

不同氧浓度培养对体外受精—胚胎移植及子代出生缺陷的影响

李恩书, 叶晓群, 方 力, 叶英辉

浙江大学医学院附属妇产科医院生殖内分泌科 生殖遗传教育部重点实验室,
浙江 杭州 310006

[摘要] **目的:**比较低氧浓度与高氧浓度培养对体外受精—胚胎移植中胚胎发育、妊娠结局以及子代出生缺陷的影响。**方法:**根据胚胎体外培养的氧浓度,将2013至2015年在浙江大学医学院附属妇产科医院行体外受精—胚胎移植的患者随机分为低氧浓度组($n=2036$,培养体系含氧气体积分数为5%)和高氧浓度组($n=4617$,培养体系含氧气体积分数为20%)。比较两组间受精率、优质胚胎率、临床妊娠率、异位妊娠率、流产率以及子代出生缺陷率等结果指标。**结果:**低氧浓度组优质胚胎率高于高氧浓度组($P<0.05$),但两组间受精率、临床妊娠率、异位妊娠率、流产率和子代出生缺陷的发生率差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。**结论:**体外受精—胚胎移植采用低氧环境培养可能有助于提高胚胎发育潜能,但对妊娠结局和子代出生缺陷的影响不明显。



[关键词] 氧;受精,体外;胚胎移植;新生儿筛查;先天畸形;胚胎发育;妊娠结局

[中图分类号] R715; R394-33 **[文献标志码]** A

Effect of oxygen concentration on outcome of *in-vitro* fertilization—embryo transfer

LI Enshu, YE Xiaoqun, FANG Li, YE Yinghui (Department of Reproductive Endocrinology, Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Key Laboratory of Reproductive Genetics, Ministry of Education, Hangzhou 310006, China)
Corresponding author: YE Yinghui, E-mail: yeyh1999@zju.edu.cn, <http://orcid.org/0000-0001-7520-3871>

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of low and high oxygen concentration on embryo development, pregnancy outcome and birth defects of *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Methods:** According to the oxygen concentration of *in vitro*

收稿日期:2017-02-15 接受日期:2017-06-02

基金项目:国家自然科学基金(81370761);浙江省医药卫生科技计划(2014KYA252,201493615)

第一作者:李恩书(1985—),女,硕士,实验师,主要从事辅助生殖技术研究;E-mail: lienshu@zju.edu.cn; <http://orcid.org/0000-0002-2535-9592>

通讯作者:叶英辉(1970—),女,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事生殖遗传学研究;E-mail: yeyh1999@zju.edu.cn; <http://orcid.org/0000-0001-7520-3871>

culture environment, the IVF-ET performed in the Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine during 2013 and 2015 were divided into low oxygen concentration group ($n = 2036$, 5% O_2) and high oxygen concentration group ($n = 4617$, 20% O_2). The rate of fertilization, good quality embryo, clinical pregnancy, ectopic pregnancy, abortion and birth defect were compared between two groups. **Results:** The good quality embryo rate was significantly higher in the low oxygen concentration group ($P < 0.05$). However, no significant differences were found between two groups in the rate of fertilization, clinical pregnancy, ectopic pregnancy, abortion and birth defect (all $P > 0.05$). **Conclusion:** Low oxygen environment may improve the potential of embryonic development, but its impact on pregnancy outcome and birth defect is not significant.

[**Key words**] Oxygen; Fertilization *in vitro*; Embryo transfer; Neonatal screening; Congenital abnormalities; Embryonic development; Pregnancy outcome

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2017,46(3):290-294.]

一直以来,在辅助生殖技术中,体外受精—胚胎移植的培养体系是影响妊娠结局的重要因素之一。培养体系主要包括培养液、温度和气体浓度。在培养液和温度相对稳定的情况下,有学者开始关注气体组成对配子和胚胎的影响。目前,培养体系的气体组成中,二氧化碳的体积分数均为5%~6%,而氧气浓度有两种——氧气体积分数为5%的低氧培养箱和氧气体积分数为20%的高氧培养箱。在人体内,输卵管和子宫均为低氧环境^[1-2]。有研究指出,在动物模型中,高氧环境可能会产生过多的活性氧,影响胚胎的代谢、发育及基因表达^[3-4]。目前,氧气浓度对人类胚胎培养的影响尚未达成共识^[5-11]。但也有学者认为低氧环境能改善胚胎发育及妊娠结局^[12-15],有些学者则认为低氧浓度环境未必能获得更好的妊娠结局^[6-9,16]。目前在各个生殖中心,低氧培养箱和高氧培养箱均为常规使用设备,两种氧浓度培养对卵裂期胚胎发育的影响尚未有定论。本研究通过

对低氧培养箱和高氧培养箱培养胚胎的比较,观察体外受精—胚胎移植的结局,旨在探讨低氧环境培养对配子、胚胎发育及各种妊娠结局特别是子代出生缺陷是否有影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究的对象为2013至2015年在浙江大学医学院附属妇产科医院行体外受精—胚胎移植的患者6653例,年龄40周岁以下,取卵周期数少于3,不孕年限5年以下,不孕原因为输卵管盆腔因素、免疫因素及原因不明,排除严重男性因素,常规超排卵方案。患者随机分为低氧浓度组(2036例)和高氧浓度组(4617例),两组间年龄、体质指数、不孕年限、获卵数及胚胎移植数差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表1。

1.2 仪器、试剂和药物

氧气体积分数为5%的三气培养箱购自澳大

表1 两组患者一般资料比较

Table 1 Clinical data of two groups

($\bar{x} \pm s$)						
组别	n	年龄(岁)	体质指数(kg/m^2)	不孕时间(年)	获卵数	胚胎移植数
低氧浓度组	2036	30.0 ± 3.6	21.8 ± 2.9	2.60 ± 1.37	11.8 ± 5.1	1.91 ± 0.49
高氧浓度组	4617	30.1 ± 3.9	21.9 ± 2.9	2.64 ± 1.39	12.0 ± 5.4	1.91 ± 0.52
t 值	—	1.30	0.75	0.74	0.46	2.52
P 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

“—”:无相关数据.

利亚 Cook 公司,培养箱型号为 K-MINC-1000;氧气体积分数为 20% 的培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司,培养箱型号为 Forma[®] II 3110。G-IVF 胚胎培养液、G1 胚胎培养液、G2 胚胎培养液均购自瑞典 Vitrolife 公司。促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a):醋酸曲普瑞林注射液(达必佳)购自瑞士辉凌公司;促卵泡生成激素:注射用重组人促卵泡激素(果纳芬)购自德国默克雪兰诺公司,重组促卵泡素 β 注射液(普利康)购自荷兰欧加农公司;绒毛膜促性腺激素:注射用重组人绒促性素(艾泽)购自德国默克雪兰诺公司。

1.3 促排卵、卵子—放射冠—卵丘细胞复合物培养及分组

所有患者按本中心常规 GnRH-a + 促卵泡生成激素 + 人绒毛膜促性腺激素超排卵后行卵泡穿刺,获得卵子—放射冠—卵丘细胞复合物,置于 G-IVF 培养液中,分别放入两种氧浓度培养箱中培养。低氧浓度组获卵后放入氧气体积分数为 5% 的三气培养箱中培养,高氧浓度组获卵后放入氧气体积分数为 20% 的培养箱中培养。

1.4 授精及胚胎卵裂球观察

注射人绒毛膜促性腺激素后(40 ± 1) h 进行授精,将合适浓度的精子加入放有卵子的 G-IVF 培养液中。次日去除颗粒细胞后卵子转移至 G1 微滴培养液中,倒置显微镜下观察受精情况,去除未受精及异常受精卵,将正常受精的卵继续放回原培养箱中培养。3 d 后观察正常受精卵的胚胎分裂情况,观察胚胎卵裂球的数目,并按以下标准进行分级:Ⅰ级,卵裂球大小均匀,形状规则,透明带完整,细胞质均匀清晰,没有颗粒现象,碎片占比为 0% ~ 5%;Ⅱ级,卵裂球大小略不均匀,形状略不规则,细胞质有颗粒现象,碎片占比为 6% ~ 20%;Ⅲ级,卵裂球大小明显不均匀,形状不规则,细胞质有粗大的颗粒,碎片占比为 21% ~ 50%;

Ⅳ级,卵裂球大小严重不均匀,细胞质可有严重颗粒现象,碎片占比超过 50%。

1.5 胚胎移植及妊娠判断

细胞数在 6 ~ 9 个、胚胎评级在Ⅱ级以上为优质胚胎,选择 1 ~ 2 个优质胚胎行胚胎移植。胚胎移植后 45 d,超声检查见孕囊和胎心搏动判定为临床妊娠。

1.6 新生儿筛查

新生儿筛查在婴儿出生后 3 d 采取脐血或足跟血的纸片进行,用快速、敏感的实验室方法对新生儿的遗传代谢病、先天性内分泌异常以及某些危害严重的遗传性疾病进行筛查。对研究对象进行电话随访,记录新生儿的初查健康状况。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以百分率(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组受精、胚胎发育及妊娠结局比较

低氧浓度组优质胚胎率高于高氧浓度组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组受精率、临床妊娠率、异位妊娠率和流产率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2。提示低氧浓度培养能获得更多的优质胚胎,但对受精率及临床妊娠结局并无显著影响。

2.2 两组出生缺陷率比较

低氧浓度组和高氧浓度组子代出生缺陷的发生率分别为 4.46% (30/672) 和 6.22% (97/1560),差异无统计学意义($\chi^2 = 2.692, P > 0.05$)。新生儿出生缺陷主要包括低体质量、耳聋、染色体疾病、基因突变疾病、畸胎瘤、先天性心脏病等心血管疾病以及多指、唇腭裂等。

表 2 两组受精、胚胎发育及妊娠结局比较

Table 2 Fertilization, embryonic development and pregnancy outcome of two groups

[%(n)]					
组 别	受精率	优质胚胎率	临床妊娠率	异位妊娠率	流产率
低氧浓度组	69.60 (16 663/23 939)	46.55 (7757/16 663)	48.84 (672/1376)	4.61 (31/672)	12.50 (84/672)
高氧浓度组	69.81 (38 506/55 154)	43.30 (16 672/38 506)	47.36 (1560/3294)	4.49 (70/1560)	12.80 (199/1560)
χ^2 值	0.347	49.945	0.850	0.017	0.028
P 值	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨 论

有研究认为,在高氧浓度环境下培养胚胎会加剧其活性氧的产生,而高浓度的活性氧会引起线粒体改变、DNA 损伤,影响基因表达以及引起脂质过氧化或蛋白质表达异常等严重影响^[17-18]。基于这方面考虑,有研究认为降低培养环境的氧气浓度有利于改善临床结局,但目前的研究结论尚未一致。有些研究认为,通过降低培养环境的氧浓度能有效减少活性氧的产生,影响胚胎的早期发育,提高发育潜能,改善临床结局^[10-11];但同时也有研究者提出,降低氧浓度并不一定能对胚胎的发育和妊娠结局产生影响^[6-9]。本文资料表明,低氧浓度培养能获得更高的优质胚胎率,但对提高受精率和改善妊娠结局等并无显著影响。

出生缺陷是指由于遗传因素、环境因素或两者交互作用引起的胎儿在发育过程中发生的解剖学结构、功能或代谢异常。近年的一些研究表明,出生缺陷的发生与表观遗传学有密切联系^[19]。在辅助生殖技术中,体外培养的过程恰恰是配子及胚胎发育的敏感时期。印证基因的甲基化在胚胎发育的过程中擦除并重建,随后在胚胎着床前后又有一个去甲基化阶段^[20]。在此敏感时期,体外培养的环境、操作,都极易引起印证基因的改变,从而影响胚胎的发育,导致出生缺陷的发生。作为体外培养环境中的重要因素,氧浓度对表观遗传学是否有影响犹未可知,因此,出于对辅助生殖技术安全性的考虑,研究低氧浓度能否减少出生缺陷的发生十分必要。本文资料显示,低氧浓度培养对于减少子代出生缺陷影响不明显。

基于以上研究结果,分析原因可能有以下几方面:①要引起一系列的细胞器改变、DNA 损伤需要足够高浓度的活性氧,而高氧浓度环境相对于低氧浓度环境是否增加了足够多量的活性氧仍值得商榷。有研究显示,相对于高氧浓度环境,低氧浓度环境并未改变胚胎分裂期的代谢水平^[9]。因此,推测本研究中受精率及妊娠结局未受到影响可能是由于高氧浓度环境并未产生足够量的活性氧或者由于配子、胚胎本身的自我修复机制抵消了这部分影响^[21]。②从优质胚胎形成率方面考虑,我们推测低氧环境培养可能有助于提高胚胎发育潜能。但是,由于优质胚胎的评判均采用形态学方法,根据观察到的细胞数及碎片数量等

人为评判,存在一定的主观性,各报道结果相左也在所难免。③对于子代出生缺陷的研究,由于从配子发育到新生儿,其中有太多的环节及影响因素,仅根据单一维度的指标来判断未免有失偏颇。本研究中低氧浓度培养减少出生缺陷的发生并不明显,这一结论仍需更多数据以及更多维度研究证实。④本研究采用的是两个品牌型号不同的培养箱,不能排除不同培养箱之间的差异对结果的影响。

综上所述,本研究显示低氧浓度培养能获得更多的优质胚胎,但对受精率及临床妊娠结局并未有显著影响,推测其可能有助于提高胚胎发育潜能。今后需加大样本量,从发生机制、代谢水平、分子水平等层面对低氧浓度对体外受精—胚胎移植临床结局的影响作进一步深入探讨。

参考文献

- [1] OTTOSEN L D, HINDKAER J, HUSTH M, et al. Observations on intrauterine oxygen tension measured by fibre-optic microsensors [J]. **Reprod Biomed Online**,2006,13(3):380-385.
- [2] FISCHER B, BAVISTER B D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits[J]. **J Reprod Fertil**,1993,99(2):673-679.
- [3] JOHNSON M H, NASR-ESFAHANI M H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? [J]. **Bioessays**,1994,16(1):31-38.
- [4] GUÉRIN P, EL M S, MÉNÉZO Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings [J]. **Hum Reprod Update**,2001,7(2):175-189.
- [5] PENG Z F, SHI S L, JIN H X, et al. Impact of oxygen concentrations on fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates of *in vitro* generated human embryos[J]. **Int J Clin Exp Med**,2015,8(4):6179-6185.
- [6] KEA B, GEBHARDT J, WATT J, et al. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of *in vitro* fertilization[J]. **Fertil Steril**,2007,87(1):213-216.
- [7] GOMES S D B, OLIVEIRA J B, PETERSEN C G, et al. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis[J]. **Reprod Biol Endocrinol**,2011,9:143.
- [8] SWAIN J E, CARRELL D, COBO A, et al.

- Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential[J]. **Fertil Steril**,2016,105(3):571-587.
- [9] DE LOS SANTOS M J, GÁMIZ P, DE LOS SANTOS J M, et al. The metabolomic profile of spent culture media from day-3 human embryos cultured under low oxygen tension[J/OL]. **PLoS One**,2015,10(11):e0142724.
- [10] KASTERSTEIN E, STRASSBURGER D, KOMAROVSKY D, et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study[J]. **J Assist Reprod Genet**,2013,30(8):1073-1079.
- [11] GUO N, LI Y, AI J, et al. Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study[J]. **Int J Clin Exp Pathol**,2014,7(9):6191-6198.
- [12] 杨 雨,徐艳文,李 涛,等.不同氧浓度对单精子卵浆内注射技术胚胎发育及妊娠结局的影响[J]. **中山大学学报(医学科学版)**,2013,34(1):89-93.
YANG Yu, XU Yanwen, LI Tao, et al. Effect of oxygen concentration on outcome of women undergoing ICSI and embryo transfer[J]. **Journal of Sun Yat-sen University(Medical Sciences)**,2013,34(1):89-93. (in Chinese)
- [13] 牛子儒,岳晓静,孔群钰,等.辅助生殖技术中低氧浓度胚胎培养的 meta 分析[J]. **中国计划生育学杂志**,2013,21(5):295-301.
NIU Zirui, YUE Xiaojing, KONG Qunyu, et al. A meta-analysis of low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technology[J]. **Chinese Journal of Family Planning**,2013,21(5):295-301. (in Chinese)
- [14] 唐向辉,张琼芬,赵富鲜,等.体外低氧培养系统下的高质量早期人胚形态学特征[J]. **昆明医科大学学报**,2014,35(2):52-56.
TANG Xianghui, ZHANG Qiongfeng, ZHAO Fuxian, et al. Morphologic characteristic of human embryo cultured *in vitro* under low oxygen tension[J]. **Journal of Kunming Medical University**,2014,35(2):52-56. (in Chinese)
- [15] KASTERSTEIN E, STRASSBURGER D, KOMAROVSKY D, et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study[J]. **J Assist Reprod Genet**,2013,30(8):1073-1079.
- [16] OLIVEIRA J B. Does embryo culture at low oxygen tension improve ART outcomes? [J]. **JBRA Assist Reprod**,2017,21(1):1.
- [17] CULBERTSON G R. 532-nm diode laser treatment of seborrheic keratoses with color enhancement[J]. **Dermatol Surg**,2008,34(4):525-528, discussion 528.
- [18] NOILES K, VENDERR. Are all seborrheic keratoses benign? Review of the typical lesion and its variants[J]. **J Cutan Med Surg**,2008,12(5):203-210.
- [19] HANSEN M, KURINCZUK J, MILNE E, et al. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis[J]. **Hum Reprod Update**,2013,19(4):330-353.
- [20] MORGAN H D, SANTOS F, GREEN K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals[J]. **Hum Mol Genet**,2005,14 Spec No 1:R47-R58.
- [21] BAVISTER B. Oxygen concentration and preimplantation development[J]. **Reprod Biomed Online**,2004,9(5):484-486.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者投稿时请提供 ORCID

开放研究者与贡献者身份识别码(open researcher and contributor identifier, ORCID)是由汤森路透和自然出版集团等单位于2009年共同发起创建的,其意义与科学文献领域的DOI(数字对象标识符)类似:DOI为科技文献的身份证,一文一证;ORCID为科研人员的学术身份证,一人一证。若尚未获取ORCID的作者请先登录<http://orcid.org>,进入网站注册(register)后免费获取ORCID。本刊从2015年第3期起在作者信息栏添加ORCID,即<http://orcid.org>/后16位数字。如贺晶ORCID为0000-0002-9579-9593,作者信息最后加上<http://orcid.org/0000-0002-9579-9593>。