# 短时受精对体外受精妊娠结局的影响

李瑞岐，王文军*，黄丽丽，马芸，欧阳能勇，麦美琪，陈静华，张宁锋，区颂邦
（中山大学孙逸仙纪念医院生殖中心，广州 510120）

**摘 要**：【目的】研究短时受精(2 h)对体外受精(IVF)多精受精率以及妊娠结局的影响。【方法】对本中心 658 名 IVF 患者进行随机分组，分为 2 h 受精组(A 组)和常规受精组(B 组)，研究 2 h 受精对 IVF 受精率(2PN 率)、多精受精率(>2PN 率)、胚胎质量、临床妊娠率和种植率的影响。【结果】在 658 名 IVF 患者中有 61 名患者由于取消 ET 没有纳入最后统计，2 h 受精组和对照组分别有 294 和 303 名患者参与。统计结果显示，短时受精组与对照组相比 2PN 率显著下降（68.8% vs 72.1%，$P < 0.05$），而短时受精组与对照组多精受精率(11.4% vs 11.7%，$P > 0.05$)、可用胚胎率(86.5 %vs 86.1%，$P > 0.05$)、临床妊娠率(47.6% vs 42.6%，$P > 0.05$)和种植率(28.6% vs 26.5%，$P > 0.05$)没有统计学意义。【结论】2 h 受精没有降低多精受精率，对临床结局没有明显改善作用。

**关键词**：短时受精；多精受精率；妊娠率；种植率
**中图分类号**：R711.6 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2012)05-0683-04

## Effect of Short Time Insemination on Outcome of In Vitro Fertilization

LI Rui-qi, WANG Wen-jun*, HUANG Li-li, MA Yun, OUYANG Neng-yong, MAI Mei-qi, CHEN Jing-hua, ZHANG Ning-feng, OU Song-bang
(Reproductive Medical Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract**: 【Objective】To assess the effect of short time insemination (2 hours, 2 h) on the polyspermy rate and the outcome of in vitro fertilization (IVF).【Methods】In this prospective study, 658 patients were randomized divided into short time insemination group (group A) and standard insemination group (group B). The rates of fertility, polyspermy, usable embryos, clinical pregnancy and implantation were studied.【outcome】Sixty-one patients of the total participates were excluded because of no embryos available. The data of the other 597 patients were analyzed. There were 294 patients in the short co-incubation group and 303 patients in the standard insemination group. The fertility rate was significantly lower in group A than that in group B (68.8% vs 72.1%, $P < 0.05$). But the rates of polyspermy (11.4% vs 11.7%, $P > 0.05$), usable embryos (86.5% vs 86.1%, $P > 0.05$), clinical pregnancy (47.6% vs 42.6%, $P > 0.05$) and implantation (28.6% vs 26.5%, $P > 0.05$) had no significant differences.【conclusion】2 h insemination did not improve the polyspermy rate and the outcome of IVF.

**Key words**: short time insemination; polyspermy rate; pregnancy rate; implantation rate
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(5):683-686]

常规体外受精(in vitro fertilization,IVF)中精卵共孵育时间一般为 16~20 h，卵子周围的精子密度要远高于体内受精卵子周围的精子密度，长时间共孵育可能会对卵子后期发育产生不利影响，例如高密度精子释放的反应性氧自由基(reaetive oxygen speeies,ROS)能够影响胚胎的质量[1]，使透明带变硬，影响胚胎的着床[2]。为了降低大量精子和卵丘细胞代谢物对卵子的不利影响，人们开始尝试将受精时间缩短到 1~2 h[3-4]。并且在受精 6 h 后进行了早期剥除卵丘细胞，便与早期行胞聚内单精子注射(intracytoplasimc sperm injection,ICSI)补救。甚至，有文章中将受精时间缩短到了 30 s[5]。虽然已有多位学者对短时受精进行了报道，但是仍旧没有一致的结论。一些研究认为缩短受精时间能够提高胚胎质量，改善临床结局[6]。但是，有的研究结果显示缩短受精时间对胚胎质量和临床

**收稿日期**：2012-05-25
**基金项目**：国家自然科学基金(81070466)；广东省科技计划项目(2010B031600043)
**作者简介**：李瑞岐，硕士，研究实习员，E-mail：lirq07@sina.com；*通信作者：王文军，副教授，硕士生导师，E-mail：wenjungzcn@163.com

结局没有显著影响[7],甚至还使受精率有所下降[8]。本文研究目的是通过随机对照研究，比较短时受精对卵子正常受精率、多精受精率、临床妊娠率和种植率,进一步探讨短时受精对 IVF 结局的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究经伦理委员会讨论通过,并且,患者在签署知情同意书后方可进入研究周期，每对夫妇只参与一次。利用随机数字软件制作随机表,将 IVF 周期患者随机分为短时受精(受精 2 h)和常规 IVF 组(受精 16 ~ 18 h,B 组)两组。实验纳入标准为:超排卵方案为长方案;男方精液检查根据世界卫生组织(WHO)第四版男科精液常规检查手册标准检查后可行 IVF。

### 1.2 精子制备

男方患者禁欲 3 d 后,采用手淫法取精,待精液液化后采用梯度离心法(500 ×$g$,15 min)收集活动精子,同时对精子密度、活力进行评估。第一步离心完之后收集沉淀，再用 SpermRinse（Vitrolife, Sweden)和 IVF 受精液(Vitrolife, Sweden)300 ×$g$,5 min 分别离心洗涤 1 次。之后将沉淀放入加有 1 mL IVF 液的离心管底部进行上游。40 min 后收集上清备用。

### 1.3 常规受精

取卵日下午 15:00 左右,在加有卵丘卵母细胞复合体(cumllus oocyte complexes,COCs)的 3037 皿(Falcon,3037)中加人适量上游后的精子,使平均每个卵子精子数为 1~1.5 × $10^5$/mL，每个 3037 皿中所含 COCs 数不超过 16 个。

### 1.4 短时受精

加精过程同常规受精,精卵孵育 2 h 后,用巴氏吸管将卵子转移至另一加有 1mL IVF 培养液并盖油的 3037 培养皿中,此时卵子周围仅剩少量卵丘细胞。

### 1.5 胚胎培养与移植

受精次日剥除卵子周围颗粒细胞后，将单个受精卵置于 20 μL 的 G1(Vitrolife, Sweden)培养液微滴中,观察受精后培养至受精后第 3 天,对胚胎进行观察评分，并挑选可用胚胎进行移植或者冷冻。胚胎评分标准为:Ⅰ级,细胞大小均匀,状规则,透明带完整,胞质清晰,无颗粒现象,碎片<5%卵裂球面积;Ⅱ级,细胞大小略不均,形态略不规则,胞质可有颗粒现象;Ⅲ级,细胞大小明显不均,可有明显的形态不规则,胞质可有颗粒现象,碎片 21% ~ 50%;Ⅳ级,细胞大小严重不均,胞质可有严重的颗粒现象,碎片 > 50%。冷冻胚胎的选择标准为:第 2 天胚胎细胞数 ≥ 2,第 3 天胚胎达到或超过 5 细胞,分级为Ⅰ~ Ⅲ级;或 4 细胞Ⅰ级胚胎,均被冷冻。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件分析（$t$ 和 $\chi^2$),$P < 0.05$ 则认为有统计学意义。

## 2 结 果

进入本研究的共 658 个 IVF 周期，由于卵巢过度刺激征、卵子不成熟、多精受精等原因导致胚胎移植(embryo transplantation,ET)取消的共 61 个周期,其中受精失败行补救 ICSI(RICSI)的短时受精组有 1 例,常规受精组没有发生。本文对进行新鲜周期 ET 的 597 个周期进行了统计分析,其中,2 h 受精组 294 例,常规受精组 303 例。患者的不孕原因参见表 1。

**表 1 患者不孕原因诊断**

**Table 1 Demographic characteristics of patients in the two groups**

| | Group A (%) | Group B (%) |
|---|---|---|
| Tubal factor | 153(25.6) | 156(26.1) |
| Endometriosis | 6(1.0) | 6(0.8) |
| Polycystic ovaries | 118(19.8) | 119(19.9) |
| Unexplained | 17(2.8) | 22(3.7) |

表 2 中我们统计了可能影响 IVF 结局的一些因素,在这两组中男、女方年龄、基础 FSH、基础 LH、平均 Gn 用量、HCG 日子宫内膜厚度以及平均周期数和平均移植Ⅰ级胚胎数均没有统计学意义，但是 A 组中平均移植胚胎数相比于 B 组有统计学意义(2.3 vs 2.2,$P < 0.05$)。

表 3 中对比了 A、B 两组男方精液处理先后精子密度以及 A、B 级精子的比例,各项比较均没有统计学意义。

表 4 中结果显示,A、B 两组成熟卵子数分别为 2 654 枚和 2 566 枚，冷冻胚胎数分别为 1 073

表 2　患者自身因素统计

Table 2　The facts of patients in the two groups

| | Group A | Group B | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| Female age / years | 32.3 ± 4.4 | 32.0 ± 44.5 | 0.815 | 0.415 |
| Male age / years | 34.0 ± 4.4 | 34.1 ± 5.1 | −0.451 | 0.653 |
| Transfered embryo number per cycle | 2.3 ± 0.6 | 2.2 ± 0.58 | 2.010 | 0.045 |
| Baseline FSH / IU | 8.2 ± 3.4 | 8.3 ± 3.6 | −0.381 | 0.703 |
| Baseline LH / IU | 4.6 ± 3.1 | 4.9 ± 3.56 | −1.040 | 0.299 |
| Average dose of Gn | 2032 ± 721 | 1933 ± 998 | 1.391 | 0.165 |
| Endometrial thickness on hCG day / mm | 11.5 ± 2.5 | 11.6 ± 3.0 | −0.507 | 0.612 |
| Average cycle | 1.4 ± 0.7 | 1.3 ± 0.7 | 0.719 | 0.473 |
| Average transfered grade I embryo number | 0.6 ± 1.0 | 0.6 ± 0.9 | 0.996 | 0.320 |

Independent-samples $t$ test; Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

表 3　两组中精子处理前后对比

Table 3　The comparison of sperm before and after washing

| | Group A | Group B | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| Sperm density before washing | 84.3±34.5 | 84.7±38.2 | −0.149 | 0.882 |
| Rates of grade A before washing | 31.2±14.3 | 30.2±14.6 | 0.793 | 0.428 |
| Rates of grade B before washing | 15.0±7.4 | 15.0±7.4 | −0.050 | 0.960 |
| Sperm density after washing | 119.8±66.9 | 123.5±76.1 | 0.634 | 0.526 |
| Rates of grade A after washing | 87.2±8.6 | 87.1±8.0 | 0.124 | 0.901 |
| Rates of grade B after washing | 3.6±1.6 | 3.7±1.9 | −1.146 | 0.252 |

Independent-samples $t$ test; Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

表 4　两组中受精率、胚胎质量、妊娠率以及种植率

Table 4　The rates of fertility, pregnancy, and implantation in the two groups

| | Group A | Group B | $\chi^2$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|
| 2PN rate (%) | 68.8(1 826/2 654) | 72.1(1 849/2 566) | 6.637 | 0.01 |
| Usable embryo rate (%) | 86.5(1 737/2 008) | 86.1(1 749/2 031) | 0.129 | 0.719 |
| Rate of having frozen embryo cycle | 68.4(201/294) | 65.7(199/303) | 0.489 | 0.485 |
| Polyspermy rate (%) | 11.4(303/2 654) | 11.7(301/2 566) | 0.125 | 0.723 |
| Clinical pregnancy rates (%) | 47.6(140/294) | 42.6(129/303) | 1.534 | 0.216 |
| Implantation rates (%) | 28.6(190/664) | 26.5(174/656) | 0.722 | 0.396 |

Pearson chi-square test; Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

枚和 1 095 枚,有冷冻胚胎的比例分别为 68.4%和 65.7%。A 组 2PN 率与 B 组有统计学意义(68.8% vs 72.1%, $P < 0.05$),而多 PN 率(11.4% vs 11.7%)、可用胚胎率(86.5% vs 86.1%)、临床妊娠率(47.6% vs 42.6%)和种植率(28.6% vs 26.5%),在两组间均没有统计学意义($P > 0.05$)。

## 3　讨　论

有研究指出,受精时间的延长可使培养环境中ROS 的水平明显上升[9]。培养环境中 ROS 能够影响质膜中多不饱和脂肪酸,降低质膜的流动性,对卵母细胞发育潜能产生不利影响[1]。Dirnfeld 等[6]研究显示,受精 1 h 与受精 16 ~ 18 h 相比,虽然受精率和卵裂率没有显著提高,但是妊娠率和种植率明显提高。而本研究结果显示,2 h 受精妊娠率和种植率较常规受精有所提高,但是,没有统计学意义。有报道称,各文献中的受精精子浓度、胚胎培养方式等不同可能是造成结果不一致的原因[10]。

本中心在女方年龄大于等于35周岁或者周期数大于1时,在可选择移植3个胚胎,而女方年龄小于35周岁或者为第一周期,则移植胚胎数只能小于3个。因此,本实验中A组平均移植胚胎数显著多于B组(2.3 vs 2.2,$P<0.05$)这可能是由于A组中女方年龄偏大(32.3 vs 32.0, $P>0.05$)以及平均周期数较多(1.4 vs 1.3, $P>0.05$)所致。

另外,本研究显示,与常规受精相比2 h受精并没有改善多精受精发生率(11.4% vs 11.7%, $P>0.05$),与一些文献报道一致[8]。李涛等[11]将受精时间缩短至10 min多精受精率仍然没有显著降低。金海霞等[12]指出,短时受精可降低0PN、1PN率,但是多PN率没有改善。这可能与受精时间不够短有关,Bungum等[5]研究显示,当受精时间缩短到30 s时,与受精90 min相比,可以显著降低多精受精率,但是妊娠率和种植率有所下降。

值得注意的是2 h受精与常规受精相比,2PN率显著降低(68.8% vs 72.1%,$P<0.05$),与一些研究结果相一致[8]。Kattera等[13]在研究中指出,取卵时未成熟的卵母细胞在受精过程中能够体外成熟并受精,因此我们猜测,随着年龄增长卵泡发育的同步性会下降,致使在取卵时有部分未成熟卵子,这些卵子能够体外成熟并在常规受精过程中受精,而在短时受精时由于脱离了受精环境而无法受精,从而造成短时受精组2PN率低于常规受精组。但是可用胚胎率(86.5% vs 86.1%, $P>0.05$)并没有降低,提示体外成熟的这部分受精卵并没有增加可用胚胎数。

综上所述,本研究结果显示2 h受精在本实验条件下没有改善临床结局,多精受精率和胚胎质量也没有明显改善。

**参考文献:**


[1] Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species[J]. Fertil Steril, 2004, 82(3): 593-600.

[2] Dirnfeld M, Shiloh H, Bider D, et al. A prospective randomised controlled study of the effect of short coincubation of gametes during insemination on zona pelluc-ida thickness[J]. Gynecol Endocrinol, 2003, 17(5): 397-403.

[3] Coskun S, Roca GL, Elnour AM, et al. Effects of reducing insemination time in human in vitro fertilization and embryo development by using sibling oocytes[J]. J Assist Reprod Genet, 1998, 15(10): 605-608.

[4] Kattera S, Chen C. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study[J]. Fertil Steril, 2003, 80(4): 1017-1021.

[5] Bungum M, Bungum L, Humaidan P. A prospective study, using sibling oocytes, examining the effect of 30 seconds versus 90 minutes gamete co-incubation in IVF[J]. Hum Reprod, 2006, 21(2): 518-523.

[6] Dirnfeld M, Bider D, Koifman M, et al. Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves in vitro fertilisation outcome: a prospective, rendomised, controlled study[J]. Hum Reprod, 1999, 14(10): 2562-2564.

[7] Swenson K, Check JH, Summers-Chase D, et al. A randomized study comparing the effect of standard versus short incubation of sperm and oocyte on subsequent pregnancy and implantation rates following in vitro fertilization embryo transfer[J]. Arch Androl, 2000, 45(1): 73-76.

[8] Barraud-Lange V, Sifer C, Pocaté K, et al. Short gamete co-incubation during in vitro fertilization decreases the fertilization rate and does not improve embryo quality: a prospective auto controlled study[J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(7): 305-310.

[9] Enkhmaa D, Kasai T, Hoshi K. Long-time exposure of mouse embryos to the sperm produces high levels of reactive oxygen species in culture medium and relates to poor embryo development [J]. Reprod Domest Anim, 2009, 44(4): 634-637.

[10] Lundqvist M, Johansson U, Lundkvist O, et al. Reducing the time of co-incubation of gametes in human in-vitro fertilization has no beneficial effects[J]. Reprod Biomed Online, 2001, 3(1): 21-24.

[11] 李涛, 任姿, 张敏芳, 等. 超短时受精对人类配子体外多精受精发生率的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(3): 67-69.

[12] 金海霞, 孙莹璞, 戴善军, 等. 短时受精与长时受精对体外受精及临床妊娠结局的影响[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(2): 56-58.

[13] Kattera S, Chen C. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study[J]. Fertil Steril, 2003, 80(4): 1017-1021.


(编辑 张恩健)