

文章编号 1006-8147(2023)01-0055-04

论 著

不同时期胚胎线粒体拷贝数与胚胎自身形态学分型的关系研究

张英¹,李豫峰²,王婷³,赵华³

(1.河南省人民医院检验科,郑州 450000;2.华中科技大学同济医学院附属同济医院生殖中心,武汉 430000;
3.河南省人民医院生殖医学中心,郑州 450000)

摘要 目的:探讨人类不同形态学分型的卵裂期胚胎和囊胚与自身线粒体拷贝数的关系。方法:选择在生殖中心因女性双侧输卵管梗阻行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)助孕顺利娩出健康胎儿后,自愿丢弃冷冻的卵裂期胚胎和囊胚用于科学研究。将冷冻的胚胎解冻复苏后,依据胚胎发育的时期,将所有胚胎分为卵裂期胚胎冷冻组(D3 冷冻胚胎组, $n=63$)和囊胚冷冻组(D5 冷冻胚胎组, $n=82$),再根据冷冻胚胎的形态学评分标准,将冷冻卵裂期胚胎分为优质胚胎组($n=38$)和较差胚胎组($n=25$),将冷冻囊胚分为优质囊胚组($n=52$)和较差囊胚组($n=30$)。采用实时 PCR 检测胚胎线粒体拷贝数,比较不同阶段胚胎和相同阶段不同质量的胚胎与自身线粒体拷贝数的差异。结果:D3 冷冻胚胎组线粒体拷贝数明显低于 D5 冷冻胚胎组($t=9.34, P<0.02$),D3 冷冻胚胎组中优质胚胎 mtDNA 拷贝数高于质量较差胚胎组($t=6.62, P<0.01$),D5 冷冻胚胎组中优质胚胎 mtDNA 拷贝数明显高于质量较差胚胎组($t=8.03, P<0.04$)。结论:不同时期胚胎 mtDNA 拷贝数对胚胎的发育潜能有重要影响,mtDNA 拷贝数越高,胚胎质量越好。

关键词 体外受精-胚胎移植;胚胎;线粒体;拷贝数;囊胚

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

Study on the relationship between the mitochondrial copy number of embryos at different stages and the morphological types of embryos

ZHANG Ying¹, LI Yu-feng², WANG Ting³, ZHAO Hua³

(1.Department of Clinical Laboratory, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2.Reproductive Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China; 3.Reproductive Medicine Center, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract **Objective:** To study the relationship between mitochondrial copy number and embryos of different forms and types in different periods of human beings. **Methods:** Frozen cleavage stage embryos and blastocysts voluntarily discarded for scientific research after successful pregnancy assisted by *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the reproductive center due to female bilateral fallopian tube obstruction were selected. After thawing and recovery of frozen embryos, according to the different embryonic development period, all the embryos points D3 frozen embryos (cleavage stage embryo, $n=63$) and D5 frozen embryos group (blastocysts, $n=82$), and then based on the criteria of frozen embryos, frozen cleavage stage embryos can be divided into high quality embryos ($n=38$) and poor embryo group ($n=25$), frozen blastula were divided into poor quality blastocyst groups ($n=52$) and blastocyst groups ($n=30$). Real-time PCR was used to detect the mitochondrial copy number of single embryo, and the differences of mitochondrial copy number between embryos at different stages and embryos of different quality at the same stage and their own mitochondria were compared. **Results:** D3 frozen embryos group of mtDNA copy number was lower than that in group D5 frozen embryos, the difference was statistically significant ($t=9.34, P<0.02$), D3 group of frozen embryo quality embryos mtDNA copy number higher than that of poor quality embryos group, difference was statistically significant ($t=6.62, P<0.01$), D5 group of frozen embryo quality embryos mtDNA copy number significantly higher than the poor quality embryos group, difference was statistically significant ($t=8.03, P<0.04$). **Conclusion:** The mtDNA copy number of embryos at different stages has an important effect on embryo development potential, and the higher the mtDNA copy number, the better the embryo quality.

Key words *in vitro* fertilization-embryo transfer; embryo; mitochondria; copy number; blastocyst

线粒体在哺乳动物卵母细胞和早期胚胎形成

基金项目 国家自然科学基金项目(81701444);河南卫健委科技创新杰出人才培养项目(YXKC2020021);河南省医学科技攻关省部共建重点项目(SBGJ202102016)

作者简介 张英(1970-),女,主管技师,学士,研究方向:PCR检测;通信作者:赵华, E-mail:417692121@qq.com。

过程中起调控生长发育的重要作用^[1-3],这种作用在体外受精和胚胎培养等不孕症的治疗过程中已经体现出来。并且线粒体的功能与胚胎质量及发育潜能息息相关。线粒体完全属于母系遗传,在成熟的卵母细胞与精子受精后,受精卵的线粒体

数量直接来源于卵母细胞,在形成囊胚之前线粒体 DNA 停止复制,直到囊胚期胚胎线粒体又重新开始复制^[4]。卵子内线粒体的数目及功能与受精后的胚胎质量密切相关^[5-6],线粒体 DNA 结构的缺陷和数量的差异会引起线粒体功能障碍,对受精后胚胎进一步发育到着床前胚胎有着不利的影响,并且也影响着床后的早期胚胎发育^[7]。因此,本研究集中探讨不同时期、不同形态学分型的卵裂期胚胎和囊胚与自身线粒体拷贝数的关系,深入探究不同时期、不同形态学分型的胚胎线粒体拷贝数的特性,为筛查出可供患者移植的质量较好的胚胎提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择在华中科技大学附属同济医院生殖中心因双侧输卵管梗阻行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)助孕顺利娩出健康胎儿后,患者自愿丢弃冷冻的卵裂期胚胎和囊胚,患者签署知情同意书。本研究通过医院伦理委员会委员讨论并给予通过,批准号:TJ-C20141211。

根据所收集胚胎的发育阶段不同将胚胎分为 D3 冻胚组(冷冻的卵裂期胚胎, $n=63$)和 D5 冻胚组(冷冻的囊胚, $n=82$)。根据 2010 年伊斯坦布尔关于卵裂期胚胎评分标准共识^[8],依据胚胎卵裂球的大小、均匀度、相互对称性、胞质形态、胚胎胞质内有无碎片及碎片占胞质的比例,将卵裂期胚胎分为优质胚胎组($n=38$,卵裂球大小均匀,形态规则,碎片率 $<10\%$)和较差胚胎组($n=25$,卵裂球大小均匀或稍不均匀, $10\%<$ 碎片率 $\leq 20\%$),囊胚以胚胎分期、内细胞团分级及滋养层细胞分级 3 方面的总和来评估囊胚质量,依据囊胚解冻复苏后形态学分型的不同分为优质囊胚组(4AA-4BB, $n=52$)和较差囊胚组(4BC-4CB, $n=30$)。

1.2 方法

1.2.1 胚胎解冻复苏 在胚胎复苏前 30 min 将 1 号解冻液置于 39℃ 环境中预热,其余 2、3 及 4 号液置于室温。按操作顺序将 4 种解冻液依次滴入皿内并且标记,快速将载有胚胎的 cryotop 载杆前段放入 1 号液滴(含 1.0 mol/L 蔗糖)复苏 1 min,2 号液滴(含 0.5 mol/L 蔗糖)3 min,3 号和 4 号液滴(均为基础平衡液)各 5 min,最后将胚胎吸出放入胚胎培养液中,置于 5% CO₂ 培养箱内培养 2 h。根据以上标准对胚胎的形态学进行分级,进一步评估胚胎质量。

1.2.2 胚胎线粒体拷贝数的检测 (1)mtDNA 标准

品质粒制作:应用人工基因合成方法制作 mtDNA 的线性化质粒,采用 Hind III 限制性内切酶进行质粒线性化处理后,加入苯酚-氯仿,行异戊醇(25:24:1)抽提和乙醇精制,最终获得 mtDNA 的标准品质粒。构建的标准品质粒线粒体拷贝数为 2.8×10^5 copy/ μ L,其吸光度值是 1.84。取 1 μ L 标准品质粒依照梯度(1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10)稀释作为模板进行实时 PCR 反应,并制作 mtDNA 标准曲线。(2)实时 PCR 检测胚胎 mtDNA 拷贝数:引物由大连宝生物技术有限公司设计,其引物序列上游:5'-TAGCATCACACACCGCACAA-3',下游:5'-GAGTGGGAAGAAGAAAGAGAGGAAG-3',引物扩增产物长度为 196 bp。实时 PCR 反应体系含 0.5 μ L 上游引物和 0.5 μ L 下游引物、12.5 μ L SYBR Plus,2 μ L DNA 模板,9.5 μ L 灭菌水。以 98℃ 预变性 2 min,98℃ 变性 10 s,60℃ 退火 15 s,68℃ 延伸 20 s 进行扩增,共 40 个循环。在相同的引物、反应体系和反应条件下进行标准品和样本的检测。根据实时 PCR 仪显示出的 Ct 值,用 mtDNA 标准曲线不同区间的数值转换成每个胚胎的 mtDNA 拷贝数(单位为 copy/ μ L)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据统计学分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

经实时 PCR 检测所有胚胎的线粒体 DNA 拷贝数在 $1.17 \times 10^5 \sim 8.64 \times 10^5$ 之间。D3 和 D5 冻胚组线粒体 DNA 平均拷贝数分别是 $(3.32 \pm 1.40) \times 10^5$ copy/ μ L 和 $(4.30 \pm 1.10) \times 10^5$ copy/ μ L,前者明显低于后者($t=9.34$, $P < 0.02$)。D3 冻胚优质胚胎组线粒体平均拷贝数明显高于质量较差胚胎组 [$(3.75 \pm 1.60) \times 10^5$ copy/ μ L vs. $(3.29 \pm 0.90) \times 10^5$ copy/ μ L, $t=6.62$, $P < 0.01$],D5 冻胚优质囊胚组线粒体平均拷贝数明显高于质量较差囊胚组 [$(4.63 \pm 1.5) \times 10^5$ copy/ μ L vs. $(3.67 \pm 1.7) \times 10^5$ copy/ μ L, $t=8.03$, $P < 0.04$](图 1~5)。

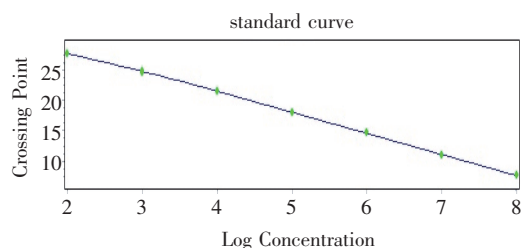


图 1 标准品 real-timePCR 标准曲线图

Fig 1 Real-time PCR standard curve of standard substance

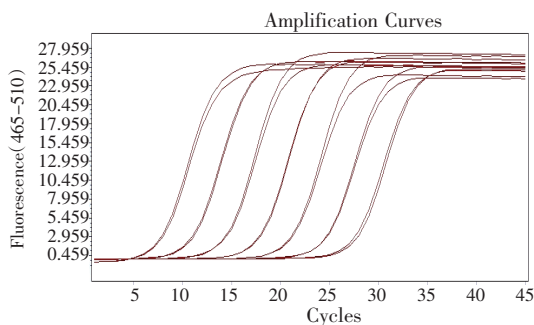


图 2 标准品 real-time PCR 扩增曲线图

Fig 2 Real-time PCR amplification curve of standard substance

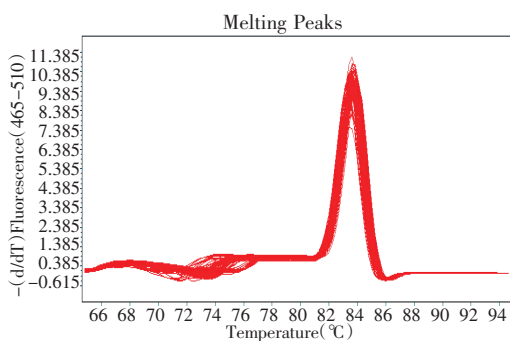


图 3 样本 real-time PCR 溶解曲线图

Fig 3 Real-time PCR dissolution curve of samples

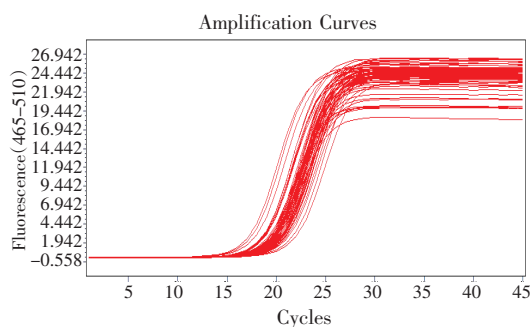


图 4 样本 real-time PCR 扩增曲线图

Fig 4 Real-time PCR amplification curve of samples

3 讨论

早期胚胎发育是一个动态过程,只有在足够能量水平供给下才能保证胚胎顺利完成每次的细胞分裂。线粒体作为胚胎发育所需能量供给的重要细胞器,主要通过氧化磷酸化途径产生 ATP 为胚胎发育提供能量,在卵母细胞的成熟、受精及胚胎发育过程中发挥极其重要的作用^[1-3]。卵母细胞和胚胎内线粒体的数量由线粒体拷贝数决定^[8],目前,研究表明卵母细胞和胚胎发育的潜能^[9-10]与线粒体拷贝数高低密切相关,在卵母细胞发育、成熟过程中,根据所需的能量线粒体拷贝数不断进行自我复制,从最初窦卵泡发育到卵泡发育成熟线粒体,线粒体拷贝数可由不足 10 个增加至 20 000~500 000^[11]。当卵母细胞发育成熟后,线粒体拷贝数停止自我复制,随着卵母细胞受精、进一步发育到囊胚所需供给能量增加

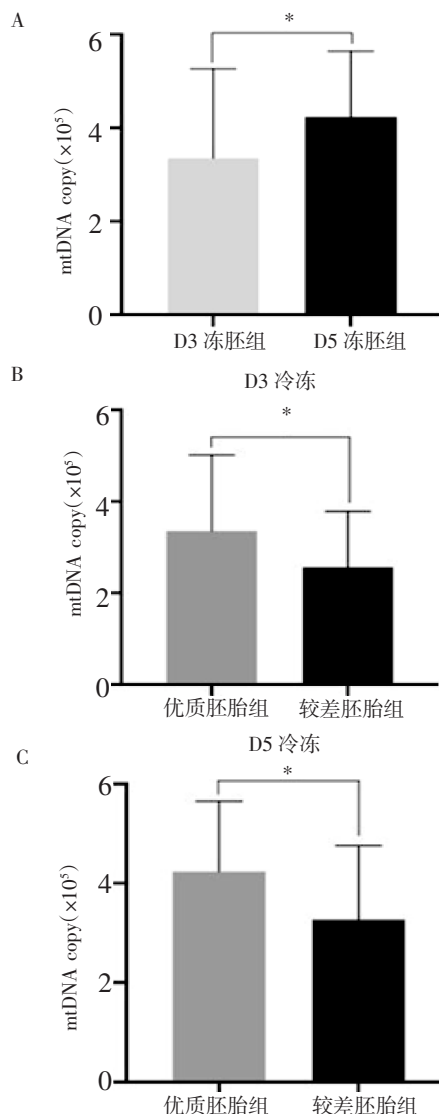


图 5 不同时期不同质量胚胎线粒体平均拷贝数的比较

Fig 5 Comparison of average mitochondrial copy numbers of embryos of different quality at different periods

时,线粒体开始重新启动自我复制模式。因此,卵母细胞发育成熟后储备的线粒体拷贝数对卵母细胞受精和受精卵的后续发育至关重要,与此同时,囊胚期线粒体拷贝数的高低对胚胎着床及着床后的胚胎发育同样起着关键作用。所以,线粒体拷贝数可视为卵母细胞和胚胎发育潜能的重要指标之一^[12]。

通过对卵母细胞线粒体 DNA 拷贝数的检测,很多研究者认为卵母细胞线粒体拷贝数存在一个变异区间,其变异范围为 50 000~1 500 000,即使是同一个体的卵母细胞,线粒体 DNA 拷贝数也存在较大差异。Chan 等^[13]和 May-Panloup 等^[14]检测卵母细胞线粒体 DNA 平均拷贝数分别是 $598\,350 \pm 265\,862$ 和 $256\,000 \pm 213\,000$,两者检测结果不尽相同。Santos 等^[15]检测正常受精者卵母细胞线粒体 DNA 平均拷贝数是 $250\,454 \pm 29\,730$,受精障碍的卵母细胞线粒体 DNA

平均拷贝数是 $163\ 698 \pm 20\ 192$, 因此认为线粒体 DNA 拷贝数的数量对受精结局有重要影响。

在生殖医学领域,线粒体功能研究的样本主要来源于动物的卵子、胚胎、人类未成熟的卵子、受精而发育很差不适合移植的胚胎,而对于人类卵裂期胚胎和囊胚的线粒体功能研究甚少,尤其是囊胚期的胚胎,分析原因可能是国外许多国家伦理在人类胚胎研究中起着一定约束的作用,有些欧洲国家认为受精卵作为一个生命体存在,禁止用于科研。另外,国外的样本量来源很少,对囊胚的研究很多也是局限于基因有问题的患者。因此,关于检测人类囊胚期可移植的胚胎线粒体拷贝数的文献非常少。

笔者采用实时 PCR 对可移植胚胎线粒体拷贝数进行检测,发现所有胚胎线粒体 DNA 拷贝数在 $1.17 \times 10^5 \sim 8.64 \times 10^5$ 。卵裂期胚胎线粒体拷贝数明显低于囊胚期胚胎。众所周知,卵裂期胚胎的线粒体均来自于受精前的卵母细胞,受精后的卵裂期胚胎的线粒体不再复制,当受精卵发育到囊胚期又重新开始启动线粒体 DNA 的复制。在不同形态学分型的卵裂期胚胎线粒体拷贝数中,优质胚胎组线粒体拷贝数明显高于质量较差组。目前已知卵裂期胚胎的线粒体拷贝数来源于受精前卵母细胞,能正常受精发育到卵裂期胚胎说明卵母细胞内有足够的线粒体提供能量,所以卵裂期胚胎线粒体拷贝数存在一定差异,但差异并不明显,那为什么根据形态学分型又有优劣之分呢?本课题组对优、劣胚胎重新进行检测,前后两次结果检测没有太大差异,卵裂期形态学分型较差、有碎片的胚胎,可能是在胚胎分裂过程中,由于外界环境的刺激或者自身能量的不足,未能将线粒体均匀分到不断分裂的卵裂球中,线粒体 DNA 拷贝数较多、供能较好的卵裂球能正常发育,而线粒体 DNA 拷贝数较少、供能较差的卵裂球在发育过程中出现发育滞后,或者产生碎片,导致整个胚胎的形态学分型较差,但这种胚胎总的线粒体 DNA 拷贝数与形态学较好的胚胎的线粒体拷贝数没有明显差异。这种形态学较差的胚胎如果继续培养,发育到囊胚的几率明显小于形态学较好的胚胎。在不同形态学分型的囊胚期胚胎的线粒体 DNA 拷贝数中,优质胚胎组线粒体拷贝数明显高于质量较差组。对于这种检测结果分析可能与以下原因有关:当受精卵发育到囊胚期又重新开始启动 mtDNA 的复制,质量较好的卵裂期胚胎线粒体拷贝数较多,能更好的为胚胎发育到囊胚提供能量,更容易发育成囊胚。

从本研究结果来看,随着胚胎从第3天发育到第5天,线粒体 DNA 拷贝数呈上升趋势,且形态学

分型较好的胚胎线粒体 DNA 拷贝数较高,同时也证实各大生殖中心多年来一直沿用的胚胎形态学分型的评判标准具有一定的客观性和实用性。线粒体持续供能是保证胚胎不断发育的动力,那么线粒体 DNA 拷贝数的高低对胚胎发育的影响也是至关重要的,但其影响机制还不完全明确,这些均有待于后续进一步研究。

参考文献:

- [1] SCHATTEN H, SUN Q Y, PRATHER R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12: 111.
- [2] TAKAHASHI T, IGARASHI H, AMITA M, et al. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2013, 39(10): 1431–1439.
- [3] VAN BLERKOM J, DAVIS P. Mitochondrial signaling and fertilization[J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13(11): 759–770.
- [4] SMEETS H J. Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders: selecting the good guys or kicking out the bad guys[J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 27: 599–610.
- [5] SUTOVSKY P, MORENO RD, RAMALHO –SANTOS J, et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria[J]. *Nature*, 1999, 402(6760): 371–372.
- [6] VAN BLERKOM J, COX H, DAVIS P. Regulatory roles for mitochondria in the peri-implantation mouse blastocytes: possible origins and developmental significance of differential DeltaPsim[J]. *Reproduction*, 2006, 131(5): 961–976.
- [7] ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE MEDICINE AND ESHRE SPECIAL INTEREST GROUP OF EMBRYOLOGY. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(6): 1270–1283.
- [8] SANTOS T A, EL SHOURBAGY S, ST JOHN J C. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(3): 584–591.
- [9] KUJJO L L, PEREZ G I. Ceramide and mitochondrial function in aging oocytes: juggling a new hypothesis and old players[J]. 2012, 143(1): 1–10.
- [10] VAN BLERKOM J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(5): 797–813.
- [11] JANSEN R P, BURTON G J. Mitochondrial dysfunction in reproduction[J]. *Mitochondrion*, 2004, 4(5–6): 577–600.
- [12] CHIARATTI M R, MEIRELLES F V. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(1): 1–2.
- [13] CHAN C C, LIU V W, LAU E Y, et al. Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes[J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(12): 843–846.
- [14] MAY –PANLOUP P, CHRÉTIEN M F, JACQUES C, et al. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(3): 593–597.
- [15] SANTOS T A, EL SHOURBAGY S, ST JOHN J C. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(3): 584–591.

(2022-05-29 收稿)