

人类生育力保存

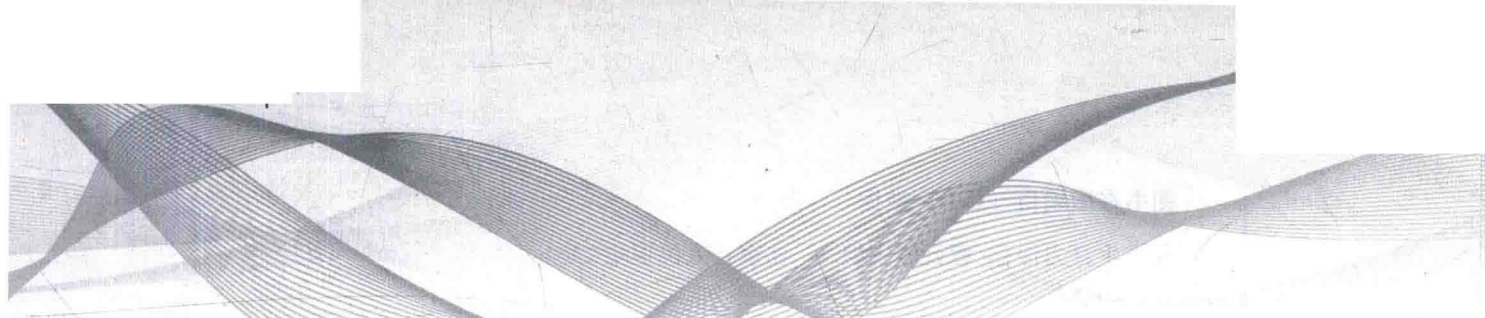
Human Fertility
Preservation

主编 © 曹云霞



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



人类生育力保存

主 编 曹云霞

副主编 乔 杰 刘嘉茵 陈子江 千日成

编 委 (以姓氏笔画为序)

于修成	王树玉	邓晓惠	邢 琼	向卉芬
许成岩	许孝凤	孙 赟	李尚为	李 铮
杨 芳	吴 娟	张云山	范立青	周 平
贺小进	徐玉萍	黄元华	章志国	魏兆莲

编 者 (以姓氏笔画为序)

王俊龙	文 燕	叶四云	许长龙	纪冬梅
杜天奇	李 梅	吴 欢	汪 燕	张静静
陈大蔚	陈蓓丽	罗桂英	赵 硕	郝 燕
徐千花				

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

人类生育力保存/曹云霞主编. —北京: 人民卫生出版社, 2015

ISBN 978-7-117-20793-5

I. ①人… II. ①曹… III. ①生殖医学
IV. ①R339.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 216122 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

人类生育力保存

主 编: 曹云霞

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 三河市宏达印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 889×1194 1/16 印张: 25 插页: 1

字 数: 774 千字

版 次: 2015 年 10 月第 1 版 2015 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20793-5/R · 20794

定 价: 98.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E - mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

主编简介



曹云霞

安徽医科大学校长,医学博士,主任医师,二级教授,博士生导师。安徽医科大学妇产科学系主任,安徽医科大学附属第一医院生殖医学中心主任。安徽省学术技术带头人,安徽省低温医学与人工器官工程技术研究中心主任;安徽省“115”产业创新团队“辅助生殖关键技术应用与推广创新团队”带头人。中华医学会生殖医学分会常务委员,安徽省生殖医学会主任委员。享受国务院特殊津贴,国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)有突出贡献中青年专家。全国优秀科技工作者,安徽省“五一”劳动奖章获得者,安徽省省级教学名师。主持包括国家重大基础研究计划、国家自然科学基金在内的国家级和省级课题 30 余项。获得省科技进步一等奖 1 项,二等奖 2 项,三等奖 1 项。获得省教学成果一等奖 1 项。发表 SCI 收录论文 60 余篇,核心期刊等论文 200 余篇。获得国家发明专利 1 项。担任 4 部国家卫生和计划生育委员会规划教材的副主编和编委。安徽省第九届、第十届政协委员,第十二届省人大常委会委员。安徽省妇联副主席(兼)。

序 一

我看了一些国内出版的关于生殖医学方面的书著,各有所长,各领风骚。而曹云霞教授领衔主编这部《人类生育力保存》,内容更加丰富、观念更加新颖,提出的问题更加令人思考。

生育力,或者作为一门学科,或称之生殖医学,是一个关乎人类繁衍、民族昌盛的决绝问题。人的自身未知数最多,而生殖过程尤为微妙复杂,或可认为医学之谜之最!

从性分化、性器官发育形成,从性腺、生殖细胞,从受精、受精卵,从胚胎发育、胎儿成熟,或妊娠分娩;有发育、解剖、生殖、病理、精神心理……有内分泌功能,必须回归于全身与整体,以及相互影响;也还必须落巢于家庭与社会。因为生殖活动是机体功能,因为生殖活动关乎配偶、家庭与社会。也因此,所谓“生育力的保存”是科学问题,更是民生问题。

1978年第一个“试管婴儿”(IVF-ET)路易·布朗诞生,这不仅仅是解决了一对夫妇不育之苦,也不仅仅是创造性地开辟了生育之路,而是表明科学家对生殖过程的深刻、细腻认识以及人工干预的成功。其划时代或里程碑式的意义乃在于此,接着各种人工助孕或辅助生育技术(ART)接踵而至。

各种“中心”如雨后春笋般在各种医院开放,人们甚至排起长队而翘首期盼。

这无疑令人振奋的,这也无疑是令人忧虑的,所谓喜忧参半。回顾生殖医学的发展史,几乎每一步都会遭遇质疑、争论,甚至批评、反对,包括诺贝尔奖金获得者爱德华(Robert Edwards)本人。几十年前,学者们已经提出“人的复制”,后来不仅有了体外受精胚胎移植,真的有了克隆技术、干细胞技术……,或者如何替代、减少、优化(3R)……。此时,生殖医学或辅助生育,或生育力保存,似乎面对的不是科学技术问题,而是伦理道德问题、社会法律问题,甚至哲学宗教问题。我们会思忖,医学打破了面对的自然规律(姑且不论这些现象和规律是如何形成,或是否可循,或是否应该改变),但也许会导引人类去抗拒某种必然。问题是,我们并不完全知晓这种必然的意义,或者是否是一种善意的扰乱,甚至这种“有效”可能只是暂短的取胜!

我们也不应怀疑科学与认知的进步,但哲学始源于医学,医学最终要归隐于哲学。让我们庆幸的是,上述的诸多问题都可以在本书中找到陈述,供我们学习、讨论和思索,这也是我愿意接受曹教授之邀作序的理由。严格地说,我是生殖医学的“业内门外汉”,虽然我一直强调生殖内分泌学是妇产科学的内科学基础,每位妇产科医生都应认真学习它;虽然我也写过内分泌与肿瘤(甚至一本书)以及多囊卵巢综合征与肿瘤等文章,但自知不是本领域的专家,只是感兴趣,也重视,常思考而已。

于是,上述的这些话,仅供书编著者、有关专家及同道们参考、思量。

是为序。

郎景和

二〇一五年十月

序 二

人类生殖器官的衰退比动物来得早,特别是女性。卵巢功能在40~50岁开始逐渐下降直至衰竭。人类是哺乳动物中唯一具有更年期特征的动物,新生女婴具有50万~100万个始基卵泡,这是不可再生的固定“资产”,从青春后期开始每月成熟排卵一个,同簇发育的卵泡闭锁耗竭数十至百个。真正的排卵生育期不过是二、三十年。现代社会人类的寿命不断延长,但是由于各方面因素影响,生育能力在下降,比如环境污染、精神紧张、炎症、手术、肿瘤放疗化疗后、遗传疾病、卵巢早衰、晚婚等成为当前不孕不育患者需要助孕的原因。体外受精与胚胎移植技术成为解决生育一个重要的治疗手段。各种衍生技术如冷冻技术、ICSI、PGD、卵子体外成熟等促进了辅助生殖技术的发展,但依然不能解决所有不孕不育问题。尽管近代技术大大提高了肿瘤患者的治愈率与生存率,但仍要面对卵巢早衰与生活质量下降问题,卵巢功能下降伴随的生育障碍问题尤为突出。国内外科学家已经开始卵巢干细胞的研究,但距离临床应用为期尚早。在保存生育力方面还是以配子及卵巢组织与睾丸组织的冷冻保存作为中心课题,尤其为年轻癌症患者带来储存孕育生命的希望。

我国实施辅助生殖技术过程从冷冻精子开始一直关注人类生育力保存。近10年间国内各中心低温冷冻技术尤其是玻璃化冷冻不断发展,囊胚、分裂胚复苏率提高,增进了IVF/ICSI-ET的临床妊娠率及活产率。曹云霞教授带领安徽医科大学生殖医学中心同道、研究生对低温冷冻技术进行了相关研究,从动物实验到临床实践,不断探讨对生物组织进行低温冷冻的安全性及可行性,以及技术的改进。他们的卵子玻璃化冻存技术已获得92%以上复苏率,积累了实践经验,丰富了理论知识,推动了国内冷冻技术发展,为实现卵子库建立奠定了技术基础。

《人类生育力保存》一书内容非常丰富,包含人类辅助生育技术的由来与发展、生育力保存的必要性及可行性、当今配子(卵子和精子)的冷冻、卵巢与睾丸组织的冻存、冷冻技术动物模型等,阐述了低温生物学实验理论的依据,探讨简便、快捷、高效、安全的生殖冷冻技术。本书编写云集了陈子江、刘嘉茵、乔杰、千日成等国内外优秀的生殖领域专家,学术观点迎合国际研究热点,极具临床指导意义,对国内人类生育力保存的研究与实践颇具挑战性,为辅助生殖技术同道们提供了一本在生育力保存研究与临床实践的优秀读物。

谨以推荐!

陈子江

二〇一五年十月

前言

笔者从事生殖医学事业近 20 载,经手诊疗患者无数,也处理过很多疑难病症,但感到最难以面对的就是已经失去配子产生能力的患者。当一再被“失独”母亲流着眼泪反复恳求,要求我们提供卵源;当七尺男儿因为“无精子症”自卑地低下头请求供精时,我一次次下定决心,要求自己应该做些什么,这就是编写这本《人类生育力保存》的动因和初衷。

在工作之余,我也对此问题进行了更多、更深的思考,形成了撰写本书的理由,并体会到做生育力保存工作的意义。

第一,人类生殖生育力保存是我国国情的需要。我国计划生育政策规定,一对夫妇生育一个孩子,这个基本国策对我国人口控制、对经济社会发展起到了重要作用,尤其是我国仍然是个发展中国家,对人口的宏观控制在相当一个时期内仍然很有必要,且随着经济社会的发展、对外改革开放与我国国民较为传统的思想的冲突日益明显,人口以及性别比的控制形势依然严峻。实施“计划生育,优生优育”30 多年来,独生子女家庭占据中国家庭的主要部分,独生子女享受到的生活条件和教育远比非独生子女优越。独生子女是家庭的“核心”,父母、祖父母、外祖父母都围绕这个“核心”生活,一旦失去这个核心,就等于家庭中的“希望完全破灭”。这个因疾病、意外和灾害等原因导致失去孩子的“失独”群体,有相当一部分女性年龄在 45 岁左右,往往已经处于或接近围绝经期,其男性伴侣的生育力也有显著下降,尤其是在遭受失去子女重创后,身体状况也急剧下降,再生育希望渺茫。在本书成稿之际,欣闻国家对原来的生育政策做了调整,实行“单独二胎”政策,这对原独生子女家庭确实是个“利好”消息,对我国的人口结构也将带来良性的变化。

第二,是女性生理特点所决定的。在生理状态下,女性一生中只有 400~500 个卵子排出,且随着年龄的增长卵泡不断消失。35 岁后卵泡耗竭加速并且卵子质量也在下降,这使得因年龄增大产生的不孕患者增多且高龄产妇的早期自然流产率也很高,获得健康孩子的几率逐渐减小。

第三,是现代人生活方式改变的需要。当今社会发展迅速,生活和工作压力明显增大,一些年轻夫妇迫于紧张的工作和生活,以及生育观念的改变,迟迟不愿生育,担心增加家庭和夫妻双方负担以及干扰“生活的自由”,然而当等到认为条件成熟想要生育时往往已失去了生育的黄金时期,生育力已明显下降甚至不育。

第四,是肿瘤患者治疗后对生育的需求。随着医疗保健的发展和检查手段的进步,中青年女性肿瘤检出率越来越高,女性肿瘤患者越来越多。但随着治疗手段的进步,治愈率也逐渐提高,同时治愈后的生育问题凸显出来。中青年女性可患各种恶性肿瘤,如乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、输卵管癌等生殖系统肿瘤,甲状腺癌以及消化道恶性肿瘤,这些肿瘤的放化疗对女性生殖功能都有致命的影响,可导致大多数患者不育。女性易患的一些非肿瘤疾患,如红斑狼疮、类风湿性关节炎、子宫内膜异位症、卵巢功能早衰、多囊卵巢综合征等,也都可以直接和间接导致生育力的下降和丧失。生育力的剥夺,使得患者生活质量明显下降,人生变得不再圆满。随着科学的进步,女性儿童恶性肿瘤的治愈率也逐渐升高,如霍奇金病, Wilm 病的长期存活率可达 85% 以上,而这些患儿经过放射治疗存活后的生育力几乎完全丧失。

第五,现代生活对男性生育力的影响因素增多。当今生活的快节奏、生活方式的改变使男性生育力有明显下降趋势。据报道,近半个世纪以来,人类的精液质量已有明显下降,环境因素对人类生殖的影响越来越受到人们的重视。污染问题、杀虫剂过度使用以及环境内分泌干扰物都是影响精子质量和数量的重要因素。



不良的生活习惯也是重要影响因素,如长期的烟酒史、桑拿、熬夜上网、频繁使用手机、喝可乐类饮料以及吸食毒品等,严重影响男性的生精能力;性行为过度、性伴侣过多、不洁性生活等导致的感染性疾病也严重影响男性生育力;物质生活的丰富、不良生活方式所致肥胖、高血压和糖尿病等也会导致性功能及生育力的下降。

综上所述,诸多因素影响人类生育力,而人类生育力是繁衍后代、保持生生不息的主要因素,是社会向前发展的物质基础。所以,保存人类生育力就显得尤其重要和必要。

本书云集了国内外生殖医学界的多位著名专家,他们既是生殖医学的实践者,也是生殖医学前沿技术的探索者,他们对本书的编写贡献了智慧和精力。从生育力保存的历史到最新的保存技术,从前沿的研究到临床的应用,从基本的配子、胚胎保存到生殖干细胞可能的应用前景都做了系统的阐述。在此,向各位编者表示崇高的敬意和衷心的感谢!一并感谢生殖医学中心所有参与编写的年轻博士和硕士们,感谢你们在如此繁忙的临床工作和科研之余,为本书的撰写做出的贡献,谢谢你们!

本书出版之际,恳切希望广大读者在阅读过程中不吝赐教,欢迎发送邮件至邮箱 renweifuer@pmph.com,或扫描封底二维码,关注“人卫妇产”,对我们的工作予以批评指正,以期再版修订时进一步完善,更好地为大家服务。

二〇一五年十月于合肥

目 录

第一篇 生殖医学的发展概况

第一章 人类生殖研究及应用概况	3	第二章 人类生育力保存概述	43
第一节 生殖医学的动物实验	3	第一节 人类生殖能力的损伤与评估	43
第二节 促排卵药物研究历史	5	第二节 人类肿瘤及相关疾病对生育力的影响	48
第三节 人工授精	8	第三节 人类生育力保存的意义	58
第四节 体外受精与胚胎移植	12	第四节 低温生物学的科学基础和原理	60
第五节 单精子卵胞浆内注射	21	第五节 低温冷冻方法	64
第六节 种植前遗传学诊断	24	第六节 冷冻保护剂在生育力保存中的应用	69
第七节 人工辅助孵出技术	29		
第八节 未成熟卵体外培养技术	32		

第二篇 女性生育力保存

第三章 女性生育力保存的现状	85	第三节 人卵巢组织冷冻技术的发展及其应用	124
第一节 女性生育力保存的必要性	85	第四节 卵巢组织的慢速冷冻	126
第二节 女性生育力保存的可能性	86	第五节 卵巢组织的玻璃化冷冻	128
第三节 女性生育力保存的途径	89	第六节 胎儿卵巢组织的冷冻	131
第四章 卵子的冷冻保存	95	第七节 全卵巢冷冻	135
第一节 卵母细胞的发生发育与生命周期	95	第八节 卵巢冷冻的影响因素	140
第二节 动物卵子的冻存技术	98	第六章 卵巢组织移植	152
第三节 成熟卵子的慢速冷冻	101	第一节 冻存卵巢的组织学检查	152
第四节 成熟卵子的玻璃化冷冻	105	第二节 冻存卵巢组织的体外培养	156
第五节 人未成熟卵子冷冻技术	107	第三节 卵巢组织库的建立	160
第六节 卵子分享技术与卵子库	109	第四节 卵巢组织移植与全卵巢移植	162
第五章 卵巢组织冷冻保存	118	第五节 卵巢组织移植后的功能学检测	167
第一节 卵巢的结构及功能	118	第六节 卵巢组织移植的影响因素	168
第二节 动物卵巢组织的冻存技术	120	第七节 冻存卵巢组织的临床应用	170



第三篇 男性生育力保存

第七章 男性生育力保存现状	183
第一节 男性生育力保存的必要性	183
第二节 男性生育力保存的可能性	185
第三节 男性生育力保存途径	188
第八章 精子冷冻保存	197
第一节 精子的发生发育与生命 周期	197
第二节 精子冷冻技术发展	201
第三节 人精子冻存技术	204
第四节 人类精子库的建立	210
第五节 供精志愿者精子的冷冻保存	211

第九章 睾丸组织的冷冻保存及应用	222
第一节 睾丸的发育	222
第二节 动物睾丸组织的冷冻技术	224
第三节 人睾丸组织冻存技术	228
第四节 精原干细胞培养	232
第五节 全睾丸冷冻	237
第六节 睾丸以及睾丸组织的移植	239
第七节 睾丸及睾丸组织移植影响 因素	242

第四篇 胚胎的冷冻保存

第十章 胚胎冷冻保存概述	251
第一节 受精与胚胎的形成	251
第二节 人胚胎发育各阶段及其特点	252
第三节 胚胎冻存技术的发展	257
第十一章 胚胎的慢速冷冻	263
第一节 胚胎慢速冷冻方法	263
第二节 胚胎慢速冷冻的复苏和培养	266
第三节 胚胎慢速冷冻与复苏的影响 因素	269

第十二章 胚胎的玻璃化冷冻	274
第一节 胚胎玻璃化冷冻方法	274
第二节 胚胎玻璃化冷冻保护剂	279
第三节 玻璃化冷冻后胚胎的复苏	281
第四节 影响胚胎玻璃化冻融效果的 因素	283

第五篇 多潜能干细胞冷冻保存

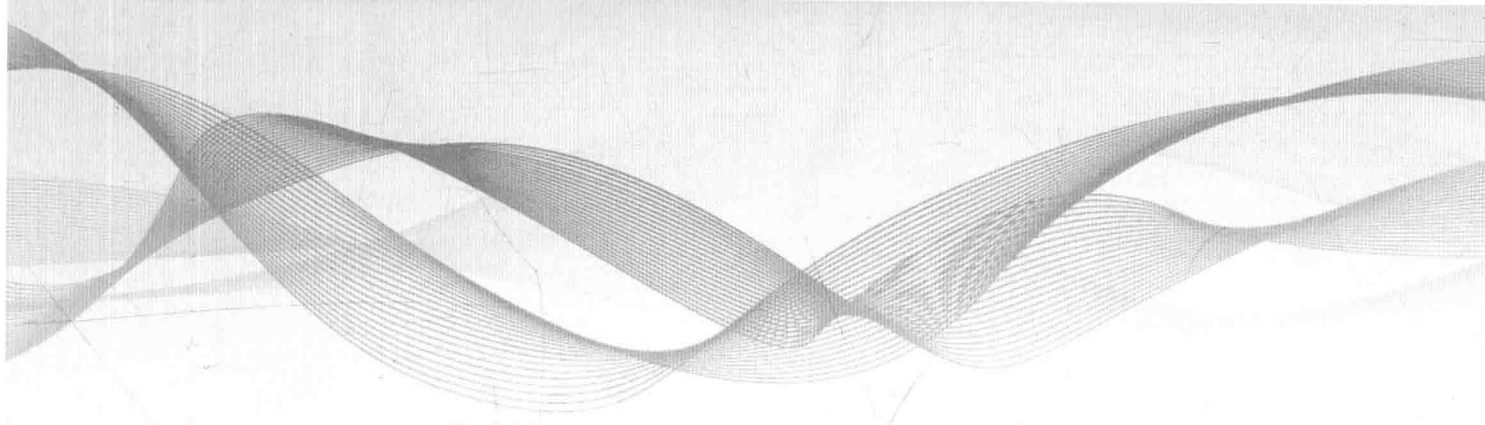
第十三章 多潜能干细胞概况	291
第一节 多潜能干细胞及其分类	291
第二节 动物多潜能干细胞研究历史	295
第三节 全能干细胞向生殖细胞的发育 分化	297
第四节 诱导性多能干细胞向生殖细胞 分化	301
第五节 胚胎干细胞研究概况及核移植 技术	304
第六节 全能干细胞发育分化在生殖 医学的应用	310

第十四章 多潜能干细胞的冷冻保存	319
第一节 人类多潜能干细胞冷冻保存在 生殖中的意义	319
第二节 多潜能干细胞冷冻保存与 复苏	320
第三节 多潜能干细胞冻融技术的影 响因素	325



第六篇 人类生育力保存的伦理与管理

第十五章 人类生育力保存的管理	331	第十六章 人类生育力保存的伦理	357
第一节 卵子冷冻和卵子库的管理	331	第一节 人类辅助生殖技术伦理研究	
第二节 卵巢组织冷冻的管理	337	进展	357
第三节 精子库及睾丸组织库的		第二节 各国辅助生殖技术伦理规范	360
管理	339	第三节 我国辅助生殖技术伦理规范	366
第四节 干细胞临床应用研究及其冷冻		第四节 生育力保存的伦理问题	373
管理	349	第五节 干细胞发育分化以及保存的伦理	
		问题	379
中英文名词对照索引			384



第一篇 生殖医学的发展概况

第一章 人类生殖研究及应用概况

第一节 生殖医学的动物实验

自 20 世纪 50 年代初“实验动物科学”这个名称诞生以来,各个领域的研究者们对实验动物本身和动物实验过程中很多重要因素进行了广泛研究,积累了大量资料,实验动物科学已成为一门具有独立理论体系的重要学科,是现代科学技术中不可分割的重要组成部分。实验动物医学的最终目的就是要通过对动物生命现象的研究,进而推广到人类,探索人类的生命奥秘,控制人类的疾病和衰老,提高人类生存质量,延长人类寿命。其中实验动物科学中较为重要的内容之一就是比较医学(comparative medicine)。比较医学是对动物和人类的健康与疾病进行对比研究,以探讨和阐明人类疾病本质的一门新兴边缘学科,对动物和人类的基本生命现象,特别是各种疾病进行类比研究是这门学科的主要特征。目前已形成比较解剖学、比较生理学、比较病理学、比较外科学等学科分支,采用实验性(experimental)和自发性(spontaneously occurred)动物疾病模型,研究人类疾病的发生、发展过程,探讨诊断治疗措施、宿主抵抗力机制、药物/致癌物质作用机制、残留毒物试验等,为人类健康服务。

生殖医学研究也需要动物实验。体外受精与胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)技术的发展可以追溯到 19 世纪末,早在 1890 年,Heape 从刚刚受孕的兔子输卵管中取出早期胚胎,并移植到其他兔子输卵管中使其孕育。1978 年 7 月 25 日,世界上首例经体外受精与胚胎移植受孕的婴儿 Louise Brown 在英国出生,该试管婴儿的诞生是基于美籍华人生物学家张民觉于 1959 年在动物实验基础上进行的开创性研究。他在研究家兔体外受精时发现,雄兔精子必须在雌兔体内发生某些变化后才具备使卵细胞受精的能力。同年,澳大利

亚学者奥斯汀博士在其他动物实验中也发现了同样的现象,并将该现象称之为精子获能(sperm capacitation)。之后生殖学界将他们的发现命名为“张-奥斯汀原理”,即从兔子交配后回收的精子 and 卵子在体外受精结合,然后再将受精卵移植到其他兔子输卵管内,产生出正常的幼兔。随后,在掌握家兔精子体外获能的方法后,张觉民和 Pincus 合作成功完成了兔子的体外受精实验,并将兔子的胚胎移植到其他兔子输卵管内,并诞生了正常幼兔。这项实验成为体外受精研究的先驱,动物实验结果为后来的体外受精-胚胎移植技术的发展和“试管婴儿”的诞生打下了坚实的基础。

从上述动物实验结果分析推论后再应用到人的实验研究模式经实践证明是可行的。类似的例子很多,例如毒性实验采用的实验动物作为正常人群的模型;又如,药理或者一些药物试验中,使用自发或者诱发疾病的动物模型作为人的相似疾病的模型。因为人与动物之间的生殖生理状况有很多相似之处,有共同的进化起源,因此把人和动物的生理病理现象加以比较分析有助于揭示生命的本质和遗传的奥秘。同样可以依据这种进化上的同源性和遗传上的同质性在实验动物体上复制人类疾病模型,进而研究有效的治疗措施。但有时也因存在局限性而出现巨大差异,即使我们使用与人生理较为接近的种系,也可能出现与人极为不同的反应。在人类不同种族之间同样也会出现不同的反应,甚至同一种族中不同个体之间也会有差异。实验所用到的动物,包括从原始生物变形虫到后生动物灵长类猿猴。但是,从繁多的动物中选择适宜的动物进行实验至关重要。首先,要选择与人的生物学特性非常接近的动物;其次,要易于获得且饲养管理经济方便。目



前,最常用的是哺乳动物,特别是啮齿类中的大鼠、小鼠和兔子等。但有时也会用到与人类生物特性更为接近的动物,如猩猩和猴子等。动物实验是测试某种物质通过动物获得生物学应答。但是,动物对某一试验的生物学应答取决于内在和外在各种综合因素。内在因素决定了实验动物质量,在试验中外在因素对实验的结果有较大的影响,因此我们只有对动物质量严格要求,对饲养繁殖统一规范管理,才能取得精确可靠的动物实验结果。

随着生殖医学的发展,辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)经过 30 多年的发展已经日趋成熟,为众多不孕不育患者带来了希望。单精子胞浆内注射技术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)是将单个完整精子或精子细胞核注入卵周隙或卵质中,激活卵母细胞并完成受精作用,其特点是显微受精过程不受精子的数量、活力和形态等因素的影响,这一突破性的观念首先在实验小鼠中取得成功,移植这种受精卵获得正常的小鼠后代。1993 年,我国通过该技术首次获得正常的仔兔。我国大陆首例 ICSI 试管婴儿于 1996 年 9 月 30 日在中山医科大学第一附属医院生殖中心诞生。自通过 ICSI 技术获得“试管婴儿”出生以来,ICSI 技术现在已经发展成为治疗部分男性不育症的理想手段。调查显示,在男性不育症中,约 10% 患者为无精子症,却能产生正常的变态前的圆形精子细胞。那么,单倍体的圆形精子细胞能否像精子一样参与基因组的配合和胚胎发育呢? 1993 年, Ogura 和 Yanagimachi 将仓鼠圆形精子细胞核注入成熟卵母细胞中,观察到了雄原核形成及其 DNA 合成,并最终能与卵母细胞染色体配合,由于技术原因,研究者没能检测这种精子细胞核受精的仓鼠卵母细胞是否能正常发育。为了减轻由于注射对卵母细胞造成的机械损伤, Ogura 分别将仓鼠和小鼠的圆形精子细胞注入卵周隙,然后加一直流电脉冲,使精子细胞融入卵母细胞,分别获得 20% ~ 40% 和 10% 的融合率,并研究了融入卵母细胞的精子细胞核的行为。利用电融合的方法,在 1994 年出生了首例圆形精子细胞受精的小鼠,证明了圆形精子细胞具有与精子同样的发育潜能,1995 年人圆形精子注射(round spermatid injection, ROSI)和长形精子注射(elongated spermatid, ELSI)相继取得成功,给非梗阻性无精子患者带来了很大希望。

随着科学技术的飞速发展以及多学科之间的相互渗透,发育遗传学、细胞工程学等学科分支在生殖

医学中扮演着日趋重要的作用,核移植、克隆技术、胚胎干细胞和基因工程技术为辅助生殖提供了全新的方法和思路,成为辅助生殖技术未来发展的趋势和前景,为困扰人类生殖医学领域的众多难题带来了崭新的希望。克隆(cloning)在生物学中是指一个细胞以无性生殖的方式产生一群细胞或一群个体,这些细胞和个体具有完全相同的遗传性状。早在 1938 年,德国著名胚胎学家 Spermann 根据所有胚胎细胞具有与受精卵完全相同的发育能力的观点,提出分化的细胞核移入卵母细胞中能指导胚胎发育的设想。直到 1952 年美国科学家 Brigg 和 King 进行首次细胞核移植,将美洲豹蛙囊胚期细胞核移入去核的卵中,正常卵裂发育成蝌蚪,为哺乳动物细胞核移植技术奠定了基础。1963 年,英国生物学家 Haldane 在一次演讲中首次提出克隆概念以后,该技术得到不断完善和发展。1997 年,英国罗斯林研究所报道了成年母羊乳腺上皮细胞为核供体成功获得世界上首例体细胞克隆羊“多莉”。这一技术的成功实现,对于畜牧业生产、科学实验和发育生物学的基础研究等均具有重要意义。克隆技术可以挽救、保护多种濒危动物;可以为器官移植患者提供所需的组织和器官;可以为科学家提供更合适的动物,减少科学研究中所需实验动物的数量。继克隆羊“多莉”诞生不久,1998 年罗斯林研究所的科学家 Wilmut 等以含人凝血因子 IX 的胚胎为核供体,获得了表达人凝血因子 IX 的转基因克隆羊“Polly”,为临床治疗血友病提供了新的途径和方法,这就是所谓的转基因动物。转基因技术的成功应用,对部分疾病的治疗具有重大意义。目前,可供移植的人体器官不足一直是困扰医学界的难题,利用转基因动物可以生产人体器官,进行异种移植;也可以建立人类疾病的动物模型,为研究人类疾病提供实验材料,能够提高结果的可靠性,能够更准确地了解疾病病因和发展过程,从而能够达到治愈疾病为人类造福的目的。

自 19 世纪中期,以动物实验为主要内容的实验医学问世之后,生物医学得到迅速发展。生物医学的每一次重大发展与进步,都与动物实验息息相关,动物实验在整个生物医学发展中占有重要地位。同时,动物实验对生殖医学的发展也起到了不可忽视的作用。但是随着动物保护的兴起,动物实验带来了许多伦理方面的思考,比如动物权理论、动物福利法等。这就要求我们医学工作者应以科学、人道、认真的态度来进行动物实验。



动物实验是医学研究必不可少的重要手段和方法,同时,动物实验也必不可少地给动物带来一定程度的恐惧、疼痛,甚至献出生命。1959年,英国动物学家 Russell 和微生物学家 Burch 在他的《人道试验技术的原则》一书中提出“3R”原则,即替代(replacement)、减少(reduction)、优化(refinement)。替代,即在保证实验结果可靠的前提下,用非生命材料替代有生命材料、用低等动物替代高等动物、用动物的部分组织器官替代整体动物等;减少,即反复利用或不同试验连续使用一批动物,相对减少实验动物的用量,尽量减少在实验中动物的痛苦等;优化,即优化实验设计和伦理审查,减少实验动物的数量,减少非人道程序的影响程度与范围。尽管目前有些科学家对此有不同看法,也有些学者有所补充,但“3R”原则已经成为动物实验的职业道德标准,在实

际研究工作中被广泛应用,对推动生命科学及其相关学科研究的发展起到了重要作用,并成为实施实验动物权益伦理的核心。作为一名医学科技工作者,我们既要认识到动物实验是医学研究的重要手段和方法,也要正确认识实验动物的生命特征;既要不断地进行动物实验为人类生命健康作出更大的贡献,又要通过科学、有效、经济、人道的方法,尽量减少实验动物的痛苦。因此,善待实验动物,维护实验动物权益伦理是每一个医学科技工作者的责任,我们要树立科学维护实验动物权益伦理观,又要保障实验动物生命全过程都能得到最基本的权益伦理待遇,努力遵循“3R”原则,科学、人道地使用实验动物,使生殖医学的研究与人类道德文明同步和谐发展。

(曹云霞 徐千花)

第二节 促排卵药物研究历史

1978年世界首例采用自然周期排卵的试管婴儿诞生,使生殖内分泌学取得了划时代的进展。随后报道采用氯米芬(枸橼酸氯米芬,克罗米芬)和人绝经促性腺素诱发排卵,旨在获得更多的成熟卵子,提高 IVF-ET 成功率。半个世纪以来,促排卵药物的诞生及推新使得从自然周期到诱发排卵直至当今的控制性超排卵技术成为试管婴儿的核心技术之一,极大的提高了 IVF-ET 成功率。

一、非固醇类雌激素类似物

(一) 氯米芬

氯米芬(clomiphene, CC)于1956年首次人工合成,1960年开始在临床应用,1967年美国食品药品监督管理局(FDA)批准和推荐的剂量为50~150mg/d,连用5天,由于其价廉,使用方便、安全、有效,为应用最广泛的促排卵药,是诱导排卵的一线口服药物。

1. 作用机制 氯米芬具有抗内源性雌激素与微弱雌激素的双重活性。一方面,氯米芬作为抗雌激素可直接作用于下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)神经元,通过抑制内源性雌激素对下丘脑的负反馈作用,间接促进 GnRH 释放,刺激卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)分泌,兴奋卵巢活性,促进卵泡发育;另一方面,氯米芬的弱雌激素活性,可直接作用于垂体和卵巢,提高其敏感性和反应性,增加性激素的合成和分泌,促进雌二醇(E_2)的正反馈效

应,诱发垂体 LH 峰而促发排卵。氯米芬只能对已发育的卵泡起刺激作用,因而必须在体内有一定内源性雌激素水平的作用下才能发挥促排卵作用。如有月经周期、孕激素试验阳性者,或血 $E_2 \geq 100\text{pg/ml}$ 者等。

2. 适应证 氯米芬无孕激素、糖皮质激素、雄激素及抗雄激素作用,对肾上腺及甲状腺功能无影响。因此,迄今为止,氯米芬仍为临床上首选的诱发排卵药物。主要适应证包括:①排卵障碍如多囊卵巢综合征(PCOS);②无排卵性功血;③因下丘脑功能性闭经、口服避孕药等原因引起的继发性闭经;④黄体功能不全;⑤助孕技术中为获得更多的卵细胞,与其他药物联合应用诱发超排卵;⑥男性少精子及无精子症。

3. 使用方法 月经周期或撤退性出血第3~5天开始,每天50mg,共5天。若连用3个周期卵泡发育不良,按每次50mg方式逐次增加用量,加量2~3个月无效则继续依次加量,每天最大剂量不宜超过150mg。为了提高排卵率及妊娠率,可以和其他药物联合应用,如氯米芬+hCG、氯米芬+雌激素、氯米芬+溴隐亭、氯米芬+人绝经促性腺素(hMG)等。

4. 治疗效果 排卵率50%~96%,平均80%,妊娠率11%~65%,平均40%。每个诱发排卵周期妊娠率可达35%~65%,与正常妇女自然周期妊娠率相似,但也可引起多胎妊娠发生率增加,偶见卵巢



过度刺激综合征 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)。

(二) 他莫昔芬

他莫昔芬 (tamoxifen, TMX) 与 CC 一样均是选择性雌激素受体抑制剂, 其诱发排卵的排卵率与妊娠率与 CC 无明显差异, 用药方法与 CC 相同, 一般于月经第 3~5 天开始, 每天口服 20~40mg, 共 5 天, 主要用于月经稀发的无排卵患者和对 CC 无反应的患者, 排卵率 60%~80%, 妊娠率 10%~56%。副作用主要有: 经量减少、粉刺、体重增加、潮热、头晕等, OHSS 少见。

二、芳香化酶抑制剂

来曲唑 (letrozole, LE, 国外制剂为 femora, 弗隆) 系非甾体类第 3 代芳香化酶抑制剂, 为人工合成的三苯三唑类衍生物。该药最早用于绝经期乳腺癌患者, 1997 年 LE 首次应用于动物促排卵研究, 2000 年首次报道将其应用于人类促排卵, 获得良好疗效, 并证实了 LE 有类似 CC 的促排卵作用。此后国外多家生殖中心的临床研究也肯定了 LE 的促排卵疗效。目前由于其促排卵的机制与优越性, LE 已成为新一代促排卵药物。

1. 作用机制 LE 可阻断雌激素的产生, 解除雌激素对下丘脑垂体性腺轴的负反馈抑制作用, 促使内源性促性腺激素分泌增多, 刺激卵泡发育。同时, 在卵巢内部, LE 于卵巢水平阻断雄激素向雌激素的转化, 导致雄激素在卵泡内积聚, 从而增强 FSH 受体的表达, 扩大 FSH 效应, 并促使卵泡发育。此外, 卵泡内雄激素的蓄积可刺激胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) 及其他自分泌和旁分泌因子的表达增多, 在外周水平通过 IGF1 系统提高卵巢对激素的反应性。

2. 适应证 主要用于 CC 治疗反复失败患者、PCOS 患者, 但下丘脑性无排卵或卵巢衰竭无排卵不育妇女一般不采用。此外, LE 可以提高卵巢低反应者对 FSH 的反应。

3. 使用方法 月经周期或撤退性出血第 3~5 天开始, 每天 2.5mg, 共 5 天。若连用 3 个周期卵泡发育不良, 则改为每天 5.0mg, 共 5 天。

4. 治疗效果 LE 治疗后的每周期妊娠率 14%~21%, 不产生 OHSS, 对子宫内膜容受性影响小, 更有利于胚胎着床, 降低流产率。

三、促性腺激素

促性腺激素 (gonadotropin, Gn) 包括卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 及人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG)。FSH 和 LH 均由垂体产生, 绝经期妇女尿液中含有大量 FSH 和 LH。目前应用的促性腺激素有从绝经妇女尿液中提炼出来的人绝经后促性腺激素 (human menopausal gonadotropin, hMG)、纯化的人卵泡雌激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 及重组人卵泡刺激素。

1959 年以色列人率先将 hMG 应用于临床诱发排卵并获妊娠足月分娩, 此后由于药物来源丰富和价格低廉应用较为广泛。20 世纪 80 年代国内已开始生产和应用。每支 hMG 含 FSH 及 LH 各 75IU。由于 hMG 中所含 LH 对诱发超排卵不利, 1983 年开始开发纯尿 FSH 制剂, 进行纯化后每支含 FSH75IU, LH<1IU。目前市场上有国产的高纯尿促性素和进口的高纯尿促性素。近年来, 通过 DNA 技术生产基因重组人 FSH 制剂进一步降低了 LH 的含量, 每支含 FSH75IU, LH<0.001IU, 且不含其他蛋白质, 可皮下注射。1992 年报道经该药治疗第 1 例婴儿成功诞生, 其具有高纯度、高效价和适宜大生产等优点。人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 是由胎盘产生的促性腺激素, 目前有从孕妇尿中提取的 hCG 及基因重组产生的 hCG。1994 年重组 LH 问世, 1997 年使用全部基因重组产品的婴儿诞生。

1. 作用机制 FSH 直接促进窦前卵泡及窦状卵泡的生长发育, 对卵泡的募集、生成及成熟有重要作用, FSH 还可激活颗粒细胞芳香化酶, 促进 E_2 的合成与分泌, 进而促进子宫内膜的增殖, FSH、LH 协同作用, 刺激卵泡内各种细胞的增殖和分化, 刺激卵泡的发育, 用于诱发排卵及超排卵。LH 在卵泡期刺激卵泡膜细胞合成雄激素, 为 E_2 合成提供底物; 排卵前促使卵母细胞进一步成熟及排卵, 黄体期维持黄体功能, 促进孕激素、雌激素的合成和分泌。而 hCG 具有 LH 的生物活性, 一次大剂量用药可促发卵泡成熟及排卵, 并可支持黄体功能。

2. 适应证 Gn 适用于下丘脑-垂体-卵巢轴 (HPOA) 功能低下或 CC 治疗无效者, 分以下三类:

(1) 下丘脑-垂体功能衰竭, 低 Gn 和 E_2 。下丘脑-垂体功能衰竭临床表现为原发性或继发闭经, 伴低内源性 Gn (FSH、LH) 和 E_2 , 其 PRL 浓度正常, 下