

不孕相关疾病以及辅助生育技术的研究进展

黄荷凤, 刘爱霞

(浙江大学医学院 附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 影响妇女生育健康的疾病是导致妇女不孕不育的重要原因。对与不孕相关疾病进行基础和临床系列的研究,将有助于探索、优化对这些疾病的处理方案。辅助生育技术是目前治疗不孕症的重要手段,与此同时也为人类生殖医学基础研究和临床应用带来了新的挑战。其中,卵巢低反应的发生机理、辅助生育技术对于代遗传物质的影响、胚胎活检的结局和安全性评估、卵母细胞体外成熟效率以及人类胚胎干细胞建系等,一直是国内外学者关注的热点。

[关键词] 子宫内膜异位症;多囊卵巢综合征;宫颈炎;不孕;辅助生育技术;卵巢低反应;印记基因;卵母细胞;干细胞

[中图分类号] R 711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)05-0417-07

影响妇女生育健康的疾病,如子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征、生殖道和盆腔炎症以及肿瘤等,主要是通过影响卵细胞的发育和成熟、受精、胚胎着床和发育等多个环节的生殖过程,成为妇女不孕不育的重要原因。对上述疾病不孕机制的研究、探索和优化治疗方案一直是国内外学者关注的热点。辅助生育技术经过近30年的发展,已取得了举世瞩目的成绩,已成为现代不孕症治疗的重要组成部分。同时,辅助生育技术的发展也推动了人类生命研究理论以及研究技术向更高、更深层次的发展,并超越了人类生殖医学本身的意义。

1 女性不孕相关疾病

不孕症是妇科常见病之一,据国内外资料统计,女性因素引起的不孕约为60%。80%的女性不孕由解剖、内分泌异常、感染及肿瘤等因素所致,20%为不明原因造成。其中,子宫内膜异位症不孕机制一直是国内外学者关注的热点。多囊卵巢综合征是无排卵型不孕症的主要原因之一。近来,对于卵巢局部调节机制的深入研究,不仅加深了人们对卵泡发育和成熟的认识,也对改善此类患者的生育结局提供了新的思路。生殖道以及盆腔感染从破坏局部解剖结构、

微生态失衡、微环境和免疫功能的异常等方面的改变而影响自然受孕。近年来,由于以上相关疾病患病率呈现不断升高的趋势,已成为不孕基础和临床研究的重点。

1.1 子宫内膜异位症与不孕 子宫内膜异位症(endometriosis,简称内异症)是育龄妇女的多发病和常见病。内异症是一种始于细胞水平而终止于以盆腔疼痛和不孕为特点的持续性病变,严重影响妇女的健康和生活质量,也是不孕症的主要病因之一,不孕率高达40%^[1]。

内异症患者的免疫功能异常与不孕有关。近年研究发现,抗子宫内膜抗体达到一定量时,可与自身靶细胞-子宫内膜组织产生抗原抗体结合反应,并激活补体引起损伤性效应,造成子宫内膜组织细胞生化代谢和生理功能的损害,干扰和妨碍精、卵结合以及受精卵的着床和胚囊的发育,最终导致流产或不孕。

内异症患者腹腔局部微环境的改变,是轻度内异症不孕发病机制的新靶点。研究发现内

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-07-05

基金项目: 国家973项目(2006CB944006)。

作者简介: 黄荷凤(1957-),女,教授,博士生导师,从事妇产科生殖内分泌研究; E-mail: huanghefg@hotmail.com.

异症患者腹腔液中有多种成分发生改变,如IL-1、IL-8、IL-10^[2-4]、表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属酶(MMPs)和一氧化氮^[5-8]等。近年发现,内异症患者腹腔液中有异常表达的fractalkine,该分子通过与精子表面受体CX3CR1的作用,降低精子活动度^[9-10]。总之,内异症患者腹腔液成分的改变可导致盆腔微环境改变,从不同环节影响卵细胞发育、精子活性、受精以及胚胎发育,导致不孕的发生。

1.2 多囊卵巢综合征(PCOS)与不孕 PCOS是育龄期妇女中最常见的内分泌疾病之一,是危害女性生殖健康的重要原因,发病率高达6%~10%。PCOS病因及发病机制十分复杂。近来越来越多的研究表明,卵巢局部调控机制紊乱是导致卵泡发育异常的重要原因^[11-12]。卵巢局部分泌的促卵泡增殖生长的因子,如胰岛素样生长因子、瘦素、生长分化因子9和骨形成蛋白-15^[13-15]等,在PCOS发病中的作用机制已见较多报道,但针对卵泡凋亡相关因子的作用机制的研究较少见。我们首次发现细胞凋亡调节蛋白cathepsin D在人卵巢组织中有表达,并观察到cathepsin D蛋白在PCOS患者卵巢中表达降低,推测cathepsin D表达改变可能与PCOS患者卵巢中卵泡发育异常有关^[16]。另一方面,我们发现参与颗粒细胞水转运和卵泡发育及凋亡相关的水通道蛋白9(AQP9),在PCOS患者卵巢窦状卵泡的颗粒细胞的胞浆和胞膜有表达^[17-19],推测AQP9可能与PCOS患者卵泡中过多卵泡液生成有关。当然,要证实上述分子在PCOS病理发生中的确切作用机制仍然需要大量的研究事实。

1.3 宫颈炎与不孕 子宫颈微环境与人类生殖密切相关。子宫颈像一种生物瓣膜,在生殖周期的一定时期允许精子通过并进入宫腔、输卵管,以达到受孕目的。宫颈及其分泌物能发挥筛选及蓄精池的作用^[20-21]。慢性宫颈炎时,由于局部炎症性反应,大量白细胞浸润,宫颈腺体异常分泌和阴道微生态的失衡致大量非常态微生物包括致病性微生物的繁殖,宫颈微环境发生明显变化,黏液的理化性状发生病理性改变。上述改变可能是通过影响到达受精部位的精子数

量、运动力以及存活时间,诱发自身免疫反应,导致抗精子抗体产生,阻碍精子通过宫颈黏液等多个环节影响生殖过程^[22-23]。我们发现,慢性宫颈炎患者经聚焦超声治疗后宫颈黏液的性状得到明显改善。同时,性交后试验显示聚焦超声治疗后宫颈黏液中a级和b级精子数目较治疗前明显增多。其机理可能是将高频超声波作用于组织内,使局部组织瞬间高热,杀灭宫颈局部病原微生物。另外,聚焦超声作用于病变组织所产生的各种效应可使病变组织变性,促进组织重建,从而改善了微循环及局部组织的营养,有利于受孕^[24]。

2 辅助生育技术

近30年来,辅助生育技术(ART)突飞猛进,该技术极大地提高了不孕症治疗的成功率,同时也为人类生殖医学基础研究和临床应用带来新的问题。其中,卵巢低反应的发生机制仍不清楚,因此针对卵巢低反应的筛查和治疗仍是控制超促排卵(COH)的棘手难题。植入前遗传学诊断(PGD)是产前诊断的一种补充措施,其在优生优育中蕴含巨大潜力,但是胚胎活检的结局及安全性仍需要谨慎评估;ART作为由多种技术手段综合的系统治疗过程,技术本身是否对胚胎遗传物质造成影响,还需要深入研究;人未成熟卵母细胞体外培养成熟是现代生殖医学的研究热点和前沿技术。由于目前卵母细胞体外成熟(IVM)技术难以完全模拟体内卵母细胞成熟的生理环境,其临床应用还需要不断地摸索。令人鼓舞的是,人胚胎干细胞(hES)的建系效率不断提高和培养体系的完善,为生产临床应用安全标准的hES奠定了基础。但是,迄今为止建立的hES系仍有很大的偶然性。只有对干细胞基础研究不断深入,才能为将来大规模建立并生产符合临床应用标准的hES系打开希望之门。

2.1 卵巢低反应 Garcia等(1983年)将卵巢低反应定义为hMG刺激后E₂峰值小于300 pg/ml。在控制性促排卵治疗过程中,大约有9%~24%的妇女对促性腺激素的反应差,表现为卵泡数量少、E₂峰值低,妊娠率极低。超促排卵中卵巢低反应发生的本质是卵巢储备的下降,造

成卵巢低反应的原因包括高龄、遗传、免疫性因素、以往卵巢功能的缺陷或受损以及环境因素等。近来发现,BMP-15和FSH-FSHR等卵巢局部调节机制异常在卵巢低反应发生中占有重要的作用。动物实验研究证明,卵母细胞来源的旁分泌因子BMP-15能调控周围颗粒细胞的分裂,对正常卵母细胞发育及生殖功能具有重要的影响^[25-27]。我们发现,在超促排卵过程中,卵巢低反应妇女的卵泡液BMP-15水平显著高于正常反应妇女,颗粒细胞FSHR mRNA和蛋白水平均显著低于卵巢中高反应者。推测卵巢低反应患者FSHR表达的显著降低可能与BMP-15的高表达有关^[28];卵泡BMP-15的水平可作为评价卵泡发育的指标。因而,进一步研究卵母细胞来源因子的作用机理及相互关系,揭示卵巢局部调节机制,对探索、预测和治疗卵巢低反应的新方法有极大的潜在意义。

2.2 基因印迹与胚胎发育及辅助生育技术

基因组印迹(genomic imprinting)也称亲源印迹,是一种不遵循孟德尔遗传规律的亲本等位基因差异表达现象,即DNA甲基化修饰通过启动子附近的差异甲基化区域控制等位基因的不对称表达。具有这种现象的基因被称为印迹基因(imprinted gene)。目前证实的人类印迹基因有51个(<http://igc.otago.cn.nz/home.html>)。对于基因印迹的产生及其调控机制,特别是配子形成过程中印迹擦除或重建,目前所知仍然有限。DNA差异甲基化,特殊的染色质结构和反义转录产物表型遗传修饰可能参与调节基因印迹产生和维持。其中,不同亲本来源的两个等位基因不同程度的甲基化,即差异甲基化是印迹形成最可能的机制。

研究发现,基因印迹对原始生殖细胞细胞核全能性、配子成熟、胚胎生长发育、胎盘结构和功能以及出生后个体的生长发育均有重要意义^[29-31]。著名的小鼠单性生殖胚胎学实验发现,孤雄生殖的胚胎发育差而胎盘发育相对良好,而孤雌生殖的胚胎生长相对正常而胎盘发育差,两者都无法存活至分娩,说明双亲来源的基因组对维持正常妊娠有不同的调节作用。母源性印迹基因的主要功能是调节胚胎生长发育,降低胎盘过度生长,并维持胎盘组织正常结构。

而基因组印迹的错误可引发胚胎性肿瘤或死胎,也可导致多种人类遗传综合征,如BWS综合征(Beckwith-Wiedemann syndrome)、SRS综合征(Silver-Russell syndrome)、新生儿一过性糖尿病(transient neonatal diabetes mellitus)、PWS综合征(Prader-Willi syndrome)和AS综合征(Angelman syndromes)^[32]等。

目前有研究报道,这些由遗传印迹异常导致的疾病可能与ART存在一定关系^[33]。近30年来,全世界通过辅助生育技术出生的健康婴儿数以万计,异常婴儿虽然只有零星报道,但这个现象已受到重视。ART作为由多种技术手段综合的系统治疗过程,技术本身对胚胎发育的影响是否涉及到印迹基因的建立、维持、擦除和重建等过程,需要进行深入与谨慎地研究。

2.3 胚胎植入前遗传学诊断(PGD) 遗传学

疾病是威胁人类生殖健康的重要疾病之一。自1989年Handyside等^[34]首次采用PCR技术完成世界上首例胚胎PGD以来,PGD的临床应用例数在全球范围内逐年稳步上升^[35-36],并广泛应用于性连锁疾病、单基因疾病、常染色体异常及高危人群非整倍体的检测。罗伯逊易位是人类染色体结构异常中的常见类型,活产出生率约为1.23/1000^[37]。罗伯逊易位携带者虽然可通过自然受孕或产前诊断获得正常妊娠,但对于大部分患者来说,自然妊娠率低,而流产率高。将荧光原位杂交技术应用用于罗伯逊易位的胚胎植入前诊断,已经在世界范围内展示了良好的应用前景。权威资料显示,2003年度全球PGD在罗伯逊易位患者中应用的统计资料表明:360个PGD周期,其中移植周期260个,获得临床妊娠66例,妊娠率25.4%(66/260)^[38]。同时,胚胎活检随之而来的安全性和嵌合现象也受到广泛关注。基于早期发育胚胎细胞全能性的理论,细胞活检不会影响剩余胚胎的质量。但是,由于胚胎发育的不平衡性,活检时期并不能保证。另一方面,学者对于PGD活检的细胞数目也有争议。研究发现,易位患者的胚胎嵌合率高于染色体正常组,且嵌合多发生在易位的染色体上^[39-40]。因此,分析1个以上细胞可以提高诊断的准确性,降低嵌合胚胎带来的误诊率和漏诊率。但是,也有学者指出,一定比例的细

胞丢失可能降低内细胞团与滋养外胚层细胞数目的比例^[41]。我们认为,活检1个以上细胞在提高诊断准确性的同时会降低胚胎的种植率。因此,在以获得正常临床妊娠为目的PGD应用中,活检细胞数超过1个是不明智的。

2.4 卵母细胞体外成熟 卵母细胞体外成熟技术的应用可以避免卵巢过度刺激综合征风险,减少促排卵药物的治疗费用,避免多次促排卵引发卵巢癌发生的潜在风险,为妇女生殖保存提供技术支持等。尽管IVM技术有诸多优点,但至今未被作为常规的ART技术^[42],主要原因在于目前IVM技术难以完全模拟体内卵母细胞成熟的生理环境。

为探索这一关键问题,我们采用了不同的取卵周期准备、卵泡直径、IVM培养液成分,比较了它们对未成熟卵的获取率、成熟率、受精率、卵裂率、优质胚胎率、着床率、妊娠率和出生率及其胚胎冷冻复苏移植的影响。研究发现,IVM周期可以获得与常规IVF/ICSI周期相似的胚胎冻存-复苏移植后的妊娠率,而且出生后代外观未发现严重畸形。目前我们初步建立了经IVM-IVF-胚胎冷冻-复苏移植的治疗方法,如果能进一步改善IVM培养系统,提高妊娠成功率,IVM将拥有更广阔的应用前景^[43]。

2.5 胚胎干细胞 干细胞按分化阶段不同,分为胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hES)和成体干细胞(adult stem cell, ASC)。其中, hES是取自人囊胚内细胞团,经体外分离、培养获得的一种原始多能(pluripotent)干细胞。它具有体外无限增殖和多向分化潜能两个基本特点,在移植或体外适当培养条件下能够自发或被诱导分化为三个胚层的多种类型细胞^[44]。

一般来说, hES在体外传至15代以上,并保持hES的基本特性,可以说建系基本成功^[45]。目前建立的hES细胞株主要来源于临床进行IVF-ET和胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)治疗的患者捐赠的多余废弃胚胎^[46]。最近有报道利用小鼠的单个卵裂球分离并培养了5个胚胎干细胞系和7株滋养干细胞系^[47],如果将该技术应用于hES的建系,不仅可解决伦理的争议,而

且也大大扩充了建系的胚胎来源。另一方面, 人源饲养层细胞的应用^[48]和无饲养层培养体系的建立^[49],为生产临床应用安全标准的hES奠定了基础。

人胚胎干细胞系的分离和体外成功培养具有极其重要的研究和临床应用价值。hES可用于体外研究人类胚胎发生发育过程,有助于理解分化发育机理、认识生命和疾病现象。通过对其体外分化和定向分化的研究,识别某些靶基因,为人类新基因的发现及其功能的研究提供新方法。hES最为深远的潜在用途是通过定向分化诱导产生各种特化的细胞和组织,并将其用来修复或替换丧失功能的组织和器官,从而治疗许多疾病,如帕金森病、老年痴呆症、脊髓损伤、中风、烧伤、心脏病、糖尿病、白血病和骨关节炎等^[50]。经过遗传工程改造的hES可为人类疾病的基因治疗开辟更广泛的应用前景。

3 结 语

不孕症发病率不断增加的现状令人担忧,针对生殖生理与病理不同层次和方面进行深入的研究,不仅可以加深对不孕病因的认识,同时对于优化不孕相关疾病的处理方案也具有重要的意义。另一方面, ART的发展经历了人工授精至IVF-ET,直到最近的克隆和人类胚胎干细胞研究的辉煌历程。其中, IVF婴儿诞生以及克隆技术的成功作为现代医学的伟大成就,使人们对生殖医学的了解有了极大进步,由此派生出的许多生殖科技形成了近代人类生殖医学发展新态势。如今,重组促排卵药物的问世,卵母细胞和胚胎系统体外培养体系改进,囊胚培养技术的开展和完善,人类胚胎干细胞系的成功建立,为生殖科技进步提供了重要的物质基础。

References:

- [1] BOLARINDE O, WILLIAM L L. Endometriosis and Infertility [J]. *Women's Health Medicine*, 2005, 2(1): 15-17.
- [2] ESFANDIARI N, FALCONE T, GOLDBERG J M, et al. Effects of peritoneal fluid on preimplantation mouse embryo development and apoptosis *in vitro* [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11(5): 615-619.

- [3] GOMEZ-TORRES M J, ACIEN P, CAMPOS A, et al. Embryotoxicity of peritoneal fluid in women with endometriosis. Its relation with cytokines and lymphocyte populations [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(3):777-781.
- [4] IWABE T, HARADA T, TERAOKAWA N. Role of cytokines in endometriosis-associated infertility [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2002, 53 (Suppl 1):19-25.
- [5] HUANG J C, YEH J. Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression in endometriosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79(4):1097-1101.
- [6] SHIFREN J L, TSENG J F, ZALOUDEK C J, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, (8):3112-3118.
- [7] HUANG H F, HONG L H, TAN Y, et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with changes in steroid hormones in the sera and peritoneal fluid of patients with endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(5):1235-1239.
- [8] LUO Q, DONG L J, HUANG H F (罗琼, 董丽军, 黄荷凤). Increased nitric oxide levels in peritoneal fluids of minor-endometriosis patients and its relation to IVF-ET outcomes [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(5):424-428. (in Chinese)
- [9] SHIMOYA K, ZHANG Q, TEMMA A K, et al. Fractalkine in the peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2005, 91 (1):36-41.
- [10] ZHANG Q, SHIMOYA K, OHTA Y, et al. Detection of fractalkine in human seminal plasma and its role in infertile patients [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17:1560-1564.
- [11] AMSTERDAM A, SASSON R, KEREN T I, et al. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66:1355-1362.
- [12] JIANG J Y, CHEUNG C K, WANG Y, et al. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia [J]. *Front Biosci*, 2003, 8:d 222-d 237.
- [13] LUDWIG A K, WEISS J M, TAUCHERT S, et al. Influence of hypo- and hyperglycaemia on plasma leptin concentrations in healthy women and in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(6):1555-1561.
- [14] MAKOTO O, SANAE O, JIN Y J, et al. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage [J]. *Mol Endo*, 2006, 20(10):2456-2468.
- [15] MCNATTY K P, JUENGEL J L, READER K L, et al. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants [J]. *Reproduction*, 2005, 129(4):481-487.
- [16] JIN M, CAI J, HU Y J, et al (金敏, 蔡婕, 胡燕军, 等). Cathepsin D expression in the ovaries from patients polycystic ovarian syndrome patients [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(5):429-432. (in Chinese)
- [17] ZEUTHEN T. How water molecules pass through aquaporins [J]. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2001, 26(1):77-78.
- [18] MCCONNELL N C, YUNUS R S, GROSS S A, et al. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins [J]. *Endocrinology*, 2005, 43(8):2905-2912.
- [19] JABLONSKI E M, WEBB A N, MCCONNELL N A, et al. Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(4):C 975-C 985.
- [20] DUNSON D B, BIGELOW J L, COLOMBO B. Reduced fertilization rates in older men when cervical mucus is suboptimal [J]. *Obstet Gynecol*, 2005, 105(4):788-793.
- [21] SUAREZ S S, PACEY A A. Sperm transport in the female reproductive tract [J]. *Human Reproduction Update*, 2006, 12(1):23-37.
- [22] KATZ D F, MORALES P, SAMUELS S J, et

- al. Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus [J]. **Fertil Steril**, 1990, 54(3): 513-516.
- [23] DIMITROVA D, KALAYDJIE S, HRISTOV L, et al. Antichlamydial and antisperm antibodies in patients with chlamydial infections [J]. **Am J Reprod Immunol**, 2004, 52(5): 330-336.
- [24] LIN Z Y, XU J, WANG H Y, et al (林珍云, 徐健, 王惠云, 等). Improvement of cervical microenvironment after treatment of chronic cervicitis with focused ultrasound in infertility women [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical sciences** (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(5): 454-457. (in Chinese)
- [25] JUEGENGEL J L, HUDSON N L, HEALTH D A, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep [J]. **Biol Reprod**, 2002, 67(6): 1777-1789.
- [26] MOORE R K, ERICKSON G F, SHIMASAKI S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals [J]. **Trends Endocrinol Metab**, 2004, 15: 356-361.
- [27] GALLOWAY S M, MCNATTY K P, CAMBRIDGE L M, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner [J]. **Nat Genet**, 2000, 25: 279-283.
- [28] WU Y T, LU X E, WANG T T, et al (吴琰婷, 陆秀娥, 王婷婷, 等). Women with poor response to ovarian stimulation have increased follicular bone morphogenetic protein-15 levels [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical sciences** (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(5): 439-442. (in Chinese)
- [29] LUCIFERO D, MANN M R, BARTOLOMEI M S, et al. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting [J]. **Hum Mol Genet**, 2004, 13(8): 839-849.
- [30] MARQUES C J, CARVALHO F, SOUSA M, et al. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis [J]. **Lancet**, 2004, 363(9422): 1700-1702.
- [31] BURNS J L, HASSAN A B. Cell survival and proliferation are modified by insulin-like growth factor 2 between days 9 and 10 of mouse gestation [J]. **Development**, 2001, 128(19): 3819-3830.
- [32] CONSTANCIA M, KELSEY G, REIK W. Resourceful imprinting [J]. **Nature**, 2004, 432(7013): 53-57.
- [33] WINSTON R M L, HARDY K. Are we ignoring potential dangers of *in vitro* fertilization and related treatments [J]. **Nature Cell Biology**, 2002, 4: S 14-S 18.
- [34] NIELSEN J, WOHLERT M. Chromosomes abnormalities found among 34 910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark [J]. **Hum Genet**, 1991, 87(1): 81-83.
- [35] HANDYSIDE A H, KOTOGIANNI E H, HARDY K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification [J]. **Nature**, 1990, 344(6268): 768-770.
- [36] SERMON K, MOUTOU C, HARPER J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection IV; May-December 2001 [J]. **Hum Reprod**, 2005, 20(1): 19-34.
- [37] HARPER J C, BOELAERT K, GERAEDTS J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection V; cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003 [J]. **Hum Reprod**, 2006, 21(1): 3-21.
- [38] SERMON K D, MICHIELS A, HARTON G, et al. ESHRE PGD Consortium data collection VI; cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004 [J]. **Hum Reprod**, 2007, 22(2): 323-336.
- [39] EMILIANI S, GONZALEZ M E, VAN DEN BERGH M, et al. Higher degree of chromosome mosaicism in preimplantation embryos from carriers of robertsonian translocation (13; 14) in comparison with embryos from karyotypically normal IVF patients [J]. **J Assist Reprod Genet**, 2003, 20(2): 95-100.
- [40] IWARSSON E, MALMGREN H, INZUNZA J, et al. Highly abnormal cleavage divisions in preimplantation embryos from translocation carriers [J]. **Prenat Diagn**, 2000, 20(13): 1038-

- 1047.
- [41] EDGAR D H, BOURNE H, JERICHO H, et al. The developmental potential of cryopreserved human embryos [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169(1-2): 69-72.
- [42] MIKKESSEN A L. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(5): 593-599.
- [43] ZHU Y M, HUANG H F, YE Y H, et al (朱依敏, 黄荷凤, 叶英辉, 等). *In vitro* maturation—*in vitro* fertilization—embryo transfer—frozen-thawed of human oocytes [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(5): 443-448. (in Chinese)
- [44] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282: 1145-1147.
- [45] BIVANLOU A H, GAGE F H, JAENISCH R, et al. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells [J]. *Science*, 2003, 300(5621): 913-916.
- [46] BONGSO A, FONG C Y, NG S C, et al. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts [J]. *Hum Reprod*, 1994, 9: 2110-2117.
- [47] BECKER S, CHUNG Y. Embryonic stem cells from single blastomeres [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 418: 108-116.
- [48] JUNG B L, JEOUNG E L, JONG H P, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition [J]. *Biology of reproduction*, 2005, 72: 42-49.
- [49] XU C H, INOKUMA M S, DENHAZ J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Nature Biotechnol*, 2001, 19: 971-974.
- [50] HEINS N, ENGLUND M C, SJOBOM C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 367-376.

[责任编辑 黄晓花]

《浙江大学学报:医学版》征订和征稿启事

《浙江大学学报:医学版》是由国家教育部主管,浙江大学主办的报道医药学等方面研究成果的学术性刊物。主要登载医学、药学、生物医学以及相关学科的学术论文。读者对象为医务工作者、医药学教育和科研人员,以及研究生等。

《浙江大学学报:医学版》被多种国外著名的期刊数据库和文摘刊物作为收录对象,例如被美国的《化学文摘》(CA)和俄罗斯的《文摘杂志》(AJ)收录,特别是被国际上在医学领域中最权威的美国《医学索引》,即IM/Medline收录,刊物印刷本被美国国立医学图书馆永久收藏。该刊欢迎作者投稿,稿件的取舍以学术质量为标准,一视同仁。投稿须知请查阅网址(<http://www.journals.zju.edu.cn/med>)上所登载的要求。

《浙江大学学报:医学版》编辑部地址:杭州市天目山路148号;邮编:310028;

电话:0571-88272797;电子邮箱:zdxbyxb@zju.edu.cn;国内邮发代号:32-2,国外邮发代号BM6585;定价:5.00元/期,30.00元/年;订阅:全国各地邮局。