

体外低氧培养系统下的高质量早期人胚形态学特征

唐向辉¹⁾, 张琼芬¹⁾, 赵富鲜¹⁾, 朱琼媛¹⁾, 王梦月¹⁾, 陈晓刚²⁾

(1) 云南省第二人民医院生殖医学科, 云南昆明 650021; 2) 昆明医科大学资产管理处, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨低氧 (7.5% O₂) 和高氧 (20% O₂) 培养体系对人早期胚胎 (D1~D3) 体外发育及胚胎移植临床结局的影响. **方法** 选取 2012 年 2 月至 2013 年 8 月在云南省第二人民医院生殖医学中心接受常规 IVF-ET 治疗, 行 D3 新鲜胚胎移植的周期资料, 共 280 个周期, 比较 7.5% O₂ 低氧组 (120 个周期) 和 20% O₂ 高氧组 (160 个周期) 早期胚胎体外发育的结果和胚胎移植的临床结局. **结果** 低氧组 D3 优级胚胎形态外观上明显有别于次优级胚胎 (即传统优级胚胎), 呈卵裂球紧贴, 裂球边界渐模糊的形态学特征, 且优级胚胎率显著高于高氧组 (66.22%与 47.54%), 但 2 组受精率、卵裂率和可用胚胎率比较差异无统计学意义. 低氧组胚胎的着床率显著高于高氧组 (42.94%与 31.01%), 生化妊娠率 (62.22%与 47.06%) 和临床妊娠率 (53.33%与 39.22%) 也均比高氧组高. **结论** 体外低氧培养系统能产生质量更高的人早期胚胎, 对提高 IVF 临床结局有益.

[关键词] IVF; 氧浓度; 体外培养; 胚胎移植

[中图分类号] R711.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 02 - 0052 - 05

Morphologic Characteristic of Human Embryo Cultured in Vitro under Low Oxygen Tension

TANG Xiang-hui¹⁾, ZHANG Qiong-fen¹⁾, ZHAO Fu-xian¹⁾, ZHU Qiong-yuan¹⁾, WANG Meng-yue¹⁾, CHEN Xiao-gang²⁾

(1) Dept. of Reproduction, The 2nd People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650021; 2) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of low oxygen tension (7.5% O₂) on human embryo development in vitro and outcome of women undergoing IVF-ET. **Methods** The data of 280 routine IVF cycles with fresh embryo transfer on day3 conducted in the 2nd People's Hospital of Yunnan Province from February 2012 to August 2013 were retrospectively analyzed. Two groups, 7.5% O₂ low oxygen tension (n=120) and 20% O₂ high oxygen tension (n = 160), were setup for early embryo (D1-D3) development in vitro. **Results** Good quality embryo on day 3 in low oxygen tension group showed morphologically appearance of blastomere mutually clinging to each other, a characteristic of slight compaction. Higher rate of good quality embryo (66.22% v. 47.54%) and of clinical pregnancy (53.33% v. 39.22%) were found in the low oxygen tension group. There were no significantly differences in rates of fertilization, cleavage and embryo utilization respectively between the two groups (P all >0.05). **Conclusion** High quality early stage human embryos can be developed in vitro in low oxygen tension, and may improve clinic outcome of IVF.

[Key words] IVF; Oxygen concentration; In vitro culture; Embryo transfer

以体外受精 - 胚胎移植 (in vitro fertilization embryo transfer, IVF-ET) 及其衍生技术为基础的人类辅助生殖技术最近 10 a 发展迅速, 并在国内

外成为了临床治疗不孕不育症的常规手段之一. 随着 IVF-ET 及其衍生技术的不断完善, 人们逐渐认识到, 目前对人类辅助生殖技术的最大挑战是以最

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011c170)

[作者简介] 唐向辉 (1960~), 男, 江西丰城市人, 生物学硕士, 副研究员, 主要从事生殖医学研究工作.

[通讯作者] 陈晓刚. E-mail: 3076279@qq.com

小的干预过程为患者提供最大的单胚移植活产率。这就要求辅助生殖技术实验室优化胚胎早期发育阶段的环境, 为培养高质量发育潜能的胚胎提供物质基础, 进而实现单胚移植高活产率的目的。

在体外培养早期胚胎过程中, 氧气对人胚胎的作用一直未有定论^[1]。30 a 来, 人类及动物早期胚胎的体外培养方法一直沿用传统的体细胞培养方案, 即在 5%CO₂ + 20%O₂ 的培养箱中进行。但是, 动物子宫和输卵管里的 O₂ 浓度通常在 2% ~ 8% 之间波动^[2,3], 提示动物早期胚胎的生存环境是低氧的。将大鼠^[4]、猪^[5]、山羊^[6]和牛^[7]等动物的早期胚胎培养在低氧 (5%~7%) 环境下均获得了更好的发育结果。低氧条件下培养的小鼠早期胚胎, 非整倍体数量明显减少^[8]。Ottoen 等^[9]报道人宫腔内的 O₂ 浓度为 2%, 人的早期胚胎是否也在低氧环境中发育? 迄今体外低氧培养系统对人类早期胚胎发育及临床结局影响的报道不尽一致。Dumoulin 等^[10]和 Kea 等^[11]认为低氧培养的人胚在 D2 和 D3 移植的着床率及临床妊娠率并无明显优势。虽然杨雨等^[12]的结果与 Kea 等^[11]的相似, 但认为低氧培养环境对 ICSI 授精短期体外培养胚胎优于高氧培养环境。Kovacic 等^[13]的结果则支持低氧对 IVF 治疗周期中的妊娠率和活产率有帮助, 而且对卵巢反应不良的患者的临床妊娠率更有益。本研究旨在比较低氧 (7.5% O₂) 和高氧 (20% O₂) 培养体系对人早期胚胎 (D1~D3) 体外发育及临床结局的影响, 为优化胚胎早期发育阶段的环境提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 2 月至 2013 年 8 月到云南省第二人民医院生殖医学中心接受常规 IVF-ET 治疗, 行 D3 新鲜胚胎移植的周期资料, 共 280 个周期。不孕原因为免疫因素、输卵管盆腔因素及原因不明因素, 排除因男性因素导致的不育。根据培养箱中 O₂ 浓度分为 2 组: 20% O₂ 高氧组, 7.5% O₂ 低氧组。使用同一品牌的三气或单气 ASTEC 培养箱 (Astec 公司, 日本), 型号分别为 APM-30D 和 APC-30D。

1.2 研究方法

1.2.1 超排卵方案 2 组对象都采用常规长方案超排卵^[14], 即用促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH-a) 降调节, 月经来潮后开始用促性腺激素 (Gn) 促卵泡发育, 期间用超

声观察和测定血清激素监测卵泡发育状况, 当大于 18 mm 卵泡的数量占 14 mm 以上卵泡总数的比例 ≥ 60% 时, 给予人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 5 000 ~ 10 000 U 促卵子成熟。注射 HCG 后 36 ~ 38 h, 行阴道超声引导下穿刺取卵术, 并记录卵子成熟度和获卵数。

1.2.2 体外受精及胚胎发育 2 组卵子被拣出后即放入相应氧浓度的培养箱预培养, 体外受精过程在各自的培养箱中进行。操作配子和胚胎用的培养基为 Quinn's 系列产品 (SAGE in Vitro Fertilization 公司, 美国), 精液处理采用上游法。受精后 17 ~ 19 h 观察原核并对原核评分, 观察到 2 个原核 (2PN) 判断为正常受精。正常的受精卵在各自氧浓度的培养箱中培养至 D3 移植。D2 和 D3 分别记录 1 次胚胎发育情况。

1.2.3 胚胎评级 参照 Brinsden^[15]的方法并结合云南省第二人民医院生殖中心的工作实践, 优级胚胎为 Brinsden 标准的 I 或 II 级胚, 同时卵裂球在 D3 表现出紧贴外观, 次优级胚胎 (或传统优级胚胎) 为 Brinsden 标准的 I 或 II 级胚, 但 D3 卵裂球边界分明, 未紧贴。

1.2.4 胚胎移植 取卵后第 3 天 (D3) 按胚胎发育进度和评级情况选择高质量胚胎移植, 视患者的年龄、周期情况和优级胚胎数量确定移植 1 或 2 个优级或次优级胚胎, 剩余的可用胚胎采用玻璃化冷冻保存。胚胎移植后 14 d 检测血 HCG ≥ 50 U/L 者判定为生化妊娠, 若 2 周后 B 超检测到孕囊则为临床妊娠。

1.2.5 相对指标计算

$$\text{正常受精率} = \frac{\text{2PN 数}}{\text{获卵数}} \times 100\%$$

$$\text{优胚率} = \frac{\text{优胚数}}{\text{2PN 卵裂数}} \times 100\%$$

$$\text{可用胚率} = \frac{\text{移植胚胎数} + \text{冷冻胚胎数}}{\text{2PN 卵裂数}} \times 100\%$$

$$\text{胚胎着床率} = \frac{\text{孕囊数}}{\text{移植胚胎数}} \times 100\%$$

1.3 统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 组间均数比较采用 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般情况

本研究的 7.5% O₂ 低氧组 120 个周期, 20% O₂ 高氧组 160 个周期。在 2 组的一般性资料中, 患者

平均年龄、平均不孕时间、平均体重指数 (BMI)、HCG 日 E2 浓度及内膜厚度、获卵数、移植胚胎数等差异无统计学意义, 表 1。

2.2 不同氧浓度环境下胚胎发育结果比较

2 组受精率、卵裂率和可用胚胎率比较均差异无统计学意义, 高氧组同期的胚胎 (图 1 A 列) 只是传统优级胚胎。但低氧组的 D3 胚胎形态表现的

优级状明显 (图 1 B 列), 而且低氧组 D3 优级胚胎率显著高于高氧组 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 低氧浓度培养胚胎对临床结局的影响

低氧组胚胎着床率显著高于高氧组 ($P < 0.01$), 而且低氧组生化妊娠率和临床妊娠率均比高氧组高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 2 组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of baseline data between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄 (岁)	不孕时间 (a)	BMI	hCG 日 E2 浓度 (ng/mL)	hCG 日内膜厚度 (mm)	获卵数 (枚)	移植胚胎数 (个)
7.5% O ₂ 组	120	32.14 ± 3.52	4.11 ± 2.95	20.56 ± 2.11	2651 ± 1104	11.3 ± 1.5	11.27 ± 4.21	2.67 ± 0.41
20% O ₂ 组	160	31.89 ± 3.01	4.07 ± 2.32	21.05 ± 2.27	2729 ± 1201	10.8 ± 1.2	10.89 ± 3.65	2.72 ± 0.34

表 2 胚胎体外发育结果和临床结局比较 (%)

Tab. 2 Comparison of embryos development in vitro and clinical outcome (%)

组别	受精率	卵裂率	优胚率	可用胚胎率	着床率	生化妊娠率	临床妊娠率
7.5% O ₂ 组	82.69	97.14	66.22	85.03	42.94	62.22	53.33
20% O ₂ 组	81.14	96.57	47.54*	86.54	31.01**	47.06**	39.22**

与 7.5% O₂ 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

为了应对人类辅助生殖技术的挑战, 即为患者提供最大的单胚移植活产率, 优化早期胚胎发育阶段的体外培养环境是目前可选的措施之一。本研究比较了 7.5% O₂ 和 20% O₂ 的体外培养环境对人胚早期发育及胚胎移植临床结局的影响。结果表明: 受精卵在 7.5% O₂ 低氧环境中培养 48 h, 可在 D3 上午观察到优级胚胎 (图 1 B 列), 这些优级胚在形态学上明显有别于次优级胚胎 (即传统优级胚胎, 图 1 A 列)。这是国内外首次报道在 IVF 操作过程中, 人早期胚胎在 D3 上午或下午移植前表现出卵裂球紧贴, 裂球边界渐模糊的形态学特征。过去 30 a 国内外 IVF 操作实践表明, 人早期胚胎在传统的单气培养箱 (即本研究的 20% O₂ 高氧组) 培养 48 h, 传统优级胚在 D3 表现的形态特点是卵裂球大小均匀或轻度不均匀, 裂球清晰分布规则, 胞质透明均质, 无或少见裂球碎片 (<5%) (图 1 A 列)^[15]。用传统单气培养箱培养的人早期胚胎通常在 D4 表现致密化 (Compact), 并在 D4 晚些时候形成桑椹胚 (Morula)。本研究低氧组 D3 优级胚的形态有别于桑椹胚, 比桑椹胚致密化的程度低, 仅仅表现为裂球间边界紧贴程度高, 但尚能在显微镜下分辨出卵裂球。本研究观察到的 D3 优级胚胎

形态特征可能与笔者的操作有关。本研究使用的低氧浓度是 7.5% O₂, 与文献报道的 5% O₂ 作为低氧浓度有所区别, 而且在胚胎分组培养之前, 从培养基的过夜预平衡, 到拣卵及受精等操作过程都是在各自的氧浓度下完成的。笔者认为在 COC 取出来后即实行氧浓度分组操作, 能尽可能减少前期高氧浓度对卵母细胞和受精过程的影响, 进而干扰分组后胚胎的发育结果。

本研究低氧组的生化妊娠率和临床妊娠率均比高氧组高 ($P < 0.05$), 这一结果与 Kasterrstein 等^[16]的报道一致。在笔者的 IVF 实践中, 行 D3 胚胎移植操作的时间往往在下午, 此时已经可以从形态学上判别并挑选高质量的优级胚胎 (图 1 B 列), 为取得好的临床结局提供了物质保障。本研究低氧组 D3 优级胚胎率显著高于高氧组 (表 2) 是低氧组获得高临床妊娠率的直接原因。本研究的结果表明, 认为人早期胚胎可能对较高浓度氧气产生的毒性不敏感这一观点值得商榷。此外, 从 IVF 临床结局来看, 本研究从形态学上确定的 D3 优级胚胎有比较高的可信度, 而且容易识别 (图 1 B 列)。

细胞间的粘连是细胞间物质和信息交流的一种表现形式, 属于间隙连接介导的细胞间通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC)。虽然对 GJIC 的形成和确切的生理功能目前仍不清

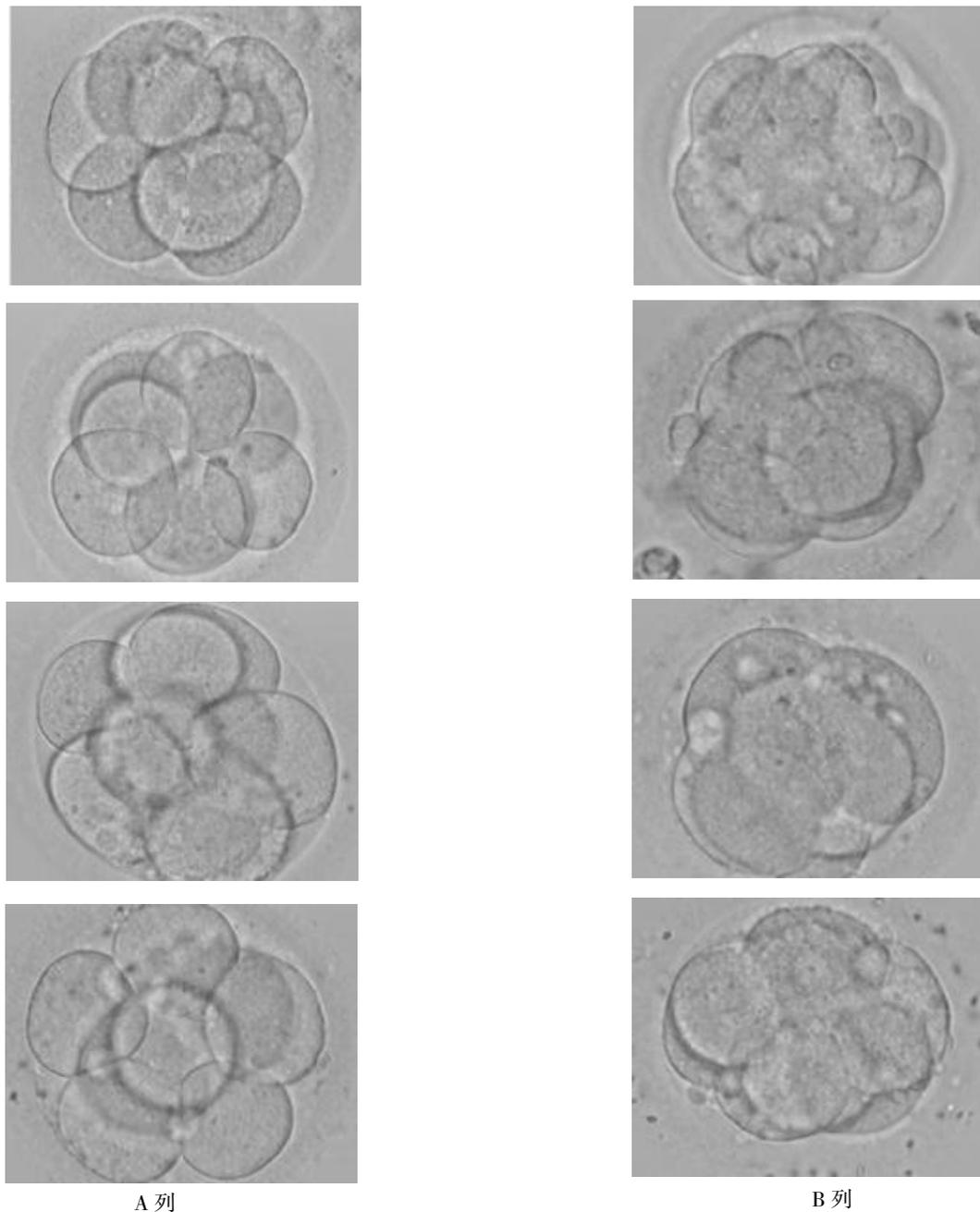


图1 人早期胚胎体外培养第3天优级胚比较. A列:20% O₂高氧组; B列:7.5% O₂低氧组 (200×)

Fig. 1 Good quality human embryos were developed in vitro on day 3. A line: 20% O₂; B line: 7.5% O₂ (200×)

楚, 但人们认为 GJIC 在胚胎发育, 卵裂球的同步化活动和细胞分化等方面有重要作用^[17,18]. GJIC 在小鼠和兔早期胚胎的启动时间为 4~8 细胞期, 其对胚胎致密化和卵裂球分化命运应该有影响. 本研究低氧组培养产生的优级胚, 卵裂球细胞间的粘连程度比高氧组的高, 笔者推测这种现象可能更符合人生理状态下自然受孕胚胎的发育情况.

综上所述, 低氧环境下培养的人早期胚胎, 在 D3 有外观特征明显的优级胚, 用这种胚胎移植, 能获得较高的着床率和妊娠率. 因此, 体外低氧

培养系统对提高 IVF 临床结局有益.

[参考文献]

- [1] ASKOXYLAKI M, SIRISTATIDIS C, CHRELIAS C, et al. Reactive oxygen species in the follicular fluid of subfertile women undergoing In Vitro Fertilization: a short narrative review[J]. J Endocrinol Invest, 2013, 36(12):8-12.
- [2] KOVACIC B. Culture systems: low-oxygen culture[J]. Methods Mol Biol, 2012, 912(1):249-272.
- [3] FISCHER B, BAVISTER BD. Oxygen tension in the

- oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits[J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 99(2):673 – 679.
- [4] KISHI J, NODA Y, NARIMOTO K, et al. Block to development in cultured rat 1-cell embryos is overcome using medium HECM-1[J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(5):1 445 – 1 448.
- [5] KARJA NW, WONGSRIKEAO P, MURAKAMI M, et al. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(5):1 585 – 1 595.
- [6] BATT P A, GARDNER D K, CAMERON A W. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1991, 3(2):601 – 607.
- [7] YUAN Y Q, VAN SOOM A, COOPMAN F O, et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(6):1 585 – 1 596.
- [8] BEAN C J, HASSOLD T J, JUDIS L, et al. Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(8):2 362 – 2 367.
- [9] 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.
- [10] DUMOULIN J C M, MEIJERS C J J, BRAS M, et al. Effect of oxygen concentration on human in vitro fertilization and embryo culture[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(3):465 – 469.
- [11] 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.
- [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.
- [13] KOVACIC B, SAJKO M C, VLAISAVLJEVIC V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(2):511 – 519.
- [14] 唐向辉, 陈晓刚, 张琼芬, 等. 心理干预对IVF-ET疗效的促进作用[J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(12):1 – 8.
- [15] BRINDEN P R. A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction [M]. New York: The Parthenon Publishing Group Inc, 1999:196.
- [16] KASTERSTEINE, 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):1 073 – 1 079.
- [17] 徐营, 雷蕾, 刘忠华, 等. 应用激光扫描共聚焦显微镜 FRAP 技术研究兔早期胚胎发育中细胞间隙连接介导通讯[J]. *细胞生物学杂志*, 2002, 24(5):310 – 312.
- [18] DALE B, GUALTIERI R, TALEVI R, et al. Intercellular communication in the early human embryo [J]. *Mol Reprod Dev*, 1991, 29(1):22 – 28.

(2013 – 12 – 06 收稿)