

透明带与卵母细胞及胚胎质量相关性的研究进展

成俊萍, 黄莉, 何冰, 薛林涛, 王世凯(综述), 谭毅(审校)

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅重点科研课题(编号:重2010043)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 成俊萍(1974-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 胚胎工程。E-mail: chengjunpinggy@163.com

[摘要] 透明带是卵母细胞中与其成熟、正常受精及胚胎附植等预后密切相关的一个重要结构, 越来越多的研究显示透明带特性与卵母细胞及胚胎随后的发育潜力密切相关, 现就近年来对透明带与卵母细胞及胚胎发育潜力的相关研究作一综述。

[关键词] 偏振光显微镜; 卵母细胞; 胚胎; 透明带; 双折射值

[中图分类号] R 714.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)07-0671-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.07.32

The study progress on the relationship between zona pellucida and the quality of oocyte and embryo CHENG Jun-ping, HUANG Li, HE Bing, et al. Human Reproductive and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] Zona pellucida is an important structure closely related to oocyte maturation, normal fertility and embryo implantation. More studies show that the zona pellucida property had a close relationship with the subsequently developmental potential of embryo. In this paper, the studies about the relationship between zona pellucida and developmental potential of oocyte and embryo were reviewed.

[Key words] Polscope; Oocyte; Embryo; Zona pellucida; Birefringence value

1 透明带(zona pellucida)的构成和作用

透明带是包裹于哺乳动物卵子和附植前胚胎外的多层糖蛋白结构, 在卵子发生过程中由卵母细胞、卵丘及颗粒细胞合成、分泌并组装, 主要由三种糖蛋白(ZP₁、ZP₂、ZP₃)构成, 从排卵到胚胎种植前的囊胚孵化过程中具有多种功能并经历了一系列结构和生物化学变化^[1]。在卵母细胞阶段, 透明带保护卵母细胞通过生殖道到达受精部位; 在受精过程中精子必须与透明带糖蛋白结合并穿过透明带才能完成受精^[2], 保证了精子和卵子的相互作用种属特异性, 促进顶体反应完成并阻止多精受精; 受精后, 透明带在胚胎输卵管伞部到达子宫的旅程中起保护作用, 避免卵裂球分解, 并阻止不成熟的胚胎在输卵管和子宫内膜表面着床; 受精之后, 在子宫附植前的囊胚由透明带孵出。另外, 透明带还能够保护胚胎免受细菌、病毒、毒素和吞噬细胞的侵袭, 调节胚胎和外界的营养物质交换和胚胎-母体的早期信号传导。

透明带在卵子发生过程中形成, 因此推测通过透明带的形态特点尤其是它的厚度、发育迟缓和不规则程度可估计卵子或胚胎质量。

2 影响透明带功能的因素

2.1 冷冻 冷冻会影响胚胎的质量, 使胚胎移植后种植率和临床妊娠率降低。Moreira da Silva等^[3]用扫描电镜观察牛体外培养的桑葚胚和囊胚冷冻后透明带的物理变化发现, 所有的胚胎直径无明显差异, 而各组透明带外表面的孔径相比差异显著, 对照组(0.48 ± 0.003) μm, 慢速冷冻组(0.34 ± 0.001) μm, 玻璃化冷冻组(0.27 ± 0.001) μm (P < 0.05)。对照组与玻璃化冷冻组透明带上小孔的数目分别为(45.4 ± 7.3)比(38.2 ± 8.2), 差异有统计学意义(P < 0.05)。因此推测透明带作为一道屏障可以阻止病原体的侵袭, 但是当营养物质从外界供应时, 透明带的屏障作用对胚胎却是有害的。

2.2 病人年龄 孙莹璞等^[4]研究显示透明带厚度

(ZPT)、透明带厚度变量(ZPTV)与年龄明显相关,随着年龄的增加,ZPT、ZPTV明显下降,年龄>35岁者尤甚,与文献报道一致^[5,6]。ZPT随年龄增加而变薄是目前观察到的一种现象,尚缺乏理论依据,是否与控制性促超排卵周期中hCG给药时间有关尚待研究。Longo^[7]从老龄鼠胚的透明带研究中发现,透明带随年龄增加有变硬的趋势;而对于人类胚胎,不同年龄患者胚胎透明带硬度随年龄增加(尤其≥35岁者),激光打孔所需能量也增加,提示透明带随年龄增长有变硬的趋势,但大龄患者ZPT、ZPTV下降的原因还需进一步研究。有作者认为选择性地对年龄≥38岁的患者进行辅助孵出能有效提高妊娠率^[8]。孙莹璞等^[4]研究发现随年龄增加ZPTV下降,影响妊娠结局,优质胚胎的ZPTV显著高于劣质胚胎。

3 透明带与胚胎发育潜力的关系

3.1 ZPT与ZPTV 目前,大多数IVF实验室仍以胚胎卵裂速度、卵裂球均匀程度及含无核碎片的多少等参数进行胚胎质量评分,以评估胚胎的种植潜力,但胚胎ZPT及ZPTV作为补充胚胎评分的有效性已引起了广泛关注。Cohen等^[9]发现人类胚胎的透明带并非厚薄均匀,而是存在相对较薄的区域,推测薄化区或许可以促进跨膜运输和物质释放以消化局部透明带,从而促进胚胎种植。随后的研究证实ZPT、ZPTV与临床妊娠密切相关。Palmstierna等^[10]认为ZPTV对妊娠结局的预测有很高价值,是胚胎质量的重要预测指标。孙莹璞等^[4]研究发现随年龄增加ZPTV下降,影响妊娠结局,优质胚胎的ZPTV显著高于劣质胚胎。认为ZPTV与卵裂速度、卵裂球形态等一样,是胚胎质量的一个标志。建议在临床挑选移植胚胎时,应选择ZPTV≥20%者或人为局部薄化透明带增大ZPTV,以增加其种植潜力。

3.2 透明带超微结构 近年来,随着辅助生殖技术(ART)的发展,对胚胎透明带的结构特征和理化特性更为关注,其中有许多超微结构的研究。Nottola等^[11]用相差显微镜(PCM)和扫描电镜(SEM)观察了人的体外受精-胚胎移植(IVF-ET)和胞浆内单精子注射(ICSI)的囊胚透明带形态。选择颜色清晰的囊胚和颜色发暗的囊胚各5枚,用PCM观察时,清晰的囊胚呈现出规则、圆形的轮廓,由清晰、体积大的细胞组成,用SEM观察发现,清晰囊胚显示出海绵样柔软的透明带,透明带上由网格状细丝形成了无数的小孔。颜色发暗的囊胚用PCM观察时发现外型不规则,常常有崩解,由暗色细胞和碎片组成。

Santos等^[12]用SEM对牛卵母细胞质量与透明带超微结构、多精受精、胚胎发育潜力等的关系进行研究,结果显示1级卵母细胞透明带微孔直径(0.5 ± 0.07) μm 显著小于2级(0.83 ± 0.1) μm 、3级(1.02 ± 0.22) μm 和4级(1.38 ± 0.59) μm ($P < 0.05$)。对于体外受精组,结果显示卵母细胞质量为3、4级卵裂率(68.4%和43.8%),低于卵母细胞质量为1、2级组(79.5%和69.3%);并且卵母细胞质量为3、4级的没有胚胎发育到孵化,而卵母细胞质量为1、2级发育到孵化囊胚的比率分别为15.2%和12.5%;关于多精受精,1、2级卵母细胞多精受精率(4.1%,4.5%)显著低于3、4级卵母细胞的多精受精率(11.1%,9.8%)。总之,研究结果显示,低质量的卵母细胞将导致IVF后低胚胎发育潜力和高多精受精率,而这可能与ZP结构如透明带上微孔数目及直径等有关。Nara等^[13]认为分析透明带蛋白结构的变化对于了解透明带在受精和胚胎种植前的生理作用具有重要意义。用傅氏转换红外线和透射电子显微镜分析透明带在受精时的2级结构的变化证实猪卵巢卵子透明带在水和蛋白中 β -片层结构占优势,也存在 α -螺旋结构。用同样方法研究牛卵巢卵子和囊胚期受精卵表明,在受精过程中 β 结构增加。另外,用透射电镜(TEM)观察到受精时透明带会变薄,因而认为受精时透明带变硬的变化是由透明带蛋白的2级结构变化引起的。

3.3 透明带双折射性 卵母细胞中的纺锤体和透明带,都是高度有序的生物大分子。偏振光显微镜(PolScope)利用其大分子结构的双折射性,可对其微观结构进行观察,现已开始应用于人类辅助生殖临床研究^[14~19]。除了对纺锤体进行观察外,这种无创伤性分析还可以用于观察卵和胚胎的透明带厚度、结构参数等来帮助评价其质量。PolScope显示透明带由三层组成,相对于卵子,内层透明带丝呈放射状,而外层透明带丝为切线性^[2,14]。中间层透明带丝方向随机排列,双折射性最低,将内层和外层分割开来。研究结果显示卵子透明带内层双折射值增大预示着卵子有较好的发育潜能,并且随着胚胎发育,透明带尤其是透明带的外层逐渐变薄^[20]。Pelletier等^[1]对人卵母细胞和胚胎透明带多层结构进行了研究,结果显示在透明带三层结构当中,无论是卵母细胞还是胚胎都是最内层最厚,且双折射值高;最外层较最内层为薄,有较低的双折射值;中间层在三层当中最薄,几乎没有双折射值。无论透明带单层厚度还是透明带总厚度在成熟卵母细胞(GV

期和 M I 期)和成熟卵母细胞(M II 期)之间没有差异,但是胚胎透明带与成熟卵母细胞透明带比较,透明带各层厚度均较薄,因此整个胚胎透明带变薄。在胚胎透明带最外层所占比例小于在卵母细胞中所占比例,最内层的双折射值在卵母细胞和胚胎没有差异,但胚胎透明带中间层双折射值有所增加,而最外层双折射值则有所降低,最内层和最外层的厚度和双折射值呈正相关,如 3 d 的胚胎厚度增加 1 μm ,双折射值就增加 0.38 nm,因此厚的透明带双折射值也较高。另外,在不同的卵母细胞群、不同的病人,卵母细胞和胚胎透明带也存在差异,其中一些病人卵母细胞和透明带厚度和双折射相似,另一些则差异较大。关于透明带双折射值与卵母细胞、胚胎质量相关性的研究,大部分都集中在单精注射周期(ICSI),Cheng 等^[21]通过对体外受精周期(IVF)的研究,发现卵 IVF 周期中母细胞双折射值与病人年龄、卵母细胞成熟度以及原核密切相关,但与随后的胚胎发育潜力和怀孕率关系不大。由此表明,卵母细胞的双折射值能在一定程度上预测 IVF 周期中卵母细胞的质量,可作为辅助生殖卵母细胞和胚胎早期选择的参考指标。使用 Polscope 对人卵母细胞透明带结构特点进行描述,为建立人透明带度量提供相对规范的标准,将有助于明确哪些病人需要实施辅助孵化,改善辅助生殖的临床结局,减轻病人的经济和心理负担。

4 展望

随着辅助生殖技术(ART)的不断发展,对胚胎透明带的结构特征和理化特性将更为关注,其中包括透明带厚度和厚度变量、透明带双折射值以及透明带超微结构的研究。Polscope 下透明带的相关指标体系将不断完善,对卵母细胞和胚胎进行无创伤性观察,确定其随后的发育潜力,将成为辅助生殖领域发展的必然趋势。

参考文献

- Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos[J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(Suppl 1): 850-856.
- Wassarman PM. Sperm receptors and fertilization in mammals[J]. *Mt Sinai J Med*, 2002, 69(3): 148-155.
- Moreira da Silva F, Metelo R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification[J]. *Reprod Domest Anim*, 2005, 40(3): 205-209.
- 孙莹璞, 徐瑜, 苏迎春, 等. 人胚胎透明带厚度及其变量与体外受精——胚胎移植妊娠结局的关系[J]. *生殖医学杂志*, 2004, 13(6): 349-353.
- Garside WT, Loret de Mola JR, Bucci JA, et al. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality, age, and implantation[J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47(1): 99-104.
- Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, et al. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2000, 17(6): 323-328.
- Longo FJ. Changes in the zones pellucidiae and plasmalemma of aging mouse eggs[J]. *Biol Reprod*, 1981, 25(2): 399-411.
- Montag M, van der Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction[J]. *Croat Med J*, 1999, 40(3): 398-403.
- Cohen J, Inge KL, Suzman M, et al. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation[J]. *Fertil Steril*, 1989, 51(5): 820-827.
- Palmstierna M, Murkes D, Csemiczky G, et al. Zona pellucida thickness variation and occurrence of visible mononucleated blastomeres in preembryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatment[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1998, 15(2): 70-75.
- Nottola SA, Makabe S, Stallone T, et al. Surface morphology of the zona pellucida surrounding human blastocysts obtained after in vitro fertilization[J]. *Arch Histol Cytol*, 2005, 68(2): 133-141.
- Santos P, Chaveiro A, Simões N, et al. Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida, polyspermic penetration and developmental competence[J]. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43(6): 685-689.
- Nara M, Yonezawa N, Shimada T, et al. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the intact zona pellucida of the mammalian egg: changes in the secondary structure of bovine zona pellucida proteins during fertilization[J]. *Exp Biol Med*, 2006, 231(2): 166-171.
- Oldenbourg R. Polarized light microscopy of spindles[J]. *Methods Cell Biol*, 1999, 61: 175-208.
- 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): 1464-1468.
- 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): 2374-2378.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes[J]. *Fertil Steril*, 2001, 75(2): 348-353.
- Ebner T, Balaban B, Moser M, et al. Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(3): 913-920.

- 19 Madaschi C, Aoki T, de Almeida Ferreira Braga DP, et al. Zona pellucida birefringence score and meiotic spindle visualization in relation to embryo development and ICSI outcomes[J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18(5): 681-686.
- 20 Shen Y, Betzendahl I, Sun F, et al. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes[J]. *Reprod Toxicol*, 2005, 19(4): 459-471.
- 21 Cheng J, Huang L, He B, et al. Quantitative analysis of the intensity of zona pellucida birefringence of oocytes during IVF cycles[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22(8): 1167-1174.
- [收稿日期 2011-01-14][本文编辑 谭毅 黄晓红]

新进展综述

手足口病并发中枢神经系统损害的研究进展

张才儒, 谢付静(综述), 蒋就喜(审校)

基金项目: 桂林市科学研究与技术开发计划项目(编号:20090536)

作者单位: 541400 桂林, 资源县人民医院儿科(张才儒); 541001 桂林, 桂林医学院附属医院(谢付静, 蒋就喜)

作者简介: 张才儒(1958-), 男, 大学本科, 医学学士, 主治医师, 研究方向: 手足口病及其相关疾病。E-mail: zyxrmyy4311156@163.com

通讯作者: 蒋就喜(1955-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 重大传染病分子生物学及流行病学。E-mail: gjjiangx@sohu.com

[摘要] 肠道病毒 71 型(EV71)感染患者后可引起手足口病, 重症者可合并中枢神经系统损害、神经源性肺水肿和神经源性心肌损害等。对手足口病并发中枢神经系统损害的发病机制、临床表现、诊断和治疗方法作一综述。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒 71 型; 中枢神经系统

[中图分类号] R 512.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)07-0674-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.07.33

Research advances on hand foot and mouth disease complicated with central nervous system damage

ZHANG Cai-ru, XIE Fu-jing, JIANG Jiu-xi. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Ziyuan County, Guilin 541400, China

[Abstract] Enterovirus 71 (EV71) infection can cause hand foot and mouth disease (HFMD). In the severe case HFMD can be complicated with central nervous system damage, neurogenic pulmonary edema, neurogenic myocarditis and so on. This paper reviewed the pathogenesis, clinical manifestation, diagnosing and treating of HFMD complicated with central nervous system damage.

[Key words] Hand foot and mouth disease; Enterovirus 71; Central nervous system

感染肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A16(Coxsackievirus A16, CA16)后均能导致手足口病(HFMD), 两者所引起的手足口病在临床症状上难以区别, 但由于 EV71 具有高度嗜神经性, 它能引起无菌性脑膜炎、脑炎、脊髓灰质炎样麻痹等中枢神经系统损害以及继之而来的神经源性肺水肿、神经源性心肌损害等, 致残率及病死率都较高。自 1969 年 Schmidt 等^[1]首次分离出肠道病毒和定出血清型并作了相关报道至今已有 40 余年, 之后 EV71 感染引起的手足口病在保加利亚、马来西亚、台湾、新加坡等世界各地大规模爆发流行。2010

年, 我国广东、广西、山东、河南等全国范围内爆发手足口病, 且并发中枢神经系统损害的重症率和病死率均较高。本文对 EV71 感染后引起的重症手足口病并发中枢神经系统损害的研究进展作一综述。

1 手足口病的流行概况

手足口病一年四季均可发病, 以 6~9 月为发病高峰期^[2], 每 3 年左右有一次大流行, 一般为 EV71 病毒感染和柯萨奇 16 型病毒感染, 每次以其中的一种病毒感染为主。手足口病在世界范围内的大流行主要有 1975 年保加利亚、1997 年马来西亚以 EV71 感染为主的手足口病爆发和 1998 年我国的台湾地