



## 第一极体不能精确定位人卵母细胞纺锤体

自从1992年Palermo等进行了首例单精子卵泡浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)以来, ICSI在治疗人类不孕尤其是在治疗男性不孕不育方面发挥了重要的作用。传统的ICSI操作是转动卵母细胞, 使第一极体位于6点或12点位置, 然后在3点的位置注入精子。此操作是建立在MII (metaphase II) 卵母细胞纺锤体是靠近第一极体假设的基础上的, 注入精子位置的选择是为了避免损伤卵母细胞纺锤体。近年来有研究发现, 在一些和仓鼠的MII卵母细胞中, 第一极体的位置并不能准确定位纺锤体的位置, 传统的穿刺部位选择, 可能会损伤纺锤体和/或造成染色体的异常[1]。为了明确纺锤体与第一极体的位置关系, 我们进行了以下的研究。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象

2003年3月~10月, 在本中心接受辅助生殖治疗的36位28~34岁男性因素不孕妇女。患者同意将其部分卵子进行本项研究。

#### 1.2 方法

1.2.1 卵子获得 促排卵采用长周期疗法, 肌内注射绒毛膜促性腺激素6 000~10 000 IU(Profasi, 2 000 I-U/支, 瑞士Serenio公司产品), 36~48 h后行B超监测下的经阴道取卵术[2]。在4×10倍解剖显微镜下捡卵。取卵后放入5% CO<sub>2</sub>、37 °C的培养箱培养2 h, 经透明质酸酶消化后去除卵子周围的颗粒细胞。

1.2.2 成熟卵子的处理 如果卵子有第一极体存在即为体内成熟卵子, 归入体内成熟组。用纺锤体成像系统(LC-PolScope Imaging System)观测卵子纺锤体。然后将卵子放入5% CO<sub>2</sub>、37 °C的培养箱培养30 min以上后行ICSI[3][4]。

1.2.3 未成熟卵子的处理 如果卵子在取卵当日无第一极体存在, 即将卵子移入人输卵管液(human tubal fluid, HTF)培养小滴中, 放入5% CO<sub>2</sub>、37 °C的培养箱培养24~48 h。培养后如果有第一极体排出, 就归入体外成熟组。同样用纺锤体成像系统观测卵子纺锤体, 然后将卵子放入5% CO<sub>2</sub>、37 °C的培养箱培养30 min以上后行ICSI。

#### 1.3 数据处理

实验结果用SPSS11.5处理, 检验方法采用配对t检验。

### 2 结果

36位试者共获得体内成熟组卵子40个, 其中有34个卵子观测到纺锤体; 获得体外成熟组卵子35个, 其中有26个卵子观测到纺锤体。测量纺锤体、卵子中心和第一极体形成的角度, 具体方法见图1。图中绿线所示即

为所要测量的角度。

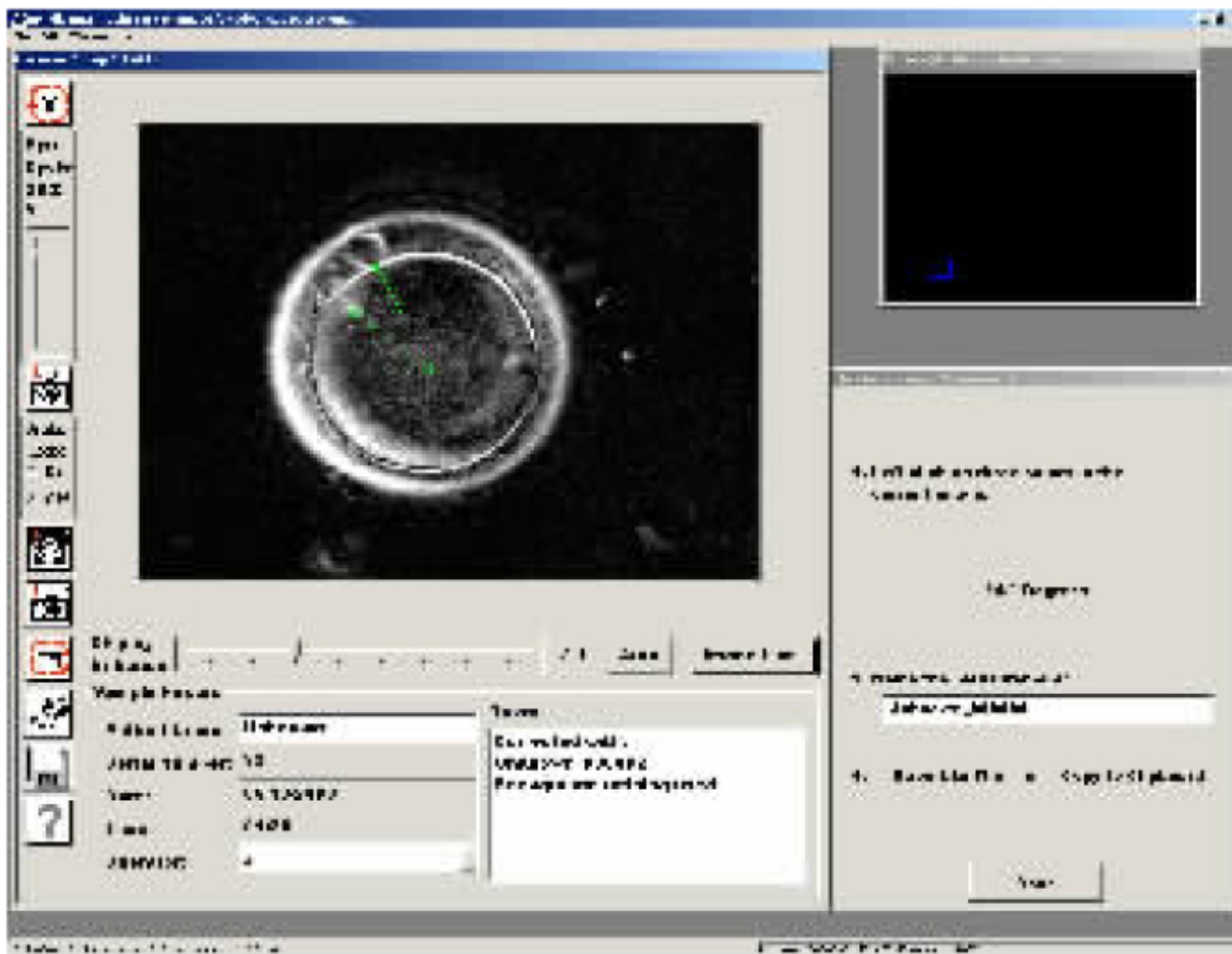


图 1 纺锤体与第一极体之间的角度测量

Fig.1 Measurement of angle between the spindle and the first polar body

两组检测结果发现，绝大部分MII卵子第一极体的位置都不能精确定位纺锤体的位置，能够精确定位的仅占5.88%和7.69%(表1)。

表 1 纺锤体与第一极体的位置关系的分布

Tab.1 Relationship between the position of the metaphase II spindle and that of the first polar body in different groups

Group	Number of oocyte					
	n	With spindles	Angle between the center of an oocyte, the spindle and the first polar body			
			0°	0°~45°	45~90°	>90°
<i>In vitro</i> matured	35	26	2(7.69)	16(61.54)	7(26.92)	1(3.85)
<i>In vivo</i> matured	40	34	2(5.88)	18(52.94)	12(35.29)	2(5.88)

选择同时有体内和体外成熟卵子的患者共16位，比较体内成熟组和体外成熟组中第一极体与纺锤体形成

的角度。体内成熟组的角度为 $(44.7 \pm 31.1)^\circ$ ，体外成熟组则为 $(25.9 \pm 26.5)^\circ$ ，体内与体外组角度差值为 $(18.8 \pm 23.3)^\circ$ ，t值为3.235，P值为0.006，差异具有显著性。

### 3 讨论

此研究为国内首次将纺锤体成像系统应用于观测活体卵母细胞，结果发现MII卵子中第一极体的位置并不能精确定位纺锤体的位置，在体内和体外成熟组中，能够精确定位的仅占5.88%和7.69%。

Silva等[5]检测了30个仓鼠MII卵母细胞的纺锤体，发现只有5个卵母细胞的第一极体可以较精确地预测纺锤体的位置。Hardarson等[6]的研究表明，所获得的54个体内成熟MII卵母细胞中，第一极体和纺锤体的平均角度是 $41.7^\circ$ 。与本研究结果相近。由于第一极体的位置并不能精确预测纺锤体的方位，所以以往建立在MII卵母细胞纺锤体是靠近第一极体假设的基础上的传统ICSI技术就受到了挑战。传统ICSI的安全性受到了质疑。也许以往ICSI之后单原核和多原核的形成就与纺锤体的损伤有关。前文已经说明了传统ICSI的操作方法，可见90度的位置非常关键，而以往的研究分组并没有体现90度的重要性。本研究将90度作为一个分组点，对于以后将纺锤体成像应用于人类辅助生殖领域具有更强的指导意义。

本研究同时发现，卵子的成熟方式会影响MII卵母细胞与第一极体之间形成的角度，差异具有显著性。Hardarson等[6]的研究也得出了相同的结论。究其原因，首先可能与观测纺锤体前的机械操作有关：因为卵子需要机械拆除其周围的颗粒细胞才能观察第一极体的排出和纺锤体的方位，机械的挤压可能会造成第一极体的移位，而体外成熟组由于有一段培养时间，所以第一极体的移位可以复原。其次，卵母细胞活化过程中会出现纺锤体的旋转等动力学变化[7]，只是这种变化的规律、意义目前还不得而知，也许体内成熟卵子的纺锤体已经处于旋转等动力学变化的状态，而体外成熟组卵子可能存在活化不足。再次，纺锤体对周围环境的改变非常敏感[8][9][10][11]，由于体内和体外培养条件的差异，纺锤体可能出现不同程度的移位。

纺锤体对卵母细胞染色体的平衡、运动、分配和极体的排出非常关键。卵母细胞纺锤体的异常会导致异常的减数分裂，有可能产生异常的胚胎。以往研究动物卵母细胞纺锤体的方法都是侵袭性的，需要固定和染色。人卵母细胞来源有限，所以不能广泛应用。本试验应用纺锤体成像系统观测纺锤体，不需要对标本进行固定、染色等侵袭性操作，因此观测过程快速、安全。此纺锤体成像系统实际上是将液晶可变减速器、电子成像和数码成像技术结合起来一种液晶偏振光显微镜。对于具有双折射特性的纺锤体来说，偏振光显微镜能显示纺锤体的细微变化，分辨率高[12][13]，目前液晶偏振光显微镜可认为是最适合应用于人类辅助生殖领域的一种显微镜。

本研究表明，传统的ICSI操作很可能会损伤卵子的纺锤体。而通过纺锤体成像，可以精确定位卵母细胞中纺锤体的位置，从而完全避免在ICSI过程中损伤纺锤体，使ICSI更加安全可靠。将纺锤体成像应用于ICSI将可以获得更高的受精率和临床妊娠率[14]。

#### 参考文献：

[1] Hewitson L, Dominko T, Takahashy D, et al. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilisation after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys[J]. Nature Med, 1999, 5(4): 431-3.

[2] 邢福祺, 陈士岭, 宋兰林, 等. 体外授精-胚胎移植治疗不孕症85例报道[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1998, 14(6): 353-4.

Xing FQ, Chen SL, Song LL, et al. In vitro fertilization and embryo transfer used for treatment of infertile patients: a clinical report of 85 cases[J]. J Chin Prac Gynecol Obstet, 1998, 14(6): 353-4.

[3] 邢福祺, 陈士岭, 闫宗合, 等. 卵母细胞质内单精子注射治疗不孕症34例临床总结[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 343-4.

Xing FQ, Chen SL, Yan ZH, et al. Evaluation of 34 cycles of intra-cytoplasmic sperm injection for infertility[J]. J First Mil Med U-niv/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19

(4): 343-4.

[4] 罗琛, 邢福祺, 罗深秋. 对曾育21三体综合征患儿者行胚胎种植前遗传学诊断获妊娠1例[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 269-71.

Luo C, Xing FQ, Luo SQ. Normal pregnancy in a woman having had a child with trisomy 21 syndrome before: application of preimplantation genetic diagnosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 269-71.

[5] Silva CP, Kommineni K, Oldenbourg R, et al. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes[J]. Fertil Steril, 1999, 71(4): 719-21.

[6] Hardarson Th, Lundin K, Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte[J]. Hum Reprod, 2000, 15(6): 1372-6.

[7] Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, et al. Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes[J]. Biol Reprod, 2000, 63(1): 251-8.

[8] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy[J]. Hum Reprod, 2001, 16(11): 2374-8.

[9] Maria TZ, Ryszard B, Robert F, et al. Effects of chilling to 0 °C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes[J]. Fertil Steril, 2001, 75(4): 769-77.

[10] Boiso I, Marti M, Santalo J, et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cry-preserved at the germinal vesicle and metaphase II stage[J]. Hum Reprod, 2002, 17(7): 1885-91.

[11] 朱亮, 罗琛, 黄敏珍, 等. 应用两种麦管系统对小鼠囊胚的玻璃化冷冻[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 992-5.

Zhu L, Luo C, Huang MZ, et al. Vitrification of mouse blastocysts using two kinds of straw systems[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 992-5.

[12] Oldenbourg R. Polarized light microscopy of spindles[J]. Methods Cell Biol, 1999, 61: 175-6.

[13] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination[J]. Hum Reprod, 2001, 16(7): 1464-8.

[14] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates[J]. Fertil Steril, 2002, 77(6): 1274-7.

#### 参考文献:

[1] Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, et al. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilisation after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys[J]. Nature Med, 1999, 5(4): 431-3.

[2] 邢福祺, 陈士岭, 宋兰林, 等. 体外授精-胚胎移植治疗不孕症85例报道[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1998, 14(6): 353-4.

Xing FQ, Chen SL, Song LL, et al. In vitro fertilization and embryo transfer used for

treatment of infertile patients: a clinical report of 85 cases[J]. J Chin Prac Gynecol Obstet, 1998, 14(6): 353-4.

[3] 邢福祺, 陈士岭, 闫宗合, 等. 卵母细胞质内单精子注射治疗不孕症34例临床总结[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 343-4.

Xing FQ, Chen SL, Yan ZH, et al. Evaluation of 34 cycles of intra-cytoplasmic sperm injection for infertility[J]. J First Mil Med U-niv/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(4): 343-4.

[4] 罗琛, 邢福祺, 罗深秋. 对曾育21三体综合征患儿者行胚胎种植前遗传学诊断获妊娠1例[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 269-71.

Luo C, Xing FQ, Luo SQ. Normal pregnancy in a woman having had a child with trisomy 21 syndrome before: application of preimplantation genetic diagnosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 269-71.

[5] Silva CP, Kommineni K, Oldenbourg R, et al. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes[J]. Fertil Steril, 1999, 71(4): 719-21.

[6] Hardarson Th, Lundin K, Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte[J]. Hum Reprod, 2000, 15(6): 1372-6.

[7] Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, et al. Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes[J]. Biol Reprod, 2000, 63(1): 251-8.

[8] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy[J]. Hum Reprod, 2001, 16(11): 2374-8.

[9] Maria TZ, Ryszard B, Robert F, et al. Effects of chilling to 0 °C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes[J]. Fertil Steril, 2001, 75(4): 769-77.

[10] Boiso I, Marti M, Santalo J, et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cry-opreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage[J]. Hum Reprod, 2002, 17(7): 1885-91.

[11] 朱亮, 罗琛, 黄敏珍, 等. 应用两种麦管系统对小鼠囊胚的玻璃化冷冻[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 992-5.

Zhu L, Luo C, Huang MZ, et al. Vitriification of mouse blastocysts using two kinds of straw systems[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 992-5.

[12] Oldenbourg R. Polarized light microscopy of spindles[J]. Methods Cell Biol, 1999, 61: 175-6.

[13] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination[J]. Hum Reprod, 2001, 16(7): 1464-8.

[14] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates[J]. Fertil Steril, 2002, 77(6): 1274-7.