

移植胚胎选择的量化指标

张宁锋*, 陈静华, 王文军, 李瑞岐, 欧阳能勇, 马 芸, 麦美琪
(中山大学孙逸仙纪念医院生殖医学中心, 广州 广东, 510120)

摘要:【目的】探讨胚胎累计评分(ECS)预测胚胎发育潜能及胚胎种植率(IR)和临床妊娠率(PR)的价值。【方法】782 个 IVF 周期及 223 个 ICSI 周期分别计算 ESC, 并依据 ESC 及种植率和妊娠率做频数表, 并分别分为妊娠与非妊娠组进行比较 ESC。【结果】IVF 周期在 ESC 大于 18 且不大于 32 时和 ICSI 周期在 ESC 大于 22 且不大于 32 时可以达到 50% 以上妊娠率, 此范围外 ESC 均致使妊娠率降低; IVF 周期在 ESC 大于 28 且不大于 32 时和 ICSI 周期在 ESC 大于 26 且不大于 32 时可以达到 35% 以上种植率, 此范围外 ESC 均致使种植率降低; 两种周期妊娠组 ESC 均高于未妊娠组 ($P < 0.01$)。【结论】ESC 可以预测胚胎移植后的临床妊娠率, 并为临床移植胚胎挑选提供量化标准。

关键词: 体外受精-胚胎移植; 胚胎评分; 妊娠率

中图分类号: R321-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)01-0131-05

Quantitative Clinical Standard of Embryo Selection

ZHANG Ning-feng*, CHEN Jing-hua, WANG Wen-jun, LI Rui-qi, OUYANG Neng-yong, MA Yun, MAI Mei-qi
(IVF Center of Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the predict value of the developmental potential of embryos and embryo implantation rate (IR) and clinical pregnancy rate (PR) with cumulative embryo score (embryo cumulative score, ECS). 【Methods】ESC of 782 IVF cycles and 223 ICSI cycles were calculated, And frequency tables based on ESC and IR and PR were done, then ESCs were compared between pregnant and non-pregnant group. 【Results】The PR was more than 50% when ESC was bigger than 18 and not bigger than 32 in IVF cycles and ESC was bigger than 22 and not bigger than 32 in ICSI cycles, ESC out of these scope causes decreasing of PR. The IR was more than 35% when ESC was bigger than 28 and not bigger than 32 in IVF cycles and ESC was bigger than 26 and not bigger than 32 in ICSI cycles, ESC out of these scope causes decreasing of IR. Two periods of projects showed that ESC of pregnancy group were higher than non-pregnant group ($P < 0.01$). 【Conclusion】ESC can predict the clinical pregnancy rate after embryo transfer, and provide a quantitative clinical standard for embryo selection.

Key words: IVF-ET; embryo score; pregnancy rate

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(1): 131-135]

胚胎移植是体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 过程中的重要环节。选择最具有发育潜能的 1~2 个胚胎移植, 可防止多胎妊娠的发生而又不影响临床妊娠率 (pregnancy rate, PR)^[1]。但如何准确判断胚胎的发育潜能一直是 IVF-ET 技术中亟待解决的问题之一。目前国内外用于评估卵裂期胚胎质量的方法主要有原核期胚胎的原核评分法^[2-3]和卵裂期胚

胎评分法^[4], 但均有一定的局限性且不便于量化评比, 无确切选择标准。Desai 等^[5]2000 年的研究提出了一种累积评分法, 但评分方法繁琐, 临床操作可行性不强, 未被普遍采用。因此, 本实验室通过对经筛选的 1005 个 D3 胚胎移植 ART 周期进行跟踪随访, 结合胚胎累积评分进行回顾性分析, 探讨胚胎累计评分系统的量化评分方式对移植胚胎选择的指导作用, 为临床实际操作提供量化指

标,使移植胚胎挑选更加合理优化。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

选取 2008 年 1 月至 2010 年 12 月在本生殖中心进行 ART 助孕的第 3 天新鲜胚胎移植周期 1 005 例。其中 IVF 周期 782 例,ICSI 周期 223 例;原发不孕 444 例,继发不孕 561 例;病因仅选取男方因素或女方盆腔或输卵管因素;女方平均年龄 31($S=4$)岁,男方平均年龄 34($S=5$)岁。

1.2 胚胎培养及移植

1005 个周期均采用促性腺激素释放激素激动剂/卵泡刺激素/人绝经期促性腺激素(GnRH-a/FSH + HMG) 长方案促排卵,从月经第 8 天起每天 B 超监测卵泡大小,适时注射人绒毛膜促性腺激素(HCG) 10 000 U,36 h 后在 B 超介导下取卵。授精及胚胎培养所用的序贯培养液为 G III 系列(VITROLIFE, 美国),预先添加 10%血清代用品(HAS, VITROLIFE, 美国),在 CO₂ 培养箱(6.0% CO₂, 37 °C) 内平衡 18 h。男方手淫法取精液于无菌无毒容器,完全液化后用 45%/90%的梯度离心液(Spermgrade, 美国)优化处理。IVF 患者采用加卵法授精,受精浓度 1.5×10^6 /mL,授精后 16 ~ 18 h 去除颗粒细胞;ICSI 患者用 80 U 透明质酸酶(Sigma, 美国)去除颗粒细胞后选择有第一极体的成熟卵细胞进行显微受精。受精后 16 ~ 18 h,将受精卵放入覆盖矿物油的 20 μ L G1 培养液滴,倒置显微镜下观察,出现 2 个原核者判为正常受精。每 24 h 观察胚胎情况,至受精后第 3 天(D3),观察胚胎形态,并选取优质胚胎移植。早发卵裂(受精 16 ~ 18 h 内发生卵裂)、多原核受精及发育停滞胚胎不用于移植胚胎挑选。

1.3 ESC 计算方法

目前,多数中心都采用卵裂球数、卵裂球均一程度、碎片程度联合的全面胚胎评分系统,由此得到的胚胎评分为三个孤立的数字,然后再据此分级^[6],Bar-Yoseph^[4]及 Sole 等^[7]在各自的研究中也均采用该形态学评分系统:

I 级:胚胎卵裂球等大,形态规则,脑汁均匀清晰,碎片无或少于 10%;II 级:胚胎卵裂球不等,形态欠规则,碎片 10% ~ 25%;III 级:胚胎卵裂球大小不均,形态欠规则,碎片 26% ~ 50%;IV 级:胚

胎卵裂球大小严重不均,碎片大于 50%。

回顾性分析所选取周期的 D3 移植胚胎评分,按胚胎累计评分(embryo cumulative score, ECS)法重新计分,并分析其与临床妊娠率之间的关系。ECS 计算方法:D3 胚胎细胞数乘以胚胎等级积分(I 级胚胎计 4 分,II 级胚胎计 3 分,III 级胚胎计 2 分,IV 级胚胎计 1 分);如果移植 2 个或 2 个以上胚胎,则计算其平均值。

1.4 数据处理

应用 SPSS17.0 统计分析软件做统计分析,所有检测数据用平均数 \pm 标准差表示,均值比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 纳入分析患者基本信息

本研究经过单一化影响因素,共纳入 1 005 对夫妇,其中单胚胎移植 50 例,双胚胎移植 696 例,三胚胎移植 259 例。患者基本信息见表 1。

表 1 入选患者基本信息

Index	IVF	ICSI
Cycles included (n)	782	223
Infertility years	5.1 \pm 0.1	5.2 \pm 0.2
BMI	21.0 \pm 0.2	20.8 \pm 0.2
Basic FSH(U/L)	7.68 \pm 0.89	7.73 \pm 0.17
Basic E2 (mmol/L)	50.9 \pm 1.6	50.7 \pm 3.0
Basic LH(U/L)	4.69 \pm 0.12	5.02 \pm 0.20
HCG day E2 (mmol/L)	2 438 \pm 128	2 824 \pm 135
HCG day LH(U/L)	2.67 \pm 1.85	2.35 \pm 0.78
HCG day Endometrium thickness(mm)	11.6 \pm 0.1	12.6 \pm 0.2
Oocytes retrieved	10.8 \pm 0.2	10.8 \pm 0.4
Fertilization rate (%)	85.4 \pm 0.6	78.2 \pm 1.4
Cleavage rate (%)	96.5 \pm 0.4	96.6 \pm 0.6
Embryos transferred	2.2 \pm 0.1	2.14 \pm 0.1
Female age(21 ~ 25)	2.1 \pm 0.1(55) ¹⁾	1.9 \pm 0.1(18)
Female age(26 ~ 30)	2.1 \pm 0.1(280)	2.0 \pm 0.1(89)
Female age(31 ~ 35)	2.2 \pm 0.1(303)	2.1 \pm 0.1(77)
Female age(36 ~ 40)	2.7 \pm 0.1(144)	2.4 \pm 0.1(39)

1) Embryos transferred(N).

2.2 IVF 周期 ESC 与种植率和妊娠率

2.2.1 各 ESC 组间种植率和妊娠率比较 按 ESC 评分将 782 个 IVF 周期分组,分别计算种植率

表 2 IVF 周期 ESC 及种植率和妊娠率频数表:

Table 2 IR and PR of ESC absolute frequency with IVF cycles

ESC ¹⁾	≤10	>10~12	>12~14	>14~16	>16~18	>18~20	>20~22	>22~24	>24~26	>26~28	>28~30	>30~32	>32~34	>34
n	14	15	14	34	52	63	69	158	66	150	47	95	5	3
IR(%)	22.4	28.9	24.5	25.8	31.8	30.7	32.0	35.1	29.0	32.6	37.9	36.4	10.0	0.0
PR(%)	0.0	26.7	28.6	29.4	40.4	50.8	49.3	58.9	51.5	66.7	68.1	66.3	40.0	0.0

1)Groups are not including the low limit but the upper limit. (eg. 10~12 means >10 and ≤12)

(implantation rate, IR)及妊娠率,结果见表 2。

可以看出随 ESC 评分的升高, 种植率及妊娠率逐步提高;在 ESC 大于 28 且不大于 32 时,可以达到 35%以上的种植率;在 ESC 大于 18 且不大于 32 时, 妊娠率都可以维持 50%以上的妊娠率,而 ESC 过高(>34)或过低(≤10)则会导致 ART 的失败。

2.2.2 妊娠与分妊娠组间 ESC 比较 将 IVF 周期患者分为妊娠组(a 组)与未妊娠组(b 组),对两组 ESC 评分进行独立样本 T 检验,结果见表 3。

2.3 ICSI 周期 ESC 与种植率和妊娠率

2.3.1 各 ESC 组间种植率和妊娠率比较 按 ESC 评分将 223 个 ICSI 周期分组, 分别计算种植率和妊娠率,结果见表 4。由于 ICSI 周期例数较少,各组间妊娠率变化并不像 IVF 周期有明显的规律

表 3 IVF 周期妊娠与未妊娠组 ESC 评分及双方年龄对比表

Table 3 Different ESC and ages between pregnancy group and non- pregnancy group with IVF cycles

Group	A	B	P
n	427	355	-
Female age (years)	31.1 ± 0.2	32.3 ± 0.3	0.40
male age (years)	33.5 ± 0.2	34.1 ± 0.3	0.33
ESC ¹⁾	25.1 ± 0.2	22.5 ± 0.3	0.00

1)P < 0.01

性, 但依然可以看出当 ESC 大于 22 且不大于 32 时可以得到令人满意的妊娠率;且超出此 ESC 评分范围的胚胎则均会使妊娠率降低。而种植率亦可在 ESC 大于 26 且不大于 32 时达到 35%以上,且与 ESC 有较好的相关性。

表 4 ICSI 周期 ESC 评分及种植率和妊娠率频数表

Table 4 IR and PR of ESC absolute frequency with ICSI cycles

ESC ¹⁾	≤10	>10~12	>12~14	>14~16	>16~18	>18~20	>20~22	>22~24	>24~26	>26~28	>28~30	>30~32	>32~34	>34
n	3	3	10	11	14	18	12	24	43	31	15	27	4	0
IR(%)	27.8	23.3	27.0	23.3	23.3	26.4	27.1	29.5	31.8	38.5	36.7	39.0	20.2	-
PR(%)	33.3	33.3	0.0	28.6	27.8	41.7	45.8	55.8	60.0	71.0	66.7	66.7	25.0	-

1)Groups are not including the low limit but the upper limit. (eg. 10~12 means >10 and ≤12)

2.3.2 妊娠与分妊娠组间 ESC 比较 将 ICSI 周期患者分为妊娠组(a 组)与未妊娠组(b 组),对两组 ESC 评分进行独立样本 T 检验,结果见表 5。

表 5 ICSI 周期妊娠与未妊娠组 ESC 评分及双方年龄对比表

Table 5 Different ESC and ages between pregnancy group and non-pregnancy group with IVF cycles ($\bar{x} \pm s$)

Group	A	B	P
n	114	109	
Female age (years)	30.1 ± 0.4	31.6 ± 0.4	0.43
male age (years)	33.1 ± 0.6	34.6 ± 0.6	0.43
ESC ¹⁾	25.2 ± 0.5	22.2 ± 0.7	0.00

1)P < 0.01

2.4 双胚胎移植周期 ESC 与妊娠率

为避免移植胚胎质量不均所造成的 ESC 不能准确反映移植胚胎质量, 将双胚胎移植的 696 个周期按两胚胎中评分较高者 ESC 分组, 分别计算种植率和妊娠率,结果见表 6。

进一步选取双胚胎移植周期中两胚胎评分相同者共 214 个周期, 按不同 ESC 分组后分别计算种植率和妊娠率,结果见表 7。

2.5 ESC 对妊娠率的预测价值

取全部 1005 周期 ESC 评分与其妊娠率做 ROC 曲线,见图 1。ESC 曲线下面积为 0.634、标准误为 0.018、P=0.000 和 95%可信区间为 0.600-0.669

表 6 双胚胎移植周期优质胚胎 ESC 评分及种植率和妊娠率频数表

Table 6 IR and PR of ESC absolute frequency with two embryos transferred

ESC ¹⁾	≤10	>10~12	>12~14	>14~16	>16~18	>18~20	>20~22	>22~24	>24~26	>26~28	>28~30	>30~32	>32~34	>34
<i>n</i>	6	8	19	24	47	44	53	158	50	138	34	107	6	1
IR(%)	29.7	33.3	23.3	24.5	24.7	26.4	27.1	29.5	31.8	39.5	37.7	39.0	15.2	50.0
PR(%)	0.0	50.0	21.1	33.3	38.3	50.0	49.1	59.5	56.6	71.7	67.7	68.2	50.0	0.0

1) Groups are not including the low limit but the upper limit. (eg. >10~12 means >10 and ≤12)

表 7 同评分双胚胎移植周期 ESC 评分及种植率和妊娠率频数表

Table 7 IR and PR of ESC absolute frequency with two identical embryos transferred

ESC	12	15	16	18	21	24	27	28	32	36
<i>n</i>	4	2	3	7	22	72	3	2	102	1
IR(%)	22.6	25.0	33.3	33.3	20.5	32.6	50.0	100.0	37.3	0.0
PR(%)	50.0	0.0	33.3	47.1	50.0	56.9	66.7	100.0	69.6	0.0

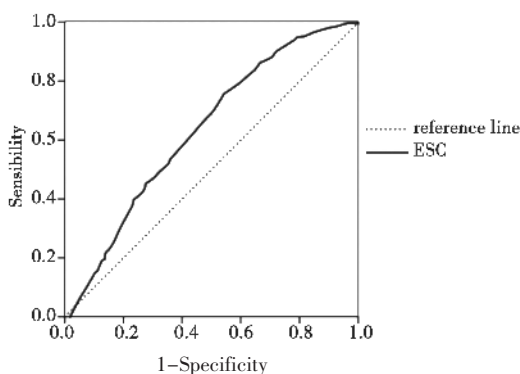


图 1 ESC 预测妊娠率 ROC 曲线

Fig.1 ROC curve of prediction of PR with ESC

3 讨论

在 IVF-ET 的临床实践中, 胚胎质量好坏是影响妊娠结局的关键因素之一^[8]。选择最具有发育潜能的优质胚胎进行移植是保证妊娠成功的前提, 但如何在不损害胚胎的前提下准确判断胚胎的发育潜能, 一直是 IVF-ET 技术面临的最具挑战性的问题。曾有学者利用来自胚胎的生化标记在体外预测胚胎的发育潜能^[9-10], 但至今尚未发现一种生化标记能准确判断胚胎发育潜能, 并作为指导选择胚胎移植的参数。目前国内外用于评价卵裂期胚胎质量的常用方法主要有原核期胚胎的原核评价法和卵裂期胚胎评价法。但由于原核形态仅代表受精卵的状态, 因此有学者认为原核评分不一定能完全反映胚胎的后期发育情况^[11]。卵裂期胚胎评分法是选择移植胚胎的传统方法, 其评

价指标主要是根据卵裂球的数目、均匀程度以及无核碎片的比例等参数来判断胚胎的质量。但无法对胚胎质量进行量化考核, 因此本研究筛选大样本回顾性分析移植胚胎选择与妊娠率的关系, 为胚胎选择提供了有效的量化指标。

目前临床使用的分级系统比较简单, 只能属于定性的大概评估; 也有文献推荐移植首选 1 级和 2 级胚胎, 但也只是经验性评判, 本 ESC 评分系统, 结合胚胎分级及卵裂球数量, 对移植胚胎给出一个确切的数字, 使分析更规范、科学。

本研究经过严格筛选, 减少混杂因素: 病因仅选择男方因素或女方盆腔或输卵管因素, 排除女方子宫内膜因素干扰; 治疗方案则只选择长方案治疗周期; 女方基础激素水平在正常参考范围内, 而促排卵后在 HCG 日的激素水平也满足临床取卵需求; 男女方年龄也严格控制在 40 岁以下, 且妊娠组与未妊娠组之间无显著性差异。经筛选的患者平均取卵 10.8 个, 最少取卵 5 个, 无卵巢反应不良患者。研究结果显示, 对于 IVF 周期患者, 第 3 天移植胚胎 ESC 评分在 18~32 之间时, 可以得到满意的妊娠率, 对于 ICSI 周期患者, 则要在评分 22~32 之间时才能达到相当的妊娠率。而 ESC 评分在 26~32 之间时, IVF 周期和 ICSI 周期都可以达到 60% 以上的妊娠率。当 ESC 评分大于 32 时, 两种治疗方案下妊娠率则均出现下降, 本中心 3 个周期 ESC 评分大于 34 的胚胎移植则均未妊娠。通过进一步排除干扰因素, 选取双胚胎移植周期进行细化分析, 无论是按双胚胎中高评分胚胎分组, 还是选取同评分双胚胎周期分组, 均可得

出类似结论。可见移植胚胎 ESC 评分对妊娠率有明确的指导意义。妊娠组与未妊娠组移植胚胎 ESC 评分也存在显著性差异,更有力地证明了该观点。同时也可以观察到:ESC>34 时,虽然胚胎具有较多的卵裂球,但已经不具备或只有很差发育潜能,不利于临床妊娠;同样,D3 胚胎 ESC 不大于 10 时,也几乎没有移植价值,临床实践中应谨慎选择,必要时果断取消胚胎移植。

另外,也可以观察到,胚胎种植率与 ESC 亦有一定的相关性,虽不如妊娠率规则,但在 ESC 大于 26 且不大于 32 时,种植率仍有明显增高。通过对同评分双胚胎移植周期的分析可见,ESC 为 32 时,可以达到 37.3%的种植率和 69.6%的妊娠率。可见,用 ESC 评分系统选择的优质胚胎可以得到满意的种植率和临床妊娠率。

仅取 ESC 评分作为诊断指标做 ROC 曲线预示妊娠率可见,曲线下面积可以达到 0.634,且 $P < 0.01$,结果可靠。可见 ESC 可以作为妊娠率的预测指标,通过对第 3 天移植胚胎进行形态分级并计算 ESC 评分可以筛选出优质胚胎供临床移植,并预测其妊娠率。本研究统计 1 005 个 ART 长方案周期妊娠结局,可以看到 ESC 评分对妊娠阳性的预测达到了 63.4%, $P < 0.01$,是一种可比较靠的评分方法。

另外,选取纳入本研究的因为胚胎发育不良,致使只剩余一个优质胚胎的单胚胎移植周期共计 50 例分析亦得出相似结论,在 ESC 大于 26 且不大于 32 时达到 56.7%的最高妊娠率。但由于纳入周期过少,规律性不够明显。然而依然可以说明,对单胚胎移植,该 ESC 评分方法也同样适用,当然进一步的大样本观察研究仍需继续进行。

胚胎累计评分法是一种较为全面的评分方法,该评分法不仅考虑了胚胎的发育情况,而且进一步量化了胚胎评判指标。因此在选择移植胚胎时,就可以准确把握胚胎选择标准,合理选择胚胎,既保证满意的妊娠率,又避免优质胚胎的浪费。特别对于基础条件较好的低龄女性(<35 岁),依据 ESC 评分选择优质胚胎行单胚胎移植或优质与次优质胚胎联合移植,更有利于达到高妊娠率及低多胎率的双赢效果。上述结果表明,ESC 评分可以有效量化评判胚胎发育潜能,方便临床操作,为移植胚胎挑选提供可靠标准;同时也为胚胎发育不良周期取消胚胎移植与否提供参考。

参考文献:

- [1] 孙海翔,胡娅莉,王玢,等. 移植胚胎数量与多胎妊娠[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(12): 730-732.
- [2] Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum Reprod, 1998, 13 (4) :1003-1013.
- [3] Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal p reimplantation development can be predicted by a single static observation on p ronuclear stage morphology [J]. Hum Reprod, 1999, 14 (5) : 1318-1323.
- [4] Bar-Yoseph H, Levy A, Sonin Y, et al. Morphological embryo assessment: reevaluation [J]. Fertil Steril, 2011, 95(5): 1624-1628.
- [5] Desai NN, Goldstein J, Ronland DY, et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study [J]. Hum Reprod, 2000, 15 (10): 2190-2196.
- [6] 李媛. 人类辅助生殖实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 100-138.
- [7] Sole M, Santalo J, Rodriguez I, et al. Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo score in a cryopreservation programme. Assist Reprod Genet [J]. 2011, 28 (2): 129-136.
- [8] Saith RR, Sriniva san A, Michie D, et al. Relationships between the developmental potential of human in-vitro fertilization embryos and features describing the embryo, oocyte and follicle [J]. Hum Reprod Update, 1998, 4 (2): 121-134.
- [9] Leese HJ, Hooper MAK, Edwards RG, et al. Up take of pyruvate by early human embryos determined by a non-invasive technique [J]. Hum Reprod, 1986, 1 (3): 181-182.
- [10] Clark DA, Lee S, Fishell S, et al. Immunosuppressive activity in human in vitro fertilization (IVF) culture supernatants and prediction of the outcome of embryo Transfer: a multicenter trial [J]. J In Vitro Fertil Embryo Transf, 1989, 6(1): 51-58.
- [11] De Placido G, Wilding M, Strina I, et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate [J]. Hum Reprod, 2002, 17(9): 2402-2409.

(编辑 张恩健)