

# IVF-ET 时影响胚胎着床率的因素分析

孙永成, 王锋\*, 赵雪萍, 许丹

(南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京 210095)

**摘要:** 胚胎移植成功的标志性事件是胚胎着床。着床是一个高度协调的事件, 影响胚胎着床的因素主要有胚胎质量和子宫内膜容受性两方面。

**关键词:** 胚胎移植; 胚胎着床; 胚胎质量; 子宫内膜容受性

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083 (2007) 01-0235-04

## Analysis of Factors that Affect Embryo Implantation after IVF-ET

SUN Yong-cheng, WANG Feng\*, ZHAO Xue-ping, XU Dan

(Center of Animal Embryo Engineering & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** The symbol phenomenon of embryo transferring is embryo implantation, which is a highly coordinated event that involves the number of embryo, embryo quality and endometrial receptivity.

**Key words:** embryo transfer; embryo implantation; embryo quality; endometrial receptivity

在人类不孕不育的治疗中, 辅助生殖技术 IVF-ET 和 ISCI-ET 等得到了广泛的应用。随着技术水平的发展, 卵母细胞回收率和获得胚胎的数量、质量也不断提高, 但妊娠率却仍然较低。妊娠的标志性事件是胚胎着床, 但着床是一个高度协调的事件, 如何提高 ET 胚胎着床率仍是一个亟待解决的问题。而胚胎质量和子宫内膜容受性是提高胚胎着床率的关键性的因素, 因此胚胎移植能否成功就主要取决于这两方面。所以, 改善移植胚胎的质量或选择高质量的胚胎, 以及增加子宫内膜容受性将有助于胚胎的着床, 从而提高胚胎移植的效率。

### 1 胚胎质量的影响

#### 1.1 选择胚胎的形态学标准

着床前的胚胎在形态学上和发育潜力方面有很大的差异, 筛选具有高着床潜力的胚胎可以得到高的妊娠率。对人类试管婴儿而言, 由于缺乏一种方法能够比较准确预测胚胎着床能力和发育到足月的能力, 为保证手术成功率, 通常会移植 3 个或 3 个以上的胚胎, 虽然临床妊娠较低, 但同时多胎妊娠发生率也比较高<sup>[1]</sup>。所以选择优质胚胎移植, 以提高胚胎的着床率和临床妊娠率, 可以限制移植的胚胎数量, 以减少多胎妊娠的发生。

胚胎形态学检查通常是在显微镜下, 观察 D3 胚胎中卵裂球数目、碎片所占比例以及卵裂球的均匀程度。常规方法是根据移植当天的胚胎分级来判断胚胎的质量, 其着床率一般较低, 所以减少移植的胚胎数时, 妊娠率会降低。

Tesarik<sup>[2]</sup>等提出, 根据合子期两原核中 NPB (nuclear precursor bodies, 核仁前体) 的数量及分布将合子分型, 作为 D3 选择移植胚胎的亚标准, 在优质胚胎中 NPB 少于 7 个, 呈极性分布, 或大于等于 7 个, 呈非极性分布。结果表明, 即使在移植时的卵裂速度和形态相同, 原核形态正常的受精卵发育的胚胎着床率是异常胚胎的 3 倍, 因此原核形态评分能够在形态好的胚胎中筛选具有较高着床能力的胚胎, 使得每次只移植一个胚胎成为可能。

#### 1.2 移植胚胎发育阶段的影响

Amin<sup>[3]</sup>等研究表明, 用于卵裂期胚胎选择的形态学标准, 即使由经验丰富的胚胎学家挑选, 也仅有不足 1/3 的胚胎在发育到囊胚期时可供移植。由此可见用卵裂期胚胎选择的形态学标准可能存在不足。将胚胎培养到囊胚期不但可避免多胎, 而且能选择具有最高着床潜能的胚胎。

着床前发育包括从受精开始到胚胎着床阶段, 在体内包括输卵管和子宫内发育的独立生存阶段。着床的建立要求囊胚形成, 这是胚胎移植前胚胎质量的决定性因素。这个阶段的发育由特异性基因家族调控<sup>[4]</sup>。胚胎培养至囊胚期 (卵母细胞回收 5~6 天后) 时移植比卵裂期胚胎 (2~3 天) 移植的成功率高。因为自然情况下, 2、3 日龄的胚胎通常是在输卵管中发育, 而不是在子宫。在排卵后 80 h 左右胚胎才进入子宫, 着床过程发生于囊胚形成后。因此如果能够提高体外培养条件, 使囊胚形成率增加, 就可以在囊胚期将胚胎移入子宫, 即培养至囊胚可以增加子宫和胚胎发育的同步性。而且还可以控制胚胎基因组, 通过胚胎

收稿日期: 2006-02-21 基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2003075)

作者简介: 孙永成 (1979-), 男, 硕士生

\* 通讯作者 Corresponding autho, 博士, 教授, 博导, 主要从事动物胚胎工程研究, E-mail: f\_wang2001@sina.com

表现出的继续发育的潜能来筛选用于移植的胚胎<sup>[5]</sup>。

另有研究表明,受精后早期发生卵裂的胚胎(受精后 25 h 内发生第一次卵裂)的妊娠率明显提高,而且更容易发育至囊胚<sup>[6]</sup>。但是,只有少数比例的胚胎在受精早期发生卵裂。这些研究表明,卵裂率可能在胚胎的着床潜能方面起作用。卵裂速度快的胚胎着床潜能高。用线性回归分析对培养 3 天后每个胚胎的卵裂率进行检查,结果表明妊娠率与胚胎卵裂速度呈正相关。然而,卵裂率的数据只能评估胚胎早期的发育情况。尽管整体而言,早期发生卵裂的胚胎有较好的质量,但是不能保证这些胚胎在体外培养阶段维持较高的发育率<sup>[7]</sup>。

卵裂期移植与囊胚期移植异位妊娠的发生率没有差异。从理论上讲,黄体期子宫的收缩性降低,与卵裂期移植相比,D5 移植的异位妊娠率应该降低。因为囊胚的体积较大,D5 的胚胎迁移至输卵管的机会可能降低。但实际的研究结果并没有表现出这种差异。原因可能是移植的囊胚确实进入输卵管的机会降低,但是进入输卵管的囊胚比 D3 胚胎更容易发生附植,因为 D3 的胚胎还有 2 天时间迁移回到子宫腔<sup>[8]</sup>。

### 1.3 提高胚胎质量的措施

很多因素影响胚胎的质量,如控制性超数排卵、受精、胚胎培养技术。控制性超数排卵(COH)是以药物的手段在可控制的范围内诱发多个卵泡的发育和成熟,取得较多卵子,受精后获得可供移植的至少 1~2 个优质胚胎。COH 的周期常用促性腺激素释放激素激动剂或拮抗剂进行调节,促性腺激素刺激卵巢产生较多的卵子,并使体内激素水平超常,内环境发生改变。这种变化可能对子宫内膜植入窗的开放产生影响。

囊胚培养的应用至少有 3 个障碍:(1)对任何物种而言,培养环境不能达到最优化以充分支持胚胎在体外发育到囊胚阶段;(2)胚胎体外培养时容易丢失,尤其是有高达 80% 的卵母细胞体外成熟和受精后不能发育到囊胚阶段。(3)着床前的发育阶段如果是在体外非最佳环境下完成,就可能破坏正常的发育程序,这些损伤不仅影响短期内的发育过程,如囊胚形成、着床、妊娠建立等,而且可能对胎儿和产后发育产生长期的影响,在生命过程中可能容易罹患心血管疾病和糖尿病<sup>[4]</sup>,并且囊胚培养增加了工作量和实验室的消耗。

目前囊胚培养多采用序贯培养(sequential culture)系统<sup>[9]</sup>。序贯培养注意到体外培养的胚胎在不同发育时期代谢需求的不同,配制出同系列、不同成分的培养液,依次采用适合该时期营养需要的培养液进行培养。通过基因组激活、囊胚腔发育和胚胎扩展促进胚胎的生长,并且选择有最大着床潜能的胚胎。尽管人胚胎发育过程中所需的确切氨基酸尚不清楚,但已发现加入必需和非必需氨基酸后可使囊胚形成率明显升高<sup>[10]</sup>。还有一些生长因子,如肝素结合的表皮生长因子在囊胚形成过程中起着积极的作

用<sup>[11]</sup>。

粘多糖、玻璃酸(hyaluronan)水平在胚胎着床时增加。移植培养液中增加玻璃酸的浓度能够提高胚胎着床率,机理可能是因为增加的粘多糖浓度与子宫溶液的浓度相似,所以与其混合的能力增加,从而降低了胚胎移植后被排斥的机会。培养液中增加玻璃酸浓度可以使每个患者移植的胚胎数减少<sup>[12]</sup>。

## 2 子宫内腔容受性的影响

着床是一个复杂的、严格调控的过程,胚胎发育与子宫内腔必须协调一致,并于子宫内腔“着床窗”开放时期相互识别,着床才会成功。

### 2.1 子宫内腔容受性的评估

在过去的 20 多年中,进行了大量的研究以提高着床率。随着辅助生殖技术的迅猛发展,在控制性超数排卵、受精、胚胎培养技术都有了很大的突破,致使移植胚胎的质量和数量都有明显提高,然而,子宫内腔容受性方面仍没有相应的改善。子宫内腔容受性是胚胎着床发生的关键因素,但实际操作中子宫容受性的评估和提高受到限制,这是因为几个因素的影响。第一,多种因素在子宫着床接受性方面起重要作用,因为着床过程是由子宫内腔复杂的形态和生物化学方面的变化调控的,因此需要同时检测所有的相关因素,从而准确的估计子宫内腔的着床接受状态。第二,在实际的 ET 过程中,取组织样进行子宫容受性标记物的直接评价几乎是不可能实现的。

**2.1.1 超声波辅助评估** 胚胎移植过程临床触诊的盲目性是胚胎移植处理失败的主要原因。利用腹部超声波辅助诊断进行的胚胎移植效率显著高于临床触诊的效率,高分辨率的超声波探针可以直接观察到子宫的收缩性活动,在临床上得到广泛应用。使用超声波可以避免导管接触子宫基底部,因为接触能刺激产生强烈的子宫收缩。但有经验的操作者不借助超声波也可以做到这一点。超声波辅助胚胎移植的主要缺点是时间、空间、仪器和需要对工作人员进行培训<sup>[13, 14]</sup>。此外,某些病例中需要移动导管以方便观察,这个运动可能潜在的破坏子宫内腔,从而降低了超声波所提供的优势<sup>[15]</sup>,而且超声波的使用不能阻止异位妊娠。盲法移植胚胎时,为了避免导管与基底部的接触,最简单的办法就是移植胚胎时固定外部导管的长度<sup>[16]</sup>。因此,有的研究认为超声波在胚胎移植中没有临床应用价值。

在临床诊断中,用超声波检查作为预测胚胎着床的参数也有局限性<sup>[17]</sup>,因为在检查子宫内腔容受性的研究中,超声波与 Doppler 检查是在胚胎移植当天进行的(黄体期的第 4 或第 5 天),即接近着床窗口期,此时决定是否进行胚胎移植则为时已晚。在临床实践中,需要能使用的预测方法最晚应在 hCG 注射当天,从而允许最大时间范围内进行必要的刺激方案、卵母细胞回收计划,或者胚胎低温保存以调整、延迟胚胎移植时间<sup>[18]</sup>。

**2.1.2 子宫内腔组织血液循环评估** VEGF(血管内皮生

长因子) 具有强烈的促血管内皮细胞增殖及增加血管通透性作用, 在调控生理和病理的血管发生方面起着重要的作用, 同时被认为是卵巢类固醇和子宫内膜血管发生的旁分泌调控因子。在月经周期, 子宫内膜中 VEGF mRNA 和蛋白的表达在分泌阶段达到最高, 也是子宫内膜血管发生最活跃的时期。在子宫内膜的腺上皮细胞能检测到强烈的免疫反应, 而在基质细胞中免疫活性低。研究发现, 强烈的子宫内膜 VEGF 表达与成功妊娠相关, 妊娠妇女的 VEGF 表达显著高于非妊娠的妇女<sup>[19]</sup>。在围着床期, VEGF 主要对胚胎着床的早期阶段产生影响, VEGF 的增多, 可能有助于改善子宫内膜容受性, 以利于胚胎着床, 也有助于早期绒毛血管的形成。VEGF 可以用免疫组化的方法检测, 但这种方法只能在术后离体组织上进行。

评估子宫内膜容受性还可以通过检测子宫内膜组织血液循环。丰富的毛细血管网对卵泡的选择性生长和功能性黄体的形成是必需的。子宫内膜和胎盘生长的同时也伴随着大量血管的发生。因此, 活跃的血液供应是繁殖功能, 包括正常着床所必需的。ETBF (子宫内膜组织血液循环) 比传统的容受性标记物, 包括超声波参数, 血清激素浓度以及子宫内膜的组织学标记等更能反映子宫内膜容受性, 而且 ETBF 测量简单、迅速、无损伤性<sup>[19]</sup>。在形态正常的子宫, ETBF 显著高于非正常子宫, 而且在基底部最大。相应地, 正常子宫有 85% 的妊娠囊胚在基底部着床<sup>[19]</sup>。hCG 注射当天的内膜间血管穿入和内膜下血液循环速度与妊娠率相关。如果子宫内膜下和子宫内膜中都没有血管穿入, 表现为着床失败。如果没有内膜下血液循环, 即使其他方面处于有利环境, 也不会有妊娠发生<sup>[20]</sup>。

子宫血液循环可以用 Doppler 超声波分析子宫动脉血流量进行估计, 但是 Doppler 流量分析比较困难, 也不太精确, 因为分析的结果不仅依赖于声波作用的角度, 要求声波作用角度为 0° (因为小螺旋血管的方向不确定), 而且还取决于血管直径的精确测量、血管的扭曲程度和仪器的分析能力<sup>[21]</sup>。激光血液流量计可以对组织血液循环进行非损伤性的实时测量, 在医学领域得到广泛的应用, 与其他手段相比更加精确<sup>[19]</sup>。

## 2.2 提高子宫内膜容受性的措施

子宫在每个月经周期有 3 种典型的收缩形式, 影响着床。ET 时子宫的收缩能够降低 IVF 胚的妊娠率。Ijland<sup>[22]</sup>等发现, 在自发周期中, 怀孕个体比非怀孕个体的子宫内膜波动活动少, 而 ET 时子宫高频率的收缩导致着床率低和 IVF-ET 效果差。这些结果表明, 子宫的收缩性和是否选择非损伤性检测手段是子宫内膜容受性的决定因素。就此方面而言, 辅助药物, 如子宫迟缓药物治疗, 可以使子宫启动适合胚胎着床的状态。piroxicam 是一种 NSAIDs 药物 (非甾体化合物的抗炎药物), 具有阻止 COX (环氧化酶) 的作用, 而 COX 能催化 arachidonic acid 合成前列腺素, 刺激子宫收缩, 所以 ET 前用 piroxicam 处理, 通

过镇静子宫收缩能够增加囊胚着床率, 同时还可使子宫血液循环增大<sup>[23]</sup>。在目前的研究中, piroxicam 对老龄妇女没有表现出积极的作用, 尤其是 40 岁以上的妇女, 这个结果表明, piroxicam 的镇静作用似乎不能克服与年龄有关的生育能力降低<sup>[23]</sup>。

患有子宫疾病的妇女在辅助生殖技术中胚胎着床率低。动物实验证实, 雌激素能激发某些免疫过程, 而雄激素则抑制其过程, 因此女性易发自身免疫疾病, 临床上常表现为反复自然流产、死胎、不孕、卵巢早衰、子宫内膜异位症以及 IVF-ET 失败。

患有 Müllerian 异常症的妇女胚胎着床率低, 但可以通过 TET (输卵管胚胎移植) 降低这种影响<sup>[24]</sup>。对于 B 超显示子宫内膜回声紊乱及异常增厚的妇女, 切除息肉和异常增厚的内膜部分可以修复异常的子宫内膜, 使子宫内膜的形态趋于正常, 增加子宫内膜的容受性。轻柔环刮子宫内膜搔刮 1~4 次, 机械刺激子宫内膜也可显著提高 IVF-ET 的胚胎着床率、临床妊娠率和活胎率。一方面, 损伤能够诱导子宫蜕膜, 这与给小鼠或大鼠子宫内注射油剂引起的蜕膜相似, 另一方面, 子宫内膜的局部手术造成的损伤可诱导某些细胞因子或生长因子在胚胎着床的过程中起作用, 如白细胞介素-6、白细胞介素-11、白血病抑制因子、肝素结合 EGF 样生长因子以及双调蛋白参与旁分泌和自分泌系统的着床过程<sup>[25, 26]</sup>。

临床经验发现, 评分较高的 IVF 胚胎移植后不一定着床, 而评分低的胚胎却有可能着床。通过对自然妊娠、IVF 后或提供卵母细胞后内分泌和子宫内膜的研究发现, 在明显不是最佳的着床激素环境和子宫内膜容受性情况下仍可能发生胚胎的着床。总之, 胚胎着床是多个因素协同作用的结果, 任何一个环节都可能导致着床的失败。在临床实践中, 对每个患者都应有独特的诊疗方案。

## 3 参考文献

- [1] Hazelanp J, Bergh C, Wennerholm UB, *et al.* Avoiding multiple pregnancies in ART: consideration of new strategies[J]. Hum Reprod, 2000, 15: 1217.
- [2] Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology[J]. Hum Reprod, 1999, 14: 1318.
- [3] Amin A, Milki, Mary D. Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos[J]. Fertility and Sterility, 2002, 77 (6): 1191
- [4] AJ Watson, DR Natale, LC Barcroft. Molecular regulation of blastocyst formation[J]. Animal Reproduction Science, 2004 (82-83): 583
- [5] Blake D, Proctor M, Johnson N, *et al.* Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2002, (2): CD002118.
- [6] Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, *et al.* Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human

- preimplantation embryos *in vitro* [J]. Hum Reprod, 2002 (17): 407.
- [7] Wei Li, Salim Daya, Joanne Gunby. Faster embryo growth rate *in vitro* increases probability of pregnancy in assisted reproduction cycles[J]. International Congress Series, 2004 (1271): 143.
- [8] Amin A Milki, Sunny H Jun. Ectopic pregnancy rates with day 3 versus day 5 embryo transfer: a retrospective analysis[J]. BMC Pregnancy and Childbirth, 2003, 3: 7.
- [9] Menezes Y, Veiga A, Benkhaifa M. Improved methods for blastocyst formation and culture [J]. Hum Reprod, 1998, 13 (Suppl 4): 256.
- [10] Gardner DK, Lane M. Alleviation of the "2-cell block" and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters[J]. Hum Reprod, 1996, 11 (12): 2703.
- [11] Martin KL, Barlow DH, Sargent. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum free medium[J]. Hum Reprod, 1998, 13 (6): 1645.
- [12] William Schoolcraft, Michelle Lane, John Stevens, *et al.* Increased hyaluronan concentration in the embryo transfer medium results in a significant increase in human embryo implantation rate [J]. Fertility and Sterility, 2002, 14: S5.
- [13] William M, Buckett MD. A meta-analysis of ultrasound-guided versus clinical touch embryo transfer[J]. Fertility and Sterility, 2003, 80 (4): 1037.
- [14] SR Lindheim, MA Cohen, MV Sauer. Ultrasound guided embryo transfer significantly improves pregnancy rates in women undergoing oocyte donation [J]. International J Gynecology & Obstetrics, 1999, 66: 281.
- [15] Juan A, Garcia-Velasco, Verónica Isaza, Javier Martinez-Salazar, *et al.* Transabdominal ultrasound-guided embryo transfer does not increase pregnancy rates in oocyte recipients [J]. Fertility and Sterility, 2002, 78 (3): 534.
- [16] Naakgeboren N, Dieben S, Keijnsbroek I, *et al.* Embryo transfer, easier said than done[J]. Fertil Steril, 1998, 70: S352.
- [17] Bienvenido Puerto, Montserrat Creus, Francisco Carmona, *et al.* Ultrasonography as a predictor of embryo implantation after *in vitro* fertilization: a controlled study[J]. Fertility and Sterility, 2003, 79 (4): 1015.
- [18] Friedler S, Schenker JG, Herman A, *et al.* The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review[J]. Hum Reprod Update, 1996, 2 (4): 323.
- [19] Masao Jinno, Tsuneo Ozaki, Mitsutoshi Iwashita, *et al.* Measurement of endometrial tissue blood flow: a novel way to assess uterine receptivity for implantation[J]. Fertility and Sterility, 2001, 76 (6): 1168.
- [20] Li-Wei Chien, Heng-Kien Au, Ping-Ling Chen, *et al.* Assessment of uterine receptivity by the endometrial-subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer[J]. Fertility and Sterility, 2002, (78): 245.
- [21] Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy[J]. Hum Reprod Update, 1997, 3 (5): 467.
- [22] IJland MM, Evers JL, Dunselman GA, *et al.* Relation between endometrial wavelike activity and fecundability in spontaneous cycles [J]. Fertil Steril, 1997, 67: 492.
- [23] Hwa Sook Moon, Sea Hee Park, Ju Ok Lee, *et al.* Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after *in vitro* fertilization and embryo transfer [J]. Fertility and Sterility, 2004, 82 (4): 816.
- [24] E Mor, A Bayrak, DE Tourgeman, *et al.* Embryo Implantation in Women with Müllerian Anomalies: Role of Tubal Embryo Transfer [J]. Fertility and Sterility, 2004, 81 (suppl 3): S22.
- [25] Rong Li, Yaoting Gui, Lihua Lu, *et al.* Local injury to the endometrium improves the pregnancy rate in patients undergoing *in vitro* fertilization [J]. International Congress Series, 2004, (1271): 73.
- [26] Lessey BA, Gui Y, Apparao K B, *et al.* Regulated expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: a potential paracrine role during implantation [J]. Mol Reprod, 2002, 62 (4): 46.