

· 论 著 ·

胚胎培养液中血管内皮生长因子的水平及其与 IVF-ET 结局的关系

任建枝, 蔡嘉力, 韩冬梅, 李 萍, 耿 洁, 马彩辉, 韩 艳

[摘要] 目的 探讨体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗患者胚胎培养液中血管内皮生长因子水平与早期胚胎质量及胚胎移植后临床结局的关系。方法 留取第 3 天胚胎培养液,采用酶联免疫吸附试验检测培养液中血管内皮生长因子(VEGF)的水平。结果 ①两组患者的平均年龄、获卵数、胚胎数、优胚数及移植胚胎的累积胚胎评分均无明显差异($P>0.05$),妊娠组卵泡液内 VEGF 水平显著低于非妊娠组($P<0.05$)。② I 级胚胎培养液中 VEGF 水平明显低于 II 级胚胎培养液中 VEGF 水平($P<0.01$)。结论 胚胎培养液中 VEGF 的水平可以作为预测胚胎质量及妊娠结局的参考指标之一。

[关键词] 血管内皮生长因子;胚胎质量;改良长方案

[中图分类号] R711.6 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.05.007

Vascularendothelial growth factor level in embryo culture medium and its impact on clinical outcome of IVF-ET

REN Jian-zhi, CAI Jia-li, HAN Dong-mei, LI Ping, GENG Jie, MA Cai-hui, HAN Yan. Reproductive Medicine Center, 174 Hospital of PLA, Xiamen, Fujian 361002, China

[Abstract] **Objective** To explore vascular endothelial growth factor (VEGF) level in embryo culture medium and the impact on early Embryo quality and clinic outcome in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). **Methods** Embryo culture mediums were obtained on the third day. ELISA was used to detect the level of VEGF in embryo culture mediums. **Results** ①There were no significant difference in female age, the numbers of oocytes and embryos, the number of high-quality embryos, cumulative embryo score (CES) of embryo transfer in two groups ($P>0.05$).The level of VEGF in embryo culture medium in pregnancy group was significant lower than in no pregnancy group ($P<0.05$). ②The level of VEGF in embryo culture medium was statistically significant lower in grade I embryo than grade II embryo ($P<0.01$). **Conclusion** The level of VEGF in embryo culture medium can be used as one of predictors of embryo quality and pregnancy outcome.

[Key words] vascular endothelial growth factor (VEGF); embryo quality; modified long protocol

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种多功能生长因子和特异性血管生长因子,具有特异性促血管内皮细胞有丝分裂,强烈诱发活体内新血管形成。参与多种生理活动,并在一些疾病的发病机制中起重要作用^[1]。我们的既往研究表明,在排卵周期中,随着卵泡的增大成熟,血清及卵泡液中 VEGF 水平也明显增高,提示 VEGF 可能参与卵泡的发育^[2]。然而对于 VEGF 在人的胚胎发育过程中的相关研究尚鲜有报道,我们试图通过测定接受体外受精-胚胎移

植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)治疗患者的卵裂期单胚胎培养液中 VEGF 水平,并分析胚胎培养液中 VEGF 水平及胚胎移植后临床结局的关系,为今后选择移植胚胎时提供有价值的参考指标。

1 对象与方法

1.1 对象 2014 年 10-12 月在解放军 174 医院生殖医学中心接受 IVF-ET 治疗的 80 例患者,其中原发性不孕 39 例、继发性不孕 41 例,年龄(30.95 ± 4.23)岁,体重指数(BMI)为(21.16 ± 2.14),所有患者均符合 IVF-ET 适应证。

1.2 样本收集及处理 均采用本中心的常规促排卵方案-改良方案促排卵^[3],经阴道 B 超引导下穿刺取卵,精液处理后选择常规体外受精,加精后 19 h 观察受精。受精后,将受精卵转移到胚胎培养微滴,采用一个胚胎一个培养滴的微滴培养,胚胎培

基金项目:南京军区医学科技创新课题项目(10MB015)
作者单位:361002 福建厦门,解放军 174 医院生殖医学中心
引用格式:任建枝,蔡嘉力,韩冬梅,等.胚胎培养液中血管内皮生长因子的水平及其与 IVF-ET 结局的关系[J].东南国防医药,2016,18(5):472-474.

养置 37 °C、6%CO₂ 培养箱培养。48 h 观察胚胎进行胚胎评分。选择最好的 2 个胚胎进行移植。转移胚胎后将胚胎培养液, 2030 μL/滴分装, -80 °C 超低温冰箱保存待检测。

1.3 移植胚胎累积胚胎评分 培养第 3 天行胚胎评分, 根据卵裂球的细胞数量、细胞是否均匀及是否有碎片, 按 Wetzels 胚胎评分法^[4]: ① I 级胚胎(4 分): 细胞均匀, 形状规则, 透明带完整, 胞质均匀清晰, 细胞碎片在 5%; ② II 级胚胎(3 分): 细胞大小不均匀, 形状略不规则, 胞质可有颗粒现象, 细胞碎片在 10%~20%; ③ III 级胚胎(2 分): 细胞大小明显不均匀, 形状明显不规则, 胞质可有颗粒现象, 细胞碎片在 21%~50%; ④ IV 级胚胎(1 分): 细胞极不均匀, 胞质可有严重颗粒现象, 碎片在 50% 上; ⑤ V 级胚胎(0 分): 退化、死亡胚胎。胚胎的形态评分乘以胚胎细胞数, 得到每个胚胎的分数, 移植周期移植胚胎分数的总和得到每个患者移植周期的累积胚胎评分(cumulative embryo score, CES)。

1.4 分组 根据临床结局分为临床妊娠组与非妊娠组。临床妊娠的诊断方法是胚胎移植后 4 周行超声检查见妊娠囊及胎芽、原始心管搏动或刮宫见到绒毛者。

1.5 培养液中 VEGF 的检测 培养液液中 VEGF 浓度采用 ELISA 法测定, 测定所用试剂为 VEGF 试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司), 并做预试验以调整稀释比例。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计学软件包处理数据。对计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料以百分率表示, 对计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用卡方检验, *P*<0.05 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 不同临床结局患者间相关指标的比较 80 例行胚胎移植者获妊娠 48 例, 妊娠率为 60.00%。妊娠组为 48 例, 非妊娠组为 32 例。两组患者的平均年龄、不孕年限、既往移植次数、基础的促卵泡成熟激素(follicle stimulating hormone, FSH)水平、黄体生长素(luteinizing hormone, LH)水平、绒毛膜促性激素(human chorionic gonadotropin, HCG)日内膜厚度、雌激素(estradiol, E2)水平、孕激素(progesterone, P)水平、获卵数、胚胎数、优胚数、优质胚胎率及移植胚胎的累积胚胎评分均无明显差异(*P*>0.05), 妊娠组胚胎培养液内 VEGF 水平明显低于非妊娠组, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 见表 1。

表 1 不同临床结局患者间相关指标的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	妊娠组(<i>n</i> =48)	非妊娠组(<i>n</i> =32)
女性年龄(岁)	30.75±3.96	31.08±4.44
不孕年限(年)	4.94±3.42	4.26±3.24
体重指数	21.52±2.30	20.93±2.02
既往移植次数	1.09±0.30	1.25±0.60
基础 FSH(mIU/mL)	7.13±1.36	7.04±1.71
基础 LH(mIU/mL)	4.60±1.90	4.93±2.97
基础 E2(pg/mL)	39.29±17.86	48.85±60.94
HCG 日内膜厚度(cm)	7.52±4.42	7.13±5.65
HCG 日 E2(pg/mL)	3 727.96±2 438.26	3 302.02±3 110.11
HCG 日孕酮(ng/mL)	1.31±0.75	1.29±0.68
获卵数	20.38±12.55	16.71±11.37
胚胎数	10.22±3.86	9.17±4.56
优质胚数	7.28±3.67	6.15±3.40
优胚率	0.72±0.23	0.71±0.24
CES	42.5±10.8	39.68±10.73
VEGF(pg/mL)	10.21±5.22	13.22±6.06*

注: 与妊娠组比较, **P*<0.05

2.2 不同质量胚胎的胚胎培养液中 VEGF 水平

I 级胚胎(4 分)培养液中 VEGF 水平为(7.65±3.92)pg/mL, II 级胚胎(3 分)培养液中 VEGF 水平为(16.46±3.34)pg/mL。具有更良好着床潜能的 I 级胚胎对应的卵胚胎培养液中 VEGF 水平比胚胎质量稍差的 II 级对应的卵胚胎培养液中 VEGF 水平明显低, 差异有统计学意义(*P*<0.01)。

3 讨论

3.1 胚胎质量评判的方法及局限性 胚胎质量是妊娠成功的关键因素之一, 在目前的人类辅助生殖技术中, 胚胎的形态学参数仍作为挑选胚胎的主要非侵入性指标。形态学的评估虽然对于挑选胚胎进行移植提供了简便有效的方法, 然而, 不少通过形态学方法评估为优质胚胎移植后却未能着床。目前胚胎形态学评估存在诸多问题, 如缺少可量化的指标、受到实验室技术人员主观因素的影响。因此如何增加预测方法、提高预测早期胚胎发育潜能的能力成为当务之急。测量胚胎代谢产物中胚胎内源性因子来评估胚胎发育潜能因其非侵入性、风险低等优点而可能成为评估胚胎质量的有效方法。早年, Risau^[5]在动物实验中发现 VEGF 作为血管形成关键的始动因子作用于早期的诱生阶段, 诱导血管内皮细胞分裂增生, 形成原始血管, 再通过血管生成素 1 和酪氨酸蛋白激酶 B2 的协同作用使该血管重塑而成熟, 从空间、时间、数量的不同角度敏感地调节血管生长。在小鼠体外胚胎培养过程中

去除 VEGF, 胚胎发育迟缓甚至停止, 再加入 VEGF 后, 胚胎发育恢复正常并可见心血管形成^[6]。近年来在猪的未成熟卵母细胞体外培养及体外受精的研究中发现^[7], 培养液中加入 VEGF 组的卵母细胞体外成熟率、受精率及囊胚形成率均高于未加入组。而对于 VEGF 在人的胚胎发育过程中的相关研究尚鲜有报道。

3.2 不同临床结局组的胚胎培养液中 VEGF 水平 既往的研究认为 IVF 的临床妊娠与患者的年龄、胚胎质量、子宫内膜的容受性有关^[8]。但本研究结果显示: 在妊娠组与非妊娠组患者的临床特征(平均年龄、不孕年限、促性腺激素的用量、促性腺激素的天数及 HCG 日内膜厚度)和胚胎发育情况(获卵数、胚胎数、优胚数、移植胚胎的累积胚胎评分)无差异的情况下, 初步对比了妊娠组和未妊娠组胚胎培养液中 VEGF 的表达含量, 结果表明, 妊娠组胚胎培养液中 VEGF 的水平明显低于非妊娠组, 提示: 低水平的 VEGF 的优质胚胎具有高的种植能力。同时我们也发现具有更良好着床潜能的 I 级胚胎对应的胚胎培养液中 VEGF 水平比胚胎质量稍差的 II 级对应的卵胚胎培养液中 VEGF 水平明显低, 差异有统计意义。这些均提示胚胎培养液中的 VEGF 水平可能比胚胎形态学更早更灵敏地预测胚胎移植后的临床结局, 可作为预测妊娠结局的一个参考指标。

3.3 卵泡液中 VEGF 的水平与胚胎质量的关系

尽管早年, Barroso 等^[9]研究发现, 卵泡液中 VEGF 的含量与胚胎形态呈负相关, 显示卵泡液中高 VEGF 含量为胚胎发育不良的标志。Friedman 等^[10]的研究也发现患者卵泡液中 VEGF 的含量与获卵数及妊娠率呈负相关。张四林等^[11]通过测定卵泡液中 VEGF 浓度发现, 优质胚胎(6 细胞 B 级以上胚胎)组对应的卵泡液 VEGF 水平比非优质胚胎组水平低 ($P < 0.05$)。但是, 有关胚胎培养液中 VEGF 水平在人的胚胎发育过程中的相关研究尚鲜有报道, 培养液中 VEGF 的出现及水平对胚胎发育的具体作用机制还有待于进一步研究^[12]。

多胎妊娠带来的母婴危害是有目共睹的, 有数据显示辅助生育技术多胎妊娠率升高明显, 故辅助生殖领域都提倡单胚胎移植^[13-15]。若胚胎培养液中 VEGF 的低浓度水平能表明胚胎的发育代谢能力, 应用 VEGF 水平和胚胎形态学参数联合选择胚胎, 将有可能得到发育潜能最优的胚胎用于移

植, 对于年轻者进行单胚胎移植, 切实降低多胎妊娠的发生率, 提高妊娠成功率。

【参考文献】

- [1] 李晶晶, 李国利. VEGF、P53 在精原细胞瘤中的表达及相关性分析[J]. 东南国防医药, 2013, 15(3): 262-264.
- [2] 任建枝, 沙爱国, 王厚照, 等. 血清与卵泡液中血管内皮生长因子在控制性超排卵周期中的变化[J]. 临床军医杂志, 2003, 31(5): 44-46.
- [3] 任建枝, 沙爱国, 韩冬梅, 等. 改良长方案的控制性超排卵方案在体外受精-胚胎移植中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2013, 22(11): 846-850.
- [4] Wetzels AM, Bastiaans BA, Hendriks JC, et al. The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation [J]. Hum Reprod, 1998, 13(5): 1325-1330.
- [5] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. Nature, 1997, 386(6626): 671-674.
- [6] Uiger H, Karabulut AK, Pratten MK. The growth promoting effects of bFGF, PD-ECGF and VEGF on cultured postimplantation rat embryo deprived of serum fractions [J]. J Anat, 2000, 197(2): 207-219.
- [7] Biswas D, Hyun SH. Supplementation with vascular endothelial growth factor during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes and subsequent developmental competence after in vitro fertilization [J]. Theriogenology, 2011, 76(1): 153-160.
- [8] 邓晓惠. 生殖医学技术及其彩色图谱[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 39.
- [9] Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients [J]. Fertil Steril, 1999, 72(6): 1024-1026.
- [10] Friedman CI, Seifer DB, Kennard EA, et al. Elevated level of follicular fluid vascular endothelial growth factor is a marker of diminished pregnancy [J]. Fertil Steril, 1998, 70(5): 836-839.
- [11] 张四林, 杨菁, 尹太郎, 等. 卵泡液中 VEGF 水平对卵母细胞成熟及早期胚胎发育的影响[J]. 武汉大学学报, 2008, 29(1): 59-62.
- [12] 周经委, 吴蓉花, 郭里, 等. 玻璃化冷冻胚胎与新鲜胚胎移植对子代小鼠生长发育的影响[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(6): 569-573.
- [13] Bromer JG, Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008, 20(3): 234-241.
- [14] 邵一丹, 梁元姣, 陈莉, 等. 抗菌素类激素下降率对多囊卵巢患者促排卵疗效的预测价值[J]. 医学研究医学报, 2016, 29(6): 616-620.
- [15] Van AM, Peperstraten WL, Nelen DM, et al. Why don't we perform elective single embryo transfer? A qualitative study among IVF patients and professionals [J]. Hum Reprod, 2008, 23(9): 2036-2042.

(收稿日期: 2016-04-26; 修回日期: 2016-07-19)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)