基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.012

HCG刺激对未成熟卵母细胞体外成熟培养的影响

王炼炼，丘 彦，幸贵邦
（重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨获取未成熟卵母细胞之前使用人绒毛膜促性腺激素（Human chorionic gonadotropin，HCG）能否改善未成熟卵母细胞在体外培养条件下成熟的时间、体外受精率、2 细胞、4 细胞发生率。方法：将 HCG 刺激后或未刺激所获得的小鼠生殖泡（Germinal reside，GV）期卵丘-卵母细胞复合物在培养液中进行体外培养，观察未成熟卵母细胞减数分裂的恢复、核成熟、受精率以及胚胎的发育。结果：体外培养后 16 h G-PR 组生殖泡破裂（Germinal vesicle break down，GVBD）发生率显著高于 G-UPR 组（$P<0.01$）。体外培养后 20 h G-PR 组 GVBD 发生率明显高于 G-UPR 组（$P<0.05$）。体外培养后 24 h G-PR 组 PBI 发生率显著高于 G-UPR 组（$P<0.01$）。G-PR 组受精率明显高于 G-UPR 组（$P<0.05$）。结论：HCG 加快了卵母细胞的体外成熟进程，同时也增加了卵母细胞的体外受精率。

【关键词】绒促性腺激素；卵母细胞；体外成熟
【中国图书分类法分类号】R714.13 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-15

Effect of HCG-stimulation on in-vitro maturation of immature mouse oocytes

WANG Lian-lian, QIU Yan, XING Gui-bang
(*the Center of Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the in-vitro maturation time, in vitro fertilization, 2 cell and 4 cell rate of the immature oocytes after the use of HCG (human chorionic gonadotropin). *Methods*: The germinal vesicle (GV) immature oocytes were acquired from the ovaries of the HCG (human chorionic gonadotropin)-stimulated and non-HCG-stimulated rats. Immature oocytes were cultured in culture media. Observations were made for the status of germinal vesicle break-down (GVBD) and the extrusion of the first polar body (PB1). The achieved MⅡ oocytes were then inseminated in-vitro; and the pronuclei (PN) and the pre-implantation development were observed. *Results*: Observations showed that after being cultured via in-vitro maturation in culture media for 16 hours, the GVBD in the GV cumulus-oocyte complexes (COC) occurring in the HCG-stimulated group had better outcomes than in non-HCG-stimulated group ($P<0.01$). After being cultured for 20 hours the GVBD occurring in the HCG-stimulated group had better outcomes than in non-HCG-stimulated group ($P<0.01$). After being cultured for 24 hours, the elimination ratio of PB1 in the HCG-stimulated group was higher than that of the non-HCG-stimulated group ($P<0.01$). The fertilization rate of the oocytes in the HCG-stimulated group was higher than that in non-HCG-stimulated group ($P<0.05$). *Conclusion*: Stimulation with HCG can speed up the maturation of the oocytes, and enhance the fertilization rate.

【Key words】human chorionic gonadotropin; oocyte; in-vitro maturation

未成熟卵母细胞体外成熟（In vitro maturation，IVM）指获取未成熟卵母细胞进行体外培养，将培养成熟后的卵母细胞体外受精和胚胎移植，最终获得妊娠。此项技术在辅助生殖技术领域具有重要意义，为不孕患者提供了一条新的治疗途径，临床应用前景十分广阔。未成熟卵母细胞在生长过程中受到各种营养成份，如代谢所需的氨基酸、葡萄糖、维生素以及物理因素、内分泌激素和旁分泌因子，如表皮生长因子、胰岛素样生长因子等多重因素的调节，它们相互影响、相互作用，通过细胞内基因的调控为卵母细胞的成熟、受精和胚胎的发生作最后的准备。卵母细胞在成熟过程中的主要变化是胞核分裂和胞质细胞器的重排[1]，其成熟过程中细胞内基因调控的具体机制尚不完全清楚。近年来，大量研究致力于获取到胞核、胞质同步性成熟、受精率高、发展潜力好的卵母细胞。绒毛膜促性腺激素（Human chorionic gonadotrophin，HCG）是卵母细胞最终成熟的基本物质。本研究拟探讨获取未成熟卵母细胞之前使用 HCG 能否改善卵母细胞在体外培养条件下成熟的时间、体外受精率以及胚胎的发育。

1 材料与方法

1.1 研究对象

8~15 周，质量 25~30 g 的清洁级 NIH 种雌性小鼠，用于获取未成熟卵母细胞；14~18 周，质量 35~40 g 的清洁级 NIH

作者介绍：王炼炼（1976-），女，主治医师，硕士，研究方向：妇产科生殖内分泌。
通信作者：丘 彦，女，教授，Email：cqartq@163.com。

雄性种鼠，用于获取精子。清洁级 NIH 小鼠均来源于重庆医科大学动物实验中心。

1.2 研究方法

1.2.1 未成熟卵母细胞的收集、培养、体外受精 将28只NIH雌鼠分为 2 组，各 14 只。第 1 组小鼠取卵前不注射 HCG，第 2 组小鼠取卵前 48 h 腹腔内注射 5 IU HCG 0.5 ml。

脱颈处死 28 只雌性小鼠，摘取卵巢，用配制好的 Ham's F10 培养液（美国 HyClone 公司，原装。批号：APC20858）洗涤卵巢 3 次，在解剖显微镜下刺破半透明的卵泡获得 COC，第 1 组小鼠获得 40 个 COC，第 2 组小鼠获得 38 个 COC。

用配制好的 Ham's F10 培养液洗涤 3 次后的 COC 移至已预平衡 6~8 h 的培养皿培养液滴中[以 Ham's F10 培养液为基础培养液，加入 10%BSA，0.5 U/ml FSH 以及含 5 ng/ml的 EGF（1 μg 干粉，美国 Pepro Tech 公司产品）]，每滴放入 3~5 枚 COC，置于 37℃，5%的 CO_2，95%的空气和相对饱和湿度的培养箱中培养。

脱颈处死 NIH 雄性种鼠，分离两侧附睾周围组织，剪下附睾尾，在解剖显微镜下（×20 倍）将其剪成 0.5~1.0 mm 长的小段，洗涤 3 次后放入预平衡后的 Ham's F10 培养液中将精液挤出。置于 37℃、5%的 CO_2、95%的空气和相对饱和湿度的培养箱中培养 40 min。取出后将初步孵育、分散好的精子悬浮液吸出约 20 μl，调整精子密度为 $(5\sim10)\times10^5$ 个/ml。在培养箱中与第 2 次减数分裂中期（Metaphase Ⅱ，MⅡ）的卵母细胞进行受精。

1.2.2 分组 取卵前未注射 HCG 所获得的 COC 为 G-PR 组（Gonadotrophin-unprimed）；取卵前 48 h 腹腔内注射5 IU HCG 所获得的 COC 为 G-UPR 组（Gonadotrophin-primed）。

1.2.3 观察指标 分别于培养后的第 12、16、20、24 h 在倒置显微镜下观察 2 组未成熟卵母细胞体外培养过程中生殖泡破裂（Germinal vesicle breakdown，GVBD）情况（图 2）；分别在培养后的 20、24、36 h 观察第一极体（The first polar body，PB1）的排出（图 3）；分别在培养后 36 h 观察卵母细胞退化情况；体外受精后 6~10 h 观察原核的形成（图 4）；体外受精后 16~26 h，在倒置显微镜下（×200 倍）观察胚胎透明带是否完整，卵裂球轮廓是否清晰，大小是否均匀，有无变性，对胚胎状况和质量作出判断并计数（图 5、6）。

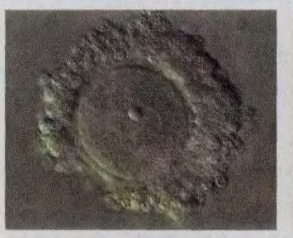


图 1 GV 期卵丘－卵母细胞复合物（×200）

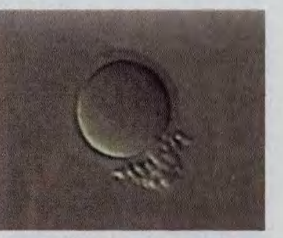


图 2 GVBD 的卵母细胞（×200）

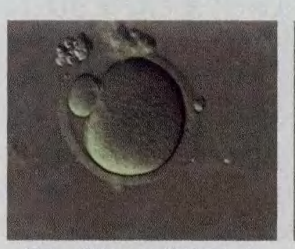


图 3 排出 PB1 的卵母细胞（×200）



图 4 双原核受精卵（×200）

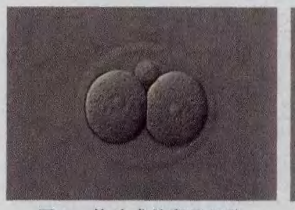


图 5 体外成熟卵母细胞受精后已卵裂



图 6 体外成熟卵母细胞受精后已卵裂成 4- 细胞（×200）

1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 G-PR 和 G-UPR 组 GVBD、PB1 发生率及 COC 退化率的比较

时间（h）	G-UPR组（共 40 个 COC）			G-PR组（共 38 个 COC）		
	GUBD%	PBI（%）	COC退化率	GVBD%	PBI%	COC退化率%
12	11（27.50）	/	/	10（26.31）	/	/
16	15（37.50）a1	/	/	29（76.31）	/	/
20	19（47.50）a2	10（25.00）	/	29（76.31）	13（34.21）	/
24	32（80.00）	14（35.00）b	/	32（84.21）	24（63.15）	/
36	/	26（65.00）	12（30.00）	/	27（71.05）	9（23.68）

a1：$P<0.01$ 与 G-PR 组 16 h GVBD%比较，a2：$P<0.05$；与 G-PR 组 20 h GVBD%比较；b：$P<0.01$，与 G-PR 组 PBI %比较

表 2 G-PR 和 G-UPR 组 COC 受精率和胚胎发育的比较

组别	MⅡ细胞数（个）	受精率（2NP）（%）	2细胞胚胎发生率（%）	4细胞胚胎发生率（%）
G-UPR组	26	14（53.85）a	10（38.46）	8（30.77）
G-PR组	27	21（77.77）	15（55.56）	13（48.15）

a：$P<0.05$；与 G-PR 组受精率比较

2 结 果

2.1 G-PR 和 G-UPR 组 GVBD、PB1 发生率及 COC 退化率的比较

体外培养 16、20、24 h 3 组时间点总体检验 χ^2=15.086 8，P=0.000 1 示 3 组总体差异有统计学意义。χ^2 检验分别比较了体外培养后 16 h G-PR 组 GVBD 发生率为 76.31%显著高于G-UPR组的37.5%（χ^2=11.784 7，P=0.000 6<0.05/3=0.016 7）（P<0.01）。体外培养后 20 h G-PR 组 GVBD 发生率为 76.31%明显高于 G-UPR 组的 47.5%（χ^2=6.748 9，P=0.009 4）（P<0.05）。体外培养后 24 h G-PR 组和 G-UPR 组 GVBD 发生率分别为 84.21%和 80%，差异无统计学意义（χ^2=0.231 6，P=0.630 4）（P>0.05）。体外培养后 24 h G-PR 组 PBI 发生率为 63.15%显著高于 G-UPR 组的 35%（χ^2=6.105 1，P=0.013 5）（P<0.01）。体外培养后 36 h G-PR 组和 G-UPR 组 PBI 发生率分别为 71.05%和 65%（χ^2=0.323 6，P=0.569 5）（P>0.05）差异无统计学意义。体外培养后 36 h G-PR 组和 G-UPR 组 COC 退化率分别为 23.68%和 30%（χ^2=0.390 0，P=0.532 3）（P>0.05）差异无统计学意义（见表 1）。

2.1 G-PR 和 G-UPR 组 COC 受精率和胚胎发育的比较

χ^2 检验分别比较了 G-PR 组受精率为 77.77%明显高于 G-UPR 组的 53.85%（P<0.05）。2 组 2 细胞和 4 细胞阶段的胚胎发生率差异无统计学意义（P>0.05）。

3 讨 论

卵母细胞在成熟过程中涉及到一系列复杂的细胞器和分子上的重构[2]，除了受下丘脑-垂体-卵巢调节外，卵巢局部内环境以自分泌和旁分泌等形式或多种因子间的相互影响，作用于卵泡内卵母细胞的成熟、排卵以及卵丘颗粒细胞的扩展。这种渐进的过程要求卵母细胞胞核和胞质成熟的同步性，为卵母细胞受精和早期胚胎的发展作好充分的准备。

本实验发现 G-UPR 组和 G-PR 组总的 GVBD 发生率分别为 84.21%和 80%，差异无统计学意义。但我们从 GVBD 发生的时间段上可以清楚的看到 G-PR 组在 12~16 h 阶段的 GVBD 发生率较高，而 G-UPR 组 GVBD 发生的高峰阶段则出现在 20~24 h（表 1）。因此提示：HCG 刺激后所获取的未成熟卵母细胞与未使用 HCG 刺激组相比，其体外 GVBD 总的发生率虽然没有明显差异，但加快了体外未成熟卵母细胞减数分裂恢复的进程。研究还发现 G-PR 组受精率为 77.77%明显高于 G-UPR 组的 53.85%，而 2 组 2 细胞和 4 细胞阶段的胚胎发生率差异无统计学意义（表 2）。提示 HCG的刺激可以提高 IVM 后的体外受精率，但不能增加其胚胎发育的内在潜能。另有一些报道也认为，取卵前应用 HCG，有利于 IVM 的结局[3-5]。因此，先注射 HCG 后取卵，再进行 IVM，是目前较为理想的方案。但也有学者报道了多囊卵巢综合征患者的未成熟卵母细胞体外成熟培养中加用 HCG 后对于卵母细胞的成熟率及胚胎发育的观察，发现其并不能改善卵母细胞的成熟率及胚胎的发育潜能[6]。

总之，适当的 IVM 方案不但可以促进未成熟卵母细胞减数分裂的恢复和完成，使胞核和胞质同步性成熟，也能促进胚胎的发展、减少体外卵母细胞的退化率。

参 考 文 献

[1] 卢惠森，卢光秀，主编.人类生殖与生殖工程[M].河南：河南技术科学出版社，2001.

[2] Sanfins A，Plancha C E，Overstrom E W，et al.Meiotic spindle morphogenesis in vivo and in vitro matured mouse oocytes：insights into relationship betwween nuclear and cytoplasmic quality[J].Hum Reprod，2004，19(12)：2889-2899.

[3] Fukuda A，Nakaoka Y，Tohnaka M，et al.Establishment of in vitro maturation system (1VM-ⅣF)as a routine ART procedure by comb ination of HCG admi nistration and frozen.thawed embryo transfer[J].Fertil Steril，2002，78(s1)：232.

[4] Hreinsson J，Rosenlund B，Friden B，et al.Recomb ination LH is equally efective as recomb inate hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme：a randomized study[J].Hum Reprod，2003，18：2131-2136.

[5] 李 媛，姜晶晶，马永英.无刺激周期未成熟卵母细胞体外培养用于多囊卵巢综合征不孕患者治疗的临床观察[J].中华妇产科杂志，2005，40(6)：388-391.

[6] Ge H S，Huang X F.Exposure to chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome[J].Fertil and Steril，2008，89(1)：98-103.

（责任编辑：冉明会）