

〔文章编号〕 1007-0893(2023)03-0008-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.03.003

受精卵动态形成参数时间与胚胎发育潜能相关性研究

范树明 徐娇燕 张静雯 朱 莉 董玲凤 马文敏

(佛山市妇幼保健院, 广东 佛山 528000)

〔摘要〕 **目的:** 探讨受精卵关键事件发生时间与形成优质卵裂期胚胎(优胚)之间是否有相关性。**方法:** 选取佛山市妇幼保健院2021年2月至2021年9月进行体外受精辅助治疗的患者作为研究对象。根据是否形成优胚分为: 未形成优胚组724例, 形成优胚组476例。比较两组之间关键事件发生时间差异及其时间与是否形成优胚的相关性。**结果:** 两组患者的受精卵雌雄原核同步形成时间(tPNa)、雌雄原核相接触时间(tPC)、雌雄双原核同步形成时间与双原核相接触的时间间隔(T1)及雌雄双原核同步消失与受精卵发生首次卵裂的时间间隔(T2)比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 形成优胚组的雌雄原核消失时间(tPNf)较未形成优胚组更短, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但相关性分析结果显示, tPNa、tPC、tPNf、T1、T2与优胚形成均不存在相关性。**结论:** 受精卵关键事件发生时间与优胚的形成之间并不存在相关性。

〔关键词〕 体外受精辅助治疗; 优质卵裂期胚胎; 雌雄原核

〔中图分类号〕 R 394 〔文献标识码〕 B

Study on Correlation between Parameters Time of Dynamic Formation of Fertilized Egg and Embryonic Development Potential

FAN Shu-ming, XU Jiao-yan, ZHANG Jing-wen, ZHU Li, DONG Ling-feng, MA Wen-min
(Foshan Maternal and Child Health Hospital, Guangdong Foshan 528000)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate whether there is correlation between the occurrence time of key events in fertilized eggs and the formation of high-quality cleavage embryos. **Methods** Patients receiving in vitro fertilization (IVF) assisted treatment in Foshan Maternal and Child Health Hospital from February 2021 to September 2021 were selected as the research objects. According to the formation of good embryos, there were 724 cases in the group without good embryos and 476 cases in the group with good embryos. To compare the difference of critical event occurrence time between the two groups and its correlation with the formation of embryos. **Results** There were no significant differences in the synchrony formation time of male and female prokaryotes (tPNa), the contact time of male and female prokaryotes (tPC), the time interval between the synchrony formation time of male and female diprokaroyotes and the contact time of diprokaroyotes (T1), and the time interval between the disappearance of synchrony between male and female diprokaroyotes and the first cleavage of fertilized eggs (T2) between the two groups ($P > 0.05$). The time of pronucleus fading (tPNf) of male and female prokaryotes in the optimal embryo group was shorter than that in the non-optimal embryo group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, correlation analysis showed that tPNa, tPC, tPNf, T1 and T2 were not correlated with the formation of embryos. **Conclusion** There was no correlation between the time of critical events in fertilized eggs and the formation of high-quality embryos.

〔Keywords〕 In vitro fertilization adjuvant therapy; High quality cleavage embryo; Hermaphrodite prokaryote

近几年我国女性不孕症发生率逐渐升高, 已成为生殖妇科的重点研究方向。目前治疗不孕症常用方法是进行体外受精(in vitro fertilization, IVF) - 胚胎移植。IVF完成后, 胚胎发育作为一个连续的动态过程, 期间发生许多关键事件, 如极体排出、原核形成、原核消失及卵裂等^[1]。在这个过程中, 传统的受精和胚胎观察及评价

是通过特定时间点技术人员在倒置显微镜下观察并记录。这个时间点的选择, 大部分实验室均根据 Istanbul 共识中受精检查时间点定在授精后(17 ± 1) h, 早卵裂的观察是在 IVF 后(28 ± 1) h。这种非连续性的传统观察方式对某些动态参数无法准确记录, 由于胚胎发育环境要求的严格性, 不能增加过多的观察时间点, 对所有胚胎发

〔收稿日期〕 2022 - 12 - 08

〔基金项目〕 佛山市卫生健康局医学科研项目(20210047)

〔作者简介〕 范树明, 男, 主管技师, 主要研究方向是辅助生殖胚胎培养。

育过程中的重要事件进行观察及记录。因此，传统观察必然导致一些胚胎发育的关键事件的错过。

随着时差成像培养 (time-lapse incubator, TLI) 系统技术应用的成熟，临床可有效的观察其关键事件发生时间，从而使胚胎学家们有效评估胚胎的发育潜能。目前临床上使用 TLI 系统技术主要用于观察胚胎形态，从而评分判断其是否适合移植。但作为人为的判断评分可能会对结果产生一定的偏移，因此需要一个更客观的指标预测胚胎的发育潜能。目前关键事件产生时间研究日渐兴起。而目前关键事件发生时间对于后续胚胎形成潜能尚未达成共识^[2]，因此研究关键事件发生时间对胚胎形成能力影响，有助于临床上更好地了解胚胎的发育潜能。本研究对受精卵雌雄原核同步形成时间 (time of pronucleus appearance, tPNa)、雌雄原核相接触时间 (time of prokaryotic contact, tPC) 以及雌雄原核消失时间 (time of pronucleus fading, tPNf) 与是否形成优质卵裂期胚胎 (优胚) 进行了相关性分析，探讨了其中的关联，旨在为临床研究胚胎发育潜能以及预判胚胎是否形成优胚提供研究思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取佛山市妇幼保健院 2021 年 2 月至 2021 年 9 月进行 IVF 辅助治疗患者作为研究对象。根据是否形成优胚分为：未形成优胚组 724 例，形成优胚组 476 例。在 200 个卵泡期长方案促排卵周期中，患者年龄范围 25 ~ 35 岁，平均 (30.44 ± 4.05) 岁；体质指数 (body mass index, BMI) 范围 19 ~ 25 kg · m⁻²，平均 (21.88 ± 2.56) kg · m⁻²；基础卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 范围 5.02 ~ 6.89 mU · mL⁻¹，平均 (6.78 ± 1.92) mU · mL⁻¹；获卵数范围 5 ~ 15 个，平均获卵数 (9.20 ± 3.58) 个。共获得 1840 枚卵子，常规 IVF 后受精数为 1439 枚，受精率 78.2%，共获得双原核受精数为 1372 枚，1200 枚可利用胚胎。本研究经佛山市妇幼保健院医院伦理委员会审批 (FSFY-MEC-2021-02)。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 (1) 治疗周期数 ≤ 2 个周期；

(2) 女方年龄 ≤ 35 岁；(3) 女方单纯输卵管因素；(4) 第 3 天 FSH ≤ 10 U · mL⁻¹，抗缪勒管激素 > 1.1 ng · mL⁻¹；(5) 卵泡期长方案促排卵；(6) 患者及家属知情并同意本研究。

1.2.2 排除标准 完全或部分受精失败 (受精率 < 30%) 及受精卵形态异常。

1.3 方法

实验方法及指标：入组患者行卵泡期长方案促排卵，人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 扳机后 36 h 经阴道 B 超行取卵术，取出卵子置于 G-IVF (Vitrolife, 瑞典) 培养微滴，37 °C、6% CO₂ 的 COOK 培养箱中预培养。同日男方手淫取精，经密度梯度离心法对夫精标本进行初步优化处理，再以上游法行二次优化后置培养箱预培养。按 HCG 后 39 h 加精 (授精浓度为每个卵子 2500 条精子)。授精 4 ~ 6 h 后去除颗粒细胞并转入含有 G-1 (Vitrolife, 瑞典) 培养液的 TLI 系统专用胚胎培养皿 (Vitrolife, 瑞典) 中，置 TLI 系统中进行胚胎培养和全程记录胚子与胚胎发育。TLI 拍照频率设定 5 min，焦距平面扫描 7 层。以受精时间为起点，记录 tPNa、tPC 以及 tPNf，并计算雌雄双原核同步形成时间与双原核相接触的时间间隔 (T1)，雌雄双原核同步消失与受精卵发生首次卵裂的时间间隔 (T2)。优胚：胚胎 D1 为双原核 (two-pronuclear, 2PN)，胚胎培养第 3 天 (D3) 细胞数为 7 ~ 9 个，碎片 < 10%，卵裂球大小均一，无多核、空泡等异常现象。D3 卵裂期可用胚胎细胞数 ≥ 4 个，碎片 < 50%。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验，计数资料用百分比表示，采用 χ^2 检验，Spearman 相关性分析确定关键事件时间与优胚是否形成之间相关性，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者优胚关键事件时间比较

两组患者的 tPNa、tPC、T1 及 T2 比较，差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)；形成优胚组的 tPNf 较未形成优胚组更短，差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)，见表 1。

表 1 两组患者优胚关键事件时间比较 ($\bar{x} \pm s, h$)

组 别	<i>n</i>	tPNa	tPC	tPNf	T1	T2
未形成优胚组	724	8.54 ± 2.32	9.89 ± 8.13	24.23 ± 4.00	1.40 ± 0.32	2.44 ± 0.68
形成优胚组	476	8.42 ± 1.88	9.44 ± 2.27	23.40 ± 2.71 ^a	1.02 ± 0.26	2.27 ± 0.45

注：tPNa — 雌雄原核同步形成时间；tPC — 雌雄原核相接触时间；tPNf — 雌雄原核消失时间；T1 — 雌雄双原核同步形成时间与双原核相接触的时间间隔；T2 — 雌雄双原核同步消失与受精卵发生首次卵裂的时间间隔。与未形成优胚组比较，^a*P* < 0.05。

2.2 关键事件时间与优胚形成之间相关性

Spearman 相关性分析结果显示：tPNa、tPC、tPNf、T1、T2 与优胚形成均不存在相关性，见表 2。

表2 两组患者关键事件时间与优胚形成的相关性

指标	r	P
tPNa	0.0030	0.959
tPC	0.0449	0.439
tPNf	-0.0823	0.155
T1	-0.0408	0.604
T2	-0.0325	0.587

注: tPNa—雌雄原核同步形成时间; tPC—雌雄原核相接触时间; tPNf—雌雄原核消失时间; T1—雌雄双原核同步形成时间与双原核相接触的时间间隔; T2—雌雄双原核同步消失与受精卵发生首次卵裂的时间间隔。

3 讨论

胚胎发育受到多方面的因素影响,能从中找到潜在的机制及表现从而提高胚胎的发育潜能一直是胚胎学家的研究重点^[3-5]。目前胚胎观察及评分方面,技术人员的培训完全依赖传统的倒置显微镜人工胚胎观察,只能对极为有限的几个时间点进行观察,技术人员的观察由于观察时间点及观察指标极为有限,故传统胚胎观察存在较大的主观性,不利于胚胎的客观评价及选择。而通过本课题中的TLI系统技术,获取胚胎发育的连续动态过程,监控指标更为全面。胚胎发育的动态参数与胚胎活力和染色体是否正常有关,可用来评估胚胎质量,预测其发育潜能。目前主要认为受精卵形态学观察一定程度上能识别具有优质发育潜能的胚胎,并且可根据形态学观察筛选胚胎从而提高妊娠率^[6-7],Vaiserman等^[8]研究认为第一极体形态具有预测胚胎发育潜能的能力,同时也有研究发现透明带的结构与胚胎发育及受精率存在一定相关性^[9-10]。然而利用形态学观察来判断胚胎发育潜能目前主要依靠人为判断,这存在一定的潜在主观而导致结果偏移^[11-12]。在胚胎发育期间关键事件发生时间,则可使用TLI系统技术进行实时监控,从而具有客观记录的优势。

本研究主要记录关键事件中的tPNa、tPC及tPNf,比较在是否成为优胚之间的时间差异。结果显示:形成优胚组的tPNf较未形成优胚组更短,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而两组患者的tPNa、tPC、T1及T2比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。然后笔者使用Spearman相关性分析进一步观察关键事件时间与优胚结局的相关性,结果显示tPNa、tPC、tPNf、T1、T2与优胚形成均不存在相关性。此前Lemmen等^[13]研究发现tPNf越早,其胚胎的发育潜能越好,张璨等^[1]使用延时摄像技术判断胚胎发育潜能,发现tPNf较早的胚胎也具有更好的发育潜能。除探究原核消失时间与是否形成优胚的相关性,也有研究人员探究tPNf与第5~7天囊胚形成的相关性,李柔等人^[14]发现tPNf越长,其优质囊胚形成率也呈现一定的下降趋势。但本研究所选用的第1~3天优质胚胎,结果显示tPNf长短与优胚形成率之间并不存在相关性,这与金海霞等^[15]研究结论相似,该研

究同样发现胚胎关键事件发生时间与胚胎发育差异之间并不存在直接的相关性。胚胎发育迟缓在体外胚胎培养中极易容易发生,而其影响原因众多,包括染色体异常、氧化应激等。而tPNf过长可能提示胚胎发育中存在一定量脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)损伤或转录组停滞,亦或者细胞周期减缓、细胞凋亡增加等使胚胎发育延缓。但具体机制仍未完全清楚。

综上所述,笔者认为受精卵关键事件发生时间与优胚的形成并不具有相关性。使用TLI系统技术监测其发生时间,确实可以保证客观判断,减少人为观察偏移。但目前通过该技术来观察关键事件时间预测优胚形成潜能为时尚早,仍需要大量的研究判断其时间是否存在可判断优胚的能力。同时其潜在影响机制还需要更深入的研究,并且需要更多的样本探究tPNf与后续胚胎潜能的研究。

〔参考文献〕

- (1) 张璨,胡艳秋,余宏,等.延时摄像系统对胚胎发育及妊娠结局的影响[J].中华妇幼临床医学杂志(电子版),2018,14(6):675-682.
- (2) 徐雅兰,郝永秀,乔杰.未成熟卵母细胞体外成熟影响因素及在助孕中的应用进展[J].医学综述,2021,27(24):4870-4874.
- (3) Yamaguchi A, chida M, Ishibashi H, et al. Potential mechanisms underlying embryonic developmental toxicity caused by benzo[a]pyrene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Chemosphere, 2020, 242(3): 125243.1-125243.9.
- (4) Posfai E, Schell JP, Janiszewski A, et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency [J]. Nature Cell Biology, 2021, 23(1): 49-60.
- (5) Fabian P, Crump JG. Reassessing the embryonic origin and potential of craniofacial ectomesenchyme [J]. Semin Cell Dev Biol, 2023, 138(3): 45-53.
- (6) Feliu N, Hassan M, Garcia Rico E, et al. SERS Quantification and Characterization of Proteins and Other Biomolecules [J]. Langmuir, 2017, 33(38): 9711-9730.
- (7) Sozen B, Amadei G, Cox A, et al. Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures [J]. Nature Cell Biology, 2018, 20(8): 979-989.
- (8) Vaiserman A, Koliada A, Lushchak O. Developmental programming of aging trajectory [J]. Ageing Research Reviews, 2018, 17(47): 105-122.
- (9) Montag M, Schimming T, Koster M, et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles [J]. Reproductive Biomedicine Online, 2008, 16(2): 239-244.
- (10) Shen Y, Stalf T, Mehnert C, et al. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles [J]. Hum Reprod, 2005, 20(6): 1596-1606.

(11) Dyrland TF, Kirkegaard K, Poulsen ET, et al. Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis (J). *Hum Reprod*, 2014, 29(11): 2421-2430.

(12) Rhenman A, Berglund L, Brodin T, et al. Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos (J). *Hum Reprod*, 2015, 30(1): 28-36.

(13) Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes (J). *Reprod Biomed Online*, 2008, 17(3): 385-391.

(14) 李柔, 周静, 廖宏庆, 等. 原核持续时间预测胚胎发育潜力的研究 (J). *生殖医学杂志*, 2022, 31(2): 177-182.

(15) 金海霞, 王赛赛, 石森林, 等. 不同胚胎培养试剂胚胎发育时间动力学参数、胚胎发育潜能及临床结局的比较 (J). *中华生殖与避孕杂志*, 2020, 40(4): 294-300.

(文章编号) 1007-0893(2023)03-0011-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.03.004

葡萄糖酸钙联合 rhGH 治疗少儿特发性矮小症的疗效

郭燕 许素玲

(商丘市第三人民医院, 河南 商丘 476000)

[摘要] **目的:** 探讨葡萄糖酸钙联合重组人生长激素 (rhGH) 治疗少儿特发性矮小症的疗效。**方法:** 选取 2020 年 3 月至 2021 年 9 月期间于商丘市第三人民医院诊治的 80 例特发性矮小症患者, 随机将其分为对照组 40 例, 观察组 40 例。对照组患儿给予 rhGH 治疗, 观察组患儿给予葡萄糖酸钙联合 rhGH 进行治疗, 比较两组患儿治疗前后生长指标、骨代谢指标及治疗期间不良反应发生情况。**结果:** 观察组患儿治疗 12 个月后身高高于对照组, 生长速率快于对照组, 骨龄大于对照组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 观察组患儿治疗 12 个月后血清骨特异性碱性磷酸酶 (BAP)、骨钙素 (OC)、I 型胶原交联羧基末端肽 (ICTP)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) 水平均显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组患儿治疗 12 个月期间均未发生严重不良反应。**结论:** 在特发性矮小症患者中给予葡萄糖酸钙联合 rhGH 治疗, 可促进患儿生长, 有效提高患儿骨龄, 改善其骨代谢水平。

[关键词] 特发性矮小症; 葡萄糖酸钙; 重组人生长激素; 儿童

[中图分类号] R 581.2¹ **[文献标识码]** B

Effect of Calcium Gluconate Combined with rhGH in the Treatment of Children with Idiopathic Short Stature

GUO Yan, XU Su-ling

(Shangqiu Third People's Hospital, Henan Shangqiu 476000)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of calcium gluconate combined with recombinant human growth hormone (rhGH) in the treatment of children with idiopathic short stature. **Methods** A total of 80 children with idiopathic short stature diagnosed and treated in Shangqiu Third People's Hospital from March 2020 to September 2021 were selected and randomly divided into a control group and an observation group with 40 cases in each group. The control group was treated with rhGH, and the observation group was treated with calcium gluconate combined with rhGH. The growth indexes and bone metabolism indexes before and after treatment and the occurrence of adverse reactions during treatment were compared between the two groups. **Results** After 12 months of treatment, the height of the observation group was higher than that of the control group, the growth rate was faster than that of the control group, and the bone age was higher than that of the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). After 12 months of treatment, the serum levels of bone-specific alkaline phosphatases (BAP), osteocalcin (OC), type I collagen carboxy-terminal cross-linked peptide (ICTP) and N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) in the observation

[收稿日期] 2022 - 12 - 19

[作者简介] 郭燕, 女, 主治医师, 主要研究方向是儿内科及儿童生长发育方面。