

卵巢高反应临床结局及其卵母细胞超微结构分析

许慧丽, 许波, 施维, 郑圣霞, 刘雨生

摘要 目的 探讨控制性超促排卵周期中卵巢高反应对卵母细胞、胚胎质量及妊娠结局的影响。方法 回顾性分析因输卵管因素和(或)男方因素初次行体外受精-胚胎移植/卵泡浆单精子注射(IVF-ET/ICSI)周期治疗的326例不孕患者的临床资料。根据人绒毛膜促性腺激素(HCG)日血清雌二醇(E_2)水平、获卵数不同分为卵巢高反应组(HCG日血清 $E_2 > 3\ 000$ pg/ml或获卵数 > 15 个, $n = 146$)和正常反应组(HCG日血清 $E_2 500 \sim 3\ 000$ pg/ml或获卵数 $5 \sim 15$ 个, $n = 180$)。分析两组间的MII卵率、受精率、卵裂率、优质胚胎率、种植率、临床妊娠率和流产率。并通过透射电子显微镜下观察两组卵母细胞透明带、卵母细胞卵周隙、卵母细胞细胞器等超微结构的变化。结果 卵巢高反应组获卵数、优质胚胎数和移植周期取消率均显著高于正常反应组($P < 0.05$)。MII卵率、受精率、优质胚胎率、可利用胚胎率、种植率和临床妊娠率均显著低于正常反应组($P < 0.05$)。两组间卵裂率、流产率和中重度卵巢过度刺激综合征(OHSS)发生率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。高反应组的超微结构分析显示,部分卵母细胞胞质中出现大量异常线粒体。结论 卵巢高反应影响卵母细胞质量及胚胎发育潜能,最终降低临床结局。

关键词 卵巢高反应; 卵母细胞; 胚胎发育; 透射电子显微镜; 线粒体

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1658-05

卵巢高反应主要是指卵巢对促性腺激素(gonadotropin, Gn)刺激异常敏感,发生多卵泡发育,通常以血清雌二醇(estradiol, E_2)峰值和获卵数来衡量。关于卵巢高反应对辅助生殖技术治疗结局是否有影响仍存在较大争议,主要集中在胚胎质量和子宫内膜容受性两方面。该研究回顾性分析因输卵管因素和(或)男方因素于本院生殖中心接受体外受精-胚胎移植/卵泡浆内单精子显微注射(*in vitro* fertilization and embryo transfer/intracytoplasmic sperm in-

jection, IVF-ET/ICSI)周期治疗的不孕患者的临床资料,并对部分IVF周期中未受精的成熟卵母细胞的超微结构进行研究,进一步探讨卵巢高反应对卵母细胞、胚胎质量及妊娠结局的影响。

1 材料与方法

1.1 研究来源

1.1.1 研究对象 选择2012年1月~12月于安徽医科大学附属省立医院生殖医学中心初次行IVF/ICSI助孕的326例不孕患者。纳入标准:①年龄 < 40 岁,月经第2天卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH) < 10 IU/L;②不孕原因主要为输卵管因素和(或)男方因素;③经阴道超声(transvaginal ultrasonography, TVS)监测证实排卵功能和子宫腔形态正常。排除合并子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)、多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)、高催乳素血症、甲状腺和肾上腺等其他内分泌疾病。用于电镜分析超微结构的35个卵母细胞均为IVF 24~48 h后未受精的成熟卵母细胞,用于研究的卵母细胞均经患者同意并签署知情同意书。

1.1.2 分组 卵巢反应性判断参照文献^[1]的标准,将纳入研究的患者分为高反应组($n = 146$)和正常反应组($n = 180$)。高反应组标准:获卵数 > 15 个或人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)注射日血清 $E_2 > 11\ 010$ pmol/L(3 000 pg/ml);正常反应组标准:5个 $\leq$ 获卵数 ≤ 15 个或 $1\ 835$ pmol/L(500 pg/ml) $\leq$ HCG注射日血清 $E_2 \leq 11\ 010$ pmol/L(3 000 pg/ml)。

1.2 研究方法

1.2.1 超促排卵 (controlled ovarian hyperstimulation, COH)方案 采用本中心常规长方案^[2],黄体中期垂体降调节满意,启动COH方案,根据患者年龄、体重、卵巢窦卵泡数等确定Gn启动剂量,并根据卵泡生长及雌激素增长速度来调整Gn剂量,当 ≥ 2 个主导卵泡直径达到18 mm或 ≥ 3 个主导卵泡直径达到17 mm时注射HCG 10 000 IU诱发卵子成熟,34~36 h行TVS引导下取卵术。

1.2.2 IVF-ET及妊娠结局判断 将取出的卵丘-

2014-07-19 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085QH131)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院生殖医学中心,合肥 230001

作者简介:许慧丽,女,硕士研究生;

刘雨生,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: sheng-zhizhongxin@126.com

卵母细胞复合体置于 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养 4 h 后,进行常规 IVF 或 ICSI 授精。授精后 16 ~ 18 h 观察原核情况,授精 42 h 后观察卵裂情况,根据卵裂球大小均匀与否及碎片占整个胚胎的比例进行胚胎质量评分,将胚胎分为 V 级^[3]。其中 I、II 级胚胎为优质胚胎,I ~ III 级胚胎为可利用胚胎。根据患者情况移植 2 ~ 3 个形态学评分最佳的胚胎,剩余有发育潜能的胚胎行冷冻保存。取卵后常规肌注黄体酮 60 mg/d 直至移植后 14 d,检查血清绒毛膜促性腺激素(β-HCG),阳性者为生化妊娠,继续黄体支持,移植后 4 周 B 超见孕囊及胚芽确诊为临床妊娠。未受精、无可移植胚胎或因中重度卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome,OHSS)取消新鲜胚胎移植周期记为未移植周期。中重度 OHSS 的诊断参照文献^[4]标准。

1.2.3 透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)标本制备 收集两组 IVF-ET 周期新鲜废弃卵母细胞(常规 IVF 24 ~ 48 h 后未受精的成熟卵母细胞)共 35 枚,其中卵巢高反应组卵母细胞 16 枚,正常反应组卵母细胞 19 枚,制作成电镜标本观察。将标本迅速固定于 4 °C、25 g/L 的戊二醛中 4 ~ 6 h,取出后用 pH = 7.2 的 PBS 液冲洗干净,1% 锇酸固定 1.0 ~ 1.5 h,然后用梯度乙醇脱水,脱水后吸去乙醇,加入环氧丙烷透明 30 min,然后换成环氧丙烷与 Epon812 环氧树脂(1:1)配制的混合液浸透 1.5 h,用圆锥底的塑料包埋模,最后用 Epon812 环氧树脂加满进行包埋,投入 65 °C 烤箱中 48 h,降至室温。取出包埋好的组织以 60 ~ 80 nm 的厚度进行超薄切片(超薄切片机型号 LKB-NOVA 型,瑞典)。将干燥好的带样品的铜网放入醋酸双氧铀液滴中染色 30 min,用双蒸水冲洗干净后,再放入柠檬酸铅液滴中染色 10 min,最后用双蒸水冲洗后干燥,将制备好的电镜样品置于 JEM-1230 型 TEM 下观察。

1.2.4 实验数据计算标准 ICSI 周期中 MII 卵率(%) = MII 卵数/获卵数 × 100%;受精率(%) = 2PN 卵子数/获卵数 × 100%;卵裂率(%) = 卵裂数/正常受精总数 × 100%;优质胚胎率(%) = I 级 + II 级胚胎数/总胚胎数 × 100%;可利用胚胎数(%) = I 级 + II 级 + III 级胚胎数 / 总胚胎数 × 100%;胚胎种植率(%) = 孕囊数/移植胚胎数 × 100%;临床妊娠率(%) = 妊娠周期数/移植周期数 × 100%;流产率(%) = 流产数/临床妊娠数 × 100%;移植周期取消率(%) = 取消移植周期数/取

卵周期数 × 100%;中、重度 OHSS 发生率(%) = 中、重度 OHSS 例数/取卵周期数 × 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间计量资料比较采用 *t* 检验,计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 两组患者一般临床特征的比较 高反应组与正常反应组间年龄、体质指数(body mass index, BMI)、不孕年限、基础 FSH 的比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);高反应组 Gn 用量显著低于正常反应组($P < 0.01$),但两组 Gn 用药时间差异无统计学意义;高反应组 HCG 日 E₂ 水平高于正常反应组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 HCG 日子宫内膜厚度差异无统计学意义。见表 1。

表 1 两组间一般临床特征的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	高反应组 (n = 146)	正常反应组 (n = 180)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	29.21 ± 3.46	29.78 ± 3.73	-1.416	0.158
不孕年限(年)	4.12 ± 2.47	4.61 ± 2.68	-1.695	0.091
BMI(kg/m ²)	21.39 ± 2.74	21.79 ± 3.03	-1.221	0.223
基础 FSH(U/L)	6.58 ± 1.62	6.82 ± 1.88	-1.218	0.224
Gn 用药时间(d)	12.41 ± 2.07	12.60 ± 2.14	-0.799	0.425
Gn 用量(支)	28.19 ± 8.64	33.19 ± 10.71	-4.551	<0.001
HCG 日 E ₂ (pg/ml)	4 492.36 ± 484.93	2 186.66 ± 798.97	25.830	<0.001
HCG 日内膜厚度(mm)	10.81 ± 1.65	10.83 ± 1.96	-0.089	0.930

2.2 两组间卵母细胞及胚胎质量的比较 高反应组获卵数、获胚胎数均高于正常反应组($P < 0.01$),但高反应组 ICSI 周期中 MII 卵率、受精率、优质胚胎率和可利用胚胎率低于正常反应组,差异有统计学意义($P < 0.05$),两组间卵裂率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 两组间获卵及胚胎情况的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	高反应组 (n = 146)	正常反应组 (n = 180)	<i>t</i> 值/ χ^2 值	<i>P</i> 值
获卵数(个)	14.23 ± 3.65	9.51 ± 3.03	12.745	<0.001
获胚胎数(个)	77.4(944/1219)	83.2(738/887)	10.598	0.001
受精率(%)				
IVF	69.4(679/978)	74.3(613/825)	5.238	0.022
ICSI	80.6(761/944)	85.5(631/738)	6.933	0.008
卵裂率(%)	99.1(1 427/1 440)	99.0(1 231/1 244)	0.141	0.708
优质胚胎数(个)	6.22 ± 2.36	4.74 ± 2.19	5.764	<0.001
优质胚胎率(%)	62.7(895/1 427)	66.5(819/1 231)	4.194	0.041
可利用胚胎数(个)	8.00 ± 3.09	5.82 ± 2.53	7.002	<0.001
可利用胚胎率(%)	81.4(1 161/1 427)	84.4(1 039/1 231)	4.292	0.038

2.3 TEM 下卵巢高反应组卵母细胞与正常反应组

卵母细胞的超微结构 正常反应组:颗粒细胞围绕于成熟卵母细胞周围,呈不规则圆形,约 $9 \sim 17 \mu\text{m}$,内有 $1 \sim 3$ 个网状核仁及分散的染色质。颗粒细胞胞质中可见有管状嵴的线粒体、光面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER)及丰富的脂滴、多核糖体、高尔基等丰富的细胞器,见图 1A。透明带(zona pellucid, ZP)为正常的疏松致密物结构,含有大量卵母细胞胞膜残留物。卵膜和 ZP 之间的卵周隙,呈一狭窄透亮间隙,内见第一极体及呈树突状粗大的微绒毛,见图 2A。在卵母细胞胞质内,可见高尔基体及周围的分泌小泡、SER、SER 集合管、SER 大泡及小泡、线粒体等丰富的细胞器。线粒体是细胞内最主要的细胞器,大多呈椭圆形,中度密集,有少量嵴,结构清晰,见图 3A1、3A2。

高反应组:颗粒细胞分布及超微结构同正常反应组,见图 1B。卵周隙同正常反应组,可见第一极体及丰富的微绒毛,见图 2B。卵母细胞胞质中亦见高尔基体、SER、SER 集合管等细胞器,与正常反应组相比未见明显异常。两组之间存在明显差异的细胞器主要是线粒体,部分卵母细胞胞质内线粒体的数量明显减少,不与 SER 泡相连,孤立存在,且线粒体结构也存在异常,如嵴结构消失、内膜结构丢失、可见空泡及膨大等。SER 周围可见大量结构异常的线粒体及线粒体空泡复合物,见图 3B1、3B2。与正常反应组相比,一些高反应组中正常线粒体的比例明显降低($84.6\% \text{ vs } 65.2\%$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

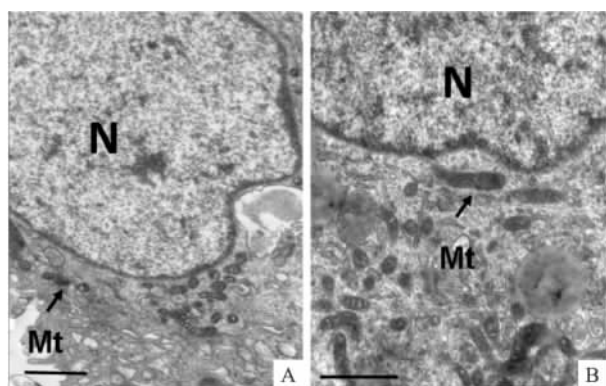


图1 TEM下两组的颗粒细胞

A:正常反应组 $\times 4\,000$; B:高反应组 $\times 10\,000$; N:细胞核; Mt:线粒体

2.4 两组临床结局及并发症的比较 与正常反应组比较,高反应组移植周期取消率显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),但两组间中重度 OHSS 发

生率差异无统计学意义($P > 0.05$);高反应组胚胎种植率和临床妊娠率低于正常反应组,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而两组间流产率相比较,差异无统计学意义。见表3。

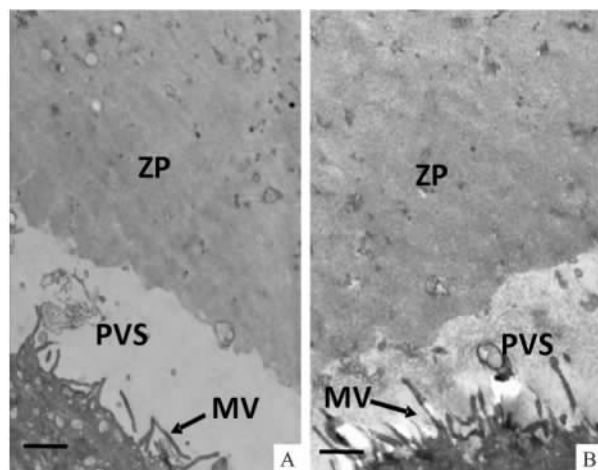


图2 TEM下两组卵母细胞的透明带与卵周隙 $\times 20\,000$
A:正常反应组; B:高反应组; ZP:透明带; PVS:卵周隙; MV:微绒毛

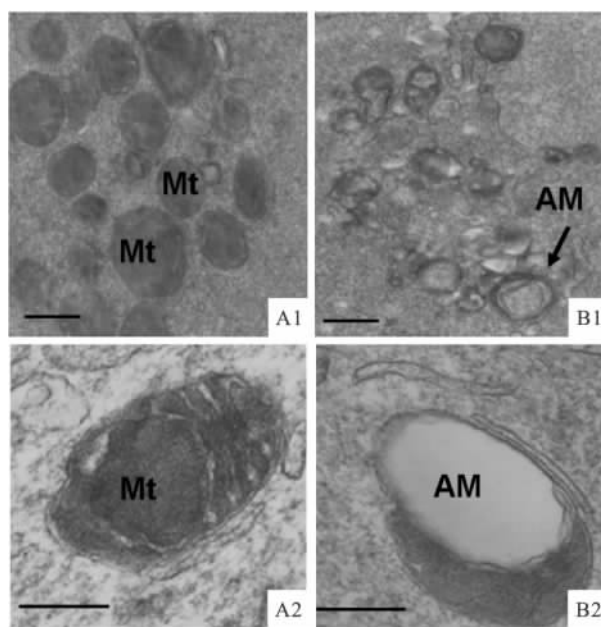


图3 TEM下两组的卵母细胞胞质与线粒体

A:正常反应组; B:高反应组; 1: $\times 20\,000$; 2: $\times 40\,000$; Mt:正常线粒体; AM:异常线粒体

表3 两组临床结局及并发症的比较(%)

项目	高反应组 (n=146)	正常反应组 (n=180)	χ^2 值	P 值
移植周期取消率	19.2(28/146)	8.9(16/180)	7.310	0.007
中重度 OHSS 发生率	8.2(12/146)	4.4(8/180)	1.995	0.158
胚胎种植率	27.7(72/260)	35.8(132/369)	4.544	0.033
临床妊娠率	49.2(58/118)	61.0(100/164)	3.894	0.048
流产率	12.1(7/58)	11.0(11/100)	0.042	0.838

3 讨论

在 COH 过程中,卵巢高反应患者易出现多卵泡的生长发育,导致血清 E_2 水平显著升高。高水平 E_2 除了增加诱发 OHSS 的风险,对 IVF 妊娠结局还会产生何种影响尚存争议,主要集中在胚胎质量和子宫内膜容受性两方面。Valbuena et al^[5]发现高浓度的甾体激素影响卵裂期胚胎的发育,使胚胎与子宫内膜上皮细胞的黏附力下降。也有学者^[6-7]认为高水平的 E_2 环境还会导致子宫内膜形态学和着床相关基因表达的改变,降低子宫内膜容受性,导致高反应者胚胎种植率和妊娠率下降。但是,仍有不少研究^[8-10]显示胚胎质量没有下降,因为高反应组在随后进行的冷冻胚胎移植周期中,与正常反应组有相似的着床率和妊娠率,并且将高反应患者的胚胎用于赠卵治疗时,其妊娠结局也较好。本研究纳入的对象排除了高龄、EMs、PCOS、反复种植失败、子宫疾病等影响卵母细胞质量和子宫内膜容受性的疾病,更为可靠地评估两组卵母细胞和胚胎质量的差异,分析卵巢高反应对卵母细胞、胚胎质量及妊娠结局的影响。临床统计结果显示高反应组获卵数、优质胚胎数和可利用胚胎数均显著高于正常反应组,但 MII 卵率、受精率、优质胚胎率、可利用胚胎率低于正常反应组。可见卵巢高反应募集的多卵泡发育不同步,使未成熟卵母细胞比例增加,卵母细胞利用率降低,导致受精率降低,与 Kok et al^[11]报道一致。

目前,卵母细胞质量的评估主要根据其形态学观察结果,但是,临床工作中经常会遇到某些形态学评分正常的卵母细胞其发育潜能并不佳,因此对卵母细胞超微结构的分析才能真正反映其质量的好坏,从而更有利于探讨卵巢高反应对卵母细胞及胚胎质量的影响。本研究显示高反应组部分卵母细胞胞质中出现一些异常的线粒体,表现为嵴结构消失、内膜结构丢失、可见空泡及膨大等,且数量明显减少,孤立存在,未与 SER 泡相连。细胞内线粒体的形态、数量及分布的变化与细胞的代谢水平、增殖和分化密切相关^[12-13]。线粒体是细胞的主要能量供应者,最主要的生物学功能就是产生 ATP,为维持卵母细胞和胚胎的正常生命活动提供能量,对卵母细胞成熟及胚胎发育潜能至关重要。高反应组胞质中异常线粒体无法行使正常功能,进而导致其所在的卵母细胞胞质不成熟,胞质与胞核发育不同步,最终影响了卵母细胞受精及胚胎发育潜能,导致种植率

和妊娠率下降。但本研究中高反应组的中、重度 OHSS 发生率并没有显著高于正常反应组,这可能与本中心采取了有效的预防措施有关,对具有年轻、体瘦、窦卵泡数多等 OHSS 高危因素的患者,减少 Gn 启动剂量;取卵后为避免中、重度 OHSS 的发生,部分高反应患者取消新鲜胚胎移植、实行全部胚胎冷冻。因此,最佳的卵巢反应是既不影响妊娠结局又充分利用卵母细胞,而且减少并发症的发生。

本研究通过应用 TEM 对卵母细胞超微结构的观察,发现卵巢高反应组部分卵母细胞中异常线粒体数目明显增多,表明卵巢高反应影响卵母细胞质量及胚胎发育潜能,最终影响妊娠结局。

参考文献

- [1] Sharara F I, McClamrock H D. High estradiol levels and high oocyte yield are not detrimental to *in vitro* fertilization outcome [J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(3): 401-5.
- [2] 骆丽华, 刘雨生, 季静娟, 等. 长方案卵巢刺激启动日血黄体生成激素水平作为黄体生成激素添加指标的价值 [J]. *中国实用妇科与产科杂志* 2012, 28(8): 619-23.
- [3] Condido T, Orava M, Tuomivaara L, et al. Low pregnancy rate is achieved in patients treated with ICSI due to previous low or failed fertilization in IVF [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(1): 65-70.
- [4] 苏宁, 张清学, 李予, 等. 45 例中重度卵巢过度刺激综合征临床分析 [J]. *中国妇幼保健* 2007, 22(8): 1070-2.
- [5] Valbuena D, Martin J, de Pablo J L, et al. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(5): 962-8.
- [6] Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF [J]. *Hum Reprod Update*, 2003, 9(6): 515-22.
- [7] Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, et al. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(6): 1436-45.
- [8] Chen Q J, Sun X X, Li L, et al. Effects of ovarian high response on implantation and pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation (with GnRH agonist and rFSH) [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2007, 86(7): 849-54.
- [9] Bianco K, Mahutte N G, Arici A, et al. Effect of estradiol on oocyte development [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009, 104(3): 230-2.
- [10] Massart P, Sermondade N, Dupont C, et al. Elective cryopreservation of all embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: prevention and efficiency [J]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2013, 41(6): 365-71.
- [11] Kok J D, Looman C W, Weima S M, et al. A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(4): 918-24.

(下转第 1692 页)

Discovery and identification of serum sialylated glycoproteins biomarkers for common gynecological tumors

Xiao Chaoqiang¹, Pei Lili¹, He Wei²

(¹*Institute of Radiation Medicine of the Academy of Military Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206*)

Abstract A strategy was developed for identifying sialylated glycoprotein in human serum. Two highly abundant proteins of albumin and IgG were removed from the serum, then sialylated glycoproteins were enriched using SNA lectin affinity column. The differentially expressed sialylated glycoproteins were analyzed based on the quantitative proteomics methods incorporated iTRAQ stable isotope labeling, liquid chromatography, nanoelectrospray ionization and high resolution tandem mass spectrometry. And this strategy was successfully applied to the discovery of novel biomarkers for common gynecological tumors diagnosis, 169 serum sialylated glycoproteins were identified, a quantitative comparison analysis with healthy control revealed that 11 proteins were in breast tumor, 8 proteins were in cervical tumor and 19 proteins were in ovarian tumor.

Key words quantitative proteomics; sialylated glycoprotein; mass spectrometry; gynecological tumors

(上接第 1661 页)

[12] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging [J]. *Cell*, 2005, 120(4):483–95.

[13] Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 77:21–49.

The analysis of the clinical outcome and ultrastructure of the oocytes with ovarian high response

Xu Huili, Xu Bo, Shi Wei, et al

(*Center for Reproductive Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001*)

Abstract Objective To investigate the effects of high ovarian response on oocyte quality, embryo quality and pregnancy outcome in controlled ovarian hyperstimulation cycles. **Methods** A retrospective study was designed covering 326 infertile patients with male and (or) tubal factor who were admitted first *in vitro* fertilization and embryo transfer / intracytoplasmic sperm injection (IVF-ET/ICSI) treatment from January 2011 to December 2012. The oocyte and embryo parameters and pregnancy outcome were compared between high responder group (peak $E_2 > 3\,000$ pg/ml on the day of HCG administration or the number of oocytes retrieved > 15 , $n = 146$) and normal responder group ($500 \text{ pg/ml} \leq \text{peak } E_2 \leq 3\,000 \text{ pg/ml}$ on the day of HCG administration or $5 \leq$ the number of oocytes retrieved ≤ 15 , $n = 180$). The ultrastructures of oocytes between two groups were observed using transmission electron microscope, including zona pellucida, perivitelline space, oocyte organelles. **Results** The numbers of oocytes, good-quality embryos, the cycle cancellation rate in high responder group were significantly higher than those of normal responder group ($P < 0.05$), but the MII oocytes rate, fertilization rate, high-grade embryo rate, implantation rate and clinical pregnancy rate were significantly lower than those of normal responder group ($P < 0.05$). There were no statistical differences in cleavage rate, miscarriage rates, the incidence of moderate and severe ovarian hyperstimulation between two groups ($P > 0.05$). The ultrastructure showed that abnormal mitochondria increased significantly in the high responder group. **Conclusion** The high ovarian response can affect the oocytes quality and embryo development potentiality, ultimately reduce the pregnancy outcome.

Key words high ovarian response; oocytes; embryo development; pregnancy outcome; TEM; mitochondria