

• 论 著 •

二代测序技术在东南亚缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血夫妇胚胎植入前遗传学检测中的应用*

何天文^{1,2}, 周伟宁^{1,2}, 卢建^{1,2}, 李静姝^{1,2}, 陈创奇³, 董云巧³, 杜丽^{1,2}, 尹爱华^{1,2,△}

广东省妇幼保健院; 1. 医学遗传中心; 2. 广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室; 3. 生殖中心, 广东广州 511443

摘要:目的 探讨二代测序技术在东南亚缺失型(—^{SEA}) α 珠蛋白生成障碍性贫血(以下简称“地贫”)夫妇胚胎植入前遗传学检测中的应用价值。方法 选取 1 对 2017 年 12 月于广东省妇幼保健院就诊的东南亚缺失型 α 地贫不孕不育夫妇。选择—^{SEA} 缺失区域为目标区域,在其上下游 2 Mb 区域内选择高密度紧密连锁的单核苷酸多态性(SNP)位点作为遗传连锁标记,多重 PCR 和二代测序后选择有效 SNP 位点构建家系成员 SNP 单体型,确定夫妇携带致病风险染色体。对活检获得的滋养层细胞进行全基因组扩增和多重 PCR 后,采用二代测序对胚胎—^{SEA} 缺失区域直接测序和构建胚胎 SNP 单体型连锁分析进行植入前遗传学检测。Sanger 测序验证—^{SEA} 的二代测序结果。对正常和东南亚缺失型 α 地贫的胚胎进行了低深度的染色体非整倍性筛查。结果 胚胎—^{SEA} 缺失区域直接测序、胚胎 SNP 单体型连锁分析和 Sanger 测序结果显示,活检的 12 个囊胚中 4 个为正常($\alpha\alpha/\alpha\alpha$),7 个为东南亚缺失型 α 地贫(—^{SEA}/ $\alpha\alpha$),1 个为重型 α 地贫(—^{SEA}/—^{SEA})。11 个正常和东南亚缺失型 α 地贫囊胚中有 8 个为整倍体,3 个为非整倍体。选择正常和发育良好的整倍体胚胎植入母体子宫后,足月分娩了 1 例健康婴儿。结论 采用二代测序可对东南亚缺失型 α 地贫夫妇进行胚胎植入前遗传学检测,阻断了东南亚缺失型 α 地贫在该家系中的再发风险,同时可以避免选择非整倍体胚胎而导致的流产问题。

关键词:二代测序; 东南亚缺失型 α 地贫; 植入前遗传学检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.003 **中图法分类号:**R446.9

文章编号:1673-4130(2021)04-0397-05 **文献标志码:**A

Preimplantation genetic testing of Southeast Asian deletion type α thalassemia couple by next generation sequencing*

HE Tianwen^{1,2}, ZHOU Weining^{1,2}, LU Jian^{1,2}, LI Jingshu^{1,2}, CHEN Chuangqi³,
DONG Yunqiao³, DU Li^{1,2}, YIN Aihua^{1,2,△}

1. Medical Genetics Center; 2. Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory; 3. Reproductive Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong 511442, China

Abstract: Objective To explore the application value and advantage of next generation sequencing in pre-implantation genetic testing of couple with Southeast Asian deletion type (—^{SEA}) α thalassemia. **Methods** A infertile couple with Southeast Asian deletion type α thalassemia was selected from Guangdong Women and Children Hospital in December 2017. The —^{SEA} region were selected as the target regions. The high-density and closely linked single nucleotide polymorphism (SNP) was selected as the genetic linkage marker in the upstream and downstream 2 Mb regions of the —^{SEA} region. After multiple PCR and next generation sequencing (NGS), the effective SNP sites were selected to construct the haplotype of family members, and the risk chromosomes carried by the couple were determined. After the whole genome amplification of the trophoblast cells obtained from the biopsy and multiple PCR, the next generation sequencing was used

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1000703)。

作者简介:何天文,男,副主任技师,主要从事植入前遗传学检测的相关研究。△ 通信作者,E-mail:yinaiwa@126.com。

本文引用格式:何天文,周伟宁,卢建,等.二代测序技术在东南亚缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血夫妇胚胎植入前遗传学检测中的应用

to sequence the $-\text{SEA}$ region of embryo directly and construct SNP haplotype of embryo to linkage analysis for preimplantation genetic testing. Sanger sequencing verified the $-\text{SEA}$ region sequencing results of next generation sequencing. Low depth chromosome aneuploidy screening was carried out in normal and Southeast Asia deficient α thalassemia embryos. **Results** Direct sequencing of the $-\text{SEA}$ region of embryo, SNP haplotype linkage analysis of embryo and Sanger sequencing showed that 4 of the 12 blastocysts were normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), 7 were Southeast Asian deletion type α thalassemia ($-\text{SEA}/\alpha\alpha$), and 1 was severe α thalassemia ($-\text{SEA}/-\text{SEA}$). Among the 11 normal and Southeast Asian deletion type α thalassemia blastocysts, 8 were aneuploidy and 3 aneuploidy. After the normal and well-developed aneuploid embryo was implanted into the mother's uterus, a healthy baby was born at full term. **Conclusion** The preimplantation genetic testing of Southeast Asian deletion type α thalassemia family by using the next generation sequencing technology can not only block the risk of recurrence of this single gene disease in the family, but also avoid the abortion caused by the selection of aneuploid embryos.

Key words: next generation sequencing; Southeast Asian deletion type α thalassemia; preimplantation genetic testing

珠蛋白生成障碍性贫血(以下简称“地贫”)主要分为 α 地贫和 β 地贫两种类型^[1]。 α 地贫发病机制主要是 α 珠蛋白基因的缺失,在我国主要分布于广东、广西和海南等南方地区,以东南亚缺失型 α 地贫($-\text{SEA}/\alpha\alpha$)最为常见^[2-4]。如果夫妻双方为东南亚缺失型 α 地贫,每次妊娠胎儿均有 25% 的可能性为重型 α 地贫,又称巴氏水肿胎。巴氏水肿胎无法存活,还严重危害母体健康,同时给家庭与社会带来沉重负担^[5]。产前诊断和胚胎植入前遗传学检测(PGT)是预防重度地贫患儿出生的重要措施。近年来随着二代测序(NGS)技术的飞速发展,基因测序成本不断降低,临床应用领域不断扩大。目前 NGS 已经成为 PGT 的主要检测手段之一^[6-7]。本研究采用 NGS 技术对胚胎 $-\text{SEA}$ 区域直接测序和构建胚胎单核苷酸多态性(SNP)单体型连锁分析对东南亚缺失型 α 地贫夫妇进行 PGT,以避免重型 α 地贫胎儿的形成。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 1 对 2017 年 12 月于广东省妇幼保健院就诊的东南亚缺失型 α 地贫不孕不育夫妇。为了寻求辅助生殖和避免重型 α 地贫胎儿的形成,这对夫妇要求行第三代试管婴儿治疗。这对夫妇中,男方 34 岁,为东南亚缺失型 α 地贫,基因型为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$; 女方 26 岁,为东南亚缺失型 α 地贫,基因型为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$, 2013 年结婚至今未孕,超声提示左侧卵巢有个大小为 78 mm × 55 mm 的囊肿,囊肿破坏毗邻的卵巢组织的卵泡结构导致卵巢储备功能下降。向该夫妇充分介绍第三代试管婴儿治疗过程及相关风险后,该夫妇签署知情同意书并接受 PGT。本研究经广东省妇幼保健院生殖医学伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 广州米基科技发展有限公司的磁

珠法血液基因组提取试剂盒、胚胎植入前单基因病检测建库试剂盒、胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒(北京中仪康卫医疗器械有限公司),PCR-流式荧光杂交法地贫基因检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司),Verity 梯度 PCR 仪、ABI3730 测序仪(美国 ABI 公司)、MiSeq 高通量测序仪(美国 Illumina 公司)、MAGPIX 液相芯片分析仪(德国 Luminex 公司)、全基因组扩增试剂盒(德国 Qiagen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 夫妇及双方父母地贫基因检测 抽取夫妇及双方父母外周血各 2 mL(EDTA 抗凝),使用血液基因组提取试剂盒进行外周血基因组 DNA 的提取,严格按照试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取操作。使用 PCR-流式荧光杂交法地贫检测试剂盒检测夫妇及双方父母的地贫基因,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.2 家系成员 SNP 单体型的构建 以 $-\text{SEA}$ 区域[HBA2 基因(NM_000517.4)、HBA1 基因(NM_000558.4) chr16:215400-234700 正向转录]为目标区域,在 $-\text{SEA}$ 区域的上游 234 kb 区域内选择 143 个高密度紧密连锁的 SNP 作为遗传标记,下游 2 Mb 区域选择 100 个作为遗传标记。利用 Ion AmpliSeq Designer 网站设计引物,对 $-\text{SEA}$ 区域和高密度紧密连锁的 SNP 进行多重 PCR 扩增,多重 PCR 产物经纯化和建库进行 NGS,选择有效 SNP 位点对构建家系成员的单体型进行连锁分析,确定夫妇是否携带有致病风险的染色体。

1.3.3 植入前遗传学诊断 采用卵细胞质内单精子注射(ICSI)方式进行授精。胚胎发育第 3 天时用激光脉冲在透明带上切割一裂口,将胚胎转移至囊胚培

养液中继续培养。胚胎发育第 5、6 天时观察到囊胚形成且脱出裂口滋养层细胞数在 5~10 个时进行活检。对活检获得的囊胚滋养层细胞采用全基因组扩增试剂盒进行胚胎细胞全基因组扩增(WGA)。全基因组扩增成功的产物通过多重 PCR 扩增——^{SEA} 区域[HBA2 基因(NM_000517.4)、HBA1 基因(NM_000558.4) chr16:215400-234700 正向转录]和高密度紧密连锁的 SNP,多重 PCR 产物经纯化和建库后进行 NGS。通过 Sanger 测序验证——^{SEA} 区域 NGS 结果。对正常和东南亚缺失型 α 地贫的胚胎进行了低深度的染色体非整倍性筛查,以排除有携带染色体拷贝数异常的胚胎。

1.3.4 产前诊断 选择正常且发育良好的整倍体胚胎于冻融胚胎周期进行移植。于胚胎移植后 14 d 检测血人绒毛膜促性腺激素(HCG)以确定是否妊娠,于胚胎移植后 4 周行经阴道 B 超确定是否临床妊娠,于孕 18~24 周时行羊膜腔穿刺进行染色体核型分型和 α 地贫基因产前检测来验证 PGT 结果。

2 结 果

2.1 夫妇及双方父母地贫基因检测结果 提取外周血基因组 DNA 后,采用 PCR-流式荧光杂交法对夫妇及双方父母的地贫基因进行检测,男方的——^{SEA} 来源于父亲,女方的——^{SEA} 来源于母亲,见表 1。

表 1 夫妇及双方父母地贫基因检测结果

标本来源	地贫基因型	
	—— ^{SEA} / αα	αα / αα
男方	—— ^{SEA} / αα	
男方父亲	—— ^{SEA} / αα	
男方母亲	— α ^{3.7} / αα	
女方	—— ^{SEA} / αα	
女方父亲		αα / αα
女方母亲	—— ^{SEA} / αα	

2.2 家系成员 SNP 单倍型的构建 多重 PCR 扩增——^{SEA} 区域和高密度紧密连锁的 SNP 后,经过 NGS 后,选择了 106 个有效 SNP 位点成功构建了家系成员 SNP 单倍型,连锁分析后确定夫妇致病的风险染色体,见表 2。

表 2 夫妇 α 珠蛋白基因有效 SNP 位点数和分布(n)

标本	基因上游		基因内	基因下游	
	>1~2 Mb	0~1 Mb		0~1 Mb	>1~2 Mb
	男方	0		27	4
女方	0	7	4	16	13

2.3 植入前遗传学诊断 获卵 28 个,其中成熟卵子 23 个,予以 ICSI 后得到正常受精卵 20 个。所有正常

受精卵均发生卵裂,第 5 天观察有 7 枚囊胚符合活检标准,活检后进行胚胎玻璃化冷冻保存,活检产物标记为 D501、D502、D503、D504、D505、D506 和 D507;第 6 天观察有 6 枚囊胚符合活检标准,活检产物标记为 D601、D602、D603、D604、D605 和 D606,每个样本活检细胞数为 5~10 个。对活检获得的囊胚滋养层细胞进行全基因组扩增,13 个囊胚中 12 个全基因组扩增成功,其中 D504 标本全基因组扩增失败。对全基因组扩增成功的标本进行多重 PCR 扩增——^{SEA} 区域和高密度紧密连锁的 SNP,产物纯化、建库后行 NGS。对胚胎——^{SEA} 区域直接测序和构建胚胎 SNP 单体型连锁分析,结果显示 12 个囊胚中 4 个为正常(αα/αα),7 个为东南亚缺失型 α 地贫(——^{SEA} / αα),1 个为重型 α 地贫(——^{SEA} / ——^{SEA})。利用 Sanger 测序进行进一步验证,结果与 NGS 结果一致,见表 3。11 个正常和东南亚缺失型 α 地贫囊胚中有 8 个为整倍体,3 个为非整倍体,见表 4。

表 3 PGT 的结果分析

标本	单体型检测结果	基因型	致病性	Sanger 测序验证	
				—— ^{SEA}	αα
男方	F0/F1	—— ^{SEA} / αα	携带	/	/
男方父亲	F0/	—— ^{SEA} / αα	携带	/	/
男方母亲	F1/	— α ^{3.7} / αα	携带	/	/
女方	M0/M1	—— ^{SEA} / αα	携带	/	/
女方父亲	M1/	αα / αα	正常	/	/
女方母亲	M0/	—— ^{SEA} / αα	携带	/	/
D501	M0/F1	—— ^{SEA} / αα	携带	检出	检出
D502	M0/F1	—— ^{SEA} / αα	携带	检出	检出
D503	M1/F0	—— ^{SEA} / αα	携带	未检出	检出
D505	M1/F0	—— ^{SEA} / αα	携带	检出	检出
D506	M1/F1	αα / αα	正常	未检出	检出
D507	M1/F1	αα / αα	正常	未检出	检出
D601	M1/F1	αα / αα	正常	未检出	检出
D602	M0/F1	—— ^{SEA} / αα	携带	检出	检出
D603	M1/F1	αα / αα	正常	未检出	检出
D604	M1/F0	—— ^{SEA} / αα	携带	检出	检出
D605	M0/F0	—— ^{SEA} / —— ^{SEA}	重型	检出	未检出
D606	M1/F0	—— ^{SEA} / αα	携带	检出	检出

注: M0 表示女方风险染色体; M1 表示女方正常染色体; F0 表示男方风险染色体; F1 表示男方正常染色体; / 表示该项未做。

2.4 产前诊断 选择正常和发育良好的整倍体胚胎(D506)于女方的第 3 个月经周期进行囊胚解冻移植。移植后 14 d 检测外周血 HCG 为 594.4 mIU/mL;移植后 40 d 经阴道超声见单个孕囊,孕囊大小 18~11 mm,胚芽长约 3 mm,可见心管搏动。孕 19 周经羊膜

腔穿刺进行产前诊断的结果显示胎儿地贫基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 胎儿染色体 G 显带核型没有发现异常, 与 PGT 结果一致。足月顺产分娩一男婴, 健康状况良好。

表 4 胚胎染色体非整倍体筛查结果

标本	基因型	致病性	染色体非整倍体筛查(>10 Mb)	是否可移植
D501	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	46, XN	是
D502	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	45, XN, -3	否
D503	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	46, XN	是
D505	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	46, XN	是
D506	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	正常	46, XN	是
D507	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	正常	46, XN	是
D601	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	正常	46, XN	是
D602	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	46, XN	是
D603	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	正常	46, XN	是
D604	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	47, XN, +1	否
D605	—SEA/—SEA	重型	/	否
D606	—SEA/ $\alpha\alpha$	携带	46, XN, -(2)(q13-q37.3) (129.30 Mb)	否

注: / 表示该项无数据。

3 讨论

地贫是全球分布最广、累积人群最多的一种单基因病, 主要分布于热带和亚热带地区, 其中 α 地贫主要分布于东南亚、中国南方和少数非洲地区^[8]。我国广西与广东两地做过大样本、辖区全覆盖的地贫分子流行病学调查, 其中广西壮族自治区流调数据显示广西 α 地贫基因携带率为 17.55%, 东南亚缺失型 α 地贫携带率为 7.85%^[9], 而广东省的流调数据显示广东省 α 地贫基因携带率为 13.31%, 其中东南亚缺失型 α 地贫携带率为 6.85%, 夫妻为同型地贫的携带率为 1.87%^[10]。如果夫妻双方为东南亚缺失型 α 地贫, 每次妊娠均有 25% 的可能性为重型 α 地贫, 又称巴氏水肿胎。巴氏水肿胎可导致孕妇各种并发症的发生, 如妊娠高血压和产后大出血等, 危及孕妇的生命。重型地贫具有致死致残性, 且治疗费用高昂, 通过产前诊断和胚胎植入前遗传学诊断可以预防重度地贫患儿的出生^[11-13]。绒毛穿刺术、羊膜腔穿刺术和脐带穿刺术等传统产前诊断技术不但具有有创性, 而且具有一定的导致孕妇流产的风险。东南亚缺失型 α 地贫夫妇经产前诊断确诊胎儿为重型地贫后, 需要选择终止妊娠, 对孕妇本人及其家庭也造成了一定的生理和心理负担。PGT 是在胚胎植入前对胚胎染色体及遗传致病基因进行检测, 选择正常的胚胎植入到宫腔内, 最终实现减少出生缺陷发生的目的^[14-15]。对东南亚

缺失型 α 地贫夫妇进行 PGT, 在胚胎植入前进行遗传学分析后选择正常胚胎进行移植, 可以避免异常胚胎妊娠的发生, 可以阻断东南亚缺失型 α 地贫在家系中的再发风险。PGT 把遗传病检测提前到孕前, 将遗传病的预防提前到胚胎阶段, 与传统的产前诊断相比具有明显的优势, 可以避免治疗性引产给母体带来身体和心理的创伤。本研究采用 NGS 对胚胎 —SEA 区域直接测序和构建胚胎 SNP 单体型连锁分析进行 PGT, Sanger 测序验证 —SEA 区域 NGS 结果, 对正常和东南亚缺失型 α 地贫的胚胎进行了低深度的染色体非整倍性筛查。本研究为该东南亚缺失型 α 地贫夫妇选择正常和发育良好的整倍体胚胎, 移植后女方成功妊娠, 足月顺产分娩一正常婴儿。

全基因组扩增技术的发明克服了单细胞水平基因检测 DNA 模板量过少的问题, 极大地提高了检测结果的准确性以及单细胞水平基因检测的可靠度, 但是 WGA 会增加扩增不均匀或等位基因脱扣的风险^[16]。NGS 技术的发明, 实现了一次性对上百万条 DNA 进行测序, 不仅缩短了检测时间, 也将单碱基测序成本降至最低, 使遗传性疾病的诊断率和分辨率迈入新的高度, 给 PGT 技术带来了革命性的改变。NGS 技术具有高通量、高并行性和高分辨率等特性, NGS 技术可以提供高深度的多位点多基因分析, 结合致病基因连锁 SNP, 可以避免由等位基因漏码 (ADO) 带来的检测错误^[17]。NGS 已经成为 PGT 的主要的检测手段, 不但能检测染色体非整倍性、染色体结构异常和单基因遗传病, 而且准确性好和精度高^[18-19], 与如荧光原位杂交和比较基因组杂交等传统的 PGT 技术相比具有明显的优势。选择 —SEA 区域为目标区域, 在其上下游 2 Mb 区域内选择高密度紧密连锁的 SNP 位点作为遗传连锁标记, 多重 PCR 和 NGS 后选择 106 个有效 SNP 位点构建家系成员 SNP 单体型, 可很大程度上减少因重组或扩增脱扣导致的检测不完全。

本研究采用 NGS 技术对胚胎 —SEA 缺失区域直接测序和构建胚胎 SNP 单体型连锁分析对东南亚缺失型 α 地贫夫妇进行 PGT, 避免了重型 α 地贫胎儿的形成和选择非整倍体胚胎而导致的流产问题, 是重型 α 地贫的有效预防手段。

参考文献

- [1] TAHER A T, WEATHERALL D J, CAPPELLINI M D. Thalassaemia[J]. Lancet, 2018, 391(1116): 155-167.
- [2] 李哲涛, 李伍高, 唐永梅, 等. 东南亚缺失型 α 地中海贫血的胚胎植入前遗传学诊断[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(12): 2006-2008.

- [3] 杨阳,张杰. 中国南方地区地中海贫血研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(1): 276-280.
- [4] 杨喆,林芬,黄斌,等. 全球不同地区 α 地中海贫血基因型及分布特征[J]. 汕头大学医学院学报, 2020, 33(1): 60-64.
- [5] 甄理,甄恩明,许遵鹏,等. 早孕期胎儿超声检测预测胎儿重型 α 地中海贫血的价值[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2019, 15(2): 150-156.
- [6] 谢美娟,邓权衡,邓红辉,等. 应用下一代测序技术对 α 地中海贫血进行胚胎植入前遗传学检测[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(6): 367-374.
- [7] 周飞飞,谭季春,徐小延,等. 高通量测序技术在胚胎植入前遗传学检查中的应用[J]. 西南国防医药, 2018, 28(7): 685-687.
- [8] LAI K, HUANG G, SU L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 920-923.
- [9] XIONG F, SUN M, ZHANG X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2): 139-148.
- [10] YIN A, LI B, LUO M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14 332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.
- [11] VIPRAKASIT V, EKWATTANAKIT S. Clinical classification, screening and diagnosis for thalassemia[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(2): 193-211.
- [12] 叶丽花,潘慧娟,胡君燕,等. 920 例地中海贫血基因突变类型分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(2): 545-548.
- [13] 杜丽,秦丹卿,刘玲,等. 台湾型缺失 β 地中海贫血的基因诊断、产前诊断和植入前遗传学诊断[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(5): 1585-1591.
- [14] 陈欢. 胚胎植入前遗传学检测技术的发展及临床应用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2019, 38(4): 300-304.
- [15] 高明,高媛. 非侵入性胚胎植入前遗传学检测的研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2020, 50(6): 616-622.
- [16] PAEZ J G, LIN M, BEROUKHIM R, et al. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole-genome amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(9): e71.
- [17] 谢美娟,杨学习,李明. 下一代测序技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(5): 353-357.
- [18] 朱洁茹,欧建平,朱伟杰. 基因测序在胚胎植入前遗传学诊断应用的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(8): 666-671.
- [19] 任一昕,乔杰,闫丽盈. 单基因遗传病的胚胎植入前遗传学诊断方法研究进展[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(3): 443-447.

(收稿日期:2020-07-08 修回日期:2020-11-28)

(上接第 396 页)

- DNA fragmentation, chromatin packaging, mitochondrial membrane potential, and apoptosis[J]. JBRA Assist Reprod, 2017, 21(4): 295-301.
- [7] 邓春华,商学军. 精索静脉曲张诊断与治疗中国专家共识[J]. 中华男科学杂志, 2015, 21(11): 1035-1042.
- [8] 董彦,刘哲婴,张卫国. 高频超声对亚临床型精索静脉曲张患者的诊断及术后疗效评价的应用价值[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(6): 683-684.
- [9] 罗国新,杨明辉,陶伟,等. 高频彩超在诊断基层部队官兵精索静脉曲张中的作用和有效性[J]. 华南国防医学杂志, 2016, 30(3): 187-189.
- [10] 郝天羽,张宁宁. 人类精浆对夫精宫腔内人工授精妊娠结局影响的初步研究[J]. 中国性科学, 2019, 28(8): 64-66.
- [11] ANEL-LOPEZ L, ORTEGA-FERRUSOLA C, MARTINEZ-RODRIGUEZ C, et al. Analysis of seminal plasma from brown bear (*Ursus arctos*) during the breeding season: Its relationship with testosterone levels[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0181776.
- [12] 沙琨,齐莹莹. 精浆生化分析在精索静脉曲张诊断中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(9): 1389-1390.
- [13] YAZAR H, HALIS F, NASIR Y, et al. Effect of the Oxidant-Antioxidant system in seminal plasma on varicocele and idiopathic infertility in male humans[J]. Clin Lab, 2017, 63(5): 935-940.
- [14] 余文龙. 手术结合聚精汤加减对不育症精索静脉曲张患者精浆中性 α -糖苷酶影响的研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2015.
- [15] 朱少明,余伟民,饶婷,等. 精索静脉曲张大鼠睾丸细胞自噬的初步研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2017, 22(5): 381-386.

(收稿日期:2020-05-06 修回日期:2020-11-23)