

网络出版时间:2024-06-13 19:20:22 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240612.1134.001

◇ 专家笔谈 ◇

高通量测序技术在生殖医学领域的研究与应用

曹云霞

摘要 高通量测序技术的发明是基因组学领域一项具有里程碑意义的事件。经过 20 多年的发展与更迭,高通量测序技术在遗传学检测、肿瘤检测、病原体鉴定、疾病诊断等领域为精准医疗提供了一个高效的检测工具,成为推动现代医学发展的重要力量。在生殖医学领域,在高通量测序技术基础之上发展出的适用于各种生殖医学应用场景的新技术,为更进一步揭示人类生殖自然规律、生殖疾病致病机制以及临床诊断和治疗提供新策略。

关键词 高通量测序;生殖医学;单细胞测序;胚胎植入前遗传学检测

中图分类号 R 71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-0929-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.001



高通量测序技术又称“下一代测序”(next-generation sequencing technology, NGS) 技术,能一次并行对几十到几百万条 DNA 或 RNA 分子进行序列测定。经过 20 多年的迅速发展,NGS 具有高通量、低成本、快速、准确等优点。因此,高通量测序技术在医学领域的研究和应用越来越广泛,通过提取患者血液或组织样本中的 DNA/RNA,利用高通量测序仪检测获得数据,采用生物信息学分析,提炼出生命活动变化的信息,为疾病的诊断、治疗和预防提供有力证据。在生殖医学领域,在 NGS 技术基础之上发展出适用于各种生殖医学场景的新技术,如单细胞测序技术(single cell sequencing, SCS)、微量细胞测序技术和胚胎植入前 DNA 甲基化筛查技术(Pre-implantation DNA methylation screening, PIMS)等,为

更进一步揭示人类生殖自然规律、生殖疾病致病机制以及临床诊断和治疗提供新策略。

1 应用 SCS 解码生殖疾病病理生理过程

SCS 是指在单个细胞水平上对相关组学进行测序分析的一项新技术。在过去基于群细胞测序方法解读癌症生物学、发育生物学和细胞稳态等领域的全基因组转录组变异方面发挥了重要作用,然而群细胞数据代表单个细胞基因表达的平均值可能会掩盖具有最丰富细胞类型或状态的不同亚群的转录趋势,单细胞测序却可以单细胞分辨率探索基因表达谱,不仅能分析单细胞水平的序列及表达信息,还能综合评价多细胞异质性的问题,这对研究细胞、个体发育、器官发生、疾病进程及其关键信号通路具有重要意义。随着测序技术和组学研究快速发展,也为样本量较少的生殖细胞和胚胎干细胞的研究提供了新方法。单细胞测序方法在解码生殖疾病病理生理过程,如胚胎着床、妊娠维持及相关疾病等方面的研究已有相当可观的成绩。

1.1 胚胎着床 胚胎着床是胎生胚胎发育早期阶段的重要环节,是胚泡和母体子宫壁结合建立胚胎与母体间结构上的联系以实现物质交换的过程。Petropoulos et al^[1]用单细胞 RNA 测序技术对 88 个胚胎的 1 529 个高质量人植入前单细胞进行分析,提供了一个完整的人类胚胎发育转录图,揭示了营养外层、外胚层和原始内胚层的同时建立以及 X 染色体剂量补偿的独特特征。使用单细胞 RNA 测序对反复种植失败(recurrent implantation failure, RIF)

2024-04-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:U20A20350);国家重点研发计划(编号:2021YFC2700600);国家自然科学基金面上项目(编号:82071614)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科,国家卫生健康委配子及生殖道异常国家重点实验室,生命资源保存与人工器官教育部工程研究中心,合肥 230032

作者简介:曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,安徽医科大学妇产科学系主任。现任国家卫生健康委配子及生殖道异常国家重点实验室主任、生命资源保存与人工器官教育部工程研究中心主任、出生人口健康教育重点实验室副主任、生育障碍与妇科疾病研究安徽省重点实验室主任、生育力保存与人工器官安徽省工程技术研究中心主任、安徽省学术技术带头人、安徽省“115”产业创新团队“辅助生殖关键技术应用与推广创新团队”负责人。

患者和健康对照组在植入窗期(window of implantation, WOI)出现的子宫内膜细胞进行分析,并提供了WOI时健康和RIF子宫内膜的详细分子和细胞图,研究了RIF患者异常的分子和细胞特征以及子宫内膜细胞—细胞通讯障碍,为RIF的子宫内膜微环境紊乱提供了更深入的认识。这不仅可用于改进不明原因RIF的病因诊断和治疗,还对生育治疗和体外受精有重要意义。

1.2 妊娠维持 人类胎盘和蜕膜在妊娠过程中发挥着关键作用,妊娠维持的一个重要环节是母胎血液循环的建立,这有赖于子宫内膜蜕膜化过程中血管系统的扩张和重新形成。Suryawanshi et al^[2]报道来自妊娠早期人胎盘绒毛和蜕膜组织的14 341和6 754个细胞的单细胞RNA测序,用生物信息分析确定胎盘绒毛和蜕膜中的主要细胞类型,揭示了胎儿母体微环境中亚群的增殖和细胞类型特异性转录因子的富集,进一步揭示这些细胞在胎盘和蜕膜中对于维持早期妊娠以及妊娠相关疾病的发病机制的作用。Gillis-Buck et al^[3]用单细胞RNA测序研究表达自身免疫调节基因(autoimmune regulator, Aire)的细胞在母胎耐受中的作用,表明怀孕期间Aire表达细胞的消耗会导致活化T细胞的扩增,且胸腺外Aire表达细胞可以保护胎儿免受免疫介导的宫内生长受限的影响,报道了一种以前未被描述的维持母胎免疫稳态的机制。He et al^[4]使用SCS对早孕流产中胎盘和蜕膜细胞的发育特征、不明原因反复妊娠丢失(recurrent pregnancy loss, RPL)的单细胞免疫景观和基因分布进行分析应用,分析了胎盘和蜕膜细胞群的组成,揭示了人类蜕膜的免疫特征并发现CDGSH铁硫域2(CDGSH iron sulfur domain 2, CISD2)和细胞色素P450家族17亚家族A成员1(cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1, CYP17A1)基因参与铁代谢异常从而导致RPL。这些成果为妊娠维持的进一步研究提供了新方向。

1.3 生殖系统相关疾病 单细胞测序分析方法在妊娠相关疾病如子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)和多囊卵巢综合征等方面也取得了进展^[5]。

1.3.1 EMs EMs是指子宫内膜组织在子宫腔被覆内膜及子宫以外的部位出现、生长、浸润,反复出血继而引发疼痛、不孕及结节或包块等,是生育年龄妇女的多发病、常见病。EMs的起源和发病机制有不同的理论支持,有许多临床事实将其与多基因疾病联系起来,而SCS的出现为子宫内膜症的研究开辟了新的道路。Shih et al^[6]用单细胞RNA测序比

较从33个受试者新鲜收集的月经流出物(menstrual effluent, ME)的子宫内膜组织,包括EMs患者和对照组以及慢性EMs患者,在对照组的ME组织中发现了一个独特的增殖子宫自然杀伤细胞亚群,而EMs病例中几乎不存在这种情况,由此提出ME子宫内膜组织的表征将为识别可能患有EMs的慢性症状的患者提供有效的筛查工具,对ME的综合分析预计将为EMs和其他相关生殖疾病带来新的诊断和治疗方法^[6]。Zhu et al^[7]用单细胞RNA测序来探讨异位子宫内膜、在位子宫内膜和正常子宫内膜在分泌期的特性,发现分泌期异位子宫内膜(ectopic endometrium, ECE)中肌成纤维细胞、周细胞、内皮细胞和巨噬细胞的比例超过了非异位组织,在ECE中,肌成纤维细胞主要是成纤维细胞到肌成纤维细胞转分化,周细胞是内皮细胞依赖的分化,肌成纤维细胞和周细胞均具有低分化潜能,提示肌成纤维细胞、周细胞和巨噬细胞可能是EMs抗纤维化、抗血管生成和抗炎治疗的潜在靶标。这些发现将有助于探索EMs的特定诊断生物标志物和治疗靶点。

1.3.2 多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS) PCOS是因月经调节机制失常产生的,其特征是一系列相关的生殖异常,包括促性腺激素分泌紊乱、雄激素分泌增加、慢性无排卵和多囊卵巢形态。PCOS病例的家族性聚集性表明遗传因素对PCOS有影响,罕见的孟德尔形式的PCOS与极端表型相关,但PCOS通常遵循与复杂的遗传结构一致的非孟德尔遗传模式,反映了易感基因和环境因素的相互作用,PCOS的基因组研究为了解疾病途径提供了方法,包括PCOS的遗传改变、表观遗传调控、转录调控、蛋白质相互作用和代谢改变,未来PCOS在单细胞水平的多组学研究可能增加PCOS诊断和治疗的选择。Lu et al^[8]根据GEO数据库中的34个卵母细胞的单细胞测序数据进行初筛、分期、功能分析以及靶基因和治疗药物的筛选,发现PGR、SIRT1和ADAMTS1作为中心差异表达基因,并使用药物基因相互作用数据库找到了相关药物,发现口服避孕药和胰岛素增敏剂对治疗PCOS有效。Harris et al^[9]对原始单细胞测序数据处理分析,识别卵泡膜细胞中受PCOS影响的途径和基因,为PCOS的分子机制提供了新见解。单细胞测序是识别受疾病影响的分子途径和基因的强大工具,能以高分辨率识别细胞亚群、基因表达模式和基因调控网络,可用于识别PCOS发病机制相关的分子变化以及治疗干预的潜在靶点,其在妊娠相关并发症

的研究方面同样展现了巨大的应用价值。

2 微量细胞测序揭示生殖细胞及胚胎早期发育遗传学规律

生殖细胞的形成是一个复杂的过程,受到多种机制的调控,包括表观遗传调控、生殖细胞特异性基因转录和减数分裂^[10]。哺乳动物胚胎发育起始于受精卵,胚胎在卵裂期发生合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA),不断分裂、分化,形成具有内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoblast, TE)细胞的囊胚。这一过程中发生了剧烈的转录和表观遗传变化,在胚胎发育过程中,精确的重编程过程是避免发育缺陷和胚胎致死的先决条件。生殖细胞及胚胎早期发育具有样本细胞量少的特点,使用微量细胞测序技术可更加深入探索生殖细胞和早期胚胎发育过程中表观遗传重建的动态过程。

2.1 生殖细胞减数分裂 在哺乳动物中,生殖细胞在两性中以不同的方式发育:雄性的“精子发生”和雌性“卵子发生”。在雄性中,青春期后的大多数哺乳动物的整个寿命期间都存在“精子发生”,连续产生数十亿个配子^[11]。然而,在女性中,卵母细胞池在出生前于卵巢中形成,数量有限,并在出生前后急剧减少,且在整个女性生殖生命中逐渐减少^[12]。正常的减数分裂进程对生殖细胞的生长发育极为重要,典型的减数分裂研究利用蛋白质组学技术和细胞学方法来捕获疾病的独特特征^[13]。RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq)是一种基于测序的方法,由于其能够完全测序整个转录组,因此是研究减数分裂分子机制的有力工具。Zhao et al^[14]通过使用批量 RNA-seq,研究了生殖细胞的转录谱;Margolin et al^[15]通过使用批量 RNA-seq 生成了小鼠精子发生的转录组,揭示了细胞的异质性,为哺乳动物睾丸中生殖细胞发育的定位提供了高分辨率数据,然而批量 RNA-seq 无法检测输入细胞之间的异质性,并且无法在基础和临床研究中研究未知的细胞类型。更先进的单细胞 RNA-seq(single cell RNA sequencing, scRNA-seq),通过将测序分辨率提高到单细胞水平来打破上述限制^[16]。为了从单个细胞捕获转录组信息并构建单细胞测序文库,scRNA-seq 方法包括单细胞分离和裂解、mRNA 捕获、通过逆转录产生 cDNA 和 cDNA 扩增^[17-18]。Lau et al^[19]通过 scRNA-seq 数据分析计算性染色体和常染色体之间的表达比率,可以定量确定减数分裂性染色体失

活;Niu et al^[20]对大量小鼠减数分裂卵母细胞独立进行 scRNA-seq,首次揭示了早期减数分裂阶段的清晰转录组图谱。总之,scRNA-seq 能够准确地识别细胞异质性并以更高的分辨率研究减数分裂转录组,拓宽了对生殖细胞减数分裂的认识。

2.2 胚胎早期发育 在哺乳动物中,发育从受精开始,其过程触发了全能胚胎发育所必需的事件,统称为母体-合子转换(maternal-to-zygotic transition, MZT)。初始事件包括父本鱼精蛋白-组蛋白交换和配子 DNA 甲基化的消除以及翻译后组蛋白尾部修饰,这一过程称为全局表观遗传重编程^[21-22]。在达到卵裂后第 2~3 天分别含有 2~8 个细胞,来自胚胎基因组的转录产物在称为胚胎基因组激活的过程中取代了大多数卵母细胞来源的物质,该过程控制 MZT 期间的进一步发育^[23]。此时,胚胎已经经历了定向分化,形成 ICM 和 TE。

微量细胞测序在胚胎早期发育的生物学事件中也得到了广泛应用,Probst et al^[24]将 scRNA-seq、遗传命运标记和成像方法相结合,揭示了在小鼠胚胎原肠胚形成的胚层形成过程中,中胚层和内胚层祖细胞出现的精确时空模式;Guzzetta et al^[25]利用 scRNA-seq 揭示了原肠胚形成过程中驱动前中胚层模式形成的潜在机制,发现成纤维细胞生长因子信号轴是必需的。单细胞平行甲基化和转录组测序(scM&T-seq),是一种能从同一细胞获得定量表达和潜在 DNA 甲基化谱的技术。Hernandez Mora et al^[26]通过采用多组学 scM&T-seq 技术,定量了停滞胚胎的子集中的 DNA 甲基化,发现整体甲基化水平增加,另外还发现甲基化与 DNMT1 和 UHRF1 表达水平之间存在正相关性。高通量染色体构象捕获技术(high-throughput chromosome conformation capture, Hi-C),主要是以整个细胞核为研究对象,利用高通量测序技术,结合生物信息分析方法,研究全基因组范围内整个染色质在空间位置上的关系,从而获得高分辨率的染色质调控元件相互作用图谱。Collobet et al^[27]在小鼠胚胎植入前的过程中,使用 Hi-C 绘制了每个亲本基因组(包括 X 染色体)的相互作用,整合了具有等位基因表达状态和染色质标记的染色体结构,并揭示了受精后高阶染色质结构与组蛋白 H3 在赖氨酸第 27 位甲基化等位基因特异性富集相吻合。这些发现证明,在早期发育过程中,三维基因组结构和基因表达存在复杂的动态。

近年来,单细胞和微量细胞测序技术在表观基因组研究中的广泛应用极大促进了对胚胎发育的表

观遗传重编程的理解。然而,在不同的基因组位点如何调节重编程仍然是未知的,测序技术的最新进展引起了对哺乳动物植入前胚胎发育过程中的表观基因组重编程调控网络的研究,并且迫切需要进一步的研究来揭示其潜在的分子机制。

3 新型检测技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用

现代的胚胎植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing, PGT) 的发展与 NGS 息息相关。PGT 总共经历了 3 个阶段,第一阶段是“胚胎植入前遗传学筛查 (preimplantation genetic screening, PGS)”,它以荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术为主,主要是对染色体非整倍体的检查,仅能检测 13、18、21 和性染色体这几种染色体非整倍体,无法主动检测拷贝数变异 (copy number variation, CNVs),但它仍应用于 PGT-SR、侵入性产检、隐匿性易位的检测。PGT 的第二阶段又称为全染色体筛查 (comprehensive chromosome screening, CCS),主要的检测技术是比较基因组杂交技术 (comparative genome hybridization, CGH),这种技术相对于第一阶段的 FISH 来说,检测的范围更大,从少数几种扩展到了全染色体组。第三阶段的 NGS 技术诞生于第二阶段,逐渐成为 PGT 的主要检测技术。近年来,基于 NGS 发展出适用于不同应用场景的 PGT 技术,在拓展 PGT 为未来的适应证解决更多临床问题方面,展现出卓越的优势。

3.1 无创 PGT-A (non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy, niPGT-A) niPGT-A 技术诞生于 2016 年,它是一种通过检测胚胎培养基中的 DNA 来对植入前胚胎的染色体进行检测的无创检测技术。它将滋养外胚层 (trophectoderm, TE) 与内细胞团释放到培养基的 DNA 进行富集,通过全基因组扩增技术和高通量测序技术,反映滋养外胚层和内细胞团的染色体整倍性^[28]。与传统的通过 TE 活检技术相比,niPGT-A 是一种无创检测技术,降低了因对胚胎造成创伤而导致移植率下降的可能性。同时,Xu et al^[29] 的研究表明,niPGT-A 技术的假阳性仅为 16%,假阴性率为 11.8%,而 TE 活检技术因嵌合体问题,无法完全反映内细胞团的基因组图谱。因此与传统 PGT-A 比较,niPGT-A 在无创性、降低嵌合体诊断率等方面展现出巨大优势。

3.2 PIMS 技术 PIMS 是一种基于表观遗传学的检测技术,这种技术主要是检测胞嘧啶上的甲基化

修饰,这种修饰与基因表达有关,可以反应婴儿能否顺利出生。它使用了全基因组双硫酸盐测序来测量胚胎滋养层中的 3~5 个细胞的甲基化水平。利用甲基组数据,分析 CNV 和全局平均甲基化水平。Gao et al^[30] 的研究表明,DNA 甲基化水平在 0.25~0.27 之间的胚胎活产率显著增加。将 PIMS 技术与 PGT 技术中的非整倍体筛查结合,使得胚胎植入前的筛查更加精确,从而提高胚胎种植成功率,改善 RIF 患者的妊娠结局。

3.3 全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 技术 WGS 利用高通量测序平台对人类不同个体或群体进行全基因组测序,并在个体或群体水平上进行生物信息分析,可全面挖掘 DNA 水平的遗传变异,为筛选疾病的致病及易感基因,研究发病及遗传机制提供重要信息。使用父母和胚胎的测序数据,通过 WGS 进行可靠的单基因疾病的胚胎植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing for monogenic gene diseases, PGT-M)、染色体数目异常的胚胎植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing for aneuploidy, PGT-A) 和结构重排的胚胎植入前遗传学检测 (preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement, PGT-SR)。与传统的 PGT 方法相比,WGS 方法具有以下优势:① 全基因组单倍型分析:WGS 方法可以提供全基因组范围内的单倍型分析,可以检测到更多的遗传变异。② 无需额外家庭成员:WGS 方法可以进行 PGT-M 的单倍型分析,无需额外的家庭成员参与,减少了检测的复杂性。③ 综合性 PGT 方法:WGS 方法可以同时 PGT-M、PGT-A 和 PGT-SR,提供了全面的胚胎遗传学检测。但这种方法常常受到绒毛膜促性腺激素的影响,且它可能无法直接测得某些特定疾病的突变,如三核苷酸重复疾病^[31]。

3.4 植入前遗传单倍体连锁分析 (preimplantation genetic haplotyping, PGH) 技术 PGH 通过检测与致病突变密切相关的基因标记,识别携带风险染色体的胚胎,并筛选出没有风险染色体的胚胎。基于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的定向突变检测结合短串联重复序列 (short tandem repeats, STRs) 连锁分析目前常用于 PGT-M。随着 NGS 技术的发展,基于 NGS 技术检测与目标基因或位点紧密连锁的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点的方法逐渐发展起来,促进了 PGH 的发展。由于 SNPs 的多态性位点最多,这种方法比传统的 PCR-STR 更加准确^[32],目前

NGS-SNP 已成功用于多种单基因疾病的 PGT,但应用于 PGT-M 中的种系嵌合体的筛选尚无报道。

4 高通量测序技术在生殖医学诊断中的应用

4.1 内膜容受性检测 内膜容受性的检测临床上常常用于 RIF 患者,即内膜容受性阵列(endometrial receptivity array, ERA)检测,这是一种基于高通量测序技术的内膜组织分析,常用的检测技术有 TAC-seq 技术^[33]。临床医师常使用标准化激素替代周期方案,予以雌激素 17~19 d,及黄体酮约 5 d 后取内膜,活检的时间相当于胚胎移植的第 1 天,通过对内膜组织 mRNA 和 microRNA 的分析来检测胚胎着床的潜在兼容性标志物的表达,评估内膜在胚胎移植过程中的适应性,从而可以确定胚胎移植的最佳时间窗。Ruiz-Alonso et al^[34]的研究表明,通过 NGS 技术与计算预测器相结合,可以分析每个子宫内膜阶段的转录组信息,从而通过对不同患者子宫内膜阶段的分析,达到个体化移植的目的。虽然 ERA 测试可以帮助确定胚胎的最佳种植窗,但它只是 RIF 的一种内膜功能异常的表现,而不是唯一的原因。因此,ERA 测试可能对于调整胚胎移植前孕酮暴露期来增加成功种植的机会是有用的,但并不能解决所有 RIF 的问题。

4.2 内膜微生态检测 基于 NGS 技术的子宫内微生物检测为顽固性的慢性子宫内膜炎患者和 RIF 患者的治疗提供了解决办法。子宫微生物群可能会对妊娠和着床率产生影响。研究^[35]表明,胚胎移植期间,包括移植前和移植后,子宫颈和子宫内膜中的主要微生物为乳酸菌属,子宫颈和子宫内膜中大肠杆菌的增加使得乳酸菌属对胚胎移植的保护作用降低。子宫内微生物检测可以检测出顽固性子宫内膜炎患者内膜中的细菌菌株,如肠杆菌科、链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌等,这些菌株与着床率降低和妊娠结果不佳相关。研究^[36]发现,利用试管婴儿助孕的女性中,高水平的乳酸杆菌与生殖成功率显著相关。

4.3 全外显子测序(whole exome sequencing, WES)检测 WES 是指利用序列捕获技术将全基因组外显子区域 DNA 捕捉并富集后进行高通量测序的基因组分析方法,在研究遗传因素与生殖障碍之间的关系中起到了重要作用。WES 可以用于检测与人类疾病相关的遗传变异,并且已成功应用于揭示无法解释的反复流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)的遗传原因^[37]。通过 WES

技术,可以发现与 URSA 和胎儿畸形相关的病理性突变,从而更好地理解这些疾病,并最终导向针对生殖障碍的有针对性治疗。WES 可以检测与生殖障碍有关的遗传变异,帮助确定可能的致病基因。通过分析 WES 测序数据,可以确定导致生殖障碍的具体遗传变异,从而为病因诊断提供依据。通过夫妻双方的 WES 检测,还可以揭示出可能影响后代的疾病基因,为 PGT 提供依据。

5 结语

高通量测序已经广泛应用于生命科学、医学和种群学等领域,成为现代基础医学疾病诊断的重要工具。高通量测序技术在生殖科学领域的研究和应用呈现出蓬勃快速发展的趋势,包括应用 SCS 解码生殖疾病病理生理过程,利用微量细胞测序揭示生殖细胞及胚胎早期发育遗传学规律,开发新型检测技术应用于胚胎植入前遗传学检测以及发展多种检测方法应用于临床诊断等,随着测序技术的不断发展和测序成本的降低,高通量测序在未来将会更快捷、准确、便宜,成为推动生殖医学发展的重要工具。

参考文献

- [1] Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, et al. Single-cell RNA-Seq reveals lineage and X chromosome dynamics in human preimplantation embryos[J]. *Cell*, 2016, 165(4): 1012–26.
- [2] Suryawanshi H, Morozov P, Straus A, et al. A single-cell survey of the human first-trimester placenta and decidua[J]. *Sci Adv*, 2018, 4(10): eaau4788.
- [3] Gillis-Buck E, Miller H, Sirota M, et al. Extrathymic Aire-expressing cells support maternal-fetal tolerance[J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(61): eabf1968.
- [4] He Y B, Han L, Wang C, et al. Bulk RNA-sequencing, single-cell RNA-sequencing analysis, and experimental validation reveal iron metabolism-related genes C1SD2 and CYP17A1 are potential diagnostic markers for recurrent pregnancy loss[J]. *Gene*, 2024, 901:148168.
- [5] Naydenov D D, Vashukova E S, Barbitoff Y A, et al. Current status and prospects of the single-cell sequencing technologies for revealing the pathogenesis of pregnancy-associated disorders[J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(3):756.
- [6] Shih A J, Adelson R P, Vashistha H, et al. Single-cell analysis of menstrual endometrial tissues defines phenotypes associated with endometriosis[J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 315.
- [7] Zhu S, Wang A, Xu W, et al. The heterogeneity of fibrosis and angiogenesis in endometriosis revealed by single-cell RNA-sequencing[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(2): 166602.
- [8] Lu Z, Chen C, Gao Y, et al. Screening target genes for the treat-

- ment of PCOS *via* analysis of single-cell sequencing data[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1):2975–89.
- [9] Harris R A, McAllister J M, Strauss J F 3rd. Single-cell RNA-Seq identifies pathways and genes contributing to the hyperandrogenemia associated with polycystic ovary syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13):10611.
- [10] La H, Yoo H, Lee E J, et al. Insights from the applications of single-cell transcriptomic analysis in germ cell development and reproductive medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):823.
- [11] De Kretser D M, Loveland K L, Meinhardt A, et al. Spermatogenesis[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13 Suppl 1: 1–8.
- [12] Reynaud K, Driancourt M A. Oocyte attrition[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 163(1–2):101–8.
- [13] DeSouza L, Diehl G, Yang E C, et al. Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression [J]. *Proteomics*, 2005, 5(1):270–81.
- [14] Zhao Z H, Ma J Y, Meng T G, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the landscape of early female germ cell development[J]. *FASEB J*, 2020, 34(9):12634–45.
- [15] Margolin G, Khil P P, Kim J, et al. Integrated transcriptome analysis of mouse spermatogenesis [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15:39.
- [16] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377–82.
- [17] Kolodziejczyk A A, Kim J K, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4):610–20.
- [18] Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications[J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 59:36–46.
- [19] Lau X, Munusamy P, Ng M J, et al. Single-cell RNA sequencing of the cynomolgus macaque testis reveals conserved transcriptional profiles during mammalian spermatogenesis[J]. *Dev Cell*, 2020, 54(4):548–66. e7.
- [20] Niu W, Spradling A C. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(33):20015–26.
- [21] Jenkins T G, Carrell D T. Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization[J]. *Front Genet*, 2012, 3:143.
- [22] Smith Z D, Chan M M, Mikkelsen T S, et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo[J]. *Nature*, 2012, 484(7394): 339–44.
- [23] Blakeley P, Fogarty N M, Del Valle I, et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq[J]. *Development*, 2015, 142(20): 3613.
- [24] Probst S, Sagar, Tomic J, et al. Spatiotemporal sequence of mesoderm and endoderm lineage segregation during mouse gastrulation [J]. *Development*, 2021, 148(1):dev193789.
- [25] Guzzetta A, Koska M, Rowton M, et al. Hedgehog-FGF signaling axis patterns anterior mesoderm during gastrulation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(27): 15712–23.
- [26] Hernandez Mora J R, Buhigas C, Clark S, et al. Single-cell multi-omic analysis profiles defective genome activation and epigenetic reprogramming associated with human pre-implantation embryo arrest[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(2): 112100.
- [27] Collombet S, Ranisavljevic N, Nagano T, et al. Parental-to-embryo switch of chromosome organization in early embryogenesis [J]. *Nature*, 2020, 580(7801): 142–6.
- [28] Huang L, Bogale B, Tang Y, 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): 14105–12.
- [29] Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for *in vitro* fertilization[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(42):11907–12.
- [30] Gao Y, Yi L, Zhan J, et al. A clinical study of preimplantation DNA methylation screening in assisted reproductive technology [J]. *Cell Res*, 2023, 33(6): 483–5.
- [31] Chen S, Yin X, Zhang S, et al. Comprehensive preimplantation genetic testing by massively parallel sequencing [J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(1): 236–47.
- [32] Chen D, Xu Y, Fu Y, et al. Clinical application of next generation sequencing-based haplotype linkage analysis in the preimplantation genetic testing for germline mosaicisms [J]. *Orphanet J Rare Di*, 2023, 18(1): 137.
- [33] Saxtorph M H, Hallager T, Persson G, et al. Assessing endometrial receptivity after recurrent implantation failure: a prospective controlled cohort study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 41(6): 998–1006.
- [34] Ruiz-Alonso M, Valbuena D, Gomez C, et al. Endometrial Receptivity Analysis (ERA): data versus opinions [J]. *Hum Reprod Open*, 2021, 2021(2): hoab011.
- [35] Bednarska-Czerwińska A, Morawiec E, Zmarzły N, et al. Dynamics of microbiome changes in the endometrium and uterine cervix during embryo implantation: a comparative analysis[J]. *Med Sci Monit*, 2023, 29: e941289.
- [36] Młodzik N, Lukaszuk K, Sieg W, et al. Endometrial microbiota-do they mean more than we have expected? [J]. *Ginekol Pol*, 2020, 91(1):45–8.
- [37] Guo W, Zhu X, Yan L, et al. The present and future of whole-exome sequencing in studying and treating human reproductive disorders[J]. *J Genet Genomics*, 2018, 45(10): 517–25.