

## 两种培养基对卵母细胞体外成熟效果比较

周桦<sup>1</sup>, 何峻<sup>2</sup>, 周从容<sup>1</sup>

(1. 贵阳医学院附院 生殖医学中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院, 贵州 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的: 观察两种培养基在未成熟卵母细胞体外培养时, 对卵子成熟及授精后胚胎发育的影响。方法: 144 枚未成熟卵母细胞随机分为两组行体外成熟培养, 组 1 为囊胚培养基, 共培养 80 枚卵子; 组 2 为人输卵管液培养基, 共培养 64 枚卵子培养, 两种培养基除基础液不同, 其余组分及含量均相同, 比较两组卵子的体外成熟、受精及胚胎发育情况。结果: 组 1 卵子成熟率 (86.25%) 明显高于组 2 (60.94%), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两组卵子的受精率、卵裂率及优胚率无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 但组 1 有优于组 2 的趋势。结论: 两种培养基均可将未成熟卵母细胞培养成熟, 但囊胚培养基更优于人输卵管液培养基, 且方便配制, 更适用于临床。

**[关键词]** 卵母细胞; 体外研究; 培养基; 胚胎; 成熟率; 受精率; 卵裂率; 优胚率

**[中图分类号]** R349.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)05-0509-03

## Comparison of the Effects of Two Kinds of Culture Media on Maturation of Human Oocytes *in vitro*

ZHOU Hua<sup>1</sup>, HE Jun<sup>2</sup>, ZHOU Congrong<sup>1</sup>

(1. Reproductive Medicine Centre, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;  
2. People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550001, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the effects of two kinds of culture media on maturation of human oocytes *in vitro*, and to observe embryonic development in them. **Methods:** One hundred and forty-four immature human oocytes were randomly divided into two groups and cultured *in vitro*. The components of the 2 culture media were the same except the foundational medium which was blastocyst medium in group 1 ( $n=80$ ) and fertilization medium in group 2 ( $n=64$ ). The maturation rates, fertilization rates, embryonic development situation were compared between the two groups. **Results:** The maturation rate in group 1 (86.25%) was significantly higher than that in group 2 (60.94%) ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in fertilization rate, cleavage rate, and good quality embryo rate between the two groups, but the data of group 1 were better than that of group 2. **Conclusions:** Both the two kinds of culture media could induce human oocytes to mature *in vitro*, but blastocyst medium is better than fertilization medium.

**[Key words]** oocytes; *in-vitro*; culture media; embryo; maturation rate; fertilization rate; cleavage rate; good quality embryo rate

卵母细胞体外 (*in vitro* maturation, IVM) 成熟是指通过体外培养, 使卵泡内的未成熟卵母细胞发育成为成熟的第二次减数分裂中期 (metaphase II, MII) 卵母细胞的一种辅助生殖技术。人未成熟卵母细胞体外成熟的培养基系统已在临床应用, 但价格昂贵。本研究根据卵细胞成熟理论, 采用两种培养基体外培养卵母细胞, 现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选用 2010 年 4 月 ~ 2012 年 4 月在辅助生殖科经卵巢刺激行常规体外受精/单精子卵胞浆内注射 - 胚胎移植 (IVF/ICSI - ET) 治疗中获得的剩余未成熟卵母细胞, 患者年龄 26 ~ 37 岁, 不孕因素为输

卵管因素或男方因素。本研究获医院伦理委员会批准,受试者均知情同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组** 根据所获取的未成熟卵母细胞的采集日期随机分为 2 组,80 个未成熟卵母细胞在囊胚培养基(组 1)中培养,64 个未成熟卵母细胞在人输卵管液培养基(组 2)中培养。因实验中生发泡(germinal vesicle, GV)期卵母细胞较少(组 1 有 5 枚,组 2 有 3 枚),故未再将第一次减数分裂中期(metaphase I, MI)及 GV 期卵母细胞分组比较。

**1.2.2 实验方案** (1)超排卵方案:采用促性腺激素释放激素类似物和促性腺激素(FSH/HMG)联合方案,肌注人绒毛膜促性腺激素(HCG)5 000~10 000 U 或皮下注射达菲林 0.2 mg,34~36h 后经阴道 B 超下穿刺取卵。(2)卵子采集及处理:取手术中获得的卵冠丘复合体先以形态学特征初步评价其成熟度,当所获成熟卵超过 5 个且超过所占获卵总数比例的 3/4 时,选出外观提示不成熟的常规废弃的卵母细胞置于显微镜下观察, GV 期或 MI 期末成熟卵母细胞用于 IVM 实验。当天收集的所有未成熟卵母细胞进行体外成熟培养。(3)卵母细胞体外成熟方案:所有成熟培养基中均加入 75 IU/L rFSH、150 IU/L rHCG(均为 Serono,瑞士),10% HAS(Quinn's 3001, SAGE, 美国),2 mg/L EGF、25 mmol/L 丙酮酸钠(均为 Sigma, 美国)。培养基总量约为 1.0 mL,在使用前 1 d 配制,置培养箱中过夜平衡。组 1 的基础液为囊胚培养基(Quinn's 1029, SAGE, 美国,含 10% HSA),组 2 的基础液为人输卵管液培养基(Quinn's 1020, SAGE, 美国,含 10% HSA)。所获取的未成熟卵母细胞先移入含有人输卵管液培养基的皿内,37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内培养 2 h,然后移入成熟培养基中继续培养 24~26 h 后观察,视第一极体排出为成熟卵母细胞。成熟的卵子数除以培养的卵子数为成熟率。

**1.2.3 授精方式** 成熟后的卵母细胞行 ICSI 方式授精。精子来自 IVF-ET 周期正常的男性自愿者精液。受精后 16~18 h 将受精卵移入卵裂培养基(Quinn's 1026, SAGE, 美国,含 10% HSA,每滴 25 μL)中观察原核的形成情况并单个培养,以后每隔 24 h 观测胚胎发育情况。授精后 16~18 h 出现原核为受精,将受精卵数除以授精的卵子数为受精率,受精后分裂的卵子数除以受精卵数为卵裂率。

**1.2.4 胚胎分级标准** 按参考文献[1]分级。将

授精后第 3 天胚胎的卵裂球数目 $\geq 6$ 、但 $\leq 8$ 、卵裂球均匀、碎片 $\leq 10\%$ 的胚胎定为优质胚胎,优质胚胎数除以胚胎总数为优质胚胎率。经伦理委员会讨论后将所有胚胎予以丢弃。

## 1.3 统计学方法

采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

组 1 中 80 枚卵子共有 69 枚卵子成熟,成熟后 59 枚卵子受精,56 枚合子卵裂,有优质胚胎 26 枚;组 2 中 64 枚卵子共有 39 枚卵子成熟,成熟后 32 枚卵子受精,29 枚合子卵裂,有优质胚胎 12 枚。组 1 中 1 枚 GV 期卵子成熟,组 2 中无 GV 期卵子成熟。不成熟卵母细胞、成熟卵母细胞及受精卵、卵裂期的胚胎见图 1,图 1-A 为不成熟的 GV 期卵母细胞,胞质内可见生发泡;图 1-B 为不成熟的 MI 期卵母细胞,可见胞质内生发泡已破裂,卵间隙内未见第一极体;图 1-C 为成熟的 MII 期卵母细胞,卵间隙可见第一极体;图 1-D 为受精卵,胞质内见清晰的双原核,卵间隙见双极体;图 1-E 为授精后第 2 天卵裂的优质胚胎,可见四个卵裂球,大小略不均,见少许碎片;图 1-F 为授精后第 3 天卵裂的优质胚胎,可见 8 个卵裂球,大小较均匀,见少许碎片)。各组的成熟率、受精率、卵裂率和优胚率比较见表 1。

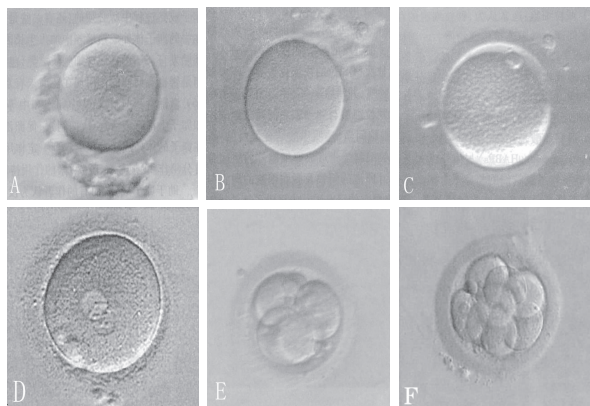
表 1 两组卵子成熟率、受精率、卵裂率和优胚率(%)

Tab. 1 Comparison of the maturation rate, fertilization rate, cleavage rate and top quality embryo formation rate between the 2 groups				
组别	成熟率	受精率	卵裂率	优胚率
组 1	86.25 <sup>(1)</sup>	85.51 <sup>(2)</sup>	94.92 <sup>(2)</sup>	46.43 <sup>(2)</sup>
组 2	60.94	82.05	90.63	41.38

与组 2 比较, <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ ; 与组 2 比较, <sup>(2)</sup> $P > 0.05$

## 3 讨论

IVM 可以弥补 IVF、ICSI 的不足,具有较大的发展潜力,这在临床上已是不争的事实。然而,目前面世的商品化 IVM 培养基价格昂贵,自行配制 IVM 培养基的报道亦不多见,本研究基于对卵母细



A: 不成熟的 GV 期卵母细胞; B: 不成熟的 MI 期卵母细胞; C: 成熟的 MII 期卵母细胞; D: 受精卵; E: 受精后第 2 天卵裂的优质胚胎; F: 受精后第 3 天卵裂的优质胚胎。

图 1 人未成熟卵母细胞体外成熟前、后及成熟后受精、卵裂情况

Fig. 1 Pictures of immature human oocyte, mature human oocyte, oosperm, and cleavage situations

胞成熟的理论基础,进行了实验性研究。

葡萄糖、丙酮酸盐和乳酸盐是卵子能量代谢的主要底物,卵母细胞的成熟受促性腺激素、表皮生长因子等因素调控<sup>[2-3]</sup>;卵母细胞的成熟不仅有核的成熟,还包含细胞浆的成熟,在自然发育的卵母细胞中,两者的成熟是高度统一的,但在 IVM 中,两者的成熟却不完全同步,而且核浆成熟度不一致一直是影响胚胎质量的关键。有报道指出,仅有丙酮酸盐并不能有效地支持卵子的胞质成熟,在培养液中添加必需氨基酸对卵胞质成熟和支持进一步的胚胎发育是必需的,而且非必需氨基酸和必需氨基酸对于卵子的胞质成熟也起到了辅助作用<sup>[4-5]</sup>。在胚胎培养液内加入水溶性维生素进行未成熟卵子的培养,对卵子的核成熟和胞质成熟都有益处<sup>[6]</sup>。本研究组 2 所用的人输卵管液培养基属于简单培养液,其成分比较简单明确,但往往仅加有丙酮酸、乳酸以及葡萄糖等胚胎发育所必需的能量物质,而不含氨基酸等复合成分。组 1 中所用的囊胚培养基则属于复合培养液,它是由体细胞培养液衍化而来,其内除了含有必须的无机离子、碳水化合物以及蛋白质外,还含有必需氨基酸、非必需氨基酸、维生素等成分<sup>[7]</sup>。本研究显示,囊胚培养基组其卵子成熟率明显高于人输卵管液培养基组,而且其后的卵子受精率、卵裂率及优胚率在前者有优于后者的趋势,较报道的商品化培养基及人输卵管液培养基效果更好,这可能与囊胚培养基是复合培养基有关<sup>[8-11]</sup>。此外作为基

础液,囊胚培养基与 TCM 199 培养基相比也有其优势<sup>[8]</sup>。囊胚培养基是生殖医学中心常用的培养基,一般不需额外订购,也不存在因使用频率过低而发生浪费的现象,因而更适于临床应用。

## 4 参考文献

- [1] 徐艳文, 卵裂期胚胎的评分 [M] 庄广伦. 现代辅助生育技术. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 240 - 241.
- [2] Yang SH, Son WY, Yoon SH, et al. Correlation between in vitromaturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles [J]. Hum Reprod, 2005 (8): 2097 - 2103.
- [3] Ben-Ami I, Komsky A, Bern O, et al. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium [J]. Hum Reprod, 2011 (1): 76 - 81.
- [4] Won H, Park E, Lee D, et al. Comparison of basic medium for the in vitro maturation for human immature oocytes [J]. Fertil Steril, 2005 (Suppl 1): 53.
- [5] Hong JY, Yong HY, Ke BC, et al. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media [J]. Theriogenology, 2004 (8): 1473 - 1482.
- [6] Tao Y, Zhou B, Xia G, et al. Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation [J]. Reprod Domest Anim, 2004 (1): 52 - 57.
- [7] 金美善; 黄国宁, 等. 体外受精 - 胚胎移植实验室技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 191 - 195.
- [8] 冯婷, 王守林, 刘嘉茵, 等. 两种未成熟卵母细胞体外成熟培养液的运用效果比较 [J]. 南京医科大学学报, 2010 (1): 121 - 127.
- [9] 高敏芝, 汪玉宝, 顾敦瑜, 等. 多囊卵巢患者行未成熟卵母细胞体外成熟、受精和胚胎发育观察 [J]. 生殖与避孕, 2005 (2): 89 - 94.
- [10] 刘晓音, 金炜, 薛松果, 等. 一种简易的促排卵周期挽救性卵子体外成熟培养技术 [J]. 中山大学学报, 2010 (2): 293 - 297.
- [11] 贾婵维, 李颖, 任国庆, 等. 体外受精 - 胚胎移植过程中未成熟卵母细胞体外培养的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010 (1): 100 - 102.

(2013-05-20 收稿, 2013-07-12 修回)

编辑: 文箫颖