

· 论著 ·

# 自体颗粒细胞线粒体移植对胚胎发育质量的影响

孔令红 刘忠 李红 朱亮 陈思梅 陈士岭 邢福祺

**【摘要】** 目的 探讨自体颗粒细胞线粒体移植(线粒体移植)对改善胚胎发育质量的影响。方法 对 3 次行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗未获妊娠或年龄大于 37 岁的 18 例患者,采用长周期超促排卵方案促排卵。当患者取出的成熟卵子多于 4 个时,采用常规方法,进行卵母细胞浆内精子注射(ICSI);或进行线粒体移植。线粒体移植的方法为收集卵丘复合体和卵泡液中的颗粒细胞,经匀浆离心提取线粒体,应用显微操作技术将线粒体和精子一并注入卵母细胞浆内。观察、比较两种方法获得卵子的受精和胚胎发育情况。结果 18 例行超促排卵方案后,获得成熟卵子 168 个,其中行线粒体移植卵子 86 个,受精 64 个,受精率为 74.4%;行 ICSI 卵子 82 个,受精 63 个,受精率为 76.8%。两种方法比较,差异无显著意义( $P>0.05$ );行线粒体移植的良好胚胎形成率为 59.4%,行 ICSI 的良好胚胎形成率为 34.9%。两种方法比较,差异有显著意义( $P<0.05$ )。18 例中 7 例临床妊娠,妊娠率为 38.9%。结论 自体颗粒细胞线粒体移植可明显改善胚胎发育质量,提高妊娠率。

**【关键词】** 粒层细胞; 线粒体; 移植; 胎儿发育

**Mitochondria transfer from self-granular cells to improve embryos' quality** KONG Ling-hong, LIU Zhong, LI Hong, ZHU Liang, CHEN Si-mei, CHEN Shi-ling, XING Fu-qi. Department of Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**【Abstract】 Objective** To improve embryos' quality and pregnancy rate with the method of self-mitochondria transfer. **Methods** All the 18 cases of women with repeated in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET)-treatment failure or older than 37 years were treated with the long gonadotropin releasing hormone-agonist (GnRH-a) regimens. The oocytes were divided into two groups: intracytoplasmic sperm injection (ICSI) group and mitochondria transfer group if the number of the individual patients' oocytes was more than four. In mitochondria transfer group, mitochondria were prepared by different centrifugation after the granulosa cells were trimmed from the oocytes or collected from follicular fluid and homogenated. Mitochondria and immobilized sperm were injected into oocytes by micromanipulation. The fertilization rate and embryos' quality were compared. **Results**

The fertilization rate was 74.4% in mitochondria transfer group, and 76.8% in ICSI group, with no statistical difference ( $P>0.05$ ). The good quality embryo rate in mitochondria transfer group was 59.4%, and it was 34.9% in ICSI group. The difference was significant ( $P<0.05$ ). There were 7 clinical pregnancies in the 18 cases. **Conclusion** Self-mitochondria transfer can improve embryos' quality and pregnancy rate without influence on fertilization rate.

**【Key words】** Granulosa cells; Mitochondria; Transplantation; Fetal development

常规行辅助生殖技术(assisted reproductive technique, ART),会出现有些患者多次胚胎种植失败和年龄偏大患者妊娠率低的现象,其原因可能是由于卵细胞内线粒体数量减少,或线粒体 DNA 结构变异导致卵子 ATP 能量产生不足,细胞分裂时非等倍染色体增多等,影响了胚胎的发育质量和

种植潜能<sup>[1,2]</sup>。本研究拟通过采用患者自体颗粒细胞线粒体移植(线粒体移植)的方法,以改善胚胎发育质量,提高妊娠率。

## 资料与方法

### 一、研究对象

选择自 2002 年 7 月至 2003 年 10 月,在我院生殖医学中心进行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗

的患者 18 例。患者年龄 33~46(38±3)岁,因胚胎发育质量差,进行 3 次以上 IVF-ET 均未妊娠,或患者年龄大于 37 岁。经超促排卵治疗,取出的成熟卵子少于 4 个者仅行线粒体移植;多于 4 个者随机行线粒体移植及 ICSI。本研究经过患者知情同意,并得到我院伦理委员会的认可。

### 二、方法

1. 超促排卵:全部患者采用促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)长周期超促排卵方案;即于黄体中期肌内注射曲普瑞林(商品名达菲林)1.875 g,14d 左右垂体功能受到抑制后,给予促卵泡激素(商品名果纳芬)促排卵。于出现直径达到 18 mm 的 2 个卵泡的当晚,肌内注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)10 000 IU,34 h 后在阴道 B 超导引下取卵。将卵丘复合体放入含有 5%人血白蛋白(HAS)的人输卵管培养液(HTF,美国 Irvine Scientific 公司产品)内,在 37℃,5%二氧化碳培养箱中培养。

2. 颗粒细胞线粒体提取:卵丘复合体经 80μ/ml 透明质酸酶(美国 Sigma 公司产品)消化后,拆除卵子周围的颗粒细胞。颗粒细胞用 HTF 培养液离心、洗涤后,记数并调整浓度为 10<sup>6</sup>/ml。卵丘颗粒细胞数量少的从卵泡液中收集颗粒细胞。取 1 ml 用冰浴后的细胞匀浆器将颗粒细胞匀浆 4~6 次,采用 4℃的冷冻离心机,2000 g 离心 20 min;取上 2/3 上清液,以 10 000g 离心 20 min。弃上清液,沉淀物即为线粒体。用 0.5μl 平衡后经人输卵管培养液(美国 Irvine Scientific 公司产品)悬浮,并放入 4℃冰箱保存备用。

3. 线粒体移植:移植的准备工作同行卵细胞浆内单精子注射(ICSI)。将制动的精子吸入直径为 7μm 的显微注射针(美国 IVM 公司制作),并移入线粒体微滴即吸入相当于约 1~1.5 个卵子直径长度的液体。然后将线粒体与精子一同注入卵细胞浆内。反复吸吐 1~2 次,使线粒体与卵细胞浆混匀,防止精子处在线粒体的液泡中不利受精。用这种方法移植到每个卵子的液体约是卵子体积的 1%,线粒体约 3000 个左右<sup>[3]</sup>。

4. 卵子受精和胚胎质量的观察:在受精后的第 16~20 h,观察卵子的受精情况,计数卵子的受精率(即出现的 2 个原核占有卵子的比例)。在第 2 天和第 3 天观察胚胎的发育情况,包括发育速度、细胞形态和碎片,计数良好胚胎(即在第 3 天胚胎移植时,每个胚胎内的细胞数目不少于 6 个,细胞碎片不超过胚胎总体积的 20%)的形成率(即良好胚胎

占正常受精卵子的比例)。

### 三、统计学方法

将两种胚胎移植方法所获得卵子的受精率和良好胚胎形成率输入计算机,采用 SPSS 软件进行  $\chi^2$  检验。

### 结 果

18 例患者经过超促排卵后,获得成熟卵子 168 个,其中行线粒体移植卵子 86 个,正常受精 64 个,受精率为 74.4%;行 ICSI 卵子 82 个,正常受精 63 个,受精率为 76.8%。两种方法的受精率比较,差异无显著意义( $P>0.05$ )。

行线粒体移植的胚胎发育速度正常,细胞碎片较少;移植日良好胚胎形成率为 59.4%。行 ICSI 的胚胎质量较差,移植日良好胚胎形成率为 34.9%。两种方法的良好胚胎形成率比较,差异有显著意义( $P<0.05$ )。见表 1。移植的胚胎全部选择线粒体移植,行 ICSI 的胚胎进行冷冻保存。每个患者移植的胚胎数目为 1~3 个。18 例中 7 例获临床妊娠,4 例为双胞胎,妊娠率为 38.9%,与我生殖医学中心同期行 ICSI 的平均妊娠率为 41.7%接近。其中 1 例香港患者年龄 46 岁,在 3 个卵泡中获得卵子 2 个,行线粒体移植后 1 个卵子正常受精,胚胎发育良好,移植后获临床妊娠<sup>[3]</sup>。

表 1 两种胚胎移植方法获得卵子的受精率和良好胚胎形成率比较

类别	获卵数 (个)	受精		良好胚胎	
		受精数 (个)	百分率 (%)	良好胚胎 数(个)	百分率 (%)
线粒体移植	86	64	74.4	38	59.4
ICSI	82	63	76.8	22	34.9

### 讨 论

#### 一、线粒体移植可以改善胚胎发育质量

提高高龄生育期妇女和多次行 IVF-ET 失败患者的妊娠率,是近年来人类生殖领域的重大课题和难题。多项研究提示,与年龄有关的老化卵子是由于线粒体数量或线粒体 DNA 变异造成的。线粒体产生 ATP 能力的降低,不能维持正常染色体分离、生物合成、有丝分裂及胚胎细胞的各种生理功能。由此导致种植期胚胎细胞的发育异常、停滞或凋亡<sup>[4,5]</sup>。卵子产生 ATP 的能力是不相同的,这对以后胚胎的发育有显著影响。有测定发现,成熟卵子中的线粒体含量有明显的区别,不能正常受精的

卵子含量低<sup>[6]</sup>。我们通过行线粒体移植,给卵子提供补充受精和继续发育的能量,明显改善了胚胎的质量,并提高了妊娠率。在卵子受精方面,线粒体移植没有显示优势,原因可能是线粒体移植比单纯行 ICSI 操作难度大,回吸卵细胞浆对卵细胞骨架的破坏较重,可能伤及纺锤体。

## 二、线粒体移植的安全性及可行性

有文献报道,将年轻妇女的卵细胞质注入年老或多次行 IVF-ET 失败患者的卵子内,可明显改善胚胎的质量,提高了妊娠率<sup>[7]</sup>。但是由于卵细胞质移植存在导致胚胎和胎儿线粒体 DNA 嵌合,以及传播线粒体遗传性疾病的可能性<sup>[8,9]</sup>,以致卵细胞质移植技术已被多个国家禁止于临床应用。颗粒细胞来源于患者自身,消除了异体线粒体移植的各种危险因素。且颗粒细胞是最靠近卵子的组织细胞,在卵子的发育过程中提供营养物质和调节因子,两者的线粒体的形态和功能有着最大的相似性。本研究行线粒体移植,取得了良好的效果。随访至今,7 例临床妊娠患者的胎儿发育均正常,1 例患者已出生健康的新生儿<sup>[10]</sup>。

总之,线粒体移植为改善老龄生育期妇女以及反复妊娠失败患者的胚胎质量,提供了比较有效和安全的方法。在此基础上,我们将谨慎地就移植线粒体在卵子内迁徙和功能发挥方面,开展进一步

研究。

## 参 考 文 献

- 1 Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, et al. Mitochondrial DNA rearrangments in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5:927-933.
- 2 Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, et al. Mitochondrial deletion in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4: 872-892.
- 3 孔令红,刘忠,李红,等.经自体颗粒细胞线粒体移植 46 岁妇女临床妊娠一例报告. *第一军医大学学报*, 2003, 23(7): 743.
- 4 Tzeng CR, Hsieh S, Chang N, et al. Pregnancy derived from mitochondrial transfer (MIT) into oocyte from patients own cumulus cell(cGcs). *Fertil Steril*, 2001,76:176-180.
- 5 Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG, et al. Mitochondria and the death of oocytes. *Nature*,2000,403(6769):500-501.
- 6 Reynier P, Panloup PM, Chrien MF, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7:425-429.
- 7 Dale B, Wilding M, Botta G, et al. Pregnancy after cytoplasmic transfer in a couple suffering from idiopathic infertility. *Hum Reprod*, 2001, 16:1469-1472.
- 8 Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, et al. Mitochondrial in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod*, 2001, 16:513-516.
- 9 Malter HE, Cohen J. Ooplasmic transfer: animal models assist human studies. *Reprod Bio Med Online*, 2002, 5:26-35.
- 10 孔令红,刘忠,李红,等.首例经自体颗粒细胞线粒体移植的双胞胎儿出生. *第一军医大学学报*, 2003, 23: 990-991.

(收稿日期:2003-05-30)

(本文编辑:赵小丽)

## · 启 事 ·

### 关于文稿申请“快速通道”发表的规定和要求

为了使反映我国妇产科领域中,有重大研究成果内容的论文尽快、及时在我刊发表,我刊自 2002 年起,对作者的来稿从审查到正式发表的程序,开辟了“快速通道”。为了使广大作者、读者了解文稿申请“快速通道”的规定和要求,特将申请“快速通道”的规定和要求公布如下:(1)凡内容涉及有重大创新和为国内首创,达到或超过国内或国际先进水平的科研及临床论文,均可申请进入“快速通道”,以使论文快速发表;(2)作者本人提出进入“快速通道”申请;(3)作者提供国内外数据库的查新报告;(4)作者提供两位同行知名专家(作者所在单位的专家和作者的导师应回避)的推荐信,推荐

信内容应包括本研究为“最新”、“首创”,及申请快速发表论文的理由;(5)作者提供申请快速发表论文的作者署名无争议、发明权(即首创权)无争议的证明;(6)作者提供论文一式 3 份(包括软盘);(7)作者提供由作者单位科研部门开具的介绍信。

凡符合上述规定和要求,获准进入“快速通道”的论文,将由本刊编委会总编辑、相关专业编委共同审议决定是否刊登(每篇论文需交纳快速审稿费 200 元,并请通过邮局汇款),如编委会审查后同意论文发表,本刊郑重承诺,该论文于收稿后 4 个月内正式刊出。