测准确性干扰较大,如比例过高会掩盖培养液核酸预测胚胎发育潜能。②研究缺少统一判断标准,有些研究利用整胚作为准确性判断标准,有些研究用囊胚滋养层活检细胞检测结果作为判断标准,导致NICS评估胚胎发育潜能准确性无法统一。建议最终以临床结局作为标准进行观察和评估。③目前缺乏多中心临床验证数据,对于临床应用方式,评估维度,分析方法等都建议进一步扩大临床验证数据。

随着扩增技术和测序技术的不断发展和完善,相信未来NICS技术能实现集准确性和无创性的完

美结合,用于胚胎植入前遗传学筛查和诊断,为广大患者提供更多更优的生育解决方案。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] GERAEDTS J, MONTAQ M, MAQLI MC. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(11): 3173-3180.
- [ 2 ] ADLER A, LEE HL, MCCULLOH DH, et al. Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophectoderm biopsies [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(4): 485-491.
- [ 3 ] VERPOEST W, STAESSEN C, BOSSUYT PM, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(9): 1767-1776.
- [ 4 ] DANILO C, ANTONIO C, FILIPPO MU, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis [J]. *BioMed Research International*, 2016;7193075.
- [ 5 ] WU Y, LV Z, YANG Y, et al. Blastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(9):1761-1774.
- [ 6 ] ZHAO HC, ZHAO Y, LI M, et al. Aberrant epigenetic modification in murine brain tissues of offspring from preimplantation genetic diagnosis blastomere biopsies [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(5):117.
- [ 7 ] ZENG Y, LV Z, GU L, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) influences adrenal development and response to cold stress in resulting mice [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 354(3):729-741.
- [ 8 ] STIGLIANI S, ANSERINI P, VENTURINI PL, et al. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(10): 2652-2660.
- [ 9 ] HAMMOND ER, SHELLING AN, CREE LM. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(8):1653-1661.
- [10] STIGLIANI S, PERSICO L, LAGAZIO C, et al. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome [J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(12): 1238-1246.
- [11] GWATKIN R B. Passage of mengovirus through the zona pellucida of the mouse morula [J]. *J Reprod Fertil*, 1967, 13(3):577-578.
- [12] HASTINGS RA, ENDERS AC, SCHLAFKE S, et al. Permeability of the zona pellucida to protein tracers [J]. *Biol Reprod*, 1972, 7(2):288-296.
- [13] LEGGE M. Oocyte and zygote zona pellucida permeability to macromolecules [J]. *J Exp Zool*, 1995, 271(2):145-150.
- [14] JENNA K, HASAN K. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(9):6552-6563.
- [15] HUANG SJ, SCHATZ F, MASCH R, et al. Regulation of chemokine production in response to pro-inflammatory cytokines in first trimester decidual cells [J]. *J Reprod Immunol*, 2006, 72(1-2):60-73.
- [16] DEKEL N, GNAINSKY Y, GRANOT I, et al. The role of inflammation for a successful implantation [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2014, 72(2):141-147.
- [17] BOLTON H, GRAHAM SJL, VAN DER AA N, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11165.
- [18] SINGLA S, IWAMOTO-STOHL LK, ZHU M, et al. Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):2958.
- [19] ORVIETO R, SHIMON C, RIENSTEIN S, et al. Do human embryos have the ability of self-correction? [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1):98.
- [20] JIAO J, SHI B, SAGNELLI M, et al. Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(7): 1369-1379.
- [21] SCHOBERS G, KOECK R, PELLAERS D, et al. Liquid biopsy: state of reproductive medicine and beyond [J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(11): 2824-2839.
- [22] LEAVER M, WELLS D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics [J]? *Hum Reprod Update*, 2020, 26(1):16-42.
- [23] CHEN Y, GAO Y, JIA J, et al. DNA methylome reveals cellular origin of cell-free DNA in spent medium of human preimplantation embryos [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2021, 131(12):e146051.
- [24] XIE P, ZHANG S, GU Y, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for conventional IVF blastocysts [J]. *J Transl Med*, 2022, 20:396.
- [25] CHEN L, SUN Q, XU J, et al. A Non-invasive

- Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:708322.
- [26] CHEN L, LI W, LIU Y, et al. Non-invasive embryo selection strategy for clinical IVF to avoid wastage of potentially competent embryos[J]. *Reprod Biomed Online*, 2022, 45(1):26-34.
- [27] RUBIO C, RIENZI L, NAVARRO-SÁNCHEZ L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications [J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(3): 510-519.
- [28] CHEN M, WEI S, HU J, et al. Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140779.
- [29] XI H, QIU L, YAO Y, et al. Noninvasive Chromosome Screening for Evaluating the Clinical Outcomes of Patients With Recurrent Pregnancy Loss or Repeated Implantation Failure [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 896357.
- [30] 孙琴,许娟娟,冯雨明,等.无创胚胎染色体筛查在男性严重少弱畸精子症不育患者的临床应用[J].*中华男科学杂志*,2022, 28(1): 14-19.
- [31] LI X, HAO Y, CHEN D, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study[J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(7): 2020-2034.
- [32] WEIQIANG L, JIANQIAO L, HONGZI D, et al. Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium [J]. *ANNALS OF MEDICINE*, 2017, 49(4): 319-328.
- [33] LEI H, BERHAN B, YAQIONG T, et al. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2019,116(28):14105-14112.
- [34] RUBIO C, NAVARRO-SÁNCHEZ L, GARCÍA-PASCUAL CM, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020 ,223(5):751. e1-751. e13.
- [35] HUANG J, YAO Y, JIA J, et al. Chromosome Screening of Human Preimplantation Embryos by Using Spent Culture Medium: Sample Collection and Chromosomal Ploidy Analysis[J]. *J Vis Exp*, 2021,175:e62619.

(收稿日期:2024-09-26)

编辑:刘邓浩

## · 消息 ·

## 本刊在京东和天猫同时开通期刊订购服务啦!

为了方便广大读者订购本杂志的过往期刊以及新发杂志,现委托“贝叶图书专营店”在京东及天猫商城提供特许服务。

读者们可以搜索“产前诊断杂志”获得订购链接,下单购买时请明确注明需要哪一年出版的第几期杂志,同时将订购信息邮件至编辑部备查,谢谢!(EMAIL:chinjpd@vip.163.com,邮件名“杂志订购”)。