

抗着丝点抗体阳性患者体外受精结局分析

田雨晴^{1,2}, 周易尔², 范宇航³, 陈素峰⁴, 郭晓燕², 俞亦奇², 吴香丽², 徐维海², 舒静^{2*}

- 锦州医科大学研究生院, 辽宁 锦州 121001
- 浙江省人民医院生殖内分泌科, 浙江 杭州 310014
- 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053
- 浙江省人民医院检验中心, 浙江 杭州 310014

[摘要] **目的:**通过观察抗着丝点抗体(ACA)阳性患者体外受精-胚胎移植和自然试孕结局,探讨此类患者的生育策略。**方法:**采用病例对照研究回顾性分析2016年6月至2023年6月在浙江省人民医院接受体外受精-胚胎移植治疗且有抗核抗体(ANA)谱检查结果的3955例患者的临床资料。根据ACA结果将所纳入患者分为ACA阳性组和ACA阴性组。采用倾向评分匹配方法对两组进行1:3配对,分别比较两组体外受精的胚胎结局;并采用自身对照分析不同授精方法和是否应用免疫抑制剂对结局的影响;对ACA阳性患者体外受精失败后的自然试孕和疾病进展进行随访。**结果:**ACA阳性患者34例,占总病例数的0.86%,占ANA阳性体外受精患者数的2.51%。无论是接受常规体外受精(c-IVF)还是卵胞质内单精子注射(ICSI)的患者,ACA阳性组卵母细胞成熟度和受精情况均与ACA阴性组有明显差异(均 $P<0.01$),且ACA阳性组授精后第三日(D3)次优胚数和D3优胚数均减少(均 $P<0.05$)。5例ACA阳性患者自身ICSI周期相比c-IVF周期双原核(2PN)率未提高($P>0.05$),D3优胚数和D3次优胚数减少(均 $P<0.05$)。12例ACA阳性患者经过免疫抑制剂治疗1~2个月后再行c-IVF/ICSI,用药前后获卵和受精情况均未改变(均 $P>0.05$),2PN胚胎卵裂率改善($P<0.05$)。ACA阳性组与ACA阴性组移植胚胎数相近,但ACA阳性组胚胎着床率、临床妊娠率显著低于ACA阴性组(均 $P<0.05$),流产率差异无统计学意义($P>0.05$)。27例ACA阳性患者体外受精失败后尝试自然试孕或人工授精,共获临床妊娠7例。**结论:**血清ACA阳性会干扰卵母细胞的成熟和正常受精过程,使用ICSI和免疫抑制剂不能改善受精结局,但ACA阳性患者有可能获得自然妊娠。



收稿日期(Received):2023-11-30 接受日期(Accepted):2024-01-24 网络预发表日期(Online):2024-05-27

基金项目(Funding):浙江省医药卫生科技计划(2022RC108)

第一作者(First author):田雨晴,硕士研究生,主要从事卵母细胞异常受精机制研究;E-mail:yuqing.tian@foxmail.com; <https://orcid.org/0009-0004-1828-4715>

通信作者(Corresponding author):舒静,主任医师,硕士生导师,主要从事不孕不育相关研究;E-mail:shujing@hmc.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0003-0398-2188>

*现在浙江大学医学院附属第一医院生殖医学中心工作

[关键词] 抗着丝点抗体;体外受精-胚胎移植;多原核受精;卵母细胞成熟度;胚胎发育结局;妊娠结局

[中图分类号] R711.6 [文献标志码] A

Pregnancy outcomes of patients with positive anticentromere antibodies receiving *in vitro* fertilization-embryo transfer

TIAN Yuqing^{1,2}, ZHOU Yi'er², FAN Yuhang³, CHEN Sufeng⁴, GUO Xiaoyan², YU Yiqi², WU Xiangli², XU Weihai², SHU Jing^{2*} (1. Postgraduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; 2. Department of Reproductive Endocrinology, Zhejiang Provincial People's Hospital/Affiliated People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China; 3. The Second Clinical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 4. Clinical Laboratory Center, Zhejiang Provincial People's Hospital/Affiliated People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

*Now works in the Department of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine.

Corresponding author: SHU Jing, E-mail: shujing@hmc.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0003-0398-2188>

[Abstract] **Objective:** To analyze the pregnancy outcomes in patients with positive anti-centromere antibodies (ACA) receiving *in vitro* fertilization (IVF)-embryo transfer (ET) and natural conception. **Methods:** A case-control study was used to retrospectively analyze the clinical data of 3955 patients who received IVF-ET therapy and had the results of antinuclear antibody (ANA) spectrum at Zhejiang Provincial People's Hospital from June 2016 to June 2023. Patients with positive ACA and negative ACA were matched at a ratio of 1:3 using propensity score matching. Embryo outcomes of IVF were compared between the two groups, and the impact of different fertilization methods and the use of immunosuppressants on pregnancy outcomes were analyzed using self-matching. The natural conception and disease progress were followed up for ACA-positive patients after IVF failure. **Results:** The ACA-positive patients accounted for 0.86% of all IVF patients (34/3955) and 2.51% of total ANA-positive IVF patients. Regardless of whether patients received conventional IVF (c-IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI), the ACA-positive group exhibited significant differences in oocyte maturity and fertilization compared to the ACA-negative group (both $P < 0.01$). Moreover, the ACA-positive group had a decreased number of D3 suboptimal embryos and D3 optimal embryos (both $P < 0.05$). In 5 cases of ACA-positive patients who underwent ICSI cycles, the two pronucleus (2PN) rate did not increase compared to c-IVF cycles ($P > 0.05$), and there was a decrease in the number of D3 high-quality embryos and D3 suboptimal embryos (both $P < 0.05$). After 1–2 months of immunosuppressant treatment, 12 ACA-positive patients underwent c-IVF/ICSI again, and there were no changes in egg retrieval and fertilization before and after medication (both $P > 0.05$), but there was an improvement in the 2PN embryo cleavage rate ($P < 0.05$). The number of embryos transferred was similar between the ACA-positive and negative groups, but the ACA-positive group had significantly lower embryo implantation rate and

clinical pregnancy rate compared to the ACA-negative group (both $P < 0.05$), with no significant differences in the miscarriage rate between the two groups ($P > 0.05$). Twenty-seven ACA-positive patients attempted natural conception or artificial insemination after IVF failure, resulting in a total of 7 cases of clinical pregnancy. **Conclusions:** Serum ACA positivity may disrupt oocyte maturation and normal fertilization processes, with no improvement observed with ICSI and immunosuppressant use. However, ACA-positive patients may still achieve natural pregnancy.

[**Key words**] Anticentromere antibodies; *In vitro* fertilization-embryo transfer; Multiple pronucleus fertilization; Oocyte maturity; Embryonic development; Pregnancy outcome

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(3): 342-350.]

[**缩略语**] 抗核抗体(antinuclear antibody, ANA); 抗着丝点抗体(anticentromere antibody, ACA); 抗着丝点蛋白(centromere protein, CENP); 免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG); 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG); 常规体外受精(conventional *in vitro* fertilization, c-IVF); 卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI); 第二次减数分裂中期(metaphase II of meiosis, MII); 原核(pronucleus, PN); 倾向评分匹配(propensity score matching, PSM); 抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH); 第一次减数分裂中期(metaphase I of meiosis, MI)

免疫相关性不孕是生殖临床研究的热点,其致病机制和治疗方案饱受争议。1987年,研究发现患者卵泡液中存在 ANA 等自身抗体^[1],之后越来越多的研究发现 ANA 与不孕不育发病和体外受精失败有关^[2-9]。有学者认为女性 ANA 阳性会导致卵子质量降低、体外受精胚胎发育受损、优质胚胎数较少、临床妊娠率降低^[10-12];也有学者认为 ANA 不影响胚胎质量^[13-14]。ANA 类型众多,不同亚型可能对体外受精影响不同。ACA 是 ANA 的一种,2012年 Shirota 等^[15]首先发现其对受精不利,但未深入研究。

ACA 是一类以 CENP 为抗原的自身抗体,存在于血液、胸腔积液、滑膜液、卵泡液等体液中^[5, 16],与 CREST 综合征、干燥综合征、原发性胆汁性肝硬化等自身免疫性疾病相关^[17-22]。着丝点是细胞分裂时纺锤体微管的染色体附着位点,在有丝分裂和减数分裂过程中保护和维持姐妹染色单体的聚合^[23]。CENP 主要由 CENP-A、CENP-B 和 CENP-C 这三种蛋白组成。其中,抗 CENP-B 抗体在 ACA 中最常见,几乎出现在所有抗 ACA 抗体阳性的患者中^[24]。CENP-B 通过招募 CENP-A 和

稳定 CENP-C 发挥作用^[25]。CENP-B 缺乏或功能异常将导致着丝点新生障碍,表现为染色体主缢痕区形态及功能改变、染色体与纺锤体微管连接数减少甚至无法正常连接,增加染色体不稳定性,染色体错误分离率显著升高^[26]。有关 ACA 对人类配子减数分裂,以及对胚胎甚至整个生殖健康影响的研究目前仍十分匮乏。

本研究收集了 2016 年 6 月至 2023 年 6 月在浙江省人民医院接受体外受精-胚胎移植患者的资料,发现其中 ACA 阳性率虽然不高,但严重影响辅助生殖结局,因此对 ACA 阳性患者的体外受精结局和自然受孕随访结局进行回顾性分析,以总结此类患者的不孕特征,希望为改进诊治提供新思路。

1 对象与方法

1.1 对象

回顾性收集 2016 年 6 月至 2023 年 6 月在浙江省人民医院接受体外受精-胚胎移植治疗且有 ANA 谱检查结果的 3955 例患者的临床资料,排除年龄 40 岁以上及有恶性肿瘤或已知的遗传性不孕

患者。根据 ANA 谱检查结果将研究对象分为 ACA 阳性组和 ACA 阴性组。ACA 阳性患者 34 例,占 ACA 体外受精患者总数的 0.86%(34/3955),占 ANA 阳性体外受精患者数的 2.51%(34/1356),且 34 例抗 CENP-B 抗体均阳性。研究通过浙江省人民医院伦理委员会审查(浙人医伦审 2023 研第 054 号)。

1.2 主要试剂和药物

ANA 谱 IgG 检测试剂盒为德国 Euroimmun 公司产品; Vitrolife G-系列胚胎培养液为瑞典 Vitrolife 生物技术公司产品。促排卵药物尿源性人绝经期促性腺素(商品名丽申宝)为丽珠集团丽珠制药厂产品。重组促卵泡激素:注射用重组人促卵泡激素(商品名果纳芬,意大利 Merck Europe B.V/Merck Serono Europe Ltd 公司;商品名金赛恒,长春金赛药业股份有限公司),重组促卵泡激素 β 注射液(商品名普丽康,荷兰 Merck Sharp & Dohme BV 公司)。免疫用药:羟氯喹(商品名酚乐,上海上药中西制药有限公司;商品名赛能,法国 Sanofi-Aventis 公司);环孢素(商品名新赛斯平,杭州中美华东制药有限公司);泼尼松(商品名强的松,山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司)。

1.3 间接免疫荧光测定和欧蒙免疫印迹法检测 ACA

采用 ANA 谱 IgG 检测试剂盒,以 HEP-2 和猴肝组织底物为抗原,在血清稀释比不低于 1:32 的情况下,细胞核中出现明显的斑点图案定义为 ANA 阳性。将血清标本分别以 1:100、1:320、1:1000 的比例进行稀释,得到 ACA 最终的滴度。采用欧蒙免疫印迹法对血清和卵泡液中的 ACA 靶抗原 CENP-B 进行检测。两种检测方法均呈阳性的患者纳入 ACA 阳性组。

1.4 体外受精助孕过程

促排卵方案包括激动剂长方案、拮抗剂方案、高孕激素状态下促排卵方案、氯米芬联合促性腺激素促排卵方案等^[27]。促性腺激素的药物品种和剂量根据患者对卵巢刺激的反应而定。当主导卵泡有一个直径为 18 mm 或两个直径为 17 mm 时,给予 hCG 或促性腺激素释放激素类似物扳机,35~38 h 后取卵,在扳机 39 h 后对卵母细胞进行授精。c-IVF 周期:在授精 16~18 h 后观察受精情况,同时对未受精的卵母细胞成熟度进行分期。ICSI 周期:在显微注射前观察卵母细胞成

熟度分期,仅对 MII 卵母细胞进行显微注射,注射 11~18 h 后进行受精检查。参考伊斯坦布尔共识^[28]对 2PN 胚胎情况进行分级:I 级为 7~8 个细胞对称性均匀,碎片化占 10% 以下,无多核化;II 级为 7~8 个细胞对称性均匀,碎片化占 11%~25%,或至少有 9 个细胞对称性均匀,碎片化占 26% 以下;III 级为至少 4 个细胞对称性均匀,碎片化占 50% 以下。其中 I 级、II 级为优胚,III 级胚胎为次优胚。胚胎发育每 24 h 评估一次,直至移植日或冷冻日。

1.5 免疫抑制药物治疗

服用羟氯喹(200~400 mg/d)、泼尼松(5~10 mg/d)、环孢素(2 次/d,每次 50~75 mg)中的任意 1~3 种。

1.6 随访方法

胚胎移植 9 d 后检测患者血清 hCG。若结果呈阳性,患者在 1~2 周后接受超声检查确定是否临床妊娠,并随访至分娩或妊娠丢失。对 hCG 阴性患者亦进行电话长期随访,询问自然试孕、疾病进展和治疗情况。

1.7 观察指标

取卵日观察指标:获卵率(%)=获卵数/穿刺卵泡数 $\times 100\%$,卵母细胞成熟度(%)=各期卵母细胞数/获卵数 $\times 100\%$ 。异常卵指卵母细胞透明带异常、极体异常、胞质异常、卵周间隙过大、卵母细胞形态异常。

授精后第一日(D1)观察指标:2PN 判定为正常受精,0PN 且后续未卵裂判定为未受精,1PN 和 ≥ 3 PN 判定为异常受精。c-IVF 周期正常受精率(%)=2PN 卵数/所有卵母细胞数 $\times 100\%$,0PN 率(%)=0PN 卵数/所有卵母细胞数 $\times 100\%$,1PN 率(%)=1PN 卵数/所有卵母细胞数 $\times 100\%$,多 PN 率(%)=多 PN 卵数/所有卵母细胞数 $\times 100\%$;ICSI 周期正常受精率(%)=2PN 卵数/MII 卵母细胞数 $\times 100\%$,0PN 率(%)=0PN 卵数/MII 卵母细胞数 $\times 100\%$,1PN 率(%)=1PN 卵数/MII 卵母细胞数 $\times 100\%$,多 PN 率(%)=多 PN 卵数/MII 卵母细胞数 $\times 100\%$ 。

授精后第二日(D2)观察指标:正常卵裂胚胎是指在 D2 2PN 来源的卵裂胚胎。正常卵裂率(%)=2PN 卵裂胚胎数/2PN 数 $\times 100\%$ 。

授精后第三日(D3)观察指标:卵裂球数、卵裂球的均一度及胚胎碎片数。由于囊胚培养在

本院为选择性治疗,因此未进行比较。

1.8 统计学方法

采用 R 4.1.0 软件包进行 PSM,将患者的年龄、AMH、不孕因素、体重指数作为预测变量,采用最近邻匹配方法计算各研究对象的倾向评分,选取 ANA 阴性患者进行 1:3 匹配,卡钳值设为 0.02。应用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;符合非正态分布的计量资料用中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;计数资料以例数(百分比)[$n(\%)$]或率(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本特征

ACA 阳性患者首周期为 c-IVF 授精方式 18 例,

PSM 匹配阴性组 54 例;ACA 阳性患者首周期为 ICSI 授精方式 16 例,PSM 匹配阴性组 48 例。PSM 后同种授精方式下的 ACA 阳性组和 ACA 阴性组之间年龄、AMH、体重指数、不孕类型、不孕因素差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 1。提示 ACA 阳性组和阴性组之间具有可比性。

2.2 ACA 阳性对胚胎结局的影响

无论是接受 c-IVF 还是接受 ICSI 的患者,ACA 阳性组卵母细胞成熟度和受精情况均与 ACA 阴性组有明显差异(均 $P<0.01$),且 ACA 阳性组 D3 次优胚数和 D3 优胚数减少(均 $P<0.01$),见表 2、3。

有 5 例 ACA 阳性患者首周期为 c-IVF 授精,后续周期改为 ICSI 授精,其中 1 例连续接受 2 周期 c-IVF 治疗后进行 ICSI 周期。更改受精方案后 ACA 阳性患者获卵、受精差异无统计学意义,但 D3 优胚、D3 次优胚数减少($P<0.05$),见表 4。

表 1 倾向评分匹配后研究对象基本特征

Table 1 Fundamental attributes of the subjects prior to and following propensity score matching

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	AMH (ng/mL)	体重指数 (kg/m ²)	继发性不 孕	不孕因素				
						女 方	男 方	双 方	原因不明	
c-IVF 周期	ACA 阳性组	18	32.6±3.6	4.4±3.3	22.5±3.8	10(55.6)	18(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	ACA 阴性组	54	32.3±3.5	6.5±5.6	21.6±2.5	35(64.8)	41(75.9)	13(24.1)	0(0.0)	0(0.0)
ICSI 周期	ACA 阳性组	16	34.8±2.7	2.1(1.5, 3.4)	20.9±1.7	8(50.0)	4(25.0)	7(43.8)	5(31.3)	0(0.0)
	ACA 阴性组	48	33.3±4.1	3.7(2.0, 6.8)	21.0±1.9	27(56.3)	18(37.5)	11(22.9)	18(37.5)	1(2.1)

AMH:抗米勒管激素;c-IVF:常规体外受精;ACA:抗着丝点抗体;ICSI:卵胞质内单精子注射。

表 2 接受常规体外受精的 ACA 阳性与阴性患者首周期胚胎结局比较

Table 2 The comparison of the embryo outcomes between the two groups in their initial conventional *in vitro* fertilization cycle

组别	<i>n</i>	获卵情况			受精情况			
		获卵数	获卵率	未受精	OPN&2PB	1PN&2PB	2PN&2PB	≥3PN
ACA 阳性组	18	9.3±6.4	77.3(167/216)	10.8(18/167)	5.4(9/167)	7.2(12/167)	45.5(76/167)	31.1(52/167)
ACA 阴性组	54	10.1±5.7	76.8(533/694)	15.6(83/533)	6.9(37/533)	2.8(15/533)	66.8(356/533)	7.9(42/533)
<i>t</i> 或 χ^2 值	—	—0.53	0.24	2.37	0.50	6.55	24.38	59.17
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

组别	<i>n</i>	卵母细胞成熟度*				胚胎发育		
		异常卵	GV 卵	MI 卵	MII 卵	2PN 卵裂率	D3 优胚数	D3 次优胚数
ACA 阳性组	18	9.6(16/167)	0.6(1/167)	0.6(1/167)	89.2(149/167)	94.7(72/76)	1.0(0.0, 2.0)	3.0(1.0, 4.0)
ACA 阴性组	54	2.3(12/533)	0.8(4/533)	3.8(20/533)	93.2(497/533)	93.5(333/356)	4.0(1.0, 7.0)	5.0(3.0, 8.0)
<i>t</i> 或 χ^2 值	—	17.79	0.04	4.35	2.89	0.15	—3.07	—3.20
<i>P</i> 值	—	<0.01	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

—:无相关数据.*系受精后第一日观察推断, MII 卵数=未受精 MII 卵数+受精卵数. ACA:抗着丝点抗体;PN:原核;PB:极体;GV:生发泡期;MI:第一次减数分裂中期;MII:第二次减数分裂中期。

表3 接受卵胞质内单精子注射的ACA阳性与阴性患者首周期胚胎结局比较

Table 3 The comparison of the embryo outcomes between the two groups in their initial intracytoplasmic sperm injection cycle [M(Q₁, Q₃)或%(n)]

组别	n	获卵情况			受精情况			
		获卵数	获卵率	未受精	0PN&2PB	1PN&2PB	2PN&2PB	≥3PN
ACA阳性组	16	7.5(5.3, 9.0)	81.1(133/164)	22.1(23/104)	7.7(8/104)	4.8(5/104)	33.7(35/104)	31.7(33/104)
ACA阴性组	84	6.0(2.8, 11.3)	75.8(360/475)	21.2(72/339)	2.1(7/339)	3.5(12/339)	71.4(242/339)	1.8(6/339)
t或χ ² 值	—	-1.10	1.95	0.04	7.70	0.35	48.36	88.98
P值	—	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01

组别	n	卵母细胞成熟度*				胚胎发育		
		异常卵	GV卵	MI卵	MII卵	2PN卵裂率	D3优胚数	D3次优胚数
ACA阳性组	16	5.3(7/133)	3.0(4/133)	13.5(18/133)	78.2(104/133)	82.9(29/35)	0.0(0.0, 2.0)	0.0(0.0, 2.0)
ACA阴性组	84	1.7(6/360)	1.7(6/360)	0.6(2/360)	94.2(339/360)	97.5(236/242)	2.0(1.0, 4.0)	3.0(1.0, 5.0)
t或χ ² 值	—	4.89	0.88	42.03	27.18	15.86	-3.38	-3.16
P值	—	<0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

—:无相关数据.*系受精当日观察得到.ACA:抗着丝点抗体;PN:原核;PB:极体;GV:生发泡期;MI:第一次减数分裂中期;MII:第二次减数分裂中期.

表4 抗着丝点抗体阳性患者c-IVF更改为ICSI方案前后胚胎结局比较

Table 4 The comparison of embryo outcomes between two insemination protocols in antientromere antibody positive patients [$\bar{x}\pm s$ 或%(n)或M(Q₁, Q₃)]

授精方式	n	获卵情况			受精情况			
		获卵数	获卵率	未受精	0PN&2PB	1PN&2PB	2PN&2PB	≥3PN
c-IVF	5	6.3±3.8	69.1(38/55)	18.4(7/38)	7.9(3/38)	2.6(1/38)	29.0(11/38)	42.1(16/38)
ICSI	5	3.8±2.2	69.2(27/39)	10.5(2/19)	15.8(3/19)	5.3(1/19)	21.1(4/19)	47.4(9/19)
t或χ ² 值	—	0.49	0.00	0.59	0.84	0.26	0.41	0.14
P值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

授精方式	n	卵母细胞成熟度*				胚胎发育		
		异常卵	GV卵	MI卵	MII卵	2PN卵裂率	D3优胚数	D3次优胚数
c-IVF	5	0.0(0/38)	0.0(0/38)	0.0(0/38)	100.0(38/38)	100.0(11/11)	0.0(0.0, 0.0)	1.0±0.7
ICSI	5	11.1(3/27)	0.0(0/27)	18.5(5/27)	70.4(19/27)	100.0(4/4)	0.0(0.0, 1.0)	0.0±0.0
t或χ ² 值	—	—	—	—	12.84	—	0.43	3.16
P值	—	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	—	<0.05	<0.05

—:无相关数据.*c-IVF周期卵母细胞成熟度系授精后第一日观察推断,ICSI周期卵母细胞成熟度系受精当日观察得到.c-IVF:常规体外受精;ICSI:卵胞质内单精子注射;PN:原核;PB:极体;GV:生发泡期;MI:第一次减数分裂中期;MII:第二次减数分裂中期.

上述结果提示,ACA阳性患者在c-IVF和ICSI周期均存在受精率较低、胚胎质量较差的情况,即使转为ICSI,多PN现象也没有明显改善。

2.3 免疫抑制剂对ACA抗体阳性患者胚胎结局的影响

共有12例ACA抗体阳性患者前次c-IVF/ICSI结束经过免疫抑制剂治疗1~2个月后再次行c-IVF/ICSI,用药前后获卵和受精结果差异无统计学意义(均 $P>0.05$),但2PN胚胎卵裂率改善($P<0.05$),见表5。可见免疫抑制剂并未使体外

受精周期明显获益。

2.4 ACA阳性对移植结局的影响

34例ACA阳性患者中21例获得了胚胎。对21例患者的移植周期进行分析(1例次鲜胚移植,29例次冻胚移植)并与PSM匹配的90例阴性组进行比较。两组间移植胚胎数和流产率差异无统计学意义(均 $P>0.05$),但ACA阳性组临床妊娠率显著低于ACA阴性组($P<0.05$),见表6。可见,ACA阳性患者在移植周期中移植胚胎数与阴性组相近,但临床妊娠率低于阴性组,着床后的妊

表5 抗着丝点抗体阳性患者应用免疫抑制剂前后重复周期的胚胎结局比较

Table 5 The embryo laboratory data of patients with positive anticentromere antibody before and after immunosuppressant treatment

免疫抑制剂 用药情况	n	获卵情况		受精情况				
		获卵数	获卵率	未受精	0PN&2PB	1PN&2PB	2PN&2PB	≥3PN
未用药周期	12	7.3±4.5	83.8(88/105)	28.4(25/88)	8.0(7/88)	1.1(1/88)	33.0(29/88)	29.5(26/88)
用药后周期	12	7.1±3.9	77.3(85/110)	28.2(24/85)	4.7(4/85)	3.5(3/85)	42.4(36/85)	21.2(18/85)
t或 χ^2 值	—	0.15	1.46	0.00	0.77	1.10	1.63	1.60
P值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

免疫抑制剂 用药情况	n	卵母细胞成熟度*				胚胎发育		
		异常卵	GV卵	MI卵	MII卵	2PN卵裂率	D3优胚数	D3次优胚数
未用药周期	12	2.3(2/88)	1.1(1/88)	5.7(5/88)	90.9(80/88)	82.8(24/29)	1.0(0.0, 2.0)	1.4±1.2
用药后周期	12	2.4(2/85)	2.4(2/85)	8.2(7/85)	87.1(74/85)	100.0(36/36)	0.5(0.0, 2.0)	0.6±1.5
t或 χ^2 值	—	0.00	0.38	0.44	0.66	6.72	-0.46	-2.34
P值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

—:无相关数据.*c-IVF周期卵母细胞成熟度系授精后第一日观察推断,ICSI周期卵母细胞成熟度系授精当日观察得到.PN:原核;PB:极体;GV:生发泡期;MI:第一次减数分裂中期;MII:第二次减数分裂中期;c-IVF:常规体外受精;ICSI:卵胞质内单精子注射.

表6 ACA阳性与阴性患者胚胎移植后妊娠结局比较

Table 6 Comparison of pregnancy outcomes after embryo transfer between two groups

组别	n	移植胚胎数	未着床	生化妊娠	临床妊娠	临床妊娠流产	活产
ACA阳性组	30	2.0(1.0, 2.0)	66.7(20/30)	3.3(1/30)	30.0(9/30)	33.3(3/9)	20.0(6/30)
ACA阴性组	90	2.0(1.0, 2.0)	26.7(24/90)	15.6(14/90)	57.8(52/90)	19.2(10/52)	46.7(42/90)
t或 χ^2 值	—	-0.25	15.50	3.07	6.95	0.91	6.67
P值	—	>0.05	<0.01	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

—:无相关数据.ACA:抗着丝点抗体.

娠丢失率并未升高。

2.5 ACA阳性患者随访结果

对34例ACA阳性患者进行随访。7例经IVF/ICSI-ET累积移植后获得临床妊娠,其中6例成功分娩,1例孕9周胚胎停育,胚胎染色体检查为9号染色体三体。4例自然试孕获临床妊娠,其中3例顺利分娩;1例孕8周自然流产,胚胎染色体为16号染色体三体,后续自然试孕未孕。3例促排卵后经自然同房或宫腔内人工授精获临床妊娠,均已成功分娩。3例供卵治疗获临床妊娠,均成功分娩。15例患者至随访结束仍未妊娠。2例失访。在获得临床妊娠的患者中,仅有1例患者在停止免疫用药两年后成功自然受孕,并在怀孕期间恢复了免疫用药;而其余患者则在移植期和怀孕期间均接受了免疫抑制药物治疗,包括羟氯喹、泼尼松和环孢素等。可见,ACA阳性患者若能获得整倍体胚胎,移植或自然妊娠后活产率较高。

3 讨论

本研究回顾性分析了ACA阳性患者体外受精的相关实验室结果和临床结局。ACA阳性患者在本院寻求体外受精治疗的人群中占比低(0.86%),虽然是非主流的不孕症合并免疫问题,但普遍表现出体外受精预后差,值得重视。其特征总结为:①卵母细胞成熟度略受干扰,ICSI授精时阳性组MII卵率降低,MI卵率升高、生发泡期卵和结构异常卵并未增多,这与日本学者此前的发现一致^[15];②异常受精现象频发,ACA阳性组多PN受精率显著增多,其中≥4PN的现象也常见,改用ICSI技术也不能降低异常受精率;③胚胎发育受限,大多数患者不能获得可利用胚胎,ACA阳性组D3次优胚数、优胚数显著低于阴性组,这与此前的发现一致^[15]。

据文献报道,c-IVF的多PN率为5.0%~8.1%,ICSI为2.5%~6.2%^[29]。然而,本文资料显示ACA

阳性患者 c-IVF 周期的多 PN 受精率比 ACA 阴性患者高 4~7 倍,ICSI 周期更是高出 4~12 倍,提示这类患者的多 PN 并非来源于精子而是源自于卵子。Ying 等^[5]发现用 ANA 阳性患者血清共培养体外受精胚胎,胚胎内可显示 IgG 荧光,发育成优质胚胎数下降,临床妊娠率和着床率也降低。因此推测,ACA 尤其是抗 CENP-B 抗体可能进入卵母细胞,引起卵母细胞 CENP-B 蛋白功能异常,导致纺锤体微管牵引染色体障碍,造成染色体分离的不稳定性。这种干扰持续存在于卵母细胞成熟-受精-卵裂过程,导致染色体与纺锤体连接数减少甚至无法正常连接,纺锤体的不稳定性增加,影响减数分裂进程^[12]。从卵母细胞恢复减数分裂开始,尽管这类患者仍能获得成熟的 MII 期卵母细胞,但其内部纺锤体的结构可能是混乱的(如出现同源染色体分离异常、单倍体和多极纺锤体),导致精子进入卵母细胞后,中心体与卵母细胞纺锤体结合过程受影响,两者不能正常结合或纺锤丝无法将染色体均匀引向细胞两极。ICSI 治疗过程可能加重卵母细胞内微管微丝结构紊乱,如 ICSI 期间中期板区域受损、精子注射期间第一次减数分裂纺锤体的重新定向或卵母细胞骨架的损伤以及随后第二次减数分裂纺锤体的定向错误^[20]。因此认为,ACA 阳性患者选择 c-IVF 方案或许更佳。

为了降低 ACA 对患者卵母细胞的影响,尝试使用免疫抑制剂改善抗 CENP-B 抗体阳性患者的体外受精结局,但效果并不理想。患者应用免疫抑制剂前后获卵情况和受精情况未见差异,卵裂率增加、D3 次优胚数降低。推测应用免疫抑制剂并不能有效抑制新抗体的生成,已存在的抗体无法在短时间内清除^[21],会持续存在于患者的卵泡液中。从产生窦腔的次级卵泡发育至优势卵泡排卵前需要约三个月^[30],理论上需要在取卵前至少三个月将卵泡液中抗体滴度下降至影响卵母细胞的下限滴度。因此,短期内免疫抑制剂的应用对患者体外受精结局的改善可能有限。

尽管 ACA 患者体外受精的获胚结局差,但偶有获优胚后能移植成功,均未流产。体外受精失败后,患者自然受孕亦有获得自然妊娠机会,而且自然受孕后流产风险并未增加;供卵 3 例均成功妊娠,且未发生流产。表明如果在排卵和受精环节未发生染色体的分离异常,后继胚胎发育很

少受 ACA 的影响,妊娠结局良好,并不会出现类似其他 ANA 阳性早期流产率增加的情况。本文资料中,ACA 阳性患者均因不孕症首诊,通过筛查发现 ACA 阳性,就诊时并无任何自身免疫损伤的表现,后期是否会出现典型的免疫相关症状尚待后期长期随访。

综上所述,ACA 阳性患者卵母细胞减数分裂、受精、胚胎发育显著差于 ACA 阴性患者,且 ICSI 和使用免疫抑制剂并不能使这些患者获益。尽管 c-IVF/ICSI 并非解决 ACA 阳性患者问题的有效方法,但却让研究者成功发现导致这类患者不孕的重要原因是受精异常。幸运的是,患者仍有一定的体内妊娠成功率。但是,要精准高效解决这类患者的生育问题,需要更深入的研究和更具靶向的治疗。

致谢 研究得到浙江省医药卫生科技计划(2022RC108)支持

Acknowledgements This study was supported by the Zhejiang Provincial Medical and Health Science Research Project (2022RC108)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献 (References)

- [1] EL-ROEY A, GLEICHER N, FRIBERG J, et al. Correlation between peripheral blood and follicular fluid autoantibodies and impact on *in vitro* fertilization [J]. *Obstet Gynecol*, 1987, 70(2): 163-170.
- [2] SILMAN A J, BLACK C. Increased incidence of spontaneous abortion and infertility in women with scleroderma before disease onset: a controlled study [J]. *Ann Rheum Dis*, 1988, 47(6): 441-444.
- [3] YING Y, ZHONG Y P, ZHOU C Q, et al. Antinuclear antibodies predicts a poor IVF-ET outcome: impaired egg and embryo development and reduced pregnancy rate[J]. *Immunol Invest*, 2012, 41(5): 458-468.
- [4] LI Y, WANG Y, MA Y, et al. Investigation of the impact of antinuclear antibody on the outcome of *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2015, 54(6): 742-748.
- [5] YING Y, ZHONG Y P, ZHOU C Q, et al. A further

- exploration of the impact of antinuclear antibodies on *in vitro* fertilization-embryo transfer outcome[J]. **Am J Reprod Immunol**, 2013, 70(3): 221-229.
- [6] TICCONI C, ROTONDI F, VEGLIA M, et al. Antinuclear autoantibodies in women with recurrent pregnancy loss [J]. **Am J Reprod Immunol**, 2010, 64(6): 384-392.
- [7] ZENG M, WEN P, DUAN J. Association of antinuclear antibody with clinical outcome of patients undergoing *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment: a meta-analysis[J/OL]. **Am J Reprod Immunol**, 2019, 82(3): e13158.
- [8] REIMAND K, TALJA I, METSKÜLA K, et al. Autoantibody studies of female patients with reproductive failure [J]. **J Reprod Immunol**, 2001, 51(2): 167-176.
- [9] LI Y, WANG Y, MA Y, et al. Investigation of the impact of antinuclear antibody on the outcome of *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment [J]. **Taiwan J Obstet Gynecol**, 2015, 54(6): 742-748.
- [10] GEVA E, YARON Y, LESSING J B, et al. Circulating autoimmune antibodies may be responsible for implantation failure in *in vitro* fertilization[J]. **Fertil Steril**, 1994, 62(4): 802-806.
- [11] GEVA E, AMIT A, LERNER-GEVA L, et al. Auto-immune disorders: another possible cause for *in-vitro* fertilization and embryo transfer failure[J]. **Hum Reprod**, 1995, 10(10): 2560-2563.
- [12] CARP H J, SELMI C, SHOENFELD Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss[J]. **J Autoimmun**, 2012, 38(2-3): J266-74.
- [13] GAO R, DENG W, MENG C, et al. Combined treatment of prednisone and hydroxychloroquine may improve outcomes of frozen embryo transfer in antinuclear antibody-positive patients undergoing IVF/ICSI treatment [J]. **Lupus**, 2021, 30(14): 2213-2220.
- [14] HEFLER-FRISCHMUTH K, WALCH K, HEFLER L, et al. Serologic markers of autoimmunity in women with recurrent pregnancy loss[J/OL]. **Am J Reprod Immunol**, 2017, 77(4): e12635.
- [15] SHIROTA K, NAGATA Y, HONJOU K, et al. Involvement of anticentromere antibody in interference with oocyte meiosis and embryo cleavage[J]. **Fertil Steril**, 2011, 95(8): 2729-2731.
- [16] TALBERT P B, HENIKOFF S. What makes a centromere?[J]. **Exp Cell Res**, 2020, 389(2): 111895.
- [17] TRAMPOSCH H D, SMITH C D, SENEAL J L, et al. A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies[J]. **Arthritis Rheum**, 1984, 27(2): 121-124.
- [18] TUFFANELLI D L, MCKEON F, KLEINSMITH D M, et al. Anticentromere and anticentriole antibodies in the scleroderma spectrum[J]. **Arch Dermatol**, 1983, 119(7): 560-566.
- [19] TAN E M, RODNAN G P, GARCIA I, et al. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to crest syndrome[J]. **Arthritis Rheum**, 1980, 23(6): 617-625.
- [20] MOROI Y, PEEBLES C, FRITZLER M J, et al. Auto-antibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1980, 77(3): 1627-1631.
- [21] FRITZLER M J, KINSELLA T D. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies[J]. **Am J Med**, 1980, 69(4): 520-526.
- [22] STEEN V D, ZIEGLER G L, RODNAN G P, et al. Clinical and laboratory associations of anticentromere antibody in patients with progressive systemic sclerosis [J]. **Arthritis Rheum**, 1984, 27(2): 125-131.
- [23] MCKINLEY K L, CHEESEMAN I M. The molecular basis for centromere identity and function[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2016, 17(1): 16-29.
- [24] EARNSHAW W, BORDWELL B, MARINO C, et al. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies [J]. **J Clin Invest**, 1986, 77(2): 426-430.
- [25] MOHIBI S, SRIVASTAVA S, WANG-FRANCE J, et al. Alteration/deficiency in activation 3 (ADA3) protein, a cell cycle regulator, associates with the centromere through CENP-B and regulates chromosome segregation [J]. **J Biol Chem**, 2015, 290(47): 28299-28310.
- [26] MOROZOV V M, GIOVINAZZI S, ISHOV A M. CENP-b protects centromere chromatin integrity by facilitating histone deposition via the H3.3-specific chaperone Daxx[J]. **Epigenetics Chromatin**, 2017, 10(1): 63.
- [27] OVARIAN STIMULATION T, BOSCH E, BROER S, et al. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI[J]. **Hum Reprod Open**, 2020, 2020(2): hoaa009.
- [28] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting[J]. **Hum Reprod**, 2011, 26(6): 1270-1283.
- [29] 乔杰, 刘平. 生殖医学实验室技术[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2013: 91.
QIAO Jie, LIU Ping. **Laboratory techniques in reproductive medicine**[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2013: 91. (in Chinese)
- [30] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 19.
XIE Xing, GOU Wenli. **Obstetrics and gynecology science**[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013: 19. (in Chinese)

[本文编辑 余方沈敏]