文章编号:1000-5404(2010)16-1785-03

论著

短时受精对体外受精结果的影响

屈宗银,王凤英,李玉艳,何 畏,俞炽阳,李明舵,邓 丽,彭 倩,姚春莉 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

【摘要】 **目的** 了解短时受精对体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)结局的影响。**方法** 选择在本生殖医学中心接受常规 IVF 治疗的 248 个周期,通过一定条件限制将其分为短时受精组和过夜受精组,将 248 个常规 IVF 周期中的卵子进行配对资料(同一 IVF 周期同时进行短时受精和过夜受精者,共 20 个周期)和非配对资料(1 个 IVF 周期只采用 1 种方式受精者,过夜受精组 177 个周期,短时受精组 51 个周期)研究,比较短时受精组和过夜受精组的正常受精(2PN)率、多精受精率、卵裂率、优质胚胎率及临床妊娠率。**结果** 无论配对还是非配对资料,短时受精组的正常受精(2PN)率、多精受精率、卵裂率、优质胚胎率、临床妊娠率等与过夜受精组比较均无统计学差异($P>0.05$);在非配对资料中,短时受精组的移植优胚率(77.33±36.69)%明显高于过夜受精组(64.04±41.85)%($P<0.05$),而在配对资料中,用于移植的优质胚胎率短时受精组和过夜受精组无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 短时受精是一种安全、有效的受精方式,但不能改善胚胎质量和妊娠结局。

【关键词】 体外受精-胚胎移植;胚胎质量;短时受精;过夜受精
【中图法分类号】 R321-33;R321.2 【文献标志码】 A

Effects of short imsemination on *in vitro* fertilization outcomes

Qu Zongyin, Wang Fengying, Li Yuyan, He Wei, Yu Chiyang, Li Mingduo, Deng Li, Peng Qian, Yao Chunli (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of short gamete (sperm-oocyte) co-incubation on outcomes of *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET). **Methods** All oocytes from 248 IVF-ET cycles in our department from October 2008 to September 2009 were studied in pair and non-pair design. They were divided with some condition into shortened insemination group and overnight insemination group. Their IVF outcomes were analyzed. **Results** All pair and non-pair data showed that there was no significant difference in the number of retrieved oocytes, percentage of oocytes at MⅡ stage, diploid fertilization rates (two pronuclei, 2PN), polyspermy (>2PN) rates, cleavage rates, high quality embryo rates and the pregnancy rates between shortened insemination group and overnight fertilization group ($P>0.05$). The high quality embryo rates used for ET in shortened insemination group were significantly higher than those in overnight insemination group in the non-pair data ($P<0.05$), but no significant difference between shortened insemination and overnight fertilization groups was found in the pair data ($P>0.05$). **Conclusion** Short gamete co-incubation is reliable and efficacious. However, it could not improve embryo quality.

【**Key words**】 *in vitro* fertilization-embryo transfer; embryo quality; shortened insemination; overnight insemination

Supported by the Tackling Funds of Science and Technology Research of Population and Family Planning of Chongqing (06-3-01). Corresponding author: Wang Fengying, Tel: 86-23-68765903, E-mail: fyw018@163.com

近几年,国内外一些生殖中心通过短时受精方式进行体外受精(*in vitro* fertilization, IVF),获得了较好的 IVF 结果[1]。但也有研究者发现短时受精不但不能改变 IVF 结局,还可明显增加多精受精率[2]。本中心也对部分 IVF 周期进行了短时受精,现将结果总结如下,以进一步探讨短时受精在 IVF 中的作用。

1 资料与方法

1.1 受精方式的选择

选择 2008 年 10 月至 2009 年 9 月在本中心进行 IVF 治疗

【基金项目】 重庆市人口计生委科技攻关基金(06-3-01)
【通信作者】 王凤英,电话:(023)68765903,E-mail:fyw018@163.com

的248个周期的卵子。短时受精选择主要依据以下几个条件：卵子整体成熟度较好，授精前不需要延时培养者；精子参数较差，常规IVF存在一定风险，需要提前了解受精情况者；对卵子数量在14个以上的部分周期，将卵子一分为二，一部分进行短时受精，一部分进行常规过夜受精（配对资料，共20个周期）。对于卵子整体成熟度明显不够，需要延长授精前卵子培养时间者不进行短时受精。1个IVF周期只采用1种方式受精者为未配对资料，其中包括短时受精51个周期，过夜受精177个周期。

1.2 受精及剥卵时间

按WHO人类精液实验室检验手册要求和标准对精液进行评估和处理，根据精液情况分别采用上游法或密度梯度离心方法分离精子。授精时间为取卵后2～6 h，最终授精浓度每个卵约2万条精子。短时受精组剥卵（脱颗粒细胞）时间为授精后4～5 h，过夜受精组为授精后16～20 h（D1）。原核（PN）观察时间均为授精后16～20 h。

授精后第2、3天（D2、D3）观察卵裂和胚胎情况，选择胚胎质量较好者（如临床有特殊要求者除外）行宫腔内胚胎移植。每个患者移植1～3个胚胎。

1.3 胚胎评分及优质胚胎的判断

过夜受精采用本中心常规评分标准：参照Puissant的标准作修改：4分，卵裂球大小均匀，形态规整，无碎片；3分，卵裂球形态大小稍不均，碎片≤15%；2分，卵裂球形态大小不均，碎片<50%；1分，卵裂球可辨，碎片≥50%。短时受精同时采用等级胚胎评分系统[3]进行评分。

D2卵裂球3个以上或D3卵裂球6～10个，常规评分3分和4分，无空泡、多核及其他明显形态异常等情况，且碎片≤15%者被认为是优质胚胎（简称优胚）。

在短时受精组，当用常规评分显示有足够的优质胚胎供移植选择时，同时参照等级胚胎评分结果，从最高分开始选择用于移植的胚胎。

1.4 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件分别对数据进行单因素方差分析、χ^2检验。

2 结果

2.1 未配对资料的获卵情况及受精结果

2.1.1 获卵情况　在未配对资料中，过夜受精组患者年龄大于短时受精组（$P<0.05$），但获卵数、MⅡ期卵数量及MⅡ期卵百分率在2组间差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见表1。

表1　未配对资料的2组获卵情况比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	周期数	年龄	获卵数	MⅡ期卵数量	MⅡ期卵百分率(%)
过夜受精组	177	32.48±4.56[a]	10.66±6.74	8.26±5.67	77.92±20.59
短时受精组	51	31.18±3.72	9.55±4.36	7.35±3.74	76.79±22.51

a：$P<0.05$，与短时受精组比较

2.1.2 受精结果　从表2可以看出，短时受精组的2PN受精数、2PN受精率、多PN受精率、卵裂率、优质胚胎率及周期移植胚胎数与过夜受精组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。但短时受精组的移植优胚率（ET优胚率）明显高于过夜受精组（$P<0.05$）。

此外，过夜受精组的临床妊娠率为41.24%，短时受精组的临床妊娠率为45.10%，统计学分析结果显示2组间无明显差异（$P>0.05$）。

2.2 配对资料的获卵情况及受精结果

在配对资料的20个周期中，女性年龄（31.0±3.5）岁，获卵数14～30（20.70±5.53）个。20个周期中，1个周期因内膜问题取消移植，19个移植周期有13个周期获得临床妊娠，妊娠率68.42%。从表3可以看出，短时受精组和过夜受精组的受精数及MⅡ期卵百分率无明显区别，受精后2组获得的受精率、卵裂率、多精受精率及优质胚胎率差异均无统计学意义（$P>0.05$）。被选择用于移植的胚胎数在短时受精组多于过夜受精组（$P<0.05$）。但其中所含的优质胚胎率差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨论

在20世纪末期，Dirnfeld等[4]发现缩短精卵共孵育时间也就是短时受精可提高胚胎质量和种植潜能。但在常规IVF中，大多数中心仍采用过夜受精方式即取卵当天下午将精子和卵细胞放在培养皿中共同培养，16～18 h后（次日上午）去除培养液中的精子及卵细胞周围的颗粒细胞，观察卵细胞受精情况。相对于短时受精方式，过夜受精方式的特点是可减少对卵细胞的观察和操作次数，程序简单并利于工作的安排，同时也减少了卵细胞在培养箱外暴露的时间。近年来的

表2　未配对资料的2组受精结果比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	周期数	2PN数	2PN率(%)	多PN率(%)	卵裂率(%)	优胚数	优胚率(%)	ET胚胎数	ET优胚率(%)
过夜受精组	177	6.76±4.97	63.20±27.50	4.32±12.08	92.53±24.44	2.94±3.00	45.16±35.37	2.14±0.49	64.04±41.85[a]
短时受精组	51	5.79±3.08	62.86±24.53	3.43±6.67	96.96±12.96	2.73±2.04	50.85±33.08	1.87±0.77	77.33±36.69

a：$P<0.05$，与短时受精组比较

表3　配对资料的2组受精结果比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	周期数	受精数	MⅡ期卵百分率(%)	2PN率(%)	多PN率(%)	卵裂率(%)	优胚率(%)	ET胚胎数	ET优胚率(%)
过夜受精组	20	9.95±2.98	79.60±21.18	66.90±22.73	7.40±8.95	97.90±6.55	49.70±28.04	0.95±1.00[a]	83.30±32.49
短时受精组	20	10.75±2.88	86.80±14.76	65.70±22.48	3.90±6.97	98.30±4.30	54.00±33.95	1.20±0.95	86.90±29.37

a：$P<0.05$，与短时受精组比较

研究发现受精卵长时间暴露于含高密度精子的培养液可能使卵细胞处于一个营养不良及含大量氧化物的不利环境中,从而导致透明带硬化,影响胚胎的后续发育、孵出及植入等。为避免和减少这些不利因素的影响,国内外一些中心又开展了短时受精的相应研究,但结果并不一致[1,2,5]。有研究认为短时受精可以提高优质胚胎率,改善妊娠结局[1,5,6]。但也有报道发现短时受精并无此作用[7-9],甚至可能减少正常受精率[8],而增加多PN发生率[2]。为了慎重起见,本中心有条件地进行了尝试性的研究,结果发现无论是未配对资料还是配对资料,均未显示短时受精有提高受精率和妊娠率的作用。尽管在未配对资料中,短时受精组患者年龄明显比过夜受精组年轻,但受精后获得的结果并无明显差别,这可能与本资料中2组的卵子数量及MⅡ期卵百分率无明显差别有关。因为大量的研究表明,IVF受精率及其后的胚胎质量和发育潜能主要与精子和卵子的数量及质量有关[10-13],而年龄主要是影响卵子的数量和质量的因素。尤其在精子数量和质量能够满足体外受精的情况下,受精率和胚胎质量则主要受卵子成熟度和卵子数量的影响。由于本研究中2组的卵子数量和成熟度并无明显差别,因此,年龄因素的差别并未对IVF结局带来明显影响。我们分析短时受精后的结果在各中心出现差别的原因可能与受精时间、分组条件的控制等因素不同有关,此外,目前大多数研究可能还存在样本量不足的问题。

在配对资料中,2组的年龄完全相同,受精后的结果也显示2组无明显差别,进一步验证短时受精没有明显改善胚胎质量和发育潜能的作用。至于被选择用于移植的胚胎数在短时受精组多于过夜受精组的原因主要与这部分周期同时进行了等级胚胎评分有关。相对于D2、D3单纯的形态评分,等级胚胎评分系统对胚胎的评分更全面,在单纯形态评分相同时,等级胚胎评分结果可能帮助实验室工作人员更好地区分胚胎质量。配对资料的妊娠率较高可能与该部分患者获卵数较多有关,但是否与胚胎的选择标准有关尚需进一步研究。

另一方面,本资料未发现短时受精有增加多精受精的问题。提示受精4 h后剥离颗粒细胞没有导致多精受精风险。文献报道的增加多精[2]或减少正常受精率[8]的情况我们分析可能主要与受精时间偏短,某些卵子的受精过程可能没有完成而受到干扰有关。

基于上述结果,我们认为短时受精是一种安全有效的受精方式,虽然对提高胚胎质量和临床妊娠率可能没有意义,但对于预先估计常规IVF存在一定风险,需要提前了解受精情况者,采用短时受精可能有助于提前发现受精失败而及早采用补救性卵胞浆内单精子注射,从而改善IVF结局。

志谢 本研究的数据分析得到重庆市卫生信息中心孙安龙副主任的帮助,在此表示衷心的感谢

参考文献:

[1] 方伟芬, 冯贵雪, 张波, 等. 精卵孵育时间对胚胎质量的影响[J]. 广西医学, 2008, 30(9):1333-1334.

[2] 李豫峰, 镇春, 何巧花, 等. 体外受精-胚胎移植患者妊娠率与年龄及多精受精关系的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(1):102-103, 56.

[3] Fisch J D, Sher G, Adamowicz M, *et al*. The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer[J]. Fertil Steril, 2003, 80(6):1352-1358.

[4] Dirnfeld M, Bider D, Koifman M, *et al*. Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves *in-vitro* fertilization outcome: a prospective, randomized, controlled study[J]. Hum Reprod, 1999, 14(10):2562-2564.

[5] 张丽红, 王克华, 李娟, 等. 缩短受精前卵母细胞培养和精卵共孵育时间对妊娠结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2006, 15(2):127-129.

[6] 张若鹏, 邵华, 张丽蓉, 等. 短时受精对体外受精-胚胎移植胚胎质量与妊娠率的影响[J]. 生殖医学杂志, 2004, 13(1):44-46.

[7] 张宁媛, 孙海翔, 胡娅莉, 等. 短时受精联合早期补救性卵细胞胞质内单精子注射在完全受精失败周期的临床应用[J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(6):538-541.

[8] Barraud-Lange V, Sifer C, Pocate K, *et al*. Short gamete co-incubation during *in vitro* fertilization decreases the fertilization rate and does not improve embryo quality: a prospective auto controlled study[J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(7):305-310.

[9] Alminana C, Gil M A, Cuello C, *et al*. Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation[J]. Theriogenology, 2005, 64(8):1783-1796.

[10] 王凤英, 俞炽阳, 何畏, 等. 常规IVF中受精失败相关因素及后续处理结果分析[J]. 生殖与避孕, 2009, 29(10):648-653.

[11] Emery B R, Wilcox A L, Aoki V W, *et al*. *In vitro* oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy[J]. Fertil Steril, 2005, 84(4):1027-1029.

[12] Dawson A, Griesinger G, Diedrich K. Screening oocytes by polar body biopsy[J]. Reprod Biomed Online, 2006, 13(1):104-109.

[13] 王凤英, 屈宗银, 李玉艳, 等. 常规体外授精中正常受精率患者的精液参数分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23):2378-2380.

(收稿 2010-03-02 修回 2010-04-25)

(编辑 王小宴)