IVF-ET 周期中单原核胚胎的形态学及体外发育潜能

袁 萍，王文军*，李瑞岐，郑灵燕，区颂邦，欧阳能勇，麦美琪，朱玉琴
（中山大学孙逸仙纪念医院生殖中心，广东 广州 510120）

摘 要：【目的】探讨 IVF-ET 周期中单原核(1PN)胚胎形态学及继续体外培养潜能，指导其临床利用价值。【方法】对受精后 16～18 h 观察到的 486 个 1PN 胚胎进行体外培养，观察其原核大小、极体及卵裂情况；通过囊胚序贯培养法将其中 374 个 1PN 胚胎培养至囊胚期，观察囊胚形成情况。【结果】374 个 1PN 胚胎共形成囊胚 179 个(47.86%)，其中优质囊胚 41 个(22.91%)。行囊胚培养的 374 个 1PN 胚胎原核直径为(27.64 ± 3.30)μm，大于未达囊胚培养标准的 81 个胚胎的(26.22 ± 3.38)μm，以及对照组 2PN 胚胎 (24.08 ± 1.85)μm ($P < 0.05$)；且原核直径大的 1PN 胚胎，囊胚形成率：76.04%、41.79%、28.57%($P < 0.05$)；和优质囊胚率高：27.40%、22.62%、9.09%($P > 0.05$)。IVF 来源的 1PN 胚胎原核直径为(27.80 ± 3.44)μm 大于 ICSI 组 (26.77 ± 2.29)μm ($P < 0.05$)，且前者囊胚形成率 (IVF，50.96%；ICSI，31.67%；$P < 0.05$) 和优质囊胚率(IVF，24.38%；ICSI，10.53%；$P > 0.05$)均高于后者。不同极体数目(不确定、2PB、1PB)的 1PN 胚胎间原核大小无统计学差异($P > 0.05$)，但其优质囊胚率有统计学差异(39.39%，20.00%，17.65%；$P < 0.05$)。D3 评分级别越优、卵裂球数目越多者，其囊胚形成率($P < 0.05$)和优质囊胚率($P < 0.05$)越高。【结论】对于 IVF 来源的 1PN(2PB)胚胎，可通过对其形态学和胚胎发育潜能进行初步筛选，冷冻发育良好的 1PN 囊胚，在无可利用的 2PN 胚胎情况下，可选择进行移植。

关键词：体外受精；1PN 胚胎；原核；囊胚；发育潜能
中图分类号：R711.6 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2014)06-0823-07

Morphology and Developmental Potential of Embryos Derived from Single Pronucleus Zygotes in Vitro Fertilization-Embryo Transfer

YUAN Ping, WANG Wen-jun*, LI Rui-qi, ZHENG Ling-yan, OU Song-bang, OUYANG Neng-yong, MAI Mei-qi, ZHU Yu-qin
(Center for Reproductive Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To explore the morphology and developmental potential of embryos derived from single pronucleus (1PN) zygotes in vitro fertilization-embryo transfer, and guide the clinical application. 【Methods】 486 single pronuclear zygotes were observed at 16~18 hours after fertilization and 374 1PN embryos were cultured into blastocysts by the sequential method, recording pronuclear size, polar body, cleavage and blastocyst. 【Results】A total of 374 1PN embryos were performed blastocyst culture and formed 179 blastocysts (47.86%), among which 41 were high-quality blastocyst (22.91%). The pronucleus diameter of 374 1PN (27.64 ± 3.30 μm) was greater than 81 1PN embryos which were not cultured (26.22 ± 3.38 μm; $P < 0.05$) and the control 2PN embryos (24.08 ± 1.85 μm; $P < 0.05$). 1PN embryos with larger pronucleus sizes had high rates of blastocyst formation (76.04%, 41.79%, 28.57%; $P < 0.05$) and high-quality blastocyst (27.40%, 22.62%, 9.09%; $P > 0.05$). The size of pronucleus was statistically significantly larger in 1PN IVF zygotes (27.80 ± 3.44 μm) than in the 1PN ICSI zygotes (26.77 ± 2.29 μm; $P < 0.05$), and higher rates of blastocyst formation (IVF, 50.96%; ICSI, 31.67%; $P < 0.05$) and high-quality blastocyst (IVF, 24.38%; ICSI, 10.53%; $P > 0.05$) in the former. No differences were obtained when comparing pronucleus diameters with the different polar body number (uncertain, 2PB, 1PB) in 1PN embryos ($P > 0.05$), but differences were statistically significant in the rates of high-quality blastocyst (39.39%, 20.00%, 17.65%; $P < 0.05$). Both of the blastocyst formation ($P < 0.05$) and high-quality blastocyst ($P <$

收稿日期：2014-06-04
基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金(13ykpy29)
作者简介：袁萍，博士，研究实习员，医学遗传学，E-mail：kekeyp1983@163.com；* 通信作者：王文军，副教授，硕士生导师，E-mail：wenjungzcn@163.com

0.05) were statistically significant in embryo quality and the blastomere number.【Conclusions】1PN (2PB) embryo from IVF was selected by the morphology and developmental potential, and frozen with high-quality blastocyst which was transferred under the circumstances of unavailable 2PN embryos.

Key words: in vitro fertilization; 1PN embryo; pronucleus; blastocyst; developmental potential

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2014,35(6):823-829]

在人类体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)过程中,正常受精的标准被认定为受精后16~20 h内观察到胚胎内存在明确的2PN(2 pronucleus)及2PB(2 polar body)[1],然后根据其卵裂及发育情况从中择优进行胚胎移植。然而异常受精广泛存在于IVF-ET过程中,特别是被认为异常受精的单原核(single pronucleus, 1PN)胚胎其发生率为2.5%~4.5%[2],其是否能用于胚胎移植,仍处于争议焦点。目前认为其可能的发生机制为:①雌雄原核形成的不同步(asynchrony)[3];②雌雄原核发生融合(syngamy)[4];③孤雌激活(parthenogenetic activation)[5]。前两种情况受精后的1PN胚胎很可能为二倍体胚胎,而孤雌激活的1PN胚胎只可能是单倍体胚胎。由于1PN胚胎极有可能存在染色体异常,胚胎质量较差,多数胚胎存在发育停滞,只有约30%发育至桑椹胚或囊胚[6-7],故认为其不具有临床价值,作为废胚丢弃,或者在个别无正常受精的2PN胚胎的情况下考虑使用[8]。而一些学者对IVF来源的1PN胚胎进行了细胞遗传学研究,认为大多数受精为1PN胚胎为二倍体胚胎[3,9]。同时,有报道通过移植1PN胚胎获得了健康出生婴儿,认为可以通过囊胚培养的方法对其进行发育潜能的筛选,增加其为临床应用的机会[10]。目前对于1PN胚胎的研究尚缺乏大样本量的数据统计及其可能相关因素的形态学和发育潜能评估。同时,我们无法常规对所有1PN来源的胚胎进行植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD),那么判断1PN的胚胎的临床使用价值及初步筛选方法只能是通过形态学方法观察及继续培养。本研究对收集到的519例患者来源共693个1PN胚胎,通过对其中486个1PN胚胎发育过程中相关因素——极体、原核大小及卵裂情况进行评估,以及进一步地对其进行囊胚培养,评价其发育潜能,通过上述研究对1PN胚胎的发育情况判断其作为可利用胚胎进行冷冻或移植的价值,以增加临床可利用的胚胎率。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集了2013年4月至2014年2月期间在中山大学孙逸仙纪念医院生殖中心因不孕症接受IVF-ET治疗的519例患者,共693个1PN胚胎,1PN形成率为9.79%(693/7 076)。在693个1PN胚胎中由于207个胚胎未收集到原核大小信息,我们对其中486个1PN胚胎进行追踪,观察极体、原核大小、卵裂及囊胚形成情况。采用常规促排卵方案,即长方案、短方案、微刺激、自然周期等,取卵后根据患者情况采用常规IVF或卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI),受精后16~18 h观察胚胎受精情况,记录1PN极体数目和测量原核大小,继续培养至取卵后第3天(D3)。对于D3评分为I~III级的1PN胚胎进行囊胚培养;除部分评分为IV级1PN胚胎应患者要求进行囊胚培养外,余下受精数≤3个或可利用胚胎数≤3个的胚胎,则进行新鲜周期移植或冷冻,取消1PN胚胎的序贯培养。整个过程已取得患者知情同意,且获得医院伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 D1原核直径测量 所有图像经OCTAX Eye-WareTM Olympus系统拍照及测量,取原核平面两个最大直径做垂直线,取其均数作为原核直径(d),原核面积则为$\pi \cdot r^2$。同时选取519例患者中378个2PN(2PB)作为对照组,采用相同方法测量原核直径和面积。同时,我们根据既往报道[8]并结合本研究的原核直径情况将1PN原核直径分为3组:$d \leqslant 25\ \mu m$、$25\ \mu m < d < 30\ \mu m$、$d \geqslant 30\ \mu m$。

1.2.2 胚胎极体判断 综合2个PB的大小、形态和之间的距离对1PN胚胎极体判断如下:2PB,显微镜下能清晰看到2个完整的极体并存在一定的极体间距(排除极体分裂情况),或看到1个完整的极体和与之有一定距离的极体碎片;1PB,显微镜下仅能清晰看到1个完整的极体;不确定,看到

1个边缘粗糙的极体和与之紧邻的碎片或卵周隙内全为极体碎片，在晃动培养皿后观察仍为上述情况。

1.2.3　胚胎培养及评分　胚胎培养采用 vitrolife G-5 系列序贯培养液(vitrolife, Sweden)培养。按 2011 年伊斯坦布尔会议[11]的评分系统对卵裂期胚胎质量进行评分，结合本中心实际工作，将 D3 胚胎评级分为 5 级：Ⅰ级，D3 胚胎为 7~9 细胞，卵裂球均匀，胞质均匀透亮，透明带完整，胚胎无或仅有极少(<5%)碎片；Ⅱ级，D3 胚胎 ≥ 4 细胞，卵裂球大小略不均，碎片 5% ~ 25%，透明带完整；Ⅲ级，D3 胚胎 ≥ 4 细胞，卵裂球大小明显不均，碎片 26% ~ 50%，透明带完整；Ⅳ级，D3 胚胎 < 4 细胞，或者卵裂球严重不均，碎片 > 50%；Ⅴ级，无明显卵裂球存在，观察到大量无核碎片。本中心规定Ⅰ、Ⅱ级为可利用胚胎，其中Ⅰ级为优质胚胎；Ⅲ级在无Ⅰ、Ⅱ级胚胎情况下视为可用胚胎；Ⅳ级和Ⅴ级胚胎丢弃。

1.2.4　囊胚培养及评分　将由 1PN 发育而来的 D3 胚胎转移至预先平衡好的囊胚培养液微滴中培养至 5 ~ 6 d，观察胚胎发育情况。根据 1999 年 Gardner 囊胚分级法[12]对囊胚进行分级评分。①根据囊胚的扩张和孵出程度将囊胚分为 1 ~ 6 级：1 级，早期囊胚，囊胚腔体积小于胚胎总体积的 1/2；2 级，早期囊胚，囊胚腔体积大于或等于胚胎总体积的 1/2；3 级，扩张囊胚，囊胚腔完全占据整个胚胎总体积；4 级，扩张期囊胚，囊胚腔体积较早期囊胚明显扩大，透明带变薄；5 级，正在孵出的囊胚，囊胚的一部分从透明带破口处孵出；6 级，完全孵出的囊胚，囊胚全部从透明带中孵出。②对处于 3 ~ 6 级囊胚，根据以下标准评估内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层细胞(trophectoderm, TE)的发育。ICM 评分：A 级，细胞数目多，排列紧密；B 级，细胞数目少，排列松散；C 级，细胞数目很少。TE 评分：A 级，上皮细胞层由较多的细胞组成，结构致密；B 级，上皮细胞层由不多的细胞组成，结构松散；C 级，上皮细胞层由稀疏的细胞组成，大细胞很少。将 D5 评分≥3AA、3AB、3BA、3BB 或 D6 评分≥4AA、4AB、4BA、4BB 的囊胚定为优质囊胚。

1.3　统计学处理

使用 SPSS 19.0 统计软件采用独立样本 t 检验、Mann-Whitney 检验、χ^2 检验和 Logistic 回归进行数据分析，$P < 0.05$ 被认为统计学上有差异。

2　结　果

我们对本研究的 486 个 1PN 胚胎中 374 个进行囊胚培养，未行囊胚培养的 112 个胚胎中 81 个因 D3 评分为Ⅳ级或 F 级丢弃，余下 31 个胚胎进行冷冻或移植。

2.1　1PN 胚胎的原核直径比较

进行囊胚培养的 374 个 1PN 胚胎原核直径为 18.2 ~ 35.8 (27.6 ± 3.3)μm，原核面积为 260 ~ 1 004 (607 ± 142)μm²；未行囊胚培养丢弃的 81 个 1PN 胚胎原核直径为 17.7 ~ 34.7(26.2 ± 3.4)μm，原核面积为 245 ~ 944(548 ± 137)μm²。两组的原核直径和面积均有统计学差异(t = 3.472 & 3.428，P = 0.001)。

比较 374 个 1PN 胚胎中，314 个 IVF 来源的 1PN 胚胎，其原核直径范围 18.2 ~ 35.8 (27.8 ± 3.4)μm；60 个 ICSI 来源的 1PN 胚胎，原核直径为 19.4 ~ 30.6(26.8 ± 2.3)μm。两组的原核直径有统计学差异(P = 0.004)。

比较 374 个 1PN 胚胎和对照组中 378 个 2PN 胚胎的原核直径和面积均有统计学差异 (P < 0.001，表 1)。比较 374 个 1PN 胚胎中不同极体数目(1PB、2PB、不确定)的原核直径无统计学差异(表 1)。

表 1　1PN 与 2PN 原核直径和面积的对比

Table 1　The comparison of the pronucleus diameter and area　　($\bar{x} \pm s$)

Pronucleus	1PN			2PN
	1PB	2PB	Uncertain	
Diameter/μm	27.2 ± 3.3	27.8 ± 3.1	27.7 ± 4.0	24.1 ± 1.8
Area/μm²	589 ± 137	614 ± 135	614 ± 165	458 ± 69

2.2　不同因素的 1PN 胚胎囊胚形成情况

本研究中 374 个进行囊胚培养的 1PN 胚胎，共形成囊胚 179 个，囊胚形成率为 47.86%，其中优质囊胚 41 个，优质囊胚率为 22.91%。根据患者的年龄、受精方式以及极体数目进行囊胚形成情况的比较，不同年龄组的囊胚形成率和优质囊胚率均无统计学差异(表 2)。IVF 来源的 1PN 胚胎的囊胚形成率和优质囊胚率均高于 ICSI 组，且有统

表 2 不同因素的囊胚形成对比

Table 2 The blastocyst formation of different factors $n/N(\%)$

Different facts	Group	No. of embryos	Blastulation rates	χ^2	P	Rates of high-quality blastocysts	χ^2	P
Age /years	< 35	292	136/292(46.58)	0.88	>0.05	33/136(24.26)	0.59	>0.05
	≥ 35	82	43/82(52.44)			8/43(18.60)		
Fertilization	IVF	314	160/314(50.96)	7.51	0.007	39/160(24.38)	1.85	>0.05
method	ICSI	60	19/60(31.67)			2/19(10.53)		
	1	107	51/107(47.66)	0.06	>0.05	9/51(17.65)	6.33	0.04
No. of PB	2	200	95/200(47.5)			19/95(20.00)		
	uncertain	67	33/67(49.25)			13/33(39.39)		

Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

计学差异(表 2)。不同极体数目的 1PN 胚胎中,不确定组的囊胚形成率和优质囊胚率均高于其他两组,且优质囊胚率有统计学差异(表 2)。

2.3 原核直径和囊胚形成的关系

将 1PN 原核直径分为 3 组(表 3),结果显示原核直径大的 1PN 胚胎的囊胚形成率和优质囊胚率高于原核直径小的 1PN 胚胎, 且 3 组间的囊胚形成率有统计学差异(表 3)。

表 3 1PN 原核直径与囊胚形成的关系

Table 3 The relationship between pronucleus diameter and blastulation in 1PN embryos

Pronucleus diameter/μm	No. of embryos	Blastulation rates (%)	Rates of high-quality blastocysts (%)
$d \leqslant 25$	77	22/77(28.57)	2/22(9.09)
$25 < d < 30$	201	84/201(41.79)	19/84(22.62)
$d \geqslant 30$	96	73/96(76.04)[1)]	20/73(27.40)[2)]

1)Differences were statistically significant in the blastulation rates among above three groups ($\chi^2 = 45.000$, $P < 0.001$).2)No Differences were statistically significant in the rates of high-quality blastocysts among above three groups ($\chi^2 = 3.216$, $P > 0.05$).

在分析 1PN 胚胎囊胚形成的相关因素中,我们通过 Logistic 回归分析了年龄、获卵率、受精方式、极体数目、原核直径对于囊胚形成的影响,结果显示原核直径对囊胚形成有影响〔($P < 0.001$, 95% CI: 1.252(1.163 ~ 1.347)〕,而年龄、获卵率、受精方式和极体数目与囊胚形成无关($P > 0.05$)。

比较同一例患者的 1PN (2PB) 原核直径和 2PN 原核直径大小, 将其分为两组 (表 4), 比较 1PN 的囊胚形成率, 结果显示两组之间无统计学差异($\chi^2 = 0.052$, $P > 0.05$,表 4)。

表 4 基于囊胚形成 1PN(2PB)与 2PN 原核直径比较

Table 4 Comparison of pronucleus diameter in 1PN (2PB) and 2PN based in the blastumation

Group	Blastocyst formation or not	
	No. of embryos with blastulation	No. of embryos without blastulation
d (1PN) > d (2PN)	86	96
d (1PN) < d (2PN)	8	10

2.4 D3 胚胎卵裂球数与囊胚形成的关系

根据 D3 胚胎评分,将胚胎卵裂球数分为 4 组(表 5), 其中卵裂球数目≤ 3 行囊胚培养后无囊胚形成, 余下 3 组间比较结果显示组间的囊胚形成率和优质囊胚率均有统计学差异(表 5)。

表 5 D3 胚胎卵裂球数与囊胚形成的关系

Table 5 The relationship between the number of blastomeres in D3 embryos and blastulation $n/N(\%)$

No.of blastomeres	No. of embryos	Blastulation rates	Rates of high-quality blastocysts
≤ 3	12	0	0
4~6	146	48/146(32.88)[1)]	4/48(8.33)[2)]
7~9	182	109/182(59.89)	31/109(28.44)
≥ 10	34	22/34(64.71)	6/22(27.27)

1)Differences were statistically significant in the blastulation rates among the three groups (4~6,7~9, ≥10) ($\chi^2 = 27.144$, $P < 0.001$). 2) Differences were statistically significant in the rates of high-quality blastocysts among the three groups (4 ~ 6,7 ~ 9, ≥ 10) ($\chi^2 = 7.901$, $P = 0.019$).

2.5　D3 胚胎评分级别与囊胚形成的关系

根据 D3 胚胎评分级别，将胚胎分为 4 组（表 6），其中 12 个 IV 级 1PN 胚胎均未形成囊胚，余下 3 组间比较结果显示组间囊胚形成率和优质囊胚率均有统计学差异（表 6）。

表 6　D3 胚胎评分与囊胚形成的关系

Table 6　The relationship between D3 embryonic grade and blastulation

Embryonic grade	No. of embryos	Blastulation rates (%)	Rates of high-quality blastocysts (%)
Ⅰ	61	50/61(81.97)[1)]	21/50(42.00)[2)]
Ⅱ	277	126/277(45.49)	20/126(15.87)
Ⅲ	24	3/24(12.50)	0/3(0)
Ⅳ	12	0	0

1) Differences were statistically significant in the blastulation rates among the three groups (Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ) ($\chi^2 = 40.652$, $P < 0.001$). 2) Differences were statistically significant in the rates of high-quality blastocysts among the three groups (Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ) ($\chi^2 = 14.744$, $P = 0.001$).

2.6　1PN 胚胎移植后的结局

截稿止，本研究共追踪到其中 29 例患者 1PN 胚胎移植后的妊娠情况（表 7），但鉴于非单胚胎移植，目前无法统计其临床妊娠率和流产率。

3　讨　论

在临床 IVF-ET 过程中，除正常受精的 2PN（2PB）胚胎外，常会出现胚胎发育及形态良好的 1PN 等被认为异常受精胚胎，而对此类胚胎的取舍尚无定论。由于既往对 1PN 胚胎的细胞遗传学研究显示，约 50%的 IVF 来源的 1PN 胚胎为二倍体胚胎，而仅不到 30%的 ICSI 来源的胚胎为二倍体[3,13]。因此，一些学者认为 1PN 胚胎存在雌雄原核不同步出现或发生融合的可能，移植 1PN 的胚胎有可能获得健康出生婴儿[4,10]，并建议采用囊胚培养的方法对其进行发育潜能的筛选，增加临床使用率[10]。目前对于 1PN 的研究多停留在核型分析及囊胚形成率方面，且无统一临床指导意见，大多认为 1PN 胚胎虽具有正常二倍体可能，但须在临床上无 2PN 正常受精胚胎移植的情况下使用，建议结合 PGD 或产前诊断筛查是否存在染色体异常[8,14]。但实际工作中，对于 D1 观察到的 1PN 胚胎，很可能存在继续培养后发育良好的优质胚胎情况，如何对 1PN 胚胎进行形态学观察和初步筛选，增加其临床可利用胚胎率，是本研究的主要关注点。

3.1　原核直径与囊胚形成关系

本研究收集了 519 例患者的 693 个 1PN 胚胎，发生率为 9.79%〔其中 IVF 为 9.88%（594/6009），ICSI 为 9.28%（99/1067）〕，高于 Porter 等[2]的研究，但也有不同学者统计 1PN 发生率在 5%～22.8%之间，这可能与纳入患者标准、受精液类型、获卵数等相关[15]。同时，我们从原核大小、极体数目和胚胎分级等多方面对其中 486 个 1PN 胚胎进行详细的形态学研究，以及进一步囊胚培养。通过对 1PN 胚胎原核直径研究，我们发现 D3 评分为Ⅰ～Ⅲ级胚胎（行囊胚培养）1PN 原核直径和面积大于发育较差（Ⅳ～F 级）的胚胎，且前者的原核直径也大于对照组 2PN 胚胎原核直径。进一步的研究显示 1PN 原核直径大的胚胎，其囊胚形成率越高，与其他学者的研究结果一致[8,16]。同时，我们考虑是否存在同一患者 1PN（2PB）胚胎的原核直径大于其 2PN 胚胎者囊胚形成率高，但结果显示两者无统计学差异。由于存在样本量小问题，还需进一步研究。对于所观察到的 1PN 原核大小与胚胎发育相关的机制尚需进一步研究，而 Mateo 等[8]采用 time-lapse 观察 21 例 1PN 胚胎显示其单原核一直存在，未发现有雌雄原核的不同时出现或融合现象。

3.2　受精方式与囊胚形成关系

在考虑不同因素对 1PN 胚胎囊胚形成情况的影响，我们发现年龄对其囊胚形成率及优质囊胚率影响无差别。Mateo 等[8]对于 ICSI 后的 1PN（2PB）胚胎进行综合研究发现大部分胚胎存在染色体异常，仅有 7.4%的 1PN 胚胎发育至囊胚且形态学评分良好，认为 ICSI 来源的 1PN 胚胎应该丢弃。本研究比较了 IVF 和 ICSI 来源的 1PN 胚胎，从原核直径来看，IVF 组高于 ICSI 组，且两者有统计学差异；从囊胚形成率和优质囊胚率来看，前者有统计学差异，表现为 IVF 组高于 ICSI 组，这与梁菊燕等[14]报道一致。说明 IVF 来源的 1PN 胚胎的形态学和发育潜能总体均高于 ICSI 来源的胚胎，我们推测这可能与 ICSI 来源的 1PN 胚胎染色体异常率高相关[8,16]。因此，我们也认同 ICSI 来源的 1PN 胚胎最好丢弃。

表 7 进行移植的 1PN 胚胎临床结局

Table 7 Outcome of 1PN embryos after embryo transfer

Patient No.	Age /year	No. of PB	Pronucleus diameter/μm	Blastocyst formation	Blastocyst score	Outcome	Outcome of pregnancy
1	31	1	26.04	UC		ET(2.2/9,1.2/4)	SP
2	42	UC	31.27	UC		ET(2.2/7)	NP
3	34	2	33.69	UC		ET(2.3/3,2.3/3,2.1/7)	SP, ESA
4	38	UC	28.02	UC		ET(1.1/8,2.2/6,2.2/10)	SP
5	33	2	25.85	UC		ET(2.2/5,3.2/4)	NP
6	35	2	22.72	UC		ET(1.1/8,1.1/8)	GP
7	36	1	25.63	UC		ET(1.1/8,1.1/7,1.1/8)	SP, ESA
8	42	2	no data	UC		ET(2.1/8,1.2/6,1.2/8)	SP, LSA
9	27	UC	28.31	UC		ET(2.2/7,2.3/6)	SP
10	37	2	28.64	UC		ET(1.1/8,1.1/4)	NP
11	37	1	no data	UC		ET(1.1/8,1.1/9,2.2/5)	SP
12	37	2	no data	UC		ET(1.1/8,1.1/9,2.2/5)	SP
13	34	2	24.99	UC		ET(1.2/8,2.1/6)	NP
14	41	2	no data	UC		ET(2.2/7,2.1/8)	NP
15	25	1	27.40	UC		ET(2.2/7,1.2/4,2.3/8)	NP
16	34	2	26.68	UC		ET(2.2/5,2.2/7)	NP
17	33	UC	26.78	UC		ET(2.2/5,1.2/8)	NP
18	34	1	25.67	UC		FET(2.2/8,2.2/6)	NP
19	40	1	22.77	UC		FET(2.1/8,1B,2.2/11)	NP
20	35	2	28.86	BL	3BC(D5)	FET(3BC,4BC)	SP
21	35	1	19.90	BL	3BC(D6)	FET(3BC,3BC)	NP
22	42	UC	30.01	BL	4AB(D5)	FET(1.2/10,4AB,2.2/9)	NP
23	29	2	29.61	BL	4BC(D5)	FET(4BC,4BC)	SP
24	38	1	29.11	BL	4BB(D5)	FET(4BB,4BC)	NP
25	34	UC	no data	BL	4BC(D6)	FET(3BC,4BC)	SP
26	27	2	28.09	BL	4CB(D6)	FET(4CB,2.2/9,2.2/6)	SP, ESA
27	29	2	32.31	BL	3CB(D6)	FET(3BC,3CB)	NP
28	41	2	25.54	BL	3BC(D6)	FET(3BC,3BC,2B)	NP
29	34	2	27.37	BL	3AB(D5)	ET(2.2/8,3AB,4CB)	NP

ET: embryo transfer; FET: frozen embryo transfer. UC: uncertain; BL: blastulation; SP: singleton pregnancy; NP: non-pregnancy; ESA or LSA: early or late spontaneous abortion; GP: gemellary pregnancy.

3.3 极体数目与囊胚形成关系

对于既往研究认为 1PN(2PB)胚胎其二倍体可能性更高[15],且可排除双雌胚胎的可能。因此我们对极体数目不同的 1PN 胚胎进行了的原核直径和囊胚培养的分组研究,发现 1PN(2PB)胚胎的原核直径均数高于另外两组,但无统计学差异;其优质囊胚率有统计学差异,且 1PN(1PB)的优质囊胚率在 3 组比较中最低, 而不确定组高于 2PB 和 1PB 组, 我们推测这可能因为不确定组中极体碎片来源与 2PB 相关。

3.4 胚胎评分与囊胚形成关系

从胚胎评分与囊胚形成关系来看, 卵裂球数目越高,胚胎评分级别越优者,其囊胚形成率和优质囊胚率越高,且有统计学差异,这与既往研究结果一致[14,17]。而对于卵裂球数目小于 4,且评级为Ⅳ ~ F 级的 1PN 胚胎,序贯培养后均未形成囊胚,且其他研究的结果显示其囊胚形成率和优质囊胚率均明显低于胚胎评级为Ⅰ~Ⅲ组[14,17]。因此,我们认为此类 1PN 胚胎在 D3 评分后可予以丢弃。而对于 D3 评分为Ⅲ级胚胎, 鉴于其囊胚形成率

低,且无优质囊胚形成,因而将其进行囊胚培养筛选意义不大。此外,我们发现进行序贯培养的胚胎中,尽管有 46 个 1PN 胚胎在 D5 发育成桑椹胚或早期囊胚,但继续培养至 D6 时停止发育或囊胚的 ICM 和 TE 评级均为 C 级。因此,我们认为对于 1PN 胚胎在行囊胚培养筛选时,应以培养至 3 级囊胚以上作为评分标准。

综上所述,我们对 1PN 胚胎的形态学和胚胎发育潜能进行综合研究,认为对于 D1 评分为 1PN(2PB)的 IVF 来源的胚胎,可选择原核直径大(>25 μm),D3 评分为 I~II 级胚胎进行囊胚培养至 3 级以上。冷冻发育良好的 1PN 囊胚,在无可利用的 2PN 胚胎情况下,移植前与患者取得沟通,可选择进行或不进行 PGD 后移植,但若获得临床妊娠后需进行产前诊断行染色体筛查。

参考文献:

[1] Elder K, Dale B. In vitro fertilization [M]. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 59-63.

[2] Porter R, Han T, Tucker MJ, et al. Estimation of second polar body retention rate after conventional insemination and intracytoplasmic sperm injection: in vitro observations from more than 5,000 human oocytes [J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(9): 371-376.

[3] Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, et al. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization [J]. Hum Reprod, 1993, 8(2): 221-223.

[4] Levron J, Munné S, Willadsen S, et al. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes [J]. Biol Reprod, 1995, 52(3): 653-657.

[5] Payne D, Flaherty SP, Barry MF, 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.

[6] Balakier H, Squire J, Casper RF. Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization [J]. Hum Reprod, 1993, 8(3):402-408.

[7] Park EA, Park KH, Chung MK, et al. The developmental potential of human single pronuclear (1PN) zygotes obtained from ICSI and conventional IVF [J]. Fertil Steril, 2002, 78(3): S237-S238.

[8] Mateo S, Parriego M, Boada M, et al. In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection [J]. Fertil Steril, 2013, 99(3):897-902.e1.

[9] Munné S, Tang YX, Grifo J, et al. Origin of single pronucleated human zygotes. J Assist Reprod Genet [J]. 1993, 10(4):276-279.

[10] Gras L, Trounson AO. Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization [J]. Hum Reprod, 1999, 14(7): 1869-1871.

[11] 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.

[12] Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: to wards a single blastocyst transfer [J]. Fertil Steril, 2000, 73(6):1155-1158.

[13] Staessen C, Van Steirteghem AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization [J]. Hum Reprod, 1997, 12(2):321-327.

[14] 梁菊艳, 王芳, 孙莹璞, 等. 废弃胚胎继续囊胚培养研究 [J]. 生殖与避孕, 2008, 28(10): 698-601.
Liang JY, Wang F, Sun YP, et al. Study on the Culture of Discarded Embryos to Blastocyst [J]. Reprod Contrac, 2008, 28(10): 698-601.

[15] Plachot M, Crozet N. Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization [J]. Hum Reprod, 1992, 7(Suppl 1): 89-94.

[16] Otsu E, Sato A, Nagaki M, et al. Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in in vitro fertilization [J]. Fertil Steril, 2004, 81(3):723-724.

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

(编辑　徐　杰)