

体外受精—胚胎移植过程中未成熟卵体外培养的研究

贾婵维, 李颖, 任国庆, 周丽颖, 周明书, 王树玉
(首都医科大学附属北京妇产医院遗传诊断中心, 100026)

摘要:目的 研究来源于超排卵周期中的未成熟卵进行体外成熟培养 (IVM) 的成熟、受精及胚胎发育能力, 探讨适宜的未成熟卵体外培养条件, 探索 IVM 技术的临床应用。方法 选取 68 名体外受精 卵胞浆内单精子显微注射—胚胎移植 (IVF/ICSI-ET) 患者为研究对象, 比较采用基本细胞培养基与改良培养基条件下, MI 和 GV 期未成熟卵的体外成熟情况; 并比较体内成熟卵和体外成熟卵进行 ICSI 后的受精、卵裂和优质胚胎形成情况。结果 采用常规培养基培养条件下, GV 期未成熟卵培养失败, MI 期卵成熟率为明显低于改良培养基条件下未成熟卵成熟率; 改良培养基条件下 GV 期与 MI 期卵成熟率无明显差异 ($P > 0.05$); 体外培养中 69.23% 的 MI 期卵和 76.74% 的 GV 期卵均在 24h 内达到成熟, 其 24h 和 48h 的成熟率无明显差异 ($P > 0.05$); 体外成熟卵与体内成熟卵相比较, 受精率、卵裂率均无明显差异 ($P > 0.05$), 优质胚胎形成率较低, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 常规超排卵周期中的未成熟卵在改良培养基中能够发育成熟; 未成熟卵在拆除卵丘细胞后继续体外发育成熟, 具有与体内成熟卵相似的 ICSI 受精、卵裂能力; 虽然优质胚胎的形成率低于体内成熟卵, 但增加了胚胎数目, 可增加移植胚胎数和冷冻胚胎数量, 是一种有效的辅助生殖措施。

关键词: 未成熟卵; 体外成熟培养; 体外受精—胚胎移植 (IVF-ET); 卵胞浆内单精子显微注射 (ICSI)

中图分类号: R321-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-9534 (2010) 01-0100-03

卵母细胞体外成熟 (in vitro maturation IVM) 是指通过体外培养, 使卵泡内的未成熟卵母细胞发育成为成熟的第二次减数分裂中期 (MII) 卵母细胞, 受精分裂成胚胎并移植获得妊娠的技术。在体外培养后, 未成熟卵母细胞可恢复减数分裂并达到 MII 期, 具有受精、发育为正常胚胎的能力。包括完整的卵泡培养和单纯的卵丘复合体培养^[1], 目前应用于辅助生殖技术的主要限于后者。IVM 的应用优势主要在于: 可以节省用于募集卵泡的药物费用; 重新利用常规 IVF 中收集的不成熟卵; 降低发生卵巢过度刺激和卵巢癌的危险性; 可以作为研究卵子发生减数分裂异常和非整倍体的模型; 为冷冻卵子提供了一条出路。

在常规的体外受精 卵胞浆内单精子显微注射—胚胎移植 (IVF/ICSI-ET) 治疗周期中, 所获卵子约 15% 为未成熟卵^[1], 这些未成熟的卵子在过去常常因无法使用而被丢弃, 如果将这些未成熟卵进行体外培养成熟 (in vitro maturation IVM), 将增加可移植胚胎的数量, 提高累积妊娠率, 有利于助孕结局。本文探讨来源于超排卵刺激周期的未成熟卵在拆除卵丘细胞后进行体外培养的条件, 未成熟卵的成熟、受精和发育能力及其临床应用。

资料与方法

1. 一般资料

选择北京妇产医院生殖医学中心接受 IVF/ICSI-ET 治疗的不孕患者 68 名, 平均年龄 31.86 ± 4.19 岁, 治疗指征包括输卵管阻塞、少弱精子、无精子症、多囊卵巢综合征 (PCOS)、子宫内膜异位症等。本研究开展获北京妇产医院生殖医学伦理委员会批准, 受试者知情同意并签字后进入本研究。

2. 研究方法

(1) 超排卵方案

采用促性腺激素释放激素类似物 (GnRH-a) 和促性腺激素 (FSH/HMG) 联合长短超短方案, 肌注人绒毛促性素 (HCG, Serono 瑞士) 10000U, 36h 后经阴道 B 超下穿刺取卵。

(2) 卵子采集

采集的卵冠丘复合体 (OCCC) 放置于人输卵管培养液 (HTF, Quinn s1023, SAGE, 美国) 中孵育 2h, ICSI 之前, 使用透明质酸酶 (Sigma H-3757, 美国) (80U/ml) 处理 OCCC, 再以机械法剔除卵丘细胞, 在倒置显微镜下观察卵母细胞成熟度。

(3) 分组标准及培养方法

将所有卵母细胞按剔除卵丘细胞时的卵母细胞的成熟度分为 3 组: I 组, 有第一极体, 为 MII 期卵 (成熟卵); II 组, 无第一极体也无生发泡 (GV), 为 MI 期卵; III 组, 有生发泡, 为 GV 期卵。

其中 II 组和 III 组的未成熟卵分别采用 a 基本细胞培养基—人输卵管培养液 (HTF, Quinn s1023), b 改良培养基—基本细胞培养基 + 0.075U/ml 人绝经期促性腺激素 (HMG Serono 瑞士) 进行体外成熟培养。培养液 20 μ L 在 5cm 培养皿内做成滴滴, 上面覆盖矿物油, 于 37 $^{\circ}$ C、6% CO₂ 及饱和湿度条件下单个培养 24h、48h 分别在显微镜下观察, 排出第一极体者被认为成熟, 立即用于 ICSI 受精。

(4) 成熟卵的受精及胚胎培养

取卵当日的成熟卵立即进行 IVF 或 ICSI 受精, 采用的精子为新鲜精液。ICSI 后的卵转入卵裂培养基 (Quinn s1026, SAGE, 美国, 加 15% HSA) 的微滴中 (25 μ L) 单个培养。ICSI 后 16~18h 观察受精情况, 出现双原核或双极体为受精标志, 每天观察胚胎生长情况并评分, 直至采卵后 72h。

(5) 胚胎分级标准

根据 Brian Dale 的分级标准^[2], 常规将分裂期胚胎分为 4 级, 评级 ≤ 2 者为优质胚胎, 评级 ≤ 3 者为可移植胚胎, 评 4 级的胚胎为不可用胚胎, 丢弃。

3. 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件, 数据处理应用方差分析和 χ^2 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 未成熟卵体外成熟情况比较

68 个 IVF/ICSI 或 ICSI 周期中共采集卵子 790 个, 平均每个周期获卵 11.62 ± 5.32 个。其中 655 个 (82.91%) 为成熟卵, 135 个为未成熟卵 (17.09%)。未成熟卵中 74 个为 MI 期, 61 个为 GV 期, 分别占总数的 9.36% (74/790)、7.72% (61/790)。其中未成熟卵采用 a 基本细胞培养基培养 MI 期 22 个、GV 期 18 个; 采用 b 改良细胞培养基培养 MI 期 52 个、GV 期 43 个。

表 1 未成熟卵体外成熟情况

	I 组 (MII)	II 组 (MI) (%)		III 组 (GV) (%)	
		a	b	a	b
卵子数 (n)	655	22	52	18	43
24h 体外成熟 (n%)	—	11 (50.00)	36 (69.23)	0	33 (76.74)
48h 体外成熟 (n%)	—	1 (4.05)	6 (11.54)	0	2 (4.65)
成熟卵子 (n%)	655	12 (54.55)	42 (80.77)	0	35 (81.40)

未成熟卵成熟率比较:

II 组采用不同培养方法 a b 比较, $P = 0.020 < 0.05$, 差异有统计学意义。

III 组采用不同培养方法 a b 比较, $P = 0.000 < 0.05$, 差异有统计学意义。

采用相同培养方法 a II、III 组比较, $P = 0.000 < 0.05$, 差异有统计学意义。

采用相同培养方法 b II、III 组比较, $P = 0.938 > 0.05$, 差异无统计学意义。

采用不同培养方法 a b 比较, a 成熟率为 30% (12/40), b 成熟率为 81.05% (77/95), $P = 0.000$, 差异有统计学意义。

2. 卵子 ICSI 受精、卵裂情况比较

三组卵子受精率和卵裂率比较无明显差异, 两两比较亦无统计学差异 ($P > 0.05$)。

三组卵子在优质胚胎形成率比较差异有统计学意义, I 组优质胚胎率高于其他两组。两两比较结果: I、II 组比较 $P = 0.002$ 差异有统计学意义; I、III 组比较 $P = 0.021$, 差异有统计学意义; II、III 组比较 $P = 0.751$, 差异无统计学意义。

表 2 卵子受精和卵裂率的比较

	I 组 (MII)	II 组 (MI)	III 组 (GV)	P
ICSI 卵子数 (n)	423	54	35	—
受精率 (%)	78.96 (334/423)	74.07 (40/54)	77.14 (27/35)	0.703
卵裂率 (%)	90.42 (302/334)	85 (34/40)	88.89 (24/27)	0.558
优质胚胎率 (%)	57.62 (174/302)	29.41 (10/34)	33.33 (8/24)	0.001

讨论

1. 卵母细胞成熟的生理过程

卵母细胞成熟是指卵母细胞恢复和完成第一次减数分裂, 进入并停滞于第二次减数分裂中期 (MII), 此间伴随着胞浆成熟, 也就是说卵母细胞的成熟包括其核成熟和胞浆成熟两个方面。核成熟是核膜破裂, 同源染色体分离和排出第一极体^[3]; 胞浆成熟是胞浆内各种蛋白组成达到一定水平及

线粒体有效重排, 对于受精及将来的胚胎发育具有十分重要的意义。因此, 维持减数分裂的静止状态, 使卵母细胞核质成熟得以同步进行, 是哺乳动物在进化过程获得的一种重要机制。在自然发育的卵母细胞中, 胞核和细胞质的成熟是高度统一的, 但在 IVF 中, 胞核与细胞质的成熟却不完全同步, 其机制不明。卵母细胞成熟阻滞主要发生于生发泡 (GV) 期向生泡破裂期 (GVBD) 转化及第一次减数分裂中期 (MI) 向 MII 转化这两个阶段。卵母细胞的成熟受促性腺激素、表皮生长因子、胰岛素生长因子等因素调控^[4]。

2. 去除卵丘细胞的未成熟卵的体外发育

未成熟卵可在没有卵丘和颗粒细胞的情况下经历核成熟, 虽然有证据表明丘细胞对卵子的胞浆成熟有帮助, 但有报道在合适的培养基条件下, 去掉丘细胞的人卵母细胞有较高比例的囊胚形成率^[5]。这可能与有些培养基是通过支持丘细胞的新陈代谢, 经与卵母细胞间的缝隙连接起调节作用而达到促进成熟, 而有些培养基则是通过支持卵母细胞自身的需求起到促进成熟的作用^[6]。本研究的结果指出如果卵子在合适的 IVF 培养基中培养, 丘细胞对卵子的成熟似乎变得不那么重要, 表明没有丘细胞的卵母细胞在合适的培养基条件下可以进行体外成熟, 也可进一步完成早期胚胎发育。

3. 刺激周期中未成熟卵的体外培育条件

有研究认为来自刺激周期的未成熟卵可能已经获得了启动成熟的能力, 因为它们已经暴露在大剂量的促性腺激素之下。促性腺激素通过 cAMP 途径促进颗粒细胞增生, 卵丘细胞膨散, 刺激颗粒细胞分泌成熟促进物, 启动卵母细胞成熟。也有学者认为, 在培养基中添加 FSH 和 LH 可以进一步增加卵母细胞的成熟, 维持颗粒细胞之间及颗粒细胞与卵母细胞之间的缝隙连接, 促进卵成熟, 提高受精率和卵裂率, 在培养基中添加生理浓度的 Gn 能刺激体外培养的颗粒细胞和卵丘细胞分泌类固醇激素雌二醇 (E_2) 和孕酮 (P), 很好地促进卵母细胞成熟^[7]。有研究发现, 在培养液中加入 $0.075 IU/mL$ FSH 和 LH, 可使 60.5% 的 MI 期卵达到 MII, 而不含 FSH/LH 组只有 49.5% 的卵成熟^[8]。

在我们的研究中, GV 期未成熟卵在未添加促性腺激素的基本细胞培养基中不能成熟, 而在添加了 FSH 和 LH 的改良培养基中发育良好; MI 期未成熟卵在改良培养基中的成熟率显著高于基本细胞培养基。此结果表明了促性腺激素在未成熟卵母细胞成熟过程中的作用是肯定的, 尤其在生发泡 (GV) 期向生泡破裂期 (GVBD) 转化过程中。激素平衡对于卵母细胞的发育是非常重要的, LH 和 FSH 协同维持卵泡发育, 能够促进人类卵母细胞的成熟和卵裂, 人类卵母细胞对促性腺激素十分敏感, 通过 cAMP 途径来启动卵母细胞的成熟、分裂, 增加受精率。FSH 能够加速细胞核的成熟、减少染色体异常的发生, 排卵前 LH 峰使卵母细胞完成生发泡 (GV) 期向生泡破裂期 (GVBD) 转化成为 MI 期卵母细胞, 促进生发泡期卵母细胞核成熟和胞质成熟^[9]。

4. 刺激周期中未成熟卵的体外成熟发育能力

据报道 80.0% 以上的卵母细胞体内成熟, 而仅 46.4~81.0% 的未成熟卵母细胞能够体外成熟^[9], 可能是在体外培养过程中, 有的卵母细胞早已发生凋亡或者是体外培养条件不佳, 导致卵母细胞未获得足够的成熟能力, 第一极体释放

失败。研究表明,来自卵巢刺激 (HMG /HCG)周期和非刺激周期的 GV卵的生发泡破裂 (GVBD)时间和卵子成熟时间是不同的,但最终的成熟率与发育率相当^[1]。本研究中未成熟卵子所占的比例达 17.09%,研究显示来自刺激周期的未成熟卵有在体外发育成熟并完成早期胚胎发育的能力,并且 MI与 GV卵的体外成熟能力无明显差异。

5. 体外成熟卵与体内成熟卵来源的胚胎质量

本研究中 MI卵与 GV卵的来源的胚胎质量相似,但体外成熟卵的胚胎发育质量低于体内成熟卵,是否与过早去除了丘细胞从而影响了卵母细胞的胞浆成熟有关,尚需进一步的研究探讨。但在人卵 IVF研究中,核浆成熟度不一致一直是影响胚胎质量的关键问题。胞浆的成熟度不完全,尚未合成维持胚胎进一步发育的有关成分,可造成精原核 (PN)形成落后,导致精 PN和卵 PN形成不同步,将影响受精卵的发育。另外,胞浆成熟缺陷,可能导致卵裂时的纺锤体缺陷,不能够完全支持胚胎的发育和成功种植^[10]。因此,仍需不断改善 IVF的培养系统。

6. 体外培养的时间

我们的研究结果表明,在改良培养基体外培养中 69.23%的 MI期卵和 76.74%的 GV期卵均在 24h内达到成熟, 11.54%的 MI期卵和 4.65%的 GV期卵在进一步培养到 48h前成熟。有研究显示,体外培养 28h成熟的卵母细胞与体外培养 36h成熟的卵母细胞其受精、胚胎发育能力相似,并可避免由于体外培养时间过长导致的衰老^[11]。体外培养时间过长可能导致透明带结构发生变化,多为变厚变硬,并可能导致精卵结合障碍,所以目前对 IVF卵多采用 ICSI方法受精。我们的研究也表明,采用 ICSI方法受精的 IVF成熟卵受精率和卵裂率与体内成熟卵是相当的。

7. IVF技术的临床应用

目前在我们中心还没有将经 IVF产生的胚胎用于移植,主要从医疗安全和伦理角度考虑。我们的研究结果提示对于未成熟卵通过体外培养可以成熟,完成受精与卵裂,我们将进一步改善卵子体外成熟培养的条件,寻找更适合卵子体

外成熟的培养基,探讨卵发育成熟的特点和调控机制,以期提高 IVF后胚胎的质量,增加可胚胎数量,增加移植周期,减少取消周期,提高累积妊娠率,改善助孕结局。对常规 IVF有积极补充作用,具有重要的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] Cha KY, et al. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use[J]. Human Reproduction Update 1998, 4(2): 103.
 [2] Brian Dale Kay Elder. In vitro fertilization[M]. Cambridge University Press 1997. 115.
 [3] Mikkelsen AL. In vitro maturation of human ova[C]. Intern Conger series 2004, 1266, 160-166.
 [4] Mrzak M, et al. Failure of oocyte maturation, possible mechanisms for oocyte maturation arrest[J]. Hum Reprod 2003, 18(11): 2249-52.
 [5] Chian RC, et al. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and ICSI cycles[J]. Reproductive BioMedicine Online 2002, 5(2): 125.
 [6] Cekleniak NA, et al. A novel system for in vitro maturation of human oocytes[J]. Fertil Steril 2001, 75(6): 1185-93.
 [7] Roberts R, et al. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro[J]. Biol Reprod 2005, 72(1): 107-118.
 [8] Silva CC, Knight PG. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro matured oocytes[J]. Biol Reprod 1998, 58: 558.
 [9] Le Du A, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience [J]. Hum Reprod 2005, 20(2): 420-24.
 [10] Nogueira D, Staessen B, Ve Lde HVD, et al. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro matured oocytes [J]. Fertil Steril 2000, 7(2): 295-298.
 [11] Smith DS, et al. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours[J]. Fertil Steril 2000, 79(3): 541-544.

收稿日期: 2009-11-05

(上接第 54页)

体移位的结果^[1],既源自平衡重排列的样本,多来自父源。本文两例中患儿 1父母染色体结果正常,是新发生的突变所致。患者 2父母拒绝做染色体检查,尚不知患儿染色体异常来源。

国外研究表明,猫叫综合征 5p缺失的长度与症状无明显相关,关键在于缺失的部位。其关键片段位于 5p15.2、5p15.3^[2]。Gersh等研究发现 5p15.2关键区域的缺失在临床上表现为小头、圆脸、眼距宽、小下颌、低耳位等面容异常及智力发育迟缓的特征^[3]; Comish等发现 5p15.3的缺失导致患儿喉肌发育不全,患儿在哭叫时表现出高音调的猫叫样哭声特征,并伴有发音功能缺陷^[4]。Church等研究发现 5p15.32基因的缺失可导致患儿在临床上表现出语言发育迟缓的特征^[5]。本文中患儿 1染色体的断裂位点位于 5p15,患儿 1染色体的断裂位点位于 5p13,均包含上述猫叫基因、小头、智力发育迟缓相关基因、语言发育迟缓基因,亦有相应的临床表现,支持 5p15.2-15.3为猫叫综合征关键区的观点。

参 考 文 献

[1] 夏家辉, 李麓云. 染色体病 [M]. 北京: 中国科学出版社, 1989. 131.
 [2] Goodart SA, Smmons D, et al. Yeast artificial chromosome contig of the critical region for cri-du-chat syndrome [J]. 1994, 24(1) 63-68.
 [3] Gersh M, Grady D, Rojas K, et al. Development of diagnostic tools for the analysis of 5p deletions using interphase FISH [J]. Cytogenet Cell Genet 1997, 77(3-4): 246-251.
 [4] Comish KM, Cross G, Green A, et al. A neuropsychological-genetic profile of a typical cri-du-chat syndrome: implications for prognosis [J]. Med Genet 1999, 36(7): 567-570.
 [5] Church DM, Bengtsson U, Nielsen KV, et al. Molecular definition of deletion of different segments distal 5p that result in distinct phenotypic features [J]. Am J Hum Genet 1995, 65(5): 1162-1172.

收稿日期: 2009-05-22