临床研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0766-03

自然周期未成熟卵体外培养、受精和胚胎移植研究

邓华丽,曾品鸿,叶 虹,刘 红,文宏贵,裴 莉,黄国宁
(重庆市妇幼保健院遗传与生殖研究所,重庆 400013)

【摘 要】目的:探讨自然周期未成熟卵体外成熟培养(In vitro maturation,IVM)、受精和胚胎移植技术在治疗不育症中的应用。方法:选取 30 对接受体外授精/卵胞浆内单精子显微注射 - 胚胎移植(In vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer,IVF/ICSI-ET)助孕的不育夫妇为对象,在自然月经周期卵泡直径 >10 mm、内源性 LH(Luteinizing hormone)峰出现之前采卵。采卵当日成熟卵(Metaphase Ⅱ ,M Ⅱ)行 IVF 授精,未成熟卵进行体外培养 24~48 h,成熟至 M Ⅱ期后行 ICSI 授精,受精后 72 h 行胚胎移植。结果:30 个 IVM 周期中,2 个周期取卵未获卵。另 28 个周期共获卵 113 个,其中成熟卵 29 个,退化卵 10 个,未成熟卵 74 个,体外培养后成熟 60 个,成熟率 81.08%。20 个周期有胚胎移植,6 例临床妊娠。其中 5 例成功分娩足月健康婴儿(1 例来自成熟卵、4 例来自未成熟卵),1 例临床妊娠流产。结论:自然周期未成熟卵 IVM、受精和胚胎移植技术可以用于治疗不育患者。

【关键词】体外受精与胚胎移植;卵子体外成熟培养;多囊卵巢综合征
【中国图书分类法分类号】R321-333 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-13

In vitro maturation, fertilization and embryo transfer of immature oocytes derived from nature cycles

DENG Hua-li, et al
(*Chongqing Genetic and Reproductive Institute, Chongqing Health Center for Women & Children*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of in vitro maturation (IVM), fertilization and embryo transfer of immature oocytes derived from nature cycles in infertility couples. *Methods*: 30 IVF/ICSI-ET cycles were involved in this study. Oocytes retrieval performed after follicle larger than 10 mm and before endogenesis Luteinizing hormone (LH) surge occurrence in nature cycle. Mature oocytes (Metaphase Ⅱ) were inseminated by standard in vitro fertilization (IVF) on the oocytes pick-up day. Immature oocytes (Metaphase I and germinal vesicle stage) were cultured for 24~48 hours and fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as soon as it developed to Metaphase Ⅱ stage. Embryo transfer was performed 72 h after fertilization. *Results*: 2 of 30 IVM cycles brought no oocytes in this study. 113 oocytes were obtained among other 28 oocyte retrieval cycles, 74 of which were immature, 29 were mature, and 10 were degenerated. 60 of 74 immature oocytes developed to M Ⅱ after IVM (maturation rate 81.08%). 6 cases of clinical pregnancy were obtained in the 20 embryo transfer cycles, five of which brought healthy babies (one came from immature oocyte and four came from mature oocyte) and one was abortive. *Conclusion*: IVM, fertilization and embryo transfer of immature oocytes derived from nature cycles is a feasible treatment for women with infertility.

【Key words】In vitro fertilization and embryo transfer(IVF-ET); In vitro maturation (IVM); Polycystic ovary syndrome (PCOS)

常规的体外受精 - 胚胎移植(In vitro fertilization and embryo transfer,IVF-ET)助孕中须使用促排卵药物进行控制性促排卵(Controlled ovary hyperstimulation,COH),由此带来的并发症主要包括以腹胀、腹水、小便减少等为主要临床表现的卵巢过度刺激综合征(Ovary hyperstimulation syndrome,OHSS);其次,高雌激素水平,对某些激素依赖性肿瘤、乳腺癌和卵巢癌是个潜在的危险因素。如果能不使用促排卵药物,同时获得成熟或不成熟的卵母细胞,并进行体外培养成熟(In vitro maturation,IVM)、受精和胚胎移植,则患者可避免上述风险而获得妊娠,同时可显著降低治疗费用,缩短治疗时间。本研究应用自然周期未成熟卵体外培养技术,结合 IVF-ET 技术进行不育症的助孕治疗,现将结果报告如下。

作者介绍:邓华丽(1972-),女,主治医师,硕士,研究方向:辅助生殖技术。

基金项目:重庆市自然科学基金(项目编号 8714)。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2006 年 1 月 ~2007 年 12 月于重庆市妇幼保健院遗传与生殖研究所就诊的不育妇女中具有 IVF 指征并同意接受 IVM 助孕者为研究对象，均签署 IVM 知情同意书。包括月经周期规则（26~35 d）者，或根据 2003 年鹿特丹标准诊断为多囊卵巢综合征（Polysyst ovary syndrome，PCOS）患者。排除标准：①B 超提示子宫内膜厚度及征象有异常者；②月经第 2 d 每侧卵巢窦卵泡数少于 4 个；③卵巢囊肿 >20 mm 者。

1.2 临床资料

30 对不育夫妇接受了 30 个周期自然周期 IVM 助孕，不育原因分别为盆腔输卵管因素 15 例、轻度少弱精 1 例、内膜异位 2 例、卵巢储备功能减退 3 例、不明原因 2 例、PCOS 7 例。平均年龄（32.63 ± 4.81）（23~44）岁，平均不育年限（5.78 ± 5.55）（1~20）年。

1.3 研究方法

1.3.1 获取卵母细胞 月经周期第 2~4 d 阴道 B 超了解子宫及双附件，排除卵巢囊肿，行窦卵泡计数。月经不规律者可使用黄体酮撤血后开始 IVM 周期。月经 10~14 d，当主导卵泡直径 >10 mm，排除内源性黄体生成素（Luteinizing hormone，LH）峰（LH<10 mIU/ml）产生，肌肉注射人绒毛膜促性腺激素（Humam chorionic gonadotropin，HCG，Profasi，瑞士 Serono 公司）10 000 IU，36 h 后采卵。术前 0.5h 肌注杜冷丁 75 mg。使用 Wallence 18G（英国）单腔取卵针，负压 80~90 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa），经阴道 B 超引导下行卵母细胞采集。

1.3.2 卵母细胞的评价 对取出的卵子根据卵冠丘复合物形态进行成熟情况的评价：不成熟卵：卵细胞呈深色，放射冠完全没有分散开，卵丘细胞紧密排列在一起，颜色偏深或卵丘细胞团很小。成熟卵：卵细胞外观颜色变浅，形状为规则的圆形，放射冠呈完全分散状，卵丘细胞团通常较大、排列松散，光镜下发亮。卵周间隙可见第一极体排出，处于第 2 次减数分裂中期（Metaphase Ⅱ，MⅡ）。

1.3.3 IVM 培养基的准备 取卵当日早晨抽取患者外周血 10 ml，室温下取血清，3 000 r/min 离心 10 min，离心后将上层血清移入新的试管中，用于配制 IVM 培养基，即 IVM Medium（丹麦 MediCult 公司）中加入 10%患者血清、人绝经期促性腺激素（Human menopausal gonadotropin，HMG，丽珠公司）0.075 IU/ml，过滤后置入培养箱中备用。

1.3.4 体外培养及授精、胚胎移植 取卵当日成熟卵（MⅡ期）采用常规 IVF 方法授精。IVF 授精后 16~19 h 观察原核形成情况，以出现 2 个原核为正常受精。未成熟卵立即进行体外成熟培养，转入预先配制的 IVM 培养基，于 6%CO_2、5%O_2、89%N_2 三气培养箱中 37℃体外培养 24~48 h。每天早晨 9 点观察卵子成熟情况，观察到第一极体排出，发育至 MⅡ期后，采用卵胞浆内单精子显微注射（Intracytoplasmic sperm injection，ICSI）方法授精。ICSI 授精后 16~19 h 观察原核形成情况，以出现 2 个原核为正常受精。受精后 72 h 选择 2~3 个胚胎进行移植。如果有剩余胚胎可冷冻保存。

1.3.5 子宫内膜准备

1.3.5.1 获得成熟卵子 采卵日子宫内膜 >0.7cm，不需黄体支持或使用 HCG 支持黄体，即 ET 日开始肌注 HCG 2 000 IU，3 d 1 次，共 3 次。

1.3.5.2 仅获得未成熟卵子 根据采卵日子宫内膜厚度给予雌激素（戊酸雌二醇，补佳乐，德国先灵公司），剂量：子宫内膜厚度 <0.4 cm，补佳乐 10~12 mg/d；子宫内膜厚度 0.4~0.6 cm，补佳乐 8 mg/d；子宫内膜厚度 >0.6 cm，补佳乐 6 mg/d。ICSI 当日开始给予黄体酮 60 mg/d。妊娠后逐渐减量应用补佳乐及黄体酮至孕 12 周。

1.3.5.3 取消标准 若 ET 日子宫内膜厚度 <0.7 cm 取消胚胎移植，冷冻胚胎。

1.3.6 妊娠确立及随访 胚胎移植后 14 d 验晨尿及检测血清 β-HCG 确定生化妊娠，28 d B 超宫腔内见妊娠囊确诊临床妊娠，并按期行中、晚孕及分娩后随访。

1.4 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行分析，计量资料采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 自然周期 IVM 助孕结果

30 个周期中，2 个周期未获卵，28 个周期采集到卵子。共获卵 113 个，平均获卵（4.04 ± 3.73 个）。其中成熟卵 29 个（25.7%），退化卵 10 个（8.8%），未成熟卵 74 个（65.5%）。成熟卵当日 IVF 授精，受精 20 个（受精率 68.97%，20/29），卵裂 18 个（卵裂率 90%，18/20），获可移植胚胎 11 个，移植 9 个，冷冻 2 个。未成熟卵体外培养后成熟 60 个（成熟率81.08%，60/74），行 ICSI 授精，受精 48 个（受精率 80%，48/60），43 个卵裂（卵裂率 89.58%，43/48），获可移植胚胎 26 个，移植 21 个，冷冻 5 个。

30 个周期中，有 10 个周期取消移植（2 个周期未获卵、8 个周期无可供移植的胚胎），周期取消率为 33.33%（10/30）。20 个进行了胚胎移植的周期中，ET 日平均子宫内膜厚度 0.85 cm。共获 37 个可移植胚胎，移植 30 个，冷冻 7 个。共获 6 例临床妊娠，其中 5 例成功分娩足月健康婴儿（1 例来自成熟卵、4 例来自未成熟卵），1 例临床妊娠流产。平均移植周期临床妊娠率 30%（6/20），胚胎种植率 23.33%（7/30）。没有 OHSS 的发生。

2.2 30 个 IVM 周期中，7 例 PCOS 与 23 例非 PCOS 周期的一般情况及助孕结果比较见表 1、表 2

由于非 PCOS 周期中含有 3 例卵巢储备功能减退者，且平均年龄偏大，如表 1 所示，两组比较，年龄、平均获卵数差异显著（P<0.05），其余各项无明显差异。

如表 2 所示，虽然由于例数较少，移植周期临床妊娠率、移植周期取消率在 PCOS 与非 PCOS 患者间比较无统计学差异（P>0.05），但 PCOS 患者由于平均获卵数较多，自然周期 IVM 助孕结局有好于非 PCOS 患者的趋势。

表 1 PCOS 与非 PCOS 周期的一般情况比较

	PCOS 周期(7 例)	非 PCOS 周期(23 例)
平均年龄	28.4 ± 4.45	33.64 ± 4.82
平均不孕年限	4.6 ± 1.82	5.13 ± 2.83
ET 日平均子宫内膜厚度	0.80cm	0.90cm
平均获卵数	8.2 ± 3.42	2.1 ± 1.89
当日成熟卵 IVF 受精	6/9(66.67%)	14/20(70%)
IVF 受精卵裂	6/6(100%)	12/14(85.71%)
IVM 成熟率	85.16%(46/54)	70%(14/20)
ICSI 受精率	82.61%(38/46)	71.43%(10/14)
ICSI 卵裂率	92.11%(35/38)	80%(8/10)

表 2 PCOS 与非 PCOS 周期的助孕结局比较

	PCOS 周期	非 PCOS 周期
取卵周期数	7	23
移植周期数	6	14
总移植胚胎数	11	19
总冷冻胚胎数	7	0
移植周期临床妊娠率	50%(3/6)	21.43%(3/14)
妊娠结局	1 例单胎临床妊娠流产、2 例单胎足月分娩	1 例双胎、2 例单胎均足月分娩
移植周期取消率	14.3%(1/7)	39.13%(9/23)
取消原因	无可移植胚胎 1 例	未获卵 2 例、无可移植胚胎 7 例

3 讨 论

本研究结果显示自然周期未成熟卵 IVM、受精和胚胎移植技术可以成功应用于治疗不育患者。由于治疗过程更简单而且几乎无副作用，可用于各种类型的女性不育者，因此不论对医生还是患者都是一项极具吸引力的选择[1]。

3.1 取卵时机

目前的研究认为，从小的窦卵泡取出的卵母细胞的发展能力并没有受到主导卵泡的出现的影响[2]，并已有来自于自然周期主导卵泡和小卵泡 IVM 的成功妊娠和分娩报道[3,4]。李媛等报道卵泡直径为 6~8 mm 时获取到的卵母细胞成熟率及受精率均明显低于卵泡直径为 10~12 mm 时获取的卵母细胞，认为卵泡直径较大时获得的卵母细胞在体外成熟、受精及形成正常胚胎的能力较强[5]。本研究选择卵泡直径 >10 mm、内源性 LH 峰出现之前采卵，此时采集的卵母细胞中既有成熟卵(25.7%)，也可能有不成熟卵(65.5%)。成熟卵可以直接用常规 IVF/ICSI 方法授精，同时未成熟卵的体外成熟和发育潜能也不会受到优势卵泡出现的影响，便于最大限度地结合 IVM 和常规 IVF-ET 技术的优势。

3.2 自然周期 IVM 技术应用于 PCOS 与非 PCOS 患者

自然周期 IVM 技术应用于非 PCOS 患者的研究较少，绝大多数是针对 PCOS 或多囊卵巢(Polysgst ovary，PCO)患者。这是因为 PCOS 或 PCO 者由于窦卵泡数量较多，可以不经刺激而获得更多的未成熟卵，有机会获得更多的胚胎，助孕成功率更高。文献报道，应用非刺激周期的 PCOS 患者平均获卵数为 11~15 个[6]。而 Mikkelsen 等[7]对 100 例月经周期正常、男性或输卵管因素的不育者进行了 132 个周期未经刺激的 IVM 治疗，平均获卵数 7.1 个，成熟率、受精率和卵裂率分别为 60%、73%、87%，每移植周期的妊娠率 18%。

本研究由于例数较少，且非 PCOS 周期中有卵巢功能减退和高龄者，因此影响了本组的助孕结局。但结果仍表明，PCOS 患者由于平均获卵数较多，自然周期 IVM 助孕结局有好于非 PCOS 患者的趋势。非多囊卵巢的不育者除非窦卵泡数目较多，否则取消周期的风险更大。

3.3 自然周期 IVM 助孕与常规 COH 助孕比较

本研究结果与同期常规 IVF/ICSI-ET 助孕技术

临床研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0769-03

抑酸和促动力药物对真菌性食管炎的临床疗效和病理转归分析

陈忠华,何庆玲,陈 杨
(宜宾市第二人民医院消化内科,宜宾 644000)

【摘 要】目的:观察抑酸和促动力药物治疗真菌性食管炎的疗效。方法:将 60 例轻、中度真菌性食管炎病人随机分为 2 组:实验组(30 例)给予抑酸和促动力等药物治疗;阳性对照组(30 例)给予抗真菌治疗。疗程 2~4 周。2 组均在治疗的第 2 和 4 周观察病人的临床症状,并通过胃镜、真菌检查和病理活检评价疗效。结果:两组病人均获很好治疗效果,实验组 2 周治愈 21 例,4 周治愈 8 例,好转 1 例;对照组 2 周治愈 25 例,4 周治愈 5 例,两组的有效率均为 100%。两组的病理变化也无差别。实验组副作用发生率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:对轻、中度真菌性食管炎采用抑酸和促动力药物治疗是有效和安全的。

【关键词】真菌性食管炎;抑酸药物;促动力药物
【中图图书分类法分类号】R571 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-29

Clinical and pathological effect of acid inhibitory drugs and prokinetic agents for mycotic esophagitis

CHEN Zhong-hua, et al
(*Department of Digestive Internal Medicine, the Second People's Hospital of Sichuan Province*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the curative effect of combination therapy of acid inhibitory drugs and prokinetic agents for mycotic esophagitis. *Methods*: 60 patients with low-grade or moderate-grade mycotic esophagitis were randomly divided into two groups. The experimental group(30 cases)were treated with acid inhibitory drugs plus prokinetic agents; the control group(30 cases) were treated with antimycotic drugs. All of these patients were treated for 2 or 4 weeks. The clinical symptoms were observed at weeks 2 and 4 after

作者介绍:陈忠华(1966-),女,副主任医师,
研究方向:消化道肿瘤发病机理与治疗。

相比,没有 COH 用药的费用,相应地没有频繁注射药物的焦虑和药物带来的负反应,治疗周期缩短,避免了 OHSS 的发生,并且失败后可以进行连续下一月经周期的助孕治疗,弥补了由于卵子数目少导致的单次助孕成功率降低。有统计学研究表明四个自然周期后的累积妊娠率可达到 46%,出生率为 32%,因此可以认为行 2~3 周期的自然周期助孕和行 1 次 COH 周期助孕在相同时间内的妊娠率和出生率相似[8]。

目前,虽然 IVM 有广阔的应用前景,仍然未能像常规的 IVF-ET 技术一样在临床上广泛应用,这与卵子采集时机、体外培养技术、未成熟卵体外成熟和发育的潜能等多种因素有关。因此,进一步扩大研究例数,完善 IVM 的实验室和临床技术,才能更好地服务于不育者。

参 考 文 献

[1] Chian R C, Lim J H, Tan S L. State of the art in in-vitro oocyte maturation[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004, 16(3): 211-219.

[2] Chian R C, Buckett W M, Tan S L, et al. In-vitro maturation of human oocytes[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 8(2):148-166.

[3] 许 薇,孙淑杰,翁 宁,等. 自然周期 ICSI+IVM 妊娠三胎减胎后成功分娩双胎 1 例报道[J]. 生殖与避孕,2006,26(1):60-61.

[4] Chian R C, Buckett W M, Abdul Jalil A K. Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment[J]. Fertil Steril, 2004, 82(6):1675-1678.

[5] 李 媛,陈子江,赵力新,等.超声引导下 MFP 技术治疗多囊卵巢综合征无排卵性不孕的临床研究[J]. 山东医药,2004,44:15-17.

[6] Le Du A, Kadoch J J, Bourcigaux N, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience[J]. Hum Reprod, 2005, 20(2):420-424.

[7] Mikkelsen A L, Andersson A M, Skakkebek N E, et al. Basal concentration of estrodiol may predict the outcome of in vitro maturation in regularly menstruating women[J]. Hum Reprod, 2001, 16(5): 862-867.

[8] 陈智勤,朱丽萍.体外受精联合未成熟卵母细胞体外培养技术在辅助生殖中的应用价值[J]. 生殖与避孕,2005,25(12):745-749.

(责任编辑:冉明会)