

Outlook of Biomarkers for Non-invasive Assessment of Embryo Viability in Assisted Reproduction

Xuezhen Huang Shunchang Liu

The Fifth Clinical College of Hubei University of Medicine, Suizhou, Hubei, 441300, China

Abstract

A key step in assisted reproduction is to evaluate embryo viability to determine the embryo that is most likely to lead to pregnancy. The currently used embryo assessment systems are mainly based on morphology and cleavage rate. Although these systems have played a key role in improving implantation and pregnancy rates, as well as reducing multiple pregnancies, their accuracy is still insufficient, the limitations of morphology based strategies have promoted research on assistive techniques for non-invasive embryo viability assessment in assisted reproduction. The paper explores the measurement of glucose, pyruvate, or amino acid levels in embryo culture medium, as well as the evaluation of embryo oxygen consumption and its relationship with embryo viability. With the increasing number of global ART cycles, improving the ability to quickly and non-invasive identify the best embryos for transplantation has become an increasingly important goal in reproductive medicine.

Keywords

assisted reproductive technology; in vitro fertilization; non-invasive embryo viability assessment

在辅助生殖中无创评估胚胎活力的生物标志物的展望

黄学珍 刘顺畅

湖北医药学院第五临床学院, 中国·湖北 随州 441300

摘要

辅助生殖的一个关键步骤是评估胚胎活力, 以确定最有可能导致怀孕的胚胎。目前使用的胚胎评估系统主要基于形态和卵裂率, 虽然这些系统在提高着床率和妊娠率以及减少多胎妊娠方面发挥了关键作用, 但它们的精度仍然不足, 基于形态学策略的局限性促进了对辅助生殖中无创胚胎活力评估的辅助技术的研究。论文探讨胚胎培养基中葡萄糖、丙酮酸或氨基酸水平的测量, 胚胎耗氧量的评估与胚胎活力的关系。随着全球ART周期数量的增加, 提高快速和无创地识别最佳胚胎用于移植的能力成为生殖医学日益重要的目标。

关键词

辅助生殖技术; 体外受精; 无创胚胎活力评估

1 引言

不孕症是一种低生育力状态, 指1对配偶未采取避孕措施, 有规律性生活至少12个月未能获得临床妊娠^[1]。在为不孕夫妇提供的治疗方式中, 利用辅助生殖技术(Assisted Reproductive Technology, ART)的治疗方式的成功率最高, ART程序包括从女性卵巢中取出卵母细胞, 在实验室进行体外受精, 以及将所得胚胎返回女性体内或捐赠给另一名女性, 超过99%的ART手术涉及将所得胚胎通过子宫移植到女性子宫中, 称为体外受精—胚胎移植(In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, IVF-ET)^[2]。胚胎的植入前阶段从受精开始。然后胚胎经历卵裂分裂, 达到二细胞、四细胞和八细胞阶段, 并成为桑葚胚, 其中包含10~30个

细胞。桑葚胚阶段是形成称为囊胚腔的充满液体的腔之前的最后阶段, 此时胚胎被称为早期囊胚。胚胎到达囊胚阶段后不久, 其全能细胞将开始分化成两种不同的细胞类型。第一个是内部细胞团, 它将作为胚胎继续发育。剩余的细胞将成为滋养外胚层, 最终发育成胎盘^[3]。在植入前胚胎发育的这些关键阶段, 胚胎的代谢需求发生巨大变化。适当的代谢周转对于植入前胚胎保持存活和形成最佳的妊娠潜能表现至关重要。植入前胚胎发育的一个基本机制是从羧酸到葡萄糖代谢的转换, 是胚胎代谢调节最典型的现象之一, 在发育的早期阶段, 以羧酸为基础的代谢占主导地位, 当时丙酮酸和乳酸是胚胎的主要能量来源, 而葡萄糖的摄取很少^[4]。随着发育的进展, 从受精卵阶段到紧凑期, 葡萄糖摄取量稳步增加, 并在囊胚期开始以葡萄糖代谢为主^[5]。这种晚期植入前胚胎葡萄糖消耗量的增加已经在许多物种中观察到, 包括小鼠、大鼠、人类、牛、羊和猪的胚胎, 植入前发育遵循一系列有组织的关键事件, 并要求在正确的时间满足胚胎的新陈

【作者简介】黄学珍(1997-), 女, 中国湖北襄阳人, 本科, 初级检验师, 从事生物标志物研究。

代谢需求,当胚胎沿着生殖道移动时,这些不断变化的营养需求反映在体内环境的组成上,胚胎在压缩前阶段遇到的输卵管液,含有相对较高水平的丙酮酸和乳酸,以及较低水平的葡萄糖,而子宫液中则相反^[6]。对最佳胚胎发育也至关重要的还有氨基酸,它具有广泛的功能,包括蛋白质合成、新陈代谢、螯合、pH调节,并作为能量底物^[7]。

2 丙酮酸与胚胎活力

卵母细胞和植入前胚胎具有独特且严格调节的代谢需求,这些需求对胚胎活力和诊断应用具有影响。就相关底物而言,卵母细胞和胚胎都能够利用丙酮酸、乳酸和葡萄糖等营养物质。在卵母细胞和早期卵裂阶段胚胎中,丙酮酸比葡萄糖更可取,但随着成熟的临近,囊胚阶段糖酵解变得更加依赖^[8]。糖酵解是一个六碳葡萄糖分子转化为两个三碳丙酮酸分子的过程。该过程的净产物是两分子ATP和两分子烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。糖酵解是一种古老的代谢途径,存在于大多数原核生物和真核生物中。它是厌氧菌和需氧菌葡萄糖分解的第一阶段,因为它不需要氧气。在真核生物中,糖酵解发生在细胞质中,并开始于ATP中的磷酸基团用于从葡萄糖生成葡萄糖-6-磷酸,然后这种糖被异构化,生成6-磷酸果糖。随后使用另一种ATP生成果糖1,6-二磷酸。然后通过果糖1,6-磷酸二酯的裂解产生两种糖:磷酸二羟丙酮和3-磷酸甘油醛。在过去的几十年里,基础科学家为我们理解许多物种早期发育的关键时期的代谢动力学奠定了基础,这些发现随后被转化为辅助生殖技术(ART)实验室的临床应用,并使人类胚胎高效培养至囊胚阶段,早期植入前(卵裂状态)胚胎主要使用三羧酸^[9]循环,其中主要底物是乳酸和丙酮酸,并且葡萄糖的使用最少。因此,培养物中胚胎对丙酮酸的吸收已被研究为胚胎活力和生长潜力的可能标志。Loutradis D等人^[10]报道了发育成囊胚阶段的人类胚胎吸收更高的丙酮酸。在之前的一项研究中,Gardner等人^[11]发现,与未能发育到囊胚阶段的胚胎相比,继续形成囊胚的人类胚胎在第4天的丙酮酸摄入量显著更高,这与最初的报告一致。

3 葡萄糖与胚胎活力

在从桑葚胚阶段到囊胚阶段的过渡阶段,葡萄糖的利用率显著增加,似乎反映了胚胎的发育潜力和活力,与葡萄糖摄取较低的牛相比,葡萄糖摄取较高的牛胚胎发育得更成功,与未能发育的胚胎相比,足月妊娠的第4天小鼠胚胎在培养物中的葡萄糖摄入量显得更高^[12]。最近,Gardner等人^[13]使用先进的培养基报道,在形成囊胚的胚胎中,第4天人类胚胎的葡萄糖消耗较高,并且与形态等级相关,这与动物模型中的发现一致。根据最初的动物研究和最新的人类胚胎报告,第4天或第5天人类胚胎的葡萄糖摄取很可能与生存能力一致相关。上述研究一致使用微荧光酶法测定丙酮酸、乳酸和葡萄糖。尽管准确,但该方法在技术上存在困难,需要大量的专业知识和时间投入,因此不适合临床应用。然而,

Urbanski等人最近的一项原理验证研究^[14]报道了微流体系统的开发,该系统允许同时测量小体积小鼠胚胎培养基中的丙酮酸、乳酸和葡萄糖。该系统对代谢物测量的临床适用性作出了重大改进。

4 氨基酸与胚胎活力

Houghton等人^[15]使用高效液相色谱(HPLC)来测定人类胚胎在植入前发育的不同阶段分泌和吸收的氨基酸,并将他们的发现与胚胎发育相关联,他们发现,第2天和第3天谷氨酰胺、精氨酸和蛋氨酸的摄入量降低,丙氨酸和天冬酰胺的释放量降低胚胎与囊胚阶段的发育相关,而在8细胞和桑葚胚阶段胚胎中,囊胚发育与丝氨酸的摄取较低以及丙氨酸和甘氨酸的释放有关。在所有检查的阶段中,较低的氨基酸周转率(消耗和出现的总和)与更好的发育相关,这与“安静胚胎”假说一致^[16]。胚胎的氨基酸代谢也被评估为活力预测因子。精氨酸、蛋氨酸、丝氨酸和谷氨酰胺摄入的减少与囊胚发育相关,丙氨酸和天冬酰胺产生的减少也是如此。最近,Brison等人^[17]测定了单独培养的人类胚胎的培养基中的氨基酸浓度,并确定了与临床妊娠和活产相关的氨基酸。在本研究中,在第2天转移之前,将受精卵在4μL滴含有氨基酸生理混合物的预平衡培养基中单独培养24小时,并通过HPLC分析用过的培养基,他们发现培养基中较低的甘氨酸和亮氨酸以及较高的天冬酰胺水平与临床妊娠和活产相关,丙氨酸和天冬酰胺产量的减少也与囊胚发育有关,第2天天冬酰胺摄入量的增加以及甘氨酸和亮氨酸摄入量的减少都与妊娠和活产有关,第三天谷氨酰胺摄入量的增加也与怀孕和活产有关。他们还发现,具有较高活力的胚胎比那些停滞的胚胎具有更低或更安静的氨基酸代谢,这与Houghton等人之前的报告一致^[15]。

5 氧浓度与胚胎活力

胚胎植入前胚胎的发育依赖于生殖道环境中存在的营养物质。虽然在讨论植入前胚胎营养时经常考虑碳水化合物、氨基酸、脂质和微量营养素,但环境氧气经常被忽视。虽然氧气通常不被认为是一种营养物质,但它是体外培养环境的重要组成部分,也是细胞生理学的关键调节剂。氧气是维持氧化代谢所必需的,但当氧气变得有限时,细胞会产生由称为“缺氧诱导因子”的转录因子家族驱动的生理反应,这些转录因子会促进多种氧敏感基因的表达,正是这种缺氧反应不仅导致了糖酵解代谢的转变,而且还导致了大量其他细胞反应^[18]。近年来,关于哪种环境氧张力更适合植入前胚胎的培养,一直存在很多争论。本综述将评估这个问题,并强调使用人类胚胎干细胞的研究如何帮助我们理解为什么在生理氧张力下培养可能有利于通过临床体外受精产生的胚胎的发育。在一项随机对照试验中,配子和胚胎在5%或20%的氧气下培养并在第2~3天或第5天移植,活产着床率(活产数除以移植的胚胎数)或活产率(至少有一名活产婴儿的患者人数与取出卵母细胞的患者人数相比)被测量

为主要终点,当胚胎在早期卵裂阶段移植时,氧张力对这些参数没有影响。然而,当胚胎在缺氧条件下培养并在囊胚期移植时,与在20%氧气下培养的胚胎相比,活产着床率和临床妊娠率显著增加。当第2~3天和第5天转移的数据合并时,在5%氧气下培养显示活产着床率和活产率显著提高^[19]。大约在囊胚形成时,氧消耗量以及碳的吸收和结合会大幅增加,使用葡萄糖并将其转化为乳酸的能力可能使囊胚能够在植入时不同程度发生的缺氧中存活下来。同样,最近的数据表明,在移植前第2天或第3天之前,在5%或20%氧气下培养对每个周期的活产率没有影响,但缺氧培养确实会导致更高质量的胚胎在移植后进行冷冻保存。在含氧量为5%的组中,质量良好的胚胎数量显著增加(45.8% vs 20%组为30.9%,校正OR[95%CI]=1.9 [1.6-2.4]),这并没有导致每个周期的活产率更高,但在新鲜移植后,可以冷冻保存更多高质量的备用胚胎(46.1 vs 29.7%,校正OR [95% CI]=2.0 [1.7-2.5]),经过5~7年的随访期,其中5%氧气组的82.4%的冷冻保存胚胎和20%氧气组的85.4%的胚胎解冻,低氧组研究周期至少产生一次活产的患者百分比显著更高(校正OR [95% CI]=1.5 [1.01-2.2]),在124例来自新鲜胚胎移植的活产单胎和45例来自冷冻保存胚胎移植的活产单胎中,在校正混杂因素后,两个氧气组的出生体重相似^[20]。

6 结语

胚胎移植前当代ART的一个关键方面是评估体外生长的胚胎,以确定最有可能成功妊娠的胚胎。目前,这种评估主要基于形态学进行。尽管目前使用的胚胎评估策略在提高妊娠率和减少多胎妊娠方面发挥了作用,但其准确性仍远未理想。事实上,与ART相关的两个关键问题至少部分源于我们无法准确评估胚胎活力:超过8/10的移植胚胎未能植入,超过2/3的ART周期未能怀孕^[21],给不孕不育夫妇带来巨大的身体、心理和经济负担。因此,寻找新兴的非侵入性方法,对体外生成的胚胎提供快速可靠的评估就显得至关重要。

参考文献

[1] 刘勇星,张洁.基于1980—2017年中国不孕症患病率研究的生育惯例探讨[J].医学与社会,2022,35(1):56-62.

[2] Graham ME, Jelin A, Hoon AH Jr, et al. Assisted reproductive technology: Short- and long-term outcomes[J]. Dev Med Child Neurol, 2023,65(1):38-49.

[3] Riley JK, Moley KH. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos[J]. Reproduction, 2006,131:823-835.

[4] Palini S, De Stefani S, Scala V, et al. Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation embryo development[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011,1221:54-60.

[5] Xu R, Li C, Liu X, et al. Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos[J]. Protein Cell, 2021,12(1):7-28.

[6] Zhang X, Cao Q, Rajachandran S, et al. Dissecting mammalian reproduction with spatial transcriptomics[J]. Hum Reprod Update, 2023,29(6):794-810.

[7] Van Winkle LJ. Amino Acid Transport and Metabolism Regulate Early Embryo Development: Species Differences, Clinical Significance, and Evolutionary Implications[J]. Cells, 2021,10(11):3154.

[8] Leese HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on[J]. Reproduction, 2012,143:417-427.

[9] Scott R 3rd, Zhang M, Seli E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: implications for assisted reproduction[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2018,30(3):163-170.

[10] Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, et al. Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000,900:325-335.

[11] Gardner D K, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. Fertil Steril, 2000,73(6):1155-1158.

[12] Leese HJ. History of oocyte and embryo metabolism[J]. Reprod Fertil Dev, 2015,27(4):567-571.

[13] Gardner DK, Harvey AJ. Blastocyst metabolism[J]. Reprod Fertil Dev, 2015,27(4):638-654.

[14] Urbanski J P, Johnson M T, Craig D D, et al. Anal. Chem, 200880: 6500-6507.

[15] Houghton F D, Hawkhead J A, Humpherson P G, et al. Hum. Reprod, 2002(17):999-1005.

[16] Leese H J, Baumann C G, Brison D R, et al. Mol. Hum. Reprod, 2008(14):667-672.

[17] Brison D R, Houghton F D, Falconer D, et al. Hum. Reprod, 2004(19):2319-2324.

[18] Houghton FD. HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH: Hypoxic regulation of preimplantation embryos: lessons from human embryonic stem cells[J]. Reproduction, 2021,161(1):F41-F51.

[19] Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program[J]. Hum Reprod, 2009,24(2):300-307.

[20] Van Montfoort APA, Arts EGJM, Wijnandts L, et al. Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle[J]. Hum Reprod Open, 2020(1):hoz036.

[21] 丁凯,赵纯,凌秀凤,等.冻融胚胎移植临床妊娠的影响因素分析及列线图预测模型构建[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2023,42(5):353-360+386.