

# 经自体颗粒细胞线粒体移植 46 岁妇女获临床妊娠 1 例报告

孔令红袁 忠袁 红袁 亮袁 福袁 祺袁 澜第一军医大学南方医院妇产科袁 东 广州 510515 冤

**摘要** 一名患不孕症的 46 岁妇女经自体颗粒细胞线粒体移植获临床妊娠遥具体方法为经用达菲林 1.875mg 脱敏抑制袁纳芬和尿促性腺素超促排卵袁有 4 个卵泡生长袁取得 2 个成熟卵子遥用 Percol 梯度离心收集卵泡液中的颗粒细胞与卵丘颗粒细胞合并袁调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$  遥取 1ml 的颗粒细胞袁用制冷后的玻璃匀浆器匀浆 6 次遥匀浆液经 4 益冷冻离心机 2000g 20min 离心袁之后取上清液 9800g 20min 离心袁线粒体沉淀用 1ml 的人类输卵管液稀释遥所有操作尽量保持样品在 4 益遥用显微注射针吸取线粒体溶液袁长度约 1 个卵子的直径袁和制动后的精子一并注入卵子内袁注射针的直径约 7mm 遥采用这种方法每个卵子约移植 3000 个线粒体遥两个卵子都成熟曰一个正常受精袁一个为 3 原核遥正常受精的卵子袁第 3 天移植时发育成 8 细胞胚胎遥移植后 15d 查尿阳性遥移植后 30d 于 B 超下可见胎芽和胎心搏动遥妊娠 9 周时患者发生自然流产遥

**关键词** 不育袁女性 / 治疗曰细胞移植曰颗粒细胞曰线粒体

中图分类号 714 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)07-0743-01

## Pregnancy in a 46-year-old woman after autologous granular cell mitochondria transfer

KONGLing-hong, LIUZhong, LIHong, ZHULiang, XINGFu-qi

Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Growth of 4 follicles was achieved in a 46-year-old infertile woman and 2 mature oocytes were subsequently obtained after pituitary desensitization with triptorelin (1.875mg) and hyperstimulation with recombinant human FSH (Gonal-F) and urinary human menopausal gonadotropin (HMG). The granular cells were collected from the cumulus and follicle fluid of the patient with Percol gradient centrifugation. The cells (about  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) were homogenated for 6 times with cold glass homogenizer, the resultant crude homogenate centrifuged for 20 min at 2000 伊. The supernatant was again centrifuged for 20 min at 9800 伊, after which the pellets of the mitochondria were resuspended in 1 ml modified human tubal fluid (mHTF) medium and maintained at 4 益. A microinjection needle with the inner diameter of approximately 7 滋 was used to aspirate the mitochondria suspension for about 100 滋 in length on the scale of the needle for delivering the mitochondria, along with the immobilized sperms, into a single MII oocyte. About 3000 mitochondria were retransferred into each oocyte. The two oocytes were both fertilized, but one had 3 pronucleus, and the normal fertilized oocyte developed into 8-blastomere embryo 3 d after its transfer into the patient's uterus. The urinetest confirmed clinical pregnancy in the woman 15 d later, and 30 d after the transfer, the fetal body and heart beat could be observed by ultrasound, but unfortunately, spontaneous abortion occurred at the ninth week. According to our knowledge, this woman is the eldest person in mainland China to receive assisted reproduction operation that successfully got clinical pregnancy with her own oocyte.

**Key words:** infertility, female/therapy; cell transplantation; granulosa cells; mitochondria

37 岁以上妇女的卵巢对促性腺激素的反应较差袁妊娠率也较低遥根据本科室的资料袁这部分患者进行体外受精 - 胚胎移植的妊娠率仅为 15% 左右遥经历 1~2 个治疗周期失败后袁患者一般需通过接受年轻妇女捐赠的卵子借以实现怀孕生子遥我科通过自体颗粒细胞线粒体移植使 1 名 46 岁妇女采用自己的卵子成功妊娠袁现报告如下遥

### 1 临床资料

患者 46 岁袁中国香港公民袁因人流后 16 年未孕来我院生殖中心求治遥患者初潮年龄 14 岁袁素月经规律袁量中袁痛经袁次月经为 2002 年 11 月 14 日遥患者曾孕 2 产 1袁 984 年顺产 1 男婴袁 986 年孕 7 周左右人工流产遥其后未避孕袁一直

不孕遥 2002 年 8 月 26 日于外院腹腔镜检查确诊为双侧输卵管阻塞遥患者丈夫的精液检查正常遥患者夫妇要求行体外受精 - 胚胎移植袁 IVF-ET 治疗遥考虑患者年龄较大袁建议做自体颗粒细胞线粒体移植袁患者同意遥

11 月 30 日给予达菲林 1.875mg 肌肉注射袁 2 月 9 日月经来潮遥 12 月 11 日 B 超提示右卵巢 2 个窦状卵泡袁左卵巢有 3 个窦状卵泡袁决定当日起给予果纳芬 5U/ 支袁 瑞士雪兰诺药厂 冤促排卵袁 支/d 遥 6 日后 B 超提示双侧卵巢无反应袁决定改果纳芬为尿促性腺素 100IU 袁 珠海丽珠药厂 冤 支/d 袁 12 月 20 日 B 超监测结果显示只有 3 个卵泡生长发育遥建议患者取消此治疗周期袁患者拒绝后继续原治疗方案遥 12 月 21 日袁有一卵泡直径达到 19.5mm 袁其余 3 个卵泡直径小于 14mm 遥当晚给予绒促性腺素 10000IU 袁 瑞士雪兰诺药厂 冤 0000U 遥 12 月 23 日经阴道超声介导下取卵袁得到 2 个卵子遥

由于患者的卵子少袁卵丘复合体上的颗粒细胞相应也少袁

收稿日期 2003-02-17

作者简介 孔令红 1970- 冤男袁 山东阳谷人袁主治医师袁讲师袁第一军医大学在读博士研究生袁电话 020-1641910 袁 e-mail: klh@fimmu.edu.cn

酸的峰面积增加近一倍,因此建议样品溶液即配即用。

### 4 讨论

本研究经对阿司匹林在 4 种溶剂中稳定性的比较发现,冰醋酸-甲醇溶液对阿司匹林的稳定性较好,测得数据可以看出,在 30 min 内测定样品溶液,其阿司匹林峰积分面积的值基本不变,可以认为阿司匹林水解反应很慢,对样品测定影响较小,对阿司匹林咀嚼片两批次样品的测定结果均符合药典规定。本实验选择冰醋酸-甲醇溶液作为本方法的测定溶剂,另外,根据实践经验,我们建议,制备样品溶液时,加入溶剂开始溶解样品时,最好在 10 min 内完成,制备的样品溶液最好在 30 min 内测定,否则,应从新制备样品溶液进行测定。

本法色谱条件与系统能较好的将阿司匹林咀嚼片中水杨酸与其他成分的完全分离,并用对照品按外标法计算含量,能准确地求出水杨酸的含量,参照中

国药典 2000 年版的阿司匹林肠溶片游离水杨酸检查法,选择乙醇作溶剂,经本实验观察,证明水解是很快的,结果的判定是化学反应目视法比色法,特别当颜色相近时,误差较大,综上所述,采用 HPLC 法测定阿司匹林咀嚼片中的游离水杨酸,操作简单,快速,准确。

### 参考文献

曹 Vane JR, Flower RJ, Botting RM. History of aspirin, its mechanism of action. *Stroke*, 1990, 21(12 Suppl): IV12-IV23.

曹 Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*, 1994, 330(18): 1287-94.

曹 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2000.

曹 王鹤尧, 张金平, 屈桂秋, 等. 阿司匹林和游离水杨酸高效液相色谱测定新方法的研究. *中国新药杂志*, 2001, 10(1): 37-9.

曹 Wang HY, Zhang JP, Qu GQ, et al. Improvement of HPLC method for determination of aspirin and free salicylic acid. *Chin J New Drug*, 2001, 10(1): 37-9.

曹 王晓枫, 康 晖, 裴晓丽, 等. HPLC 法测定卡巴匹林镁结构中阿司匹林的含量. *中国新药杂志*, 1999, 8(7): 463-5.

曹 Wang XF, Kang H, Pei XL, et al. Determination of aspirin in carbascalmagnesium by HPLC. *Chin J New Drug*, 1999, 8(7): 463-5.

### 连接 743 页

不能满足线粒体移植的需要,所以同时用 Percol 梯度离心的方法收集卵泡液中的颗粒细胞,卵子经透明质酸酶消化,去除卵丘复合体的颗粒细胞,将所有的颗粒细胞混合并离心洗涤,调整密度为 1.10 g/ml,取 1 ml 的颗粒细胞,用 4 益冰箱制冷后的玻璃匀浆器匀浆 5 次,匀浆液加入 1 ml 的微量离心管,置冷离心机 2000 g 离心 10 min,离心后,取上清液,9800 g 离心 10 min,离心后,线粒体沉淀用 0.5 ml 的人类输卵管液,美国 Irvine Scientific 稀释,放入 4 益冰箱备用。卵子体外培养 3 h 后,开始线粒体移植和显微授精操作,用显微注射针吸取线粒体溶液,长度约 1 个卵子的直径,和制动后的精子一并注入卵子内,采用这种方法,每个卵子约增加 3000 个线粒体,两个卵子都成熟并受精,有一个为 3 原核,正常受精的卵子,在 12 月 26 日移植时,发育成 8 细胞良好胚胎,移植后,给予黄体酮补充 0 mg/d,移植后 15 日,在香港当地医院查尿阳性,1 月 24 日,在本生殖中心 B 超下,可见单活胎,有胎心搏动,证实为临床妊娠,1 月 19 日,患者出现阴道流血,伴腹痛等流产先兆,在当地医院保胎失败,胎儿及附属组织完全娩出。

### 2 讨论

提高大龄生育期妇女的妊娠率是人类生殖领域的重大课题和难题,多项研究提示,随着年龄增长而老化的卵子,由于线粒体数量或线粒体 DNA 变异,产生 ATP 的能力降低,不能维持正常的染色体分离,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或终止。

成熟的卵细胞质中大约有 10 万个线粒体,而精子中只有

25 个左右,由于线粒体大量增殖发生于囊胚孵化阶段,前期胚胎所有的耗能主要依靠卵子所携带的有限的线粒体提供。Cohen 等曾用显微注射的方法,将年轻妇女卵细胞质的线粒体注入年老患者的卵子内,明显改善胚胎的质量,提高了妊娠率,但是由于卵细胞质移植,可能导致胚胎和胎儿线粒体 DNA 嵌合性,以及传播线粒体遗传性疾病,此项技术在美国已被停止使用,我国台湾的曾启瑞教授,在 2001 年首次报道了,用患者自体颗粒细胞线粒体移植,获临床妊娠的消息,这本科生殖中心在中国大陆首先采用自体颗粒细胞线粒体移植,并在操作方法上进行了一些改进,目前已有 5 例患者通过此项技术获临床妊娠,文献检索显示,目前中国大陆尚无这方面的报道,这位 46 岁妊娠妇女,应当是我国大陆通过辅助生殖技术孕育有自己嫡亲孩子的年龄最大的孕妇。

### 参考文献

曹 Tzeng C, Hsieh S, Chang N, et al. Pregnancy derived from mitochondrial transfer (MIT) into oocyte from patient's own cumulus cell (cGcs). *Fertil Steril*, 2001, 76(3): S67.

曹 Cummins J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod*, 1998, 3(3): 172-82.

曹 van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod*, 1998, 13(10): 2857-68.

曹 Cohen J, Scott R, Schimmel T, et al. Birth of infant after transfer of a nucleated donor oocyte cytoplasm into recipient egg. *Lancet*, 1997, 350(9072): 186-7.