论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1670-03

人原核期胚胎形态评分对妊娠结局的影响

薛 侠,师娟子,张四林,赵皖秋 (710003 西安,陕西省妇幼保健院辅助生殖中心)

【摘要】 目的 探讨多个原核期形态学指标与取卵后第3天(D3)胚胎移植后妊娠结局之间的关系,筛选能反映胚胎移植后种植潜能的原核期形态指标。方法 回顾性分析本院生殖中心2007年11月至2008年2月的186例行常规体外受精/单精子卵胞浆内注射胚胎移植的不孕症患者,共395个胚胎,选取年龄≤35岁,第3天进行胚胎移植后妊娠的共84例患者为妊娠组;没有妊娠的不孕症患者共102例为未妊娠组。根据原核期形态包括两原核是否相邻、居中、大小、排列;核仁前体(NPB)的排列方式、大小、在原核中的位置;极体和原核长、纵轴夹角,进行数据统计,比较原核期形态和胚胎妊娠之间的关系。结果 妊娠组与未妊娠组相比,两原核形态、两NPB形态、两极体方位均有统计学差异($P<0.01$);妊娠组两原核形态A级明显高于B、C、D级(67.03% *vs* 20.88%、5.49%、6.59%,$P<0.01$);妊娠组两NPB形态1级和2级明显高于3、4级(38.46%、41.21% *vs* 17.03%、3.30%,$P<0.01$),妊娠组两极体方位α和β明显高于γ(48.35%、36.81% *vs* 14.84%,$P<0.05$)。结论 原核期形态可以反映受精卵的质量,可以为临床选择移植胚胎提供依据。

【关键词】 原核形态;极体;核仁前体;妊娠率
【中图法分类号】 R321-33;R321.2;R711.6 【文献标志码】 A

Impact of human pronuclear stage score on pregnancy rates

Xue Xia, Shi Juanzi, Zhang Silin, Zhao Wanqiu (Auxiliary Reproductive Center, Maternity and Children Health Care Hospital of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi Province, 710003, China)

【Abstract】 Objective To study the relation between pronuclear stage morphologic indexes of zygotes and pregnancy rates and to screen the pronuclear stage morphologic indexes of zygotes indicating the embryo pregnancy potential in 3 d after *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET). Methods One hundred and eighty-six patients at the age of below 35 years after IVF-ET in our center from Nov. 2007 to Feb. 2008 were enrolled in this study. The patients undergoing embryo transfer on day 3 after oocyte retrieval were divided into pregnancy group ($n=84$) and pregnancy failure group as control group ($n=102$). The morphologic characteristics of zygotes were analyzed including pronuclei, nucleolar precursor bodies (NPB), polar body (PB) located in the longitudinal or perpendicular axis of pronuclei and compared between the two groups. Results In the pregnancy group, the most frequent configuration was that with centralized, juxtaposed pronuclei (pattern A, 67.03%) compared to all the others (pattern B, 20.88%; pattern C, 5.49%; pattern D, 6.59%, $P<0.01$); the most proportion of nuclear precursor bodies morphology was represented by large-sized nuclei aligned or scattered in both pronuclei were observed in patterns 1 and 2 (38.46% and 41.21%) compared with patterns 3 and 4 (17.03% and 3.30%, $P<0.01$); the most frequent configuration was represented by that where polar bodies were located in the longitudinal and perpendicularly axis of pronuclei (pattern α, 48.35%; pattern β 36.81%) compared with others patterns γ (14.84%, $P<0.05$). Conclusion The morphology of two pronuclei can reflect the quality of zygotes and may help predict the developmental potential of embryo chosen on day 3 after IVF.

【Key words】 zygote morphology; polar body; nucleolar precursor body; pregnancy rate

Corresponding author: Shi Juanzi, E-mail: shijuanzi@126.com

常规体外受精/单精子卵胞浆内注射-胚胎移植(*in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer, IVF/ICSI-ET)临床中,在减少移植胚胎数的同时保持较高的临床妊娠率,一直是人类辅助生殖技术极其关注的1个热点,而用非侵入性手段选择具有最佳发育潜能的胚胎移植成为解决这一难题的

【通信作者】 师娟子,E-mail:shijuanzi@126.com

关键。通常根据受精后第 3 天(D3)的形态特征(卵裂率、碎片比例、卵裂球大小是否均匀等)来选择移植胚胎。但研究表明,D3 卵裂期胚胎形态并不足以识别具有最佳着床潜能的胚胎[1]。李劲等[2]最近也得出原核期胚胎形态可以预测胚胎发育潜能。本研究主要通过评估原核期原核形态、核仁前体形态、极体与原核的角度对妊娠结局的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析本院生殖中心 2007 年 11 月至 2008 年 2 月 186 例行常规 IVF-ET/ICSI 胚胎移植的不孕症患者。其中以超声看见孕囊为临床妊娠。已经排除因受精失败或者严重卵巢过度刺激综合征而放弃胚胎移植的病例。选取满足下列条件的患者:①年龄≤35 岁;②第 3 天进行胚胎移植。第 3 天进行胚胎移植后妊娠的 84 例患者为妊娠组,移植 182 个胚胎;没有妊娠的共 102 例不孕症患者为未妊娠组,移植 213 个胚胎。两组患者总胚胎数为 395 个,临床妊娠率为 45.16%。整个过程已取得患者知情同意和上报医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 控制性超排卵及取卵 促排卵采用长方案:黄体中期给予注射用醋酸曲普瑞林(达菲林)1.1 ~ 1.2 mg(具体根据患者的年龄、体质指数、基础 FSH 值而定),月经来潮后的第 2 ~ 3 天测血清 E_2、FSH 和 LH,当达到降调标准后,开始注射促性腺激素(Gn),监测 B 超和血清 E_2、LH 等调整药量,当有 2 个以上卵泡直径 > 17 mm 时,给予 HCG 5 000 ~ 10 000 IU 注射。HCG 注射后 36 h 行 B 超引导下的经阴道取卵术。

1.2.2 精子的收集、优化与体外受精 患者丈夫禁欲 2 ~ 7 d 以手淫法取精子于无菌容器内,待其液化后按 WHO 标准化精液分析法进行分析,采用密度梯度离心方法处理,然后上游收集优化精子。取卵后在体外培养 4 h 后行 IVF 授精。在体外培养 4 ~ 6 h 后行 ICSI。

1.2.3 原核期胚胎形态观察和胚胎移植 常规 IVF 或 ICSI 后 18 ~ 20 h 在倒置显微镜 TE2000-S(日本 Nikon 公司)下观察原核形态,看到 2 个清楚的原核即为正常受精。授精后 44 ~ 46 h (D2)、68 ~ 70 h(D3)评估卵裂期胚胎形态。取卵后第 3 天进行胚胎移植,移植胚胎标准主要根据 D3 胚胎形态,在此基础上综合考虑原核期和 D2 胚胎形态。胚胎移植 5 周后 B 超检查见妊娠囊为临床妊娠。

1.3 原核期形态评分标准

1.3.1 两原核(2PN)形态[3] 根据 2PN 形态分为:A,居中、紧靠、大小一致;B,靠边排列、紧靠、大小一致;C,居中、分散、大小一致;D,大小不一致;E,其他。

1.3.2 核仁前体(NPB)形态[3] 根据排列方式分为:1,核仁大、在两原核紧靠部位成线性排列、大小一致;2,核仁大、分散排列、大小一致;3,核仁大、一侧散在、一侧成线性排列、大小一致;4,核仁小、散在,大小不一致;5,两个完全不同的原核中的任何核仁形态。

1.3.3 极体的方位[3] 根据两极体和原核长、纵轴夹角分为:α,最远极体和原核长轴夹角为 ±30°;β,最远极体和原核纵轴夹角为 ±30°;γ,最远极体和原核长、纵轴夹角为 ±(30° ~ 60°)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 两原核形态

两原核形态在妊娠组和未妊娠组之间有统计学差异(χ^2 = 235.243,P < 0.01),妊娠组两原核形态 A 级明显高于 B、C、D 级(P < 0.01,表 1)。

表 1 两组两原核形态[例数(%)]

组别	例数	胚胎数	A	B	C	D
妊娠组	84	182	122(67.03%)[a]	38(20.88%)[ab]	10(5.49%)[ab]	12(6.59%)[ab]
未妊娠组	102	213	11(5.16%)	22(10.33%)	23(10.80%)	157(73.71%)

a:P < 0.01,与未妊娠组比较;b:P < 0.01,与 A 比较

2.2 两 NPB 形态

两 NPB 形态在妊娠组和未妊娠组之间有统计学差异(χ^2 = 217.25,P < 0.01),妊娠组两 NPB 形态 1 级和 2 级明显高于 3、4 级(P < 0.01,表 2)。

表 2 两组两 NPB 形态[例数(%)]

组别	例数	胚胎数	1	2	3	4	5
妊娠组	84	182	70(38.46%)[a]	75(41.21%)[a]	31(17.03%)[ab]	6(3.30%)[ab]	0
未妊娠组	102	213	5(2.35%)	26(12.21%)	28(13.15%)	63(29.58%)	91(42.72%)

a:P < 0.01,与未妊娠组比较;b:P < 0.01,与 1、2 比较

2.3 两极体方位

两极体方位在妊娠组和未妊娠组之间有统计学差异(χ^2 = 75.989,P < 0.01),妊娠组两极方位 α 和 β 明显高于 γ(P < 0.05,表 3)。

表 3 两组两极体方位[例数(%)]

组别	例数	胚胎数	α	β	γ
妊娠组	84	182	88(48.35%)[a]	67(36.81%)[a]	27(14.84%)[ab]
未妊娠组	102	213	43(20.19%)	49(23.00%)	121(56.81%)

a:P < 0.01,与未妊娠组比较;b:P < 0.05,与 α、β 比较

3 讨论

Scott[4]和 Liu 等[5]通过回顾性分析研究认为早期的原核评分结合 D2、D3 胚胎和 D5 囊胚进行移植,具

有很高的种植率和分娩率，而且D1的原核评分更重要。在受精过程中，雌性原核逐步向雄性原核迁移直至2个原核紧靠。在原核开始形成时，核仁前体小，多并且杂乱分布在原核中，随着时间的推移，原核的核仁前体（NPB）互相融合，使其数目减少，但体积增大，并向2个原核连接部位线形排列[6-10]。同时，胞浆内的微细胞器也由皮质区向卵子中央迁移，胞浆边缘形成透亮的胞浆晕[11]。有研究表明，2个原核的发育速度和对称性与胚胎的发育潜能相关[6,11-13]。

国外学者目前对原核形态的研究，主要采用的评价系统有两种，最早的一种是由Scott和Smith[6]于1998年提出，他们认为NPB极化分布且有晕轮的合子发展而来胚胎的妊娠率（55.0%）和种植率（20.0%）高；而到2000年Scott等[14]提出了一套新的评分标准，主要根据NPB的线性排列状态，而没有考虑胞浆的因素。另一种是由Comizzoli等[13]于1999年提出来的，他们的研究中不仅考虑NPB的分布，还研究了NPB的数量，根据NPB的数量和分布把合子分成6类，0类为正常，至少两个原核中有一个为0类的胚胎组的种植率高（50%）。

Gianaroli等[15]研究表明了由原核C、D、E模式，极体和原核长、纵轴夹角γ模式发育的胚胎不仅质量不好而且非整倍体率高；而由核仁前体形态1和2发育而来的胚胎不仅质量好而且整倍体率高；模式4和5发育的胚胎大部分是异常的。

本研究表明，原核形态、NPB形态、极体和原核的方位在妊娠组和非妊娠组间有统计学差异（$P < 0.01$）。妊娠组原核形态以A级最多见（67.03%）、NPB形态以1级和2级最多见，分别为38.46%和41.21%，极体和原核的位置以α和β最多见，分别为48.35%和36.81%。

本研究得出了原核期原核形态、NPB形态和极体与原核的角度对妊娠结局的影响，得出两原核居中、紧靠、大小一致；两侧NPB核仁大、成线性排列或分散排列、大小一致；极体和原核长、纵轴夹角为α或β的为优质受精卵，由其发育而来的D3胚胎移植后临床妊娠率高。

此结论提示我们应该在此基础上下一步继续培养至囊胚移植观察其临床妊娠率，既可为单胚移植提供依据，同时又可为胚胎冷冻保存提供选择的标准。所以认为根据此原核期评分标准，可筛选具有继续发育能力和着床潜能的胚胎，将其与D3形态评估相结合，将有助于识别有活力的胚胎。

参考文献：

[1] Graham J, Han T, Porter R, *et al*. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture[J]. Fertil Steril, 2000, 74(3): 495-497.

[2] 李劲，陈士岭，孙玲，等. 人原核期胚胎形态与胚胎移植后着床的关系[J]. 南方医科大学学报 2007, 27(7): 1057-1060, 1064.

[3] Gianaroli L, Magli M C, Ferraretti A P, *et al*. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection [J]. Fertil Steril, 2003, 80(2): 341-349.

[4] Scott L, Finn A, O'Leary T, *et al*. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates[J]. Hum Reprod, 2007, 22(1): 230-240.

[5] Liu Q, Zhu G, Hu J, *et al*. Relationship between pronuclear scoring and embryo quality and implantation potential in IVF-ET[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(2): 204-206.

[6] Scott L A, Smith S. The successful of use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval[J]. Hum Reprod, 1998, 13(4): 1003-1013.

[7] Nagy Z P, Dozortsev D, Diamond M, *et al*. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates[J]. Fertil Steril, 2003, 80(1): 67-74.

[8] Borini A, Lagalla C, Cattoli M, *et al*. Predictive factors for embryo implantation potential[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(5): 653-668.

[9] Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development[J]. Reprod Biomed Online, 2003, 6(2): 201-214.

[10] Lan K C, Huang F J, Lin Y C, *et al*. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5[J]. Hum Reprod, 2003, 18(6): 1299-1306.

[11] Payne D, Flaherty S P, Barry M F, *et al*. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography[J]. Hum Reprod, 1997, 12(3): 532-541.

[12] Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology [J]. Hum Reprod, 1999, 14(5): 1318-1323.

[13] Comizzoli P, Marquant-Le-Guienne B, Heyman Y, *et al*. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes[J]. Biol Reprod, 2000, 62(6): 1677-1684.

[14] Scott L, Alvero R, Leondires M, *et al*. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation[J]. Hum Reprod, 2000, 15(11): 2394-2403.

[15] Gianaroli L, Magli M C, Ferraretti A P, *et al*. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement[J]. Hum Reprod, 2007, 22(1): 241-249.

（收稿：2010-03-02 修回：2010-04-13）

（编辑 王小宴）