

不同体外受精周期所获生殖泡期卵母细胞体外成熟后结果比较

方丛^{1,2}, 苗本郁¹, 钟依平¹, 周灿权¹, 庄广伦¹

(1. 中山大学附属第一医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510080; 2. 香港 Sanatorium 医院 IVF 中心, 香港)

摘要:【目的】研究对比体外受精-单精子卵胞浆内注射(IVF-ICSI)周期所获生殖泡期(GV)不成熟卵母细胞以及体外成熟(IVM)周期所获GV期卵母细胞体外培养成熟后的胚胎发育情况。【方法】163个IVF-ICSI周期中所获987个成熟卵为组I, 所获GV期卵进行体外培养后成熟的132个卵为组II, 另有37个IVM周期中所获GV期卵体外培养后成熟的235个卵为组III。对3组均进行ICSI, 并对其受精率、卵裂率及胚胎发育进行比较。【结果】组I的受精率、卵裂率以及优质胚胎率均显著高于组II及组III(分别为84.9%, 98.1%和61.6%; 72.0%, 90.5%和22.1%; 75.3%, 94.4%和25.1%)。组I的胚胎卵裂球数目及胚胎形态评分均显著优于组II及组III($P < 0.05$); 组I与组II相比差异无统计学意义。【结论】体内成熟卵形成的胚胎形态好于生殖泡期卵体外培养成熟者, IVF-ICSI周期的生殖泡期不成熟卵形成的胚胎形态学上与IVM周期的类似。

关键词: 生殖泡; ICSI; 体外成熟

中图分类号: R715.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)04-0473-04

Comparing Results with Immature Germinal Vesicle Oocytes From Different In-vitro Fertilization Cycles

FANG Cong^{1,2}, MIAO Ben-yu¹, ZHONG Yi-ping¹, ZHOU Can-quan¹, ZHUANG Guang-lun¹

(1. Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. IVF Centre, Hong Kong Sanatorium Hospital, Hong Kong)

Abstract: 【Objective】 This study compared outcomes of in vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles after IVM of immature germinal vesicle (GV) oocytes. 【Methods】 ICSI was performed on metaphase II (MII) oocytes retrieved in 163 IVF-ICSI cycles (group I; $n = 987$) or matured from GV stage oocytes in IVF-ICSI (group II; $n = 132$) and 37 IVM cycles (group III; $n = 235$). Fertilization and cleavage rates and embryo quality were compared among the three groups. 【Results】 The fertilization rate, cleavage rate and top quality embryos rate were higher in group I than group II and group III (84.9%, 98.1%, and 61.6%; 72.0%, 90.5% and 22.1%; 75.3%, 94.4%, and 25.1%, respectively). Blastomere numbers and morphology scores were highest in group I ($P < 0.05$), but no significant differences existed between group II and group III. 【Conclusion】 The morphology of embryos developed from in vivo MII oocytes was superior to those from in vitro matured MII oocytes. No significant difference was observed in embryo morphology from immature GV oocytes in IVF and IVM cycles.

Key words: germinal vesicle; intracytoplasmic sperm injection; in vitro maturation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):473-476]

在促超排卵的体外受精与胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)周期中, 所获得的卵母细胞有一部分是未成熟的, 对于这部

分未成熟卵母细胞进行体外成熟培养后继续进行单精子卵胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)^[1], 对其形成的胚胎质量各报道中

收稿日期: 2009-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(30200301); 广东省自然科学基金(5001672)

作者简介: 方丛, 博士, 副研究员, E-mail: fangcong@hotmail.com

有不同的观点,有报道认为虽然其受精率低于体内成熟的卵母细胞,但胚胎发育似不受影响^[2],也有报道认为这部分体外成熟的卵母细胞的受精率、卵裂率以及胚胎发育都较同批的体内成熟的卵母细胞差^[3],但其中多是针对减数分裂中期 I (metaphase I, MI) 不成熟卵的研究或是对 MI 期与生殖泡期 (germinal vesicle, GV) 卵的混合研究,未见有将其中 GV 期卵单独进行体外成熟培养的研究。同时,近年来,体外成熟 (in vitro maturation, IVM) 技术的应用越来越得到大家的关注,与 IVF 周期中的不成熟卵不同的是,IVM 周期中的不成熟卵没有暴露于高雌激素水平,那么这两部分不成熟卵进行体外培养成熟后,其受精率、卵裂率、胚胎发育质量是否有所不同呢?这正是我们此项研究的目的。本研究首次对 IVF 周期中的 GV 期卵以及 IVM 周期的 GV 期卵进行比较研究,并将其与体内成熟的 MII 卵进行对照研究,分析不同周期中的 GV 期卵体外成熟后的受精率、卵裂率以及胚胎发育质量有无不同。

1 材料与方法

1.1 研究资料

研究包括 2005 年 1 月至 2007 年 12 月期间因男方不育因素于本中心进行 ICSI 治疗的患者 163 例,治疗 163 个周期,年龄 (38 ± 5) 岁。所获得的卵母细胞按成熟程度分为两组: 组为排出第一极体的减数分裂中期卵 (metaphase, M);

组为未成熟且生殖泡仍存在的生殖泡期卵 (germinal vesicle, GV)。另同期因男方不育且患者要求进行 IVM-ICSI 治疗的 37 个周期,年龄 (36.3 ± 2.8) 岁,所获取的 GV 期卵为第 组。

1.2 方法

ICSI 周期采用常规促排卵方案 (GnRHa FSH HCG),当最大卵泡直径达 18 mm 时注射 HCG,注射 HCG 后 36 h 于阴道 B 超介导下取卵。取卵后 4 h 用透明质酸酶去除颗粒细胞后行 ICSI 操作。只对 MII 期卵 (I 组) 行 ICSI 操作,将未成熟的 GV 期卵 (组) 置于添加 0.075 IU/mL FSH 及 0.075 IU/mL LH 的 IVM 培养液 (SAGE, USA) 中,于 37 °C 5% 体积分数 CO₂ 培养箱培养过夜,于取卵后 28 h 观察未成熟卵是否排出第一极体,排出第一极体的视为 M 成熟卵,即时进行 ICSI 操作

后,置于 Quinn's 培养液 (SAGE, USA) 中培养。ICSI 后 16 ~ 20 h 进行受精观察,24 h (D2) 后及 48 h (D3) 后分别进行卵裂观察并进行胚胎评分。评分标准为:卵裂球大小均一且无碎片为 1 级,卵裂球大小略不均一或有 < 20% 的碎片为 2 级,卵裂球大小明显不均一或碎片为 20% ~ 50% 的为 3 级,碎片超过 50% 为 4 级。优质胚胎的标准为第 3 天胚胎卵裂球数目 ≥ 6 个且大小均一,碎片 < 20%。选择优质胚胎进行移植,每个患者最多移植 3 个胚胎,其中 35 岁以下首次治疗者移植 2 个胚胎。移植后 14 天进行妊娠检测,7 周行 B 超检查胎囊数和胎心搏动,以有胎心搏动为临床妊娠的标准。

IVM 治疗的患者于周期第 9 ~ 15 天 B 超下内膜厚度大于 6 mm,卵泡直径不超过 12 mm 时注射 HCG,36 h 后取卵,取卵后于倒置显微镜下观察是否有生殖泡存在,将 GV 期卵置于添加 0.075 IU/mL FSH 及 0.075 IU/mL LH 的 IVM 培养液 (SAGE, USA) 中,于 37 °C 体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,28 h 后用透明质酸酶去除颗粒细胞,观察是否排出第一极体,对 MII 卵进行 ICSI,ICSI 操作及胚胎观察如上。另 48 h 成熟的卵子亦进行了 ICSI,但未在此研究中。此项研究得到患者签署的书面同意书以及伦理委员会的同意。采用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

IVF-ICSI 周期中,获 GV 期卵 231 个,培养至取卵后 28 h 排出第一极体的有 132 个 (57.1%)。IVM 组获 GV 期卵 395 个,28 h 后排出第一极体的有 235 个 (59.5%);另有 62 个卵子为 48 h 后观察排出第一极体进行 ICSI,未纳入本研究)。IVM 组注射 HCG 日的血雌激素水平为 (429 ± 374) pg/mL,显著低于 IVF 周期的 (2364 ± 1792) pg/mL ($P < 0.001$)。各组卵母细胞受精率及胚胎发育情况见表 1。

3 讨论

3.1 不成熟卵的体外培养成熟率

关于对 IVF 周期中不成熟卵的应用,大多数报道是针对其 M 期卵子的应用,本研究是首个

表1 体内成熟组与体外成熟各组受精及胚胎发育情况

Table 1 Fertilization rate and embryo development of IVF and IVM groups

	Group	Group	Group
ICSI oocytes (n)	987	132	235
2PN (%)	838(84.9)	95(72.0) ¹⁾	177(75.3) ⁷⁾
3PN (%)	9(0.9)	1(0.8)	3(1.4)
Degeneration (%)	47(4.8)	9(6.8)	14(6.6)
Cleavage (%)	822(98.1)	86(90.5) ²⁾	167(94.4) ⁸⁾
Day 2 blastomeres($\bar{x} \pm SD$)	3.77 \pm 0.74	3.43 \pm 0.86 ³⁾	3.26 \pm 0.85 ⁹⁾
Day 2 morphology score ($\bar{x} \pm SD$)	1.33 \pm 0.41	1.91 \pm 0.71 ⁴⁾	1.65 \pm 0.54 ¹⁰⁾
Day 3 blastomeres($\bar{x} \pm SD$)	6.62 \pm 1.38	6.30 \pm 1.54	5.51 \pm 1.18 ¹¹⁾
D3 morphology score($\bar{x} \pm SD$)	1.52 \pm 0.51	1.99 \pm 0.73 ⁵⁾	1.89 \pm 0.64 ¹²⁾
Good quality embryos (%)	506(61.6)	19(22.1) ⁶⁾	42(25.1) ¹³⁾

1)–6): compared between group I and group II. 1) $P < 0.001$; 2) $P < 0.001$; 3) $P = 0.022$; 4) $P < 0.001$; 5) $P = 0.005$; 6) $P < 0.001$. 7)–13): compared between group I and group III. 7) $P = 0.001$; 8) $P = 0.008$; 9) $P = 0.001$; 10) $P < 0.001$; 11) $P < 0.001$; 12) $P = 0.001$; 13) $P < 0.001$. $P > 0.05$ for all comparisons between group II and group III.

针对 IVF 周期中的 GV 期卵以及 IVM 周期的 GV 期不成熟卵与体内成熟的 M 期卵进行对照的研究。Strassburger 等^[4]在研究中发现 54% 的 M 期卵在体外培养 2.5 h 后会排出第一极体,也有研究发现体外培养 4 h 后 27% 的 M 期卵会排出第一极体^[2],而其他学者报道的更长时间的体外培养,如 24 至 48 h,则成熟率分别达 73% 至 84%^[5]。关于 IVF 周期中 GV 期卵母细胞的体外培养报道较少,关于 GV 期卵母细胞体外培养的适宜时间,有研究指出 GV 期卵母细胞体外培养 6 h 后 89% 恢复减数分裂,18 h 后有 45% 至 50% 进入 M 期,将这些 M 期卵继续培养 6 h (即取卵后 24 h) 有 67% 的卵排出第一极体进入 M 期^[6],本研究 IVF 周期的 GV 期卵母细胞于体外培养 28 h 后成熟率为 57.1%。而 IVM 周期所获 GV 卵体外培养 28 h 后有 59.5% 成熟。当然本研究所指成熟,仅限于核成熟,即排出第一极体进入减数分裂中期,对其卵浆成熟度尚不能进行直接评估。

3.2 不成熟卵体外培养成熟后受精及胚胎发育

本研究显示,体内成熟卵母细胞的受精率、卵裂率均显著高于体外成熟的两组,而体外成熟的两组之间在受精率、卵裂率方面差异无统计学意义。大多数的报道均认为体内成熟卵的受精率要高于体外成熟的卵母细胞,如 De Vos^[2]等的报道指出,体外成熟卵与体内成熟卵的受精率分别为 52.7% 和 70.8%,Strassburger 等^[3]的报道表明,体外成熟与体内成熟的卵受精率分别为 44% 和

68%,卵裂率分别为 95% 和 86%,并且体外成熟的卵母细胞进行 ICSI 操作后,死亡率也高于体内成熟组,但本研究未发现体外成熟卵 ICSI 操作后死亡率增加。

本研究数据显示,体内成熟卵形成的胚胎无论是从发育速度还是胚胎形态方面都显著好于体外成熟组。IVF 周期的 GV 卵与 IVM 周期的相比,虽然前者卵母细胞体外成熟培养时已去除颗粒细胞,但其受精率、卵裂率以及胚胎的各项指标均类似。另外多个报道也认为体内成熟卵形成的胚胎形态要好于体外成熟者^[3,7-9]。但也有不同结论,Strassburger 等^[4]的研究指出 M 期体外成熟组发育的胚胎与体内成熟组在胚胎形态学方面无差异,这可能与体外培养时间不同有关,Strassburger 等的研究是针对进行体外培养 4 h 后成熟的 M 期卵,而本研究则主要针对 GV 期不成熟卵。

本研究不足之处是由于 IVF 周期的体外成熟卵发育的胚胎未进行移植,因而不能进行各组种植率的分析。但从胚胎形态学上来分析,无论是 IVF 周期的不成熟卵还是 IVM 周期的不成熟卵,体外成熟后发育的胚胎质量均较体内成熟者差,分析其原因,可能是由于目前体外培养体系尚不能很好地支持胞浆成熟^[6,10-12]。而 IVF 周期的不成熟卵与 IVM 周期的卵母细胞具有相似的胚胎形态评分,对这部分卵加以体外成熟培养,可以增加成熟卵数目及可供移植的胚胎数目。

参考文献:

- [1] 李晓虹, 于丛一, 麦美琪, 等. 常规 IVF 不受精周期行补救卵母细胞单精子注射 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(2): 188-191.
- [2] DeVos A, Van de Velde H, Joris H, et al. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection [J]. Hum Reprod, 1999, 14(7): 1859-1863.
- [3] Chen Su, Chen HF, Lien YR, et al. Schedule to inject IVM MI oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection [J]. Arch Androl, 2000, 44(3): 197-205.
- [4] Strassbruger D, Friedler S, Raziell A, et al. The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes [J]. Hum Reprod, 2004, 19(7): 1587-1590.
- [5] Cekleniak NA, Combelles CMH, Ganz DA, et al. A novel system for in vitro maturation of human oocytes [J]. Fertil Steril, 2001, 75(6): 1185-1193.
- [6] Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, et al. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in IVM MI human oocytes [J]. Hum Reprod, 2002, 17(4): 1006-1016.
- [7] Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, et al. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest [J]. Hum Reprod, 2004, 19(4): 982-987.
- [8] Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome [J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(5): 593-599.
- [9] Jurema MW, Nogueira D. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction [J]. Fertil Steril, 2006, 86(5): 1277-1291.
- [10] Sirard MA, Richard F, Blondin P, et al. Contribution of the oocyte to embryo quality [J]. Theriogenology, 2006, 65(1): 126-136.
- [11] Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro [J]. Theriogenology, 2007, 67(1): 6-15.
- [12] Vanhoutte L, Nogueira D, De Sutter P. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence [J]. Hum Reprod, 2009, 24(3): 658-669.

(编辑 张恩健)

(上接第 472 页 from page 472)

- [5] Lapaire O, Lu XY, Johnson KL, et al. Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant [J]. Prenat Diagn, 2007, 27(7): 616-621.
- [6] Peng WH, Takabayashi PH, Ikawa K. Whole genome amplification from single cells in preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2007, 131(1): 13-20.
- [7] Panelli SG, Damiani L, Espen, et al. Towards the analysis of the genomes of single cells: further characterisation of the multiple displacement amplification [J]. Gene, 2006, 372(8): 1-7.
- [8] Le Caignec C, Spits C, Sermon K, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(9): e68.
- [9] Iwamoto KM, Bundo J, Ueda, et al. Detection of chromosomal structural alterations in single cells by SNP arrays: a systematic survey of amplification bias and optimized workflow [J]. PLoS ONE, 2007, 2(12): e1306.
- [10] Paez JG, Lin M, Beroukhi R, et al. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(9): e71.
- [11] Jiang Z, Zhang X, Deka R, et al. Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(10): e91.
- [12] Spits C, C Le Caignec M, De Rycke, et al. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification [J]. Hum Mutat, 2006, 27(5): 496-503.
- [13] Ren Z, Zhou C, Xu Y, et al. Mutation and haplotype analysis for Duchenne muscular dystrophy by single cell multiple displacement amplification [J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(6): 431-436.
- [14] Hehir-Kwa J Y, Egmont-Petersen M, Janssen IM, et al. Genome-wide copy number profiling on high-density bacterial artificial chromosomes, single-nucleotide polymorphisms, and oligonucleotide microarrays: a platform comparison based on statistical power analysis [J]. DNA Res, 2007, 14(1): 1-11.

(编辑 张恩健)