

· 成果综述 ·

体外受精与胚胎移植研究进展^①

庄广伦^②

(中山医科大学附属第一医院生殖医学研究中心; 广州, 510080)

摘要 作者综述我院自 1990 年建立体外受精与胚胎移植技术应用于治疗不育的研究。目前本技术已处于国内领先地位, 技术的改进着重于如下几方面: ① 改进治疗周期超排卵方案, 提高卵子受精率; ② 改良选择性减胎术, 达到准确、简便、安全, 减少多胎妊娠; ③ 应用体外受精与胚胎移植 (IVF-ET) 技术为卵巢早衰患者及遗传病夫妇提供赠卵、赠胚胎治疗的方法; ④ 建立第 2 代 IVF-ET 技术, 应用卵母细胞单精显微注射技术 (ICSI) 治疗严重男性因素与不明原因不育, 同时展望人工辅助破‘壳’ (assisted hatching) 和提高子宫内膜对胚胎的接受性及提高种植率和妊娠率, 利用显微注射操作技术发展种植前的诊断。

关键词 受精, 体外; 胚泡移植; 促性腺素类 治疗应用; 妊娠减少, 多胎; 卵母细胞移植 方法

中图分类号 R714.13

本世纪以来人们在治疗不育症上不断寻求有效的方法, 在早期主要着眼点放在输卵管的整复手术。自 60 年代开始, 逐渐将研究重心转向探讨不依赖输卵管手术的实验室技术, 1973 年人类体外受精成功, 但移植后却失败了。终于 1978 年 Edward 与 Steptoe 医生首先成功地做了世界第 1 例试管婴儿, 开始了人类治疗不育的辅助生育技术新纪元。

体外受精与胚胎移植 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 助孕技术国内起步较晚, 1988 年北医三院国内首例试管婴儿成功分娩出生, 我院开始尚晚, 于 1990 年应用这种技术治疗输卵管因素、男性因素与不明原因不育^[1], 同年获得成功并于 1991 年在澳门分娩首例试管婴儿 3 胞胎。此后按每次移植胚胎计算, 达到 20% ~ 30% 的临床妊娠率, 至今已有 170 个试管婴儿出生并居全国榜首。更可喜的是将第 1 代试管婴儿技术演进到了第 2 代, 采用卵母细胞单精子显微注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 技术于 1996 年 10 月 3 日为一对少弱精的不育夫妇助孕成功生下一名女婴, 成为国内首次采用 ICSI 技术助孕成功的先例。

1 常规 IVF-ET 技术

常规 IVF-ET 技术过程包括超排卵、取卵、受精

培育与胚胎移植步骤, 近年来通过上述环节技术的改进以获得较高的妊娠率。

1.1 超排卵

早期的 IVF-ET 是在自然排卵周期进行, 由于获取卵子少, 导致实施以后步骤困难, 妊娠率低, 自 1983 年澳大利亚 Carl Wood 教授应用人类促性腺激素促排卵, 可以获得更多卵子, 从而提高了妊娠率。此后促性腺激素超排卵被广泛应用。但由于超排卵过程多个卵泡发育, 雌二醇产生增加, 引起反馈的内源性早熟的黄体生成素 (LH) 峰出现, 在卵泡不够发育时, 导致卵子早熟, 质量差, 受精率与妊娠率低下。为克服内源性早熟 LH 峰出现, 1991 年我院应用下丘脑促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a) 的喷鼻剂—Buserelin, 使垂体达到降调节, Buserelin / 促卵泡素 (FSH) / 人类更年期促性腺激素 (HMG) / 人类绒毛膜促性腺激素 (hCG) 作为常规的超排卵方案。对比原来超排卵不用 Buserelin 的对照组, 其 hCG 注射前 LH 水平明显下降 ($P < 0.05$), 早熟 LH 峰发生为 0, 卵子受精率与卵裂率均显著性增加 ($P > 0.25, P < 0.005$), 从而增进了妊娠率^[2]。若超排卵反应差, 卵泡发育缓慢, 在超排方案联合使用小剂量生长激素, 每周总剂量为 12 IU 足以有效促进卵母细胞成熟, 提高受精率, 增加移植胚胎数, 明显提

① 曾获 1993 年及 1995 年广东省卫生厅科技进步二等奖和三等奖, 1996 年吴阶平奖励 ② 第一作者, 1937 年出生, 男, 教授

高妊娠率。生长激素改善卵母细胞的成熟与质量可能通过胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor, IGF-1) 的旁调节, 增强促性腺激素的超排卵作用^[3]。

多囊卵巢综合征在超排卵周期是发生卵巢过度刺激征的主要高危对象^[4], 高 LH 水平常是导致卵子质量低下的原因, 1992 年我院使用长效 GnRH-a 制剂 Decapetyl 结合促性腺激素超排卵应用于 IVF-ET 治疗顽固性多囊卵巢综合征患者, 受精率及妊娠率分别为 76.2% 和 38.6%, 与常规超排卵方案相比较有明显提高 ($P < 0.05$)^[5]。Decapetyl 最大特点是对垂体降调节效应强, 且持续时间长, 尽管多个卵泡发育, 不发生早熟内源性 LH 峰, 使卵子质量获得保证, 通过穿刺取卵抽吸排空卵泡液, 减少卵巢过度刺激征的发生, 因此过去曾发生卵巢过度刺激综合征或出现过早熟 LH 峰, 或过去使用常规超排卵方案的 IVF 治疗失败的多囊卵巢综合征病者, 长效 GnRH-a 联合促性腺激素 FSH 或 HMG 是最好的选择方案。

1.2 B超监测与取卵

超排卵的卵泡发育过程过去依赖于激素测定与 B 超联合监测。目前已有一些作者通过观察雌二醇水平与卵泡发育相关性得出的经验, 可以通过 B 超直接观察发育卵泡数量与速度估计对 HMG 的反应性。我们一直采用 B 超作为超排卵主要的监测手段, 临近 hCG 注射前尿标本 LH 测定是唯一的激素检测, 因此免除了反复抽血而增加患者的痛苦。90% 以上患者可于排卵前对成熟卵泡进行穿刺取卵^[6]。

80 年代剖腹手术同时取卵早被抛弃, 腹腔镜取卵亦被 B 超引导阴道穿刺取卵所取代。我们一开始就采用 B 超引导阴道取卵, 手术不需麻醉, 不受盆腔粘连限制, 可以反复多次进行, 取卵率高, 手术简便, 痛苦少, 无需住院, 易被病者接受。同时更因技术操作简便, 容易掌握, 利于培训新手。

1.3 体外受精与胚胎移植

本技术应用于临床前已开展了小白鼠体外受精与精液处理研究^[7]。自 1992 年我们在受精与培育系统作了较大的改进, 将原来每毫升 10% 血清的 Earles 培养液含 1 个卵子与 50 000 条-80 000 条精子的受精系统改为微滴受精, 即在一个培养皿上安放 7~8 滴含 10% 血清的 Earles, 每滴含 1~3 个卵子及 5 000 条精子, 并盖上矿物油。采用微滴受精法的优点是: ① 使培养液温度与 pH 相对恒定; ② 不受外界污染; ③ 减少通常 IVF 要求受精精子的数量; ④

节省试剂及培养箱内空间。实验将提高受精率与胚胎质量, 特别适用于少弱精病者。

胚胎移植在我院常规的治疗周期前探宫腔, 了解子宫长度与倾屈位置及内口进入困难情况, 对移植胚胎时达到无创伤与出血是十分重要的。移植胚胎数 5 个以下时, 妊娠率与移植胚胎数呈正相关, 但随之而来多胎妊娠增加。我院平均每周期移植胚胎 4.2 个, 多胎妊娠发生率 44%。因此对 3 胎以上者实行减胎术。为减少多胎发生, 我们减少移植胚胎数目, 最多移植 4 个, 将剩余胚胎冷冻保存。

2 选择性减胎术

由于妊娠胎儿数目增加, 对胎儿幸存及产妇健康构成危险因素, 诱发排卵及体外受精胚胎移植增加多胎妊娠发生, 其产科分娩结局发生的合并症相对较自然妊娠略有增加^[8]。过去对多胎妊娠的处理要不引产要不任其发展, 造成了患者心理与身体健康不良影响。早期妊娠采用选择性减胎术是为多胎妊娠提供一种较有效的处理方法。本技术的发展可分为 3 个阶段:

2.1 经腹部减胎 (第一阶段)

1992~1994 年对 9 例妊娠 8~12 周采用经腹壁进针, B 超指引穿过子宫壁进入所减灭的胎囊, 直接向胎心搏动区注射 1% 氯化钾溶液 0.6~1.2 ml 致胎心搏动停止^[9,10]。此法因不易将药物准确注入胎儿心脏以及观察胎心搏动停止较费时等问题。

2.2 经阴道减胎^[11] (第二阶段)

1994~1995 年改为经阴道减胎, 用 B 超指引穿刺针穿过阴道壁、子宫壁进入胎囊, 直刺胎心搏动区抽吸与刺杀令心跳停止并抽空羊水, 此方法适用于 7~8 周妊娠, 但仍然存在抽吸刺杀后胎心跳动未能停止, 虽暂时停止或变慢需要再次反复操作等麻烦。

2.3 绞杀器减胎 (第三阶段)

从考虑增加胎囊内胎儿杀伤力研制一具绞杀器, 当穿刺针尖刺入胎心搏动区, 拔出穿刺针蕊, 绞杀器插进针管向针尖伸出, 钢丝立即向两侧分开成叉状嵌刺在心搏区, 一旦转动立即将胸腔及部分胎体绞烂, 若接触脐带可使脐带绞断, 因此毁胎准确, 快捷, 安全, 简便, 从 1996 年 4 月至今已有 6 例减胎成功, 无合并症。

3 卵子与胚胎赠送

如何解决卵巢早衰,生育功能问题,赠送卵子或胚胎是一条最好的途径。1994年1月我院首次报道我国首例卵巢早衰病者采用类固醇激素替代治疗和供卵获得妊娠成功,并足月分娩一正常新生儿^[12]。接着将1992年10月~1995年6月的22例治疗情况作小结:胚胎移植31周期,平均每周期移植胚胎数 $3.5\text{个} \pm 1.3\text{个}$,胚胎评分 $17.2\text{分} \pm 8.7\text{分}$,临床妊娠率36% (11/31),双胎妊娠4例,单胎7例,足月分娩2例。对卵子来源于已知供卵者获得完整卵泡簇供卵组,其临床妊娠率明显高于IVF-ET剩余卵子组,且流产率也显著降低 ($P > 0.001$),接受者低年龄组妊娠率明显高于高年龄组 ($P < 0.05$),类固醇激素替代治疗周期第16~18天移植胚胎获得较高妊娠率,而超过第20天移植之妊娠率为0^[13]。

自1995年7月后,除治疗卵巢早衰病者外,还接受遗传病夫妇和由于超排周期反应差无卵子导致IVF-ET治疗周期失败者,以及年龄超过42岁要求生育的妇女进行治疗,目前总治疗已达44例,49周期,获得妊娠22例,5例流产,2例宫外孕,6例分娩9个婴儿,9例继续妊娠。

4 卵母细胞单精子显微注射技术

常规IVF技术是体外试管内施行的大体受精技术 (macroinsemination),治疗男性不育,其受精率明显低于其他因素引起的不育,近年发展起来的显微注射受精技术 (microinsemination)主要是适用少弱精患者,其中透明带部分切除 (PZD),透明带下受精 (SUZI)所需的精子数目 $> 5 \times 10^6 / \text{mL}$,多精受精无法控制,受精率与妊娠率低,1992年Palermo等使用卵母细胞单精子显微注射克服了过去显微注射的缺点,这种治疗不受精液常规参数所限制,甚至经精液常规检查而无精子的患者,只要在睾丸或附睾内取到活精子便可进行。1995年12月我院开始应用了本技术治疗严重男性因素及不明原因不育患者31例,严重少弱畸精导致不育夫妇28例,其中3例输精管阻塞或缺如,采用显微手术经附睾取精,另3例为前次IVF-ET失败者。接受治疗31例共获卵281个中期MII成熟卵母细胞237个,不成熟卵母细胞44个,显微注射后存活卵子213个 (存活率

90%),存活卵子正常受精率为62%,卵裂率为90%,29个有胚胎移植周期至少有1个胚胎可供宫腔移植,8例临床妊娠,妊娠率为27.6%,本技术除应用于严重男性不育者外,对多次IVF周期受精率低 $< 20\%$ 不育者也是一个适当选择^[14]。

5 提高IVF-ET技术的展望

IVF-ET目前的妊娠率不高,大约在20%左右,且流产率20%~30%,尚易忽视发生对常规宫外孕的诊断^[15],目前已开始使用纯促卵泡素超排卵,企图提高卵子质量,提高妊娠率,降低流产率。提高移植后胚胎种植率问题,我们将进行子宫内膜的成熟与容受力研究^[17],如子宫动脉血流阻力,对妊娠与流产关系,透明带坚硬、过厚进行人工的辅助破“壳” (assisted hatching)^[18],以增加其胚胎种植能力,改善妊娠率。

IVF-ET结合人类优生学的研究,是种植前诊断。显微操作技术从胚胎取出细胞不致影响其发育,可以通过单细胞聚合酶链反应 (PCR)或荧光原位杂交 (FISH)技术进行基因诊断,将有隐性基因疾病的患者提供正常染色体的胚胎,避免遗传病儿的出生。

参 考 文 献

- 1 庄广伦,周灿权,张秀俊,等. 人类体外受精与胚胎移植. 中山医科大学学报, 1991, 12(4): 299
- 2 庄广伦,顾正田,周灿权. Buserelin在超排卵周期中的作用及对卵泡液的影响. 中华妇产科杂志, 1993, 28(1): 10
- 3 庄广伦,翁世湘,周灿权. 小剂量生长激素在体外受精超排卵周期中的作用. 中华妇产科杂志, 1994, 29(8): 471
- 4 顾正田,庄广伦. 卵巢过度刺激征四例. 生殖医学杂志. 1993, 2(2): 120
- 5 李 蓉,庄广伦,周灿权. 体外受精周期中应用长效促性腺激素释放激素激动剂治疗多囊卵巢综合征. 中华妇产科杂志, 1996, 31(5): 98
- 6 周灿权,庄广伦. B型超声显像在体外受精与胚胎移植中的作用. 生殖医学杂志, 1992, 1(1): 44
- 7 庄广伦,张曦伟,吴国华. 洗精处理的细菌学分析. 中山医科大学学报. 1990, 11(4): 49
- 8 李小毛,庄广伦,李大慈,等. 体外受精 胚胎移植术后妊娠妇女的产科结局. 中华妇产科杂志, 1996, 31(8): 483

- 9 庄广伦,方群,游泽山,等.应用选择性减胎术处理早期多胎妊娠.中华妇产科杂志,1994,29(5):270
- 10 方群,庄广伦,游泽山,等.多胎妊娠选择性减胎术的临床应用.中华医学杂志,1995,75(8):459
- 11 周灿权,庄广伦,李洁,等.经阴道穿刺选择性减胎术.中山医科大学学报,1996,17(1):37
- 12 庄广伦,李洁,周灿权,等.供卵治疗卵巢早衰妊娠成功(附1例报告).中山医科大学学报,1995,16(1):71
- 13 李洁,庄广伦,周灿权,等.卵巢早衰与卵子赠送22例分析.生殖医学杂志,1996,5(1):3
- 14 李蓉,庄广伦,张敏芳.卵母细胞单精显微注射技术治疗严重男性因素及不明原因不育患者的研究.中山医科大学学报,1996,17(4):封2
- 15 柯佩琪,庄广伦,周灿权,等.体外受精-胚胎移植致宫内同时妊娠一例.生殖医学杂志,1996,5(1):50
- 16 李满,庄广伦.在体外受精与胚胎移植中子宫内膜的成熟与容受力.中国实用妇产科杂志,1996,12(5):301
- 17 李满,庄广伦.辅助人类胚胎破“壳”(assisted hatching)对种植的作用.生殖医学杂志.1996待发表

(1996-11-25收稿 1996-11-28修回)

THE DEVELOPMENT OF STUDY ON IN VITRO FERTILIZATION AND EMBRYO TRANSFER

Zhuang Guanglun

(Assisted Reproductive Research Center, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

The objective was to review the development of studies on in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) in the treatment of infertility from 1990 to 1996. Several importances were emphasized ① Increased the fertilization rate resulting from improvement of the strategy on superovulation in the IVF-ET cycle. ② Created a simple, accurate and safe method in selective reduction to decrease multiple pregnancy rate. ③ By IVF-ET technique oocyte/embryo donation therapy for the patients who are suffering from premature ovarian failure and genetic diseases. ④ Set up the second generation IVF-ET technique-intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the management of male factor and idiopathic fertilization. In addition, assisted hatching and preimplantation diagnosis will be the future study.

Subject headings fertilization in vitro; embryo transfer; gonadotrophins/therapeutic use; pregnancy reduction, multiple; oocyte donation/methods