



利用辅助生殖技术阻断线粒体疾病发生与遗传的可行性探讨

罗世明^{1,2,3*}, 陈雷宁^{1,2,3}, 欧湘红^{1,2,3}, 孙青原^{1,2,3}

1. 广东省第二人民医院生殖医学中心, 广州 510317;

2. 广东省第二人民医院, 代谢与生殖粤港联合实验室, 广州 510317;

3. 广东省第二人民医院, 广州市代谢疾病与生殖健康重点实验室, 广州 510317

* 联系人, E-mail: luoshm@gd2h.org.cn

收稿日期: 2023-07-13; 接受日期: 2023-08-29; 网络版发表日期: 2024-01-05

国家自然科学基金(批准号: 82071714)资助

摘要 线粒体是细胞的能量工厂, 线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变会影响线粒体功能的发挥, 进而引发线粒体疾病. 线粒体功能的异常不仅影响各组织器官功能的发挥, 也是影响个体发育的重要因素, 尤其是对一些不可再生的细胞和组织, 这种影响将是终生的, 且没有任何治疗手段可对其进行恢复. 近几年, 有关mtDNA的基因编辑技术取得了重要进展, 对已出生的线粒体疾病患者的治疗具有潜在重要意义, 但无法阻断线粒体疾病向后代的传递. 利用辅助生殖技术在胚胎形成时即对线粒体疾病进行阻断有可能成为最有效、可靠和简单的治疗和阻断线粒体疾病遗传的方法. 本文将主要从有效性、安全性以及局限性等方面, 探讨利用辅助生殖技术阻断线粒体疾病的发生与遗传的可行性.

关键词 线粒体DNA, 线粒体疾病, 辅助生殖技术, 线粒体置换技术

线粒体是细胞中除细胞核外, 唯一拥有自己基因组的细胞器, 其基因组较为简单, 由一条含有约16000个碱基对的环状双链DNA组成, 称为线粒体DNA(mitochondrial DNA mtDNA)^[1]. 通过电子传递链的氧化磷酸化作用, 线粒体负责细胞中90%以上ATP的产生, 此外, 它还参与代谢、钙存储、凋亡、自噬、表观调控等众多生物学事件^[2,3]. 因此, 功能异常的线粒体将严重影响细胞功能的发挥, 导致疾病如线粒体肌无力症(mitochondrial myopathy)、线粒体脑肌病(mitochondrial encephalomyopathy)、眼肌运动障碍(ophthalmo-

plegia)、线粒体性耳聋(mitochondrial hearing loss)等的发生^[4]. 并且, 也正是由于线粒体功能的多样性和复杂性, 目前, 针对线粒体疾病尚无有效治疗方法, 只能针对具体的症状辅以相关的药物进行缓解^[5,6].

线粒体由约含有1500种蛋白质, mtDNA编码了其13种, 剩下的均为核基因组所编码. 因此, 线粒体疾病的发生既可以是核基因组突变所致, 也可以是mtDNA突变所致^[6]. 本文将主要探讨利用辅助生殖技术阻断mtDNA突变所致疾病的可行性, 因此, 如无特别说明, 以下线粒体疾病均指mtDNA突变所致.

引用格式: 罗世明, 陈雷宁, 欧湘红, 等. 利用辅助生殖技术阻断线粒体疾病发生与遗传的可行性探讨. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 187–196
Luo S M, Chen L N, Ou X H, et al. Blocking mitochondrial diseases with assisted reproductive technology (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 187–196, doi: 10.1360/SSV-2023-0149

1 mtDNA特征以及其线粒体疾病之间的关系

不同于核基因组的二倍体型, 每个细胞中含有拷贝数量不等的mtDNA, 根据不同的细胞类型和所处时期, 通常几百至几千个拷贝, 对能量需求越高的细胞, 如神经细胞和心肌细胞, 含有的mtDNA越多^[7,8]。值得注意的是, 精子为含有mtDNA最少的细胞, 受精前大部分精子mtDNA被降解清除, 最后只剩下没有mtDNA的功能性线粒体以维持受精, 因此, 其数量通常为0至几十个拷贝不等^[9,10]。而卵子则为含mtDNA数量最多的细胞, 通常为 $10^5 \sim 10^6$ 拷贝, 为受精后细胞的快速分裂和高能量需求提供保障^[11,12]。由于精子和卵子mtDNA拷贝数的巨大差异, mtDNA和线粒体疾病主要属于母系遗传^[9,13]。也有部分研究发现, mtDNA可以通过精子遗传给后代从而形成双亲mtDNA遗传^[14], 但是一则此类报道较少, 二则对于这种现象还存在较大的争议, 有研究认为检测到的精子来源的mtDNA并不是精子mtDNA而是来源于核内线粒体DNA片段(nuclear-mitochondrial segments, NUMTs)^[15,16]。本团队^[9]曾在小鼠中发现, 大部分精子在受精前将其mtDNA清除了, 只剩下不含mtDNA的功能性线粒体, 如果精子mtDNA未在受精前被彻底清除, 则可在胎盘或个别组织中检出。因此, 尽管存在父系mtDNA遗传给其子代的个别现象, 但遗传的mtDNA数量和比例都极低, mtDNA和线粒体疾病仍然以母系遗传为主。

线粒体基因组没有内含子, 除编码13个多肽的基因外, 还编码22个tRNA和2个rRNA, 共37个基因。因此, mtDNA的突变极易影响线粒体功能的发挥, 尤其是tRNA和rRNA的突变, 对13个多肽的翻译产生全局性的影响^[6,13,17]。此外, 细胞中含有多个mtDNA, 当这些mtDNA的序列完全一致时, 称为匀质性mtDNA, 而当其含有两种以上的mtDNA时, 则称为异质性mtDNA^[7,18]。因此, 除mtDNA序列外, mtDNA的异质性也是决定线粒体疾病的重要因素。通常认为, 当机体中含有的突变mtDNA比例超过60%以上时, 才会引起线粒体疾病的病症^[19]。

mtDNA的复制不依赖于细胞周期, 除在部分细胞如早期胚胎发育的过程中mtDNA不复制外^[9,20], 总体上, mtDNA的复制次数远大于核基因组的复制次数。

尤其是在卵母细胞成熟过程中, 从原始生殖细胞到成熟卵母细胞, 核基因组仅复制一次, 而mtDNA的复制次数高达 $10^3 \sim 10^4$ 次^[21]。伴随着mtDNA的复制, 产生突变的概率也会显著增加。此外, mtDNA相对裸露, 只有很少的转录因子和复制因子等蛋白结合在上面, 而线粒体是细胞中产生活性氧最多的细胞器, 因此, mtDNA更容易受到活性氧攻击产生突变^[22,23]。再者, mtDNA的修复系统相对简单, 致使突变的mtDNA发生累积^[23,24]。总之, mtDNA由于更高频率的复制, 和更容易受到活性氧攻击的特点, 以及缺少高效的修复系统, 其突变远高于核基因组, 总体约为10~20倍左右^[25,26]。因此, 线粒体疾病是一种较为常见的遗传病, 患病比例约为1/5000^[27~29]。

2 利用基因编辑技术对线粒体疾病进行治疗

近十来年, 基因编辑技术发展迅速, 而线粒体疾病是一种母系遗传病, 通过基因编辑技术编辑突变的mtDNA对其进行治疗具有高效性、定点修复、潜在的治愈性、适应性强等较为明显的优势, 是重要的研究方向^[30~33]。然而, 相对于其他遗传病, 利用基因编辑技术治疗线粒体疾病具有更高的难度, 主要表现为: (i) 任何基因编辑技术都存在剂量效应, 考虑到细胞中含有几百至几千拷贝的mtDNA, 将会存在脱靶和效率低下的矛盾, 当相应的效应分子如单碱基编辑器等过高时会显著提高对核基因组脱靶的可能性, 而当效应分子浓度偏低时会降低基因编辑的效率, 达不到治疗目的; (ii) 缺少高效的将效应分子如DNA、蛋白和RNA导入至不同细胞的技术, 尤其是考虑细胞中存在的众多mtDNA, 该局限性尤为凸显; (iii) 同一细胞中可能存在不同突变位点mtDNA的情况, 显著加大基因编辑的难度; (iv) 由于线粒体属于双层膜结构, 其mtDNA处于线粒体基质中, 目前尚无有效方法将RNA载入到线粒体基质中, 从而限制了当前最为高效的基因编辑技术Cas9的应用^[18,34]。因此, 对于已出生的线粒体疾病患者, 通过对mtDNA进行编辑或有选择性地降解以实现线粒体疾病进行治疗是重要的研究方向, 具有重要的研究意义, 但相比普通的遗传病, 具有更高的难度, 有更多的技术问题亟待解决。

3 利用辅助生殖技术对线粒体疾病的发生和遗传进行阻断的可行性

不同于部分核基因组的基因, 仅在出生后, 甚至是在一定的年龄后才发挥功能, 线粒体是细胞的能量工厂, 对于细胞的分化、增殖和凋亡等有着重要影响, 突变mtDNA对个体发育会造成不可逆的损伤^[35,36]. 因此, 利用辅助生殖技术在胚胎形成之初即对线粒体疾病的发生进行阻断具有重要意义, 是治疗线粒体疾病最为有效和可靠的途径^[18].

线粒体疾病属于母系遗传, 所有mtDNA均来源于卵母细胞, 因此, 通过辅助生殖技术利用供卵进行体外受精并移植, 是阻断线粒体疾病的最简单技术^[18,19,37]. 然而, 通过这种方法所获得的个体, 由于其母亲的核基因组无法遗传给后代, 并不为患者所接受. 因此, 这种方法虽最为简单高效, 其应用价值和意义有限.

线粒体置换技术(mitochondrial replacement technology, MRT)是通过显微操作对卵母细胞或受精卵胞质置换, 从而将突变的mtDNA置换成正常的mtDNA, 而保留核基因组的辅助生殖技术^[18,19,37]. 因决定个体性状的信息主要为核基因组, 线粒体基因组对其影响十分有限, 因此, MRT是当前阻断线粒体疾病最为有效和现实的途径. 根据核基因组所处的时期和状态, 胞质置换技术可分为生发泡移植、纺锤体移植、第一和第二极体移植以及原核移植(图1)^[19].

3.1 生发泡移植

生发泡移植后的卵母细胞可完成成熟、受精、早期胚胎发育等事件, 并最终出生后代, 具备用于卵母细胞成熟异常情况的潜在价值^[38,39]. 然而, 生发泡移植技术有一定的局限性, 主要表现为: 一方面, 由于生发泡时期有非常明显的线粒体围核现象, 生发泡移植过程中, 容易导致携带过多的突变mtDNA到重构胚胎中; 另一方面, 生发泡时期, 有大量的颗粒细胞附着在卵母细胞周围, 且没有透明带间隙, 不利于显微操作^[19]. 此外, 体外成熟的卵母细胞发育能力明显降低, 尤其是成熟培养早期卵丘细胞的存在有利于卵母细胞质的成熟, 再考虑到突变mtDNA一般并不影响卵母细胞成熟和受精, 无需借助生发泡移植克服卵母细胞成熟和受精障碍, 目前生发泡移植并没有被应用于临床线粒体置换治疗.

3.2 纺锤体移植

卵母细胞经过第一次减数分裂成熟后, 停止在第二次减数分裂中期(metaphase II, MII), 该时期的染色体以浓缩的染色体形式存在, 并通过着丝粒与纺锤体微管相连, 组成纺锤体-染色体复合体(也称为减数分裂器), 定位于细胞膜下. 在偏振光显微镜下, 纺锤体-染色体复合体清晰可见, 因此, 非常适合于做胞质置换. 2001年, 通过两种不同品系的小鼠, 本团队^[40]证实了可通过纺锤体移植出生小鼠. 2009年, Tachibana等人^[41]在非人类灵长类(*Macaca mulatta*)进一步证实了利用纺锤体移植阻断线粒体疾病的可行性. 2016年, 首例通过纺锤体移植对线粒体疾病进行阻断的婴儿出生于墨西哥, 出生后对该男婴的mtDNA进行检测, 表明其携带突变mtDNA的比例为2.36%~9.23%, 远低于会导致线粒体疾病的阈值(60%)^[42]. 2023年, Costa-Borges等人^[43]报道了一项关于纺锤体移植的先导研究, 为治疗原发性不孕(无线粒体疾病), 该课题进行了28例纺锤体移植, 植入了其中的19个胚胎, 最终有6个婴儿出生, 随后对这些婴儿进行检查均未发现明显缺陷. 此外, 通过单细胞多组学技术, Qi等人^[44]比较了纺锤体移植后的胚胎和对照组胚胎的转录组、DNA甲基化和基因组(拷贝数变异), 均未发现明显差异. 此外, 也有研究报道, 利用纺锤体移植所获得的人卵母细胞受精后具有更高的异常原核比例, 但是, 只要原核正常, 其囊胚形成率则与对照组无明显差异^[45]. 这些研究结果表明, 利用纺锤体移植技术对线粒体疾病进行阻断, 有较好的安全性和有效性, 但是由于对其出生后代的随访时间较短, 更为准确的结论还需更多观察和研究.

3.3 极体移植

卵母细胞在成熟过程中会经过第一次减数分裂, 将同源染色体进行分离, 同时排出第一极体, 受精后, 则会在第二次减数分裂时将姐妹染色单体进行分离, 同时排出第二极体以维持正确的染色体数量^[46,47]. 小鼠中, 将第一和第二极体移植至去核卵母细胞中可完成受精、原核形成和早期胚胎发育, 并出生正常后代^[48]. 极体中主要内容物为排出的核基因组, 所含线粒体数量较少, 因此, 可以将其作为良好的核供体用于线粒体置换^[49,50]. Wang等人^[50]利用小鼠系统研究了

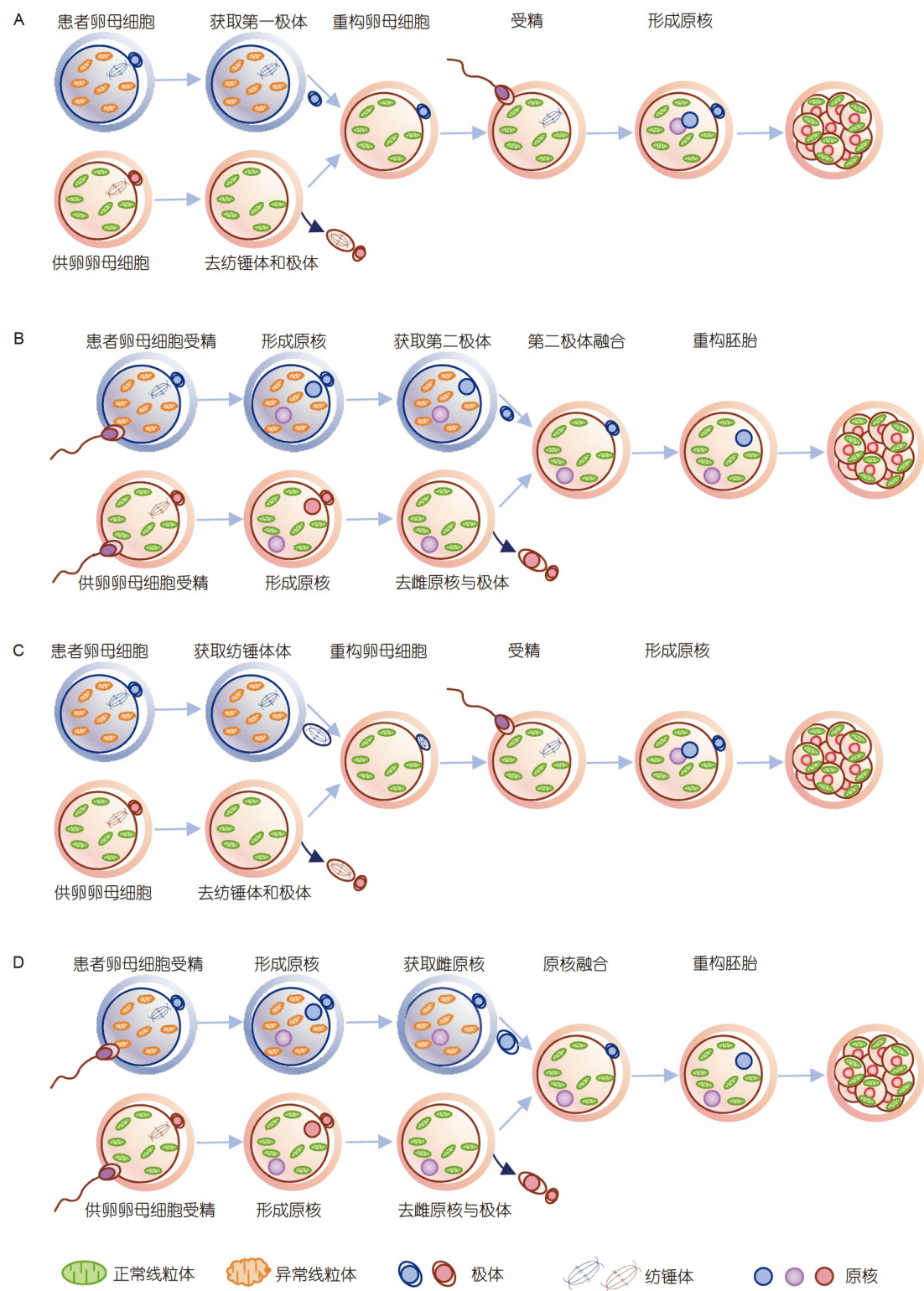


图 1 利用辅助生殖阻断线粒体疾病示意图. A: 第一极体移植; B: 第二极体移植; C: 纺锤体移植; D: 原核移植
Figure 1 Schematic illustration of using assisted reproductive technology to block mitochondrial diseases. A: First polar body transplantation; B: second polar body transplantation; C: spindle transplantation; D: pronuclei transplantation

纺锤体、第一和第二极体以及原核移植后的mtDNA异质性, 结果表明, 第经由一极体和第二极体移植出生的后代其核供体来源mtDNA分别为0%和1.7%, 而纺锤体和原核移植的核供体来源mtDNA则为5.5%和23.7%, 表明极体移植可显著减少突变mtDNA的含量. Wang等人^[51]通过检测受精率、胚胎发育率、后代出生情况以及甲基化情况, 证明第一极体可用于非人类灵长类(*Macaca fascicularis*)的线粒体移植, 不过与小鼠结果不同的是, 第一极体移植所携带的mtDNA含量平均高于纺锤体移植所携带的含量, 二者分别为 1690 ± 984 和 886 ± 545 拷贝/样本. Ma等人^[52]也在人的卵母细胞中, 探讨了利用第一极体进行核置换的可行性, 结果表明, 相比于对照组, 第一极体移植的囊胚发育率偏低, 二者分别为42%和75%, 而全基因组、表观和转录组分析则表明二者没有明显差异. Wu等人^[53]利用体外成熟的人卵母细胞, 进行了第一和第二极体的移植, 结果表明, 二者囊胚发育率与对照组无明显差异, 而mtDNA携带率分别为0.26%和0.37%. 这些结果表明, 第一和第二极体可用于线粒体置换, 能有效减少突变mtDNA的残留, 但是考虑到极体属于减数分裂过程中的“废物”, 对其安全性应予以更多和更谨慎的研究. 此外, 极体被排出后, 会快速退化而影响基因组的稳定性, 因此, 极体移植的操作窗口极短, 具有更高的技术要求, 也是限制其应用于临床的重要因素.

3.4 原核移植

受精后, 核膜包裹卵子和精子来源的基因组分别形成雌雄原核, 原核在显微镜下清晰可见, 因此特别适合做胞质置换, McGrath和Solter^[54]在1983年即利用原核置换获得了小鼠, Sato等人^[55]则在2005年利用其对携带有突变mtDNA的小鼠进行了线粒体置换. 利用原核进行线粒体置换, 其操作相对简单, 但是由于线粒体具有围核现象, 相比纺锤体和极体移植, 原核移植会携带更多的突变mtDNA至后代中. Wang等人^[50]利用小鼠系统比较过不同移植方法所携带的mtDNA含量, 结果表明, 纺锤体、第一极体、第二极体以及原核移植所携带的mtDNA分别为5.5%, 0%, 1.7%和23.7%. Craven等人^[56]利用临床上所获得的非正常原核合子(3-原核和单原核-胚胎)进行原核移植, 为了确定这部分胚胎确实属于非正常胚胎, 作者将原核移植时间选择在晚原核期(受精后16~20小时, 称为晚原核移植,

late PNT, ltPNT), 结果表明, 重构胚胎中的核供体来源的mtDNA含量小于2%. 值得注意的是, 同一实验室的结果表明, 晚原核移植技术不适用于正常胚胎的核置换, 因此, 作者将原核移植时间提前至受精后8小时左右, 称为早原核移植(early PNT, ePNT), ltPNT和ePNT的胚胎存活率分别为59%和92%, 且ePNT所获得的胚胎具有更正常的原核形态和2-细胞分裂进程, 利用ePNT获得的重构胚胎所含核供体来源的mtDNA也小于2%^[57]. 为提高原核置换的成功率, Wu等人^[58]将原核移植技术进行了改进, 主要是在原核形成之前, 将未形成原核的雌性基因组与第二极体一起从受精卵中分离出来, 待雌性原核形成后再进行原核移植, 该技术称为(pre-pronucleus transfer, PPNT), PPNT无需使用细胞松弛素B, 因此, 能最大限度地减少对细胞骨架, 尤其是纺锤体的影响, 从而提高其成功率和安全性, 同时, 由于PPNT的原核相对纺锤体-染色体复合物以及后期的原核具有较小体积的优势, 利用PPNT可有效降低移植所携带的mtDNA, 研究结果表明, 利用PPNT所携带的mtDNA的异质性平均为1.04%(0.10%~4.67%).

4 MRT过程中核供体细胞来源的mtDNA残留问题以及相应解决方案

通过纺锤体、极体以及原核移植, 均可有效阻断线粒体疾病的发生和遗传, 但是不同研究结果的mtDNA残余率相差极大, 这主要是由于不同实验人员之间的操作技术差别很大, 以及不同mtDNA检测方法的灵敏度不一样所致. 不管是哪一种方式的MRT, 都是依赖于显微操作所进行, 不可避免地会导致有部分mtDNA的残留. 虽然有研究结果表明, 经过纺锤体和极体移植后, 未检测到mtDNA的残余^[41,50], 这显然是由于核供体mtDNA残留较少, 而不能与核受体的mtDNA有效区分所致. 目前, 对于mtDNA的异质性检测主要包括测序分析、数字定量PCR、非等位基因特异性PCR等^[41,50,52,58,59]. 非等位基因特异性PCR主要是利用Taq聚合酶不能有效扩增3'末端错配引物的原理所进行, 可以选择性扩增其中的核供体或受体mtDNA, 而不扩增另外一种. 利用非等位基因特异性PCR, 本团队^[9,59]有效地区分了C57/6j和Bab/c的mtDNA, 二者扩增效率差别高达 10^{-6} , 因此, 可以在一个胚胎中检测单拷贝的核供体mtDNA.

mtDNA在复制过程中会发生基因漂移,即占比较少的mtDNA经过复制后成为优势mtDNA存在于细胞中。目前,针对mtDNA漂移的原因尚不完全清楚,既可能是随机性的,也可能是mtDNA与核基因组之间具有匹配性所致。此外,也有部分研究结果认为是一些片段缺失的mtDNA相对于野生型mtDNA具有更快的复制速度所致。MRT过程中所残留的mtDNA,一方面,可能通过聚集效应存在于部分细胞和组织中,另一方面,也可能经过基因漂移而成为优势mtDNA,从而继续导致线粒体疾病。有研究表明,以人类干细胞为模型,其起始mtDNA异质性为1.3%,然而传代36代后,其异质性增加至53.2%;另一株细胞系的后代在不同时期经检测,其异质性广泛分布于0%~90%^[60]。在前已叙及利用纺锤体移植治疗原发性不孕的先导性研究中,Costa-Borges等人^[43]报道,在获得的6个婴儿中,其中5个婴儿的mtDNA主要为核受体来源(>99%),但是另一个婴儿,在植入时,对其囊胚mtDNA进行检测,核供体来源的mtDNA含量仅有0.8%,然而,出生后该婴儿的核供体来源mtDNA急剧增加至30%~60%^[43]。导致这种现象出现的原因,既有可能是残留的核受体来源mtDNA经过基因漂移发生反转所致,但也有可能是核受体来源mtDNA在不同细胞中不均匀分布,而导致受检细胞不能真实反映整个囊胚所含核供体来源mtDNA拷贝数所致。因此,MRT过程中的mtDNA残留问题将显著增加其临床风险,致使其后代继续患线粒体疾病,如何减少MRT过程中mtDNA的残留具有重要意义。

为减少MRT置换过程中mtDNA的残留,极体移植被运用到MRT中,总体结果,由于极体具有相对较小的体积,所携带的mtDNA要少于原核移植和纺锤体移植^[50,53],但也有结果表明,非人类灵长类的第一极体移植所携带的mtDNA多于纺锤体移植^[51]。此外,考虑到原核形成是一个逐渐增大的过程,在原核形成前期或早期进行置换,可有效降低mtDNA的残留量^[57,58]。最近,Li等人^[61]通过结合第二极体移植和回吸核供体来源线粒体的方法可有效降低MRT过程中的mtDNA残余量,其原理包括:(i)第二极体含有较少的mtDNA;(ii)移植的第二极体在形成雌原核后逐渐脱离原来的胞质部分向细胞中心迁移,而大部分胞质仍然停留在原来的融合处,待雌原核离开原来的胞质后,利用显微操作将这

分胞质吸出,可进一步减少mtDNA的残留。结果表明,单独移植第二极体后,小鼠和人胚胎的mtDNA残留量分别为5.41%和0.52%,而结合回吸技术后,其残留量分别为0.43%和0.14%^[61]。极体移植的一个潜在隐患是,目前尚不确定两次减数分裂被排到极体中的遗传物质是否与留在卵母细胞中的遗传物质一样正常,的确极体移植后的卵母细胞发育能力降低^[52]。

本团队^[59,62]最近构建了一种强制性线粒体自噬系统,利用该系统可以有效清除原核移植过程中残留的mtDNA,其原理为:(i)构建一种能诱导强制性线粒体自噬的质粒,该质粒包括能定位到线粒体外膜的跨膜蛋白、荧光蛋白以及能与自噬蛋白(microtubule-associated proteins light chain 3, LC3)结合的自噬受体蛋白;(ii)将以上质粒体外转录成mRNA,原核置换前,将mRNA注射至核供体胚胎中,使核供体胚胎的线粒体外膜被标记上自噬体受体蛋白,受精之后被核受体胚胎中的自噬系统特异性识别并降解。结果表明,经由强制性线粒体自噬的原核移植所获小鼠囊胚和出生后代的组织中,其mtDNA的残留量仅为0.09%,其中70%的样本中未能检测到mtDNA的残留,而对照组的囊胚和后代组织均能检测到核供体来源的mtDNA,分别为3.2%和4.56%。利用临床上废弃的3-原核胚胎,本团队^[59]对强制性线粒体自噬的有效性进行了验证,结果表明,77%的样本中未能发现核供体来源的mtDNA,而所有的对照组中均能检测到核供体来源的mtDNA。此外,本团队也检测了强制性线粒体自噬对MRT安全性的影响,结果表明,经由强制性线粒体自噬后的重构胚胎的发育率、胚胎形态以及出生后小鼠的行为学与对照组相比均未见明显差异。这些结果表明,强制性线粒体自噬可有效、安全地清除原核移植中的mtDNA。此外,考虑到原核移植是携带mtDNA最高的MRT技术^[50],强制性线粒体自噬也可应用到纺锤体移植、极体移植以及其他的原核移植,如PPNT和ePNT中,进一步减少这些MRT的mtDNA残留量,增加MRT的安全性。值得注意的是,尽管本团队从概念上验证了强制性线粒体自噬的安全性和有效性,但由于该过程涉及到mRNA的使用,其实际临床应用还有以下因素需慎重考虑:(i)相比于MRT本身有更为复杂的伦理考虑和更为谨慎的安全性评估;(ii)mRNA的标准化制备,如序列、浓度、纯度等质量控制。

5 MRT的非技术局限性以及发展方向

除MRT技术本身的有效性和安全性外, 伦理、供卵来源以及患者对MRT的接受度等是其他限制MRT应用的非技术性关键因素. 尤其是考虑到MRT的远期效应难以预测、出生孩子的身份认同以及技术滥用风险和监管等问题, MRT的开展应慎之又慎. 目前, MRT仅在英国和澳大利亚获得了批准, 此外, 也存在一些政策相对宽松的国家和地区, 如墨西哥、希腊和乌克兰等, 而在美国等大部分国家和地区MRT仍然被禁止应用^[63,64]. 在我国, 虽然针对MRT的科学实验得到了较为广泛的探索和研究, 但缺少相关的临床试验, 对于MRT的政策目前仍不明确.

针对MRT的非技术局限性, 获取自身可用卵母细胞, 不依赖于供卵和MRT是解决这些问题的关键突破口. 线粒体疾病患者多呈现mtDNA异质性^[5,6,25], 既含有突变mtDNA, 也含有正常的mtDNA, 这就给获取正常卵母细胞提供了可能性和机会. 在卵母细胞的形成和成熟过程中, 仅有少量mtDNA被复制遗传给后代, 该现象称为线粒体瓶颈效应^[65]. 线粒体瓶颈效应的机制目前尚未完全明确, 既有可能是选择了部分mtDNA进行复制而成为优势mtDNA^[21], 也有可能是降解了部

分mtDNA而使剩下的mtDNA被复制^[66]. 明确线粒体瓶颈效应的形成机制和时期, 扩大线粒体瓶颈效应, 可减少线粒体异质性, 进而增加获得不含或者含较少突变mtDNA卵母细胞的机会, 再结合针对mtDNA的胚胎植入前遗传检测技术(preimplantation genetic test, PGT)筛选出含突变mtDNA较低的胚胎进行移植^[67-69].

6 结论与展望

线粒体置换技术是阻断线粒体疾病发生和遗传的最为有效和直接的潜在途径, 经过长期的研究, 其有效性和安全性得到了持续优化, 已具备临床应用的基础. 此外, 线粒体置换技术其本质为胞质置换, 除可应用于阻断线粒体疾病外, 还可以用来治疗一些由于胞质成熟障碍而导致的不孕不育^[70]. 因此, 完善伦理制度和法规, 制定技术标准, 进行试点应用将线粒体置换技术推向临床应用具有重要意义. 此外, 加大基础研究投入, 明确线粒体瓶颈效应的发生和mtDNA的漂移机制, 是开发出依赖于MRT的线粒体疾病阻断和治疗技术的重要突破口, 将能有效避开伦理和供卵不足的局限性, 甚至能应用于出生后的线粒体疾病患者的治疗, 具有重要的临床价值和社会意义.

参考文献

- Chiaratti M R, Chinnery P F. Modulating mitochondrial DNA mutations: factors shaping heteroplasmy in the germ line and somatic cells. *Pharmacol Res*, 2022, 185: 106466
- Johannsen D L, Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9: 780–786
- Smiraglia D, Kulawiec M, Bistulfi G L, et al. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modifications in the nucleus. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 1182–1190
- Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 2012, 148: 1145–1159
- Taylor R W, Turnbull D M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 389–402
- Wallace D C. Mitochondrial genetic medicine. *Nat Genet*, 2018, 50: 1642–1649
- Stewart J B, Chinnery P F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 530–542
- Clay Montier L L, Deng J J, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*, 2009, 36: 125–131
- Luo S M, Ge Z J, Wang Z W, et al. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13038–13043
- Luo S M, Schatten H, Sun Q Y. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J Genet Genomics*, 2013, 40: 549–556
- Reynier P, May-Panloup P, Chretien M F, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7: 425–429
- Chiaratti M R, Meirelles F V. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. *Biol Reprod*, 2010, 83: 1–2

- 13 DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. [Ann Med](#), 2005, 37: 222–232
- 14 Luo S, Valencia C A, Zhang J, et al. Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2018, 115: 13039–13044
- 15 Lutz-Bonengel S, Parson W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 1821–1822
- 16 Wei W, Schon K R, Elgar G, et al. Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes. [Nature](#), 2022, 611: 105–114
- 17 Schaefer A M, McFarland R, Blakely E L, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. [Ann Neurol](#), 2008, 63: 35–39
- 18 Greenfield A, Braude P, Flinter F, et al. Assisted reproductive technologies to prevent human mitochondrial disease transmission. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 1059–1068
- 19 Ou X H, Sun Q Y. Mitochondrial replacement techniques or therapies (MRTs) to improve embryo development and to prevent mitochondrial disease transmission. [J Genet Genomics](#), 2017, 44: 371–374
- 20 Wai T, Ao A, Zhang X, et al. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. [Biol Reprod](#), 2010, 83: 52–62
- 21 Wai T, Teoli D, Shoubridge E A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. [Nat Genet](#), 2008, 40: 1484–1488
- 22 Indo H P, Davidson M, Yen H C, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. [Mitochondrion](#), 2007, 7: 106–118
- 23 Vives-Bauza C, Gonzalo R, Manfredi G, et al. Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. [Neurosci Lett](#), 2006, 391: 136–141
- 24 Bohr V A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. [Free Radical Biol Med](#), 2002, 32: 804–812
- 25 Lax N Z, Turnbull D M, Reeve A K. Mitochondrial mutations: newly discovered players in neuronal degeneration. [Neuroscientist](#), 2011, 17: 645–658
- 26 Brown W M, George Jr M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1979, 76: 1967–1971
- 27 Elliott H R, Samuels D C, Eden J A, et al. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. [Am J Hum Genet](#), 2008, 83: 254–260
- 28 Gorman G S, Schaefer A M, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. [Ann Neurol](#), 2015, 77: 753–759
- 29 Lightowlers R N, Taylor R W, Turnbull D M. Mutations causing mitochondrial disease: what is new and what challenges remain? [Science](#), 2015, 349: 1494–1499
- 30 Gammage P A, Viscomi C, Simard M L, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation *in vivo*. [Nat Med](#), 2018, 24: 1691–1695
- 31 Mok B Y, de Moraes M H, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. [Nature](#), 2020, 583: 631–637
- 32 Qi X, Chen X, Guo J, et al. Precision modeling of mitochondrial disease in rats via DdCBE-mediated mtDNA editing. [Cell Discov](#), 2021, 7: 95
- 33 Yi Z, Zhang X, Tang W, et al. Strand-selective base editing of human mitochondrial DNA using mitoBEs. [Nat Biotechnol](#), 2023, doi: 10.1038/s41587-023-01791-y
- 34 Yang X, Jiang J, Li Z, et al. Strategies for mitochondrial gene editing. [Comput Struct Biotechnol J](#), 2021, 19: 3319–3329
- 35 Steffann J, Monnot S, Bonnefont J P. mtDNA mutations variously impact mtDNA maintenance throughout the human embryofetal development. [Clin Genet](#), 2015, 88: 416–424
- 36 Minai L, Martinovic J, Chretien D, et al. Mitochondrial respiratory chain complex assembly and function during human fetal development. [Mol Genet Metab](#), 2008, 94: 120–126
- 37 Craven L, Tang M X, Gorman G S, et al. Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease. [Hum Reprod Update](#), 2017, 23: 501–519
- 38 Takeuchi T. A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. [Hum Reprod](#), 1999, 14: 1312–1317
- 39 Liu H, Wang C W, Grifo J A, et al. Reconstruction of mouse oocytes by germinal vesicle transfer: maturity of host oocyte cytoplasm determines meiosis. [Hum Reprod](#), 1999, 14: 2357–2361
- 40 Wang M K, Chen D Y, Lui J L, et al. *In vitro* fertilisation of mouse oocytes reconstructed by transfer of metaphase II chromosomes results in live

- births. *Zygote*, 2001, 9: 9–14
- 41 Tachibana M, Sparman M, Sritanaudomchai H, et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 461: 367–372
 - 42 Zhang J, Liu H, Luo S, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34: 361–368
 - 43 Costa-Borges N, Nikitos E, Späth K, et al. First pilot study of maternal spindle transfer for the treatment of repeated in vitro fertilization failures in couples with idiopathic infertility. *Fertil Steril*, 2023, 119: 964–973
 - 44 Qi S, Wang W, Xue X, et al. Single-cell multiomics analyses of spindle-transferred human embryos suggest a mostly normal embryonic development. *PLoS Biol*, 2022, 20, e3001741
 - 45 Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 2013, 493: 627–631
 - 46 Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*, 2013, 28: 509–518
 - 47 Fragouli E, Alfarawati S, Goodall N, et al. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17: 286–295
 - 48 Wakayama T, Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol Reprod*, 1998, 59: 100–104
 - 49 Steuerwald N, Barritt J A, Adler R, et al. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote*, 2000, 8: 209–215
 - 50 Wang T, Sha H, Ji D, et al. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, 2014, 157: 1591–1604
 - 51 Wang Z, Li Y, Yang X, et al. Mitochondrial replacement in macaque monkey offspring by first polar body transfer. *Cell Res*, 2021, 31: 233–236
 - 52 Ma H, O’Neil R C, Marti Gutierrez N, et al. Functional human oocytes generated by transfer of polar body genomes. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 112–119
 - 53 Wu K, Zhong C, Chen T, et al. Polar bodies are efficient donors for reconstruction of human embryos for potential mitochondrial replacement therapy. *Cell Res*, 2017, 27: 1069–1072
 - 54 McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220: 1300–1302
 - 55 Sato A, Kono T, Nakada K, et al. Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 16765–16770
 - 56 Craven L, Tuppen H A, Greggains G D, et al. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2010, 465: 82–85
 - 57 Hyslop L A, Blakeley P, Craven L, et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2016, 534: 383–386
 - 58 Wu K, Chen T, Huang S, et al. Mitochondrial replacement by pre-pronuclear transfer in human embryos. *Cell Res*, 2017, 27: 834–837
 - 59 Fan X Y, Guo L, Chen L N, et al. Reduction of mtDNA heteroplasmy in mitochondrial replacement therapy by inducing forced mitophagy. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 339–350
 - 60 Yamada M, Emmanuele V, Sanchez-Quintero M J, et al. Genetic drift can compromise mitochondrial replacement by nuclear transfer in human oocytes. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 749–754
 - 61 Li W, Liao X, Lin K, et al. Earlier second polar body transfer and further mitochondrial carryover removal for potential mitochondrial replacement therapy. *MedComm*, 2023, 4: e217
 - 62 Fan X Y, Yin S, Luo S M. SQSTM1 and its MAP1LC3B-binding domain induce forced mitophagy to degrade mitochondrial carryover during mitochondrial replacement therapy. *Autophagy*, 2023, 19: 363–364
 - 63 Cohen I G, Adashi E Y, Gerke S, et al. The regulation of mitochondrial replacement techniques around the world. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2020, 21: 565–586
 - 64 Allen J W, Gyngell C, Koplin J J, et al. The parliamentary inquiry into mitochondrial donation law reform (Maeve’s Law) Bill 2021 in Australia: a qualitative analysis. *Bioeth Inq*, 2023, doi: 10.1007/s11673-023-10257-4
 - 65 Khrapko K. Two ways to make an mtDNA bottleneck. *Nat Genet*, 2008, 40: 134–135

- 66 Cree L M, Samuels D C, de Sousa Lopes S C, et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet*, 2008, 40: 249–254
- 67 Smeets H J M, Sallevelt S C E H, Dreesen J C F M, et al. Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders using prenatal or preimplantation genetic diagnosis. *Ann New York Acad Sci*, 2015, 1350: 29–36
- 68 Mitalipov S, Amato P, Parry S, et al. Limitations of preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA diseases. *Cell Rep*, 2014, 7: 935–937
- 69 Sallevelt S C E H, Dreesen J C F M, Drüsedau M, et al. Preimplantation genetic diagnosis in mitochondrial DNA disorders: challenge and success. *J Med Genet*, 2013, 50: 125–132
- 70 Tanaka A, Watanabe S. Can cytoplasmic donation rescue aged oocytes? *Reprod Med Biol*, 2019, 18: 128–139

Blocking mitochondrial diseases with assisted reproductive technology

LUO ShiMing^{1,2,3}, CHEN LeiNing^{1,2,3}, OU XiangHong^{1,2,3} & SUN QingYuan^{1,2,3}

1 Reproductive Medicine Center, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China;

2 Guangdong-Hong Kong Metabolism & Reproduction Joint Laboratory, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China;

3 Guangzhou Municipal Key Laboratory of Metabolic Diseases and Reproductive Health, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China

Mitochondria play a critical role in cellular energy production, and mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) can lead to mitochondrial diseases. Mitochondrial dysfunction affects tissue and organ functions and significantly impacts individual development, especially in non-renewable cells and tissues. Recent advancements in gene editing technology have opened up new possibilities for treating individuals born with mitochondrial diseases, while this technology has no way to block the transgenerational transmission of mitochondrial diseases. Mitochondrial replacement during embryo formation, combined with assisted reproductive technology (ART), offers a promising approach to preventing the inheritance of mitochondrial diseases. This article discusses the feasibility of using mitochondrial replacement technology (MRT) during ART to block the occurrence and inheritance of mtDNA mutations from the perspectives of effectiveness, safety, and limitations.

mitochondrial DNA, mitochondrial disease, assisted reproductive technology, mitochondrial replacement technology

doi: [10.1360/SSV-2023-0149](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0149)