

# 一种简易的促排卵周期挽救性卵子体外成熟培养技术

刘晓音, 金 炜, 薛松果, 曹少锋, 傅永伦, 彭秋平, 吕祁峰, 匡延平  
(上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011)

**摘要:**【目的】探讨人类成熟卵丘细胞在未成熟卵母细胞体外成熟培养中的作用,并建立一种简易的实施技术。【方法】在控制性促排卵周期有未成熟卵母细胞时,将同周期成熟卵丘复合体切出部分卵丘细胞,用1 mL注射器抽打分散细胞,贴壁培养。113个治疗周期中,298枚生发泡期卵母细胞经3种不同培养液(A、B、C)体外成熟培养(同一病人的生发泡期卵被随机分到某一组中):第1组28个周期中73枚(A液):基础培养液+卵泡液;第2组40个周期中115枚(B液):A液+分散贴壁的卵丘细胞;第3组45个周期中110枚(C液):A液+分散贴壁的卵丘细胞+促卵泡生成激素+表皮生长因子。观察其成熟率、受精率及可用胚胎获得率等。【结果】24 h成熟率:组间比较有显著性差异(A: 45.2%, B: 61.7%, C: 78.2%,  $P < 0.05$ ); 25~48 h无显著意义。成熟卵的正常受精率在59%~67%之间,组间比较无显著差异;与第1组(54.5%, 11.0%)相比,第2组(83.3%, 25.2%)、第3组(90.7%, 37.3%)的卵裂率和挽救率均有显著性差异( $P < 0.05$ ),可用胚胎获得率组间比较依次呈现上升趋势(66.7%, 82.9%, 83.7%)。【结论】来自控制性促排卵周期的成熟卵丘细胞经简易吹打分散后贴壁培养,可能协同卵泡液中外加的生长因子,促进未成熟卵母细胞的体外成熟,而本研究技术简易有效,可用于挽救促排卵周期的未成熟卵。

**关键词:** 控制性促排卵; 未成熟卵母细胞; 体外成熟培养; 成熟卵丘细胞

**中图分类号:** R715.9      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0293-05

## A Simple Technique for Immature Oocytes Rescue by In-vitro-maturation Culture in Controlled Ovarian Hyperstimulation Cycles

LIU Xiao-yin, JIN Wei, XUE Song-guo, CAO Shao-feng, FU Yong-lun, PENG Qiu-ping,  
LÜ Qi-feng\*, KUANG Yan-ping

(The Centre of Assisted Reproductive Technology, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract:** 【Objective】 To evaluate the role of mature cumulus cells from oocyte-cumulus complex (OCC) in in-vitro maturation (IVM) and establish a new culture technique which is convenient to carry out. 【Methods】 The cumulus cells of OCC were cut off and dispersed by 1 mL syringe. The cumulus cells were co-cultured with the immature oocytes retrieved from the COH cycles after they adherent to the bottom of the dish. The immature oocytes were experienced IVM procedures in different culture media. They were divided into 3 groups (the oocytes at germinal vesicle stage from one woman were allotted to the same group randomly). Group 1 (solution A): basic culture medium+ human follicular fluid (hFF); Group 2 (solution B): solution A+ cumulus cells (OCC); Group 3 (solution C): solution A+ OCC+ follicle stimulating hormone (FSH) + epidermal growth factor (EGF). Then, the maturation rate, fertilization rate and formation rate of available embryo were observed. 【Results】 In 113 treatment cycles, 298 immature oocytes were performed IVM with solution A, B, and C. The difference for 24 hour maturation rates among 3 groups was statistically significant (A: 45.2%, B: 61.7%, C: 78.2%,  $P < 0.05$ ). There was no statistical difference for 25~48 hour maturation rates and normal fertilization rates of mature oocytes. The differences of cleavage rates and rescued embryo rates between group 1 and 2, group 1 and 3 were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The formation rates of available embryo

收稿日期: 2009-07-19

基金项目: 上海自然科学基金(09411962900)

作者简介: 刘晓音, 专科, 副主任技师, 研究方向: 人类辅助生殖胚胎学, E-mail: xyliu0831@yahoo.com.cn; \* 通信作者: 吕祁峰, E-mail: lyuqifeng@hotmail.com

showed an increasing trend from group 1, 2, to 3. 【Conclusion】 After being dispersed by simply beat upon with syringe and adherent culture, the mature cumulus cells from mature OCCs in COH cycles, together with growth factors in the follicular fluid or extraneously supplemented, could promote the IVM of immature oocyte.

**Key words:** controlled ovarian hyperstimulation; immature oocytes; in-vitro-maturation; mature cumulus cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2):293-297]

在控制性促排卵 (controlled ovarian hyperstimulation, COH) 周期中普遍存在着卵母细胞发育不同步现象,除大部分成熟卵母细胞外,还有部分处于减数分裂 I (Meiosis I, MI) 期和生发泡期 (germinal vesicle, GV) 的未成熟卵母细胞。常规体外受精/卵胞浆内单精子注射-胚胎移植 (in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer, IVF/ICSI-ET) 治疗中 GV 期卵母细胞通常不被利用。目前,临床 IVM 研究报道大多是针对多囊卵巢综合症和卵巢低反应患者的治疗。而对人类 COH 周期中的未成熟卵母细胞体外成熟培养 (in-vitro maturation, IVM), 少见报道。有动物实验发现,牛卵丘细胞与未成熟卵母细胞共培养能够提高体外成熟卵母细胞的发育<sup>[1]</sup>。但尚未见类似方法用于人类临床 COH 周期。本文拟探讨 COH 周期中对未成熟卵子的成熟培养技术:在添加卵泡液、激素和相关生长因子的基础上,添加同周期成熟卵母细胞的卵丘细胞并通过简易吹打分散卵丘颗粒细胞,使其贴壁生长,以改善未成熟卵母细胞体外成熟培养环境,提高 IVM 有效率。本研究首次将成熟卵丘颗粒细胞用于人卵的体外成熟培养,并新建了简易吹打法分散成熟卵丘颗粒细胞以贴壁培养,从而适应临床的实用性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 未成熟卵母细胞来源

本研究为来自 2005 年 9 月至 2007 年 7 月间,在本院辅助生殖科经卵巢刺激或微刺激行 IVF/ICSI 治疗中获得的未成熟卵母细胞,共 113 个治疗周期,年龄 27 ~ 38 岁 (平均年龄 36 岁)。这些病例均符合辅助生殖技术指征。

### 1.2 研究方法

1.2.1 未成熟卵母细胞筛选 将卵泡穿刺取卵术中,卵泡直径  $\leq 15$  mm 获得的卵母细胞,在体视显微镜下 (NIKON, 日本),先以形态学特征初步评价其成熟度,选出颗粒细胞层少且紧密排列,卵丘组织少量致密或稀疏包绕的卵母细胞,置于常规培

养液中,轻柔洗涤去除血细胞。然后采用“浅微滴”方法观察,即取 3 ~ 5  $\mu$ L 培养液滴于培养皿底,加入待观察的卵母细胞,移去多余培养液,倒置显微镜 (NIKON, 日本) 下 200 倍观察,未成熟卵母细胞可见生 GV (图 1A)。MI 期的未成熟卵因不易观察确定,未用于本研究。

1.2.2 成熟卵母细胞评估与卵丘细胞混悬液的制备 成熟卵母细胞-卵丘复合体 (oocyte cumulus complexes, OCC) 呈旭日样,放射冠与卵丘界限分明。当卵丘细胞具有黏附培养皿的倾向并表现出黏/弹特性时,则是成熟的高质量的卵母细胞<sup>[2]</sup>。选择 2 ~ 3 个具有丰富卵丘团块组织的成熟卵母细胞,置于盛有常规培养液的 4 孔培养皿内 (NUCN, 丹麦),用 1.0 mL 注射器 (BD 公司) 前端针头以交叉切割方法,获得部分卵丘团块组织 (见图 1B)。再以注射器反复抽吸,使卵丘团块组织完全分散于培养液中,并呈混悬状态,调整密度、细胞计数为:  $0.8 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$  个/mL<sup>[1]</sup>, 5 ~ 8 min 显微镜观察,培养皿底可见分散为单个或多少个的卵丘细胞群 (图 1C、1D)。12 h 或次日观察,可见卵丘细胞群贴壁生长 (图 1E)。

1.2.3 人类卵泡液准备 本文人类卵泡液 (human follicular fluid, hFF) 选择自体卵泡液,来源于 IVF/ICSI 取卵术中首先穿刺的目标卵泡,不含冲针液、性状橙色、少血性,在 200 ~ 300  $\times g$  离心 10 min 取上清液 (参见 Chi 方法<sup>[3]</sup>),置 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱平衡备用。

1.2.4 培养液与实验分组 本实验按组别以随机方式分组 (由于未成熟卵子数通常很少,为便于操作,一个病人的几个未成熟 GV 期卵只随即放在某同一组中) 对 COH 周期中未成熟卵子进行体外成熟培养,常规培养液是:人输卵管液 HTF 0.8 mL (Irvine scientific 2001, 美国) 含 10% 合成血清代用品 SSS (Irvine scientific 99193, 美国); 第 1 组: 28 个治疗周期中获得的未成熟卵母细胞 73 枚 (平均 2.61 枚)、培养液 (A 液): HTF + 10% SSS + 20% hFF; 第 2 组: 40 个治疗周期中获得的未成熟卵母细胞 115 枚 (平均 2.88 枚)、培养液 (B 液): A

液 + 贴壁培养的颗粒细胞(其制备见 1.2.2);第 3 组:45 个治疗周期中获得的未成熟卵母细胞 110 枚(平均 2.44 枚),培养液(C液):B液 + 0.075 UI/mL 卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH; Gonal-F, Serono, 瑞士)、2 ng/mL 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF; Sigma, 美国)。每组培养液总量约为 1.0 mL。不同培养液的组成及实验分组见表 1。

1.2.5 体外成熟培养和授精 经形态学评价和浅微滴方法确认的未成熟卵母细胞,先移入含有常规培养液的 4 孔皿内,置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱、培养 1 ~ 4 h,然后移入相应培养液培养 24 h 后观察。将貌似成熟的卵母细胞以机械法(毛细管反复吹吸)去除卵周围的颗粒细胞,以明

表 1 不同培养液的组成及实验分组

Table 1 The composition of different culture medium and group design

Group	components of culture medium
1 (A fluid)	HTF + SSS + hFF
2 (B fluid)	HTF + SSS + hFF + OCC
3 (C fluid)	HTF + SSS + hFF + OCC + FSH + EGF

显排出极体为准判定为成熟的减数分裂 II (Meiosis II, M II)期卵(图 1F),择时以 ICSI 方式授精。然后,继续培养 18 ~ 20 h 观察受精,24 h 后观察胚胎发育。其余未成熟卵母细胞以半量换液,即将原培养液移出 2/3 量、200 × g 离心 5 min、取上清液预温等量加入 A 液,继续培养至 48 h 观察成熟情况。胚胎分级标准按参考文献[4]。

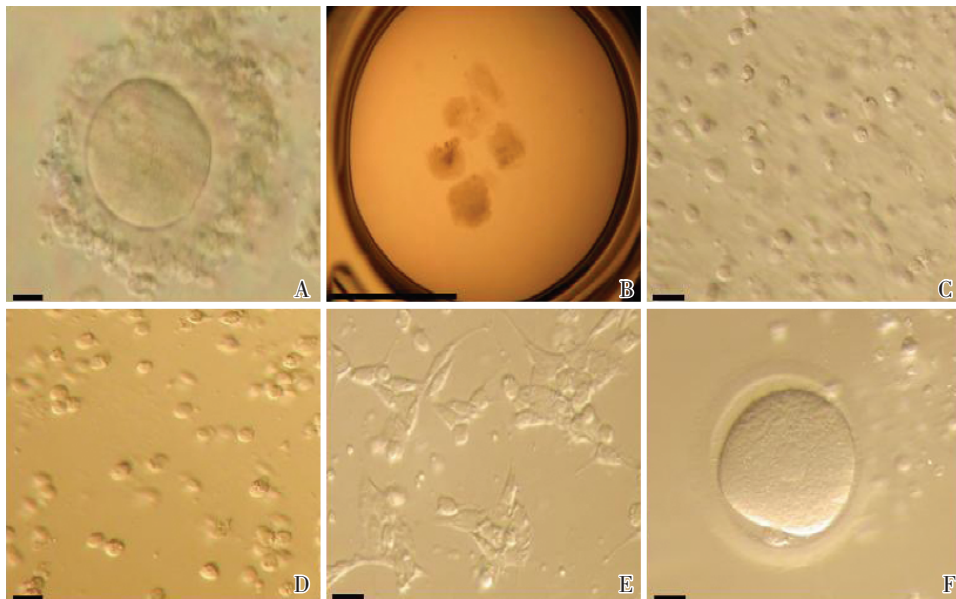


图 1 未成熟卵母细胞(GV期)与卵丘细胞共培养图

Fig.1 The picture of co-culture of immature oocytes (GV-phase) and cumulus cells from mature OCCs (Bar = 25 μm)

A: The germinal vesicle was observed in GV-phase oocyte under magnification of 20 ×; B: After being cut-off, mature cumulus cells of OCC were observed under microscope; C: The cumulus cells of OCC were dispersed by 1 mL syringe, and cultured with suspended state in a well; D: sedimentation state; E: The cumulus cells adherented to the bottom of the dish; F: A oocyte matured after in vitro culture, with a obvious first polar body.

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件对数据采用  $\chi^2$  检验进行处理,取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 未成熟卵母细胞体外成熟时间及成熟率

24 h 成熟率:第 1 组 73 枚成熟 33 枚(45.2%)、

第 2 组 115 枚成熟 71 枚(61.7%)、第 3 组 110 枚成熟 86 枚(78.2%),组间比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。25 ~ 48 h 成熟率组间比较无显著性差异(表 2)。

### 2.2 未成熟卵母细胞体外成熟 ICSI 检测的受精率、卵裂率、可用胚胎获得率及挽救率

本实验 298 枚未成熟卵母细胞中,24 h 内成熟 190 枚,48 h 内共成熟 226 枚。结果:第 1 组、第

表 2 未成熟卵母细胞体外培养成熟时间及成熟率比较

Table 2 The in vitro maturation time of immature oocytes and the comparison of maturation rates *n*(%)

Group	number of GV phase oocytes	Maturation number		Total number of maturation in 48 h
		of 0 ~ 24 h	of 25 ~ 48 h	
1	73	33(45.2)	10(13.7)	43(58.9)
2	115	71(61.7) <sup>1)</sup>	19(16.5)	90(78.2)
3	110	86(78.2) <sup>2)</sup>	7(6.4)	93(84.6)

Compared with group 1, 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ . The percentage and chi-square test are based on the number of GV-phase oocytes in each group

表 3 未成熟卵母细胞体外成熟后 ICSI 的受精率、卵裂率比较

Table 3 Comparison of fertilization and cleavage rates after IVM oocytes were carried-out ICSI *n*(%)

Group	Number of GV phase oocytes	ICSI results of oocytes matured in 0 ~ 24 h				
		Number of matured oocytes	Number of fertilized oocytes	Number of cleaved oocytes	I ~ II (%) available embryos of I ~ II	Rescue rate (%)
1	73	33	22(66.7)	12(54.5)	8(66.7)	11.0
2	115	71	42(59.2)	35(83.3) <sup>1)</sup>	29(82.9)	25.2 <sup>1)</sup>
3	110	86	54(62.8)	49(90.7) <sup>2)</sup>	41(83.7)	37.3 <sup>2)</sup>

Compared with group 1, 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ . The number of GV-phase oocytes is the denominator of rescue rate, whose numerator is the number of available embryos. Other percentages and chi-square tests are based on the numbers of previous column

2组和第3组的24 h成熟卵正常受精率分别为66.7%(22/33)、59.2%(42/71)和62.8%(54/86),组间比较无显著性差别;3组的卵裂率分别为54.5%(12/22)、83.3%(35/42)和90.7%(49/54)。第2组、第3组与第1组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),第2组与第3组间差别无统计学意义。3组的可用胚胎获得率分别为66.7%(8/12)、82.9%(29/35)和83.7%(41/49)。3组间比较无显著性差别,但依次呈上升趋势。3组的挽救率分别为11.0%(8/73)、25.2%(29/115)和37.3%(41/110),与第1组相比,第2组和第3组均有显著性差异( $P < 0.05$ )。第2组与第3组间比较无显著性差别(表3)。

### 3 讨论

目前应用于IVM的体外培养系统尚不完善,导致体外成熟卵子的受精率、胚胎形成率、胚胎发育潜能以及胚胎着床能力均下降<sup>[5]</sup>。然而不同的培养环境可产生不同的IVM结局<sup>[6]</sup>。目前IVM研究一般是在基础培养液如Ham-F10、TC199、HTF等中添加血清、卵泡液、激素、生长因子等<sup>[4,7]</sup>。而卵母细胞的生长发育和成熟是一个动态过程,其

生长环境所需的成分也不断发生变化。因此,在IVM过程中,培养液的添加物(一种或多种)难以达到卵母细胞体外成熟的最佳条件,这可能是影响卵母细胞体外成熟及成熟后发育潜能的原因之一。Hashimoto等研究发现在培养液中添加卵丘细胞( $1.6 \times 10^6$ 个/mL)可以促进牛有放射冠的卵母细胞发育<sup>[1]</sup>。鉴于此观点,本研究除在IVM培养液中添加了hFF或/和FSH、EGF外,还尝试添加了同周期成熟卵丘复合体的卵丘细胞。特别是,本研究采用1 mL注射器对切割成小块的卵丘组织细胞进行吹打分散,操作简单易行。这些细胞混悬液,在含卵泡液或/和EGF生长因子培养基中易于贴壁,从而生长状况良好,亦可释放部分由卵丘细胞自身合成的生长因子等物质,促进卵母细胞的胞质成熟<sup>[8]</sup>。

卵泡液中含有卵母细胞自然成熟所具备的全部成分和因子<sup>[4]</sup>。本研究在3个实验组的培养液中都添加了20%自体卵泡液(hFF),最低组(第1组)的成熟率亦有45.2%。这说明卵泡液确实有一定促进卵母细胞成熟的作用。而从24 h内(GV期)卵母细胞成熟率看,第2组和第3组均显著高于第1组( $P < 0.05$ )。这表明利用成熟卵丘细胞作饲养层并添加卵泡液和/或因子,可明显提高24 h

的成熟率,分别高达 61.7%、78.2%,接近其它报道的 48 h 成熟率(分别为 65.69%<sup>[9]</sup>和 76.9%<sup>[4]</sup>),而在本研究中,这两组 48 h 的成熟率更高,分别为 78.3%和 84.6%。已有研究报道单纯的 FSH、EGF 加入(不添加成熟卵丘细胞)对 MI 期卵体外成熟有明显促进作用<sup>[10]</sup>。本研究因卵子数相对较少而分组较多,未将单纯的 FSH、EGF 加入列入分组。但从成熟速度来看,FSH、EGF 与成熟卵丘细胞一起促使 GV 期卵子在 24 h 成熟率高达 78%,与李媛等<sup>[10]</sup>报道的 FSH、EGF 促 MI 期卵 28 ~ 30 h 的成熟效果(78.6% ~ 83.8%)相当。因此,这间接说明 FSH、EGF 与成熟卵丘细胞对卵子成熟可能有协同作用,其成熟速度和成熟率获得了良好效果。

0 ~ 24 h 培养成熟的卵母细胞行 ICSI 显微授精结果显示:受精率组间比较无显著性差异(表 3),接近文献报道。IVM 后行 ICSI 操作,受精率可达到 60%以上<sup>[11]</sup>。这可能与体外成熟卵母细胞的胞核、胞质成熟度相关。卵裂率第 2 组、第 3 组与第 1 组相比,差异均呈显著性。可用胚胎获得率在 3 组间比较依次呈现上升趋势。这些结果可能提示添加成熟卵丘细胞和 FSH、EGF 等成分促进胞质成熟,激发胚胎发育潜力。本研究所用卵母细胞体外成熟培养方法可以挽救性获得 25%(29/115) ~ 37%(41/110)的可用胚胎,增加可用胚胎数,显著高于对照组的 11.0%(8/73)。随着人们对促排卵周期卵巢反应认识的深入<sup>[12]</sup>及对卵巢组织冻存技术的提高<sup>[13]</sup>,对于卵子成熟的机制将进一步发展,而未成熟卵的体外成熟并利用也将得到加强。本研究提供的简易有效的技术将为这些基础研究或临床应用带来便捷的手段。

#### 参考文献:

[1] Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, et al. Effects of cumulus cell density in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes [J].

Heriogenology, 1998, 49(8): 1451-1463.

- [2] 帕特里奇奥. 人类辅助生殖彩色图谱(实验室和临床概念)[M]. 王展宏,孙倩,译. 天津:天津科技翻译出版社, 2005: 24-25.
- [3] Chi HJ, Kimi DH, Koo JJ, et al. The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human in vitro fertilization programs[J]. Fertil Steril, 1998, 70(5): 871-873.
- [4] 刘嘉茵,钱云,冒韵东,等. 人未成熟卵母细胞体外成熟、受精及胚胎移植[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 4(38): 230-232.
- [5] 付永伦,钟汉威,林其德. 人类未成熟卵母细胞体外培养成熟的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2001, 21(6): 323-329.
- [6] Roberts R, Franks S, Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes [J]. Hum Reprod, 2002, 17(11): 2950-2956.
- [7] 章志国,魏兆莲,曹云霞,等. 人成熟卵泡液在人卵母细胞体外培养中的作用[J]. 生殖医学杂志, 2005, 2(14): 40-42.
- [8] 郭效. 人未成熟卵母细胞体外成熟影响因素的探讨[J]. 国外医学计划生育/生殖健康分册, 2007, 2(26): 73-76.
- [9] 高敏芝,汪玉宝,顾敦瑜,等. 多囊卵巢患者行未成熟卵母细胞体外成熟、受精和胚胎发育观察[J]. 生殖与避孕, 2005, 2(25): 89-93.
- [10] 李媛,陈子江,赵力新,等. 表皮生长因子和促性腺激素对人类卵母细胞体外成熟的影响[J]. 中华男科学, 2004, 10(4): 257-259.
- [11] 张晓华,朱增娟,袁水桥,等. 卵丘细胞在卵母细胞体外成熟培养过程中的作用[J]. 黄牛杂志, 2005, 3(31): 43-45.
- [12] 钟依平,沈晓婷,齐谏,等. 体外受精-胚胎移植治疗中卵巢反应性的影响因素分析[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2008, 29(3): 358-COV3.
- [13] 彭艳,于丛一,李予,等. 慢速冷冻和玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(1): 70-74.

(编辑 张恩健)