文章编号:1000-5404(2011)17-1827-04

论著

原核期形态特征与胚胎体外发育能力和体内着床潜能的关系

刘 群,胡 娟,任新玲,魏玉兰,吴 黎,靳 镭,李豫峰,朱桂金,艾继辉 (430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科)

[摘要] **目的** 探讨原核期评分系统与受精后第3天胚胎形态、受精后第6天囊胚形成和着床率之间的关系,以评估其在体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer,IVF-ET)中的应用价值。**方法** 于常规IVF或卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)受精后16~20 h观察受精情况,将正常受精卵母细胞参照Scott提出的Z评分系统分为Z1~Z4四种类型,比较不同原核类型之间的卵裂率,胚胎第3天(D3)优质胚胎率和第6天(D6)囊胚形成率。并通过分析着床结局明确的移植胚胎,比较各种类型受精卵之间的着床率。**结果** Z4组受精卵的卵裂率(92.9%)、D3优质胚胎率(14.25%)、D6囊胚形成率(10.48%)均明显低于其他各组($P<0.01$)。Z4组的着床率(5.88%)很低,但各组的着床率之间差异无显著性($P>0.05$)。Z1、Z2、Z3三组间的卵裂率、D3优质胚胎率、D6囊胚形成率和着床率之间差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 异常的原核形态(Z4型)可预测胚胎的体内外发育潜能,但核仁的形态特征并不一定能预测胚胎的活力,Z1、Z2和Z3胚胎可能具有相同的发育潜能。

[关键词] 体外授精-胚胎移植;胚胎质量;囊胚形成;着床能力;原核评估
[中图法分类号] R321-33; R321.2; R321.3 [文献标志码] A

Correlation of pronucleus morphology with *in vitro* development and *in vivo* implantation potential

Liu Qun, Hu Juan, Ren Xinling, Wei Yulan, Wu Li, Jin Lei, Li Yufeng, Zhu Guijin, Ai Jihui (Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430030, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation of pronucleus scoring system with embryo morphology 3 days after fertilization, blastulation and implantation rate 6 days after fertilization in order to assess its application in in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Methods** Fertilization was observed 16-20 h after insemination during conventional IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Normal fertilized zygotes were divided into groups Z1, Z2, Z3 and Z4 according to the Z scoring system developed by Scott. Cleavage rate and excellent embryo rates 3 days after fertilization and blastulation 6 days after fertilization were compared between different pronuclei. Implantation rates of different fertilized eggs were compared by analyzing the transferred embryos. **Results** The cleavage rate (92.9%), excellent embryo rate 3 days after fertilization (14.25%) and blastulation rate 6 days after fertilization (10.48%) were significantly lower in Z4 group than in the other 3 groups ($P<0.001$). The implantation rate was very low in Z4 group (5.88%) with no significant difference among the 4 groups ($P>0.05$). Significant difference was also not observed in excellent embryo and blastulation and implantation rates among the Z1, Z2 and Z3 groups ($P>0.05$). **Conclusion** Abnormal pronucleus morphology (Z4) can predict the *in vitro* and *in vivo* developmental potential of embryos, but the morphology of nucleoli does not necessarily predict the embryo viability. Z1, Z2 and Z3 embryos may have the same development potential.

[**Key words**] *in vitro* fertilization-embryo transfer; embryo quality; blastulation; implantation potential; pronuclear assessment

Corresponding author: Ai Jihui, Tel: 86-27-83663269, E-mail: jihuiai@yahoo.com

在临床体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)实验室,目前还是主要依靠光镜下胚胎的形态学特征非侵入性地评估胚胎是否正常,而确定能代表顶级胚胎的形态特征成为IVF的难点和关键点。通常根据卵裂期胚胎的形态包括细胞数、卵裂球大小是否均匀及碎片比例来评估胚胎[1-2],尽管这些形态学指标可以预测

[通信作者] 艾继辉,电话:(027)83663269,email: jihuiai@yahoo.com

一定的胚胎发育潜能,但没有一个是胚胎能力的绝对标志,那些被判断为差质量的胚胎的成功着床和正常妊娠结局说明了这一点[3]。

近年来,人们发现,原核期作为可同时分析卵母细胞和精子两方面因素的第一个阶段,其形态特征可反映胚胎的着床能力[4-6]。研究发现,这些形态特征,包括原核的位置、大小,核仁前体(NPBs)的数量、大小和分布等,与卵裂期胚胎形态、囊胚形成、临床妊娠以及胚胎的着床能力密切相关。但最近一些研究并不支持这一结论[7-9]。本研究通过对原核期胚胎进行形态学分级,前瞻性地探讨其与第3天(day 3, D3)胚胎形态、胚胎着床及体外囊胚形成之间的关系,为更好地选择移植胚胎提供依据。

1 对象与方法

1.1 实验对象

本研究前瞻性地收集2009年10-12月在我院生殖医学中心进行常规体外受精-胚胎移植或卵胞浆内单精子注射术助孕的701个治疗周期,排除无正常受精胚胎的周期。患者年龄21~45(30.62±4.12)岁。不孕原因有输卵管性不孕441例,子宫内膜异位症33例,多囊卵巢27例,男方因素149例,原因不明40例,其他11例。因为形态评估属于主观性较强的参数,因此本研究中所有周期的胚胎评估均由专人进行,以排除不同观察者之间的变异。本研究开展获武汉同济医院伦理委员会批准。

1.2 方法

控制性超排卵,取卵,精液收集、优化,体外授精和胚胎培养等按本中心常规进行[10]。

1.2.1 原核期评估 常规IVF或ICSI后16~20 h,在配备有Hoffman调制相差系统和恒温热台的倒置显微镜(Axiovert 135M,德国Zeiss公司)下检查原核形态,看到两个清楚的原核即为正常受精。参照Scott提出的Z评分系统[4,11],先根据原核的形态(原核的大小、位置和距离)将原核期受精卵分为Z4和非Z4,再按两原核内核仁前体(NPBs)的数目、大小和分布将非Z4受精卵分为Z1、Z2和Z3三种类型。Z1、Z2和Z3三种类型的原核形态正常(雌雄原核大小相当,靠拢并排列在卵中央)。具体为Z1:核仁数目和大小相当,并列排在原核接合处;Z2:核仁数目和大小相当,分散排列在两原核中;Z3:核仁数量(相差>2)或大小不一;或者原核内见许多小的针尖样的核仁;Z4:原核形态异常,具体为两原核大小不一,两原核分离,原核位置不居中或两原核都极小。

1.2.2 卵裂期胚胎评估 于受精后42~44 h(D2)和受精后66~68 h(D3)评估卵裂期胚胎形态,记录胚胎细胞数、碎片比例、细胞大小是否均匀。

1.2.3 胚胎移植和冷冻 绝大多数患者的胚胎培养至D3移植,移植胚胎的选择首先考虑第3天胚胎形态特征,在此基础上,优先选择原核评分为Z1和Z2的胚胎。移植后剩余的优质胚胎冷冻保存。

1.2.4 D3低形态学胚胎的继续培养 于D3将移植和冷冻后剩余的正常受精D3胚胎移至G2.2培养液(Vitrolife, 瑞典)中,继续培养至D6,观察并记录有无囊胚形成。

1.2.5 分析指标 ①D3优质胚胎:D3优质胚胎定义为细胞数≥6,卵裂球大小均匀,碎片不超过10%[5]。②D6囊胚形成:D6可见早期囊胚,晚期囊胚,扩张期囊胚,正在孵出或已孵出囊胚。③临床妊娠的确定及着床率计算 移植后4周B超检查,发现孕囊诊断为临床妊娠。着床率为(B超下可见孕囊数/移植胚胎数)×100%。

1.3 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件,计数资料应用χ^2检验;计量资料应用t检验。

2 结果

2.1 一般情况

701例患者,共获卵8 279个,其中成熟卵母细胞为7 419个(89.61%),正常受精为4 729个,正常受精率为63.74%。其中卵裂胚胎4 620个,卵裂率为97.70%。去除因D2移植或退化而未培养至D3的胚胎后,至D3共有4 510个胚胎,其中优质胚胎为1 172个,优质胚胎率为25.99%。共有840个D3低形态学胚胎继续培养至D6,形成囊胚185个,囊胚形成率为22.02%。

701例患者中,排除未移植的17例患者,同时为避免其他因素对着床结果的干扰,还排除女方年龄≥40岁的16例患者,以往IVF周期数>2次的34例患者,子宫内膜<6 mm的5例患者。因此共629例患者的移植胚胎的资料用于着床能力的分析。临床妊娠273例,临床妊娠率为43.4%,共移植胚胎1 251个,孕囊数为362个,着床率为28.9%。

因为每个胚胎的确切命运即着床潜能只有在100%胚胎着床的妊娠周期(89例,169个胚胎)或未妊娠周期(356例,687个胚胎)中得到确认。这两个亚组形成主要研究组(856个胚胎)来分析早期胚胎形态参数对胚胎着床潜能的预测能力。100%着床患者与0%着床患者的资料比较见表1。两组间女方年龄,以往周期次数,移植胚胎数,原发不孕患者的比例,手术方式和hCG日子宫内膜厚度之间差异均无显著性。

表1 100%着床患者与0%着床患者的临床资料比较

因素	100%着床组(n=89)	0%着床组(n=356)	结果
女方年龄(岁)	29.71±3.62(23~39)	30.27±3.87(21~39)	NS
以往次数	1.12±0.33	1.19±0.39	NS
女方基础FSH(mIU/ml)	5.53±2.18	5.75±2.35	NS
移植胚胎数	1.90±0.37	1.93±0.47	NS
原发不孕患者比例	53/89(59.55%)	176/356(49.44%)	NS
IVF%	66/89(74.16%)	269/356(75.56%)	NS
hCG日子宫内膜厚度(mm)	10.90±2.21	10.48±2.11	NS

2.2 原核期Z评分对胚胎体外发育能力和体内着床能力的影响

共有4 729个正常受精卵母细胞。其中Z1占11.99%(567个),Z2占52.40%(2 478个),Z3占25.78%(1 219个),Z4占9.83%(465个)。各组间的卵裂率,D3优质胚胎率,D6囊胚形成率和着床率的比较见表2。结果表明,Z4组的卵裂率(P<0.001),D3优质胚胎率(P<0.001),D6囊胚形成率(P<0.01)均明显低于其他各组。各组的着床率之间差异无显著性(P<0.053),但Z4的着床率(5.88%)很低,移植胚胎中此类胚胎样本太少可能是差异无显著性的原因。Z1、Z2、Z3三组间

的卵裂率,D3 优质胚胎率,D6 囊胚形成率和着床率之间差异均无显著性。

表 2 原核期 Z 评分与卵裂率、D3 胚胎质量、D6 囊胚形成和着床之间的关系

原核分类	卵裂率	D3 优质胚胎率	D6 囊胚形成率	着床率
Z1	98.94%(561/567)	28.34%(155/547)	22.22%(22/99)	17.50%(21/120)
Z2	98.39%(2 438/2 478)	27.45%(649/2 364)	23.57%(95/403)	21.60%(111/514)
Z3	97.54%(1 189/1 219)	26.29%(306/1 164)	25.70%(55/214)	19.88%(34/171)
Z4	92.90%(432/465)[b]	14.25%(62/435)[b]	10.48%(13/124)[a]	5.88%(3/51)

a: $P<0.05$, b: $P<0.001$, 与 Z1、Z2、Z3 相比

3 讨论

正常受精遵循一系列连续的过程[12],通过非侵入性的显微镜观察方法,可简单、快速地分辨出这一过程的各种形态特征,成为各种原核评估的理论基础。同其他研究一致[4,11,13],本研究发现,Z4 型受精卵的卵裂率、D3 优质胚胎率和囊胚形成率均明显低于非 Z4 型受精卵。其着床率也低于其他各组,但差异没有显著性意义,可能与移植此类胚胎的患者很少,样本量小有关。从 Payne 等[12]的研究所揭示的正常受精过程,我们可以理解 Z4 型受精卵活力差的机制。①原核大小不一。这种原核的发生有两种可能机制,一是在雌雄原核开始由小变大时,其中一个原核停止发育,导致两原核大小不等。第二种可能是配子染色体异常,特别是如果某一原核很大,这个原核多半是双倍体,此胚胎虽然表现为 2PN,但多为三倍体。②雌雄原核未靠拢。只有两原核靠拢,排列在卵母细胞中央,父母双方染色体才会排列在位于卵中央的纺锤体上,开始第 1 次有丝分裂(卵裂)。如果受精后 16 ~ 18 h 雌雄原核仍未靠拢,说明星状体和微管的形成受到破坏,会导致发育异常。③雌雄原核的位置偏于一侧。受精时,雄原核逐步向卵母细胞的中心位置移动,同时星状体中的微管将雌原核拉向雄原核,因此最后原核应位于正中或稍偏向第二极体所在的半球。如果太偏于一侧说明微管功能异常。④两原核太小,说明发育迟缓或停滞。Edirisinghe 等[14]分析胚胎的 Z 评分与 13、16、18、21、22、X 和 Y 染色体非整倍体之间的关系,发现 Z4 来源的胚胎的染色体非整倍体高达 86.4%,说明原核期评估中,筛查原核形态异常的胚胎有助于排除染色体异常的胚胎,具有临床实用价值。

与以往一些研究的结论不同[4,11],本研究在 Z1、Z2 和 Z3 三组受精卵之间,未发现优质胚胎率,囊胚形成率和着床率之间的差异,表明这 3 种原核类型的胚胎可能具有相同的活力。这一点与本中心以前的一项回顾性分析的结果不太一致[13],其原因在于在以前的回顾性研究中,原核评估由多人进行,评估者易受以往观念的影响,混杂入其他的影响因素。而本研究是由专人评估的前瞻性研究,消除了观察者之间的主观差异,结论更为可靠。而且近年来的多项研究均支持本结论。Salumets 等[7]通过对 249 例单胚胎移植周期的分析,发现不同原核类型间的胚胎质量、着床率和妊娠结局之间没有显著性差异。同样,在一个最近的 552 个胚胎的前瞻性研究中,Payne 等[8]检测了 2 种不同的决定模型:一个基于标准的胚胎形态标准,另一个基于 Z 评分,未发现原核类型与着床或妊娠率之间的联系。最近 Bar-Yoseph[9] 和 Weitzman[15] 也报道了 Z1、Z2 和 Z3 三组受精卵的着床率之间差异没有显著性。

我们知道,原核的发育虽然遵循着一定的规律,但它不是一个静止的过程[16],而是一个不断进展的过程,在不同的时间评估原核形态可能会有不同的结果,因此,仅凭单次评估的结果来分类受精卵的质量可能会误导。在某一时间点原核评分差的胚胎在晚些时间评估时可能实际上成为高质量的受精卵。当然,在受精后固定时间范围评估原核形态可能会将此类误差降至最低,但是,在实际工作中并不能确定受精时间。在 ICSI 病例中,根据显微注射的时间,可以知道卵母细胞的受精时间,但是常规 IVF 中只能估计。在固定的时间间隔内评估受精卵是否有意义还有待进一步研究。

另一方面,从广受争议的 Z3 受精卵来看,两原核间核仁的数目或大小不等是主要特征。但是,在 Payne[12]最初进行的通过对原核期胚胎进行实时录像观察的结果来看,在正常受精的原核期胚胎中,雌原核的核仁数目(4.2 ± 0.3)明显低于雄原核的核仁数目(7.0 ± 2.8),提示两原核间核仁数目的差异可能是属于雌雄原核之间的固有差异,不足以评判其发育潜能。可能还需进行更细致的大样本前瞻性研究来探讨各 Z3 亚型之间的差异和能真实反映胚胎活力的评判标准。

总之,在受精后第 1 天的原核期,异常的原核形态(Z4)可预测胚胎的体内外发育潜能,但原核内核仁的形态特征并不一定能预测胚胎的活力,Z1、Z2 和 Z3 胚胎可能具有相同的发育潜能。

参考文献:

[1] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, *et al*. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(3): 251 - 262.

[2] Sakkas D, Gardner D K. Noninvasive methods to assess embryo quality [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005, 17(3): 283 - 288.

[3] Aydiner F, Yetkin C E, Seli E. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction [J]. Curr Mol Med, 2010, 10(2): 206 - 215.

[4] 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.

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

[6] 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.
[7] Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari A M, *et al*. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality[J]. Hum Reprod, 2001, 16(10): 2177-2181.
[8] Payne J F, Raburn D J, Couchman G M, *et al*. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes[J]. Fertil Steril, 2005, 84(4): 900-909.
[9] Bar-Yoseph H, Levy A, Sonin Y, *et al*. Morphological embryo assessment: reevaluation[J]. Fertil Steril, 2011, 95(5): 1624-1628, e1-e2.
[10] 刘群, 朱桂金, 胡娟, 等. D2胚胎核状态影响胚胎质量和着床潜能[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(1): 26-29.
[11] Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development[J]. Reprod Biomed Online, 2003, 6(2): 201-214.
[12] 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.
[13] 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.
[14] Edirisinghe W R, Jemmott R, Smith C, *et al*. Association of pronuclear Z score with rates of aneuploidy in *in vitro*-fertilised embryos[J]. Reprod Fertil Dev, 2005, 17(5): 529-534.
[15] Weitzman V N, Schnee-Riesz J, Benadiva C, *et al*. Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes[J]. Fertil Steril, 2010, 93(2): 658-662.
[16] Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(3): 237-249.

(收稿:2011-05-06;修回:2011-06-13)
(编辑 汪勤俭)

(上接1826页)

<36个月中阳性表达(+5、++9、+++14)高于22例生存期≥36个月(+3例、++3例、+++8例)($P<0.05$)。FoxM1在47例浸润型中阳性表达(+7、++12、+++11)显著高于17例肿块型(+2、++2、+++3)($P=0.009$),在36例低分化中阳性表达(+6、++8、+++11)高于28例中高分化者(+3、++6、+++3)($P<0.05$),在30例合并淋巴转移中阳性表达(+6、++9、+++8)高于34例不合并淋巴转移者(+3、++5、+++6)($P<0.05$),在34例Nevin分期Ⅰ~Ⅲ期中阳性表达(+5、++6、+++3)与30例Ⅳ~Ⅴ期(+4、++8、+++11)的差异有统计学意义($P<0.05$),在40例术后生存期<36个月中阳性表达(+7、++12、+++10)高于24例生存期≥36个月(+2、++2、+++4)($P<0.05$)。Plk1和FoxM1在不同性别、年龄、合并胆囊病史、组织类型及术式的表达分析中差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 Plk1和FoxM1在胆囊癌中表达的相关性

将64例胆囊癌中Plk1和FoxM1的表达水平行Spearman等级相关性分析发现,Plk1与FoxM1的表达存在正相关关系,($r=0.403$,$P<0.05$)。

3 讨论

胆囊癌起病隐匿、早期诊断率低、预后差。研究发现在细胞周期性分裂G_1/S期及G_2/M期中心体相关激酶调节失控后中心体受损,纺锤体产生缺陷,难以准确定位并形成异倍体,引发癌基因活性或抑癌基因的缺失而使肿瘤发生[4]。Plk1在细胞周期中启动及维系有丝分裂的正常进行,参与包括中心体成熟、纺锤体形成等调节[5],Plk1由于发挥其调控功能而呈高表达状态,这与实验发现其从正常胆囊、癌旁到癌组织中表达递增相一致。由于恶性肿瘤呈侵袭性生长,Plk1发挥其调控功能而与新生肿瘤细胞伴随,本实验证实其高表达与胆囊癌的分化程度、术后生存时间等临床病理特征相关,也证实了Plk1表达于多数实体肿瘤组织且其表达具有预测预后价值[6]。

FoxM1是一种功能涉及胚胎发育、细胞周期调控、免疫调节及肿瘤发生等方面的核增殖转录调节因子,能够调节一系列与有丝分裂相关的蛋白和酶的表达,高表达于多种肿瘤细胞且阻断或抑制其表达能够显著抑制癌细胞的增殖侵袭能力[7]。这与本实验发现其从正常胆囊、癌旁到癌组织中阳性表达递增相符,且其高表达与胆囊癌的多个临床病理指标相关,其高表达的肿瘤恶性度较高,由此推测FoxM1参与的细胞增殖信号传导通路可能在胆囊癌的发生及演变中发挥作用,运用对FoxM1在其他肿瘤中的研究成果对胆囊癌的诊治进行深入探讨是可行的。

64例胆囊癌中Plk1和FoxM1的表达存在一定的相关性,由此推测二者在癌细胞的增殖过程中均不同程度地发挥作用,联合检测其表达可作为反映癌细胞增殖程度的指标。

参考文献:

[1] 石景森, 任予. 中国原发性胆囊癌的流行病学特点[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(10): 583-584.
[2] Hanisch A, WeihnerA, Nigg E A, *et al*. Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(1): 448-459.
[3] Chan D W, Yu S Y, Chiu P M, *et al*. Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis[J]. J Pathol, 2008, 215(3): 245-252.
[4] Nakagawa Y, Numoto K, Yoshida A, *et al*. Chromosomal and genetic imbalances in synovial sarcoma detected by conventional and microarray comparative genomic hybridization[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(7): 444-450.
[5] Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 321-330.
[6] Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, *et al*. Polo-like kinases (Plks) and cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(2): 287-291.
[7] Wierstra I, Alves J. FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor[J]. Biol Chem, 2007, 388(11): 1257-1274.

(收稿:2011-04-08;修回:2011-06-02)
(编辑 邓强庭)