

精子获能时间及精卵共孵育时间对小鼠体外受精和胚胎发育的影响

段彪 杜海燕 张荣

【摘要】 目的 本文通过两种方法探讨了精子的代谢产物对小鼠的体外受精和胚胎发育的影响,以期对人类辅助生殖技术优化操作程序提供一定的理论基础。方法 (1) 精子体外获能时间的不同决定了精子代谢产物的不同,将精子获能时间分为4组,分别为0.5、1、2和4 h,接着进行体外受精,精卵共孵育的受精时间均为5 h,获能液和受精液均为G-IVF+5%人血清白蛋白(HSA)。(2) 受精时间的不同决定了精子的代谢产物对体外受精和胚胎发育的影响不同,将受精时间分为5组,分别为0.5、2、5、8和12 h,而精子的获能时间均为1 h。不同组合受精后的胚胎经洗涤后放入卵裂液G1中培养48 h。然后转入囊胚培养液G2中继续培养至囊胚期。结果 第一种方法中精子的获能时间为1 h时,卵母细胞的受精率显著高于其他组($P < 0.01$);获能时间为4 h,受精率显著下降($P < 0.01$)。胚胎在8细胞率、囊胚率、孵化囊胚率方面比较没有明显差异($P > 0.05$)。第二种方法中受精时间为0.5 h时,卵母细胞的受精率显著低于其他组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其他各组之间的受精率差异不明显;而对于胚胎发育率,12 h组的胚胎在8细胞率和囊胚率方面显著低于其他组($P < 0.01$),在孵化囊胚率方面差异显著($P < 0.05$)。其他各组之间比较没有明显差异。结论 应选择合适的精子体外获能和受精时间,以达到减少氧化性损伤对精子受精能力的影响和提高胚胎发育潜能的目的。

【关键词】 精子获能; 受精,体外; 胚胎发育; 精子

The effects of sperm metabolites on *in vitro* fertilization and embryo development in mouse DUAN Biao, DU Hai-yan, ZHANG Rong. Reproductive Center, Department of Obstetric and Gynecology, Third Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Baotou 014010, China

Corresponding author: DUAN Biao, Email: duanbiao_007@163.com

【Abstract】 Objective In order to provide a theoretical basis for optimizing operating procedures in assisted reproductive technology (ART), two methods were adopted to explore the effect of sperm metabolites on *in vitro* fertilization (IVF) and embryo development in mouse. **Methods** (1) Different sperm capacitation time decided different sperm metabolites. The capacitation time was divided into four groups, respectively 0.5, 1, 2 and 4 h. Then oocytes were fertilized *in vitro* and fertility time was 5 h. The capacitation and fertility medium were all G-IVF + 5% HSA. (2) Different fertility time decided different effects of sperm metabolites on IVF and embryo development. Fertility time was divided into five groups, respectively 0.5, 2, 5, 8 and 12 h. Sperm capacitation times was 1 h. All fertilized embryos in different groups were transferred into cleavage medium G1 for 48 h after wash. Then, the embryos were cultured in blastocyst medium G2 until to blastocyst stage. **Results** In first method, the fertility rate was significantly higher than that in other groups with 1 h of capacitation time ($P < 0.01$); When the capacitation time was 4 h, the fertility rate was significantly lower ($P < 0.01$). Each groups had no significant difference in 8-cell rate, blastocyst rate, hatched blastocyst rate ($P > 0.05$). In second method, the fertility rate was significantly lower than that of other groups in 0.5 h of fertility time and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). There was no significantly different among the other groups. For development rate, the embryos in 12 h group had extremely significant difference in 8-cell rate and blastocyst rate ($P < 0.01$) and difference in hatched blastocyst rate compared with the others ($P < 0.05$). There was no significant difference in other groups. **Conclusion** Appropriate time had to be chosen for *in vitro* capacitation and fertilization to reduce sperm oxidative damage and improve embryo developmental potential.

【Key words】 Sperm capacitation; Fertilization *in vitro*; Embryonic development; Spermatozoa

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.07.106

作者单位: 014010 内蒙古包头, 内蒙古医科大学第三附属医院妇产科生殖中心

通讯作者: 段彪, Email: duanbiao_007@163.com

近年来,随着体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术研究的不断深入,精子体外上游的处理时间和精卵共孵育的时间对受精率、优胚率、种植率及妊娠率的影响逐渐成为辅助生殖领域研究的热点。常规的体外受精中精子的体外孵育时间在不同的生殖中心有所不同,一般孵育0.5~1 h后进行授精,关于缩短或延长体外孵育时间是否会对体外受精结局产生影响却很少有报道。有研究表明:体外处理精液时容易产生活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS),而过量的活性氧对精子功能会产生不良的影响^[1]。在受精时间的研究方面,传统的方法是精卵共孵育培养16~18 h,目的是充分保证精卵有足够的受精时间,以获得较高的受精率。但过长时间的共孵育,容易造成精子产生大量的代谢产物,进而对体外受精和胚胎发育产生诸多不利的影响。目前很多中心使用的短时受精方法被认为在受精率和卵裂率等方面没有差异^[2]。但由于缩短了精子暴露给卵母细胞的时间,减少了精子代谢产物等不利胚胎发育因素的影响,从而提高胚胎质量,保证了临床妊娠率和种植率。但也有报道表明,缩短受精时间后受精率有所降低^[3-4]。所以,有关精子体外处理时间和受精时间等方面对体外受精结局的影响还有待进一步深入探讨。

本文利用常见的小鼠动物模型,通过比较不同的获能时间以模拟人类精子授精前的孵育时间,来探讨过长或过短的获能时间对体外受精和胚胎发育的影响。其次,通过比较精卵共孵育的时间以模拟辅助生殖中体外受精的受精时间,来探讨精子的代谢产物对体外受精和接下来的胚胎发育的影响。

材料与方 法

一、材料

实验动物:4~6周龄的雌性昆明小白鼠,12周龄左右的雄性昆明小白鼠,购自内蒙古大学国家清洁级实验动物繁育室。孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)(宁波市三生药业有限公司生产),受精液G-IVF、人血清白蛋白溶液(HSA)、体外操作液G-MOPS、卵裂培养液G1、囊胚培养液G2、石蜡油Ovoil均为Vitrolife公司用于人类辅助生殖的G5系列产品,35 mm(3001)培养皿为BD Falcon产品,巴氏吸管为Humagen产品。

二、方法

1. 实验组的设计:分别采用两组实验进行小鼠的体外受精和胚胎发育实验:实验组1:精子的获能时间分别为0.5、1、2和4 h,精卵共孵育的受精时间固定为5 h。实验组2:精子的获能时间固定为1 h,精卵共孵

育的受精时间为0.5、2、5、8和12 h。

2. 获能液和受精液的准备:在受精前1 d的下午准备精子获能液和受精液:精子获能皿(吸取1 ml G-IVF + 5% HSA在35 mm培养皿中制作两个500 μ l的液滴,用石蜡油覆盖)、受精皿(吸取1 ml G-IVF + 5% HSA在35 mm培养皿中制作四个250 μ l的液滴,用石蜡油覆盖),于37 $^{\circ}$ C、6% CO_2 、100%饱和湿度的条件下平衡过夜。

3. 精子的采集和体外获能:颈椎脱臼法处死雄鼠,用75%的酒精给小鼠腹部消毒,打开腹腔,找到睾丸和附睾所在的部位,用剪刀取出附睾尾部,将取得的组织放入平衡好的新鲜精子皿中,挤压附睾尾以释放精子团,用G-IVF + 5% HSA洗涤离心,计数密度,取适量精子放入预平衡的受精培养液中,使最终密度 2.5×10^6 条/ml,精子在37 $^{\circ}$ C、6% CO_2 、100%饱和湿度的条件下实验组1中分别获能培养0.5、1、2和4 h,实验组2的获能时间为1 h。

4. 卵子的采集:用PMSG处理昆明雌鼠5 IU/100 μ l,48 h后注射hCG 5 IU/100 μ l,13 h后处死雌鼠,用75%的酒精消毒腹部。打开腹部暴露子宫、输卵管和卵巢。用剪刀取出两侧输卵管放入预热的G-MOPS中,在解剖镜下用针头将输卵管壶腹部撕破使卵丘团流出。

5. 小鼠的体外受精:用宽径枪头在平衡好的受精皿中加入新鲜的精子,使精子的终浓度调整为 2.5×10^6 条/ml,将卵丘团用G-MOPS洗涤3遍后放入加好精的受精皿中,每个受精滴中含有2个卵丘团。将受精皿放入37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、100%饱和湿度的培养箱中静置,精卵共孵育的受精时间在实验组1中为5 h,在实验组2中分别为0.5、2、5、8和12 h。

6. 发育培养液的准备:用于35 mm培养皿培养受精后的胚胎,外围制备6个培养滴(30 μ l G1或G2培养液),中间做三个洗滴(30 μ l/滴),上覆盖2 ml矿物油防止培养液挥发,置于37 $^{\circ}$ C,100%饱和湿度的培养箱中平衡过夜。

7. 胚胎的体外培养:将受精培养皿从培养箱中取出,用预热的G-MOPS清洗卵子数次以去除多余的精子和碎片。受精后的胚胎前48 h在卵裂培养液G1中培养24 h后观察2细胞,之后放入囊胚培养液G2中继续培养,90 h观察囊胚形成情况。统计比较不同的获能时间和受精时间的受精率和囊胚形成率。

三、统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,对不同的获能时间和受精时间下的受精率和发育率,应用单因素ANOVA分析和 χ^2 检验对各组数据进行分析。

结 果

1. 不同获能时间的卵子受精率: 精子获能时间分为0.5、1、2和4 h, 受精时间为5 h, 以2细胞胚胎代表受精胚胎。结果显示精子获能时间为1 h, 受精率为89.8%, 显著高于其他组($P < 0.01$)。与其他组相比, 获能时间为4 h时受精率显著下降($P < 0.01$)。结果见表1。

表1 不同的获能时间对受精率的影响

获能时间 (h)	卵子数	未分裂细胞 [细胞数 (%)]	2细胞数 [细胞数 (%)]
0.5	115	29(25.2)	86(74.8) ^{ab}
1	108	11(10.2)	97(89.8) ^c
2	110	31(28.2)	79(71.8) ^{ab}
4	104	51(49.0)	53(51.0)

注: 与1 h比较,^a $P = 0.001$; 与4 h比较,^b $P = 0.000$,^c $P = 0.000$

2. 不同获能时间的胚胎发育情况: 受精后的胚胎放入在卵裂培养液G1中培养, 24 h后观察2细胞, 64 h观察8细胞。之后放入囊胚培养液G2中继续培养, 90 h观察囊胚形成情况, 各个阶段胚胎图片如图1所示。经过统计分析, 四组胚胎的8细胞形成率、囊胚形成率、孵化囊胚率差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表2所示。

表2 不同获能时间下的胚胎发育情况

获能时间 (h)	2细胞数 [细胞数 (%)]	8细胞 [细胞数 (%)]	囊胚数 [囊胚数 (%)]	孵化囊胚 [囊胚数 (%)]
0.5	105	90(85.7)	73(69.5)	47(44.8)
1	101	82(81.2)	70(69.3)	43(42.6)
2	97	86(88.7)	65(67.0)	39(40.2)
4	92	79(85.9)	59(64.1)	39(42.4)

3. 不同受精时间的卵子受精率: 受精时间分为0.5、2、5、8和12 h, 而精子的获能时间均为1 h, 以2细胞胚胎代表受精胚胎。结果显示受精时间为0.5 h, 受精率为67.6%, 明显低于其他各组($P < 0.01$)。其他各组之间比较, 没有统计学差异($P > 0.05$)。结果见表3所示。

4. 不同受精时间的胚胎发育情况: 与0.5、2、5和8 h组相比, 12 h组的胚胎在8细胞率和囊胚率方面差异显著($P < 0.01$), 在孵化囊胚率方面具有显著差异($P < 0.05$)。其他各组之间8细胞率、囊胚率和孵化囊胚率均无具有显著差异($P > 0.05$)。结果见表4所示。

表3 不同的受精时间对受精率的影响

受精时间 (h)	卵子数	未分裂细胞 [细胞数 (%)]	2细胞 [细胞数 (%)]
0.5	102	33(32.4)	69(67.6)
2	117	19(16.2)	98(83.8)
5	103	14(13.6)	89(86.4)
8	95	11(11.6)	84(88.4)
12	98	13(13.3)	85(86.7)

注: 2细胞: 0.5 h组与2、5、8、12 h组相比, P 分别为0.006、0.002、0.001和0.002

表4 不同受精时间下的胚胎发育情况

受精时间 (h)	2细胞数 [细胞数 (%)]	8细胞 [细胞数 (%)]	囊胚 [囊胚数 (%)]	孵化囊胚 [囊胚数 (%)]
0.5	118	96(81.4)	76(64.4)	48(40.7)
2	112	95(84.8)	66(58.9)	51(45.5)
5	103	88(85.4)	63(61.2)	43(41.7)
8	105	83(79.0)	60(57.1)	40(38.1)
12	110	65(59.1)	38(34.5)	28(25.5)

注: 在8细胞率方面: 12 h组与0.5、2、5、8 h组相比, P 均为0.000; 在囊胚率方面: 12 h组与0.5、2、5、8 h组相比, P 均为0.000; 在孵化囊胚率方面: 12 h组与0.5、2、5、8 h组相比, P 分别为0.003、0.000、0.002和0.013

讨 论

目前, 精子的代谢产物对卵子受精和胚胎发育的影响受到很多研究者的关注。精子在体外获能和精卵共孵育的受精过程中会产生多种有害的代谢产物, 如细胞脂肪酸代谢产生的活性氧、氧自由基^[5]、雌二醇(E2)、孕酮(P)等。这些产物在较低水平时对精子获能是必需的, 对卵子的体外受精和接下来的胚胎发育不会产生影响。但过高水平就会对精子产生一系列的损伤, 如脂质膜的过氧化反应和精子DNA碎片化^[6]等, 从而降低精子活动力和顶体反应能力, 增加精子畸形率^[7], 最终导致受精率下降。同时, 经过长时间的培养使过量的精子代谢产物堆积, 消耗培养液的营养, 精子穿透卵丘而驱散的颗粒细胞部分退化及死亡的精子等不利因素使卵细胞处于一个营养不良的环境中, 原核的形成变缓慢或受到抑制, 从而使受精率和胚胎发育能力降低。也有研究表明卵子长时间暴露于大量精子及氧自由基, 可能通过释放透明带硬化因子, 如组织型浆液溶激活因子^[8], 加重透明带变硬程度, 可能成为受精后胚胎发育和成功种植的主要障碍。

本研究通过两种方法探讨了精子的代谢产物对小鼠的体外受精和胚胎发育的影响。第一种方法结果显示, 精子的体外获能时间为1 h时, 卵母细胞的受精率

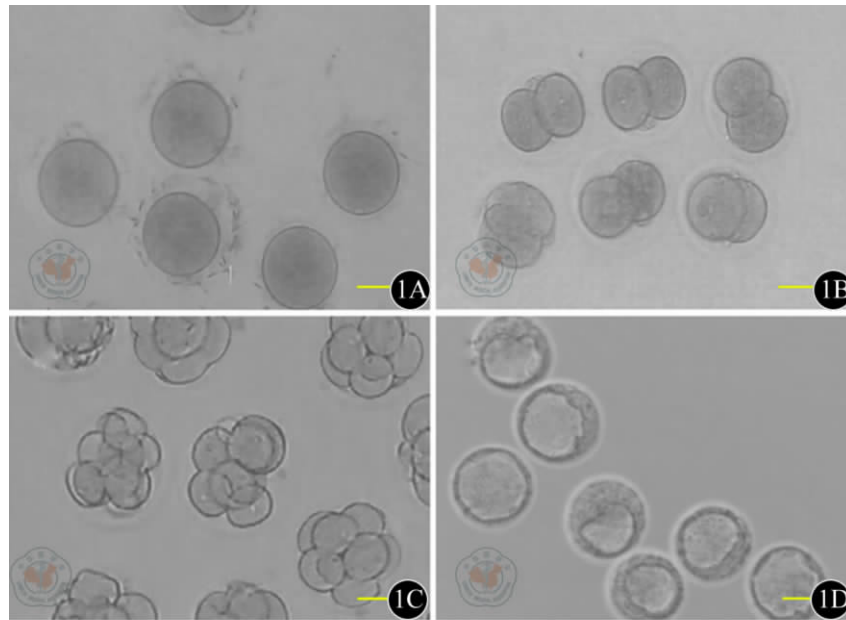


图1 不同发育阶段的鼠胚。1A: 5 h受精后的小鼠胚胎; 1B: 2细胞期胚胎; 1C: 8细胞期胚胎; 1D: 囊胚期胚胎, 标尺为50 μm

显著高于其他组,这一受精时间对昆明小白鼠的体外获能来说是最适宜的。当获能时间达到 4 h 时,受精率显著下降。这说明较长时间的体外获能培养可能导致精子的活动能力和受精能力减弱,这与 Henkel 等^[9]的在卵的体外受精研究结论一致。第一种方法得到的胚胎在 8 细胞率、囊胚率、孵化囊胚率方面比较没有明显差异,这说明获能时间没有影响到接下来的胚胎发育。第二种方法中受精时间为 0.5 h 时,卵母细胞的受精率显著低于其他组,而其他各组之间的受精率差异不明显。这可能是由于精卵相互作用的时间不充足造成的,当受精时间达到 2 h 以上,受精率差异不明显。2 h 短时受精与其他各组在受精率与其他各组没有差异,但在发育率方面显示出明显的优势,获得了较高的囊胚率和孵化囊胚率。原因可能是由于缩短了卵子暴露于精子大量的代谢产物中的时间,减少了不利胚胎发育的因素,在一定程度上起到了改善胚胎质量的作用,培养条件更符合体内自然生理条件下胚胎的发育环境。更有研究者证实^[10]30 s 的超短时受精在受精率和胚胎发育率方面与 90 min 的受精没有显著差异。但在优胚率、种植率和妊娠率等方面却显著提高,显示了短时受精的优势。当受精时间达到 12 h 时,胚胎在 8 细胞率和孵化囊胚率方面显著低于其他组,在囊胚率方面差异极显著。这说明大量的精子代谢产物可能影响到了胚胎在各个阶段的发育。

综上所述,精子过长时间的体外获能和受精时间对体外受精和胚胎发育会产生不利的影响,进而影响到 IVF-ET 临床妊娠。因此,一方面在精子上游处理时间上,应选择适宜的时间,以防止氧化损伤对精子受精

能力产生影响。另一方面选择可以短时受精来减少精子有害代谢产物对胚胎发育的影响,以达到最优的受精和胚胎发育结果。

参 考 文 献

- [1] Sanoeka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 12-15.
- [2] Dirnfeld M, Bider D, Koifman M, et al. Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves in-vitro fertilization outcome: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod* 1999; 14: 2562-2564.
- [3] Lundqvist M, Johansson U, Lundqvist O, et al. Reducing the time of co-incubation of gametes in human in-vitro fertilization has no beneficial effects. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 21-24.
- [4] Barraud-Lange V, Sifer C, Pocaté 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. *Assist Reprod Genet* 2008; 25: 305-310.
- [5] Gianaroli L, Fiorentino A, Magli MC, et al. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. *Hum Reprod* 1996; 11: 2507-2511.
- [6] Zhang XD, Chen MY, Gao Y, et al. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2011; 14: 187-191.
- [7] Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, et al. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract* 2008; 17: 108-116.
- [8] Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V, et al. Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in-vitro maturation. *Theriogenology* 2002; 57: 1897-1905.
- [9] Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 108-130.
- [10] Bungum M, Bungum L, Humaidan P. A prospective study, using sibling oocytes, examining the effect of 30 seconds versus 90 minutes gamete co-incubation in IVF. *Hum Reprod* 2006; 21: 518.

(收稿日期: 2012-01-21)

(本文编辑: 戚红丹)

段彪,杜海燕,张荣. 精子获能时间及精卵共孵育时间对小鼠体外受精和胚胎发育的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(7): 3011-3014.