



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103529218 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310225929. X

(22) 申请日 2007. 01. 26

(30) 优先权数据

0601746. 1 2006. 01. 27 GB

(62) 分案原申请数据

200780010271. 3 2007. 01. 26

(71) 申请人 诺沃塞勒斯有限公司

地址 英国萨里

(72) 发明人 亨利·J·利斯

弗兰切斯卡·D·霍顿

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 郑斌 田旻

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

评估解冻细胞的存活能力的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种评估解冻细胞的存活能力的方法, 其中所述细胞是配子、胚胎、核体、推定的干细胞群体、干细胞前体群体或者干细胞群体。该方法包括将解冻细胞在包含众多氨基酸的培养基中培育和测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度变化。

1. 一种评估解冻细胞的存活能力的方法,其中所述细胞是配子、胚胎、核体、推定的干细胞群体、干细胞前体群体或者干细胞群体,所述方法包括在含有众多氨基酸的培养基中培育解冻细胞和测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度变化。
2. 根据权利要求1的方法,其还包括如果所述变化满足预定的标准则选择所述的解冻细胞用于进一步发育的步骤。
3. 根据权利要求1或2的方法,其中培养基包含 Earle' s 平衡盐溶液,所述 Earle' s 平衡盐溶液补充有葡萄糖、L- 乳酸、丙酮酸以及氨基酸的生理混合物。
4. 根据任意前述权利要求的方法,其中使用 HPLC 然后是以邻苯二甲醛的衍生化来测量在已用的培养基中氨基酸的浓度。
5. 根据任意前述权利要求的方法,其中产生了氨基酸消耗或生成模式。
6. 根据权利要求5的方法,其中所述氨基酸消耗或生成模式整体上用作评估解冻细胞的存活能力的选择标记。
7. 根据权利要求6的方法,其中最有力活力的解冻细胞的选择是基于通常包括2至7种氨基酸的一组氨基酸,这组氨基酸的消耗或生成模式是该物种的健康、发育中的解冻细胞的指示。
8. 根据权利要求6的方法,其中最有力活力的解冻细胞的选择是基于单一的氨基酸,其消耗或生成模式是该物种的健康、发育中的细胞的指示。
9. 根据任意前述权利要求的方法,其中所述解冻细胞源于任意的生物体,该生物体包括人、牛、猪、羊、任意家畜或者稀有和 / 或受胁物种。
10. 根据权利要求9的方法,其中该方法用于人。
11. 根据权利要求10的方法,其中用于选择标记的氨基酸包括谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、赖氨酸中的一种或它们的组合。
12. 根据权利要求10的方法,其中用于选择标记的氨基酸是谷氨酰胺、甘氨酸和丙氨酸。
13. 一种区分有发育能力的和发育停止的等级 I 胚胎的方法,其包括在含有众多氨基酸的培养基中培育等级 I 胚胎和测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度变化。
14. 根据权利要求13的方法,其还包括如果所述变化满足预定的标准则选择所述的等级 I 胚胎用于进一步发育的步骤。
15. 根据权利要求13或权利要求14的方法,其中产生了氨基酸消耗或生成模式。
16. 根据权利要求15的方法,其中所述氨基酸消耗或生成模式整体上用作评估细胞的存活能力的选择标记。
17. 根据权利要求16的方法,其中最有力活力的细胞的选择是基于一组氨基酸,优选赖氨酸、甘氨酸、色氨酸、精氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺。

评估解冻细胞的存活能力的方法

[0001] 本申请是 2007 年 1 月 26 日提交的中国专利申请 CN200780010271.3 的分案申请, 后者是 PCT/GB2007/000277 的中国国家阶段申请。

[0002] 为了 IVF 过程中的成功率, 刺激卵巢以产生多于一个的卵母细胞 (oocyte)。结果, 大多数 IVF 周期导致胚胎 (embryo) 的总数超过了用于在单个周期中转移至个体患者的最适量 (optimum)。对此问题合乎伦理和经济的方法是胚胎冷藏 (cryopreservation)。胚胎冷藏允许储藏特大数量的 (supernumeracy) 优质胚胎直至它们能在后面的周期中被转移, 从而减少了达到怀孕所需的刺激卵巢药物处理周期的数目, 并因此减少了患卵巢过度刺激综合征 (ovarian hyperstimulation syndrome) 的风险 (Trounson, 1986), 且提供了对多胎妊娠的防止。冷藏还允许在自发排卵周期或者雌激素和孕酮激素水平不超过天然存在的水平的周期中替换 (replacement) 解冻的胚胎, 因此增加了每个患者的怀孕率。大多数的辅助受孕单位常规地提供前核的或早期卵裂期 (early cleavage stage) 的胚胎的冷藏。

[0003] 利用了速度受控冷冻技术: 在冷冻保护剂流体中缓慢冷却胚胎, 从体温降至 -196°C (此处所有的细胞过程停止), 在该温度将它们储藏于液氮容器中。所述的冷冻保护剂用于保护细胞免受损害。当将这些细胞解冻时, 从液氮中取出它们, 解冻, 除去冷冻保护剂, 和培养细胞。导致细胞损害以及危害解冻后功能和发育的几个因素与冷却和冷藏有关。细胞损害可由细胞内冰 (intracellular ice) 的形成然后该细胞内冰的快速冷却引起; 细胞外冰的形成也导致在未结冰部分电解质浓度的增加以及细胞脱水。利用膜溶质相互作用 (membrane solute interaction) 的体外模型检测到: 脱水和复水 (re-hydration) 导致脂质膜上的机械应力并引起物理变形和相 (phase) 行为的改变。这些物理改变可在多种程度影响细胞: 可改变细胞膜和细胞器; 已显示围绕胚胎的透明带 (zona pellucida) 在冷藏过程中遭受 (一定量的) 硬化, 以及纺锤体进而染色体分离会受到损害。近来, 已显示一些基因受到冷冻和解冻过程的诱导, 这说明该细胞积极响应刺激 (insult)。与冷冻保护剂组合的缓慢冷冻允许通过减少细胞内冰和减少溶质浓度增加的影响来保护细胞免于上述有害的机制 (mechanism)。所述细胞外冰驱动细胞经由平衡过程脱水。更快速的方法, 即玻璃化 (vitrification), 使用高浓度 (high level) 的冷冻保护剂和非常快速的冷却, 以使细胞内冰的形成最小化。它是非平衡方法。

[0004] 冷冻和冰形成导致双层 (即两层) 脂质膜的脱水。借助冷冻 (with freezing) 液体结晶至凝胶的相变导致磷脂的烃尾部的有序化成为更加紧密的和平行的阵列, 这可引起对水和阳离子的渗透性增加、整合膜蛋白的分离、膜结合酶的活性降低、蛋白质的径向扩散的降低。精子和卵母细胞很可能经历类似的作用, 尽管它们的脂质构成非常不同。成熟卵母细胞具有位于减数分裂的纺锤体处的微管。将温度降至 25°C 于 10 分钟使微管破裂, 而且完全分裂 (dissolution) 发生于 0°C 。在小鼠中重新升温导致微管的重建, 但是这不发生于人中, 因为缺乏成核细管聚合 (nucleate tubule polymerization) 所需的中心粒旁物质。因纺锤体解体, 所得的卵母细胞往往可以具有非整倍性 (aneuploidy) (即染色体数目异常)。冷冻还可通过降低透明带的胰凝乳蛋白酶敏感性和皮质颗粒 (cortical granule) 而影响受精。实际上壳可能太“坚硬”。Linford 和 Meyers 使用单细胞凝胶电泳显示精子可

能受到损伤。线粒体也易受冷藏损伤。在冷藏和随后的培养过程中,卵母细胞 DNA 的退化似乎涉及细胞凋亡 (apoptosis) 过程,并检测到典型标记 (classic markers) 和胱天蛋白酶 (caspase)。因此细胞经历程序性细胞死亡。感兴趣的是,还激活了与应激反应有关的基因,包括与热休克蛋白、氧化应激清除剂 (scavenger) 和涉及葡萄糖代谢的酶有关的基因。

[0005] 尽管胚胎冷藏通常被认为是安全的方法 (Wood), 仍然存在关于该技术的长期安全性的争议 (Winston 和 Hardy, 2002)。这主要是小鼠中进行的的结果,其中已显示胚胎冷冻可影响植入前后发育 (late preimplantation development) 中的新陈代谢 (Emiliani 等, 2000) 和具有只在发育后期显示的更精细的 (subtle) 长期效果 (Dulioust 等, 1995)。也有报道人胚胎的冷冻改变了基因表达模式 (Tachataki 等, 2003)。这些研究者发现第 2 天冷冻胚胎比第 2 天新鲜胚胎含有更少的结节性硬化基因 (tuberous sclerosis gene) TSC2 的 mRNA。

[0006] 对于冷藏技术用途的主要关注是冻伤造成的可能的胚胎损失,这意味着一些健康胚胎可以不存活于冷冻和解冻的应激。冻伤造成的胚胎损失的精确数目可变化,但非常可能的是冷冻会引起一些胚胎的损失,可能与冷藏的那些胚胎的 25-50% 一样多。对此的一种解释是冷藏甚至可以作为更有活力的胚胎的“选择门 (selection gate)”, 尽管这尚未得到证实。

[0007] 对于冷藏的另一关注是由冷冻 / 解冻胚胎产生的儿童中先天缺损的潜在风险。在家畜工业中,大规模的胚胎冷冻和移植未导致先天缺损的增加。到目前为止,对那些出身于解冻胚胎的人后代 (human offspring) 的研究,未显示相比于此群体的其余者怀孕结果出现异常性方面任何显著的增加。

[0008] 总的说来,冷藏导致植入可能性 30 ~ 40 % 的下降 (Edgar 等, 2000 和 2005 ; El-Toukhy 等, 2003)。其它研究已显示类似的冷冻解冻胚胎的临床怀孕和植入率的范围为 10 至 30% 和 5 至 15% (Van der Elst 等, 1997 ; Kowalik 等, 1998 ; Ubaldi 等, 2004)。在冷冻周期中的胚胎转移成功率的降低归因于这样的事实: 冷藏胚胎必须另外忍受冷冻和解冻过程,该过程通常在本领域中被认为会改变内环境稳定 (homeostasis)、新陈代谢、细胞完整性和发育潜能 (developmental potential)。已知新陈代谢是早期胚胎健康所固有的,且当胚胎受到应激时新陈代谢立即扰乱 (Houghton 和 Leese, 2004 ; Lane 和 Gardner, 2005 综述)。限制冷藏的成功的最重要因素之一是归因于冷冻过程中冰晶形成的解冻后胚胎存活率 (Liebermann 等, 2002), 所述冰晶形成被认为损伤细胞膜和导致裂球 (blastomere) 裂解 (Pal 等, 2004)。

[0009] 考虑到以上所述毫无疑义的是,尽管第一例冷藏之后成功的怀孕报导于 1983, 但冷藏的方法依然是相对新的且对胚胎和后续的后代的长期影响是未知的。冷藏的主要缺点是利用冷冻 / 解冻胚胎引起怀孕的成功率通常低于在“新鲜周期”中的成功率, 植入可能性大体上下降 30 至 40%。这些差异说明胚胎的冷冻和解冻会对胚胎的存活能力具有有害的影响。当处于冷冻状态时冷藏胚胎可保持其存活能力的时间长度也是未知的。

[0010] IVF 的成功取决于用于转移入子宫的最好胚胎的选择。在转移前,解冻胚胎,并检查每个胚胎从而确定它是否医学上适于转移 (能生存的, 正常发育的胚胎)。没有用于胚胎质量的准确试验,且“优质的胚胎”的区别是主观的评估。目前使用形态学标准选择胚胎。形态学评估包括计数胚胎中的细胞数和建立其“等级”; 通常在 1 至 4 或者 1 至 5 级。然后

可将等级和细胞数的测量组合从而给出具体胚胎的“得分”。对胚胎的评分是高度技巧性的工作,且花费一般临床胚胎学家约 3 个月去学习。形态学评估的主要问题是其涉及的高度主观性。它不提供发育潜能的稳健检验 (robust test),因为每个启动的处理周期只有 23% 的平均成功率 (REF, HFEA)。在解释该低成功率 (尽管是形态学上良好的胚胎的转移) 的可能原因中有子宫内膜的接受能力 (Bourgain 和 Devroey, 2003 ;Devroey 等, 2004 ;Lukassen 等, 2004) 以及导致连接区收缩增加的创伤性胚胎转移 (Lesny 和 Killick 的综述, 2004)。很多的数据表明:在不同培养基中培养的胚胎的基因表达图式发生改变但是其形态学上显示正常 (Ho 等, 1995 ;Rizos 等, 2003 ;Rinaudo 和 Schultz, 2004 ;Lee 等, 2004)。因此胚胎可能具有正常的形态但在其生物化学方面具有改变,这使得目前胚胎学家不可能选择绝对最好的胚胎用于转移。

[0011] 在显微镜分析之后,只有约 50% 的冷冻胚胎符合转移的要求。据认为,未能存活于冷藏和解冻过程的那些胚胎可能产自活力较差的卵母细胞或精子。冷冻胚胎转移过程的实际周期与在 IVF 周期中获得的“新鲜”胚胎的实际周期相同。

[0012] 共同未决的专利申请 W001/53518 显示在分裂过程中氨基酸的消耗 / 出现 (“转化”) 预示备用的“新鲜”人胚胎体外发育至胚泡期 (blastocyst stage) 的能力 (Houghton 等, 2002) 以及导致转移后怀孕和产生活的后代的能力 (Brison 等, 2004)。这些发现是与一般理论一致的:在发育的早期决定了发育能力,且植入前发育的早期中的扰动可具有长期的牵连 (implication)。

[0013] 因为冷藏技术能提供辅助避孕的实际优点,所以存在着对可靠地评估解冻后的卵或胚胎的发育能力的需求。

[0014] 冷藏不是良性的方法,且细胞的许多功能可受到影响。因而对已经历冷藏过程的胚胎的选择标准不同于在“新鲜”胚胎的选择中所使用的那些标准。冷冻过的胚胎一般生长较慢,因此形态学上非常不同于新鲜胚胎。当有着大量的胚胎可用于转移时,对用于选择最好胚胎的有效参数的需求是极为重要的。植入多胚胎已导致无法接受的高比率的多胞胎 (multiple birth)。辅助受孕的目的是制造健康婴儿,因此减少多胎妊娠率是主要目的,且转移单个胚胎是理想的。鉴定具有高植入潜能的胚胎的能力将允许更有效地选择胚胎用于胚胎转移和在不降低总的怀孕率的条件下降低多胎妊娠的可能性。对用于选择最有可能发育至足月的解冻胚胎的有效参数的需求是极其重要的。

发明内容

[0015] 根据本发明,本文提供了一种评估解冻细胞的存活能力的方法,其中所述细胞为配子 (gamete)、胚胎 (embryo)、核体 (karyoplast)、推定的干细胞群体、干细胞前体群体或者干细胞群体,所述方法包括在含有众多氨基酸的培养基中培育解冻细胞和测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度变化。

[0016] 出人意料的是,已发现单个人胚胎在氨基酸方面的解冻后新陈代谢可用于预测发育至胚泡期的能力。

[0017] 本发明的方法同样适用于其它哺乳动物物种诸如牛和猪。牛胚胎是人的良好模型:牛和人一样通常为单排卵 (monovulator)。牛胚胎的直径还与人胚胎 ($\sim 140 \mu$) 大约相同,且具有作为氧、丙酮酸和葡萄糖消耗和 / 或乳酸生成测量的大致相似的能量代谢模

式。体外生成 (IVP) 牛受精卵 (zygote) 在体外达到胚泡期的比例 (20-40%) 与人受精卵 (20-50%) 大约相同, 且受精卵基因组激活启动于紧密相关的阶段 (在人中 4-8 细胞; 在牛中 8-16 细胞阶段)。在桑椹胚 (morula): 胚泡转变过程中, 猪胚泡的氨基酸新陈代谢模式 (profile) 在质量上和数量上类似于由人胚胎给出的, 这说明猪胚泡也是人的良好模型。

[0018] 该方法同样容易适用于不同细胞类型, 例如配子 (处于任意发育阶段)、核体、推定的干细胞群体、干细胞前体群体或者干细胞群体。这些细胞类型都可被冷冻, 且适用本发明的普通原理。以最广的意义使用术语存活能力 (viability), 其中包括胚胎发育至胚泡期, 胚胎的成功植入和植入前筛选方法。

[0019] 在本发明的一个实施方案中, 如果变化满足预定标准, 则该方法包括选择所述的用于进一步发育的解冻细胞的步骤。优选该预定的标准是至少一种氨基酸的增加或减少。

[0020] 优选培养基包含补充有葡萄糖、L- 乳酸、丙酮酸和氨基酸的生理混合物的 Earle' s 平衡盐溶液。优选使用 HPLC 然后是以邻苯二甲醛 (o-phthalaldialdehyde) 的衍生化来测量已用 (spent) 培养基中的氨基酸的浓度。

[0021] 在该方法的一种实施方案中, 产生氨基酸消耗或生成模式。优选氨基酸消耗或生成模式整体上用作评估解冻细胞的存活能力的选择标记。在本发明的一个实施方案中, 最有活力的 (most viable) 解冻细胞的选择基于一组氨基酸 (通常包括 2 至 7 种氨基酸), 这组氨基酸的消耗或生成模式是该物种的健康、发育中的解冻细胞的指示。或者, 最有活力的解冻细胞的选择基于单一的氨基酸, 其消耗或生成模式是该物种的健康、发育中的细胞的指示。

[0022] 优选解冻细胞源于任何的生物体, 该生物体包括人、牛、猪、羊、任何家畜或稀有和受胁 (threatened) 物种。在优选的实施方案中, 该方法用于人。

[0023] 优选用于选择标记的氨基酸包括包括谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、赖氨酸中的一种或它们的组合。

[0024] 优选该方法包括评估解冻的哺乳动物植入前胚胎发育至胚泡期和 / 或成功植入的能力, 所述方法包括:

[0025] (i) 将解冻的哺乳动物植入前胚胎在包含众多氨基酸的培养基中培育, 以及;

[0026] (ii) 测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度的增加和 / 或减少以测定氨基酸转化 (turnover), 其中有着较小范围的氨基酸转化的解冻的哺乳动物植入前胚胎与发育至胚泡期和 / 或成功植入关联。

[0027] 优选该方法还包括选择所述的解冻的哺乳动物植入前胚胎用于进一步发育至胚泡期和 / 或植入的步骤。

[0028] 优选解冻的哺乳动物植入前胚胎发育至胚泡期和 / 或成功植入是在将解冻的哺乳动物植入前胚胎转移至培养基之后 24 小时、10 小时、6 小时或更少时间内完成的。

[0029] 优选使用该方法评估解冻的哺乳动物植入前胚胎用于植入和引起临床怀孕的能力。通过植入之后 15 天的血清 hCG 检测胚胎转移后的临床怀孕并通过在 5 周时胎心的存在来确认 (Brison 等, 2004)。

[0030] 优选从发育的第 1 天直至第 4 天来评估解冻的哺乳动物植入前胚胎。

[0031] 在本发明的一个实施方案中, 该方法还包括基于氨基酸模式选择解冻的植入胚胎和将所选的解冻的哺乳动物植入前胚胎引入生物体的子宫 (uterine tract) 中。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,解冻的哺乳动物植入前胚胎是源于体外成熟的卵的哺乳动物植入前胚胎。或者,解冻的哺乳动物植入前胚胎是源于体内成熟的卵的哺乳动物植入前胚胎。

[0033] 在本发明的一个实施方案中,通过胞质内精子注射 (ICSI) 制备解冻的哺乳动物植入前胚胎。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,该方法包括测定至少一种氨基酸(包括利用包含 2 至 7 种氨基酸的氨基酸组)的浓度的增大和/或减少,其氨基酸的转化是该物种的解冻的哺乳动物植入前胚胎发育至胚泡期和/或成功植入的能力的指示。

[0035] 因此,本发明提供一种评估解冻的哺乳动物植入前胚胎发育至胚泡期和/或成功植入的能力的方法,所述方法包括将单个解冻的哺乳动物植入前胚胎在包含众多氨基酸的培养基中培育,测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度变化,其中该浓度变化是解冻的哺乳动物植入前胚胎发育至胚泡期和/或成功植入的能力的指示。

[0036] 本发明还提供一种区别有发育能力 (developmentally competent) 和发育停止的 (arresting) 等级 I 胚胎的方法,其包括将等级 I 胚胎在含有众多氨基酸的培养基中培育和测定该培养基中至少一种氨基酸的浓度的变化。

[0037] 发明详述

[0038] 只通过实施例并参考附图说明了本发明:

[0039] 图 1 从发育的第 2 天至第 3 天冷冻解冻的人胚胎的氨基酸消耗和出现。对于发育至胚泡期的胚胎 $n = 21$;而对于在胚泡期前发育停止的胚胎 $n = 25$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 不同于 0 的显著性 (significance from zero)。具有相同上标的竖条是显著不同的;a 和 b, $P = 0.001$; c, $P = 0.0025$; d, $P = 0.016$; e, $P = 0.032$; f, $P = 0.0448$ 。

[0040] 图 2 从发育的第 2 天至第 3 天冷冻解冻的人胚胎的总氨基酸的生成、消耗、转化和余额 (balance)。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 显著不同于发育停止的胚胎。

[0041] 图 3 从发育的第 2 天至第 3 天冷冻解冻的人胚胎所利用的谷氨酰胺、甘氨酸和丙氨酸的总和。*** $P < 0.001$ 显著不同于发育胚胎。

[0042] 图 4 发育停止或发育至胚泡期的单独的冷冻解冻的胚胎所利用的谷氨酰胺、甘氨酸和丙氨酸的总和。

[0043] 图 5 从发育的第 2 天至第 3 天等级 I 解冻的人胚胎的氨基酸消耗和出现。对于发育至胚泡期的胚胎 $n = 6$;对于在胚泡期前发育停止的胚胎 $n = 13$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 不同于 0 的显著性。具有相同上标的竖条是显著不同的;a, $P = 0.014$; b, $P = 0.024$; c, $P = 0.029$; d, $P = 0.035$; e, $P = 0.0493$; f, $P = 0.050$ 。

[0044] 图 6 从发育的第 2 天至第 3 天等级 I 解冻的人胚胎的总氨基酸生成、消耗、转化和余额。* $P < 0.05$ 显著不同于发育停止的胚胎。

[0045] 方法

[0046] 获得被告知的患者同意捐赠用于研究的备用冷冻人胚胎得自在 St James' s Hospital, Leeds 的辅助受孕单位进行体外受精 (IVF) 的患者。该工作得到了 Human Fertilisation and Embryology Authority(人受孕和胚胎管理局) (HFEA) 以及合作机构的伦理委员会 (Ethics Committees) 的完全伦理批准。

[0047] 如前所述 (Balen, 2001) 进行卵巢刺激和卵母细胞收集。通常, 使用长期垂体脱敏规程 (long pituitary desensitisation protocol), 以及鼻内那法瑞林 (nafarelin) 给药, 然后是用人绝经期促性腺激素 (hMG, Menogon, Ferring Pharmaceuticals Ltd) 或者重组 FSH (Puregon, Organon Laboratories Ltd) 进行促性腺激素刺激。简而言之, 在 hCG 给药 36h 后通过卵泡吸引术收集卵母细胞并于 37°C 在 5% CO₂ 中在 Medi-Cult IVF 培养基浸油 (Medi-Cult) 中培养。在 hCG 后约 40 小时, 用最终浓度为 70,000 活动精子每毫升来授精卵母细胞-丘复合体 (oocyte-cumulus complex), 并培育过夜直至通过两前核的存在来确认受精 (授精后第 1 天)。在受精卵用于研究前, 将受精卵同在上在 70 μ l 的 Medi-Cult IVF 培养基浸油的液滴中培育。在授精后第 2 天转移最多 3 个胚胎, 将任何剩余的胚胎冷冻并存储于液氮中用于可能的将来用途。根据 HFEA 的指导, 胚胎只可存储 5 年, 因此每年 (on a yearly basis) 联系患者以确定他们是否愿意将他们的胚胎继续存储、放弃或捐赠用于研究。将这些捐赠用于研究的胚胎以干式运输 (in a dry shipper) 运输至 York 以用于本研究。

[0048] 使用 Sydney IVF 解冻试剂盒 (Cook, Queensland, Australia) 将胚胎解冻并置于浸矿油的 10 μ l EBSS 培养基液滴中约 3 小时, 该 EBSS 培养基补充有 0.5% 的 HSA, 1mM 的葡萄糖, 0.47mM 的丙酮酸 (pyruvate), 5mM 的乳酸 (lactate) 和氨基酸的接近生理的混合物 (a close to physiological mixture of amino acid) (Tay 等, 1997)。每个患者的胚胎在治疗组和所评估的胚胎的发育等级和阶段之间随机化 (Houghton 等, 2002)。然后将这些胚胎在空气中于 37°C 在含有 5% 的 CO₂ 和 20% 或者 5% 的 O₂ 的增湿气氛中在 4 μ l 的相同培养基液滴中单独地培养 24h (从第 2 天至第 3 天)。在培育后, 评估胚胎的形态学, 并将胚胎单独置于 10 μ l 预平衡的培养基液滴中, 并在 5% 或 20% 的 O₂ 下培育直至发育的第 5 天。将已用的培养基储存于 -80°C。又一次评估发育阶段和等级, 然后将胚胎在 5% 或 20% 的 O₂ 下的 4 μ l 预平衡的培养基液滴中单独放置 24h 直至发育的第 6 天。在将胚胎从液滴中移出之前, 评价胚胎发育阶段和等级。将已用的培养基储存于 -80°C。

[0049] 氨基酸分析

[0050] 将无胚胎的对照液滴在与含有胚胎的那些液滴相同的培养皿 (dish) 中培育, 从而允许在整个培养周期中氨基酸浓度的任何非特异性变化。解冻已用培养基, 并用 23 μ l 的 HPLC 级水稀释 2 μ l 等分试样。利用附接于 Jasco F920 荧光检测仪和 4.5x250mm 的 Hypersil ODS-16 柱 (Jones Chromatography) 的 Kontron500 通过反相 HPLC 进行氨基酸分析, 如前所述 (Houghton 等, 2002)。简单地说, 通过使 25 μ l 样品与等体积的试剂 (10 μ l 的 2-巯基乙醇和 5ml 的邻苯二甲醛 (OPA) 试剂) 自动反应来完成衍生化。以 1.3 毫升/分钟的流速操作洗脱梯度。溶剂 A 由 18ml 的四氢呋喃 (Fisher Chemicals), 200ml 的甲醇和 800ml 的乙酸钠 (83mmol/l, pH5.9) 组成。溶剂 B 由 800ml 的甲醇和 200ml 的乙酸钠 (83mmol/l, pH5.9) 组成。利用该方法不可能检测到脯氨酸和半胱氨酸。

[0051] 统计分析

[0052] 利用 Anderson-Darling 正态检验来分析所有的数据以确定它们是否为正态分布。利用 1-样品 t-检验或 1 样品 Wilcoxon 检验来检验氨基酸消耗/出现的数据不同于 0 的显著性, 这取决于该数据是否正态分布的。利用 Student's t-检验或 Mann-Whitney U 检验分析发育停止的胚胎和发育中的胚胎的氨基酸模式间的差异。通过 Student's t-检

验分析氨基酸消耗、出现、转化和余额之间的差异。

[0053] 结果

[0054] 第 2 天至第 3 天解冻胚胎的氨基酸转化

[0055] 培养基显著地消耗了丝氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸（图 1），同时出现天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。随后未能发育至胚泡期的解冻胚胎消耗了谷氨酰胺、精氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸，而生成了天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸。发育至胚泡期的那些解冻胚胎和胚泡形成前发育停止的那些胚胎之间在谷氨酰胺（ $P = 0.001$ ）、丙氨酸（ $P = 0.001$ ）、甘氨酸（ $P = 0.0025$ ）、谷氨酸（ $P = 0.016$ ）、精氨酸（ $P = 0.032$ ）和赖氨酸（ $P = 0.0448$ ）的利用上存在显著的差异（图 1）。

[0056] 出乎意料的是，随后未能发育至胚泡期的一群冷冻 / 解冻的第 2 天至第 3 天的胚胎比发育至胚泡期的那些含有更多的等级 I 胚胎（表 1），但是随后发育至胚泡的等级 I 胚胎与胚泡形成前发育停止的等级 I 胚胎之间，在每胚胎的裂球平均数上不存在差异。同样地，在这两组之间不存在总平均裂球数之间的差异（表 1）。

[0057] 总的来说，在胚泡期之前发育停止的胚胎在氨基酸转化、消耗（ $P = 0.011$ ）和生成（ $P = 0.009$ ）显著更多的氨基酸方面，比它们发育中的对等物（counterpart）在代谢上更活跃（图 2）。有趣的是，已发现发育中的胚胎在它们的氨基酸转化方面是平衡的，也就是说，消耗量等于生成量；然而发育停止的胚胎具有负的余额，也就是说，从培养基中消耗的氨基酸多于它们生成的氨基酸（图 2）。发育至胚泡期的那些胚胎和在胚泡形成前发育停止的那些胚胎之间，在从第 2 天到第 3 天谷氨酰胺、甘氨酸和丙氨酸的总和上存在着显著的差异（ $P < 0.001$ ）（图 3）。使用单独胚胎的谷氨酰胺、甘氨酸和丙氨酸的总和，可能以 91% 准确性预测哪些胚胎将发育至胚泡期（图 4）。

[0058] 当确定了等级 I 胚胎的氨基酸模式时，随后发育至胚泡期的那些胚胎与在胚泡形成前发育停止的那些等级 I 胚胎相比，在氨基酸消耗 / 出现上存在显著差异（图 5）。两组间具体的差异存在于赖氨酸（ $P = 0.014$ ）、甘氨酸（ $P = 0.024$ ）、色氨酸（ $P = 0.029$ ）、精氨酸（ $P = 0.035$ ）、谷氨酸（ $P = 0.0493$ ）和谷氨酰胺（ $P = 0.050$ ）的利用上。应注意的是：等级 I 发育停止的胚胎和发育中的胚胎之间，在裂球平均数上不存在显著的差异（表 1）。在总氨基酸的消耗、出现或者氨基酸的余额上，等级 I 胚胎不显示显著的差异（图 6）。然而，发育停止的等级 I 胚胎在氨基酸转化方面比发育至胚泡期的那些胚胎在代谢上更活跃。

[0059] 表 1：解冻后胚胎的等级分布和平均裂球数

[0060]

解冻等级	胚胎数	
	发育的	发育停止的
等级 I	6	13
等级 II	9	9
等级 II.5	6	2
等级 III	0	1
平均裂球数	3.76±0.53	3.12±0.25
平均等级 I 裂球数	2.67±0.62	3.00±0.28

[0061] 讨论

[0062] 在从培养基中的氨基酸消耗和氨基酸出现方面测定了冷冻解冻的人胚胎第 2 天至第 3 天的新陈代谢,并用于预测它们发育至胚泡期的能力。这是首次对冷藏人胚胎的能量代谢的研究。获得的氨基酸模式可用于预测哪个解冻胚胎将发育至胚泡期;该现象独立于第 2 天的胚胎等级和裂球数。具有发育至胚泡期能力的那些胚胎比发育停止的胚胎在代谢上更温和 (quiet),具有更低的氨基酸生成、消耗和转化速度。

[0063] 类似于 Brison 等 (2004) 的研究,冷藏胚胎的氨基酸模式研究还能预测植入和活的后代。这些研究者使用对从发育的第 1 天到第 2 天测得的 ICSI 胚胎的氨基酸模式的逆向分析 (retrospective analysis)。只基于形态学在第 2 天选择用于转移的胚胎,并发现天冬酰胺、甘氨酸和亮氨酸的转化与临床怀孕相关。具体地,它们也独立于已知的预测指标 (predictor) 如女性年龄、基础 FSH 水平、胚胎细胞的数目和等级。

[0064] 该技术提供了一种灵敏的方法,所述方法可容易地转化到 (translate into) IVF 临床,和被胚胎学家利用来选择有发育能力的解冻胚胎用于转移。氨基酸模式的使用已证明不但在逆向选择哪个冷冻解冻的胚胎将发育至胚泡期上有效,而且在给胚胎学家提供在一群最好等级 I 胚胎中对发育潜能进行区别的工具方面也是有效的。

[0065] 参考文献

[0066] Balen AH(2001).GnRH agonists and superovulation for assisted conception.Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America,12, 89-104.

[0067] Bourgain C 和 Devroey, P(2003).The endometrium in stimulated cycles for IVF.Human Reproduction Update,9,515-22.

[0068] Brison DR, Houghton FD, Falconer D 等 (2004).Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover.Human Reproduction,19,2319-2324.

[0069] Devroey P, Bourgain C, Macklon NS 和 Fauser BC(2004).Reproductive biology and IVF:ovarian stimulation and endometrial receptivity.Trends in Endocrinology and Metabolism,15,84-90.

[0070] Dulioust E, Toyama K, Busnel MC 等 (1995).Long-term effects of embryo

freezing in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A., 92, 589-93.

[0071] Edgar DH, Bourne H, Speirs AL 和 McBain JC(2000). A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. Human Reproduction, 15, 175-179.

[0072] Edgar, DH, Archer J 和 Bourne H(2005). The application and impact of cryopreservation of early cleavage stage embryos in assisted reproduction. Human Fertility, 8, 225-230.

[0073] El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K 等 (2003). Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. Fertility and Sterility, 79, 1106-1111.

[0074] Emiliani, S, Van den Bergh M, Vannin A-S, Biramane J 和 Englert Y(2000). Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Human Reproduction, 15, 905-910.

[0075] Ho, Y, Wrigglesworth K, Eppig JJ 和 Schultz RM(1995). Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. Molecular Reproduction and Development, 41, 232-238.

[0076] Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG 等 (2002). Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. Human Reproduction, 17, 999-1005. [Corrigenda(2003). Human Reproduction, 18, 1756-1757]

[0077] Houghton FD 和 Leese HJ(2004). Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, 115S, S92-S96.

[0078] Kowalik K, Palermo DG, Barmat L 等 (1998). Comparison of clinical outcome after cryopreservation of embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization. Human Reproduction, 10, 2848-2851.

[0079] Lane M 和 Gardner DK(2005). Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. Reproduction Fertility and Development, 17, 371-378.

[0080] Lesny P 和 Killick SR(2004). The junctional zone of the uterus and its contractions. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 111, 1182-9.

[0081] Lukassen HG, Schonbeck Y, van Lierop MJ 等 (2004). Hormonal stimulation for IVF treatment positively affects the CD56bright/CD56dim NK cell ratio of the endometrium during the window of implantation. Molecular Human Reproduction, 10, 513-20.

[0082] Pal L, Kovacs G, Witt B 等 (2004). Postthaw blastomere survival is predictive of the success of frozen-thawed embryo transfer cycles. Fertility and Sterility, 82, 821-826.

- [0083] Pegg DE(2005).The role of vitrification techniques of cryopresevation in reproductive medicine.Human Fertility,8,231-239.
- [0084] Rinaudo, P 和 Schultz RM(2004).Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos.Reproduction,128, 301-311.
- [0085] Rizos D,Gutierrez-Adan A,Perez-Garnelo S等(2003).Bovine embryo culture in the presence or absence of serum:implications for blastocyst development, cryotolerance,and messenger RNA expression.Biology of Reproduction,68,236-243.
- [0086] Tachataki, M, Winston RM 和 Taylor DM(2003).Quantitative RT-PCR reveals tuberous sclerosis gene,TSC2,mRNA degradation following cryopreservation in the human preimplantation embryo.Molecular Human Reproduction,10,593-601.
- [0087] Tay JI,Rutherford AJ,Killick SR等(1997).Human tubal fluid:production, nutrient composition and response to adrenergic agents.Human Reproduction,12, 2451-2456.
- [0088] Trounson A(1986).Preservation of human eggs and embryos.Fertility and Sterility,46,1-12.
- [0089] Ubaldi, F, Rienzi L, Baroni E 等(2004).Cumulative pregnancy rates after transfer of fresh and thawed embryos.European Journal of Obstetrics,Gynecology and Reproductive Biology,115, Suppl1 :S106-9.
- [0090] Van der Elst, J, Van den Abbeel E, Vitrier S 等(1997).Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates.Human Reproduction,7,1513-1521.
- [0091] Winston RML 和 Hardy K(2002).Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments? Nature Cell Biology,4(S1),S14-S18.

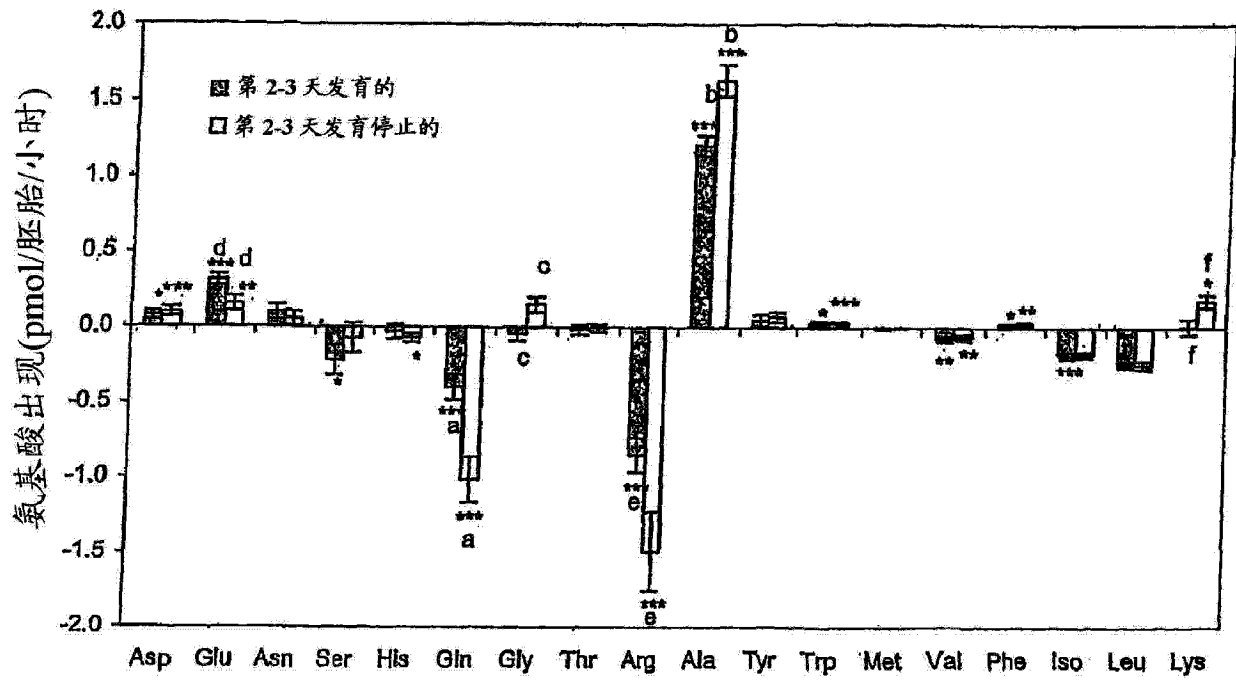


图 1

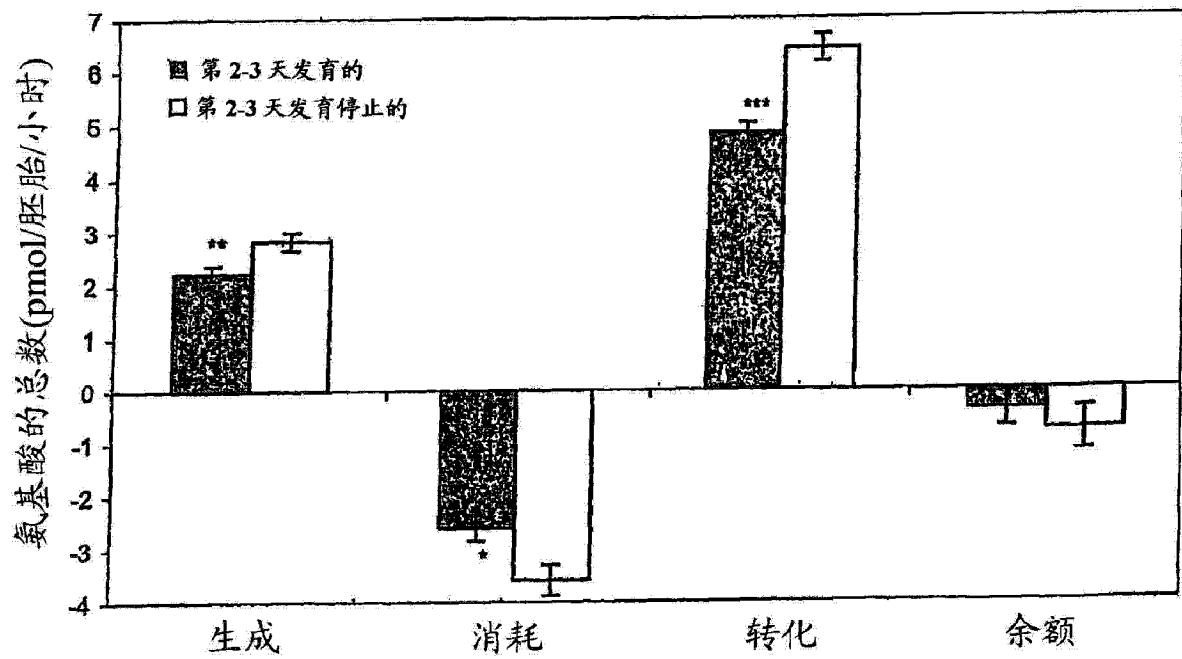


图 2

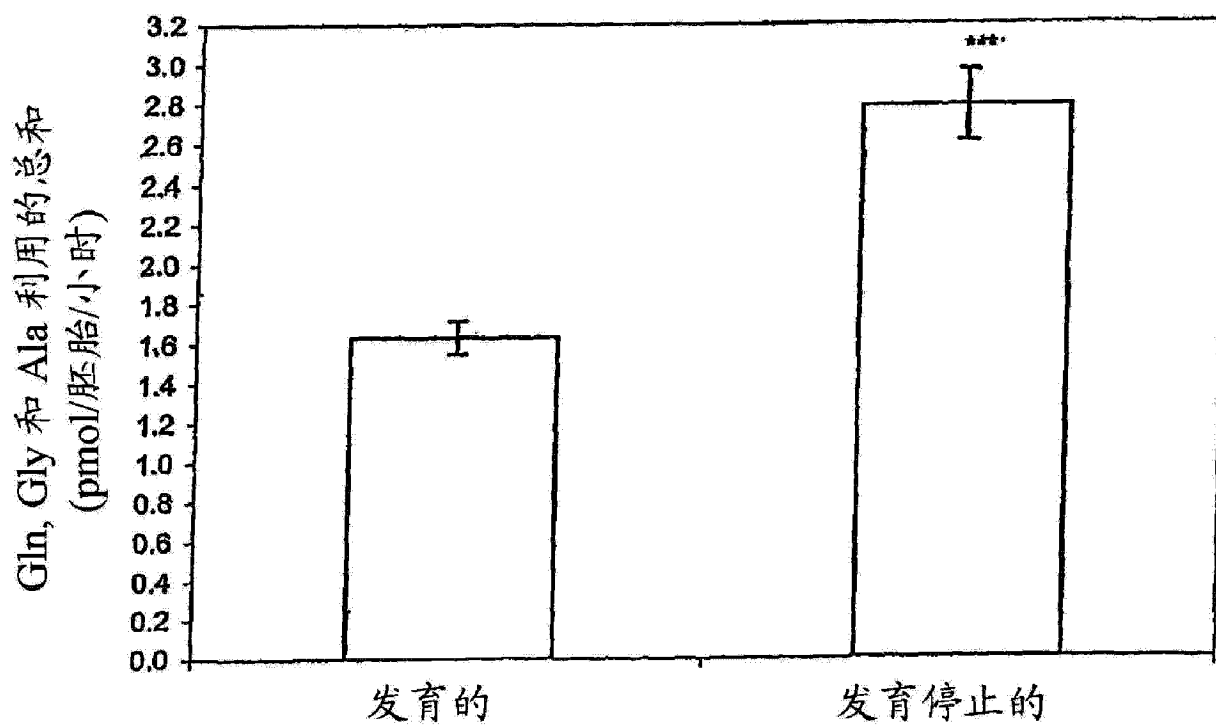


图 3

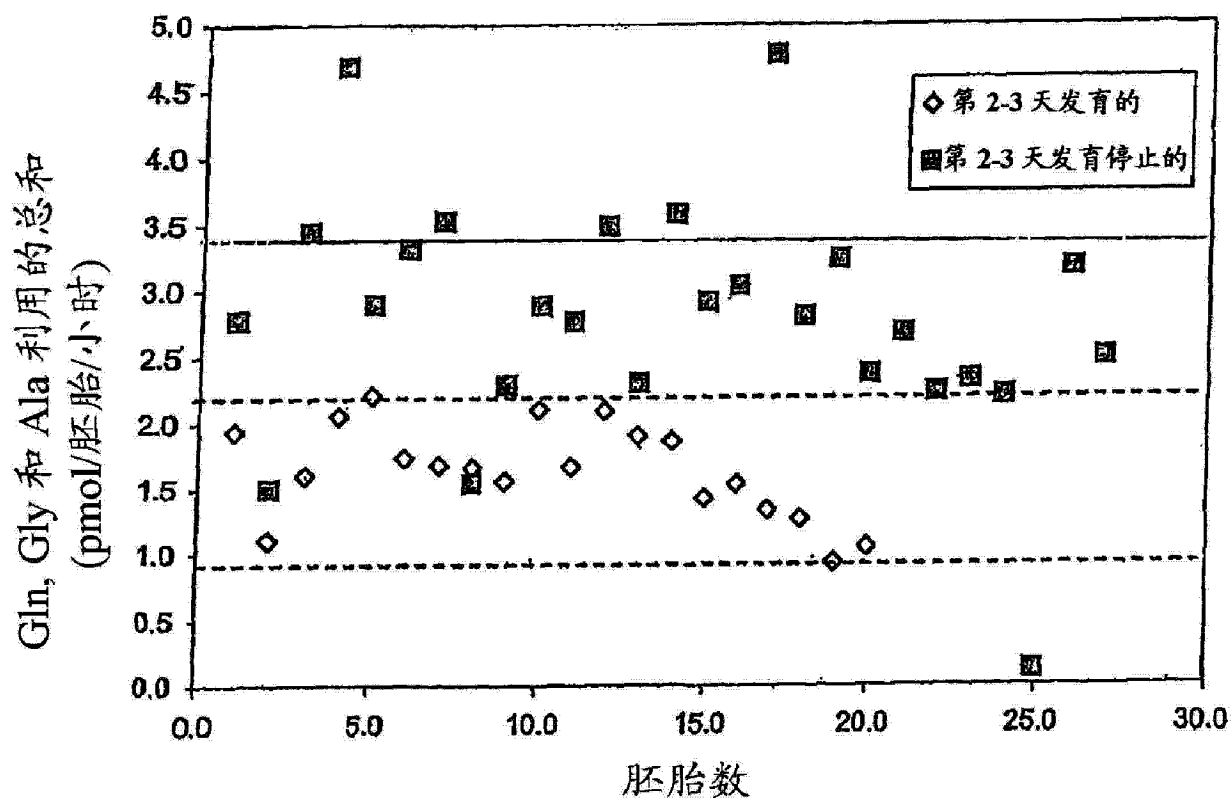


图 4

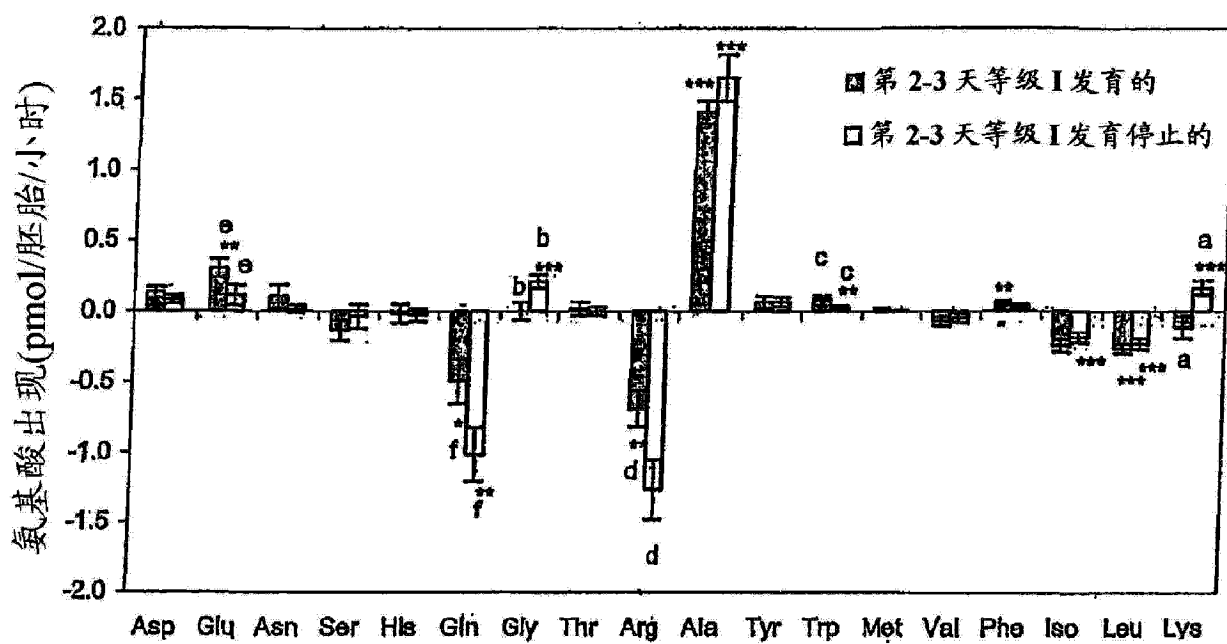


图 5

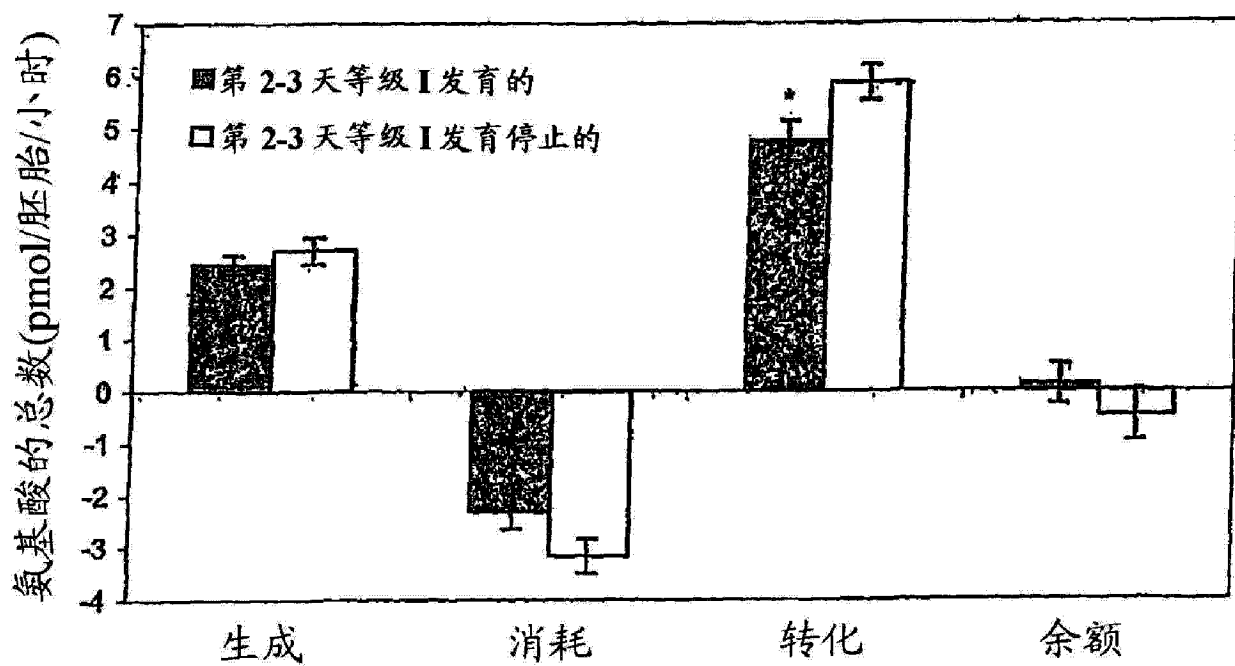


图 6