

体外受精 - 胚胎移植 (IVF-ET) 胚胎培养液中 HLA-G 检测在预测胚胎发育潜能和临床结局中的应用价值研究

罗平, 沈开元, 卢娜, 罗江霞, 黄芬, 刘刚毅 (柳州市人民医院生殖医学科, 广西柳州 545006)

摘要: **目的** 探讨培养液中可溶性人类白细胞抗原 G(HLA-G) 表达水平在预测胚胎发育潜能、评估临床结局中的应用价值。**方法** 选取 2017 年 12 月~2019 年 8 月在柳州市人民医院生殖医学科接受体外受精 - 胚胎移植 (IVF-ET) 治疗的不孕不育夫妇共 156 对, 收集其胚胎培养第三天 (D3) 或第五天 (D5) 的培养上清液, 检测培养液中 HLA-G 浓度。根据移植临床结局分为临床妊娠组和未妊娠组, 根据移植胚胎培养液 HLA-G 浓度按 D3 卵裂期胚胎 ≥ 2.5 U/ml 或 D5 囊胚 ≥ 6.8 U/ml 分为高浓度组和低浓度组分别进行比较, 同时对 D3 胚胎继续培养形成囊胚情况及不同级别囊胚培养液 HLA-G 含量进行比较分析。**结果** 临床妊娠组和未妊娠组间的平均年龄、不孕年限、抗苗勒管激素 (AMH)、子宫内膜厚度、平均获卵数、受精率、优质胚胎率比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), HLA-G 浓度分别为 7.38 ± 4.12 U/ml 和 2.46 ± 1.69 U/ml, 两组比较差异有统计学意义 ($t=3.628, P < 0.01$); 形成优质囊胚、可用囊胚和不可用囊胚培养液中的 HLA-G 浓度分别为 $12.36 \pm 5.27, 8.15 \pm 3.69$ 和 5.62 ± 3.10 U/ml, 三组比较差异有统计学意义 ($t=2.856, P < 0.05$); HLA-G 高浓度组临床妊娠率和胚胎种植率分别为 69.41% (59/85) 和 49.60% (62/125), 均高于 HLA-G 低浓度组 46.05% (35/76) 和 26.78% (30/112), 差异有统计学意义 ($\chi^2=9.011, 12.946, P < 0.01$), 两组之间的生化妊娠率和流产率比较差异无统计学意义 ($\chi^2=0.527, 0.368, P > 0.05$)。**结论** 检测胚胎培养液中 HLA-G 水平可作为胚胎发育潜能的预测指标, 联合形态学评分进行胚胎移植可获得较好的临床结局。

关键词: 体外受精 - 胚胎移植; 胚胎培养上清液; 可溶性人类白细胞抗原 G; 发育潜能; 临床结局

中图分类号: R394-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-163-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.040

Correlation between HLA-G Detection in (IVF-ET) Embryo Culture Medium and Embryonic Development Potential and Clinical Outcome Abstract

LUO Ping, SHEN Kai-yuan, LU Na, LUO Jiang-xia, HUANG Fen, LIU Gang-yi

(Reproductive Medicine Center, Liuzhou People's Hospital, Guangxi Liuzhou 545006, China)

Abstract: Objective To investigate the application value of soluble human leucocyte antigen G (sHLA-G) expression in culture medium in predicting embryo development potential and evaluating clinical outcome. **Methods** 156 infertile couples treated with in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the Department of Reproductive Medicine of Liuzhou People's Hospital from December 2017 to August 2019 were selected to collect the culture supernatant from the third (D3) or fifth (D5) day of embryo culture and to detect the HLA-G concentration in the culture medium. The clinical pregnancy or non-pregnant group was divided according to the clinical outcome of transplantation. According to the HLA-G content in medium, HLA-G ≥ 2.5 U/ml from day 3 embryo culture medium or HLA-G ≥ 6.8 U/ml from day 5 blastocyst was regarded as HLA-G high group. HLA-G < 2.5 U/ml from day 3 embryo culture medium or HLA-G < 6.8 U/ml from day 5 blastocyst was regarded as HLA-G low group. The blastocyst formation rates and the HLA-G contents in culture medium from different grade blastocyst were compared. **Results** There was no significant difference in the mean age, infertile years, AMH, endometrial thickness, average number of oocytes retrieved, fertilization rate and high quality embryo rate between clinical pregnancy and non-pregnant groups (all $P > 0.05$), but was statistically significant difference in HLA-G concentration from culture medium ($t=3.628, P < 0.01, 7.38 \pm 4.12$ U/ml and 2.46 ± 1.69 U/ml, respectively). The HLA-G concentration in the culture medium from high quality blastocyst, available blastocyst and unavailable blastocyst groups were $12.36 \pm 5.27, 8.15 \pm 3.69$ and 5.62 ± 3.10 U/ml, respectively, which were significant differences ($t=2.856, P < 0.05$). The clinical pregnancy rate and embryo implantation rate in HLA-G high group were 69.4% (59/85) and 49.6% (62/125), respectively, which significantly higher than those in HLA-G low group 46.05% (35/76) and 26.78% (30/112), respectively ($\chi^2=9.011, 12.946, P < 0.01$). No significant difference was found in biochemical pregnancy rate and abortion rate between HLA-G high and HLA-G low groups ($\chi^2=0.527, 0.368, P > 0.05$). **Conclusion** Combined

基金项目: 广西自然科学基金青年基金项目 (2018GXNSFBA281048); 广西壮族自治区卫健委课题 (Z20170677)。

作者简介: 罗平 (1971-), 男, 学士学位, 副主任技师, 研究方向: 人类辅助生殖, E-mail: LUOP521@163.com。

with morphological score, the detection of HLA-G content in the embryo culture medium can be used as a predictor of embryo development potential for a better clinical outcome in embryo transplantation.

Keywords: IVF-ET; supernatant of embryo culture medium; soluble HLA-G; developmental potential; clinical outcome

体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术的诞生为广大不孕不育患者解决了生育难题,虽然该技术的临床妊娠率已达到40%~60%,但因为追求妊娠率而导致的多胎妊娠已成为最常见的并发症之一,其带来的孕产期风险及后代安全隐患越来越明显,因此选择具有发育潜能的单胚胎移植以避免多胎妊娠已经成为趋势。目前评价胚胎质量的主要方法是形态学评估法,但该方法具有一定的局限性^[1],不能很好地预测胚胎的发育潜能。人类白细胞抗原HLA-G(human leukocyte antigen G, HLA-G)基因在1987年被成功克隆,它是组织主要相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC)Ib类家族成员,与其他HLA I基因具有同源的分子结构^[2],HLA家族蛋白广泛应用于癌症以及一些遗传疾病的诊断^[3],是一类敏感性较高的疾病标记物。HLA-G已被证实未受精的卵母细胞及早期胚胎的二细胞至囊胚阶段均有表达,其表达水平在每个发育阶段的胚胎中都有着不同的变化^[4],在早期胚胎的培养液中也检测到可溶性HLA-G的存在并且证实其蛋白表达浓度可能与妊娠结局密切相关^[5-6]。本研究通过检测胚胎培养上清液中的HLA-G含量,探讨HLA-G在评估早期胚胎质量、预测胚胎发育潜能中的应用价值,为临床实施选择性单胚胎移植提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2017年12月~2019年8月在我院生殖医学科接受辅助生殖技术IVF-ET治疗的不孕不育夫妇共156对,女方平均年龄34.25岁,平均不孕年限 3.56 ± 1.89 岁,入组标准:女方年龄 ≤ 37 岁,基础激素水平正常,排除标准:①子宫内膜异位症或子宫畸形、腺肌症;②输卵管积水或宫腔积液;③盆腔黏连;④有家族遗传病史;⑤夫妇染色体核型分析异常。

1.2 试剂和仪器 胚胎培养液购自瑞典Vitrolife公司,胚胎冷冻液、解冻液购自日本KITAZATO公司,HLA-G检测试剂盒购自捷克Exbio公司,胚胎培养箱(型号:C200)购自德国Labotect公司,酶标仪(型号:MK-3)购自美国ThermoFisher公司。

1.3 方法

1.3.1 促排卵及取卵:严格按本中心超促排卵方案促排卵,当有2个或以上卵泡直径达到18mm时注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)扳机启动,36h后通过阴道B超引导下穿刺取卵,所获得卵冠丘复合

物清洗干净后置于受精培养液内继续培养2~4h后授精。

1.3.2 胚胎培养:授精后18~20h将已拆除颗粒细胞的受精卵转入卵裂培养基微滴(G1, Vitrolife, 瑞典)置于6ml/dl CO₂, 5ml/dl O₂, 37℃培养箱继续培养,标记正常受精卵。受精后第3天(D3)对胚胎进行形态学(细胞发育速度、卵裂球数目、均一性及碎片率)评分,胚胎评分I、II级为优质胚胎,III级以上为可用胚胎,IV级为不可用胚胎丢弃。本中心优质胚胎标准:卵裂球6~10个,大小均一,碎片率 $\leq 20\%$,胞质均匀。根据患者情况选取评分最高的2个优质胚胎移植或冷冻,剩余可用胚胎(III级以上正常受精胚胎)继续培养至第5天(D5)观察囊胚形成情况,采用单个培养法(每个液滴放一个胚胎)培养。用Gardner评分系统^[7]进行囊胚评分,D5评分 $\geq 3BB$ 或D6 $\geq 4BB$ 视为优质囊胚,优质囊胚、可用囊胚移植或冷冻保存,不可用囊胚知情沟通后丢弃。

1.3.3 临床结局:胚胎移植14天后测尿HCG或血 β -HCG,移植后4周B超检测孕囊及胎心搏动以确定是否临床妊娠。

1.3.4 实验室检测:分别收集第3天优质胚胎及第5天囊胚移植或冷冻后其对应的培养上清液30~35 μ l,保存于0.5ml的EP管中,标记后-20℃冰箱保存。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测培养液中HLA-G浓度,所有检测步骤均严格按照说明书操作。

1.4 统计学分析 用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用率(%)表示,各组间率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同妊娠结局患者基本情况和HLA-G检测结果比较 本研究共纳入156对助孕患者总计194个新鲜胚胎(D3胚胎和D5囊胚)移植周期,根据妊娠结局分为临床妊娠组和未妊娠组,两组患者情况见表1。数据显示两组患者的平均年龄、不孕年限、抗苗勒氏管激素(AMH)、促性腺激素(Gn)天数、子宫内膜厚度、平均获卵数、受精率、优质胚胎率差异均无统计学意义($P > 0.05$),妊娠组胚胎培养液中的HLA-G表达水平显著高于未妊娠组和生化妊娠组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 胚胎移植临床结局各组间基本情况及 HLA-G 浓度的比较

项目	未妊娠组 (n=76)	生化妊娠组 (n=15)	临床妊娠组 (n=103)	χ^2/t	P
平均年龄 (岁)	34.66 ± 4.78	34.44 ± 5.12	32.63 ± 4.25	0.956	0.347
不孕年限 (年)	3.93 ± 1.52	3.56 ± 1.72	3.76 ± 1.59	0.258	0.845
AMH (ng/ml)	2.79 ± 0.86	3.08 ± 1.15	2.93 ± 0.95	-0.759	0.453
获卵数 (枚)	12.95 ± 3.45	11.29 ± 2.98	13.12 ± 3.86	2.453	0.625
受精率 % (n)	81.32 (766/942)	79.57 (148/186)	82.34 (1119/1359)	1.028	0.598
优胚率 % (n)	47.34 (303/640)	46.28 (56/121)	48.61 (436/897)	0.384	0.825
囊胚形成率 % (n)	55.33 (301/544)	53.77 (57/106)	56.43 (443/785)	0.352	0.838
内膜厚度 (mm)	11.22 ± 1.85	10.84 ± 2.08	11.32 ± 2.24	0.745	0.568
HLA-G (U/ml)	2.46 ± 1.69	4.15 ± 2.64	7.38 ± 4.12	3.628	0.006

2.2 D3 胚胎继续培养囊胚形成情况及 HLA-G 在不同级别囊胚中的表达 根据 D3 继续培养胚胎级别分为 8 细胞优质胚胎组、其它优质胚胎组、8 细胞 III 级胚胎组及其他可用胚胎组, 比较各组囊胚形成情况, 并分别检测形成囊胚培养液中 HLG-A 含量。结果显示 8 细胞优质胚胎组优质囊胚率、可用

囊胚率及囊胚形成率显著高于其他各组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 形成优质囊胚、可用囊胚及不可用囊胚培养液的 HLA-G 均值分别为 12.36 ± 5.27 , 8.15 ± 3.69 和 5.62 ± 3.10 U/ml, 三组之间的差异有统计学意义 ($t=2.856$, $P < 0.05$)。

表 2 D3 胚胎继续培养形成囊胚情况的比较 [% (n)]

项目	8C 优胚组 (n=86)	优胚组 (n=115)	8C 三级胚组 (n=62)	可用胚胎组 (n=158)	χ^2	P
优质囊胚形成率	30.23 (26)	21.74 (25)	20.96 (13)	5.06 (8)	29.008	<0.001
可用囊胚形成率	34.88 (30)	19.13 (22)	24.19 (15)	18.35 (29)	9.856	0.02
不可用囊胚形成率	10.47 (9)	15.65 (18)	12.90 (8)	24.05 (38)	8.88	0.031
合计	75.58 (65)	56.52 (65)	58.06 (36)	47.47 (75)	18.026	<0.001

2.3 HLA-G 浓度和胚胎移植临床结局的比较 见表 3。根据移植胚胎培养液 HLA-G 浓度, 按 D3 卵裂期胚胎 ≥ 2.5 U/ml 或 D5 囊胚 ≥ 6.8 U/ml 分为高浓度组和低浓度组, 比较两组胚胎移植后临床结

局。结果显示 HLA-G 高浓度组临床妊娠率、胚胎种植率显著高于低浓度组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 两组之间的生化妊娠率和流产率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 HLA-G 浓度与胚胎移植临床结局的相关性比较 [% (n)]

项目	HLA-G 高浓度组	HLA-G 低浓度组	χ^2	P
临床妊娠率	69.41 (59/85)	46.05 (35/76)	9.011	0.003
胚胎种植率	49.60 (62/125)	26.79 (30/112)	12.946	0.001
生化妊娠率	5.08 (3/59)	11.43 (4/35)	0.527	0.468
流产率	3.39 (2/59)	8.57 (3/35)	0.368	0.544

3 讨论

自 JURISICOVA A^[4] 等首次在培养液中检出 HLA-G 后, 随着研究的深入 HLA-G 被认为对人类胚胎的发育和成功植入具有重要意义, 多篇报道也指出 sHLA-G 可以作为评价体外受精胚胎质量的指标并且能够获得更好的移植效果^[8-10]。检测培养上清液 HLA-G 用来筛选更具发育潜能的优质胚胎进行移植, 有利于降低多胎妊娠的风险并能获得很好的临床结局。HLA-G 对人类早期胚胎植入影响的机理为 HLA-G 能够阻止由母源毒性淋巴细胞引起的同种识别以及保护目标细胞免受自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK-cell) 介导的溶解^[11], 抑制

子宫自然杀伤细胞的细胞毒作用和诱导细胞凋亡活化的 CD8 细胞中表达的因子, 从而保护胎儿滋养层细胞免受 NK 细胞杀伤^[12]。通过诱导细胞因子的释放在胚胎与母体免疫耐受机制之间建立相应的“化学对话”以确保胎儿在母体内能安全发育^[13-14]。

本研究结果显示, 胚胎移植临床妊娠组培养液中 HLA-G 浓度均值显著高于未妊娠组和生化妊娠组, 形成囊胚组培养液中 HLA-G 的浓度高于非囊胚组, 优质囊胚组高于非优质囊胚组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。证实 HLA-G 蛋白特异表达于囊胚滋养层细胞内并促使其往胎盘发育, 通过调控滋养层细胞的侵入能力并且促使子宫螺旋动脉血

管的重塑为胚胎的成功着床和妊娠维持做好准备,其表达水平和临床结局密切相关,可作为评价胚胎发育潜能的客观指标,为挑选单个胚胎移植避免多胎妊娠提供依据。对于全胚冷冻或冷冻周期,选择 HLA-G 表达水平高的胚胎(囊胚)移植,中心的临床妊娠率可由 55% 左右提高到 69%,生化妊娠率和流产率降低至 5% 和 3%。对于表达较高浓度 HLA-G 的胚胎仍有 31% 左右未能成功妊娠,除与患者本身的机体状态、子宫内膜容受性有关外,有研究^[15]显示培养至第 3 日的胚胎种植前遗传学诊断(PGD)染色体显示异常时其培养液中仍可检测到 HLA-G 表达,提示染色体的异常可能影响了这部分胚胎的植入。同时我们还观察到对于第三天 8 细胞 III 级胚胎其囊胚形成率、HLA-G 水平与第三天非 8 细胞优质胚胎相比差异并无统计学意义,显示其亦具有较好的发育潜能,8 细胞优胚的囊胚形成率、HLA-G 含量与其他各组差异有统计学意义,提示我们在今后的胚胎形态学评分中应以胚胎的发育速度和卵裂球的均一性为主要评分依据。即往的文献报道大多为检测第三天胚胎上清液 HLA-G 表达水平,本研究中 168 枚可用囊胚培养上清液 HLA-G 均值显著高于第三天优质胚胎。证实 HLA-G 随着胚胎的不断分化而升高,可作为胚胎发育潜能的独立预测指标。

本研究的局限在于仅纳入 ≤ 37 岁、卵巢功能正常患者且检测例数有限,对于卵巢低反应或高龄尤其是 ≥ 40 岁患者,由于卵子的数量和质量下降,胚胎的发育潜能有限形成囊胚的几率也随之降低^[16],进行囊胚培养失败的几率升高而导致移植周期取消^[17],给患者造成较大的经济和心理上的压力,检测 D3 胚胎培养液 HLA-G 水平也许更有利于选择有发育潜能的胚胎移植。本研究结果真正应用于临床还需要更多的数据和扩大检测范围来证实。同时由于 ELISA 方法的局限性,培养液中杂质的干扰及检测的特异度、敏感度都会影响到检测值的真实性,而且检测尚未具备上机自动化操作,因此对于移植前 HLA-G 水平的检测仅限于冷冻胚胎移植周期而不适用于新鲜胚胎移植周期。

综上所述胚胎形态学评分结合 HLA-G 值可较好预测胚胎发育潜能,改善临床结局,为实施单胚胎移植策略提供客观依据。相较于其他侵入性检测方法而言,不仅能避免对胚胎的损害,同时也为评价早期胚胎的发育潜能提供客观依据。虽然在检测的时间点、检测标准以及灵敏度上仍然存在不少的争议,但不可否认利用 HLA-G 作为生物学标记预测早期胚胎发育潜能仍具有巨大的应用前景。

参考文献:

- [1] SJÖBLOM P, MENEZES J, CUMMINS L, et al. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics[J]. *Fertility and Sterility*, 2006, 86(4): 848-861.
- [2] ELLIS S A, SARGENT I L, REDMAN C W, et al. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line[J]. *Immunology*, 1986, 59(4): 595-601.
- [3] 林帝金, 刘纯岳, 方俊粤, 等. 乳腺肿瘤患者外周血中 T 淋巴细胞表面活化分子和 Tregs 的表达研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(5):31-34,37.
LIN Dijin, LIU Chunyue, FANG Junyue, et al. Expression of T lymphocyte surface activating molecules and tregs in peripheral blood of patients with breast neoplasia[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2018, 33(5):31-34,37.
- [4] JURISICOVA A, CASPER R F, MACCLUSKY N J, et al. HLA-G expression during preimplantation human embryo development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(1): 161-165.
- [5] 阳艳, 章汉旺, 魏玉兰, 等. 第 3 天移植的胚胎培养液 sHLA-G 表达与妊娠率和种植率的关系[J]. *中国妇幼保健* 2008, 23(4): 510-512.
YANG Yan, ZHANG Hanwang, WEI Yulan, et al. Relationship between sHLA - G expression of culture media and pregnancy or implantation rates from day 3 embryo transfer[J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2008, 23(4): 510-512.
- [6] MOSAFERI E, MAJIDI J, MOHAMMADIAN M, et al. HLA-G expression pattern: reliable assessment for pregnancy outcome prediction[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 3(2): 443-446.
- [7] GARDNER D K, LANE M, STEVENS J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. *Fertility and Sterility*, 2000, 73(6):1155-1158.
- [8] 樊桂玲, 王莉, 王春艳, 等. 胚胎培养液中 sHLA-G 的表达及其对 IVF-ET 妊娠结局的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(28):4629-4631.
FAN Guiling, WANG Li, WANG Chunyan, et al. Expression of sHLA-G in embryo culture medium and its impact on pregnancy outcome of IVF-ET[J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2014, 29(28):4629-4631.
- [9] 郝天羽, 崔永魁, 刘晓雁, 等. 卵泡液和卵裂期胚胎培养液可溶性人类白细胞抗原 G(sHLA-G) 的表达与 IVF-ET 结局的相关性研究[J]. *生殖与避孕*, 2013, 33(6):387-393.
HAO Tianyu, CUI Yongkui, LIU Xiaoyan, et al. Relationship between the expression of sHLA-G in follicular fluid and embryo culture fluid and the IVF-ET outcome[J]. *Journal of Reproduction and Contraception*, 2013, 33(6):387-393.

(下转第 186 页)