

# 暗色透明带卵母细胞临床结局及超微结构分析

施 维, 许 波, 金仁桃, 吴丽敏, 周桂香, 刘雨生, 童先宏

**摘要** 目的 对暗色透明带(ZP)卵母细胞在体外受精胚胎移植中,胚胎发育潜能及受精率、种植率、临床妊娠率及超微结构进行分析。方法 根据光镜下ZP的折光性,将33例患者卵母细胞全部为暗色ZP的纳入研究组,将108例患者卵母细胞全部为正常ZP的纳入对照组。对两组患者的年龄、不孕年限、基础卵泡刺激素值(FSH)、促性腺激素(Gn)总量、人绒毛促性腺激素(HCG)注射日内膜厚度、HCG注射日雌二醇(E2)值、获卵数、成熟卵率、受精率、种植率、临床妊娠率和流产率进行比较分析。并对暗色ZP的卵母细胞和正常卵母细胞在透射电子显微镜下观察的卵母细胞ZP、卵母细胞卵周隙、卵母细胞细胞器等超微结构进行分析。结果 两组患者年龄、不孕年限、基础FSH、Gn总量、HCG注射日内膜厚度、HCG注射日E2值、获卵数、成熟卵率、卵裂率和流产率差异无统计学意义。而研究组的受精率、优质胚胎率、种植率、临床妊娠率较对照组均显著下降( $P < 0.05$ )。对研究组的超微结构分析发现,暗色ZP卵母细胞ZP内高电子致密物明显增多,同时卵母细胞胞质中异常线粒体和液泡明显增多。结论 暗色ZP卵母细胞的超微结构改变如胞质内异常线粒体及液泡增多,从而导致卵母细胞质量下降、胚胎发育潜能和临床妊娠结局降低。

**关键词** 透明带;卵母细胞;胚胎发育;透射电镜;线粒体

中图分类号 R 321.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0434-05

受精是一个精卵相互作用极其精细而又协调发育的复杂过程,而人类卵子受精过程中透明带(zona pellucid, ZP)起着不可替代的作用。暗色ZP属于胞质外异常<sup>[1-2]</sup>,曾有多个中心对暗色ZP进行了报道和相关分析,根据笔者中心临床数据统计暗色ZP的卵母细胞在接受体外受精胚胎移植(*in vitro ferti-*

lization-embryo transfer, IVF-ET)的患者中总体发生率约为5%,笔者发现在一次超排卵过程中卵母细胞全部为暗色ZP的周期中受精率和胚胎发育潜能低下。因此,该研究对1次周期中出现全部为暗色ZP的卵母细胞进行回顾性分析及超微结构研究,探讨其是否影响妊娠结局和胚胎发育潜能。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集我院2010年11月~2012年6月共141例接受IVF或卵胞质内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)治疗的不孕症患者,其中1次促排周期中全部卵母细胞为暗色ZP的患者33例(19例IVF,14例ICSI周期)为研究组,全部卵母细胞为正常ZP的患者108例(64例IVF,44例ICSI周期)为对照组。两组患者的年龄均 $\leq 36$ 岁,不孕原因均为输卵管因素、男方因素(弱精子症、梗阻性无精子症等)等,并排除染色体异常、卵巢低反应等疾病。收集IVF-ET周期新鲜废弃卵母细胞(常规IVF 42~48 h后未分裂的成熟受精卵母细胞)共23枚,其中暗色ZP的卵细胞11枚,正常ZP卵母细胞12枚,制作成电镜标本观察。所有用于研究的卵母细胞均经患者同意并签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 促排卵方法** 患者均为标准长方案:从月经的黄体中期开始使用促性腺激素释放激素激动剂(gonadotropin releasing hormone agonist, GnRHa)皮下注射,降调节14 d后,超声检查子宫内膜厚度,窦卵泡数量和大小;待血清卵泡刺激素值(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(Estradiol, E2)达到降调标准后,则开始使用FSH和(或)尿促性腺激素(human menopausal gonadotropin, HMG)超排卵治疗。用阴道B超每天监测卵泡发育情况,当B超显示2个卵泡 $> 18$  mm或3个卵泡 $> 17$  mm时,当天肌注人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG) 10 000 IU, 34~36 h后取卵。取卵后常规短时受精或ICSI培养<sup>[3]</sup>。

2013-10-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373671);安徽省自然科学基金(编号:1308085QH131);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2013Z134)

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:施 维,女,硕士研究生;

刘雨生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: shizhizhongxin@126.com;

童先宏,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: tong68xianhong@163.com

**1.2.2 IVF-ET 及妊娠结局判断** 卵母细胞取出体外后,精液处理采用上游法或密度梯度离心法。卵丘复合体培养 4 h 后,根据男方精液常规指标分析指标采用不同的授精方式<sup>[4]</sup>,即(a+b)级精子总数 $\geq 10 \times 10^6$ 的采用 IVF,另外(a+b)级精子总数 $< 10 \times 10^6$ 的采用 ICSI。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 4 级,Ⅰ级:卵裂球大小均匀,无碎片;Ⅱ级:卵裂球大小均匀,碎片 $< 20\%$ ;Ⅲ级:卵裂球大小不均匀,碎片 $< 20\%$ ;Ⅳ级:卵裂球大小均匀或不均匀,碎片 $20\% \sim 50\%$ 。Ⅰ~Ⅱ级胚胎视为优质胚胎,根据患者情况将 2~3 个形态学评分最佳的胚胎在超声指导下移植入子宫,剩余有发育潜能的胚胎行冷冻保存。胚胎移植后第 2 天开始行黄体支持治疗。胚胎移植 14 d 后检查血清绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -HCG),阳性者继续进行黄体支持,胚胎移植 4 周后 B 超检查见孕囊及胚芽诊断为临床妊娠,否则为生化妊娠。

**1.2.3 光镜下观察 ZP** 将颗粒细胞去除干净在光镜下观察卵母细胞 ZP 情况,1 个超排周期中全部为暗色 ZP 的为研究组,正常 ZP 为对照组。在 ICSI 周期中,将颗粒细胞包裹的卵母细胞放入 FALCON 3001 皿中,用 40 IU 透明质酸酶消化,在手工拉细的玻璃针吹吸去除多余的放射冠细胞和血细胞,彻底将放射冠细胞和卵母细胞分离。在 IVF 周期中,将受精后 16~18 h 的卵丘复合物用手工拉细的玻璃针小心吹吸多次,分离放射冠细胞和卵母细胞。将分离后的卵母细胞在奥林巴斯倒置显微镜下放大 400 倍观察 ZP 情况。

**1.2.4 IVF 相关结局指标计算方法** ICSI 周期中成熟卵率=成熟卵数/获卵数;IVF 受精率=受精卵数/获得卵数 $\times 100\%$ ;ICSI 受精率=受精卵数/成熟卵数 $\times 100\%$ ;卵裂率=卵裂卵数/受精卵数 $\times 100\%$ ;优质胚胎率=(Ⅰ级胚胎数+Ⅱ级胚胎数)/总胚胎数 $\times 100\%$ ;胚胎种植率=妊娠囊数/移植胚胎个数;临床妊娠率=临床妊娠数/移植周期数 $\times 100\%$ ;流产率=流产数/临床妊娠数 $\times 100\%$ 。

**1.2.5 透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)下观察卵母细胞** 将标本迅速固定于 4℃、25 g/L 的戊二醛,固定 4~6 h 后将卵母细胞从戊二醛中取出,用 pH 7.2 的 PBS 液冲洗干净,固定于 1% 锇酸 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℃ 烤箱中 48 h,降至室温。取出包埋好的组织以 60~80 nm 厚度进行超薄切片(超薄切片机型号 LKB-NOVA 型,瑞典产)。将干燥好的带样品的铜网放入醋酸双氧液液滴中染色 30 min,用双蒸水冲洗,再放入柠檬酸铅液滴中染色 10 min,双蒸水冲洗后干燥,制备好的电镜样品 JEM-1230 型 TEM 观察。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,两组独立样本比较采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 光镜下观察暗色 ZP 卵母细胞与正常 ZP 卵母细胞** 两组的卵母细胞在光镜下的形态如图 1 所示,研究组为暗色 ZP 的卵母细胞,对照组为正常 ZP 的卵母细胞在光镜下显示出折光率不同。

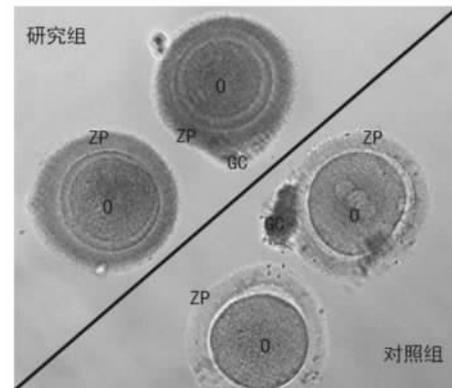


图 1 光镜下的暗色 ZP 卵母细胞与正常 ZP 卵母细胞  $\times 400$

ZP: 透明带; O: 卵胞质; GC: 颗粒细胞

**2.2 两组患者一般情况及超排卵观察指标及临床结局比较** 两组患者的年龄、不孕年限、基础 FSH、促性腺激素(Gn)总量、注射 HCG 日内膜厚度及 E2 值和获卵数相比较,差异均无统计学意义,见表 1。两组在 ICSI 周期中成熟卵率、卵裂率间和流产率差异均无统计学意义;而研究组双原核(two pronuclei, 2PN)受精率、优质胚胎率、胚胎种植率和临床妊娠率均明显低于对照组( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.3 TEM 下暗色 ZP 卵母细胞与正常 ZP 卵母细胞的超微结构**

表1 一般临床资料及基本特征比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目           | 研究组(n=33)       | 对照组(n=108)      | t值   | P值   |
|--------------|-----------------|-----------------|------|------|
| 年龄(岁)        | 31.26±4.23      | 30.56±4.39      | 0.58 | 0.56 |
| 不孕年限(年)      | 5.13±2.85       | 4.88±3.05       | 0.44 | 0.66 |
| 基础FSH(U/L)   | 7.70±2.55       | 7.35±2.64       | 0.65 | 0.52 |
| Gn总量(IU)     | 2496.63±755.86  | 2407.53±867.14  | 0.52 | 0.61 |
| HCG日内膜厚度(mm) | 11.21±2.35      | 11.13±2.14      | 0.64 | 0.52 |
| HCG日E2(ng/L) | 2772.33±1302.11 | 2912.18±1384.94 | 0.80 | 0.43 |
| 获卵数(个)       | 10.18±5.11      | 10.73±4.76      | 0.66 | 0.51 |

表2 IVF结局相关指标比较(%)

| 项目         | 研究组            | 对照组            | $\chi^2$ 值 | P值    |
|------------|----------------|----------------|------------|-------|
| ICSI周期成熟卵率 | 73.77(90/122)  | 78.75(404/513) | 1.42       | 0.230 |
| 受精率        |                |                |            |       |
| IVF        | 64.04(130/203) | 74.61(479/642) | 8.56       | 0.003 |
| ICSI       | 67.78(61/90)   | 81.19(328/404) | 7.91       | 0.005 |
| 卵裂率        | 99.48(190/191) | 99.26(801/807) | 0.02       | 0.880 |
| 优质胚胎率      | 51.58(98/190)  | 64.17(514/801) | 10.31      | 0.001 |
| 胚胎种植率      | 23.33(14/60)   | 38.80(71/183)  | 4.75       | 0.030 |
| 临床妊娠率      | 21.95(9/41)    | 49.50(50/101)  | 9.11       | 0.003 |
| 流产率        | 22.22(2/9)     | 12.00(6/50)    | 0.09       | 0.780 |

**2.3.1 对照组** ZP为正常的网状疏松状结构,厚10~14 nm,含有大量卵泡细胞膜残留物,内可见散在排列的纤维物,纤维呈直线型或弯曲型,长0.1~0.4  $\mu\text{m}$ ,见图2A、C。对照组在卵膜和ZP之间为卵周隙,呈一狭窄透亮间隙,内可见第一极体,呈树突状粗大的微绒毛,见图3C。卵膜下可见一层散在线性排列的皮质颗粒(cortical granule, CG),见图3A。胞质内细胞器丰富,可见高尔基体及周围的分泌小泡、光面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER)、SER集合管、SER大泡及小泡、线粒体等,其中线粒体又是最主要的细胞器。线粒体大多呈椭圆形,中度密集,有少量嵴,结构清晰;有些线粒体较平,呈新月型围绕在SER小泡周围;有些线粒体成簇,围绕于整齐SER嵴周围,线粒体与SER小管及小泡一起形成体积较大线粒体SER-线粒体复合物,见图4A。

**2.3.2 研究组** ZP呈网状疏松结构,但可见高电子密度的致密纤维组织,明显比正常ZP增多,见图2B、D。卵周隙正常同对照组,可见第一极体及丰富的微绒毛等,见图3D。卵膜下均可见散在分布的皮质颗粒,见图3B。胞质中可见大量细胞器,高尔基体、SER、SER集合管等与对照组相比未见异常。但胞质内主要的细胞器为线粒体,其数量略减少,有的孤立存在,未与SER泡相连;线粒体结构也存在异常,如嵴结构消失或减少、形态幼稚化、内膜结构

丢失、线粒体内可见空泡及膨大等,见图4B、C。SER-线粒体复合物中也可见大量结构异常的线粒体及线粒体空泡复合物。胞质中还含大量SER液泡,打断正常胞质间连接,见图4D。

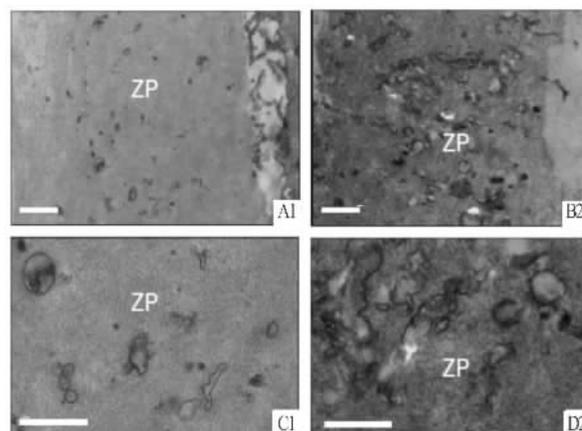


图2 暗色ZP与正常ZP在TEM下的结构

醋酸双氧铀染色  $\times 20\ 000$

1: 对照组; 2: 研究组; A、B: ZP  $\times 10\ 000$ ; C、D: A、B的放大结构  $\times 20\ 000$

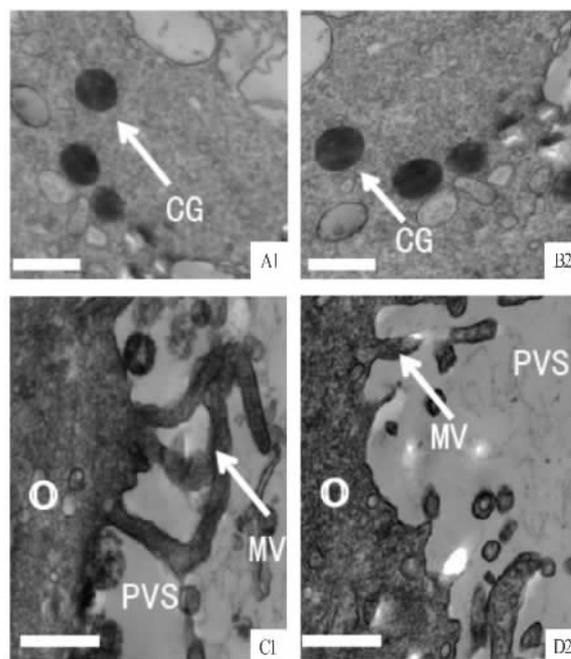


图3 TEM下两组卵母细胞胞质与卵周隙的超微结构

醋酸双氧铀染色  $\times 20\ 000$

1: 对照组; 2: 研究组; A、B: 胞质; C、D: 卵周隙; CG: 皮质颗粒; O: 卵胞质; MV: 微绒毛; PVS: 卵周隙

### 3 讨论

目前在IVF实验室工作中评价卵母细胞及胚胎

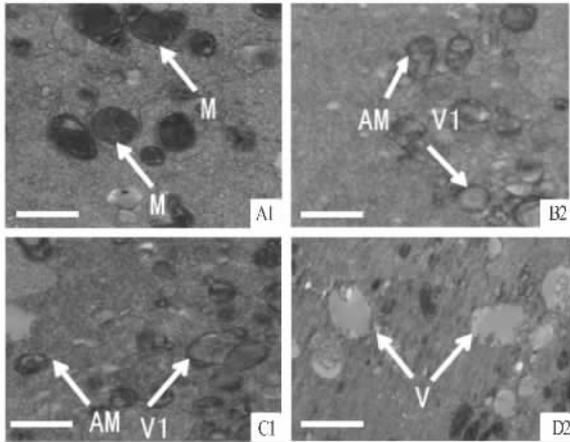


图4 TEM下两组的卵母细胞胞质与线粒体的超微结构  
醋酸双氧铀染色×20 000

1: 对照组; 2: 研究组; A、B、C、D: 胞质; M: 线粒体; AM: 异常线粒体; V: 液泡; V1: 线粒体空泡

质量仍多采用形态学评分法,其没有损害其生物活性及发育潜能,故很适用于辅助生殖等生物技术领域。ZP也是评价胚胎和卵母细胞质量和发育潜能的指标之一。已有研究<sup>[1-5]</sup>报道,ZP异常均可以影响受精、胚胎发育潜能和种植率。Nottola用相差显微镜观察颜色发暗的囊胚,发现其ZP外型不规则、结构断裂,发育潜能低下<sup>[6]</sup>;相反有学者认为暗色ZP和正常卵母细胞相比有着同样的受精率和胚胎发育潜能,可以成功怀孕<sup>[1-7]</sup>。本研究显示,虽然移植了暗色ZP的胚胎的患者可以成功怀孕,但临床妊娠率显著降低。因此笔者推测暗色ZP卵母细胞的卵母细胞质量和胚胎发育的潜能降低。

目前,TEM可作为评价卵子及胚胎质量的最有价值的客观评判标准。本研究发现暗色ZP卵子的ZP内高电子致密物及纤维物明显增多,这有可能是ZP在光镜下折射改变的原因之一。ZP是由初级卵母细胞分泌而形成的酸性糖蛋白膜,在诱导精卵识别和结合,激活精子发生顶体反应,受精后阻止多精入卵中起着重要的作用<sup>[8]</sup>。任何ZP结构、蛋白成分发生异常都会影响精、卵正常结合,导致受精失败,而且ZP蛋白质表达减少或者修饰异常可能直接反应出卵母细胞成熟过程中存在的不足<sup>[9]</sup>,同时也表明颗粒细胞和卵母细胞胞质之间正常的信号通信和连接可能受到了干扰。本研究发现暗色ZP的卵子在IVF和ICSI周期中的受精率均明显降低,表明暗色ZP并不是通过阻止精卵结合来影响正常的受精过程,而是表明这些暗色ZP的卵子可能成熟程度不足,并且与周围颗粒细胞的通讯存在障碍。

其次,本研究用TEM观察时发现,暗色ZP的卵母细胞胞质内线粒体结构严重畸形,线粒体空泡、膨大、内膜结构丢失等。线粒体作为卵母细胞内最主要的细胞器,产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),是细胞的主要能量供应者,对卵母细胞发育潜能起着决定性作用,与细胞的代谢水平、增殖和分化密切相关<sup>[10-11]</sup>。线粒体形态结构的改变可以直接影响代谢活动,从而降低卵母细胞的质量和胚胎发育潜能<sup>[12]</sup>。异常线粒体的数量在胞质中明显增多,可能影响了卵母细胞的正常能量代谢和提供,从而导致暗色ZP卵母细胞受精能力及优质胚胎率的下降。

暗色ZP卵母细胞的胞质中发现有大量液泡结构,打断了胞质中正常连接。研究<sup>[13]</sup>显示卵母细胞液泡的形成可能也标志着其他胞质超微结构的改变,如受损的线粒体的存在、卵黄膜断裂等卵母细胞凋亡、衰老方面的表现。Coticchio et al<sup>[14]</sup>指出在发育成熟卵母细胞中很少出现,这些液泡可能被认为是胞质不成熟的一个标志。

研究组中IVF和ICSI受精率、优质胚胎率、种植率和临床妊娠率与对照组相比均明显降低,差异有统计学意义。根据TEM研究结果表明,这些卵子胞质可能不成熟,胞质与核发育不同步,影响了卵母细胞的正常发育,从而导致受精失败,发育潜能低下。另外,研究组的卵母细胞可能存在着卵子本身质量低下,影响了卵母细胞正常的生长发育,致使优质胚胎率下降。即使种植了优质的胚胎由于胚胎内部线粒体异常能量代谢不协调,胚胎发育异常或阻滞而导致种植率下降,临床妊娠结局差的结果。

本研究即应用TEM观察暗色ZP卵母细胞的超微结构,结合线粒体及其他细胞器形态特征与功能的改变,分析卵母细胞受精失败及胚胎发育阻滞的原因。发现其超微结构的改变可能是造成其临床妊娠结局下降的重要原因,所以暗色ZP可能提示了胚胎发育潜能较差,在选择移植胚胎时应避免选择暗色ZP的胚胎。

#### 参考文献

- [1] Rienzi L, Ubaldi F M, Iacobelli M, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome [J]. Fertil Steril, 2008, 90(5): 1692-700.
- [2] Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation [J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(5): 608-15.

- [3] 何晶晶,章志国,邢琼. 短时受精与传统受精的临床应用 [J]. 安徽医科大学学报 2011 46(1): 76-8.
- [4] Younglai E V, Holt D, Brown P, et al. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(9): 1950-3.
- [5] Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, et al. Brown oocytes: implications for assisted reproductive technology [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(5): 1522-5.
- [6] Nottola S A, Makabe S, Stallone T, et al. Surface morphology of the zona pellucida surrounding human blastocysts obtained after *in vitro* fertilization [J]. *Arch Histol Cytol*, 2005, 68(2): 133-41.
- [7] Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, et al. Brown oocytes: implications for assisted reproductive technology [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(5): 1522-5.
- [8] Wassarman P M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion [J]. *Cell*, 1999, 96(2): 175-83.
- [9] Petersen C G, Vagnini L D, Mauri A L, et al. Evaluation of zona pellucida birefringence intensity during *in vitro* maturation of oocytes from stimulated cycles [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 23(9): 53.
- [10] Balaban R S, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging [J]. *Cell*, 2005, 120(4): 483-95.
- [11] 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.
- [12] Motta P M, Nottola S A, Makabe S, et al. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 129-47.
- [13] Isachenko V, Selman H, Isachenko E, et al. Modified vitrification of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure [J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 7(2): 211-6.
- [14] Coticchio G, Borini A, Distratis V, et al. Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(4): 131-40.

## Analysis of the clinical outcome and ultrastructure of the oocytes with dark zona pellucida

Shi Wei, Xu Bo, Jin Rentao, et al

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

**Abstract Objective** To analyze the embryo developmental potential, fertilization rate, implantation rate, clinical pregnancy rate and ultrastructural of oocytes with dark zona pellucid (DZP) *in vitro* fertilization-embryo transfer.

**Methods** According to the different refraction of zona in microscope, the oocytes with DZP retrieved from 33 patients were collected as the study group, and 108 patients of whom oocytes with normal zona pellucida were received as controls. The age, duration of infertility, basic FSH, total of Gn doses, endometrial thickness on HCG day, E2 value on HCG day, number of oocytes, MII oocytes rate, fertilization rate, good embryos rate, implantation rate, clinical pregnancy rate and abortion rate were compared respectively between these two groups. The ultrastructure of oocytes with DZP and normal zona pellucida was detected using transmission electron microscope, including zona pellucida, perivitelline space, oocyte organelles. **Results** No differences were detected in the age, duration of infertility, basic FSH, total of Gn doses, endometrial thickness on HCG day, E2 value on HCG Day, number of retrieving oocytes, rate of MII oocytes and abortion rate between them. The rate of fertilization in IVF and ICSI cycles, good embryos, implantation and clinical pregnancy in study group were significantly lower than that in control group. By ultrastructural analysis of using transmission electron microscopy (TEM), the appearance of high electron dense in DZP, the number of abnormal mitochondria and vacuoles in the cytoplasm of oocytes with DZP increased significantly. **Conclusion** The ultrastructural alterations such as abnormal mitochondria and intracytoplasmic vacuoles in oocytes with DZP, are resulting in reduced oocytes quality, embryo development potential and poor clinical pregnancy outcome.

**Key words** zona pellucida; oocytes; embryo development; TEM; mitochondria