

We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists

4,800

Open access books available

122,000

International authors and editors

135M

Downloads

Our authors are among the

154

Countries delivered to

TOP 1%

most cited scientists

12.2%

Contributors from top 500 universities



WEB OF SCIENCE™

Selection of our books indexed in the Book Citation Index
in Web of Science™ Core Collection (BKCI)

Interested in publishing with us?
Contact book.department@intechopen.com

Numbers displayed above are based on latest data collected.
For more information visit www.intechopen.com



胚胎移植新进展

主 编 武 彬

主 译 王素改

译者 (按姓氏笔画排序)

中国河北省石家庄市第一医院

王素改 刘 盼 孙晓慧

杨惠祥 尚丽丽 赵敏英

郭丽娜 蔺会兰

中文编辑 郭丽娜

版权说明

胚胎移植新进展
编者 武彬

版权© 2012 InTech
本书所有章节依据“创作共同社专属”3.0许可证均可免费发布

翻译© 2014 InTech [王素改, 郭丽娜]
主译 王素改
本书所有章节依据“创作共同社专属”3.0许可证均可免费发布

InTech出版
Janeza Trdine 9, 51000 里耶卡, 克罗地亚

注意

本书的章节中所表达的声明和观点, 均是个人的观点, 并非是编辑或出版商的观点。出版商对出版章节中所包含信息的准确性不承担责任。出版商对于利用本书中的任何材料、结构、方法或观点所造成人身或财产的损失或伤害不承担责任。

从www.intechopen.com可以获得本书免费在线版本。
从orders@intechweb.org可以获得更多复印版本。

出版流程经理Danijela Duric
封面设计InTech设计组
2014年11月第1版 克罗地亚印刷
ISBN 978-953-51-1727-8

Advances in Embryo Transfer
Edited by Bin Wu

Copyright © 2012 InTech
Individual chapters are distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 license.

Translation © 2014 [Sugai Wang, Lina Guo]
Individual chapters are distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 license.

Published by InTech
Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia

Notice

Statements and opinions expressed in the chapters are those of the individual contributors and not necessarily those of the editors or the publisher. No responsibility is assumed for the accuracy of information contained in the published chapters. The publisher assumes no responsibility for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods, or ideas contained in the book.

A free online edition of this book is available at www.intechopen.com
Additional hard copies can be obtained from orders@intechopen.com

编者介绍



武彬，博士，美国生物分析学会(ABB)授予的综合实验室主任，目前是美国亚利桑那生殖医学研究中心试管婴儿实验室主任。在西北农业大学获得学士，硕士和博士学位。自从1992年，曾先后在美国爱达荷大学、康奈尔大学和加拿大的圭尔夫大学留学和做博士后。1999年起开始在芝加哥从事人类胚胎生物工程——试管婴儿的研究和生产工作。

长期以来，武彬教授主要从事动物遗传育种和胚胎生物工程技术的研究和应用工作。1990年以前曾率先在国内从事动物血液蛋白质多态性的遗传标记研究，并发表论文二十余篇，获奖四项，被西北农业大学破格晋升为副教授。1992年出国后着重动物配子发生和胚胎发育的分子机制研究，在国际杂志上率先发表c-Mos原癌蛋白在牛卵母细胞成熟中的调节作用。1994年在澳大利亚国际胚胎移植会议上获得研究竞赛二等奖。此外，他也率先探测到c-fos、c-jun原癌基因在绵羊胚胎发生过程中表达作用。他运用分子生物学方法和Confocal显微镜技术系统地研究牛、羊卵子发生和胚胎发育的分子机制，曾在SCI国际杂志以及国际学术会议上发表论文和报告30余篇，并获奖四次。1998年被西北农业大学评为教授，博士生导师，并给研究生讲授分子生物学和现代生物技术进展等课程。

近十多年来主要从事人类试管婴儿的研究和临床工作，并继续卵子和胚胎的发育机制以及精子、卵子和胚胎的遗传学诊断，例如PGD和PGS。因此，他具有娴熟的胚胎生物工程和分子生物学技术，尤其是卵母细胞体外成熟、胚胎体外培养移植、胚胎显微操作技术，如单精子显微注射治疗雄性不育、卵裂球分离作为遗传诊断、以及胚胎生物工程等方面的专家。

武彬博士是美国生殖医学学会、国际胚胎移植学会、生殖生物学学会、美国生物分析学会以及欧洲人类生殖和胚胎学会的职业学会的成员。他也从这些学会获得一些重要的奖项。2014年7月被美国胚胎学家学会授予杰出胚胎学家荣誉。

编者序言

在人和动物生殖领域中，胚胎移植技术已经成为世界范围内最大的产业。人的体外受精技术在不孕不育治疗领域快速发展。研究哺乳动物受精和早期胚胎发育不仅为研究动物体外受精技术提供了颇有价值的工具，同时也带动其商业应用的快速发展。到目前为止，这些技术的发展经历了三个阶段：第一，传统的动物胚胎移植，主要是用于牛（为了提高产量而超排卵）；第二，为了提高人和动物体外受精的胚胎数量。第三，近些年体细胞核移植技术和动物转基因产品是克隆技术发展最显著的体现。在改良动物品种的动物产业中，胚胎移植技术同样得到广泛应用。在人类，世界各地为治疗不孕夫妇建立了许多生殖中心。随着胚胎移植技术经验的长期积累，许多有关人和动物胚胎移植方面的书籍相继问世。以往大部分书籍介绍胚胎移植的操作过程和流程，本书则着力于胚胎移植的新进展，讨论在胚胎移植过程中遇到的理论和技术问题，并用实例说明如何使用创新技术提高妊娠率，以此使读者，尤其是胚胎学家和医生可以获得一些新的、有用的信息以及一些关键的应用技术。

这本书包括五个部分，共 16 章。第一部分为序言。在第二部分，着重介绍最佳的卵巢刺激方案——自然周期和卵巢微刺激方案。然后，本文分析了每个取卵周期多少个卵母细胞对于人体外受精-胚胎移植（IVF）实践是最佳的。如果刺激产生过多的卵，常常会导致卵巢过度刺激综合征的发生。所以，有一个章节专门讨论卵巢过度刺激综合征的诊断、预防和治疗。第三部分，列举了先进的受精技术。先介绍了正常精子的生理学，然后分析了不育患者的精子、异常染色体和 DNA 片段的减数分裂。接着又讨论了卵细胞浆内单精子注射（ICSI），如精子形态学选择微注射（IMSI）和透明质酸捕获精子用于 ICSI（PICSI）。最后，我们介绍一些可以使无精症的男性不育者实现生孩子梦想的新技术和方法。第四部分，主要讨论了改善胚胎移植技术操作来增加妊娠率，包括最佳胚胎移植技术、囊胚选择和单胚胎移植以及性交和妊娠率直接的关系。在最后的的部分，将讨论子宫内膜容受性和胚胎种植。更有意思的是，还发现了迄今为止有 20 多种与子宫胚胎种植窗和妊娠失败相关的生物标记物。所以，在这本书中，作者以最大努力提供新的信息以帮助胚胎学家和 IVF 医生改善人的 IVF 妊娠率。

在此，向为本书各个章节杰出的内容付出心血和汗水的作者表示衷心的感谢。

武彬博士 Bin Wu, Ph.D., HCLD (ABB)
美国亚利桑那生殖内分泌与不孕中心 图森

刘平序言

她一直有开展辅助生殖技术的梦想！

为王素改医师译著《胚胎移植新进展》而序

我与本书主译者王素改医师相识多年，大约在二十年前，她曾作为进修医师在我院妇产科进修，当时我院已有试管婴儿出生，每个在这里进修的医师都对这些神奇生命的诞生油然而生一种敬意。很多人回到原单位后，从事方向由普通妇产科转向了生殖内分泌，有些更是成为本单位辅助生殖技术的创业者。

2011 年春节期间，我接到王医师的电话，她所在的石家庄市第一医院准备开展辅助生殖技术，她在筹建人工授精（IUI）实验室，因为条件简陋，担心申报困难，请我去帮助参谋一下。那次见面，她告诉我进修回去后她一直有开展辅助生殖技术的梦想，始终没有放弃。2012 年 10 月在美国加州圣迭戈参加年度生殖医学年会（ASRM）期间，我与王医师不期而遇，分外高兴，王医生告诉我她正在美国进修学习，来参加 ASRM 会议时就打算好要找到她所熟悉的生殖医学专家和她曾经的老师们。会议期间我们一起参加了华人团体的学术聚会，并合影留念。

武彬教授主编，InTech 出版的英文版《胚胎移植新进展》一书，由王素改医师带领她的团队进行了认真、详实的翻译，借受邀为此书写序的机会，本人通览全书中英文，文中内容不乏新颖细致之精华，使人受益匪浅。在此我非常高兴地向国内同行推荐这本译著。以世界上第一个试管婴儿出生为标志的辅助生殖技术经过了三十多年的发展，在进入二十一世纪以来，随着我国改革开放和医学科学技术的快速发展，在我国也迎来蓬勃发展的阶段。国内广大从业人员不断地学习提高，从各种渠道获取新技术新信息，参加国内外主办的各种继续教育课程和学术会议，使我国辅助生殖技术的掌握和实施达到了与国际同步的水平。此刻，由王素改医师主译的《胚胎移植新进展》一书的出版，无疑会给国内广大同行增加一本有学术价值的参考书。在此感谢作者和译者的辛勤耕耘！

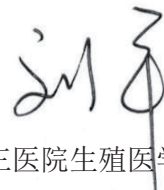
然而，本人也认为，随着辅助生殖技术发展的日新月异，一些学术观点不免受时代和作者本身认识的局限性的影响，尚存挑战和争鸣。翻译内容以“直译”为主，避免过多受译者观点修饰，但也可能造成与原文之间的一些差距，但总体来说，翻译准确，语言精练。

在此，我由衷地祝愿王素改医师早日实现理想，让我们一起为梦想插上翅膀，展翅飞翔！

刘平

北京大学第三医院生殖医学中心

2014 年 7 月 9 日于北京



美国加州圣迭戈生殖医学年会合影（左 王素改，右 刘平）



石家庄市第一医院生殖医学科全体医务人员合影



译者序言

人类不孕症是 21 世纪社会问题之一。近些年来，由于环境污染和精神压力等诸多因素的影响，不孕症发病率逐年增加，据报道占总人口的 10%~15%，这些严重影响不孕夫妇的身心健康，甚至给家庭和社会带来不安定的因素。辅助生殖技术的出现和快速发展给不孕症家庭带来福音，使他们能够圆一个做爸爸妈妈的梦。近几十年辅助生殖技术飞速发展，体外受精-胚胎移植（IVF）领域不断出现新理论及新技术，使得这一学科的相关知识不断更新。

本书是 2012 年由 InTech 出版社出版，全面阐述了辅助生殖领域最新进展，紧密结合临床，特别注重实用性。从最佳的卵巢刺激方案，到男性不育、授精技术的新进展、胚胎移植技术操作技巧及胚胎冷冻保存等都做了详尽的描述。特别对子宫内膜容受性的最新研究成果如与种植相关的标记物进行了阐述，并对未来生殖医学的发展如胚胎干细胞研究、卵细胞核移植、卵细胞浆置换、单性生殖、胚胎克隆等进行了展望。对从事辅助生殖技术的医务人员、胚胎学家以及科研工作者确实是一本很有价值的参考书。

我有幸作为河北省人力资源和社会保障厅资助的优秀出国人员，于 2012 年到美国费城访问学习，在 InTech 看到了此书。为了使更多的同行从此书受益，了解胚胎移植领域的最新进展，最终使千万个不孕家庭受益，使他们和正常人一样享有做父母的权利，我便组织我们科室人员进行中文翻译，由此他们付出了艰辛的劳动。更幸运的是，我们还得到本书作者武彬教授的大力支持和帮助，并给予审校指导。事实证明我们的团队非常优秀，通过翻译不但提高了专业英语翻译水平，还使得专业知识得到了强化和更新，工作起来更得心应手。译者们衷心希望通过本书的翻译及出版，普及胚胎移植技术的相关知识，使更多的从业人员更新观念和了解相关的专业知识，最终使广大患者受益。

在此，我们谨对本书作者武彬教授以及《国际生殖健康/计划生育杂志》《国际妇产科学杂志》编辑部李淑杰主任在出版编辑中提供的无私帮助，表示衷心的感谢。由于译者水平有限，在翻译过程中难免存在一些不妥或错误之处，恳切祈望国内同道和广大读者批评指正。

中国河北省石家庄市第一医院
生殖医学科 王素改
2014 年 5 月

目录

第一部分 介绍篇	1
第一章 胚胎移植新进展.....	1
第二部分 最佳卵巢刺激方案.....	14
第二章 IVF 周期中卵泡微刺激方案和自然周期方案.....	15
第三章 获卵数影响第 3 日和第 5 日胚胎移植的妊娠率吗?	31
第四章 卵巢过度刺激综合征的预防和治疗.....	43
第三部分 受精技术新进展.....	51
第五章 辅助生殖技术中的精子细胞.....	51
第六章 正常核型不育患者的减数分裂染色体异常和精子 FISH 检查.....	57
第七章 卵细胞浆内单精子注射 (ICSI) 的新进展.....	79
第八章 无精症男性生育选择的进展.....	93
第四部分 胚胎移植术	107
第九章 改善胚胎移植技术提高妊娠率.....	107
第十章 胚胎移植结局的最佳化: 如何决定捐卵.....	119
第十一章 囊胚形态在移植选择中的重要性.....	131
第十二章 人冻融胚胎培养与未培养移植后其妊娠率的比较.....	145
第十三章 性生活影响 IVF 的成功率吗?	151
第五部分 胚胎种植与冷冻保存.....	157
第十四章 人胚着床.....	157
第十五章 与子宫内膜容受性和种植相关的生物标记物.....	169
第十六章 生育能力的低温保存.....	185

IntechOpen

第一部分 介绍篇

第一章 胚胎移植新进展

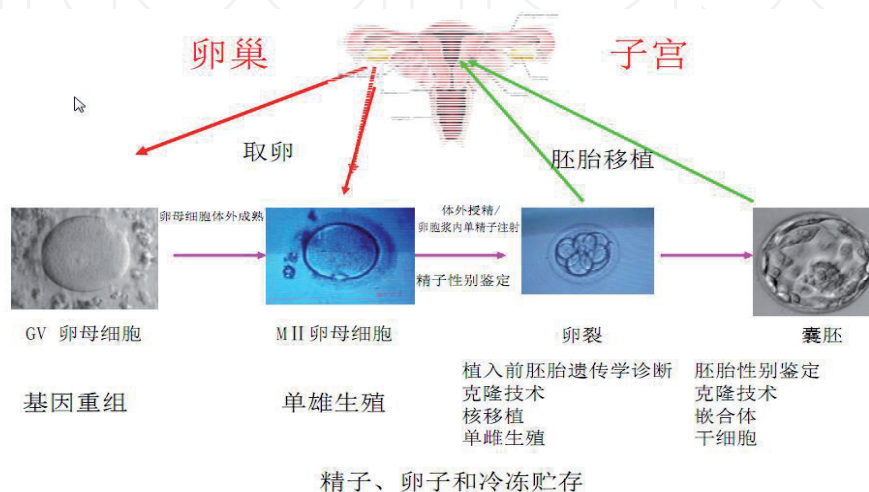
Bin Wu

Arizona Center for Reproductive
Endocrinology and Infertility, Tucson, Arizona USA

1. 引言

体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 指的是用辅助生殖技术把一个或几个胚胎置入女性子宫内以获得妊娠的过程。近代生物技术的发展使其已经成为世界领域杰出的产业之一。IVF 技术由于研究目的不同被广泛用于人类和动物。在畜牧业, 饲养员想获得最佳遗传结构畜群的质量和数量以增加牛奶产量, 胚胎移植已经成为最强大的工具。而在人类, 胚胎移植被用于不孕症夫妇使他们能圆一个做父母的梦想。这项技术可追溯到很早, 但是现代应用起于 20 世纪 70 年代 (Stepsto and Edwards, 1978)。在过去的三十年里, 胚胎移植技术的发展经历了三个阶段: 第一阶段, 源于超促排卵, 非手术和移植获得更多的胚胎, 特别用于牲畜; 第二阶段, 取卵体外受精靠试管获得更多的胚胎; 第三阶段, 随着实验室技术的发展特别是显微操作技术的发展, 应用体细胞克隆技术、胚胎干细胞技术和植入前遗传学诊断技术, 转基因技术等, 使得这项技术进入了一个崭新的发展阶段。与此同时, 商业性的动物胚胎移植已经成为一个大的国际商务 (Betteridge, 2006)。人类胚胎移植也在世界范围内用于不孕症的治疗。在 2009 年美国疾病控制中心的报告中仅在美国就有 442 家辅助生殖技术中心开展 IVF。胚胎移植, 除了通常所说的男性精子之外, 涵盖了从女性卵巢刺激 (开始) 到子宫容受性 (结束) 的整个过程。在全过程中, 许多新的生物技术都有了发展 (见图 1)。这项技术包括最佳卵巢刺激方案、取卵技术、不成熟卵的体外成熟技术 (IVM)、体外受精技术、卵胞浆内单精子注射、移植前遗传学诊断、囊胚培养技术、最佳子宫环境的识别等等。这里, 我们将着重介绍人类胚胎移植关键生物技术的最新进展。

图 1. 从卵巢到子宫的胚胎生物技术图示



2. 卵巢刺激技术

目前据我们所知, 女性卵巢在出生时大约有 2,000,000 个含有初级卵母细胞的始基卵泡, 到青春期有 300,000 到 400,000 个初级卵母细胞。自青春期开始, 卵巢卵母细胞在性激素如卵泡刺激素 (FSH) 和黄体生成素 (LH) 和雌激素的刺激下开始不断地发育、成熟、排卵。但是正常的育龄妇女每次月经周期仅排出一个卵子, 如此是为了确保妇女能够有一个单胎妊娠。然而, 在辅助生殖技术 IVF 周期中, 对那些不孕妇女, 为了获得更多的怀孕机会, 需要在单个周期中使用高剂量的促性腺素来刺激卵巢以便能取到更多的卵子。目前, 在美国比较流行的刺激方案, 通常使用三种类型的药物: 1). 抑制 LH 峰值直到卵子发育成熟即将排卵。促性腺激素释放激素类似物 (GnRH-a) 如: 亮丙瑞林 (利普隆) 和促性腺激素释放激素拮抗剂 (GnRH-anta) 如: 加尼瑞克和西曲瑞克。2). FSH 产品刺激卵泡发育如果纳芬 (Follistim, Bravelle, Menopur)。3). HCG 促使卵泡的最终成熟。使用这些刺激卵巢的方案就能选择一个或多个可供移植的胚胎, 而剩余的胚胎还可以冷冻储存以供以后的移植周期使用 (Macklon et al., 2006)。目前所有的 IVF 中心都有标准的卵巢刺激方案 (Santos et al., 2010), 这些方案就是使用外源性的促性腺素作为常规刺激卵巢以获得较多的卵子。这些方法在大部分患者身上很有效果。由此也促使了许多先进的药物公司生产各种用于辅助生殖技术、胚胎移植的药物。然而, 近些年研究证实卵巢刺激本身对卵子的发生、胚胎质量、子宫内膜容受性以及围生结局都有损害效应。在常规的 IVF 周期中取卵数量也是被考虑的重要的方面 (参看本书第三章), 如果使用刺激方案产生了太多的卵子, 常常会导致卵巢过度刺激综合征 (OHSS) 的发生。在标准的 IVF 方案要求使用大剂量注射药物以获得多个卵泡发育, 这些药物既昂贵又对身体有潜在的危害, 在实施过程中, 要仔细观察以确保其安全性及有效性。对患者来讲, 要增加获卵数以获得较多的可供移植的胚胎, 就要花费大量的时间和药物。另外, 在标准的方案或传统的 IVF 周期, 冷冻保存剩余的胚胎还可以在以后的非刺激周期解冻移植。总的期望抱婴回家率 IVF 方案不同也有所不同。首先很大程度上依赖于患者的年龄, 近来有些 IVF 中心在 IVF 时采用了自然方法或微刺激方案, 获得了较好的结果。最近在辅助生殖技术领域实用技术方面发生了新的变化, 就是在 IVF 过程中较流行小剂量或微刺激方法或自然周期法、不成熟卵母细胞体外成熟法 (Edward, 2007)。这些技术各有好处, 将来能很好地灵活使用。这些方法的一个共同点是在不孕治疗中使用药物较少。这个概念就是与标准的 IVF 周期相比, 可使药物用量减少 50% 到自然周期的 100%。使用药物减少, 就意味着血液监测和超声监测相应减少, 由此操作减少, 从经济学角度也就省钱。对大部分方法来说, 卵子越少, 意味着实验室要做的工作就越少。许多患者在实验室的花费常多于临床花费, 如此说来, 患者也就节省了实验室的花费 (参看第二章)。常规的 IVF 方案还有发生严重卵巢过度刺激综合征的风险。而这些微刺激方案大大减少了这个风险, 自然周期和不成熟卵母细胞体外成熟技术甚至消除了这种风险 (Tang Pedersen et al., 2012)。更重要的是某些常规 IVF 方案可能导致重度卵巢过度刺激综合征的妇女因为症状严重甚至需要住院治疗 (罕见)。不管怎样, 这种技术需要花更多的时间取卵其结果往往是因为每个取卵周期获卵数较少或仅有一个卵可用, 导致每个取卵周期的妊娠率很低。所以, 这种方案仅用于年龄小于 30 岁的年轻妇女或大于 40 岁的妇女。在这本书中, 回顾了卵巢刺激的影响及其产生机制, 并且对如何减少卵巢刺激对

IVF 结局影响的策略分别进行了阐述（参见本书第二章）。

如上所述，卵巢过度刺激综合征是发生在不孕妇女用药刺激卵巢卵泡发育过程中所表现的一个结果。在 OHSS，卵巢变得肿胀而引起轻重不等的临床症状。大约 1/4 的不孕妇女在注射药物过程中产生轻度的症状，通常在一周后自然消失。如果妇女用药后怀孕，OHSS 症状将会持续几周。少部分用药的妇女会发生更严重的症状，表现为体重迅速增加，下腹疼痛，呕吐，气短。我们应采取有效的措施来预防 OHSS 的发生。一旦发生了，应以重度 OHSS 指南指导治疗。其目的是缓解症状，预防并发症。本书第四章将详细介绍 OHSS 的诊断、预防和治疗。

3. 人工授精和体外受精技术新进展

受精标志着胚胎发育的开始。在受精之前，卵子和精子都必须经历一系列的成熟阶段以获得能力达到成功受精。一直以来，对这阶段的研究更多的是面向改善家畜的有效繁殖和保护濒临绝种的动植物。IVF 是胚胎移植的重要里程碑。在动物研究领域，IVF 为研究哺乳动物受精和早期胚胎发育提供了一个极有价值的工具。IVF 是由人工取卵并体外受精的一个过程。它在其他方法失败时为不孕症患者提供了一种主要的治疗方法。目前在世界范围内，这项技术已经作为常规操作被广泛应用于治疗人类不孕症。IVF 最初被用于治疗因输卵管阻塞不能受精的不孕妇女，多年以来证明，这项技术对帮助那些其他原因包括不明原因不孕的妇女也非常有效。到目前为止，IVF 技术为许多不孕夫妇圆了他们做父母的梦想。然而，IVF 不仅仅是针对有不孕问题的妇女。

男性精子的数量和质量也对卵子受精产生决定性的影响。精子功能异常多伴有不能结合和穿过透明带。近二十年来，显微操作技术取得了巨大的进展，包括部分透明带切除术 (PZD)、透明带下注射术 (SUZI) 和细胞浆内单精子注射 (ICSI)。这些方法大大地改善了卵子的受精率。更重要的是 ICSI 技术能解决严重的男性不育问题，包括：1) 无精子症；2) 少精子症；3) 畸精子症（精子形态异常）；4) 完全不活动精子（死精子症），若进一步了解这些技术的进展情况，请参看本书第五章有关精子治疗。

首先，在第五章，从生理学角度对精子基础知识进行了描述，并对男性不孕症的评估进行了讨论。第二，精子染色体异常对胚胎质量和妊娠率有明显的影响。甚至在妊娠后会 导致多次流产。最近有许多关于精子染色体异常的研究，包括精子染色体检测和精子 DNA 碎片分析等等。所以，在第六章对正常染色体不孕患者的精子进行荧光原位杂交技术 (FISH) 和染色体减数分裂异常分析。这是一个非常有趣的结果。第三，最近些年，ICSI 技术又发展到了精子形态学选择微注射 (IMSI) 和透明质酸捕获精子选择微注射 (PICSI) (Parmegiani et al., 2010a b; Said & Land 2011; Berger et al., 2011)。许多诊所采用这些创新技术后受精率和妊娠率明显增加了。这些技术主要目的就是在没有好的精子时做 ICSI 来获得较高质量的胚胎用于移植。少精子症是精子数量减少常常伴有染色体畸变和异常 DNA 片段的增加。所以，实验室选择精子做 ICSI 非常关键，在植入前胚胎发生方面直接影响父方遗传。透明质酸 (H) 是卵丘基质中的主要成分，在 IVF 中，它在选择功能完善的精子方面发挥着关键性作用。透明质酸捕获精子 (HBS) 表现为细胞质内包涵体和残余组蛋白水平下降，HspA2 伴侣蛋白表达水平增加，染色体异常发生率显著下降。HBS 与反应能力增加之间的关系已成为目前临床试验的方向 (WorriIow et al., 2010)。PICSI 技术作为 HBS

的一项试验，在ICSI中选择透明质酸捕获精子已经成为治疗男性的少弱精不育症的新方法(Parmegiani et al., 2010b)。除此之外，精子形态学选择微注射(IMSI)的研究新进展还用于形态异常的精子(畸精子症)。这些技术已经开始被用于一些试管婴儿中心。这部分将在第七章详述。

最后，最严重的男性不育为无精子症，占男性不育的10%。无精子症分两种类型，其一这是由于生殖道解剖正常而睾丸活检证实睾丸内没有精子生成则诊断非梗阻性无精症(NOA)。而另一种则为输精管梗阻所致的无精症(梗阻性无精症OA)。OA患者常见的原因是先天性双侧输精管缺如或输精管梗阻重建手术失败。一旦证实睾丸和附睾功能正常，则可通过手术解除梗阻。目前治疗男性不育最佳方法是用手术或非手术疗法通过睾丸或附睾获得精子(Wu et al., 2005)。然而，有时候无论是通过精液还是睾丸活检都不能获得成熟的精子，因此不成熟的精子单体或精母细胞二倍体或精原细胞，甚至体细胞像sertoli细胞核或睾丸间质细胞也可能被认为像精子一样将父方的DNA植入卵细胞形成胚胎转移给母亲。在第八章男性不育新进展有关章节(第八章)将进行详述。在这章中，从无精子症睾丸活检的最佳操作方法以获取最佳应用精子(圆形精子或长形精子)到体外受精胚胎移植进行论述。还对干细胞和体细胞产生人造精子新进展(还包括精子克隆新技术)一并进行讨论，总之，所有的目的就是为了使无精症患者实现他们有孩子的梦想。

4. 胚胎移植技术

胚胎移植技术至关重要，此步骤需要花费大量的时间和精力。它是IVF的最后一个步骤也是最关键的步骤。无论多么好的体外受精实验室，均可因为医生稍微不小心的操作而毁灭整个胚胎移植。整个试管婴儿周期还取决于胚胎着床位置。胚胎置入应以最轻微操作最小创伤将其放置于宫腔中部。胚胎移植成功的终极目标是将胚胎无损伤地送达宫底使着床最大化。

胚胎移植可以通过几种不同的方式进行操作。经输卵管(ZIFT)、子宫肌层和经宫颈三种方式。目前大多数胚胎植入是将一个特定的导管经子宫颈管插入宫腔。为了优化胚胎移植技术，虽然曼苏尔和Aboulghar(2002)有一篇关于胚胎移植的文章很好地回顾了操作过程，书中有两章节介绍应该采取一些预防措施和注意事项(第九章和第十章)。首先是使用软导管、轻微地操作和避免碰触宫底。其次，正确地评价子宫腔大小和子宫屈度也非常重要，可以提前虚拟胚胎移植过程和通过超声评价子宫宫颈角度和子宫腔长度。另一个重要步骤是去除宫颈黏液，这样它才不会在撤出导管时又粘在导管上。最后要必须绝对保证胚胎移植导管已通过宫颈内口将胚胎轻轻放在子宫腔。

胚胎期不同阶段移植也对体外受精妊娠结局产生重要影响。我们知道，移植的时间和数量对妊娠率有明显影响。目前的体外受精技术可能会使许多不孕不育夫妇实现他们做父母的梦想，但多胎妊娠大大增加了围生期的母婴风险，容易发生一系列母婴并发症，主要原因是在早卵裂期植入了3~4个胚胎。降低多胎率最好的方法是单胚胎移植。然而，这将大大降低怀孕率。许多研究表明，从形态学选择质量好的胚胎特别是选择囊胚移植将获得较高的植入率。因此自从1999年首次发明了一系列囊胚培养介质以来，延长胚胎培养至囊胚期在各大生殖中心已经成为一种常规做法。相比卵裂期移植(Gardner and Schoolcraft, 1999; ovačić et al., 2004)，囊胚培养的好处在于以形态学为基础选择胚

胎(Braude et al., 1988)预测着床率有更高的预测值(如果不考虑妊娠率而减少移植胚胎数量(Gardner et al., 2000)), 并且, 囊胚期移植与子宫内膜容受性更同步。有趣的是, Kovačič et al.的研究(见第十一章)表明, 在年轻患者组单胚胎移植与双胚胎移植有相似的妊娠率。令人难接受的是, 如果至少有一个囊胚形态学好, 并移植双胚胎, 双胎率还是很高的。因此, 对于年轻夫妇来讲, 体外受精时基于囊胚形态学评估进行单胚胎移植来预防多胎妊娠是可行的。

另外, 冻融胚胎移植(FET)在世界各地生殖中心也已经成为一种常规辅助生殖技术。它是利用上一周期体外受精形成胚胎进行安全冷冻后再解冻进行植入。然而, 与新鲜胚胎移植相比, 冻融胚胎移植妊娠率低, 主要是由于冷冻和解冻过程对胚胎形态结构造成的损害使囊胚生存率低导致了低的着床率。因此, 在解冻后再评估, 移植一个或多个活的胚胎将极大地改善妊娠率。在第十二章, 有一篇文章介绍了培养后移植与未培养冻融胚胎移植妊娠率的比较, 这项研究提供了一种可行的方法来原因胚胎解冻后仍然存活, 它采用胚胎过夜培养, 选择有卵裂球分裂的胚胎进行移植。在胚胎解冻后移植有卵裂的胚胎将可大大地增加妊娠率(Joshi et al., 2010)。

到目前为止, 对于胚胎移植后是否性交仍有争议。一个大型的随机对照研究表明, 胚胎移植前后性交对改善胚胎着床率和提高妊娠率无明显影响。在第十三章, 将对性交对辅助生殖技术结局的影响提供有效的证据。

5. 胚胎着床与子宫内膜容受性

胚胎在被成功移植后, 继续生长、自透明带孵出最终在子宫壁着床。因此, 着床是胚胎发生学的最终一步, 是成功妊娠的标志。在过去的三十年里, 理解人类胚胎发育和植入子宫的过程发生了巨大的变化。胚胎植入子宫的过程需要在子宫内膜容受和胚胎之间发生微妙的交互作用。胚胎和子宫内膜之间这个复杂系列的互动过程可以分为三个不同的步骤: 定位、黏附、侵入(第十五章, Norwitz et al., 2001)。这错综复杂的交互过程需要动态的胚胎和母体组织之间的对话。因此, 显而易见, 植入过程表现出子宫内膜的动态变化和胚胎的发育必须同步。只要这些问题没有解决, IVF就很难成功。近些年来, 许多研究集中在提高胚胎质量和理解子宫壁组织动态的变化, 因为大家都知道胚胎着床和子宫内膜容受性有非常密切的关系(Horne et al., 2000)。女人怀孕不仅依赖胚胎的质量, 还取决于子宫内膜容受性。因为子宫内膜必须在短时间内经历一系列的变化为胚胎着床做准备, 这一短暂关键时期称为“种植窗”。超出这段时间, 子宫将拒绝胚胎植入。如何确定这个窗口对于获得高的妊娠率是非常重要的。由于材料的限制和其他哺乳动物物种存在显著差异, 确定人类胚胎着床的分子机制是一个非常具有挑战性的任务。最近的一些文献回顾性分析了在保持组织完整性及胚胎种植时子宫内膜上皮细胞内表达的一些黏附分子(Singh and Aplin, 2009), 并认为trophinin可能是囊胚滋养外胚层最初黏附到子宫内膜表面时唯一的顶端细胞黏附分子(Fukuda, 2008)。在小鼠中, 囊胚上的ErbB4与肝素结合的表皮生长因子, 比如子宫内膜表面生长因子结合可以激活囊胚种植的初始阶段。人们已经提出, L-选择素和其糖类配体是介导人囊胚最初黏附到子宫内膜上皮的一套体系。有证据显示, L-选择素和trophinin都包含在人胚胎种植中, 同时, 他们的相关功能和人胚胎种植时的细胞黏附机制也被进行了描述(Fukuda, 2008)。有趣的是, 在胚胎种植期间可以在子宫内膜上

皮细胞中发现一些重要的生物标记物，包括蛋白类、细胞因子类和肽类的基本表达 (Aghajanova et al., 2008)。同样，人类卵丘细胞也可以作为胚胎和妊娠结局的生物标记 (Assou et al., 2010)。因此，此书选了2篇有关胚胎种植机制的有趣的文献（第十四、十五章）。这两篇文章探讨了控制人类子宫内膜容受性的神秘机制，该文献描述了大约20种生物标记物在月经周期第20~24天与胚胎种植窗的区别。并且有趣的是，还能决定胚胎移植时间和改善妊娠率。另外，筛查容受性标记物和对患者的评估可以用于增加单胚胎移植的选择。

从临床角度来看，反复种植失败是对IVF失败原因的理解。反复种植失败的原因可以是子宫内膜容受性降低、胚胎缺陷或其他多种因素组成。各种子宫解剖学因素，如子宫内膜薄、黏附分子表达的改变以及免疫因素等，都可能降低子宫内膜容受性。而男性或女性遗传学异常、精子缺陷、胚胎非整倍体或透明带坚硬等都是胚胎着床失败的原因。子宫内膜异位症和输卵管积水也是导致胚胎种植失败的原因。最近分子研究进展也描述了胚胎种植失败的原因。我们利用部分章节对胚胎种植失败进行详尽描述的同时也推荐了一些可行的治疗方法。

6. 生育冷冻保存

生育冷冻保存是生殖科学重要的分支，包括配子保存（精子和卵子）、胚胎保存和用于辅助生殖技术的生殖组织（卵巢和睾丸组织）保存。生殖细胞的冷冻保存是精子或卵子冷冻、贮藏和解冻的过程。包括暴露于冷冻保护剂，零度以下制冷、保存，最终当使用时，再解冻、去除冷冻保护剂，允许返回到生理环境继续发育。成功地冷冻、适当处理渗透压避免细胞内冰晶形成对细胞损害是解冻的关键。目前，有两种技术用于生殖细胞或生殖组织的保存：慢速程序化冷冻技术和玻璃化冷冻技术。在近十年，许多科学家和胚胎学家对玻璃化冷冻技术更感兴趣。程序化冷冻技术最早用于在IVF程序中，被认为是对动物或人类胚胎冷冻最有效的方法。最近的十年，科学家和胚胎学家对玻璃化冷冻方法更感兴趣，因为它可以超快速冷冻胚胎和卵子而避免在冷冻过程中细胞内冰晶的形成。所以，可以节省时间并且获得较高的存活率。为了更好地理解这两种方法，在第十六章将详细介绍生殖细胞和组织包括精子、卵子、胚胎以及活检的卵巢/睾丸组织的冷冻技术。

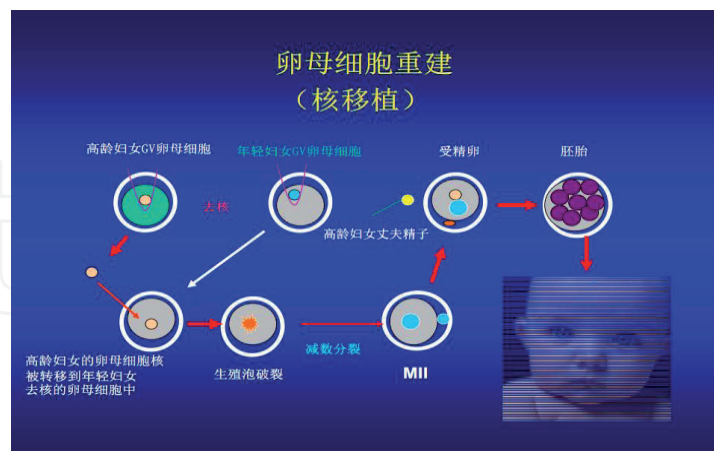
7. 胚胎移植技术应用的展望

如前所述，胚胎移植经历了三个阶段。在人类，大多数应用在第二阶段，即体外受精胚胎移植用于不育夫妇的治疗。然而，第三阶段包括这项技术进一步发展，特别是胚胎显微操作技术的改革，能促进我们进行各种各样的胚胎操作包括体细胞的克隆技术、胚胎干细胞技术、植入前遗传学诊断技术、转基因动物产品等。因为女性原始生殖细胞(PGCs)可变为卵原细胞，卵原细胞在卵巢内经过多次有丝分裂和进入第一次减数分裂前期停滞 (Eppig et al., 1989)。早期卵母细胞可通过卵巢组织体外培养和原始生殖细胞(PGCs)得到 (图1所示)。在胚泡期(GV)，可以通过核移植技术诱导卵母细胞重建 (Takeuchi et al., 1999)。在高等生物包括人类，既有细胞核又有含DNA的线粒体。线粒体是位于核外的细胞质，是负责能源合成的细胞器。卵母细胞在大量的细胞质含有丰富的线粒体 (Spikings et al., 2006)。在正常的有性生殖，后代继承来自母亲的线粒体DNA。这种类型的遗传模式

一般被称作母系遗传。当母亲有缺陷的线粒体传给孩子，可能会导致致命的心脏、肝脏、脑和肌肉疾病。为了防止这种遗传疾病，消除母亲有缺陷的线粒体DNA，母亲的核DNA可以被转移到卵子捐献者提供的一个正常的去了核的卵子内(图2)。捐赠一个无核的细胞目的是由另一个女人而非孩子的母亲提供孩子没有线粒体缺陷的DNA，这个结果导致一个三亲胚胎。其细胞核是由精子和母亲卵子核融合而成，而细胞浆由去核的捐赠细胞提供。因此，孩子DNA遗传来源于三部分，核DNA来源于父母，线粒体DNA主要来源于捐赠人 (Zhang et al., 1999)。

另外，有些高龄妇女不能产生正常的受精卵和发育好的胚胎，主要的问题是：高龄妇女缺乏合成一些成熟启动因子，如细胞环素B，c-Mos原癌蛋白，细胞静止因子(Wu et al., 1997 a, b)。因此，新开发的卵母细胞重建技术的包括核移植和细胞浆替换技术可能增加高龄妇女的怀孕机会。核移植技术是将高龄妇女的细胞核移入年轻妇女去核的卵细胞使高龄妇女的细胞核能够完成一个正常减数分裂(图2)。细胞浆移植(图3)是将年轻妇女卵母细胞浆的一部分转移到高龄妇女卵母细胞浆内以取代部分卵母细胞浆(Cohen, 1998)。在这种情况下，捐卵的健康部分细胞质可以补充不育受卵者有缺陷的部分帮助卵存活并变成一个好卵。因此，由于卵核的存在，不育妇女的遗传信息得以保留而捐卵的细胞浆仅含有促使卵存活的线粒体DNA能量的补充，仅占胚胎1%的遗传构成。一旦受精，胚胎将被植入不育妇女的子宫内。遗憾的是，在美国诞生了许多人细胞浆移植婴儿之后，发生了许多伦理学问题和医学并发症。在2001年美国政府禁止了这项技术操作。今天，生殖不育专家必须将这些并发症总结归类并继续此项研究，纽约的新希望生殖中心获准继续这项研究。将来有可能证明这项技术的发明不仅适用于非人物种，并且可用于人类，得到法律认可。

图2. 卵母细胞的核移植技术模式图

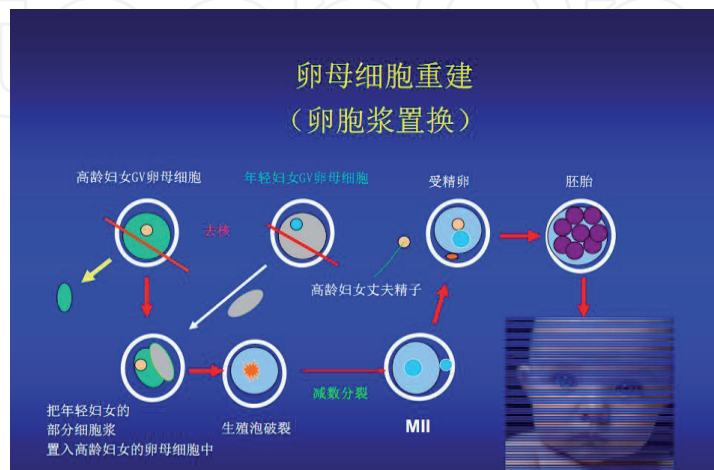


高龄妇女的卵母细胞核被转移到一个年轻妇女去核的卵母细胞中，未成熟卵母细胞会诱发高龄妇女的细胞核在卵母细胞成熟过程中完成减数分裂。高龄妇女丈夫的精子会被注入这个重建的卵母细胞形成一个可用于移植的正常胚胎。

随着卵母细胞体外成熟 (IVM) 和体外受精 (IVF) 技术的发展，又开发出了某些技术，如精子性别检测、卵母细胞的激活、孤雌生殖等应用于动物研究和人类不孕症的治疗。性别选择是试图控制后代的性别来实现所需性别动物。它可以有几种方法来完成：包括精子性

别选择和植入前胚胎性别选择。有一些文献发表了在牲畜精液进行性别选择 (Seidel and Garner, 2002; Seidel, 2003)。目前成功分离精液的方法用流式细胞术分离携带X或Y染色体的精子用于人工授精或IVF (DeJarnette et al., 2007, Blondin et al., 2009)。然而, 在人类治疗中, 因性别选择涉及伦理问题而受到限制。因此, 精子性别检测可被用于X染色体遗传病的治疗。

图3. 部分卵胞浆置换的卵母细胞重建技术模式图



首先, 高龄妇女的部分卵胞浆被去除, 年轻妇女的细胞浆被置入高龄妇女细胞内, 此细胞浆诱导高龄妇女细胞核在细胞成熟的过程中完成减数分裂。然后, 高龄妇女丈夫的精子将被注入重建的细胞内形成可以用于移植的胚胎。

精子性别鉴定技术开展受限主要原因是活力差的精子效率非常低。卵母细胞的激活可能会增加卵母细胞受精或导致孤雌生殖。结合可靠的核移植方法, 卵母细胞激活可能产生母系的单雌胚胎 (Kawahara et al., 2008) 或父系的单雄胚胎 (Wu and Zan, 2011; Tesarik 2002)。在本书第八章, 描述了使用未成熟卵母细胞诱导男性体细胞完成减数分裂。未成熟卵母细胞的细胞核被移除和男性二倍体细胞被注入这个去核的卵母细胞。在完成减数分裂, 诱导单倍体细胞核转移到正常女性成熟的卵母细胞形成一个双亲的可供移植的胚胎。同时, 本书还对精子基因组克隆技术进行了描述。一个单精子注入去核的卵母细胞, 这细胞经历单性生殖过程成为一个4~8细胞单倍体胚胎。这个单卵裂细胞被移植到一个正常的成熟卵母细胞形成一个合子。发育后的胚胎被移植至受鼠体内而产生鼠后代。并且, 核移植研究显示当移植完全成熟的囊胚期受精卵, 细胞核也从未成熟发育至MII期成熟核。然而, 在卵母细胞生成能力缺乏, 体外受精后卵细胞核直径需大于65 μm 时才能满足发育需求 (Niwa et al., 2004)。

受精后, 受精卵形成并在此期可观测到两个明显的原核。在生殖生物学领域两个基本发现是前核期胚胎遗传学操作 (Wilmut et al., 1991)。通过原核的移除和交换, 能有力地证明遗传印记的存在。通过注射外源DNA到卵细胞两个原核中的任意一个, 由此产生的后代的基因组中可能包含一个外源基因, 被称为转基因技术。生产转基因动物产品在农业和医学领域有广泛的应用 (Niemann and Kues, 2003)。在农畜牧业, 转基因技术可用于开发快速增长、高品质或抗病牛肉产品生产线 (Greger, 2010)。过去十年的转基因实践已经证

明, 插入一个生长调节基因至一农用牲畜, 动物生长速度和饲料利用率会大大增加, 而其脂肪沉积则明显减少。这种技术已经改变了整个肉食动物产业(Wheeler, 2007)。在人类, 此技术可将目标基因序列植入到预定宿主的DNA某个位点, 用于治疗某些基因遗传疾病。

动物克隆可能涉及胚胎克隆和成年体细胞克隆。在8细胞前早胚胎期, 胚胎细胞可以分散进入各卵裂细胞。每个胚叶细胞具有全能的胚胎细胞潜能, 它具有按照核移植发育成新个体的潜能, 这就是克隆。胚胎分裂就是克隆的一种而且能产生一模一样的双胞胎。在人类体外受精, 人们从胚胎切取一个卵裂细胞, 采用荧光原位杂交(FISH)技术或聚合酶链反应(PCR)技术用于诊断一些遗传性疾病和性连锁遗传病。正常的胚胎活检可以不影响胎儿发育并能分娩正常新生儿。并且, 对胚胎来讲, 冻融的过程还是相当粗暴的, 并不是所有的细胞或胚胎都能存活。冻融后, 在一些胚胎常发生一个或几个细胞溶解, 这些损害的细胞或者发生胚胎停育或产生不良反应影响幸存胚胎的生长发育。最近新技术试图通过酸或激光在透明带打出小洞移除溶解细胞碎片以此恢复胚胎的发育潜能。与没有清除溶解的细胞碎片相比, 胚胎细胞数量和形态有显著改善(Elliott et al., 2007)。这种方法已经被证明能够极大地增加人类胚胎着床和妊娠率(Nagy et al., 2005)。

另外, 许多数据已经显示胚胎碎片比例与囊胚发育率呈显著的负相关关系(Eftekhari-Yazdi et al., 2006)。如上所述, 胚胎的碎片是可以被清除的。一些研究已经表明从第三天的新鲜胚胎移除细胞碎片, 可以增加胚胎发育率(Alikani et al., 1999; Eftekhari-Yazdi et al., 2006)。

在囊胚期可以观察到两种截然不同的细胞层、内细胞团(ICM)和滋养外胚层细胞(TE)。内细胞团细胞是全能干细胞, 可以产生胎儿所有的组织。目前已经通过体外细胞培养ICM研发出胚胎干细胞(ES)。胚胎干细胞有分化成为胚胎三胚层各层细胞的能力而体外培养可保持其不分化和不确定细胞增殖的能力。这样, 结合细胞克隆和核移植技术, 特定的干细胞可以从胚胎的ICM产生。最近的成就表明, 完全分化的细胞(包括胎儿和成人)可以重新编程生成多潜能胚胎细胞, 即非常类似于靠维持表达胚胎干细胞特质的重要基因和因子的胚胎干细胞称之为多能干细胞(iPSCs)(Takahashi and Yamanaka 2006; Yu et al., 2007)。这一发现为新药发现、细胞治疗和基础研究创造出有价值的多能细胞的新资源。

十多年来, 胚胎植入前的遗传学筛查(PGS)和胚胎植入前的遗传学诊断(PGD)已经被用于协助识别第三天的非整倍体胚胎。然而, 目前的方法, 多采用荧光原位杂交技术(FISH)细胞活检, 允许少于一半的染色体被筛选。目前, FISH技术已逐步被竞争基因组杂交(全息图)(CGH)或基因芯片分析所取代(Wells et al., 2008)。这种分析可以通过胚胎的囊胚外胚层活检评估所有染色体, 并可能显著减少第三天胚胎活检对胚胎的危害。滋养外胚层活检从IVF囊胚内容物移取滋养外胚层细胞, 这些细胞被用来检测染色体是否正常, 或采用PGD或PGS技术来检测特殊的基因缺陷。结合单基因和非整倍体疾病诊断, 一些芯片技术也提供了胚胎指纹的优势。然而, 在基因芯片技术广泛应用之前, 还需要获得更多准确的数据和进一步降低有关测试的价格。

8. 结论

胚胎移植不仅在动物品种遗传改良和创造新的动物品种方面已经成为一个全球范围内的杰出产业。而且在治疗不孕不育夫妇实现他们有自己的孩子的梦想时也成为最主要的

工具。新开发的胚胎生物技术已经能够让没有精子(精子缺乏)的男人实现梦想——拥有一个孩子。同时,各种创新的卵泡刺激技术,如最佳卵巢刺激方案,新开发ICSI技术,超声引导胚胎移植、胚胎选择,寻求子宫生物标记,大大地改善了胚胎移植的妊娠率。随着新的胚胎培养方法改进和PGD、PGS、CGH和电子芯片技术的发展,可选择一个质量好的胚胎进行移植并减少了多胎妊娠的发生率。同时,胚胎冷冻保存技术的发展,特别是玻璃化冷冻技术,大大地增加胚胎解冻后的生存率,即使取出单卵也增加了怀孕的机会。新开发的技术,如胚胎克隆、核移植、转基因动物、干细胞等,在农业和生物医学领域都显示出极广阔的前景。目前,这些技术已被或将被用于治疗人类不孕症。在接下来的十年里,这些技术不仅会极大地促进动物遗传改良和创造新的动物品种,也会显著改善人类生殖健康。

9. 文献

- Aghajanova L, Hamilton AE, and Giudice LC(2008) Uterine Receptivity to Human Embryonic Implantation: Histology, Biomarkers, and Transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 19(2): 204–211
- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT (1999) Embryo fragmentation and fragmentation removal in IVF. *Fertility and Sterility* 71(5):836-842
- Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S (2010) Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod* 16 (8): 531-538
- Berger DS, AbdelHafez FRussell H, Goldfarb J, Desai N (2011) Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology, embryonic cleavage and compaction. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 37
- Betteridge KJ 2006: Farmanimal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology* 65: 905-913.
- Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA (2009) Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30-38.
- Braude, P. Bolton, V & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the Four and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332(6163):459-461.
- Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munné S, Levron J, Wu L, Brenner C, Warner C, Willadsen S (1998) Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 4(3): 269-280
- DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW (2007) Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 91:1778-1785.
- Edwards, RG (2007) IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF - time for arethink. *Reprod Biomed Online* 15(1):106-19.
- Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Ashtiani SK, Eslaminejad MB, Karimian L (2006) Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *Reprod Biomed Online* 13(6):823-32.
- Elliott TA, Colturato LFA Taylor TH, Wright G, Kort HI, Nagy ZP (2007) Lysed cell removal promotes frozen-thawed embryo development. *Fertil Steril* 87(6): 1444-1449.
- Eppig JJ, Schroeder AC(1989) Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 41:268-276
- Fukuda MN (2008) An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. *J Obs*

- Gyn Res* 34(2) 129-136.
- Gardner, DK & Schoolcraft, WB (1999) *in vitro* culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds) *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Parthenon Publishing, Carnforth, UK. pp. 378-388.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T and Schoolcraft WB (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 73, 1155-1158.
- Greger M (2010) *Transgenesis in Animal Agriculture: Addressing Animal Health and Welfare Concerns*. *J Agric Environ Ethics* DOI 10.1007/s10806-010-9261-7
- Guerif F, Bidault R, Cadoret V, Couet ML, Lansac J, Royerel D (2002) Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. *Hum Reprod* 17 (5): 1321-1326.
- Horne AW, White JO, Lalani EL-N (2000) The endometrium and embryo implantation: Areceptive endometrium depends on more than hormonal influences. *BMJ* 321(7272): 1301-1302.
- Joshi BV, Banker MR, Parel PM, Shah PB (2010) Transfer of human frozen-thawed embryos with further cleavage during culture increases pregnancy rates. *J Hum Reprod Sci* 3(2): 76-79.
- Kawahara M, Obata Y, Sotomaru Y, Shimozawa N, Bao S, Tsukadaira T, Fukuda A, Kono T (2008) Protocol for the production of viable bimaternal mouse embryos *Nature Protocols* 3: 197-209
- Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M (2004) Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online* 8: 687-694
- Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC & Fauser BC (2006) The science behind 25 years of ovarian stimulation for *in vitro* fertilization. *Endocrine Reviews* 27:170-207.
- Mansour RT, Aboulghar MA (2002) Optimizing the embryo transfer technique. *Hum. Reprod.* 17(5): 1149-1153.
- Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T (2006) Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 21(12): 3036-3043.
- Nagy ZP, Taylor T, Elliott T, Massey JB, Kort HI, Shapiro DB (2005) Removal of lysed blastomeres from frozen-thawed embryos improves implantation and pregnancy rates in frozen embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 84:1606-1612.
- Niemann H and Kues WA (2003) Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Animal Reprod Sci* 79: 291-317.
- Niwa K, Takano R, Obata Y, Hiura H, Komiyama J, Ogawa H, Kono T (2004) Nuclei of Oocytes Derived from Mouse Parthenogenetic Embryos Are Competent to Support Development to Term. *Bio Reprod* 71(5):1560-1567
- Norwitz ER, Schust DJ and Fisher SJ (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400-1408.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M (2010a) "Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 93:598-604
- Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M (2010b) Efficiency of

- hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet* 27(1):13-16
- Said TM, Land JA (2011) Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* doi: 10.1093/humupd/dmr032 First published online: August 25, 2011
- Santos MA, Kujik EW, Macklon NS (2010) The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction* 139:23-34.
- Seidal GE Jr, Carner DL (2002) Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124:733-743.
- Seidel GE Jr (2003) Economic of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59:585-598.
- Singh H, Aplin JD (2009) Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anatomy* 215 (1): 3-13.
- Spikings ED, Alderson J, John JC St (2006) Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer. *Hum Reprod Update* 12 (4): 401-415.
- Stephens PC, Edwards RG (1978) Birth after the preimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4) 663-676.
- Takeuchi T, Ergun B, Huang TH, Rosenwaks Z, Palermo GD (1999) A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. *Hum Reprod* 14 (5): 1312-1317.
- Tang-Pedersen M, Westergaard LG, Erb K, Mikkelsen AL (2012), Combination of IVF and IVM in naturally cycling women. *Reprod Bio Med Online* 24(1): 47-53.
- Tesarik J (2002) Reproductive semi-cloning respecting biparental embryo origin: Embryos from syngamy between a gamete and a haploidized somatic cell. *Hum Reprod* 17(8):1933-1937.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E (2008) Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 14(12):703-710
- Wheeler MB (2007) Agricultural applications for transgenic livestock. *Trends in Biotechnology* 25(5): 204-210.
- Wilmot I, Hooper ML and Simons JP (1991) Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J Reprod Fert* 92:245-279.
- Worilow KC, Eid S, Matthews J, Pelts E, Khoury C, Liebermann J (2010) Multi-site clinical trial evaluating PICSI®, a method for selection of hyaluronan bound sperm (HBS) for use in ICSI: improved clinical outcomes. *Human Reprod* 25(suppl 1): 6-9.
- Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X (1997a) Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Bio Reprod* 56:253-259.
- Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X (1997b) Expression of Mos proto-oncogene protein in bovine oocytes during maturation in vitro. *Biol Reprod* 56:260-265.
- Wu B, Wong D, Lu S, Dickstein S, Silver M, Gelety T (2005) Optimal use of fresh and frozen thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 22: 389-394.
- Wu B, Zan LS (2011) Enhance beef improvement by embryo biotechnologies. *Reprod Domestic Animals* (in press)
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived

from human somatic cells. Science 318:1917-1920.

Zhang J, Wang CW, Krey L, Liu H, Meng L, Adler A and Grifo J (1999) in vitromaturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicletransfer. Fertil Steril 71:726-731. (王素改译)

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

第二部分 最佳卵巢刺激方案

第二章 IVF 周期中卵泡微刺激方案和自然周期方案

Jerome H. Check Cooper Medical School of Rowan University, Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Reproductive Endocrinology & Infertility, Camden, New Jersey USA

1. 引言

体外受精-胚胎移植技术 (In vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 广泛应用于大多数生殖中心, 该技术的目的是在避免发生卵巢过度刺激的同时获得更多的成熟卵母细胞, 以提供更多可移植的优质胚胎。大多数生殖中心用传统的促排卵方案可以获得较好的妊娠率, 但是传统的促排卵方案需要注射高剂量且昂贵的FSH。有时在促排卵过程中, 卵巢过度刺激可能会对患者健康造成危害, 尤其是重度卵巢过度刺激综合征 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)。最近研究的热点是在IVF的控制性超促排卵 (controlled ovarian hyperstimulation, COH) 中, 用最小剂量的FSH达到促排卵的效果。IVF中低剂量刺激也就是所谓的微刺激不同的是: 刺激起始时间从月经第5日取代原来的第3日, FSH起始剂量低于常规剂量的50%, 甚至为常规剂量的1/3~1/4, 这样可以使质量差的一部分卵泡先凋亡; IVF也可以选择自然周期, 包括单纯的自然周期和加用促性腺激素释放激素拮抗剂及微量FSH的周期, 以达到最好的获卵时机。温和刺激也可以利用其他的药物, 使卵巢募集较少的窦卵泡, 如抑制脑垂体雌激素受体产生的枸橼酸克罗米芬和芳香化酶抑制剂来曲唑, 它们可以单独使用也可以随后加用低剂量的FSH来达到促排卵的效果。而高于常规剂量FSH刺激方案多用于卵巢储备功能低下的患者, 以获得更多的卵泡, 这就是所谓的高剂量刺激方案。

长期以来, 大部分生殖中心专家认为在卵巢刺激中获卵越多越好, 本章节将会分别探讨各种促排卵方法的优缺点。根据卵巢储备功能分别分析采用低剂量、常规剂量及高剂量FSH刺激方案的优缺点。

2. 卵巢刺激的基本理论

2.1 卵巢的卵子发生和分泌激素功能

卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 是窦卵泡发育成为优势卵泡的必要因素, 在有正常排卵的女性, 卵泡的颗粒-膜细胞可以上下调节 FSH 受体水平, FSH 与卵泡的颗粒-膜细胞发生复杂的相互作用。FSH 受体的上下调节作用又与促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 的波动密切相关, GnRH 脉冲式的分泌 FSH 和 LH, 导致雌二醇 (E_2) 逐渐增加。反过来, E_2 的增加抑制促性腺激素细胞对 FSH 释放, 使每个周期中被募集的大量窦卵泡中只有一个优势卵泡继续发育。尽管血清中 FSH 从早卵泡期到月经中期不断下降, 卵泡颗粒细胞上的大量 FSH 受体足以能够使其发育成为一个优势的卵泡。理论上来说, 在每个月经周期中, 大量窦卵泡簇中至少有一个优质的窦卵泡发育成为成熟的卵母细胞。而没有足够 FSH 受体的卵泡, 随着血清中 FSH 的不断降低, 逐渐走

向闭锁^[1]。

随着促排卵药物的出现，如克罗米酚或促性腺激素，血清中内源性或外源性的 FSH 可以升高，使卵巢募集到更多的窦卵泡发育成为优势卵泡，而那些 FSH 受体较少的窦卵泡则需要更高剂量的 FSH 来刺激。

在一个卵泡发育成为成熟 MII 卵母细胞之前，大量卵泡产生 E₂，E₂ 水平不断增加可以诱导 LH 峰的生成。IVF 中常规的卵巢刺激方案是从月经周期第 2~3 日开始用 225~300 IU 的 FSH。为了抑制促排卵过程中 LH 过早升高引起卵泡过早黄素化而影响获卵率，在月经的黄体中期加用促性腺激素释放激素激动剂，一直用到下个周期晚卵泡期人绒毛膜促性腺激素扳机时停止；或者是早卵泡期添加促性腺激素释放激素激动剂；或者是从中卵泡期到晚卵泡期添加促性腺激素拮抗剂。

2.2 卵巢储备功能和血清 FSH、LH

卵巢窦卵泡计数是指早卵泡期窦卵泡的数量，这是衡量卵巢储备功能的一个指标。两种主要抑制垂体分泌 FSH 的激素是 E₂ 和抑制素 B。窦卵泡产生少量的 E₂ 和抑制素 B，窦卵泡数目少的女性由于抑制素 B 的分泌减少，月经第 2、3 日的血清 FSH 升高^[1]。

正常卵巢储备功能的女性，月经周期第 3 日的血 FSH>LH 并且 FSH≤11 mIU/mL。对于卵巢有超过正常数量窦卵泡的患者，由于雄烯二酮不断转化为雌激素使总的雌激素水平不断增加。雌激素对垂体正反馈的作用使 LH 分泌增加，而对垂体负反馈作用使 FSH 分泌减少，最终使 LH/FSH 比值不断升高，超过 1.8:1。

在自然周期，内源性 FSH 使窦卵泡开始生长，同时血清中 E₂ 不断增加。血清 FSH 逐渐下降使 FSH 受体最多的卵泡成为优势卵泡，最终单卵排卵。自然周期取卵所面临的挑战是取卵时机的选择，要刚好在 LH 升高到能使卵发育为减数分裂 II 期的时候。

迄今为止，尽管生殖泡或者减数分裂 I 期的卵母细胞可以在试管中培养成为减数分裂 II 期的卵母细胞，并进一步正常授精，胚胎冷冻保存后移植，但是据报道并没有预期的妊娠率和活产率^[2]。

3. FSH 刺激卵泡发育的方式

3.1 卵巢温和刺激方案

在没有外源性激素作用下，卵巢温和刺激方案中 FSH 的剂量从月经第 3~5 日 150 IU 起始，如果添加了 GnRH 拮抗剂或者是血清 E₂ 水平升高不满意，FSH 的剂量可增加至 225 IU。

有证据证明，卵巢窦卵泡中优势卵泡的产生不是一种巧合。这个卵泡是这一批窦卵泡中最好的卵泡，含有最好的卵母细胞。不难理解，最早闭锁的一批卵泡也是质量最差的卵泡。在中卵泡期，卵泡颗粒-膜细胞上含有更多 FSH 受体的质量较好卵泡，如果在这个时候没有一个小剂量外源性 FSH 刺激，随着血清中 E₂ 不断升高和 FSH 的逐渐下降，这一批质量较好并有可能成为优势的卵泡发生闭锁。

在单纯的自然周期，我们所面临的问题是不能预测自发的 LH 峰。因此，我们要承担取卵前卵泡已经提前释放的风险。人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）在自发性 LH 升高前应用，但 hCG 的应用要在不影响卵泡的成熟及卵母细胞质量的基础上。

为了避免 LH 峰提前出现并获得最好的优势卵泡，一些 IVF 中心在优势卵泡发育到接

近 14 mm 的时候，增加 75 IU 的 FSH，加用或者不用 GnRH 拮抗剂。在使用 FSH 的自然周期中，也可以使用 GnRH 拮抗剂方案来防止卵泡的过早黄素化，一种方法是用 3 日 GnRHa，如月经第 2~4 日，GnRHa 的应用可以阻止晚卵泡期的 LH 峰的提前出现^[3-4]。实际上，GnRHa 轻微刺激卵泡发育，卵泡的持续发育需要月经周期第 5 日开始的低剂量 FSH 的作用。另一种方法是用稀释剂量的 GnRHa 和低剂量的 FSH 从早卵泡期开始应用，这就是所谓的微刺激效应^[5]。

温和刺激方案是先用抗雌激素药物来募集少量的窦卵泡，再给予低剂量的 FSH 或者是 FSH/LH 的组合药物。例如：我们从月经周期第 3~7 日或者第 5~9 日用枸橼酸克罗米芬 100 mg/d，最后一日开始加 75~150 IU FSH^[6-8]。其他的抗雌激素药物如他莫西芬和芳香化酶抑制剂来曲唑可以代替克罗米芬用于促排卵^[9-10]。温和刺激也可以从月经周期的第 3~5 日开始直接用 75~150 IU 的 FSH 或者是女性绝经后促性腺激素（human menopausal gonadotropin, HMG），并加用 GnRH 激动剂或者拮抗剂。必须指出在拮抗剂方案中，如西曲瑞克（cetrotorelix）或者加尼瑞克（ganirelix），可以增加 FSH 大约 75 IU 的用量。

3.2 常规的卵巢刺激方案

有几种常规的 COH 方案。生殖中心经常从黄体中期或者是从月经周期第 2 日开始应用 GnRH 激动剂。所谓的点火效应是利用 GnRH 激动剂在晚卵泡期促性腺激素抑制作用发生前的早期激发作用。有些患者也可以在晚卵泡期当卵泡 ≥ 14 mm 时加用 GnRH 拮抗剂。在常规的 COH 中 FSH 起始剂量是 225~300 IU，不常规添加 75~150 IU 的 LH。许多 IVF 中心用 225~300 IU 的 FSH 诱导多个卵泡发育，然后减少 75~150 IU，减量的 FSH 继续刺激已发育的卵泡，使未发育的小卵泡闭锁。当有两个主导卵泡达到 18~20 mm 时，我们用 hCG 来诱发排卵。有时 GnRH 激动剂可以代替 hCG 促进内源性的促性腺激素释放，减少 OHSS 发生的风险^[11]。

3.3 高剂量 FSH 刺激方案

高剂量的 FSH 刺激方案是指 FSH 起始剂量超过 300 IU。在大部分生殖中心，这种方案常用于既往卵巢反应差的患者，目的是增加卵泡的反应。

4. 各种卵巢刺激方案的优势——卵巢储备功能正常

4.1 常规 FSH 的刺激方案和卵巢温和刺激方案相比的优势

常规的 COH 方案目的是为了获得更多卵子和胚胎。理论上这种促排卵方案可以使我们获得更多优质的可移植胚胎，特别是囊胚移植。胚胎越多，患者越有更多的机会在冷冻周期移植。冷冻周期胚胎移植不仅减少了 OHSS 发生的风险，和新鲜周期相比还大大减少了患者的费用，包括促性腺激素、GnRH 激动剂、GnRH 拮抗剂及麻醉剂等相关费用。IVF 最重要的是旨在获得卵母细胞，形成胚胎后在新鲜周期或者冷冻周期进行移植，能够使患者妊娠并且活产^[12]。因此，我们获得的胚胎越多，每个成熟的卵母细胞发育成为一个妊娠胎儿的机会就越大^[12]。

4.2 卵巢温和刺激方案和常规刺激方案相比的优势

卵巢微刺激的一个主要优势是减少了所用药物的费用。由于胚胎实验室工作的减少，IVF-ET 周期的费用也相应下降。我们生殖中心温和刺激促排卵周期可以减少患者约 50% 的费用。同时，FSH 用量的减少也大大降低了 OHSS 的风险。

有趣的是，常规刺激方案的支持者认为，胚胎越多，这些胚胎发育成为正常染色体胚胎的机会就越多；而温和刺激方案的支持者认为在自然周期中减数分裂错误的卵母细胞更容易发生凋亡，不能继续发育为优势卵泡。一项关于温和刺激和常规刺激中相同数量染色体正常的胚胎中非整倍体比例的回顾性研究，即每个周期平均为 1:8^[13]。根据这个研究，温和刺激方案要比常规的高剂量 FSH 方案产生更多的染色体正常的胚胎^[13]。

另外，一些生殖中心通过胚胎植入前遗传学诊断（preimplantation genetic diagnosis, PGD）在胚胎移植前选出染色体正常的胚胎，而完成这一过程需要更多的卵母细胞和胚胎。目前 PGD 技术中荧光原位杂交（fluorescent in situ hybridization, FISH）技术已经被更有竞争力的基因组杂交和芯片技术所取代，后者可以评估所有的染色体。囊胚的滋养外胚层活检和第 3 日的胚胎活检相比可以显著降低对胚胎的损害^[14]。但是，这些程序不仅增加了额外的费用，还需要更高剂量 FSH 的刺激。温和刺激是优质卵母细胞的自然选择过程，可以以最低的价格获得最好的胚胎。

4.3 卵巢刺激方案和胚胎冷冻保存的关系

另外一种避免严重 OHSS 的方法是冷冻所有的胚胎，延迟移植时间。但是这需要该生殖中心有较好的冷冻胚胎移植成功率。温和刺激的优点是如果冷冻程序不是很成熟，他们不必担心新鲜周期胚胎移植的妊娠率。事实上，评估每个移植周期的妊娠率，不应忽视每个获卵周期的妊娠率情况。妊娠率的评估应结合新鲜和冷冻周期移植，如果不考虑新鲜周期还是冷冻周期的话，最低限度也要结合第一周期移植妊娠率^[12]。

温和刺激的一个理论上的优势是自然选择最好的卵泡。在常规的刺激方案中，大量的胚胎外观看起来形态相似，但是可能着床差。染色体异常的卵母细胞更容易发生闭锁。如果有好的胚胎冷冻程序，所有的胚胎最终都会被移植。但是，胚胎冷冻程序做的不好的生殖中心可能错过了在新鲜周期移植最好胚胎的机会，而温和刺激增加了最好胚胎在新鲜周期胚胎移植的机会。

5. 控制性卵巢刺激—排卵后对子宫内膜的影响

不育患者把自己的一半的卵捐献给受卵者，由于 COH 的不利影响，受卵者比捐卵者有更高的妊娠率^[15]。但是，妊娠率的不同可能和捐卵者由于输卵管积水而做过输卵管切除术相关^[16-18]。选择输卵管积水切除输卵管者作为受卵者，数据表明常规的 COH 对女性胚胎移植后的妊娠率有一定的影响^[19]。

有时候例子可以更好的理解一个概念，不像病例对照研究那么抽象。一个多囊卵巢综合症的闭经患者每个周期用克罗米芬或促性腺激素促排卵及黄体支持，连续 6 年。其它所有的不孕因素都已经排除，但一直没有受孕。她在 3 个最好的 IVF 中心有 10 个 IVF-ET 周期，获得共 92 个胚胎，均在新鲜周期移植都没有怀孕。但是在第 11 个 IVF 周期，所有的胚胎都特意冷冻保存。最终她在第一个冷冻移植周期怀孕并生育了一个健康的孩子^[20]。从那以后，这个妇女开始恢复了自然排卵，并且通过性交自然受孕，加用黄体支持，最终又生育了一个健康宝宝^[21]。

Kerin 等^[22]人认为在 IVF-ET 周期中，排卵期前卵泡自发排卵后不会引起黄体功能缺陷。然而，早在 1980 年，Edwards, Steptoe 和 Purdy^[23]发表文献，所有促排卵刺激周期的黄体功能都会有异常。Edwards 等^[23]公布了他们的研究数据，认为 GnRH 激动剂和拮抗剂

不应成为促排卵的常规用药。因此，黄体功能不足与促排卵药物应用有关。黄体功能不足与 GnRH 激动剂对垂体抑制作用的延迟恢复有关，在 GnRH 拮抗剂周期垂体功能能够迅速恢复，但是仍然存在黄体功能不足，我们需要应用黄体酮或者是 hCG 来提高妊娠率^[24]。

近来被广泛认可的理论依据是：COH 和 IVF-ET 周期的黄体功能不足和早黄体期多个黄体分泌的超生理剂量的激素有关，它们通过负反馈直接抑制了垂体和下丘脑的 LH 的释放。

Bourgain 和 Devroey^[25]总结了 FSH 在促排卵后对子宫内膜的不利影响。相对于自然周期，在 FSH 刺激周期中：① 在 IVF 周期中，排卵后和早黄体期的腺体分泌使黄体中期的内膜在腺体和基质发育不同步；② 子宫内膜的激素受体调节的改变；③ 促排卵对子宫内膜的增生的抵抗作用；④ 种植窗口期子宫内膜标记物的过早表达，包括胞饮突、整合蛋白、白血病抑制因子^[25]。一些研究表明，一种称为孕酮诱导阻断因子（Progesterone-induced blocking factor, PIBF）的免疫调节蛋白在 COH 后早于早黄体期可以被检测到。PIBF 在母胎界面的 γ/δ T 细胞表达，同时抑制了自身的自然杀伤细胞活性的表达。在一定环境下，不成熟的滋养细胞的侵入使 PIBF 表达，机体发生同种异体反应， γ/δ T 细胞表达诱导孕激素受体产生，最终导致胚胎着床失败^[26]。这些数据表明，不成熟的滋养细胞浸润可能是移植后着床失败的原因^[26]。显然，超过 3 日的围排卵期会导致较差的妊娠率（可能到 0）^[25]。

可疑的是，前边提到的患者经历 6 年诱导排卵，10 个 IVF-ET 周期获得 92 个可移植胚胎，最终冷冻移植周期妊娠和一次自然周期妊娠，可以用排卵窗口期提前和过早的滋养细胞侵入来解释^[20-21]。然而，有证据表明，黄体功能不足可以在黄体期补充黄体酮或 hCG，以提高 IVF 每个移植周期的妊娠率^[23-27]，但是也有人认为黄体支持不能增加分娩率^[34]。

6. 作者关于常规 FSH 刺激和温和量 FSH 刺激的经验

良好的治疗建议是建立在大量前瞻性随机对照研究（randomized controlled trial, RCT）的基础上的，但是现在很少有人去做这样的研究了。前瞻性队列研究的 Meta 分析可以给出这样的建议，但是经常存有期刊审稿人和作者的偏见。如果没有明显的偏差和变量的混淆，对比两种治疗方法的回顾性研究可以得出重要的临床结论。由于没有制药公司会赞助这样一个研究，常规 FSH 刺激和微量 FSH 刺激对比的大量前瞻性 RCT 研究成为不可能。

如果要对比常规 COH 和温和刺激 COH 方案促排卵效果的不同，必须要考虑到每次促排卵后的妊娠率。因此，大样本的回顾性研究的数据要来自于一个冷冻胚胎移植妊娠率高的 IVF 中心。我们生殖中心改进了缓慢冷却的胚胎冷冻保存技术，新鲜周期和冷冻解冻胚胎移植周期的妊娠率没有差别^[35-37]。我们中心的数据可以用来评价每一个新鲜周期或者是冷冻移植周期（由于过度刺激的风险所有的胚胎需要冷冻保存）的妊娠率。同样，我们在评估每次促排卵后妊娠率的同时，也有必要考虑到 COH IVF-ET 周期中所有冷冻胚胎的移植率^[12]。

我们的数据来自于超过 10 年大样本回归性研究，对卵巢储备功能正常的患者进行常规刺激和温和刺激的比较（数据在 2011 年日本东京举行的 IVF 世界年会上进行交流）。这些数据是建立在患者所花费用减少 50%及 FSH 药物的费用减少 50%的基础上的。两种方案的结果没有明显区别（表 1 和表 2）。如果不考虑新鲜或者冷冻胚胎移植，第一次胚胎移植妊娠

率较高的是温和刺激。

当然，在年轻组每个获卵周期的妊娠率差异都没有显著的统计学意义（表 3），常规促排卵组相对有较高的妊娠率。36~39 岁的患者用常规卵巢刺激方案比温和刺激方案有一个较高的妊娠率（32.5% vs. 26.7%, $P < 0.05$ ）。

表 1. 新鲜周期胚胎移植的妊娠率

	高剂量刺激周期			低剂量刺激周期		
	总数	≤35	36~39	总数	≤35	36~39
取卵年龄						
取卵例数	859	536	323	396	265	131
移植例数	678	418	260	288	194	94
临床妊娠例数/移植例数 (%)	44.5	50.2	35.4	43.8	51.0	28.7
继续妊娠例数/移植例数 (%)	39.8	46.4	29.2	41.3	47.9	27.7
活产例数/移植例数 (%)	36.1	41.9	26.9	38.5	44.8	25.5
着床率 (%)	27.0	32.1	19.7	30.0	34.6	20.1

表 2. 第一次新鲜周期或冷冻周期胚胎移植的妊娠率

	高剂量刺激周期			低剂量刺激周期		
	总数	≤35	36~39	总数	≤35	36~39
取卵年龄						
取卵例数	790	498	292	342	238	104
临床妊娠例数/移植例数 (%)	43.5	49.2	33.9	44.4	49.6	32.7
继续妊娠例数/移植例数 (%)	39.4	45.8	35.4	41.8	46.6	30.8
活产例数/移植例数 (%)	35.7	41.2	26.4	39.2	43.7	28.8
着床率 (%)	26.0	31.0	18.6	29.8	33.0	22.2

表 3. 每个获卵周期的妊娠率

	高剂量刺激周期			低剂量刺激周期		
	总数	≤35	36~39	总数	≤35	36~39
取卵年龄						
临床妊娠例数/移植例数 (%)	55.9	64.4	41.8	48.2	57.0	30.5
继续妊娠例数/移植例数 (%)	49.2	58.0	34.7	44.4	52.5	28.2
活产例数/移植例数 (%)	45.3	53.0	32.5	41.9	49.4	26.7

7. 卵巢储备功能降低和不孕症

众所周知，随着年龄的增长，卵巢早卵泡期的窦卵泡会越来越来少^[38]。随着窦卵泡数量的减少，抑制素 B 分泌减少，提前发育的卵泡分泌的 E₂ 水平升高，最终导致月经第 3 日 FSH 升高。随着生育年龄的增大，女性卵巢的卵泡更容易发生错误的减数分裂，导致胚胎非整倍体率增高。年龄大于 45 岁的患者，虽然 FSH 在正常范围，但是妊娠率很低^[39]。

从含有最好线粒体的卵母细胞发育成为次级卵母细胞到次级卵母细胞发育成为一个窦卵泡，整个过程是个自然选择的过程，这可以用来解释低妊娠率和高流产率现象。年龄大的患者在自然选择的过程中，可选择的卵泡会越来越来少。线粒体质量下降导致减数分裂错

误的风险增加，最终导致低妊娠率和高流产率。

另外一个对立的假设是除了年龄导致线粒体老化和减数分裂异常外，卵泡的选择仅是依位置而定的。二十世纪八十年代的研究发现，卵巢储备功能下降的年轻患者，尤其是月经第 3 日 FSH 水平升高者，妊娠率很低^[40-43]。很多大的 IVF 中心认为，年轻的患者伴有 FSH 升高超过 15 mIU/mL 者，尽管移植了几个外观形态正常的胚胎，但是活产率仍然很低（甚至是 0）^[44-45]。综上所述，很多生殖内分泌学家（不是指作者本身）认为，随着患者年龄的增长，妊娠率降低和卵母细胞的质量下降有关。

8. 作者关于卵巢储备功能下降的经验

如果患者有残存的卵母细胞，但是卵巢储备功能显著下降，FSH 水平达绝经后水平，妊娠率几乎为 0，很难解释高促性腺激素和低雌激素性闭经的患者在不借助任何辅助生殖技术的情况下，其中在 11.7% 的排卵者中 1 年内最少能达到 28% 的妊娠率（19/68）^[47]。一部分患者我们可以用雌激素和促性腺激素来降调节 FSH 受体，随后再用低剂量的促性腺激素治疗^[47]。年龄 ≤ 39 岁的雌激素升高的患者，血清 FSH 平均值为 18.9 mIU/mL，在没有接受辅助生殖技术的情况下，临床妊娠率和妊娠超过 6 个月所占比例分别为 46.1% 及 34.6%^[48]。不仅 FSH > 100 pg/mL 有月经的患者在没有任何辅助生殖技术的帮助下都能自然妊娠^[49]，而且有明显更年期症状的且 FSH 水平达到 164 mIU/mL 的患者^[50]，甚至是更年期妇女出现明显的卵巢萎缩者都可以自然妊娠^[51-52]。有一个 40 岁女性，伴有更年期、闭经、雌激素缺乏症状很多年，FSH 达到 124 mIU/mL（甚至有时达到 180 mIU/mL），曾经做了 4 次供卵的新鲜周期胚胎移植均未受孕，但是通过降低升高的 FSH 和提高卵巢对促性腺激素的敏感性，而成功受孕^[53]。在 2011 年美国生殖医学年会上，我提供了一组关于年龄 ≤ 37 岁且月经周期第 3 日 FSH > 15 mIU/mL 的患者用自然周期或者是温和刺激周期加用黄体支持方案的相关数据。临床妊娠率和活产率分别是 41.6% ($n=24$) 及 33.3%，以 FSH 正常为对照组（月经周期第 3 日 FSH ≤ 8 mIU/mL），对照组的妊娠率和活产率分别为 70.8% 和 62.5%。

据报道，有研究者对伴有输卵管问题的围绝经期患者，在降低 FSH 水平和恢复少量剩余卵泡的敏感性的基础上，诱导排卵达到成功受孕^[54-55]。一名有月经且第 3 日 FSH 升高的患者，在 8 年时间里做了 4 个周期的 IVF-ET-ICSI，共生育了 3 个孩子^[56]。Roberts 等^[45]的研究认为，患者 FSH 超过 15 mIU/mL 均不能活产，即使有足够的卵巢刺激和形态正常的胚胎。他们认为，高 FSH 使好的卵母细胞的大量减少及剩余卵母细胞质量下降相当于大于 45 岁妇女的卵母细胞^[45]。由此可见，尽管有卵母细胞的严重消耗，此类患者有活产的孩子证实了这个结论是不正确的^[45-47]。

近来，有一个对 IVF 人群中卵巢储备功能下降且血清 FSH > 15 mIU/mL 的患者进行研究，该研究是通过第 3 日胚胎的卵裂数及碎片指数来评估妊娠率和着床率^[57]。这个研究只是针对单一胚胎移植的患者，如果超过 6 个分裂球（占到移植的 65%）每个移植周期有 40% 的临床妊娠率及 31.7% 的活产率，而移植 4 或 5 细胞胚胎时仅有 3.8% 和 9.5% 的妊娠率^[57]。

大部分 IVF 中心正常卵巢储备功能的患者的控制性超促排卵是从月经周期第 2 日或第 3 日以最少 FSH 225 mIU/mL、大部分 300 mIU/mL 起始。当对于卵巢储备功能下降的妇女，大部分生殖中心会增加 FSH 的起始剂量，以获得更多的卵泡。但是这部分人群对高剂

量的促性腺激素反应往往由于没有反应而周期被取消。但是，大部分的相关报道是选择有较多的卵子储备、药物反应好的人群，他们用常规或高剂量的 FSH 刺激方案，获卵数一般最少 5 个，但妊娠率差^[40-45]。

9. 关于以上研究结果和作者的经验相矛盾的解释

有明显更年期症状的患者要恢复排卵必须有窦卵泡，但是卵巢中的窦卵泡对内源性或者是外源性的促性腺激素存在抵抗，血清 FSH 的升高使 FSH 受体的调节作用下降^[58]。外源性的雌激素可以降低血清中的 FSH，下调 FSH 受体，然后患者在内源性或者外源性促性腺激素的作用下促进优势卵泡进一步发育^[59]。也有人认为，单纯雌激素就可以改善卵泡对 FSH 的敏感性，而不用再下调 FSH 水平。但是，相反的是，高促性腺激素闭经的患者可以通过用 GnRH 激动剂或者拮抗剂来达到降低血清 FSH 水平，最后成功诱导排卵^[47,59-60]。

在细胞水平，经常会出现过量的激素刺激的反向调节，这样就可以解释为什么高剂量的 FSH 刺激会有很少的卵泡发育，而微量的 FSH 刺激反而卵巢反应很好。一个很好的例子是一例医源性更年期患者经用克罗米芬来提高内源性的 FSH，停克罗米芬后，她能有 3 个优势卵泡发育，且 $E_2 > 800 \text{ pg/mL}$ ^[61]。可能的解释是，温和刺激和常规剂量及高剂量外源性 FSH 刺激方法相比，能够促进更多的优势卵泡发育。另外在 IVF 人群中的差异没有统计学意义。

高剂量的 FSH 刺激的不良妊娠结局的原因还不确切，高剂量 FSH 刺激可能影响的是胚胎的质量而不是子宫内膜（作者的个人经验），卵巢储备功能下降患者选择冷冻周期移植并不能改变妊娠结局。可能的原因是在早卵泡期高 FSH 增加减数分裂的错误和非整倍体胚胎，高 FSH 受体的降调节更多的是影响胚胎本身。

10. 作者关于卵巢储备功能低下的温和刺激方案

对卵巢储备功能下降的患者，温和 FSH 刺激方案是利用患者自身升高的 FSH，而不再另外添加外源性的 FSH。对接近更年期的妇女，通过降低血清 FSH 水平来恢复卵巢颗粒-膜细胞的 FSH 受体^[62-63]。作者的经验是用价格便宜的炔雌醇来降低 FSH 水平，可以提高子宫内膜的厚度和宫颈黏液，若卵母细胞在取卵前排掉，正常的性生活有机会怀孕。和其他的雌激素相比，如 17β 雌二醇、炔雌醇可以在所募集的及成熟的卵泡中测到^[64]。炔雌醇还可以使卵泡期延长，使子宫内膜在雌激素的刺激下生长及诱导孕激素受体的产生^[65-66]。

如果围绝经期患者 FSH 升高，有一个提前发育的卵泡，同时雌激素升高，最好的方法是在不加用外源性 FSH 的前提下，使卵泡自然发育^[55]。如果 FSH 只是轻微的升高，卵泡的发育不够快，这时可以给予低剂量的 FSH（75~150 IU）。同样，如果仅有 1~2 个窦卵泡，且 FSH 降至正常范围，这时可以用低剂量的促性腺激素（FSH 或者 FSH/LH 混合物）。

前面提到的高 FSH 的人群研究，92 个起始刺激周期均是自然周期，然后单胚胎移植^[57]，其中 60 个周期成功获卵。数据的分析是依据起始的周期，不包括周期取消的病例，周期取消可能和药物价格便宜，没有发育成熟的卵母细胞，或者在取卵前排掉，周期取消率在常规刺激或高 FSH 刺激没有太大差别。60 个卵母细胞中仅有 19 个（33%）发育成为可移植胚胎，有 21% 的临床妊娠率和 16% 的活产率。

另外一组选择增加一定剂量的促性腺激素有较好的妊娠结局，70%（80/116）发育成为成

熟的卵母细胞，75%的移植率。临床妊娠率和活产率分别是 29%和 24%^[57]。卵巢储备功能下降的女性，FSH>12 mIU/mL 及高雌激素水平，常用的是自然周期，内源性的雌激素水平不断升高可以降低早卵泡期 FSH 的水平，再加用 75~250 IU 的 FSH, 这组患者一般会有超过一个的胚胎可移植。

如果月经周期第 3 日的 FSH 轻度升高，正常的温和刺激方案是从月经第 5 日起始用 75~150 IU FSH 和后期加用 GnRH 拮抗剂。卵巢储备功能下降不太明显的患者对药物的反应要好些，大部分进入周期的患者可以取卵、移植。我们的数据给出了和年龄相关的流产率，而不是 FSH 水平（2011 年发表在 Pacific Coast Reproductive Society）。我们对比了年龄和 FSH 的升高对妊娠率的影响，表 4 是年龄≤39 岁的年轻女性，表 5 是年龄在 40~45 岁。直到 43 岁以后，当用温和刺激促排卵，FSH 水平才会影响到活产率。这个数据在所有 IVF 的患者中通过评估流产患者的非整倍体性获得的。正常 FSH 病例组是在其它生殖中心多次 IVF 均未受孕再来我中心的，而高 FSH 病例组由于月经第 3 日高 FSH，既往均未在其它中心做过 IVF，因此数据可能存在一定偏差。

表 4. 年轻组妇女年龄及 FSH 水平与妊娠率的关系

年龄	≤35				36~39			
	≤11	12~14	15~17	>17	≤11	12~14	15~17	>17
基础 FSH 水平 (mIU/mL)	≤11	12~14	15~17	>17	≤11	12~14	15~17	>17
移植例数	2,120	111	37	88	1,313	120	47	93
活产例数/移植例数 (%)	45.2	42.3	48.6	45.5	33.4	35.0	29.8	36.6
流产例数/移植例数 (%)	11.9	13.9	13.3	12.8	17.2	11.4	7.1	22.9

表 5. 高龄组妇女年龄及 FSH 水平与妊娠率的关系

年龄	40~42				43~44			
	≤11	12~14	15~17	>17	≤11	12~14	15~17	>17
基础 FSH 水平 (mIU/mL)	≤11	12~14	15~17	>17	≤11	12~14	15~17	>17
移植例数	737	103	30	65	121	30	18	25
活产例数/移植例数 (%)	23.1	20.4	30.0	27.7	24.0	10.0	0.0	8.0
流产例数/移植例数 (%)	27.3	32.3	36.4	30.4	34.4	75.0	100.0	75.0

11. 卵巢储备功能下降的患者温和刺激方案的其它研究

并不是所有的研究都认为温和刺激方案是对反应差的病人增加妊娠律的关键因素。

Kolibianakis 等^[44]在 78 个改进的自然周期中, 先是以 100 IU 的 FSH 起始, 当卵泡 ≥ 16 mm 后加用加尼瑞克, 并没有激素水平的测定, 没有一例活产。以上结果可能和 hCG 应用太早, 卵泡没有完全成熟有关。Kim 等^[67]发现低剂量 FSH 刺激周期活产率为 13.5%, 而高剂量 FSH 刺激周期活产率为 16.7%。这个研究并不支持高剂量的 FSH 刺激方法妊娠结局较差的观点。但是, 需要指出的是每日 225 IU 的 FSH 是一个低剂量, 而大部分生殖中心对卵巢储备功能下降的女性经常用更高剂量的 FSH。

另一个回顾性研究, 针对关于自然周期和常规及高剂量的 FSH 周期的妊娠率比较, 所选都是卵巢反应差的患者, 最终都只有一个胚胎可移植。作者报道在自然周期有 20% (6/30) 的妊娠率, 在高剂量 FSH 周期是 8.3% (23/274) 的妊娠率。尽管以上研究用了低剂量的 FSH 刺激方案, 但是他们并没有遵守作者特定的原则。刺激程序上的不同可以解释在其它研究中的低妊娠率^[69]。

12. 结论

在 IVF-ET 中正常卵巢储备功能的患者, 温和刺激和常规 FSH 刺激方案中活产率没有差别。但是考虑到 OHSS 的风险和所花费用, 卵巢储备功能正常的患者可选择温和刺激的方法。如果女性生育年龄 >35 岁, 最好是选择常规 FSH 剂量的刺激方法。如果应用低温保存技术, 把多余的胚胎进行冷冻保存, 给不孕患者增加了一个新的希望。

对于卵巢储备功能下降的患者, 大量的数据支持了低剂量 FSH 刺激方案的应用。许多大的 IVF 中心认为, 卵巢储备功能下降的女性的妊娠率降低并不是和卵子的质量有关, 而是常规或者是高剂量 FSH 应用的直接影响。我们对这样的患者, 重要的不是进一步增加 FSH 水平, 而是利用内源性或者外源性的雌激素来降低 FSH 到正常水平, 然后再用 FSH 刺激。

13. 参考文献

- [1] *Check JH: Understanding the physiology of folliculogenesis serves as the foundation for perfecting diagnosis and treatment of ovulatory defects. Clin Exp Obst Gyn, in press.*
- [2] *Check ML, Brittingham D, Check JH, Choe JK: Pregnancy following transfer of cryopreserved-thawed embryos that had been a result of fertilization of all vitro matured metaphase, or germinal stage oocytes: Case report. Clin Exp Obst Gyn 28:69-70, 2001.*
- [3] *Howles CM, Macnamee MC, Edwards RG: Short term use of an LHRH agonist to treat poor responders entering an in vitro fertilization programme. Hum Reprod 1987; 2:655-656.*
- [4] *Check JH, Nowroozi K, Chase JS: Comparison of short versus long-term leuprolide acetate-human menopausal gonadotropin hyperstimulation in in vitro fertilization patients. Hum Reprod 7:31-34, 1992.*
- [5] *Sharara FI, McClamrock HD: Use of Microdose GnRH agonist protocol in women with low ovarian volumes undergoing IVF. Hum Reprod 2001; 16:500-503.*
- [6] *Shanis B, Check JH, O'Shaughnessy A, Summers D: Improved pregnancy rates (PRs) in older patients or those with elevated baseline FSH levels with short flare or clomiphene-hMG hyperstimulation protocols. In: IX World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted*

- Reproduction*, International Proceedings Division. eds: Aburumieh A, Bernat E, Dohr G, Feichtinger W, Fischl, Huber J, Muller E, Szalay S, Urdl W, Zech H. Monduzzi Editore. pgs. 279-283, 1995.
- [7] Check JH, Davies E, Adelson H: A randomized prospective study comparing pregnancy rates following clomiphene citrate and human menopausal gonadotropins therapy. *Hum Reprod* 1992 ; 7:801-805.
- [8] Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J: Pregnancies in human by fertilization in vitro and embryo transfer in controlled ovulatory cycle. *Science* 1981 ; 212:681-682.
- [9] Garcia-Velasco JA, Moreno L, Pacheco A, Guillen A, Duque L, Requena A, Pellicer A: The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril* 2005 ; 84:82-87.
- [10] Mitwally MF, Caster RF: Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2001 ; 75:305-309.
- [11] Check JH, Nazari A, Barnea ER, Weiss W, Vetter BH: The efficacy of short-term gonadotrophin-releasing hormone agonists versus human chorionic gonadotrophin to enable oocyte release in gonadotrophin stimulated cycles. *Hum Reprod* 8:568-571, 1993.
- [12] Katsoff B, Check JH, Choe JK, Wilson C: Editorial article: A novel method to evaluate pregnancy rates following in vitro fertilization to enable a better understanding of the true efficacy of the procedure. *Clin Exp Obst Gyn* 2005 ; 32:213-216.
- [13] Baart EB, Martini E, Elkemans MJ, Van Opstal D, Beckers N, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser B: Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human pre-implantation embryos: a controlled trial. *Hum Reprod* 2007 ; 22:980-988.
- [14] Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT Jr: Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and singlenucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril* 2011 ; 96:638-640.
- [15] Check JH, Choe JK, Katsoff D, Summers-Chase D, Wilson C: Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization- embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*, 16:416-420, 1999.
- [16] Strandell A, Waldenstrom U, Nilsson L, Hamberger L: Hydrosalpinx reduces in vitro fertilization/embryo transfer pregnancy rate. *Hum Reprod* 1994 ; 9:861-863.
- [17] Shelton KE, Butler L, Toner JP: Salpingectomy improves the pregnancy rate in in vitro fertilization patients with hydrosalpinx. *Hum Reprod* 1996 ; 11:523-525.
- [18] Choe J, Check JH: Salpingectomy for unilateral hydrosalpinx may improve in vivo fecundity. *Gynecol Obstet Invest* 48:285-287, 1999.
- [19] Check JH, Choe JK, Nazari A, Fox F, Swenson K: Fresh embryo transfer is more effective than frozen ET for donor oocyte recipients but not for donors. *Hum Reprod*, 16:1403-1408, 2001.
- [20] Check JH, Choe JK, Nazari A, Summers-Chase D: Ovarian hyperstimulation can

- reduce uterine receptivity. A case report. *Clin Exp Obst Gyn* 27(2):89-91 , 2000.
- [21] Check JH , Check ML: A case report demonstrating that follicle maturing drugs may create an adverse uterine environment even when not used for controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Exp Obst Gyn* 28:217-218 , 2001.
- [22] Kerin JF , Broom TJ , Ralph MM , et al: Human luteal phase function following oocyte cycles. *Br J Obstet Gynecol* 1981 ; 88:1021-8.
- [23] Edwards RG , Steptoe PC , Purdy JM: Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynecol* 1980 ; 87:737-756.
- [24] Albano C , Grimbizis G , Smitz J , Riethmuller-Winzen H , Reissmann T , Van Steirteghem A , Devroey P: The luteal phase of nonsupplemented cycles after ovarian superovulation with human menopausal gonadotropin and the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Fertil Steril* 1998 ; 70:357-9.
- [25] Bourgain C , Devroey P: the endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update* 2003 ; 9:515-522.
- [26] Check JH , Check ML: Evidence that failure to conceive despite apparent correction of ovulatory defects by follicle-maturing drugs may be related to premature trophoblast invasion. *Med Hypoth* 2002 Oct ; 59(4):385-8.
- [27] Check JH: Luteal phase support in assisted reproductive technology treatment: focus on Endometrin® (progesterone) vaginal insert. *Ther Clinic Risk Manag* 2009 ; 5:403-7.
- [28] Doody KJ , Schnell VL , Foulk RA , et al. Endometrin for luteal phase support in a randomized , controlled , open-label , prospective in-vitro fertilization trial using a combination of Menopur and Bravelle for controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* , 2009 ; 91:1012-7.
- [29] Fatemi HM , Popovic-Todorovic B , Papanikolaou E , et al: An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Update* 2007 ; 13:581-90.
- [30] Chakravarty BN , Shirazee HH , Dam P , Goswami SK , Chatterjee R , Ghosh S: Oral dydrogesterone versus intravaginal micronised progesterone as luteal phase support in assisted reproductive technology (ART) cycles: results of a randomized study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 ; 97:416-20.
- [31] Nosarka S , Kruger T , Siebert I , et al: Luteal phase support in in vitro fertilization: meta-analysis of randomized trials. *Gynecol Obstet Invest* 2005 ; 60:67-74.
- [32] Araujo E Jr , Bernardini L , Frederick JL , et al: Prospective randomized comparison of human chorionic gonadotropins versus intramuscular progesterone for luteal phase support in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 1994 ; 11:74-8.
- [33] Ludwig M , Finas A , Katalinic A , et al: Prospective , randomized study to evaluate the success rates using HCG , vaginal progesterone or a combination of both for luteal phase support. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001 ; 80:574-582.
- [34] Nyboe AA , Popovic-Todorovic B , Schmidt KT , Loft A , Lindhard A , Hojgaard A , Ziebe S , Hald F , Hauge B , Toft B: Progesterone supplementation during early gestations after IVF

- or ICSI has no effect on the delivery rates: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2002 ; 17:357-61.
- [35] Baker AF , Check JH , Hourani CL: Survival and pregnancy rates of pronuclear stage human embryos cryopreserved and thawed using a single step addition and removal of cryoprotectants. *Hum Reprod Update* May 1996 ; 2:271 (CD-ROM) , Item 12.
- [36] Check JH , Summers-Chase D , Swenson K , Choe JK , Yuan W , Lurie D: Transfer success of frozen-thawed embryos at different cell stages at cryopreservation. *Reprod Technol* 10:201-205 , 2000.
- [37] Check JH , Katsoff B , Choe JK: Embryos from women who hyperrespond to controlled ovarian hyperstimulation do not have lower implantation potential as determined by results of frozen embryo transfer. In: *International Proceedings of the 13th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction and Genetics* , Monduzzi Editore , Pgs. 109-113 , 2005.
- [38] Goldenberg RL , Grodin J , Rodbard D , Ross GT: Gonadotropins in women with amenorrhea: the use of follicle stimulating hormone to differentiate women with and without ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 1973;11:1003.
- [39] Manken J , Trussel J , Larsen U: Age and infertility. *Science* 1986 ; 233:1389.
- [40] Muasher SJ , Eohninger S , Simonetti S , Matta J , Ellis LM , Liu H-C , et al: The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1988 ; 50:298.
- [41] Fenichel P , Grimaldi M , Olivero J-F , Donzeau M , Gillet J-Y , Harter M: Predictive value of hormonal profiles before stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989 ; 51:845.
- [42] Scott RT , Toner JP , Muasher SJ , Oehninger S , Robinson S , Rosenwaks Z: Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989 ; 51:651.
- [43] Tanbo T , Dale PO , Abyholm T , Stokke KT: Follicle-stimulating hormone as a prognostic indicator in clomiphene citrate/human menopausal gonadotropin- stimulated cycles for in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989 ; 4:647.
- [44] Kolibianakis E , Zikopoulos K , Camus M , Tounaye H , Van Steirteghem A , Devroey P: Modified natural cycles for IVF does not offer a realistic chance of parenthood in poor responders with high day 3 FSH levels as a last resort prior to oocyte donation. *Hum Reprod* 2004 ; 19:2545.
- [45] Roberts JE , Spandorfer S , Fasouliotis SJ , Kashyap S , Rosenwaks Z: Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005 ; 83:37.
- [46] Nassari A , Mukherjee T , Grifo JA , Noyes N , Krey L , Copperman AB: Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertil Steril* 1999 ; 71:715.
- [47] Check JH , Nowroozi K , Chase JS , Nazari A , Shapse D , Vaze M: Ovulation induction and pregnancies in 100 consecutive women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 53(5):811-

816 , 1990.

- [48] Check JH , Peymer M , Lurie D: *Effect of age on pregnancy outcome without assisted reproductive technology in women with elevated early follicular phase serum follicle-stimulating hormone levels.* *Gynecol Obstet Invest* 45:217-220 , 1998.
- [49] Check JH , Check ML , Katsoff D: *Three pregnancies despite elevated serum FSH and advanced age: Case report.* *Hum Reprod* 15(8):1709-1712 , 2000.
- [50] Check ML , Check JH , Kaplan H: *Pregnancy despite imminent ovarian failure and extremely high endogenous gonadotropins and therapeutic strategies: Case report and review.* *Clin Exp Obst Gyn* 2004 ; 31:299-301.
- [51] Check JH , Chase JS , Wu CH , Adelson HG: *Ovulation induction and pregnancy with an estrogen-gonadotropin stimulation technique in a menopausal woman with marked hypoplastic ovaries.* *Am J Obstet Gynecol* 1989 ; 160:405-406.
- [52] Shanis BS , Check JH: *Spontaneous ovulation and successful pregnancy despite bilateral streaked ovaries.* *Infertility* 15:70-77 , 1992.
- [53] Check JH , Katsoff B: *Successful pregnancy with spontaneous ovulation in a woman with apparent premature ovarian failure who failed to conceive despite four transfers of embryos derived from donated oocytes.* *Clin Exp Obst Gyn* 2006 ; 33:13-15.
- [54] Check JH , Summers D , Nazari A , Choe J: *Successful pregnancy following in vitro fertilization-embryo transfer despite imminent ovarian failure.* *Clin Exp Obst Gyn* , 27(2):97-99 , 2000.
- [55] Check ML , Check JH , Choe JK , Berger GS: *Successful pregnancy in a 42-year-old woman with imminent ovarian failure following ovulation induction with ethinyl estradiol without gonadotropins and in vitro fertilization.* *Clin Exp Obst Gyn* 2002 ; 29:11-14.
- [56] Check JH , Katsoff B: *Three successful pregnancies with in vitro fertilization embryo transfer over an eight year time span despite elevated basal serum follicle stimulating hormone levels - Case report.* *Clin Exp Obst Gyn* 2005 ; 32:217-221.
- [57] Check JH , Summers-Chase D , Yuan W , Horwath D , Wilson C: *Effect of embryo quality on pregnancy outcome following single embryo transfer in women with a diminished egg reserve.* *Fertil Steril* 2007 Apr ; 87(4): 749-56.
- [58] Check JH: *Pharmacological options in resistant ovary syndrome and premature ovarian failure.* *Clin Exp Obst Gyn* 2006 ; 33:71-77.
- [59] Check JH: *The concept and treatment methodology for inducing ovulation in women in apparent premature menopause.* *Clin Exp Obst Gyn* 2009 ; 36:70-73.
- [60] Check JH , Katsoff B: *Ovulation induction and pregnancy in a woman with premature menopause following gonadotropin suppression with the gonadotropin releasing hormone antagonist , cetrorelix - a case report.* *Clin Exp Obstet Gynecol* 2008 ; 35(1):10-12.
- [61] Check JH: *Multiple follicles in an unstimulated cycle despite elevated gonadotropins in a perimenopausal female.* *Gynecol Obstet Invest* , 33:190-192 , 1992.

- [62] Check JH , Chase J: *Ovulation induction in hypergonadotropic amenorrhea with estrogen and human menopausal gonadotropin therapy. Fertil Steril 42: 919-922 , 1984.*
- [63] Check JH , Wu CH , Check M: *The effect of leuprolide acetate in aiding induction of ovulation in hypergonadotropic hypogonadism: A case report. Fertil Steril 49(3):542-543 , 1988.*
- [64] Check JH: *The multiple uses of ethinyl estradiol for treating infertility. Clin Exp Obst Gyn 2010 ; 37:249-251.*
- [65] Katsoff B , Check MD: *Successful pregnancy in a 45-year-old woman with elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and a short follicular phase. Clin Exp Obstet Gynecol 2005 ; 32:97-98.*
- [66] Check JH , Adelson H , Lurie D , Jamison T: *The effect of the short follicular phase on subsequent conception. Gynecologic and Obstetric Investigation. 34:180-183 , 1992.*
- [67] Kim C-H , Kim SR , Cheon YP , Kim SH , Cahe AD , Kang BM: *Minimal stimulation using gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonist and recombinant human follicle stimulating hormone vs. GnRH antagonist multi-dose protocol in low responders undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2009 ; 92:2082-2084.*
- [68] Ata B , Yakin K , Balaban B , Urman B: *Embryo implantation rates in natural and stimulated assisted reproduction treatment cycles in poor responders. Reprod Biomed Med Online 2008 ; 77:207-212.*
- [69] Verberg MFG , Macklon NS , Nargund G , Frydman R , Devroey P , Broekmans FJ , Fauser BCJM: *Mild ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod Update 2009; 15:13- 29*

(赵敏英译)

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

第三章 获卵数影响第3日和第5日胚胎移植的妊娠率吗?

*Veljko Vlaisavljević, Jure Knez and Borut Kovačič Department of Reproductive
Medicine, University Medical Centre Maribor Slovenija*

1. 引言

卵巢刺激方法的选择是辅助生殖技术 (medically assisted reproduction, MAR) 中一个重要的组成部分。在这个领域的大量研究提高了我们对发生在这个过程中生物学现象的认识, 同时也促进了卵巢刺激方法的发展。然而, 现在还没有足够的证据证实获得多少个卵子才能够达到预期的妊娠率及活产率。首先, 本章会阐述MAR的特定的发展历史。接着, 讨论目前的卵巢刺激方案、卵巢刺激希望达到的目标, 胚胎培养和胚胎移植的结局。一个单中心10年的MAR研究旨在解决的问题是: 要想达到胚胎移植后高的临床妊娠率, 最佳获卵的数量是多少?

2. 卵巢刺激和胚胎移植的里程碑

从MAR技术开始, 增加活产机会是研究者最重要的努力目标。在二十世纪七十年代早期, 第一例成功妊娠的胚胎移植是Edwards和Steptoe在自然周期实施的, 而且仅获得 (在腹腔镜下取得) 一枚卵子。世界第一例IVF成功妊娠的婴儿 Louise Brown 在1978年出生 (Edwards & Steptoe, 1980), 在此之前有很多IVF失败的尝试。这些多个第一次的尝试为世界范围的MAR成功奠定了基础, Edwards 和 Steptoe描述了从44例患者, 65个自然周期中获得45枚卵子, 最终有3例成功妊娠。因此, 每个获卵周期妊娠率为9.1%, 分娩率为6.8%。从此以后, MAR技术水平不断提高。在二十世纪八十年代早期, 最重要的进步是人绝经期促性腺激素 (human menopausal gonadotropin, HMG) 的使用, 实现了控制性超促排卵 (Controlled Ovarian Hyperstimulation, COH) 和多个卵泡生长。这样能够获得多个卵子, 大幅度增加了胚胎的数目和随后成功妊娠的可能性。HMG的应用引起了进一步的研究和开发, 改变了促性腺激素使用的方法, 提高了效率, 但是, 详细说明这个过程已经超出了本章的范围。

3. 卵巢刺激面临的挑战

3.1 卵巢过度刺激综合征

随着促性腺激素在MAR控制性超促排卵中的应用, 带来了一个可能危及生命的并发症——卵巢过度刺激综合征 (ovary hyperstimulation syndrome, OHSS) (Brinsden et al., 1995)。可以确定的是, OHSS风险性和卵巢对刺激的反应密切相关, 包括HCG日卵泡数目、获卵数和雌二醇 (E_2) 水平 (Asch et al., 1991)。之前的研究证实, OHSS的风险随着获卵数的增加而增加, 尤其是当获卵数大于10个时 (Reljič et al., 1999)。严重的OHSS是MAR中一种严重的, 可能危及生命的并发症, 在标准卵巢刺激方案中平均发生率为1%~3% (Fauser et al., 1999)。但是, 迄今为止, 没有可靠的预测OHSS发生的指标。基于这些事实, 近十年的很多研究旨在选择温和的促排卵方法来消除OHSS的发生 (Revelli et al., 2011)。

3.2 卵巢刺激方法

卵巢刺激方法是医学辅助生殖技术中重要的组成部分。抑制垂体的长效GnRH激动剂和重组或纯的尿源性的FSH联合应用是最常用的卵巢刺激方案(Macklon et al.,2006)。但是,为了使MAR更加安全,温和刺激方案的应用不仅减少了并发症的发生,还减少了MAR治疗的费用(Fausser et al.,1999)。随着GnRH拮抗剂在卵巢刺激方案中的应用,FSH延长到中卵泡期开始应用,由此可以减少促性腺激素的用量,使外源性激素的干扰最小化(Fausser & van Heusden, 1997)。另一方面,在GnRH拮抗剂刺激周期可以使用GnRH激动剂来替代绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin,hCG)进行扳机,可以减少OHSS的发生。用拮抗剂方案,OHSS可以被完全消除,甚至在获卵很多的高反应患者(Humaidan et al.,2011)。

尽管有以上新的卵巢刺激方法,但获卵数目仍然被认为是每个MAR周期结局的重要预测指标。但是在关于卵子的数目和MAR妊娠结局关系的相关研究中,结果是相互矛盾的(Hamoda et al.,2010; Letterie et al.,2005; Meniru et al.,1997; Sunkara et al.,2011; Yoldemir et al.,2010)。并且,随着IVF技术在全球的应用,某些国家采取新的限制性立法政策限定每个MAR刺激周期获卵的数量。由于缺乏可靠的数据,专家们这些立法的观点和治疗成功的结局经常是相互矛盾的。因此,有必要做进一步的研究来确定获卵数量对于MAR结局的预测。

3.3 胚胎培养和移植方法

如果移植一个以上的胚胎,多胎妊娠是MAR中最常见的并发症。因此,近年来社会学家提倡MAR技术的目标是实现单胎妊娠(欧洲人类生殖及胚胎学会(European Society of Human Reproduction and Embryology [ESHRE] Task Force on Ethics and Law, 2003)。减少多胎妊娠发生最简单的方法是严格执行单胚胎移植策略。但是,这会使妊娠率显著下降。在过去二十年,随着胚胎培养基的不断发展,使胚胎能够延长培养到囊胚期。很多人主张囊胚移植是由于囊胚期胚胎比卵裂期胚胎能够更好地进行形态学评估。虽然对这一问题的看法仍不统一,但是近期的很多研究证明囊胚移植有更好的妊娠结局(Papanikolau et al., 2008)。因此,在一篇近期的循证医学综述中提出,囊胚移植的妊娠率和活产率显著高于卵裂期移植(Blake et al., 2007)。

目前,越来越多的发达国家通过立法在MAR特定情况下强制实施单胚胎移植(主要是年轻患者),以降低多胎妊娠的发生率。因此面临的问题是:如何选择最好的胚胎来达到最大的妊娠率,同时降低多胎妊娠的发生率?基于以上事实,需要进一步解决的问题是,在什么情况下获卵数是选择单胚胎移植或多胚胎移植、是移植卵裂期还是囊胚期胚胎的一个决定因素。

4. 获卵数对胚胎移植成功的影响

一个关于在MAR中获卵数和妊娠结局的回顾性研究在Maribor大学的生殖医学和妇科内分泌科进行,总共纳入6,989例IVF和ICSI取卵周期。卵巢刺激方案中用GnRH_a/GnRH-ant和重组FSH(Gonal-f®, Serono International SA, Geneva, Switzerland)/HMG(Menopur®, Ferring Pharmaceuticals Inc.,Saint-Prex, Switzerland),具体用法之前有详述(Vlaisavljević et al.,2000)。经验丰富的胚胎学家在受精第2日对胚胎质量进行评估,而囊胚的分级是在受精后第5日进行(Kovačić et al., 2004)。胚胎移植在受精后第3日或第5日进行。按胚胎评估标准,在第3日如果获得超过4个受精卵并且超过3个优胚的话,我们在第5日对患者进行囊

胚移植(Kovačič et al., 2002)。通过和患者协商, 胚胎移植可以选择在第3日或第5日进行。临床妊娠是指在患者妊娠6周超声检查有原始心管搏动。胚胎冻融移植周期、PGD(preimplantation genetic diagnosis, PGD)周期或IVM(in vitro maturation, IVM) 周期均不在研究之内。

根据获卵数量对患者进行分类, 各分类变量之间, 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用t-检验或u-检验。不同获卵数组间连续变量之间的比较采用方差分析。为了进一步研究获卵数量和临床妊娠率的关系, 建立逻辑回归模型。该模型调整了在单因素变量分析中影响妊娠率的混杂变量分析(既往有过MAR史、年龄和促性腺激素的剂量)。数据分析采用SPSS17.0统计学软件(SPSS Inc, Chicago IL)。

4.1 每个取卵周期的分布

在6,989个研究周期中, 共获得61,793个卵子。获卵的中位数为8 [四分位数间距(IQR) 4~12], 产生胚胎的中位数为4[IQR 2~7], 图1为每个取卵周期分布的描述。

4.2 MAR周期的结果

根据获卵数量对周期数进行分类。每个周期的临床妊娠率为37.1%, 每个移植胚胎的妊娠率是41.0%。每个获卵周期和胚胎移植周期的分娩率分别为29.8%和32.9%。具体临床结果见表1。

4.3 临床妊娠率和胚胎形成率与获卵数量的关系

临床妊娠率和胚胎形成率通过计算每个周期的获卵数得到。获卵数越多, 妊娠率也随之增加, 11~15个卵达到顶峰, 之后保持不变, 但是当卵巢高反应超过20个卵子的时候, 妊娠率会下降(表1和图2)。然而当获卵数超过11~15个之后妊娠率并没有显著性改变。但是, 随着获卵数的增加, 卵巢刺激的相关风险特别是周期取消率增加, 尤其是获卵数超过20个时(表1)。关于获卵数量影响胚胎移植结果的相关报道结论是不一致的。一些专家认为, 获卵数量对于胚胎移植后的妊娠率没有直接关系(Letterie et al., 2005; Yoldemir et al., 2010), 其他的报道则认为妊娠率随着获卵数的增加而增加。在这些研究中最优的获卵数量的范围是5~15个(van Gast et al., 2006; Meniru & Craft, 1997; Timeva et al., 2006)。但是这些研究大部分是单中心、小样本的研究。近来, Sunkara 等对英国IVF中心的数据进行了大规模的回溯性研究得出结论, 15个是最佳获卵数量(Sunkara et al., 2011)。我们的研究结果是, 对近7,000周期进行统计学分析, 为达到最大的临床妊娠率, 卵巢刺激的最佳获卵数量是11~15个。

4.3.1 低获卵数量

如上所述, 当获卵数少于5个时, 妊娠率和分娩率显著降低。通过分析以上数据, 每组之间的妊娠率均有显著差别(表2)。在多因素分析中排除了年龄和既往MAR史两个因素的影响之后, 差异仍然很显著。

已经证实, 卵巢刺激后低获卵数和卵巢老化、原始卵泡池的耗竭有关(Tarlatzis et al., 2003)。卵巢储备功能低的患者在IVF中对卵巢刺激的反应差(Revelli et al., 2011)。但是, 低获卵率和妊娠率之间的关系尚不清楚。

图1. 获卵数的分布

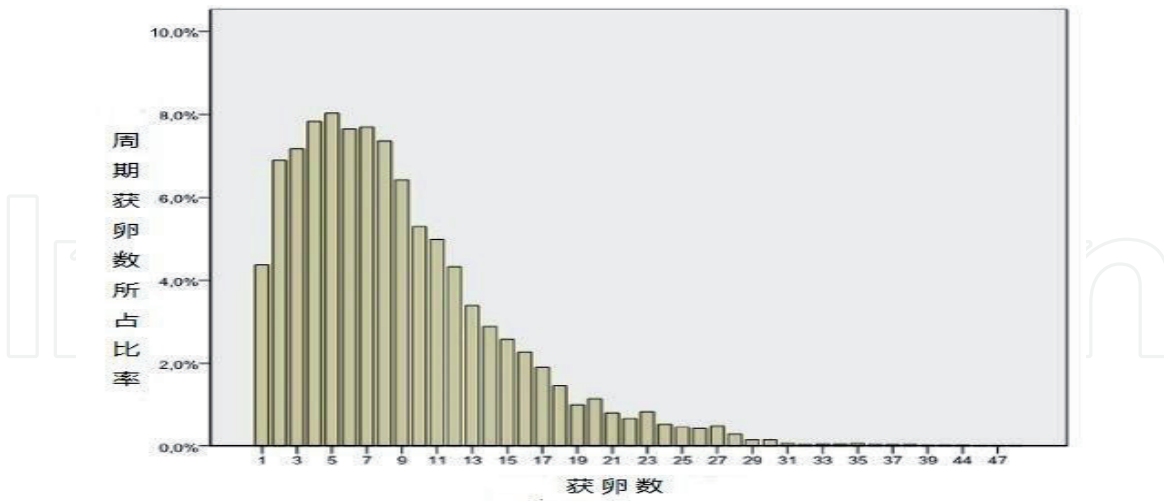


表1. 依据获卵数进行分类得到的MAR结果

获卵数	1~5	6~10	11~15	16~20	>20	总计
周期数	2,396	2,405	1,269	544	375	6,989
年龄(SD)	36.1(2.4) ^a	33.8(4.6) ^b	32.6(4.2) ^c	32.2(4.4) ^c	32.0(4.2) ^c	34.2(4.7)
既往MAR周期数(SD)	2.0(2.4) ^a	1.6(2.1) ^b	1.5(1.9) ^{bc}	1.4(1.9) ^c	1.3(1.6) ^c	1.7(2.2)
获卵数	7,765	18,823	16,061	9,571	9,573	61,793
受精卵(2PN)	4,910	11,552	9,668	5,686	5,510	37,326
D2胚胎	4,837	11,352	9,454	5,565	5,381	36,589
移植周期	2,027	2,241	1,213	513	332	6,326
D5胚胎移植	14.0% ^a	69.4% ^b	86.7% ^c	92.6% ^d	94.3% ^d	58.2%
取消周期	15.4% ^a	6.8% ^b	4.4% ^c	5.7% ^{bc}	11.5% ^{ab}	9.5%
移植胚胎	3,502	4,040	2,123	828	489	10,982
冷冻胚胎	295	2,212	2,544	1,982	2,150	9,183
临床妊娠	532	954	638	286	184	2,594
平均受精率	75.6% ^a	77.2% ^{ab}	77.6% ^{ab}	79.3% ^{ab}	83.8% ^b	77.3%
妊娠率/周期	22.2% ^a	39.7% ^a	50.3% ^c	52.6% ^c	49.1% ^c	37.1%
妊娠率/移植	26.3% ^a	42.6% ^b	52.6% ^c	55.8% ^c	55.4% ^c	41.0%
冷冻囊胚周期	8.3% ^a	38.9% ^b	58.3% ^c	73.0% ^d	83.5% ^e	37.0

^{abcde} 每个分类中, 不同上标的字母代表数据之间是有差别的, 相同上标的字母则代表数据之间差异没有统计学意义 ($P < 0.05$)。

在常规刺激中使用高剂量促性腺激素, 而获卵数低意味着卵母细胞质量差。而且, 高剂量的卵巢刺激方案会影响子宫内膜的质量 (Gougeon, 1996; Pal et al., 2008)。另一方面, 如果获卵数较多, 我们可以在大量可利用胚胎中选择优质胚胎进行移植 (Devreker, 1999; Pal et al., 2008)。相反, 温和的卵巢刺激产生高质量的卵子, 并且胚胎的非整倍体性染色体发生率低, 虽然获卵数量少但妊娠率相似 (Verberg et al., 2009)。然而, 关于这个问题的相关研究较少, 近期的Meta分析只包括3个获卵数较低的研究 (Verberg et al., 2009)。以上研究报道了相对低妊娠率, 15%~21%。更重要的是, 这些研究没有考虑到胚胎的冷冻保存周期, 如果增加胚胎冻融周期进行分析, 可能会拓展了传统卵巢刺激的

范围。理论上，温和刺激是一个切实可行的选择，尤其是针对卵巢反应差的患者，低剂量的促性腺激素可以得到预期的高质量卵子和子宫内膜。但是由于数据有限，当前的报道不能提供足够的证据支持，最后，在MAR治疗中定义的温和刺激方案还需要进一步的研究。

图2. 临床妊娠率与分娩率和低获卵数之间的关系

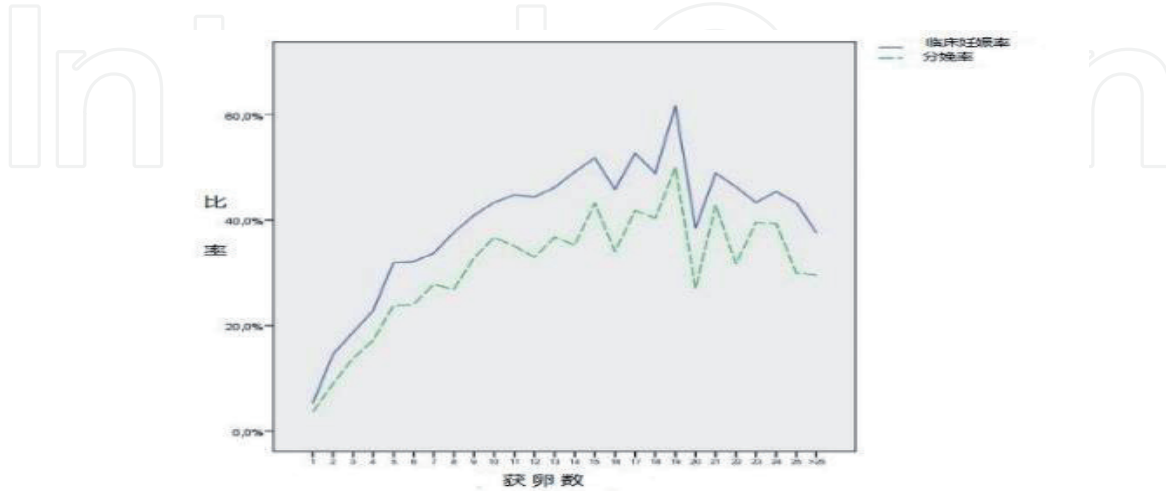


表2. 低反应者的周期特点 (<5卵)

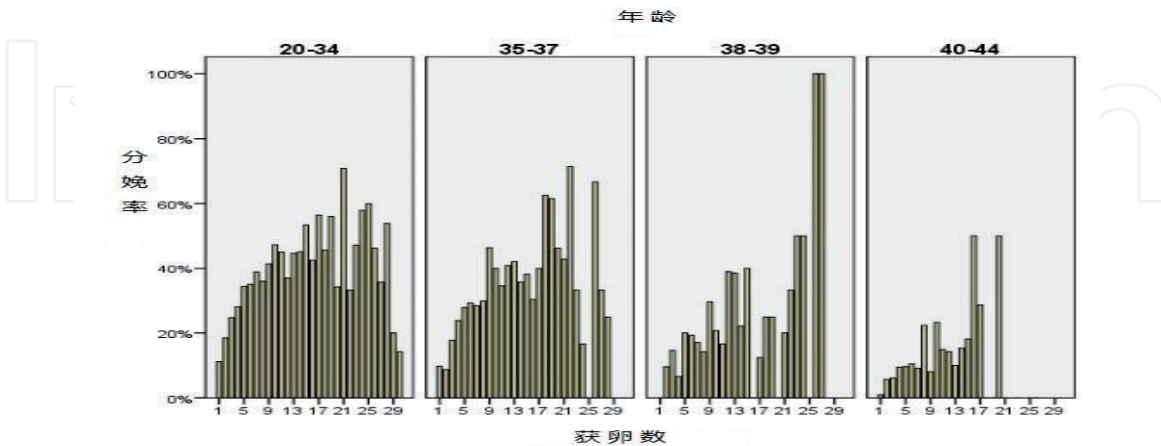
获卵数	1	2~3	4~5	总数	
周期数	305	983	1,108	2,396	
年龄	37.9(4.2) ^a	36.7(4.4) ^b	35.2(4.6) ^c	36.1(4.6)	$P < 0.001$
既往MAR周期	2.0(2.4) ^a	2.1(2.7) ^a	1.9(2.2) ^a	2.0(2.4)	$P > 0.05$
应用过促性腺激素(IE)	2,979 ^a	2,789 ^b	2,518 ^c	2,692	$P < 0.001$
获卵数	305	2,467	4,993	7,765	
受精卵(2PN)	212	1,574	3,124	4,910	
D2胚胎	205	1,532	3,100	4,837	
移植	185	828	1,014	2,027	
D5移植比例	0.5%	3.0%	25.4%	14.0%	
取消周期	39.34%	15.77%	8.48%	15.40%	$P < 0.001$
移植胚胎	186	1,368	1,948	3,502	
冷冻胚胎周期	0	41	254	295	
临床妊娠	16	184	332	532	
平均受精率	78.2% ^a	75.0% ^a	75.8% ^a	75.6%	$P > 0.05$
妊娠率/周期	5.30% ^a	18.70% ^b	30.00% ^c	22.20%	$P < 0.001$
妊娠率/移植	8.70% ^a	22.20% ^b	32.70% ^c	26.30%	$P < 0.001$
囊胚冷冻周期	0% ^a	3.30% ^b	15.10% ^c	8.30%	$P < 0.001$

4.4 年龄的影响

除了卵子的数量，年龄被认为是在周期开始时预测成功妊娠的最重要因素之一。根据女性患者的年龄对周期进行进一步分类。年龄增长是MAR周期中独立于获卵数的显著的不利影

响因素。在年龄最小组 (20~34岁)平均临床妊娠率最高,达45.6%,而患者年龄超过40岁组妊娠率降至16.8%。另一方面,平均获卵数在年长患者也显著降低 (20~34岁,10.4卵;35~37岁,8.5卵;38~39岁,6.9卵;40~44岁,5.7卵, $P<0.001$)。结果如图3所示。

图3. 以患者年龄来分析卵子数量和分娩率之间的关系



随着卵巢的衰老,卵巢储备功能下降,我们需要改变高剂量促性腺激素的卵巢刺激方案,避免前面提到的不利影响。尽管研究中我们没有把窦卵泡计数和抗苗勒管因子作为衡量卵巢储备功能的因素,但是从我们的研究结果中可以看出,年龄是低获卵数的一个独立的影响因素。即使对促性腺激素反应正常的年长患者,怀孕率要低于年轻的患者。这可能和患者非整倍体胚胎所占比例增加有关。当患者年龄超过40岁后这个比例迅速增加,当患者年龄超过45岁,尽管卵巢功能正常,但MAR中健康孩子的出生率几乎为0 (Forman et al., 2011)。

4.5 胚胎冷冻保存

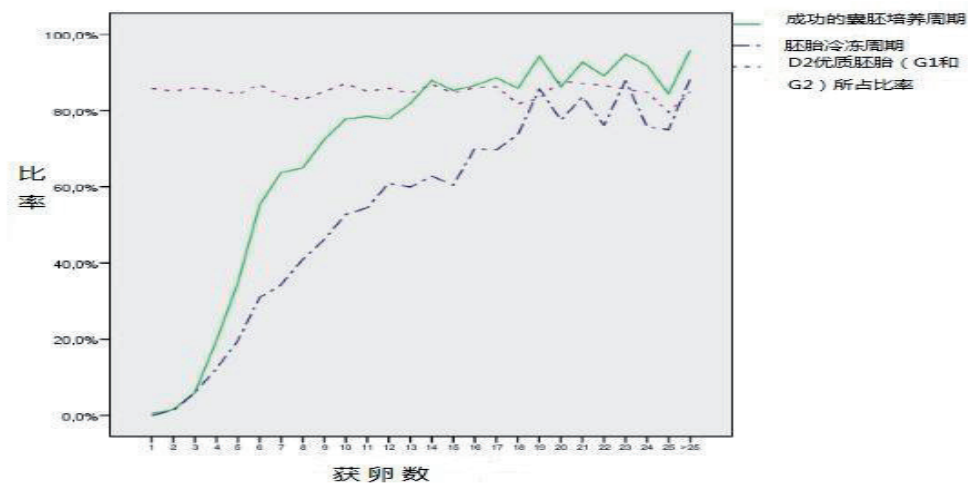
虽然活产率是MAR治疗周期中最重要的临床妊娠结局的评估指标,但是还有其他因素来评估MAR周期。

91.5%的获卵周期可以进行胚胎移植,同时大约有9.5%的周期被取消。如果患者卵巢反应差,仅获得1个卵子,移植周期取消率高达40% (表1和表2)。这也减少了可用于移植的胚胎,降低了可用卵子的质量 (Tarlantzis et al., 2003)。另一方面,卵巢高反应的患者周期取消率显著增加,尤其是获卵数超过20个。由于周期取消率增加,妊娠率和分娩率在获卵超过20个的患者也是降低的 (表1和图2)。和以上结论一致,近来的研究认为,以获得尽可能多的卵子为目的显然是没有意义的 (van der Gast et al., 2006; Sunkara et al., 2011)。由于高OHSS风险进行全胚胎冷冻这个因素没有排除在外,使我们的分析受到限制。由于卵巢过度刺激的风险导致低妊娠率和高胚胎移植取消率。根据文献报道,当获卵数达到20个时,OHSS发生率大约为15%,而且风险随获卵数增加而增加 (Reljić et al., 1999; Verwoerd et al., 2008)。另外,有证据证实高雌激素水平也影响胚胎的发育潜能 (Ertzeid & Storeng, 2001),干扰黄体早期子宫内膜的容受性 (Devroey et al., 2004; Horcajadas et al., 2008)。因此,卵巢高反应的患者,尤其是有卵巢过度刺激风险的患者,妊娠率减低。

但是,当获卵数达到20个时 (>20个),胚胎用于冷冻周期的机会也相应增加 (表1和

图4)。这个关系可能和在控制了混杂变量（如年龄、既往MAR史和促性腺激素的剂量）后的多因素变量有关。患者的妊娠率降低理论上可以在冷冻-解冻周期有所改变。需要引起注意的是，所研究对象还包括为避免OHSS冷冻所有胚胎，取消新鲜周期胚胎移植。由于研究设计的限制，我们不能进行新鲜周期和冻融周期结合性研究及其累积妊娠率的研究。我们的研究结果和Hamoda的研究相似，当获卵数超过18个时，用于冷冻保存的卵子数量并没有明显增加(Figure 4)。而且，大量胚胎的冷冻保存还涉及到胚胎的处理、管理和伦理学问题。尽管如此，随着冷冻保存技术的进步，特别是玻璃化冷冻技术的发展，累积妊娠率有了大幅度的提高(Kolibianakis et al., 2009)。另外，随着获卵数的增加，进行囊胚移植的机会增加。因为第5日的囊胚移植提高了胚胎选择的机会，增加了胚胎移植成功的机会(Blake et al., 2007; Kovačič et al., 2002; Papanikolaou et al., 2008)。我们还需要对不同的胚胎培养和移植的方法做进一步研究。

图 4. 获卵数和胚胎冷冻、成功的囊胚培养、D2 优质胚胎之间的关系



4.6 胚胎培养方案

根据所移植胚胎的不同将患者分两组，一组是在囊胚阶段移植1~2个胚胎，另一组是在卵裂期阶段移植1~3个胚胎，胚胎移植数目根据患者年龄、病史和胚胎质量的不同而不同。不同的胚胎移植方案结果详见表3。

在MAR初期，常规移植卵裂期胚胎。早期胚胎的生理机能和能量代谢尚不清楚，培养介质不能用来培养4细胞以外的胚胎。但是随着科学的进步，新改进的囊胚培养介质使胚胎可以在试管内培养更久(Menezo et al., 1998)。这种囊胚培养理论上能够改善移植结果，有两个主要原因。首先，囊胚移植模拟了自然妊娠的生理过程：胚胎穿过输卵管到达子宫腔不早于妊娠后第4日。移植卵裂期胚胎后，由于子宫提供的营养环境不同于培养液，引起子宫腔自身产生压力，降低了胚胎着床率(Blake et al., 2007)；第2个原因是前面提到的在囊胚阶段能够更好地进行胚胎形态学选择。但是，在之前的研究中提到少量的胚胎对于改善胚胎移植的成功率没有帮助。如果在取卵后第2日少于3个胚胎的情况下，延长培养到囊胚阶段不能够改善妊娠结局。另一方面，虽然移植第5日胚胎使移植取消率显著增高，但每个周期的妊娠率和分娩率相当(Kovačič et al., 2002; Vlaisavljević et al., 2001)。近期的研究

表明, 囊胚移植的临床妊娠率和继续妊娠率显著高于第3日卵裂期胚胎移植(分别为52.7% vs. 25.3% 和43.1% vs. 18.6%)。在多变量的Logistic回归模型中, 尽管控制了年龄和获卵数目两个影响因素, 结局差异仍然有统计学意义。这些结果的解读是建立在患者是有个体差异的基础上的。一般而言, 如果患者获卵数少于5个或第2日生成胚胎数少于3个, 则第3日卵裂期胚胎移植预后很差。患者形成的胚胎数第5日显著少于第3日。尽管如此, 我们的数据和文献报道一致(Blake et al.,2007; Papanikolaou et al.,2008), 囊胚移植增加了胚胎着床和临床妊娠的机会。

另外我们还发现, 双囊胚移植和单囊胚移植相比并没有增加妊娠率。以上结论是在最少移植一个优质囊胚的周期中得出的。另一方面, 双胚胎特别是双囊胚移植周期中, 双胎分娩率显著增加(38.1%)。

表3. 胚胎培养方案和临床妊娠结局的关系

	D5	SBT	DBT	D3	SET	DET	TET	总计
周期	3,572	1,452	2,120	2,647	798	1,377	472	6,219
年龄 (SD)	32.8 (4.3)	31.8 (4.2) ^a	33.4(4.3) ^b	35.8(4.6)	35.7 (4.7) ^c	35.3 (4.5) ^c	37.5(4.3) ^d	
平均获卵 数(SD)	11.8(5.6)	12.5(6.5) ^a	11.3(5.1) ^b	5.2(3.7)	3.5(2.8) ^c	5.6(3.6) ^d	6.9(4.0) ^e	8.8(6.1)
最佳囊胚 移植率	53.2%	60.6%	48.2%					
临床妊娠 /移植	52.7%	52.2% ^a	53.1% ^a	25.3%	15.2% ^b	30.5% ^c	27.3% ^c	41.1%
着床率	43.9%	53.1% ^a	37.6% ^b	16.6%	15.1% ^{cd}	19.2% ^c	11.3% ^d	31.2%
继续妊娠 /移植	43.1%	(626)43.1%	(912)43.2%	18.6%	(92)11.6%	(313) 22.8%	(84)17.9%	(1,663)32.9%
双胎	24.5%	(8)1.7%	(303)38.1%	17.6%	(1)1.4%	(49)20.1%	(19)25.3%	(380)22.8%
三胎	0.4%	0	(5)0.8%	0.3%	0	(1)0.4%	0	(6)0.4%

关于多胎妊娠率的研究指出, 三胎及以上的发生率是低的, 在过去十年间, 仅有6对三胞胎。相反, 如前所述, 双胎分娩率达22.8%, 特别是移植2个囊胚的患者。在我们的研究中, 女性患者年龄和有多余的囊胚进行冷冻保存是囊胚移植后多胎妊娠的危险因素(Vlaisavljević et al., 2004)。近期的数据指出, 即使对超过40岁的患者进行双囊胚移植, 仍有27.7%的双胎妊娠率。以上研究表明, 减少多胎妊娠风险的唯一选择是单胚胎移植, 甚至在年龄大的患者。

5. 结论

在卵巢刺激中使用外源性促性腺激素是MAR中重要组成部分, 改善了不孕症治疗的结局。第一例MAR患者在自然IVF周期成功妊娠。从那时开始, 应用GnRH激动剂或拮抗剂结合重组的或高纯度的促性腺激素成为MAR的常规。研究表明, 当前卵巢刺激方案旨在避免过多卵泡的发育同时达到适度的卵巢刺激。这种方法与过强刺激和温和刺激方案相比有更好的妊娠结局。我们的研究结果指出, 最终获卵数在11~15个是最佳的卵巢刺激结局。移植第5日囊胚比移植卵裂期胚胎的妊娠率要高, 尤其是在获卵后第3日有大量发育良好的胚胎。延

长到囊胚培养虽然减少了胚胎数量，但是单胚胎移植的严格实施可以减少多胎妊娠的发生。以上这些措施加上实验室胚胎冷冻保存技术，是MAR的最佳选择。

6. 参考文献

- Asch , RH. Li , HP. Balmaceda , JP. Weckstein LN & Stone , SC. (1991). Severe ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology: definition of high risk groups. *Human Reproduction* , Vol.6 , No.10 , pp. 1395-1399
- Blake , D.Farquhar , C. Johnson , N. & Proctor , M. (2007). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database SystemicReview* , No.4 , Art. No.: CD002118. DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub3.
- Brinsden , PR. Wada , I. Tan , SL. Balen , A & Jacobs , HS. (1995). Diagnosis , prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* , Vol.102 , No , 10 , pp.767-772
- Devreker , F. Pogonici , E. De Maertelaer , V.,Revelard , P.,Van den Bergh , M. & Englert Y.(1999) Selection of good embryos for transfer depends on embryo cohort size: implications for the 'mild ovarian stimulation' debate. *Human Reproduction* , Vol.14 , No.12 , pp. 3002-8
- Devroey , P. Bourgain , C. Macklon , NS. & Fauser , BC. (2004). Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrinology and Metabolism* , Vol.15 , pp. 84-90
- Edwards , RG. Steptoe , PC. & Purdy , JM. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryo grown in vitro. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* , Vol.87 , pp. 737-755
- Edwards , RG. (2007). IVF , IVM , natural cycle IVF , minimal stimulation IVF - tome for a rethink. *Reproductive Biomedicine Online* , Vol.15 , No.1 , pp. 106-19
- Ertzeid , G & Storeng , R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction* , Vol.16 , pp. 221-225
- Fauser , BC. & van Heusden , AM. (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine Reviews* , Vol.18 , No.1 , pp. 71-106
- Fauser , BC. Devroey , P. Yen , SSC. Gosden , R. Crowley , WC. Baird , DT. & Bouchard P.(1999). Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Human Reproduction* , Vol.14 , No.11 , pp. 681-686.
- Forman , EJ. Treff , NR. Scott , RT. (2011). Fertility after age 45: From natural conception to Assisted Reproductive Technology and beyond. Review. *Maturitas* , Vol.70 , pp. 216-221
- Gougeon , A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* , Vol.17 , No.2 , pp. 121-155.
- Hamoda , H. Sunkara , S. Khalaf , Y. Braude , P. & El-Toukhy , T. (2010). Outcome of fresh IVF/ICSI cycles in relation to the number of oocytes collected: a review of 4 , 701 treatment cycles. *Human Reproduction* , Vol.25 , p. 417
- Horcajadas , JA. Minguez , P. Dopazo , J. Esteban , FJ. Dominguez , F. Giudice , LC. Pellicer , A.& Simon C. (2008). Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , Vol.93 ,

No.11 , pp. 4500-4510

Humaidan , P. Kol , S. & Papanikolaou , E. (2011). Copenhagen GnRH Agonist Triggering Workshop Group. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice? *Human Reproduction Update* , Vol.17 , No.4 , pp. 510-524

Inge , GB. Brinsden , PR. & Elder , KT. (2005). Oocyte number per live birth in IVF: were Steptoe and Edwards less wasteful? *Human Reproduction* , Vol.20 , No.3 , pp. 588-592

Kolibianakis , EM. Venetis , CA. & Tarlatzis , BC. (2009). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* , Vol.21 , No.3 , pp. 270-274

Kovacic , B. Vlasisavljevic , V. Reljic , M. & Gavric-Lovrec V. (2002). Clinical outcome of day 2 versus day 5 transfer in cycles with one or two developed embryos. *Fertility Sterility* , Vol.77 , No.3 , pp. 529-536

Kovacic , B. Vlasisavljevic V. Reljic M. & Cizek-Sajko M. (2004). Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae et blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online* , Vol.8 , No.6 , pp. 687-694.

Letterie , G. Marshall , L. & Angle , M. (2005). The relationship of clinical response , oocyte number , and success in oocyte donor cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* , Vol.22 , No.3 , pp. 115-117 Macklon , NS. Stouffer , RL. Giudice , LC. & Fauser BC. (2006). The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrine Reviews* , Vol.27 , No.2 , pp. 170-207

Menezo , YJR. Hamamah , S. Hazout , A. & Dale , B. (1998). Time to switch from co-culture to sequential defined media for transfer at the blastocyst stage. *Human Reproduction* , Vol.13 , No.8 , pp. 2043-2044.

Meniru , GI. & Craft , IL. (1997). Utilization of retrieved oocytes as an index of the efficiency of superovulation strategies for in-vitro fertilization treatment. *Human Reproduction* , Vol.12 , No.10 , pp. 2129-2132

Pal , L. Jindal , S. Witt , BR. & Santoro , N. (2008). Less is more: increased gonadotrophin use for ovarian stimulation adversely influences clinical pregnancy and live birth after in vitro fertilization. *Fertility Sterility* , Vol.89 , No.6 , pp. 1694-1701

Papanikolaou , EG. Kolibianakis , EM. Tournaye , H. Venetis , CA. Fatemi , H. Tarlatzis , B. & Devroey P. (2008). Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* , Vol.23 , No.1 , pp. 91-99

Reljic , M. Vlasisavljevic , V. Gavric , V. & Kovacic , B. (1999). Number of oocytes retrieved and resulting pregnancy. Risk factors for ovarian hyperstimulation syndrome. *The Journal of Reproductive Medicine* , Vol.44 , No.8 , pp. 713-718

Revelli , A. Cassano , S. Salvagno , F. & Delle Piane L. (2011). Milder is better ? advantages and disadvantages of "mild" ovarian stimulation for human in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology* , Vol.9 , No.25 , pp. 1-9

Sharma , V. Allgar , V. & Rajkhowa , M. (2002). Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. *Fertility Sterility* , Vol.78 , No.1 , pp.

40-46.

- Sunkara , SK. Rittenberg , V. Raine-Fenning , N. Bhattacharya , S. Zamora , J. & Coomarasamy , A. (2011). Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Human Reproduction , Advance Access ; Vol.0 , No.0 , pp. 1-7*
- Tarlatzis , BC. Zepiridis , L. Grimbizis , G. & Bontis J. (2003). Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Human Reproduction Update , Vol.9 , No.1 , pp. 61-76*
- The ESHRE Task Force on Ethics and Law. (2003). 6. Ethical issues related to multiple pregnancies in medically assisted procreation. *Human Reproduction , Vol.18 , No.9 , pp. 1976-1979*
- Timeva , T. Milachich , T. Antonova , I. Arabaji , T. Shterev , A. & Omar , HA. (2006). Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *The Scientific World Journal , Vol.6 , pp. 686-690*
- van der Gaast , MH. Eijkemans , MJC. van der Net , JB. de Boer , EJ. Burger , CW. van Leeuwen , FE. Fauser , BCJM. & Macklon , NS. (2006). Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reproductive Biomedicine Online , Vol.13 , No.4 , pp. 476-480*
- Verberg , MFG. Eijkemans , MJC. Macklon , NS. Heijnen , EMEW. Baart , EB. Hohmann , FP. Fauser , BCJM. & Broekmans , FJ. (2009). The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Human Reproduction Update , Vol.15 , No.1 , pp. 5-12*
- Verwoerd , GR. Mathews , T. & Brinsden , PR. (2008). Optimal follicle and oocyte numbers for cryopreservation of all embryos in IVF cycles at risk of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online , Vol.17 , No.3 , pp. 312-317*
- Vlaisavljevic , V. Kovacic , B. Gavric-Lovrec , V & Reljic , M. (2000). Simplification of the clinical phase of IVF and ICSI treatment in programmed cycles. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics. Vol.69 , pp. 135-142*
- Vlaisavljevic , V. Kovacic , B. Reljic , M. Gavric-Lovrec , V. & Cizek Sajko M. (2001). Is there any benefit from the culture of a single oocyte to a blastocyst-stage embryo in unstimulated cycles? *Human Reproduction , Vol.16 , No.11 , pp. 2379-2383*
- Vlaisavljevic , V. Cizek Sajko , M. Reljic , M. Gavric-Lovrec , V. Kovac , V. & Kovacic B. (2004). Analysis of prognostic factors influencing multiple pregnancy. *Human Reproduction Vol.19 , Suppl.1 , p. 196*
- Yoldemir , T. & Fraser , IS. (2010). The effect of retrieved oocyte count on pregnancy outcomes in assisted reproduction program. *Archives of Gynecology and Obstetrics , Vol.281 , No.3 , pp. 551-556*

(赵敏英译)

IntechOpen

IntechOpen

第四章 卵巢过度刺激综合征的预防和治疗

Ivan Grbavac, Dejan Ljiljak and Krunoslav Kuna University Hospital Center "Sisters of Mercy", ZagrebCroatia

1. 引言

卵巢过度刺激综合征 (Ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) 是因应用外源性促性腺激素而引起的卵巢增大而产生的一种复杂的临床综合征。严重的患者可出现大量腹水、卵巢显著增大、胸腔积液、电解质紊乱、低血容量性低血压、少尿、血液浓缩和栓塞等症状 (Madill JJ et al., 2008)。中重度的卵巢过度刺激综合征在所有卵巢刺激周期中占到0.2%~2% (Binder H et al., 2007)。

严重的OHSS是可能威胁到生命的并发症。一旦妊娠, 严重OHSS的患者预后会更差。

2. 病理生理学

OHSS的发病原因不清, 可能与过度刺激的卵巢分泌大量具有血管活性的细胞因子有关 (Goldsmann MP et al., 1995)。内源性或外源性的人绒毛膜促性腺激素 (Human chorionic gonadotropin, hCG) 是OHSS早期发挥作用的因子。hCG作用于黄体, 黄体产生血管活性物质使血管通透性增加 (Chen SU et al., 2010)。

OHSS的主要病理特征是血管通透性增加, 导致体液、蛋白质和电解质进入腹膜腔 (Tollan A et al., 1990)。

OHSS消化系统的临床表现有腹水 (第三间隙液体)、麻痹性肠梗阻和卵巢增大; 呼吸系统的临床表现有胸腔积液、限制性肺病 (由于腹水或麻痹性肠梗阻引起)、急性呼吸窘迫综合征 (Acute respiratory distress syndrome, ARDS); 心血管系统的临床表现有血容量减少、血压降低、中心静脉灌注减少, 由于动脉血管的舒张, 心率和心脏输出量代偿增加; 高雌激素水平引起血液高凝状态和血栓形成倾向; 肾脏系统的临床表现为肾脏灌注减少、少尿、肾衰竭; 肝脏可能发生肝水肿。

血液系统的变化包括血细胞容积 (继发于毛细血管通透性增加和液体的丢失) 和白细胞计数的增加, 多因素研究发现血液系统的变化和高雌激素水平、前列腺素类物质作用及血液稀释有关。

妇科的变化主要是由于卵巢增大引起的卵巢扭转和破裂。另外, 患者还会出现电解质紊乱如低钠血症 (由于血管收缩引起抗利尿激素水平增加) 和高钾血症 (由于肾脏钠/钾泵的改变)。

3. 血液动力学改变

以上这些临床表现主要是由于血管间隙缩小和富含蛋白的液体流向体腔及细胞间隙。血管容积减小导致血液动力学改变如低血压、严重的心动过速、肾脏低灌注和血液浓缩。

低血压使静脉压降低和回心血量减少, 可能最终导致心输出量减少; 但是, 研究表明OHSS患者心输出量是增加的, 伴有外周动脉的扩张 (Manau D et al., 1998)。

肾脏灌注减少使肾小球率过滤降低，导致少尿。肾脏灌注的改变还可以影响到肝脏的功能，包括蛋白综合征、抗凝血因子的丢失 (Fabreuges F et al.,1999)。

OHSS患者血液浓缩使血液凝固性增加，导致动静脉血栓形成(Chan WS et al.,2009)。

血管的容积减小和肾脏灌注减少共同作用导致电解质异常 (高钾、低钠)、血细胞容积和白细胞计数增加、肌酐清除率降低。

由于OHSS患者多有腹水产生，所以腹部不适是最常见的症状。富含蛋白的液体在腹腔内积聚导致腹胀、腹内压力增加。腹内压增加可能影响到呼吸、心脑血管、肾脏、胃肠道及肝脏的功能失衡(Selgas R et al.,2010)。

近来，血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)做为OHSS病理生理过程中的一个重要因子被研究。VEGF是一种具有血管活性的糖蛋白 (细胞因子)，其刺激血管内皮细胞增殖，增加细胞渗透性和促进血管再生。

近来研究表明，hCG是OHSS发生的主要扳机因素，可能是OHSS症状出现的主要刺激因素。随着hCG的清除，OHSS的相应症状也会缓解(Soares SR et al.,2008)。hCG可以增加人类黄体粒细胞上的VEGF和VEGF-2受体，增加血清VEGF浓度。

VEGF通过重新排列内皮功能蛋白 (包括钙黏着蛋白和封闭蛋白5) 来增加毛细血管的通透性。Villasante A等把脐静脉中人类的内皮细胞作为OHSS的体外模型，不受雌激素作用的情况下，hCG和VEGF可以引起肌钙蛋白纤维的改变，增加毛细血管的通透性和提高钙黏着蛋白的浓度 (Villasante A et al.,2007)。钙黏着蛋白是一种可溶的细胞黏附分子，其在增加毛细血管通透性的病理生理过程中起主要作用(Villasante A et al.,2007)。

4. OHSS的分级

传统的OHSS分级是依据临床症状和实验室检查结果来区分疾病的严重程度。最常用OHSS的分级系统是采用的是Golan分类法 (Golan et al.,1989)。此分级系统结合阴道超声下卵巢大小及腹水多少来分级。如果超声下检测到腹水，可以诊断为中度OHSS，而中度OHSS有进一步恶化到重度OHSS的风险，因此腹水的检测是非常重要的。此分类法在随后的修订中添加了重度和极重度OHSS (Jenkins JM et al.,2006)。

根据OHSS发生的起始时间，OHSS分为早期和晚期，能够有效的判断预后。早期OHSS是指hCG诱发排卵后9日，外源性hCG促卵泡成熟后的蓄积作用可能刺激卵巢发生过度反应。晚期OHSS是指妊娠早期的卵巢受内源性hCG刺激作用发生过度反应。晚期OHSS比早期OHSS更持久更严重。

表1. OHSS严重程度分级

分级	体征
轻度	腹胀不适 轻度下腹痛 卵巢增大, 直径<8 cm*
中度	中度下腹痛 恶心±呕吐 超声发现腹水 卵巢增大, 直径8~12 cm*
重度	临床腹水或胸水 少尿 血细胞比容>45% 低蛋白血症 卵巢增大, 直径>12 cm*
极重度	张力性腹水或胸腔积液 血细胞比容>0.55% 白细胞计数>25,000/mL 少尿/无尿 血管栓塞 成人型呼吸窘迫综合征

*由于辅助生殖技术中卵泡穿刺的影响, 严重OHSS和卵巢大小可能不一致。

5. 危险因素

OHSS发生的高危因素(Enskog A. et al., 1999) :

- * 年轻
- * 低体质量指数
- * 多囊卵巢综合征
- * 高敏体质
- * 窦卵泡数目多
- * 高剂量的促性腺激素
- * 高雌激素水平或者雌激素水平迅速增高
- * 大量的优势卵泡
- * 获卵数多
- * 大剂量hCG的应用
- * 妊娠
- * 既往发生过OHSS

雌二醇 (E_2) 和 E_2 增长幅度决不能很好地预测OHSS (Papanikolau EG et al.,2006)。

我们如果以3,000 pg/mL为界点将会漏诊2/3的严重OHSS的患者。而卵巢内计数大于12 mm的卵泡数目比血清 E_2 水平能够很好的预测OHSS。研究表明, 我们把 E_2 水平大于5,000 pg/mL和18个以上大于12 mm的卵泡两个因素结合在一起能够很好地预测OHSS, 敏感性为83%, 特异性为84% (Papanikolau EG et al.,2006)。

6. 预防

预防OHSS的关键是诱导排卵的经验和对OHSS危险因素的认识。

对OHSS危险因素提高警惕(Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008):

- * 迅速增加的 E_2 水平
- * E_2 的水平超过2,500 pg/mL
- * 出现大量中等大小的卵泡 (10~14 mm)
- * 既往有过OHSS的患者, 有以下的预防措施。

6.1 周期取消

在IVF周期中, hCG扳机是诱发OHSS的主要因素, 因此周期取消是最有效的预防措施, 但是要承担情感上和经济上的压力。但是, 为避免周期失控, 对既往有严重OHSS病史的患者取消周期。

6.2 滑行疗法 (Coasting)

Coasting是指COH过程中暂时停用促性腺激素, 直到 E_2 水平下降后再用hCG进行扳机。Coasting的应用机制如下: 低促性腺激素刺激导致LH受体减少、黄体功能减低和VEGF水平下降。低促性腺激素水平可能增加粒细胞尤其是小卵泡的粒细胞凋亡的几率。Coasting降低卵泡液VEGF水平, 因此可能会阻止OHSS的进展(Tozer AJ et al., 2004)。

此方法对于高反应的患者诱导排卵是个不错的选择, 可以避免周期取消, 避免发生重度的OHSS。虽然coasting后OHSS仍会发展, 但是发生率和严重程度会降低。但是, 过长的Coasting会降低妊娠率 (Garcia-Velasco JA et al., 2006)。

6.3 减少hCG扳机的剂量

理论上, 减少hCG的用量对于预防OHSS是有意义的, 但是没有数据的支持, 可能和样本量太小, 没有统计学差别有关。

6.4 GnRH激动剂扳机

预防OHSS发生的另一种方法是在诱发排卵时应用GnRH激动剂。激动剂扳机仅仅用在拮抗剂周期。

Griesinger G等把患者随机分入激动剂组和hCG组, 对比2组的妊娠率, 结果2组的获卵数、受精率和胚胎评分差别没有统计学差异。以上入选患者均没有发生OHSS, 但是GnRH激动剂扳机组妊娠率相对较低, 这可能与黄体支持有关(Griesinger G et al, 2006)。

6.5 冷冻保存所有胚胎

患者妊娠后, hCG对卵巢的持续刺激使患者更容易发生严重的OHSS, 因此冷冻保存所有的胚胎是一种预防OHSS不错的方法。

Sills等为了预防OHSS的进一步发展, 对一组进行胚胎冷冻保存的患者进行研究(Sills

ES et al.,2008)。他们选择移植第5日去透明带后的单一胚胎，其余胚胎进行冷冻保存，或冷冻保存所有的胚胎，推迟移植时间可以有效地预防由于妊娠引起的晚期OHSS。由于外源性hCG的应用，以上的方法并不能阻止早期的OHSS继续发展。他们把冷冻保存的2原核胚胎进行解冻，进一步培养成囊胚进行移植，可以提高胚胎的利用率和妊娠率。

从胚胎冷冻保存到解冻移植的平均时间为115日（范围为30~377日），囊胚形成率为88%，移植胚胎的活产率为43.6%。

但是在Cochrane的综述中阐述用常规的胚胎冷冻保存方法预防OHSS的证据不足(D'Angelo A et al.,2002)。

6.6 在取卵时静脉滴注白蛋白

白蛋白是一种低分子质量的等离子体化合物，主要影响胶体渗透压。在hCG注射日用人类血清白蛋白来预防高危的患者OHSS发生。然而最近的一项前瞻性随机研究认为，人类血清白蛋白不能预防和减少OHSS的发生。但是，白蛋白短时间内会扩散到血管外，对血管内容积和血细胞比容有影响，反而使腹水和胸水更严重(Isikoglu M et al.,2007)。

6.7 非甾体药物应用

近期研究表明，低剂量的阿司匹林（100 mg/d，在第一日卵巢刺激时开始服用）对于有高危因素的OHSS患者能够达到有效的预防作用(Varnagy A et al., 2010)。本研究评估了2,425个接受促性腺激素释放激素激动剂的周期，其中1,192例患者有发生OHSS的风险，随机选用780例患者应用阿司匹林，OHSS的发生率为0.25%，而没有应用阿司匹林的患者OHSS的发生率为8.4%。两者的妊娠率相似。

6.8 多巴胺受体激动剂

预防OHSS进展的另外一种有效方法是应用多巴胺激动剂如卡麦角林。卡麦角林的作用机制是抑制VEGF的受体磷酸化，减少毛细血管的渗出。

Alvarez 等(Alvarez et al.,2007)将研究对象分为两组，35例患者（病例组）在hCG日开始给予卡麦角林0.5 mg/d，共8日，32例患者（安慰剂组）给予等量的安慰剂。所有患者进行OHSS的评估，包括血细胞比容测定、超声下腹水的评估和MRI下卵巢静脉的磁导率的测量。他们发现病例组的腹水量显著低于安慰剂组。病例组患者发展成为中度OHSS的比例显著低于安慰剂组。但是，两组患者中发展成为重度OHSS的比例差异没有统计学意义。

尽管多巴胺激动剂卡麦角林对毛细血管渗透性有抑制作用，但这种作用在卵母细胞的成熟和玻璃化过程中减低，对着床率和妊娠率没有太大影响，还能够预测和预防OHSS的发生(Garcia-Velasco Ja et al.,2009)。

6.9 卵母细胞的体外成熟 (*In vitro* maturation of oocytes, IVM)

预防OHSS的最安全的方法是不去刺激卵巢。在IVM周期，我们从轻度刺激的卵巢或者是完全没有刺激的卵巢中取出不成熟的卵母细胞。卵母细胞在特定的培养基内培养24~48 h后行体外受精或者是胞浆内单精子注射。移植和常规方法相同，即在授精后2、3日移植2个胚胎。在IVM周期，由于卵巢不受刺激有很多优势：减少了药物的费用，没有OHSS的风险，临床和实验室的患者数量减少(Lazendorf SE et al.,2006)。

试验表明，进行IVM的PCOS患者每次胚胎移植率为20%~54%，着床率为5.5%~34.5% (Suikkari aM et al.,2008)；但是，对排卵正常的患者进行IVM，结局不太理想，每次胚胎妊

娠率为15%~33.3%，着床率为8.8%~22.6%。

尽管很多生殖中心报道了IVM的优点，但是IVM还不是不育治疗的主流。最可能的原因是：从未刺激卵巢取出不成熟的卵母细胞在培养成熟的过程存在技术困难；和常规的IVF相比，IVM的活产率要低；不成熟人类卵母细胞发生纺锤体和染色体异常的几率更高(Lazendorf SE et al.,2006)。

7. 管理

7.1 门诊患者的管理

对于轻度OHSS的患者，不需要特殊治疗。然而，门诊患者的监测也是非常重要的，检测出那些有可能发展为中度或重度的OHSS患者。大部分中度OHSS的患者仍可以在门诊观察，但是我们需要更认真地去每日测量她们的体质量及腹围的增加，进行体格检查，超声监测腹水量的变化及卵巢大小。患者经口摄入的液体每日不超过1 L，鼓励患者口渴的时候喝水，切忌过量饮水；避免剧烈运动和性生活；不提倡绝对的卧床休息，会增加血栓的风险；黄体支持选用黄体酮，禁用hCG。

对于重度的OHSS，我们可以用对乙酰氨基酚或阿片类制剂缓解。由于对肾脏有不良反应，非甾体类抗炎药不被推荐使用。

评估重度OHSS的实验室数据有血红蛋白、血细胞比容、血清肌酐、电解质和肝功能。以上检测数据可以帮助我们评估OHSS的进展。

嘱患者每2~3日复诊一次，但是如果患者出现不断加重的严重疼痛、腹胀、呼吸急促、尿量减少等情况需要紧急就诊(Jenkins JM et al.,2006)。

7.2 住院患者的管理

对于患严重疾病或重度OHSS的患者需要住院治疗，他们会得到更好的监测和积极的治疗。我们有必要对重度OHSS的住院患者进行认真反复的病情评估。临床检查包括水量及心肺功能的评估，每日记录患者腹围和体质量，每日记录液体出入量，如果患者尿量<1,000 mL/d需要引起注意。

血生化检测包括血清电解质、肝肾功能、凝血功能和血细胞计数，超声下测量卵巢大小、胸腹水及心包积液量。如果患者出现呼吸道症状和体征如胸水、肺部感染、肺栓塞等情况，还要监测胸片、脉搏和血氧饱和度。hCG的化验可以尽早诊断妊娠。疼痛和腹水容易掩盖附件扭转、卵巢破裂和急性腹腔内出血。一系列的临床和实验室的评估手段提供了识别疾病和监测疾病的进展方法(Jenkins et al., 2006)。

早期妊娠者可以用止吐药物如普鲁氯嗪、甲氧氯普胺和赛克利嗪。

OHSS患者的治疗主要是支持疗法，直到症状自然缓解。

OHSS患者的症状缓解是重要的，特别是疼痛和恶心。如果症状严重，我们可以用对乙酰氨基酚或鸦片类药物缓解。如果应用麻醉剂，患者的活动相应减少，要避免便秘。恶心与腹水量的增加有关，因此腹胀缓解后相应的恶心症状也会减轻。另外，我们给患者及家属提供安慰和心理咨询来减轻他们的焦虑症状。

对于血液浓缩的治疗主要是静脉输液。推荐使用静脉输液的起始剂量为第1小时超过500~1000 mL的生理盐水，然后给予30 mL/h水化液，同时用等张溶液来测定尿排出量。限制经口的液体摄入，应该在患者口渴时再饮水。25%的白蛋白用来扩大毛细血管的容积，

50~100 mg的白蛋白静脉注射超过4个小时，间隔4~12 h可以重复使用。

治疗高钾血症的药物包括乙烯磺酸钠树脂、胰岛素、碳酸氢钠或沙丁胺醇。OHSS的患者由于毛细血管损伤，要慎用利尿剂。一部分住院患者需要进行穿刺。OHSS患者若有高凝状态要预防血栓发生，高凝状态推荐使用弹力袜和抗凝血剂低分子肝素5000 IU 皮下注射，每日2次。由于血栓栓塞、肾功能衰竭、血液动力学异常（中心静脉压、毛细血管楔压）等并发症，有的患者需要进入特护病房(Alper MM et al., 2009)。

8. 参考文献

- Alper MM , Smith LP , Sills ES. *Ovarian hyperstimulation syndrome: current views on pathophysiology , risk factors , prevention , and management. J Exp Clin Assist Reprod. 2009 Jun 10 ; 6:3.*
- Alvarez C , Marti-Bonmati L , Novella-Maestre E , Sanz R , Gomez R , Fernandez-Sanchez M , Simon C , Pellicer A. *Dopamine Agonist Cabergoline Reduces Hemoconcentration and Ascites in Hyperstimulated Women Undergoing Assisted Reproduction. J Clin Endocrinol Metab 2007 ; 92(8):2931-2937.*
- Binder H , Dittrich R , Einhaus F , Krieg J , Muller A , Strauss R , et al. *Update on ovarian hyperstimulation syndrome: Part 1—incidence and pathogenesis. Int J Fertil Womens Med 2007 ; 52:11-26.*
- Chan WS. *The 'ART' of thrombosis: a review of arterial and venous thrombosis in assisted reproductive technology. Curr Opin Obstet Gynecol 2009 ; 21:207-18.*
- Chen SU , Chen RJ , Shieh JY , Chou CH , Lin CW , Lu HF , et al. *Human chorionic gonadotropin up-regulates expression of myeloid cell leukemia-1 protein in human granulosa-lutein cellsimplication of corpus luteum rescue and ovarianhyperstimulation syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2010 ; 95:3982-92.*
- D'Angelo A , Amso N. *Embryo Freezing for Preventing Ovarian Hyperstimulation Syndrome. Cochrane Database Syst Rev 2002 ; 2:CD002806.*
- Enskog A , Henriksson M , Unander M , Nilsson L , Brannstrom M. *Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. Fertil Steril 1999 ; 71(5):808-814.*
- Fabregues F , Balasch J , Gines P , Manau D , Jimenez W , Arroyo V , et al. *Ascites and liver test abnormalities during severe ovarian hyperstimulation syndrome. Am J Gastroenterol 1999 ; 94:994-9.*
- Garcia-Velasco JA , Isaza V , Quea G , Pellicer A. *Coasting for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: much ado about nothing? Fertil Steril. 2006 Mar ; 85(3):547-54.*
- Gracia-Velasco JA. *Reprod Biomed Online. 2009 ; 18 Suppl 2:71-5.*
- Golan A , Ron-El R , Herman A , Soffer Y , Weinraub Z , Caspi E. *Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. Obstet Gynecol Surv 1989 ; 44:430-40.*
- Goldsman MP , Pedram A , Dominguez CE , Ciuffardi I , Levin E , Asch RH. *Increased capillary permeability induced by human follicular fluid: a hypothesis for an ovarian origin of the hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 1995 ; 63:268-72.*
- Griesinger G , Diedrich K , Devroey P , Kolibianakis EM. *Gnrh Agonist for Triggering Final Oocyte Maturation in the GnRH Antagonist Ovarian Hyperstimulation Protocol: a Systematic Review and Meta-Analysis. Hum Reprod Update 2006 ; 12(2):159-168.*

- Isikoglu M , Berkanoglu M , Senturk Z , Ozgur K. Human albumin does not prevent ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology program: a prospective randomized placebo-controlled double blind study. *Fertil Steril*. 2007 ; 88:982-5.
- Jenkins JM , Drakeley AJ , Mathur RS. The management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Green-top Guideline 2006 September ; (5):1-11.*
- Lanzendorf SE. Developmental potential of in vitro- and in vivomatured human oocytes collected from stimulated and unstimulated ovaries. *Fertil Steril*. 2006 ; 85:836-7.
- Madill JJ , Mullen NB , Harrison BP. Ovarian hyperstimulation syndrome: a potentially fatal complication of early pregnancy. *J Emerg Med* 2008 ; 35(3):283-6.
- Manau D , Balasch J , Arroyo V , Jimenez W , Fabregues F , Casamitjana R , Creus M , et al. Circulatory dysfunction in asymptomatic in vitro fertilization patients. Relationship with hyperestrogenemia and activity of endogenous vasodilators. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 ; 83:1489-93.
- Mathur RS , Akande AV , Keay SD , Hunt LP , Jenkins JM. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000 ; 73:901-7.
- Papanikolaou EG , Pozzobon C , Kolibianakis EM , Camus M , Tournaye H , Fatemi HM , et al. Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2006 ; 85:112-120.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2008 ; 90:188-93.
- Selgas R , Del Peso G , Bajo MA. Intra-abdominal hypertension favors ascites. *Perit Dial Int* 2010 ; 30:156-7
- Sills ES , McLoughlin LJ , Genton MG , Walsh DJ , Coull GD , Walsh AP. Ovarian Hyperstimulation Syndrome and Prophylactic Human Embryo Cryopreservation: Analysis of Reproductive Outcome Following Thawed Embryo Transfer. *J Ovarian Res* 2008 ; 1(1):7.
- Soares SR , Gomez R , Simon C , Garcia-Velasco JA , Pellicer A. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update* 2008 ; 14:321-333.
- Suikkari AM. In-vitro maturation: its role in fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008 ; 20:242-8
- Tollan A , Holst N , Forsdahl F , Fadnes HO , Oian P , Maltau JM. Transcapillary fluid dynamics during ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1990 ; 162:554-8.
- Tozer AJ , Iles RK , Iammarrone E , Gillott CM , Al-Shawaf T , Grudzinskas JG. The Effects of "Coasting" on Follicular Fluid Concentrations of Vascular Endothelial Growth Factor in Women at Risk of Developing Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Hum Reprod* 2004 ; 19(3):522-528.
- Varnagy A , Bodis J , Manfai Z , Wilhelm F , Busznyak C , Koppan M. Low-dose aspirin therapy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2010 ; 93(7):2281-4.
- Villasante A , Pacheco A , Ruiz A , Pellicer A , Garcia-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 ; 92:314-21.

(赵敏英译)

第三部分 受精技术新进展

第五章 辅助生殖技术中的精子细胞

Dejan Ljiljak¹, Tamara Tramišak Milaković², Neda Smiljan Severinski²,

Krunoslav Kuna1 and Anđelka Radojčić Badovinac²

¹University Hospital Center "Sisters of Mercy", Zagreb

²University Hospital Center Rijeka, Rijeka Croatia

1. 引言

不育已经成为困扰人类的全球性问题。在不育夫妻中因男方因素所导致的比例约占50%。在过去的10年间，我们已经证实了人类精子质量降低和睾丸源性恶性肿瘤与隐睾的发生率增加。现在，我们对精子质量进行评估主要根据包括精子计数、形态和活动力在内的精液常规分析来进行。上述3个主要因素中不同的变异和组合提供的诊断价值尽管有限，但是如今先进的辅助生殖技术（ART）特别是胞浆内单精子注射（ICSI）技术可用于解决多数男性不育问题。总体而言，传统的精子参数能够提供的诊断信息不多，因此我们相信某些诊断项目应该被加以应用，其中包括更专业的检测，比如DNA检测和精子蛋白组学分析等。

精子生成是一个涉及生理、形态和生化演进的过程。在经历从圆形的二倍体精原细胞到单倍体精子的复杂过程之后，成熟精子才拥有了与成熟卵子结合的能力。如果在此过程中发生任何差错的话，都不会产生完善的精子。因此在ART实践中，我们要熟悉正常的精子生成过程和发现导致异常情况的原因。在本章中，我们将会重温以下知识：

- -精子生成
- -精子染色质结构（精子核蛋白）
- -精子生成过程中DNA 损伤
- - 细胞凋亡
- - 氧化应激（睾丸和睾丸后因素）
- - Y 染色体微缺失
- - 中心体（表观遗传因素）
- - ART中的精子优选新技术

2. 精子生成

精子由头部、颈部和尾部组成。整个精子由被称为质膜的精子细胞膜所包绕（图1）。精子头部由细胞核和顶体组成。细胞核内有精子DNA（半量染色体），顶体中有受精过程中重要的酶。精子颈部或中段有100个精子线粒体，后者可产生能量提供给精子尾部。精子尾部的支架是9+2个微管，成对的微管以双联体对双联体的方式与动力蛋白臂结合。

精子生成的基本过程包括干细胞有丝分裂扩张、基因减数分裂重组和单倍体精子细胞生成(图2)。该过程的目的是产生高度专业化的能够与卵子结合的成熟精子。父系遗传的中心体对于正常受精、染色质包装和早期胚胎发育是必需的。完全成熟的精子必需经历顶体

发育和细胞核的延伸、压缩过程，最终形成中段、尾部和少量细胞质。

图1. 人类精子模式图

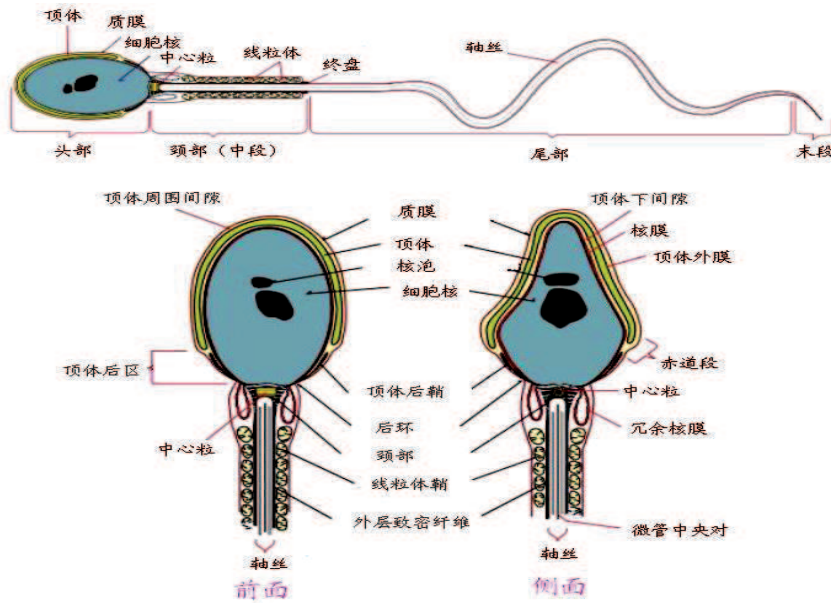
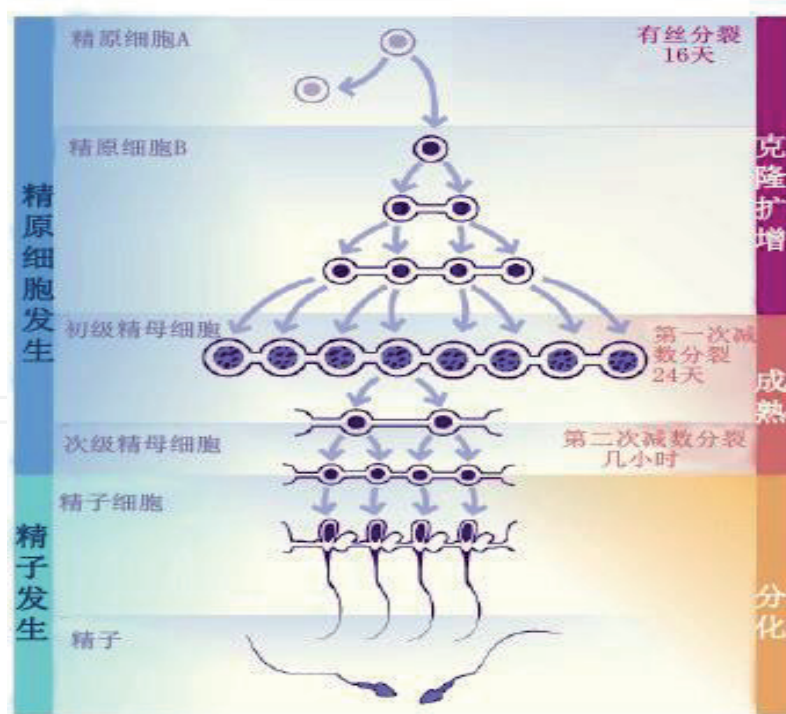


图2. 精子生成过程



在胎儿的睾丸中，原始干细胞被小管中的生殖母细胞（来源于活跃增殖细胞）所包裹，此时减数分裂受到抑制。精原细胞位于曲细精管中，与Sertoli细胞相连。Sertoli细胞和界膜形成血液-睾丸屏障。出生后，生殖母细胞产生的精原细胞群组成干细胞池。精原

细胞的有丝分裂到青春期才开始启动。二倍体的精原细胞分化为初级精母细胞，初级精母细胞经过首次减数分裂生成次级精母细胞。经过第二次减数分裂后，次级精母细胞产生4个单倍体精子细胞，后者在形态分化之后，产生成熟精子。Leydig细胞负责生成睾酮，后者是精子生成过程的必要条件。其他一些激素也与精子生成有关。LH (Luteinising hormone) 和FSH (follicle stimulating hormone) 对于正常的精子生成有重要影响，前者刺激Leydig细胞产生睾酮和保持有丝分裂，后者则影响Sertoli细胞。Sertoli细胞产生抑制素B (inhibin B)。精子生成过程大约耗时3周。

表1

细胞	倍性/染色体数目	过程
精原细胞	二倍体/46	精母细胞发生
初级精母细胞	二倍体/46	精子细胞发生 (第一次减数分裂)
次级精母细胞	单倍体/23	精子细胞发生 (第二次减数分裂)
精子细胞	单倍体/23	精子发生
成熟精子细胞	单倍体/23	精子发生

3. 精子染色质结构

精子的染色质压缩地非常紧密，结果造成父系基因组失活。核蛋白和DNA以独特的形式相连。精子细胞核经重塑和压缩后与修饰后的组蛋白相结合，然后经过转换蛋白转移，最终与鱼精蛋白结合。不过，大约15%的精子DNA和组蛋白包装在一起，原因在于这种特殊的方式可以使卵子在精子进入后被活化。鱼精蛋白和精子DNA紧密结合成为核鱼精蛋白复合物，二硫化物在鱼精蛋白半胱氨酸富集区的交联造成染色质浓缩和父系基因稳定，这使得生殖道发生氧化或者温度升高时，男性基因组得到保护。人类睾丸表达2种鱼精蛋白：鱼精蛋白1(P1)和鱼精蛋白2(P2)。对于人类精子而言，P1和P2应该是等量的。P1和P2比例的不平衡与男性不育有关。基因敲除小鼠模型显示鱼精蛋白单倍体不足（发生突变后，正常的等位基因所编码的蛋白不足以维持生物学功能）直接损害精子生成和胚胎发育。随着鱼精蛋白的演进，会增加带阳离子残基的数量，这些阳离子残基与DNA紧密结合形成复合物。

P1以成熟蛋白形式合成，P2以前体形式合成。与P2不同，P1是1-4N端扩展的残留物。P2是一种以Cys2-His为基元的锌指蛋白，两者只在某些哺乳动物中表达。P1和P2在与DNA结合之前都要经过转录后修饰的过程。Khara等 (1997) 首次比较了P1/P2比例与IVF的关系，他们发现当P1/P2 比例在0.55和0.29 之间时，受精指数(FI) $\geq 50\%$ ，而对于FI小于50%的不育患者而言，1/3患者的P1/P2 比例超出这个范围(Khara 等, 1997)。Carrel 和 Liu (2001) 报道在不育男性中未能检测到P2的存在。

4. 精子生成过程中DNA损伤

精子DNA损伤明显与男性不育有关。在一小部分能够生育的男性精子中也可以检测到DNA水平的损害。引起DNA损害的因素包括鱼精蛋白缺乏、细胞凋亡、化疗、活性氧分子 (ROS)、吸烟和精索静脉曲张等。氧化应激可使线粒体产生的自由基活化，进而导致DNA氧化损伤，产生DNA 碎片。它是造成DNA损害的主要原因。氧化应激产生的后果之一是形成ROS，精子线粒体是产生ROS的最大来源。因为精子只含有少量的细胞质，不含有抗氧化分

子和修复系统，因此精子易受ROS 攻击产生碎片。DNA碎片是单链和双链断裂形成的片段，与弱精、畸形精子和少精有关。同时，DNA碎片也对IVF周期的结局有预测价值。明显来源于父系的性染色体三体综合征已有报道。某些染色体异常的精子能够使卵子受精。精子的非整倍体率增加与低植入率和怀孕率有关。

5. 细胞凋亡

细胞凋亡是精子生成过程中正常的生理过程。大约75%的精子被这种程序性细胞死亡自毁。细胞凋亡是早期生殖细胞的选择性因素，可以阻止其过度增殖。同样，精子生成过程中的异常精子也可以被清除。但一些DNA 损伤或破碎的精子可以逃脱细胞凋亡而存在于精液中。异常精液参数的男性有着高水平的细胞凋亡蛋白Fas，Fas与低精子浓度和异常精子形态明显相关。同时，其他的一些凋亡蛋白如Bcl-x、p53、caspase 和anexin V也在人类精液中被发现。

6. 氧化应激

活性氧分子(ROS)是细胞正常代谢的产物，也是白细胞吞噬过程的产物。自由基由于有不成对电子而具有高度化学活性。ROS影响精子DNA的完整性,通过引起碱基缺失和突变能够损伤DNA。在不育男性的精液中可以检测出高水平的ROS。由于精子蛋白巯基被氧化，ROS会造成DNA的过度压缩。生殖道感染可导致白细胞精子症和DNA损伤。抗氧化治疗可以减少精子DNA碎片。

7. Y染色体微缺失

Y染色体基因微缺失与精子生成过程的受阻或缺失有关。Y染色体的三个无精症因子区域有AZFa、AZFb和AZFc，它们是精子生成过程的关键因素。AZFa区缺失只是与Sertoli细胞有关，AZFb区缺失与精子发生阻滞有关，AZFc区缺失与精子细胞阶段的精子发生阻滞有关。大约5~15%的不育男性会发生Y染色体微缺失。先前的研究显示：如果父亲为少精症男性，那么通过ICSI技术出生的男孩会增加携带Y染色体微缺失的风险。

8. 中心体

中心体由2个互相垂直排列的中心粒和中心粒周围物质组成。在精子和卵子融合后，精子尾部并入卵细胞质中，中心粒区形成精子星状体，它指引雌原核游向雄原核，此过程中母系中心体全部降解，因此受精卵的中心体主要遗传自精子。中心体丧失功能将导致染色体异常。人类精子中心体负责正常的有性生殖和早期胚胎发育。

9. ART中的精子优选新技术

常规的精子准备技术是通过密度梯度离心和上游法优选。该技术依赖于沉降或迁移来分离精子，并不直接以精子固有特性（如细胞凋亡、DNA完整和细胞膜成熟）为目标。现在，磁激活细胞分选法(MACS)成为精子分离的新技术，该法以存在于精子的膜联蛋白V作为凋亡标记。另外，因为成熟精子膜上有与透明质酸捕获的结合位点，因此还有改良的ICSI（称为PICSI），其常被用于单个精子细胞挑选。总之，精子能够根据表面电荷（电泳技术）、凋亡情况、精子膜成熟度和精子极端形态来进行优选。用电泳技术分离精子是一种根据精子大小和带负电电荷数的电泳技术。使用磁激活细胞分选系统，外化的磷脂酰丝氨酸

(细胞凋亡标记物)可以绑定带有膜联蛋白V的共轭顺磁性微粒，从而分离凋亡的精子(MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Germany)。

10. 参考文献

- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991; 40:25-94.
- Lewis JD, Song Y, de Jong ME, Bagha SM, Ausio J. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 2003; 111:473-482.
- Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV. Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem* 2004; 279:20088-20095.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 4:417-435.
- Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:519-527.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005; 26:741-748.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis WD i sur. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003; 69:211-217.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* 2007; 8:227-234.
- Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 1:59-66.
- Larson KL, DeJonge C, Barnes A, Jost L, Evenson DP. Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum Reprod* 2000; 15:1717-1722.
- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful *J Androl* 2009; 3:219-229.
- Kutchino Y i sur. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327:77-79.
- Aoki VW, Carrell DT. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 2003; 5:315-324.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 4:1027-1036.
- Burrello N i sur. morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligoasthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004; 19:2298-302.
- Glander HJ, Schaller J. Localization of enzymes in live spermatozoa by cellprobe reagents. *Andrologia* 1999; 31:37-42.
- Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality. *Fertil Steril* 2000; 74:245-250.
- Picture Number 1 was taken

from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_en.svg

Picture Number 2 was taken form: <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato03.html>

Tamer MS, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. Hum Rep Update 2011; 719-733.

(杨惠祥译)

IntechOpen

IntechOpen

第六章 正常核型不育患者的减数分裂染色体异常和精子

FISH 检查

Simón Marina, Susana Egozcue, David Marina,

Ruth Alcolea and Fernando Marina

Instituto de Reproducción CEFER. ANACER member, Barcelona

Spanish

1. 引言

一般认为不孕不育影响15%的育龄期夫妇，其中单独女方因素38%，单独男方因素20%，双方因素27%，原因不明占15%(Ferlin et al., 2007)。包括单独和混合原因在内的男方因素为50%。大约7%~8%的男性会面临不育或引起女方流产的问题。在造成不育的原因中，染色体因素占比例很高。在发生于妊娠前三个月的流产者中50%的女方卵子存在非整倍体现象(Hassold et al., 1980)，在中期和晚期妊娠流产者中，非整倍体率相应降低到15%和5%(Simpson, 2007)。在活婴中约0.5%~1%显示存在非整倍体(Gardner and Sutherland, 2004)。不育群体中，归因于染色体或基因者占15%(Griffin and Finch, 2005)。

目前，尚不清楚仅仅是减数分裂的染色体异常而有丝分裂的染色体核型正常者的患病率。因为通过射出精液得到的减数分裂细胞中、初级精母细胞和次级精母细胞的量少且状态不佳，不足以进行检测，因此检验精子染色体异常需要行睾丸活检，而这是有创伤性操作。与能影响多个器官和功能的有丝分裂不同，单独的减数分裂染色体异常主要影响生育能力，会引起一项或多项精子参数（精子计数、活动力和形态）改变，甚至会导致非整倍体配子的形成。在临床工作中，减数分裂异常的男性会出现原发性或继发性不育或流产。继发性不育或者再次生育困难者可以解释为“发生改变的细胞系与其他正常细胞系共存(染色体嵌合现象)”。

减数分裂染色体的异常情况可以通过由睾丸活检获得的减数分裂细胞直接进行观察研究。要了解其对生育的影响需要：1) 明确患者生育史（包括现在和以前的配偶）；2) 精液分析，结果可以是3个基本参数正常、某项或全部精子参数异常、无精子等；3) 光镜下研究睾丸组织病理，结果可以是在精母细胞 I 或 II 水平的完全阻滞也可以有明显正常的精子发生；4) 研究精子中的非整倍体。

如果不育是由于基因而非染色体的改变如Kallmann综合征、囊性纤维化、圆头精子症、9+0 综合征、Y染色体微缺失等所引起的，不是本章要讨论的内容。尽管如此，因为基因异常可能是染色体减数分裂异常的基础，所以这只是在理论上对基因异常和染色体异常进行区分。

本章描述了精子荧光原位杂交技术（FISH）的检查结果和通过不育患者的睾丸活检进行减数分裂染色体研究的结果。在进行这2种检查的患者中，我们可以提供准确临床数据者超过60例。

本章目的有2个：a) 了解不育男性中精子非整倍体和睾丸生殖细胞减数分裂的发生率和

类型；b) 研究两者的相关性。

2. 精子生成

精子生成过程发生在成人睾丸的曲细精管中，要持续大约64 d(Heller and Clermont, 1964)。可分为以下3个不同阶段：

2.1 精原细胞阶段

此阶段的精原细胞发生有丝分裂。其中一部分保留下来做为细胞储备用于之后的再次分裂，其他的细胞进入后续的减数分裂。精原细胞位于曲细精管的基部小室内，处于曲细精管壁、Sertoli细胞和细胞间紧密连接之间。Sertoli细胞和紧密连接形成血液-睾丸屏障，在曲细精管中央制造出无血管区（管腔室）。精原细胞进入减数分裂后因紧密连接的分离和重构而穿过Sertoli细胞间隙，从基部移动到管腔室(Byers et al., 1993)。

2.2 精母细胞或减数分裂阶段

在此阶段，共有2次减数分裂，分别发生在精母细胞 I 和 II 时期。在第一次减数分裂时，初级精母细胞产生2个次级精母细胞。次级精母细胞分裂时，即第2次减数分裂或平均分裂，生成2个精子细胞。这个过程通常持续大约2周(Heller and Clermont, 1964)。最终，1个精子细胞生成1个精子。

2.3 精子形成阶段

此阶段没有细胞分裂，但精子细胞分化成为精子。

2.4 精子排放过程

精子脱离Sertoli细胞，释放入曲细精管内。减数分裂和精子形成阶段发生于曲细精管的管腔室。在那里有着特殊的激素环境，尤其存在高浓度的睾酮。本章将只涉及减数分裂阶段。

3. 减数分裂

在减数分裂过程中，发生了2个不可或缺和独有的事件：基因重组和细胞减数分裂。基因重组是因配对的同源染色体基因之间发生交换而产生的，2条同源染色体的其中1条来自于父亲，另1条来自于母亲。这种基因互换产生了庞大的精子（也有卵母细胞）基因变异，大约 2^{23} /配子和 $2^{23} \times 2^{23}$ /胚胎。因此，基因互换有助于基因重组。这些新基因组合中某些有利于个体和物种，其他的则或多或少是有害的。减数分裂是孟德尔遗传规律的物质基础。减数分裂过程中的第二个关键事件是减数细胞分裂。在希腊语中Meiosis意味着减少。人体全部的有核体细胞中都包括46条染色体（23对）。只有经过第一次减数分裂后生成的细胞：次级精母细胞、精子细胞和精子，有着23条而不是23对染色体。次级精母细胞的每条染色体包括2条染色单体，而精子细胞和精子的染色体只包括1条染色单体。与减数分裂相反的过程是受精。此过程中，单倍体精子的染色体 ($n=23$) 和卵母细胞结合，也就是单倍体 ($n=23$) 通过融合产生受精卵，后者是二倍体，带有23对染色体 ($n=46$)。

有性生殖就是以减数分裂和受精为基础的。减数分裂可以确保世代的染色体数目不变，同时与祖先相比又有着不同的基因组合。除性染色体XY以外的染色体都有同源染色体：1条来自于父亲，另1条来自于母亲。X染色体总是母系遗传，Y则是父系来源。染色体是由着丝粒确定的，其可以有1或2条染色单体—称为姐妹染色单体—这取决于细胞周期时

相。因为一条姐妹染色单体是另一条的拷贝，所以两者之间不发生基因重组。基因重组发生在同源染色单体之间，而不是姐妹染色单体之间。

3.1 第1次减数分裂

减数分裂前期或细线前期阶段：在减数分裂前期的合成过程中(S相)，每条染色体通过完全相同的DNA复制产生2条染色单体，称为姐妹染色单体，两者在细胞周期的G2阶段保持连接。减数分裂前期的合成是相当长的过程，要持续若干个24 h。当S相结束后，每对同源染色体的DNA发生四分裂（称四分体），成为4条染色单体。来自于同一条染色体的2条染色单体称为姐妹染色单体，被命名为“同源相关染色单体”。姐妹染色单体间的联合通过二者之间的指环结构所维持，是由来自于黏连蛋白复合体的蛋白所形成的(Gruber et al., 2003)。黏连蛋白复合体在着丝粒附近，由黏连蛋白shugoshin和sororin组成。Shugoshin位于近着丝粒区(Lee et al., 2008)。

3.1.1 分裂前期 I

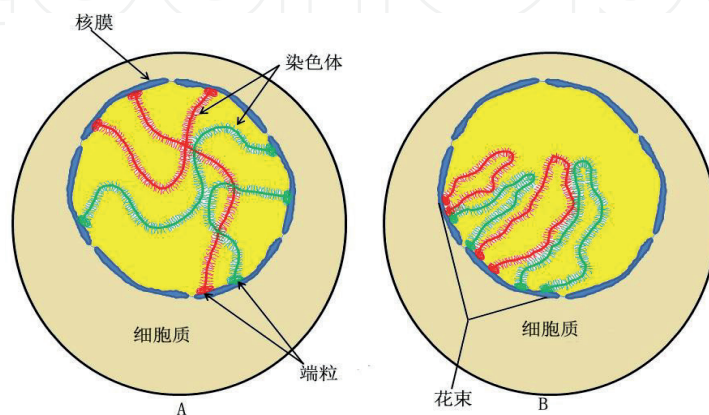
染色体附着于核内膜

减数分裂开始时，分布于整个细胞核内被端粒附着的染色体向核膜移动(图1A)。核膜在端粒附着区密集。端粒沿着核膜的内面移动，围绕中心体聚集形成花束(图1B) (Zickler and Kleckner, 1998; Scherthan, 2001; Bass, 2003)。花束的形成需要肌动蛋白(Trelles-Sticken et al., 2005)。每条染色体靠近各自的同源染色体。如果端粒没有附着于核膜和/或没有形成花束，配对和基因重组就会发生改变(Trelles-Sticken et al., 2000)。花束状结构存在于细线期末和整个偶线期，在粗线期消失。已配对且同源间的基因发生重组后的染色体分布在全部核膜表面，但仍然附着在一起。当端粒与核膜分离后，细胞进入终变期(review: Alsheimer, 2009)。

细线期:同源染色体匹配排列

在分裂前期I的第一阶段或细线期，同源染色体几乎平行于端粒匹配排列，这受沿染色体形成的长细链的制约。这些长细链称为侧体(LE)。每个LE与一对姐妹染色单体相关联。当附着于核内膜时侧体会扩展。

图1. 端粒附着于核膜(A)。花束形成(B)

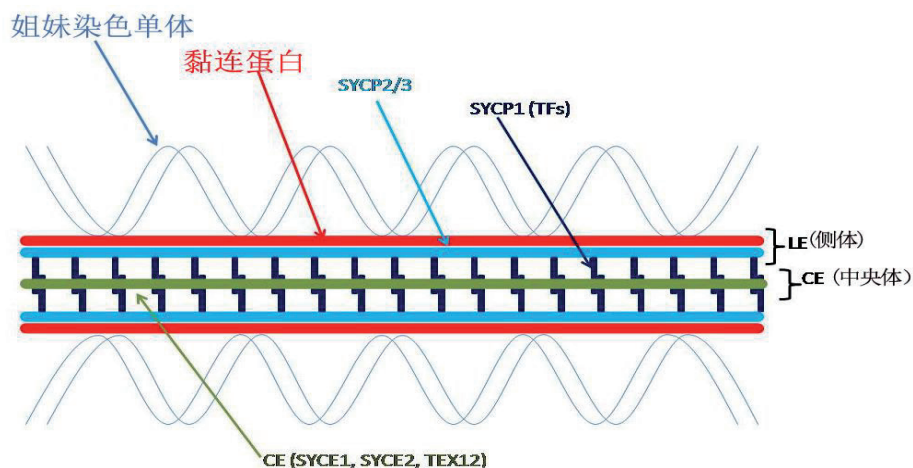


偶线期：同源染色体配对，或联会期

紧随细线期之后的是偶线期，其间染色体变粗，并与同源染色体配对。XY配对组成性染色体。配对（或联会）需要形成联会复合体(SC)，Fawcett曾通过扫描电镜对其进行观察描述 (Fawcett, 1956)。SC (图 2)是一种蛋白结构，带有3个纵体，2个侧体 (LE)，1个中央体 (CE)。侧体可在前面的细线期观察到，中央体提供SC的稳定性 (Hamer et al., 2006; Bolcun-Filas et al., 2007)。侧体平行于中央体，2个侧体距中央体的距离相同。侧体伸出核膜。SC的结构被纤细的横丝(TF)所完善，横丝连接侧体并垂直于侧体和中央体。每个侧体与一对姐妹染色单体相连。同源染色体连接紧密，二者之间距离约100 nm (Zickler, 2006)。

侧体由蛋白SYCP2、SYCP3和黏连蛋白复合体组成，包括涉及减数分裂的 β -SMC1、REC8和STAG3 (Revenkova and Jessberger, 2006)。蛋白SYCE1、SYCE2和TEX12被中央体识别 (Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006)。蛋白SYCP1被横丝识别 (Meuwissen et al., 1997)。染色质附着于侧体，形成一系列环状结构。

图2. 联会复合体(SC)模式图



粗线期：基因交换或重组

基因交换或重组始于DNA双链断裂(DSB)，启动于细线前期和细线期，由拓扑异构酶II生成 (Lichten, 2001; Keeney and Neale, 2006)。基因重组发生在同源染色单体之间，而不是姐妹染色单体之间。由于这个过程在每个精母细胞中独立发生，所以来源于同一染色体的不同染色单体之间存在基因差异。它主要发生在基因座区域，临近端粒，被称为热点 (Lynn et al., 2004)。DSB是基因交换高度活跃的标记，其发生在热点，而不是随机或均匀一致发生的 (Petes, 2001; Nishant and Rao, 2006; Buard and de Massy, 2007)。

热点活动并非由局部DNA序列所决定 (Neumann and Jeffreys, 2006)，因此在基因重组中存在着表观遗传调控。决定基因组热点位置的因素和机制尚不清楚。据信热点是重组的最小功能单位。要想发现热点，分辨能力必需达到100~200 kb。越接近端粒，越易发生基因交换 (Lynn et al., 2004)，有人通过光镜观察认为热点是染色体交叉(交换)的基础 (Nishant and Rao, 2006)。每个交叉只有2条同源染色单体交叉在一起，其他2条不参与。

在粗线期和双线期观察到的交叉数量是相同的，其数目从50~53，组内和组间个体差异是3~10% (Codina-Pascual et al., 2006)。在粗线期，同源染色体只通过交叉或交换连接。可在XY的拟常染色体区观察到单条交叉。这对性染色体有一致密染色质并形成小体，称为“性体”，紧贴在精母细胞核膜的内面 (Solari, 1974)。用于基因交换的DNA链断裂处必需要被修复。DNA链的3'断端呈游离状态，在重组酶作用下在相应的同源染色单体的另一条DNA分子上寻找互补碱基序列。

双线期：联会消失

在此阶段联会复合体解离。同源染色体联会消失、分离，但仍然通过交叉保持关联。姐妹染色单体也继续连接。

3.1.2 分裂中期 I

此阶段核膜消失，同源染色体对(二倍体)沿着纺锤体的赤道排列。二倍体染色体有2个着丝粒和4条染色单体。每条同源染色体最少需要1个交叉用于正确分离。

3.1.3 分裂后期 I

在此阶段，同源染色体臂失去黏合力，同时交叉消失和分离。着丝粒向纺锤体的微管接近，这会使同源物向相反的两极方向拉开。各有一半染色体通过纺锤体纤维分别向两极接近。同源染色体完全分离，而姐妹染色单体没有分离。每条染色体有2条染色单体。着丝粒不复制和分裂。同源染色体的分离需要在分离酶作用下释放REC8黏连蛋白 (Kudo et al., 2009)。姐妹染色单体的臂间连接丢失，而着丝粒的黏连蛋白仍然存在。

3.1.4 分裂末期 I

每个次级精母细胞有单倍体染色体 ($n=23$)，但每条染色体由2条染色单体组成。所有的同源染色体被分别拉向两极，形成核膜。

3.1.5 分裂间期

分裂间期处于第一次和第二次减数分裂之间，时间很短。第二次减数分裂前不需DNA合成，过程迅速，类似于有丝分裂。细胞质分裂不完全，2个细胞通过细胞间桥保持信息传递。

3.2 第二次减数分裂

在分裂后期 II 阶段，黏连蛋白 shugoshin 失活，着丝粒黏连蛋白丢失 (Marston and Amon, 2004)。位于着丝粒边缘椭圆板上的2个着丝点分离。着丝点依附于纺锤体微管，染色单体在分离酶作用下分离，这与分离后期 I 相似 (Kudo et al., 2009; review: Barbero, 2011)。

此阶段产生的细胞是精子细胞，且只有一套单倍体染色体 ($n=23$)，每个染色体有1条染色单体。进而通过细胞分化，精子细胞形成精子。

减数分裂持续大概2周时间，其中分裂前期 I 大概需要12d，其他阶段1~2d左右。在这2周中，发生了2次细胞分裂，1个四分体DNA细胞产生4个单倍体细胞。每个细胞携带不同的基因内容，基因重组和单倍体化也已发生。

4. 减数分裂染色体异常的原因

减数分裂改变可归因于不同的原因和不同的机制。总体而言，我们可以将其分为以下

几组。

4.1 精原细胞有丝分裂异常影响减数分裂

克氏症 (Klinefelter) 患者核型为47, XXY。其XY配对发生改变, 至少其父的部分精原细胞像是整倍体 (Bergère et al., 2002)。在减数分裂水平, 罗伯逊异位和相互异位分别产生了三倍体和四倍体。

4.2 涉及减数分裂的基因异常

减数分裂过程中有超过200个基因进行表达, 如果在其他组织和器官中同时有该基因表达的话, 男性将显示出其他的病理表现。如黏连蛋白的改变(黏连蛋白病)会影响减数分裂、DNA修复 (Watrin and Peters, 2006) 和基因表达 (Dorsett, 2007)。罗伯茨综合征就属于黏连蛋白病 (Gerkes et al., 2010)。SC蛋白的改变会导致不育。SYCP3蛋白的基因杂合子突变可导致无精症 (Miyamoto et al., 2003)。缺少REC8黏连蛋白, 改变了染色体联会也会造成不育 (Bannister et al., 2004; Xu et al., 2005)。Shugoshin和sororin是来源于黏连蛋白家族的蛋白, 是保持着丝粒聚合的必要条件。在减数分裂II阶段shugoshin蛋白失活才引起姐妹染色单体的分离, 如果其没有失活, 染色单体无法分离, 就会产生非整倍体配子。已有报道黏连蛋白SMC1 beta的缺乏会造成粗线期停滞, 而小鼠由于缺少黏连蛋白SMC1 beta可导致不育 (Revenkova et al., 2004)。横丝上缺少SYCP1蛋白可造成染色体匹配而无法配对 (de Vries et al., 2005)。

4.3 表观遗传学

表观遗传学是研究在不改变DNA碱基序列的前提下, 临时发生的可遗传的基因表达的改变。DNA甲基化程度影响基因表达。甲基化可以受氯化镉、砷、镍化合物的影响。还有人声称错误的DNA甲基化可以诱发产生非整倍体配子。

4.4 有机磷农药

有机磷农药可通过血-睾丸屏障, 干扰基因分离影响生育 (Perry, 2008)。这种影响取决于暴露的时间和农药浓度 (Härkönen, 2005)。

4.5 叶酸缺乏症

叶酸为DNA甲基化提供甲基对, 如果含量不足时会导致基因分离的异常。

5. 减数分裂染色体异常的诊断

对于核型正常而减数分裂异常的诊断需要对睾丸或者精子的非整倍体情况进行直接研究, 但是睾丸活检是有创性操作, 具有局限性。睾丸实质组织碎片中没有或者只有极少量的减数分裂细胞, 而且鉴于第二次减数分裂时间很短, 因此只能在分裂前期I找到分裂细胞, 而非分裂中期I或分裂中期II (Hultén et al., 1992) (图3)。最常用的方法是观察第一阶段(分裂前期 I)细胞, 它们在减数分裂阶段持续时间最长。减数分裂研究的另一个局限性是难以明确特有的染色体。

在减数分裂染色体的研究中很容易发现有2种细胞系, 1种是正常减数分裂细胞系, 另1种是异常减数分裂细胞系, 评估每种细胞系所占的百分比。

如果应用荧光原位杂交技术 (FISH) 研究精子非整倍体情况, 要想获得有统计学意义的结果最少需要500到1000个精子。因此, FISH技术在无精症患者中无法应用, 在隐匿性无精子症患者中的研究价值也较低。

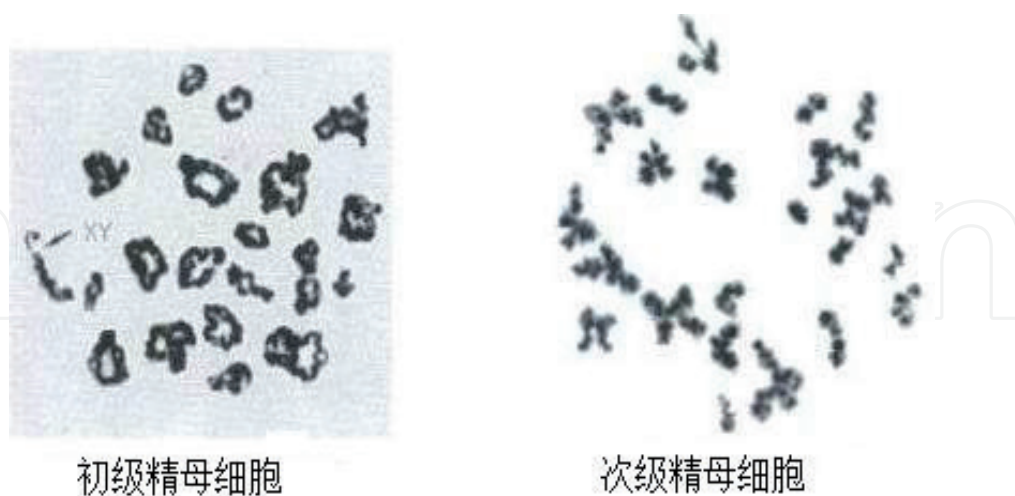
FISH 使用的探针只能为经过研究的以下染色体提供信息，通常是5条：13, 18, 21, X 和Y。如果非整倍体影响的是其它19对染色体，则FISH无法检测出来。虽然可以用FISH或捕获比较基因组杂交技术(CGH, comparative genomic hibrization)研究全部的染色体，但花费非常巨大。由于FISH检测无创，虽然有局限性，其仍然是诊断减数分裂异常最常用的方法。显然，如果FISH结果有异常睾丸活检就没有必要再进行。既往的生育史（例如，父亲和过去的伴侣已经有了健康的孩子）则可以排除异常的减数分裂。

体检不能提供减数分裂典型的异常信息。常规的精液分析也无法揭示具体的减数分裂异常，即使减数分裂异常者中少精症和严重畸形精子症的发生率增高。

6. 减数分裂染色体异常的影响

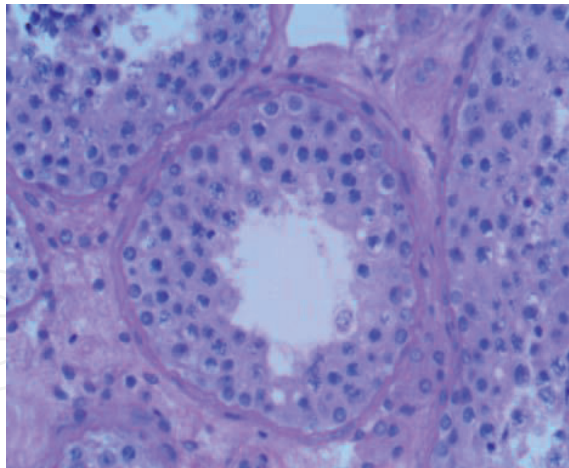
减数分裂过程复杂，需要大量基因和蛋白质的精确调控。某些基因只在睾丸中表达，具有减数分裂特异性，这些基因的异常会影响生育能力。有些基因不只在睾丸表达，也在其他组织和器官中表达（比如黏连蛋白复合体上的基因），这些基因的异常可能影响生育能力，也可能显示其他的病理变化。所有人，包括能够生育者，都可能存在减数分裂异常。由于这种异常的类型和影响减数分裂细胞的数量不同，其对生育力的影响程度也有很大差异。减数分裂染色体异常会影响睾丸组织，可以在不同阶段阻滞减数分裂的进程。光学显微镜下，可以判断出精原细胞 I 和精原细胞 II 的成熟阻滞，虽然这种情况出现的几率不大。这种阻滞可以是完全的也可以是不完全的(图4)，如果是不完全阻滞，减数分裂可以进行下去，但数量减少。

图3. 正常初级精母细胞和次级精母细胞



有时减数分裂异常并不阻滞进程，此时，在光镜下观察睾丸组织学表现是正常的。在精子水平，减数分裂异常的影响可能是：1) 如果完全阻滞，无精症；2) 根据成熟阻滞的严重程度，精子总数明显或轻度减少；3) 精子总数正常甚至增高；4) 程度不等的畸形精子症。

图4. 精曲小管HE染色 (×200)

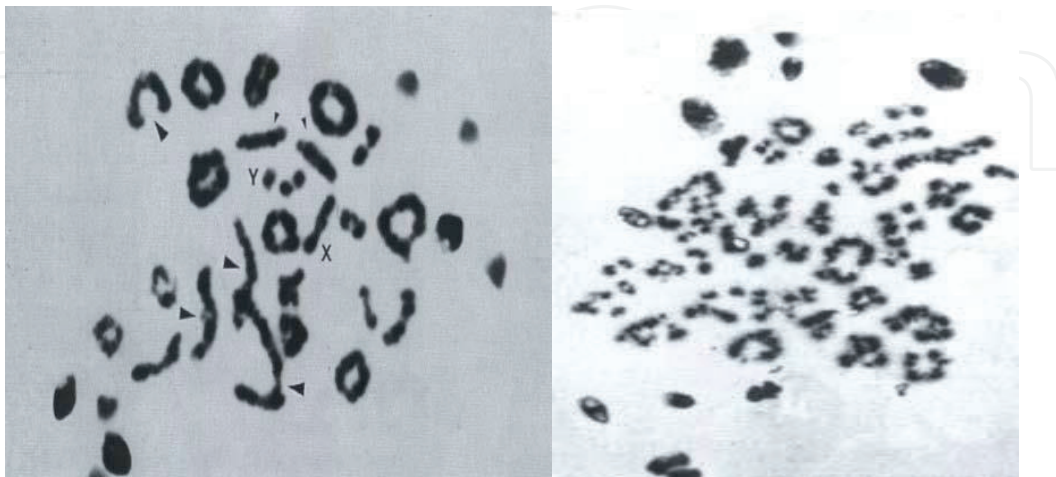


在通过睾丸活检进行的减数分裂染色体研究中发现，异常主要在分裂前期 I (配对异常) 和分裂中期 I (联会消失) 阶段 (图5)，而分裂中期 II (二倍体，多倍体) 阶段较少出现。目前认为，缺乏此阶段细胞不是减数分裂异常的结果。减数分裂染色体异常会生成非整倍体配子、染色体易位、缺失、倒置等。我们的关注点在于非整倍体配子。

临床上，因减数分裂完全阻滞而造成的无精症者是无法生育的。减数分裂不完全性阻滞和低精子总数的患者会降低生育能力，可能导致难以怀孕、怀孕后流产、或者是已有健康后代却难以再有其他后代 (包括有病的孩子) 等，这有赖于精子总数和非整倍体配子的数量。考虑到影响妊娠和女性生育能力的因素多种多样，量化上述情况非常复杂。

对于低精子总数者，如果精子是整倍体则 IVF-ICSI 治疗有益，但对于精子为非整倍体者，IVF-ICSI 则无法解决问题。这就是为什么我们要了解患者的精子是否为非整倍体和所占比例的原因。

图5. 二价联会消失(左) 和非特异联会消失(右)



7. 我们的经验

全部患者数据来自于Barcelona 生殖中心。并非所有患者都需要通过精子FISH和/或睾丸活检来检测减数分裂染色体的情况。

在整个实验过程中，精子FISH和/或睾丸活检的指征是不一致的。开始阶段，如果患者有健康的男孩或精液参数正常，就不进行FISH 检测，所以纳入的少弱畸形精子症（OAT）患者更多一些。患者被分成3组：

7.1 患者分组

1组 为FISH检测组 ($n=1,813$; 100%)

该组不育患者的染色体核型正常，用于FISH检测的精子数量足够。

2组 为睾丸活检组 ($n=216$; 100%)

因不育或配偶流产，该组患者在过去3年内都曾行睾丸活检，染色体核型均正常。精液检查结果从无精症到正常精液都有。

3组 为同时进行FISH检测和睾丸活检组 ($n=60$; 100%)

该组患者同时进行FISH检测和睾丸活检，包括不育者或配偶易流产者。

但是，下列患者被排除：i) 后代健康；ii) 患者的染色体核型存在没有病理意义的形态变异，比如9号染色体臂间倒位；iii) 患者精子总数低于 0.10×10^6 ，因为难以评估FISH结果；iv) 患者精液含有很多非生殖细胞，这会干扰FISH结果。

7.2 精液分析

精液分析操作根据WHO指南(WHO, 1999)进行。部分病例的FISH标本取自相近的精液样本，大多数患者的精液分析和FISH标本取自同一份精液样本。

7.3 FISH技术

精子标本在甲醇/醋酸溶液(3:1)中固定，玻片在二硫苏糖醇(DTT)(5 mmol/L)和Triton X-100(1%)中孵育以解聚精子核(详见Vidal et al., 1993)。使用着丝粒探针(Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA)得到染色体18(浅绿色)，X(绿色)和Y(桔黄色)的3色FISH，用特殊位点探针得到染色体13(绿色)和21(桔黄色)的2色FISH。孵育和检测的步骤按照Vysis试剂盒的说明书进行。结果评价通过Olympus BX51显微镜(滤片是专用的FITC、TRITC、Aqua和DAPI/FITC/PI 滤片)进行。只有通过形状和/或存在尾部来确定是精子细胞核后，才进行评价。以下情况的精子细胞核不予评价：1) 精子重叠分布或没有明确轮廓；2) 存在二体和二倍体者，因二者信号强度相同，如果加以区分的话，分离距离要相当于其中之一的直径(Blanco et al., 1996)，杂交效率必需 $\geq 98\%$ (即单倍体精子百分比加上两倍二倍体精子百分比加上二倍体精子百分比)(Blanco et al., 1996)。

每个患者最少分析1,000个精子(2种探针各500个精子)。统计学分析用卡方检验， $P < 0.05$ 有统计学意义。染色体异常频率用百分数和95%可信区间表达。对照组结果已经发表(Blanco et al., 1997)。

7.4 减数分裂细胞睾丸活检研究

患者于门诊在局麻下行单侧开放式睾丸活检。睾丸组织置于低渗氯化钾溶液(0.075 mol/L)中，根据文献(Egozcue et al., 1983)固定。用低渗液处理减数分裂细胞使之肿胀，在分裂前期打碎细胞核膜，使纺锤体和二价体染色体(在第一次减数分裂时彼此联合

的一对同源染色体)的正常形态丢失。在双线期可能看到交叉点(叫做chiasmata, 基因交换在此进行)。在终末期(前期I的最后阶段)和中期I难以区分染色体, 我们用“分裂中期I”描述这两个阶段。由于继发出现细胞浓缩, 该方法除了性染色体和9号染色体外, 不能用于其他染色体。

7.5 结果

7.5.1 1组. FISH 检测组($n=1813$)

1,813例患者中, 1,576例(86.9%)结果正常, 237例(13%)异常。图6,7,8显示FISH结果和精液检查结果的关系。

7.5.2 2组睾丸活检组($n=216$)

若患者的精母细胞在分裂早期I和分裂中期I阶段没有改变, 就认为结果是正常的。缺少精母细胞II不是病理变化。如果正常和改变的精母细胞共存则诊断为嵌合现象。此组包括各种最常见的异常情况。结果见表I。42例(100%)减数分裂异常者的类型见表II。

图6. FISH 结果和精子总数之间的关系图

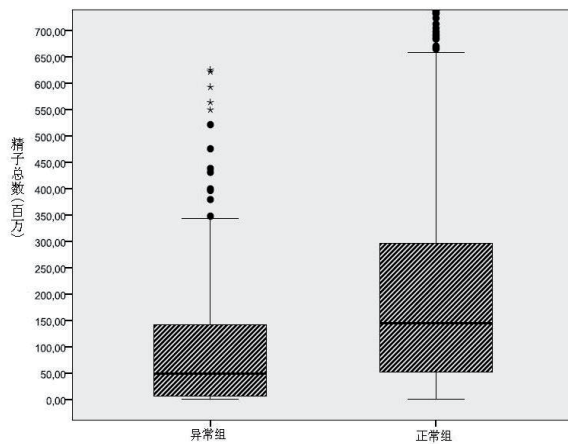


图7. FISH 结果和精子活动力之间的关系

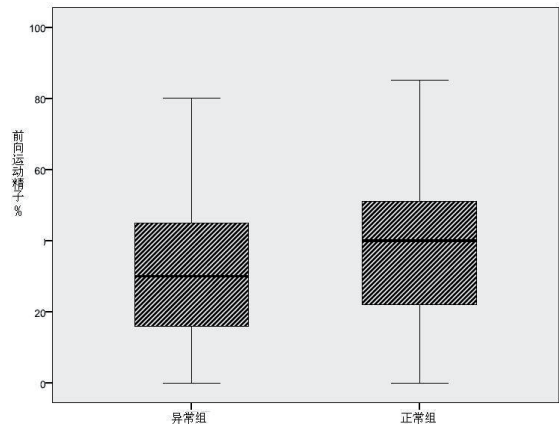


图8. FISH 结果和精子形态之间的关系

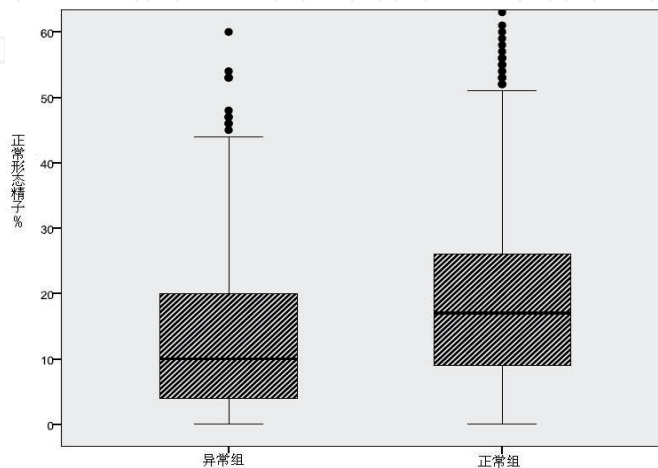


表 I. 睾丸活检减数分裂检测结果

诊断	例数	%
正常减数分裂	67	31
仅有 Sertoli 细胞	16	7.4
仅有第一次有丝分裂前期细胞	31	14.3
异常减数分裂	42	19.4
嵌合	60	27.7
合计	216	100

表 II. 减数分裂异常情况

减数分裂异常	例数	%
PI 期异常匹配	6	14.2
二价染色体联会消失	14 ^a	33.3
交叉点数量减少	3	7.1
MI 期存在单价染色体	11 ^b	26.2
XY 分离	2	4.7
MI 期超倍体	5	11.9
MII 期二倍体	1	2.3
合计	42	100

a) 4例患者次级精母细胞中存在二倍体，2例患者的全部联会消失，b) 2例患者XY对分离
PI, MI和MII（细胞位于分裂前期I、分裂中期I和II）

7.5.3 3组同时进行FISH检测和睾丸活检组 ($n=60$; 100%)

其中18例患者的FISH和睾丸活检结果均未发现异常(30%) (表III)，该组有13例患者的配偶有流产史(21.6%)，6例有正常减数分裂(33.3%)。余下42例中的7例有减数分裂异常(16.6%) (表IV和表V)。虽然样本数量少，但正常组和减数分裂异常组间的流产率差异有统计学意义。在18例睾丸组织活检正常者中，13例有减数分裂中期II像缺失(72.2%)，在这13例中，9例精子总数正常，他们的分裂中期II像可能没有完全缺失。这可以解释睾丸活检样本的分裂中期II像经常缺失(Hultén et al., 1992)。

25例患者的精子FISH正常而睾丸减数分裂显示异常。表IV显示了精液检查和睾丸活检减数分裂的结果。

表V数据描述了17例精子FISH和睾丸减数分裂均异常者。

表VI给出了该组FISH的异常情况。

这17例患者中，只有1例有妻子流产史，9例的精子总数正常(52.9%)，9例(52.9%)的精子活力正常或中等偏低($\geq 30\%$)，11例(64.7%)的精子形态正常或中等偏低($\geq 20\%$)。

表IV和V显示了减数分裂异常者的个人资料($n=42$; 70%)。全部患者($n=42$; 100%)都有减数分裂前期I像和性染色体。24例(57.1%)同源染色体对粗线期正常。在分裂中期I最常见的异常是不完全性联会消失，这可影响减数分裂中期I像(29/38, 76.3%)，4例(10.5%)可以观察到完全性联会消失。

25例患者的精子FISH正常而睾丸减数分裂显示有改变。表IV显示了精液检查和睾丸活检减数分裂的结果。

表V数据描述了17例精子FISH和睾丸减数分裂发生改变者。

表VI给出了该组FISH的异常情况。

表 III . FISH检测和减数分裂检测结果均正常的患者 (18/60; 30%): 流产情况、精液分析和检测减数分裂

病 例 号	流产情况	精液分析			减数分裂检测结果		
	例数	精子总数 ($\times 10^6$)	活力 (%)	形态 (%)	分裂前期I	分裂中期I	分裂中期II
1	无	738	20	8	正常	正常	正常
2	无	205	10	3	正常	正常	正常
3	无	203	25	6	正常	正常	正常
4	无	157	50	17	正常	正常	正常
5 ^a	无	121	15	3	正常	正常	无
6	无	116	30	40	正常	正常	无
7 ^b	无	104	5	18	正常	正常	无
8	无	85	55	17	正常	正常	无
9	无	57	25	18	正常	正常	无
10	无	1.1	40	38	正常	正常	无
11 ^c	无	0.7	0	4	正常	正常	无
12	无	0.13	0	8	正常	正常	无
13	6	564	60	47	正常	正常	无
14	2	495	50	16	正常	正常	正常
15	4 ^d	161	50	18	正常	正常	无
16	2 ^e	154	40	23	正常	正常	无
17	2	90	30	16	正常	正常	无
18	3 ^f	0.5	30	9	正常	正常	无

^a左侧精索静脉曲张; ^b单侧小睾丸; ^c单侧隐睾; ^d 1例患者的13号染色体三体, 1例患者核型为46, XX; ^e 1例患者的16号染色体三体; ^f1例患者核型为46, XX

这17例患者中, 只有1例有妻子流产史, 9例的精子总数正常(52.9%), 9例(52.9%)的精子活力正常或中等偏低($\geq 30\%$), 11例(64.7%)的精子形态正常或中等偏低($\geq 20\%$)。

表IV和V显示了减数分裂异常者的个人资料($n=42$; 70%)。全部患者($n=42$; 100%)都有减数分裂前期 I 像和性染色体。24例(57.1%)同源染色体对粗线期正常。在分裂中期 I 最常见的异常是不完全性联会消失, 这可影响减数分裂中期I像(29/38, 76.3%)。4例(10, 5%)可以观察到完全性联会消失。

在多精子症者, 正常、低或极低精子总数者, 正常、低或极低精子活力者, 正常、低或极低精子正常形态者中都可以发现存在着不完全性联会消失和/或小单价染色体(表IV和V)。在不完全性联会消失和精液参数异常改变之间未发现相关性。在睾丸减数分裂异常的类型和配子的非整倍体类型(二倍型、二体型)之间未发现相关性。联会过程是在染色体水平由每条染色体单独控制而非在细胞水平控制(Templado et al., 1981)。在全部细胞的二

表 IV. FISH检测正常且减数分裂检测结果异常的患者(25/60; 41.6%): 流产情况、精液分析和检测减数分裂

病例号	流产情况 例数	精液分析			减数分裂结果		
		精子总数 (x10 ⁶)	活力 (%)	形态 (%)	分裂前期 I	分裂中期 I	分裂中期 II
1	无	1,721	45	19	PA (部分)	2-3 联会消失的二价染色体 ^{bc}	无
2	无	670	45	17	正常	2-4 单价染色体 ^a	无
3	无	363	40	4	PA (部分)	2-3 联会消失的二价染色体 ^b	无
4	无	330	40	9	正常	2-4 联会消失的二价染色体 ^b	无
5	无	287	11	33	正常	2-6 单价染色体 ^a 和 2-3 联会消失的二价染色体 ^b	无
6	无	265	3	3	正常(70%), PA(30%)	正常(70%), 完全联会消失(30%) ^d	无
7	无	192	35	27	正常	2 联会消失的二价染色体 ^b	无
8	无	159	40	7	正常	23 二价染色体 ^d	无
9	无	88	15	5	PA (部分)	1 联会消失的二价染色体 ^{be}	无
10	无	77	50	21	正常	正常(75%), 完全联会消失(25%) ^d	无
11	无	42	30	5	正常	1 附加的二价染色体: 超倍体	无
12	无	28	35	4	PA	2 联会消失的二价染色体 ^{ace}	无
13	无	17	15	11	PA	无	无
14	无	10	25	34	正常	无	无
15	无	9.6	60	15	正常	2-3 联会消失的二价染色体 ^{bcd}	无
16	无	9	65	23	PA (部分)	2-4 单价染色体 ^a	无
17	无	4	16	2	正常	2-3 联会消失的二价染色体 ^{ce}	无
18	无	0.2	8	10	正常	23 二价染色体 ^d	无
19	无	0.18	50	8	PA 和 四倍体	完全联会消失	二倍体
20	3	1,716	40	54	正常	2-3 联会消失的二价染色体 ^b	无
21	5	489	40	25	正常	2-4 单价染色体 ^a	无
22	3	218	30	11	正常	23 二价染色体 ^d 和 23 正常二价染色体	无
23	4	208	50	35	四倍体 -12%	四倍体 (部分)	1 二倍体
24	5	198	15	19	PA (部分)	2-4 单价染色体 ^a 和 2 联会消失的二价染色体 ^{abe}	无
25	4	73	55	20	PA (部分)	2-3 联会消失的二价染色体 ^c	无

^a小; ^b中等; ^c大; ^d退化; ^exy配对早期分离; ^f部分四倍体携带2个性泡 PA = 配对异常

表V. FISH检测和减数分裂检测结果均异常的患者(17/60; 28.3%)

病例	流产情况		精液分析			FISH结果		减数分裂结果		
	例数	精子总数(x10 ⁶)	活力(%)	形态(%)	改变情况	分裂前期I	分裂中期I	分裂中期II		
1	无	260	45	23	二倍性性染色体	正常	2单价染色体 ^{ad}	无		
2	无	250	15	39	二倍性二体性21号染色体	正常	2-6单价染色体; 1联会消失的二价染色体 ^b	无		
3	无	202	35	22	二倍性	部分四倍体	2单价染色体; 1-2二价染色体 ^{abc}	部分二倍体和亚倍体		
4	无	176	45	45	二倍性	正常	正常(25%); 2联会消失的二价染色体(75%) ^c ; 2-4单价染色体	无		
5	无	80	3	9	二倍性13号染色体	正常	2单价染色体 ^a ; 2-3联会消失的二价染色体 ^{bcd}	无		
6	无	74	30	20	二倍性性染色体	PA	2-3联会消失的二价染色体 ^{bc}	无		
7	无	66	15	4	二倍性二体性13号染色体	正常	2-4单价染色体 ^a ; 联会消失的二价染色体 ^b	无		
8	无	64	45	54	二倍性	正常	4联会消失的二价染色体 ^{bc}	无		
9	无	38	55	20	二倍性	3号为二价染色体染色体, 配对	无	无		
10	无	15	35	33	二倍性	正常	4-6单价染色体 ^a ; 2-3联会消失的二价染色体 ^{bc}	无		
11	无	9	20	46	二倍性二体性13号染色体	正常	2-3联会消失的二价染色体 ^b	无		
12	无	7	30	8	二倍性, 二体性性染色体	正常	2-4单价染色体 ^a ; 1联会消失的二价染色体 ^b	无		
13	无	3	10	15	二倍性, 二体性性染色体	正常	单价染色体 ^a ; 联会消失的二价染色体 ^d	无		
14	无	1.2	16	10	二倍性, 二体性性染色体	PA	完全联会消失	无		
15	无	0.9	5	1	二倍性	PA	无	无		
16	无	0.46	15	22	二倍性13号染色体	PA	2-4单价染色体 ^a ; 1-2联会消失的二价染色体 ^{bd}	部分超倍体		
17	2 ^e	396	55	53	二倍性	PA	10单价染色体 ^a ; 4联会消失的二价染色体 ^{bd}	部分二倍体		

PA: 配对异常; ^a小; ^b中等; ^c大; ^dXY配对早期分离; ^e1例患者核型为92, XX, XY

价染色体都发生完全性联会消失的患者中，其精子总数极低： 0.18 和 1.2×10^6 (表IV的病例19和表V的病例14)。表IV中病例6和10的精子总数正常，分别为 $265 \times 10^6/\text{mL}$ 和 $77 \times 10^6/\text{mL}$ ，而他们是部分细胞完全性联会消失 (分别只有30%和25%)。42例中有37例 (88%) 未观察到分裂中期II像。

这篇报道的结论来自于睾丸活检的研究，不能简单推广到全部睾丸实质。

表VI. FISH检测结果异常的类型 ($n=17$; 100%)

FISH检查结果异常	例数	(%)
二倍体	7	41.1
二倍体和二体性性染色体	3	17.6
二倍体和二体性常染色体 ^a	3	17.6
二体性性染色体	2	11.7
二体性常染色体 ^b	2	11.7
合计	17	100

^a涉及13和21号染色体，^b2位患者均涉及13号染色体

8. 评论

随着1992年Palermo等应用IVF-ICSI技术诞生第一个婴儿和1年后将睾丸内精子(TESE) (Schoysman et al., 1993) 应用于该技术获得成功，男科进入了新纪元。男性生育就成为了从精液或睾丸中获得少量精子的问题。但IVF-ICSI这20年的应用显示现实并非如此简单：精子必须是整倍体的。如果进入卵子胞浆的精子是非整倍体的，则IVF-ICSI技术无法解决不育问题。

如果显微注射入成熟卵母细胞的精子是非整倍体的，卵细胞可能无法受精 (Lee et al., 2002) 或者虽然可以产生非整倍体胚胎但在受精后的开始阶段就停止发育。这些胚胎有很高的染色体畸变率 (Almeida and Bolton, 1998)；另一种可能是胚胎不能植入，会引起流产或娩出不健康婴儿 (Giorlandino et al., 1998)。

在能生育的男性中，每条染色体会检测到大约0.1%的二体型，8号染色体低一些 (0.03%)，而性染色体高一些 (0.27%) (Templado et al., 2011)，包括一个非常高的 (0.43%) 二体型XY (de Massy, 2003)。通过FISH技术检测，在有生育能力的男性中总二体型大约是4.5% (Templado et al., 2011)。需要注意的是，这里所有有生育能力男性的减数分裂核型结果都是异常的。这是一个简单的百分比问题。与可生育男性相比，正常核型不育患者的睾丸非整倍体水平要高很多：13% (根据我们获得的数据) 和14% (根据Sarrate等结果) (2010)。大量患者被纳入这两项研究中，数量超过2,000例。由于不育男性精子非整倍体的发病率明显增高，推荐在所有有生育问题的患者中进行调查。

不育是一种症状，原因众多，包括不直接归因于男方者 (女方问题)。做为病因的一部分，不育的症状 (或既往流产史) 不能使我们证实或无视减数分裂核型异常的可能性。

已有报道OAT患者中精子非整倍体增加 (Devillard et al., 2002; Lee et al., 2002)。另外，在常规精液检查中出现低精子总数 (Templado et al., 2011) 或异常精子形态 (Calogero et al., 2002) 等单个异常结果的患者中，可见到精子非整倍体增加的报告。不过，并非所有作者都在异常的精子活动 (Calogero et al., 2001) 或形态和非整倍体

精子增加(Sbracia et al., 2002)之间发现相关性。

由于在不同实验室、不同患者、不同时间之间,精液检查结果存在易变性,我们只能确定变化趋势而非具体百分值。

另一个易变性是精子计数的表示是在浓度水平(每毫升)而非总数,这导致与已经发表的结果难以进行比较。

即使基本精液参数(计数、活动力和形态,包括多精症)正常,我们也不能排除精子非整倍体的存在或睾丸减数分裂核型的异常(表IV和V)。精液参数中与精子非整倍体关联性最强的是精子总数(图6),其次是精子形态(图8)。第3组的样本量很小且纳入的患者经过高度选择,由此得到的数据不能普遍应用于不育或易流产人群。经FISH检测,相比第2组(237/1813; 13%)13%的异常百分率,第3组(表V)要高得多(17/60; 28.3%)。这可以解释为该组入选的病例更为严格。

根据生育史(不育、流产、进入IVF/ICSI周期的授精率低、胚胎发育停滞、胚胎植入失败)和精液参数的质量不同,精子非整倍体和减数分裂异常的发生率也会不同。Sarrate等发布的百分率(26.5%)和我们的结果非常相似(28.3%)。

与过去只用3个探针相比,5条染色体的FISH研究使我们能够检测出的非整倍体比例更高,特别是13号染色体高达11.7%。(表VI)。

本研究中,患者FISH的异常(100%)意味着睾丸活检减数分裂的核型异常。Sarrate等(2010)在91.7%的患者中遇到这种情况。因为任何非整倍体配子的出现都是因减数分裂异常所致,所以如果精子FISH发生改变,就没有必要通过睾丸活检进行减数分裂的研究。根据我们没有公布和Sarrate等(2010)发表的数据来看,有5%~8%的患者会出现FISH改变而睾丸减数分裂正常的情况。对于睾丸活检的患者,我们在分裂中期II没有观察到任何细胞。那么,产生非整倍体配子的改变可能在第二次减数分裂时发生。另一种可能的解释是镶嵌现象的存在。

在正常FISH患者中,有减数分裂异常的在本研究中占41.6%(25/60),在Sarrate等(2010)的研究中达73.6%。数据表明正常FISH结果无法排除减数分裂异常的存在。对于这种情况可能的解释是:减数分裂异常的细胞不产生精子,与此同时,减数分裂正常的细胞产生整倍体配子。另一个可能的解释是,精子是非整倍体,其他异常染色体未被检出。如果FISH结果正常,那就有必要考虑是否需要通过睾丸活检来进行减数分裂的研究。

在睾丸活检出现的减数分裂异常和经FISH检测染色体异常的类型—染色体二倍型或二体型—中,我们没有找到相关性。与常染色体二体相比,我们也没有观察到性染色体二体的增加。但因本组病例数很少($n=25$),这一点还难以下结论。

通过FISH和睾丸活检2种方法来检测减数分裂染色体异常,结合既往生育史,建议男科医生进行胚胎染色体的研究来发现非整倍体精子。另一个选择是建议使用精子库。如果并未研究存在异常减数分裂的可能性,就贸然进入第二次和多次IVF周期,不是一种合理选择。

在睾丸活检的减数分裂研究中,正常者占31%,不能提供信息者占7.4%。分裂前期I的阻滞(14.3%的病例)可能是由于基因改变所引起,因为在光镜下没有发现导致异常的变化。在所有改变中,最多见的是联会消失,占33.3%(表2)。

值得注意的是, 27.7%(60/216)的患者表现出嵌合性。他们可能会得益于IVF-ICSI技术。使用IMSI技术(Intracytoplasmic Morphologically Selected Spermatozoon Injection)将为如何选择显微注射的精子带来更好的方法。ICSI中, 可以用16,000 x来选择用于注入卵母细胞的精子, 从而代替标准的400 x。现已发现精子核内的空泡与非整倍体精子存在相关性(Garolla et al., 2008)。

胚胎植入前的遗传学诊断(PGD)技术, 特别是可用于研究全部染色体的阵列比较基因组杂交技术(aCGH), 能使我们选择整倍体胚胎转移到子宫。

9. 结论

我们能够得到以下结论:

1. 不育人群的染色体非整倍体发生率是正常生育人群的3倍(13% ~14% *V.S.* 4.5%)。
2. 对于一个有着正常有丝分裂核型的不育男性而言, 临床或精液分析的资料不能使我们确定或排除产生非整倍体配子的可能性。我们已经观察到在精子计数和非整倍体水平之间的部分反向关系。
3. FISH检测的异常结果和睾丸减数分裂结果的一致性几乎达到100%, 因此FISH异常者不必再进行睾丸活检。
4. 正常FISH结果可能需要进行睾丸活检, 因为在超过40%的患者中可以观察到睾丸减数分裂异常。这有赖于既往生育史。
5. 对于完全不育患者来说, FISH检测必需与精液检查同时进行。这一点很重要, 此外没有更为直接的方法。

10. 参考文献

- Almeida PA & Bolton VN. (1998). Cytogenetic analysis of human preimplantation embryos following developmental arrest in vitro. *Reprod Fertil Dev* 10:505-513.
- Alzheimer M. (2009). The Dance Floor of Meiosis: Evolutionary Conservation of Nuclear Envelope Attachment and Dynamics of Meiotic Telomeres. In: *Meiosis*, Benavente R, Volff JN (Eds.), pp.81-93, S. Karger, Basel, Switzerland.
- Bannister LA, Reinholdt LG, Munroe RJ & Schimenti JC. (2004). Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. *Genesis* 40:184-194.
- Barbero JL. (2011). Sister Chromatid Cohesion Control and Aneuploidy. In: *Aneuploidy*, Delhanty J D A, Pellestor F (Eds.), pp. 223-233, S. Karger, Basel, Switzerland.
- Bass HW. (2003). Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. *Cell Mol Life Sci* 60:2319-2324.
- Bergere M, Wainer R, Nataf V, Bailly M, Gombault M, Ville Y & Selva J. (2002). Biopsied testis cells of four 47, XXY patients: fluorescence in-situ hybridization and ICSI results. *Hum Reprod* 17:32-37.
- Blanco J, Egozcue J & Vidal F. (1996). Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11: 722-726.
- Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J & Vidal F. (1997). Increased incidence of disomic sperm nuclei in a

- 47, *XXY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH)*. *Hum Genet* 99: 413-416.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG & Cooke HJ. (2007). *SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination*. *J Cell Biol* 176:741-747.
- Buard J & de Massy B. (2007). *Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots*. *Trends Genet* 23:301-309.
- Byers S, Pelletier R-M. & Suarez-Quian C. (1993). *Sertoli cell junctions and the Seminiferous Epithelium Barrier*. In: *The Sertoli Cell*; L.D. Russell and M.D. Griswold (Eds.), pp. 431-446; Cache River Press. Clearwater F.L. U.S.A.
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G & D'Agata R. (2001). *Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters*. *Hum Reprod* 16:1172-1179.
- Calogero AE, Vicari E, De Palma A, Burrello N, Barone N, Grazioso C, Zahi M & D'Agata R. (2002). *Elevated sperm aneuploidy rate in patients with absolute polymorphic teratozoospermia*. *Hum Reprod* 17 (Abstract book 1), pp. 95-96.
- Codina-Pascual M, Campillo M, Kraus J, Speicher M, Egozcue J, Navarro J & Benet J. (2006). *Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis*. *Mol Hum Reprod* 12:123-133.
- Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, et al. (2005). *Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis*. *J Cell Sci* 118:2755-2762.
- de Massy B. (2003). *Distribution of meiotic recombination sites*. *Trends Genet* 19:514-521.
- de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, et al. (2005). *Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation*. *Genes Dev* 19:1376-1389.
- Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, Guichaoua M, Sele B & Rousseaux S. (2002). *Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases*. *Hum Reprod* 17:1292-1298.
- Dorsett D. (2007). *Roles of the sister chromatid cohesion apparatus in gene expression, development, and human syndromes*. *Chromosoma* 116:1-13.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F & Marina S. (1983). *Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males*. *Hum Genet* 65:185-188.
- Fawcett DW. (1956). *The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes*. *J Biophys Biochem Cytol* 2:403-406.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G & Foresta C. (2007). *Male infertility: role of genetic background*. *Reprod Biomed Online* 14:734-745.
- Gardner RJ & Sutherland GR. (2004). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*, 3rd ed. (Oxford University Press, New York).
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M et al. (2008). *High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI*

- by physiological status. *Reproductive BioMedicine Online* 17:610-616.
- Gerkes EH , van der Kevie-Kersemaekers AM , Yakin M , Smeets DF & van Ravenswaaij- Arts CM. (2010). *The importance of chromosome studies in Roberts syndrome/SC phocomelia and other cohesinopathies. Eur J Med Genet* 53:40-44.
- Giorlandino C , Calugi G , Iaconianni L , Santoro ML & Lippa A. (1998). *Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. Fertil Steril* 70:576-577.
- Griffin DK & Finch KA. (2005). *The genetic and cytogenetic basis of male infertility. Hum Fertil (Camb)* 8:19-26.
- Gruber S , Haering CH & Nasmyth K. (2003). *Chromosomal cohesin forms a ring. Cell* 112:765-777.
- Hamer G , Gell K , Kouznetsova A , Novak I , Benavente R & Hoog C. (2006). *Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. J Cell Sci* 119:4025-4032.
- Harkonen K. (2005). *Pesticides and the induction of aneuploidy in human sperm. Cytogenet Genome Res* 111:378-383.
- Hassold T , Chen N , Funkhouser J , Jooss T , Manuel B , et al. (1980). *Scytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet* 44:151-178.
- Heller CG & Clermont Y. (1964). *Kinetics of the germinal epithelium in man. Rec Progr Hormone Res* 20:545-575.
- Hulten MA , Goldman ASH , Saadallah N , Wallace BMN & Creasy MR. (1992). *Meiotic studies in man. In: De Rooney and BH Czepulkowski , Hum Cytogenet. A practical approach.,pp 193-221 , Oxford University Press , Oxford , UK.*
- Keeney S & Neale MJ. (2006). *Initiation of meiotic recombination by formation of DNA doublestranded breaks: mechanism and regulation. Biochem Soc Trans* 34:523-525.
- Kudo NR , Anger M , Peters AH , Stemmann O , Theussl HC , et al. (2009). *Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. J Cell Sci* 122:2686-2698.
- Lee MS , Tsao HM , Wu HM , Huang CC , Chen CI and Lin David PC (2002). *Correlations between sperm apoptosis and aneuploidy. Hum Reprod* 17 (Abstract book 1) , pp. 112 - 113.
- Lee J , Kitajima TS , Tanno Y , Yoshida K , Morita T , et al. (2008). *Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. Nat Cell Biol* 10:42-52.
- Lichten M. (2001). *Meiotic recombination: Breaking the genome to save it. Curr Biol* 11:R253- R256.
- Lynn A , Ashley T & Hassold T. (2004). *Variation in human meiotic recombination. Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:317-349.
- Marston AL & Amon A. (2004). *Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. Nat Rev Mol Cell Biol* 5:983-997.
- Meuwissen RL , Meerts I , Hoovers JM , Leschot N & Heyting C. (1997). *Human synaptonemal complex protein1 (SCP1): isolation and characterization of the DNA and chromosomal localization of the gene. Genomics* 39:337-384.
- Miyamoto T , Hasuike S , Yogeve L , Maduro MR , Ishikawa M , Westphal H & Lamb DJ. (2003) . *Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. Lancet* 362:1714-1719.
- Neumann R & Jeffreys AJ. (2006). *Polymorphism in the activity of human crossover hotspots independent of local*

- DNA sequence variation. *Hum Mol Genet* 15:1401-1411.
- Nishant KT & Rao MR. (2006). Molecular features of meiotic recombination hotspots. *Bioessays* 28:45-56.
- Pacchierotti & Eichenlaub-Ritter. (2011). Environmental Hazard in the Aetiology of Somatic and Germ Cell Aneuploidy. In: *Aneuploidy*, Delhanty JDA and Pellestor F (Eds.), pp. 254-268, S. Karger, Basel, Switzerland.
- Palermo G, Joris H, Devroey P & Van Steirteghem AC. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18.
- Perry MJ. (2008). Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 14:233-242.
- Petes TD. (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* 2:360-369.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, et al. (2004). Cohesin SCMI beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* 6:555-562.
- Revenkova E & Jessberger R. (2006). Shaping meiotic prophase chromosomes: Cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* 115:235-240.
- Sarrate Z, Vidal F & Blanco J. (2010). Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 93:1892-1902.
- Sbracia M, Baldi M, Cao D, Sandrelli A, Chiangetti A, Poverini R & Aragona C. (2002). Preferential location of sex chromosomes, their aneuploidy in human sperm, and their role in determining sex chromosome aneuploidy in embryos after ICSI. *Hum Reprod* 17:320-324.
- Scherthan H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:621-627.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijis M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E & Schoysman D. (1993). Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 342:1237-1238.
- Simpson JL. (2007). Genetics of spontaneous abortions. In: *Recurrent Pregnancy Loss*. Howard J.A. Carp (Ed), pp.23-34, Informa Healthcare. London, U.K.
- Solari AJ. (1974). The behaviour of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* 38:273-317.
- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM & Egozcue J. (1981.) A new meiotic mutation: Desynapsis of individual bivalents. *Hum Genet* 59:345-348.
- Templado C, Vidal F & Estop A. (2011). Aneuploidy in human Spermatozoa. In: *Aneuploidy*, Delhanty J D A, Pellestor F, (Eds.), pp.91-99, S. Karger, Basel, Switzerland.
- Trelles-Sticken E, Dresser ME & Scherthan H. (2000). Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *J Cell Biol* 151:95-106.
- Trelles-Sticken E, Adelfalk C, Loidl J & Scherthan H. (2005). Meiotic telomere clustering requires actin for its formation and cohesion for its resolution. *J Cell Biol* 170:213-223.
- Vidal F, Moragas M, Catala V, Torello MJ, Santalo J, Calderon G, Gimenez C, Barri P N, Egozcue J & Veiga A. (1993). Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa

by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. Hum Reprod 8:1740-1743.

Watrin E & Peters JM. (2006). Cohesin and DNA damage repair. Exp Cell Res 312:2687-2693.

WHO. (1999). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press , Cambridge , UK.

*Xu H , Beasley MD , Warren WD , van der Horst GT & McKay MJ. (2005). Absence of mouse *REC8* cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. Dev Cell 8:949-961. Zickler D. (2006). From early homologue recognition to synaptonemal complex formation.*

Chromosoma 115:158-174.

Zickler D & Kleckner N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. Annu Rev Genet 32:619-697

(杨惠祥译)

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

第七章 卵细胞浆内单精子注射 (ICSI) 的新进展

Lodovico Parmegiani, Graciela Estela Cognigni and Marco Filicori
GynePro Medical Centers, Reproductive Medicine Unit, Bologna

1. 引言

近二十年来, 卵细胞浆内单精子注射 (ICSI) 已经成功的应用于男性不育症的治疗 (Van Steirteghem et al., 1993); 将精子直接注射入卵细胞浆内使胚胎学家克服了精子活力差、精子卵透明带结合能力差及顶体反应差等所造成的缺陷。虽然 ICSI 技术已经在全球范围内成功应用了很多年, 但是我们对 ICSI 成人是否会存在长期的副作用一无所知。实际上, 由于 ICSI 省略了自然受精过程中的几个关键检测点而且许多步骤与生理过程有很大不同, 因此人们对这项技术的安全性仍然存在怀疑 (Oehninger, 2011)。例如, 将精子的尾部注入卵细胞浆内可能导致精子核解聚 (Dozortsev et al., 1995; Markoulaki et al., 2007)。另外, 我们还应该注意到 ICSI 可能会增加注入遗传或功能异常精子的风险 (Sakkas et al., 1997; Bonduelle et al., 2002; Marchesi, 2007; Schatten, 2009; Heytens et al., 2009; Navarro-Costa et al., 2010)。鉴于以上原因, 为了使 ICSI 技术风险最小化, 此程序中有任何新进展都是可喜的, 这些新进展可以帮助操作者复原一些基本的生理检测点并模拟自然受精过程 (Parmegiani et al., 2010a)。

2. 透明质酸 (HA) 和透明带: 两个重要的人类受精检测点

自然状态下, 人类卵母细胞周围是:

- 卵丘冠状复合物 (COC), 由细胞和细胞外基质构成。细胞外基质由透明质酸 (HA) 和蛋白聚合而成。

- 透明带 (ZP), 一层紧邻卵母细胞的厚的有弹性的糖蛋白衣被 (Yanagimachi, 1994)。

精子必须穿透这两层才能与卵膜融合。

在人类睾丸的生精过程中, 细长的精子细胞在细胞质挤压和质膜重塑的作用下形成了 HA 和 ZP 受体, 这两种受体是精子穿入卵母细胞必不可少的。

在精子形成末期, 两种特定蛋白的不同表达水平似乎与精子的成熟度、DNA 的完整性、染色体非整倍性率及受精潜能有关。这两种蛋白是:

- 热休克蛋白 HspA2 分子伴侣, 参与减数分裂。
- 肌酸激酶 (CK), 富含于精子细胞质中 (Cayli et al., 2003)。

成熟精子中含有高浓度的 HspA2 和低浓度的 CK (Cayli et al., 2003)。相反, 成熟障碍的精子其 HspA2 低表达, 这可能是引起减数分裂缺陷和染色体非整倍性的原因。事实上, 与不成熟精子相比, 成熟精子的非整倍性率减少了五倍以上 (Jakab et al., 2005)。不成熟精子也含有较高水平的 CK (Huszar, 1993); 不成熟精子中这种高水平 CK 的形成要归因于精子形成末期精子的缺陷, 在正常的精子发育末期多余的细胞质会作为“残余体”从细长的精子细胞中挤出 (Cayli et al., 2003)。与之相反, 成熟受阻或成熟度减低的精子表现为更多的富含 CK 和其他细胞质酶的胞质被保留, 脂质过氧化作用增

加并随之产生了 DNA 碎片, 以及精子形态学畸形。由于缺少了细胞膜的重塑, 不成熟精子缺乏 ZP 和 HA 的结合位点, 因此不成熟精子不能使卵母细胞自然受精。

3. 透明质酸筛选精子 ICSI

自然过程中, 透明质酸 (HA) 参与精子的筛选机制, 因为只有已经排出特异受体以结合到 HA 上的成熟精子才能够接近卵母细胞并使之受精。在体外研究中 HA 也被公认为“生理性选择因子”。有研究证实在体外能够结合到 HA 上的精子是那些已经完成质膜重塑、细胞质挤出和核成熟的精子 (Cayli et al., 2003; Huszar et al., 2003; 2007)。而且, 结合 HA 的精子具有更好的形态 (Prinosilova et al., 2009; Parmegiani et al., 2010a), 它们在非整倍性或 DNA 碎片方面也表现为低风险 (Parmegiani et al., 2010a)。因此, 在 ICSI 之前用 HA 选择精子可以优化治疗的结局 (Parmegiani et al., 2010a, b) 并且还有很多其他好处:

- 在实际操作过程中, 结合 HA 的精子更容易被注射针吸取 (Balaban et al., 2003)
- 含有 HA 的培养基对注射后的受精卵的发育没有负面影响 (Van den Bergh et al., 2010)
- 由于其天然属性 HA 可以被卵母细胞代谢 (Balaban et al., 2003; Barak et al., 2001; Van den Bergh et al., 2010)

至少, 在 ICSI 前处理精子时 HA 作为一种更天然的替代品要优于人工合成的塑胶聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。在大多数辅助生殖中心, PVP 被常规用于 ICSI 操作过程中, 以减低精子活力, 并且人们认为 PVP 可能对卵母细胞有毒副作用 (Jean et al., 1996; 2001)。

任何 IVF 实验室都很容易制备“自制”HA-捕获精子选择体系 (Huszar et al., 2003; Nasr-Esfahani et al., 2008)。然而, 目前专门为精子-HA 结合选择而设计的两种备用的体系可以由市场提供:

- 底部有 HA 水凝胶微粒的塑料培养皿 (PICSI® Sperm Selection Device, MidAtlantic Diagnostic - Origio, Måløv, Denmark);
- 含 HA 的黏性介质 (Sperm Slow™, MediCult - Origio)

这种用 HA 结合的精子 (使用 HA-黏性介质或 HA-培养皿) 进行 ICSI 的新方法已经被定义为“透明质酸筛选精子 ICSI” (Parmegiani et al., 2010a)。

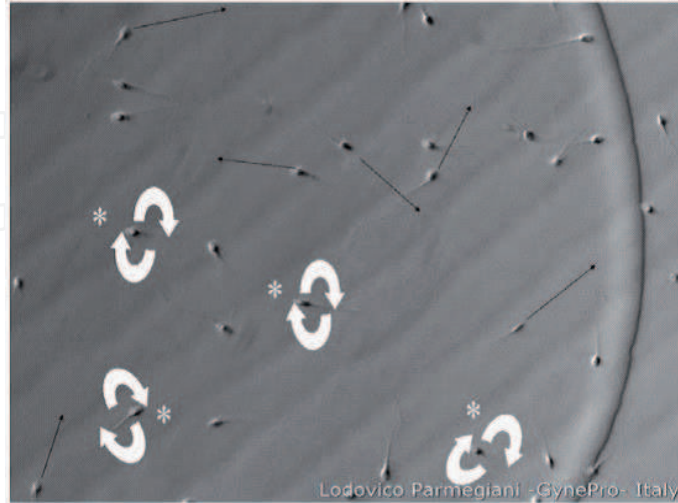
由于这些精子-HA 结合选择体系易获、高效并且被批准用于 IVF (Parmegiani et al., 2010 a; 2010 b; Mènèzo, 2004; WorriLOW et al., 2007; 2010), 所以 IVF 中心可以选择最合适自己中心的体系。黏性介质需要制备微滴这一特定步骤来优化 HA-捕获精子的选择 (Parmegiani et al., 2010b); 而“透明质酸筛选精子 IMSI”比 PICSI 更实用, 因为它可以用在玻璃底培养皿的高倍精子评估中 (Parmegiani et al., 2010a; 见第 5 段, IMSI)。另一方面, 即使没有参加过专业培训的胚胎学家也能很容易地找到 PICSI 中 HA-捕获精子。

3.1 PICSI 操作步骤

PICSI 皿为预置 3 个粉化 HA 微粒的常规塑料培养皿。通过将 5 μ L 的新鲜培养基加到三个微粒上使粉化的 HA 得以重新水化。然后用细管尖将 2 μ L 处理后的精子悬浮液移入到

这些培养基液滴中。PICSI 培养皿是在油下孵育的；5 分钟内结合的精子会通过其头部连接到 HA 微粒表面上，并且绕着其头部旋转。（图 1）

图 1. PICSI 皿里的精子(放大倍数 400 X)



ICSI 注射针选取能动性最好的 HA-捕获精子，然后逐个将其注入卵母细胞中。为了使精子的显微操作更易实施，ICSI 注射针内可以预先装入制动介质（PVP 或精子制动体系）。

在 PICSI 中，结合 HA 的精子 (*) 通过其头部固定于皿的底部，其尾部在头部周围大幅度摆动。相反，未结合 HA 的精子以各种各样的运动方式自由地在培养基液滴中游动。

3.2 精子制动操作方法 (Parmegiani et al., 2010b)

在培养皿（塑料或玻璃底）中，用吸管将 2 μ L 处理后的精子悬液液滴连接到 5 μ L 新鲜培养基液滴上。同时，用吸管将 5 μ L 精子减速剂液滴连接到 5 μ L 新鲜培养基液滴上（图 2）。培养皿中覆盖一层矿物油，精子在 37°C 下培养 5 min。结合 HA 的精子会在两液滴连接区域减速（如果被捕获的话），通过注射针选择和分离这些精子，然后将其注入卵母细胞内。在精子减速操作中，HA 结合的精子尾部被拉直，活动性明显减慢，鞭打幅度较小。未结合 HA 的精子在介质液滴周围泳动，它们的活动不因介质的黏度而减慢而且其尾部有较宽的鞭打幅度。

3.3 “透明质酸筛选精子 ICSI” 的临床有效性

已证明，注入 HA-捕获精子可以改善胚胎的质量和发育，因为可以顺利选择核正常及 DNA 完整的精子：实际上，HA-ICSI 的优胚率高于传统的 PVP-ICSI 并且胚胎发育率也明显增高 (Parmegiani et al., 2010a)。而且 HA-ICSI 可以加快费时的 IMSI (Parmegiani et al., 2010a)。迄今为止发表的例数最多（428 例患者）的研究 (Parmegiani et al., 2010b) 对生理性 HA-ICSI 和常规的 PVP-ICSI 进行了比较，它揭示了注入 HA-捕获精子能够明显改善胚胎的质量和种植。

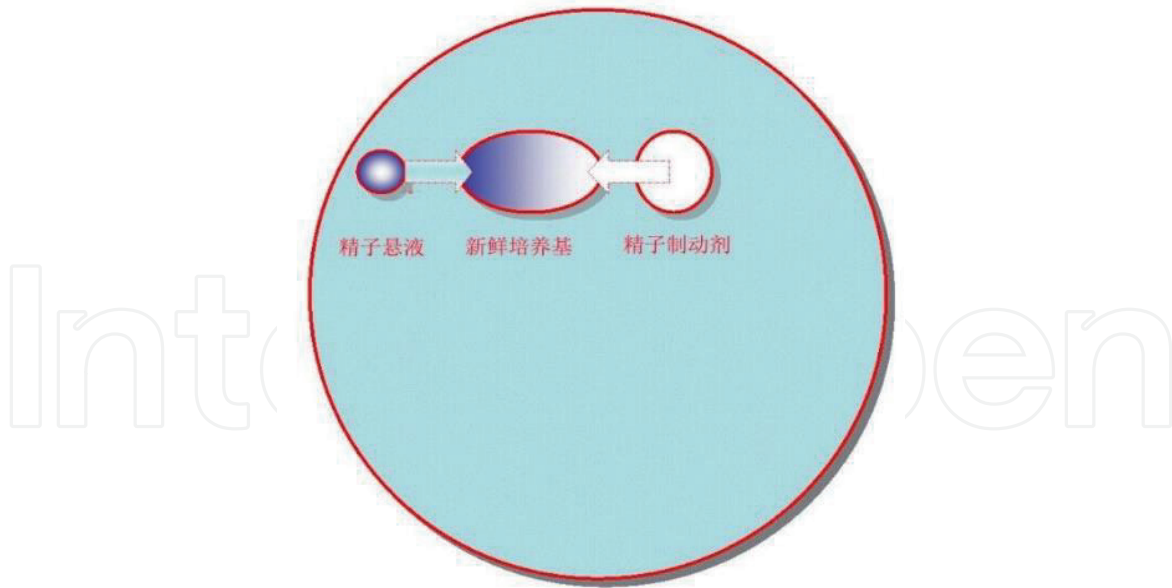


图 2. 精子制动液滴的准备

用吸管将 2 μL 处理后的精子悬液液滴连接到 5 μL 新鲜培养基液滴上。同时，用吸管将 5 μL 精子制动剂液滴连接到 5 μL 新鲜培养基液滴上。

有研究报道，注入 HA-捕获精子其受精率和妊娠率也有增长趋势 (Mènèzo Nicollet, 2004)。Nasr-Esfahani 等 (2008) 发表的文章显示注入 HA-捕获精子的卵母细胞有更高的受精率。

WorriIow 等 (2007) 发现与常规 ICSI 相比，PICSI 可以明显改善受精率和胚胎质量并降低流产率，此差异具有统计学意义。他们随后的研究证明 PICSI 可以明显降低第 3 天胚胎的碎片率进而显著提高其质量，并有利于优质囊胚的形成和提高临床妊娠率 (WorriIow et al., 2010)。

然而，有一篇报道认为受精率、妊娠率和种植率没有差别 (Sanchez et al., 2005)；注入 HA-捕获精子后没有显著的临床改善可能是因为研究的患者例数太少 (18 例)。近来，对 2014 例 HA-ICSI 和 1920 例 PVP-ICSI 进行历史性对照研究显示生理性 ICSI 在胚胎质量和妊娠率上均没有显著的增加 (Mènèzo et al., 2010)。

Van den Berg 等 (2010) 用前瞻性随机的方法将 HA 结合 (HA+) 或未结合 (HA-) 的精子分别注入 407 个第二次减数分裂中期 (MII) 的卵母细胞内，发现受精卵评分没有差异。我们的团队 (Parmegiani et al., 2010c) 对这个研究的伦理方面产生了质疑，因为这个研究中注入了未结合 HA 的精子，所以存在染色体畸变的遗传风险。

总而言之，以上引用的大部分研究认为应用 HA 制动介质或 HA-皿的生理性 ICSI 可以改善临床结局 (Parmegiani et al., 2010a; 2010b; WorriIow et al., 2007; 2010; Nasr-Esfahani et al., 2008)。至少，在所有的研究中生理性 ICSI 从来没有对 ICSI 的结局参数产生过不利影响 (表 1)。如果大型多中心前瞻性随机对照研究证实其对 ICSI 结

局有暗示性有利结果, HA 应该作为 ICSI 前的“生理性”精子选择的首选, 因为 HA 能够降低遗传并发症并且没有任何毒副作用 (Parmegiani et al., 2010c)。

FR: 受精率; EQ: 胚胎质量; PR: 妊娠率; IR: 种植率; MR: 流产率; ND: 未描述

表 1. 关于注入 HA-捕获精子的研究

作者	HA体系	治疗或患者的例数	HA-ICSI 结局
Menezo et Nicollet, 2004	SpermSlow	92 HA-ICSI 比较 110 PVP-ICSI	无差异
Sanchez et al., 2005	N.D.	18 HA-ICSI与对照组比较	无差异
WorriLOW et al., 2007	PICSI	240 对夫妇: PICSI 比较 PVP-ICSI	FR, EQ, MR提高
Nasr-Esfahani et al., 2008	Home-made	50 对夫妇: 同胞卵: HA-ICSI比较PVP-ICSI	FR提高
Van Den Berg et al., 2009	SpermSlow	44 对夫妇 同胞卵: HA+比较 HA-精子	无差异
Parmegiani et al., 2010 ^a	SpermSlow	125 HA-ICSI 比较 107 PVP-ICSI	EQ提高
Parmegiani et al., 2010 ^b	SpermSlow	331 HA-ICSI 比较 97 PVP-ICSI	EQ, IR提高
WorriLOW et al., 2010	PICSI	215 couples: PICSI 比较PVP-ICSI	EQ提高
Menezo et al., 2010	SpermSlow	2014 HA-ICSI比较1920 PVP-ICSI	无差异

4. 结合透明带的精子

不成熟精子中含有低密度的 ZP 结合位点和 HA 受体 (Huszar et al., 2003)。结合 ZP 的人类精子显示的属性与 HA-捕获精子相似, 包括最少的 DNA 碎片, 正常的形态及较低的染色体非整倍性率 (Yagcy et al., 2010)。而且, 在某些哺乳动物中, 同样的精子膜蛋白首先参与透明质酸酶活性, 其次参与 ZP 结合 (Hunnicuttt et al., 1996)。这些研究表明精子-ZP 的结合过程与 HA 一样在精子的自然选择中扮演着十分重要的角色。

精子-ZP 结合试验可以将精子与不成熟的 M I 卵母细胞共培养几小时; 结合到 ZP 上的精子可用注射针回收并用于 ICSI: 当应用这一系统时, Paes de AlmeidaFerreira Braga 等 (2009) 发现注入 ZP-结合精子可以提高胚胎质量。Black 等 (2010) 在一研究中发现注入 ZP-结合精子的 ZP-ICSI 与传统的 ICSI 相比可以提高着床率和临床妊娠率。Liu 等 (2011) 发现 ZP-ICSI 与传统的 ICSI 相比可以显著提高优质胚胎的质量。

尽管目前关于精子-ZP 结合及其机制的信息还很少, 但是, 最近的研究表明对于鉴定 ICSI 精子的性能方面, 精子-ZP 结合试验是一种有效的方法。因此, 精子-ZP 选择同时 HA-精子选择可以用来模拟精子结合卵子的自然过程。

5. 卵细胞浆内形态学选择精子注射 (IMSI)

对于 ICSI 中精子的评估一般采用最高 400× 的放大倍数。一些研究表明依照严格的标准可以对精子的形态进行评估 (Kruger et al., 1986; 1988):

- 对于 ICSI 周期结局没有太大的预测价值 (Svalander et al., 1996; French et al., 2010)
- 对胚胎发育或形态没有影响 (French et al., 2010)。

但是, 若想实现获得最有活力的胚胎和减少新生儿疾病的目标, 依赖某些方法来选择理想的配子 (卵子和精子), 这样做似乎是合乎逻辑的 (Parmegiani et al., 2010c)。很遗憾, 在 400~1, 000 的放大倍数下观察时, 精子的大小及形态对染色体完整性或染色体数目畸变没有可靠的预测性 (Celik-Ozenci et al., 2004)。

为了改善“成像”精子选择, Bartoov 团队 (1994, 2001, 2001) 发明了一种不染色、实时的、高倍放大的评估精子的方法 (MSOME: 活动精子细胞器形态学检测)。MSOME 是通

过应用一台倒置光学显微镜来实现的，此显微镜配备有高倍 Nomarski 镜片，通过数字成像后使放大倍数高达 6, 300× (图 3)。MSOME 选择系统应用于 ICSI 患者中证明了人类精子核的形态学完整性是与妊娠率有关的一个重要参数 (Bartoov et al., 2003, Berkovitz et al., 2005)。根据 MSOME 标准修改的 ICSI 规程被定义为 IMSI: 卵胞浆内形态学选择精子注射 (Bartoov et al., 2003)。一项配伍研究 (Bartoov et al., 2003) 证实与传统的 ICSI 相比 IMSI 可以显著提高妊娠率，甚至种植率可以提高 3 倍。Berkovitz 等，2005 年发现如果没有正常的精子用于 ICSI，流产率将从 10% (没有有正常细胞核的精子) 增加到 57%。事实上，对于有既往 ICSI 失败史 (Bartoov et al., 2003; Berkovitz et al., 2005; Hazout et al., 2006; Antinori et al., 2008; Franco et al., 2008; Mauri et al., 2010; Souza Setti et al., 2010) 或有较严重的男方因素 (Balaban et al., 2011; Souza Setti et al., 2011) 的夫妇来说，只将严格定义的，有正常核形态的精子显微注入卵细胞内可以大大改善 ICSI 的结局。IMSI 的积极作用对于第 2 日的胚胎并不明显 (Mauri et al., 2010)，相反地，注入头部不正常或核含空泡的精子会对 5~6 日的胚胎发育 (Vanderzwalmen et al., 2008) 及 ICSI 结局 (Berkovitz et al., 2006a; 2006b; Cassuto et al., 2009; Nadalini et al., 2009) 产生负面影响。注入不含核空泡的精子对 ICSI 结局具有积极影响，这可能是因为与注入含空泡的精子相比，其具有更好的线粒体功能，染色体状态及低非整倍性率 (Garolla et al., 2008; Boitrelle et al., 2011)。另外，精子的核形态正常可能与获胚的非整倍性发生率较低有关 (Figueira et al., 2011)。

必须提及的是 IMSI 的操作步骤是费时的：选取 1 个“正常”的 MSOME 精子需要 60-120min (Antinori et al., 2008)。而且，在高倍镜下选取精子的过程本身也可能会损伤精子的细胞质：显微镜加热 2h 后，精子的核空泡显著增加 (Peer et al., 2007)。通过将高倍显微镜与 HA-精子选择系统相结合可以加速 IMSI 的操作。根据 MSOME 标准，HA 介质有助于选择核正常的精子亚群：Parmegiani 等 (2010a) 发现结合 HA-捕获精子的核正常率明显高于 PVP 中的精子。

可以看出，尽管操作过程费时而且高倍显微镜的成本较高，但是 IMSI 确实是一种安全有效、无损伤的精子选择系统，在不久的将来可以得到广泛地应用。

图 3. 人类精子 (放大倍数>6, 300×)



5.1 IMSI 操作程序

通常，首先用密度梯度系统对精子进行处理。然后，将制备好的精子悬液加入到玻璃底培养皿中的 PVP（或“生理性 IMSI”的精子减速体系 Parmegiani et al., 2010a）液滴中，其上覆盖矿物油。为了选择最好的精子进行注射，需要评估精子“核常态”。依照活动精子细胞器形态学检测（MSOME）标准常常对细胞核进行实时评估。根据 MSOME 标准，正常形态的精子核为光滑的、匀称的、椭圆形的结构。平均长度和宽度（±标准差）必须为 $(4.75 \pm 0.28) \mu\text{m}$ 和 $(3.28 \pm 0.20) \mu\text{m}$ 。如果精子头部含一个或多个空泡（直径为 0.78 ± 0.18 ）并且其面积大于正常核的 4%，则认为核染色质内容物异常。精子核必须同时具备正常形状及正常染色质内容物才可以被认为是形态正常。为了快速评估精子核正常形态，可以将一种固定的、适合 MSOME 长宽标准的精子核透明胶片叠放在显示器屏上来测量细胞：如果长度或宽度偏离正常平均轴值 2 个标准差，则认为核形状异常，可以采用类似的胶片形式来检测空泡（图 4）。也可以采用专门的数字成像软件来测量核长度、宽度及空泡。

为了快速评估精子核正常形态，可以将一种固定的、适合 MSOME 长宽标准的精子核透明胶片叠放在显示器屏上来测量细胞：如果长度或宽度偏离正常平均轴值 2 个标准差，则认为核形状异常。可以采用类似的胶片形式来检测空泡（Bartoov et al., 2003）。

图 4. IMSI 过程 人类精子（放大倍数 $>10,000\times$ ）



6. 精子头部的双折射

偏振光显微镜在 ICSI 中的应用是一种新的精子选择工具（Baccett, 2004）。这种方法是基于精子原生质结构具有双折射的特性。在成熟精子核内，有一种很强的固有双折射，这与核蛋白丝纵向有序的排列有关。装有偏振透镜的倒置显微镜被用于 ICSI 中实时的选择双折射精子。双折射位于顶体后区说明顶体反应已经发生；注入有顶体反应的精子似乎有利于有活力的 ICSI 胚胎的发育（Gianaroli et al., 2010）。特别是对少弱畸精子症或睾丸精子而言，注入双折射精子似乎是有益的（Gianaroli et al., 2008; 2010）。

7. 结论

ICSI 的引入 (Palermo et al., 1992) 已经以革命性的方式改变了辅助生殖技术领域, 使我们能够有效治疗以下患者:

- 少弱畸精子症
- 睾丸精子
- 卵子数量少
- 既往 IVF 失败

在这些情况下, 欠佳的精子可以越过自然受精过程中的生理检测点并且发育成胚胎, 然后形成胎儿。传统的 ICSI 有注入不成熟、DNA 损伤、非整倍性、低活性、形态学异常、透明带结合缺陷、顶体反应不足精子的潜在风险。如今, 至少对于人类而言, 在选择欠佳精子对 ICSI 成人的长远影响方面, 我们还没有相关的认识。例如, 注入 DNA 损伤精子的一个潜在的令人担忧的负面影响已经由动物研究所证明, 此研究表明其不仅对妊娠和分娩有副作用, 而且对于之后的成年动物的健康亦有影响, 如生长异常、早熟衰老症、行为异常及间质瘤 (Fernandez-Gonzales et al., 2008)。

幸运的是, 在人类中, 虽然染色体畸变的轻微增高似乎是由注入非整倍体精子引起的 (Bonduelle et al., 2002), 但是标准的 ICSI 前精子制备技术似乎已将注入 DNA 损伤精子的风险降到最小 (Zini et al., 2000; Younglai et al., 2001; Donnelly et al., 2000; Ahmad et al., 2007; Jackson et al., 2010; Marchesi et al., 2010; Castillo et al., 2011; Ebner et al., 2011), 同时对 ICSI 儿童的后续研究也证实了该技术的安全性 (Van Steirteghem et al., 2002, Leunens et al., 2008; Belva et al., 2011; Woldringh et al., 2011)。

本章节描述的最新的精炼的 ICSI 操作程序是可靠的、易于操作的、非侵入性的, 并且在某些方面与传统程序相比“最接近自然”。例如, 在 ICSI 之前通过精子的成熟标记如 HA-ZP 受体来选取精子 (Huszar et al., 2003; Paes de Almeida Ferreira Braga et al., 2009), 这样至少可以模拟自然状态, 以便恢复生理性选择并预防假定的 DNA 损伤和染色体不平衡精子的受精。另外, 非侵入性成像精子选择技术如 IMSI (Bartoov et al., 2003) 或精子头部双折射 (Gianaroli et al., 2008) 可以成为理想精子选择的有效辅助方式。

事实上, 基于非侵入性形态学或成熟度标记物进行的精子选择可以帮助胚胎学家选取“完美的”精子进行注射。这些 ICSI 新进展可能会促进精子选择体系改善:

- 受精
- 胚胎质量
- 囊胚形成
- 妊娠
- 流产减少

而且, 一些新技术也有助于标准化 ICSI, 从而减少操作者内部及操作者间选择注射精子的差异性。例如, HA-ICSI 为胚胎学家提供了识别已完成成熟过程的精子的可能性。另一方面, IMSI 可以精确评估和测量精子。尤其是这两种技术还可以

合二为一，在高倍镜评估前先选择 HA-捕获精子。这种组合程序（生理性 IMSI）加速了根据 MSOME 标准进行的“费时”的精子选择过程（Parmegiani et al., 2010 a）。

这些 ICSI 新进展的易重复性应该能促使胚胎学家和临床医生主动的为所有 ICSI 患者提供这些技术的改进，其不仅优化了临床结局，而且恢复了在传统 ICSI 中被省略的自然受精过程中一些基本检测点。

8. 致谢

作者感谢 Ms Maggie 对原稿的校正。

9. 参考文献

- Ahmad L, Jalali S, Shami SA, Akram Z. (2007) Sperm preparation: DNA damage by comet assay in normo- and teratozoospermics. *Arch. Androl* 53, 325-338.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, D'angelo D, Antinori S. (2008) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 16, 835-841.
- Baccetti B. (2004) Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 36, 333-339.
- Balaban B, Lundin K, Morrell JM, Tjellstrom H, Urman B, Holmes PV. (2003) An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. *Hum Reprod* 18, 1887-1889.
- Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. (2011) Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 22, 472-476
- Barak Y, Menezes Y, Veiga A, Elder K. (2001) A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Hum Fert* 4, 99-103.
- Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. (1994) Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 9, 2069-2075.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. (2001) Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 345, 1067-1068.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. (2002) Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23, 1-8.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. (2003) Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 80, 1413-1419
- Belva F, De Schrijver F, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P, Haentjens P, Bonduelle M. (2011) Neonatal outcome of 724 children born after ICSI using non-ejaculated sperm. *Hum Reprod* 7, 1752-1758.
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. (2005) The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically

- selected sperm. Hum Reprod* 20, 185-190.
- Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. (2006a) Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 21, 1787-1790.
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. (2006b) How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 12, 634-638.
- Black M, Liu de Y, Bourne H, Baker HW. (2010) Comparison of outcomes of conventional intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic sperm injection using sperm bound to the zona pellucida of immature oocytes. *Fertil Steril* 93, 672-674.
- Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F. Albert M, Selva J. (2011) Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod* 7, 1650-1658.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steriteghem A, Liebaers I. (2002) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 17, 2600-2614.
- Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R. (2011) Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifugated sperm from infertile patients. *J Androl* 32, 324-32.
- Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, Larue L, Barak Y. (2009) A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 92, 1616-1625.
- Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. (2003) Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 7, 462-468.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. (2004) Sperm selection for ICSI: Shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 19, 2052-2059.
- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. (2000) Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 1552-1561.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. (1995) Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum Reprod* 10, 2960-2964.
- Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. (2011) Easy sperm processing technique allowing exclusive accumulation and later usage of DNA-strandbreak-free spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 22, 37-43.
- Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, de Dios HJ, De Fonseca FR, Gutierrez-Adan A. (2008) Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior

- of adult offspring. *Biol Reprod* 78, 761-772.
- Figueira R de C, Braga DP, Setti AS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. (2011). Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes. *Fertil Steril* 95, 990-993.
- Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. (2008) Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 17, 42-45.
- French DB, Sabanegh ES Jr, Goldfarb J, Desai N. (2010) Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril* 93, 1097-1103.
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. (2008) High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 17, 610-616.
- Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. (2008) Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 90, 104-112.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. (2010) Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 93, 807-813.
- Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen BP, Tesarik J. (2006) High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 12, 19-25.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, Fissore RA, Hamer R, Deane CM, Ruas M, Grasa P, Soleimani R, Cuvelier CA, Gerris J, Dhont M, Deforce D, Leybaert L, De Sutter P. (2009) Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 24, 2417-2428.
- Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. (1996) Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 55, 80-86.
- Huszar G & Vigue L. (1993) Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 34, 292-298.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. (2000) Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 63, 925-932.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. (2003) Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 79 (Suppl 3), 1616-1624.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. (2007). Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 14, 650-663.
- Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, Smith GD. (2010) Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 94, 2626-2630.

- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. (2005) Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 84, 1665-1673.
- Jean M, Barriere P and Mirallie S. (1996) Intracytoplasmic sperm injection without polyvinylpyrrolidone: an essential precaution? *Hum Reprod* 11, 2332.
- Jean M, Mirallie S, Boudineau M, Tatin C and Barriere P. (2001) Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk. *Fertil Steril*, 76, 419-420.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46, 1118-1123.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. (1988) Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49, 112-117.
- Leunens L, Celestin-Westreich S, Bonduelle M, Liebaers I, Ponjaert-Kristoffersen I. (2008) Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children. *Hum Reprod* 23, 105-111.
- Liu F, Qiu Y, Zou Y, Deng ZH, Yang H, Liu DY. (2010). Use of zona pellucida-bound sperm for intracytoplasmic sperm injection produces higher embryo quality and implantation than conventional intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 95, 815-818.
- Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Hershlag A, Feng HL. (2010) The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 151, 176-180.
- Markoulaki S, Kurokawa M, Yoon SY, Matson S, Ducibella T, Fissore R (2007) Comparison of Ca²⁺ and CaMKII responses in IVF and ICSI in the mouse. *Mol Hum Reprod* 13, 265-272.
- Mauri AL, Petersen CG, Oliveire JB, Massaro FC, Baruffi LR, Franco JG Jr. (2010) Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 150, 42-46.
- Menezo Y & Nicolle B. (2004) Replacement of PVP by Hyaluronate (SpermSlow™) in ICSI - Impact on outcome. Abstract of 18th World Congress on Fertility and Sterility IFFS.
- Menezo Y, Junca AM, Dumont-Hassan M, De Mouzon J, Cohen-Bacrie P, Ben Khalifa M. (2010) "Physiologic" (hyaluronic acid-carried) icsi results in the same embryo quality and pregnancy rates as with the use of potentially toxic polyvinylpyrrolidone (PVP). *Fertil Steril* 94 (Supp 1): 232.
- Navarro-Costa P, Nogueira P, Carvalho M, Leal F, Cordeiro I, Calhaz-Jorge C, Gongalves J, Plancha CE (2010) Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod* 25, 2647-2654.
- Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A (2009) Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online* 19 (Supp 13), 45-55
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M (2008) Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 25, 197-

203.

Oehninger S. (2011) *Clinical management of male infertility in assisted reproduction: ICSI and beyond*. *Int J Androl*, 34:e319-329

Paes Almeida Ferreira de Braga D, Iaconelli A Jr, Cassia Savio de FR, Madaschi C, Semiao-Francisco L, Borges E Jr. (2009) *Outcome of ICSI using zona pellucida-bound spermatozoa and conventionally selected spermatozoa*. *Reprod Biomed Online* 19, 802-807.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992) *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. *Lancet* 340(8810), 17-18.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M (2010a) *"Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality*. *Fertil Steril* 93, 598-604.

Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. (2010b) *Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection*. *J Assist Reprod Genet* 27, 13-16.

Parmegiani L, Cognigni GE, Filicori M. (2010c) *Risks in injecting hyaluronic acid non-bound spermatozoa*. *Reprod Biomed Online* 20, 437-438.

Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P, Bartoov B. (2007) *Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C?* *Fertil Steril* 88, 1589-1594.

Prinosilova P, Kruger T, Sati L, Ozkavukcu S, Vigue L, Kovanci E, Huszar G. (2009) *Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology*. *Reprod Biomed Online* 18, 177-183.

Sakkas D, Bianchi PG, Manicardi GC. (1997) *Chromatin packaging anomalies and DNA damage in human sperm: their possible implications in the treatment of male factor infertility*. In: *Genetics of human male infertility* (eds Barratt C, De Jonge C, Mortimer D, Parinaud J), pp 205-221. Editions EDK, Paris, UK.

Sanchez M, Aran B, Blanco J, Vidal F, Veiga A, Barri PN, Huszar G. (2005) *Preliminary clinical and FISH results on hyaluronic acid sperm selection to improve ICSI*. *Hum Reprod* 20 (Suppl), i200.

Schatten H & Sun QY. (2007) *The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI*. *Mol Hum Reprod* 15, 531-538.

Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cassia Savio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E J. (2010) *Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a metaanalysis*. *Reprod Biomed Online* 21, 450-455

Sousa Setti A, Figueira RD, Paes de Almeida Ferreira Braga D, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. (2010) *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection benefits for patients with oligoasthenozoospermia according to the 2010 World Health Organization reference values*. *Fertil Steril* 95, 2711-2714.

Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC, Wikland M. (1996) *The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology*. *Hum Reprod* 11,

1019-1022.

Van Den Bergh M, Fahy-Deshe M, Hohl M.K. (2009) Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 19, 796-801.

Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, Cassuto C, Zech NH. (2008) Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 17, 617-627.

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. (1993) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8, 1061-1066.

Van Steirteghem AC, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I. (2002) Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 8, 111-116.

Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. (2011) Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 28, 253-262.

Woldringh GH, Horvers M, Janssen AJ, Reuser JJ, de Groot SA, Steiner K, D'Hauwers KW, Wetzels AM, Kremer JA (2011) Follow-up of children born after ICSI with epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 7: 1759-1767.

Worilow KC, Huynh HT, Bower JB, Anderson AR, Schillings W, Crain JL. (2007) PICSI vs. ICSI: statistically significant improvement in clinical outcomes in 240 in vitro fertilization (IVF) patients. *Fertil Steril* 88 (Suppl), s37.

Worilow KC, Eid S, Matthews J, Pelts E, Khoury C, Liebermann J. (2010) Multi-site clinical trial evaluating PICSI, a method for selection of hyaluronan bound sperm (HBS) for use in ICSI: improved clinical outcomes. *Hum Reprod* 25 (Suppl), i7.

Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. (2010) Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl* 31, 566-572.

Yanagimachi R. (1994) Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. (eds: Knobil E & Neill JD), pp. 189-317. Raven Press Ltd, New York, .

Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. (2001) Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 16, 1950-1953.

Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. (2000) Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 56, 1081-1084.

(孙晓慧、尚丽丽译)

第八章 无精症男性生育选择的进展

Bin Wu¹, Timothy J. Gelety¹ and Juanzi Shi²

¹Arizona Center for Reproductive Endocrinology and Infertility

Tucson, Arizona, USA

²Shanxi Province Hospital for Women and Children Health Care

Xi'an, Shaanxi, People's Republic of China

1. 引言

不孕症定义为夫妇在规律、无保护的性生活一年后未能怀孕。人们对于不育的误解非常常见。不育大约影响15%的夫妇。这不只是什么“女性问题”，因为不育夫妇中约50%是男性因素造成的。对于不育夫妇而言，不应该低估男方存在的问题。男性不育可能是夫妇未能受孕的唯一原因，所以最好到男性不育专科去确诊。据美国辅助生殖技术学会2009年的全国总结报告，近35%的不孕不育是由于男方因素引起的。在上个世纪后期，只能使用捐赠的精子进行人工授精或体外受精来治疗严重的男性不育。然而，对于大多数不育夫妇，尤其是男性来说，由于民族文化的影响并不愿意使用捐赠的精子。现在，对于男性不育症的研究进展已经产生了新颖的治疗方法，特别是胞浆内单精子注射（ICSI），该方法大大提高了男人，包括那些由于遗传原因没有精子（无精子症）者，获得自己亲生后代的机会（Palermo et al., 1992）。目前，即使是严重的男性不育者，仍然可能使女方怀孕。这主要得益于ICSI技术的成功和外科经睾丸取精技术的进步。近年来ICSI技术已经发展出形态选择胞浆内精子注射（IMSI）和透明质酸捕获选择胞浆内精子注射（PICSI）技术（Parmegiani et al., 2010a, b; Said & Land 2011; Berger et al., 2011），明显提高了世界各地IVF诊所的受精率和妊娠率。因为在这本书的其他章节已经深入探讨了人类ICSI技术的新进展，这里主要讨论通过睾丸活检获得精子、将来源于无精子症男性的圆形或伸长形精子细胞用于人类IVF以及探索利用干细胞和体细胞采用新技术来生产人造精子等。

2. 无精子症男性不育的评价

有多种情况可能会导致男性不育。通过对每对配偶进行全面的临床评价来建立正确的诊断，是治疗男性不育的重要组成部分。精液分析是男性生育力评价的基石，这也是评估男性生育力最简单的方法。而完整的评价标准包括综合全面的病史、体检和至少2次的精液分析。

除了精液分析以外，还要进行专门的精子功能试验，包括精子获能和顶体反应的测量，计算机辅助精子运动分析，精子抗体检测，白细胞定量等。根据世界卫生组织（WHO，2010）的标准，精液参考值下限应包括精液量（1.4~1.7 mL）、精子浓度（12~16百万/mL）、精子运动能力（38%~42%）和形态（3.0~4.0），它们作为一个整体来用于评估精子使女方受精的潜力。在正常范围之外的多次异常结果往往提示男性不育症。在大约1%~2%的病例中，精液分析异常可能是某种危及生命疾病的首要迹象。不育的诊断不仅仅意味着

丈夫出现了问题，同时也可能使其后代的健康处于危险之中。随着对男性不育遗传学认识的不断深入，可能20%的患者由于基因因素引起。这种评价的主要目的是明确问题的原因和排除危及生命的病理情况。因此，男性不育的遗传诊断在辅助生殖技术中发挥重要作用。如今，可以对有遗传风险的不育夫妻进行囊性纤维化、染色体核型和Y染色体微缺失的分析，这些实验具有重要的诊断价值。

在经过详细的精液分析后，可能会找到潜在的男性不育原因（Comhaire & Vermeulen, 1995）：（1）完全没有精子（无精子症）；（2）精子计数低（少精子症）；（3）异常形态精子（畸形精子症）；（4）精子运动异常（弱精子症）；（5）完全不动精子（死精子症），此时的精子可能是活着但不移动，也可能是死精子；（6）精子运输异常，如功能障碍、梗阻、曾行输精管结扎术，或逆行射精等。在早期的研究中，人们认为男性最常见的不育原因是精索静脉曲张，也就是在阴囊中存在曲张的静脉。曲张静脉会产生额外的热量，从而导致低精子计数和精子的运动障碍。不过，一些临床研究发现，修复曲张的精索静脉后并未出现女方怀孕率的明显增长。对Y染色体微缺失的现代研究表明，基因异常可能造成精液参数异常。随着卵胞浆内单精子注射（ICSI）技术的进展，实验人员可以采用显微工具来分离单个精子，然后直接注入到卵母细胞内。该技术与体外受精（IVF）联合，在治疗男性少精子症、弱精子症和女性成熟卵子少的病例中已经获得成功。少精子症的男性经常出现染色体畸变和DNA的完整性受损。因此，体外选择正常的精子是ICSI中至关重要的环节，直接对着床前胚胎的发生产生影响。透明质酸是卵丘细胞基质的主要成分，在IVF中对选择有功能的精子可起到关键作用（Parmegiani et al., 2010a）。PICSI技术已被用于治疗少精子症和弱精子症男性的不育问题。此外，先进的IMSI技术已被用来治疗畸形精子症。

3. 获得无精症男性的精子

在对无精症男子进行完整评估和诊断的基础上，可以通过非手术或手术方式获得精子。

3.1 非手术取精技术

3.1.1 电射精（EEJ）

许多原因会造成脊髓损伤的男性发生不育。射精障碍、精子生成异常、生殖道的慢性感染和堵塞都是潜在因素。目前，已经有一些方法来获取无精子症男性的精子。例如，通过振动刺激阴茎头和阴茎体来得到精液。由于脊髓损伤造成的神经损害或偶因其他原因所导致的男性不射精，可以通过射精管内部的电刺激产生精子。对于能正常产生精子的男性而言，电刺激可沿输精管和附睾形成的输精管路，直接到达睾丸，获得精子，这是一种非常成功的治疗方式，但对于神经系统发生短路者则无法成功。尽管由于在体内时间太长，精子质量往往较差，但通常可用于ICSI治疗。对于因其他原因造成无法射精者，如糖尿病、腹膜后淋巴结清扫术后、盆腔手术后、多发性硬化症、或特发性性高潮损失，EEJ也被证明是有效的。EEJ是非侵入性操作，整个过程在门诊局麻下30 min即可结束，无痛苦，当天即可恢复工作。电射精可在超过90%的患者中获得成功，但在大多数情况下，精子浓度和精子活力相对较低。EEJ结合ICSI技术，受孕率可高达50%。总体而言，通过这种方法怀孕的机率与健康男性类似。不过，对于脊髓损伤平面低于腹部者，电射精必须在满意的麻醉

下操作。为了避免自主神经反射异常引起的并发症，必须进行完整的泌尿系统检查和治疗尿路感染。在此过程中，往往发生逆行射精，也就是精液向后射入膀胱，精子必须从尿中收集。

3.1.2 睾丸精子抽吸术 (TESA) 和经皮附睾穿刺取精术 (PESA)

辅助生殖技术中，TESA和PESA已被用于作为微创或非手术的取精术。这种技术是在镇静情况下进行的快速无痛的过程。一个微小的经皮穿刺针用于直接从睾丸或附睾提取精子。使用这些微创技术，可以从输精管结扎术者、输精管结扎复通术失败者、输精管缺如者、梗阻性无精症者得到精子。此外，在某些非梗阻性无精子症 (NOA) 患者中偶尔可能获得个别精子。取精过程通常在门诊手术完成，持续约1 h。经皮抽吸技术的优点在于可以局部麻醉，不用开放手术进行阴囊探查和无随后带来的术后不适，无需显微外科经验。此外，患者并不需要住院治疗，并几乎立刻恢复。患者在一两天内就可返回到工作岗位。应该指出的是，一些男性单次经皮穿刺就可产生足够的精子，可将其冷冻用于后续的ICSI。与一次射精通常含有100~300百万个精子相比，通过这种技术取精虽然只能获得100~200个精子，但当它与ICSI结合时，足以使女方成功怀孕。

3.2 手术取精技术

当精子产量低或附睾、睾丸有一定萎缩时，需要应用显微外科技术进行手术取精，该方法是经附睾、含精子丰富的背侧睾丸小管或直接切除小块睾丸组织，进行处理后最终得到精子，一般包括：显微附睾精子抽吸术 (MESA) 和睾丸精子抽取术 (TESE)。这两种技术显然更具侵入性。当患者的精子产量极低时，TESE是在高倍镜下非常精确地寻找精子的过程。MESA和TESE是最常用的手术方式，因为两者的目的是获取足够的精子来冻存用于未来的ICSI。MESA从附睾小管中直接取得精子，从而最大限度地减少血细胞污染附睾液，这可能会对IVF中精子的受精能力产生影响 (Cornell Physicians, 2010)。不过，在大多数情况下，MESA结果往往很差和难以预测。因此，TESE是从非梗阻性无精子症或梗阻性无精子症 (OA) 患者中获得精子的一种有效和易被接受的技术。不过，常规的TESE技术是在多个区域进行盲穿睾丸活检，需要切除大量睾丸组织 (>700 mg)，存在睾丸永久性损害的风险。最近的研究建议 (Pühse et al., 2011)，诊断OA时没有必要进行睾丸活检，因为其具有正常的FSH、葡萄糖苷水平和正常睾丸体积。不过由于正常的精子发生经常出现在较大的睾丸，因此对OA者进行单侧活检是可行的，当两侧睾丸之间的差异显著时，则可对较大侧睾丸进行操作。利用光学放大系统，在睾丸的相对无血管区做切口。目前，因为许多泌尿科诊所没有先进的显微手术仪器，所以多采用常规手术途径经睾丸或附睾获得睾丸组织活检。睾丸暴露后，沿鞘膜做长切口显露出睾丸实质。将曲细精管轻轻分开，在手术显微镜下检查。睾丸的精子可能存在于非梗阻区的睾丸小管中。这样做损伤最小，可避免破坏睾丸功能，如果没有取到足够数量的精子还有进行ICSI的机会。但睾丸活检是一种侵入性手术，因此，有效应用TESE和精子冻存技术将可减少额外手术。

4. 睾丸活检精子的优选方法

治疗无精子症时，用外科手术进行睾丸取精被广泛使用，但睾丸活检是一种侵入性手术，而使用显微镜将减少手术打击。在过去的十年中，许多研究小组建议优化使用睾丸活检的标本。目前已经产生了几种策略，包括改善精子活力和增加冷冻后的活动精子回收率

(Wu et al., 2005)。在大多数情况下，睾丸活检只能得到几个精子，而且这些精子完全不活动，偶尔会出现个别精子缓慢的“颤动”。无精子症的治疗目的是在睾丸组织中获得足够的活动精子用于ICSI。在临床实践中，我们使用以下3种方法来优化单个的睾丸活检标本。

4.1 从睾丸活检组织中获得活动或不活动的精子

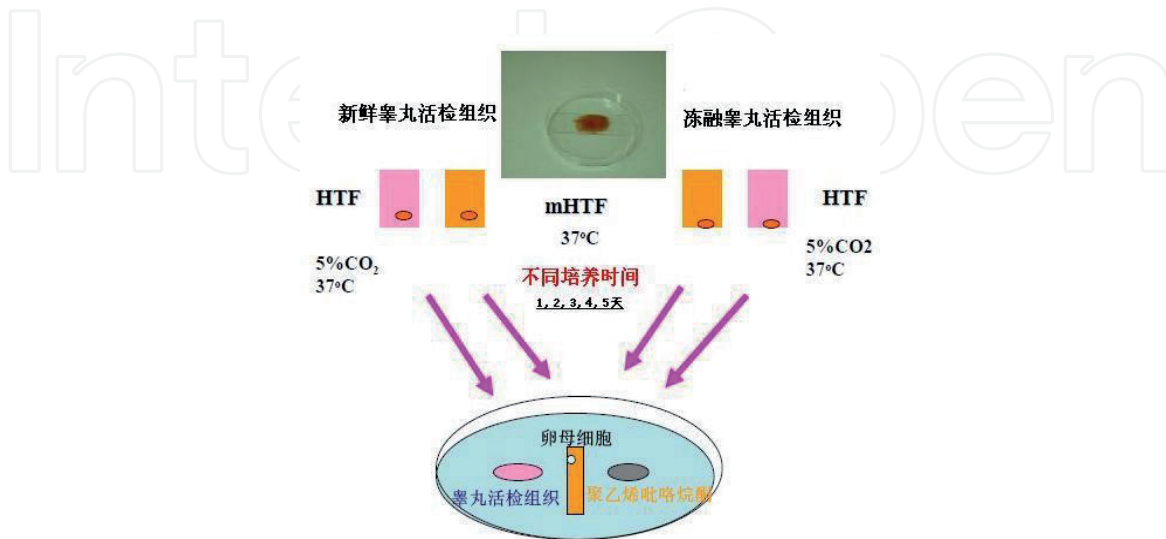
睾丸组织活检手术往往是由泌尿科医生在局麻下进行。获得睾丸活检组织后，要马上检查是否存在精子和他们的运动情况，但TESE样品通常包含大量组织、红细胞和碎片。在我们实验室，将标本切成小块，把所有组织和培养液移入到离心管中，离心后用改良人输卵管液（mHTF, Irvine scientific, CA）洗涤。移去上清液，将沉淀用1~2 mL的mHTF液重悬混合。然后，取带有少量组织的切片，在显微镜下检查精子情况。

4.2 睾丸活检组织的体外成熟

实施ICSI的唯一要求是每一个卵母细胞对应一个活精子 (Nagy et al., 1995)。精子运动不是ICSI获得成功的必要条件，但其是最可靠的精子生存的标记。经睾丸抽取的精子数量常常足够用于ICSI，不过这些极少数的精子在刚获得的睾丸活检标本中表现为颤动或完全不动。我们的研究结果显示，在刚取得的睾丸活检样本中，活动精子小于3%（轻微颤动）(Wu et al., 2005)。大多数情况下，刚取得或冻融的TESE标本中难以找到足够多的活动精子。因此，我们研究通过培养睾丸活检组织来获得活动精子的可靠方法。为了从新鲜或冻融的睾丸活检组织中得到更多的活动精子，我们采用2种培养基mHTF和HTF进行了对照实验（图1）。

我们的结果表明，在37°C条件下培养，无论是新鲜还是冻融的睾丸活检组织，在HTF培养基（在含5%CO₂环境下）中的结果略好于mHTF，但差异没有统计学意义（表1）。我们进一步的实验表明，经过体外培养24小时后，活动精子数量明显增加，最高的精子活动率在培养48~72小时出现（图2），直到培养120小时仍然可以观察到活动精子（Wu et al., 2005）。基于我们的研究和临床实践，对于ICSI而言，如果使用睾丸中的精子，其最佳时间是培养24~48小时后。因此，睾丸活检的操作可在取卵前一天或两天进行。

图1. 睾丸活检组织在2种培养基（mHTF和 HTF）中的流程

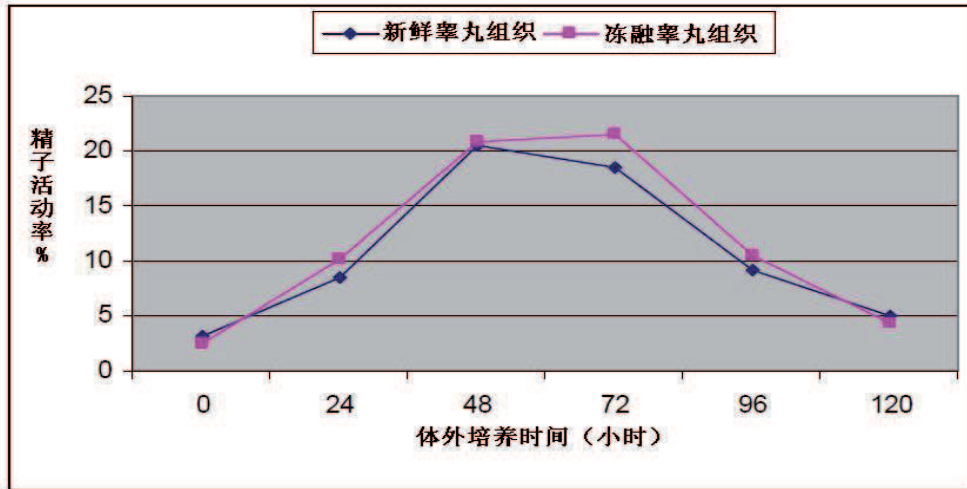


[切碎的睾丸活检组织分成2部分，分别在mHTF（不存在CO₂）和HTF（存在CO₂）培养基中孵育。第1~5天，比较活动精子数]

表1. 睾丸组织在2种培养基中进行体外培养对精子活力的影响

培养时间	0 小时	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时	120 小时
HTF 培养基	2.1±2	9.0±7.2	15.0±6.5	35.0±15.3	25.4±11	15.0±9.3
mHTF 培养基	2.0±2	7.5±6.5	12.0±7.6	31.0±17.2	23.0±12	13.0±9.9

图 2. 体外培养TESE组织的时间对精子活动力的影响



4.3 睾丸活检组织的冷冻保存

通过开放手术进行睾丸活检是一种侵入性操作。冷冻保存睾丸活检的标本，可以避免对无精症患者进行反复的睾丸活检。手术取精后，采用简易方法冻存梗阻性和非梗阻性无精症患者的睾丸精子，有助于提高总成功率 (Friedle et al., 1997)。当解冻的睾丸精子培养48小时后，精子活力明显提高 (图2)。我们的研究表明，在体外培养期间，冻融TESE标本的活力与新鲜TESE样本相似。培养24小时后，冻融TESE标本显示活动精子的数目增加。在大多数标本中，我们并没有观察到冷冻对睾丸精子的生存产生不利影响。不过，我们观察到其他细胞 (包括精子细胞和生殖细胞) 的冷冻损伤。使用含有甘油的蛋黄缓冲液 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 进行冷冻保存，简便、实用、精子生存可靠性高。因此，我们建议：在IVF的临床实践中，常规冷冻保存所有的睾丸活检标本。

总之，对梗阻性和非梗阻性无精子症患者的睾丸活检标本，进行冻存和体外培养促其成熟是有益的处理方法。这些技术为使用一个睾丸活检标本进行IVF/ICSI提供了可能性。在ICSI取卵前1~3天，对新鲜和冷冻的标本进行体外培养可能会增加精子运动能力。睾丸活检标本的冻存和随后进行的体外培养是代替取卵前睾丸活检手术的可靠方法，允许根据患者的具体情况予以调整。

5. 圆头精子症的治疗

圆头精子症可在不到0.1%的男性不育患者中发现，其会造成精子失去激活卵母细胞的能力。圆头精子症是罕见的畸形精子症，其特征是精子头圆形、无顶体囊泡，伴有杂乱的

中段和尾部 (Holstein et al., 1973)。Sigh (1992) 等描述了不同类型的圆头精子症, 全部精子或仅部分精子缺乏精子顶体和球形核或保留顶体囊泡脱离原子核的遗迹。电镜下观察这些精子表现为典型的圆头, 细胞核内有大空泡区, 无顶体, 中段和尾部异常 (Stone et al., 2000, Dam et al., 2007)。因染色质包装异常 (Larson et al., 2001) 和线粒体异常 (Battaglia et al., 1997) 造成的细胞核损害, 亦有描述。人类精子形态的缺陷增加了精子细胞内有更多异常的可能性, 对临床实践可能有意义。最近, Dam等 (2007) 回顾和总结了圆头精子症的临床特点、出现这种情况的可能原因以及对临床实践的影响, 把其做为遗传分析的一个先决条件。圆头精子在缺乏顶体结构的情况下, 无法结合透明带。因此, ICSI是这些患者唯一的治疗方法, 但是自1995年诞生第1例圆头精子症患者的后代 (Trokoudes et al., 1995) 以来, 该病的低受精率和只有少数婴儿能够出生一直困扰着研究者。这大概可以解释为卵母细胞激活出现异常 (Battaglia et al., 1997; Nardo et al., 2002)。行ICSI后的低受精率表明, 这些精子没有激活卵母细胞的能力。因此, 研究者采用各种激活卵母细胞的方法, 包括常规ICSI吸吮卵浆、应用钙离子载体, 并有怀孕和活产婴儿的报道 (Rybouchkin et al., 1996; Eldar-Geva et al., 2003)。不过, 也有只进行胞浆内单圆头精子注射而未采取辅助激活卵母细胞措施的一些正常活产儿的报道 (Stone et al., 2000; Banker et al., 2009)。一般来说, 采用ICSI技术联合卵母细胞激活措施, 可能实现圆头精子症患者拥有自己孩子的梦想, 但较低的受精率和妊娠率严重影响整体成功率。使用这些精子并未出现增加堕胎、流产或非整倍体/出生缺陷后代的风险 (Dam et al., 2007)。目前, 在临床IVF实践中, 治疗这些患者的唯一选择是行ICSI, 尽管可以反复进入治疗周期, 但并没有一个指标能够明确的预测结局是否成功。

6. 精子细胞的选择

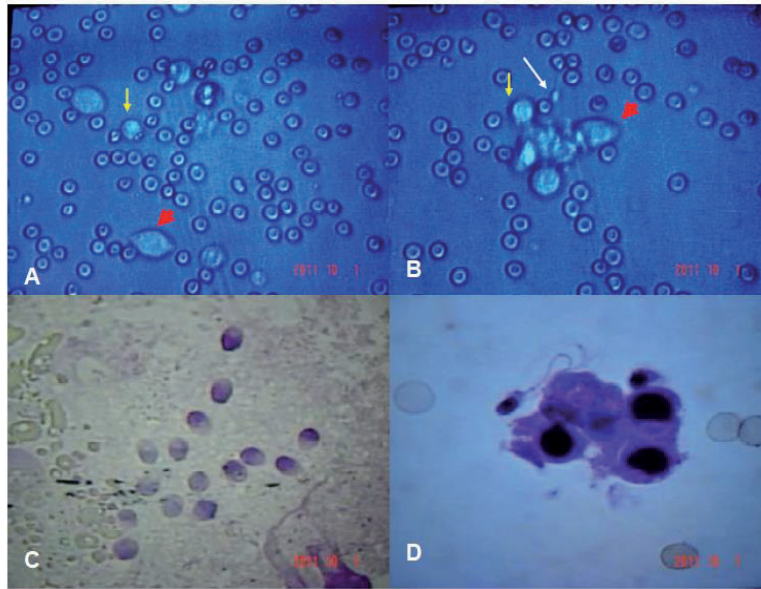
在某些无精子症患者, 即使采用外科手术技术 (如MESA、FNA、TESE、TESA) 也仍然无法找到精子。为此, 研究者尝试针对未成熟的雄性生殖细胞采用多种新技术来进行辅助生殖。有研究表明, 与成熟的精子相比, 精子细胞具有高受精能力, 可以有效地代替配子 (Al-Hasani et al., 1999, Mansour et al., 2003), 这对于无精子症的治疗是一种技术上的突破。与精子相比, 精子细胞是未成熟的单倍体生殖细胞, 尚未发生生化和形态的变化。从形态上看, 哺乳动物精子的形成涉及到伸长、精子细胞核压缩、顶体的发育和微管套短暂出现, 因此精子细胞可能会显示圆形或长形 (Kierszenbaum et al., 2007)。与圆形精子细胞相比, 伸长形精子细胞似乎处于更高阶段。在湿片中这些细胞很容易与其他细胞区分 (图3)。非梗阻性无精子症的男性可以采用卵母细胞内圆形精子细胞注射 (ROSI) 或伸长形精子细胞注射 (ELSI)。曾有人建议, 注射的精子细胞应完好无损, 并且伸长形精子细胞优于圆形精子细胞 (Fishel, 1995)。精子细胞可从精液或睾丸活检组织中获得 (图3)。精子细胞核包含半量染色体, 因此可直接注射入卵母细胞。虽然精液中的圆形和伸长形精子的受精率分别为33%和18%, 睾丸内的分别为22%和38%, 但两者之间的受精率相似 (Fishel et al., 1997)。不过另有多项研究表明, 精子和伸长形精子细胞比圆形精子细胞有更高的植入成功率和出生率, 而精子和伸长形精子细胞之间没有差别 (Ogonuki et al., 2010)。自1995年通过注射精子细胞获得第一例试管婴儿以来 (Tesarik et al., 1995), 又有许多健康婴儿通过该技术手段陆续出生。在过去的几年中, 我们的试管婴儿中心进行了5例圆形

精子细胞注射，于2007年有一位健康的男孩出生。这位典型的病例是从一位23岁的女性体内取得6个卵母细胞，于2006年4月将来自于其丈夫的新鲜睾丸活检组织中的圆形精子细胞注入4个成熟的卵母细胞中。结果，一个卵子显示正常的两个原核，另一个卵子显示异常的三核，其他两个则是未受精的卵母细胞。第3天，只将处于正常的6细胞阶段受精胚胎植入，最终于2007年2月诞生一名男孩。我们的临床实践表明，在睾丸活检标本中当正常的精子或长形精子细胞无法找到时，圆形精子细胞可用于生产健康后代。但是，圆形精子细胞注射的受精率较低，只有年轻夫妇才能成功怀孕。

虽然精子细胞可以作为治疗无精症患者的一种选择方式，但因其低受精率和妊娠率严重影响了其成功率 (Sousa et al., 1998; Akhondi et al., 2003)。应用精子细胞时会面临一个主要问题，那就是可能伴有核蛋白的不完全成熟。因此，许多研究者热衷于研究精子细胞的体外培养过程，试图寻找到合适的介质使成熟圆形精子细胞以合理的速度进入到长形阶段甚至成为成熟精子 (Cremades, 1999)。此外，研究者还关注精子细胞体外成熟的最适温度、体外精子生成过程加速的原因、是否可以用生精细胞群来代替单细胞方面 (Tesarik et al., 2000; Amarin et al., 2002)。在我们进行的TESE培养实验中显示，经24~48小时培养后，少数圆形精子细胞的形状会略有变化，但因为我们没有跟踪单个精子细胞的成长，所以我们不能确定这种培养基是否可以促进圆形精子细胞成为长形精子细胞。虽然有一些报告表明，圆形精子细胞在特殊的体外培养基中可以长出鞭毛和成为长形精子细胞 (Aslam & Fishel, 1999)，但我们认为选择将光镜下没有细胞膜损伤的精子细胞注入卵母细胞中，似乎才是影响受精成功率的重要因素。尽管体外培养圆形精子细胞是一种很有前途的方法，但我们建议这些经体外培养成熟的精子细胞在临床试验前，应该首先进行检查，以验证其是否有活力 (台盼蓝染色)，是否包含正常染色体 (荧光原位杂交，FISH)，是否能够使卵母细胞受精 (经实验性注射确定正常受精率、卵裂率)，产生的胚胎基因是否正常 (FISH)。将一个活的精子细胞注入卵母细胞会增加受精机会，但活精子细胞很难识别。因此，选择最佳形状细胞可能会有助于在睾丸活检标本中区分出活精子细胞，这可以简单通过观测细胞大小和存在其周围被一圈细胞质包绕的圆型细胞核来证实 (图3, Silber et al., 2000)。

如上所述，精子细胞的核蛋白不成熟，但将其注入到卵母细胞质后，激活的卵母细胞质可以诱发核蛋白成熟。因此，对于精子细胞注射而言，卵母细胞的活化是非常重要的。卵母细胞可以通过多种人工措施在注射之前或期间被激活，以便于摧毁促成熟因子 (MPF)。这些举措包括，注射过程中强力抽吸卵细胞质、电脉冲、注射摆蛋白 (oscillin)、钙离子载体或乙醇刺激。事实上，精子细胞注入经钙离子载体 A 23187处理过的卵母细胞可增加受精率，并应用ROSI技术诞生了一个健康婴儿 (Ahmady&Michael, 2007)。基于我们的临床实践，我们建议当精子细胞被注入卵母细胞的细胞质中而没有其他卵母细胞激活时，其细胞膜应该用注射针打破。圆形精子细胞直径7~8 μm ，并有光滑的圆形轮廓。当这些精子细胞注入到卵母细胞时，可以使用相同尺寸 (7~8 μm) 内径的注射针。精子细胞被吸入到注射针后，再被挤出时细胞膜就被打破了。这种简单技术可以大大提高使用精子细胞的受精率。

图3. 睾丸活检组织中的精子细胞和球形精子



[图A和B示未染色的睾丸活检组织，红色和黄色箭头分别示长形和圆形精子细胞。白色箭头示精子。圆形细胞是血细胞。图C和D是用Testesimplet染色的结果。球形精子没有尾部（C），D中可见精子细胞和精子]

7. 应用次级精母细胞

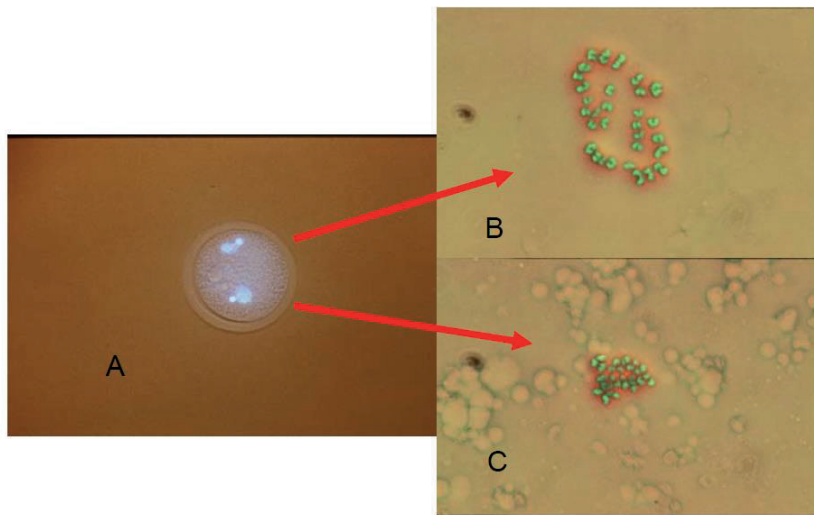
在IVF中，注射圆形或伸长形精子细胞会诞生正常后代，但有时在Hoffman光镜下难以区分这些细胞到底是单倍体圆形精子细胞、二倍体精母细胞、精原细胞，还是体细胞（比如像睾丸支持细胞或睾丸间质细胞）？那么我们可以考虑使用不成熟的生殖细胞来受精吗？根据我们对卵母细胞成熟机制的认识，卵母细胞在减数分裂II阶段成熟，这是因为哺乳动物的卵母细胞在此阶段具有两个关键因子：中期促进因子（MPF）和抑制细胞生长因子（CSF），他们是C-MOS原癌基因产物的主要组成部分之一（Wu et al., 1997 a, b）。这两个关键因子在卵母细胞的细胞质中被激活，并在第二次减数分裂中期维持成熟卵母细胞染色体的稳定。当采用上述方法激活卵母细胞时，C-MOS原癌蛋白降解引起CSF和MPF在细胞质内失活，被注入的精子细胞或精子的染色体和卵母细胞染色体开始融合形成合子。但是，将未成熟的三倍体精母细胞注入卵母细胞，卵母细胞不会被激活。此时，被注入的细胞核暴露于MPF和CSF的环境中，而两者可能诱导其进入中期阶段，卵母细胞的细胞核也同样如此（Tesarik, 1996）。如果卵母细胞被激活，MPF和CSF的失活将导致注入的细胞核浓缩并完成减数分裂形成单倍体染色体组。因此，在卵母细胞未被激活的情况下，注射成熟前期细胞的染色体产生浓缩，这是使次级精卵母细胞实现受精的必要条件（Kimura & Yanagimachi, 1995）。

8. 诱导成年体细胞

因为未成熟的卵母细胞中的某些重要成分对细胞核重塑是必不可少的（Gao, 2002），因此采用相同的理论和技术，体细胞也可被不成熟或成熟的卵母细胞诱导出单倍体染色体的细胞（Tesarik 2002; Keefer 2007; Neri et al., 2009）。在我们的初步动物实

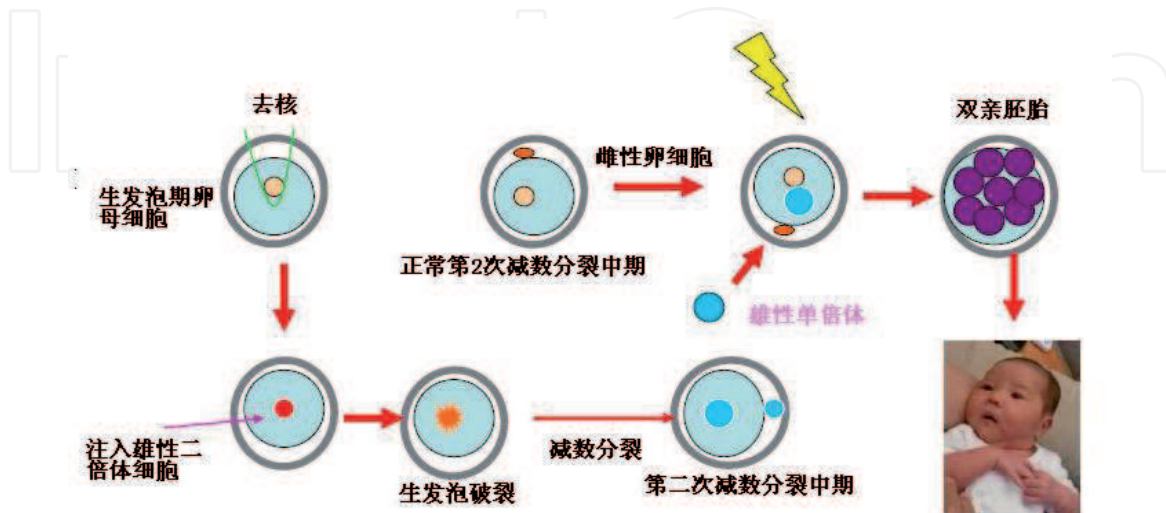
验中，从牛卵巢卵泡液中获得卵丘细胞被注入去核未成熟的卵母细胞内，体外培养24小时后，注射的细胞核被Hoechst 33258染色，用荧光显微镜可观察到两套分离的染色体（图4A）。将2套染色体取出后，计数染色体数目。成年牛有60条二倍体染色体，诱导后每套包含30条染色体（图4B和图4C）。因此，未成熟的卵母细胞可成功诱导体细胞获得单倍体。当单倍体细胞核从诱导成熟的卵母细胞移出后，转移到一个正常的卵母细胞中，采用电-融合方法使卵母细胞核和注射的雄性核融合形成受精卵类似物，后者发育成用于移植的胚胎（图5）。

图4. 应用卵母细胞诱导体细胞基因组成为单倍体基因组的预实验



[单个牛卵丘细胞被注入到去核未成熟卵母细胞内。经24小时体外培养后，注射的细胞核被Hoechst 33258染色，用荧光显微镜观察2套染色体组（蓝色，A）。经处理后得到分离的染色体，每套有30条染色体（绿色，B和C）]

图5. 应用未成熟卵母细胞诱导雄性体细胞进行完全性减数分裂

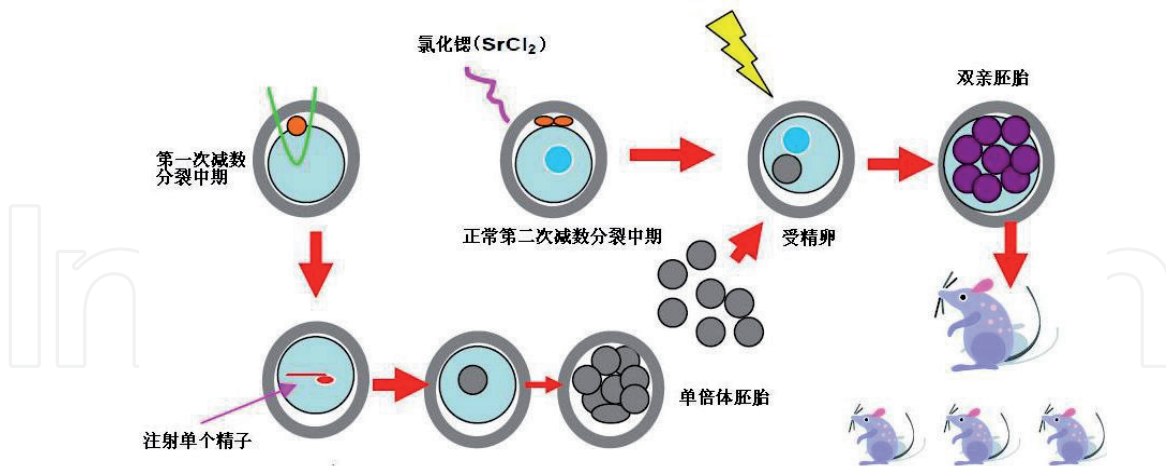


(去除未成熟卵母细胞核，将雄性二倍体体细胞注入其中。进行完全性减数分裂后，诱导的单倍体细胞核转移入正常成熟卵母细胞内，形成的双亲胚胎进行转移。)

9. 精子的细胞克隆

在一些少精子症和无精子症患者中，偶尔在他们的精液和/或睾丸活检组织中会发现单个有活力的精子。这个精子对于希望怀孕的夫妇是非常珍贵的，那么单个精子如何被用来帮助患者实现自己有孩子的梦想呢？如果只发现了一个精子，我们不得不用于受精。如上所述，由于卵母细胞的细胞质可诱导异源细胞的细胞核融合，我们曾尝试将精子注入到去核的卵母细胞中，观察精子细胞核动力学（Jones et al., 2010; Ogonuki et al., 2010）。最近的研究显示了人工复制单个精子基因的可能性，这或许有助于极低精子计数的男性成为父亲，这被称为“精子细胞或男性基因组克隆”（图6）。利用这种技术有可能产生足够多的精子细胞核，以确保产生和植入的胚胎是健康的。精子细胞克隆已用于小鼠身上，他们将小鼠精子注入去核的小鼠卵母细胞（Hopkin, 2007）。在被卵激活的去核卵母细胞中，精子可形成单雄原核，然后电-融合。该单倍体合子能发育成早期胚胎。当产生的胚胎发育为4~8个细胞时，每个卵裂球可被专门的方法所分离（图6）。该方案在几乎所有的病例中获得成功，在超过80%的克隆分析中发现从源精子产生的卵裂球染色体与起源者相同。然后，将得到的细胞与已被化学激活的正常卵子融合。采用这种技术，Palermo博士的研究小组获得了64-细胞囊胚，将胚胎植入到6个同源母鼠体内，有4只发育成正常小鼠（Takeuchi, 2008）。由此生育的异常后代发生率与克隆动物一致。这种技术为无精症男性提供了一种新的思路，但用于人类自身还有很长的路要走（Takeuchi, 2008）。要想弄明白为什么胚胎会发育受损和出现异常，并采取预防措施，还有很多工作需要去做（Neri et al., 2009）。

图6. 精子基因组克隆示意图



（将单个精子注入去核卵母细胞，然后通过孤雌生殖过程形成4~8个细胞单倍体胚胎。将1个卵裂球转移至正常成熟卵母细胞形成合子。发育后的胚胎转移至宿主体内产生后代。）

10. 制造人工精子

胚胎干细胞技术的发展使制造人工精子取得突破（Ogawa, 2008）。在过去的10年间，许多研究小组已经试图在实验室里重现精子生成的过程，他们以干细胞为原料，小鼠为动

物模型。2003年，美国科学家巧妙地将小鼠胚胎干细胞变成原始精子，后者注入卵母细胞后形成正常胚胎。这种能够受精的“人工精子”已经在实验室中首次产生，可能终结男性不育。2005年，英国科学家进一步显示人类的精子和卵子都可以从干细胞产生，并于2009年在英国大学创造出世界上第一个产自于干细胞的人类精子 (Alleyne, 2009)。然而，实验引起了对于胚胎研究的激烈争论。近期，日本研究人员将小鼠胚胎干细胞转变成早期精子细胞，这种细胞被称为原始生殖细胞 (PGCs)，并成功将这种早期精子细胞植入到不育老鼠中，经此处理能够产生健康的后代 (Hayashi et al., 2011)。

其他类型胚胎细胞可以重复人工精子的制造过程，这些细胞被处理成干细胞状态。这些干细胞被称为诱导式多能性干细胞 (iPS细胞)，可来源于多种起始细胞，包括皮肤细胞。选择带有绿蛋白标记的提取自小鼠胚胎的雄性胚胎干细胞，这些干细胞能够分化成组成机体的任何特有细胞类型。在特定条件下，胚胎干细胞被诱导发育成特定类型的细胞，被称为“原始生殖细胞样细胞或原始生殖细胞”。原始生殖细胞再形成生殖细胞，然后产生精子。原始生殖细胞样细胞被移植到无生殖细胞的小鼠睾丸中。当这些细胞发育成精子后，被从睾丸中提取出来，并注射到正常小鼠卵母细胞内。产生的胚胎被转移到雌性小鼠体内，诞生出了健康后代。这项研究对进一步了解精子如何生成有巨大的影响，可能有一天我们将其应用于临床，为不育男子制造精子。在未来的十年，我们相信这项技术可使没有精子和精子细胞的不育夫妇拥有自己的遗传学孩子。其甚至可以从女性干细胞产生精子，这将最终意味着一个女人可以不需要男人就有自己的孩子。

11. 结论

对男性不育的认识取得了激动人心地进展，产生出创新的治疗方案。这主要归因于ICSI技术在不孕夫妇中的迅速普及和对无精子症男子实施先进的睾丸取精手术，这大大提高了不育夫妇拥有自己生物学后代的机会。目前，即使是病情严重的男性不育者，其配偶也可因先进的技术得以怀孕。随着ICSI技术的进一步发展，可以通过IMSI或PICSI方法选择单个形态和功能良好的精子，提高胚胎着床率和妊娠率。睾丸活检似乎是获得无精症男性精子最可行的技术，因为单次睾丸活检可提供的精子（如果标本含有精子）或精子细胞（如果活检组织中不包含任何精子）数就足够用于ICSI。与正常射出的精子相比，应用无精子症患者的睾丸活检精子可能会获得同样高的怀孕率，但由于低受精率和妊娠率，应用精子细胞的效果则存在疑问。由于细胞克隆技术的发展，治疗无精子症的其他选择包括应用次级精母细胞、克隆精子细胞、通过诱导干细胞制造人工精子和诱导成人体细胞生成精子细胞等。虽然这些技术仍停留在动物实验阶段且效率低下，但我们相信，在未来十年这些新型技术的应用将大大提高不育夫妇（特别是无精症男性）拥有自己生物学后代的机会。

12. 参考文献

- Ahmady A , Michael E (2007) Successful pregnancy and delivery following intracytoplasmic injection of frozen-thawed non-viable testicular sperm and oocyte activation with calcium ionosphere. *J Androl* 28:13-14.
- Akhondi MA , Sedighi MA , Amirjannati N , Sadri-Ardekani H (2003) Use of spermatide for treatment of non-obstructive azoospermic patients. *J Reprod Infertil* 4(3):177-183.

- Al-Hasani S , Ludwig M , Palermo I , Kupker W , Sandmann J , Johannisson R , Fornara P , Sturm R , Bals-Pratsch M , Bauer O , Diedrich K (1999) Intracytoplasmic injection of round and elongated spermatids from azoospermic patients: results and review. *Hum Reprod Suppl* 1:97-107
- Alleyne R , Science Correspondent 7:01AM BST 08 Jul 2009 Human sperm created from stem cells in world first , claims British university *The Telegraph* 08 Jul 2009.
- Amarin ZO , Jamal HS , Rouzi AA (2002) Successful pregnancy after round spermatid microinjection. *Saudi Medical Journal* 23 (1): 113-114.
- Angelopoulos T , Adler A , Krey L , Licciardi f , Noyes , McCullough A (1999) Enhancement or initiation of testicular sperm motility by in vitro culture of testicular tissue. *Fertil Steril* 71(2): 240-243.
- Arakil Y , Ogawa S , Ohnol M , Moshizawa m , Araki S , Aslam I , Fishel S. (1999) Successful metaphase chromosome analysis of human elongated spermatids using mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 5 (8): 784-787.
- Aslam I , Fishel S (1999) Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated , in-vitro cultured and cryopreserved human spermatids by injection into hamster oocytes. *Hum Reprod* 14 (6): 1528-1533.
- Banker MR , Patel PM , Joshi BV , Shah PB , Goyal B. Successful pregnancies and a live birth after intracytoplasmic sperm injection in globozoospermia *J Hum Reprod Sci* 2009 , 2: 81-82.
- Battaglia DE , Koehler JK , Klein NA and Tucker MJ (1997): Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil Steril* 68 , 118-122.
- Berger DS , AbdelHafez F , Goldfarb J , Desai N (2011) Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology , embryonic cleavage and compaction. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 37
- Comhaire F , Vermeulen L (1995) Human semen analysis. *Hum Reprod Update* 1:343-362.
- Cornell Physicians (2011) Male infertility/sperm retrieval techniques. www.cornellurology.com/infertility/srt/icsi.shtml
- Cremades N , Bernabeu R , Barros A , Sousa (1999) In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum Reprod* 14 (5): 1287-1293.
- Dam AH , Feenstra I , Westphal JR , Ramos L , van Golde RJ , Kremer JA (2007) Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 13:63-75.
- Eldar-Geva , T , Brooks B , Margalioth EJ , Zylber-Haran E , Gal M , Silber , SJ (2003). Successful pregnancy and delivery after calcium ionophore oocyte activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection *Fertil Steril* 79(suppl. 3):1656-1658
- Fishel S , Green S , Hunter A , Lisi F , Rinaldi L , Lisi R , McDermott H (1997) Human fertilization with round and elongated spermatids. *Hum Reprod* 12 (2): 336-340.
- Friedler S , Raziel A , Soffer Y , Strassburger D , Komarovsky D , Ron-EI R (1997) Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non-obstructive azoospermia: A comparative study. *Fertil Steril* 68:892-897.
- Gao S , Gasperrini B , McGarry M , Ferrier T , Fletcher J , Harkness L , De Sousa P , Wilmut I (2002) Germinal Vesicle Material Is Essential for Nucleus Remodeling after Nuclear Transfer. *Biol Reprod* 67(3):928-934.
- Girardi SK , Schlegel PN (1996) Microsurgical epididymal sperm aspiration: Review of techniques , preoperative considerations , and results. *J Androl* 1:5-9.
- Hayashi K , Ohta H , Kurimoto K , Aramaki S , Saitou M (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146:519-532.
- Holstein AF , Schirren CG , Schirren C , Mauss J (1973) Round headed spermatozoa: A cause of male infertility. *Dtsch Med Wochenschr* 98:61-2.
- Hopkin M (2007) Mice born from cloned sperm Technique raises hopes for infertile men. Published online 3 July 2007 Nature doi:10.1038/news070702-8 [http: / / www.nature.com/news/2007/070702/full/news070702-8.html](http://www.nature.com/news/2007/070702/full/news070702-8.html)
- Jones EL , Mudrak O , Zalensky AO (2010) Kinetics of human male pronuclear development in a heterologous ICSI model. *J Assist Reprod Genet* 27(6): 277-283.
- Jow WW , Steckel J , Schlegel PN , Magid MS , Goldstein M (1993) Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J Androl* 14:194-198.
- Keefer Cl , (2008) Lessons learned from nuclear transfer (cloning). *Theriogenology* 69(1):48-54.

- Kierszenbaum AL , Rivkin E , Tres LL (2007) *Molecular biology of sperm head shaping. Soc Reprod Fertil Suppl.* 65:33-43.
- Kimura Y , Yanagimachi R (1995) *Development of normal mice from injected with secondary spermatocytes nuclei. Biol Reprod* 53:855-852.
- Larson KL , Brannian JD , Singh NP , Burbach JA , Jost LK , Hansen KP , Kreger DO , Evenson DP (2001) *Chromatin structure in globozoospermia: a case report. J Androl* 22 , 424-431
- Maggiulli R , Neri QV , Monahan D , Hu J , Takeuchi T , Rosenwaks Z , Palermo GD (2010) *What to do when ICSI fails. Syst Biol Reprod Med* 6(5):376-87.
- Mansour RT , Fahmy IM , Taha AK , Tawab NA , Serour HI , Aboulghar MA (2003) *Intracytoplasmic spermatid injection can result in the delivery of normal offspring. J Andrology* 24(5):
- Matthews GJ , Goldstein M (1996) *A simplified method of epididymal sperm aspiration. Urology* 47:123-125.
- Nagy Z , Liu J , Cecile J , Silber s , Devroey P , Van Steirteghem A (1995) *Using ejaculated , fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril* 63:808-815.
- Nardo LG , Sinatra F , Bartoloni G , Zafarana S and Nardo F (2002) *Ultrastructural features and ICSI treatment of severe teratozoospermia: report of two human cases of globozoospermia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 104:40-42.
- Neri QV , Takeuchi T , Rosenwaks Z , Palermo GD (2009): *Treatment options for impaired spermatogenesis: germ cell transplantation and stem-cell based therapy. Minerva Ginecol* 61(4):253-9
- Ogawa T (2008) *Reproductive stem cell research and its application to urology. International Journal of Urology* 15(2):121-127.
- Ogonuki N , Mori M , Shinmen A , Inoue K , Mochida K (2010) *The effect on intracytoplasmic sperm injection outcome of genotype , male germ cell stage and freeze-thawing in mice. PLoS ONE* 5(6): e11062. doi:10.1371/journal.pone.0011062
- Palermo GJorisH , Devroey P , Van Steirteghem AC (1992) *Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet* 340:17-18.
- Parmegiani L , Cognigni GE , Bernardi S , Troilo E , Ciampaglia W , Filicori M (2010a) *"Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus , resulting in improvement of embryo quality. Fertil Steril* 93: 598-604
- Parmegiani L , Cognigni GE , Ciampaglia W , Pocognoli P , Marchi F , Filicori M (2010b) *Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. J Assist Reprod Genet* 27(1):13-6
- Puhse G , Hense J , Bergmann M , Kliesch S (2011): *Bilateral histological evaluation of exocrine testicular function in men with obstructive azoospermia: condition of spermatogenesis and andrological implications? Human Reprod* 26(10):2606-2612
- Rybouchkin A , Dozortsev D , Pelinck MJ , De Sutter P , Dhont M (1996) *Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. Hum Reprod* 11:2170-5.
- Said TM , Land JA (2011) *Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. Hum Reprod Update* doi: 10.1093/humupd/dmr032 First published online: August 25 , 2011
- Schlegel PN , Palermo GD , Goldstein M (1997) *Testicular sperm extraction with ICSI for nonobstructive azoospermia. Urology* 49:435-440.
- Sheynkin YR , Schlegel PN (1997) *Sperm retrieval for assisted reproductive technologies. Contemporary OB/GYN* 15:113-129.
- Silber S , Johnson L , Verheyen G , Van Steirteghem A (2000) *Round spermatid injection. Fert Sterit* 73:897-900.
- Silber SJ , Nagy Z , Liu J et al. (1994) *Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. Hum Reprod* 9:1705-1709
- Singh G (1992) *Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. Int J Fertil* 37:99-102.
- Sousa M , Barros A , Tesarik J (1998) *Current problems with spermatid conception. Human Reprod* 13(2):255-258.
- Stone S , O'Mahony F , Khalaf Y , Taylor A and Braude P (2000) *A normal livebirth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation: case report. Hum Reprod* 15 , 139-141.

- Takahashi K , Uchida A , Kitao M (1990) Hypoosmotic swelling test of sperm. *Arch Androl* 25(3):225-42.
- Takeuchi T , Neri QV , Palermo GD (2008) Male gamete empowerment. *Ann NY Acad Sci* 1127:64-6
- Tesarik J (1996) Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa , spermatids and spermatocytes. *Review of Reproduction* 1:149-152.
- Tesarik J (2002) Reproductive semi-cloning respecting biparental embryo origin: Embryos from syngamy between a gamete and a haploidized somatic cell. *Hum Reprod* 17 (8): 1933-1937.
- Tesarik J , Mendoza C , Greco E (2000) Immature germ cell conception \pm in vitro germ cell manipulation. *BaillieAre's Clinical Endocrinology and Metabolism* 14(3):437-452.
- Tesarik J , Mendoza C , Testart J (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *New England Journal of Medicine* 333:525.
- Trokoudes KM , Danos N , Kalogirou L , Vlachou R , Lysiotis T , Georghiadis N , Leros S and Kyriacou K (1995) Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment. *Hum Reprod* 10 , 880-882.
- WHO (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition , World Health Organization , Switzerland , Page 223.
- Worilow KC , Eid S , Matthews J , Pelts E , Khoury C Liebermann J (2010) Multi-site clinical trial evaluating PICS[®] , a method for selection of hyaluronan bound sperm (HBS) for use in ICSI: improved clinical outcomes. *Human Reprod* 25(suppl 1): 6-9.
- Wu B , Ignatz G , Currie WB , Yang X (1997a) Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent protein during in vitro maturation of bovine oocytes. *Boil Reprod* 56:253-259.
- Wu B , Ignatz G , Currie WB , Yang X (1997b) Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation in vitro. *Biol Reprod* 56: 260-265.
- Wu B , Wong D , Lu S , Dickstein S , Silver M , Gelety T (2005) Optimal use of fresh and frozen- thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 22: 389-394.

(杨惠祥译)

IntechOpen

第四部分 胚胎移植术

第九章 改善胚胎移植技术提高妊娠率

*Alan M. Martinez and Steven R. Lindheim University of Cincinnati College of Medicine,
Cincinnati, OH USA*

1. 引言

胚胎移植技术被认为是在IVF过程中最后的关键阶段(Neithardt et al., 2005; Ghazzawi et al., 1999)。大多数(大约80%) IVF患者能够达到胚胎移植阶段, 但只有少数人妊娠(Mansour & Aboulghar, 2002; Adamson et al., 2006)。尽管胚胎基因异常 (Munne et al., 1995) 和子宫内膜容受性差是影响着床的重要因素, 但胚胎移植技术可能是大部分胚胎着床失败的直接因素。胚胎移植需要生殖生物学家和临床医生共同努力。如果没有质量好的胚胎, 胚胎移植不会成功; 另外, 胚胎移植技术差同样会导致胚胎着床失败(Schoolcraft et al., 2001)。但是在临床IVF中, 对胚胎移植技术的关注却很少 (Mansour & Aboulghar, 2002; Schoolcraft et al., 2001)。这可能由于一些临床医生的误解, 他们认为移植方法不影响妊娠结局(Schoolcraft et al., 2001)。早期的研究者认为, 非常小心进行胚胎移植对于IVF的成功妊娠是必要的 (Meldrum et al., 1987)。近来, 很多研究者逐渐认识到IVF结局和不同移植技术之间的关系, 研究表明容易操作的移植患者妊娠率为33.3%, 不容易操作的移植患者妊娠率为10.5% (Englert et al., 1986, as cited in Schoolcraft et al., 2001)。在本章节我们将会回顾性分析能够改善胚胎移植技术的影响因素, 将它们分成以下三个阶段: 移植前、移植过程中和移植后。

2. 第一阶段: 胚胎移植前的准备

影响妊娠率的因素包括: 宫颈-子宫轴的评估、胚胎移植技术的模拟操作、子宫腔的评估(Derks et al., 2009)。

2.1 宫颈-子宫轴的评估

宫颈-子宫轴的评估对于保证胚胎顺利放置是必要的。这种评估包括胚胎移植模拟操作或超声检查下进行。它们对于评估子宫腔和子宫颈管的位置和长度有重要作用。为了改善妊娠结局, 建议在卵巢刺激周期前或胚胎移植前进行胚胎移植模拟操作(Sharif et al., 1995; Mansour et al., 1990)。如果这种模拟操作在接近胚胎移植时(如取卵时)进行, 由于后期子宫收缩的影响, 妊娠率会显著下降 (Madani et al., 2009a)。因此, 我们评估子宫颈和宫腔要在合适的时候进行。我们的研究包括124例接受IVF患者, 把她们平均分为两组。在月经周期第2、3日或取卵时对宫颈-子宫轴进行评估, 并测量子宫腔的深度(宫颈外口到宫底部)。我们的结果显示两组的临床妊娠率差别有统计学意义(64.2%和35.8%, $P < 0.005$)。因此, IVF周期中测量时机影响临床妊娠率, 子宫测量的最好时机是在月经周期的第2、3日 (Madani et al., 2009)。

2.2 胚胎移植技术的模拟操作

有很多意想不到的进入宫腔困难的原因，如宫颈息肉或肌瘤、操作者的准确度、先天异常或手术史导致的宫颈变形，这些都可以通过移植的模拟操作来发现。对于宫颈管狭窄、宫颈扩张应该在卵巢刺激前进行(Mansour & Aboulghar, 2002)。

2.3 子宫腔的评估

在IVF前通过超声技术对子宫腔进行评估，尽早发现子宫内膜息肉、子宫肌瘤和宫颈畸形(Mansour & Aboulghar, 2002; Niknejadi et al.,2010)。子宫内膜息肉是最常见的病理学改变(Isikoglu et al.,2006)。极富挑战的是在IVF或ICSI的卵巢刺激过程中偶然发现子宫内膜息肉。

在辅助生殖技术中，息肉的大小(Lass et al.,1999; Isikoglu et al., 2006)和位置(Yanaihara et al.,2008)可能会影响胚胎着床的成功率。据研究报道，小于1.5 cm的子宫内膜息肉不影响妊娠结局，反之妊娠丢失增加(Lass et al.,1999; Isikoglu et al.,2006)。通过活检将子宫内膜破坏或宫腔镜下息肉切除后可以显著提高妊娠率(Varasteh et al.,1999; Spiewankiewicz et al.,2003; Stamatellos et al.,2008)。近来，我们报道了子宫内膜息肉小于1.5 cm的9例患者在宫腔镜下息肉切除术后的妊娠结局。息肉切除是在卵巢刺激过程(8例为标准的长方案周期)中或激素替代周期(1例为卵子捐赠接受者)进行。子宫内膜息肉切除和胚胎移植时间间隔为2~16日。在我们的研究中有相对较高的妊娠率。可能的机制是，宫腔镜下子宫内膜息肉切除术后，由于创伤愈合，可以改善子宫内膜的容受性。在这个过程中，大量不同的细胞因子和生长因子分泌，这些因子在着床过程中起着重要的作用(Basak et al.,2002)。尽管以上研究报道了宫腔镜下子宫内膜息肉切除术在IVF卵巢刺激周期进行有好的妊娠结局，仍然建议子宫腔的评估在卵巢刺激之前进行，以确定子宫内膜病理。

3. 第二阶段：胚胎移植方法

需要引起重视的还有胚胎移植技术。为了保证成功率，关键是胚胎移植时对内膜的损伤最小化(Mansour et al.,1990)。在这个阶段影响妊娠率的因素有(Derks et al.,2009; Schoolcraft et al.,2001): 1) 宫颈的准备，移除移植管中的黏液和血液; 2) 矫正子宫-宫颈轴; 3) 超声的应用; 4) 移植管的类型; 5) 胚胎培养液的选择; 6) 胚胎加载方法; 7) 胚胎移植时机和子宫收缩的问题; 8) 移植管撤出前注射少量空气(Madani et al.,2010)。

3.1 宫颈的准备，移除移植管中的黏液和血液

宫颈黏液会干扰移植管中的胚胎进入子宫腔。这种干扰可能由于过量的宫颈黏液覆盖在移植管上，使胚胎移植不容易操作(Visschers et al.,2007)。移植管上出现血液和宫颈黏液是组织损伤所致，可能会降低着床率(Schoolcraft et al.,2001)。据报道，当取出移植管后，宫颈黏液会包绕在胚胎周围并驱赶胚胎离开原来位置(Eskandar et al.,2007)。由于宫颈黏液对导管尖和子宫腔的污染，这也是低妊娠率的另外一个因素(Eskandar et al.,2007; Derks et al.,2009)。同样，子宫内膜也会被宫颈黏液污染。在Egbase 等(1996)的研究中，宫颈黏液培养的阳性率为70.9%，导管尖培养的阳性率为49.1%。研究者报道了导管尖培养阴性的患者临床妊娠率(57.1%)要高于导管尖培养阳性的患者(29.6%)。同样，其他的研究者也认

为，培养阳性对患者的妊娠结局有显著的不利影响(Fanchin et al.,1998a)。在胚胎移植前，对宫颈进行反复擦洗来移除宫颈黏液可以改善妊娠结局(McNamee et al.,1998)。如果在胚胎移植前我们没有认真地去清洁宫颈，可能会因宫颈炎继发严重的盆腔感染（如盆腔脓肿），已经有相关报道(Sauer & Paulson,1992)。

3.2 矫正子宫-宫颈轴

移植管进入宫腔是否顺利会受到前倾子宫的影响，前位子宫是大部分患者的子宫位置(Sundstrom et al., 1984, as cited in Derks et al., 2009)。通过矫正子宫-宫颈角度，可以避免子宫收缩和移植管的插入损伤，提高胚胎移植的成功率。子宫-宫颈角度的矫正可以通过以下方法(Derks et al., 2009)：1) 充盈膀胱：充盈膀胱是移植过程中非常有用的方法，特别是在后倾和前屈的子宫(Abou-Setta, 2007; Lewin et al., 1997)；2) 宫颈钳牵拉宫颈；3) 金属管芯引导；4) 在胚胎移植过程中改变患者位置。

3.3 超声引导的应用

胚胎通过移植管经宫颈移植到子宫腔内。以前的移植技术是将移植管放置在距子宫底大约1 cm。这是一个盲操作，依靠临床医生的触觉感觉来判断移植管是否在适当的位置(Brown et al.,2010)。因此这种方法用来评估移植管的正确位置是不可靠的。Woolcott和Stanger(1997)用阴道超声对胚胎移植进行监测，以便观察移植管在子宫内膜表面和子宫底的位置。他们认为只有半数能达到最佳移植状态，因为移植管对子宫内膜有压痕或者直接插入子宫内膜。超声引导下胚胎移植对于既往移植困难的患者是有帮助的(Kan et al., 1999)，其着床率和妊娠率都显著提高(Coroleu et al., 2000)。另外，超声引导下胚胎移植还有其他的优点：如可以观察移植管、气泡、子宫内腔和内膜形态(Strickler et al., 1985)。气泡的转移认为是胚胎在子宫位置的标记。在超声引导下进行移植，我们可以精确地定位移植管和气泡的位置(Lambers et al., 2007)。大量研究证实，移植管在距宫底1.5cm 或 2cm要优于距宫底1cm (Coroleu et al., 2002)，气泡在胚胎植入时的位置和妊娠率密切相关(Lambers et al., 2007)。

3.4 移植管的类型

柔软的、易弯曲的胚胎移植管可以减少子宫颈内膜和子宫内膜的损伤，这种移植管更容易插入，是最好的选择。早期的研究已经报道过使用柔软的胚胎移植管的优势。对比各种胚胎移植管，很多研究证实患者使用柔软胚胎移植管患者的妊娠率显著提高(Wood et al., 2000; Wisanto et al., 1989; Mansour et al., 1994; Ghazzawi et al., 1999b; Mansour & Aboulghar, 2002)。关于柔软的胚胎移植管需要重点指出的是，移植管外部的硬壳应该在子宫颈外口，而不能被推到宫颈管内。由于胚胎移植管通过子宫颈内口时对子宫颈管的刺激引起前列腺素的释放，引起子宫收缩(Fraser, 1992)。因此，在胚胎移植过程中，最好对子宫颈没有刺激(Dorn et al., 1999; Lesny et al., 1999; Mansour & Aboulghar, 2002)。总之，强烈推荐选择能够使胚胎顺利植入、对子宫基底部刺激少的移植管，例如，使用软头的移植管可以提高妊娠率(Neithardt et al., 2005)。

3.5 胚胎培养基的选择

在胚胎转运过程中，胚胎周围培养基的组成是重要的。我们通过增加胚胎黏附在子宫内膜的机会来增加妊娠率，而这种黏附作用通过增加胚胎培养基来实现。透明质酸是一种天然的、有黏附作用的大分子，是首先推荐的增强黏附作用的分子 (Bontekoe et al., 2010)。尽管缺乏足够的证据，透明质酸明确的作用是促进胚胎着床，增加细胞与细胞之间的黏附、细胞与基质之间的黏附 (Turley & Moore, 1984 as cited in Bontekoe et al., 2010)。透明质酸会产生一种黏性溶液，这种黏性溶液可能会促进胚胎着床，防止胚胎溢出 (Simon et al., 2003)。

白蛋白曾被认为是大部分培养基主要的大分子物质。血清白蛋白来源于血液，其纯度不高，容易受病毒污染并有传播病毒的风险。研究表明，透明质酸对于提高妊娠率有积极的作用，可以用来代替白蛋白做为转运胚胎的培养基 (Simon et al., 2003; Mahani & Davar, 2007)。对小鼠的研究表明，含有透明质酸的培养基的胚胎着床、发育显著高于没有加入透明质酸的培养基 (Gardner, 1999)。胚胎黏胶 (EmbryoGlue®) 是一种含有高浓度透明质酸的胚胎转运培养基，其能够提高不育症患者的临床着床率和妊娠率。我们在815个IVF/ICSI周期中评估了胚胎黏胶做为一种人类胚胎转运培养基的有效性。研究对象被随机分为研究组 ($n=417$) 和对照组 ($n=398$)。在两组中，胚胎培养基为G-1TMver 3添加10%的重组人白蛋白。在胚胎移植日 (第三日)，选择质量好的胚胎分别放置在胚胎黏胶 (研究组) 和新鲜的培养基中 (对照组) 进行移植，结果显示，与使用G-1TMver 3在输卵管性不育患者相比，使用EmbryoGlue®的患者有较高的着床率和妊娠率；在反复种植失败的患者中，有较高的着床率 (Valojerdi et al., 2006)。

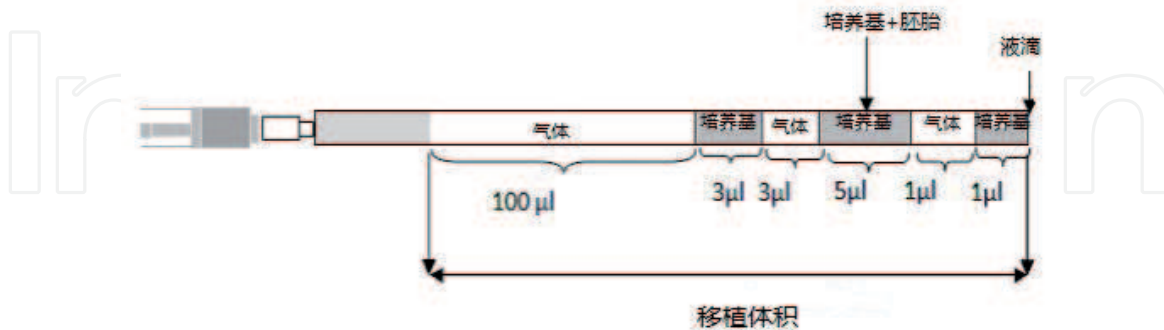
3.6 移植胚胎的加载方法

胚胎移植的目的在于把胚胎运送到近宫底处适合胚胎着床的子宫内膜上。在IVF中心，尽管用不同的方法把胚胎加载到移植管中，结果都能够观察到移植管中均会有一些气体和液体的混合物。如果加载管中只含有液体，胚胎就会有一个更大的分布空间。另外，尽管子宫组织吸收气体比液体快，但是气体在液体的转载过程中是有益的 (Eytan et al., 2004)。在大部分生殖中心，当然也包括我们生殖中心，胚胎移植方法大多数是三滴过程 (Friedman et al., 2011)，气泡分离了一滴包含胚胎的培养基和两滴胚胎黏胶，两滴胚胎黏胶分别位于胚胎滴前和胚胎滴后 (Figure 1)。

胚胎在移植管转运的过程中，加入气体和液体的混合物可以防止胚胎在注射的过程中黏附在管壁 (Eytan et al., 2004)，在胚胎培养基前后的两滴气泡阻止了胚胎在移植管移动，另外，在超声引导下，气泡是胚胎移植过程中胚胎在子宫位置的标志 (Lambers et al., 2007)。最后，在移植管尖端加载 $1\mu\text{l}$ 的培养基，就不阻止胚胎的溢出。据报道，胚胎移植管中大量的液体 ($60\mu\text{l}$) 与胚胎滞留在移植管内有关 (Hearn-Stokes et al., 2000)。另一方面，移植气体的体积应该足够小才能够阻止胚胎在移植过程中进入宫颈 (Eytan et al., 2004)，我们把移植管中的胚胎缓慢注射到宫腔时会产生气泡，气泡帮助我们运送更多的培养基到宫底，建议再用缓慢注射速度置入胚胎。但是，具体的注射速度尚没有临床研究证

实(L. Bungum & M. Bungum, 2009)。为了降低胚胎的风险, 移植管要缓慢撤出(Mansour & Aboulghar, 2002; Eytan et al., 2007)。

图1. 导管中装载不同比例的气体和运输介质



3.7 胚胎移植时机和子宫收缩的问题

动物研究表明, 子宫收缩会影响到胚胎着床(Adams, 1980; schoolcraft et al., 2001)。Fanchin 等(1998b)研究了 5 分钟内超声波扫描子宫肌层活动的数字化记录, 子宫收缩的平均频率为 4.3 次/分钟。他们还指出, 随着子宫收缩频率的增加, 着床率和妊娠率也相应降低。和子宫收缩频率相关的变量有(Schoolcraft et al., 2001): 1) 胚胎移植当日的血清孕酮水平: 通过增加孕酮水平, 子宫收缩减少; 2) 胚胎移植的难易程度: 子宫收缩频率和胚胎移植的困难程度相关。一项研究, 对 14 例捐卵者, 用 30μl 不透明介质模拟容易操作的胚胎移植, 不透明的对照介质在子宫颈上部保留 45 分钟, 结果子宫收缩的频率没有改变。相反, 对于操作困难的胚胎移植, 则出现有力的、随机的子宫颈深部的子宫收缩(Lesny et al., 1998); 3) 宫颈钳的应用: 当应用宫颈钳钳夹宫颈时, 子宫收缩增加(Lesny et al., 1999b); 4) 黄体期移植: 当患者在黄体期进行移植时, 子宫收缩减少。这是第五天囊胚期胚胎移植成功的一个因素(Lesny et al., 1999a)。

3.8 胚胎移植管撤出时推注少量空气

胚胎溢出发生在移植时或移植后延迟出现, 可能和毛细血管的活动和移植管撤出时的反作用力有关。一些研究人员表示, 15%的胚胎是在移植时溢出, 出现在移植管尖、子宫颈和阴道窥器上(Mansour, 2005; Poindexter et al., 1986), 这可能是 IVF 失败的原因(Ghazzawi et al., 1999; Ansour et al., 1994)。

胚胎移植后立即在移植管内推注 0.2 mL 的空气是一件容易操作且低成本的标准胚胎移植技术(Madani et al., 2010), 这种做法提高了妊娠率。近来, 我们对 110 例不育症患者采用这种胚胎移植技术进行胚胎移植, 获得了比对照组高的着床率和临床妊娠率。在这个研究中, 我们的目的是阻止胚胎溢出。通过推注空气将胚胎轻置入子宫腔, 由此产生一个正性的压力阻止胚胎随移植管的拔出或防止胚胎受到子宫收缩力影响, 最终减少胚胎溢出。但是, 我们建议进行进一步的临床随机研究来证实更好的妊娠结局, 并阐明这个简单的、修改后的胚胎移植技术的确切机制(Madani et al., 2010)。

4. 第三阶段：胚胎移植后措施

近来，建立在循证医学基础上的指南使胚胎移植技术更加优化和规范化。但是，关于胚胎移植后是否使用相关措施存在争议。有三个主要措施用于胚胎移植后(Abou-Setta et al.,2009)：1) 防止液体和胚胎从宫颈口溢出；2) 纤维蛋白胶的应用(Bar-Hava et al.,1999； Feichtinger et al.,1992)；3) 胚胎移植后卧床休息(Sharif et al.,1998)。

4.1 预防液体和胚胎从宫颈溢出

胚胎移植后阻止胚胎溢出的一个方法是关闭子宫颈口。近期前瞻性随机对照研究表明，在胚胎移植管进入后，通过放松阴道窥器的螺丝，来关闭子宫颈口(Mansour, 2005)。在这项研究中，宫颈阴道部分由于窥器的撤出而闭合。在轻轻撤出胚胎移植管后，阴道窥器会继续压迫宫颈5~7分钟。患者耻骨弓的压迫感和轻微的不适感是这篇文献中报道的唯一并发症。为了做好胚胎移植后的预防措施，精心设计的和有效的随机对照实验是必要的(Abou-Setta et al.,2009)。

4.2 纤维蛋白胶

在Ben-Rafael等(1995)的研究中，两步法(Feichtinger et al.,1992)已被应用于纤维蛋白胶。在这种方法中，应用多个空气或培养基的间隔使纤维蛋白胶与胚胎部分分隔。首先，向胚胎移植管中吸入纤维蛋白胶，然后，吸入空气，再细如培养基和胚胎。这种方法使带有培养基的胚胎运送到移植管中。胚胎和子宫腔之间的隔层（即培养基和纤维蛋白胶）使胚胎和子宫腔之间紧邻，这是该技术的基础。按照这个理论，胚胎接近子宫内膜，胚胎和母体组织之间的联系更容易，促进黏附过程，提高妊娠率(Abou-Setta et al.,2009)。但在临床实践中经常出现胚胎移植后一件非预期的事情是液体从宫腔内溢出(Schulman, 1986； Ghazzawi et al.,1999； Mansour, 2005)，有时候这些液体中包含移植的胚胎，这使得胚胎移动到远离其移植的位置(Ghazzawi et al.,1999； Mansour, 2005； Schulman, 1986)。

4.3 卧床休息

一般认为，胚胎运动经常是移植后立即发生。胚胎移植后的成功率和卧床休息的时间有线性关系。因为移植的胚胎数量有限，而胚胎溢出经常导致移植失败。任何阻止这种非意愿溢出的干预措施都会增加妊娠率(Abou-Setta et al.,2009)。在过去，为了保证成功率，胚胎移植后完全卧床休息24小时，使含有胚胎的液体避免由于重力作用溢出。为使这个过程简单且更利于患者，临床医生建议减少卧床休息时间(Sharif et al.,1998)，近期的指南推荐卧床休息的时间为15分钟(Abou-Setta et al.,2009)。按照Purcell及其同事(2007)的研究，卧床休息时间并不影响临床妊娠率。

5. 单胚胎移植

尽管辅助生殖技术取得了很大进步，活产率仍不尽人意，但是ART的成功率和过去的10~15年相比显著增加(Gerris, 2009)。按照《辅助生殖技术协会》的报道，在过去6年里，活产率仅增加了4%（1996年28%到2002年的32%）(Neithardt et al.,2005)。同样需要引起注意的是随着多胚胎移植，尽管妊娠率增加但活产率并没有随之增加(Gerris, 2009)。在过去的十年里，2003年首次研究表明单胚胎移植和双胚胎移植有相似的妊娠率

(Poikkeus & Tiitinen, 2008)。而且, 在一些研究的基础上, 将单胚胎移植和冷冻胚胎移植结合起来, 其妊娠率和双胚胎移植妊娠率相似 (Thurin et al., 2004; illiez & Dickens, 2009), 而双胎出生率则从25%降低到1%。单胚胎移植最大的好处是降低了众所周知的产科和新生儿的并发症, 而双胎发生并发症的风险比单胎高4倍 (Davis, 2004; oikkeus & Tiitinen, 2008; illiez & Dickens, 2009)。一些研究人员建议, 在认真的选择患者的基础上进行优质单胚胎移植, 可以减少多胎妊娠的风险并保证一个高的活产率 (Gerris, 2009)。

还有一些人从经济学的角度来分析单胚胎移植 (Bergh, 2005; iddelers et al., 2007)。从社会学的角度来看, 研究表明, 双胎妊娠节省的相关费用和重复单胚胎移植的费用相当, 两者抱婴率相同。很多情况下, 患者的治疗费用是患者自己花费, 而多胎妊娠则需要患者和社会共同承担责任 (Roberts et al., 2010)。总之, 对于选择辅助生殖技术的人群来讲, 最经济有效安全的方法是进行单胚胎移植。

6. 结论

无论是移植一个还是两个优质胚胎, 仍然存在一个问题: 为什么移植结局是低效的? 引起着床现象的机制尚不清楚, 对其临床意义仍然是知之甚少。胚胎移植后, 我们无法控制胚胎, 不能区分能够到达子宫内膜的胚胎和有着床机会的胚胎。有很多因素影响胚胎着床和妊娠, 而胚胎移植技术是影响胚胎移植成功的关键因素之一。正因如此, 胚胎移植必须是轻柔的、无创伤的操作。要减少移植管尖上的血液 (由于宫颈损伤) 和宫颈黏液, 减少胚胎溢出的风险和频繁而严重的子宫收缩, 在移植前进行胚胎移植模拟操作是非常有意义的。另外, 使用阴道超声和选择软的移植导管可以增加成功妊娠的机会。由于临床实验证据不足, 哪些因素是重要的尚不明确, 所有的因素都需要引起重视, 以达到最佳胚胎移植效果。有很多的问题需要在将来的研究中得到解决, 以实现更好的胚胎移植结局。例如, 提高关于着床条件的知识, 可以指导我们选择更符合正常胚胎发育的培养基。一种改进的带有微型照相机的导管, 可以使胚胎移植对子宫腔的损害最小化, 明确子宫收缩的确切机制 (机械、化学或激素), 最终减少新材料和新技术应用在胚胎移植过程中的有害影响。

7. 感谢

在此对Royanyan 研究所及全体员工表示感谢!

8. 参考文献

- Abou-Setta , A. M. (2007). *Effect of passive uterine straightening during embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica , Vol.86 , No.5 , PP. 516-22 , ISSN 0001-6349*
- Abou-Setta , A. M.,D'angelo , A.,Sallam , H. N.,Hart , R. J. & Al-Inany , H. G. (2009). *Postembryo transfer interventions for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperminjection patients. Cochrane database of systematic reviews , No.4 , PP. CD006567 , ISSN 1469-493X*
- Adams , C. E. (1980). *Retention and development of eggs transferred to the uterus at various times after ovulation in the rabbit. Journal of reproduction and fertility , Vol.60 , No.2 , PP. 309-15 , ISSN 0022-4251*

- Adamson , G. D , DE Mouzon , J.,Lancaster , P.,Nygren , K.G.,Sullivan , E&Zegers- Hochschild , F. (2006). *World collaborative report on in vitro fertilization , 2000. Fertility and sterility , Vol.85 , No.6 , PP. 1586-622 , ISSN 0015-0282*
- Bar-Hava , I.,Krisi , H.,Ashkenazi , J.,Orvieto , R.,Shelef , M.&Ben-Rafael , Z. (1999). *Fibrin glue improves pregnancy rates in women of advanced reproductive age and in patients in whom in vitro fertilization attempts repeatedly fail. Fertility and sterility , Vol.71 , No.5 , PP. 821-4 , ISSN 0015-0282*
- Barash , A , Dekel , N , Fieldust , S , Segal , I , Schechtman , E.&Granot , I.(2003).*Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. Fertility and sterility , Vol.79 , No.6 , PP. 1317-22 , ISSN 0015-0282*
- Basak , S , Dubanchet , S.,Zourbas , S.,Chaouat , G.&Das , C.(2002). *Expression of pro- inflammatory cytokines in mouse blastocysts during implantation: modulation by steroid hormones. American journal of reproductive immunology , Vol.47 , No.1 , PP. 2.ISSN 1046-7408*
- Batioglu , S. & Kaymak , O. (2005). *Does hysteroscopic polypectomy without cycle cancellation affect IVF? Reproductive biomedicine online , Vol.10 , No.6 , PP. 767-9 , ISSN 1472-6483*
- Ben-Rafael , Z.,Ashkenazi , J.,Shelef , M.,Farhi , J.,Voliovitch , I.,Feldberg , D. & Orvieto , R.(1995). *The use of fibrin sealant in in vitro fertilization and embryo transfer. International journal of fertility and menopausal studies , Vol.40 , No.6 , PP. 303-6 , ISSN 1069-3130*
- Bergh , C. (2005). *Single embryo transfer: a mini-review. Human reproduction , Vol.20 , No.2 , PP.323-7 , ISSN 0268-1161*
- Bontekoe , S , Blake , D , Heineman , M. J.,Williams , E. C. & Johnson , N. (2010). *Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. Cochrane database of systematic reviews , No.7 , PP. CD007421 , ISSN 1469-493X*
- Brown , J.,Buckingham , K.,Abou-Setta , A. M. & Buckett , W. (2010). *Ultrasound versus 'clinical touch' for catheter guidance during embryo transfer in women. Cochrane database of systematic reviews , No.1 , PP. CD006107 , ISSN 1469-493X*
- Bungum , L. & Bungum , M. (2009). *Embryo transfer , In: Textbook of assisted reproductive technologies: Laboratory and clinical perspectives. Gardner , D. K.,Weissman , A.,Howles , C. M.,Shoham , Z , PP.693-701 , Informa Healthcare , 978-0415448949 , United kingdom*
- Coroleu , B , Carreras , O , Veiga , A.,Martell , A.,Martinez , F.,Belil , I.,Hereter , L. & Barri , P. N.(2000). *Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. Human reproduction , Vol.15 , No.3 , PP. 616-20 , ISSN 0268-1161*
- Coroleu , B , Barri , P. N.,Carreras , O.,Martinez , F. Parriego , M.,Hereter , L , Parera , N , Veiga , A. & Balasch , J. (2002). *The influence of the depth of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF: a controlled , ultrasound- guided study. Human reproduction , Vol.17 , No.2 , PP. 341-6 , ISSN 0268-1161*
- Davis , O. K. (2004). *Elective single-embryo transfer--has its time arrived? The New England journal of medicine , Vol.351 , No.23 , PP. 2440-2 , ISSN 0028-4793*
- Derks , R. S.,Farquhar , C.,Mol , B. W.,Buckingham , K. & Heineman , M. J. (2009). *Techniques for preparation prior to embryo transfer. Cochrane database of systematic reviews , No.4 , PP. CD007682 , ISSN 1469-493X*
- Dorn , C.,Reinsberg , J.,Schlebusch , H.,Priehl , G.,Van Der Ven , H. & Krebs , D. (1999). *Serum oxytocin concentration during embryo transfer procedure. European journal of obstetrics , gynecology , and reproductive biology , Vol.87 , No.1 , PP. 77-80 , ISSN 0301-2115*
- Egbase , P. E.,Al-Sharhan , M.,Al-Othman , S.,Al-Mutawa , M.,Udo , E. E. & Grudzinskas , J.G. (1996). *Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in- vitro fertilization and embryo transfer. Human reproduction , Vol.11 , No.8 , PP. 16879 , ISSN 0268-1161*
- Englert , Y.,Puissant , F.,Camus , M.,Van Hoeck , J. & Leroy , F. (1986). *Clinical study on embryo transfer*

- after human in vitro fertilization. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer* , Vol.3 , No.4 , PP. 243-6 , ISSN 0740-7769
- Eskandar , M. A.,Abou-Setta , A. M.,El-Amin , M.,Almushait , M. A. & Sobande , A. A. (2007).Removal of cervical mucus prior to embryo transfer improves pregnancy rates in women undergoing assisted reproduction. *Reproductive biomedicine online* , Vol.14 , No.3 , PP. 308-13 , ISSN 1472-6483
- Eytan , O.,Elad , D.,Zaretsky , U. & Jaffa , A. J. (2004). A glance into the uterus during in vitro simulation of embryo transfer. *Human reproduction* , Vol.19 , No.3 , PP. 562-9 , ISSN 0268-1161
- Eytan , O.,Elad , D. & Jaffa , A. J. (2007). Evaluation of the embryo transfer protocol by a laboratory model of the uterus. *Fertility and sterility* , Vol.88 , No.2 , PP. 485-93 , ISSN 0015-0282
- Fanchin , R.,Harmas , A.,Benaoudia , F.,Lundkvist , U.,Olivennes , F. & Frydman , R. (1998a).Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertility and sterility* , Vol.70 , No.5 , PP. 866-70 , ISSN 0015-0282
- Fanchin , R.,Righini , C.,Ayoubi , J. M.,Olivennes , F.,De Ziegler , D. & Frydman , R. (1998b).[Uterine contractions at the time of embryo transfer: a hindrance to implantation?]. *Contraception , fertilité , sexualité* , Vol.26 , No.7-8 , PP. 498-505 , ISSN 1165-1083
- Feichtinger , W.,Strohmer , H.,Radner , K. M. & Goldin , M. (1992). The use of fibrin sealant for embryo transfer: development and clinical studies. *Human reproduction* , Vol.7 , No.6 , PP. 890-3 , ISSN 0268-1161
- Fiddellers , A. A.,Severens , J. L.,Dirksen , C. D.,Dumoulin , J. C.,Land , J. A. & Evers , J. L.Economic evaluations of single- versus double-embryo transfer in IVF. *Humanreproduction Update* , Vol.13 , No.1 , PP. 5-13 , ISSN 1355-4786
- Fraser , I. S. (1992). Prostaglandins , prostaglandin inhibitors and their roles in gynaecological disorders. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* , Vol.6 , No.4 , PP. 829-57 , ISSN 0950-3552
- Friedman , B. E.,Lathi , R. B.,Henne , M. B.,Fisher , S. L. & Milki , A. A. (2011). The effect of air bubble position after blastocyst transfer on pregnancy rates in IVF cycles. *Fertility and sterility* , Vol.95 , No. 3 , PP. 944-7 , ISSN 0015-0282
- Gardner , D. K.,Rodríguez-Martínez , H. & Lane , M. (1999). Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Human reproduction* , Vol.14 , No.10 , PP. 257580 , ISSN 0268-1161
- Gerris , J. (2009). Single-embryo transfer versus multiple-embryo transfer. *Reproductivebiomedicine online* , Vol.18 Suppl 2 , PP. 63-70 , ISSN 1472-6483
- Ghazzawi , I. M.,Al-Hasani , S.,Karaki , R. & Souso , S. (1999). Transfer technique and catheter choice influence the incidence of transcervical embryo expulsion and the outcome of IVF. *Human reproduction* , Vol.14 , No.3 , PP. 677-82 , ISSN 0268-1161
- Hearns-Stokes , R. M.,Miller , B. T.,Scott , L.,Creuss , D.,Chakraborty , P. K. & Segars , J. H.(2000). Pregnancy rates after embryo transfer depend on the provider at embryo transfer.*Fertility and sterility* , Vol.74 , No.1 , PP. 80-6 , ISSN 0015-0282
- Isikoglu , M.,Berkanoglu , M.,Senturk , Z.,Coetsee , K. & Ozgur , K. (2006). Endometrial polyps smaller than 1.5 cm do not affect ICSI outcome. *Reproductive biomedicine online* , Vol.12 , No.2 , PP. 199-204 , ISSN 1472-6483
- Kan , A. K.,Abdalla , H. I.,Gafar , A. H.,Nappi , L.,Ogunyemi , B. O.,Thomas , A. & Ola-Ojo , O. O. (1999). Embryo transfer: ultrasound-guided versus clinical touch. *Human reproduction* , Vol.14 , No.5 , PP. 1259-61 , ISSN 0268-1161
- Lambers , M. J.,Dogan , E.,Lens , J. W.,Schats , R. & Hompes , P. G. (2007). The position of transferred air bubbles after embryo transfer is related to pregnancy rate. *Fertility and sterility* , Vol.88 , No.1 , PP. 68-73 , ISSN 0015-0282
- Lass , A.,Williams , G.,Abusheikha , N. & Brinsden , P. (1999). The effect of endometrial polyps on outcomes

- of in vitro fertilization (IVF) cycles. Journal of assisted reproduction and genetics , Vol.16 , No.8 , PP. 410-5 , ISSN 1058-0468*
- Lesny , P., Killick , S. R., Tetlow , R. L., Robinson , J. & Maguiness , S. D. (1998). *Embryo transfer--can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions? Human reproduction , Vol.13 , No.6 , PP. 1540-6 , ISSN 0268-1161*
- Lesny , P., Killick , S. R., Robinson , J. & Maguiness , S. D. (1999a). *Transcervical embryo transfer as a risk factor for ectopic pregnancy. Fertility and sterility , Vol.72 , No.2 , PP. 305-9 , ISSN 0015-0282*
- Lesny , P., Killick , S. R., Robinson , J., Raven , G. & Maguiness , S. D. (1999b). *Junctional zone contractions and embryo transfer: is it safe to use a tenaculum? Human reproduction , Vol.14 , No.9 , PP. 2367-70 , ISSN 0268-1161*
- Lewin , A., Schenker , J. G., Avrech , O., Shapira , S., Safran , A. & Friedler , S. (1997). *The role of uterine straightening by passive bladder distension before embryo transfer in IVF cycles. Journal of assisted reproduction and genetics , Vol.14 , No.1 , PP. 32-4 , ISSN 1058-0468*
- Madani , T., Ashrafi , M., Abadi , A. B. & Kiani , K. (2009a). *Appropriate timing of uterine cavity length measurement positively affects assisted reproduction cycle outcome. Reproductive biomedicine online , Vol.19 , No.5 , PP. 734-6 , ISSN 1472-6483*
- Madani , T., Ghaffari , F., Kiani , K. & Hosseini , F. (2009b). *Hysteroscopic polypectomy without cycle cancellation in IVF cycles. Reproductive biomedicine online , Vol.18 , No.3 , PP. 412-5 , ISSN 1472-6483*
- Madani , T., Ashrafi , M., Jahangiri , N., Abadi , A. B. & Lankarani , N. (2010). *Improvement of pregnancy rate by modification of embryo transfer technique: a randomized clinical trial. Fertility and sterility , Vol.94 , No.6 , PP. 2424-6 , ISSN 0015-0282*
- Mansour , R., Aboulghar , M. & Serour , G. (1990). *Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. Fertility and sterility , Vol.54 , No.4 , PP. 678-81 , ISSN 0015-0282*
- Mansour , R. T., Aboulghar , M. A., Serour , G. I. & Amin , Y. M. (1994). *Dummy embryo transfer using methylene blue dye. Human reproduction , Vol.9 , No.7 , PP. 1257-9 , ISSN 0268-1161*
- Mansour , R. T. & Aboulghar , M. A. (2002). *Optimizing the embryo transfer technique. Human reproduction , Vol.17 , No.5 , PP. 1149-53 , ISSN 0268-1161*
- Mansour , R. (2005). *Minimizing embryo expulsion after embryo transfer: a randomized controlled study. Human reproduction , Vol.20 , No.1 , PP. 170-4 , ISSN 0268-1161*
- Mcnamee , P., Huang , T. & Carwile , A. (1998). *Significant increase in pregnancy rates achieved by vigorous irrigation of endocervical mucus prior to embryo transfer with a Wallace catheter in an IVF-ET program. Fertility and sterility , Vol.70 No.Suppl PP. 1:S228 ,*
- Meldrum , D. R., Chetkowski , R., Steingold , K. A., De Ziegler , D., Cedars , M. I. & Hamilton , M. (1987). *Evolution of a highly successful in vitro fertilization-embryo transfer program. Fertility and sterility , Vol.48 , No.1 , PP. 86-93 , ISSN 0015-0282*
- Milliez , J. & Dickens , B. (2009). *Legal Aspects of Iatrogenic Multiple Pregnancy. International journal of Fertility and sterility , Vol.3 , No.2 , PP. 84-86 , ISSN 2008-0778*
- Munne , S., Alikani , M., Tomkin , G., Grifo , J. & Cohen , J. (1995). *Embryo morphology , developmental rates , and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertility and sterility , Vol.64 , No.2 , PP. 382-91 , ISSN 0015-0282*
- Neithardt , A. B., Segars , J. H., Hennessy , S., James , A. N. & Mckeeby , J. L. (2005). *Embryo afterloading: a refinement in embryo transfer technique that may increase clinical pregnancy. Fertility and sterility , Vol.83 , No.3 , PP. 710-4 , ISSN 0015-0282*
- Niknejadi , M., Ahmadi , F., Zafarani , F., Khalili , G., Ghaderi , F. & Rashidi , Z. (2010). *Diagnostic Accuracy of Transvaginal Sonography in Infertile Patients with Endometrial Polyps.*

- International journal of Fertility and sterility* , Vol.3 , No.4 , PP. 157-160 , ISSN 2008-0778
- Poikkeus , P. & Tiitinen , A. (2008). Does single embryo transfer improve the obstetric and neonatal outcome of singleton pregnancy? *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* , Vol.87 , No.9 , PP. 888-92 , ISSN 0001-6349
- Poindexter , A. N.,3rd , Thompson , D. J.,Gibbons , W. E.,Findley , W. E.,Dodson , M. G. & Young , R. L. (1986). Residual embryos in failed embryo transfer. *Fertility and sterility* , Vol.46 , No.2 , PP. 262-7 , ISSN 0015-0282
- Purcell , K. J.,Schembri , M.,Telles , T. L.,Fujimoto , V. Y. & Cedars , M. I. (2007). Bed rest after embryo transfer: a randomized controlled trial. *Fertility and sterility* , Vol.87 , No.6 , PP. 1322-6 , ISSN 0015-0282
- Roberts , S.,Mcgowan , L.,Hirst , W.,Brison , D.,Vail , A. & Lieberman , B. (2010). Towards single embryo transfer? Modelling clinical outcomes of potential treatment choices using multiple data sources: predictive models and patient perspectives. *Health technology assessment* , Vol.14 , No.38 , PP. 1-237 , ISSN 1366-5278
- Sauer , M. V. & Paulson , R. J. (1992). Pelvic abscess complicating transcervical embryo transfer. *American journal of obstetrics and gynecology* , Vol.166 , No.1 Pt 1 , PP. 148-9 , ISSN 0002-9378
- Schoolcraft , W. B.,Surrey , E. S. & Gardner , D. K. (2001). Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertility and sterility* , Vol.76 , No.5 , PP. 863-70 , ISSN 00150282
- Schulman , J. D. (1986). Delayed expulsion of transfer fluid after IVF/ET. *Lancet* , Vol.1 , No.8471 , PP. 44 , ISSN 0140-6736
- Sharif , K.,Afnan , M. & Lenton , W. (1995). Mock embryo transfer with a full bladder immediately before the real transfer for in-vitro fertilization treatment: the Birmingham experience of 113 cases. *Human reproduction* , Vol.10 , No.7 , PP. 1715-8 , ISSN 0268-1161
- Sharif , K.,Afnan , M.,Lashen , H.,Elgendy , M.,Morgan , C. & Sinclair , L. (1998). Is bed rest following embryo transfer necessary? *Fertility and sterility* , Vol.69 , No.3 , PP. 478-81 , ISSN 0015-0282
- Simon , A.,Safran , A.,Revel , A.,Aizenman , E.,Reubinoff , B.,Porat-Katz , A.,Lewin , A. & Laufer , N. (2003). Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertility and sterility* , Vol.79 , No.6 , PP. 1434-8 , ISSN 0015-0282
- Spiewankiewicz , B.,Stelmachow , J.,Sawicki , W.,Cendrowski , K.,Wypych , P. & Swiderska , K. (2003). The effectiveness of hysteroscopic polypectomy in cases of female infertility. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* , Vol.30 , No.1 , PP. 23-5 , ISSN 0390-6663
- Stamatellos , I.,Apostolides , A.,Stamatopoulos , P. & Bontis , J. (2008). Pregnancy rates after hysteroscopic polypectomy depending on the size or number of the polyps. *Archives of gynecology and obstetrics* , Vol.277 , No.5 , PP. 395-9 , ISSN 0932-0067
- Strickler , R. C.,Christianson , C.,Crane , J. P.,Curato , A.,Knight , A. B. & YANG , V. (1985).Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertility and sterility* , Vol.43 , No.1 , PP. 54-61 , ISSN 0015-0282
- Sundstrom , P.,Wramsby , H.,Persson , P. H. & Liedholm , P. (1984). Filled bladder simplifies human embryo transfer. *British journal of obstetrics and gynaecology* , Vol.91 , No.5 , PP. 506-7 , ISSN 0306-5456
- Thurin , A.,Hausken , J.,Hillensjo , T.,Jablonowska , B.,Pinborg , A.,Strandell , A. & Bergh , C. (2004). Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *New England journal of medicine* , Vol.351 , No.23 , PP. 2392-402 , ISSN 0028-4793
- Turley , E. & Moore , D. (1984). Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin , laminin and collagen. *Biochemical and biophysical research communications* , Vol.121 , No.3 , PP. 808-14 , ISSN 0006-291X
- Valojerdi , M. R.,Karimian , L.,Yazdi , P. E.,Gilani , M. A.,Madani , T. & Baghestani , A. R.(2006). Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective , randomized clinical trial study. *Journal of assisted*

- reproduction and genetics* , Vol.23 , No.5 , PP. 20712ISSN 1058-0468
- Varasteh , N. N.,Neuwirth , R. S.,Levin , B. & Keltz , M. D. (1999). Pregnancy rates after hysteroscopic polypectomy and myomectomy in infertile women. *Obstetrics and gynecology* , Vol.94 , No.2 , PP. 168-71 , ISSN 0029-7844
- Visshers , B. A.,Bots , R. S.,Peeters , M. F.,Mol , B. W. & Van Dessel , H. J. (2007). Removal of cervical mucus: effect on pregnancy rates in IVF/ICSI. *Reproductive biomedicine online* , Vol.15 , No.3 , PP. 310-5 , ISSN 1472-6483
- Wisanto , A.,Janssens , R.,Deschacht , J.,Camus , M.,Devroey , P. & Van Steirteghem , A. C.(1989). Performance of different embryo transfer catheters in a human in vitro fertilization program. *Fertility and sterility* , Vol.52 , No.1 , PP. 79-84 , ISSN 0015-0282
- Wood , E. G.,Batzer , F. R.,Go , K. J.,Gutmann , J. N. & Corson , S. L. (2000). Ultrasound- guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Human reproduction* , Vol.15 , No.1 , PP. 107-12 , ISSN 0268-1161
- Woolcott , R. & Stanger , J. (1997). Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Human reproduction* , Vol.12 , No.5 , PP. 963-6 , ISSN 0268-1161
- Yanaihara , A.,Yorimitsu , T.,Motoyama , H.,Iwasaki , S. & Kawamura , T. (2008). Location of endometrial polyp and pregnancy rate in infertility patients. *Fertility and sterility* , Vol.90 , No.1 , PP. 180-2 , ISSN 0015-0282

(赵敏英译)

IntechOpen

第十章 胚胎移植结局的最佳化：如何决定捐卵

Alan M. Martinez and Steven R. Lindheim University of Cincinnati College of Medicine,

Cincinnati, OH USA

1. 引言

在过去十年，人类辅助生殖技术成功率大大提高，但总的妊娠率和着床率仍然相对较低。尽管我们改进了卵巢刺激方案和实验室技术，但是两个率却并没有大的提高。有三个方面需要引起注意：1) 最佳宫腔环境的识别；2) 延长胚胎培养到囊胚阶段；3) 胚胎移植技术。其中，胚胎移植技术曾经被认为是ART中不重要的因素。

在IVF失败的周期中，要区分是卵泡因素还是子宫内膜因素的影响是困难的。而且，由于伦理因素，对胚胎和子宫内膜的同步性和容受性的研究是困难的，因此相关的研究更多的是提出建议而不是得出结论。相比之下，捐卵在不孕症治疗方面已经成功运用超过25年 (Trounson et al., 1983)。捐卵模型为达到标准化把影响妊娠结局的胚胎质量和子宫内膜容受性两个参数作为独立因素分开，为达最佳化要求捐卵者提供高质量的卵子且没有发生卵巢过度刺激 (Acosta, 2000; Garcia, 1984; Oehninger, 2008)。

本章节中，我们回顾性分析了两个临床变量的影响因素，一个是越来越重要的着床决定因素，另外一个影响最佳胚胎移植结局的卵子捐赠因素，在临床研究中努力控制混杂变量的影响。

2. 在卵母细胞捐赠周期中薄型子宫内膜和妊娠结局

迄今为止，子宫内膜容受性的研究包括子宫内膜组织学研究，用免疫组化的方法测定子宫内膜性激素受体，通过电子显微镜扫描评估分子的连接表达，还有近来研究较多的细胞因子、生长因子及整合蛋白分子等 (Castelbaum, 1997; Noci, 1995; Noyes, 1950; Paulson, 1997)。尽管这些研究方法使我们对子宫内膜容受性有了进一步的理解，但是在胚胎移植周期中是不可行的。

在超声下测量子宫内膜厚度和形态是容易操作且无创性的，在胚胎移植周期可以用来评估子宫内膜容受性。普遍认为，在阴道超声下薄型子宫内膜可能和胚胎着床能力降低有关。(McWilliams, 2007; Rashidi, 2005; Schild, 2001; Zang, 2005; Zenke, 2004)，而在其他的研究中报道了子宫内膜厚度不断增加的不利影响 (Amir et al., 2007; Kovacs, 2003; Richter, 2007)。另外超声下子宫内膜回声形态可以用来预测妊娠结局 (Noyes, 2001; Sharara, 1999; Sher, 1991)。相反，有的研究者认为，超声波对IVF患者子宫内膜容受性的评估没有优势 (Barufi, 2002; Dietterich, 2002; Garcia-Velasco, 2003; Sundstrom, 1998; Yuval, 1999)。因此，子宫内膜的厚度和形态作为着床的预测因素是不确定的。

卵母细胞捐赠周期提供了一个排除混淆因素的模型，使对照组自体IVF周期出现的胚胎质量问题是由于卵巢过度刺激引起对子宫内膜容受性的不利影响等问题得到了控制。子宫

内膜的增长和卵巢产生的雌激素密切相关，因此依赖于卵巢功能。由于患者年龄影响卵巢功能，因此用相同的IVF方法，不同年龄的患者胚胎质量、雌激素水平和子宫内膜厚度不同，妊娠结局也不同。在自体移植周期，子宫内膜发育差可能是卵巢功能下降的一个标志（产生雌激素的功能下降），但这并不是低着床率和妊娠率的独立影响因素。在卵母细胞捐赠模型中，子宫内膜受到外源性的类固醇激素作用，根据子宫内膜的反应（血清雌激素水平测定或子宫内膜厚度）来调节激素的剂量。因此，子宫内膜增长成为不依赖卵巢功能的独立影响因素。另外，卵子供体要年轻且卵巢储备功能正常，以获得具有良好着床潜能的优质胚胎。

关于受孕者子宫内膜厚度和妊娠结局的研究很少。Noyes等回顾性分析了343个受孕周期，研究者在周期第12日测量患者子宫内膜的厚度和形态。结果发现当子宫内膜厚度小于8 mm时，临床妊娠率和活产率显著低于子宫内膜超过9 mm时(Noyes et al., 2001)。Zenke和Chetkowski 报道了41例受孕者在IVF失败周期获卵前1周子宫内膜厚度均小于8 mm(Zenke & Chetkowski, 2004)。

然而，Remlhi等回顾性分析了465例捐卵患者，结果发现胚胎移植前的超声下子宫内膜和妊娠率没有关系(Remohi et al., 1997)。Garcia-Velasco对365例受孕者进行配对分析研究，在周期第15或16日测量子宫内膜厚度，结果发现2组下子宫内膜不同妊娠结局也不同，但差异没有统计学意义(Garcia -Velasco et al., 2003)。Barker等回顾性分析了132例IVF受孕患者子宫内膜厚度（晚卵泡期和黄体中期）和妊娠结局的关系，此研究只选用囊胚移植，以排除其他干扰因素对妊娠结局的影响(Barker et al., 2009)。有的研究用卵裂期胚胎或卵裂期胚胎与囊胚的混合物进行移植，两者都没有最大限度的排除胚胎因素的影响(Abdalla, 1994; Check, 1993; Garcia-Velasco, 2003; Noyes, 2001; Remohi, 1997; Zenke, 2004)。而这个研究受到回顾性研究的限制，认为在晚卵泡期和黄体中期子宫内膜的厚度不能预测妊娠结局。而且，薄型子宫内膜、厚型子宫内膜（分别为<7 mm和>13 mm）和子宫内膜的形态不是影响子宫内膜容受性的决定因素。

总之，研究认为子宫内膜的厚度可能在预测成功率上没有太大帮助。尽管如此，很多报道（有些是相互矛盾的）认为，子宫内膜厚度和子宫内膜形态是评价子宫内膜容受性和妊娠结局的重要因素。因此，研究者们有必要做进一步大样本研究来达成一致意见，用更严格的标准来评估子宫内膜厚度和形态。

3. 在捐卵周期囊胚移植是首选的改善妊娠结局的方法

另一方面，囊胚移植引起了人们的高度关注。胚胎培养已经从卵裂阶段延长到囊胚阶段，囊胚阶段是胚胎在培养媒介中进行细胞的压缩和基因活动后形成的(Braude, 1988; Gardner, 1998)。两大临床随机对照试验研究和近期的Cochrane的Meta分析(Blake, 2007; Papnikolaou, 2005, 2006)结果显示，囊胚移植患者有较高的妊娠率和活产率，并且减少了胚胎移植的平均数量。IVF周期中，对于有良好预后的患者（患者年龄<36岁）进行单胚胎移植，据报道每个囊胚移植周期的着床率达65%(Papnikolaou et al., 2006)。

随着我们对发展生物学中胚胎植入前理论的深入了解，发现第3日卵裂期胚胎着床率相对较低。而Blake的综述中报道，很多IVF失败周期中，把患者看似正常的胚胎延长培养到囊胚阶段，有证据证实可以增加活产率(Blake et al., 2007)。

用两点来说明这种高着床率和妊娠率。第一，很容易理解这是个自然选择的过程，只有可发育的胚胎才能继续培养成为囊胚，再将这些胚胎进行移植或冷冻保存(Schoolcraft, 2001; Schillaci, 2002)。研究表明，大部分形态正常的卵裂期胚胎可能发生染色体异常，不能发育到囊胚阶段(Magli, 1998; Staessen, 2004)，尽管有完善的胚胎分类系统，包括受精卵的细胞数量和形态特征，卵裂期胚胎细胞核的形态、碎片、卵裂球的一致性，这可以解释为什么卵裂期胚胎移植周期着床失败率高(De Placido, 2002; Gamiz, 2003; Gianarolo, 2003; Hnida, 2004; Nagy, 2003; Nikas, 1999; Montag, 2001; Rienzi, 2005; Van Royen, 1999; Ziebe, 1997)。

第二个因素是和子宫内膜的环境有关系，子宫内膜容受性的窗口期为<48 h，正好是黄体酮分泌期(Nikas, 1999; Valbuena, 2001)。但是，活体内的胚胎经过输卵管，且胚胎发育为桑葚胚之后才到达宫腔(排卵后数日)，而体外培养的胚胎在卵裂期移植到子宫腔，因此胚胎可能受到不同于自然周期的压力。有些人认为，卵裂期胚胎移植周期中，周围环境和子宫高收缩状态可能会驱逐早期移植的卵裂期胚胎，这可以解释在大部分IVF周期中如此高的着床率失败现象(Croxatto, 1972; Fanchin, 2001; Valbuena, 2001)。

显然，子宫环境是胚胎着床的关键因素。囊胚在子宫内膜着床的过程包括定位、黏附和侵入等很多因素的影响，这就是所谓的窗口期。但是，囊胚-子宫内膜之间的相互作用仍是需要探索的内容(Garcia et al., 1984)，在着床中的作用还不完全清楚。

由于伦理原因，胚胎和子宫内膜的同步性和容受性研究实施起来是困难的，因此得出的更多是建议而不是结论。Shapiro等研究认为在新鲜的自体移植周期，患者移植第5日的胚胎比移植第6日的胚胎有更高的着床率和妊娠率，然而，移植第6日的冷冻周期胚胎比移植第6日新鲜自体移植周期的胚胎妊娠率高，第5日和第6日的冷冻胚胎移植周期的妊娠结局是相同的(Shapiro et al., 2008)。以上研究结果表明，子宫内膜容受性的不同可能和子宫内膜同步性有关。卵子捐赠模型的研究表明，子宫内膜的容受性有重要的作用。正如之前的研究，接受自体移植的IVF患者，将她一半的卵子捐赠，受孕组的着床率和妊娠率均高，这说明子宫内膜容受性和子宫环境的关系密切(Check, 1999)。

在捐卵周期($n=93$)，Porat等回顾性分析了在卵裂期(第三日)和囊胚期(D6)胚胎移植后的妊娠率和着床率；另外，他们还做出以下评估：1) 根据卵裂期胚胎细胞和形态学分级来预测囊胚形成率；2) 546个正常授精的胚胎继续在培养液中培养后高质量囊胚的形成率(囊胚完全孵化形成，有好的内细胞团和滋养外胚层，按照Gardner的分级系统为 $\geq 4BB$) (Porat et al., 2010)。尽管囊胚培养明显减少了胚胎的数量，但卵裂期胚胎移植周期的生化妊娠率、临床妊娠率和着床率显著下降(47%、40%和27%，而囊胚移植周期分别为82%、73%和64%)。总体来说，高质量的囊胚更多的来自于第三日高质量的胚胎>6细胞，【分级1~1.5(均匀一致，体积小且没有碎片)】(59%)，而质量好的胚胎占到43%，一般和质量差的第三日胚胎占55%。在2010年Cochrane的综述中，把卵裂期胚胎移植组和囊胚期移植组做对比(包括1,144例患者的9个随机对照研究)，其中囊胚组活产率显著高，两者比值为1.35(Blake et al., 2010)。在这篇综述中，关于两者临床妊娠率的临床研究包括17个，共2,557例患者，结果两者的比值为1.17，支持囊胚培养。

为了选择高质量的囊胚，双盲回顾性分析6个高质量的第三日胚胎，把它们分成三组

(分别为1个、2个和3个胚胎)，选择这6个胚胎的时机精确度超过95%，每2个胚胎之间的选择时机精确度接近70%。移植第6日囊胚着床率要比移植第3日卵裂期胚胎高，这个数据提示我们提高妊娠率和着床率不应仅仅依靠延长胚胎培养时间（选择移植高质量胚胎），而且要选择合适的胚胎移植时机。合适的时机对最佳妊娠结局起了一个非常重要的作用。

4. 超声监测下胚胎移植

以前，胚胎移植被认为是在ART治疗周期中不重要的一部分（Stafford-Bell, 1999），移植技术操作均是盲做的，而没有超声引导。近来的研究认为，移植技术是最佳妊娠结局的关键因素，包括技术本身、移植管的类型及超声引导的应用（Abou-Setta, 2005, 2006; Bucket, 2003; Sallam & Sadek, 2003）。关于移植技术(Baba et al., 2000)中超声引导（二维超声、三维超声或四维超声引导）的应用，已经有超过150篇临床随机试验研究，包括20篇随机临床试验研究和4篇Meta分析，包括Cochrane（国际循证医学协作组织）的一篇综述（Abou-Setta, 2007; Brown, 2007; Buckett, 2003; Sallam & Sadek, 2003）。以上研究认为，超声引导下的移植技术有利于增加临床妊娠率和着床率，是改善妊娠结局的关键因素。但是，Drakeley等随机对照研究了2,295个胚胎移植周期，结果显示超声引导下的胚胎移植和非超声引导组没有区别，而这个研究没有被任何Meta分析所收录（Drakeley et al., 2008）。

迄今为止，只有两个研究用卵子捐赠模型排除混杂因素影响后来评估超声引导下的胚胎移植。Lindheim 等回顾性研究了137个周期，评估经阴道或经腹超声在胚胎移植中对妊娠率、着床率和多胎妊娠率的影响。超声引导显著增加了胚胎移植容易进行患者的着床率和妊娠率（29% vs. 18% 和 63% vs. 36% $P < 0.05$ ），没有影响多胎妊娠率。同样，超声引导也增加了胚胎移植困难患者的妊娠率、着床率和多胎率，但是2组患者差异没有统计学意义。

Garcia-Velasco等对接受卵子捐赠患者进行了随机对照试验研究，他们的研究目的是想确定经腹超声引导胚胎移植技术是否是一个提高妊娠率的有用工具。在这种前瞻性、随机对照研究中，把374例接受卵子捐赠的患者随机分配到超声引导组和非超声引导组，结果显示，超声引导组的妊娠机会增加了15%。

超声引导组及对照组的妊娠率分别为60%和55%，着床率分别为31%和25%，流产率分别为11%和9%，多胎妊娠率21%和23%。作者得出结论，超声引导下胚胎移植对于提高受卵者的妊娠率没有太大帮助。

虽然这两个研究受实验设计和证据不足的限制，但是数据证实超声引导下的胚胎移植和盲的临床触诊法相比改善了妊娠结局，是达到IVF最佳妊娠结局的一个关键因素，同时也颠覆了胚胎移植技术在ART周期中是不重要因素的观点（Brown, Mains & Van Voorhis, 2010）。而且，超声确定了胚胎移植管尖端和胚胎在子宫腔的位置，使胚胎移植技术容易操作，避免了子宫内膜压痕。更重要的是，还有观点认为这种标准化的胚胎移植技术缩小了医生之间的差异。

众所周知，胚胎移植操作的难易度和妊娠结局紧密联系在一起，对于移植操作困难的患者，即使用更精确的移植管和辅助仪器时妊娠率也低于移植操作容易的患者。移植管（TDT, Frydman, Tomcat, Tefcat, Rocket）首选软管（Cook, Wallace），因为软的移植管在

通过宫颈的过程中，对宫颈和子宫内膜的创伤小 (Mains, 2010; McDonald, 2002; Sallam, 2003)，对比使用各种软管的妊娠率没有显著区别 (Saldeen et al., 2008)。

5. 结论

当卵巢刺激方案及实验室技术在ART周期均能够使患者达到最佳妊娠结局，胚胎移植技术的重要性需要引起重视。胚胎移植技术的延伸领域包括子宫内膜的容受性（子宫内膜厚度），优质胚胎的选择、替代（囊胚移植）和胚胎移植技术（超声引导下）等在改善妊娠结局上起着非常重要的作用。卵子捐赠模型提供了一个独一无二的环境，消除了自体移植周期中混杂变量的影响，为IVF/ET中重要变量的研究提供方法。

现在的观点认为，子宫内膜厚度 >7 mm可以增加妊娠率，因此，对于接受IVF/ET咨询和治疗的患者需要考虑到这个因素。关于胚胎移植时机的选择，有明确的证据证实对有良好预后的患者进行囊胚移植，每个移植周期都会有较高的妊娠率和活产率。另外，这两个率的提高可以减少胚胎移植的平均数量。将胚胎延长培养到囊胚阶段，尤其是高质量、染色体正常的卵裂期胚胎，移植第5日或第6日的胚胎有更大的着床优势。因此，选择高质量的胚胎仍然是最重要的，如果可能的话，移植延长到囊胚期的胚胎可以提高妊娠率和增加单胚胎移植率。最后，超声引导下移植提供了一种标准化操作方法，缩小了胚胎移植者操作技术上的差异，可能是胚胎移植过程中的一个有力条件。有充分的数据表明，超声引导下的胚胎移植技术和非超声引导下相比可以改善妊娠结局，是达到最佳妊娠结局的另外一个关键因素。

在本章中提到的，卵子捐赠模型排除了在自体IVF移植中出现的混杂因素影响，提供更精确的变量控制，在达到最佳妊娠结局起到重要作用。在本章中讨论到的变量如子宫内膜厚度与形态、囊胚移植和超声引导下胚胎移植等无疑成为IVF妊娠结局的重要决定因素。

6. 参考文献

- Abdalla, HI., Brooks, AA., Johnson, MR., Kirkland, A., Thomas, A., & Studd, JW. (1994). Endometrial thickness: a predictor of implantation in ovum recipients? *Human Reproduction*, Vol.9, No.2, (February 1994), pp.363-5, ISSN 0268-1161
- Abou-Setta, AM., Al-Inany, HG., Mansour, RT., Serour, GI., & Aboulghar, MA. (2005). Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, Vol.20, No.11, (November 2005), pp.114-21, ISSN 0268-1161
- Abou-Setta, AM. (2006). Firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta analysis using direct and adjusted indirect comparisons. *Reproductive Biomedicine Online*, Vol.12, No.2, (February 2006), pp.191-8, ISSN 1472-6483
- Abou-Setta, AM., Mansour, RT., Al-Inany, HG., Aboulghar, MM., Aboulghar, MA., & Serour, GI. (2007). Among women undergoing embryo transfer, is the probability of pregnancy and live birth improved with ultrasound guidance over clinical touch alone? A systemic review and meta-analysis of prospective randomized trials.

- Fertility and Sterility*, Vol.88, No.2, (August 2007), pp.333-41, ISSN 0015-0282
- Acosta, AA.,Elberger, L.,Borghi, M.,Calamera, JC.,Chemes, H.,Doncel, GF, Kliman, H.,Lema, B.,Lustig, L.,& Papier, S. (2000). Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertility and Sterility*, Vol.73, No.4, (April 2000), pp.788-9, ISSN 0015-0282
- Amir, W.,Micha, B.,Ariel, H.,Liat, LG.,Jehoshua, D.,& Adrian, S. (2007). Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*, Vol.87, No.4, (April 2007), pp.799-804, ISSN 0015-0282
- Baba, K.,Ishihara, N.,Saitoh, M.,Taya, J.,& Kinoshita, K. (2007). Three-dimensionalultrasound in embryo transfer. *Ultrasound In Obstetrics & Gynecology*, Vol.16, No.4, (September 2000), pp.372-3, ISSN 1469-0705
- Barker, MA.,Boehnlein, LM.,Christianson, MS.,Kovacs, P.,& Lindheim, SR. (2009).Relationship of Follicular and Luteal Phase Endometrial Thickness plus Echogenic Pattern and Pregnancy Outcome in Oocyte Donation Cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.26, No.5, (May 2009), pp.243-9, ISSN 1573-7330
- Baruffi, RLR.,Contart, P.,Mauri, AL.,Peterson, C.,Felipe, V.,Garbellini, E.,& Franco, JG Jr.(2002). A uterine ultrasonographic scoring system as a method for the prognosis of embryo implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.19, No.3, (March 2002), pp.99-102, ISSN 1573-7330
- Blake, DA.,Farquhar, CM.,Johnson, N.,& Proctor, M. (2007). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Vol. 17, No.4, (October 2007), pp.1-79, ISSN 1469-493X
- Braude, P.,Bolton, V.,& Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stages of pre-implantation development. *Nature*, Vol.332 No.6163, (March 1988), pp.459-61, ISSN 0028-0836
- Brown, JA.,Buckingham, K.,Abou-Setta, A.,& Buckett, W. (2007). Ultrasound versus 'clinical touch' for catheter guidance during embryo transfer in women. *CochraneDatabase of Systematic Reviews*, Vol.24, No.1, (January 2007), ISSN 1469-493X
- Buckett, WM. (2003). A meta-analysis of ultrasound-guided versus clinical touch embryo transfer. *Fertility and Sterility*, Vol.80, No.4, (October 2003), pp.1037-41, ISSN 0015-0282
- Castelbaum, AJ.,Ying, L.,Somkuti, SG.,Sun, J.,Ilesanni, AO.,& Lessey, BA. (1997).Characterization of integrin expression in well differentiated endometrial a endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol.82, No.1, (January 1997), pp.136-142. ISSN 1945-7197
- Check, JH.,Nowroozi, K.,Choe, J.,Lurie, D.,& Dietterich, C. (1993). The effect of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in donor oocyte-embryo transfer cycle. *Fertility and Sterility*, Vol.59, No.1, (January1993), pp.72-5, ISSN 0015-0282
- Check, JH.,Choe, JK.,Kotsoff, D.,Summers-Chase, D.,& Wilson, C. (1999).Controlled ovarian

- hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Vol.16, No.8, (September 1999), pp. 416-20, ISSN 1573-7330*
- Croxatto, HB.,Fuentesalba, B.,Diaz, S.,Patene, L.,&Tatum, HJ. (1972). *A simple nonsurgical technique to obtain unimplanted eggs from human uteri. American Journal of Obstetrics and Gynecology, Vol.112, No.5, (March 1972), pp.662-8, ISSN 0002-9378*
- De Placido, G.,Wilding, M.,Strina, I.,Alvigi, E.,Alvigi, C.,Mollo, A.,Varicchio, MT.,Tolino, A.,Schiattarella, C.,& Dale, B. (2002). *High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate.Human Reproduction, Vol.17, No.9, (September 2002), pp.2402-09, ISSN 0268-1161*
- Dietterich, C.,Check, JH.,Choe, JK.,Nazari, A.,& Lurie, D. (2002). *Increased endometrial thickness on the day of human chorionic gonadotropin injection does not adversely affect pregnancy or implantation rates following in vitro fertilization-embryo transfer. Fertility and Sterility, Vol.77, No.4, (April 2002), pp.781-86, ISSN 0015-0282*
- Drakeley, AJ.,Jorgensen, A.,Sklavounos, J.,Aust, T.,Gazvani, R.,Williamson, P.,& Kingsland, CR. (2005). *A randomized controlled clinical trial of 2295 ultrasound. Human Reproduction, Vol.23, No.5, (2008), pp.1101-06, ISSN 0268-1161*
- Fanchin, R.,Ayoubi, JM.,Righini, C.,Olivennes, F.,Schonauer, LM.,& Frydman, R. (2001). *Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. Human Reproduction, Vol.16, No.6, (June 2001), pp.1115-9, ISSN 0268-1161*
- Gamiz, P.,Rubio, C.,de los Santos, MJ.,Mercader, A.,Simon, C.,Remohl, J.,& Pellicer, A. (2003). *The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. Human Reproduction, Vol.18, No.11, (November 2003), pp.2413-19, ISSN 0268-1161*
- Garcia, JE.,Acosta, AA.,Hsiu, JG.,& Jones, HW Jr. (1984). *Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization. Fertility and Sterility, Vol.41 No.1, (January 1984), pp.31-5, ISSN 0015-0282*
- García-Velasco, JA.,Isaza, V.,Martinez-Salazar, J.,Landazábal, A.,Requena, A.,Remohí, J.,& Simón, C. (2002). *Transabdominal ultrasound-guided embryo transfer does not increase pregnancy rates in oocyte recipients. Fertility and Sterility, Vol. 78, No.3, (September 2002), pp.534-9, ISSN 0015-0282*
- Garcia-Velasco, JA.,Isaza, V.,Caligara, C.,Pellicer, A.,Remohí, J.,& Simón, C. (2003). *Factors that determine discordant outcome from shared oocytes. Fertility and Sterility, Vol.80, No.1, (July 2003), pp.54-60, ISSN 0015-0282*
- Gardner, DK.,Schoolcraft, WB.,Wagley, L.,Schlenker, T.,Stevens, J.,& Hesla, J. (1998). *A randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. Human Reproduction, Vol.13, No.12, (December 1998), pp.3434-40, ISSN 0268-1161*
- Gianaroli, L.,Magli, MC.,Ferraretti, AP.,Fortini, D.,& Grieco, N. (2003). *Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. Fertility and Sterility, Vol.80, No.2, (August 2003), pp.341-9, ISSN 0015-0282*

- Hnida, C., Engenheiro, E., & Ziebe, S. (2004). Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Human Reproduction*, Vol.19, No.2, (February 2004), pp.288-93, ISSN 0268-1161
- Kovacs, P., Matyas, S., Boda, K., & Kaali, SG. (2003). The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Human Reproduction*, Vol.18, No.11, (November 2003), pp.2337-41, ISSN 0268-1161
- Lindheim, SR., Cohen, MA., & Sauer, MV. (1999). Ultrasound guided embryo transfer significantly improves pregnancy rates in women undergoing oocyte donation. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, Vol. 66, No.3, (September 1999), pp.281-4, ISSN 0020-7292
- Magli, MC., Gianaroli, L., Munne, S., & Ferratetti, AP. (1998). Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.15, No.5, (May 1998), pp.297-301, ISSN 1573-7330
- Mains, L., & Van Voorhis, BJ. (2010). Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertility and Sterility*, Vol.93, No.3, (August 2010), pp.785-790, ISSN 0015-0282
- McDonald JA, Norman RJ. A randomized controlled trial of a soft double lumen embryo transfer catheter versus a firm single lumen catheter: significant improvements in pregnancy rates. *Hum Reprod* 2002; 17:1502-6
- McWilliams, GD., & Frattarelli, JL. (2007). Changes in measured endometrial thickness predict in vitro fertilization success. *Fertility and Sterility*, Vol.88, No.1, (July 2007), pp.74-81, ISSN 0015-0282
- Montag, M., & van der Ven, H. (2001). Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective randomized multicentre study. *Human Reproduction*, Vol.16, No.11, (November 2001), pp.2384-89, ISSN 0268-1161
- Nagy, ZP., Dozortsev, D., Diamond, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Adelmassih, R., & Greco, E. (2003). Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertility and Sterility*, Vol.80, No.1, (July 2003), pp.67-74, ISSN 0015-0282
- Nikas, G., Develioglou, OH., Toner, JP., & Jones, HW. Jr. (1999). Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Human Reproduction*, Vol.14, No.3, (March 1999), pp.787-92, ISSN 0268-1161
- Noci, I., Borri, P., Chieffi, O., Scarsselli, G., Biaglotti, R., Moncini, D., Paglierani, M., & Taddei, G. (1995). Aging of the human endometrium: a basic morphological and immunohistochemical study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology, and Reproductive Biology*, Vol.63, No.2, (December 1995), pp.181-85, ISSN 0301-2115
- Noyes, N., Hampton, BS., Berkeley, A., Licciardi, F., Grifo, J., & Krey, L. (2001). Factors useful in predicting the success of oocyte donation: a 3-year retrospective analysis. *Fertility and Sterility*,

- Vol.76, No.1, (July 2001), pp.92-97, ISSN 0015-0282
- Noyes, RW, Hertig, AT, & Rock, J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertility and Sterility*, Vol.1, No.3, (March 1950), pp.1-3, ISSN 0015-0282
- Oehninger, S. (1950). Revealing the enigmas of implantation: what is the true impact of ovarian hyperstimulation? *Fertility and Sterility*, Vol.89, No.1, (January 1950), pp.27-30, 0015-0282
- Papnikolaou, EG, D'haeseleer, E, Verheyen, G, Van de Velde, H, Camus, M, VanSteirteghem, A, Devroey, P, & Tournaye, H. (2005). Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage transfer when at least four embryos are available on day 3 of culture. A randomized prospective study. *Human Reproduction*, Vol.20, No.11, (November 2005), pp.3198-203, ISSN 0268-1161
- Papnikolaou, EG, Camus, M, Kolibianakis, EM, Landuyt, LV, Van Steirteghem, A, & Devroey, P. (2006). In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos. *New England Journal of Medicine*, Vol.354, No.11, (March 2006), pp.1139-46, ISSN 00284793
- Paulson, RJ, Sauer, MV, & Lobo, RA. (1997). Potential enhancement of endometrial receptivity in cycles using controlled ovarian hyperstimulation with antiprogestins: a hypothesis. *Fertility and Sterility*, Vol.67, No.2, (February 1997), pp.321-25, ISSN 0015-0282
- Porat, N, Boehnlein, LM, Barker, MA, Kovacs, P, & Lindheim, SR. (2010). Blastocyst Embryo Transfer is the Primary Determinant for Improved Outcomes in Oocyte Donation Cycles. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, Vol.36, No.2, (April 2010), pp.357-63, ISSN 1447-0756
- Rashidi, BH, Sadeghi, M, Jafarabadi, M, & Tehrani Nejad, ES. (2005). Relationships between pregnancy rates following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and endometrial thickness and pattern. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, Vol.120, No.2, (June 2005), pp.179-184, ISSN 0301-2115
- Remohí, J, Ardiles, G, García-Velasco, JA, Gaitán, P, Simón, C, & Pellicer, A. (1997). Endometrial thickness and serum oestradiol concentrations as predictors of outcome in oocyte donation. *Human Reproduction*, Vol.12, No.10, (October 1997), pp.2271-2276, ISSN 0268-1161
- Rienzi, L, Ubaldi, F, Iacobelli, M, Romano, S, Minasi, MG, Ferrero, S, Sapienza, F, Baroni, E, & Greco, E. (2005). Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive Biomedicine Online*, Vol.10, No.5, (May 2005), pp.669-681, ISSN 1472-6483
- Richter, KS, Bugge, KR, Bromer, JG, & Levy, MJ. (2007). Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1, 294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. *Fertility and Sterility*, Vol.87, No.1, (January 2007), pp.53-59, ISSN 0015-0282
- Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF, Ezzeldin F, Sallam AN. Impact of technical difficulties, choice of catheter, and the presence of blood on the success of embryo

- transfer: experience from a single provider. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:135-42
- Sallam, HN., & Sadek, SS. (2003). Ultrasound-guided embryo transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, Vol.80, No.4, (October 2003), pp.1042-6, ISSN 0015-0282
- Schild, RL., Knobloch, C., Dorn, C., Fimmers, R., van der Ven, H., & Hansmann, M. (2001). Endometrial receptivity in an in vitro fertilization program as assessed by spiral artery blood flow, endometrial thickness, endometrial volume, and uterine artery blood flow. *Fertility and Sterility*, Vol. 75, No.2, (February 2001), pp.361-66, ISSN 0015-0282
- Schillaci, R., Castelli, A., Vassiliadis, A., Venzia, R., Sciacca, GM., Perino, A., & Cittadini, E. (2002). Blastocyst stage versus day 2 embryo transfer in IVF cycles. Abstracts of the 18th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, 2002, P-418.
- Schoolcraft, WB., & Gardner, DK. (2001). Blastocyst versus day 2 or 3 transfer. *Seminars in Reproductive Medicine*, Vol.19, No.3, (September 2001), pp.259-268, ISSN 1526-8004
- Shapiro, BS., Daneshmand, ST., Garner, FC., Aguirre, M., & Ross, R. (2008). Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertility and Sterility*, Vol.89, No.1, (January 2008), pp.20-26, ISSN 0015-0282
- Sharara, FI., Lim, J., & McClamrock, HD. (1999). Endometrial pattern on the day of oocyte retrieval is more predictive of implantation success than the pattern or thickness on the day of hCG administration. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.16, No.10, (November 1999), pp.523-28, ISSN 1573-7330
- Sher, G., Herbert, C., Maassarani, G., & Jacobs, MH. (1991). Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Human Reproduction*, Vol.6, No.2, (February 1991), pp.232-37, ISSN 0268-1161
- Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I., & Van Steirteghem, A. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Human Reproduction*, Vol.19, No.12, (December 2004), pp.2849-58, ISSN 0268-1161
- Sundström, P. (1998). Es Stafford-Bell, MA. (1999). Which factors are important for successful embryo transfer after in vitro fertilization? *Human Reproduction*, Vol.14, No.10, (October 1999), pp.2678-9, ISSN 0268-116
- Establishment of a successful pregnancy following in-vitro fertilization with an endometrial thickness of no more than 4 mm. *Human Reproduction*, Vol.13, No.6, (June 1998), pp.1550-52, ISSN 0268-1161
- Trounson, A., Leeton, J., Besanko, M., Wood, C., & Conti, A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilized in vivo. *British Medical Journal*, Vol.286, No.6368

(March 1983), pp.835-838, ISSN 0959-8138

Valbuena, D., Martin, J., de Pablo, J., Remohi, J., Pellicer, A., & Simon, C. (2001). Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertility & Sterility*, Vol.76, No.5, (November 2001), pp.962-8, ISSN 0015-0282

Van Royen, E., Mangelschots, K., De Neubourg, D., Valkenburg, M., Van de Meerssche, M., Ryckaert, G., Estermans, W., & Gerris, J. (1999). Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Human Reproduction*, Vol.14, No.9, (September 1999), pp.2345-49, ISSN 0268-1161

Yuval, Y., Lipitz, S., Dor, J., & Achiron, R. (1999). The relationships between endometrial thickness, and blood flow and pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, Vol.14, No.4, (April 1999), pp.1067-71, ISSN 0268-1161

Zenke, U., & Chetkowski, R.J. (2004). Transfer and uterine factors are the major recipient-related determinants of success with donor eggs. *Fertility and Sterility*, Vol.82, No.4, (October 2004), pp.850-56, ISSN 0015-0282

Zhang, X., Chen, CH., Confino, E., Barnes, R., Milad, M., & Kazer, RR. (2005). Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertility and Sterility*, Vol.83, No.2, (February 2005), pp.336-40, ISSN 0015-0282

Ziebe, S., Peterson, K., Lindenberg, S., Andersen, AG., Gabrielsen, A., & Andersen, NA. (1997). Embryo morphology or cleavage stage: How to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, Vol.12, No.7, (July 1997), pp.545-49, ISSN 0268-1161

(赵敏英译)

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

第十一章 囊胚形态在移植选择中的重要性

Borut Kovačič and Veljko Vlajsavljević, University Medical Centre Maribor, Slovenia

1. 引言

自1999年商品化的序贯培养基被发明后，人们也逐渐习惯将体外受精延长培养到囊胚期。如今，培养体系经多次改进，大多数囊胚培养基可以使逾50%的胚胎发育到囊胚阶段（Gardner et al., 1998; Kovačič et al., 2004）。囊胚培养的优势在于1)它使挑选基因组激活的胚胎成为可能（Braude et al., 1988）；2)与早期胚胎相比，囊胚的形态学对于种植有更高的预测价值（Gardner and Schoolcraft, 1999; Kovačič et al., 2004）；3)在不降低妊娠率的前提下可以减少移植胚胎的数目（Gardner et al., 2000a）。而且，在胚胎种植时囊胚期是胚胎种植时与子宫内膜容受性同步最佳的时期（Croxatto et al., 1978; Gardner et al., 2000c）。用囊胚取代胚胎，可以大大缩短他们暴露于高刺激性环境的时间并且减少频繁的子宫收缩时间，而这些因素对他们来说是致死性的（Lesny et al., 1998）。另外，与早期胚胎相比较，囊胚含有的细胞数目多，这使得囊胚冷冻后的复苏率较高（Veeck, 2003）。

2. 囊胚培养

50年前人们合成了首例哺乳动物胚胎培养基，这种培养基仅含有9种成分。自此之后，大量研究致力于合成更适合人类胚胎并且化学成分确定的培养基（Summers and Biggers, 2003）。人们对女性生殖道的不同部分进行了研究，包括子宫、输卵管液的生化和能量底物代谢的分析（Leese et al., 1993; Conaghan et al., 1993; Houghton et al., 2002; Gardner et al., 2001），这些研究推动了人类胚胎序贯培养基的进一步发展（Gardner and Lane, 1997）。此后，培养基又被改良了很多次，加入其他大分子物质可以增加胚胎的发育潜能和种植能力，例如EDTA（Gardner et al., 2000b）和透明质酸（Stojković et al., 2002）。另外，带入热敏感性谷氨酰胺可以使氨基酸变成更稳定的丙氨酰谷氨酰胺从而使之降解产生的毒性得到降低（Lane et al., 2001）。IVF中使用商品化的培养基，其囊胚形成率将会在50%以上。囊胚形成率和囊胚发育的质量可以通过降低培养箱的氧浓度得到改善（Kovačič and Vlajsavljević, 2008; Kovačič et al., 2010）。

3. 囊胚发育过程

3.1 紧密态

早期胚胎的分裂不伴随体积的增大，直至第三次有丝分裂后，随着重要蛋白质合成的恢复，胚胎才开始生长。于是卵裂球的连接点改变直接导致了紧密态的形成。通常情况下，紧密态应该在胚胎发育的第4日完成，即桑椹胚时期（Abe et al., 1999）。

这些连接点在有丝分裂过程中是动态变化的。紧密态代表分化的开始，随之会有周边卵裂球的极化和全能性的丢失。极化是由邻近卵裂球的连接诱导的。由于胚胎的生长，细胞失去了他们卵圆形的形状，并且彼此间变得更加紧密。所以，紧密态是一种在卵裂球间形成缝隙连接、粘着连接、紧密连接和桥粒的过程。缝隙连接在转运代谢产物和调节有丝

分裂的分子方面发挥着非常重要的作用 (Ducibella et al., 1975)。在光学显微镜下, 很难观察到细胞之间的膜。异常的紧密连接可以使卵裂球之间互相排斥, 从而影响紧密态胚胎的形成 (Watson, 1992)。

3.2 腔形成

大约在紧密态后24小时, 细胞间开始形成充满液体的囊胚腔。在囊胚腔形成过程中, 细胞分化为滋养外胚层 (TE) 和内细胞团 (ICM), 其中TE细胞保持细胞的极性。囊胚腔内水的积聚是由Na⁺转运的。TE细胞基底外侧膜上的Na/K ATP酶可以将TE细胞内的Na⁺泵入到囊胚腔内 (Watson and Kidder, 1988)。滋养外胚层细胞之间由细胞表面的紧密连接和桥粒所介导, 这种连接使细胞之间形成了一种密封状态, 防止囊胚腔内的液体和钠离子外泄 (Gualtieri et al., 1992; Garrod et al., 1996), 同时维持了细胞的极性。离子浓度形成的渗透梯度可以使水分子被动扩散到囊胚腔内, 从而使囊胚腔进一步扩张 (Watson, 1992)。

囊胚腔的扩张在TE和ICM分化过程中起到了非常重要的作用。ICM细胞具有非分化性和多能性, 形成致密的椭圆形结构。ICM外膜与其他细胞之间没有任何连接, 直接与囊胚腔液相通。囊胚腔内的特定生长因子可以调控ICM, 使其分化为原始内胚层。另外, 囊胚腔液也很好的充当了ICM的培养基 (Dardik et al., 1993)。囊胚腔液的分子组成大部分取决于TE细胞, TE细胞的功能之一就是降低囊胚腔液的氧浓度, 为ICM细胞的基因转录提供一个必需的低氧环境。

4. 囊胚评价体系

人们将囊胚培养应用于IVF中, 这使减少胚胎移植的数目成为可能。但是移植一个以上囊胚仍然导致了很高的多胎妊娠率 (Vlaisavljević et al., 2008)。因此, 单囊胚移植已成为一种趋势, 人们也在不断探索各种方法来挑选最具发育潜能的囊胚。大量研究显示可以通过评价囊胚的代谢活动对其进行挑选 (Hardy et al., 1989; Conaghan et al., 1993; Gardner et al., 2001; Houghton et al., 2002)。然而, 这些生化实验方法不但费时而且还需要昂贵的实验室设备。除此之外, 这些方法在预测种植能力方面的价值也并不比形态学评估高。因此, 囊胚形态学评估仍然是目前最常用的选择最佳囊胚的方法。

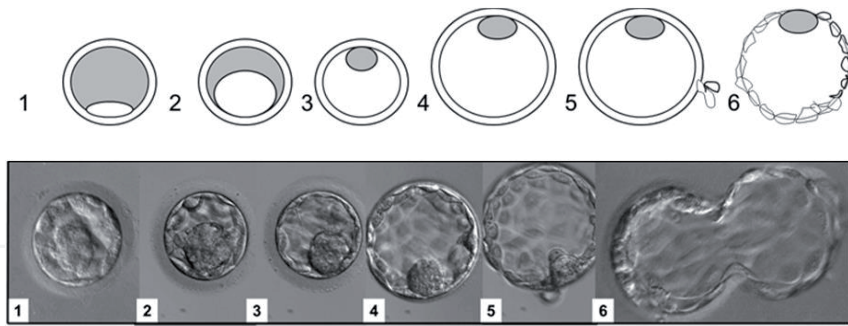
近二十余年来, 已经形成了多种囊胚评价体系。Dokras等 (1993) 首先尝试通过区分囊胚腔是起源于早期腔形成还是空泡来定义最佳囊胚。在人囊胚培养早期, 许多人优先选择囊胚腔扩张性好的 (Shoukir et al., 1998) 和孵化中的囊胚 (Balaban et al., 2000; Yoon et al., 2001) 进行胚胎移植。1999年Gardner 和 Schoolcraft 提出了新的囊胚三分法评价体系, 此评价体系共包括三种形态参数: 囊胚腔的扩张性、内细胞团 (ICM) 的构成和滋养外胚层 (TE) 的紧密性。

4.1 囊胚的三分法评价体系

Gardner 和 Schoolcraft (1999年) 根据囊胚腔的扩张度和孵化状态将囊胚评为1~6分。将开始形成囊胚腔的早期囊胚评为1分, 将孵化的囊胚评为6分 (图11-1)。

仅评分为3~6分的满囊胚可以进行ICM的评分。将ICM和TE分别分为A、B、C三个等级。A表示最佳形态, C表示存在一些不规则形态 (图11-2)。应用此评价系统进行评分, 3AA或更优的囊胚移植后妊娠率为60%。

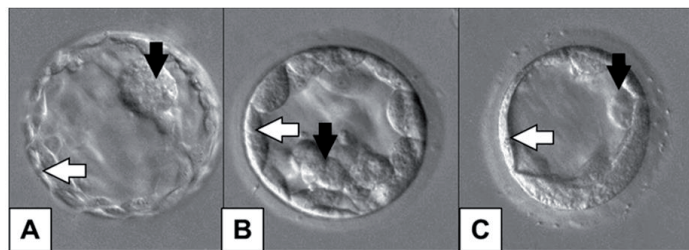
图11-1. 扩张性和孵化状态



1. 囊胚腔小于胚胎体积的一半；2. 囊胚腔大于胚胎体积的一半；3. 满囊胚：囊胚腔完全占据整个胚胎；4. 扩张胚：囊胚腔稍大于胚胎，透明带逐渐变薄；5. 从透明带逐渐孵出；6. 完全从透明带孵出。

(Gardner 和 Schoolcraft, 1999).

图11-2. 内细胞团（黑色箭头）和滋养外胚层（白色箭头）评分



内细胞团：A 大量细胞，填满紧密；B 少量细胞，结构松散；C 极少量细胞。

滋养外胚层：A 许多细胞形成紧密结合的上皮；B 少量细胞形成结构松散的上皮；C 极少量大细胞。

(Gardner 和 Schoolcraft, 1999).

Cornell小组对Gardner评分体系进行了修改 (Veeck and Zaninović, 2009)，他们认为有早期腔形成且囊胚腔小于胚胎体积一半的致密胚胎是空的桑椹胚而非囊胚。他们定义的囊胚是指囊胚腔大于孕体体积的一半并且含有形成ICM的细胞，这就意味着Gardner评分体系的3分相当于Cornell评分体系中的1分。2分是指由于胚胎生长透明带变得更薄的囊胚。3分是指具有薄透明带的完全扩张囊胚。4分和5分相当于Gardner评分体系的5分和6分。6分是指正在孵出或已经孵出的囊胚，此期囊胚的透明带由于卵裂球活检或辅助孵出已经破裂。除此之外，Cornell评分体系包括对ICM和TE的四等级评分 (A~D)，其中D级是指退化的ICM或TE。

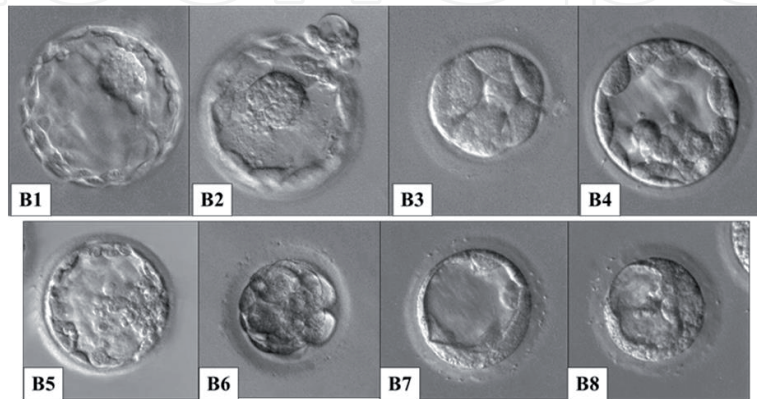
移植一个1BD囊胚，种植率为59%，同样移植一个3AA或3AB或3BA囊胚，种植率为63%，两者之间无显著性差异。作者推断任何第5日定义的囊胚都将会有一个好的种植和妊娠结局。只有移植第5日的桑椹胚才将会获得较低的成功率 (17%)。

4.2 囊胚等级

人们很少关注个体等级参数，而在胚胎选择中面对的主要问题是囊胚哪项结构对正常的妊娠更为重要。因此，三分法评价体系很难用于评价各种形态囊胚的种植潜能。这对移植囊胚必须在欠佳囊胚中选择的周期是无益的。

因此，Kovačić等（2004）提出了简单的囊胚等级体系。他们的等级体系包括四种形态参数：囊胚腔扩张性、ICM形态、TE紧密性和存在囊胚结构外的受排斥卵裂球或碎片（图11-3）。此体系没有进行囊胚腔扩张度的区分，其原因为囊胚腔会在非常短的时间内进行扩张和填充。他们描述了第5日胚胎的八种形态，这些形态是在进行体外延长培养后还具有生命力的胚胎中最常见形态。八种形态的囊胚根据其种植力和活产率被分为B1~B8（活产率分别为：45.2%，32.8%，26.9%，23%，17.7%，16.7%，7.7%，1.2%）。另外，他们发现ICM是成功种植最重要的影响因素。

图11-3. 囊胚等级 (Kovacic et al., 2004)



B1 最优囊胚：具有充满囊胚的囊胚腔、卵圆形结构、致密内细胞团（ICM）和多细胞紧密结合的滋养外胚层（TE）的满囊胚或扩张囊胚。B2 具有正常的ICM，但TE（成碎片或坏死）不是最佳的扩张囊胚。B3 未扩张囊胚和开始腔形成的致密桑椹胚。B4 具有正常的TE，但ICM(非致密或成碎片)不是最佳的扩张囊胚。B5 ICM和TE均不是最佳状态的扩张囊胚。B6 具有大于20%的被排斥的卵裂球或碎片的较小囊胚。B7 没有ICM和囊胚腔，具有大空泡的坏死囊胚。B8 小于80%的胚胎转化成致密桑椹胚或囊胚的小囊胚。

4.3 其他形态特征对植入的影响

许多学组对个体等级参数进行了更加深入的研究。

Richter等（2001）用ICM的形态计量法定义的最佳囊胚更加精确。他们对先前的三分法评价体系持怀疑态度，并认为此评价体系所观察到的差异仅能反映囊胚发育时间上的不同，而不能反映其实际质量的不同。他们发现成功植入的囊胚ICM要明显大于植入失败的囊胚ICM，同时揭示ICM大小和种植能力之间呈现线性正相关关系。ICM $>4500\mu\text{m}^2$ 被定义为最佳囊胚，ICM $<3800\mu\text{m}^2$ 被认为是劣质胚胎（种植率分别为45%和32%）。在胚胎的进一步发育过程中ICM的形状似乎也起着重要的作用，因为有最佳ICM大小和卵圆形形状的囊胚种植率较高（60%），高于仅有最佳ICM大小（29%）或仅有最佳ICM形态（32%）的囊胚种植率。

Ebner等（2004）发现在孵化过程中疝出位置不同其囊胚种植率也有明显的不同，疝出位置在ICM区或TE区的种植率分别为67%和41%。

在可能影响胚胎进一步发育的各种形态学特征中，连接ICM和TE的细胞质带（Scott, 2000）和ICM区空泡被认为可能降低种植能力。

在囊胚形成过程中作为卵裂球或碎片被排出细胞质的比例与胚胎发育成形态学最佳囊胚的能力也有一定的相关性（Ivec et al., 2011）。

另外，一些学组还对囊胚形成延迟一日的的影响进行了分析。一些胚胎常常仅在第6日形成囊胚，而此现象产生的原因还不得而知。人们只是猜测卵母细胞胞质不成熟、卵裂球染色体畸变和培养环境欠佳可能会引起有丝分裂间期延长，从而导致胚胎发育迟缓。我们的结果 (Ivec et al., 2011) 显示84.4%的第5日致密桑椹胚可以发育到囊胚阶段，但是其中仅有23.9%为形态学上的最佳囊胚。

第5日的囊胚通常比第6日的囊胚有更高的种植率 (37.4% and 20.6%, Shapiro et al., 2001) (22.1% and 3.6%, Barrenetxea et al., 2005)。然而，当第6日的囊胚被冷冻并于之后的任何一个新鲜周期被移植，其种植率均能得到改善 (Shapiro et al., 2008)。

5. 移植中的囊胚选择

多胎妊娠是IVF的常见的并发症，它为母婴带来了严重的围生期风险。欧洲和美洲的辅助生殖技术记录分析显示借助IVF或ICSI出生的儿童一半都是来自于多胎妊娠 (de Mouzon et al., 2010; Schiev et al., 1999)。

过去人们已经接受了如此高的IVF多胎妊娠率，因为只有移植三、四个早期卵裂期胚胎才能达到预期的成功率。通过改进培养条件、研发延长胚胎培养的体外培养基并引进囊胚培养体系，降低移植胚胎数目也是可行的 (Vlaisavljević et al., 2008)。此外，大量研究已经证明，对受孕几率高的患者组移植一个囊胚与对其移植两个囊胚相比其妊娠率无显著性差异，但其多胎妊娠率显著性降低 (Gerris et al., 2005)。对四项随机研究中的904个IVF周期和六项队列研究中的7404个IVF周期进行分析，结果显示选择性单胚胎移植 (eSET) 的妊娠率为33.9%，双胚胎移植 (DET) 的妊娠率为35%，DET组的双胎率显著增高，为32.6% (Gerris et al., 2005)。

eSET的成功率主要取决于选择最佳胚胎的能力。囊胚的选择相较于早卵裂期胚胎容易一些。然而，囊胚的形态是千差万别的，在很多情况下，尤其是当可用囊胚的形态都不是最佳时，选择单囊胚移植还是双囊胚移植是很难抉择的。

5.1 移植结局与囊胚形态有关

人们对马里博尔IVF中心2001年到2010年间的2779囊胚移植周期进行了分析，这些女性患者的年龄均小于36岁，且之前IVF周期 ≤ 1 。卵巢刺激方案为GnRH激动剂或GnRH拮抗剂联合重组FSH (果纳芬，国际Serono号，日内瓦，瑞士) 或HMG (美诺孕，Ferring制药有限公司，圣徒学院，瑞士)，方案具体内容前面已经介绍，在此不再赘述 (Vlaisavljević et al., 2008)。受精后第3日再决定是短期培养还是继续培养。如果第3日的胚胎中有两个以上的胚胎为8细胞，体积等大，碎片小于10%的最佳胚胎的话，可以继续培养至第5日。胚胎在序贯培养基 (胚胎培养体系，Medicult/Origio，丹麦) 中培养，并且每日常规的早期胚胎评分体系和我们中心的囊胚评分体系 (Kovačić et al., 2004) 对其进行评价。单囊胚 (SBT) 还是双囊胚移植 (DBT) 由患者自行选择。2008年，斯洛文尼亚健康保险学会试图降低多胎妊娠周期数。他们通过补偿两个额外的IVF周期来增加患者的权益，并允许总共6个周期的补偿。但是对于小于36岁的妇女来说，前两个IVF周期只允许移植一枚最佳的胚胎。基于此项限制，2008年以后选择单囊胚移植的患者是受惠的。

分析结果显示三组之间的分娩率无差异 ($P > 0.05$)，最佳单囊胚移植组为54.7%，最佳双囊胚组为60.4%，最佳囊胚+非最佳囊胚移植组为53.1%。

最佳双囊胚移植组的双胎率为51.9%，仅比最佳囊胚+非最佳囊胚移植组（41.5%）高10%。

非最佳单囊胚和非最佳双囊胚移植组的分娩率大致相等（32.6%和34.7%），但他们明显低于最佳单囊胚移植组的分娩率（54.7%）（ $P < 0.05$ ）。然而，非最佳双囊胚移植组的双胎率仍为28%。（表11-1）

对B5到B8级劣质胚胎的移植进行详细分析，结果显示SBT和DBT的分娩率无差异，为29.1%和26.9%，DBT组的双胎率为21.7%。

从上述的研究报告中明显看出≤36岁女性移植两个囊胚将会导致多胎妊娠率显著性增高（Henman et al., 2005; Lukassen et al., 2005; Vlaisavljević et al., 2008）。在一些国家（比如斯洛文尼亚），单胚胎移植的实施不仅仅与患者的年龄有关而且还与胚胎的质量（比如：选择最高质量的单胚胎移植）有关。目前关于最佳囊胚尚存在争议，一些人认为每个囊胚都是最高质量的胚胎，另一些人却认为根据囊胚精确分类囊胚形态不是最佳时应进行双囊胚移植。

表11-1. 单囊胚和双囊胚移植后分娩率（患者年龄<36岁且以前的IVF周期数≤1）

囊胚质量	单囊胚移植			双囊胚移植	
	最佳	非最佳	最佳+最佳	最佳+非最佳	非最佳+非最佳
移植例数	869	362	555	377	616
临床妊娠	546 (62.8)	124 (34.3)	373 (67.2)	227 (60.2)	248 (40.3)
分娩	475 (54.7)	118 (32.6)	335 (60.4)	200 (53.1)	214 (34.7)
单胎	469 (98.7)	115 (97.5)	157 (46.9)	115 (57.5)	154 (72)
双胎	6 (1.3)	3 (2.5)	174 (51.9)	83 (41.5)	60 (28)
三胎	0	0	4 (1.2)	2 (1)	0

注：括号内为百分数。

我们的囊胚等级体系（Kovačić et al., 2004）包括7种形态上欠佳的囊胚类型，而且对每一种类型，我们均在小于40岁的患者组计算了其相应的预期活产率。所有分级为B4到B8的欠佳囊胚活产率均低于30%。根据在预期分娩率大于30%的周期中限制双胚胎移植的建议，我们推断若囊胚为B3级或更高级别时，可以移植一个以上的囊胚。然而，我们最近对质量极差囊胚的移植进行了研究，结果再次显示无论是在最佳囊胚周期还是在质量极差囊胚周期，双囊胚移植对分娩率均无改善（表11-2）。

过去，对单囊胚移植合理性怀疑的主要原因之一是囊胚冷冻成功率相对较低。欧洲国家的解冻周期妊娠率为15%左右，仅为新鲜囊胚移植周期的一半（de Mouzon et al., 2010）。但是最近几年随着玻璃化冷冻技术的改进，其存活率和活产率得到了明显的改善（Mukaida et al., 2001; Hiraoka et al., 2004; Kuwayama et al., 2005）。

表11-2. 年轻患者组移植1个或2个劣质囊胚后的分娩率和双胎率

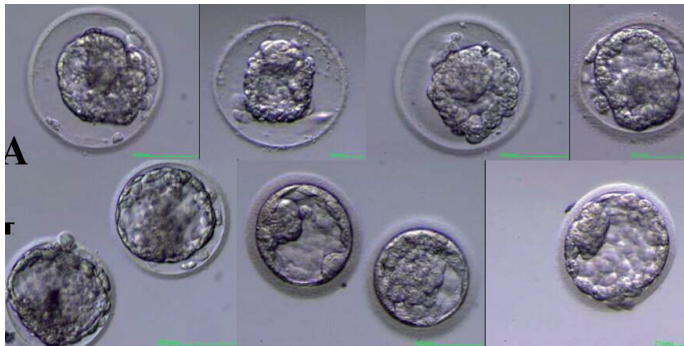
	单囊胚移植	双囊胚移植
囊胚质量	B5~B8	双B5~B8
移植例数	172	308
临床妊娠	57 (33.1)	99 (32.1)
分娩	50 (29.1)	83 (26.9)
单胎	50 (100)	65 (78.3)
双胎	0 (0)	18 (21.7)
三胎	0	0

注：括号内为百分数。

6. 冷冻保存后的囊胚形态

囊胚不是最佳的冷冻保存阶段。囊胚腔中含有大量的液体，而这些液体必须在胚胎冷冻前被除去。为了达到此目的，就必须使用高浓度的冷冻保护剂，然而长时间暴露在此环境会对胚胎产生毒性。玻璃化冷冻是一种两步技术。第一步，将囊胚暴露于平衡液中，可以使囊胚部分脱水、体积缩小、两分钟后再膨胀。第二步必须在一分钟内完成。将囊胚放入玻璃化冷冻液后，囊胚腔内的液体快速流失。因此，囊胚是在萎陷阶段进行的玻璃化。解冻后，胚胎团块仅能填充透明带内体积的一半（图11-4A）。通过逐步降低冷冻保护剂的浓度，囊胚应该能够恢复其在冷冻保存之前的滋养外胚层细胞的体积。细胞内的细胞器应该被重新分配形成极性细胞和功能性的Na/K泵，Na/K泵的功能为使囊胚腔内填充液体。解冻两小时后，囊胚应该部分或完全再扩张（图11-4）到玻璃化冷冻之前的大小。如果囊胚存活，ICM必须具有与冷冻保存前同等的形状和大小。

图11-4. 经玻璃化/去玻璃化后完全存活的囊胚



A 去玻璃化后萎陷阶段的囊胚；B 两小时后再扩张的囊胚

6.1 玻璃化后囊胚扩张性对其存活的影响

新鲜囊胚在形态上和玻璃化冷冻存活能力上是各不相同的。我们的研究目的是得到玻璃化冷冻、复苏和胚胎移植（vitrification, warming and embryo replacement, VER）后各类囊胚类型的种植力，并估算其预期活产率。

用我们的评价体系（Kovačič et al., 2004）（图11-3）对IVF/ICSI周期中第5日剩余囊胚或致密桑椹胚进行玻璃化冷冻前评分。利用IrvineScientific公司（美国）的玻璃化冷冻协议和介质，剩余囊胚被玻璃化冷冻保存在低温生物系统玻璃化冷冻管（法国）中。囊胚被单独冷冻，这样，将之解冻后便能知道其质量等级。

在一项回顾性研究中，750例玻璃化冷冻囊胚被解冻，有642例胚胎存活并被移植。我们分析了430个去玻璃化周期，其中，在327个自然周期或103个雌孕激素支持周期中进行了解冻囊胚的移植。

所有解冻的囊胚均在移植前进行形态学评估，解冻开始后立即进行第一次评估，2 h后进行第二次评估。根据未受损细胞的比例和再扩张的能力，解冻囊胚被分成四组（A~D）。A指具有100%未受损细胞并且在冷冻保存后2 h内再扩张的囊胚。B指具有小于100%大于50%未受损细胞且囊胚腔能再扩张的囊胚。C包括解冻后培养2 h仍未扩张的囊胚。D指变性或未受损的细胞小于50%的囊胚。

表11-3. 不同扩张类型囊胚在玻璃化冷冻保存后的存活率和活产率

玻璃化冷冻前囊胚类型	扩张囊胚	早期囊胚	劣质囊胚
解冻囊胚数目 (<i>n</i>)	552	97	101
解冻囊胚形态			
A 100%完整, 再扩张 (<i>n</i>)	224 (40.6)	63 (64.9)	38 (37.6)
B <100%>50%完整, 再扩张 (<i>n</i>)	200 (36.2)	21 (21.6)	32 (31.7)
C <100%>50%完整, 未扩张 (<i>n</i>)	40 (7.2)	7 (7.2)	17 (16.8)
D 破损的 (<i>n</i>)	88 (15.9)	6 (6.2)	14 (13.9)
存活率 (a+b+c) (%)	84.0	93.8	86.1
活产数/解冻囊胚数 (%)	82/552 (14.9)	14/97 (14.4)	8/101 (7.9)
活产数/移植囊胚数 (%)	82/464 (17.7)	14/91 (15.4)	8/87 (9.2)

注：括号内为百分数。

我们对解冻移植后结果明确的（98.4%的移植囊胚）三组囊胚进行了存活率（大于50%的未受损细胞）、最佳存活率（100%未受损细胞且再扩张）、种植率（有胎心搏动的妊娠囊）和活产率的统计分析。

最佳存活囊胚包含的全部细胞均未受损，其囊胚腔可以重新填充并在保温培养两小时后扩张。扩张囊胚（40.6%）和非扩张囊胚（64.9%）的最佳存活率明显不同（ $P < 0.0001$ ）。仅有37.6%的劣质囊胚在玻璃化后完全存活。

与在形态学上拥有扩张囊胚腔和正常 TE 和 ICM 的最佳囊胚相比，没有囊胚腔或腔形成早期的胚胎在玻璃化后有更好的总存活率（至少50%的未受损细胞）（ $P < 0.05$ ）。Van Landuyt 等也报道了同样的结论（2011），他们的研究显示早期囊胚（86.7%）的存活率要高于满囊胚（78.7%）或扩张囊胚（72.7%）的存活率。Cho 等（2002）、Vandezwalmen 等（2002）、Mukaida 等（2006）和 Ebner 等（2009）也有相似报道。这可能与晚期囊胚对冷冻保护剂的通透性降低有关（Cho et al., 2002; Vandezwalmen et al., 2002）。

6.2 各种扩张囊胚玻璃化后的活产率

对程序性冻融和玻璃化冻融的胚胎和囊胚移植结果进行 Meta 分析，结果显示玻璃化组有更好的临床结局（Loutradi et al., 2008）。由于玻璃化的程序简单，所以它正在变成一种越来越流行的冷冻保存方法。显然，这种方法提高了存活率和种植率，尤其是在囊胚冷冻保存过程中。但很多技术细节对囊胚的存活也有很大影响。首先，扩张的囊胚比其他阶段的胚胎更难在冷冻保护剂中平衡，因此，胚胎在平衡液中的时间需要根据其膨胀率得到相应的修改。然而，所有的程序都是受时间限制的，因为长时间在冷冻保护剂中培养可能会对胚胎产生毒性作用。其次，通过将玻璃化冷冻保护剂的体积最小化可以达到更快的冻融速率。大多数关于囊胚玻璃化的文献均显示其存活率大于85%（Mukaida and Takahashi, 2007）。然而，文献中的种植率和妊娠率仍然存在很大的差异。

Mukaida 和 Takahashi（2007）对冷冻环冻存的3500个囊胚的1500个冻融周期进行分析的结果显示其妊娠率和种植率分别为48.4%和38.5%。他们将扩张的囊胚在玻璃化前进行人工皱缩，从而得到了更好的结果（60%妊娠率和48%种植率）。

Goto 等（2011）证明新鲜囊胚评分与玻璃化冻融后囊胚移植的妊娠结局呈显著相关性。移植完全扩张和孵化中囊胚的年轻患者组分娩率最高（59.9%），而早期囊胚组最低（4.5%）。他们报道的成功率与移植新鲜最佳囊胚的成功率一致。在此研究中囊胚被以每分钟-23,000摄氏度的速度玻璃化冻存在开放性冷冻管中。

根据欧盟有关组织和细胞保存的要求，在我们的研究中，将囊胚以大约每分钟-2,000

摄氏度的速度玻璃化冻存在封闭性冷冻管中。我们扩张囊胚组的分娩率（17.7%）与 Goto 的结果大相径庭。我们不能将两项研究中成功率的不同归咎于冷冻速度的不同，因为一些实验已经证明囊胚不论是玻璃化冷冻在封闭系统还是开放系统其成功率都是相同的（Guns et al., 2008）。我们的研究结果与 Belgian 小组（Van Landuyt et al., 2011）的研究结果是完全相同的，他们的研究显示满囊胚的临床妊娠率大约为 17.5%，早期囊胚的临床妊娠率为 10.6%。

在我们和 Belgian 的研究中，玻璃化的囊胚均没有经过严格的挑选。另外，日本学者研究的不同之处在于他们要等待囊胚腔扩张或者囊胚自然孵化，以及实行玻璃化前的辅助皱缩。所有这些细节都可能是成功的关键点，但其具体影响有待进一步研究。

7. 结论

计算特定类型囊胚的种植能力应该可以帮助临床医生决定移植新鲜或冷冻-解冻囊胚的数目并预测移植后的种植和活产情况。我们的结果显示在年轻患者组单囊胚移植和双囊胚移植的妊娠率是相似的，但双囊胚移植后，特别是其中至少一个为形态最佳囊胚时，双胎率仍然高得令人无法接受。因此，双囊胚移植在年轻患者组是不予以考虑的。

玻璃化冷冻是一种冷冻保存剩余囊胚的方法。由于非扩张囊胚经玻璃化冻融后存活率更高，故对于扩张囊胚来说，非扩张囊胚似乎是进行玻璃化冷冻的更佳阶段。然而去玻璃化后的早期囊胚或扩张囊胚的种植能力相当，但与新鲜囊胚相比其种植能力还是显著降低的。目前尚不清楚不同研究间去玻璃化囊胚移植成功率的差异，是与预选适合玻璃化的囊胚的标准不同有关还是与对胚胎存活和种植至关重要的玻璃化技术细节有关。我们需要进一步研究分析开放或封闭性玻璃化系统、不同冷冻保存介质、辅助皱缩和胚胎暴露于玻璃化冷冻保存液的时间对其产生的影响。

8. 参考文献

- Abe, H. Otoi, T. Tachikawa, S. Yamashita, S. Satoh, T & Hoshi, H. (1999). Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anatomy and Embryology*, Vol.199(6), pp. 519-527
- Balaban, B. Urman, B. Sertac, A. Alatas, C. Aksoy, S & Mercan, R. (2000). Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*, Vol.74, pp. 282-287
- Barrenetxea, G. Lopez de Larruzea, A. Ganzabal, T. Jimenez, R. Carbonero, K & Mandiola, M. (2005). Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertility and Sterility*, Vol.83(1), pp. 49-53
- Braude, P. Bolton, V & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, Vol.332(6163), pp. 459-61
- Cho, H.J. Son, W.Y. Yoon, S.H. Lee, S.W. & Lim, J.H. (2002). An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Human Reproduction*, Vol.17(9), pp. 2419-2422
- Conaghan, J. Hardy, K. Handyside, A.H., Winston, R.M. & Leese, H.J. (1993). Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, Vol.10, pp. 21-30
- Croxatto, H.B. Ortiz, M.E. Diaz, S. Hess, R. Balmaceda, J. & Croxatto, H.D. (1978). Studies on the

- duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. American Journal of Obstetrics and Gynecology, Vol.132(6), pp. 629-634*
- Dardik, A. Doherty, A.S. & Schultz, R.M. (1993). Protein secretion by the mouse blastocyst: stimulatory effect on secretion into the blastocoel by transforming growth factor- alpha. *Molecular Reproduction and Development, Vol.34(4), pp. 396-401*
- De Mouzon, J. Goossens, V. Bhattacharya, S. Castilla, J.A. Ferraretti, A.P. Korsak, V. Kupka, M. Nygren, K.G. Nyboe Andersen, A. & The European IVF-monitoring (EIM) Consortium. (2010). Assisted reproductive technology in Europe 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction, Vol.25, pp. 1851-1862*
- Dokras, A. Sargent, I.L. & Barlow, D.H. (1993). Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential. *Human Reproduction, Vol.8, pp. 2119-2127*
- Ducibella, T. Albertini, D.F. Anderson, E. & Biggers, J.D. (1975). The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Developmental Biology, Vol.45(2), pp. 231-250*
- Ebner, T. Gruber, I & Moser, M. (2004). Location of herniation predicts implantation behaviour of hatching blastocysts. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association, Vol.8, pp. 184-189*
- Ebner, T. Vanderzwalmen, P. Shebl, O. Urdl, W. Moser, M. Zech, NH & Tews, G. (2009). Morphology of vitrified/warmed day-5 embryos predicts rates of implantation, pregnancy and live birth. *Reproductive Biomedicine Online, Vol.19(1), pp. 72-78*
- Gardner, D. Vella, P. Lane, M. Wagley, L. Schlenker, T & Schoolcraft, W. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility, Vol.69, pp. 84-88*
- Gardner, D.K. & Lane, M. (1997). Culture and selection of viable human blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Human Reproduction Update, Vol.3, pp. 367-382*
- Gardner, D.K. & Schoolcraft, WB. (1999). In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds) *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Parthenon Publishing, Carnforth, UK. pp. 378-388
- Gardner, D.K. Lane, M. Stevens, J. & Schoolcraft, WB. (2001). Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and Sterility, Vol.76, pp. 1175-1180*
- Gardner, D.K. Lane, M. Stevens, J. Schlenker, T. & Schoolcraft, W.B. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility, Vol.73(6), pp. 1155-1158*
- Gardner, D.K. Lane, M.W. & Lane, M. (2000). EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development, Vol.57, pp. 256-261*
- Gardner, D.K. Pool, T.B. & Lane, M. (2000). Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Seminars in Reproductive Medicine, Vol.18(2), pp.*

205-218

- Garrod, D. Chidgey, M. & North, A. (1996). Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.8(5), pp. 670-678
- Gerris, J.M. (2005). Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Human Reproduction Update*, Vol.11, pp. 105-121
- Goto, S. Kadowaki, T. Tanaka, S. Hashimoto, H. Kokeguchi, S & Shiotani, M. (2011). Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1, 488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility*, Vol.95(3), pp. 948-952
- Gualtieri, R. Santella, L & Dale, B. (1992). Tight junctions and cavitation in the human preembryo. *Molecular Reproduction and Development*, Vol.32(1), pp. 81-87
- Guns, Y. Vandermonde, A. Vitrier, S. Sterckx, J. Devroey, P. Van den Abbeel, E. & Van Der Elst, J. (2008). Validation of media and devices for vitrification of human embryos: in search of an optimum. In: *Abstracts of the 24th Annual Meeting of the ESHRE, Barcelona, Spain, O-134*, pp. i55-i56
- Henman, M. Catt, J.W. Wood, T. Bowman, M.C. de Boer, K.A. & Jansen, R.P. (2005). Elective transfer of single fresh blastocysts and later transfer of cryostored blastocysts reduces the twin pregnancy rate and can improve the in vitro fertilization live birth rate in younger women. *Fertility and Sterility*, Vol.84, pp. 1620-1627
- Hiraoka, K. Hiraoka, K. Kinutani, M & Kinutani, K. (2004). Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Human Reproduction*, Vol.19, pp. 2884-2888
- Houghton, F.D. (2006). Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation*, Vol.74, pp. 11-18
- Houghton, F.D. Hawkhead, JA. Humpherson, PG. Hogg, JE. Balen, AH. Rutherford, AJ & Leese, HJ. (2002). Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction*, Vol.17, pp. 999-1005
- Ivec, M. Kovacic, B & Vlajavljec, V. (2011). Prediction of human blastocyst development from morulae with delayed and/or uncomplete compaction. *Fertility and Sterility*, (In Press).
- Kovacic, B. & Vlajavljec, V. (2008). Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, Vol.17, pp. 229-236
- Kovacic, B. Sajko, M.C. & Vlajavljec, V. (2010). A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, Vol.94, pp. 511-519
- Kovacic, B. Vlajavljec, V. Reljic, M. & Cizek-Sajko, M. (2004). Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reproduction Biomedicine Online*, Vol.8, pp. 687-694
- Kuwayama, M. Vajta, G. Ieda, S & Kato, O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine*

- Online, Vol.11, pp. 608-614
- Leese, H.J. Conaghan, J. Martin, KL & Hardy, K. (1993). Early human embryo metabolism. *Bioessays*, Vol.15, pp. 259-264
- Lesny, P. Killick, S.R. Tetlow, R.L. Robinson, J. & Maguiness, S.D. (1998). Uterine junctional zone contractions during assisted reproduction cycles. *Human Reproduction Update*, Vol.4(4), pp. 440-445
- Loutradi, K.E. Kolibianakis, E.M. Venetis, C.A. Papanikolaou, E.G. Pados, G. Bontis, I. & Tarlatzis, B.C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, Vol.90, pp. 186-193
- Lukassen, H.G. Braat, D.D. Wetzels, A.M. Zeilhuis, G.A. Adang, E.M. Scheenjes, E. & Kremer, J.A. (2005). Two cycles with single embryo transfer versus one cycle with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*, Vol.20, pp. 702-708
- Mukaida, T & Takahashi, K. (2007). Vitrification of blastocysts using the Cryoloop technique. In Tucker MJ, Lieberman J (eds.) *Vitrification in assisted reproduction*, Informa Healthcare, London, pp. 219-238
- Mukaida, T. Nakamura, S. Tomiyama, T. Wada, S. Kasai, M. & Takahashi, K. (2001). Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertility and Sterility*, Vol.76, pp. 618-620
- Mukaida, T. Oka, C. Goto, T. & Takahashi, K. (2006). Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Human Reproduction*, Vol. 21(12), pp. 3246-3252
- Richter, K.S. Harris, D.C. Daneshmand, S.T. & Shapiro, B.S. (2001). Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner-cell mass size and shape. *Fertility and Sterility*, Vol.76, pp. 1157-1167
- Schieve, L.A. Peterson, H.B. Meikle, S.F. Jeng, G. Danel, I. Burnett, N.M. & Wilcox, L.S. (1999). Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *JAMA*, Vol.282, pp. 1832-1838
- Scott, L.A. (2000). Oocyte and embryo polarity. *Seminars in Reproductive Medicine*, Vol.18, pp. 171-183
- Shapiro, B.S. Daneshmand, S.T. Garner, F.C. Aguirre, M. & Ross, R. (2008). Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertility and Sterility*, Vol.89(1), pp. 20-26
- Shapiro, B.S. Richter, K.S. Harris, D.C. & Daneshmand, S.T. (2001). A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and Sterility*, Vol.75, pp. 1126-1130
- Shoukir, Y. Chardonnens, D. Campana, A. Bischof, P & Sakkas, D. (1998). The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Human Reproduction*, Vol.13, pp. 676-681
- Stojkovic, M. Kolle, S. Peinl, S. Stojkovic, P. Zakhartchenko, V. Thompson, JG. Wenigerkind, H. Reichenbach, H.D. Sinowatz, F. & Wolf, E. (2002). Effect of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*, Vol.124, pp. 1411-1413
- Summers, M.C. & Biggers, J.D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian

- preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Human Reproduction Update, Vol.9, pp. 557-582*
- Van Landuyt, L. Stoop, D. Verheyen, G. Verpoest, W. Camus, M. Van de Velde, H. Devroey, P & Van den Abbeel, E. (2011). Outcome of closed blastocyst vitrification in relation to blastocyst quality: evaluation of 759 warming cycles in a single-embryo transfer policy. Human Reproduction, Vol.26, pp. 527-534*
- Vanderzwalmen, P. Bertin, G. Debauche, C.H. Standaert, V. van Roosendaal, E. Vandervorst, M. Bollen, N. Zech, H. Mukaida, T. Takahashi, K & Schoysman, R. (2002). Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. Human Reproduction, Vol.17(3), pp. 744-751*
- Veeck, L. & Zaninovic, N. (2009). Human blastocysts in vitro. In: Veeck L, Zaninovic N, eds. An Atlas of Human Blastocysts. Boca Raton, London, New York, Washington: Parthenon Publishing, pp. 99-137.*
- Veeck, L.L. (2003). Does the developmental stage at freeze impact on clinical results postthaw? Reproductive Biomedicine Online, Vol.6(3), pp. 367-374*
- Vlaisavljevic, V. Dmitrovic, R. & Sajko, M.C. (2008). Should the practice of double blastocyst transfer be abandoned? A retrospective analysis. Reproduction Biomedicine Online, Vol.16, pp. 677-683*
- Watson, A.J. & Kidder, G.M. (1988). Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K-ATPase during mouse embryogenesis. Developmental Biology, Vol.126(1), pp. 80-90*
- Watson, A.J. (1992). The cell biology of blastocyst development. Molecular Reproduction and Development, Vol.33, pp. 492-504*
- Yoon, H.J. Yoon, S.H. Son, W.Y. Im, K.S. & Lim, J.H. (2001). High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. Fertility and Sterility, Vol.75, pp. 832-833*

(刘盼译)

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

第十二章 人冻融胚胎培养与未培养移植后其妊娠率的比较

Bharat Joshi, Manish Banker, Pravin Patel, Preeti Shah and Deven Patel

Pulse Women's Hospital, Ahmedabad, Gujarat India

1. 引言

目前, 冷冻胚胎移植 (FET) 在世界上先进的辅助生殖技术中心内已经成为体外受精 (IVF) 常规中的一部分。虽然冷冻胚胎移植的妊娠率仍低于新鲜胚胎移植, 但是冷冻保存可以使剩余胚胎得到更充分的利用, 并且对发生卵巢过度刺激的患者及需要放、化疗的肿瘤患者提供最佳的保存方式。

在胚胎冷冻保存过程中, 最重要的环节就是使胚胎细胞内脱水。应用渗透性和非渗透性冷冻保护剂 (CPA) 可以使胚胎细胞充分脱水。冷冻保护剂可以减少细胞内细胞器的损害, 并且使细胞在冻融过程中不受渗透性损伤的危害。几乎所有的冷冻保护剂都存在一定程度的毒副作用, 这种毒副作用与冷冻保护剂的浓度及卵裂球暴露于其中的时间成正相关性。随着冷冻保护剂在冷冻保存中的广泛应用, 这些毒副作用将会逐渐减少。

冻融还可能破坏胚胎的形态特征以及卵裂球的存活率, 从而导致种植率下降。卵母细胞及各个阶段的胚胎都可以被冷冻, 如卵母细胞 (Chen, 1986; Borin et al., 2004, 2006), 原核细胞 (Barg et al., 1990; Van den Abbeel et al., 1997; Senn et al., 2000 & Al-Hasani et al., 2007), 第 2 日和第 3 日的胚胎 (Li et al., 2007; Mauri et al., 2001; Kuwayama et al., 2005; Van der Elst et al., 1997 & Rama Raju et al., 2005), 桑椹胚 (Tao et al., 2001) 及囊胚 (Menezo 2004, Liebermann & Tucker, 2006, Clifford et al., 2007)。卵母细胞及各阶段胚胎的解冻生存率从 40% 到 90%, 成功率从 7% 到 40%, 具有显著性差异。

2. 冷冻保存

冷冻对细胞质脂滴的危害是不可逆的, 对微管的危害是可逆的。而且冷冻还会对细胞器, 细胞骨架及细胞连接产生危害 (Vincent & Jhonson, 1992; Massip et al., 1995; Dobrinsky, 1996)。同时, 冻融过程还可能存在透明带断裂, 进而导致冻融胚胎存活率差异。Guiref 和 Abdel Hafez 等研究表明, 胚胎卵裂期、预冷冻状态、周期中激素的补充、取卵及新鲜胚胎移植周期前卵巢的过度刺激、冷冻剂的选择、冷冻技术 (程序性冷冻或玻璃化冷冻) 及载体类型等都是影响结局的重要因素。

3. 慢速冷冻技术

慢速冷冻过程: 首先, 胚胎在 1~2 mol/L 的渗透性和非渗透性冷冻保护剂中平衡, 在程序冷冻仪中将胚胎从室温降至 -7°C, 然后从 -7°C 以 -0.3~-1.0°C/min 的速率将温度降至 -35°C, 迅速降温直至温度降到 -120°C 以下, 将装在麦管中的胚胎储存在液态氮中。慢速冷冻的优点是, 低浓度的冷冻保护剂可以降低由于胚胎细胞内冰晶形成导致的胚胎损伤, 有利于胚胎的存活。慢速冷冻技术的不足之处是费用较昂贵, 需要配备程序冷冻仪、液氮罐等, 费时, 耗电。尽管如此, 在世界各地仍然有很多实验室采用这种冷冻技术。

4. 玻璃化冷冻

玻璃化冷冻是通过15,000~30,000 °C/min的速率快速降温,使冰晶体不能形成从而固化的一个过程(Rama Raju et al.,2006)。玻璃化冷冻需要快速的冷却速率(Rall,1987)及高浓度冷冻保护剂以减少冰晶体形成并提高低温黏滞性直到分子固化(Fahy,1986)。为了达到快速冷却(2500 °C/min)的目的,胚胎暴露于冷冻保护剂的时间应该尽量短,因为高浓度的冷冻保护剂具有毒性作用。但是,如果细胞暴露的时间过短,冷冻保护剂的浸入不充足,即使细胞外无冰细胞内也会有冰晶形成(Otoi et al.,1998)。玻璃化冷冻过程中,可以通过缩短胚胎暴露于高浓度冷冻保护剂的时间(Vajta et al.,1998)或增加低浓度冷冻保护剂的平衡时间来解决冷冻保护剂的毒性作用(Papiset al.,2000)。

随着低温生物学的发展,应用胚胎冻融结合技术可以提高妊娠率。Abdel Hafez等(2010)通过Meta分析证明玻璃化冷冻技术与慢速冷冻技术相比大大提高了胚胎植入后的存活率及妊娠率。就冷冻技术而言,玻璃化冷冻技术相对于慢速冷冻技术存在更大的优势。

然而,在我们的中心玻璃化冷冻刚刚推出,仍在试验阶段。我们正在努力探索在应用慢速冷冻技术过程中如何提高妊娠率,目的是使冻融后的胚胎移植与新鲜胚胎移植的结局差异不大。

5. 材料与方法

5.1 胚胎冻融

为了提高妊娠率并选择冻融后胚胎中(培养和未培养)较好的胚胎,印度的Ahmedabad选取2006~2011年在Pulse女子医院进行人类辅助生殖技术治疗且采用长方案或拮抗剂方案的患者进行了回顾性的分析。大多数卵泡直径达18~20mm时,在人类促绒毛激素(HCG)的作用下可以引发排卵。成熟卵母细胞在募集4 h内即可受精。人工授精16~18小时后可以检测受精情况,48 h后可以移植不超过3个胚胎。剩余的胚胎通过载体(COOK, Medicals Austrilia)装载在容量为0.25 ml的微量吸管中,用CL1800程序冷冻仪冻存。先将其置于-7 °C环境中,随后以0.30 °C/min的冷却速率使温度降至-35 °C,直至温度降到-120 °C。最后将微量吸管存储在液态氮中。胚胎解冻在移植当日或移植前一天进行。胚胎解冻要按照CPA(COOK, Medicals Austrilia)解冻介质说明书步骤逐步解冻。

5.2 结果和讨论

应用卡方检验对2006-2011年期间创建的数据进行了统计学分析。在1,248个解冻周期中,有275个周期妊娠,妊娠率为22.0%,与Ying-hui等2002年获得的28.8%妊娠率结果相比无显著性差异。比较的参数包括患者的年龄、胚胎移植的数量及胚胎解冻与移植之间的时间。

5.3 患者的年龄

表1中患者年龄的比较结果显示,30岁以下的患者妊娠率为25.4%明显高于30岁以上的患者妊娠率18.6%($p<0.01$)。

表 1. 妊娠率与患者年龄的关系

年龄	未移植数	妊娠数	妊娠率 (%)
≤30	630	160	25.4
>30	618	115	18.6

5.4 胚胎移植数

表 2 中新鲜胚胎移植周期, 移植 3 个胚胎的妊娠率为 27.1% 明显高于移植 2 个胚胎的妊娠率 9.9% ($p < 0.00003$)。

表 2. 妊娠率与胚胎移植数的关系

胚胎移植数	移植数	妊娠数	妊娠率 (%)
≤2	365	36	9.9
3	883	239	27.1

5.5 胚胎解冻与移植之间的时间

表 3 中将数据进一步分成两组进行比较, 组 I 为解冻培养过夜后再移植的胚胎, 组 II 为解冻 2 h 后移植的胚胎。

表 3. 妊娠率与胚胎移植时间的关系

组别	平均年龄	妊娠或移植数	妊娠数	妊娠率 (%)
组 I	31.1 岁	1074	240	22.3
组 II	31.1 岁	174	35	20.1

解冻培养过夜后再移植的胚胎的妊娠率为 22.3%, 解冻 2h 后移植的胚胎妊娠率为 20.1%, 两组结果显示无显著性差异。此结果与 1997 年 Karlstorm 等及 2007 年 Singh 等得到 22% 和 16% 的妊娠率具有可比性。

Vander 等 (1997 年), Elst 等 (1998 年) ZeibeGuiref 等 (2002 年) 提出对解冻培养过夜后再移植的胚胎进行卵裂恢复的评估。在此基础上, 例如组 I 培养组的胚胎能够进一步进行卵裂球的分裂。无卵裂移植胚胎的妊娠率为 7.1%, 而 1-3 次卵裂移植胚胎的妊娠率为 31.9%, 两组结果显示有显著性差异 ($p < 0.0001$) (表 4)。这与 Ying-hui 等 2002 年获得的至少 1 次卵裂移植胚胎妊娠率 35.2% 及无卵裂移植胚胎妊娠率 10.2% 的结果很相似。而且, 2 次卵裂移植胚胎 ($p = 0.0004$) 及 3 次卵裂移植胚胎 ($p = 0.0005$) 妊娠率明显高于仅 1 次卵裂的移植胚胎。然而 2 次卵裂移植胚胎与 3 次卵裂移植胚胎妊娠率无明显差异。

2 次卵裂胚胎培养后移植妊娠率为 36.1%, 3 次卵裂胚胎培养后移植妊娠率为 43.0%, 这一结果显示, 与新鲜移植周期获得的妊娠率水平相一致。然而这一结果显著高于 1997 年 Karlstorm 等的 2 次卵裂移植胚胎妊娠率 23% 及 3 次卵裂移植胚胎妊娠率 27% 的结果。表 5 显示进一步培养后只卵裂成 8 细胞阶段的胚胎移植后的妊娠率显著高于表 4 中的结果。

结果显示, 未卵裂的移植胚胎妊娠率与卵裂 1-3 次后培养成 8 细胞的移植胚胎妊娠率有非常显著的差异 ($p < 0.0001$)。2 次卵裂培养成 8 细胞的移植胚胎妊娠率 ($p < 0.001$) 及 3 次卵裂培养成 8 细胞的移植胚胎妊娠率 ($p < 0.003$) 与仅 1 次卵裂培养成 8 细胞的移植胚胎妊娠率之间也存在显著性差异。然而, 2 次卵裂培养成 8 细胞的移植胚胎妊娠率与 3

次卵裂培养成 8 细胞的移植胚胎妊娠率无显著性差异。

表 4. 不同移植胚胎卵裂次数间妊娠率的比较

胚胎卵裂数	移植数	妊娠数	妊娠率 (%)	P 值
0	294	21	7.1 ^a	
1	422	83	19.7 ^b	<0.0001 a, b
2	258	93	36.1 ^c	=0.0004 b, c
3	100	43	43.0 ^d	=0.0005 b, d

表 5. 仅移植 8 细胞胚胎妊娠率的比较

胚胎卵裂数 (仅 8 细胞)	移植数	妊娠数	妊娠率 (%)	P 值
0	294	21	7.1 ^a	
1	302	67	22.2 ^b	<0.0001 a, b
2	208	84	40.4 ^c	<0.001 b, c
3	82	38	46.3 ^d	<0.003 b, d

6. 结论

根据以上大量研究结果，我们得到以下结论：我们可以通过选择更好的胚胎来提高妊娠率从而达到与新鲜移植周期妊娠率相一致的水平。

7. 参考文献

- [1] Chen, C. (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1, 884-886.
- [2] Borini, A., Bonu M.A., Coticchio, G., Bianchi, V., Cattoli, M and Flamigni, C. (2004) Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertility and sterility*, 82, 601-605.
- [3] Borini, A., Sciajno, R., Bianchi, V., Sereni, E, Flamigni, C. and Coticchio, G., (2006) Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Human Reproduction*, 21, 512-517.
- [4] Barg, P.E., Barad, D.H. and Feichtinger, W. (1990). Ultrarapid freezing (URF) of mouse and human preembryos: a modified approach. *J. In vitro Fertil. Embryo Transfer* IVF 7, 355-357.
- [5] Van den Abbeel, E., Camus, M., Van Waesberghe, L., et al., (1997) A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Human Reproduction* Vol.12, pp- 1554-1560.
- [6] Senn, A., Vozzi, C., Chanson, A., et al. (2002) Prospective randomized study of two

- cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. Ferti. Steril. 74, 946-952.*
- [7] Al-Hasani, S., Ozmen, B., Koutlaki, N., et al (2007) Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reproductive BioMedicine Online 14, 288-293.*
- [8] Li, Y., Chen, Z.J., Yang, H.J., et al, (2007) Comparison of vitrification and slow freezing of human day 3 cleavage stage embryos: post vitrification development and pregnancy outcomes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 42, 753-755.*
- [9] Mauri, A.L., Petersen, C.G., Baruffi, R.L., et al., (2001) Comparison of the cryopreservation of human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection with a slow cooling or an ultrarapid cooling procedure. *J. Assist. Reprod. Genet. 18, 257-261.*
- [10] Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., Kato, O., (2005) Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online. Vol 11, pp-608-614.*
- [11] Van der Elst, J., Van den Abbeel, E., Vitrier, S., Camus, M., Devroey P. and Van Steirteghem, A.C. (1997) Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates. *Human Reproduction. Vol. 12, pp-1513-1521.*
- [12] Rama Raju, G.A., Haranth, G.B., Krishana, K.M., Jaya Prakash, G. and Madan, K. (2005) Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reproductive BioMedicine Online, Vol 11, 434-437.*
- [13] Tao, J., Tamis, R., Fink, K., (2001) Pregnancies achieved after transferring frozen morula/compact stage embryos. *Fertility and Sterility, 75, 629-631.*
- [14] Menezo, Y., (2004) Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 113, (Suppl. 1) S28-S32.*
- [15] Liebermann, J., and Tucker, M.J., (2006) Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertility and Sterility, 86, pp-20-26.*
- [16] Clifford, A.L., Jilbert, P.M., Gentry, W.L., et al., (2007) Better ongoing pregnancy rates from frozen embryo transfers when vitrified blastocysts are used. *Fertility and Sterility. 88 (Suppl. 1), S349-S350.*
- [17] Vincent, C. and Jhonson, J.H. (1992) Cooling cryoprotectants and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford Review in Reproductive Biology, 14, 73-100.*
- [18] Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A. (1995) Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction, 10, 3004-3011.*
- [19] Dobrinsky, J.R. (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology, 45, 17-26.*
- [20] Guiref, F., Bidault, R., Cadoret, V., Couet, M., Lansac, J and Royere D. (2002) Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. *Human Reproduction Vol.17,*

No.5 PP. 1321-1326.

- [21] Abdel Hafez, F.F., Desai, N., Abou-setta, A.M. Falcone T and Goldfarb J. (2010) Slowfreezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta analysis.
- [22] Rama Raju G A, Murali Krishna K, Prakash G J and Madan K. 2006. Vitrification: An emerging Technique for Cryopreservation in Assisted Reproduction Programmes. Embryo Talk Vol 1.4 : 210-227.
- [23] Rall W F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 24, 387-402.
- [24] Fahy G M. 1986. vitrification: a new approach to organ cryopreservation. In: Meryman HT (ed.), Transplantation: approaches to graft rejection, Alan R Liss, New york, PP:305-355.
- [25] Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. 1998, Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. Cryobiology. Aug; 37 (1):77-85.
- [26] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth P J, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Openpulled straw vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev. 51: 53-58.
- [27] Papis K, Shimizu M, Izaike Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology. Sep 15; 54(5):651-8.
- [28] Ying-hui, Y.E., Fan, J.I.N., Chen-ming, X.U., Lan-feng, X.I.N.G., (2002) Factors influencing the outcome of embryo freezing and thawing program. Journal of Zhejiang University Science V.3. pp-493-496
- [29] Karlstorm, P.O., Bergh, T., Forsberg, A.S. Sandkvist, U., Wikland, M. (1997) Prognostic factors for the success rate of embryo freezing. Human Reproduction. Vol 12, pp-1263-1266.
- [30] Singh, P.M., Vrotson, K., Balen, A.H., (2007) Frozen embryo replacement cycle: An analysis of factors influencing the outcome. J. Obstet Gynecol India. Vol 57, pp-240-244.
- [31] Zeibe, S., Bech, B., Petersen, K., et al., (1998) Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer. Human Reproduction. Vol 13, pp-178-181.

(孙晓慧译)

第十三章 性生活影响 IVF 的成功率吗?

Abbas Aflatoonian¹, Sedigheh Ghandi² and Nasim Tabibnejad¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Research and Clinical Center for Infertility

Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd² Department of Obstetrics and Gynecology Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar Iran

1. 引言

胚胎着床依赖于好的子宫环境。子宫容受性通过卵巢分泌的类固醇激素在细胞和分子水平上调节信号传导,同时细胞和细胞因子对免疫系统也有重要的作用^[1-2]。IVF患者中胚胎着床率和妊娠率低于正常生育人群。在IVF过程中性生活是不允许的,而人工受精是可以的。但是大量的证据证实,在胚胎移植时女性生殖系统暴露在精液/精浆中^[3],可以达到最大的妊娠率。本章节的目的是阐述在辅助生殖技术中为什么性生活对妊娠结局是有益的/有害的。

在生殖过程中,精浆被认为是性交后精子穿过女性宫颈、子宫的主要传播介质^[4-5]。但是在动物研究中表明,精浆传递给女性大量的信号分子,这些信号分子和女性生殖系统的上皮细胞相互作用。这种相互作用诱发局部细胞和分子的改变类似炎症反应^[6]。在老鼠和猪的实验研究中,精液激活了数个子宫上皮细胞的促炎细胞因子和趋化因子的表达^[7-9]。反过来,以上因素增强了精液趋化因子的作用,导致血管的改变,巨噬细胞、粒细胞和树突细胞的募集和激活。这些细胞积聚在子宫内膜组织的上皮细胞表层下,并且在上皮细胞和细胞腔隙间移动^[9-11]。这些浸润的白细胞会清除女性组织和可能授精精子周围的精子碎片^[12-13]。白细胞浸润可能会影响到女性对精子抗原的免疫反应,引起子宫内膜环境的变化,为受孕做准备^[3,6]。

在小鼠和猪,子宫内膜的上皮细胞是和精液相互作用的主要地方,主要的诱导产生GM-CSF、IL-6、趋化因子KC和MCP-1^[7-9]。通过切除雄性小鼠的输精管或精囊腺的实验表明,信号分子包含在从精囊射出的精浆中^[8]。细胞转化生长因子 β (Cytokines of the transforming growth factor- β , TGF- β)家族被认为是老鼠精浆中的主要活动因子^[14]。精液中的IGF- β 是在精囊腺中合成,性交时在女性生殖道内激活^[14]。

但是,精液如何激活炎症细胞因子,白细胞如何在女性生殖道内浸润尚不清楚。两个体内研究表明,在性交或者是人工授精后女性宫颈组织出现中性粒细胞胞吐作用,据报道引起白细胞反应的是精子而不是精浆^[15-16]。初步认为,信号活动和游离细胞、精浆成分有关。体外研究表明,人类女性生殖道细胞对精浆的反应是会增加IL-8和宫颈组织分泌白细胞蛋白质酶抑制剂(eukocyte protease inhibitor, SLPI)^[17]。研究表明,子宫内膜上皮细胞与精液共同培养后可以增加IL-1 β 、IL-6和白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)^[18]。由于精液可以诱导人类单核细胞U937细胞产生IL-10因子,因此精液可能直接作用于白细胞浸润^[17]。精液在女性生殖道内作用引起子宫内膜分子学和细胞学的改变可以促进胚胎发育和着床。

2. 临床研究

关于接受辅助生殖技术的患者进行性交优点的相关文献报道并不多。迄今为止,只有两个研究,研究了在ART周期中胚胎移植前后进行性交的妊娠结局^[19-20]。而有一些研究的重点在于用精液或者是精浆进行人工授精产生的不同结局^[21-23]。在一个多中心的随机对照研究

中,包括400个新鲜胚胎移植周期和200个解冻周期,根据患者意愿决定是否在胚胎移植前后进行性生活,有性生活组和无性生活组相比患者的妊娠率没有明显差别。但有性生活组移植胚胎的生存能力在6~8周明显强于无性生活组。作者的研究结果表明,在胚胎移植前后女性生殖道接触精液可能会增加早期胚胎着床和发育^[19]。在另一个研究中,390例接受辅助生殖技术的患者被随机分成两组,即有性生活组和无性生活组,结果表明性生活没有显著增加ART周期患者的妊娠率和着床率^[20]。两者的临床妊娠率差异没有统计学意义。在一个前瞻性试验中,Belinge^[21]的研究结果表明,在女性生殖道内有配偶精液患者的胚胎着床率比对照组高。但是,在随后的FisheI^[22]前瞻性研究中,对IVF的患者在取卵期间进行阴道内受精没有明显作用。以上两个研究都没有选用随机分组的病例对照研究。最后一个随机对照试验中,取卵期间患者阴道放入精液或盐水安慰剂^[23]。结果在168例患者中,阴道内有精液组的着床率相对阴道内无精液组增加45%,但差异没有统计学意义。在一个回顾性研究中,他们对进行输卵管内配子移植术后的患者进行子宫内和宫颈内授精,结果临床妊娠率提高^[24]。在一个随机、双盲对照研究中,他们对进行宫腔内人工授精患者,诱导排卵期间生殖道是否暴露在精液下进行研究,但性生活是受限制的。但性生活是受限制的,两组的临床妊娠率差异没有统计学意义。以上数据再和进行性生活组对比,结果差异也没有统计学意义^[25]。Coulam和Stern^[26]报道,和安慰剂相比,不孕或者复发性流产的患者接受阴道精浆胶囊后着床率更高,但是这个差别没有统计学意义。他们还报道,对于有关反复自然流产的患者利用精浆可以提高21%的活产率^[27]。因此绝大多数的证据表明女性生殖道通过性交或者是人工授精的方法暴露在精子/精浆下,是不影响妊娠结局的。

3. 讨论

理论上,性交通过以下机制来影响胚胎着床:

1、感染的产生

2、引起子宫收缩(性兴奋时)

3、性交过程中由于阴茎和宫颈接触产生的压力会驱逐胚胎,而且性交可能会引起卵巢破裂产生剧烈疼痛。

性交和妊娠后的子宫上行感染有关^[28],这种亚临床上生殖道感染和IVF胚胎移植后不良的妊娠结局有关^[29]。在IVF周期中,子宫腔对于性交引起的感染是敏感的,而宫颈黏液对于抑制上行感染具有屏障作用,但这种屏障作用被胚胎移植管所破坏。另一方面,Sharkey等^[30]研究精液诱导人类宫颈阴道上皮细胞炎症性的细胞因子和趋化因子产生的体外基因调控机制。实验研究表明,精浆能够引起生殖道上皮细胞炎症性的细胞因子和趋化因子表达,这说明外子宫颈是其主要的表达地点。精液对宫颈上皮细胞的炎症性的细胞因子的调节作用,可能和精子免疫抗原反应有关。这种炎症细胞因子能够抵抗性交后诱发的感染原。在性高潮过程中,性交会增加子宫肌层活动^[31],这种高频率自发的子宫肌层活动会干扰早期的胚胎着床而影响IVF的妊娠结局^[32-33]。值得肯定的一点是,性交有助于胚胎着床。精液可以诱导促炎症因子产生和细胞因子的趋化作用,因为人类性交后精液聚积在女性生殖道内引起炎症级联反应,这类似于小鼠^[6]和猪^[8]的交配过程。由于人类性交后白细胞的聚集、激活,可能增加了促炎症性因子和细胞趋化因子,使宫颈局部白细胞数提高,这就是所谓的女性性交后白细胞反应^[15-16]。关于上皮细胞的调控作用的观点一致认

为，上皮细胞因子控制局部树突细胞、巨噬细胞和粒细胞在上皮细胞的集聚和功能行为^[34]。由于不能检测精液对白细胞的作用，也不排除精液对这些细胞信号直接作用的可能性。在人类女性性交后激活宫颈管中大量的细胞因子合成，这些细胞因子抵抗病原菌侵入上生殖道并加强了上皮细胞表面的防御功能^[35]。

在子宫颈组织中产生的GM-CSF和IL-6会影响局部抗原呈递细胞的激活状态，抗原呈递细胞的编码表型影响细胞的抗原反应^[36-39]。这两种细胞因子优先在子宫颈外口表达，这与子宫颈组织是父系抗原在女性的首选作用位置有关。精液中的这两种因子和TGF β 、PGE₂共同作用发生特异性抗原免疫反应，使女性不会由于接触精液而出现不良反应。同样，精液取出并处理后再和母系抗原发生免疫反应，可以为随后的妊娠做准备，因为同一孕体会会有很多相同的父系抗原^[13,19]。体外实验中由于精液因素的作用可以诱导子宫内膜产生IL-6、LIF和IL-1P^[18,40-41]，这是胚胎植入时子宫内膜容受性的关键因素。精液调节整个女性生殖道免疫反应，促进子宫蠕动收缩达到像输卵管一样运输大分子材料^[42]。GM-CSF、IL-8和IL-6都能够在子宫内膜诱导产生，不需要检测。

4. 结论和建议

大量的随机对照研究表明，在胚胎移植前后性交可以增加IVF中的着床率和ART周期中的妊娠率，但是也有研究者认为性交不能明显增加妊娠率。然而性交提高妊娠率的机制并没有被完全认识到，他们认为精子/精浆可以诱导女性生殖道内发生免疫反应，而这种免疫反应可以促进胚胎发育和提高子宫内膜的容受性。不利的是，过度刺激的卵巢在性交的过程中容易发生破裂。因此，除非有严重的卵巢过度刺激症，我们建议鼓励患者胚胎移植前后进行性生活。

5. 参考文献

- [1] Rogers PAW, Murphy CR. Uterine receptivity for implantation: human studies. In: Yoshinaga K, editors. *Blastocyst implantation*. Norwell, MA: Serono Symposia Press. 1989; 231-280
- [2] Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Reprod Fertil*. 1974; 39(1): 195-206.
- [3] Robertson SA, Mau VJ, Hudson SA, et al. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:438-442.
- [4] Mann T. *The Biochemistry of Semen and the Male Reproductive Tract*. John Wiley and Sons, Inc., New York; 1964
- [5] Aumuller G, Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia* 1992; 24:183-196.
- [6] Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005; 322:43-52.
- [7] Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Uterine epithelial cells synthesize granulocytemacrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod* 1992; 46:1069-1079.
- [8] Robertson SA, Mau VJ, Tremellen KP, et al. Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *J Reprod Fertil* 1996; 107:265-277.

- [9] O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, et al. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* 2004; 128:237-247.
- [10] Phillips DM, Mahler S. Migration of leukocytes and phagocytosis in rabbit vagina. *J Cell Biol* 1975; 67:334a.
- [11] McMaster MT, Newton RC, Dey SK, et al. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J Immunol* 1992; 148:1699-1705.
- [12] Mattner PE. Phagocytosis of spermatozoa by leucocytes in bovine cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil* 1969; 20:133-134.
- [13] Roldan ER, Gomendio M, Vitullo AD. The evolution of eutherian spermatozoa underlying selective forces: female selection sperm competition. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1992; 67:551-593.
- [14] Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA. Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol Reprod* 1998; 58:1217-1225.
- [15] Pandya IJ, Cohen J. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertil Steril* 1985; 43:417-421.
- [16] Thompson LA, Barratt CL, Bolton AE, et al. The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:85-89.
- [17] Denison FC, Grant VE, Calder AA, et al. Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:220-226.
- [18] Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, et al. Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:785-791.
- [19] Tremellen KP, Valbuena D, Landeras J, Ballesteros A, Martinez J, Mendoza S, et al. The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. *Hum Reprod*.2000; 15(12):2653-2658.
- [20] Aflatoonian A.,Ghandi S.,Tabibnejad N. The effect of intercourse around Embryo Transfer on Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology Cycles. *IJFS* 2009; 2: 169-172
- [21] Bellinge BS, Copeland CM, Thomas TD, et al. The influence of patient insemination on the implantation rate in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1986; 46: 252 – 6.
- [22] Fishel S, Webster J, Jackson P, Faratian B. Evaluating of high vaginal insemination at oocyte recovery in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1989; 51:135- 138.
- [23] Von Wolff M, Rosner S, Thone C, et al. Intravaginal and intracervical application of seminal plasma in in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection treatment cycles – a double blind, placebo – controlled, randomized pilot study. *Fertil Steril* 2009; 91:167 – 72
- [24] Tucker MJ, Wong CJ, Chan YM, Leong MK, Leong CK. Post-operative artificial insemination –does it improve GIFT outcome? *Hum Reprod*. 1990; 5(2):189-192.
- [25] Qasim SM, Trias A, Karacan M, Sheldon R, Kemmann E. Does the absence or presence of seminal fluid matter in patients undergoing ovulation induction with intrauterine insemination? *Hum Reprod*. 1996; 11(5):1008-1010.

- [26] Coulam C.B and Stern, J.J. Effect of seminal plasma on implantation rates. *Early pregnancy: Biol. Med*, 1995; 1: 33 – 36.
- [27] Stern, J.J, Coulam, C.B, Wagenknecht, D.R, Peters AJ, et al. Seminal plasma treatment of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*, 1992; 27, 50.
- [28] Naeye RL. Coitus and associated amniotic-fluid infection. *N Engl J Med*.1979; 29; 301(22):1198-200.
- [29] Fanchin R, Harmas A, Benaoudia F. Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1998; 70(5):866-870.
- [30] Sharkey DJ, Macpherson Am, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod*. 2007 Jul; 13(7):491-501.
- [31] Fox CA, Wolff HS, Baker JA. Measurement of intra-vaginal and intra-uterine pressures during human coitus by radio-telemetry. *J Reprod Fertill*. 1970; 22(2)243-251.
- [32] Fanchin R, Righini C, Olivennes F. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998; 13(7):1968 – 1974
- [33] Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM, Olivennes F, de Ziegler D. Uterine contractions at the time of embryo transfer: a hindrance to implantation? *Contracept Fertil Sex*. 1998 jul – Aug; 26(7 – 8): 498 – 505
- [34] Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, et al. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991; 337:211-214
- [35] Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 2002; 57:61-79.
- [36] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179:1109-1118.
- [37] Burnham K, Robb L, Scott CL, et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the generation of epidermal Langerhans cells. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:1071-1076.
- [38] Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002; 39:531-536.
- [39] Thompson LA, Barratt CL, Bolton AE, et al. The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:85-89.
- [40] Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, et al. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73:136-142.
- [41] Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2007; 73:74-84.
- [42] Kunz G, Leyendecker G. Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization regulation function dysfunction. *Reprod Biomed Online* 2002; 4 Suppl 3:5-9.

(赵敏英译)

IntechOpen

IntechOpen

第五部分 胚胎种植与冷冻保存

第十四章 人胚着床

Russell A. Foulk, University of Nevada, School of Medicine, USA

1. 引言

种植是胚胎发育和成功妊娠的最终步骤。在过去三十年，人们对胚胎发育的理解已经取得了长足的进步。自体外受精技术问世以来，胚胎的体外研究也变得容易可行。实际上，此项研究极大地推动了胚胎干细胞诱导的进程。遗憾的是，对植入步骤的评估并不是一件容易的事情，因为大多数研究工具都不能进入子宫内，这就限制了我们对早期植入的理解。在很大程度上，植入的病理生理机制是不为所见的。这些过程在物种间存在异质性，这也限制了我們建立合适的动物模型来进行研究。在人类中，存在一个精确协调的时间表，在此期间可以发生宫内妊娠，我们称之为“种植窗”。然而，在很多情况下，胚胎即使是在最佳时机和最佳质量时移植，仍然未能成功种植。如果将一枚完美的胚胎移植到一个准备好的子宫内却未种植的话，这结果不论是对患者还是她的临床医生都是一种打击。本章将复习一下人类胚胎植入的机制并探讨导致其失败的一些原因。

2. 胚胎种植窗

人类胚胎大约在受精后4~5日进入子宫腔内。从输卵管或移植管中出来后，胚胎在子宫节律性收缩作用下在宫腔内来回移动，直到它完全附着在子宫内壁上。胚胎进入子宫腔后，滋养外胚层细胞便暴露于子宫上皮上，此后1~2日内胚胎从透明带内孵出。种植发生于受精后6~7日。在植入和胎盘形成过程中，人类胚胎必须在剪应力存在的条件下附着在子宫上。子宫内壁的相对面之间有大量的黏液，胚胎在此环境中不停地滚动。这种互动过程是一连串的复杂事件，我们可以将之分为三个独立的步骤：定位、黏附和侵入（Norwitz et al., 2001）。

2.1 定位

一旦人囊胚从透明带中孵出后，自由移动的球体细胞必须在其接近子宫内壁表面时将自己进行定位，并且在能够稳定的黏附和开始侵入之前形成初始的黏附（即定位）。定位是一个短暂的动态过程，借此胚胎将自己“拴”在子宫内壁表面。子宫收缩和宫腔内黏蛋白的分泌可以推动囊胚环绕在腔内。虽然流体动力学产生了剪应力，但是胚胎仍然可以靠近子宫壁并且在适合自己的附近滚动以便使覆盖在内细胞团上的滋养外胚层定位在子宫内壁表面上。在定位阶段，漂浮的囊胚和子宫内壁之间通过双向调节因子，例如细胞因子和炎症趋化因子，进行沟通，以引导囊胚形成三维“对接”结构。子宫内壁表面激素调节的胞饮突已经被证明可以标记最佳子宫内壁容受性出现的时间及其出现时的外观（Bentin-Ley et al., 2000）。

在定位阶段的种植窗时期，子宫内壁和囊胚均可以局部分泌炎症趋化因子，如IL-8、调解活化正常T细胞表达和分泌的趋化因子（RANTES）或单核细胞趋化蛋白1（MCP-1）。特

别是L-选择素系统,已被证明其在囊胚定位相是非常重要的(Genbacevet al.,2003)。选择素类是凝集素样糖蛋白,包括E-、L-和P-选择素,起初他们均被认为仅由成血管细胞的后代所表达。活化的内皮细胞上表达E-选择素,活化的血小板和内皮细胞表面表达P-选择素,淋巴细胞上表达L-选择素。最初对选择素系统感兴趣的原因是种植过程和白细胞通过血管壁的渗出过程有一些相似之处。就像一个滚动的囊胚一样,选择素黏附系统允许白细胞在侵入间质之前在内皮细胞表面被限制并来回滚动。白细胞通过特有的机制,包括L-选择素黏附系统,在剪应力作用下,从流动的血液中溢出进入内皮壁中。这些脉管系统特有的机制使细胞在剪切流的作用下可以发生黏附。糖结合蛋白(选择素)通过识别特定的寡糖结构作为他们的配体来介导白细胞和内皮细胞之间的相互作用。这些相互作用允许白细胞在内皮表面缓慢通过(Alon and Feigelson, 2002)。此后整合素激活,使白细胞在血管内皮细胞表面形成牢固黏附并随后迁移到组织内(Alon and Feigelson, 2002; McEver, 2002)。细胞表面的选择素将细胞固定在血管壁特定内膜细胞上的相应配体上,直到形成牢固的黏附(McEver, 2002)。这些凝集素样分子识别特定的寡糖结构,此结构由一些糖蛋白所携带,包括PSGL-1, CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1, 足糖萼蛋白和内糖。这些糖蛋白由至少30%的碳水化合物构成,并且在内皮上结合成黏蛋白寡糖配体。这些相互作用具有快速性和可逆性,例如游离的白细胞减速、束缚、释放和在内皮细胞表面滚动直到最终到达溢出部位。一旦白细胞停留,整合素激活便触发牢固的黏附(抗剪应力),最终白细胞从血管内皮渗出。

从形态学水平来讲,白细胞从脉管系统渗出和胚胎到达子宫壁之间存在相似之处,因为两种类型的黏附均发生在剪应流的作用下并且随后均有整合素的激活。Genbacev等(2003)已经证明L-选择素黏附系统在囊胚种植的初始阶段起到了决定性的作用。孵化的囊胚表达L-选择素,此分子通过其糖类配体,MECA-79和相关的抗原表位可以介导囊胚到达腔上皮表面。阐明L-选择素介导黏附的两种不同的体外模型被用来证实原位观察的正确性。第一个模型是在剪应力下将涂有合成的L-选择素糖类配体的植株覆盖在胎盘绒毛膜绒毛外植体上。结果证明L-选择素抗体阻断了植株结合到外植体的细胞滋养层细胞(CTBs)上。另外的免疫定位实验证实CTBs表达L-选择素。第二个模型是在剪应力下将离体的CTBs覆盖在子宫内膜组织切片上。结果表明CTBs能结合到黄体期获得的子宫内膜组织表面,而不能结合到卵泡期获得的子宫内膜表面。这种结合再一次被抗L-选择素抗体所阻断。与这些观察一致,子宫内膜的免疫定位研究也表明在种植窗期L-选择素糖类配体MECA-79从排卵当天开始发生一个正调节,到排卵后6日达到一个峰值。MECA-79在整个卵泡期均是阴性的,而且如果未排卵也仍然呈阴性。Carson等(2006)已经证明MUC-1似乎为L-选择素糖类配体充当了支架,其是一种跨膜糖蛋白并且表达于子宫上皮表面顶端。总之,这些研究表明,在整合素开始发挥关键性作用使之牢固黏附之前,人类胚胎通过一种机制介导其滚动和束缚到子宫内膜壁上,而且这种机制在白细胞中已经得到了很好的研究。

2.2 胚胎黏附

定位后不久,整合素依赖的黏附便开始了。受体介导这一过程使囊胚牢固地黏附在子宫壁上并使滋养层细胞穿过腔上皮细胞进行迁移,从而将胚胎埋在子宫壁下。整合素是一类细胞黏附分子,其作为异源二聚体 α 和 β 糖蛋白亚基存在于质膜上。滋养层细胞和子宫内

膜细胞表面受体在植入过程中发挥了多重功效。已经证明，滋养层整合素在滋养层吸附、迁移、分化和凋亡过程中介导细胞-细胞和细胞-基质间的相互作用。在子宫内膜表面，大部分的整合素扮演着管家的角色，但是有三种异二聚体的表达标记着种植窗的范围（Lessey, 2002）。在整个种植窗期间即从排卵到晚黄体期均有子宫内膜整合素 $\alpha 1\beta 1$ 的表达。 $\alpha 4\beta 1$ 在排卵后开始表达，并于周期的第24日窗口关闭时停止表达。子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 在周期的第19~20日，即种植窗开始时期，开始出现在子宫内膜上皮细胞的顶端，并于随后的1周快速减少。 $\alpha v\beta 3$ 的配体骨桥蛋白也与之同时被发现，此配体可能在子宫内膜或胚胎发信号、推动胚胎在侵入之前黏附于顶端时发挥了一定的作用。

据报道，种植窗期 $\alpha v\beta 3$ 的表达缺失出现在黄体功能不足和一些子宫内膜异位症、不明原因性不孕和输卵管积水的妇女中。正常整合素表达的丢失被认为可以导致种植失败。对整合素基因敲除的研究发现 $\beta 1$ 敲除的小鼠胚胎虽然可以正常发育到囊胚阶段但是会种植失败（Stephens et al., 1995）。定位阶段，在子宫内膜中，人类胚胎在蛋白水平上调节这些整合素（Simonet et al., 1997）。因此，在被束缚并穿过多糖-蛋白复合物屏障后，人类囊胚在旁分泌引导下形成良好的上皮细胞的整联蛋白模式使其黏附得更加牢固。

2.3 滋养层侵入

种植的最终阶段是侵入，其为血性绒毛膜胎盘的形成功创造了条件。这种侵入性暗示细胞有穿过解剖学屏障的能力。第一道屏障是子宫内膜上皮细胞，滋养层即黏附在此层上。紧贴着上皮细胞层的下边便是一种特有的基质即基底膜，即一层薄的连续的膜，主要由IV型胶原组成。基底膜一方面对表面上皮起固定作用，另一方面也起到了隔离血管壁、肌细胞和神经的作用。在基底膜的另一边是一种多变的基质即间质，包括其他的组织细胞、血管和淋巴管。因为囊胚太大而不能挤过上皮细胞层，黏附的滋养层便通过旁分泌活动在上皮细胞下面诱导细胞凋亡反应（Galan et al., 2000）。

为实现成功的侵入，于是滋养层在严密的调控下分化成锚定的细胞滋养层和高分泌性的合体滋养层，合体滋养层可以分泌一些蛋白酶降解细胞外基质。基质金属蛋白酶-9表达于滋养层的侵入潜能最大时。受精后第10日，囊胚已经完全在子宫内膜间质中着床，与此同时上皮细胞再生并覆盖种植部位。最后，细胞滋养层侵入到整个子宫内膜、子宫脉管系统并达到第三层子宫肌层。滋养层进入子宫血管后形成了由子宫胎盘血液循环构成的网状系统，使胎盘滋养层可以直接与母血接触。然后，胎盘开始在母亲和胎儿之间行使其转换器官的重要功能，进行营养素、气体和废物、激素和生长因子等等的交换。

不当的侵入可以引起无免疫力胎盘的形和妊娠并发症。然而如果侵入过度，胎盘便可以达到子宫肌层（accreta，植入），进入子宫肌层（incretta，部分植入），完全穿过子宫肌层（percreta，完全植入）。这些均与出血、手术分娩和子宫切除的高风险性有关。如果侵入太浅的话，可以引起宫内生长受限和/或先兆子痫（Zhou et al., 1997）。

3. 最佳胚胎植入

现已证实，对患有不育症的夫妇来说，辅助生殖技术在克服多数障碍方面是最有效的。体外受精（IVF）可以通过克服某些障碍来发挥其功效，比如精子计数低或输卵管功能障碍，并在最佳时机选择最具活力的胚胎放入子宫腔内。限制IVF成功的因素通常可以被分成胚胎的健康与子宫内膜的健康，或从本质上说是种子的评估与土壤的评估。

3.1 胚胎（种子）

在过去十年里，人们对胚胎能力的研究，或在评估什么使胚胎有如此高的植入潜能并创造婴儿方面，取得了巨大的进步。历史上，最常见的评估方法是观察最佳培养条件下的胚胎发育形态。虽然这已经逐步提高了挑选最具生育潜能胚胎的能力，提高了妊娠率同时降低了多胎妊娠率，但是绝大多数胚胎却种植失败。这些失败和挫折促使在工具和方法上进一步发展以更好地评估胚胎。代谢产物学和蛋白组学的研究领域是胚胎培养条件，以寻找改善胚胎健康的可溶性标记物。遗憾的是，形态和/或培养条件的评估是不够的，因为大多数不健康的胚胎是由非整倍体造成的。基因组学是很有前景的，因为染色体异常本质上就代表了无生育力（Hassold, 2007）。已经证明，临床上随着女性年龄增加，生殖力逐渐减低，流产率逐渐增加并且非整倍体出生率也越来越高。实际上，在临床实践中卵母细胞的年龄是影响辅助生殖结果的一个最重要的变量。

植入前遗传学诊断（PGD）或评估也应运而生，以确定胚胎移植前的染色体构成。最初，人们用荧光原位杂交（FISH）技术对第3日胚胎的极体和卵裂球进行活检，以评估所选一定数目的染色体。因为FISH存在局限性，全面PGD的评估已超出了本章的范围，但是简要地说，目前分析和活检技术已经发展成为全面染色体筛选平台（Schoolcraft et al., 2011）。某些技术改进极大地改善了正确判断单个囊胚生育潜能的能力。联合使用滋养外胚层活检技术、玻璃化冷冻技术和对23个染色体单核苷酸多态性（SNP）评估为基础的芯片筛选技术，人们得到了可喜的数据，植入率显著提高达到了60%以上，流产率也得到了明显降低。这表明，选择最具生育力的种子可以改善种植率。然而，我们应该清醒地认识到，种植率高达60%意味着仍然有40%具有正常染色体组的最佳胚胎会种植失败。因此，种子的健康不是唯一的因素。毫无疑问，进一步的答案将来自于子宫内膜。

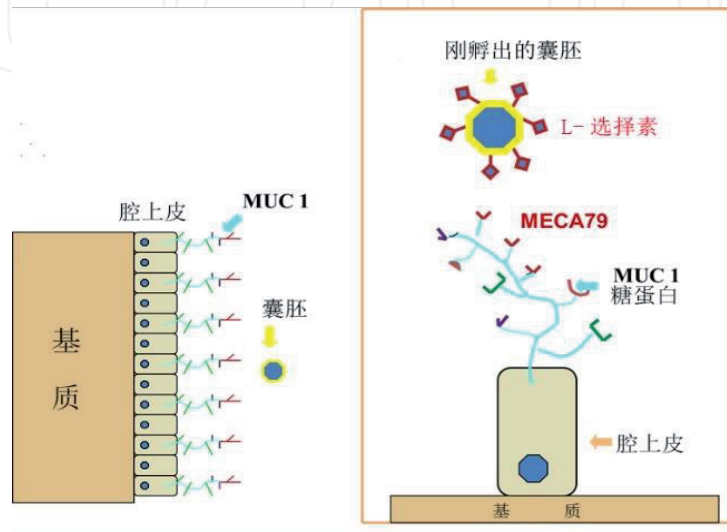
3.2 子宫内膜（土壤）

植入前子宫内膜在大量的激素作用下生成了具有植入能力的上皮细胞。可受性子宫内膜的形成依赖于雌激素诱导的快速组织增殖与紧随其后的孕激素诱导的分泌模式。这些甾体激素的重要性不能被低估，因为没有它们就不会妊娠。它们的作用是适当地组织子宫内膜或“土壤”以使局部的细胞因子和炎症趋化因子在植入过程中能够参与进来。如果土壤因不当的激素信号而没有准备好的话，接下来的事情就不太可能会发生。在最佳的预处理作用下，子宫内膜的容受性会变得最强。在月经周期的第20~24日，或排卵后6~10日，子宫内膜变得很易植入，此时间跨度被称为“种植窗”。在此窗之外，子宫内膜是不易植入的，就好像存在抗性因子在抵抗植入似的。事实上，胚胎更易种植在输卵管里或腹膜上，其次才是种植在接受能力差的子宫内膜上。接受性的获得是一个调节的过程。引起不育的某些疾病要么是缺乏接受分子要么是存在阻止植入的抵抗分子。曾有人提出，MUC1基因可能是以抗黏附分子的形式出现在小鼠胚胎附着过程中的（Surveyor et al., 1995）。有一种理论是，MUC1就像是圣诞树上光秃秃的树杈，在用饰品装饰之前此圣诞树都是有抵抗性的，这些饰品充当了胚胎受体的配体（如图14-1）。因为MUC1是L-选择素配体的支架，所以如果此糖蛋白复合体被破坏便可导致植入失败。

与种子的活跃功能相比，土壤处于相对被动的位置，与此不同，子宫内膜必须变得有接受力并且允许异种细胞的侵入。创造这种接受力的关键环节是子宫内膜和附着囊胚之间

的“对话”。子宫内膜准备它的“着陆地带”，与此同时孵化的囊胚在宫腔内移动时准备它的“停靠触须”。当彼此接近时，子宫内膜便通过旁分泌双向沟通作用积极地参与到植入过程中。我们使用上面的比喻来进行说明，接近内膜的囊胚指导树杈（即子宫内膜）用合适的饰品或配体装饰自己，以便表达于暴露的滋养外胚层上的L-选择素能够结合到上边。人们可以推测，反复种植失败的不育患者其子宫内膜在种植窗期间要么是缺乏配体要么是配体减少。

图14-1. 孵出的囊胚最初附着在子宫腔上皮细胞上的模式图



4. 关于植入失败的研究

考虑到诸多不育和早期流产的原因，我们推测，选择素黏附系统缺陷可以用来解释部分不明原因的生殖失败。实际上，尽管为接受体外受精的妇女移植质量最好的胚胎，仍有一群患者会反复种植失败。我们的研究目的是评估子宫内膜上的L-选择素配体MECA-79的缺失是不是更多地出现在反复种植失败（RIF）的患者身上，并评价子宫内膜L-选择素配体的缺失是否与种植失败有关。

4.1 研究设计

我们比较了子宫内膜L-选择素配体在能生育人群组和有反复种植失败史患者组的表达情况。我们在促排卵周期的黄体中期（如种植窗期）对受试者进行子宫内膜活检。种植失败的患者通过进一步的治疗继续尝试妊娠。我们用MECA-79抗体免疫染色法识别L-选择素配体，并根据是否存在此配体对每一位患者的结果进行跟踪、制表。

4.2 选择患者

对照组是证明有生育力的年轻健康女性，她们充当匿名捐卵者。我们在内达华生殖中心招募了20例RIF患者。这项研究获得了著名的医疗中心伦理审查委员会的人权研究委员会的批准。如果他们至少两次是因为种植失败而导致体外受精失败的话，便被招募进入试验组。如果将最高质的胚胎移植到正常的子宫腔但未植入的话便可诊断为种植失败。根据Veek标准对胚胎形态进行评分（Veek, 1999），仅移植6~8-细胞且为1和2级的胚胎的患者被纳入其中。周期前用宫腔声学造影评估子宫腔，周期中用经阴道超声评估内膜的厚度和外观。仅有内膜厚度大于7 mm且有三线征的患者被纳入其中。

4.3 子宫内膜活检

所有患者的知情同意书均使用著名医疗中心人类研究委员会批准的IRB协议。通过控制性促排卵周期或监测自然周期来确认月经周期所处的阶段。促排方案包括14 d的雌激素（estrace, 2mg, 口服, 2次/d），紧接着为微粒化的孕酮（prometrium, 200 mg, 口服, 2次/d）加雌激素（estrace, 2mg, 口服, 1次/d）。自然周期的排卵用晚期卵泡超声和LH检测来证实。在孕酮第6日或LH峰后第7日对子宫内膜进行活检，将Unimar针推到子宫底部，产生负压并以螺旋方式退出探针。组织立即在3%多聚甲醛中固定24h。将之在PBS中冲洗3次，浸润在5%~15%蔗糖溶液中，然后浸在最佳切割温度（OCT）复合物中并在液氮中快速冷冻。用冷冻切片机（莱卡微系统，Bannockvurn, IL）将组织切片（5 μ m），进行免疫组化定位。

4.4 子宫内膜定期

子宫内膜活检的形态由经验丰富的组织学家根据Noyes定期规范进行评分（Noyes, 1950）。组织学家对患者的病史一无所知，包括子宫内膜活检的时期。

4.5 免疫组化

识别L-选择素配体MECA-79的鼠单克隆抗体为加利福尼亚州圣约瑟的BD生物公司所生产。MECA-79抗体识别高亲和力的L-选择素配体的糖类抗原表位，此抗原表位包含S03 \rightarrow 6GlcNAc（N-乙酰葡萄糖胺）（Yeh, 2001）。添加一抗，浓度为5 μ g/ μ L。标本在4 $^{\circ}$ C孵育过夜后，用PBS冲洗3次，与山羊FITC标记的抗鼠IgM（Jackson ImmunoResearch 实验室）共同孵育。用不相关的鼠IgM抗体（抗-KLH, eBioscience）或PBS替代一抗作对照。染色结果用Zeiss Axiophot荧光显微镜评价。

4.6 结果

首先，我们检测了对照组20例健康女性子宫内膜活检组织的MECA-79表达情况，这些女性都已被证明是有生育力的。所有活检标本均有黄体中期子宫内膜的形态特征。MECA-79抗体免疫染色显示对照组所有样本均存在L-选择素配体，阳性表达于腔上皮和腺上皮表面。

有趣的是，一位起初MECA-79染色阴性的对照组患者在自然周期中是不同步的。后来我们发现她没有排卵。她被放到控制性促排周期组后，黄体中期的染色便显示阳性。RIF患者组的差异是很大的。20例标本中有15例MECA-79免疫染色阳性（即为检测活检组织的75%，如图14-2）。在15例阳性标本中，4例显色浅或不均匀，11例显色正常。MECA-79阴性的5例标本均与严重的子宫异常有关，包括先天异常（如单角子宫）、Asherman's综合征、子宫腺肌病和多发性子宫肌瘤切除术。对这些患者实施平均5次的胚胎移植后均未使她们怀孕（见表14-1）。在15例MECA-79阳性的患者中，10例怀孕，5例在活检后又经历平均1次移植后放弃了治疗。

继续治疗的大多数患者再经历平均2次的移植之后成功妊娠（见表14-2）。那些配体阳性但是未受孕的患者停止治疗的时间要早于那些成功妊娠患者平均1.5个周期（2.8个周期 vs. 4.3个周期）。迄今为止无妊娠并发症。

这项试验性研究的结果有重大的意义。第一，患者黄体中期子宫内膜活检组织缺乏L-选择素配体MECA-79，便预示其受孕机会极低或没有。其预测值为100%，敏感度为50%，特异度为100%。（见表14-3）。毋庸置疑，如果放弃治疗的患者坚持下来并怀孕的话，此

图14-2. 患者L-选择素配体MECA-79免疫染色情况

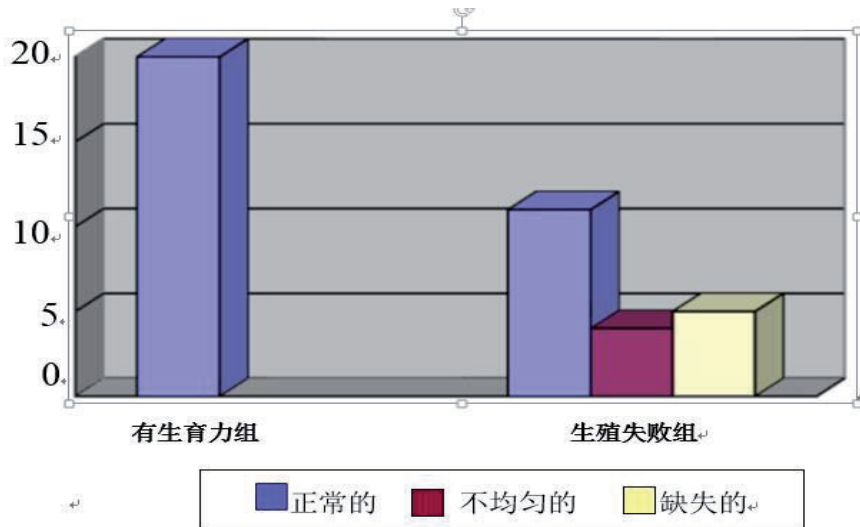


表14-1. 反复种植失败患者的信息摘要

L-选择素配体 (N)	年龄 (SD)	子宫史	IVF史 (周期数)	种植率 (妊娠数/胚胎数)
		单角 (2)		
缺失的 (5)	39.0 (1.67)	Asherman's 综合征 子宫腺肌病 多发性子宫肌瘤切除术	25/5 (5)	0/72
不均匀的 (4)	34.7 (4.43)	正常 (1) 水电输卵管切除术 (2) 产后刮宫术	17/4 (4.25)	3/47 (15.7%)
正常的 (11)	40.1 (6.73)	正常 (6) 子宫肌瘤切除术 (2) 腔壁肌瘤 (2) 子宫中隔成形术	40/11 (3.6)	11/76 (14.5%)

敏感度将得到改善。第二，MECA-79阳性的患者，如果已经错失了两个好的预后周期的话，他在随后的每个周期中都会有32%的机会怀孕。第三，在8个有正常子宫且MECA-79免疫染色阳性的患者中，妊娠的可能性要累积高于85%，或每周期高于53.8% (7/13)。然而那些怀孕了的整体种植率也仅有12%，这比治疗中心的所有患者的三分之一种植率还要少。不管L-选择素配体存在与否，显然这些患者代表了低生育能力组。

表14-2. L-选择素配体和RIF患者结局

患者	L-选择素配体	种植	正常子宫	种植率	平均周期数
5	缺失	全无	0/5	0/72胚胎	5
10	存在	10	7/10	14/116 (12.1%) ---子宫内膜活检后 14/57 (25%)	4.3
5	存在	全无	1/5	0/37	2.8

表14-3. L-选择素配体缺失对随后的妊娠失败的预测值

(至少两个失败周期后进行筛选试验)

L-选择素配体	未妊娠	妊娠	阳性预测值	阴性预测值	#随后的周期数	每周期妊娠率(%)
缺失	5	0	100%		15	0/15
存在	5	30		86%	31	10/31 (32.2)

7 讨论

子宫内膜的顶端表面包含触发分子间相互作用来捕获人类囊胚的关键元素。子宫内膜在月经周期中经激素预处理，形成一段接受胚胎成功植入的最佳时期。“种植窗”发生在第20~24日期间。在此窗口以外，子宫内膜对胚胎的吸附都是有抵抗性的(Navot, 1991)。Lai等描述了L-选择素配体在整个自然月经周期(Lai, 2005)和控制性促排周期都是有表达的(Lai, 2006)。且其表达从排卵期开始增多直到分泌中期。L-选择素配体免疫染色峰值出现在腔上皮表面的早分泌期到中分泌期之间的时期，这与种植窗的时间一致。Vlahos等发现，在控制性促排卵后，黄体期补充孕酮可以提高L-选择素配体的表达(Vlahos, 2006)。Khan等的初步工作发现N-乙酰葡萄糖胺-6-O-磺基转移酶(GlcNAc-6-OST)受雌孕激素的调节，此酶基因负责高亲和性L-选择素配体表位的生成。雌激素上调此基因，同时孕激素放大此效应。然而单独的孕激素会抑制GlcNAc-6-OST的表达，这可能是子宫内膜无接受性的原因。

在我们的研究组中，缺乏配体的患者都有子宫缺陷的高危史。医源性的原因包括刮宫术和子宫肌瘤剔除术，同时类似于先天性异常的自然状态也可以引起子宫内膜缺陷。显然，并不是所有有这样病史的患者都不能怀孕，但是在高危人群尝试怀孕之前L-选择素配体MECA-79也许可以作为一种反映损伤或异常程度的标记物。

也许还有其他疾病状态可以影响L-选择素配体的表达。Lessey等描述了子宫内膜异位症女性的子宫内膜表达异常的整合蛋白(Lessey, 1994)。同样地，Kao等发现GlcNAc-6-OST基因在子宫内膜异位症患者中表达下调(Kao, 2003)。Mak等发现雄激素抑制GlcNAc-6-OST基因的表达，这可能是引起多囊卵巢综合征患者生殖结局更差的原因之一(Mak, 2005)。

Shamonki 等将L-选择素配体的表达与随后供卵周期的妊娠率进行了相关性分析 (Shamonki, 2006)。他们描述了从接受供卵且随后怀孕的患者模拟周期中获得的子宫内膜表面上皮顶端有更高的L-选择素配体免疫组化反应, 而未怀孕者的免疫组化反应较低。他们将染色强度和妊娠率进行了关联分析, 而不是我们已经做过的存在或缺失。此项研究进一步支持了我们的结果, 证明了不仅L-选择素的存在在种植中扮演了重要角色, 其程度也起到了重要作用。

我们证明, 如果有多次种植失败周期的患者缺乏L-选择素配体的话, 其在进一步的种植尝试中会继续失败。而这些有失败史但是L-选择素配体检测阳性的患者会在随后的种植试验中有非常好的预后, 尽管仍然存在低生育力的不明诱因。

5. 总结

人类胚胎的种植是子宫内膜和移动囊胚之间的一种复杂的相互作用。在具备一个准备接受囊胚的表面上皮和一个形态改变的滋养外胚层的条件下, 胚胎种植会发生在一个相对短的时间段内。机械地讲, 囊胚的运动必须被限制以便进行黏附并且随之侵入。人们越来越相信, L-选择素黏附系统在调节最初的胚胎定位方面发挥了主要作用。摆脱束缚后, 囊胚可以进行附着并且牢牢地吸附, 尽管子宫腔内存在剪应力。一旦锚定, 一系列事件便展开, 这可以让胚胎钻进子宫内膜壁中并生成血性绒毛膜胎盘。

囊胚或子宫内膜功能障碍均可以限制植入的效能。关于胚胎生殖能力的许多研究已经表明, 改善胚胎的选择可以大大提高种植率。然而对子宫内膜的研究更具挑战性, 我们正在揭示一些领域, 比如可接受性子宫内膜的适当准备和测定可以改善结局。已证明, 在种植过程的每个阶段, 特定的疾病状态均可以破坏种植时所需的精细对话。关于定位阶段, L-选择素配体可以作为种植效能的标记物。临床上, 对高危人群来说, 我们可以对其进行活检, 如果配体缺失的话, 我们可能可以避免许多徒劳的昂贵治疗。这可以为患者提供为什么不能怀孕的重要信息和开放性选项, 如通过代孕来帮助她成为一个母亲。除定位外, 许多疾病状态所引起的缺陷都可以破坏整合素的表达, 比如子宫内膜异位症和输卵管积水。对这些缺陷的处理有效地改善了结局。最后, 细胞滋养层侵入到适当的子宫深度是确定妊娠结局的关键。过度入侵导致胎盘植入, 侵入不足参与子痫前期的病理生理过程, 而子痫前期是工业化国家中导致产妇死亡的首要原因。

正常的植入是成功受孕的关键。对不育夫妇和他们的主治医生来说, 更好地了解植入过程将有助于更好地诊断和治疗, 并针对引起他们不能拥有一个健康孩子的原因进行治疗。总之, 我们可以通过选择最健康的胚胎, 并建立最容易接受的子宫内膜来提高植入的效能。未来对子宫内膜容受性标记物的研究将有助于临床医生定义移植最好胚胎的最佳环境, 由此提高妊娠率, 减少并发症, 如多胎妊娠、流产, 并最终定义危及胎儿宫内健康发育的环境。

6. 参考文献

- Alon R., Feigelson S. (2002). *From Rolling to Arrest on Blood Vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. Semin Immunol*, Vol. 14, pp 93-104
- Bentin-Ley U., Sjogren A., Nilsson L., Hamberger L., Larsen J.F., Horn T. (2000). *Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation. Hum Reprod Suppl.*, Vol. 6, pp. 67-73
- Carson D.D., Julian J., Lessey B., Prakobphol A., Fisher S. (2006). *MUC1 is a Scaffold for Selectin Ligands in*

- the Human Uterus. Frontiers in Bioscience* , Vol. 11 , pp. 2903-2909
- Galan A.,Herrer R.,Remohi J.,Pellicer A.,Simon C. (2000). Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation. *Hum Reprod.*,Vol. 15(suppl. 6) , pp. 74-80
- Genbacev O.,Prakobphol A.,Fouk R.,Krtolica A.,Ilic D.,Singer M.,Yang Z.Q.,Kiessling L.,Rosen S.,Fisher S. (2003). Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface. *Science* , Vol.299 , pp. 405-408
- Hassold T.,Hall H.,Hunt P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been , where we are going. *Hum Mol Genet* , Vol. 16 , pp. R203-208
- Kao L.C.,Germeyer A.,Tulac S. (2003). Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* , Vol. 144 , pp. 2870-2881
- Khan S.,Pisarska D.,Kao L.C. (2005). Hormonal Regulation of N-acetylglucosamine-6-O- sulfotransferase (GlcNAc-6-OST) , Expression in a Human Endometrial Cell Model. Abs presented at conjoint meeting ASRM/CFAS Sept.2005 , Vol. 85:suppl 1:S434
- Lai T.H.,Shih I.M.,Vlahos N.,Ho C.L.,Wallach E.,Zhao Y. (2005). Differential Expression of L-selectin ligand in the Endometrium During the Menstrual Cycle. *Fertil Steril* , Vol. 83 , pp. 1297-1302
- Lai T.H.,Zhao Y.,Shih I.M.,Ho C.L.,Bankowski B.,Vlahos N. (2006). Expression of L- selectin ligands in human endometrium during the implantation window after controlled ovarian stimulation for oocyte donation. *Fertil Steril* Vol. 85(3) , pp. 761763
- Lessey B.,Castlebaum A.,Sawin S. (1994). Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* , Vol. 79 , pp. 643-649.
- Lessey B.A. (2002). Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* Vol. 55 , pp. 101112
- Mak W.,Khan S.,Pisarska D. (2005). Androgen Suppression of a target human implantation gene N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase (GlcNAc-6-OST) in a human endometrial cell model. Abs presented at conjoint meeting ASRM/CFAS Sept.2005 , Vol 85:suppl 1:S10
- McEver R.P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* , Vol. 14 , pp. 581
- Navot D.,Scott R.T.,Droesch K. (1991). The Window of Embryo Transfer and the Efficiency of Human Conception in vitro. *Fertil Steril* , Vol. 55 , pp.114-118
- Norwitz E.,Schust D.,Fisher S. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy.*NEJM* , Vol. 342 , 19 , pp 1400-1408
- Noyes W.,Hertig A.I.,Rock J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* Vol. 1 , pp. 325.
- Prakobphol A.,Thomsson K.,Hansson G.,Rosen S.,Singer M.,Phillips N.,Medzihradzky K.,Burlingame A.,Leffler H.,Fisher S. (1998). Human low-molecular-weight salivary mucin expresses the sialyl lewis - X determinant and has L-selectin ligand activity. *Biochemistry* Vol. 37 , pp. 4916-4927
- Prakobphol A.,Boren T.,Ma W.,Zhixiang P.,Fisher S. (2005). Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* Vol. 44 , pp. 2216-2224
- Rosen S. (2004). Ligands for L-selectin: homing , inflammation , and beyond. *Annul. Rev. Immunol.* Vol. 22 , pp. 129-156
- Schoolcraft W.,Treff N.,Stevens J.,Ferry K.,Katz-Jaffe M.,Scott R. (2011). Live birth outcome with trophectoderm biopsy , blastocyst vitrification , and single-nucleotide polymorphism micro-array-based comprehensive chromosomal screening in infertile patients. *Fertil Steril* , Vol.96(3) , pp. 638-642
- Shamonki M.I.,Kligman I.,Shamonki J.M. (2006). Immunohistochemical expression of endometrial L-selectin ligand is higher in donor egg recipients with embryonic implantation. *Fertil Steril* Vol.86(5) , pp. 1365-1375
- Simon C.,Gimeno M.J.,Mercader A.,O'Connor J.E.,Remohi J.,Polan M.L.,Pellicer A. (1997). Embryonic regulation of integrins beta 3 , alpha 4 , and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* , Vol. 82 , pp. 2607-2616
- Stephens L.E.,Sutherland A.E.,Klimanskaya I.V.,Andrieux A.,Meneses J.,Pedersen R.A.,Damsky C.H. (1995). Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* , Vol. 9 , pp. 1883-1895
- Surveyor G.A.,Gendler S.,Pemberton L.,Das S.,Chakraborty I.,Pimental R. (1995).Expression and steroid

hormonal control of muc-1 in the mouse uterus. Endocrinology , Vol. 136 , pp. 3639-3647

Veeck L.L. (1999). An atlas of human gametes and conceptuses. New York , Parthenon , pp. 46-51

N.F.,Lipari C.W.,Bankowski B. (2006). Effect of luteal-phase support on endometrial L-selectin ligand expression after recombinant follicle-stimulating hormone and ganirelix acetate for in Vitro Fertilization.

Clin Endocrine Met , Vol. 91(10) , pp. 4043-4049

Yeh , J.C.,Hiraoka N. (2001). Novel Sulfated Lymphocyte Homing Receptors and Their Control by a Core1

Extension Beta 1 , 3-N , acetylglucosaminyltransferase. Cell Vol.105 , pp. 957-969

Zhou Y.,Damsky C.,Fisher S. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? J Clin

Invest. Vol.99 , pp. 2152-2164

(刘盼译)

IntechOpen

IntechOpen

IntechOpen

第十五章 与子宫内膜容受性和种植相关的生物标记物

Mark P. Trollice¹, George Amyradakis²

¹Associate Professor, Department of Obstetrics & Gynecology,

University of Central Florida School of Medicine, Orlando, FL

Director, Fertility Center of Assisted Reproduction & Endocrinology, Winter Park, FL

²Resident Physician, Winnie Palmer Hospital for Women & Babies, Orlando, FL USA

1. 引言

植入是一种胚胎和有接受性的子宫内膜之间微妙作用的过程。这种复杂的相互作用需要胚胎和母体组织之间和谐地对话 (Aghajanova et al., 2008; Simon et al., 2000)。植入的三个步骤是：定位、黏附和侵入。定位是指滋养层细胞附着在可接受性子宫内膜壁上。胚胎在基底膜和间质细胞外基质中的黏附发生在特定激素、细胞因子和黏附分子存在的情况下。囊胚一旦锚定在子宫内膜壁上后，它便被合体滋养层外层和细胞滋养层内层包被。随着合体滋养层侵蚀子宫内膜，囊胚便钻进去并且开始植入 (Ganong, 2005)。在过去几年里，人们研究的目标是提高胚胎质量以及了解子宫内膜壁高度动态的组织结构。虽然形态学标准和染色体规范提高了移植胚胎的质量，但是种植率仍然保持在25%~35% (Boomsma & Macklon, 2006)。

近几十年来，子宫内膜进入最佳种植窗阶段的启动一直倍受关注。人们做了大量的工作以了解子宫内膜壁创造与囊胚相互作用的良好环境的准备能力。虽然胚胎因素引起1/3的种植失败，但是大约2/3的种植失败与子宫容受性的缺失有关 (Achache, 2006; Ledee-Bataille et al., 2002)。多种细胞因子、激素、免疫球蛋白及其他因子都在内膜为种植做充分准备时发挥了作用。早在1950年，Noyes, Hertig和Rock就对容受性子宫内膜的形态学改变进行了描述，这种改变是在性类固醇激素雌激素和孕激素控制下发生的，雌激素是增殖期的决定性激素，孕激素是分泌期的决定性因素。

在黄体种植期，相当于周期的第20~24日，或者排卵后7~9日，子宫内膜对邻近的囊胚是有容受性的 (Goiran & Mignot, 1999)。此时，可以检测到蛋白、细胞因子和肽类的基本表达，它们可以作为最佳的子宫内膜容受性的生物标记 (Singh & Aplin, 2009; Lessey et al., 2002)。对种植阶段生物标记物的检测和探索是具有极大吸引力的研究领域，在不久的将来，其将有助于建立一种未来的治疗模式以使辅助生殖技术 (ART) 的作用发挥到最大化。据Zhu的研究所述，生物标记是种植阶段存在于子宫内膜，接近于种植位点并且随后消失的物质 (Cavagna & Mantese, 2003)。本章将要讨论生物标记物及其在种植阶段吸附和侵入过程中所发挥的作用。

2. 生物标记物

人白细胞抗原G (HLA-G)

人白细胞抗原G (HLA-G) 是一种主要组织相容性复合体 (MHC) Ib类基因，人们认为其

在种植时发挥了必不可少的作用，其可以通过调节细胞因子分泌保持局部的免疫耐受性，并且通过调节细胞因子的分泌控制滋养细胞的侵入（Roussev & Coulam, 2007）。起初，HLA-G被作为一种保护剂而提出，其可以抑制自然杀伤（NK）细胞介导的靶细胞的溶解，并且阻止母源性细胞毒性淋巴细胞的同种识别。最近大量研究已经表明，这些蛋白可以调控免疫细胞，包括T细胞、NK细胞和抗原提呈细胞（Fournel, 2000）。其在植入过程中的重要作用，人们最近一直关注HLA-G及其在诊断和治疗方面的临床应用。包括评价复发性流产夫妇与HLA-G基因变异的关系。孕期血清可溶性HLA-G（sHLA-G）水平可能会成为未来评估成功种植的诊断指标，但此方法至今尚未建立（Roussev & Coulam, 2007）。

胞饮突

已证实，胞饮突是一种细胞器，在种植阶段出现在子宫内膜壁上。胞饮突可以被电子显微镜检测到，并且是子宫容受性的特异性标记物。孕激素依赖性的胞饮突出现在黄体周期的第20~21日（Cavagna & Mantese, 2003）。胞饮突的功能还没有被完全阐述，但是胞饮突被认为在保护囊胚免受子宫内膜纤毛扫动、加速宫腔积液抽离和促进胞饮突和囊胚分子黏附方面发挥了重要的作用。发育完全的胞饮突的寿命不超过48 h，提示其是一种短暂的细胞状态。在枸橼酸克罗米芬和人绒毛膜促性腺素（hCG）的促排卵周期，胞饮突在17日或18日形成，要稍早于自然周期（Cavagna & Mantese, 2003）。促排卵和早期胞饮突形成可能是使容受窗改变导致子宫内膜和囊胚不同步并最终对IVF的种植率产生负面影响的重要因素之一。

整合素

整合素是跨膜糖蛋白家族，是由两种不同的、非共价键链接的 α 和 β 亚基相互作用构成的（Achache & Revel, 2006）。整合素是黏附分子，参与细胞黏附，并且在细胞与细胞外成分之间的黏附中起到了一定的作用（Ceydell, 2006）。另外，整合素参与了很多重要的生理过程，包括胚胎发育、止血、血栓形成、伤口愈合、免疫和非免疫防御机制及癌性转化。特别指出的是，人们用免疫组化的方法发现 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白就像其配体骨桥蛋白一样在子宫内膜腔上皮细胞表面有阳性表达，而子宫内膜腔上皮表面是首先与滋养层细胞相互作用的部位（Achache & Revel, 2006; Apparao et al., 2001）。子宫内膜间质中整合素的表达受多种因子的调节，已证明IL- α 、IL- β 和TNF- α 可以刺激子宫内膜间质中 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的表达（Ceydell, 2006）。整合素被认为是子宫内膜容受性的标记，尤其是 $\alpha v \beta 3$ 糖蛋白，它与种植有直接的关系。

L-选择素

选择素是蛋白类凝集素，包括E-、L-和P-选择素，它们起初被认为仅由成血管细胞后代表达。P-选择素表达于血小板表面，E-选择素表达于活化的内皮细胞上，L-选择素表达于淋巴细胞上。携带寡糖结构的糖蛋白类，包括CD34、糖基化依赖性细胞黏附分子1（GlyCAM-1）、P型选凝素糖蛋白配体1（PSGL-1）、足糖萼蛋白和四聚糖，可以被选择素分子所识别（Foulek et al., 2007）。选择素与内皮表面的限定和滚动机制有关。一旦白细

胞速度减慢并最终停留，整联蛋白的活化便触发其黏附并使之通过血管内皮渗出 (Torry et al., 2007)。最近, Genbacec 等 (Genbacev et al., 2003)。已经证明孵化的囊胚表达L-选择素, 并且通过此分子与其糖类配体--- MECA-79和相关表位的结合吸附于腔上皮表面上。Foulk 和 Zdravkovic (Foulk et al., 2007), 也证明若黄体中期子宫内膜活检组织无L-选择素配体MECA-79的表达将预示着怀孕机会很低或没有。

肝素结合的表皮生长因子 (HB-EGF)

肝素结合的表皮生长因子 (HB-EGF) 与EGF受体相互作用, 属于表皮生长因子家族。已证明, HB-EGF在子宫内膜增殖期仅有少量表达, 但在种植窗前迅速达到最高值, 这说明其在囊胚种植阶段起到了一定的作用 (Cavagna & Mantese, 2003; Lessey et al., 2002)。有人曾提出当细胞穿过间质时HB-EGF可通过旁分泌/自分泌信号途径促进种植和滋养层细胞的侵入。HB-EGF也被证明能够抑制细胞凋亡和诱导侵入性滋养层细胞表型的产生。人们通过电镜和免疫化学方法发现了HB-EGF和胞饮突的共存, 并证明在完全发育的胞饮突存在的情况下HB-EGF的表达最高, 这一发现支持了HB-EGF在种植过程中发挥作用的说法。

绒毛膜促性腺激素和Notch1

绒毛膜促性腺激素是一种来自于植入前胚胎滋养层细胞的早期胚胎分泌物。其有助于妊娠期黄体的维持, 并可引起子宫内膜形态的修饰和基因的表达, 从而为植入做准备。

在人类及多种无脊椎动物中, Notch受体家族均可以介导调节分化和促存活的高度保守的信号通路 (Afshar et al., 2007; Paria et al., 2002)。Notch蛋白是配体依赖性的跨膜受体, 其可以转导细胞外信号, 从而负责整个发育过程中的细胞结局和分化。Notch信号通路通常会限制细胞分化的结局, 并与其他信号通路一起调控细胞向特定的方向分化, 同时抑制其向另一种方向分化并促进细胞存活。证据表明, Notch信号通路调节细胞的三种命运: 分化、细胞周期和细胞凋亡。最近, Afshar等证明CG信号产生后的 α SMA 和 Notch 1的共表达可以在孕初期抑制间质细胞的凋亡。子宫内膜脱落和子宫对胚胎的无容受性可能与Notch 1的低表达有关。补充(h)CG或孕酮可以介导子宫内膜的存活, 因为两者可以诱导Notch 1的表达 (Afshar et al., 2007)。

黏蛋白类

黏蛋白是高分子量的糖蛋白, 包含50%以上的碳水化合物, 以O键连接到富含苏氨酸/丝氨酸的肽核心上 (Gendler et al., 1990)。MUC-1是分子量大于250kDa的巨大糖蛋白。

(Achache & Revel, 2006)。当MUC-1在细胞表面高表达时, 它便产生一种位阻现象从而干扰细胞的附着。细胞-细胞和细胞-基质之间粘连受到抑制与MUC-1胞外区的长度直接相关 (Hilkens et al, 1992)。大多数上皮细胞的顶面被主要成分为黏蛋白的厚厚的糖衣所保护, 人们认为这可以保护细胞表面免遭病理过程的损害。在子宫内膜上, MUC-1可能是在种植前与囊胚最早相遇的分子。这种相互作用似乎证明了在合适的种植位置未被找到之前, 囊胚均被阻止接近子宫内膜壁。在小鼠、大鼠和猪中均已证明, 在可容性窗口期MUC-1是下

调的，这样可以优化囊胚和子宫壁之间的相互作用；而与之相反的是，现已证明人类MUC-1在种植前阶段是上调的。因此认为，人类必须有一种机制来诱导抑制因子下调MUC-1的屏障作用。显然，高孕酮水平可以降低MUC-1水平，从而使子宫内膜表面的细胞外黏附分子（CAM）暴露并提高子宫的容受性（Bowen et al., 1996）。免疫组织化学和扫描电镜表明，MUC-1的抗原表位仅对应纤毛细胞，而非纤毛细胞（比如胞饮突）的表面无MUC-1。已证明胞饮突为囊胚的种植提供了MUC-1空白区，这一点是非常重要的。虽然，MUC-1的出现似乎对种植起到了负面作用，但是其上调和在覆盖于子宫内膜以外的糖衣上的延伸表明MUC-1可能在指导胚胎的有效种植方面起到了短暂的作用（Achache & Revel, 2006）。

降钙素

高钙血症时甲状腺滤泡旁细胞释放降钙素来降低血钙水平。虽然其作用有待商榷，但是降钙素在分泌期表达于人子宫内膜上，并于黄体周期的第19~21日达到最高浓度，而这正好与种植期相一致。已证明，孕酮可以诱导子宫内膜中降钙素基因的表达（Cavagna & Mantese, 2003; Kumar, 1998）。通过观察降钙素mRNA的免疫反应可以得出，在增殖期和排卵期降钙素似乎是缺失的。此项发现可能是推测降钙素是子宫容受性标记物的另一原因。降钙素通过结合到特异性受体CR1a和CR1b上来控制钙稳态（exton et al., 1993; Wang, 1998）。人们发现CR1a受体在鼠的卵母细胞和受精卵中呈低表达，但是在胚胎的8-细胞到囊胚阶段其表达明显增加。Wang等证明在体外研究中用10 nmol/L降钙素处理30 min后囊胚开始加速分化（Cavagna & Mantese, 2003; Wang, 1998）。虽然这似乎表明了降钙素在胚胎发育过程中所扮演的角色，但是我们需要进一步的研究以确定其在胚胎种植和发育过程中的明确作用。

前列腺素

当种植开始时，囊胚需要进入并与母体的脉管系统相连接。要做到这一点，植入部位的血管通透性就需要相应增加（Chakraborty et al., 1996）。众所周知，前列腺素（PGs）具有作用于血管的特性，其在排卵、受精和分娩过程中发挥了决定性作用。最近证明其在种植过程中也起到了关键性作用（Achache & Revel, 2006; Song et al., 2006）。

前列腺素是类花生酸类物质，包括四名成员，前列腺素D2（PGD2），前列腺素E2（PGE2），前列腺素F2a（PGF2a）和前列环素（PGI2）。它们由两种酶的作用产生，即细胞溶质磷脂酶A2（cPLA2）和环氧化酶（COX）。Song等证明缺乏cPLA2和COX的雌鼠不能产生PG，从而引起显著的种植缺陷。cPLA2敲除小鼠也表现为继发于延迟种植的妊娠失败和低产仔数。补充外源性PG可以在适当的时间内恢复胚胎的种植。目前尚不清楚PG的表达减少是否会抑制人类的生育力，因为缺乏PG的小鼠是能够生育的，但是存在细微的调节。因此，我们假设在人类存在导致延迟种植的相似过程，其可以引起早期流产。PGs在人类胚胎种植和妊娠晚期异常中所起的作用应该被进一步探讨。

同源基因

同源基因HOXA-10和HOXA-11与子宫内膜容受性有关。在小鼠中这些基因的突变可以导

致种植失败 (Cavagna & Mantese, 2003; Daftary & Taylor, 2001)。人类子宫内膜的生长和发育与这些基因有关, 并已证明它们在分泌中期的种植窗期明显上调。已证明, 有HOXA-10或HOXA-11纯合子突变的雌鼠是不能生育的, 这归咎于子宫内膜因素 (Satokata et al., 1995)。据Benson等所述, HOXA-10基因可能在形态发生过程中起到了非常重要的作用, 包括形成适宜形状的生殖道和适合种植的成人子宫内膜。

Taylor等发现, 子宫内膜异位症妇女的HOX基因表达发生了改变, 这引起子宫内膜分子组成改变, 从而导致子宫内膜容受性下降。这些发现进一步支持了HOX基因表达在种植过程中可能具有重要作用的观点。

血管发生

母胎界面的血管生长是保证胚胎成功种植和发育的主要成分。滋养细胞、自然杀伤细胞和其他类型细胞负责这方面的发展。众所周知, 滋养细胞产生血管生长因子 (Cross et al., 2002; Torry et al., 2007), 在子宫内膜向分泌期转化期间, 未产粒的子宫自然杀伤细胞 (uNK) 前体被募集到子宫内膜上。孕激素使这些uNK前体向大的产粒的uNK细胞发育。这些现象似乎出现在种植期间, 而且在怀孕初期释放血管生成相关细胞因子及随着妊娠进展形成螺旋小动脉方面发挥了重要作用 (Leonard et al., 2006)。小鼠体外模型显示, 孕激素可以上调蜕膜IL-15, IL-15又反过来激活uNK群 (Leede-Bataille et al., 2005)。

在怀孕早期, 其他细胞比如B和T淋巴细胞也参与到血管形成过程中。已证明, B淋巴细胞表达c-Myc癌基因, 这种癌基因可以通过产生血管内皮生长因子 (VEGF) 来诱导血管生成 (Ruddell et al., 2003)。众所周知, VEGF是血管增生过程中生成血管的物质 (Tammela et al., 2005)。在围植入期, 特定的VEGF受体表达并通过调节血管通透性来发挥功能优化囊胚的植入。受体包括VEGFR-1、VEGFR-2和NRP-1 (Halder et al., 2000; Torry et al., 2007)。已证明, 在种植和早期胎盘发育过程中, VEGF的功能和表达对血管形成有至关重要的作用, 干扰此过程可以导致种植失败和早期流产。

胰岛素样生长因子- II

人们认为胰岛素样生长因子及其结合蛋白负责分化、子宫内膜生长、血管生成和细胞凋亡 (Cavagna & Mantese, 2003)。特别指出的是, IGF-II是一种已知的调节滋养细胞功能的介质, 其在适当的胎盘发育和行使胚胎运输功能方面也是必不可少的 (Herr et al., 2003)。已证明, 滋养细胞表达IGF-II, 而种植位点附近的血管也同样被证明表达IGF-II受体, 这表明IGF-II可直接作为一种血管生长因子发挥作用 (Torry et al., 2007)。在小鼠中, IGF-II显示了其血管增生的潜力, 其通过诱导血管生长因子如VEGF和增殖蛋白来发挥这种潜力。胰岛素样生长因子被胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) 所调控 (Cavagna & Mantese, 2003)。Licht等证明子宫内膜在LH峰后10日左右分泌IGFBP-1, 这正好与种植窗吻合 (Licht et al., 2002)。IGFBP-1作为IGF-II的主要调节因子, 可能在子宫内膜容受性和种植方面发挥了重要的作用。

白血病抑制因子

1992年, Hilton证明LIF是造血因子, 其具有刺激小鼠髓样白血病细胞系的巨噬细胞分化的能力 (Achache & Revel, 2006; Hilton, 1992)。增殖、细胞存活和分化是LIF自分泌和旁分泌的部分作用, 研究者已经对LIF在囊胚发育和种植方面的功能进行了探索。Stewart (Stewart, 1994) 的一项研究显示, 缺乏纯合子LIF基因表达的雌鼠会表现为胚胎种植失败, 而为先前受累的小鼠补充LIF可以使胚胎成功种植, 这进一步证明了其重要性。在分泌中晚期, LIF的表达达到最大值。子宫内膜活检显示LIF mRNA在月经周期的第18~28日表达, 并且在第20日达到最大表达量 (Charnock-Jones et al., 1994)。已证明, 不育和反复种植失败患者的LIF水平异常, 这也说明了LIF是种植过程的一个基本要素 (Achache & Revel, 2006)。临床前及临床试验已经对重组人LIF (r-hLIF) 在改善子宫内膜容受性方面的作用进行了研究 (Brinsden et al., 2003)。鉴于LIF在种植过程中的重要性, 在不久的将来r-hLIF可能会成为优化子宫内膜容受性的重要工具。

血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1 (SGK1)

最近, Feroze-Zaidi等证明不明原因不育或IVF后反复种植失败妇女的腔上皮细胞在分泌中期的容受期 (相当于种植窗期) 表现为SGK1基因表达异常 (Fakhera et al., 2007)。上皮Na⁺通道 (ENaCs) 的调节是由SGK1所控制的。因此, 子宫流体内稳态直接受SGK1的影响, SGK1可以降低子宫内膜容受性并破坏成功的种植。分化的人子宫内膜间质细胞 (HESCs) 也可以激活SGK1, SGK1可以刺激泌乳素(PRL) 的表达, PRL是最重要的蜕膜标记基因 (Brosens & Gellersen, 2003, 2006)。

FOXO蛋白是已知的能够调控与凋亡特性有关的基因的蛋白, 同时其还调控与分化、细胞周期阻滞、DNA修复和抗氧化相关的基因 (Fakhera et al., 2007; Sunters et al., 2003)。调控FOXO蛋白表达的转录因子的磷酸化受激酶类所作用, SGK1属于激酶类, 其可以灭活这类蛋白质 (Brunet et al., 2001; Rena et al., 2003)。分泌中期SGK1的活性增加可以阻断种植, 这种破坏作用是通过阻断调控Na⁺和水运输的ENaC的正常活性或阻断局部的细胞凋亡来实现的。

白细胞介素-6 (IL-6)

IL-6是一种已知的经典的诱导活化的B细胞产生免疫球蛋白的细胞因子, 另外发现, 其也行使B-淋巴细胞系统外的多种功能。人们检测到人子宫内膜上IL-6的表达在黄体期达到最高水平 (Achache & Revel, 2006)。IL-6 mRNA的表达从分泌中期到分泌晚期呈平稳增长, 到分泌晚期后又再次下降。在种植的关键性窗口期, IL-6的免疫反应性变得更易被检测到。与间质相比, 上皮细胞和腺细胞区域的蛋白质表达是最显著的。人们发现, 在种植窗期间, IL-6受体不仅可以在子宫内膜上表达, 而且在囊胚中也有表达, 这就说明了IL-6的旁分泌/自分泌在种植前期起到了重要作用。IL-6基因断裂的小鼠实验显示, 虽然能够种植, 但是其囊胚的生长发育情况不是很好 (Achache & Revel, 2006; Salamonsen et al., 2000)。此实验提示纵使IL-6可能不是种植的必需因素, 但是在某些情况下其表达缺失也是不育的原因之一。最近的研究发现复发性流产的患者其分泌中期子宫内膜上IL-6 mRNA的表达受到抑制, 因此这也支持了IL-6在不育中有重要作用的观点。

白细胞介素-1 (IL-1)

IL-1 α , IL-1 β 和IL-1受体抗体 (IL-1ra) 都属于IL-1家族, 都是免疫应答和炎症反应至关重要的介导者。在过去关于小鼠的实验中, 敲除IL-1的小鼠仍然可以成功种植, 但是有趣的是, 接受腹腔注射IL-1ra的小鼠囊胚却不能种植到子宫壁上。Simon认为这是因为IL-1ra可以下调腔上皮表面重要的结合素。在人类, 人们观察到给予IL-1可以引起子宫内膜上皮细胞 (EECs) 培养基中的整联蛋白 $\beta 3$ 表达增加, 从而优化囊胚的种植 (Achache & Revel, 2006)。瘦素也被证明可以增加整联蛋白 $\beta 3$ 的表达。有趣的是, IL-1 β 可以行使其刺激瘦素分泌和上调EECs上其Ob-R受体的功能。已证明, 人子宫内膜上皮内的IL-1 R II mRNA及其蛋白的表达在黄体期达到最大水平, 同时证明, 在种植窗期间, IL-1抗体表达减少。这项发现提示在种植的关键时期抑制IL-1抗体的表达可以实现最完美的成功种植 (Boucher et al., 2001)。

与对照组相比, 子宫内膜异位症的妇女其腹水 (PF) 和血清中IL-1 α 和IL-1ra显著增加, 这可能是引起这类患者发病和不育的原因之一 (Kondera-Anasz et al., 2005)。

瘦素

作用于内分泌和旁分泌水平的瘦素与体质量和生殖功能的调控有关 (Cervero et al., 2004)。瘦素是OB基因 (肥胖基因, 减肥蛋白基因) 的产物。对啮齿类动物的研究显示, 配体-受体系统对种植来说是必不可少的。子宫内膜上与瘦素相关的受体包括总瘦素受体 (OB-RT)、长型 (OB-RL) 和HuB219.1、HuB219.3短亚型。小鼠实验显示, ob/ob变异的小鼠表现为肥胖和不育。用外源性瘦素治疗后, 这些小鼠可以恢复生育力, 但是控制食物却不能恢复, 这说明瘦素是维持正常生育功能的必要条件 (Cervero et al., 2004)。另外, 已证明, 瘦素可以增加整联蛋白 $\beta 3$ 的表达, 整联蛋白 $\beta 3$ 是一种维持子宫内膜容受性和囊胚种植所必须的重要的配体蛋白。瘦素受体OB-RT、OB-RL、HuB219.1和HuB219.3都在黄体晚期显示出其最大表达量 (Achache & Revel, 2006)。

钙黏素

钙依赖性细胞-细胞间的黏附机制与钙黏素有关, 其属于糖蛋白类, 包括N-、P-和E-钙黏素, 均显示出特殊的功能和特殊的组织分布。在所有的钙黏素中, 有关种植的研究涉及最多的是E-钙黏素。E-钙黏素它是普遍存在的, 而且认为其作用是维持上皮细胞间的黏着连接 (Singh & Aplin, 2009)。E-钙黏素的抑制可以引起细胞-细胞间黏附功能的障碍。Riethmacher等证明E-钙黏素基因的定向突变可以导致小鼠植入前的发育缺陷。

在黄体期, E-钙黏素mRNA水平显著提高, 这似乎主要是通过细胞内钙离子水平来控制的。黏着连接处E-钙黏素细胞支架的组构和分解是通过信号通路介导的钙离子水平的升高来调节的。体外研究证明, 降钙素可以引起细胞内钙离子水平的短暂升高, 并抑制细胞接触点的E-钙黏素。这些实验是由Li等用培养的Ishikawa细胞做的。

降钙素似乎是重要的种植调节剂。孕酮可以增加降钙素水平, 降钙素反过来又可以增加细胞内钙离子浓度, 从而调节E-钙黏素的表达。E-钙黏素似乎在子宫容受性方面发挥了两种主要功能: ①参与初始阶段的黏附; ②在分泌阶段, 孕酮和降钙素灭活E-钙黏素从而

为上皮细胞分离和囊胚种植创造条件 (Achache & Revel, 2006)。

细胞周期蛋白E和P27

细胞周期蛋白是已知的控制细胞分裂期进展的蛋白。G1期向S期的转变是由细胞周期蛋白E的限速步骤所控制的,然而细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物p27可以阻止细胞周期的进展 (Kliman et al., 2006)。貌似细胞周期蛋白E的作用是参与增生,而p27主要是负责分化 (Dubowy et al., 2003)。与这些作用一致,雌激素可以正向调节细胞周期蛋白E,孕激素似乎可以诱发p27占主导位置。细胞周期蛋白E在上皮细胞胞质内发挥活性,而p27仅在胞核内发挥活性。虽然细胞周期蛋白E出现在月经周期的早期,但是其反应活性好像在周期的第19日就迅速下降,这可能与其随后的转移有关,其向胞核内移动并在胞核内与p27结合而灭活。

子宫内膜功能试验 (EFT) 是指通过用免疫组织化学的方法 (抗-细胞周期蛋白E抗体) 染色子宫内膜活检组织来评估细胞周期蛋白E,此试验也是鉴别异常发育子宫内膜的一种方法 (Dubowy et al., 2003)。EFT显示,细胞周期蛋白E的持续存在与腺体的发育停滞有关 (GDA),这种现象存在于不育妇女中。细胞周期蛋白E的过表达似乎表明这些细胞停滞在月经周期的早期可能与p27的过早表达有关 (Kliman et al., 2006)。在不久的将来,EFT中细胞周期标记物及其相关的雌孕激素可以发展为评估不育患者子宫内膜容受性及外源性激素补充后功效的重要工具 (Kliman et al., 2006)。

集落刺激因子

CSF-1是诱导细胞增殖和分化的造血生长因子,属于单核-吞噬细胞系。Pollard等证明CSF基因变异的op/op小鼠表现为骨骼多种缺陷和种植率下降。另外一些研究显示CSF-1也是排卵时重要的因子。与野生型小鼠相比,op/op小鼠表现为较低的卵泡发育率和排卵率。已经证明,与孕前CSF-1水平较高的妇女相比,孕前CSF-1水平较低的妇女更易发生复发性流产 (Cavagna & Mantese, 2003)。

3. 临床意义

人们为了了解和探索新的子宫内膜容受性标记物而进行了持续性研究,这仍然是生殖内分泌学领域的热点和重点问题。Haouzi等近期的研究发现了一种在种植窗期由人子宫内膜表达的新基因 (Haouzi et al., 2009)。此信息连同先前讨论的生物标记物的知识促使研究者探寻一种更完善的方法,以便更好地应用在自然周期的子宫内膜活检组织中,特别是IVF周期不成功患者的子宫内膜。这些研究的目的是为了更好地了解囊胚种植的环境要求。这些知识可能会降低种植失败率,并且在IVF周期中为单胚胎移植创造最佳的可接受性环境。

4. 未来应用

因为近期人们对子宫内膜容受性高度关注,所以研究子宫内膜因子的新方法已成为当下的研究热点,并且这些新方法将在不久的将来成为探究不育原因的常规程序,这已不足为奇。最近进行的研究对IVF和IUI患者胚胎移植前子宫内膜的分泌物进行了分析。Boomsma

等 (Boomsma et al., 2009) 近期对不同细胞因子的分泌情况进行了评估, 其中包括白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、巨噬细胞移动抑制因子、嗜酸细胞活化趋化因子、单核细胞趋化蛋白-1和肝素结合表皮生长因子 (Boomsma et al., 2009)。这些新颖的方式可能会在不久的将来为子宫内膜缺陷提供新的疗法。

5. 结论

种植是在不同的细胞因子、激素和免疫调控机制的准时、精确作用下的复杂过程, 需要同步事件和化学反应的协同作用。正如前面所讨论的, “种植窗” 相当于月经周期的第20~24日这一较短的时间段, 在此期间子宫内膜开始变得对接近的囊胚具有可接受性。在月经周期的第一阶段, 雌激素是主导激素, 可以引起子宫内膜细胞的增殖。在月经周期的晚期, 排卵后黄素化卵泡分泌的孕激素可以诱导细胞分化。

大约于排卵后5~6日, 囊胚进入子宫腔内并寻找适合种植的充分准备的子宫内膜。诸如先前所讨论的生物标记物就是确保此过程成功的关键。选择素和黏蛋白在诱导囊胚到达可接受性子宫内膜时发挥了作用, 而结合素和钙黏着糖蛋白充当着床时的黏附分子。这种生物标记物和定时事件的完美编排引导科学家们去更好地了解子宫内膜及其在种植期间所起的作用。在过去的几十年间, 人们在提高排卵和胚胎质量方面做了很多努力。在已经取得了显著进展的同时 (比如IVF和其他辅助生殖技术), 科学家们也开始意识到胚胎-子宫界面处“沃土”的重要性。关于生物标记物和子宫内膜容受性的研究可能会在未来优化胚胎种植方面发挥作用。对容受性标记物的筛选和对患者的相应治疗可能会增加IVF中的单胚胎的使用率, 从而降低多胎妊娠引起的诸多并发症。患者将会获得一系列的益处, 他们可以节省重复ART治疗所引起的高额费用, 并避免了治疗失败后的情感沮丧。

一些医师已经开始采用积极的方法来评估子宫内膜容受性, 他们通过评估生物标记物, 比如结合素、细胞周期蛋白E、p27, 甚至子宫内膜活检组织的基因来评估子宫内膜容受性。在不久的将来, 这些筛查可能会标准化, 并且带来强有力的治疗措施, 从而达到更高的成功种植率。

6. 参考文献

- [1] Foulk RA, Zdravkovic T, Genbavec O, Prokober A. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. *J Assist Reprod Genet* 2007 ; 24:316-321
- [2] J/Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet* 2007 ; 24:303-315.
- [3] Roussev RG, Coulam CB. HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet* 2007 ; 24:288-295.
- [4] Meyer WR, Castlebaum AJ, Somkutti S, Sagoskin AW, Doyle M, Harris JE, Lessey BA. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Human Reproduction* 1997 ; 12:1393-1398.
- [5] Cheung W, Ng EH, Chung P. A randomized double-blind comparison of perifollicular

- vascularity and endometrial receptivity in ovulatory women taking clomiphene citrate at two different times. Human Reproduction* 2002 ; 17:2881-2884.
- [6] *Fakhera F , Fusi L , Takano M , Higham J , Salker M , Goto T. Role and regulation of theserum - and glucocorticoid-regulated kinase 1 in fertile and infertile human endometrium. Endocrinology* 2007 ; 148:5020-5029.
- [7] *Achache H , Revel A. Endometrial receptivity markers , the journey to successful embryo implantation. Human Reproduction Update* 2006 ; 6:731-746.
- [8] *Diedrich K , Devroey P , Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. Human Reproduction Update* 2007 ; 13:365-377.
- [9] *Afshar Y , Stanculescu A , Miele L , Fazleabas AT. The role of chorionic gonadotropin and Notch 1 in implantation. J Assist Reprod Genet* 2007 ; 24:296-302.
- [10] *Nikas G , Toner J , Jones H. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. Human Reproduction* 1999 ; 14:787-792.
- [11] *Damario MA , Lesnick TG , Lessey BA , Mandelin E , Rosenwalks Z. Endometrial markersof uterine receptivity utilizing the donor oocyte model. Human Reproduction* 2001 ; 16:1893-1899.
- [12] *Cavagna M , Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity - a review. Placenta* 2003 ; 24:39-47.
- [13] *Strowitzki T , Germeyer A , Popovici R , Wolf M. The human endometrium as a fertility-determining factor. Human Reproduction Update* 2006 ; 5:617-630.
- [14] *Cittadini E. Human implantation: the new frontiers of human assisted reproductive technologies. Reproductive BioMedicine Online* 2007 ; 1 ; 1-3
- [15] *Boomsma CM , Macklon MS. What can the clinician do to improve implantation? Reproductive BioMedicine Online* 2006 ; 13:845-855.
- [16] *Horcajadas JA , Pellicer A , Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times , new opportunities. Human Reproduction Update* 2007 ; 13:77-86.
- [17] *Ceydell N , Kaleli S , Calay Z , Akbas F. Difference in avp3 integrin expression in endometrial stromal cell in subgroups of women with unexplained infertility. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006 ; 126:206-211.
- [18] *Goiran D , Mignot TM. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999 ; 83:85-100.
- [19] *Lessey BA , Gui Y , Aparao SL. Regulated-expression of heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: a potential paracrine role during implantation. Mol Reprod Dev* 2002 ; 62:446-455.
- [20] *Zhu LJ , Polihronis M , Bagchi MK. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. Endocrinology* 1998 ; 139:3923-3935.
- [21] *Fournel S , Huc X , Alam A. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells interacting with CD8. J Immunol* 2000 ; 164:6100-6104.

- [22] Martel D , Frydman R , Glissant M. Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol* 1987 ; 114:319-324.
- [23] Apparao KB , Murray MJ , Fritz MA , Meyer WR. Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86:4991- 5000.
- [24] Alon R , Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol* 2002 ; 14:93-104.
- [25] Genbacev OD , Prakobphol A , Foulk RA , Krtolica A , Ilic D , Singer MS , et al. Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003 ; 299:405- 408.
- [26] Yoo , Barlow , Mardon. Temporal and special regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet* 1997 ; 21:102-108.
- [27] Stavreus E , Nikas G , Sahlin L , Eriksson H. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 2001 ; 76:782-791.
- [28] Paria BC , Reese J , Das SK , Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002 ; 296:2185-2188.
- [29] Artavanis-Tsakonas S , Matsuno K , Fortini ME. Notch signaling. *Science* 1995 ; 268:225-232.
- [30] Artavanis-Tsakonas S , Rand MD , Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999 ; 284:770-776.
- [31] Gendler SJ , Lancaster CA , Taylor-Papadimitriou , Duhig J , Peat N , Lalani EN. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 1990 ; 265:15286-15293.
- [32] Hilkens J , Ligtenberg MJ , Vos HL , Litvinov SV. Cell membrane associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* 1992 ; 17:359-363.
- [33] Hey NA , Li TC , Devine PL , Graham RA. MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies in flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum Reprod* 1995 ; 10:2655-2662.
- [34] Bowen JA , Bazer FW , Burghardt RC. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biol Reprod* 1996 ; 55:1098-1106.
- [35] Kumar S , Zhu LJ , Polihronis M , Cameron ST , Baird ST , Dua A. Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 ; 83:4443-4450.
- [36] Sexton PM , Houssami S , Hilton JM , Center RJ. Identification of brain isoforms of the rat calcitonin receptor. *Mol Endocrinol* 1993 ; 7:815-821.

- [37] Wang UK , Rout UK , Bagchi IC , Armant DR. Expression of calcitonin receptors in mousepreimplantation embryos and their function in regulation of blastocyst differentiation by calcitonin. *Development* 1998 ; 125:4293-4302.
- [38] Chakraborty I , Das SK , Wang J. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 1996 ; 16:107- 122.
- [39] Song H , Lim H , Paria BC , Matsumoto H , Swift LL , Morrow J , Bonventre JV , Dey SK. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial [correction of A2alpha deficiency is crucial] for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 2002 ; 129:2879-2889.
- [40] Wilcox AJ , Baird DD , Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999 ; 340:1796-1799.
- [41] Ma L , Benson GV , Lim H , Dey SK , Maas RL. Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* 1998 ; 197:141-154.
- [42] Daftary GS , Taylor HS. Molecular markers of implantation: clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001 ; 13:269-274.
- [43] Satokata I , Benson G , Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa 10 deficient mice. *Nature* 1995 ; 374:460-463.
- [44] Benson GV , Lim H , Paria BC , Satokata I , Dey SK , Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996 ; 12:2687-2696.
- [45] Cross JC , Hemberger L , Lu Y , Nozaki T , Masutami M. Trophoblast functions , angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2002 ; 187:207-212.
- [46] Leonard S , Murrant C , Tayade C , Heuvel M , Watering R , Croy BA. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification-Facts and hypotheses-a review. *Placenta* 2006 ; 27:S40-6.
- [47] Leede-Bataille N , Bonnet-Chea K , Hosny G , Dubanchet S , Frydman R , Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18 , -15 , and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization- embryo transfer failure. *Fertil Steril* 2005 ; 83:598-605.
- [48] Ruddell A , Mezquita P , Brandvold KA , Farr A , Iritani BM. B-lymphocyte-specific c-Myce expression stimulates early and functional expansion of the vasculature and lymphatics during lymphomagenesis. *Am J Pathol* 2003 ; 163:2233-45.
- [49] Tammela T , Enholm B , Alitalo K , Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005 ; 65:550-63.
- [50] Halder JB , Zhao X , Soker S , Paria BC , Klagsbrun M , Das SK. Differential expression of VEGF (164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF (164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis* 2000 ; 26:213-24.

- [51] Herr F , Liang OD , Herrero J , Lang U , Preissner KT , Han VK , et al. Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 88:4811-7.
- [52] Volpert O , Jackson D , Bouck N , Linzer DI. The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is required for proliferin-induced angiogenesis. *Endocrinology* 1996 ; 137:3871-6.
- [53] Licht P , Russu V , Lehmeier J , Moll J , Wildt L. Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 2002 ; 78:252-258.
- [54] Hilton DJ. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci* 1992 ; 17:72-76.
- [55] Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 1994 ; 39:233-238.
- [56] Charnock-Jones DS , Sharkey AM , Fenwick P and Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 1994 ; 101:421-426.
- [57] Brinsden PR , Ndukwe G , Engrand P , Pinkstone S , Lancaster S , Macnamee MC and De Moustier B. Does recombinant leukemia inhibitory factor improve implantation in women with recurrent failure of assisted reproduction treatment? 0-050 ESHRE Annual Meeting , 2003 ; Madrid , Spain.
- [58] Brosens JJ , Gellersen B. Death or survival: progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* 2006 ; 36:389-398.
- [59] Gellersen B , Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 2003 ; 178:357-372.
- [60] Sinters A , Fernandez de Mattos S , Stahl M , Brosens JJ , Zoumpoulidou G , Saunders CA , Coffey PJ , Medema RH , Coombes RC , Lam EW. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2003 ; 278:49795-49805.
- [61] Dijkers PF , Medema RH , Pals C , Banerji L , Thomas NS , Lam EW , Burgering BM , Raaijmakers JA , Lammers JW , Koenderman L , Coffey PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000 ; 20:9138-9148.
- [62] Brunet A , Park J , Tran H , Hu LS , Hemmings BA , Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 2001 ; 21:952-965.
- [63] Rena G , Woods YL , Prescott AR , Peggie M , Unterman TG , Williams MR , Cohen P. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *EMBO J* 2002 ; 21:2263-2271.
- [64] Woods YL , Rena G , Morrice N , Barthel A , Becker W , Guo S , Unterman TG , Cohen P. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro , a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem J* 2001 ; 355:597-607.
- [65] Revel A , Helman A , Koler M , Shushan A , Goldshmidt O , Zcharia E , Aingorn H , Vlodavsky I. Heparanase improves mouse embryo implantation. *Fertil Steril* 2005 ; 83 , 580-586.
- [66] Akira S , Taga T , Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*

- 1993 ; 54 , 1-78.
- [67] Vandermolen DT , Gu Y. Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression , in vitro protein production , and stimulation thereof by IL-1 beta. *Fertil Steril* 1996 ; 66 , 741-747.
- [68] von Wolff M , Thaler CJ , Zepf C , Becker V , Beier HM , Strowitzki T. Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol* 2002 ; 16 , 121-129.
- [69] Tabibzadeh S , Kong QF , Babaknia A , May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod* 1995 ; 10 , 2793-2799.
- [70] Kopf M , Baumann H , Freer G , Freudenberg M , Lamers M , Kishimoto T , Zinkernagel R , Bluethmann H , Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994 ; 368 , 339-342.
- [71] Salamonsen LA , Dimitriadis E , Robb L. Cytokines in implantation. *Semin Reprod Med* 2000 ; 18 , 299-310.
- [72] Lim KJ , Odukoya OA , Ajjan RA , Li TC , Weetman AP , Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000 ; 73 , 136-142.
- [73] Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J* 1998 ; 2 , 108-115.
- [74] Simon C , Frances A , Piquette GN , el Danasouri I , Zurawski G , Dang W , Polan ML. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994 ; 134 , 521-528.
- [75] Simon C , Gimeno MJ , Mercader A , O'Connor JE , Remohi J , Polan ML , Pellicer A. Embryonic regulation of integrins beta 3 , alpha 4 , and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 ; 82 , 2607-2616.
- [76] Gonzalez RR , Leavis P. Leptin upregulates beta3-integrin expression and interleukin-1beta , upregulates leptin and leptin receptor expression in human endometrial epithelial cell cultures. *Endocrine* 2001 ; 16 , 21-28.
- [77] Simon C , Piquette GN , Frances A , Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 ; 77 , 549-555.
- [78] Boucher A , Kharfi A , Al-Akoum M , Bossu P , Akoum A. Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biol Reprod* 2001 ; 65 , 890- 898.
- [79] Kondera-Anasz Z , Sikora J , Mielczarek-Palacz A , Jonca M. Concentrations of interleukin (IL)-1alpha , IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005 ; 123 , 198-203.
- [80] Cervero A , Horcajadas JA , Martin J , Pellicer A , Simon C. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J of Clin Endocrinol Metab* 2004 ; 89:2442-2451.

- [81] Houseknecht KL , Baile CA , Matteri RL , Spurlock ME. *The biology of leptin: a review. J Anim Sci* 1998 ; 76:1405-1420.
- [82] Holness MJ , Munns MJ , Sugden MC. *Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function. Mol Cell Endocrinol* 1999 ; 157:11-20.
- [83] Zhang Y , Proenca R , Maffei M , Barone M , Leopold L , Friedman JM. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature* 1994 ; 372:425-432.
- [84] Chehab FF , Lim ME , Lu R. *Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet* 1996 ; 12:318-320.
- [85] Mounzih K , Lu R , Chehab FF. *Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. Endocrinology* 1997 ; 138:1190-1193.
- [86] Gumbiner BM. *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell* 1996 ; 84 , 345-357.
- [87] Huber O , Bierkamp C , Kemler R. *Cadherins and catenins in development. Curr Opin Cell Biol* 1996 ; 8 , 685-691.
- [88] Riethmacher D , Brinkmann V and Birchmeier C. *A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 , 855-859.
- [89] Fujimoto J , Ichigo S , Hori M , Tamaya T. *Alteration of E-cadherin , alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. Gynecol Endocrinol* 1996 ; 10 , 187-191.
- [90] Gumbiner BM. *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell* 1996 ; 84 , 345-357.
- [91] Li Q , Wang J , Armant DR , Bagchi MK , Bagchi IC. *Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. J Biol Chem* 2002 ; 277 , 46447-46455.
- [92] Kliman HJ , Honig S , Walls D , Luna M , Mc Sweet JC , Copperman AB. *Optimization of endometrial preparation results in a normal endometrial test (EFT) and good reproductive outcome in donor ovum recipients. Physiology* 2006 ; 23:299-303.
- [93] Dubowy R , Feinberg R , Keefe D , Doncel G , Williams S , McSweet J , Kliman HJ. *Improved endometrial assessment using cyclin E and p27. Fertil Steril* 2003 ; 80:146- 56.
- [94] Kliman HJ. *The soil test for your endometrium: the endometrial function test (EFT). Fertility today* 2006 ; spring:108-111.
- [95] Stanley ER , Guilbert LJ , Tushinski RJ , Bartelmez SH. *CSF-1-a mononuclear phagocyte lineage specific haemopoietic growth factor. J Cell Biochem* 1983 ; 21:151-159.
- [96] Pollard JW , Hunt JS , Wiktor-Jedrzejczak WQ , Stanley ER. *A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. Dev Biol* 1991:148:273-283.
- [97] Cohen E , Zhu L , Pollard JW. *Absence of colony stimulating factor-1 in osteopetrotic (cs fmop/ cs fmop) mice disrupts estrous cycles and ovulation. Biol Reprod* 1997 ; 56:110-118.

- [98] *Daiter E , Pampfer S , Yeung YG , Barad G , Stanley ER , Pollard JW. Expression of colony stimulating factor-1 in the human uterus and placenta. J Clin Endocrinol Metab 1992;74:850-858.*
- [99] *Katano K , Matsumoto Y , Ogasawara M , Aoyama T , Ozaki Y , Kajiura S , Aoki. Low serum M-CSF levels are associated with unexplained recurrent abortion. Am J Reprod Immunol 1997 ; 38:1-5.*
- [100] *Shinetugs B , Runesson E , Bonello NP , Brannstrom M , Norman RJ , Colony stimulating factor-1 concentrations in blood and follicular fluid during the human menstrual cycle and ovarian stimulation: possible role in the ovulatory process. Hum Reprod 1999 ; 14:1302-1306.*
- [101] *Simon C , Martin JC and Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000 ; 14:815-826.*
- [102] *Enders A. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am J Anat 1967 ; 125:1-29.*
- [103] *Ledee-Bataille N , Lapree-Delage G , Taupin JL , Dubanchet S , Frydman R and Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. Hum Reprod 2002 ; 17:213-218.*
- [104] *Ganong WF. Review of Medical Physiology. 22nd Edition 2005:411-467.*
- [105] *Boomsma , CM , Kavelaars A , Eijkemans MJC , Amarouchi K , Teklenburg G , Gutknecht D. Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. Reproductive BioMedicine Online 2009 ; 18 , 85-94.*
- [106] *Haouzi D , Mahmoud K , Fourar M , Bendhaou K , Dechaud H , Reme T , Dewailly D , Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. Human Reproduction 2009 ; 24 , 198-205.*
- [107] *Singh H , Aplin J. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. Journal of Anatomy 2009 ; 215 , 3-13.*
- [108] *Aghajanova L , Hamilton AE , Giudice LC. Uterine Receptivity to Human Embryonic Implantation: Histology, Biomarkers, and Transcriptomics. Semin Cell Dev Biol. 2008; 19:204-211*

(刘盼译)

第十六章 生育能力的低温保存

Francesca Ciani , Natascia Cocchia , Luigi Esposito and Luigi Avallone

Department of Biological Structures , Functions and Technology

Department of Veterinarian Clinical Sciences

Department of Animal Sciences and Inspection of Food of Animal Origin

University of Naples Federico II

Italy

1. 引言

低温生物学是关于低温生物知识的一门学科。生育能力低温保存是生殖医学的重要分支，主要包括对用于辅助生殖技术（ART）的配子（精子和卵子）、胚胎和生殖组织（卵巢和睾丸组织）的保存。生殖细胞冷冻保存是指对精子或卵子的冷冻、存储和解冻，主要过程包括首先将配子暴露于冷冻保护剂中、冷却到零度以下，储存、解冻，最后稀释和去除冷冻保护剂，使之回到生理环境中继续生长。正确调整渗透压可以消除细胞内冰晶形成所造成的损害，这对冷冻-解冻能否成功至关重要。

储存非冷冻的生殖细胞（如精子或卵子）和组织（如睾丸和卵巢组织）存在一些问题，因为要实现供体与受体同步化很难，同时也存在传播疾病的可能，这就限制了此项技术的广泛应用。冷冻的细胞或组织可以存储几个世纪，并能保持其遗传信息和功能几乎不变，这也正是冷冻保存最具吸引力的地方。冷冻保存是建立在细胞物理特性基础上的，这是为了降低非生理条件，如零下的温度、冰晶形成、离子和高溶质浓度对细胞膜的损伤，更好的保护细胞的生存能力。因此，迫切需要一种适合多物种生殖细胞和组织冷冻保存的最佳方法。目前有两种主要的冷冻保存方法：慢速（程序化）冷冻和玻璃化冷冻。他们的主要不同是玻璃化冷冻过程中没有冰晶形成。然而，虽然生殖生物技术已被广泛应用，并产生了一些针对牛精子和卵子冷冻保存的草案。但由于其效果不理想，故不能推广到其他物种中。

ART 为患者及具有商业价值或濒危物种的生育能力的保存提供了一系列的方法。尽管如此，成功的冷冻保存生殖细胞和组织仍很困难。现在，科学家对引起低存活率的潜在低温生物学原理越来越感兴趣，并在努力探索更好的低温保存技术。

影响精子保存寿命的主要因素有保存温度、冷冻速率、保护剂的化学组成、冷冻保护剂的浓度、活性氧（ROS）、血浆精液复合物、精浆成分和质量控制。精子冷冻保存方法随着物种的不同而不同，这与他们固有的特性有关，此特性改变了制冷和冷冻中保护剂的种类。

另一方面，与精子相比，卵子的获得数量有限，因此，冷冻保存方法应该能够保持高存活率，以便更好的用于 ART 中。影响冷冻过程的关键因素之一是表面积与体积比。因为卵子的体积比精子的大，所以卵子在冷冻保护剂中达到渗透平衡需要的时间比精子长。因此，冷冻过程中，卵子会发生各种各样的损害，包括细胞骨架瓦解、染色体和脱氧核糖核酸（DNA）异常、纺锤体崩解、等离子膜破坏和皮质颗粒过早胞吐导致透明带硬化等。

现在，越来越多的研究集中于冻存睾丸组织的利用方面，因为睾丸组织内含有大量不同发育阶段的生殖细胞。晚期生殖细胞（如精子细胞，精子）可以通过机械提取法或酶消化法从冻存的睾丸组织中取回，而且现在也可以获得早期的细胞（如精原细胞）并使之在体内进一步成熟。

卵巢皮质含有成千上万的原始卵泡，这些卵泡由包绕着单层颗粒细胞的早期卵母细胞构成。这些细胞对冷冻损伤不敏感，因为他们体积小并且没有透明带形成。虽然在很多物种中都没有获得可重复的方法，但是已经证实动物配子可以在低温保存中存活，并且最近的研究也取得了可喜的结果。

2. 发展史

人类精子冷冻保存应追溯到 1776 年，当时 Lazaro Spallanzani，一位意大利牧师、科学家，提出精子被雪冷却后能保持在静止状态。1866 年，Mantegazza 首次提出把战斗中即将死去的士兵的冷冻精子运送回国以保证其后代的繁衍。

在过去 50 年里，从基础科学理论中衍生出的关于冷冻保存生殖细胞和组织的技术得到了可喜的发展。将理论与实验研究结合后取得了许多令人振奋的进步并且为寻找最优冷冻保存方法提供了深刻见解。自 1949 年 Polge 等利用无意中添加了甘油的冷冻精子培育出小鸡后，生育能力冷冻保存技术日益发展起来。此后，Bunge 和 Sherman (1953) 发现用 10% 的甘油处理人精子后再用“干冰”冷冻，其存活率较高。1969 年，Edwards 等第一个成功地利用人卵子进行了体外授精。随后的数十年，辅助生育诊所和商业动物育种家利用冻存精子成功地进行人工授精。虽然已经证实了精子在 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存后仍能存活，但直到加入冷冻保护剂后，先前冷冻精子的功能才表现了出来。1964 年，Sherman 首先证明了先前冷冻精子使卵母细胞受精的功能。自 1969 年，第一例用冻精实现人成功妊娠的案例出现后，大量人类精子便被冷冻保存，直到 1977 年第一个精子库在加利福尼亚建立。第一个体外授精婴儿的诞生预示着已开始全球推广用 ART 技术治疗不育夫妇。这燃起了科学家们利用冷冻技术保存剩余胚胎以供将来使用的兴趣 (Kelly et al., 2003)。后来，保存生育能力的方法从精子冷冻保存扩大到卵母细胞和胚胎的冷冻保存。

3. 低温生物学基础

冷冻保存是指将组织保存在 $-140\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，在这个温度范围内组织没有任何生理活性，这就产生了一种组织的“假死”状态，这种状态可以得到永久保持 (Fuller & Paynter, 2004)。冷冻的细胞和组织能储存几个世纪，并且其功能和遗传信息不会发生改变，这使得此项技术很有吸引力。冷冻保存指冷冻-解冻过程，冻存会对细胞和组织造成损害 (Mullen & Critser, 2007; Barrett & Woodruff, 2010)。

冷冻是指水以冰的形式分离出来，使液态溶质浓缩。此过程可能会产生两种冷冻损伤即冰本身造成的损伤和液体性状改变造成的损伤。水存在于细胞的任何部位，这对大分子和其他细胞结构如脂质膜的功能很重要。虽然水是一种万能的生物溶剂，但是也拥有维持活细胞稳定性的独特性能。低温可对细胞结构和功能产生影响，水到冰的相变-这个过程对细胞的存活是一个很大的挑战 (Fuller & Painterm, 2004)。冷冻可以对细胞产生直接危害，例如：钠泵对调节细胞的体积起关键作用，而冷冻能关闭钠泵，导致细胞膨胀

(Leaf, 1959)；膜脂质变可能本身就是有害的，另外他也会对膜结合酶的反应速率产生重大影响 (Lyons, 1972)；难溶性物质可能会沉淀，解离常数发生变化，最终导致溶液的成分和 PH 值改变 (van den Berg, 1959; van den Berg and Rose, 1959)；在自身温度下降过程中一些细胞会受损甚至死亡，尤其是冷冻速度过快会产生一种叫做热休克的现象 (Lovelock, 1955)。

为了保护活细胞和组织的结构完整性，一种假设是细胞内大块冰晶形成对细胞产生致命的损害 (Mazur, 1977)，因此冷冻保存技术专注于其在低温下的损害保护机制，以试图保护组织的活力 (Muldrew & McGann, 1990)。人们采用了一些方法，如降低冰晶形成总量 (Farrant et al., 1977) 或阻止冰晶形成 (Mazur, 1963) 来了解和避免冷冻过程中潜在的损害条件。

细胞环境内冰晶的形成会引发一些改变，而细胞必须对此予以回应。在冷冻过程中，所生成的冰晶形态与许多因素有关，包括溶质成分，冷冻速率和温度。当细胞悬液冷却到冰点以下时，水会以冰的形式从等渗溶液中分离出来，这就增加了非冷冻部分溶质（如：盐）的浓度，并因此增强了渗透压，这虽然有助于减少细胞内冰晶的形成，但也会使细胞严重脱水并引起细胞损伤和死亡。在 $-0.56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷却等渗盐溶液 (0.15 mol/L) 时，随着冷却继续，冰被进一步分离出来，剩余液体中盐进一步浓缩。剩余溶液的体积进行性缩小而浓度逐渐增加，直到 $-21.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时盐溶液浓度达到 5.3 mol/L ；在这个温度即共晶点时，剩余溶液发生凝固。因此，当细胞悬浮于冷冻的等渗盐水中时，氯化钠浓度会增加 32 倍。在混合溶质中，摩尔浓度也发生类似的变化，但是不同溶液的溶解度特点不同，其成分也不同 (Pegg, 1976; 2007)。细胞体积变化的动力可能与细胞膜损害有关，膜损害由一些机械方式造成，例如质膜拉长甚至破裂 (Leibo et al., 1978; Mazur & Schneider, 1986)。

一般来说，冰晶完全形成于细胞外，这与几个因素相关：第一，当热量从标本的外表面被传导出后，细胞外液通常会达到最冷点。第二，细胞外液形成一个大间隔，同时细胞内形成很多小间隔，在间隔内能否形成冰晶与间隔的大小直接关系，这就不可避免地大量细胞内部冻结之前细胞外液就已出现冰核。一旦冰晶开始形成，便会传导到所有间隔直至达到平衡。因此，虽然少量细胞应该在细胞外冷冻开始之前先进行内部冷冻，但是一旦细胞外已形成冰晶它便会在该部位继续蔓延，另外，因为主要的细胞溶质不能穿过细胞膜，所以随着细胞外渗透压的升高细胞将会脱水。因此，细胞会萎缩，只要冷却速度缓慢到足以让水离开细胞以维持平衡，细胞内就不会形成冰晶。因此，为了提供保存生命的稳定条件，了解如何冷冻很重要。

虽然细胞内没有冰晶形成时，细胞和组织可以被成功的冷冻并储存到液氮中，但在解冻过程中操作不当仍有形成冰晶的危险。如果标本解冻速度较慢，冰晶形成和/或体积增大会导致更多的损害；然而，如果标本解冻速度足够快，冰晶形成和增长的时间就所剩无几 (Fabbri, 2006; Fabbri et al., 2006)。

当表面能量大的小冰晶溶解和较大的冰晶增长时，冷冻标本会发生再结晶现象，再结晶的速度随温度升高而升高 (Mazur & Schmidt, 1968)。虽然冰的总量随着温度的升高而降低，但在复温时，细胞内外仍会有再结晶现象。已证明，在形成少量细胞内冰晶的条件下冷冻的细胞，当复温速度较快时，会完好地复原。当复温速度较慢时，细胞内再结晶现

象会对其造成不可挽回的损害 (Mazur et al., 1972; McGann & Farrant, 1976)。这表明只要复温时能阻止冰晶重结晶穿过细胞膜, 渗透压梯度对细胞膜造成的损害是可以修复的。1980年 Law 等提出在冻融过程中受损害的细胞也有类似的修复机制, 这就解释了为什么在细胞内冰晶形成后仍有 6% 的细胞保留了其屏障性能。解冻后, 去除冷冻保护剂的过程也会对细胞造成损害。如果把细胞迅速放到低浓度冷冻保护剂中, 水会迅速进入细胞内, 使细胞膨胀甚至破裂。因此, 常规用一系列浓度递减的冷冻保护剂缓慢去除细胞内的冷冻保护剂并使细胞逐渐再水化。另一个选择是利用非渗透性冷冻保护剂如蔗糖降低递减程序中的渗透性损伤 (Shaw, 2000)。

4. 冷冻保存方法

慢速 (程序化) 冷冻和玻璃化冷冻是最常用的两种配子冷冻方法。程序化冷冻使用低浓度冷冻保护剂进行冷冻, 但这些冷冻保护剂有化学毒性对细胞易造成渗透损害; 玻璃化冷冻是一种快速冷冻方法, 其使用高浓度的保护剂快速冷冻, 减少了冷冻损害, 且无溶液影响或结晶的风险 (Arav et al., 2002)。

4.1 慢速 (程序化) 冷冻

慢速 (程序化) 冷冻是传统的冷冻保存程序, 此程序使用较低浓度的冷冻保护剂 (1.5 mol/L), 其对细胞或组织有少量毒性且需要昂贵的设备。当添加冷冻保护剂后, 细胞出现脱水, 随后保护剂和水渗透使之恢复等渗体积。一般来说, 用程序化冷冻仪缓慢冷却细胞, 能使标本在不同速率下冷却; 卵巢组织结晶前的冷却速率为 $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 结晶后的冷却速率为 $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 以确保在冰晶形成前组织已完全脱水。减少细胞内冰晶形成的最佳冷冻速率随着细胞和组织不同而不同 (Fuller & Painter, 2007)。

一般认为, 在慢速冷冻时, 细胞损害与细胞内外电解质浓度有关, 而冷冻保护剂能降低这种累积损害。实验数据支持这种解释, 实际上, 人红细胞在氯化钠/甘油/水中冷冻时的损伤程度可以通过增加溶质浓度进行定量评价。此外, 在高浓度甘油存在时, 即使溶质的浓度再低也会产生一定程度的损害, 看来甘油本身就是损害元素 (Barbas & Mascarenhas, 2009)。

4.2 玻璃化冷冻

传统冷冻方法为避免冰晶形成, 使用低浓度冷冻保护剂慢速冷冻。玻璃化冷冻则使用高浓度冷冻保护剂超速冷冻。1985年, 首次报道了玻璃化冷冻在鼠胚中的应用 (Rall & Fahy, 1985), 其后在动物生殖学中得到了进一步发展 (Ali & Shelton, 1993)。1999年, 报道了第一例用玻璃化冷冻的人卵母细胞成功妊娠并分娩的例子 (Kuleshova et al., 1999)。自此, 科学家们对玻璃化冷冻的兴趣越来越浓 (Liebermann et al., 2002; 2003)。玻璃化的物理定义是在低温环境中溶液发生凝固, 不是在冷却过程中形成冰晶而是黏度极度增高, 这样把细胞或组织放入冷冻保护剂中并直接投到液氮中。冷冻保护剂很大程度上取代了水。冷冻速度达到 $15,000\text{--}30,000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时水从液态直接变为玻璃化状态。这种方法中没有冰晶形成, 所以不会对细胞或组织造成伤害。从技术角度讲这种方法很有吸引力; 不幸的是, 高浓度冷冻保护剂会对细胞产生毒性。溶质毒性是使用玻璃化冷冻保存的最大缺点, 即使用很高的冷冻速率。只要冷冻速度快得足以阻止冰晶形成, 就可以在冷冻时减少冷冻保护液的浓度以降低其毒性 (Herrero et al., 2011)。

5. 冷冻保护剂

通常情况下细胞内形成冰晶是致命的，以溶质损害为主。而在细胞和组织中细胞外冰晶起着重要作用，其可以通过充分地降低冷冻速率来避免。冷冻保护剂被定义为是一种能在冷冻保存中增强细胞活性的复合物，主要被用于减少任何预定零下温度下所形成的冰量。只要加入足够的冷冻保护剂，就可以避免冰晶聚集，从而使溶液成玻璃状。但高浓度冷冻保护剂产生的渗透性损害和毒性损害成了关键问题。可以通过计算实际可能性进行优化的方法来充分理解冷冻保护剂在细胞和组织中的进出过程，但直接实验的方法仍然对冷冻保存过程的其他方面的发展起着重要的作用。

冷冻保存介质即冷冻保护剂，能减少冻融精子时所产生的物理和化学的应力（Gao et al., 1997; Purdy, 2006）。冷冻保护剂分为渗透性和非渗透性。渗透性冷冻保护剂（甘油、二甲基亚砷、乙二醇、丙二醇）能使脂质膜和蛋白重排，从而增加了膜的流动性，增强了低温下的脱水，减少了细胞内冰晶的形成，提高冷冻存活率（Holt, 2000）。此外，渗透保护剂是一种溶剂，能溶解冷冻保存介质中的盐和糖（Purdy, 2006）。非渗透保护剂（蛋黄、脱脂乳、海藻糖、氨基酸、右旋糖酐、蔗糖）不能通过脂质膜，只能在细胞外发挥作用（Aisen et al., 2000）。因此，非渗透保护剂能够改变脂质膜，或作为一种溶质，降低介质的冰点，减少细胞外冰晶形成（Amann, 1999; Kundu et al., 2002）。

对甘油冷冻保护作用的历史性发现是在 1984 年，当时 Polge 等（1949）发现鸡的精子在 1.1mol/L 甘油中冷却到 -76°C ，解冻后仅有少量损害。实际上许多常用的冷冻保存剂能穿透细胞膜，产生一些问题，而这种穿透细胞膜的性能在冷冻时是不需要的。渗透性冷冻保护剂如甘油和二甲基亚砷（DMSO）比水的渗透速度慢得多，因此它们会产生渗透瞬变，其严重程度和持续时间随着化合物和细胞的不同而不同。一般而言，渗透干扰在解冻和重悬浮细胞（溶质脱离细胞）期间的影响比在最初的平衡和冷却过程（溶质进入细胞）中的影响更严重。因为相对于皱缩，细胞对膨胀更敏感。在解冻和后续的操作中降低渗透干扰非常重要，因为它们可能会对储存的细胞和组织的产生严重损害。

最常用的精子冷冻保护剂是甘油。与非渗透性冷冻保护剂相似，甘油通过细胞脱水产生的渗透刺激发挥细胞外作用，因此减少细胞内可冻结水量。甘油可以穿过细胞膜在细胞内发挥作用，从而降低脱水所引起的细胞内渗透应力。这是通过替代维持细胞体积的细胞内水，与离子和大分子交换，并抑制水的冰点来实现的。渗透性冷冻保护剂（取决于所使用的浓度）是有毒的，并能导致细胞膜损害及降低精子活力。与确定最适当的冷冻速率及冷冻保护剂浓度和类型有关的重要细胞特征是表面体积比、细胞膜对水和冷冻保护剂的渗透性（和相应的活化温度）、细胞膜承受生理应激的能力。不同物种精子的细胞形态、体积、细胞器大小和组成等遗传特征不同，故冷冻时采取的方法也不同（Medeiros et al., 2002）。

目前，在生育能力保存技术中应用较广泛的渗透性冷冻保护剂（CPs）有三种：二甲基亚砷（DMSO）、乙二醇（EG）和丙二醇。这些保护剂有相似的属性：低温水溶性，细胞渗透性和相对较低的毒性。然而，每种 CPs 仍然有不同程度的膜渗透性，这已在哺乳动物卵母细胞中得到证实。

6. 种质的冷冻保存

6.1 为什么冷冻保存遗传物质？

辅助生殖技术（ART）为患者和具有商业价值的或濒危物种的生育力保存提供了一系列的方法。冷冻保存作为一种种质保存方法，已用于农业、水产业、生物工程和保护濒临灭绝的物种中（Holt, 1997; Andrabi & Maxwell, 2007）。

生育力冷冻保存是一个新兴领域，它包括多种治疗方法，主要是针对一些希望通过治疗能对未来的生育力产生影响的患者。虽然生殖能力保存多用于抗肿瘤治疗的患者，但也用于患有狼疮、肾小球肾炎、脊髓发育不良和年轻的卵巢早衰（POF）的患者（Jensen et al., 2011）。

目前的迹象表明精子的储存相当广泛，包括未来可能对男性生殖系统造成损伤的各种情况和环境。众所周知，精子冷冻保存主要影响其活力（Donnelly et al., 2001）。自从通过卵胞浆内单精子显微注射（ICSI）使一条可用精子使卵子受精之后，精子冷冻库得到了很快发展（Palermo et al., 1992）。与注射新鲜精子相比，子宫内注射解冻精子的成功率较低（Sherman, 1973），但只要解冻精子有活力，用解冻精子行 ICSI 也能成功（Kuczynski et al., 2001）。ICSI 可以使那些仅有少量幸存的精液精子甚至睾丸精子的男人使其配偶的卵子受精。ICSI 为一些精子质量和数量很低或精子来源不能再生的患者提供受孕及分娩的机会。

对于濒危物种，遗传物质的冷冻保存已用于对其遗传管理计划和遗传信息库（Holt, 1997）。现在，精子库更多用于保存罕见的家养品种（牛、绵羊、山羊和猪），但是利用精子库对濒危物种进行管理和保存的理念也正在广泛推广（Roth et al., 1997）。为了最大限度地提高遗传多样性，挽救一种珍贵的牛科动物就需要从 25 头不同的雄性牛科动物中收集 1,000 份精子进行保存（Comizzoli et al., 2000）。

如今，精子冷冻保存还有其他生物用途。其也可以用于解决濒危物种精液和 DNA 保存的问题，从而保护物种多样性。在辅助生殖中配子的冷冻保存很重要；卵子或精子的长期保存对那些将来要做 IVF 和人工授精的患者很重要，或者当捐赠者由于地域差和时间差而雌雄配子不能同步时，冷冻保存就是唯一的选择（Luvoni & Pellizzari, 2000）。精子、卵子和胚胎的冷冻保存可以为活着的或去世的濒危种群的男性或女性提供一种拯救遗传物质的潜在工具（Ciani et al., 2008; Cocchia et al., 2009; 2010）。

睾丸组织的冷冻保存至少使两种患者受益：接受化疗或放疗的青春期的男孩和接受睾丸活检的不育男性。尽管有人试图利用激素治疗保护生殖上皮（Meistrich et al., 1996; Thomson et al., 2002），但在治疗肿瘤期间，青春期的男孩经常会丧失产生精子的能力。尤其在骨髓移植时，精子的损害通常是不可避免的，同时 Leydig 细胞也可能会遭到破坏（Siimes & Rautonen, 1990）。在临床，青春期后的男孩和男人中，精液冷冻保存已经建立和并得到广泛的应用。另外对于他们来说，肿瘤治疗后自然生育能力的恢复也是一大益处（Song et al., 2010）。

由于供体-受体的同步化困难和传染病病原体的潜在传播，管理非冷冻生殖细胞（如精子或卵母细胞）和组织（如睾丸组织或卵巢组织）是存在问题的，这就限制了这些技术的广泛应用（Woods et al., 2004）。随着将低温生物学引入辅助生殖，人们意识到了大量关于配子和/或胚胎储存的道德伦理问题（Kelly et al., 2003）。

6.2 精子冷冻保存

应用最广泛的哺乳动物精子冷冻保存方法由一系列非生理性步骤组成，包括高渗性冷冻保护剂的添加、冷冻、复温和冷冻保护剂的去除。一些研究专注于决定最佳冷冻保护剂添加和去除、冷冻和复温速率的基础生物物理条件上 (Morris et al., 1999)。基于此方法，理论上是可以计算冷冻保存剂的最小用量的。精子冷冻保存已成功用于人和牛科动物的生殖技术。此类精子最成功的冷冻保存方法是首先用慢冷冻速率 (1~5 °C/min) 将精子从室温降到植冰温度，然后于冰晶形成后，再由蛋黄-柠檬酸介质缓冲的甘油中快速冷冻 (100~200 °C/min)。

在从体温降到接近冰点的过程中，哺乳动物的精子非常敏感。人们观察到，被称为冷休克精子损伤表现为复温后不可逆的活力丧失。另外，人们用不能穿透完整质膜的染料来观察细胞内染色，发现冷休克能够影响细胞的其他功能，比如膜丧失渗透选择性。电镜下，冷休克最明显的表现为顶体膜的破裂。

冷冻过程中发生超微结构、生化和功能的变化，会损害精子在女性生殖道内的运输和生存，并降低家养品种的生育力 (Salamon & Maxwell, 2006)。冷冻保存时精子对外界环境更加敏感 (Bailey et al., 2000)。冷冻后细胞膜的通透性增加，这可能是由于特异蛋白通道膜泄漏增加的后果。冷休克降低细胞膜对水和溶质的渗透性，并损害顶体膜 (Purdy, 2006)。钙调节影响精子获能及质膜和顶体膜的融合，对细胞功能有极大的损伤，包括细胞死亡。在冷冻过程中，获能时精子膜结构发生重组。人们检测到公羊的超微结构损害比公牛要大，主要损害发生在质膜和顶体膜、线粒体鞘和鞭毛轴丝中 (Salamon & Maxwell, 2006; Barbas & Mascarenhas, 2009)。

对精子玻璃化冻存的研究较少。传统的玻璃化冷冻技术不能用于冻存人类精子，因为冷冻时使用的高浓度渗透保存剂 (30%~50%) 会导致致死性的渗透休克损害。这也是为什么玻璃化冷冻主要用于卵母细胞和胚胎的原因所在。另一种选择是对非常小的标本进行快速冷冻和解冻。已证实利用没有冷冻保护剂的冷冻环对人的精子进行玻璃化保存是可行的 (Nawroth et al., 2005)。此外，为什么没有冷冻保护剂也能进行玻璃化冷冻呢？这可能取决于人类精子的大小和相对于其他哺乳动物 (公猪、公牛、公羊、兔子、猫、狗、猪和马) 的更佳稳定性。另外，在人精子中，非渗透性水的量较多，并且与一些大分子结构如 DNA，组蛋白和透明质酸酶等相结合 (Thurston et al., 2002)。因此，精子内高分子量复合物的数量比胚胎高 6~16 倍，从而增加了黏滞性和玻璃化温度。与慢速冻融精子相比，玻璃化冷冻的精子 DNA 完整性更好。这些研究证实可以接受大范围的精子冷冻速率 (Isachenko et al., 2003; 2004a; 2004b; Nawroth et al., 2005)。

一些中心提供睾丸组织的冷冻保存，但仍处于实验阶段；其未来的潜在用途包括将精原细胞体外培养成精母细胞或者把生殖细胞移植到自体睾丸组织中。

7. 女性种质冷冻保存

7.1 前言

在过去的 55 年里，生殖生物学即 IVF，包含对胚胎和卵子保存 (Fuller & Paynter, 2004)。现在，对于那些想要保存遗传物质以备将来使用的女性患者来说，胚胎或卵子的冷冻保存是唯一的选择。

利用保存种质（卵子和胚胎）来保护女性的遗传物质。通过保存卵巢组织和整个卵巢移植后卵子成熟或自然妊娠实现。

对地球上大多数物种来说，利用现代冷冻保存技术，只能对男性精子进行保存，对卵子和任何阶段的胚胎却不行，主要是因为他们在大小、组成和相关结构上差别较大。因此，即使是在慢速冷冻时，细胞内冰晶形成仍是主要问题。

胚胎冷冻保存是生育能力保存的一种方法。关于胚胎冷冻保存成功的报道有 Whittingham (1977), Whittingham et al. (1972), Wilmut (1972) and Wilmut & Rowson (1973), 这比 Polge (1949) 成功冷冻精子晚了 20 多年。在很多年后冷冻模式形成了一个基本方案 (Willadsen et al., 1976; 1978), 并且这种方案目前仍被广泛应用, 因此, 胚胎冷冻库有助于建立一个原始种群, 其最终目的是放归荒野 (Ptak et al., 2002)。然而, 进化使每个物种在很多方面具有独特性, 其中之一就是高度特化的生殖能力适应的发展, 特化是定义一个物种的一部分。虽然在人类、牛、羊、鼠中, 通过移植冷冻-解冻胚胎产生了成千上万的后代, 但是在许多其他物种中即使物种非常接近其成功率仍较低 (Abe et al., 2011; Aller et al., 2002)。

迄今为止, 包括人类、家畜和实验室动物在内, 胚胎冻存的相关报道仅有 40 例左右。对野生动物, 尤其是濒危动物来说, 冻存胚胎几乎是不可能的, 而且获取卵子或胚胎的机会也非常小。为了克服这一局限, 研究人员发现必须在胚胎冻存所需的生殖技术发展过程中, 利用实验室、农场或伴侣动物作为模型。在某些情况下, 人们发现了合适的模型物种。例如, 对家猫的研究有助于形成多种技术, 将来用于研究非家养猫科动物中 (Dresser et al., 1988; Pope et al., 1984; Pope, 2000; Cocchia et al., 2010), 或者牛可以做为研究其他有蹄动物的模型 (Loskutoff et al., 1995)。不幸的是, 对于很多动物 (如大象、犀牛) 来说, 仍没找到合适的模型, 研究者只能利用研究其他物种所得到的有限资源来进行研究 (Bilton & Moore, 1976; Breed et al., 1994)。

虽然对少数哺乳动物的胚胎进行冻存的尝试非常有限, 但也取得了一些成功。从保存角度来看, 胚胎冻存对父母双方整个互补遗传信息保存很有利, 但是通过获得胚胎来保存女性有价值的遗传物质是不可能的。那么, 在许多情况下, 卵子和卵巢组织的冷冻保存成为一种很有吸引力的潜在的女性生殖细胞保存的方法, 以便在以后的辅助生殖中使用。(Vajta & Nagy, 2006; Abir et al., 2006; Whittingham & Adams, 1974)。

人类化疗和/或放疗可以引起大多数女性癌症患者发生卵巢早衰 (POF)。一些患者可能因为太虚弱或太年轻而不能经受生育治疗, 或因为患有激素敏感性肿瘤而不能接受标准的治疗方法。现在随着抗肿瘤治疗的不断改善, 年轻女性肿瘤患者的生存率也在逐步提高。然而, 用于肿瘤治疗的电离辐射和抗肿瘤药物大多数烷化剂 (如, 白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、异环磷酰胺、噻替哌) 常常引起 POF, 使患者不育。除此之外, 用于治疗癌性和非癌性血液病的骨髓移植, 也会最终导致卵巢衰竭, 因为骨髓移植前需要大量的放疗和化疗来破坏先前存在的骨髓。而且, 可能除了乳腺肿瘤以外, 几乎所有的肿瘤在被诊断后不久就要启动化疗方案。因为取卵的准备和刺激一般需要 2~3 周或更长, 所以为成年女性肿瘤患者冻存胚胎的方法通常是不可行的。即使对乳腺癌患者来说, 大部分人也不能成为卵子或胚胎冻存的候选者, 因为高水平的雌激素可能会对

原发肿瘤产生不利影响。另外，并不是所有患者都有能使她们的卵子形成胚胎以便冻存的配偶。

因此，对大多数生育年龄的女性肿瘤患者来说，迄今为止，还不能用辅助生殖技术来为她们的生育能力提供保障。

对将要面临抗肿瘤治疗的女性来说，卵巢组织和卵子的冷冻保存可以为将来生育潜力的存储提供希望。

由于伦理、宗教以及政府规定等原因，卵子的冻存为单身女性提供了未来的“社会选择”。灵长类动物作为很多领域的人类研究模型，当涉及到冷冻保存雌性种质时，事情就反过来了(Almondin et al., 2010; Cranfield et al., 1992)。企业需要将冻融移植技术推广到养牛业以达到商业化水平(Abe & Hoshi, 2003; Armstrong et al., 1995)。据国际 ET 协会的最新报道，到 2008 年全球大约有超过 300,000 个冻融牛胚被移植。牛卵子冷冻非常成功，同时也促进了其他相关技术的发展，如超促排卵技术、捡卵技术和无需手术的体外胚胎培养(IVEP)。

在许多国家，尤其是南亚、欧洲地中海地区和南美，家养水牛是一种多用途的牲畜，是边际农民和无地劳动者工作中不可缺少的劳动力来源。辅助生殖技术的最近进展包括超促排卵，捡卵和卵子冷冻保存，为水牛优良基因的广泛开发和传播提供了无数的可能性。虽然，马可能是第一种接受人工授精并从中受益的动物，但是它落后于应用胚胎移植和其他卵母细胞和胚胎相关的现代繁殖技术的领域。

虽然极少能采集到野生动物尤其是濒危动物的胚胎，但获得其卵子或卵巢是很有可能，最终也可以在死后获得。例如，雌性动物生殖组织的冻存是猫科动物辅助生殖程序中的重要部分。配子的冻存是高效 ART 发展的重要工具，卵子的冻存能促进家养动物和野生动物遗传信息的保存。已证实家养猫的卵母细胞可以作为相关野生猫移植细胞核的成功受体(Cocchia et al., 2010)。

生物多样性的维护具有保护珍贵的家养猫遗传信息的内在价值，也具有保存管理物种相近的野生猫科物种的外在价值(Luvoni, 2006)。对于不同野生物种如食肉动物和有蹄动物，这些观点也是有效的。然而，已经利用一些物种，如人类(Chen, 1986)、鼠、牛、马(Maclellan et al., 2002)的冷冻卵子产生了其存活后代。可以在不同阶段进行冷冻前卵母细胞的采集或体外胚胎培养。通过手术或者尸检的方法，从新生的或性未成熟的动物卵巢或卵巢组织中能收集到非常早期的成熟或不成熟(GV)的卵子。也可以通过激素刺激和非手术取卵的方法，从青春期后的女性和哺乳动物身上获得成熟(MII)的卵母细胞。

卵子需要发育到 MII 阶段 MII 期才能受精，否则受精几率会非常低(Luvoni & Pellizzari, 2000)。因此，体外成熟(IVM)程序应该着手处理非成熟卵母细胞，目前此程序仅在极少数物种中得到了发展，其成功也是相当有限的(Krisher, 2004)。此外，化学刺激后非成熟卵子的采集破坏了自然成熟过程，因此即使这些卵子在体外成熟但其质量已受到了影响(Moor et al., 1998; Takagi et al., 2001)。在卵母细胞成熟和卵泡生长过程中，卵母细胞积聚了大量的 mRNA 和蛋白用于减数分裂的延续、受精和胚胎的发育(Krisher, 2004)。在 IVM 过程中由于缺乏整个支持系统，一些必需物质的生成被阻断，最终导致卵母细胞质量欠佳(Krisher, 2004)。尽管对此进行了大量的研究(Coticchio

et al., 2004), 但到目前为止, 没有形态学的或其他的方法能够准确预测哪种卵母细胞的发育潜能最佳。即使如此, 可以清楚地认识到卵子的质量是 IVF 成功、早期胚胎存活、建立和维持妊娠、胚胎发育、甚至是人类疾病的主要决定因素 (Coticchio et al., 2004; Krisher 2004; Wolf et al., 1989)。一旦所有这些难题被克服并牢记卵母细胞质量的重要性, 下一个需要克服的难题就是卵母细胞的冷冻保存 (Allen, 2010)。

7.2 卵母细胞的冷冻保存

7.2.1 影响卵母细胞冷冻的因素和解决方案

卵子冷冻保存与精子和胚胎冷冻保存不同, 哺乳动物卵母细胞的体积是精子的 3~4 倍, 这大大降低了表面积与体积比, 并使卵母细胞对冷却非常敏感, 对细胞内冰晶形成也高度敏感 (Ruffing et al., 1993; Arav et al., 1996)。

这个问题在脊椎动物 (鱼类, 鸟类, 两栖类和爬行类) 中更明显, 这些动物的卵母细胞比哺乳动物的要大 (Guenther et al., 2006)。例如两栖动物的卵母细胞是人类卵母细胞的 20~25 倍。冻存卵母细胞时要考虑到以下几个参数: 细胞特征、冷冻保护剂的渗透性、毒性、温度和在冷冻保护剂中的暴露时间。冷冻损伤是成功冻存卵母细胞的主要障碍。据报道, 冷冻损失会对细胞膜、微管、细胞骨架和透明带产生影响。人和鼠的卵母细胞在冷冻保存后也会发生染色体异常。最引人注目的是, 冷冻会对第二次减数分裂的纺锤体产生影响, 由于微管蛋白解聚造成微管断裂或分解。

有几种方法已被用于克服冷冻所造成的损害。通过在整个过渡阶段快速冷冻或添加一些物质如蛋白 (亚麻油酸-白蛋白)、糖 (蔗糖或海藻糖)、抗氧化剂 (丁羟甲苯) 来稳定质膜以对抗卵母细胞热效应, 使冷冻损害得到了明显改善。另外, 在冷冻溶液中添加胆碱和高浓度蔗糖更利于染色体的完整分离, 这堪比新鲜采集卵母细胞 (Willadsen et al., 1974)。

7.2.2 减数分裂阶段的影响

减数分裂阶段似乎影响冷冻卵子的存活率。冷冻保存过程中卵母细胞对冷冻的敏感性差异与减数分裂过程中的细胞周期有关。第二次减数分裂中期 (MII) 的卵子是非常脆弱的, 这主要是与它的大体积、含水量和染色体排列有关。在成熟卵母细胞中, 减数分裂中期染色体在纺锤体作用下沿赤道板排列。

人们观察到, 在降温和冻存时, 由于减数分裂的纺锤体发生改变, 从而导致成熟卵母细胞的染色体畸变增加。MII 期卵母细胞对冷冻损伤较敏感, 这是由于在慢速冷冻过程中, 中期纺锤体微管完整性被破坏, 从而导致解冻后卵母细胞受精后出现非整倍体。MII 期卵母细胞质膜渗透性较低, 因而使水和冷冻保护剂 (CPs) 的运动减慢 (Ruffing et al., 1993)。同时 MII 期卵母细胞被透明带包绕, 这对水和 CPs 进出细胞又是一层附加的障碍。在冷冻-解冻过程中, 可能会发生过早的皮质颗粒胞吐作用, 从而导致透明带硬化, 使精子不能穿入和受精, 此过程可以通过卵胞浆内单精子显微注射 (ICSI) 技术或透明带下精子注射来克服 (Mavrides & Morroll, 2005)。卵母细胞胞质内脂质含量较高, 从而增加了其对冷冻的敏感性 (Ruffing et al., 1993)。同时它们的细胞膜肌动蛋白微管含量较少, 这使它们的细胞膜不够强劲。冷冻保存能引起细胞骨架分裂, 染色体和 DNA 异常 (Luvoni, 2006)。MII 期形成的纺锤体对冷冻损伤很敏感, 同时也可能缺乏抵抗力

(Ciotti et al., 2009)。然而, 确实发现在解冻或复温和 IVC 后冷冻损伤有一定程度的恢复, 并且玻璃化冷冻比慢速冷冻恢复得快 (Ciotti et al., 2009)。卵母细胞对活性氧的损害更加敏感 (Gupta et al., 2010)。虽然在冷冻保存方面取得了许多进步, 但是尤其对于卵母细胞 (排卵的, 成熟或不成熟的) 来说, 冷冻保存仍然不被认为是一个既定程序, 其当前的标签只是实验技术 (Noyes et al., 2010)。

冻存成熟卵母细胞的替代方案是冷冻已近成熟形态和刚开始减数分裂的卵母细胞, 但必须确保其成熟和进入 MII 前冷冻 (Luvoni & Pellizzari, 2000)。有证据表明冷冻生发泡 (GV) 期的卵母细胞比冷冻 MII 的卵母细胞存活率要高。此外, 冷冻 GV 期的卵母细胞的纺锤体异常率较冷冻 MII 卵母细胞低。这个阶段的卵母细胞不含有对冷冻损伤敏感的微管或纺锤体。然而, 也有几个相矛盾的报道显示: 未成熟卵母细胞比成熟卵母细胞对冷冻更敏感, 这可能与未成熟卵母细胞的细胞膜稳定性较低和特殊细胞骨架形成有关, 也可能与卵丘复合物的损害或成熟过程中卵丘细胞和卵母细胞间的沟通中断有关。即使 GV 期卵母细胞解冻后存活率较高并且纺锤体损害较低, 但是其低效的体外成熟方案使最终获卵率与冻存 MII 期卵母细胞最终获卵率相似。

目前已经证实采用程序化冷冻或玻璃化冷冻在冷却 (核水平)、冷冻和解冻过程对未成熟卵母细胞造成损害似乎很小 (Luvoni & Pellizzari, 2000; Arav et al., 1993)。可以将囊前卵母细胞保存在于卵泡中, 大约 10% 的囊前卵泡在解冻并培养 1 周后有生理活性 (Nayudu et al., 2003)。虽然已对一些物种进行了尝试, 但是促进卵母细胞生长并完全成熟的培养条件仍是未知。唯一一个利用新鲜的 (Eppig & O'Brien, 1996) 或冷冻-复苏的 (Carroll et al., 1990) 初级卵泡产生幼崽的是鼠类。在猫科动物中也有非常有限的成功报道, 他们在 40% 的乙二醇 (EG) 中进行玻璃化冷冻, 仅 3.7% 的体外成熟卵母细胞可以发展到囊胚阶段进行 IVF (Murakami et al., 2004)。

早期阶段卵母细胞体外成熟相伴随的问题是需要开发复杂的内分泌系统以及其他的培养条件 (例如氧气压力), 以此保障和支持不同阶段卵母细胞的发育, 确保卵母细胞的存活。在很多物种中, 需要有持续的时间来保证卵泡的培养。冷冻离体卵母细胞的另一个方法是冷冻个体的原始卵泡, 随后将其移植到卵巢囊内, 在这里它们可以进一步成熟并最终在自然交配后产生后代, 这在鼠类中已经实现。另外一个方法是, 可以将卵巢皮质组织或整个卵巢冷冻或玻璃化, 然后再解冻, 将其移植并进一步在体内成熟 (Candy et al., 1995), 或者将卵母细胞授精形成胚胎后冷冻保存。

7.3 女性种质冷冻保存技术

冷冻保存是将组织保持在在 $-140^{\circ}\text{C} \sim -200^{\circ}\text{C}$, 在此温度范围内不会发生任何生物活性, 组织处于一种可以长期维持的“假死”状态。它是降温和升温的过程, 不是长期的冷冻保存, 这对细胞或组织是有损伤的。冷冻保存成功与否与组织、冷冻保护剂和所使用的冻存管有关。

最近几年, 卵母细胞的冻存方法不断改进, 包括改变慢冷冻介质中蔗糖和钠的浓度, 随着第一例玻璃化冷冻卵母细胞的成功报道和新型冷冻工具的发展, 冷冻卵母细胞的存活率和妊娠率得到了持续的改进。现在, 有两项基本的技术被用在女性生殖细胞冻存中, 即慢速冷冻技术 (Whittingham, 1977; Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972; Willadsen

et al., 1976; 1978) 和玻璃化冷冻技术。在大部分 IVF 中心, 慢速冷冻方法是一个标准的操作程序, 但是非常耗时。在慢速冷冻过程中, 将种质逐步暴露于浓度较低的渗透性冷冻保护剂 (CPs) 中。其培养介质中加入 1.0~1.5 mol/L 的甘油或 DMSO。其他冷冻保护剂也被广泛应用, 他们可以单独使用或组成不同的组合。这些保护剂包括渗透性 CPs 如乙二醇 (EG) 和丙二醇 (PROH) (Chen, 1986) 和非渗透 CPs 如蔗糖、葡萄糖或果糖。然后, 种质以较小的体积被装进麦管内, 以 $-1\sim-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却到 $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在 $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 植冰, 然后以 $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却到 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 放入液氮前自由降温到 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。这个过程一般需要 3 h。至今, 没有足够的证据显示这么慢的冷冻过程是必要的。

另一个改善卵母细胞存活率的方法是玻璃化冷冻。玻璃化冷冻是一个超速冷冻方法, 其需要 3 个主要因素: 高冷冻速率、高黏度介质和小体积 (Arav, 1992; Arav et al., 2002)。高冷冻速率可以通过直接把样品放到液氮中来实现。把样品直接放入液氮中可使冷却速率达到每分钟数百到上万摄氏度, 这主要与容器、体积、热导率、溶液成份等有关。为了加快冷冻速率, 液氮浆取代了液氮。可以用真空将液氮变成液氮浆。想要得到液氮浆, 需要将液氮冷却到凝固点 ($-210\text{ }^{\circ}\text{C}$)。利用真空仪 VitMaster (IMT LtdNess Ziona, Israel) 产生浆状物, VitMaster 是一种能把液氮的温度降到 $-205\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的设备。卵母细胞或胚胎悬浮在黏性介质中。这是根据玻璃化过程中使用的不同 CPs 和其他添加物的浓度和性能定义的。CPs 浓度越高, 玻璃化转化温度 (T_g) 就越高, 因此冰核形成和结晶的机会就越低。不同的 CPs 和其他添加物有不同的毒性、渗透率和 T_g 。不同的 CPs 结合后往往能增加介质黏度和 T_g , 降低毒性。在畜牧业中, 为了避免操作后复温胚胎, 并允许能直接进行胚胎移植, EG 因为穿透率较经常被作为渗透性冷冻保护剂使用 (Saha et al., 1996)。

最近, 由最小体积的 15% (V/V) EG, 15% (V/V) DMSO 或 PROH 和 0.5 mol/L 蔗糖混合而成的低浓度溶液被用于人卵母细胞的玻璃化冷冻中。这种方法进一步减少溶剂的毒性。另一种减少溶液毒性的方法是利用 0.25 mL 的传统麦管实现冷冻保护剂的逐步平衡。冷冻速率为 2, 500 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 复温速率为 1, 300 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。利用最小的体积, 较高的冷冻速率可以使其玻璃化。在过去的十年里, 人们开发了很多减小样本体积的技术。这些技术通常可以分成两类: 表面技术和管技术。表面技术包括: 电镜网 (EM grid)、最小滴体积 (minimum drop size) MDS (Arav 1992; Arav & Zeron, 1997)、冷冻薄膜 (Cryotop)、冷冻环 (Cryoloop)、半麦管 (Hemi-straw)、固体表面 (solid surface)、尼龙网栅 (nylon mesh)、冷冻薄片 (Cryoleaf)、直接覆盖玻璃化 (direct cover vitrification)、纤维塞 (fiber plug)、玻璃化板 (vitrification spatula)、Cryo-E, 塑料片 (plastic blade) 和 Vitri-Inga。管技术包括: 塑料麦管 (plastic straw)、手工控制的不封口的毛细管 (open pulled straw, OPS)、手工拉制的封口的毛细管 (closed pulled straw, CPS)、柔性吸管 (flexipetdenuding pipette)、超细的 OPS (superfine OPS)、冷冻尖 (CryoTip)、吸管尖 (pipette tip)、高安全性玻璃化仪 (high-security vitrification device)、手工拉制的密封的麦管 (sealed pulled straw)、冷冻管 (Cryopette)、Rapid-i 和 麦管 JY (JY Straw)。这两种技术各有其优点。表面技术中, 小滴 ($<0.1\text{ mL}$) 能达到较高的冷却/复温速率, 因为这些系统是开放

的。冷冻管技术也可以在封闭系统中达到较高冷却率，此时样本不接触液氮，这使处理更安全、更简单。降低玻璃化体积和增加冷冻速率可使 CP 的浓度适当降低，从而减少了毒性和渗透损害作用 (Barcelo-Fimbres & Seidel, 2007)。冷冻薄膜技术也得到了改良，其使用密封容器来储存以消除传播疾病的潜在威胁。

7.4 卵巢组织的冷冻保存

卵母细胞另一个来源是从冷冻保存的卵巢组织中得到。1mm 大的卵泡易在卵巢皮质中被发现，吸取大于 5 mm 的卵泡可以获得未成熟的卵丘-卵母细胞复合体。

在处理卵巢组织过程中，较小的窦卵泡破裂释放出卵母细胞并落到皿的底部，其大小和质量变化于无功能的裸卵到更大的有卵丘包绕的卵母细胞之间。从每个皿的底部收集卵母细胞，并在体外成熟达 40 小时。在培养 24 小时，包绕在卵母细胞周围的卵丘颗粒细胞，开始分裂导致卵丘细胞分化和膨胀。当培养到 40 小时，卵母细胞脱离卵丘细胞并进入减数分裂阶段；我们把最终的 MII 期的卵母细胞玻璃化冷冻保存起来以备将来使用。虽然有很多利用冷冻的体内成熟卵母细胞妊娠的报道，但是仅有极少数是用玻璃化冷冻的体外成熟卵母细胞妊娠的，目前尚无利用慢速冷冻方法从冷冻保存的卵巢组织获得的卵母细胞体外成熟而妊娠的报道。如前所述，正常卵巢的皮层中充满了静止的、未成熟的原始卵泡，在每 1mm^3 的组织中有数以百计的原始卵泡。与冷冻胚胎和成熟的卵母细胞不同，皮质层中原始卵泡内含有较小的卵母细胞，当组织被切成 $1\sim 2\text{mm}\times 1\sim 2\text{mm}\times 10\text{mm}$ 的小条时这些卵母细胞冷冻后很容易存活。

常用的卵巢组织慢速冷冻方案如下：首先在 1.5 mol/L 乙二醇和 0.1 mol/L 蔗糖中孵化 20~30 min 后，将含有卵巢组织块的冷冻管以 $-2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却至 $-7\text{ }^\circ\text{C}$ ，植冰，再以 $-0.3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度冷却至 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ ，在放入液氮储存前自由降温至 $-100\text{ }^\circ\text{C}$ 。冷冻管在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴箱中解冻，用浓度逐步降低的冷冻保护剂 (1.5、1.0、0.5、0) 亚甲基乙二醇清洗组织块。

冷冻卵巢组织的首次移植是在小鼠体内成功完成的，此后又在羊和灵长类动物中取得了成功，它们的卵巢更像人类的卵巢。在过去的几年里，有 30 多例报道描述了把冷冻保存的或玻璃化的组织异位移植到异位部位如前臂，以及原位部位如腹部或残余卵巢中。人们发现，一般情况下，卵巢组织移植 3~5 个月内激素恢复其分泌周期，这标志着卵泡被重新募集并开始生长。至今，卵巢组织移植已诞生了六个孩子。把卵巢皮质从卵巢上分离后，将其切成细条，并按前述的方法对其冷冻保存；然而由于初级和次级卵泡较大，所以很难在原位冷冻过程中存活。人们推测，分离单个的卵泡可以使冷冻保护剂更好的渗透，从而有助于稳固卵泡细胞和卵母细胞间的自然连接。因此，我们可以把皮质切成较小的碎片 (2mm^3) 并利用一些酶 (如裂解酶或胶原酶) 将其间质组织分解，释放出小卵泡并冷冻保存以供使用。已证实在小鼠、灵长类动物和人类中，用慢速冷冻方法能成功保存小的次级卵泡。解冻后，单个卵泡被封装到 3D 介质中，如藻酸盐，这是一种从海藻中提取的水凝胶，它允许氨基酸和激素自由通过，并可以作为卵泡发育的载体。已证明从青春期前的小鼠卵巢中分离出来的新鲜卵泡在藻酸盐中培养 8 天，能从 $150\text{ }\mu\text{m}$ 长到 $350\text{ }\mu\text{m}$ 。

8. 结论

在过去 20 年里, 辅助生殖技术得到了广泛的应用, 同时冷冻保存技术的发展和使用时也在迅速增加。冷冻保存技术是现代生殖治疗的一个重要的红利。目前已可以冷冻保存不同发育阶段的配子和胚胎, 这就为患者提供了一个满足其个人生育问题的选择空间。生殖细胞和组织冷冻保存技术的发展除了改进了人类不孕症的治疗模式外, 还帮助人类更好地管理了家畜和实验室动物物种, 并且更好地保护了生物多样性。

总之, 在辅助生殖技术中, 冷冻保存技术的应用产生了一系列的道德和伦理问题, 其中很多问题尚未解决并将继续产生相当大的争论。

9. 参考文献

- Abe , H. & Hoshi , H. (2003). *Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media* , *Journal of Reproduction and Development* Vol.49:193-C202.
- Abe , Y.,Suwa , Y.,Asano , T.,Ueta , Y.Y.,Kobayashi , N.,Ohshima , N.,Shirasuna , S.,Abdel-Ghani , M.A.,Oi , M.,Kobayashi , Y. et al. (2011). *Cryopreservation of canine embryos* , *Biology of Reproduction* [in press].
- Abir , R.,Nitke , S.,Ben-Haroush , A.,& Fisch , B. (2006). *In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance , progress in mammals , and methods for growth evaluation* , *Histol Histopathol* Vol.21(No. 8):887-898.
- Aisen , E.G.,Alvarez , H.L.,Venturino , A. & Garde , J.J. (2000). *Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents* , *Theriogenology* Vol.53:1053-1061.
- Ali , J. & Shelton , J.N. (1993). *Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos.*,*J Reprod Fertil* Vol. 99(No.2):471-477.
- Allen , W.R. (2010). *Sex , science and satisfaction: a heady brew* , *Animal Reproduction Science* Vol. 121:262-278.
- Aller , J.F.,Rebuffi , G.E.,Cancino , A.K. & Alberio , R.H. (2002). *Successful transfer of vitrified llama (Lama glama) embryos* , *Animal Reproduction Science* Vol.73:121-127.
- Almodin , C.G.,Minguetti-Camara , V.C.,Paixao , C.L.,& Pereira , P.C. (2010). *Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes* , *Human Reproduction* Vol.25:1192-1198.
- Amann , R.P. (1999) *Cryopreservation of sperm* , In: *Knobil E , Neill JD (eds) Encyclopedia of reproduction* , Academic Press , Burlington , MA , pp 773-783.
- Andrabi , S.,& Maxwell , W. (2007). *A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species* , *Anim Reprod Sci* Vol.99:223-243.
- Arav , A. (1992). *Vitrification of oocytes and embryos* , In *A Lauria & F Gandolfi (eds) New Trends in Embryo Transfer* , Cambridge: Portland Press , pp 255-264.
- Arav , A. & Zeron , Y. (1997). *Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the*

- cooling conditions , *Theriogenology* Vol.47:341.
- Arav , A.,Shehu , D. & Mattioli , M. (1993). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes , *Journal of Reproduction and Fertility* Vol.99:353-358.
- Arav , A.,Zeron , Y.,Leslie , S.B.,Behboodi , E.,Anderson , G.B. & Crowe , J.H. (1996) Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* Vol.33:589-599.
- Arav , A.,Yavin , S.,Zeron , Y.,Natan , D.,Dekel , I.,& Gacitua , H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation , *Molecular and Cellular Endocrinology* Vol.187:77-81.
- Armstrong , D.L.,Looney , C.R.,Lindsey , B.R.,Gonseth , C.L.,Johnson , D.L.,Williams , K.R.,Simmons , L.G. & Loskutoff , N.M. (1995). Transvaginal egg retrieval and in-vitro embryo production in gaur (*Bos gaurus*) with establishment of interspecies pregnancy , *Theriogenology* Vol.43:162.
- Bailey , J.L.,Bilodeau , J.F. & Cormier , N. (2000). Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon , *J Androl* Vol.21:1-7.
- Barbas , J.P.,& Mascarenhas R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells , *Cell Tissue Bank* Vol.10:49-62.
- Barcelo-Fimbres , M. & Seidel , G.E. Jr. (2007). Effects of fetal calf serum , phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation , *Molecular Reproduction and Development* Vol.74:1395-1405.
- Barrett , S.L. & Woodruff , T.K. (2010). Gamete preservation *Cancer Treat Res* Vol.156:25-39.
- Berg , van den L. (1959). The effect of addition of sodium and potassium chloride to the reciprocal system: KH_2PO_4 , $\text{P}_04\text{-Na}_2$, $\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ on pH and composition during freezing , *Arch Biochem* , Vol.84 , 305-315.
- Berg , van den , L. & Rose , D. (1959). Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2$, $\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$, *Arch Biochem* Vol.81 , 319-329.
- Bilton , R.J. & Moore , N.W. (1976). In vitro culture , storage and transfer of goat embryos , *Australian Journal of Biological Sciences* Vol.29:125-129.
- Breed , W.G.,Taggart , D.A.,Bradtko , V.,Leigh , C.M.,Gameau , L. & Carroll , J. (1994). Effect of cryopreservation on development and ultrastructure of preimplantation embryos from the dasyurid marsupial *Sminthopsis crassicaudata* , *Journal of Reproduction and Fertility* Vol.100:429-438.
- Bunge , R.G. & Sherman , J.K. (1953).. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa , *Nature* Vol.172:767-768.
- Candy , C.J.,Wood , M.J. & Whittingham , D.G. (1995). Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod* Vol.10(No.9):2334-2338.
- Carroll , J.,Depypere , H.,Matthews , C.D. (1990). Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes , *J Reprod Fertil* Vol.90(No.2):547-553.
- Chen , C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation , *Lancet* Vol.1:884-886.
- Ciani , F.,Cocchia , N.,Rizzo , M.,Ponzio , P.,Tortora , G.,Avallone , L. & Lorizio , R. (2008). Sex

- determining of cat embryo and some feline species , *Zygote* , Vol.16(No.2):169-177.
- Ciotti , P.M.,Porcu , E.,Notarangelo , L.,Magrini , O.,Bazzocchi , A. & Venturoli , S. (2009). Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing , *Fertility and Sterility* Vol.91:2399-2407.
- Cocchia , N.,Ciani , F.,El-Rass , R.,Russo , M.,Borzacchiello , G.,Esposito , V.,Montagnaro , S.,Avallone , L.,Tortora , G. & Lorizio , R. (2009). Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction , *Zygote* Vol.18(No.1):1-8.
- Cocchia , N.,Ciani , F.,Russo , M.,El Rass , R.,Rosapane , I.,Avallone , L.,Tortora , G. & Lorizio , R , (2010) Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture , *Cryobiology* Vol.60(No.2):229-34.
- Comizzoli , P.,Mermillod , P. & Mauget , R. (2000). Reproductive biotechnologies for endangered mammalian specie , *Reprod Nutr Dev.* Vol40(No.5):493-504.
- Coticchio , G.,Sereni , E.,Serrao , L.,Mazzone , S.,Iadarola , I. & Borini , A. (2004). What criteria for the definition of oocyte quality? *Annals of the New York Academy of Sciences* Vol.1034:132-144.
- Cranfield , M.R.,Berger , N.G.,Kempske , S.,Bavister , B.D.,Boatman , D.E. & Ialeggio , D.M. (1992). Macaque monkey birth following transfer of in vitro fertilized , frozen thawed embryos to a surrogate mother , *Theriogenology* Vol.37:197.
- Donnelly , E.T.,Steele , E.K.,McClure , N. & Lewis , S.E. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation , *Hum. Reprod.* Vol.16:1191-1199.
- Dresser , B.L.,Gelwicks , E.J.,Wachs , K.B. & Keller , G.L. (1988). First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring , *J Exp Zool* Vol.246(No.2):180-186.
- Edwards , R.G.,Bavister , B.D. & Steptoe , P.C. (1969). Early Stages of Fertilization in vitro of Human Oocytes Matured in vitro , *Nature* Vol.221 , 632-635.
- Eppig , J.J.,O'Brien , M.,Wigglesworth , K. (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro , *Mol Reprod Dev* Vol.44(No.2):260-273.
- Fabbri , R. (2006). Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue , *Cell Tissue Bank* Vol.7(No.2):113-122.
- Fabbri , R.,Pasquinelli , G.,Braconer , G.,Orrico , C.,Di Tommaso , B. & Venturoli , S. (2006). Cryopreservation of human ovarian tissue , *Cell Tissue Bank* Vol.7(No.2): 123-133.
- Farrant , J.,Walter , C.,Lee , H. & McGann , L. (1977). Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing , *Cryobiology* Vol.14:273-286.
- Fuller , B. & Paynter , S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine , *Reprod Biomed Online* Vol.9(No.6):680-691.
- Fuller , B. & Paynter , S. (2007). Cryopreservation of mammalian embryos , *Methods Mol Biol* Vol.368:325-339.
- Gao , D.Y.,Mazur , P. & Critser , J.K. (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa , In: Karow AM , Critser JK (eds) *Reproductive tissue banking* , Academic press , San Diego pp 263-327.

- Guenther , J.F.,Seki , S.,Kleinhans , F.W.,Edashige , K.,Roberts , D.M. & Mazur , P. (2006). Extra- and intra-cellular ice formation in stage I and II *Xenopus laevis* oocytes , *Cryobiology* Vol.52:401-416.
- Gupta , M.K.,Uhm , S.J. & Lee , H.T. (2010). Effect of vitrification and betamercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization , *Fertility and Sterility* Vol93:2602-2607.
- Herrero , L.,Martinez , M. & Garcia-Velasco , J.A. (2011). Current status of human oocyte and embryo cryopreservation , *Curr Op Obstetr Gynecol* Vol.23(No.4):245-250.
- Holt , W.V. (1997). Alternative strategies for long-term preservation , *Reprod Fertil Dev* Vol.9:309-319.
- Holt , W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage semen , *Anim Reprod Sci* Vol.62:3-22.
- Isachenko , E. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success , *Reprod Biomed Online* Vol.6(No.2):191-200.
- Isachenko , E.,Isachenko , V.,Katkov , I.I.,Rahimi , G.,Sch?ndorf , T.,Mallmann , P.,Dessole , S. & Nawroth , F. (2004a). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification , *Hum Reprod* Vol.19:932-93.
- Isachenko , V.,Isachenko , E.,Katkov , I.I.,Montag , M.,Dessole , S.,Nawroth , F. & Van Der Ven , H. (2004b). Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility , DNA integrity , and fertilization ability , *Biol Reprod* Vol.71:1167-1173.
- Jensen , J.R.,Morbeck , D.E. & Coddington , C.C. 3rd. (2011). Fertility preservation , *Mayo Clin Proc* Vol.86(No.1):45-49.
- Kelly , S.M.,Buckett , W.M.,Abdul-Jalil , A.K. & Tan S.L. (2003). The cryobiology of assisted reproduction , *Minerva Ginecol* Vol.55(No.5):389-398.
- Krisher , R.L. (2004). The effect of oocyte quality on development , *Journal of Animal Science* Vol.82:E14-E23.
- Krisher , R.L. (2004). The effect of oocyte quality on development , *Journal of Animal Science* Vol.82: E14-E23.
- Kuczyski , W.,Dhont , M.,Grygoruk , C.,Grochowski , D.,Woczyski , S. & Szamatowicz , M. (2001) The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa!aa prospective randomized study , *Hum. Reprod.* Vol.16: 2109-2113.
- Kuleshova , L.,Gianaroli , L.,Magli , C.,Ferraretti , A. & Trounson , A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report , *Hum Reprod* Vol.14:3077-3079.
- Kundu , C.N.,Chakraborty , J.,Dutta , P.,Bhattacharyya , D.,Ghosh , A. & , Majumder , G.C. (2002). Effects of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium , *Reproduction* Vol.123:907-913.
- Law , P.,Sprott , D.,Lepock , J. & Kruuv , J. (1980) Post-thaw lysing and osmotic reactivation of frozen-thawed cell , *Cryo Lett* Vol.1:173-180.
- Leaf , A. (1959). Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume , *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol.72:396-404.
- Leibo , S.P.,McGrath , J.J.,Cravalho , E.G. (1978). Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate , *Cryobiology* Vol.15(No.3):257-71.
- Liebermann , J.,Nawroth , F.,Isachenko , V.,Isachenko , E.,Rahimi , G. & Tucker , M.J. (2002). Potential

- importance of vitrification in reproductive medicine , *Biol Reprod* Vol.67:1671-1680.
- Liebermann , J.,Tucker , M.J.,Sills , E.S. (2003). Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in >1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants , . *Clin Exp Obstet Gynecol* Vol.30:125-129.
- Loskutoff , N.M.,Bartels , P.,Meintjes , M.,Godke , R.A. & Schiewe , M.C. (1995). Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: a model approach to preserving and managing genetic diversity , *Theriogenology* Vol.43: 3-12.
- Luvoni , G.C. & Pellizzari , P. (2000). Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages , *Theriogenology* Vol.53:1529-1540.
- Lovelock , J.E. (1955). The physical instability of human red blood cells , *Biochem J* Vol.60(No.4):692-6.
- Luvoni , G.C. (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* Vol.66(No.1):101-111.
- Luvoni , G.C. & Pellizzari , P. (2000). Embryo development in *Theriogenology* vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages , . Vol.53:1529-1540
- Loskutoff , N.M.,Bartels , P.,Meintjes , M.,Godke , R.A. & Schiewe , M.C. (1995). Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: a model approach to preserving and managing genetic diversity , *Theriogenology* Vol.43:3-12
- Lyons , J. M. (1972). Phase transitions and control of cellular metabolism at low temperatures , *Cryobiology* Vol.9: 341-350.
- MacLellan , L.J.,Carnevale , E.M.,Coutinho da Silva , M.A.,Scoggin , C.F.,Bruemmer , J.E. & Squires , E.L. (2002). Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares , . *Theriogenology*Vol. 58(No.5):911-919.
- Mavrides , A. & Morroll , D. (2005). Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes , *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* Vol.118(No.1):66-70.
- Mazur , P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing *J Gen Physiol.* Vol.47:347-369.
- Mazur , P. (1977). Slow-freezing injury in mammalian cells , *Ciba Found Symp* Vol.52:19-48.
- Mazur , P.,Leibo , S.P. & Chu , E.H.Y. (1972). A two factor hypothesis of freezing injury , *Exp Cell Res* Vol.71:345-355.
- Mazur , P. & Schmidt , J. (1968). Interactions of cooling velocity , temperature , and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast , *Cryobiology* Vol.5:1-17.
- Mazur , P. & Schneider , U. (1986). Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implication , *Cell Biophys* Vol.8:259-285.
- McGann , L. & Farrant J. (1976). Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196 C. II. Warming rate and concentration of dimethylsulfoxide , *Cryobiology* Vol.13:269-273.
- Medeiros , C.M.,Forell , F.,Oliveira , A.T. & Rodriguez , J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't better?*Theriogenology* Vol.57:327-344.
- Meistrich , M.L.,Wilson , G.,Ye , W.S.,Thrash , C. & Huhtaniemi , I. (1996). Relationship among hormonal treatments , suppression of spermatogenesis , and testicular protection from chemotherapy-induced

- damage , *Endocrinology Vol.137*: 3823-3831.
- Moor , R.M., Dai , Y., Lee , C., Fulka , J. Jr. (1998). Oocyte maturation and embryonic failure , *Human Reproduction Update Vol.4*:223-226.
- Morris , G.J., Acton , E , & Avery , A. (1999). A novel approach to sperm cryopreservation , *Hum Reprod Vol.14*:1013-1021.
- Muldrew , K. & McGann , L.E. (1990). Mechanisms of intracellular ice formation , *Biophys J Biophysical Society Vol.57*:525-532.
- Mullen , S.F. & Critser , J.K. (2007). The science of cryobiology , in Woodruff T.K. & Snyder K.A. (eds) *Oncofertility: fertility preservation for cancer survivors* , New York: Springer pp. 83-103.
- Murakami , M., Otoi , T., Karja , N.W., Wongsrikeao , P., Agung , B. & Suzuki , T. (2004). Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose , *Cryobiology Vol-48*:341-348.
- Nayudu , P., Wu , J. & Michelmann , H. (2003). In vitro development of marmoset monkey oocytes by pre-antral follicle culture , *Reproduction in Domestic Animals Vol.38*:90-96.
- Nawroth , F., Rahimi , G., Isachenko , E., Isachenko , V., Lieberman , M., Tucker , M.J. & ctive Technology: New Lieberman , J. (2005). Cryopreservation I Assisted ReproduTrends , *Seminars Reprod Med Vol.23*(No.4):325-335.
- Noyes , N., Boldt , J. & Nagy , Z.P. (2010). Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics Vol.27*:69-74.
- Palermo , G., Devroey , P., Van Steirteghem , A.C. & Joris , H. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte , *Lancet Vol.340*:17-18.
- Pegg , D. (1976). Long-term preservation of cells and tissues: a review , *J cli. Path Vol.29*: 271-285.
- Pegg , D.E. (2007). Principles of cryopreservation , *Methods Mol Biol Vol.368*:39-57.
- Polge , C., Smith , A.Y. & Parkes , A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature , *Nature Vol.164*:666.
- Pope , C.E. (2000). Embryo technology in conservation efforts for endangered felids , *Theriogenology Vol.53*:163-174.
- Pope , C.E., Pope , V.Z. & Beck , L.R. (1984). Live birth following cryopreservation and transfer of a baboon embryo , *Fertility and Sterility Vol.42*:143-145.
- Ptak , G., Clinton , M., Barboni , B., Muzzeddu , M., Cappai , P., Tischner , M. & Loi , P. (2002). Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies *Biology of Reproduction Vol.66*:796-801.
- Purdy , P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation , *Small Rum Res Vol.6*:215-225.
- Rall , W.F. & Fahy , G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196!aC by vitrification , *Nature Vol.313*:573-575.
- Roth , T.L., Armstrong , D.L., Barrie , M.T. & Wildt , D.E. (1997). Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful artificial insemination in the snow leopard (*Uncia uncia*) *Reprod Fertil Dev Vol.9*(No.3):285-295.

- Ruffing , N.A., Steponkus , P.L., Pitt , R.E. & Parks , J.E. (1993). Osmometric behavior , hydraulic conductivity , and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages , *Cryobiology* Vol.30(No.6):562-80.
- Saha , S., Otoi , T., Takagi , M., Boediono , A., Sumantri , C. & Suzuki , T. (1996). Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol , trehalose , and polyvinylpyrrolidone , *Cryobiology* Vol.33:291-299.
- Salamon , S. & Maxwell , W.M. (2006). Storage of ram semen , *Anim Reprod Sci* Vol.62:77-111.
- Saragusty , J.J. & Arav , A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification , *Reproduction* Vol.141:1-19.
- Siimes , M.A. & Rautonen , J. (1990). Small testicles with impaired production of sperm in adult male survivors of childhood malignancies , *Cancer* Vol.65:1303-1306.
- Shaw , J.M. (2000). Cryopreservation of oocytes and embryos. In Trounson AO ; Gardner DK (eds) *Handbook of in vitro fertilization*. 2. Boca Raton: CRC Press LLC , p.373-368.
- Sherman , J.K. (1964). Low temperature research on spermatozoa and eggs , *Cryobiology* Vol.1(No.2): 103-129.
- Sherman , JK (1973). Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking , *Fertil. Steril.* Vol.24:397-412.
- Song , Y., Sharp , R., Lu , F. & Hassan , M. (2010). The future potential of cryopreservation for assisted reproduction , *Cryobiology* Vol.60:S60-S65.
- Takagi , M., Kim , I.H., Izadyar , F., Hyttel , P., Bevers , M.M., Dieleman , S.J., Hendriksen , P.J. & Vos. P.L. (2001). Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH , *Reproduction* Vol.121:941-951.
- Thomson , B., Campbell , A.J., Irvine , D.C., Anderson , A.R., Kelnar , C.J. & Wallace , W.H. (2002). Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study , *Lancet* Vol.360:361-367.
- Thurston , L.M., Siggins , A., Mileham , P.F., Watson , P.F. & Holt , W.V. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation , *Biol Reprod* Vol.66:545-554.
- Vajta , G. & Nagy , Z.P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification , *Reprod Biomed Online* Vol.12:779-96.
- Whittingham , D.G. (1977). Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at K196 8C , *Journal of Reproduction and Fertility* Vol.49:89-94.
- Whittingham , D.G. & Adams , C.E. (1974). Low temperature preservation of rabbit embryos , *Cryobiology* Vol.11:560-561.
- Whittingham , D.G., Leibo , S.P. & Mazur , P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to K196 8C and K269 8C , *Science* Vol.178 411~C414.
- Willadsen , S.M., Polge , C., Rowson , L.E.A. & Moor , R.M. (1974). Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen , *Cryobiology* Vol.11:560.

- Willadsen , S.M.,Polge , C.,Rowson , L.E.A. & Moor , R.M. (1976). *Deep freezing of sheep embryos , Journal of Reproduction and Fertility Vol.46:151~C154.*
- Willadsen , S.,Polge , C. & Rowson , L.E.A. (1978). *The viability of deep-frozen cow embryos. Journal of Reproduction and Fertility Vol.52:391~C393.*
- Wilmut , I. (1972). *The effect of cooling rate , warming rate , cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing , Life Sciences Vol.11:1071~C1079.*
- Wilmut , I. & Rowson , L.E. (1973). *Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos , Veterinary Record Vol.92:686~C690.*
- Wolf , D.P.,Vandevoort , C.A.,Meyer-Haas , G.R.,Zelinski-Wooten , M.B.,Hess , D.L.,Baughman , W.L. & Stouffer , R.L. (1989). *In vitro fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey , Biology of Reproduction Vol.41:335~C346.*
- Woods , E.J.,Benson , J.D.,Agca , Y. & Crister , J.K. (2004). *Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue , Cryobiology Vol.48:146-156.*

(蔺会兰译)

IntechOpen

