

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.017
文章编号: 1005-8982 (2019) 06-0073-04

卵母细胞成熟比例对卵胞浆内单精子注射 助孕疗效的影响

杨冬宇, 陈旭龙, 谢妍, 曹晓静, 李思楠, 周文, 袁启龙, 陆杉
(广东省中医院 生殖医学科, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 探讨卵母细胞成熟比例对卵胞浆内单精子注射 (ICSI) 助孕患者疗效的影响。**方法** 本研究纳入 194 例需行 ICSI 助孕治疗的患者, 根据不同卵母细胞成熟的比例将患者分为 A、B 组, 对两组患者 ICSI 受精率、卵裂率、可利用胚胎数、优质胚胎数、胚胎着床率、临床妊娠率及早期流产率等进行比较。**结果** 两组患者大卵泡数、获卵率、促性腺激素 (Gn) 使用天数、Gn 总剂量、人绒毛膜促性腺激素日子宫内膜厚度、可利用胚胎数、优质胚胎数、移植胚胎数、临床妊娠率、胚胎着床率及自然流产率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 两组患者小卵泡数、平均获卵数、ICSI 受精率及卵裂率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 卵母细胞成熟比例过低可能影响受精率及卵裂率, 降低卵母细胞利用率。

关键词: 卵胞浆内单精子注射 / 显微操作; 卵母细胞; 妊娠结局

中图分类号: R715.9

文献标识码: A

The influence of oocyte maturation ratio on therapeutic effect of patients with ICSI cycle

Dong-yu Yang, Xu-long Chen, Yan Xie, Xiao-jing Cao, Si-nan Li, Wen Zhou, Qi-long Yuan, Shan Lu
(Department of Reproductive Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of oocyte maturation ratio on the therapeutic effect of patients with ICSI cycle. **Methods** This study included 194 female infertility patients who required intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for ART treatment. Patients were divided into two groups: oocyte maturation ratio $\geq 80\%$ as group A ($n = 107$ cases), oocyte maturation ratio $< 80\%$ as group B ($n = 87$ cases). ICSI fertilization rate, cleavage rate, available embryos, high quality embryos, implantation rate, clinical pregnancy rate and early abortion rate were compared between the two groups. **Results** There were no significant differences in the number of large follicles, the rate of oocyte acquisition, the days of gonadotropin (Gn) use, the total dose of Gn, the endometrial thickness on days of human chorionic gonadotropin, the number of available embryos, the number of high-quality embryos, the number of transferred embryos, the clinical pregnancy rate, the rate of embryo implantation and the rate of spontaneous abortion between the two groups ($P > 0.05$). There were significant differences in the number of small follicles, average number of eggs obtained, ICSI fertilization rate and cleavage rate between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Low oocyte maturation rate may affect fertilization rate and cleavage rate, and reduce oocyte utilization.

Keywords: sperm injections intracytoplasmic/ micromanipulation; oocytes; pregnancy outcome

收稿日期: 2018-09-11

[通信作者] 陆杉, E-mail: gzlushan@126.com; Tel: 020-39318509, 13710848396

控制性超促排卵技术是以药物的手段,在可控制的范围内诱发多卵泡的发育和成熟,以获取适当数量的成熟卵母细胞^[1]。目前促排卵方案包括短方案、长方案、超长方案及拮抗剂方案等^[2-3]。广义上卵母细胞的成熟应包括细胞核与细胞质同时成熟,成熟卵母细胞比例体现本周期获取卵母细胞整体的成熟度水平^[4-5]。本研究拟研究不同卵母细胞成熟比例对患者胚胎质量及临床妊娠结局的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 6 月—2017 年 12 月于广东省中医院生殖医学科接受卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)治疗的患者 194 例。纳入标准:①因男方因素首次接受 ICSI 治疗;②年龄 ≤ 35 岁;③采用长方案行促排卵治疗;④获得卵母细胞数目 ≥ 3 枚。排除标准:①移植前基因诊断或胚胎植入前遗传学筛查患者;②卵母细胞成熟比例 $\leq 10\%$ 。

根据不同的卵母细胞成熟度将患者分为 A、B 组,分别有 107 和 87 例。A 组为成熟卵母细胞数占获卵数比例 $\geq 80\%$,且有移植胚胎的 ICSI 周期;B 组为成熟卵母细胞占获取卵母细胞数 $<80\%$,且有移植胚胎的 ICSI 周期。

1.2 卵母细胞采集

采用标准长方案进行卵巢刺激,B 超监测卵泡生长发育。当有主导卵泡直径满足 3 种情况之一(≥ 19 mm、2 个 ≥ 18 mm 及 3 个 ≥ 17 mm)时,结合性激素的检查结果,使用人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)扳机,当晚注射 HCG 5 000 ~ 10 000 IU, HCG 注射后 36 h 行 B 超引导下经阴道穿刺取卵。获取的卵冠丘复合物经 G-MOPs plus 培养液(瑞典 Vitrolife 公司)洗涤后,转入经平衡过的 IVF plus 培养液(瑞典 Vitrolife 公司)中继续培养。

1.3 ICSI

卵冠丘复合物继续在 IVF plus 培养液中预培养 4 h(HCG 注射后 40 h),用透明质酸酶(瑞典 Vitrolife 公司)消化颗粒细胞,用巴斯德吸管小心谨慎的吹打卵母细胞 2、3 次,使卵丘颗粒细胞大部分脱离,仅留下 2、3 层颗粒细胞在卵母细胞周围,在透明质酸酶中处理的时间 ≤ 30 s。将部分裸化的卵母细胞转移到冲洗孔中,尽量少吸透明质酸酶液;改用内径 170 μ m

的微吸管吹吸卵母细胞 2、3 次,尽量除去颗粒细胞;换用内径约 140 μ m 的微吸管在右上、右下 2 个冲洗孔中吹吸卵母细胞,最后将裸化的卵母细胞移入 G-IVFplus 培养液(瑞典 Vitrolife 公司),置于 37°C、6% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中培养。重复以上操作直至所有卵母细胞完全裸化,取去除颗粒细胞的卵母细胞在倒置显微镜下观察卵母细胞成熟情况。①生发泡期:细胞核结构尚未消失,卵胞浆内可见核结构;②第 1 次减数分裂中期:细胞核结构消失,第 1 极体尚未排出;③第 2 次减数分裂中期(metaphase II, M II)即成熟卵母细胞:细胞核结构消失,第 1 极体已排出。挑选形态正常的精子对处于 M II 期卵母细胞行 ICSI,将注射后的卵母细胞转移至平衡好的 G1 plus 序贯培养液(瑞典 Vitrolife 公司)中继续培养。

1.4 受精及胚胎质量评估

ICSI 注射后 18 ~ 20 h 通过倒置显微观察原核,判定受精情况,以观察到 2 个原核判定为正常受精。分别于 ICSI 注射后 44 和 68 h 观察胚胎情况,根据胚胎碎片多少及卵裂球均匀度等形态学指标对胚胎进行评分。1 级:胚胎卵裂球大小均匀,形态规则,透明带完整,胞质均匀、清晰没有颗粒现象,碎片 $<10\%$ 。2 级:胚胎卵裂球大小略不均匀,形态略不规则,胞质可有颗粒现象,碎片 10% ~ $<20\%$ 。3 级:胚胎卵裂球大小明显不均匀,可有明显的形状不规则,胞质可有明显的颗粒现象,碎片 20% ~ $<50\%$ 。4 级:胚胎卵裂球大小严重不均匀,胞质可有严重的颗粒现象,碎片 $\geq 50\%$ 。其中细胞碎片 $<10\%$ 、无其他异常现象的胚胎定义为优质胚胎。

1.5 胚胎移植及临床妊娠结局判定

胚胎发育至第 3 天选取可利用胚胎进行胚胎移植。临床医生在胚胎学家的协助下,将胚胎放置于距子宫底约 0.5 ~ 1.0 cm 处。移植术后第 12 ~ 14 天进行随访,妊娠者继续黄体支持治疗,移植术后的第 28 ~ 35 天行 B 超检查,观察到胎心搏动确定为临床妊娠。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用 t 检验;计数资料以率(%)表示,比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基本资料比较

两组患者男女性年龄、体重指数 (body mass index, BMI)、基础窦卵泡 (Antral follicle count, AFC)、不孕年限、基础卵泡刺激素 (basal follicle-stimulating hormone, bFSH)、基础黄体生成素 (basal luteinizing hormone, bLH)、基础雌性激素 (basal estrogen, bE2) 及睾丸/附睾精 ICSI 比例比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。见表 1。

表 1 两组患者基本资料比较

组别	<i>n</i>	女性年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	男性年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI / (kg/m^2 , $\bar{x} \pm s$)	AFC / (个, $\bar{x} \pm s$)	不孕年限 / (年, $\bar{x} \pm s$)	bFSH / (IU/L, $\bar{x} \pm s$)	bLH / (IU/L, $\bar{x} \pm s$)	bE2 / (pmol/L, $\bar{x} \pm s$)	睾丸 / 附睾精 ICSI 比例 / %
A 组	107	29.9 ± 3.0	33.0 ± 4.7	21.6 ± 2.9	9.4 ± 5.6	3.1 ± 1.7	6.5 ± 1.9	5.4 ± 3.0	180.6 ± 86.5	16.8
B 组	87	29.2 ± 3.0	32.0 ± 4.5	21.6 ± 3.2	10.2 ± 5.2	3.4 ± 2.3	6.2 ± 1.7	5.2 ± 2.8	171.7 ± 65.4	18.3
<i>t</i> / χ^2 值		1.787	1.504	0.103	1.128	0.904	1.275	0.466	0.812	0.082
<i>P</i> 值		0.076	0.134	0.918	0.261	0.367	0.204	0.642	0.418	0.775

表 2 两组患者助孕情况比较

组别	<i>n</i>	Gn 使用天数 / (d, $\bar{x} \pm s$)	Gn 总剂量 / (IU, $\bar{x} \pm s$)	HCG 日子宫内膜厚度 / (mm, $\bar{x} \pm s$)	大卵泡数 ($\geq 14 \text{ mm}$) / (个, $\bar{x} \pm s$)	小卵泡数 ($< 14 \text{ mm}$) / (个, $\bar{x} \pm s$)	平均获卵数 / (枚, $\bar{x} \pm s$)	获卵率 ($\geq 14 \text{ mm}$) / %
A 组	107	11.5 ± 2.3	1817.2 ± 715.1	11.7 ± 2.8	10.3 ± 4.8	4.9 ± 3.3	10.7 ± 5.3	74.6
B 组	87	11.2 ± 1.9	1650.9 ± 611.0	11.2 ± 2.9	11.1 ± 4.8	7.6 ± 4.7	14.1 ± 6.2	77.1
<i>t</i> / χ^2 值		1.032	1.718	1.220	0.064	8.623	4.094	1.661
<i>P</i> 值		0.303	0.087	0.224	0.271	0.000	0.000	0.199

组别	<i>n</i>	ICSI 受精率 / %	卵裂率 / %	可利用胚胎数 / (枚, $\bar{x} \pm s$)	优质胚胎数 / (枚, $\bar{x} \pm s$)	移植胚胎数 / (枚, $\bar{x} \pm s$)	胚胎着床率 / %	临床妊娠率 / %	自然流产率 / %
A 组	107	85.2	99.8	6.4 ± 3.7	2.9 ± 2.5	1.8 ± 0.4	47.2	60.3	14.3
B 组	87	81.8	98.8	6.2 ± 3.6	2.5 ± 2.1	1.7 ± 0.5	46.6	61.1	18.2
<i>t</i> / χ^2 值		3.886	5.340	0.428	1.033	1.462	0.005	0.037	0.154
<i>P</i> 值		0.049	0.021	0.669	0.303	0.147	0.945	0.647	0.695

3 讨论

卵泡的成熟受到很多因素的影响, 如 Gn 总剂量、Gn 使用时间、促排卵方案的选择、患者的身体条件差异、卵泡发育速度、扳机方案及扳机剂量等^[6-7]。本研究中 B 组患者的平均获卵数多于 A 组, 因两组患者大卵泡数及获卵率无差异, 而 B 组平均穿刺小卵泡数多于 A 组, 分析 B 组获卵数多于 A 组是由于 B 组患者平均穿刺小卵泡数多于 A 组所致。

2.2 两组患者助孕情况比较

两组患者大卵泡数、获卵率、促性腺激素 (Gonadotrophin, Gn) 使用天数、Gn 总剂量、HCG 日子宫内膜厚度、可利用胚胎数、优质胚胎数、移植胚胎数、临床妊娠率、胚胎着床率及自然流产率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组患者小卵泡数、平均获卵数、ICSI 受精率及卵裂率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A 组小卵泡数、平均获卵数少于 B 组, ICSI 受精率、卵裂率高于 B 组。见表 2。

临床上理想的促排结果是所有目标卵泡都达到同步状态, 在合适的时机获取成熟的卵母细胞, 但仍有一部分卵泡发育迟缓或发育过快, 致使卵泡发育不同步^[8]。卵母细胞成熟应为细胞膜、细胞质、细胞核、卵丘细胞及透明带的同步成熟, 该成熟路径经历复杂的生物学过程^[9]。在日常工作中, 胚胎学家只能通过显微镜观察卵母细胞第 1 极体的释放情况来判定其成熟与否, 却无法获悉细胞质是否也达到成熟状态, 而

只有细胞质完全成熟时才能提供充足的能量及优质的代谢环境,保证卵母细胞正常受精及分裂,为胚胎正常发育提供条件。本研究中在 B 组获卵数多于 A 组的情况下,两组患者的平均可利用胚胎数和优质胚胎数无差异,说明 A 组的卵母细胞利用率更高,但两者的临床妊娠率、着床率无差异。两组患者自然流产率无差异,但由于移植周期数较少,且 B 组的流产率具有增高的趋势,有待验证是否由于卵母细胞成熟度过低从而导致胚胎发育潜能不足。蒋益群^[10]和付蕾等^[11]的研究结果,表明 ICSI 不成熟卵母细胞比例过高可能对受精率、正常受精率、临床妊娠率及种植率产生影响。结合本研究结果可以推测,随着未成熟卵母细胞比例升高,整个获取的卵母细胞成熟度偏低,对胚胎的发育潜能及临床结局影响增加。

目前针对未成熟卵母细胞比例较高的患者采用卵母细胞体外培养(in-vitro maturation, IVM)的治疗方式,对未成熟卵母细胞进行 IVM 以达到提高卵母细胞利用率的目的。通过 IVM 培养获取的胚胎预后仍不理想,尤其是体外成熟的卵母细胞非整倍体增加,最好对通过 IVM 技术获得的胚胎进行种植前遗传学诊断筛选^[12-13]。

相信随着促排方案的逐渐优化和 IVM 技术的发展,卵母细胞成熟比例将会达到令人满意水平,患者的卵母细胞利用率也会升高,从而获取更多可利用胚胎以达到满意的疗效。

参 考 文 献:

[1] ABDUL K A, AZRAI A M, CHELLIAH B, et al. Maternal thyroid

function in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation during in vitro fertilization and its relation to reproductive outcome[J]. *Minerva Ginecol*, 2017, 69(5): 431-437.

- [2] 王俊霞,孙海翔. 体外受精周期中超促排卵方案选择[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31(01): 21-24.
- [3] GANESH V, VENKATESAN V, KOSHY T, et al. Association of estrogen, progesterone and follicle stimulating hormone receptor polymorphisms with in vitro fertilization outcomes[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2018, 64(4): 260-265.
- [4] ABBARA A, VUONG L N, HO V, et al. Follicle size on day of trigger most likely to yield a mature oocyte[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 193.
- [5] GRUHN J R, KRISTENSEN S G, ANDERSEN C Y, et al. In vitro maturation and culture of human oocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1818: 23-30.
- [6] 赵伟娥,梁晓燕. 辅助生殖治疗中的促排卵时机选择[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 29(9): 884-887.
- [7] 韩洁,范俊梅,武学清. 影响促排卵周期冻胚移植结局相关因素分析[J]. *临床医药实践*, 2017, 26(7): 497-500.
- [8] 谢言信,潘萍,林海燕,等. 正常卵巢功能患者使用不同降调方案的临床研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2018, 39(3): 405-412.
- [9] 徐文丹,崔毓桂,茅彩萍. 卵母细胞代谢及其调节[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(10): 1047-1051.
- [10] 蒋益群,王珊珊,张宁媛,等. ICSI 周期卵子成熟度对胚胎发育与临床结局的影响[J]. *中国性科学*, 2015, 24(08): 84-87.
- [11] 付蕾,朱玉林,袁景川,等. IVF 助孕中卵母细胞成熟率对 ICSI 临床结局的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(2): 134-139.
- [12] RIZZO M, DUCHEYNE K D, DEELEN C, et al. Advanced mare age impairs the ability of in vitro matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate[J]. *Equine Vet J*, 2018: DOI: 10.1111/evj.12995.
- [13] 苑丽华,宋景艳,孙振高. 卵母细胞成熟障碍病因和治疗手段的最新研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2017, 26(06): 1-4.

(李科 编辑)