

# 体外受精胚胎移植中异常受精的原因分析

王丽<sup>1</sup>, 赵杰<sup>2</sup>, 刘芳<sup>2</sup>, 陈秀娟<sup>2</sup>

(1. 内蒙古医科大学 内蒙古 呼和浩特 010059;

2. 内蒙古医科大学附属医院 生殖医学中心)

**摘要:** 体外受精-胚胎移植技术(IVF-ET)是治疗不孕不育问题的重要手段之一。1978年世界上第一例试管婴儿自英国诞生以来,已有成千上万的不孕不育夫妇通过这项技术获得了后代。近年来促排卵技术、配子的体外受精技术、胚胎的体外培养技术不断得到改善,但目前仍有许多夫妇因为各种原因导致不能受孕,受精失败就是原因之一。有文献指出:夫妇双方在排除男性不育的因素之后,VF-ET的受精失败率仍然在2%~3%。受精失败的模式包括:卵子完全不受精及卵子的异常受精。临床上卵子完全不受精或受精率低时,可以通过卵胞浆内单精子显微注射进行挽救,但卵子异常受精情况的发生目前还无法进行挽救。这导致卵子的利用率低下,增加了病人的经济与精神负担。因此,如何预防和降低异常受精的发生将成为改善IVF-ET总体结局的重要环节,本文拟将体外受精过程中出现的可能影响受精结局的问题进行逐一探讨。

**关键词:** 体外受精-胚胎移植技术;胚胎异常受精

中图分类号:R3

文献标识码:A

文章编号:1673-9388(2020)02-0237-07

## ANALYSIS OF THE CAUSES OF ABNORMAL HUMAN FERTILIZATION IN CONVENTIONAL IN VITRO FERTILIZATION CYCLES

WANG Li, ZHAO Jie, LIU Fang, et al.

(Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059 China)

**Abstract:** At present, in vitro fertilization and embryo transfer is one of the important means to treat infertility. Since the birth of the world's first test-tube baby in Britain in 1978, thousands of infertile couples have obtained offsprings through this technique. With the use of this technology, the techniques of ovulation induction, in vitro fertilization of gametes and in vitro culture of embryos have been continuously improved, but there are still many couples who cannot conceive due to various reasons. Fertilization failure is one of the reasons. It has been pointed out that the failure rate of traditional IVF-ET fertilization is 2%~3%, excluding male infertility. Fertilization failures include complete non-fertilization of the egg and abnormal fertilization of the egg. When the egg is completely unfertilized or the fertilization rate is low, it can be saved by intracytoplasmic sperm injection. But the occurrence of abnormal fertilization can not be saved. This situation not only leads to low utilization of eggs, but also increases the economic and mental burden of patients. Therefore, how to prevent and reduce the occurrence of abnormal fertilization will become an important link to improve the overall outcome of IVF-ET. In this paper, the problems that may affect the outcome of in vitro fertilization will be discussed one by one.

**Key words:** in vitro fertilization; abnormal fertilization

收稿日期: 2020-03-10; 修回日期: 2020-05-18

作者简介: 王丽(1990-),女,内蒙古医科大学2017级在读硕士研究生。

通讯作者: 陈秀娟,主任医师,E-mail:90098687@sina.com 内蒙古医科大学附属医院生殖医学中心,010050

卵母细胞体外受精是IVF-ET中至关重要的一环。正常情况下卵母细胞与精子结合的17~20h后,在显微镜下可以观察到2个原核(2PN)的受精结构,这种合子是在经过体外培养后可以移植的正常胚胎。但在体外受精过程往往能够观察到大量异常受精的情况,包括:单原核(少于2个原核)和多原核(3个及3以上原核)。异常受精胚胎往往不能进行移植,尤其是多原核的胚胎,需要直接丢弃,这造成卵子的浪费。

受精过程包括:精子识别并结合到卵丘细胞-卵母细胞复合体上,精子穿过透明带,精子细胞核的解聚、重塑,皮质反应,卵母细胞激活并恢复减数分裂以及2PN的形成。受精时2PN的形成不仅是受精过程中非常重要的步骤,也是判断受精成功与否的标准。IVF-ET过程中常有异常受精情况的出现,胚胎异常受精会降低卵母细胞的可利用率以及可移植胚胎率,导致卵母细胞的浪费,而胚胎能否正常受精也直接影响周期结局。如何提高IVF-ET周期中卵母细胞的利用率、改善不孕不育症患者体外受精结局,仍然是辅助生殖技术领域重要的研究课题之一。

## 1 正常受精过程

受精以前,卵母细胞的发育停滞在第二次减数分裂中期。这一过程由成熟促进因子(MPF)和细

胞静上因子(CSF)共同维持。卵母细胞在受到在精子或其他理化因素的刺激之后才可恢复并完成减数分裂,实现卵母细胞的激活<sup>[1,2]</sup>。在自然受精时,精子首先到达卵母细胞周边,精子的头部与卵子周围的放射冠进行初步的接触,其表面的细胞膜与顶体前膜互相融合之后形成一个又一个的泡状结构,这种泡状结构在从精子头部分离之后释放出顶体内含有的多种酶类(如:透明质酸酶使精子穿透卵丘,放射冠穿透酶使精子穿透放射冠)。这些酶可以溶蚀卵子周边的组织结构,较活跃的一部分精子即可通过其表面的糖蛋白受体与透明带糖蛋白3(ZP3)相结合,随后顶体蛋白酶和N-酰胺酶作用于卵母细胞透明带,打通一条可供精子通过的生物孔道。此时在卵膜外层胞质内的大量皮质颗粒释放其内容物,通过诱发透明带中ZP3糖蛋白分子的变化使透明带变质,不再具有接受精子穿过的功能,阻断了透明带以外的精子穿入。正在穿过透明带的精子则被固定在透明带以内,这一过程即为皮质反应,可以防止多精受精的发生<sup>[3]</sup>。进入卵细胞内的精子尾部脱落,原有的DNA合成浓缩后形成新的染色体,最终形成只有半数染色体的雄原核。卵母细胞被激活之后卵子的细胞核膨大,最终形成也只有半数染色体的雌原核。两个原核在生成之后,逐渐移向细胞的中央并靠拢在一起,相互融合,二者的染色体相混合,最终形成二倍体的受精卵,受精过程就此结束。

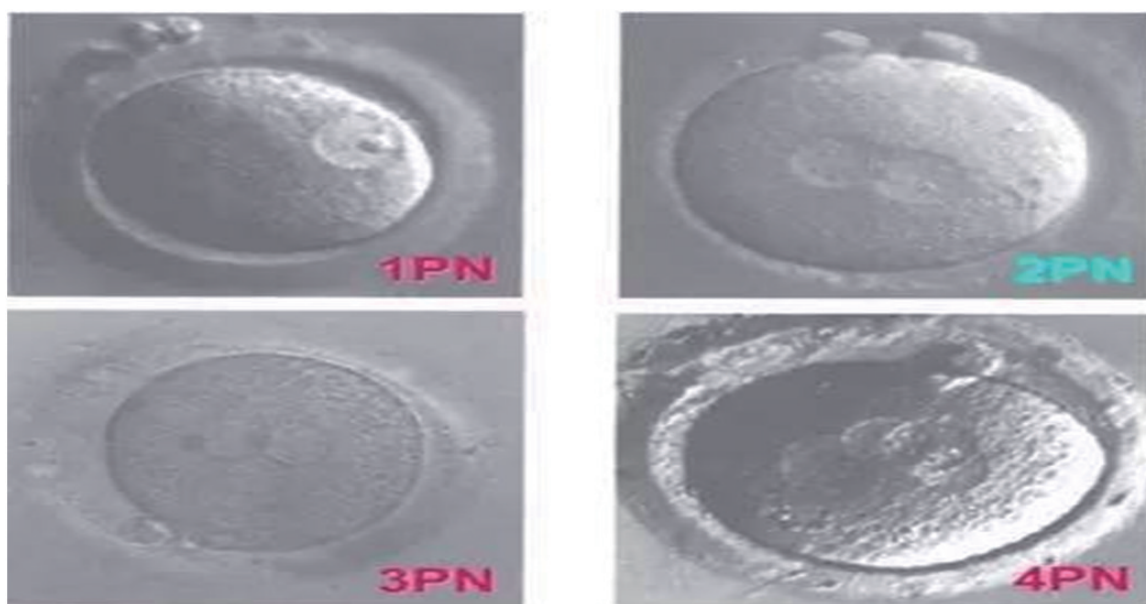


图1 正常受精与异常受精

Fig1. Normal fertilization and abnormal fertilization

## 2 异常受精情况及其原因

在IVF-ET过程中较常出现的异常受精模式(见图1)有以下几种:单原核合子(1PN),多原核合子( $\geq 3$ PN),出现1PN受精的几种可能机制为:(1)孤雌激活;(2)雄原核(male pronucleus,mPN)与雌原核(female pronucleus,PN)合并;(3)PN不在同一阶段生成<sup>[4,5]</sup>。外受精过程中出现3PN或者更多PN受精卵可考虑以下四种模式:(1)IVF中的多个精子同期受精以及ICSI过程中选择二倍体精子进行体外受精的培养(ICSI中这种情况极少见);(2)卵母细胞减数分裂时第二极体未排出;(3)体体受精过程中选择了二倍体卵母细胞进行体外受精的培养;(4)原核碎裂<sup>[6-9]</sup>。

体外受精的过程是一个高度复杂的程序,受到多种信号分子的错综复杂的调控。这种复杂的细胞、分子间相互作用使得受精过程非常容易受到外部或者内部各种因素的影响。每一个阶段分子表达的差异都有可能影响到受精的结局,只有对配子发育过程及受精的机制有了一定的了解,才能系统地探讨导致异常受精结局出现的原因。卵母细胞和精子的结合是受精过程的中心事件,它包括分子识别、各种膜的结合以及融合<sup>[10,11]</sup>。现根据上述常见异常受精模式的分类,按照受精过程的先后步骤逐一分析出现异常受精可能的原因。

### 2.1 精子穿透卵丘-卵母细胞复合体困难

围绕卵母细胞的卵丘细胞与卵子紧密结合,共同构成卵丘细胞-卵母细胞复合体。卵母细胞和卵丘细胞通过细胞间的缝隙连接进行物质交换和信息传递。卵母细胞存在多种细胞调节方式:机体内分泌的调节、自分泌调节系统和旁分泌模式,并通过这些调节方式来维持女性的生育潜力<sup>[12]</sup>。无论是哪种调节方式,作为与卵母细胞紧密连接的卵丘细胞,它的各种活动均影响到卵母细胞的状态。所以卵母细胞与卵丘细胞之间功能的协调统一对细胞成熟及发育至关重要,如卵丘细胞与卵母细胞之间缺乏协调就会导致卵母细胞发育能力低下,引起异常受精的相关问题<sup>[13,14]</sup>。

**2.1.1 COC成熟障碍** COC的成熟可以受促性腺激素的局部调节(内分泌调节),促性腺激素可以促进卵丘细胞和卵母细胞成熟,但人体内可以与促性腺激素结合的受体数量是一定的。那么,促性腺激素是如何实现全面的细胞调控?有研究认为:促性腺激素可以通过间接的作用对COC的成熟产生影

响。在卵母细胞成熟的过程中,促性腺激素可能先作用于特定的颗粒细胞释放因子,之后再以旁分泌的方式向COC传播黄体生成素(LH)促成成熟的效应达到最终的调节目的。

卵丘细胞对卵母细胞及COC的成熟有重要作用,有研究指出卵丘细胞中的PI3K/AKT信号通路和MAPK信号通路在调节类固醇激素的生成过程中发挥作用:促性腺激素和IGF-1因子可以通过调控PI3K/AKT信号通路和MAPK信号通路中类固醇生成相关基因的表达进而调控类固醇激素生成,最终实现对卵母细胞成熟及受精的调控<sup>[15-17]</sup>。卵丘细胞可以分泌的类表皮生长因子(EGF),EGF可能通过特定的方式介导人类卵母细胞成熟过程中的LH信号从而促进COC成熟。一项动物实验发现用促黄体生成素刺激小鼠排卵前卵泡后,壁层颗粒细胞可以产生和释放EGF家族成员调节素和表皮调节素。EGF在激素的生成过程中有重要作用,有实验发现EGF家族成员调节素在接受体外受精的患者的卵泡液中大量表达<sup>[18]</sup>,由此可见LH可能会刺激排卵前卵泡壁层颗粒细胞合成EGF家族成员调节素和表皮调节素,并借此影响COC的成熟<sup>[19]</sup>。

**2.1.2 卵丘细胞扩张障碍** 有研究表明EGFR信号通路既可以促进卵母细胞的发育和成熟,也可调控卵丘扩张所需的蛋白质的合成过程(卵丘扩张所需的蛋白质有:前列腺素过氧化物合成酶2、透明质酸合成酶2、五肽3和肿瘤坏死因子刺激基因6蛋白<sup>[20]</sup>。蛋白激酶A是EGF样因子发挥作用的重要元件,EGF调控卵丘细胞中透明质酸合成酶2、五肽3等转录产物,使其表达增加,这一步调控卵丘的扩张<sup>[21,22]</sup>。

**2.1.3 精子膜功能异常** 精子在获能以及与卵丘细胞结合的过程中需要一系列的酶及相关活性物质的辅助。肝素对精子膜结构的稳定及流动性的维持有重要作用,有研究表明小鼠同系物PDC-109蛋白可能通过与肝素的结合,参与调控精子膜的结构<sup>[23]</sup>。精子膜表面的透明质酸酶促进精子与卵丘细胞结合,有实验指出如果来自男性生殖道的透明质酸酶含量较少或精子未能达到超活力状态,就有可能导致精子穿透COC失败。

### 2.2 精子穿过透明带障碍

哺乳动物中包绕卵母细胞的透明带既可以保护卵子,也在卵母细胞成熟、受精和胚胎植入前发挥重要作用,同时透明带还提供精子识别卵子的受体信号,即透明带糖蛋白(ZP)。人类的ZP普遍分



四种型别:ZP1、ZP2、ZP3和ZP4。透明带蛋白的生物合成随卵母细胞成熟逐渐进行的,在MII阶段透明带发育停止,卵丘细胞在卵母细胞成熟的过程中扮演重要的角色,只有成熟和完全成熟的卵母细胞上才有透明带。

**2.2.1 ZP结构异常** 透明带糖蛋白是精子用于识别的关键物质,而调控ZP产生的信号通路受到卵子成熟的影响。有研究发现ZP的结构(糖结合物的分布、密度以及位置)在卵子成熟的过程中会发生一些改变。一些外源促性腺激素也会影响ZP的结构与功能,例如结构异常的ZP3会导致到精子诱发顶体反应失败,影响到精子与透明带的结合。另外ZP的多糖氧化作用可能会引起精子结合数量的下降,影响最终的受精结果。

**2.2.2 精子与ZP结合障碍** 精子在通过穿过卵丘细胞之后启动与ZP的结合程序,逐步与卵母细胞膜融合。透明带有供精子识别的受体信息,这使精子头部的糖蛋白分子受体可以与透明带特定部位结合产生生物学功能。ZP与精子的结合类型有蛋白-蛋白结合型、碳水化合物-蛋白结合型,另外还有一些目前尚未知的结合类型需要进一步研究。不同结合方式介导的信号通路不一致,蛋白酶和N-酰胺酶的作用可以使透明带形成供精子进入卵母细胞的通道。现有的观点认为精子与透明带ZP3结合之后引发顶体反应,裸露在外面的精子顶体内膜可以与透明带ZP2结合,实现透明带的穿透。也有研究认为精子可能通过与ZP2结合促使皮质颗粒释放蛋白酶水解ZP2,破坏其受体,防止了多精受精的发生。

**2.2.3 精子顶体结构异常** 精子的顶体是由精原干细胞的顶体颗粒产生的,并在精子发生的过程中逐渐移动到精子的头部前。精子的顶体内含有多种消化酶(包括透明质酸酶和顶体酶),并且它以帽状形态存在于精子头部上方。精子的顶体内的这些酶对COC和透明带的分解有重要作用。精子在与透明带的ZP3结合后即释放顶体内酶(丝氨酸蛋白酶、顶体酶等),随后精子与ZP2结合实现精子对透明带的穿越。临床上缺乏顶体结构的精子是无法发生顶体反应的,这类病人要想受精率达到正常水平,需要通过ICSI辅助受精。精子的顶体对受精过程有重要作用,研究表明精子顶体原始血管紧张素转化酶的缺乏会导致异常受精的发生甚至IVF受精失败。

细胞内钙离子的升高是精子发生顶体反应的

关键信号元件。细胞内游离钙离子可以对酶和蛋白质产生瞬间变构调节作用,并作为第二信使,保证信息在膜受体与传导效应分子之间的传递。细胞内钙离子信号传导需要多种细胞通道辅助。CatSper是一种仅位于精子尾部的表面睾丸特异的蛋白,且由4个亚基(CatSper 1、2、3、4)和5个附属亚基构成。CatSper 1、2、3、4可以形成孔道,这些亚基在哺乳动物中的编码至少由9个基因组成,其亚基的结构和分布保证正常的通道功能。遗传证据表明CatSper通道蛋白的功能对于男性生育有重要的影响:小鼠的CatSper基因敲除后,会表现出活力受损,导致精子穿透透明带失败。有实验指出在人类中CatSper基因的遗传损伤或基因表达谱发生改变会导致弱畸精症和男性不育。

### 2.3 精子与卵母细胞结合出现障碍

精子穿透ZP后进入到卵周间隙并与卵母细胞膜融合,其头部后端的细胞核进入到卵母细胞中。精子和卵母细胞的粘附作用是建立在其表面受体与配体对结合的基础之上,精子和卵母细胞表面受体与配体恰当的结合一方面促进细胞间粘附作用,另一方面可以使配子的膜弯曲成更紧密的对接状态。细胞结合的部位后发生构象的改变可导致融合孔的打开和扩张为精卵母细胞结合提供基础。

**2.3.1 卵母细胞发育和成熟** 异常卵母细胞的发育能力即卵母细胞受精并发育成健康胚胎的能力,这一能力与发育中卵母细胞的成熟程度有关。卵母细胞和卵丘细胞间存在紧密的缝隙连接,二者借此进行双向的信号传递。卵丘细胞在G蛋白偶联受体3和12激活后,通过内源性途径产生环磷酸腺苷(cAMP),cAMP再通过缝隙连接进入卵母细胞。cAMP是停在减数分裂状态的卵母细胞发育所需的重要物质,cAMP-磷酸二酯酶可以降解细胞内cAMP,而经过缝隙连接流入卵母细胞的环磷酸鸟苷(cGMP)则可以抑制细胞内cAMP-磷酸二酯酶的激活,维持卵母细胞能量供应。卵丘细胞对卵母细胞成熟的调控可能涉及多种细胞途径:其一,卵丘细胞内的PI3K/AKT通路和MAPK通路可能通过调控类激素的生成影响卵母细胞的成熟及受精;另外,卵丘细胞中P53信号通路可能影响卵母细胞成熟和受精,MDM2-P53-SF1通路对女性的生育起重要的作用,P53基因诱导对卵巢功能有不良影响,MDM2和SF1水平与卵母细胞成熟和受精的结局呈正相关;第三,卵丘细胞对肌动蛋白细胞骨架的调控影响可能卵母细胞成熟。肌动蛋白细胞骨架是

一种细胞内力产生的机制。这种力是产生细胞中心体、细胞核和纺锤体必不可少的,也是维持细胞迁移、细胞质的分裂以及细胞形状变化的重要细胞力。有一项模拟老化海星卵母细胞的实验表明:老化的卵母细胞在受精时会出现细胞内钙释放模式的改变以及肌动蛋白动力学的异常导致多精受精率增高,由此可以推测细胞内肌动蛋白细胞骨架的状态可能是确保单精子受精成功的卵母细胞质量的主要决定因素之一。

**2.3.2 精子顶体反应异常** 精子侵入卵丘并穿透ZP的基质后与卵膜进行物理接触,之后发生顶体反应使卵母细胞膜上暴露出一组新的表面抗原启动精子与卵膜的融合过程。精子顶体反应是许多动物受精成功的关键事件,它是由细胞内钙离子和cAMP介导的。顶体最初包裹在顶体内膜上,在受精时才发生顶体反应。动物Izumo基因在精子的顶体内膜上表达Izumo蛋白,发生顶体反应时Izumo从顶体帽扩散到精子头部的赤道部分与配子发生融合。这一过程TSSK6起到重要作用,TSSK6基因缺失的雄性小鼠往往出现Izumo的再分配错误,导致精卵融合异常。人类精子中虽发现有Izumo的表达,但很少有临床研究支持它与特发性不孕症的病因有关。

**2.3.3 卵膜结构异常** 卵母细胞表面存在一层突起状结构,精子在到达卵周隙后即附着在卵膜的这种突起结构上。卵母细胞表面的这层突起叫微绒毛,微绒毛间充满肌动蛋白,这极大地扩大了卵母细胞的接触面积,降低了精、卵并列的膜之间的排斥力。卵膜上存在一种特殊的蛋白--CD9,它对正常微绒毛形态和分布有重要作用。体外实验发现,用抗CD9单克隆抗体处理的实验组精子在与卵子结合过程中受到抑制,这就说明该表面蛋白参与配子间的相互作用;另外,CD9缺失的雌性小鼠繁殖力显著降低。一项评估细胞膜上的CD9与细胞间黏附表型关系的实验表明:CD9驱动细胞膜形成粘附位点,促进精卵融合发生所必需的紧密的精子与卵子的接触。目前CD9功能缺失影响受精的具体分子机制尚不清楚。许多动物实验表明精子在与卵膜结合时需要一个优先进入点,例如:在小鼠、大鼠和仓鼠的卵子中,精子不与无微绒毛的卵母细胞皮质区融合。但有实验观察到人的精子与卵母细胞部位似乎与卵母细胞表面微绒毛结构的分布关系不大,这表明在人类中精子与卵膜结合可以发生在卵子表面的任何地方。也有观点认为人

类卵子表面存在一种可以促进精子的粘附的结构--质膜微域,这种结构有利于精卵融合,目前这一观点研究较热。

人卵膜上还有一种基因的表达可能与受精失败相关--Juno。有实验证明Juno编码基因基因序列变异的发生率与不明原因的受精失败有关。对未受精的MII卵和体外成熟的人卵母细胞的蛋白质表达分析表明,在人卵母细胞成熟的过程中Juno在卵膜上积累。卵膜表面某些跨膜蛋白和周围蛋白生成的多分子复合物可能也会对精子与卵膜的结合与融合产生影响,有研究指出GPI的敲除会引起不孕及精子结合数量的下降。卵膜作为一个整体,其介导调控的基因表达可能存在协同作用。有研究指出Izumo和Juno通过结合诱导CD9在细胞表面接触区的积累,促进CD9介导的参与可能的融合机制组装的膜蛋白的聚集。

## 2.4 卵母细胞激活障碍

哺乳动物成熟卵母细胞停滞在第二次减数分裂中期,这一过程由成熟促进因子(MPF)和细胞静上E因子(CSF)维持,只有在精子或某些理化因素的刺激下,卵母细胞才能恢复并完成减数分裂,这一过程称为卵母细胞激活。卵母细胞激活的过程涉及的事件主要有:钙离子震荡,皮质反应,第二极体的排出,2PN形成。周期中如出现第二极体排出和2PN形成则视作卵母细胞激活成功,这也是正常受精的标志。卵母细胞激活标志着从配子到胚胎的转变。

**2.4.1 细胞钙离子振荡受阻** 卵细胞内的钙离子振荡是位于细胞内钙库上的三磷酸肌醇(IP3)受体/钙离子释放通道(IP3R)释放钙离子的结果。精子特异性磷脂酶C zeta 9是一种哺乳动物精子激活因子,它通过水解4,5-二磷酸磷脂酰酯产生磷脂酰磷脂酶3,磷脂酰磷脂酶3产生后即与其受体结合诱导细胞内的钙离子的释放。有实验表明精子特异性磷脂酶C zeta表达显著降低的转基因小鼠的精子在体外受精后表现出钙振荡的提前终止。有学者认为受精卵中的基础胞浆钙离子可以刺激精子特异性磷脂酶C zeta产生足够数量的IP3来触发钙的初始释放,但这一点还没有得到实验证实。

一项体外受精卵子的钙成像实验表明卵母细胞第一波钙振荡始于精子进入,这种信号以放射波的形式向卵母细胞的另一端扩散。向胞质中注射精子提取物会引起特征性的钙振荡,这一发现暗示卵子激活是由受精精子传递的可溶性因子触发



的。卵母细胞激活因子就是精子携带的一种可溶性因子,假设精子核周的膜释放可溶性因子,那么随着精子核的解聚核膜就会发生溶解。可溶性因子扩散到卵浆中并通过内质网储存的卵母细胞协同释放钙离子,触发卵母细胞激活的信号级联反应。通过对各种可以诱导钙离子电位升高和引发卵母细胞激活的精子蛋白能力的评估,可以预测卵母细胞激活的发生。人类受精过程 $\text{Ca}^{2+}$ 释放值的图形轮廓似乎与胚胎发育能力也有关。睾丸特异的磷脂酶C亚型是负责在哺乳动物中产生钙振荡和触发胚胎发生的变态因子,也是一种特殊的可溶性因子。胞浆精子特异性磷脂酶C zeta在精子进入卵细胞时被引入到卵母细胞内引起卵浆中一系列 $\text{Ca}^{2+}$ 释放的特征模式,这说明卵子的激活的启动除了精子,还可以通过显微注射小鼠/人精子特异性磷脂酶C zeta来实现。实验指出精子特异性磷脂酶C zeta可以诱导类受精的钙离子信号,并可能触发胚胎的孤雌激活。精子特异性磷脂酶C zeta表达受损会导致卵子中诱导钙离子振荡的能力降低或缺失。累积的临床数据还表明精子特异性磷脂酶C zeta缺乏症与男性和特发性不育有关。近期一项用缺乏ECS基因的小鼠为模型的实验说明:在敲除ECS基因的小鼠精卵融合体中,精子特异性磷脂酶C zeta1的表达正常,但第一个钙振荡峰的启动明显延迟。此实验指出ECS抑制了年龄依赖性的男性不育症,但未明确指出ECS基因是否会影响人卵母细胞的激活。

**2.4.2 皮质反应异常** 精子与透明带结合后卵母细胞激活。卵膜外层胞质内的大量皮质颗粒通过胞吐释放其内的物质,诱发透明带中ZP3糖蛋白分子的变化使透明带变质,卵子不再具有接受精子穿过的功能,阻断了透明带以外的精子穿入,正在穿过透明带的精子则被固定在透明带以内。这一过程即为皮质反应<sup>[9]</sup>,如果这一过程异常就会导致多精受精的发生。

## 2.5 原核形成异常

受精后母源和父源的染色体通过各自原核的形成独立进行复制,但是染色质重组发生在同一个细胞质中。这使两个配子暴露在相同的细胞调控因子下,二者的形成过程可能相互影响。卵子激活后精子在卵胞浆内进行修饰及原核生成。精子解、凝聚后生成原核的主要步骤如下:(1)精子核膜消失;(2)核纤层蛋白的重组;(3)染色质发生解、凝聚。受精时男性配子进入到卵母细胞发生精子染

色质的重塑,这一重塑过程为原核的形成做准备。精子DNA在精子进入到卵母细胞后迅速调控鱼精蛋白的释放,卵母细胞内的组蛋白代替精子内的鱼精蛋白生成一种形态较松散的结构,引发规则核小体的从头组装。卵母细胞的成熟程度决定其对精子进行解凝聚的能力。卵母细胞在成熟的过程中谷胱甘肽(GSH)的含量逐渐增多,这是精子解凝聚和雄原核形成的重要物质。GSH使精子染色质去浓缩、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活性增高,促使雄性原核生成<sup>[24]</sup>。

临床上精子染色体过早地出现凝聚会导致受精的失败,这有可能是由于卵子激活不完全导致的。解凝聚后的精子与其周募集的r-微管蛋白一起形成一种叫做精子星体的结构。精子星体染色质的四周被有核纤层蛋白的核膜所包被,形成mPN和fPN,二者可能同时形成或mPN早于fPN形成。fPN最早形成于第二极体附近,随后体积逐渐变大在微管动力蛋白的作用下沿着微管向mPN移动,最终两个原核并列在一起。卵母细胞形成原核障碍的原因可能是卵母细胞骨架异常或核膜组装的障碍,目前尚乏有效的解决方法,这部分患者必要时可以考虑采用供卵IVF。

## 2.6 环境对受精的影响

异常受精除了精子因素和卵丘、卵母细胞方面的问题之外,一些环境因素也可能与其相关。体外受精的实验室操作包括:卵母细胞取出及体外培养,精子处理<sup>[25]</sup>。卵母细胞的采集、体外培养基种类以及培养温度、精子的洗涤,机械拆除卵丘细胞的手法等都可能对受精的结局产生影响。所以,不断优化体外受精操作程序,降低外因对配子及胚胎的影响是胚胎学家工作的重点之一。

## 3 总结

IVF-ET过程中常有异常受精出现,胚胎异常受精会降低卵母细胞的可利用率,导致卵母细胞的浪费,而胚胎是否正常受精也直接影响周期结局。本文从精子和卵母细胞方面分别分析了体外受精过程中可能影响受精结局的因素,我们发现卵丘细胞对卵母细胞的成熟以及受精的过程中发挥重要作用。这为我们下一步的研究提供了思路。

## 参考文献

[1]Zhu J,Jiang H,He R-B et al. Association between etiologic

- factors in infertile couples and fertilization failure in conventional in vitro fertilization cycles.[J]. *Andrology*, 2015; 3: 717–22
- [2] Eliyahu Efrat, Talmor–Cohen Anat, Shalgi Ruth, Signaling through protein kinases during egg activation.[J]. *J. Reprod. Immunol.*, 2002; 53: 161–9
- [3] 乔杰主编. 生殖工程学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007
- [4] Staessen C, Janssenwillen C, Devroey P, et al. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in–vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1993; 8: 221–23
- [5] Balakier H, Squire J, Casper R F, Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in–situ hybridization.[J]. *Hum. Reprod.*, 1993; 8: 402–8
- [6] Plachot M, Mandelbaum J, Junca A M et al. Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF.[J]. *Hum. Reprod.*, 1989; 4: 99–103
- [7] Palermo G, Joris H, Derde M P et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection.[J]. *Fertil. Steril.*, 1993; 59: 826–35
- [8] Grossman M, Calafell JM, Brandy N, et al. Origin of tripnucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997; 12: 2762–5
- [9] Rosenbusch B, Schneider M, Gl–ser B et al. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy.[J]. *Hum. Reprod.*, 2002; 17: 2388–93
- [10] Stein Kathryn K, Primakoff Paul, Myles Diana, Sperm–egg fusion: events at the plasma membrane.[J]. *J. Cell. Sci.*, 2004; 117: 6269–74
- [11] Sutovsky Peter, Sperm–egg adhesion and fusion in mammals. [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2009; 11: e11
- [12] Gilchrist Robert B, Lane Michelle, Thompson Jeremy G, Oocyte–secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality.[J]. *Hum. Reprod. Update*, 2008; 14: 159–77
- [13] Li Rong, Albertini David F, The road to maturation: somatic cell interaction and self–organization of the mammalian oocyte.[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013, 14: 141–52
- [14] Gosden Roger, Lee Bora, Portrait of an oocyte: our obscure origin.[J]. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 973–83
- [15] Donaubauer Elyse M, Law Nathan C, Hunzicker–Dunn Mary E, Follicle–Stimulating Hormone (FSH)–dependent Regulation of Extracellular Regulated Kinase (ERK) Phosphorylation by the Mitogen–activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase MKP3.[J]. *J. Biol. Chem.*, 2016; 291: 19701–12
- [16] Baumgarten Sarah C, Armouti Marah, Ko CheMyong et al. IGF1R Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Steroidogenesis, Follicle Survival, and Fertility in Female Mice.[J]. *Endocrinology*, 2017; 158: 2309–2318
- [17] Wang Xiaomei, Zou Pengda, He Yuanyuan et al. Effect of luteinizing hormone on goat theca cell apoptosis and steroidogenesis through activation of the PI3K/AKT pathway.[J]. *Anim. Reprod. Sci.*, 2018; 190: 108–118
- [18] Inoue Yoshihito, Miyamoto Shingo, Fukami Tatsuya et al. Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor–alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization–embryo transfer.[J]. *Fertil. Steril.*, 2009; 91: 1035–41
- [19] Ben–Ami I, Komsky A, Bern O et al. In vitro maturation of human germinal vesicle–stage oocytes: role of epidermal growth factor–like growth factors in the culture medium.[J]. *Hum. Reprod.*, 2011; 26: 76–81
- [20] Ashkenazi H, Cao X, Motola S et al. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response.[J]. *Endocrinology*, 2005; 146: 77–84
- [21] Varani Simona, Elvin Julia A, Yan Changning et al. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor–9, causes female subfertility.[J]. *Mol. Endocrinol.*, 2002; 16: 1154–67
- [22] Fülöp Csaba, Szántó Sándor, Mukhopadhyay Durba et al. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor–induced protein–6 deficient mice.[J]. *Development*, 2003; 130: 2253–61
- [23] Suarez S S, Pacey A A, Sperm transport in the female reproductive tract.[J]. *Hum. Reprod. Update*, 2006; 12: 23–37
- [24] Xu WX, Bhandari B, He YP, et al. Mapping of epitopes relevant for in–duction of acrosome reaction on human zona pellucida glycoprotein–4. Using monoclonal antibodies [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012; 68 (6): 465 – 475
- [25] Wassarman PM. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 283: 24285–89