

·临床研究·

## 不同氧浓度对单精子卵浆内注射技术胚胎发育及妊娠结局的影响

杨 雨, 徐艳文, 李 涛, 丁晨晖, 刘瑜亮, 袁 媛, 周灿权\*

(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

**摘 要:**【目的】探讨取卵后第 1-3 天外培养时不同氧浓度对于单精子卵浆内注射技术(ICSI)胚胎发育和妊娠结局的影响。【方法】回顾性分析了 645 例于 2011 年 1-12 月期间中山大学附属第一医院生殖中心行 ICSI 授精后第 3 天(D3)胚胎移植的周期的胚胎发育情况和临床结局,根据体外培养的氧浓度将其分为 5%低氧浓度组和 20%高氧浓度组。【结果】低氧组 D3 可用胚胎率(72.02%与 68.73%)和移植胚胎评分(22.53 与 20.10)较高氧组更高,但新鲜胚胎移植的临床结局没有显著性差异。累积妊娠率低氧浓度组(60.44%与 51.67%)显著高于高氧浓度组。在预后差如高龄和/或取卵数少的病人中,低氧组移植胚胎评分(20.66 与 16.71)、可利用胚胎率(76.11%与 64.55%)和胚胎植入率(22.27%与 10.08%)更高。【结论】低氧培养环境对于 ICSI 授精短期体外培养胚胎优于高氧培养环境。

**关键词:**氧浓度; ICSI; 体外受精; 胚胎移植

中图分类号:R711.6

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)01-0089-05

### Effect of Oxygen Concentration on Outcome of Women Undergoing ICSI and Embryo Transfer

YANG Yu, XU Yan-wen, LI Tao, DING Chen-hui, LIU Yu-liang, YUAN Yuan, ZHOU Can-quan\*

(Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of incubator oxygen concentration on the embryo development and outcome of women undergoing ICSI and embryo transfer. 【Methods】 A total of 645 ICSI cycles with fresh embryo transfer conducted in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University during January 2011 to December 2011 were retrospectively analyzed. According to the oxygen concentration during day 1-3 in vitro culture, cycles were classified as 5% oxygen concentration group and 20% oxygen concentration group. Day 3(D3) transfer embryo score and clinical outcomes were measured. 【Result】 Viable embryo rate (72.02% versus 68.73%) and mean score of transfer embryo (22.53 versus 20.10) in D3 culture were higher in low oxygen group while all clinical outcomes were similar. Cumulative pregnancy rate (60.44% versus 51.67%) was higher in lower oxygen group. To subgroup cycles with poor prognosis, mean score of transfer embryo (20.66 versus 16.71), viable embryo rate (76.11% versus 64.55%) and implantation rate (22.27% versus 10.08%) was significantly higher in low oxygen group. 【Conclusion】 In vitro culture of embryos deriving from ICSI in 5% oxygen concentration during the first 3 days is superior to culture in 20% oxygen concentration.

**Key words:** oxygen concentration; ICSI; in vitro fertilization; embryo transfer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1): 89-93]

进行体外受精与胚胎移植 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)时,单气培养系统是临床中最多被采用的胚胎体外培养方式。进行单气培养系统的培养箱内氧分压为 20%,CO<sub>2</sub>

为 6%。另外,三气培养系统也逐步被临床接受。三气培养系统的培养箱内通过氮气将氧分压降为 5%,CO<sub>2</sub> 仍保持为 6%。实际上,大部分哺乳动物输卵管和子宫的氧分压波动于 2%~8%之间,从输

收稿日期:2012-08-28

基金项目:国家“973”科技计划课题(2007CB948103);广东省科技计划项目(2008A030201028)

作者简介:杨雨,硕士研究生,E-mail:rebecca.yang@gmail.com; \*通信作者:周灿权,教授,博士生导师,E-mail:drzhoucanquan@163.com

卵管至子宫逐渐降低<sup>[1]</sup>,人类宫腔氧分压大约为 2%<sup>[2]</sup>。但是目前关于不同氧浓度对于人类胚胎发育及临床结局影响的文献是相当有限的,并且结局不尽一致。本研究的目的是要探索第 1~3 天外胚胎培养过程中,不同的氧浓度是否对临床结局是否有影响,并进行亚组分析以探索最有可能从降低的氧浓度培养条件获益的群体。有国外研究,降低氧浓度可以显著提高反应不良亚组的临床妊娠率<sup>[3]</sup>,因此本文的亚组分析包含反应不良的群体。胚胎对外环境的压力有一定的适应能力,适应能力的好坏直接影响到胚胎对压力的反应,可以是没有显著影响,也可以是发育停滞。对于氧浓度的压力也同样如此,胚胎来源的好坏会影响到面对相同氧化应激压力下胚胎发育的结局。年龄是影响辅助生育结局的一个重要因素,高龄往往伴随着卵子发育异常的增加。因此本文在进行亚组分析时纳入了胚胎来源条件不好的周期( $\geq 38$ 岁)。无论是反应不良还是高龄,都伴随着卵子发育环境的改变,进而影响到卵子的质量和随后的胚胎发育<sup>[4]</sup>。两者有一定的共性,所以本文将两者结合起来分析,以了解降低氧浓度是否会对这个预后差的群体带来益处。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

回顾性分析了中山大学附属第一医院生殖中心 2011 年 1-12 月期间因男方原因或前次周期 IVF 受精不良行单精子胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)授精,周期数 $\leq 3$ ,行第 3 天新鲜胚胎移植的周期资料,共 645 周期。然后选取同期病历中预后差的周期资料进行亚组的分析,纳入标准为年龄 $\geq 38$ 岁,和/或获卵数 $\leq 3$ ,共 83 周期。

### 1.2 研究对象分组

根据取卵后卵子及胚胎所在氧浓度的不同分为两组,单气培养箱(Forma,美国)培养为高氧组,台式三气培养箱(G185 培养箱,K-System,丹麦)为低氧组。第一部分低氧组共 225 个周期,高氧组 420 个周期。第二部分低氧组共 29 个周期,高氧组 54 个周期。

### 1.3 研究方法

1.3.1 超排卵方案 所有入选周期均采用长方案,即从黄体中期开始给予促性腺激素释放激素

(gonadotropin releasing hormone, GnRH-a)降调节,月经来潮后根据降调节水平开始促性腺激素(Gn)促排卵,结合超声观察和血清激素监测卵泡发育情况。当至少有一个卵泡平均经线达到 18 mm,或至少两个卵泡经线达到 17 mm 时,给予 HCG 6 000~10 000 U 诱发卵子最终成熟。人体绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)注射后 34~36 h,行阴道超声引导下经阴道穿刺取卵术,并记录获卵数。

1.3.2 受精、胚胎发育和妊娠的评价 两组卵子和胚胎在各自氧浓度的培养箱中培养。ICSI 后 16~18 h 观察受精情况,观察到 2 个原核(pronucleus, PN)为正常受精。移植当日观察胚胎形态,选取形态最优的胚胎进行移植,最多移植 3 个胚胎。胚胎评分:D3 胚胎的形态学分级参照 Yu<sup>[5]</sup>的方法并按中心实际进行调整,结合卵裂球的均一性和碎片情况进行判定,将形态学分级转化成分值,0 代表最差的胚胎,4 代表最好的胚胎。原方法中将 D3 天胚胎细胞数小于 5 者给予 0 分,本研究将卵裂球大小明显不均并且碎片数量大于 30%的胚胎评为 0 分,4 细胞胚胎按照卵裂球的均一性和碎片情况分级同细胞数 $\geq 5$ 的胚胎。各个胚胎所得分值与卵裂球数目的成绩为单个胚胎评分。移植胚胎分值的均值为平均移植胚胎评分(MES)<sup>[6]</sup>。移植后 14 日 HCG 定量阳性但 5~7 周末见妊娠囊为生化妊娠,根据 5~7 周 B 超所见,如有胎心搏动定义为临床妊娠;见妊娠囊但未见胎心搏动定义为早期流产;若孕囊定位不在宫内定义为宫外孕。妊娠达到 12 周有正常胎心搏动为继续妊娠。

1.3.3 相对指标计算方法 成熟卵子率为第二次减数分裂中期(meiosis II, M II)卵子/获卵数,受精率为 2PN 数/M II 卵子数,可利用胚胎为细胞数 $\geq 4$ 且胚胎形态优于或等于分值为 0 分的胚胎,具体为移植胚胎数与冷冻胚胎数之和。可利用胚胎率为可利用胚胎数/受精卵数,植入率为 5~7 周 B 超所见孕囊数/移植胚胎数,继续妊娠率为孕 12 周 B 超见到活胎的周期数/移植周期数。累积妊娠率为新鲜胚胎移植和/或冷冻胚胎移植获得继续妊娠的周期数/取卵周期数。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 11.0 进行统计学分析。连续型变量根据分布情况采用独立样本 *t* 检验或非参数检验,率的比较采用卡方检验。取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 不同氧浓度体外培养的总临床结局

2.1.1 一般情况比较 低氧组和高氧组的平均年龄,平均周期数,Gn总量,HCG日雌二醇(estradiol,E2)水平,获卵数均无差异(表1)。

2.1.2 胚胎发育情况和临床结局比较 两组成熟卵子率、受精率和移植胚胎数均无差异,低氧组可用胚胎率和移植胚胎评分均显著高于高氧组, $P$ 值分别为0.014和 $<0.001$ 。两组的胚胎植入率、HCG阳性率、临床妊娠率、早期流产率、继续妊娠率的比较均没有差异,但累积妊娠率低氧浓度组高于高氧浓度组(表2)。

### 2.2 不同氧浓度对预后差周期临床结局的影响

2.2.1 一般情况比较 低氧组和高氧组的平均年龄、平均周期数、Gn总量、HCG日E2水平、获卵数

均无差异(表3)。

2.2.2 胚胎发育情况和临床结局比较 两组成熟卵子率、受精率和可用胚胎率和移植胚胎数均没有差异,低氧组可利用胚胎率和移植胚胎评分均显著高于高氧组, $P$ 值分别为0.04和0.008。低氧组来源胚胎的植入率显著高于高氧组来源胚胎, $P$ 值为0.002。低氧组的HCG阳性率和临床妊娠率均有高于高氧组的趋势,两组比较 $P$ 值临界,分别为0.08和0.07(表4)。

## 3 讨论

传统单气培养箱20%的氧分压高于生理状态下的氧分压,而高氧浓度可能通过增加活性氧的产生对胚胎造成氧化损伤,其不良影响在多种动物实验包括小鼠、猪、牛等中已被证实<sup>[7]</sup>。然而,由于材料的局限性,人类胚胎的相关基础实验研

表1 基础特征与促排卵情况

Table 1 Baseline and ovarian stimulation characteristics

	5% oxygen group	20% oxygen group	Statistics	$P$ value
Number of cycles	225	420		
Age/year	30.7 ± 4.6	31.2 ± 4.5	$t = 1.37$	0.17
Cycle rank <sup>1)</sup>	1.36	1.37	$Z = 0.17$	0.87
BMI	20.7 ± 2.2	21.0 ± 2.5	$t = 0.51$	0.61
Base FSH/(IU·L <sup>-1</sup> )	5.8 ± 1.6	5.9 ± 1.7	$t = 0.85$	0.40
Total Gn dosage/IU	2199 ± 856	2243 ± 766	$t = 0.67$	0.50
E2 level on HCG injection day(ng/mL)	2881 ± 1271	2782 ± 1266	$t = 0.95$	0.35
Oocytes retrieved	12.4 ± 5.7	12.4 ± 6.3	$t = 0.08$	0.94

1) Wilconxon Rank Sum Test, the rest variables are analyzed by student's  $t$ -test

表2 胚胎参数和临床结局

Table 2 Embryology and clinical outcome

Category	5% oxygen group	20% oxygen group	Statistics	$P$ value
Mature oocyte rate/%	2298/2783(82.57)	4381/5212(84.06)	$\chi^2 = 2.9$	0.09
Fertilization rate/%	1798/2298(78.24)	3403/4381(77.67)	$\chi^2 = 0.28$	0.6
Viable embryo rate/%	1295/1798(72.02)	2339/3403(68.73)	$\chi^2 = 6.05$	0.014 <sup>2)</sup>
Number of embryos transferred <sup>1)</sup>	2.28	2.31	$Z = 0.66$	0.51
Mean score of transferred embryo <sup>1)</sup>	22.53	20.10	$Z = 4.41$	$<0.001$ <sup>2)</sup>
Positive HCG rate/%	117/225(52.00)	213/420(50.71)	$\chi^2 = 0.10$	0.76
Implantation rate/%	161/513(31.38)	282/969(29.10)	$\chi^2 = 0.83$	0.36
Clinical pregnancy rate/%	109/225(48.44)	200/420(47.62)	$\chi^2 = 0.04$	0.84
Early miscarriage rate/%	5/225(2.22)	14/420(3.33)	$\chi^2 = 1.17$	0.43
Ongoing pregnancy rate/%	101/225(44.89)	183/420(43.57)	$\chi^2 = 0.31$	0.75
Cumulative pregnancy rate / %	136/225(60.44)	217/420(51.67)	$\chi^2 = 4.56$	0.03 <sup>2)</sup>

1) Wilconxon Rank Sum Test, the rest variables are analyzed by chi-square test; 2) $P < 0.05$

表 3 亚组基础特征与促排卵情况

Table 3 Subgroup baseline and ovarian stimulation characteristics

	5% oxygen group	20% oxygen group	Statistics	P value
Number of cycles	29	54		
Age/year	38.38 ± 2.3	37.70 ± 3.9	$t = 0.87$	0.39
Cycle rank <sup>1)</sup>	1.66	1.54	$Z = 0.59$	0.56
BMI	21.35 ± 2.5	22.18 ± 2.6	$t = 1.41$	0.16
Base FSH/(IU·L <sup>-1</sup> )	6.43 ± 1.3	6.71 ± 2.5	$t = 0.58$	0.57
Total Gn dosage/IU	3076 ± 1043	2857 ± 954	$t = 0.97$	0.34
E2 level on HCG injection day(ng/mL)	1019 ± 189	1147 ± 156	$t = 0.34$	0.74
Oocytes retrieved	6.17 ± 3.5	7.46 ± 5.5	$t = 1.14$	0.26

1) Wilcoxon Rank Sum Test, The rest variables are analyzed by student's  $t$ -test

表 4 亚组胚胎参数和临床结局

Table 4 Subgroup embryology and clinical outcome

	5% oxygen group	20% oxygen group	Statistics	P value
Mature oocyte rate	147/179(82.12)	345/403(85.61)	$\chi^2 = 1.15$	0.28
Fertilization rate	113/147(76.87)	268/345(77.68)	$\chi^2 = 0.62$	0.43
Viable embryo rate	86/113(76.11)	173/268(64.55)	$\chi^2 = 4.87$	0.04 <sup>2)</sup>
Number of embryos transferred <sup>1)</sup>	2.28	2.39	$Z = 0.52$	0.60
Mean score of transferred embryo <sup>1)</sup>	20.66	16.71	$Z = 2.64$	0.008 <sup>2)</sup>
Implantation rate	18/66(27.27)	13/129(10.08)	$\chi^2 = 9.66$	0.002 <sup>2)</sup>
Positive HCG rate	13/29(44.83)	14/54(25.93)	$\chi^2 = 3.07$	0.08
Clinical pregnancy rate	12/29(41.38)	12/54(22.22)	$\chi^2 = 3.37$	0.07
Ongoing pregnancy rate	8/29(27.59)	10/54(18.52)	$\chi^2 = 0.91$	0.34

1) Wilcoxon Rank Sum Test, the rest variables are analyzed by chi-square test; 2)  $P < 0.05$

究较少。Petersen 等<sup>[8]</sup>对不同氧浓度培养箱培养解冻的人类卵裂期胚胎,发现低氧环境囊胚形成率增加。Dumoulin 等<sup>[9]</sup>用 D2 或 D3 移植后废弃的人类胚胎继续培养至囊胚后进行细胞计数,结果在低氧环境中得到的囊胚细胞数显著高于高氧环境。

在临床观察性研究中,不同氧浓度下人类胚胎发育及临床结局的结论也不尽一致。多数囊胚培养及移植周期研究认为低氧培养环境有利于囊胚发育和提高临床妊娠率。但也有研究未发现临床结局有改善<sup>[6]</sup>。但低氧可能对提高累积妊娠率、活产率和反应不良患者的临床妊娠率有帮助<sup>[3]</sup>。相对于第 5 天囊胚移植,关于卵裂期胚胎移植培养环境不同氧浓度对于胚胎发育和临床结局的研究更加有限。Dumoulin 等<sup>[9]</sup>没有发现低氧相对于高氧对于胚胎发育和临床结局存在优势,但 Kea 等<sup>[10]</sup>报道虽然第 3 天胚胎发育评分低氧环境更好,但临床指标包括植入率和妊娠率均没有改善。

在常规 IVF 过程中,卵子周围的颗粒细胞可

以对其中卵子提供一定的保护作用,中和一部分活性氧可能带来的损伤作用,而 ICSI 来源的胚胎缺乏这种保护机制,它们对于活性氧更加敏感<sup>[11]</sup>,减少活性氧对胚胎可能造成的不良影响更多依赖于外在的氧浓度。故本研究只选取了 ICSI 周期。

我们的数据与 Kea 等<sup>[10]</sup>报道的结果相似,低氧组移植胚胎评分更高,但临床结局没有显著差异。这种现象有两种可能的解释:①如 Bavister 等<sup>[12]</sup>所述,在第 1~3 天的培养过程中,高氧带来的损伤可能因为胚胎移植入子宫而得以修复;②在早期胚胎体外培养时,低氧所能够带来的改善很轻微或没有本质性的改善,不足以影响临床结局。卵子发育成熟过程中自身也带有针对活性氧解毒的物质储备,胚胎发育过程中自身代谢也会产生活性氧,这些活性氧在生理范围内参与到细胞内信号转导,对于细胞的增殖、分化以及鼠胚胎顺利通过两细胞期阻滞是必须的<sup>[13]</sup>。因此活性氧是否带来不利的影响需要同时考虑活性氧的量,

以及胚胎自身对外环境的适应性问题。本研究的结果支持第1~3天高氧的培养环境未对胚胎后续的发育造成显著影响的观点。

本研究中低氧组可用胚胎率显著高于高氧组。Kovacic等<sup>[3]</sup>的研究结果显示虽然对于一般人群新鲜胚胎移植临床结局高氧和低氧并没有差别,但是低氧胚胎培养周期的累积临床妊娠率明显提高,并且反应不良亚组D3胚胎移植的临床结局低氧组也显著提高,提示低氧或许可以挽救一部分本身来源有缺陷而对外环境适应性差的胚胎,使其发育达到可以冷冻和继续培养的标准。

因此,我们进一步分析预后差周期的数据,包括高龄和取卵数 $\leq 3$ 周期。本研究中,在低氧培养条件下移植胚胎评分、可利用胚胎率和胚胎植入率均较高氧组显著提高,HCG阳性率和临床妊娠率均有高于高氧组的趋势,两组比较P值在临界水平,提示低氧培养环境即使仅在第1~3天的短期培养过程中,也能对条件不良患者的胚胎带来有益的改善。

本实验中我们使用了G185培养箱提供5%的低氧环境。这是一种顶置型的培养箱,分割成十个小室,与Fujiwara<sup>[14]</sup>提到的COOK培养箱相似。这种独立小室培养箱的主要优势在于能够快速从温度和气体的扰动中恢复。这对于低氧浓度培养尤为重要,因为5%的氧浓度远低于大气氧浓度,更易发生明显波动。

综上所述,低氧培养条件下可用胚胎增加,周期累积妊娠率提高,且在预后差的病人中使用低氧培养环境提高了胚胎种植率。因此,在ICSI来源胚胎短期的体外培养中,低氧培养环境要优于高氧培养环境。

#### 参考文献:

- [1] Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits[J]. J Reprod Fertil, 1993, 99(2): 673-679.
- [2] Ottosen LD, Hindkaer J, Hush M, et al. Observations on intrauterine oxygen tension measured by fibre-optic microsensors [J]. Reprod Biomed Online, 2006, 13(3): 380-385.
- [3] Kovacic B, Sajko MC, Vlasisavljević V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles[J]. Fertil Steril, 2010, 94(2): 511-519.
- [4] Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, et al. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment[J]. Fertil Steril, 2012, 98(4): 986-994.
- [5] Hu Y, Maxson WS, Hoffman DI, et al. Hoffman et al. Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality[J]. Fertil Steril, 1998, 69(4): 650-657.
- [6] Kovacic B, Vlasisavljević V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes[J]. Reprod Biomed Online, 2008, 17(2): 229-236.
- [7] Rho GJ, S B, Kim DS, Son WJ, et al. Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer [J]. Mol Reprod Dev, 2007, 74(4): 486-496.
- [8] Petersen A, Mikkelsen AL, Lindenberg S. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84(12): 1181-1184.
- [9] Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, et al. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture[J]. Hum Reprod, 1999, 14(2): 465-469.
- [10] Kea B, Gebhardt J, Watt J, et al. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 2007, 87(1): 213-216.
- [11] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Incomplete denudation of oocytes prior to ICSI enhances embryo quality and blastocyst development [J]. Hum Reprod, 2006, 21(11): 2972-2977.
- [12] Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 9(5): 484-486.
- [13] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function[J]. Physiol Rev, 2002, 82(1): 47-95.
- [14] Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, et al. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator [J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(1): 5-9.

(编辑 张恩健)