

人卵母细胞的电脉冲辅助激活

舒益民, 庄广伦, 张敏芳, 方 丛, 彭文林
(中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨电脉冲刺激进行人卵母细胞的人工辅助激活的可行性。【方法】不同卵龄和来源的人卵母细胞分为4组,49个新鲜成熟的卵母细胞作为A组,42个常规体外受精(IVF)中未受精的成熟卵母细胞为B组,C组为卵浆内单精子注射(ICSI)后未受精卵母细胞57个,D组为体外培养48h的ICSI后未受精卵母细胞37个,所有卵母细胞以直流电脉冲刺激2次,观察电脉冲刺激后卵母细胞激活和胚胎发育情况。【结果】A组卵母细胞激活率为43%(21/49),与B、C、D3组相比偏低,差异具有统计学意义(P 均 <0.05),A组中激活后卵母细胞主要表现为一原核二极体(1PN+2PB),而C组和D组则以二原核二极体(2PN+2PB)占多数。A、B、C组激活后卵母细胞分裂率分别为81%(17/21),83%(24/29)和88%(38/43),较D组(19%、5/26)显著增加($P<0.01$),在电脉冲刺激后第3天,A、B、C组分别有18%(3/17),29%(7/24),31%(11/35)的胚胎发育到8-细胞阶段。【结论】不同来源和卵龄的人卵母细胞在电脉冲刺激后表现为不同的激活类型和胚胎发育情况,直流电脉冲作为一种有效的卵母细胞人工激活方法可以应用于辅助受精。

关键词:电脉冲;卵母细胞;激活

中图分类号:R321.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)04-0337-03

Assisted Activation of Electrical Stimulation on Human Mature Oocytes

SHU Yi-min, ZHUANG Guang-lun, ZHANG Min-fang, FANG Cong, PENG Wen-lin

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

Abstract: 【Objective】 To observe activation effects of electrical stimulation on human mature oocytes. 【Methods】 Oocytes with different ages were divided into four groups. Forty-nine fresh oocytes after vitro maturation were obtained in group A. In group B unfertilized culture-aged oocytes after conventional in vitro fertilization were recruited ($n=42$). Fifty-seven unfertilized oocytes after ICSI were included in group C. And in group D unfertilized oocytes after 48 hours culture *in vitro* were collected ($n=37$). All oocytes were stimulated two times with direct current pulse. Oocyte activation and embryo development were observed. 【Results】 Activation rate in group A was 42.9% (21/49), significantly lower than that in group B, group C, and group D (69.0% ~ 75.4%, $P<0.05$). Two thirds of activated oocytes ($n=21$) in group A displayed one pronuclear (PN) and two polar bodies (PB) (1PN+2PB). In contrast in group C and group D oocytes with two pronuclei and two polar bodies (2PN+2PB) were found as the predominant pattern. The cleavage rates in group A, group B, and group C were 81.0% (17/21), 82.8% (24/29) and 88.4% (38/43) respectively, much higher than that in group D (19.2%, 5/26) ($P<0.01$). On the third day after electrical stimulation, 17.6% (3/17), 29.2% (7/24), 31.4% (11/35) of activated oocytes progressed to 8-cell stage respectively in group A, group B and group C. 【Conclusion】 Human oocytes at different ages can be effectively activated by electrical stimulation, with different activation patterns and embryo development. As an effec-

收稿日期:2002-10-28

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(20001339; 20021874)

作者简介:舒益民(1971-),男,湖北咸宁人,博士,讲师,专长生殖医学。

tive activation method, direct current pulse may be used to assist fertilization .

Key words: electrical stimulation; oocyte; activation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 337 ~ 339, 351]

卵母细胞激活及钙离子内流是受精过程的两个重要事件。对卵母细胞激活规律的认识有助于加深人们对受精机制的理解^[1,2]。卵母细胞的电激活在哺乳动物核移植中研究较多,在人卵母细胞中应用甚少^[2]。本文以成熟人卵母细胞作为研究对象,观察电激活对不同卵龄及来源人卵母细胞激活效果以及胚胎发育的影响,探讨电脉冲刺激在人类卵母细胞辅助受精中应用的可能性及具体的实验条件。

1 材料与方 法

1.1 对 象

所有卵母细胞均来源于2001年5月至2002年4月在本中心进行体外受精-胚胎移植的不孕症患者,在实验前征得患者的同意。185个卵母细胞根据来源不同可分为以下4组。A组中包括49个新鲜成熟卵母细胞,收集卵浆内单精子受精(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)中处于第一次减数分裂中期的未成熟卵母细胞进行体外培养,12 h后观察卵母细胞成熟情况,挑选形态正常的成熟卵母细胞作为研究对象。B组为42个常规体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)中受精失败的成熟卵母细胞;在常规体外受精中精卵结合后12~16 h去除卵丘颗粒细胞,未受精卵母细胞于4 h后再观察一次,如仍未见原核形成,则作为未受精卵母细胞用于电激活。按B组的观察方法收集ICSI后第2天未受精卵母细胞共94个,其中57个于受精后第2天进行电激活作为本实验的C组,另外37个继续培养24 h至取卵后48 h作为D组用于电脉冲刺激。电激活时各组卵母细胞卵龄有明显不同,其中A组卵母细胞较新鲜,卵母细胞成熟时间不超过12 h, B组和C组为成熟后24 h, D组卵母细胞卵龄更长,为成熟后48 h。

1.2 电脉冲刺激

采用BTX 2001细胞电融合仪(美国BTX公司产品)进行卵母细胞的电脉冲刺激,各组卵母细胞以相同条件进行刺激,所用电激活液成分为0.3

mol/L甘露醇,0.1 mmol/L MgCl₂, 0.05 mmol/L CaCl₂。在进行电刺激前需将卵母细胞在激活液中平衡2 min,然后将其转移到两根间距为1 mm的铂丝电融合槽中,强度1.2~1.6 kV/cm、脉宽60 μs的直流电脉冲刺激一次,30 min后以相同电脉冲再刺激一次,电刺激后卵母细胞在胚胎培养液IVF-20中清洗5遍,最后转移到CO₂培养箱中进行继续培养。

1.3 激活情况观察及胚胎培养

电刺激12 h后在倒置显微镜下观察卵母细胞的存活、原核(pronuclear, PN)形成以及第二极体(polar body, PB)排出情况,按1PN+2PB, 1PN+1PB, 2PN+2PB, 3PN等激活类型记录激活情况,仅有第二极体排出而无原核形成不列入激活卵母细胞。不同激活类型卵母细胞分开培养,48 h后观察并记录胚胎的发育情况。

1.4 统计学处理

两组间率的差异性采用 χ^2 检验进行分析。

2 结 果

2.1 电脉冲对卵母细胞激活效果的观察

比较各组卵母细胞激活情况(表1)发现,A组卵母细胞激活率(43%)较B、C、D组明显降低,其差异具有统计学意义(P 均 <0.05)。A组21个发生活化的卵母细胞中14个表现为1PN+2PB的孤雌激活类型,C组和D组激活类型相似,2PN+2PB的激活类型分别占激活卵母细胞总数的70%(30/43)和65%(17/26),B组激活后卵母细胞中1PN+2PB和2PN+2PB为主。

2.2 激活后卵母细胞分裂和胚胎发育情况

结果见表2。D组26个激活卵母细胞仅有4个发生分裂,分裂率为19%,A、B、C组激活后卵母细胞分裂率分别为81%, 83%和88%,较D组显著增加($P<0.01$),A、B、C组中分别有18%(3/17), 29%(7/24), 31%(11/38)的胚胎发育到8-细胞阶段。

表1 不同卵龄卵母细胞电激活效果比较

Table 1 Comparison of electrical stimulation on human oocytes at different ages

Group	Oocytes	Activated oocytes (%)	Activation patterns			
			1PN + 1PB	1PN + 2PB	2PN + 2PB	3PN
A	49	21(43%)	6	14	1	0
B	42	29(69%) ¹⁾	5	10	12	2
C	57	43(75%) ²⁾	3	7	30	3
D	37	26(70%) ¹⁾	1	4	17	4

Compared with group A, 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

表2 激活后卵母细胞胚胎发育情况

Table 2 Embryo development of activated oocytes in different groups

Group	Activated oocytes	Cleaved oocytes (%)	Embryo development		
			2-4 cell	5-8 cell	>8-cell
A	21	17(81%) ¹⁾	6	8	3
B	29	24(83%) ¹⁾	8	9	7
C	43	38(88%) ¹⁾	12	12	11
D	26	4(19%)	2	2	0

Compared with group D, 1) $P < 0.01$

3 讨论

3.1 卵母细胞激活与受精失败

卵浆内单精子注射在辅助生殖领域的应用为男性不育提供了一个很好的治疗手段,但是即使是非常成功的 ICSI 操作仍然会有部分卵母细胞不受精。研究表明 ICSI 后约 30% 卵母细胞不能正常受精,少部分患者会出现完全不受精的情况^[2]。Yanagida 等^[3]对 424 对夫妇 ICSI 后的受精情况进行统计,发现其中有 3 对夫妇的 4 个 ICSI 周期卵母细胞受精完全失败,受精完全失败的发生率为 0.9%。大量研究表明,卵母细胞激活不足是受精失败的一个重要影响因素。来自人类和哺乳动物的研究结果均证实,将圆形精子细胞注射到卵母细胞浆内受精率为 0,但是以化学法进行卵母细胞辅助激活后却能有效地提高受精率和获得正常妊娠和分娩^[4,5],提示卵母细胞辅助激活可能有利于受精的正常进行。

3.2 电脉冲对人类卵母细胞作用的可能机制

卵母细胞的人工辅助激活在哺乳动物的体外受精中得到广泛的应用,按作用机理可以分为化学法。机械法以及电脉冲刺激等。人卵母细胞辅助激

活研究多以化学激活为主^[6,7]。本研究结果显示,直流电电脉冲也能有效地对人卵母细胞进行激活。目前电激活的具体机制还不太清楚,推测可能与电脉冲刺激后引起卵母细胞内的钙离子内流有关,多次电脉冲刺激会引起卵母细胞多次钙离子内流,从而有效地刺激卵母细胞完成第二次减数分裂。

体外成熟的新鲜卵母细胞中含有较高水平的成熟促进因子。随着成熟卵母细胞体外培养时间的延长,卵浆中成熟促进因子水平逐渐下降,常规 IVF 或 ICSI 受精失败的卵母细胞成熟促进因子水平较新鲜卵母细胞明显下降,因而更易于发生激活,这一点与其他哺乳动物卵母细胞的激活特点相类似^[8]。本研究发现,不同来源卵母细胞在电脉冲刺激后表现为明显不同的激活类型:A 组中新鲜的体外成熟卵母细胞以 1PN + 2PB 的孤雌激活类型为主,而 C 组和 D 组中 ICSI 后未受精的卵母细胞则以 2PN + 2PB 为多见。这与 ICSI 后未受精的卵母细胞中本身含有精子有关,在卵母细胞激活的同时排出第二极体并伴有雄原核形成,而新鲜卵母细胞受到电脉冲刺激后只能发生孤雌激活。D 组中受精后 48 h 的卵母细胞虽然也能被激活,但是卵裂率很低,而 A 组和 B 组中卵母细胞在电激活后胚胎发育具有较高的分裂率和胚胎发育潜能,提示随着体外培养时间延长卵母细胞功能逐渐下降。虽然电激活后未受精卵母细胞发育潜能下降,但是它们作为研究人卵母细胞激活和受精机理的不可多得的实验材料仍有其可取之处。本研究结果显示,对于多次受精失败的患者,可以考虑联合应用电脉冲辅助激活来提高受精率。

参考文献:

- [1] Rinaudo P, Massobrio M, Pepperell J, *et al.* Dissociation between intracellular calcium elevation and development of human oocytes treated with calcium ionophore[J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(6): 1086.
- [2] Yamano S, Nakagawa K, Nakasaka H, *et al.* Fertilization failure and oocyte activation[J]. *J Med Invest*, 2000, 47(1): 1.
- [3] Yanagida K, Katayose H, Kimura Y, *et al.* Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(5): 1307.
- [4] Rybouchkin A V, Van der Straeten F, Quatacker J, *et al.*

(下转第 351 页 to page 351)

张素Ⅱ(AngⅡ)可下调体外培养的肾小球上皮细胞Bcl-2表达,上调Fas抗原的表达,从而增加细胞凋亡。使用I型血管紧张素Ⅱ受体(AT1R)拮抗剂Losartan或AT2R拮抗剂PD123319均可部分抑制细胞凋亡,而二者联合应用则可完全阻止AngⅡ引起的细胞凋亡。这与本研究在阿霉素肾病大鼠肾小球观察到的结果是一致的;不过我们未观察到大鼠肾小球内AT2R表达。由于依那普利干预在大鼠体内可引起血压下降、抑制系膜细胞增生和系膜基质产生等一系列病理生理改变^[9, 10],因此本研究观测到依那普利干预组大鼠肾小球硬化时,肾小球细胞表达Bcl-2下降程度减轻和Fas抗原表达增加程度减少(干预组与模型组比较差异无显著性,可能与样本例数不足有关),肾小球细胞凋亡减少等。所有这些结果目前尚难以区分是依那普利阻断AngⅡ生成后直接影响肾小球细胞所致的结果,还是由于依那普利干预引起大鼠体内一系列病理生理变化后的间接作用。

(本文图1,2见封3. Fig. 1,2 shown inside back cover)

参考文献:

- [1] Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, *et al.* Apoptosis in glomerular sclerosis[J]. *Kidney Int*, 1996, 49(1): 103.
- [2] 孙良忠,岳智慧,汤洁如,等.细胞凋亡在阿霉素肾病大鼠肾小球硬化过程中的意义[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(5): 285.
- [3] 孙良忠,岳智慧,陶瑜,等.依那普利减轻肾小球硬化及与肾小球细胞凋亡的关系[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(5): 289.
- [4] Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, *et al.* Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease[J]. *Kidney Int*, 1986, 29(2): 502.
- [5] 申洪.免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89.
- [6] 方积乾,凌莉,张敏瑞.近期医学论文中常见统计错误及其纠正[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(4): 314.
- [7] Ying W Z, Wang P X, Sangers P W. Induction of apoptosis during development of hypertensive nephrosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2000, 58(5): 2007.
- [8] Ding G, Reddy K, Kapasi A A, *et al.* Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(1): F173.
- [9] 张道友,叶任高,李幼姬,等.成人原发性肾病综合征临床及实验系列研究[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(2): 81.
- [10] 杨荣泽,严励,傅祖植,等.糖尿病鼠肾脏肾素血管紧张素系统活性的改变[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(2): 104.

(编辑 张恩健)

(上接第339页 from page 339)

al. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity[J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(6): 1144.

[5] Sofikitis N V, Toda T, Miyagawa I, *et al.* Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development[J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(1): 176.

[6] 舒益民,庄广伦,周灿权,等.应用钙离子载体A23187及6-甲基嘌呤对人卵母细胞进行孤雌激活

[J]. *生殖医学杂志*, 2002, 11(3): 145.

- [7] Rhoton-Vlasak A, Lu P Y, Barud K M, *et al.* Efficacy of calcium ionophore A23187 oocyte activation for generating parthenotes for human embryo research[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13(10): 793.
- [8] Ikeda K, Takahashi Y. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development *in vitro* following somatic cell nuclear transfer[J]. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(9): 1003.

(编辑 张恩健)