

· 论 著 ·

人早期胚胎体外培养中自体子宫内膜细胞共培养与序贯培养联合系统的建立

张宁媛, 胡娅莉, 孙海翔, 王 玠, 徐志鹏, 陈 华

(南京大学医学院附属鼓楼医院生殖医学中心, 江苏 南京 210008)

摘要: 目的: 建立早期胚胎与自体子宫内膜细胞共培养与序贯培养联合系统的培养方法。方法: 黄体中期获取子宫内膜, 细胞培养后程序化冻存。取卵前解冻自体内膜细胞, 受精后将双原核胚转移至已更换分裂期胚胎培养液的自体子宫内膜细胞行共培养, 取卵后 72 h 更换囊胚培养液行共培养。结果: 人黄体中期子宫内膜有良好的体外培养活力, 程序化冷冻与快速复温后细胞存活高, 自体胚胎共培养的应用比率为 74.04%。种植前各时期早期胚胎联合应用序贯培养液, 在自体内膜细胞上生长良好。建立联合培养系统的临床妊娠率 68.83%, 种植率 44.23%。结论: 人早期胚胎与自体子宫内膜细胞共培养联合序贯培养系统的建立, 为早期胚胎体外培养的模式提供了一种新的思路, 力求提高种植前胚胎的质量与发育潜能。

关键词: 子宫内膜细胞; 共培养; 序贯培养; 胚胎; 自体

中图分类号: R321.33 文献标识码: A 文章编号: 1009-3591(2006)11-0997-04

Establishment of Autologous Endometrial Coculture and Sequential System for Human Early Embryo Culture

ZHANG Ning-yuan, HU Ya-li, SUN Hai-xiang, WANG Bin, XU Zhi-peng, CHEN Hua

Reproductive Medicine Center, Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical College, Nanjing, Jiangsu 210008, China

Correspondence to: SUN Hai-xiang, E-mail: stevensun@163.com

Abstract: Objective: To establish a coculture and a sequential system for human early embryo culture. Methods: The endometrial tissue was digested enzymatically and cultured to achieve generated and cryo-thawed endometrial monolayer cells. The generated and cryo-thawed monolayer cells were cocultured with human 2PN embryos and transferred to sequential medium every 48 hours. Results: Human endometrial cells had viability in vitro culture. The autologously generated and cryo-thawed monolayer cells were successfully obtained, and 74.04% of the cryo-thawed cells were successfully used in coculturing human early embryos. The embryos developed well with the clinical pregnancy rate of 68.83% and the implantation rate of 44.23%. Conclusion: The autologous endometrial cell coculture and sequential culture system for human early embryo development provides a feasible method for studying human embryo development and implantation so as to improve embryo quality. Natl J Androl 2006, 12(11):997-999, 1003

Key words: endometrial cell; coculture; sequential culture; embryo; autologous

1978年试管婴儿的出生为人类生殖自我调控开创了新纪元。20多年来,随着促排药物的广泛使用、体外培养系统的逐步改善和显微操作技术的革新应用,辅助生殖技术取得了长足进步。但大多数

收稿日期: 2006-05-06; 修回日期: 2006-09-20

作者简介: 张宁媛(1975-),女,江苏南京市人,主治医师,硕士,从事生殖医学专业。

通讯作者: 孙海翔, E-mail: stevensun@163.com

生殖中心临床妊娠率的报道仍徘徊在 30% ~60%，胚胎体外培养过程仍有许多不解之谜。如何改善胚胎环境，提高胚胎质量与发育潜能，一直是研究的重点。人早期胚胎的体外培养往往采用序贯培养或共培养，本研究将两种培养方法联合应用，试图建立人早期胚胎与自体子宫内膜细胞共培养与序贯培养联合系统，以求改善胚胎种植能力。

1 材料与方 法

1.1 材料 人子宫内膜与早期胚胎：取自自愿接受自体子宫内膜细胞培养及体外受精 胚胎移植技术的患者。

1.2 试剂 DMEM / F12(子宫内膜细胞培养液, Gibco)、G1. 3(卵裂期胚胎培养液, Vitrolife)、G2. 3(囊胚期胚胎培养液, Vitrolife)、胶原酶 I A(Sigma)、胰蛋白酶(Sigma)、FBS(小牛血清, Gibco)、DPBS(无钙、镁磷酸缓冲液, Irvine)、DMSO(二甲亚砷, Sigma)。

1.3 方 法

1.3.1 人子宫内膜细胞的 原代培养、程序化冷冻与快速复温方法^[1-3] 原代培养：取卵前周期的黄体中期选择专用子宫内膜取样器，在常规消毒阴道、宫颈管后，进宫腔抽吸少许内膜组织，置于 DPBS 洗涤数次，组织块移入培养皿，解剖镜下用钟表镊撕碎，修剪成 1~2 mm³，在 37℃、0. 25 g/L 胶原酶 I A 中消化 2 h。含有腺细胞和间质细胞的雾状上清移至 5 ml 的无菌试管，100×g 离心 5 min，沉淀加培养液 4 ml 吹打 2 min 以 10³ /ml 密度接种于 25 cm² 的培养瓶中，DMEM / F12(含 10% FBS) 37℃、5% CO₂ 培养。培养 3 d 使细胞贴壁并形成细胞集落。培养液每 2~3 d 更换 1 次。

程序化冷冻：取聚合 >95% 且形态正常的内膜细胞，0. 25% (w/v) 胰蛋白酶中消化制成细胞悬液，转移至 5 ml 试管，200×g 离心 10 min 去上清洗涤 2 次。沉淀物用冷冻试剂 (70% DMEM / F12 + 10% DMSO + 20% FBS) 混悬。约 10⁶ /ml 放置于 1. 8 ml 冷冻管。启动程序降温仪的冷冻程序，以 -1℃ /min 由室温降至 -30℃，再以 -50℃ /min 降至 -150℃，直接投入液氮保存。

快速复温：液氮中取出冻存管，立即投入 37℃ 水浴解冻至融化，细胞转移至 10 ml 无菌试管。缓慢一滴一滴地加入 9 ml DMEM / F12(含 10% FBS) 防止细胞渗透性损伤。200×g 离心 5 min 弃上清，加入 1 ml 培养液，细胞混悬液以 10⁵ /ml 密度接种于四孔培养板，DMEM / F12(含 10% FBS)、

37℃、5% CO₂ 培养。

1.3.2 胚胎自体内膜细胞共培养联合序贯培养系统的建立^[4] 黄体中期取子宫内膜细胞行原代培养、冷冻^[5]。采卵前 1 d 解冻自体子宫内膜细胞并培养。在观察原核日，预计约 50% ~100% 细胞聚合。培养液更换成 0. 5 ml G1. 3, 2PN 胚胎每 2~3 个 1 组置于单层细胞上。4 孔培养皿培养于 6% CO₂、37℃ 的环境中，每日观察胚胎情况。取卵后第 3 d 培养液更换成 0. 5 ml G2. 3, 胚胎每 2~3 个 1 组置于单层细胞上。取卵后第 5、6 d 观察囊胚形成与孵出情况。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 12. 0 统计分析软件行 χ^2 检验，P < 0. 05 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 内膜细胞形态、生长特性与 共培养联合序贯培养系统的建立 原代培养的人子宫内膜细胞大部分表现为梭形，另有一部分表现为多角形。接种前未分离腺体细胞和基质细胞，故贴壁细胞应为两者的混合。接种后 24 h 即见到细胞贴壁，其后生长旺盛，细胞聚合呈旋涡状排列。冷冻后解冻复苏的内膜细胞接种后生长速度接近原代细胞，形态规则。双原核胚置于自体子宫内膜单层细胞上，采用序贯培养液，可见早期各阶段胚胎生长良好(图 1)。

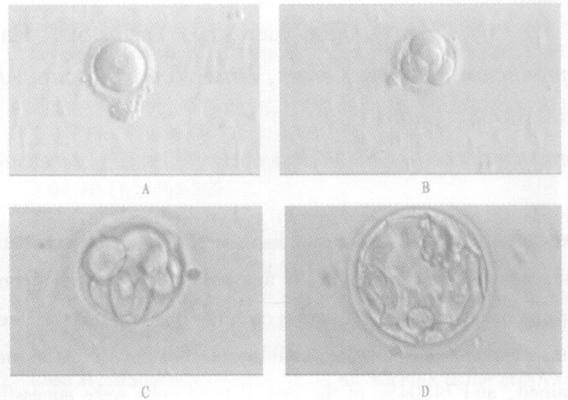


图 1 人各期种植前胚胎与自体子宫内膜细胞共培养图 A: 双原核与自体子宫内膜细胞(×100); B: 4 细胞与自体子宫内膜细胞(×100); C: 8 细胞与自体子宫内膜细胞(×200); D: 囊胚与自体子宫内膜细胞(×200)

Figure 1. Human preimplantation embryos and endometrial cells (EMC)

A: 2PN and EMC(×100); B: 4-cell and EMC(×100); C: 8-cell and EMC(×200); D: blastocyst and EMC(×200)

2.2 子宫内膜细胞培养结局 随机采集 104 例子官内膜，其中 77 例经培养、冻存及解冻后用于体外受精 胚胎移植周期的自体胚胎共培养，成功应用的

比率为 74.04% (77/104)。另 27 例放弃, 其中因内膜细胞培养失败放弃 19 例, 具体数据见表 1。

表 1 子宫内膜细胞培养结局 (n=104)

Description	No. cases [n(%)]
Successful coculture establishment	77 (74.04)
Failed coculture establishment	27 (25.96)
Failed endometrial cell culture	19 (18.27)
Hypocells or hypercells after cryo-thawing	6 (5.77)
Failed fertilization	2 (1.92)

2.3 共培养建立对临床结局的影响 成功建立胚胎共培养环境的 77 例与共培养建立失败的 27 例, 尤其是因内膜细胞培养失败放弃的 19 例患者在年龄、获卵数、受精与胚胎评分上无明显差异。取卵后 72 h 胚胎移植的临床妊娠率与种植率的比较见表 2。

表 2 自体内膜细胞共培养建立与否对临床妊娠率与种植率的影响 (%)

Table 2. Effects of establishment of autologous endometrial coculture on the rates of clinical pregnancy and implantation (%)

Group	n	Pregnancy rate	Implantation rate
Established coculture	77	68.83 (53/77)	44.23 (69/156)
Failed coculture	27	51.85 (14/27)	35.09 (20/57)
Abandoned due to failed cell culture	19	42.11 (8/19)*	30.77 (12/39)

与建立共培养组相比, * : $P < 0.05$

Compared with the established coculture group * : $P < 0.05$

3 讨论

共培养和序贯培养都是常用的人早期胚胎的体外培养方法。在序贯培养液发明以前, 一直沿用共培养。但自体甚至异种辅助细胞共培养由于操作繁琐, 更重要是安全性的瓶颈, 在序贯培养液出现以后, 应用很少。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, 依次采用适合该时期营养需要的培养液进行培养, 但与生理环境仍有差距。序贯培养中最关键的序贯培养液的配方都是经研究证实在胚胎的不同发育阶段确实促进胚胎生长的成分。而体内胚胎的生长发育环境中尚存在各种分泌因子, 这些成分的结构目前尚不清楚, 对胚胎的调控机制及各成分间协同作用也不明确。自体子宫内膜共培养系统的建立解决了安全方便的辅助细

胞来源, 将胚胎放置在有自体子宫内膜细胞的体外环境中共同生长, 利用内膜细胞的自分泌和旁分泌功能, 释放生长因子, 可提供更接近的生理环境, 促进胚胎体外发育, 减少了母胎相互间某些不利因素的影响^[6,7]。本研究试图在胚胎序贯培养的同时, 提供胚胎与子宫内膜细胞共培养的自然环境, 即建立早期胚胎的自体内膜共培养与序贯培养联合系统, 力求提高胚胎的质量与发育潜能。

自体内膜共培养的方法在培养液、冷冻液的稳定选择以及有序操作的基础上已成功确立^[8], 人黄体中期子宫内膜有良好的体外培养活力, 程序化冷冻与快速复温后细胞存活高, 经体外原代培养、冷冻及复苏后成功用于体外受精。胚胎移植周期的自体胚胎共培养的比率已达 74.04%。放弃共培养最主要的因素是内膜原代生长失败 (18.27%), 这其中有内膜细胞的形态异常, 24 h 贴壁少甚至不贴壁, 延展性差, 出现空泡样变性等, 考虑与患者自身内膜条件相关。内膜取样过少导致细胞来源不足, 也是放弃共培养的原因。其他的原因有冷冻复苏后细胞贴壁少, 可能与冷冻复苏的操作对细胞的损伤有关。冷冻复苏后生长过密往往是解冻时机和细胞培养密度的调整不当造成。随着培养与冻融技术的逐步成熟, 加强对内膜细胞的生长速度和接种密度的调控, 与共培养时机同步, 自体胚胎共培养的比率有望进一步提高。

胚胎质量是影响体外受精、胚胎移植成功最重要的因素之一, 早期胚胎的自体内膜共培养与序贯培养的联合培养系统涉及胚胎、辅助细胞层和培养液 3 方面。共培养系统中辅助细胞的存在模拟了人体自然环境, 补充了胚胎发育过程中所需各种因子, 提供了更接近生殖生理的生长环境^[9]。而序贯培养液又注意到胚胎在不同发育时期代谢需求的不同, 依次选用适合的培养液培养。将自体子宫内膜细胞共培养与序贯培养方法联合应用, 为早期胚胎体外培养的模式提供了一种新的思路。种植前各时期早期胚胎联合应用序贯培养液, 在自体单层内膜细胞上生长良好。已有的初步临床结果显示, 建立共培养联合序贯培养系统与放弃共培养而单用序贯培养组比较, 临床妊娠率与种植率均在数值上有升高的趋势, 显示人早期胚胎自体内膜细胞共培养与序贯培养联合系统的建立, 应有助于提高早期胚胎的种植能力与发育潜能, 是一种良好的早期胚胎体外培养方式^[10]。与因原代培养失败放弃共培养组相比, 内膜培养成功的临床妊娠率有统计学上明显差

(下转 1003 页)

基因型 (表 3), 主要为 CTX M 型, 检出率为 86.4% (38/44)。2 株基因不明菌 ESBLs 确认试验均阳性, 三维酶试验仅出现 ESBLs 酶活性, 这说明携带了编码 ESBLs 的基因, 但本试验只设计了 TEM 型、SHV 型、CTX M 型和 OXA 型 4 种主要 ESBLs 基因的检测, 所以未定型的 2 株可能携带其他的少见型基因。

产 ESBLs 大肠埃希菌一般只携带一种 ESBLs 近年来有文献报道同时携带两种或两种以上的 ESBLs^[10]。本实验中, 46 株细菌有 38 株携带单个 ESBLs (82.6%), 3 株同时携带两种 ESBLs (6.5%), 1 株携带了 3 种 ESBLs (2.2%), 多个 ESBLs 基因是否位于同一质粒还需进一步研究。

本实验 3 株产 ESBLs 大肠埃希菌同时检测到质粒型 ampC 基因, 1 株为 DHA 型, 2 株为 CIT 型, 说明由质粒编码的 AmpC 酶已在我院泌尿系统感染者的大肠埃希菌中出现。这不仅给临床带来了比 ESBLs 更为棘手的难题, 而且对传统检测 ESBLs 的方法提出了挑战。首先, 这两者的结合, 使细菌获得了更加广泛的抗菌谱; 另外美国临床实验室标准化协会 (CLSI/NCCLS) 对大肠埃希菌检测 ESBLs 的推荐标准是建立在一种菌不产 AmpC 酶的基础上, 但当 AmpC 酶和 ESBLs 同时产生的情况下, 有可能降低 ESBLs 检测的阳性率。而对这些酶检测的失败往往导致耐药性的传播以及治疗的失败, 故如何有效预防耐药性的产生及传播, 并加强对上述耐药机制的检测, 将是迫切需要解决的问题。

参考文献

- [1] Canton R, Oliver A, Coque TM, et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period [J]. *J Clin Microbiol* 2002, 40(4):1237-1243.
- [2] 邵海枫, 赵晓智, 王卫萍, 等. 肺炎克雷伯菌中质粒介导的 AmpC 酶及相关表型研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(2):117-119.
- [3] Perez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol* 2002, 40(6):2153-2162.
- [4] Rasheed JK, Jay C, Metchock B, et al. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41(3):647-653.
- [5] Nuesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method and comparison with the E-test [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, 15(5):398-402.
- [6] Edelstein M, Pinkin M, Palagin I, et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX M extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(12):3724-3732.
- [7] 黄支密, 陈榆, 毛培华, 等. 鲍曼不动杆菌耐药性及 β 内酰胺酶基因型研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(11):683-685.
- [8] 熊自忠, 朱德妹, 张婴元, 等. 临床分离的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中超广谱 β 内酰胺酶的检测 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(21):1476-1479.
- [9] 耿燕, 张王刚, 王香玲, 等. 泌尿系感染产超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs) 大肠埃希菌的耐药表型和基因分型 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(7):622-624.
- [10] Baraniak A, Fiejt J, Sulikowska A, et al. Countrywide spread of CTX M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46(1):151-159.

(夏欣一 编发)

(上接 999 页)

异, 是否移植前一周期内膜培养情况, 能部分反映移植周期的内膜条件, 有待更大样本临床结果考证。

参考文献

- [1] Tan Y, Tan D, He M, et al. A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice [J]. *Biol Reprod* 2005, 72(3):556-561.
- [2] Li HY, Chang SP, Yuan CC, et al. Establishment of an efficient method to quantify embryo attachment to endometrial epithelial cell monolayers [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002, 38(9):505-511.
- [3] Carver J, Martin K, Spyropoulou I, et al. An in vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst [J]. *Hum Reprod* 2003, 18(2):283-290.
- [4] Yan J, Zhu G, Liu J, et al. Co-culture of early embryo with human decidual stromal cells in vitro by improvement of early embryo development [J]. *J Tongji Med Univ* 2000, 20(1):79-81.
- [5] Spandorfer SD, Bamat LI, Navarro J, et al. Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with

multiple implantation failures [J]. *Fertil Steril* 2002, 77(6):1209-1213.

- [6] Spandorfer SD, Navarro J, Levy D, et al. Autologous endometrial coculture in patients with in vitro fertilization (IVF) failure: correlations of outcome with leukemia inhibiting factor (LIF) production [J]. *Am J Reprod Immunol* 2001, 46(6):375-380.
- [7] Caballero-Campo P, Domínguez F, Coloma J, et al. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation [J]. *Mol Hum Reprod* 2002, 8(4):375-384.
- [8] Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, et al. Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases [J]. *J Reprod Med* 2004, 49(6):463-467.
- [9] Spandorfer SD, Neuer A, Liu HC, et al. Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial coculture: correlation with outcome after in vitro fertilization [J]. *Am J Reprod Immunol* 2000, 43(1):6-11.
- [10] Seta M. Embryo transfer after autologous endometrial coculture improves pregnancy rates [J]. *Hum Cell* 2001, 14(2):135-140.

(夏欣一 编发)