

两种商品化培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响比较

潘承双 徐芝慧 张欢 李燕 金建远 费前进 倪吴花

【摘要】目的 比较 Cook 培养液和 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响。方法 收集行常规体外受精-胚胎移植(IVF-ET)893 例和卵胞浆内单精子注射-胚胎移植(ICSI-ET)320 例新鲜周期的临床数据。根据使用的培养液不同,IVF-ET 周期分为 Cook 组 456 例和 Vitrolife 组 437 例,ICSI-ET 周期分为 Cook 组 143 例和 Vitrolife 组 177 例。分别比较 IVF-ET 周期和 ICSI-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组获卵个数、正常受精率、卵裂率、第 3 天优质胚胎率、ET 个数、种植率、妊娠率。结果 IVF-ET 和 ICSI-ET 周期中,Cook 组和 Vitrolife 组获卵个数、正常受精率、卵裂率、ET 个数、种植率、妊娠率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),但 Vitrolife 组第 3 天优质胚胎率均明显高于 Cook 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 无论 IVF-ET 还是 ICSI-ET 周期,两种培养液对种植率和妊娠率均没有影响,但 Vitrolife 培养液可以获得更高的第 3 天优质胚胎率。

【关键词】 体外受精 胚胎培养 培养液

Comparison of in vitro embryo development and clinical outcomes with two commercial culture media applied in IVF-ET and ICSI-ET PAN Chengshuang, XU Zhihui, ZHANG Huan, et al. Reproductive Medicine Center, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

【Abstract】 Objective To compare the effects of Cook and Vitrolife culture media on in vitro embryo development and clinical outcomes of IVF-ET and ICSI-ET. Methods A total of 893 cycles of IVF-ET and 320 cycles of ICSI-ET in our reproductive center were analyzed retrospectively. In IVF-ET, 456 cycles used Cook media and 437 cycles used Vitrolife media, while for ICSI-ET there were 143 cycles with Cook media and 177 cycles with Vitrolife media, respectively. The number of retrieved oocytes, fertilization rate, cleavage rate, the top quality embryos, number of ET, implantation rate and pregnancy rates were compared between Cook group and Vitrolife group in IVF-ET or ICSI-ET cycles. Results There was no significant difference in the number of retrieved oocytes, fertilization rate, cleavage rate, number of ET, implantation rate and pregnancy rate between the two groups (all $P > 0.05$), while the top quality embryos rate of Vitrolife group was higher than that of Cook group, both in IVF-ET and ICSI-ET cycles (both $P < 0.01$). Conclusion There are no significant differences in implantation rate and pregnancy rate between Cook and Vitrolife culture media used in IVF-ET and ICSI-ET cycles. However, the Vitrolife media may be better for the improvement in embryo quality than Cook media.

【Key words】 In vitro fertilization Embryo culture Culture medium

随着辅助生殖技术的发展,商品化培养液逐渐替代了实验室自制的培养液。相比实验室自制培养液,商品化培养液批次之间更稳定、使用更方便,也更有利于实验室质量控制^[1]。现如今很多商品化培养液开始用于拾卵、精子洗涤、体外受精、胚胎发育、胚胎冷冻等各个环

节^[2]。但是不同厂家的培养液成分各不相同^[3],因此有可能造成胚胎发育的差异。目前尚无定论哪种商品化培养液最适合胚胎的培养^[4]。本研究对比分析了 Cook 培养液和 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响,探讨这两种培养液究竟哪种更适合胚胎体外发育。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2014 年 3 至 8 月在本中心行常规体外受精-胚胎移植(IVF-ET)893 例和卵胞浆内单精子注射-胚胎移植(ICSI-ET)320 例新鲜周期的临床数据。入组标准:因女方输卵管因素、男方少弱畸精子症、梗阻型

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.10.2018-909

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LQ16H040003);浙江省人口计划生育科研项目(2014KYB340);温州市科技计划项目(Y20140728)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院生殖中心

通信作者:倪吴花, E-mail:niwuhua228@163.com

无精子症及其他因素在本中心接受 IVF/ICSI-ET 助孕治疗的患者。所有入选周期排除了女性子宫因素(如子宫肌瘤、子宫内膜异位症等)及其他疾病因素(如卵巢储备功能下降、染色体臂间倒位、多囊卵巢综合征等)。根据使用的培养液不同,IVF-ET 周期分为 Cook 组 456 例和 Vitrolife 组 437 例,ICSI-ET 周期分为 Cook 组 143 例和 Vitrolife 组 177 例。

1.2 方法

1.2.1 超排卵方案 采用黄体期长方案和短方案进行^[5]。

1.2.1.1 黄体期长方案 即促性腺激素(Gn)治疗周期的前一个月经周期的黄体中期肌肉注射 0.5~0.9mg 促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂(醋酸曲普瑞林针,3.75mg/支,法国益普生制药公司),14d 后达到降调标准,即子宫内膜 $\leq 5\text{mm}$ 或血清雌二醇(E_2) $\leq 50\text{pg/L}$,血清黄体生成激素(LH)水平 $\leq 5\text{mIU/ml}$,开始使用促性腺激素针(基因重组卵泡刺激素,75IU/支,瑞士雪兰诺公司)。

1.2.1.2 短方案 于月经周期第 2 天开始,皮下注射短效 GnRH 激动剂 0.1mg/d(醋酸曲普瑞林针,0.1mg/支,瑞士辉瑞制药有限公司),从月经第 3 天开始使用促性腺激素 Gn 针(基因重组卵泡刺激素,75IU/支,瑞士雪兰诺公司)。

上述两种方案,用 Gn 150U/d 或 225U/d 连续 5d 后,根据卵泡生长和血清 E_2 水平调整用量,当 B 超监测到至少 3 个优势卵泡直径 $\geq 17\text{mm}$ 时,当晚肌肉注射重组人绒毛膜促性腺素 250 μg (250 μg /支,瑞士雪兰诺公司),34~36h 后取卵。

1.2.2 精液处理 精液液化后,行 IVF 的精液经非连续密度梯度离心法处理后,在 G-IVF Plus(Vitrolife 组)或 K-SIFM(Cook 组)受精液中上游 1h 后备用;行 ICSI 的精液经 G-MOPS Plus(Vitrolife 组)或 K-SIGB(Cook 组)直接离心后备用。受精前按照 WHO 标准^[6],分别检测精液的量、浓度和活动率。

1.2.3 IVF/ICSI 取卵后,根据临床指征行 IVF 或 ICSI。IVF 受精:分别将卵子和精子加入到 G-IVF Plus(Vitrolife 组)或 K-SIFM(Cook 组)培养液滴中进行受精。ICSI 受精:卵子经过透明质酸酶(100IU/ml,美国 Sigma 公司)剥除颗粒细胞后,转移至 G-MOPS Plus(Vitrolife 组)或 K-SIGB(Cook 组)培养液滴中行 ICSI。受精后 16~18h,胚胎转移至 G1 Plus(Vitrolife 组)或 K-SICM(Cook 组)培养液中培养,显微镜下观察受精情况,见到双原核和双极体为正常受精。

1.2.4 胚胎质量评估 成功受精胚胎体外培养至第 3 天,根据本中心临床操作实际经验,对胚胎进行评分。优质胚胎评价标准^[7]为:正常受精发育而来的胚胎,卵裂球数目 7~9 个,碎片 $\leq 15\%$,卵裂球无明显大小差异,定义为 I 级胚胎;可移植胚胎的标准为:卵母细胞正常受精后第 3 天形成 4 细胞 II 级以上的胚胎。其余胚胎继续培养至囊胚期,行冷冻保存。

1.2.5 胚胎移植和妊娠检查 选择评分最高的 2~3 枚胚胎进行移植,剩余胚胎进行囊胚培养,以移植后 4 周阴道 B 超下出现孕囊和胎心为临床妊娠^[8]。

1.2.6 观察指标 患者一般情况(年龄、不孕年限、BMI、原发不孕率),获卵个数,正常受精率,卵裂率,第 3 天优质胚胎率,ET 个数,种植率,妊娠率等。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较 IVF-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组年龄、不孕年限、BMI 和原发不孕率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。ICSI-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组年龄、不孕年限、BMI 和原发不孕率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2。

表 1 IVF-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组一般资料比较

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	不孕年限 (年)	BMI (kg/m^2)	原发不孕率 [<i>n</i> (%)]
Cook 组	456	31.4(28.6,34.6)	3(2,5)	21.1(19.2,23.0)	140(30.7)
Vitrolife 组	437	31.5(28.6,35.3)	3(2,5)	21.0(19.6,22.8)	133(30.4)
Z/χ^2 值		1.11	-0.88	0.24	0.01
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 2 ICSI-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组一般资料比较

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	不孕年限 (年)	BMI (kg/m^2)	原发不孕率 [<i>n</i> (%)]
Cook 组	143	30.5(27.5,34.8)	4(2,6)	20.8(19.5,23.0)	70(49.0)
Vitrolife 组	177	31.5(28.5,35.4)	4(3,7)	20.8(19.0,22.7)	94(53.1)
Z/χ^2 值		-1.40	-0.76	0.89	0.55
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 IVF-ET 周期中 Cook 与 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响 IVF-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组获卵个数、正常受精率、卵裂率、ET 个数、种植率、妊娠率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),

但 Vitrolife 组第 3 天优质胚胎率明显高于 Cook 组,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 3。

表 3 IVF-ET 周期中 Cook 与 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响

组别	<i>n</i>	获卵个数	正常受精率(%)	卵裂率(%)	第 3 天优质胚胎率(%)	ET 个数	种植率(%)	妊娠率[n(%)]
Cook 组	456	11(8,14)	65.9(3363/5104)	97.1(3264/3363)	33.8(1104/3264)	2(2,3)	30.3(308/1017)	222(48.7)
Vitrolife 组	437	10(7,14)	66.4(3077/4633)	97.8(3010/3077)	36.9(1112/3010)	2(2,3)	33.3(327/983)	224(51.3)
Z/χ ² 值		-1.78	0.30	3.76	6.67	0.60	2.05	0.59
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05

2.3 ICSI-ET 周期中 Cook 与 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响 ICSI-ET 周期中 Cook 组和 Vitrolife 组获卵个数、正常受精率、卵裂率、ET 个数、种

植率、妊娠率比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但 Vitrolife 组第 3 天优质胚胎率明显高于 Cook 组,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 4。

表 4 ICSI-ET 周期中 Cook 与 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响

组别	<i>n</i>	获卵个数	正常受精率(%)	卵裂率(%)	第 3 天优质胚胎率(%)	ET 个数	种植率(%)	妊娠率[n(%)]
Cook 组	143	11(7,14)	68.8(927/1603)	97.2(901/927)	29.9(269/901)	2(2,3)	29.4(95/323)	71(49.7)
Vitrolife 组	177	10(6,14)	70.4(1031/1836)	97.7(1007/1031)	37.9(382/1007)	2(2,3)	33.5(130/388)	93(52.5)
Z/χ ² 值		1.49	0.98	0.45	13.81	0.95	1.37	0.26
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

本研究比较了 Cook 培养液和 Vitrolife 培养液对胚胎体外发育和临床结局的影响,结果证实无论是 IVF-ET 周期还是 ICSI-ET 周期, Cook 组和 Vitrolife 组获卵个数、正常受精率、卵裂率、ET 个数、种植率、妊娠率比较差异均无统计学意义,但 Vitrolife 组第 3 天优质胚胎率均明显高于 Cook 组,差异均有统计学意义。

对于哪种商品化培养液更加有利于胚胎体外发育,学术界至今仍有争议。近年来,一些研究开始探讨不同培养液对体外受精临床结果的影响。Mauri 等^[9]比较了 P1 培养液和 IVF-50 培养液对 ICSI 周期胚胎发育以及临床结局的影响,发现两者之间受精率、卵裂率、种植率、临床妊娠率比较差异均无统计学意义。Ben-Yosef 等^[10]比较了 Cook 培养液和 P1 培养液,发现两者之间受精率、形态学评分比较差异均无统计学意义,但 P1 组临床妊娠率和种植率要优于 Cook 组。而 Zollner 等^[11]分析比较了 Vitrolife 培养液和 MediCult 培养液,发现两者之间受精率、卵裂率、种植率、临床妊娠率比较差异均无统计学意义,这与本研究结果类似。蒋益群等^[12]分析比较了 Vitrolife 培养液和 Cook 培养液,认为两者对妊娠结局并无明显影响,但 Cook 培养液可能更有利于囊胚阶段的发育。Wunder 等^[13]研究比较了 Vitrolife 培养液和 Cook 培养液,认为两种培养液在初生儿体重影响上无差异。

目前,笔者尚不清楚为何 Vitrolife 组第 3 天优质胚

胎率要明显高于 Cook 组。笔者推测这可能是由于两组培养液组成成分不一样,因而造成胚胎发育差异。Cook 培养液与 Vitrolife 培养液大部分成分比较相似,但部分成分存在差异,其中两者之间乳酸浓度以及乳酸:丙酮酸比值存在很大差别。Vitrolife 培养液中乳酸盐浓度为 10.8mM,高于 Cook 培养液的 1.8mM; Vitrolife 培养液中乳酸:丙酮酸比值为 36,高于 Cook 培养液的 5^[3]。乳酸和丙酮酸均可作为早期胚胎发育的能量物质,不同的是丙酮酸可以直接进入柠檬酸循环,而乳酸必须先通过乳酸脱氢酶作用转化为丙酮酸方可进入柠檬酸循环^[14]。乳酸转化为丙酮酸的过程中会涉及氧化态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的消耗以及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的产生。而 NAD⁺和 NADH 在维持细胞内代谢和氧化还原状态方面起着重要作用^[15-16],因此不仅仅是乳酸和丙酮酸的浓度影响胚胎的发育,乳酸:丙酮酸比值同样影响胚胎的潜能。鼠胚研究证实细胞内的高乳酸:丙酮酸比值会降低丙酮酸在细胞内的氧化作用^[17],进而造成细胞内氧浓度不同。而氧浓度不同则会造成丙酮酸吸收的差异^[18],最终又会影响胚胎体外发育。此外, Cook 培养液与 Vitrolife 培养液中存在其他成分差异: Vitrolife 培养液中添加了 0.08mm 的柠檬酸盐,对应 Cook 培养液则为 0; Cook 培养液中添加了 81μm 的天冬氨酸盐,对应 Vitrolife 培养液为 0^[3]。培养液中这些成分差异,很可能通过影响胚胎在培养液中代谢,最终导致胚胎发育的差异。

虽然 Vitrolife 组第 3 天优质胚胎率明显高于 Cook 组,但两种培养液对种植率和妊娠率均没有影响。笔者认为可能由以下原因造成:首先,ET 时只挑选 2~3 枚胚胎移植,虽然 Cook 组第 3 天优质胚胎率低于 Vitrolife 组,但仍旧可以提供足够优质胚胎进行移植;其次,有文献报道第 3 天形态学评分并不能完全反映胚胎的种植潜能^[19]。

本研究显示 Vitrolife 组第 3 天优质胚胎率明显高于 Cook 组,但两种培养液对种植率和妊娠率均没有影响。因此,暂时很难下结论 Vitrolife 培养液是否优于 Cook 培养液。下一步研究笔者考虑扩大样本量以及延长培养时至第 6 天,比较两组囊胚形成率是否存在差异,同时进行随访分析比较两组出生胎儿的体重、性别比例等指标是否有统计学差异。这将有助于进一步了解和比较 Cook 培养液和 Vitrolife 培养液对胚胎体外培养的影响。

4 参考文献

- [1] Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies[J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(1):27-29. DOI:10.1016/j.fertnstert.2003.10.003.
- [2] Quinn P. Culture systems: sequential[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 912:211-230. DOI: 10.1007/978-1-61779-971-6_13.
- [3] Morbeck DE, Krisner RL, Herrick JR, et al. Composition of commercial media used for human embryo culture[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(3):759-766.e9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.05.043.
- [4] Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, et al. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review e[J]. *Hum Reprod Update*, 2013, 19(3):210-220. DOI: 10.1093/humupd/dms061.
- [5] Jin J, Pan C, Fei Q, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(4):910-916. DOI:10.1080/09513590.2018.1500535.
- [6] 世界卫生组织.WHO 人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M]. 5 版.北京:人民卫生出版社,2011:11-33.
- [7] 郑屹,张欢,林佳,等.两侧卵巢获卵数差异率与体外受精-胚胎移植结局的关系[J]. *生殖医学杂志*, 2015, 24(1):26-31. DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2015.01.006.
- [8] 徐芝慧,潘承双.体外受精-胚胎移植术后宫内外复合妊娠临床分析[J]. *浙江医学*, 2017, 39(24):2222-2224. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.24.2017-1062.
- [9] Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, et al. A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2001, 18(7):378-381. DOI: 10.1023/A:1016670422408.
- [10] Ben-Yosef D, Amit A, Azem F, et al. Prospective randomized comparison of two embryo culture systems: P1 medium by Irvine Scientific and the Cook IVF Medium[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2004, 21(8):291-295. DOI: 10.1023/b:jarg.0000043702.35570.56.
- [11] Zollner KP, Zollner U, Schneider M, et al. Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial[J]. *Med Sci Monit*, 2004, 10(1):CR1-7.
- [12] 蒋益群,王珊珊,徐志鹏,等.商品化培养液对人类胚胎发育及妊娠结局的影响[J]. *妇幼医学*, 2016, 13(26):72-75.
- [13] Wunder D, Ballabeni P, Roth-Kleiner M, et al. Effect of embryo culture media on birthweight and length in singleton term infants after IVF-ICSI[J]. *Swiss Med Wkly*, 2014, 144:w14038. DOI:10.4414/sm.w.2014.14038.
- [14] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(4):847-856. DOI:10.1095/biolreprod62.4.847.
- [15] Dumollard R, Ward Z, Carroll J, Duchon MR. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo[J]. *Development*, 2007, 134(3):455-465. DOI:10.1242/dev.02744.
- [16] Dumollard R, Carroll J, Duchon MR, et al. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20(3):346-353. DOI:10.1016/j.semcdb.2008.12.013.
- [17] Lane M, Gardner DK. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(1):16-22. DOI:10.1095/biolreprod62.1.16.
- [18] Wale PL, Gardner DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(1):24, 1-8. DOI:10.1095/biolreprod.112.100552.
- [19] Rijnders PM, Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(10):2869-2873. DOI:10.1093/humrep/13.10.2869.

(收稿日期:2018-04-08)

(本文编辑:陈丽)

(上接第 1036 页)

- [9] 胡超力,王芬,周英杰,等.不同镇痛方式对腹腔镜结直肠癌根治术后早期细胞免疫功能的影响[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2016, 37(5):54-57.
- [10] 谭文斐,任宏伟,金凤,等.腹横肌平面阻滞对患者外周血 Th1 / Th2 比值的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2016, 45(10):898-904.
- [11] Tsui BCH, Fonseca A, Munshey F, et al. The erector spinae plane

(ESP) block: A pooled review of 242 cases[J]. *J Clin Anesth*, 2018, 53:29-34.

- [12] Bar-Yosef S, Melamed R, Page GG, et al. Attenuation of the tumor-promoting effect of surgery by spinal blockade in rats[J]. *Anesthesiology*, 2001, 94(6):1066-1073.

(收稿日期:2019-01-08)

(本文编辑:严玮雯)