

· 简 报 ·

卵母细胞体外成熟在多囊卵巢综合征中的应用研究

舒益民, 梁晓燕, 庄广伦, 周灿权, 张敏芳, 方 丛

(中山医科大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080)

关键词: 卵母细胞; 体外成熟; 卵泡刺激素; 多囊卵巢综合征

中图分类号: R715.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)04-0314-03

近年来随着辅助生育技术的不断发展, 控制性超排卵得到越来越广泛的应用, 在一个控制性超排卵周期获得较多的成熟卵母细胞有助于提高体外受精-胚胎移植的成功机会。但是控制性超排卵所需昂贵的治疗费用及其可能导致的一系列并发症(如中度或重度卵巢过度刺激综合征等)也已引起人们越来越多的关注和重视^[1]。获取不成熟卵母细胞在体外成熟(*in vitro* maturation, IVM), 然后将成熟卵母细胞进行体外受精和胚胎移植, 为人们解决上述问题提供了一条可能的途径。本研究从接受小剂量促卵泡生成素(follicle stimulating hormone, FSH)刺激的多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者获取不成熟卵母细胞进行体外成熟, 探讨在小剂量FSH刺激周期中进行IVM的可行性及具体的实验条件, 为IVM的临床应用及机理研究提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 病例选择

本实验所选取的10例病例均为月经周期不规则PCOS不孕患者, 其中9个患者为原发不孕, 另1例为继发不孕。在这些患者中3例既往有中度或重度卵巢过度刺激综合征病史, 2例为卵巢反应不良患者, 1例为3次ICSI治疗周期失败患者, 不孕时间(5.5±3.1)年, 平均年龄(30.6±3.4)岁。

1.2 小剂量FSH刺激

所有患者均在使用促性腺激素释放激素激动剂后15d或撤退性出血后第5天, 采用小剂量FSH

(Metrodin HP, Serono, Switzerland)进行刺激, FSH的应用时间一般为5~7d, 11个周期使用FSH的平均剂量为(1159±462)IU, 于FSH刺激后(5~8)d, 或于周期的第11~14d取卵, 取卵前17h肌注人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)(Profasi, Serono, Switzerland)10000IU, 取卵当天最大卵泡直径不超过10mm。

1.3 不成熟卵母细胞的获取

阴道B超引导下穿刺取卵, 双腔管冲洗1~2遍, 将卵泡穿刺液转移到Em-Con过滤器中反复冲洗, 待卵泡液冲洗清亮后在解剖显微镜下仔细查找卵冠-丘复合体(oocyte-corona-cumulus complexes, OCCCs), 捡出的形态较好OCCCs置成熟培养液(TCM 199+体积分数20%胎牛血清+75IU/LFSH+10⁴ IU/LhCG+0.05g/L青霉素+0.075g/L链霉素)中, 37℃, 体积分数5%CO₂培养箱中进行成熟培养。取卵后20h观察OCCCs的扩展情况, 取卵后36h观察并记录成熟情况。

1.4 受精和胚胎培养

取卵后36h后去除卵母细胞周围的卵丘细胞, 当观察到有第一极体排出时, 认为卵母细胞成熟。成熟卵母细胞均采用卵浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)辅助受精, 其余生殖泡期(geminal vesicle, GV)或处于第一次减数分裂中期(metaphase I, MI)的卵母细胞在成熟培养液中继续培养12h, 至取卵后48h将所得成熟卵母细胞再进行ICSI。ICSI后14~18h观察并记录原核及受精情况, 受精卵在胚胎培养液(IVF-20 (IVF Science, Sweden)中继续培养2~3d, 于取卵后

收稿日期: 2001-05-21

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(20001339)

作者简介: 舒益民(1971-), 男, 湖北咸宁人, 博士生, 妇产科生殖内分泌专业。

第4天下午进行胚胎评分和胚胎移植。

1.5 统计学分析

用 χ^2 检验分析各组率间差异显著性, $P < 0.05$ 时认为差异具显著性, $P < 0.01$ 差异有极显著意义。

2 结果

2.1 OCCCs的形态学变化

11个IVM周期共获取209个OCCCs用于体外成熟。在IVM前形态较好的OCCCs卵丘细胞排列得很紧密,整个卵母细胞被卵丘细胞完全包裹,有些卵母细胞的卵浆中可见比较明显的生殖泡,IVM后20hOCCCs逐步伸展,卵丘细胞之间的间隙变大,卵母细胞中央的GV也发生破裂,IVM后36hOCCCs变得更加舒展,卵母细胞卵周间隙中可见第一极体的排出。

2.2 卵母细胞成熟及胚胎发育情况

IVM后36h去除卵母细胞周围的卵丘细胞,209个不成熟卵母细胞中有125个成熟(125/209, 59.8%),将体外培养36h尚未成熟的卵母细胞继续培养至48h成熟卵母细胞总数达到144个,48h成熟率为68.9%,体外成熟36h时成熟卵母细胞数目占48h成熟卵母细胞总数的86.8%(125/144),这说明体外成熟36h可以获得绝大多数的成熟卵母细胞,只有少数卵母细胞(13.2%)要等到48h才能成熟。144个成熟卵母细胞受精率和分裂率分别为71.5%(103/144)和94.2%(97/103)。

2.3 临床结局

总共10个患者11个IVM治疗周期共移植41个胚胎,胚胎移植后14d hCG阳性8例,其中5例于胚胎移植后5周可见孕囊及胎心搏动,临床妊娠率45.5%,1例于hCG阳性后第5周阴道B超检查发现为空囊,另2例分别于验尿阳性后3周流产,胚胎种植率12.2%。其中第1例妊娠阳性患者于2000年12月进行胚胎移植,现为孕21周⁺正常妊娠中。

3 讨论

IVM已经比较广泛地应用于哺乳动物的研究,但是对于包括人类在内的灵长类动物,IVM的研究和应用还处于起步阶段,有关人类卵母细胞成熟的机理还有很多问题值得进一步探讨^[1]。早在1991

年Cha^[2]就报道世界上第一例不成熟卵母细胞体外成熟后出生婴儿,可是直到现在全世界通过IVM获得的出生婴儿也不超过100个^[3]。IVM成功率低除与体外成熟卵母细胞胚胎发育及种植潜能下降有关外,由于不能获得足够数量的不成熟卵母细胞而导致可供移植的胚胎数目及质量下降也是一个重要原因^[3]。与体内成熟的卵母细胞相比,来源于体外成熟卵母细胞胚胎发育相对较差,因此获取一定数量的不成熟卵母细胞对于提高IVM的成功率具有特别重要的意义。

研究证实,从PCOS患者获取的不成熟卵母细胞比非PCOS明显增加^[4],目前IVM多以PCOS或多囊卵巢患者为研究对象。至于在获取不成熟卵母细胞前是否需要进行促性腺激素刺激一直存在争议。在以往的研究中,Wynn等^[5]对比研究了在月经周期正常患者中应用小剂量FSH刺激的探讨研究,他们对17例供卵者短期内应用600IU的FSH,然后从直径小于或等于4mm的卵泡中获取不成熟卵母细胞在体外成熟培养48h,对照组9例患者没有进行FSH刺激,结果对照组与进行FSH刺激的患者卵母细胞成熟率分别为43.5%和71.1%,平均每个患者所得到的MII期卵母细胞由(2.1±0.7)个上升到(4.8±0.7)个,作者认为FSH刺激有利于得到更多的成熟卵母细胞用于体外受精和胚胎移植,而Suikkanen^[6]从黄体晚期开始给予小剂量FSH刺激直到最大卵泡达到10mm大小,他们的结果也显示,小剂量FSH能够有效地提高卵母细胞获取率和受精率。

本研究以PCOS患者作为研究对象,首次在卵泡发育早中期对PCOS患者给予小剂量FSH刺激,于优势卵泡发生选择前获取不成熟卵母细胞进行体外培养。11个IVM周期共获得209个形态较好的OCCCs,平均每个周期获卵19个,较Cha等^[3]从非促性腺激素刺激周期平均获卵13.6个明显增加。分析造成这种差异的原因,一方面可能与病例选择有关,同时也提示在避免引起卵巢过度刺激综合征的同时,小剂量FSH刺激可能有利于形成一批大小比较均匀的卵泡,增加不成熟卵母细胞的获取效率,从而为进行下一步的体外成熟提供了比较充足的卵母细胞来源。

虽然本研究中11个周期获得了5例临床妊娠,但是由于病例数较少,对小剂量FSH在PCOS中应用的可行性还无法作出一个明确结论,今后还需要进行比较大样本的对照研究。不过本研究为

进一步探讨如何提高 IVM 的成功率提供一条思路, 也为减少 PCOS 患者卵巢过度刺激综合征的发生提供了一条新的途径。

参考文献:

- [1] Schramm R D, Paprocki A M. Birth of the monkey infant after transfer of embryos derived from *in vitro* matured oocytes: short communication[J]. Hum Reprod 2000, 15 (9): 2411.
- [2] Cha K Y, Koo J J, Ko J J, et al. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles: their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program[J]. Fertil Steril, 1991, 55(1): 109.
- [3] Cha K Y, Han S Y, Chuang H M, et al. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro*

fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2000, 73(5): 978.

- [4] Trouson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocyte recovered from untreated polycystic ovarian patients[J]. Fertil Steril, 1994, 62(2): 343.
- [5] Wynn P, Picton H M, Krapez J A, et al. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by *in vitro* maturation[J]. Hum Reprod 1998, 13(11): 3132.
- [6] Suikkari A M, Tulppala M, Tuuni T, et al. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes [J]. Hum Reprod 2000, 15(4): 747.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 299 页)

采用自动模式转换 DDD 起搏器, 在快速心律失常发生时, 起搏器将及时转换起搏模式为双腔感知双腔起搏按需型 (DDI) 或心室感知双腔起搏按需型 (VDI), 避免阵发快速心律失常时双腔起搏器跟踪快速心室率而产生的较快的心室起搏频率, 防止心悸、心慌、心功能恶化^[5,9]。自动模式转换 (AMS) 的功能明显受房颤低感知和由于干扰引起过度感知的限制。心房感知程控影响房颤的正确发现, 适当调程心房感知灵敏度, 能提高 AMS 的准确性^[6~8]。根据 AMS 的程控记录判断该起搏技术对快速房性心律失常疗效, 才具有准确的客观依据。本组 2 例阵发心房颤动者安装具有自动模式转换的三腔起搏器, 术后发生阵发房颤时, 起搏器均有效地自动转换模式, 效果良好。

合并房内阻滞心功能差的病人, DDD 起搏可能发生 DDD 频率应答 (R) 起搏综合征^[1], 这是由于左右心房不同步起搏, 左房的激动延迟发生, 影响左房收缩对左室充盈作用, 使心排血量减少, 病情加重。应用双房同步起搏消除了房间传导阻滞使双房电活动恢复同步化, 可以预防某些快速房性心律失常, 治疗 DDD(R) 起搏器综合征。本组 1 例扩张性心肌病心功能低下的病人, 应用三腔起搏器治疗, 没有发生 DDD 起搏器综合征, 患者术后 1 个月复查心功能明显提高, 左室腔缩小。

参考文献:

- [1] 郭继鸿. 三腔心脏起搏器临床应用[J]. 中华心律失常学杂志, 1998, 2(3): 229.
- [2] Saksena S, Prakash A, Hill M, et al. Prevention of recurrent atrial fibrillation with chronic dual-site right atrial pacing[J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 28(3): 687.
- [3] Yu W C, Chen S A, Tai C T, et al. Effects of different atrial pacing mode on atrial electrophysiology: implicating the mechanism of biatrial pacing in prevention of atrial fibrillation[J]. Circulation, 1997, 96(9): 2992.
- [4] Barold S S, Cazeau S, Mugica J, et al. Permanent multisite cardiac pacing[J]. PACE, 1997, 20(11): 2725.
- [5] Lau C P, Tai Y T, Fong P C, et al. Atrial arrhythmias management with sensor controlled atrial refractory period and automatic mode switching in patients with minute ventilation sensing dual chamber rate adaptive pacemakers[J]. PACE, 1992, 16(10 Pt 1): 1504.
- [6] Leung S K, Lau C P, Lam C T, et al. Programmed atrial sensitivity: a critical determinant in atrial fibrillation detection and optimal automatic mode switching[J]. PACE, 1998, 21(11 Pt 2): 2214.
- [7] Lam C T, Lau C P, Leung S K, et al. Improved efficacy of mode switching during atrial fibrillation using automatic atrial sensitivity adjustment[J]. PACE, 1999, 22(1 Pt 1): 17.
- [8] 耿仁仪, 朱中林, 郑书钧, 等. 起搏方式转换功能起搏器的临床应用[J]. 中华心律失常学杂志, 1999, 3(2): 93.

(编辑 张敏瑞)