

褪黑素对 ICSI 周期中人未成熟卵母细胞体外成熟结果的影响

高明¹ 郝燕¹ 陈大蔚^{1,2} 纪冬梅¹ 陈蓓丽¹ 邹薇薇¹ 章志国^{1,2} 曹云霞^{1,2}

摘要 目的 探讨褪黑素的应用对卵胞浆内单精子注射 (ICSI) 周期中人未成熟卵母细胞体外成熟 (IVM)、受精和胚胎发育的影响。方法 收集的人未成熟卵母细胞随机置于含褪黑素和不含褪黑素的 IVM 培养液中进行 IVM 培养, 记录和分析未成熟卵 IVM 以及所获胚胎的发育情况。结果 用含褪黑素 IVM 培养液培养的未成熟卵母细胞为褪黑素组 ($n=94$) IVM 培养成熟 78 枚, ICSI 后受精 60 枚, 培养后卵裂 59 枚, 发育至囊胚 26 枚, 其 14 枚为优质囊胚, 而非褪黑素组 ($n=73$) IVM 培养成熟 60 枚, ICSI 后受精 44 枚, 培养后卵裂 42 枚, 随后 11 枚发育至囊胚, 仅 1 枚优质囊胚。两组间成熟率、受精率、卵裂率及囊胚率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但褪黑素组的优质囊胚率明显高于非褪黑素组 (53.8% vs 9.1%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$, $\chi^2=6.42$)。结论 褪黑素的应用改善了 IVM 效果, 使人未成熟

卵母细胞在 IVM、ICSI 及胚胎培养后发育更多的优质囊胚。

关键词 褪黑素; 未成熟卵母细胞; 体外成熟; 发育

中图分类号 R 321; R 329

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1044-04

1983 年, Veeck et al^[1] 首次报道了利用体外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 培养获得成熟卵母细胞并生育一正常婴儿。目前 IVM 已成为辅助生殖领域的一项重要技术, 但大量研究^[2-3] 结果显示, 未成熟卵母细胞经 IVM、体外受精和胚胎体外培养很少能发育至囊胚阶段。为了改善 IVM 结果, 研究人员不断对 IVM 过程各个环节进行改进。2013 年, Kim et al^[4] 将褪黑素引入人未成熟卵母细胞 IVM 培养体系, 在 IVM 培养液中添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素获得了 60% 的临床妊娠率, 显著高于其他报道的 IVM 妊娠率。研究^[4] 表明卵泡液中含有一定浓度的褪黑素, 在卵母细胞的生长和成熟过程中有重要的作用。该研究中添加 5~10 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素的 IVM 培养液培养卵胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 周期中获得的未成熟卵母细胞, 探讨褪黑素的应用能否改善 ICSI 周期未成熟卵母细胞及所获胚胎的发育, 为 IVM 方案的优化和临床应用提供依据。

2014-03-20 接收

基金项目: 国家重大研究计划 (编号: 2012CB944704); 国家自然科学基金委员会 (编号: 2012KJ06)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心, 合肥 230022

² 安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 高明, 男, 硕士研究生;

曹云霞, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com

章志国, 男, 副研究员, 责任作者, E-mail: zzg_100@gmail.com

chemotherapy drug resistance in cell lines YTS that over express COX-2 was analyzed among different groups treated with epirubicin alone and with celecoxib (20 $\mu\text{mol/L}$) or combined with LY294002 (25 $\mu\text{mol/L}$). Further, we detected the activation of Akt, p-Akt, Bax, Bcl-2, Mcl-1 by means of Western blot, meanwhile, flow cytometry was used to evaluate cell apoptosis rate. **Results** It was shown that epirubicin, celecoxib and LY294002 were in possession of cytotoxic effect on YTS cell line activity in a dose-dependent manner. When the dose of epirubicin increased, the expression of COX-2 showed a rising trend in YTS cell line. Compared with control cell, COX-2-over-expressing cells were more tolerant to epirubicin, and expressed higher expression of p-Akt, Bcl-2, Mcl-1 and less Bax. Over-express COX-2 was analyzed among different groups treated with epirubicin alone and with celecoxib (20 $\mu\text{mol/L}$) or combined with LY294002 (25 $\mu\text{mol/L}$). Cell survival rate decreased and cell apoptosis rate increased successively. At the same time, expression of Bax up-regulated and expression of Bcl-2, Mcl-1, p-Akt reduced successively. **Conclusion** Epirubicin has a cumulative effect on COX-2 expression induction in NK/T lymphoma cell lines YTS. Over-express COX-2 cell lines may increase tolerance of epirubicin through the apoptosis pathway mediated by p-Akt signaling.

Key words COX-2; apoptosis; Akt; epirubicin; NK/T lymphoma cell line YTS

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 卵母细胞和精子来源 未成熟卵母细胞来自于在本中心就诊的不孕症患者,经超促排卵行ICSI治疗且剥除颗粒细胞后镜下观察确定为未成熟卵母细胞。授精所用精子来自供卵患者丈夫。

1.1.2 试剂 褪黑素、透明质酸酶、雌激素、磷酸盐缓冲液、无水乙醇、丙酮酸钠、双抗、TCM199 (Sigma, 美国);COOK 胚胎培养液、Culture Oil (COOK, 澳大利亚);PVP (Irvine Scientific, 美国);重组促卵泡激素(雪兰诺,瑞士);人绒毛膜促性腺激素(丽珠,中国);供卵者自体血清。

1.1.3 主要器材 显微操作 1006 皿、中心井 3037 培养皿 (Falcon, 美国);巴斯德吸管 (Hilgenberg, 德国);显微固定针、显微注射针 (J. Y. LAB, 加拿大);细胞培养皿 (Nunc, 美国)。

1.1.4 主要仪器设备 体视显微镜 (Nikon, 日本);倒置显微镜及显微操作仪 (Olympus, 日本);超声及穿刺取卵系统 (Toshiba, 日本);常规培养箱 (SANYO, 日本);三气培养箱 (Galaxy, 英国)。

1.1.5 IVM 培养液 IVM 培养液准备:80% TCM199 + 2.2 g/L 丙酮酸钠 + 75 IU/L 促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH) + 500 IU/L 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) + 800 $\mu\text{g/L}$ 雌激素 + 5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素 + 6 g/L 双抗 + 20% 自体血清,平衡过夜备用。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的获取及分组 就诊于本中心年龄 35 岁以下的不孕症患者,予以常规方案降调节,促性腺激素促排卵,至卵泡直径达到成熟标准后,肌内注射 HCG,34 ~ 36 h 内超声引导经阴道穿刺取卵。ICSI 前将卵丘复合物置于含 80 U/ml 透明质酸酶 0.2 ml 的 3037 皿中间孔,拆除卵母细胞周围的大部分颗粒细胞,经倒置显微镜观察卵母细胞的成熟程度,未成熟卵母细胞 (GV 期或 MI 期) 供本研究使用。本研究共获得未成熟卵母细胞 167 枚 (GV 期 117 枚和 MI 期 50 枚),褪黑素组 94 枚 (含 5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素的 IVM 培养液培养 (GV 期 78 枚和 MI 16 枚),非褪黑素组 73 枚 (在不含褪黑素的 IVM 培养液培养 (GV 期 39 枚和 MI 期 34 枚))。

1.2.2 IVM 培养 将未成熟卵母细胞移入 IVM 培养液,三气培养箱培养 24 h,培养成熟的卵母细胞进

行 ICSI 授精。

1.2.3 ICSI 和胚胎培养 通过 IVM 培养成熟后的卵母细胞常规进行 ICSI:利用负压将处理后的精子自尾部开始吸入显微注射针内,调整卵母细胞至第一极体位于 6 点或 12 点处显微固定针固定,携带精子的显微注射针自正中 3 点位置垂直穿越透明带和卵母细胞胞浆膜,确认卵母细胞膜破裂后,将精子注入卵细胞浆内以完成授精过程。ICSI 后常规进行分裂期胚胎培养和囊胚培养,并记录胚胎发育情况。

1.2.4 分裂期胚胎及囊胚评分标准 分裂期胚胎根据形态学分为 4 级:I 级胚胎,细胞大小均匀,形态规则,碎片 < 10%;II 级胚胎,细胞大小比较均匀,胞质可有颗粒现象,碎片占卵胞浆体积的 10% ~ 20%;III 级胚胎,细胞大小明显不均,碎片占卵胞浆体积的 21% ~ 50%;IV 级胚胎,细胞严重大小不均,碎片占卵胞浆体积 50% 以上。I 和 II 级胚胎为优质胚胎。

囊胚评分及囊胚扩张度评分依据 Gardner 评分法^[5]:A 型内细胞团 (inner cell mass, ICM) 由许多紧密包裹的细胞组成,B 型 ICM 由包裹不紧密细胞组成。A 型滋养层由很多形态均一细胞形成连续的上皮,B 型滋养层由较少细胞形成疏松的上皮。由 A 型或 B 型 ICM 和滋养层组成的囊胚称为优质囊胚。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据以百分率表示,对结果进行 χ^2 检验及 Fisher's 精确检验。

2 结果

2.1 两组未成熟卵母细胞的 IVM 褪黑素组:未成熟卵母细胞 94 枚,IVM 培养成熟 78 枚,受精 60 枚,卵裂 59 枚,囊胚 26 枚,其中获得 14 枚优质囊胚;非褪黑素组:未成熟卵母细胞 73 枚,IVM 培养成熟 60 枚,受精 44 枚,卵裂 42 枚,囊胚 11 枚,其中 1 枚优质囊胚。两组间比较:成熟率、受精率、卵裂率及囊胚率差异无统计学意义,但褪黑素组的优质囊胚率明显高于非褪黑素组 (53.8% vs 9.1%),差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $\chi^2 = 6.42$),见表 1。未成熟卵母细胞和 IVM 后成熟卵母细胞见图 1。

2.2 两组 GV 期及 MI 期末成熟卵母细胞的 IVM 褪黑素组和非褪黑素组均含有 GV 期和 MI 期末成熟卵母细胞,两组 GV 期和 MI 期末成熟卵母细胞发育情况,成熟率、卵裂率、囊胚率和优质囊胚率比

较,差异无统计学意义,见表2。

2.3 GV期与MI期末成熟卵母细胞的IVM 褪黑素组和非褪黑素组共有GV期末成熟卵母细胞117枚,MI期卵母细胞50枚,GV期和MI期末成熟卵母细胞发育情况,成熟率、卵裂率、囊胚率和优质囊胚率比较,差异无统计学意义,见表3。

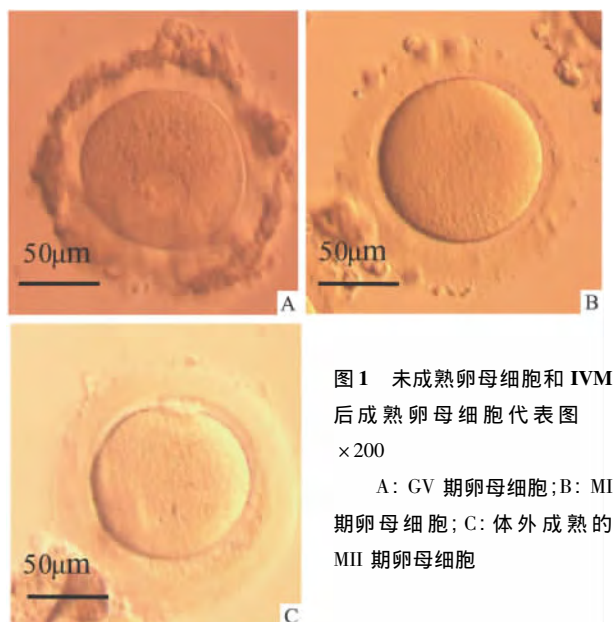


表1 褪黑素组与非褪黑素组未成熟卵母细胞发育比较

项目	褪黑素组	非褪黑素组
所获卵母细胞数目(n)	94	73
IVM成熟率(%)	78/94(83.0)	60/73(82.2)
受精率(%)	60/78(76.9)	44/60(73.3)
卵裂率(%)	59/60(98.3)	42/44(95.4)
囊胚率(%)	26/59(44.1)	11/42(26.1)
优质囊胚率(%)	14/26(53.8)	1/11(9.1)*

与褪黑素组比较: * $P < 0.05$

表2 褪黑素组与非褪黑素组GV期及MI期末成熟卵发育比较

项目	褪黑素组		非褪黑素组	
	GV	MI	GV	MI
所获卵母细胞数目(n)	78	16	39	34
IVM成熟率(%)	63/78(80.8)	15/16(93.8)	29/39(74.4)	31/34(91.2)
受精率(%)	48/63(76.2)	12/15(80.0)	21/29(72.4)	23/31(74.2)
卵裂率(%)	47/48(97.9)	12/12(100.0)	20/21(95.2)	22/23(95.7)
囊胚率(%)	22/47(46.8)	4/12(33.3)	7/20(35.0)	4/22(18.2)
优质囊胚率(%)	12/22(54.5)	2/4(50.0)	0/7(0.00)	1/4(25.0)

表3 GV期及MI期末成熟卵母细胞发育比较

项目	GV	MI
所获卵母细胞数目(n)	117	50
IVM成熟率(%)	92/117(78.6)	46/50(92.0)
受精率(%)	69/92(75.0)	35/46(76.1)
卵裂率(%)	67/69(97.1)	34/35(97.1)
囊胚率(%)	29/67(43.3)	8/34(23.5)
优质囊胚率(%)	12/29(41.4)	3/8(37.5)

2.4 囊胚情况 本研究共获得囊胚37枚,其中优质囊胚15枚,14枚发育自褪黑素组,另1枚发育自非褪黑素组。见图2。

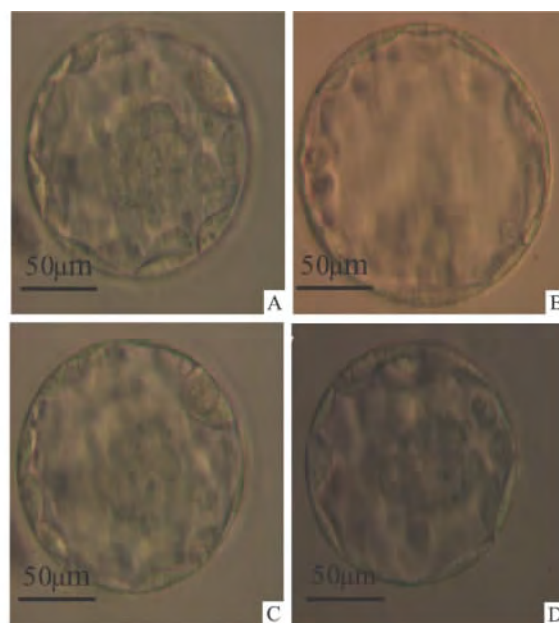


图2 优质囊胚的代表图 ×500

A:4AB; B:4BA; C:4AA; D:4AA

3 讨论

研究^[6]表明氧化应激对卵母细胞成熟起着抑制作用,在体内生长的卵母细胞,会受到体内抗氧化物质,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的保护而免于损伤。褪黑素作为体内调节生理节律周期的内源性物质,能够对抗氧化应激,卵泡液中一定浓度的褪黑素直接保护着卵母细胞在生长发育过程中免受氧化应激的损伤,卵泡液中褪黑素的存在影响到卵母细胞的质量和其后续的发育潜能^[7-8]。

本研究中人未成熟卵母细胞在含褪黑素的IVM培养液中进行IVM,体外受精及胚胎培养,褪黑素组成熟率、受精率、卵裂率、囊胚率及优质囊胚率均高于非褪黑素组,其中优质囊胚率方面,组间差异有统计学意义。本研究显示褪黑素应用于IVM培养液能改善人未成熟卵母细胞的IVM结果,提高优质囊胚形成。研究中GV期和MI期卵母细胞被分开,同一发育阶段的卵母细胞行共同培养。MI期卵母细胞的成熟率高于GV期卵母细胞;受精率与卵裂率方面,两者相当;囊胚及优质胚胎率方面,GV期卵母

细胞显著高于 MI 期卵母细胞,但各指标的组间差异均无统计学意义。但本研究样本量有限,今后仍需扩大样本量,并对褪黑素促进人胚胎发育的机制及所获胚胎的安全性进行研究。

本研究结果表明 IVM 培养液中低浓度的褪黑素因其自由基清除作用对卵母细胞的成熟和胚胎的发育有促进效应;ICSI 周期中所获得的人未成熟卵母细胞具有很高的利用价值。ICSI 周期中的人未成熟卵母细胞体外成熟后可以捐赠给卵子库或用于研究,也可应用于患者自身,提高累积妊娠率^[2-3,9]。本研究中通过褪黑素的应用使体内成熟失败人卵母细胞在 IVM、ICSI 及胚胎培养后获得更多的优质囊胚,为 IVM 的优化提供依据,也为人未成熟卵母细胞再利用的研究提供有益的借鉴。

参考文献

- [1] Veeck L L, Wortham J W Jr, Witmyer J, et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization [J]. Fertil Steril, 1983, 39(5): 594-602.
- [2] Liu Y, Cao Y X, Zhang Z G, et al. Artificial oocyte activation and human failed-matured oocyte vitrification followed by *in vitro* maturation [J]. Zygote, 2013, 21(1): 71-6.
- [3] Zhang Z G, Liu Y, Xing Q, et al. Cryopreservation of human failed-matured oocytes followed by *in vitro* maturation: vitrification is superior to the slow freezing method [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9: 156.
- [4] Kim M K, Park E A, Kim H J, et al. Does supplementation of *in vitro* culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS [J]. Reprod Biomed Online, 2013, 26(1): 22-9.
- [5] Gardner D K, Schoolcraft W B. Culture and transfer of human blastocysts [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 1999, 11(3): 307-11.
- [6] Combelles C M, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 18(6): 864-80.
- [7] Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [J]. Endocr J, 2013, 60(1): 1-13.
- [8] Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle [J]. J Ovarian Res, 2012, 5:5.
- [9] 魏兆莲, 周平, 曹云霞, 等. 未成熟卵体外培养成熟治疗难治性多囊卵巢综合征 [J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(5): 405-6.

Effect of melatonin applied to IVM medium on IVM outcome of human immature oocytes retrieved from ICSI cycles

Gao Ming¹, Hao Yan¹, Chen Dawei^{1,2}, et al

(¹Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Biopreservation and Artificial Organs, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effect of melatonin applied to *in vitro* maturation (IVM) medium on IVM, fertilization and embryonic development in human immature oocytes collected from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles. **Methods** All of the human immature oocytes were randomly placed into IVM medium supplemented with and without melatonin for IVM. **Results** The oocytes culture in the medium with melatonin belonged to the group melatonin ($n=94$), in which 94 immature oocytes were collected. In the group melatonin 78 matured, 60 fertilized, 59 cleaved, and finally 26 developed to blastocysts, of which, 14 were high-quality blastocysts. In the group non-melatonin ($n=73$), 60 matured, 44 fertilized and 42 cleaved. After a further culture for blastocyst, 11 blastocysts were achieved and only 1 high-quality blastocyst. No significant difference was found in IVM, fertilization, cleavage and blastocyst rates between groups. But the high-quality blastocyst rate in the group melatonin was higher than that in the group non-melatonin (53.8% vs 9.1%), there was a significant difference between groups ($P<0.05$, $\chi^2=6.42$). **Conclusion** IVM medium supplemented with melatonin is applied to IVM human immature oocytes retrieved from ICSI cycles and can achieve the formation of more high-quality blastocysts.

Key words melatonin; human immature oocyte; *in vitro* maturation; development