

常规 IVF 不受精周期行补救卵母细胞单精子注射

李晓虹, 于丛一, 麦美琪, 李 予, 苏 宁, 魏春霞, 陈静华, 杨冬梓, 张清学
(中山大学附属第二医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510120)

摘 要: 【目的】探讨常规体外受精胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF- ET)不受精时, 应用卵母细胞单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术进行补教授精的临床意义。【方法】2001年8月-2005年8月, 在499个常规IVF- ET周期中有25个周期完全不受精, 进行补救ICSI, 并与同期实施的179个正常ICSI周期进行比较。【结果】补救ICSI组与正常ICSI组比较, HCG日平均血清雌二醇水平、每个成熟卵泡平均血清雌二醇量、每个周期的获卵数无明显差别, 补救ICSI受精率为57.7%, 低于正常ICSI组(67.8%), 补救ICSI组平均每个周期获得胚胎数(7.8 ± 3.9)比正常ICSI(10.0 ± 4.9)组少, 且有统计学意义($P < 0.01$)。补救ICSI组4细胞的胚胎占总胚胎数的54.5%, 低于正常ICSI组(87.5%), 有统计学意义($P < 0.01$)。正常ICSI组妊娠率为38.5%, 补救ICSI组无一例妊娠。补救ICSI组中有8例在下一周期行ICSI, 有2例妊娠并分娩2个健康女婴。【结论】补救ICSI虽可以避免取消IVF周期, 但其受精率和妊娠率低, 其临床应用价值还有待于进一步探讨。对于常规IVF不受精的患者, 再次治疗时可考虑行ICSI助孕。

关键词: 卵母细胞单精子显微注射; 体外受精; 补救ICSI; 胚胎移植

中图分类号: R711.75

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0188-04

Rescue ICSI of Total Unfertilized Oocytes of Conventional IVF Cycles

LI Xiao-hong, YU Cong-yi, MAI Mei-qi, LI Yu, SU Ning, WEI Chun-xia, YANG Dong-zi, ZHANG Qing-xue¹
(Department of Reproductive Medicine, The Second Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To evaluate the effectiveness of delayed oocyte reinsemination by ICSI (rescue ICSI) after total fertilization failure in IVF. 【Methods】In the total of 499 IVF- ET cycles from August 2001 to August 2005, there were 25 cycles with total fertilization failure and received rescue ICSI, which named rescue ICSI group. A control group with a total of 179 cycles undergoing ICSI during the same period was named ICSI group. 【Results】There was no significant difference in oocyte recovery or mean serum estradiol level of HCG day between the two groups. A fertilization rate of 57.7% was achieved in rescue ICSI group, compared to 67.8% in the control group ($P < 0.01$). Likewise, the mean number of embryos obtained per cycle was significantly higher in the control group. The proportion of embryos that more than 4 cell on day 2 after ICSI was significantly lower in rescue ICSI group. The fragmentation and grade of embryo, however, was comparable in both groups. In addition, the pregnancy rate in the control group was 38.5%. Although there was no pregnancy obtained in rescue ICSI group, there were 2 clinical pregnancies resulted among eight patients who underwent ICSI in the following cycles. 【Conclusions】Although unfertilized oocytes after IVF can be fertilized by rescue ICSI, the developmental potential of the ensuing embryos is very poor; therefore, the clinical value of rescue ICSI needs to be further studied. In addition, ICSI should be recommended in the following cycles for such patients.

Key words: intracytoplasmic sperm injection; in vitro fertilization and embryo transfer; rescue ICSI; embryo transfer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):188-191]

目前大多数生殖中心常规 IVF 周期平均受精率约 60%~70%, 但有一些周期完全不受精或受

收稿日期: 2006-06-25

基金项目: 卫生部临床学科重点资助项目(2004年)

作者简介: 李晓虹, (1980-)女, 广东汕头人, 硕士研究生; 张清学, 副教授, 硕士生导师, 通讯作者, 电话: 020-81332233, E-mail: zhangqingxue@tm.com

精率低于25%。部分不受精仍有妊娠可能,但完全不受精则无胚胎可移植。为了避免取消此次IVF治疗周期,有报道对于常规IVF失败周期应用ICSI进行再受精,获得可移植胚胎甚至成功妊娠^[1-3]。本文回顾性对比分析了该院2001年8月~2005年8月常规IVF周期受精失败的25个周期实施补救ICSI(rescue ICSI or late ICSI)及同期实施的179个正常ICSI周期,以探讨其可行性和临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2001年8月~2005年8月,我院生殖中心共进行常规IVF-ET499个周期(共352个病例),在授精后16~20h颗粒细胞剥除后发现25个周期(25个病例)完全不受精,进行补救ICSI,与同期179个病例实施的179个正常ICSI周期进行比较。不孕原因包括:输卵管因素、盆腔粘连、免疫因素、子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征及男方因素。

1.2 方法

1.2.1 促排卵方案 超排卵采用常规长方案或短方案^[1],注射hCG 10 000 IU后约36h,在B超引导下经阴道取卵。

1.2.2 精液的准备 丈夫禁欲3~7d,手淫获得精液,待完全液化混匀后按世界卫生组织标准评估精液质量。对于精液常规正常者(精子浓度 $> 20 \times 10^6$ /mL, a+b级精子 $> 50\%$,形态正常精子 $> 30\%$)行常规IVF。对于严重少精症(一次射精的活精子浓度 $< 1 \times 10^6$ /mL)或少弱畸精症(精子浓度 $< 20 \times 10^6$ /mL,同时a+b级精子活动率 $< 20\%$ 和(或)异常形态精子 $> 85\%$)或弱畸精症(精子浓度 $> 20 \times 10^6$ /mL,形态正常精子 $< 10\%$ 或a+b级精子 $< 50\%$)或精液处理后a+b级运动活精浓度 $< 1 \times 10^6$ /mL者行正常ICSI。

1.2.3 受精、胚胎发育及妊娠的评价 25个IVF周期共获卵285只,使用常规IVF方法进行授精,授精后18~22h(D1)未观察到双原核及未排出第二极体的196个M期卵又实施了补救ICSI,补救ICSI授精后18~20h(D2)观察受精情况,双原核及排出第二极体为受精,补救ICSI授精后48h(D3)左右查看受精卵分裂情况。根据卵裂球大小、

是否均匀及有没有无核碎片和发育速率进行胚胎质量评估。D3选择优良的2~3个胚胎进行移植,移植后14d尿和血清hCG阳性为生化妊娠,40d后B超观察到妊娠囊和胎心搏动的确定临床妊娠。

1.3 统计学处理

用spss12.0统计系统,数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,离散型变量用 χ^2 检验,连续型变量用方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 补救ICSI与正常ICSI组的年龄、获卵数和雌激素水平

女方平均年龄、男方平均年龄、不孕年限、每个周期的获卵数、HCG的血清雌二醇水平、每个成熟卵泡的平均血清雌二醇量,均无明显差异(表1)。在补救ICSI组25例中,有11例检查了血清抗精子抗体(ASA),其中女方ASA阳性有2例,男方ASA阳性1例,双方均阳性1例,阳性率36.4%。而同期实施的474个常规IVF可受精周期中,有274例检查了血清ASA,其中女方ASA阳性有62例,男方ASA阳性43例,双方均阳性11例,阳性率38.6%。两者差别无统计学意义。

表1 补救ICSI与正常ICSI组的年龄、不孕年限、获卵数和雌激素水平

Table1 Comparison of the patient's age, duration of infertility, oocytes obtained and E2 level between the two groups

	Rescue ICSI (25 cycles)	ICSI (179 cycles)	t	P
Age of women(years)	33.0 \pm 3.8	32.4 \pm 4.5	-1.46	>0.1
Age of men(years)	35.7 \pm 4.6	36.3 \pm 4.7	-1.86	>0.1
Duration of infertility(years)	7.8 \pm 2.5	7.9 \pm 3.2	-1.5	>0.1
No. of oocytes obtained/cycle	16.0 \pm 8.4	16.7 \pm 8.3	0.8	>0.05
E2 on HCG day(ng/L)	2 836 \pm 520	2 388 \pm 544	0.9	>0.05
Average E2(ng/L)/follicle	215 \pm 70	227 \pm 100	-0.7	>0.1

2.2 补救ICSI与正常ICSI的助孕情况

正常ICSI组受精率、每个周期获得的胚胎数比补救ICSI组高,有统计学意义。在胚胎发育速率方面,正常ICSI组4个细胞的胚胎百分率比补救ICSI组高,且有统计学意义。而胚胎分级和碎片分级在两组间均无明显差别。正常ICSI组的

周期妊娠率为 38.5%，补救 ICSI 组无一例妊娠。(见表 2)。有 8 个患者在补救 ICSI 妊娠失败后，下

一周改行 ICSI 治疗，有 2 例临床妊娠，并分别分娩 1 健康女婴。

表 2 补救 ICSI 与正常 ICSI 的助孕情况
Table 2 Comparison of the results between the two groups

	Rescue ICSI (25cycles)	ICSI (179 cycles)	²	t	P
Fertilization rate (%)	57.7%(113/196)	67.8(1147/1691)	8.2	-	<0.01
Normal fertilization rate (%)	46.4%(91/196)	66.7(1129/1691)	31.8	-	<0.01
NO. of embryos available per cycle	7.8±3.9	10.0±4.9	-	-5.8	<0.01
Cells/embryo			78.6	-	
<4 cells	45.5%(46/101)	12.5%(143/1143)	-	-	<0.01
4	54.5%	87.5%(1000/1143)	-	-	<0.01
Grade of embryos			0.086	-	
Grade 1	48.5%(49/101)	47.0%(537/1143)	-	-	>0.05
Grade 2	47.5%(48/101)	49.0%(560/1143)	-	-	>0.05
Grade3~4	3.9%(4/101)	4.0%(46/1143)	-	-	>0.05
Fragmentation of embryo			0.803	-	
Grade 1 (<5%)	42.6%(43/101)	45.9%(525/1143)	-	-	>0.05
Grade 2 (5~20%)	44.6%(45/101)	41.6%(475/1143)	-	-	>0.05
Grade3~4 (>20%)	12.8%(13/101)	12.5%(143/1143)	-	-	>0.05
Pregnancy rate/transfer (%)	0%	38.5%	14.6	-	<0.01

3 讨 论

3.1 常规 IVF 不受精的可能原因

造成常规 IVF 不受精的原因可能包括卵母细胞和精子两方面。前者可能是卵母细胞透明带硬化、增厚，目前认为卵子因素并不是受精完全失败的常见原因，因为卵泡刺激方案很少导致所有卵子完全异常^[1]。多数研究提示精子异常可能才是导致完全不受精的主要原因^[1]，由于目前的精液常规检查和精子功能试验尚不能准确预测能否正常受精，即使上述检查指标均正常，也有可能出现受精失败。另有报道在常规 IVF 治疗的过程中，MII 期卵母细胞的受精失败可能主要是精子穿透异常^[2]。虽然有研究表明 ASA 的存在可干扰精卵结合位点的识别，从而影响精子穿透，但本中心 11 例补救 ICSI 组血清 ASA 阳性率 36.4%，与同期实施常规 IVF 可受精的 274 例患者的血清 ASA 阳性率并无明显差别，故 ASA 存在是否影响受精还有待进一步研究。本中心对 196 个不受精的成熟卵母细胞行补救 ICSI 后，有 113 个受精，表明补救 ICSI 可能有助于挽救常规 IVF 不受精。此外，精子处理和培养条件也可能影响受精率。

3.2 补救 ICSI 结局及改善措施

虽然国内外很多生殖中心对常规 IVF 不受精的周期实施补救 ICSI 以降低周期取消率，但其妊娠率及胎儿出生率仍偏低。根据我们所查资料，目前国内文献报道的补救 ICSI 有 92 个周期，有 13 例妊娠，仅有 4 例婴儿出生^[4,5,8-13]；国外文献报道^[3,6,14-17]的 IVF 不受精 18~22 h 实施补救 ICSI 330 周期，妊娠有 29 例，出生婴儿有 5 例^[6,17]，总出生率仅 2%，且其出生儿远期的随访情况均尚未见报道。本中心的 25 例补救 ICSI 周期，虽可受精，但却无 1 例妊娠，造成补救 ICSI 妊娠率和出生率低的原因可能有：卵子染色体异常。卵母细胞在体外培养的时间越长，卵母细胞内遗传物质发生异常的概率就越高，由于补救 ICSI 只能帮助精子进入卵母细胞内，但如果卵母细胞或/和精子存在染色体方面的异常，则难以正常受精，而且即使受精也容易形成异常胚胎或流产。胚胎生长速率慢。早期胚胎的大体形态在某种程度上反映了胚胎继续发育和种植的能力，而胚胎的发育速度对胚胎活力的影响更大^[1]。本组资料显示，虽然胚胎分级和碎片分级在补救 ICSI 组和正常 ICSI 组中无明显差别，但前者的胚胎分裂速度慢，大于 4 细胞的胚胎所占比例比正常 ICSI 组低，这可能导致胚胎

和子宫内膜的发育不同步, 不利于胚胎种植。

在常规 IVF 过程中, 出现完全不受精对医患而言都是令人沮丧的。为了减少这种情况的出现, 我们还需要进行更多的探索。Chen 等^[6]对 45 个常规 IVF 不受精周期随机分成 2 组, 分别在受精后 6 h 和 22 h 行补救 ICSI, 进行比较后发现 6 h 组(25 个周期)的受精率、种植率和妊娠率分别为 70.3%、20.2%、48.0%, 明显高于 22 h 组(20 个周期)的 48.5%、1.72%、5.0%。理论上卵子如果受精, 在受精后 8 h 会排出第二极体, 因此如果在常规 IVF 失败后 8 h 实施补救 ICSI, 既可以减少因极体排出延迟行补救 ICSI 而造成的多精受精, 又可以缩短卵母细胞的体外培养时间, 降低其老化程度和遗传物质的异常发生率, 提高受精率和妊娠率, 改善补救 ICSI 的妊娠结局, 为我们解决这一难题提供了新的研究思路。

3.3 常规 IVF 不受精患者的再次治疗

本中心 25 例补救 ICSI, 其中 8 例在下一周期行 ICSI, 有 2 例分娩, 表明常规 IVF 不受精的患者再次治疗时行 ICSI 有望获得好的妊娠结局。张丽红报道^[7]常规 IVF 不受精后下一周期行部分 IVF 部分 ICSI 时, IVF 的受精率为 39.5%, ICSI 的受精率 63.9%。但由于目前对于这部分患者再次行 IVF 时是否能受精还没有可靠的预测指标, 因此, 对于以往常规 IVF 不受精患者再次治疗时, 如果获卵足够多, 为避免再次发生完全不受精, 也可以尝试部分 ICSI 部分 IVF 的方案。

总之, 尽管常规 IVF 不受精周期行补救 ICSI 后可以受精, 降低周期取消率, 但由于其受精率、妊娠率和出生率均很低, 结合国内外的资料及本中心的结果, 我们认为其临床应用价值还有待于进一步探讨, 对于常规 IVF 不受精患者再次治疗时, 建议选择 ICSI 助孕以期获得妊娠^[10]。

参考文献:

- [1] 庄广伦. 现代辅助生育技术[M].北京:人民卫生出版社, 2005: 123, 238-241.
- [2] 罗海宁,朱桂金,胡娟,等.体外受精失败 MII 期人卵母细胞的免疫荧光研究[J].生殖医学杂志, 2005,14(2):75-77.
- [3] AMARIN Z O, OBEIDAT B R, ROUZI A A, et al. Intracytoplasmic sperm injection after total conventional in-vitro fertilization failure[J]. Saudi Med J, 2005, 26(3):411-5.
- [4] 傅志红,陈士岭,邢福祺,等.常规 IVF 失败后补救 ICSI 治疗[J].中华男科学,2001,7(4):226-228.
- [5] 卢伟英,徐雯,张岩,等.体外受精失败的次级卵母细胞单精子显微注射后的效果观察[J].海南医学院学报 2001,7(2):87-88.
- [6] CHEN C, KATTERA S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF [J]. Hum Reprod, 2003, 18(10):2122-2123.
- [7] 张丽红,李娟,江平等.常规体外受精失败患者卵巢内单精子注射治疗的结果分析[J].现代妇产科进展, 2005,14(3):255-256.
- [8] 张凤英,张美姿,张云山,等.常规 IVF 授精后 20-22h ICSI 再授精的预后[J].第四军医大学学报,2005,26(7):667-669.
- [9] 唐永梅,韦继红,姚春玲.用体外受精失败的卵细胞行单精子显微注射妊娠 1 例[J].广西医科大学学报, 2003,20(5):822.
- [10] 孙海翔,胡娅莉,王玢,等.常规体外受精失败后 ICSI 再受精及胚胎辅助孵出成功妊娠 1 例[J].中华男科学,2002,8(6):460.
- [11] 高士友,盛燕,李媛,等.在体外受精失败周期中应用卵母细胞质内精子注射的探讨[J].生殖与避孕, 2000,20(5):277-279.
- [12] 李蓉,庄广伦,周灿权,等.体外培养 24 小时受精失败卵母细胞单精子显微注射再授精的观察[J].中华妇产科杂志, 2000,35(7):404-405.
- [13] 冯婷,钱云,刘嘉茵,等.体外受精完全失败行卵细胞质内单精子注射补救的应用价值探讨[J].中华男科学,2004,10(3):175-181.
- [14] KABLY A A, BAPTISTA P-A A, RUIZ A J, et al. Unexpected failed fertilization in vitro: ICSI reinsemination or ICSI indication for subsequent cycles [J]. Ginecol Obstet Mex, 2002,70:373-378.
- [15] KUCZYNSKI W, DHONT M, GRYGORUK C, et al. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF [J]. Hum Reprod,2002,17(9):2423-2427.
- [16] YUZPE AA, LIU Z, FLUKER M R. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI) -salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure[J]. Fertil Steril, 2000, 73(6):1115-1119.
- [17] MORTON P C, YODER C S, TUCKER M J, et al. Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure[J]. Fertil Steril, 1997, 68(3):488-491.
- [18] 徐艳文,周灿权,方丛,等.卵细胞胞质内单精子注射在前次常规体外受精失败病例中的应用[J].中华男科学,2006,12(6):5315-533. (编辑 张恩健)