

废弃胚胎继续囊胚培养和移植的临床结局分析

王治鸿¹, 王媛², 土增荣¹, 王丽媛¹, 范晶¹

1. 山西医科大学第一医院生殖中心, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 探讨体外受精治疗周期中第 3 天移植、冷冻后剩余不符合冷冻标准的“废弃”胚胎形成囊胚的潜力以及与妊娠结局的关系。**方法** 收集 2013 年 4 月至 2014 年 8 月 100 例患者在体外受精(IVF)/精子显微授精术(ICSI)胚胎移植 106 个周期中的 318 枚“废弃”胚胎,采用序贯培养法将“废弃”胚胎进行囊胚培养。分别比较第 3 天 2~4 个细胞和 4~5 个细胞、碎片率 <5% 和碎片率 5%~10% 的胚胎形成囊胚的情况,并观察这些囊胚冷冻复苏后的存活情况及移植后的临床结局。**结果** 318 枚“废弃”胚胎,经序贯培养后获得了 117 枚囊胚,囊胚形成率为 36.79%,其中优质囊胚 10.38% (33/318)。4~5 个细胞者的囊胚形成率 38.16% (116/304) 高于 2~3 个细胞者的 7.14% (1/14),差异有统计学意义 ($P < 0.05$);碎片率 <5% 的囊胚形成率 38.06% (110/289) 和优质胚胎率 75.45% (83/110) 均高于碎片率 5%~10% 的囊胚形成率 24.14% (7/29) 和优质胚胎率 57.14% (4/7),但无统计学差异 ($P > 0.05$)。其中形态优良囊胚用玻璃化冷冻技术保存,共冻胚 43 枚,36 枚囊胚复苏后存活 24 枚,存活率 66.67% (24/36),9 例获得剩余胚胎来源囊胚的复苏解冻移植周期,临床妊娠 3 例,1 例健康新生儿出生,未发生流产。**结论** 一些形态学上认为无冷冻价值的第 3 天“废弃”胚胎可以有不同程度的发育潜能,延长体外培养的时间部分可以继续发育成囊胚,尤其是 4~5 个细胞者,碎片率 <5% 者发育成囊胚的潜力较大。所以在废弃胚胎前,宜先考虑将胚胎培养至囊胚期,如未形成囊胚再行废弃。来自“废弃”胚胎的囊胚能够耐受玻璃化冷冻并获得活产婴儿,从而减轻患者经济负担,最大限度地利用胚胎,提高累积妊娠率。

关键词: 废弃胚胎; 囊胚培养; 遗传学诊断; 移植; 妊娠结局

中图分类号: R 322.1 R 711.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1114-03

近年来,随着辅助生殖技术在临床中的广泛应用,每年均有大量不适合移植的胚胎被废弃,这不仅造成胚胎的浪费,也增加了不孕症患者的心理和经济负担,更是建立人类胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)系这一伟大工程的一项重大损失。本研究对第 3 天的废弃胚胎用囊胚培养液进行序贯培养,以观察不同卵裂球数、不同质量的废弃胚胎发育成囊胚的比率和质量,同时将获得的囊胚进行冷冻、复苏及移植,分析其与临床妊娠结局的关系,以期临床工作中废弃胚胎的处理及废弃胚胎与临床妊娠率的关系提供一定的参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2013 年 4 月至 2014 年 8 月在我院生殖中心行体外受精(IVF)/精子显微授精术(ICSI)助孕的 100 例不孕症患者,在 106 个周期中的 318 枚废弃胚胎。本研究均经过本院伦理委员会的批准,所有患者均签署了“自愿将胚胎用于科学研究的知情同意书”,并且遵循 2003 年科学技术部、卫生

部颁布的《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》。

1.2 研究方法

1.2.1 废弃胚胎的来源及培养 根据不孕症患者的不孕原因分别采用 IVF 或 ICSI 授精,授精后第 3 天仍处于 2~6 细胞期且评分 <5 分(评分标准见表 1)的胚胎被视为废弃胚胎。将其置于 Quinn's Advantage TM Blastocyst Medium (美国进口,ART-1029)中进行序贯培养,进而观察其囊胚的发育情况。

表 1 第 3 天胚胎形态学评分标准

得分	卵裂球数(C)	碎片体积(F,%)	卵裂球对称性(S)
0	-	>50	不对称
1	2~3	26~50	对称或略不对称
2	4~5	11~25	对称
3	6~7	5~10	对称
4	8~10	无或<5	对称

注:胚胎得分=C+F+S;<5 分胚为废弃胚胎;≥5 分胚为可用胚胎;≥7 分胚为优良胚胎;9 分、10 分胚为优质胚胎。

1.2.2 囊胚评分及冷冻移植 囊胚的分级^[1] 首先根据囊胚的扩张和孵出程度将囊胚分成 1~6 级:1 级,早期囊胚,囊胚腔体积 < 囊胚总体积的一半;2 级,囊胚腔体积 > 囊胚总体积的一半;3 级,完全扩张囊胚,囊胚腔占据整个囊胚;4 级,扩张后囊胚,囊胚腔体积较早期囊胚明显扩大,透明带变薄;5 级,正在

孵化的囊胚,囊胚正从透明带破裂口孵出;6级,孵化出的囊胚,囊胚完全从透明带中脱出。3~6级囊胚需对内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层细胞(trophectoderm, TM)进行评分。ICM评分:A级,细胞数目多,结合紧密;B级,细胞数目较少,结合较松散;C级,细胞数目极少。TE评分:A级,细胞数目多,囊胚四周均有细胞分布;B级,细胞数目较少,上皮细胞较松散;C级,细胞数目极少。将第5天评分 $\geq 3BB$ 或第6天评分 $\geq 4BB$ 的囊胚定为优质囊胚。随机将部分囊胚进行冷冻培养,当不孕症患者处于排卵后第5天或人绒毛膜促性腺激素(HCG)注射后第7天,内膜及激素水平均处于合适范围时,对冷冻的囊胚进行复苏移植,观察囊胚复苏情况及临床妊娠情况。

1.2.3 妊娠结局的判断 移植后第14天,测血HCG值,若HCG值 ≥ 25 mIU/ml,则为生化妊娠;移植后第35天行B超检查,若见妊囊者则为临床妊娠。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件包进行统计学分析。结果用百分率表示,率的比较应用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

本研究共收集100例患者进行了IVF/ICSI 106个周期的318枚“废弃”胚胎,经过序贯培养后获得了117枚囊胚,其中有33枚为优质囊胚,其囊胚形成率及优质囊胚形成率分别是36.79%、10.38%。

2.1 第3天废弃胚胎的卵裂球数与囊胚形成的关系

第3天卵裂球数为4~5个细胞的废弃胚胎304例,其囊胚形成数量为116例,形成率为38.16%;卵裂球数为2~3个细胞的废弃胚胎14例,其囊胚形成1例,囊胚形成率为7.14%。第3天卵裂球数为4~5个细胞的废弃胚胎囊胚形成率高于卵裂球数为2~3个细胞的废弃胚胎囊胚形成率,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 第3天的废弃胚胎质量与囊胚形成的关系 碎片率 $< 5\%$ 的废弃胚胎其囊胚形成率和优质囊胚形成率分别为38.06% (110/289)和75.45% (83/110);碎片率5%~10%的废弃胚胎囊胚形成率与优质囊胚形成率分别为24.14% (7/29)与57.14% (4/7)。碎片率 $< 5\%$ 与碎片率5%~10%的废弃胚胎形成率与优质胚胎形成率比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.3 妊娠结局 冷冻43枚优质胚胎,复苏36枚囊胚后共存活24枚,存活率66.67% (24/36),9例获得剩余胚胎来源囊胚的复苏冷冻移植,临床妊娠3例,

其中1个健康新生儿出生,未发生自然流产。

3 讨论

胚胎干细胞是一种高度未分化的全能细胞,它可以被诱导分化为人体各种类型的细胞和器官,从而为临床上某些遗传性疾病的治疗提供一定的帮助,具有重大的科研价值。人类辅助生殖技术中的废弃胚胎形成的囊胚可以用于人类胚胎干细胞系的研究^[2],为其提供丰富的材料。同时,通过对废弃胚胎进行继续培养,其仍有不同程度的发育潜能,部分甚至可以发育成囊胚进而冷冻保存以供移植,从而为不育症患者提供更多的可移植胚胎,减轻患者的经济负担。

大量研究显示第3天废弃胚胎仍有一定的发育成囊胚的潜能^[3-5],但是卵裂球的细胞数及胚胎的碎片率却不同程度的影响着囊胚的形成。Boostanfar等^[6]研究发现,第3天胚胎的囊胚形成率随其卵裂球细胞数目的增大而增高。魏丽娜等^[7]也认为,卵裂球数目 ≥ 6 个时,囊胚的形成率明显高于2~5细胞胚胎。本研究中废弃胚胎卵裂球细胞数为4~5个的囊胚形成率(38.16%)显著高于卵裂球细胞数为2~3个的胚胎的囊胚形成率(7.14%),两组比较差异有统计学意义,该结论与以上研究结果相一致。同时,胚胎碎片是胚胎在体外培养过程中的常见现象,虽然其产生的确切机制尚不明确^[8],但是国内外均有研究显示第3天胚胎的囊胚形成率与其碎片率密切相关,囊胚的形成率随胚胎碎片率的增长而降低^[9-10]。本研究中第3天碎片率 $< 5\%$ 的废弃胚胎囊胚形成率(38.06%)和优质囊胚率(75.45%)均稍高于碎片率5%~10%的废弃胚胎的囊胚形成率(24.14%)和优质囊胚率(57.14%),但差异无统计学意义。另外, Munné等^[11]认为胚胎碎片率在20%~40%时,大约有47%胚胎存在染色体异常。所以,在人类辅助生殖技术中我们应该不断改进,应用新技术、新方法以减少细胞碎片的形成,从而提高胚胎的质量,获得更高的临床妊娠率。

本研究中对废弃胚胎继续培养获得的囊胚进行冷冻复苏移植,囊胚复苏后存活率66.67%,临床妊娠3例,1个健康新生儿出生,该结果表明废弃胚胎形成的囊胚能够耐受玻璃化冷冻并获得活产儿,其结论与朱玉蓉等^[12]的研究结果相一致。但是,健康新生儿出生率较低,分析可能与下列因素有关:(1)样本量太少,需进一步扩大样本量加以验证;(2)废弃胚胎的细胞数较少、细胞碎片率较高、卵裂球对称性较差,这些因素均可导致染色体异常率增高^[13-15],从而影响胚胎的继续发育,进而对胚胎的种植率、临床

妊娠率、健康新生儿出生率造成影响。所以,针对以上的第二种影响因素我们可以将囊胚培养与胚胎种植前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 相结合,这种结合对出生缺陷的干预及优生优育工作均有重要的意义。另外,薛林涛等^[16]对囊胚质量与活检结局相关性研究发现,胚胎种植前遗传学诊断的进行并不会对胚胎继续发育的能力及玻璃化冻融的复苏效果造成影响。因此,为了能够选择更高质量的囊胚以供移植,我们应该尽可能的将胚胎种植前遗传学诊断应用于辅助生殖技术。

总之,对于第 3 天废弃胚胎我们可以继续培养,它不但可以用于建立人类胚胎干细胞系,而且可以增加不孕症患者的可用胚胎数。但是,废弃胚胎形成的囊胚用于解冻复苏移植时应尽可能与种植前遗传学诊断相结合。

参考文献

[1] 中华医学会. 临床技术操作规范/辅助生殖技术和精子库分册 [M]. 北京:人民军医出版社,2010.

[2] Wang F, Kong HJ, Kan QC, et al. Analysis of blastocyst culture of discarded embryos and its significance for establishing human embryonic stem cell line [J]. J Cell Biochem, 2012, 113 (12): 3835 - 3842.

[3] 莫美兰,宋成,张宏展,等. 低等级胚胎继续培养的价值与其临床结局[J]. 生殖医学杂志,2012,21(3):205 - 208.

[4] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting [J]. Hum Reprod, 2011, 26(6): 1270 - 1283.

[5] Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, et al. Limited value of morpho-

logical assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos [J]. Hum Reprod, 2007, 22(7): 1973 - 1981.

- [6] Boostanfar R, Jain JK, Slater CC, et al. The prognostic value of day 3 embryo cleavage stage on subsequent blastocyst development in a sequential culture system [J]. J Assist Reprod Genet, 2001, 18(10): 548 - 550.
- [7] 魏丽娜,吴晓云,朱玉蓉,等. 辅助生殖技术中废弃胚胎继续培养的影响因素分析[J]. 医学研究杂志,2013,42(2):113 - 116.
- [8] 黄国宁,孙海翔. 体外受精 - 胚胎移植实验室技术 [M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
- [9] 杜生荣,康跃凡,陈永艳,等. 废弃胚胎形成囊胚的潜力以及与妊娠结局的关系 [J]. 海峡预防医学杂志,2011,17(6):6 - 8.
- [10] Stone BA, Green J, Vargyas JM, et al. Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development in vitro and pregnancy outcomes following embryo transfer [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192(6): 2014 - 2019.
- [11] Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos [J]. Hum Report Update, 1998, 4(6): 842 - 855.
- [12] 朱玉蓉,吴晓云,邱惠麒,等. 人胚胎移植和冷冻后废弃胚胎继续囊胚培养研究 [J]. 中国优生与遗传杂志,2014,22(3):116 - 118.
- [13] Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, et al. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement [J]. Fertil Steril, 2007, 87(3): 534 - 541.
- [14] 关小红,张爱军,孙娟娟,等. 滋养层细胞活检法分析人废弃胚胎源性囊胚发育与染色体异常 [J]. 生殖与避孕, 2011, 31(2): 82 - 87.
- [15] 郝燕,周平,章志国,等. 胚胎第 3 天形态与非整倍体的相关性研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7): 868 - 870.
- [16] 薛林涛,黄莉,何冰,等. 囊胚期胚胎活检及玻璃化冻存的研究 [J]. 中国临床新医学, 2014, 7(7): 596 - 599.

收稿日期:2016-03-02 编辑:王娜娜

(上接第 1113 页)

[10] Bojunga J, Dauth N, Berner C, et al. Acoustic radiation force impulse imaging for differentiation of thyroid nodules [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42735.

[11] Bojunga J, Herrmann E, Meyer G, et al. Real-time elastography for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules: a meta-analysis [J]. Thyroid, 2010, 20(10): 1145 - 1150.

[12] 刘保娟,梁瑾瑜,谢晓燕,等. 剪切波弹性成像与实时组织弹性成像技术在甲状腺结节良恶性鉴别诊断中的应用价值 [J]. 中华医学超声杂志(电子版), 2014, 11(11): 57 - 62.

[13] 冯卉,李俊来,黄炎,等. 剪切波弹性模量在乳腺病灶良恶性诊断中的应用价值 [J]. 中华超声影像学杂志, 2013, 22(3): 235 - 238.

- [14] 徐争,杨丽春. 乳腺超声弹性成像的应用进展 [J]. 中国医学影像学杂志, 2013, 21(2): 155 - 156.
- [15] 王涛,王学梅,张义侠,等. 实时剪切波弹性成像鉴别甲状腺结节良恶性的定量分析 [J]. 中国医学影像学杂志, 2012, 20(9): 684 - 687.
- [16] 黄炎,李俊来,王知力,等. 实时剪切波弹性成像定量评价乳腺良恶性病变 [J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(3): 561 - 564.
- [17] 田秀丽,李劲松,王霞,等. 高频超声结合弹性成像对乳腺实质结节的应用价值 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2016, 19(1): 19 - 21.

收稿日期:2016-03-30 修回日期:2016-05-09 编辑:王海琴