

卵母细胞线粒体移植技术的研究进展

徐彦 孙晓溪

线粒体广泛存在于真核细胞,是细胞质中双层膜包被的具有自身基因转录和蛋白合成机制的细胞器,为细胞供能的同时也参与调控钙离子平衡、细胞信号转导和细胞凋亡等其他细胞活动。人线粒体 DNA(mtDNA)为双链环致密结构,全长约 16.6 kb,包含 37 个基因,编码 13 种构成电子传递链的蛋白亚单位,22 种转运 RNA(tRNA)和 2 种核糖体 RNA(rRNA)。线粒体功能异常或者减退极大地影响卵母细胞的质量,从而影响妊娠结局。近年来,卵母细胞线粒体移植技术成为辅助生殖技术领域研究的热点,以下就线粒体移植技术的最新进展进行综述。

1 线粒体移植技术的适应证

1.1 线粒体基因组的突变 线粒体基因组突变是导致线粒体功能异常的主要原因。mtDNA 缺失或点突变使编码线粒体氧化代谢过程必需的酶或载体发生障碍,糖原和脂肪酸等不能被充分利用来产生足够的 ATP,导致能量代谢发生障碍而出现复杂的临床症状。线粒体功能异常往往累及需要大量能量的组织和器官,如脑、心脏、骨骼肌等;因其复杂多变的症状而导致临床诊断异常困难,且目前仍无有效的治疗方法^[1]。目前已知存在 700 多种 mtDNA 突变,其中的某些突变引起线粒体功能障碍与人类疾病密切相关^[2],如 ND5 基因点突变 G13513A,临床表现为线粒体脑肌病、乳酸酸中毒和反复卒中样脑部损害^[3]。

1.2 线粒体功能损伤 线粒体是卵母细胞中数量最多的细胞器,为卵子成熟、受精和早期胚胎发育等过程提供能量。线粒体数量和 mtDNA 拷贝数可作为衡量卵母细胞质量的重要指标。在原始生殖细胞中,线粒体数量 < 10 个,随着卵母细胞逐渐发育成熟,成熟的卵母细胞中线粒体数量增

至 1×10^6 个以上^[4]。在胚胎发育的过程中,每个卵裂球的线粒体数量随着每次卵裂而减半,而整个胚胎的线粒体总量保持稳定,直至胚胎植入后线粒体才开始复制增殖。每个卵母细胞线粒体中含有 1 或 2 个 mtDNA,成熟卵母细胞的 mtDNA 拷贝总数应为 10^5 数量级^[5]。有研究^[6]结果表明,相较于不受精和退化的卵母细胞,能正常受精的卵母细胞含有更多 mtDNA 拷贝数。mtDNA 拷贝数越多的卵细胞具有更高的囊胚形成率和种植率^[7]。高龄妇女卵母细胞中 mtDNA 拷贝数未见明显减少,但包含有更多的突变和缺失^[8]。提示随着年龄的增加,女性的生殖能力下降,其原因是卵子中的活性氧(ROS)水平增高和抗氧化防御机制可导致 mtDNA 突变率增高,从而导致受精率低、胚胎发育异常、反复流产等发生^[9]。肥胖、糖尿病等代谢疾病和不良的生活习惯导致生育力下降,或许也与线粒体功能缺陷有关^[10-11]。有研究^[12]结果表明,糖尿病小鼠模型中卵母细胞的线粒体亚显微结构和 mtDNA 拷贝数发生变化,进而影响其生育能力。

2 线粒体移植技术种类

2.1 线粒体替代疗法(MRT) 伴随着显微操作技术的不断发展和胚胎植入前遗传学诊断/筛查(PGD/PGS)技术的广泛应用,MRT 技术的出现为阻断线粒体疾病的遗传和改善卵母细胞质量提供了新的手段。以下对目前主要的 3 种 MRT 技术进行介绍。

2.1.1 原核移植(PNT) 哺乳动物受精卵阶段的特征是合子含有两个清晰可见的原核,各包含分别来源于精子和卵子的遗传物质。PNT 是指将患者的原核取出,转移至去核的供体受精卵中。20 世纪 80 年代初,PNT 已在小鼠受精卵中操作,并成功产生后代。然而,在小鼠 PNT 过程中,含有线粒体的细胞质不可避免地被共同转移,造成后代的线粒体异质率高达 24%^[13]。这与原核的

作者单位:200011 上海,复旦大学附属妇产科医院上海集爱遗传与不育诊疗中心

通信作者:孙晓溪,电子邮箱为 xiaoxi_sun@aliyun.com

体积和线粒体的不均一分布有关。小鼠研究的结果并不一定能很好地反映人受精卵的情况。2016 年的一项研究^[14]结果显示,优化后的人受精卵 PNT 能将线粒体异质率降至 2%,且不影响囊胚形成率、胚胎整倍体率和基因表达。因此,PNT 有减少线粒体疾病发生的潜力,具有临床应用前景。

2.1.2 纺锤体移植(ST) ST 是指将 MII 期的纺锤体染色体复合物从患者卵母细胞中转移至去核的供体卵母细胞中^[15]。2009 年,有学者在猕猴卵子中成功实施 ST,猕猴产出健康且 mtDNA 异质性较低子代^[16-17]。不同于受精卵,卵母细胞中的线粒体分布较均匀,能有效地减少纺锤体移出过程中携带的线粒体数量。2016 年,世界首例“三亲婴儿”于墨西哥诞生,该案例将 1 例线粒体疾病患者 ST 至去核的供体卵母细胞内,通过卵母细胞胞质内单精子显微注射(ICSI)技术授精并培养至囊胚,随后行 PGS 后挑选整倍体囊胚进行移植,最终产出健康子代^[18]。该案例首次证实 ST 在临床治疗方面具有可行性,但其子代的安全性仍需要密切关注。

2.1.3 极体移植(PBT) 减数分裂过程中,哺乳动物的初级卵母细胞经过两次减数分裂,产生两个极体。第一极体(PB1)含二倍染色体,第二极体(PB2)含单倍染色体。极体中含有与其同期卵母细胞相同数量的核遗传物质和少量胞质。将小鼠 PB1 和 PB2 移植至去核的成熟卵母细胞和去核受精卵中能正常发育并产生健康子代^[19]。与 ST 和 PNT 相比,PBT 的操作更为简便且极体含有更少的线粒体。在小鼠模型中进行的几种 MRT 方案显示,PBT 过程中携带的线粒体极少,且在传代过程中保持稳定^[20]。极体排出后活性会随着时间推移逐渐降低,甚至发生退化和凋亡,因此获得可用的有活力的极体将影响 PBT 后的胚胎发育潜能。目前人类极体研究主要应用于胚胎植入前的诊断方面^[21],其在 PBT 方面的应用有待进一步发掘。

2.2 自体生殖系干细胞线粒体移植(AUGMENT) 年龄增长将降低卵子质量进而影响女性生育力,是导致不孕、反复自然流产和出生缺陷的重要因素。卵母细胞成熟障碍会影响减数分裂和有丝分裂,造成非整倍体的增加,同时胞质缺乏某些蛋白成分也会影响早期胚胎发育。

20 世纪 90 年代末期至 21 世纪初的临床研究^[22-24]结果表明,在 ICSI 的同时将少量年轻女性卵子的胞质注入高龄不孕女性卵子内,能有效提高其怀孕率。这种胞质移植技术能提高卵母细胞质量和早期胚胎发育能力,改善反复体外受精失败患者的临床结局。然而,少量外源线粒体引入可导致后代携带两种不同来源的线粒体。在该项试验的 17 例随访患者中,出现了 2 例特纳综合征和 1 例广泛性发育障碍^[25]。因此,线粒体的异质性或许通过表观遗传影响子代性状,或许由操作本身影响染色体的稳定,这些因素均可能给子代带来即时或长期的健康隐患。异体胞质注射技术与 MRT 技术一样,引入了第三方的遗传物质,造成“三亲婴儿”,也势必引起伦理和法律上的争议^[26]。

自体生殖系线粒体移植逐渐进入研究人员视野。生殖系干细胞(OSC)的线粒体与卵母细胞中的线粒体亚显微结构非常接近。OSC 的细胞活动水平较低,OSC 积累较少的 mtDNA 突变。与其他干细胞系相比,OSC 具有相对较好的产生 ATP 的能力。在 2015 年的研究中,3 个中心对共计 104 例有不良辅助生育史的女性采用 AUGMENT 治疗,经过处理的卵子具有更好的胚胎发育能力,患者怀孕率提高了 3~6 倍^[27-28]。AUGMENT 方案采用自体移植,避免了引入第三方遗传物质而导致的伦理和法律争议,且有效改善临床结局,具备良好的临床应用前景。

3 小结与展望

MRT 能够阻断线粒体遗传性疾病,并得到活产子代,但与其相关的安全性和伦理学问题使其无法广泛应用于临床实践。目前国际上唯有英国将 MRT 技术合法化,但仅限于阻断线粒体遗传性疾病。AUGMENT 技术通过提取患者自体 OSC 细胞中的线粒体,扩充卵母细胞线粒体池,进而提高卵母细胞质量,促进胚胎发育和着床,具有重要的理论意义和更现实的临床应用价值,但其技术尚需进一步完善,其临床安全性亦需证实。随着时间的推移和相关技术的改进,线粒体移植技术的子代安全性问题也将趋于明朗,届时该项技术的伦理问题或将被重新考虑。

参 考 文 献

[1] TUPPEN H A, BLAKELY E L, TURNBULL D M, et al.

- Mitochondrial DNA mutations and human disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(2): 113-128.
- [2] ZEVIANI M, MORAES C T, DIMAURO S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome [J]. *Neurology*, 1988, 38(9): 1339-1346.
- [3] CHOL M, LEBON S, BÉNIT P, et al. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency [J]. *J Med Genet*, 2003, 40(3): 188-191.
- [4] VAN BLERKOM J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(5): 797-813.
- [5] 林翠英, 王世鄂. 线粒体与卵母细胞和早期胚胎发育 [J]. *解剖学研究*, 2008, 30(5): 385-388, 354.
- [6] CUMMINS J M. The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis [J]. *Reprod Biomed Online*, 2002, 4(2): 176-182.
- [7] WAI T, AO A, ZHANG X, et al. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(1): 52-62.
- [8] DE PAULA W B, LUCAS C H, AGIP A N, et al. Energy, ageing, fidelity and sex: oocyte mitochondrial DNA as a protected genetic template [J/OL]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368 (1622): 20120263 [2013-06-10]. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1622/20120263.long>.
- [9] CHAPPEL S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst [J/OL]. *Obstet Gynecol Int*, 2013, 2013: 183024 [2013-04-29]. <https://www.hindawi.com/journals/ogi/2013/183024>.
- [10] ZEINAB H, ZOHREH S, SAMADAEE GELEHKOLAE K. Lifestyle and outcomes of assisted reproductive techniques: a narrative review [J]. *Glob J Health Sci*, 2015, 7(5): 11-22.
- [11] JUNGHEIM E S, TRAVIESO J L, CARSON K R, et al. Obesity and reproductive function [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2012, 39(4): 479-493.
- [12] WANG Q, FROLOVA A I, PURCELL S, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in cumulus cells of type I diabetic mice [J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5 (12): e15901 [2010-12-28]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015901>.
- [13] RICHARDSON J, IRVING L, HYSLOP L A, et al. Concise reviews: assisted reproductive technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3): 639-645.
- [14] HYSLOP L A, BLAKELEY P, CRAVEN L, et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease [J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 383-386.
- [15] TACHIBANA M, SPARMAN M, MITALIPOV S. Chromosome transfer in mature oocytes [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(5): e16.
- [16] TACHIBANA M, SPARMAN M, SRITANAUDOMCHAI H, et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2009, 461 (7262): 367-372.
- [17] LEE H S, MA H, JUANES R C, et al. Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck [J]. *Cell Rep*, 2012, 1(5): 506-515.
- [18] ZHANG J, LIU H, LUO S, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease [J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34(4): 361-368.
- [19] WEI Y, ZHANG T, WANG Y P, et al. Polar bodies in assisted reproductive technology: current progress and future perspectives [J/OL]. *Biol Reprod*, 2015, 92(1): 19 [2015-01-01]. <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.125575>.
- [20] WANG T, SHA H, JI D, et al. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases [J]. *Cell*, 2014, 157(7): 1591-1604.
- [21] MONTAG M, VAN DER VEN K, RÖSING B, et al. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening [J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18 (Suppl 1): 6-11.
- [22] COHEN J, SCOTT R, SCHIMMEL T, et al. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs [J]. *Lancet*, 1997, 350(9072): 186-187.
- [23] COHEN J, SCOTT R, ALIKANI M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes [J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(3): 269-280.
- [24] BARRITT J, WILLADSEN S, BRENNER C, et al. Cytoplasmic transfer in assisted reproduction [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(4): 428-435.
- [25] CREE L, LOI P. Mitochondrial replacement: from basic research to assisted reproductive technology portfolio tool-technicalities and possible risks [J]. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21(1): 3-10.
- [26] MITALIPOV S, WOLF D P. Clinical and ethical implications of mitochondrial gene transfer [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(1): 5-7.
- [27] PARK A. The incredible, surprising, controversial new way to make a baby [J]. *Time*, 2015, 185(18): 42-45.
- [28] WOODS D C, TILLY J L. Autologous germline mitochondrial energy transfer (AUGMENT) in human assisted reproduction [J]. *Semin Reprod Med*, 2015, 33(6): 410-421.

(收稿日期: 2017-09-05)

(本文编辑: 陈蔚)