

http://www.journals.zju.edu.cn/med

人类卵子体外成熟及其胚胎冷冻复苏研究

朱依敏, 叶英辉, 高惠娟, 徐晨明, 钱羽力, 金帆, 黄荷凤

(浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] **目的:**探讨取卵周期准备、卵泡发育状态、培养液成分对未成熟卵的获取率、体外成熟率、受精率、胚胎质量、胚胎移植后成功率及其胚胎冷冻复苏移植的影响。**方法:**19例进行卵子体外成熟的不孕不育患者为研究对象。其中1例为自然周期,14例为促性腺激素(Gn)诱导排卵周期,4例常规控制性促排卵(COS)周期;分别以TCM199或人输卵管液(HTF)为基础培养液,进行卵子体外成熟培养。**结果:**当取卵时卵泡大小不均一旦最大卵泡直径 ≥ 12 mm时,获卵率、受精率和胚胎质量下降;TCM199组优质胚胎的形成率显著高于HTF组($P < 0.01$)。IVM胚胎经冷冻复苏、胚胎移植能获得与常规IVF周期相似的妊娠成功,出生后代健康、无畸形。**结论:**在IVM周期取卵时卵泡大小不均一旦最大卵泡直径 ≥ 12 mm时,将影响胚胎着床率和累积妊娠率。TCM199优于HTF培养液,能提高未成熟卵体外成熟后受精卵所形成胚胎的发育能力。IVM胚胎经冷冻复苏-胚胎移植能获得与常规IVF周期相似的妊娠成功,出生后代健康、无畸形。

[关键词] 卵母细胞; 受精, 体外; 细胞, 培养的; 胚胎移植; 卵泡; 低温保存; 复苏术; 胚胎

[中图分类号] R 714.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)05-0443-06

In vitro maturation—*in vitro* fertilization—embryo transfer—frozen-thawed of human oocytes

ZHU Yi-min, YE Ying-hui, GAO Hui-juan, et al (*The Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of different cycles, ovarian follicle size and IVM culture media on the number of retrieved immature oocytes, maturation rate, fertilization rate, embryo quality and implantation rate, pregnancy rate, delivery rate, survival and development of frozen-thawed embryos from IVM. **Methods:** The oocytes were obtained by follicular aspiration from 19 women undergoing oocyte retrieval for *in vitro* maturation due to the possible risk of ovarian hyperstimulation in IVF-ET program. One patient was in natural cycle, four patients were in ovulation induction cycles with gonadotropine and fourteen patients is controlled ovarian stimulated cycles. All the oocytes retrieved from follicles with 10.0~13.5 mm in

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-07-12

基金项目: 浙江省科技厅重点项目(021107058, 2005 C 23021); 浙江省教育厅项目(20020786); 浙江大学医学院青年启动基金资助项目。

作者简介: 朱依敏(1964—), 女, 主任医师, 博士生; 从事妇产科生殖内分泌的研究。

通讯作者: 黄荷凤(1957—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事妇产科生殖内分泌的研究; E-mail: huanghefg@hotmail.com.

maximum diameter were allowed to culture in medium M-199 (TCM 199) or HTF supplemented with other substance. **Results:** When there were nonuniform diameters of follicles and the diameter of largest oocyte exceeded 12 mm, the retrieval rate of oocytes, fertilization rate, and the number of high-quality embryos decreased. The high-quality embryos formation rate was higher for the oocytes cultured in TCM 199 medium than in HTF medium ($P < 0.01$). After being frozen-thawed, the IVM embryos could achieve the same outcome when compared with the conventional IVF treatment. In addition, the offspring were healthy. **Conclusions:** When the nonuniform diameters of follicles and the diameter of largest oocyte exceeds 12 mm, the retrieval rate of oocytes, fertilization rate, and the number of high-quality embryos decreased. TCM199-based medium is better to improve the developmental potential and implantation rate of embryos derived from *in vitro* matured oocytes. After being frozen-thawed, the IVM embryos could achieve the same outcome when compared with the conventional IVF treatment. In addition, the offspring are healthy.

[**Key words**] Oocytes; Fertilization *in vitro*; Cells, cultured; Embryo transfer; Ovarian follicle; Cryopreservation; Resuscitation; Embryo

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(5):443-448.]

卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation of immature oocytes, IVM)是指模拟体内的环境,使处于生发泡期(germinal vesicle, GV)或第一次减数分裂中期 I (Metaphase I, M I)的未成熟卵母细胞(immature oocyte, IMOs),在体外完成第一次减数分裂进入第二次减数分裂中期 I (Metaphase II, M II)发育成为成熟卵母细胞的过程。成熟卵母细胞是具有正常受精功能、并形成着床能力的胚胎^[1]。应用 IVM 技术可以避免常规体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)促排卵周期可能诱发的危及妇女生命的严重卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS),同时可减少患者促排卵药物的治疗费用。因此,IVM 是一种对母亲较为安全、治疗费用较低廉的不孕治疗手段。尽管 IVM 技术有诸多优点,但至今尚未被作为常规的辅助生育技术(assisted reproductive technology, ART)。据 2005 年的统计,IVM 技术出生婴儿大约仅为 300 名^[1]。主要原因在于目前 IVM 技术难以完全模拟体内卵母细胞成熟的生理环境,体外成熟卵胞浆的发育远远落后于胞核的发育,从而影响了受精、胚胎进一步发育的能

力。为探索这一关键问题,本研究比较了不同取卵周期准备、卵泡直径、IVM 培养液对未成熟卵的获取率、成熟率、受精率、卵裂率、优质胚胎率、着床率、妊娠率和出生率,以及胚胎冷冻复苏移植的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2002 年 7 月—2004 年 7 月在浙江大学医学院附属妇产科医院生殖中心进行卵子体外成熟的不孕患者。纳入标准:①曾多次促排卵未孕并有 OHSS 发生的多囊卵巢综合征(PCOS)患者;②拟进行 IVF 促排卵时出现 OHSS 高危现象者;③既往促排卵时发生严重 OHSS 的不孕患者,同时存在其他 IVF 指征或 ICSI 指征;④无妊娠反指征;⑤所有患者接受 IVM 前均签署知情同意。纳入本研究的对象共 19 例,年龄 27~37 岁(中位年龄 31 岁)。其中继发不孕 9 例,原发不孕 10 例。不孕原因:5 例男性不孕合并 PCOS,1 例子宫内膜异位症,4 例输卵管性不孕,9 例常规促排卵或同时行人工授精治疗妊娠失败的 PCOS 患者。

1.2 取卵周期准备 根据研究对象纳入标准分为①未刺激周期,窦卵泡大小较一致,直径在

5~8 mm。②仅用数天促性腺激素(Gn)促排卵的月经规则或PCOS不孕妇女,月经周期6~8 d开始超声监测卵泡数目、直径和子宫内膜,当最大卵泡直径(maximum follicular diameter, MFD)达到9~12 mm时,注射hCG 5 000~10 000 IU(Profasi, Seron),34~36 h后取卵。③拟IVF妇女经常规控制下促排卵(controlled ovarian stimulation, COS),当最大卵泡发育至10~12 mm并出现OHSS高危现象时,经患者知情同意改为IVM周期。COS方案为从黄体期开始应用促性腺激素释放激素激动剂,月经来潮后启动重组促卵泡素(rFSH, Gonal-F, Serono)/尿促性素(HMG)长方案促排卵。

1.3 取卵方法 与常规IVF周期B超引导下经阴道取卵相似,但吸引负压下降至80~100 mmHg,常规双腔取卵针(K-OPSD-1635-LI-B-ET,澳大利亚Cook公司)穿刺双侧阴道,超声下可辨认卵泡,获取卵子-放射冠-卵丘复合物(oocyte-cumulus complexes, OCCCs)。

1.4 体外培养条件与方法 两种基本的培养基:①TCM组:TCM 199(Cat # M4530, Sigma, USA) + 10%PPF(plasma protein fraction, Cat #: 613-25, Irvine, USA)或10%合成血清(serum substitute supplement, SSS, Cat #: 99193, Irvine, USA) + 0.075 IU/ml r-FSH + 0.5 IU/mL hCG + 1 μ g/ml β E2(Cat #: E 4389USA, Sigma, USA);②HTF方案组:HTF(human tubal fluid medium, Cat #: 90125, Irvine Scientific, USA) + 10%PPF或10%SSS + 0.075 IU/ml r-FSH + 0.5 IU/ml hCG + 1 μ g/ml β E2。将上述培养液配制后加入0.8 ml于NUNC四孔培养皿,置5%CO₂、37 C培养箱内,过夜平衡。未成熟卵体外培养间隔6~12 h观察1次,超过24 h换培养液。倒置立体显微镜观察卵细胞的成熟度。观察卵细胞有无生发泡(GV),卵丘颗粒细胞层数及分散程度,有无极体排出。卵母细胞成熟时排出极体、卵丘颗粒细胞层呈分散状态。TCM199由于保质期的关系,在保质期内仅收集到3例,而HTF为常规IVF所需的培养液,除1例未获卵外,其余获卵的15例均采用HTF培养。

1.5 受精方法 采用单精子卵细胞质内注射

(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)受精,选择有第一极体的成熟卵细胞进行ICSI操作。16~18 h后在倒置显微镜下观察受精情况,有明显雌、雄原核和第一、第二极体者判断为正常受精合子。转入P-1+10%PPF或10%SSS培养1~2 d,有胚胎形成则行胚胎移植,多余胚胎常规冻存^[2]。

优质胚胎评价标准:卵裂速度正常;细胞大小均匀或略有不均匀,形状基本规则,透明带完整;胞质均匀清晰,无或少许颗粒出现;碎片<25%。

1.6 胚胎冷冻复苏方法 多余的优质胚胎经常规慢速冷冻方法保存^[2]。取卵周期未获妊娠者3个月后进行冻存胚胎快速解冻法^[2]复苏、移植。

1.7 子宫内膜准备与黄体支持 戊酸雌二醇(商品名补佳乐, Progynova, 广州先灵药业有限公司)取卵日开始4~6 mg/d, 2 mg分次口服;当日子宫内膜厚 \geq 8 mm时4 mg/d;否则6~8 mg/d。ICSI日开始补充黄体酮油剂80~100 mg/d,肌肉注射。冻融胚胎移植周期准备采用戊酸雌二醇递增法,月经周期第2~3天开始戊酸雌二醇2 mg/d,每4 d加量2 mg/d。周期第9天超声监测子宫内膜,日子宫内膜厚 \geq 8 mm时维持原剂量,当子宫内膜<7 mm时继续增加戊酸雌二醇2 mg/d。周期第13~18天当子宫内膜厚 \geq 8 mm时,开始补充黄体酮油剂80~100 mg/d,肌肉注射,3 d后行冻存胚胎复苏移植,维持原激素用量。妊娠者胚胎移植后10周逐步减量。胚胎移植后14 d测定血hCG确定是否妊娠,移植后35 d超声检查胚胎发育是否正常。

1.8 统计学处理 使用SPSS 10.0统计软件进行分析,两组率的比较采用 χ^2 检验;获卵数和卵泡直径的大小采用t检验。双侧检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 取卵周期准备及其获卵情况 对19例符合IVM纳入标准的不孕妇女实施了IVM,其中自然周期取卵1例,拟IVF的COS周期4例, Gn周期14例。19例除Gn周期1例未获卵,其余18例共获未成熟卵(IMOs)231个。所有周期均无

OHSS 发生。由于自然周期取卵仅 1 例未纳入统计学处理,不同周期获卵数、受精数和优质胚胎率均无统计学意义($P>0.05$),卵母细胞成熟率 COS 组显著高于 Gn 组($P<0.01$),见表 1。3 种取卵周期各有 1 例妊娠:1 例自然周期 IVM

成功妊娠发生于取卵周期胚胎移植,获得双胎妊娠,妊娠 10 周自然流产 1 胎,另 1 胎足月剖宫产分娩 1 健康男婴;Gn 周期和 COS 周期各有 1 例在行冻融胚胎移植后分别获得双胎妊娠和单胎妊娠,分别分娩 2 名女婴和 1 名女婴。

表 1 不同取卵周期准备获卵数、体外成熟率、受精率和优质胚胎率的比较

Table 1 The prepared cycles effects on the number of retrieved immature oocytes, *in vitro* maturation rates, fertilization rates sand high-quality embryo rates

周 期	获卵数/周期	M I 卵率/%	受精率/%	优质胚胎率/%
Gn 周期($n=14$)	11.1±4.7	59(92/156)	51.3(48/92)	18.7(9/48)
COS 周期($n=4$)	17.9±4.5	80(56/70)	58.9(33/56)	24.2(8/33)
	$t=1.724$	$\chi^2=9.451$	$\chi^2=0.641$	$\chi^2=0.356$
	$P=0.104$	$P=0.002$	$P=0.423$	$P=0.551$

注:自然周期仅 1 例未列入表中

2.2 两组不同培养液 IVM 结局比较 TCM 组 3 例中 2 例获得妊娠,均是在取卵周期胚胎移植未孕后进行冻融胚胎移植获得妊娠成功,共出生 3 名女婴;HTF 组 15 例,获得取卵周期胚

胎移植妊娠成功 1 例。2 种不同的培养方案,卵子成熟率、受精率、卵裂率均差异无显著性,但优质胚胎的形成率 TCM 组显著高于 HTF 组($P<0.01$),见表 2。

表 2 不同培养条件卵子体外成熟率、受精率、卵裂率和优质胚胎率的比较

Table 2 The different culture media effects on the number of retrieved immature oocytes, *in vitro* maturation rates, fertilization rates and high-quality embryo rates

组 别	IMOs	M I 卵率/%	受精率/%	卵裂率/%	优质胚胎率/%
TCM 组($n=3$)	14.0±4.0	73.8(31/42)	64.5(20/31)	100(20/20)	55(11/20)
HTF 组($n=15$)	12.6±4.9	64.5(122/189)	54.0(66/122)	100(66/66)	9.1(6/66)
	$t=0.336$	$\chi^2=1.317$	$\chi^2=1.090$	$\chi^2=0$	$\chi^2=17.605$
	$P=0.741$	$P=0.251$	$P=0.296$	$P=1$	$P=0.000$

2.3 取卵前卵泡发育的均匀度与 IVM 结局的关系 根据取卵前卵泡发育大小相对均匀情况分两组:均匀组 9 例,不匀组 10 例。不均组 MFD 大于均匀组($P<0.039$);两组获卵数、卵母细胞成熟率比较差异无显著性,但卵泡发育不均组有 1 例为 Gn 周期,穿刺卵泡 17 个,未获卵;受精率卵泡、优质胚胎率卵泡发育均匀组均高于不均组,有显著性差异($P<0.05$)。卵泡发育均匀组 3 例妊娠,卵泡发育不均组未获妊娠,见

表 3。

2.4 取卵时最大卵泡直径(MFD)对 IVM 结局的影响 以 MFD 12 mm 为界分 2 组:≥12 mm 组 7 例,<12 mm 组 12 例。两组获卵数、受精率差异无显著性($P>0.05$);卵母细胞成熟率和优质胚胎率两组有显著性差异($P<0.05$);≥12 mm 和<12 mm 组妊娠例数分别为 0 和 3 例(包括取卵周期和冻融胚胎移植周期),见表 4。

表3 卵泡发育均匀性与IVM结局

Table 3 The follicles size effects on the number of retrieved immature oocytes, *in vitro* maturation rates, fertilization rates, high-quality embryo rates and pregnancy rates

卵泡均匀性	MFD/mm	获卵数	MI 卵率/%	受精率/%	优质胚胎率/%	妊娠数
均匀组(n=9)	10.7±1.3	14.6±6.4	64.1(84/131)	66.7(56/84)	27.3(15/55)	3
不均组(n=10)	12.0±1.1	10.0±4.0	69.0(69/100)	43.5(30/69)	6.9(2/29)	0
	<i>t</i> =2.236	<i>t</i> =1.485	$\chi^2=0.603$	$\chi^2=8.275$	$\chi^2=4.884$	
	<i>P</i> =0.039	<i>P</i> =0.156	<i>P</i> =0.437	<i>P</i> =0.004	<i>P</i> =0.027	

表4 最大卵泡直径对IVM结局的影响

Table 4 The maximum follicular diameter effects on the number of retrieved immature oocytes, *in vitro* maturation rates, fertilization rates and high-quality embryo rates and pregnancy rates

最大卵泡直径	获卵数	MI 卵率/%	受精率/%	优质胚胎率/%	妊娠数
≥12 mm(n=7)	14.29±7.95	58.0(58/100)	62.1(36/58)	8.3(3/36)	0
<12 mm(n=12)	10.92±3.26	72.5(95/131)	52.6(50/95)	28.0(14/48)	3
	<i>t</i> =1.029	$\chi^2=5.345$	$\chi^2=1.3035$	$\chi^2=5.531$	
	<i>P</i> =0.318	<i>P</i> =0.021	<i>P</i> =0.254	<i>P</i> =0.019	

2.5 IVM 周期胚胎冻存复苏移植的结局 经IVM 技术除新鲜胚胎移植外,19 个周期中共有5 个周期获得多余胚胎冷冻,其中进行了4 个周期冻存胚胎的复苏移植获得2 例妊娠,出生3 名健康婴儿。

3 讨论

3.1 促性腺激素使用对IVM 的影响 本研究发现自然周期、Gn 周期和COS 周期的获卵数、受精数和优质胚胎率,虽然以COS 组最高,但无统计学意义($P>0.05$),可能与周期数较少有关。卵母细胞成熟率COS 组显著高于Gn 组($P<0.01$)。其原因可能在于卵母细胞未成熟的窦卵泡发育阶段颗粒细胞增殖活跃,受Gn 的刺激分泌雌激素,当 E_2 达到一定水平后反馈性地促使垂体分泌LH,LH 具有使卵泡黄素化的作用,如卵泡发生过早黄素化,将降低卵母细胞质量流产率增加^[3]。COS 中使用GnRHa 能控制内源性LH 峰出现,防止卵泡过早黄素化,提高卵母细胞质量、优质胚胎率和着床率。但是由于本研究例数尚少,有待于扩大样本量,进一步证实。

既往的研究发现,对于卵巢多囊样改变的妇女,卵巢内有大量处于5~10 mm 的窦卵泡,在自然周期取卵同样能获得满意的结局,本研究中唯一的自然周期取卵的PCOS 患者获得成功受孕、分娩,就是1 个例证。

3.2 卵子体外成熟的培养条件 关于卵母细胞体外成熟培养液的组成有许多研究报道,但至今还不清楚适合于IVM 的营养成分组成。目前尚无统一的体外培养体系,各体系培养液的成分及含量均不相同。据文献报道的基础培养液有:m-Ham's F10、MEME、B2、P1、Ham's F10、TCM199、HTF 和合成输卵管液。根据已知的卵母细胞的生长发育和成熟的分子机制可在上述培养液中添加一定浓度的胎牛血清(FCS)、卵泡液(FF)、白蛋白、雌二醇(E_2)、促性腺激素(hCG、FSH、LH、HMG)、生长因子(EGF、VEGF、IGF 等)、细胞因子(TNF、IL-6)、成熟抑制剂等,以提高卵母细胞成熟率、受精率和胚胎发育潜能。目前已有各种IVM 商业培养液,添加FSH/hCG,患者自体灭活血清或卵泡液可能更优于合成血清或血清蛋白调节卵母细胞成熟。

本研究采用两种经典的组织培养基 TCM199 和 HTF 作为基础培养基进行卵子体外成熟培养,结果发现两种培养系统的卵子成熟率、受精率、卵裂率均差异无显著性,但优质胚胎的形成率 TCM 组显著高于 HTF 组 ($P < 0.01$),且 TCM 组虽然只用于 3 例患者,却有多余的胚胎可以冻存,并获得了冻融胚胎移植的妊娠成功。而 HTF 基础培养液仅 1 例妊娠,其余 14 例无论是取卵周期还是冻融胚胎移植周期均未孕。从本实验结果分析,以 TCM199 替代成品 IVM 培养液,可望获得理想的妊娠率。

3.3 卵泡发育情况对 IVM 结局的影响 一般认为当卵泡直径 8~12 mm,同时子宫内膜 > 5 mm 时是获取未成熟卵的合适时机,超过这一时间点,优势卵泡引发的内分泌和旁分泌环境可能引起其他卵子的闭锁,而影响获卵率和卵子质量。有研究发现当最大卵泡达到 10 mm 为佳^[4],但也有相反观点,认为这时太迟,应取消周期^[5]。Chian 等^[6]发现,取卵时卵泡直径大于或小于 12 mm 与获卵数、成熟率、受精率、卵裂率或妊娠率无差异。

本研究发现取卵时最大卵泡直径 ≥ 12 mm 或卵泡发育大小不匀,将影响受精率以及优质胚胎的形成,也有损于胚胎的着床率和妊娠率。卵泡发育大小不匀或取卵时最大卵泡 ≥ 12 mm 的病例均未获得妊娠。因此,建议对于这类病例取消取卵,以 GnRHa 长方案加大 Gn 的用量可望获得理想的妊娠,但有发生严重 OHSS 的风险。为防止 Gn 加量后卵泡发育过多产生的 OHSS,我们参考 El-Sheikh 等^[7]的报道,对发育至 12~14mm 的卵泡采用限制性促排卵方案 (limited ovarian stimulation, LOS),也能获得满意的获卵率、受精率和妊娠率^[8]。

本研究提示 IVM 周期可以获得与常规 IVF/ICSI 周期相似的胚胎冻存-复苏移植后的妊娠率 (2/4),而且出生后代外观未发现严重畸形。我们已初步建立了经 IVM-IVF-胚胎冷冻-复苏移植的治疗方法,如果能进一步改善 IVM 培养系统以提高妊娠成功率,IVM 将有广阔的应用前景。

References:

- [1] MIKKESEN A L. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(5): 593-599.
- [2] ZHU YI-MIN, HUANG HE-FENG (朱依敏, 黄荷凤). Successful clinic pregnancy after transfer of frozen-thawed embryos [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2000, 29(1): 14-15. (in Chinese)
- [3] REGAN L, OWEN E J, JACOBS H S. Hypersecretion of LH, infertility and miscarriage [J]. *Lancet*, 1989, 336(8724): 1141-1144.
- [4] MIKKESEN A L, SMITH S, LINDEERG S. In in-vitro maturation human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(7): 1847-1851.
- [5] LE Du A, KADOCH I J, BOURCIGAUX N, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome; the French experience [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(2): 420-424.
- [6] CHIAN R C, CHUNG J T, DOWNEY B R, et al. Maturational and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis [J]. *Reprod Biomed Online*, 2002, 4(2): 127-132.
- [7] EL-SHEIKH M M, HUSSEIN M, FOUAD S, et al. Limited ovarian stimulation (LOS), prevents the recurrence of severe forms of ovarian hyperstimulation syndrome in polycystic ovarian disease [J]. *Europ Obstet Gynec Reprod Biol*, 2001, 94(2): 245-249.
- [8] ZHU Y M, GAO H J, HE R H, et al (朱依敏, 高惠娟, 何荣环, 等). Research on the protocol of limited ovarian stimulation to prevent ovarian hyperstimulation syndrome [J]. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology* (中华妇产科杂志), 2006, 41(11): 740-744. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]