

体外受精和卵胞浆单精子注射完全受精失败的临床因素分析

张文红, 龙晓林, 刘寒艳, 凌家炜, 张伟良, 李 莉, 刘见桥

(广州医学院第三附属医院生殖医学中心, 广东 广州, 510150)

摘要:【目的】分析体外受精(IVF)和卵胞浆内单精子注射(ICSI)治疗中完全受精失败(TFF)发生的临床原因。【方法】收集本中心2007年1月至2011年5月间辅助生殖治疗数据,分IVF组(5778例)、half-ICSI组(146例)、ICSI组(821例)和PESA-ICSI组(274例)进行 χ^2 检验、 t -检验和Logistic回归分析等统计分析,并对部分ICSI完全受精失败卵母细胞进行免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜观察。【结果】IVF组和ICSI组TFF发生率分别为2.1%和2.3%($P > 0.05$);half-ICSI组IVF部分TFF发生率为21.9%,显著高于其他各组($P < 0.01$)。除half-ICSI组,其他各组中获成熟卵数 ≤ 3 的患者TFF发生率高于获成熟卵数 > 3 患者($P < 0.01$)。单纯畸精子症对IVF和ICSI治疗周期受精结果的影响无统计学意义($P > 0.05$),且前次IVF受精失败不影响再次ICSI的受精结局($P > 0.05$),但少精和弱精是辅助生殖治疗周期受精失败的高危影响因素($P < 0.05$)。【结论】低获卵数是辅助生殖治疗中完全受精失败的高危因素,获取适当数目成熟卵母细胞是治疗成功的关键;畸精子症对IVF或ICSI的受精结局无显著影响;ICSI治疗是前次IVF治疗完全受精失败患者的首选。

关键词: 体外受精, 卵胞浆内单精子注射, 完全受精失败

中图分类号: R714.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)04-0499-05

Clinical Factors of Total Fertilization Failure after IVF or ICSI

ZHANG Wen-hong, LONG Xiao-lin, LIU Han-yan, LING Jia-wei, ZHANG Wei-liang, LI Li, LIU Jian-qiao

(Center for Reproductive Medicine, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the clinical factors leading to total fertilization failure (TFF) after in-vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). 【Methods】All couples who underwent IVF (5778), half-ICSI (146), ICSI (821), and PESA-ICSI (274) between January 2007 and May 2011 in our center were involved in the study. Data were analyzed by χ^2 test, multivariate logistic regression or student's t -test. Some MII oocytes of TFF in group ICSI were detected by confocal microscopy coupling with immunofluorescence. 【Results】The TFF rates in group IVF and ICSI were 2.1% and 2.3%, respectively ($P > 0.05$), while it was 21.9% for those undergoing IVF in group half-ICSI ($P < 0.01$). The TFF rates were higher if oocyte yield was poor (≤ 3) in all groups except group half-ICSI ($P < 0.01$), asthenozoospermia and oligozoospermia were both high risk factors leading to TFF ($P < 0.05$), but TFF with ICSI could not be predicted by teratozoospermia and TFF in a previous IVF cycle ($P > 0.05$). 【Conclusion】Low oocyte yield is disadvantageous for fertilization in either IVF or ICSI cycle, it is the key for success to get proper number of oocytes in an ART cycle. There is no impact for teratozoospermia on the fertilization rates in IVF or ICSI cycle. For couples with TFF in a previous IVF cycle, ICSI will be the first choice.

Key words: in-vitro fertilization; intracytoplasmic sperm injection; total fertilization failure

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4):499-503]

随着体外受精(in-vitro fertilization, IVF)和卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)等辅助生殖技术的发展,众多不孕不育夫妇拥有了自己的孩子。但有报道在常规

IVF治疗过程中,有5%~10%左右的患者因所有成熟卵母细胞无法受精而使治疗失败;进一步的ICSI治疗仍有1%~3%^[1-3]的患者完全受精失败(total fertilization failure, TFF)。目前多数研究^[1,4-6]

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 广东省计划生育委员会科研基金(2009305), 广东省科技计划项目(2010B031600299); 广东省医学科研基金(A2012271)

作者简介: 张文红, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 配子发生、受精及胚胎发育, E-mail: zhangwh98@yahoo.com.cn

主要针对 IVF 或 ICSI 治疗中完全受精失败的机理进行, 鲜见对完全受精失败临床因素的分析报道^[3]。本文收集近年在本生殖中心进行辅助生殖治疗患者的临床和实验室相关资料, 对不同方法助孕周期中成熟卵母细胞完全受精失败发生的可能临床因素进行分析, 为进一步临床治疗方案的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究资料

收集本生殖中心 2007 年 1 月至 2011 年 5 月间行 IVF 治疗患者以及利用射出精、经皮附睾精子抽吸术 (percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA) 取精行 ICSI 治疗共 6873 例患者的临床和实验室相关数据; 同时获取同期进行 half-ICSI 治疗 146 例患者的临床和实验室相关数据。

1.2 实验分组

根据《临床诊疗指南 辅助生殖技术与精子库分册》^[7], 结合患者情况制定助孕方法并采用本中心常规方案超促排卵^[8]。按助孕方式及精子来源的不同, 分 IVF 组、half-ICSI 组、ICSI 组和 PESA-ICSI 组, 获取各组的受精率、临床妊娠率和完全受精失败发生率等临床和实验室数据。其中 half-ICSI 组为一个治疗周期中部分卵母细胞行 IVF, 其余部分行 ICSI; 其入组条件为获卵数大于 8 个且满足下列至少 1 项: ①畸形精子症且精子畸形指数 (the sperm deformity index, SDI) ≥ 1.6 ^[9]; ②精子顶体酶活力异常 (顶体酶活力 $< 48.2 \mu\text{IU}/10^6$ 精子)^[10]; ③精液常规优选处理后前向运动精子百分率 20% ~ 30%, 且精子密度 $1 \sim 5 \times 10^6/\text{mL}$ ^[11]; ④原发 5 年且女方无明显输卵管阻塞性不孕; ⑤上次 IVF 受精率 $< 30\%$ 或完全受精失败患者。

常规精液检查方法参照《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版进行, 畸形精子症的诊断标准是正常形态精子百分率低于参考值下限 4%, 少精子症和弱精子症的诊断标准是精子浓度和前向运动精子百分数分别低于参考值下限 $15 \times 10^6/\text{mL}$ 和 32%^[9]。

1.3 ICSI 后未受精卵母细胞的固定及免疫荧光染色

在患者知情并同意后, 收集部分 ICSI 治疗中完全受精失败患者的未受精卵母细胞, 用 40 g/L

的多聚甲醛在室温下进行固定, 参照 Gook 等^[12]的方法进行制片和荧光染色, 并用指甲油在玻片四角点四个柱, 盖上盖玻片并小心按压, 置 -20°C 避光保存待用。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

在激光共聚焦显微镜下用 Ex488 nm, EmBP590/50 nm 波长观察减数分裂纺锤体或微管的绿色荧光信号; 用 Ex543nm, EmBP650LPnm 观察染色体红色荧光信号, 扫描获取图片, 保存实验结果。

1.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件, 运用 χ^2 检验、 t -检验和 Logistic 回归分析对相应数据进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同助孕方法治疗周期结果比较

根据助孕方法不同, 对各治疗组的平均受精率、临床妊娠率以及完全受精失败发生率进行比较分析发现, IVF 组的平均受精率显著高于其他各组 ($P < 0.01$), 但不同精液来源 ICSI 治疗各组平均受精率间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各组临床妊娠率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); half-ICSI 组 IVF 部分完全受精失败发生率为 21.9%, 显著高于常规 IVF 组、ICSI 组和 PESA-ICSI 组 ($P < 0.01$; 表 1), 表中 half-ICSI 组平均受精率为 ICSI 部分数据, 完全受精失败发生周期为 IVF 部分数据)。

2.2 不同助孕方法完全受精失败周期数据分析

IVF 组 5778 获卵周期中, 完全受精失败周期 120 例, 其中原发不孕患者完全受精失败发生率 2.8%, 与继发不孕完全受精失败发生率 1.5% 间差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2)。120 例受精失败患者中 44 名患者有两次或以上治疗周期, 其中 9 例再次 IVF 平均受精率 46.3%, 显著低于 IVF 组平均受精率 78.8%, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 19 例再次 ICSI 受精正常; 再次 IVF 受精失败 7 例 (其中 6 例为 half-ICSI), 再次 ICSI 受精失败 1 例; 5 例首次因反应差取消周期, 2 例首次 IVF 仅 OPN 受精, 1 例首次 IVF 获卵未成熟。

146 例进行 half-ICSI 治疗周期中, ICSI 部分全部受精正常, 其平均受精率为 73.0%, IVF 部分

平均受精率 34.8%，两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。进一步分析 97 例 half-ICSI 原发性不孕患者中有 25 例 IVF 完全受精失败，受精失败发生率 25.8%，高于继发性不孕患者的 14.3%；不同精子来源的 ICSI 治疗组继发不孕患者的受精失败发生率高于原发不孕患者，但两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$ ；表 2)。

除 half-ICSI 组，其他各组中获成熟卵母细胞数 ≤ 3 个的患者完全受精失败发生率都显著高于获成熟卵数 > 3 的患者，两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。其中获卵数 ≤ 3 周期中，IVF 组 304 个有 37 例完全受精失败，受精失败发生率 12.2%；ICSI

组 68 例有 20.6% 完全受精失败；PESA-ICSI 组 15 例中有 4 例完全受精失败 (表 2)。t-检验分析各组获卵数 ≤ 3 和获卵数 > 3 患者的平均年龄，仅 IVF 组平均年龄分别为 35.0 ± 4.4 和 32.2 ± 4.2 ，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

根据完全受精失败患者临床检查给出的不孕因素及诊断结果，表 3 进一步分析各相关因素致完全受精失败危险性。经 Logistic 回归分析显示，IVF 组少精子症、弱精子症和前次 IVF 受精失败显著影响本治疗周期的受精结果 ($P < 0.05$)，其 Exp(B) 值 (即 OR 值) 分别为 4.197 (95.0% C.I.: 2.288–7.701)、5.021 (95.0% C.I.: 2.811–8.968) 和

表 1 不同助孕方法治疗结果比较

Table 1 Fertilization rate and clinical results of different groups

Group	No. of cycles (n)	Fertilization rate (%)	No. of ET cycle (n)	Clinical pregnancy rate (%)	No. of TFF cycle (n)	TFF rate (%)
IVF	5778	78.8 ¹⁾	5370	43.2 ²⁾	120	2.1 ¹⁾
half-ICSI	146	73.0 ²⁾	138	39.8 ²⁾	32	21.9 ¹⁾
ICSI	821	70.5 ²⁾	763	40.1 ²⁾	19	2.3 ²⁾
PESA-ICSI	274	69.3 ²⁾	261	39.5 ²⁾	5	1.8 ²⁾

ET: embryo transfer; TFF: total fertilization failure; Compared with other groups, 1) $P < 0.01$; Compared with each other, 2) $P > 0.05$.

表 2 完全受精失败周期临床原因

Table 2 Clinical factors of TFF cycles

Group	Primary infertility		Secondary infertility		P value	Oocytes yield ≤ 3		Oocytes yield > 3		P value
	No. of cycles(n)	TFF cycle No./rate(n/%)	No. of Cycles(n)	TFF cycle rate(n/%)		No. of Cycles(n)	TFF cycle No./rate(n/%)	No. of Cycles(n)	TFF cycle No./rate(n/%)	
IVF	2467	70/2.8	3311	50/1.5	$< 0.01^{1)}$	304	37/12.2	5474	83/1.5	$< 0.01^{1)}$
half-ICSI	97	25/25.8	49	7/14.3	0.113	5	1/20.0	141	31/22.0	1.000
ICSI	616	12/1.9	205	7/3.4	0.226	68	14/20.6	753	5/0.7	$< 0.01^{1)}$
PESA-ICSI	236	4/1.7	38	1/2.6	0.529	15	4/26.7	259	1/0.4	$< 0.01^{1)}$

TFF: total fertilization failure; 1) statistically significant

表 3 不同助孕方法完全受精失败主要临床因素

Table 3 The major clinical factors of the total fertilization failure

	IVF		half-ICSI		ICSI	
	No. of cycles(n)	TFF cycle No./rate(n/%)	No. of cycles(n)	TFF cycle No./rate(n/%)	No. of cycles(n)	TFF cycle No./rate(n/%)
Teratozoospermia	243	7/2.5	15	2/13.3	15	0/0
Oligozoospermia	553	24/4.3	47	10/21.3	368	10/2.6
Asthenozoospermia	236	12 /5.1	45	6/13.3	323	6/1.8
Unexplained sterility	164	5/3.1	6	2/33.3	3	0/0
TFF in previous IVF	5	1/20	11	6/54.5	20	1/5.0
Female factors	4577	70/1.5	22	6/27.3	67	2/2.9

14.090 (95.0% C.I.:1.532–129.594);half-ICSI 组 IVF 受精失败的危险因素是上次 IVF 受精失败($P < 0.05$), 其 OR 值为 4.581 (95.0% C.I.:1.054–19.898);ICSI 组受精失败的危险因素为少精子症和弱精子症 ($P < 0.01$),OR 值分别为 10.162 (95.0% C.I.:2.574–40.121) 和 6.572 (95.0% C.I.:1.631–26.486)。各组畸精症、不明原因不孕和单纯女性因素不孕对是否完全受精失败的影响无统计学意义($P > 0.05$),上次 IVF 受精失败对 ICSI 治疗

是否受精的影响也无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 ICSI 未受精成熟卵母细胞免疫荧光染色结果

收集 1 例 ICSI 治疗中完全受精失败患者的未见原核卵母细胞进行免疫荧光染色检测, 观察其卵母细胞内纺锤体形成情况, 结果如图 1。染色结果显示卵母细胞内都有两套纺锤体形成, 但因卵母细胞激活障碍 (图 1B) 或原核形成障碍 (图 1D) 等导致注射精子后卵母细胞仍无法正常受精。

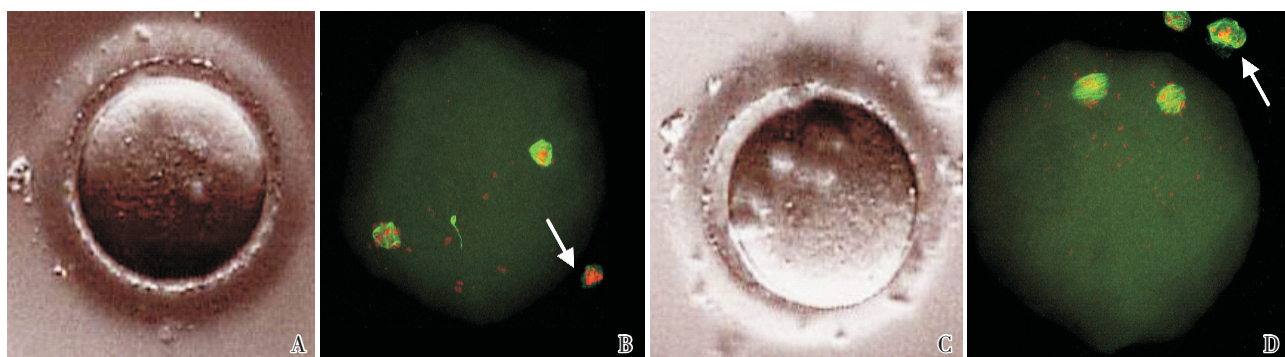


图 1 ICSI 未受精卵母细胞免疫荧光染色

Fig.1 MII oocytes with TFF in group ICSI by immunofluorescence

A,C: MII oocytes with TFF in group ICSI by microscope; B: Oocyte in FigA with two sets of spindle and chromosome, but no Pb2 by immunofluorescence; D: Oocyte in FigC was similar with B, but Pb2 could be observed; The spindles were marked in green and chromosomes in red. Pbs were shown with arrows($\times 200$).

3 讨论

辅助生殖治疗中常规把不孕不育患者分成原发不孕和继发不孕两大类。我们比较不同助孕方法组原发不孕患者与继发不孕患者的完全受精失败发生率显示, 仅 IVF 组原发不孕患者受精失败发生率高于继发不孕患者, 两者差异有统计学意义。有研究证明, 常规 IVF 治疗过程中出现的完全受精失败, 其最常见原因是精子无法穿透成熟卵母细胞透明带进入胞浆^[1]。这提示精卵结合或精子穿透卵透明带障碍可能是原发不孕的重要诱因, ICSI 治疗克服了这一障碍, 其他因素对受精结果的影响显现出来, 我们结果中 ICSI 组和 PESA-ICSI 组继发不孕患者的受精失败发生率高于原发不孕患者, 这进一步证实了这一可能。

人卵母细胞的受精包括精卵相互识别与结合、精子进入卵母细胞以及卵母细胞激活等过程。Neuber 等^[4]研究认为 25.7%左右的成熟卵母细胞,

虽然有精子进入, 却仍无法形成有原核(PN)受精卵。其中部分 ICSI 治疗患者所获成熟卵母细胞全部无法受精, 导致因完全受精失败而失去妊娠机会。我们对部分 ICSI 后完全受精失败患者的成熟卵母细胞进行免疫荧光染色, 结果显示进入卵胞浆内的精子有解聚形成纺锤体和染色体, 但因卵母细胞激活障碍或原核形成障碍等导致卵母细胞无法排出 Pb2 或形成原核而正常受精。Ben-Yosef 等^[5]的研究显示, 卵母细胞激活依赖存在于精子内的精子相关卵激活因子, 它对热敏感且无种属特异性; 此外, 卵母细胞内也存在卵激活因子^[6], 精子核的去异固缩与该因子相关, 这两种激活因子中的任何一种缺失, 卵母细胞都无法自然完成双原核的形成和有丝分裂的启动。

辅助生殖治疗中, 常通过不同超促排卵方案获取适量数目的成熟卵母细胞, 但有部分患者虽经适当的促排卵方法刺激卵巢, 卵巢仍产生过少卵子, 导致辅助生殖治疗结局不良^[7]。McAvey 等^[13]在比较分析了 737 例不孕妇女辅助

治疗周期获卵数与活产率间的关系后发现,当获卵数 ≤ 5 个时妊娠活产率显著降低($P < 0.05$)。但Haaf等^[14]的研究却显示,在相同年龄组患者中,高获卵数组(卵子数 >10 个)卵母细胞染色体异常率显著高于低获卵数组(卵子数 ≤ 5 个)以及中获卵数组(卵子数 $6 \sim 10$ 个),促排卵时获取过多卵母细胞并不能改善治疗结局。我们的分析数据显示低获卵数显著影响ICSI治疗的受精结果(获卵数 ≤ 3 组与获卵数 > 3 组受精失败发生率分别是20.6%和0.7%, $P < 0.01$),对常规IVF受精结果的影响也有统计学差异(受精失败发生率分别是12.2%和1.5%)。如ICSI组少弱畸精症患者中5例完全受精失败,其中4例为低获卵数患者,7例完全受精失败的少精或弱精子症患者中,有6例获卵数 ≤ 3 。

本生殖中心不同助孕方法完全受精失败发生数据显示,常规IVF组、ICSI组以及PESA-ICSI组的完全受精失败发生率都在1.5%~2.5%之间,而half-ICSI组IVF部分完全受精失败发生率高达21.9%,显著高于其他3组($P < 0.01$),且IVF部分平均受精率仅34.8%,显著低于常规IVF组平均受精率($P < 0.01$)。我们进一步分析了畸精子症、少精子症、弱精子症和前次IVF受精失败等因素对辅助生殖治疗周期完全受精失败发生的影响,结果显示少精和弱精是所有助孕治疗周期完全受精失败的高危因素,但前次IVF受精失败并不影响再次ICSI的受精结果。当然,由于分组多自变量Logistic回归分析中,往往存在一个或多个混杂因子,每个影响因素并非独立,而且个别影响因素亚组样本数偏小,我们虽已通过增加分析因素进行校正,但仍可能低估某些影响因素的危险度,需在后续研究中进一步补充分析。

以上结果提示,在所有辅助生殖助孕治疗中,低获卵数是完全受精失败的主要影响因素,获取适当数目的成熟卵母细胞是辅助生殖治疗成功的关键。ICSI治疗是前次IVF受精失败患者的首选治疗方法,而ICSI受精失败的主要原因是精、卵激活障碍,如何有效预测患者是否存在精、卵激活障碍仍有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Liu DY, Baker HWG. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in

clinical in-vitro fertilization[J]. Hum Reprod, 2000, 15(3): 702-708.

[2] Mahutte NG, Arici A. Failed fertilization: is it predictable? [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003, 15(1): 211-218.

[3] Moomjy M, Sills ES, Rosenwaks Z, et al. Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome[J]. Hum Reprod, 1998, 13(8): 2212-2216.

[4] Neuber E, Powers RD. Is the mouse a clinically relevant model for human fertilization failures? [J]. Hum Reprod, 2000, 15(1): 171-174.

[5] Ben-Yosef D, Shalgi R. Oocyte activation: lessons from human infertility[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(1): 163-169.

[6] Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, et al. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne oocyte activation failures[J]. Fertil Steril, 2002, 78(2): 619-624.

[7] 中华医学会 主编.《临床诊疗指南 辅助生殖技术与精子库分册》[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 36-108.

[8] 刘寒艳,龙晓林,杜红姿,等.非男性因素不孕体外受精失败行卵胞浆内单精子注射的结局分析[J].生殖与避孕,2010, 30(8): 529-532.

[9] World Health Organization. 《WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen》[M]. Switzerland: WHO Press, 2010: 117-226.

[10] 陈欣洁,龙晓林,孙筱放,等. 顶体酶活性对体外受精-胚胎移植结局的影响[J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(1): 16-19.

[11] 王雅琴,杨菁,徐望明. 99例分半IVF/ICSI指征及临床结局的分析与探讨[J]. 中华男科学杂志,2009, 15(9): 814-818.

[12] Gook D, Osborn SM, Bourne H, et al. Fluorescent study of chromatin and tubulin in apparently unfertilized human oocytes following ICSI [J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(12): 1130-1135.

[13] McAvey B, Zapantis A, Jindal SK, et al. How many eggs are needed to produce an assisted reproductive technology baby: is more always better? [J]. Fertil Steril, 2011, 96(2): 332-335.

[14] Haaf T, Hahn A, Lambrecht A, et al. A high oocyte yield for intracytoplasmic sperm injection treatment is associated with an increased chromosome error rate [J]. Fertil Steril, 2009, 91(3): 733-738.

(编辑 张恩健)