

A Color Atlas for
Human Assisted Reproduction

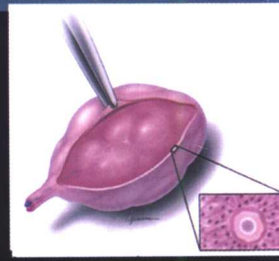
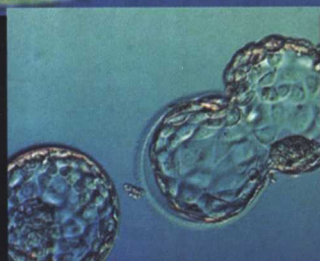
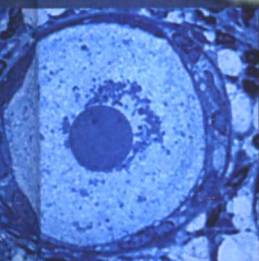
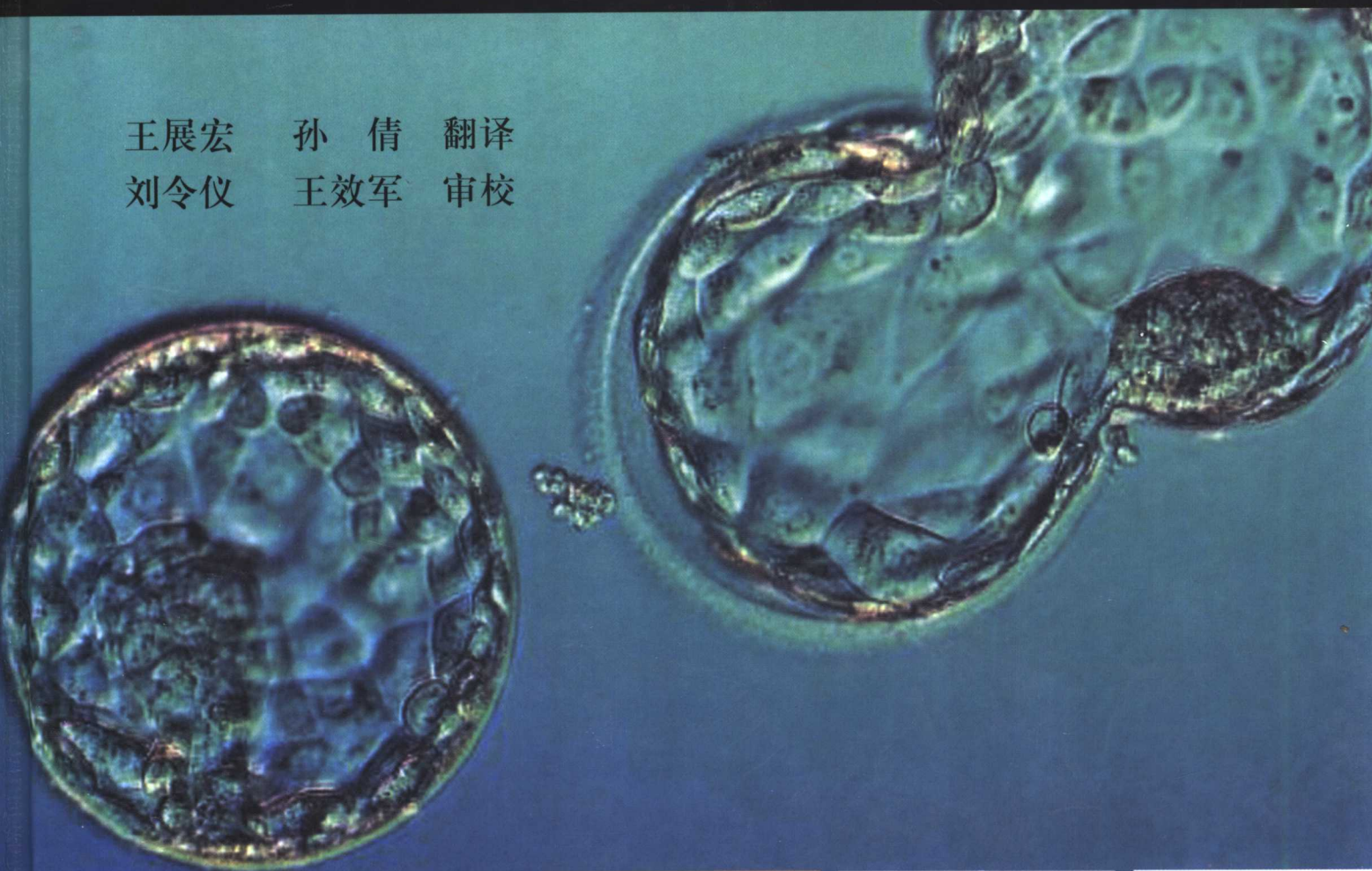
Laboratory and Clinical Insights

〔美〕Pasquale Patrizio · Michael J. Tucker · Vanessa Guelman 编著

人类辅助生殖彩色图谱

〔实验室和临床观念〕

王展宏 孙倩 翻译
刘令仪 王效军 审校



Lippincott Williams & Wilkins 授权
天津科技翻译出版公司出版

人类辅助生殖彩色图谱： 实验室和临床观念

A Color Atlas for
Human Assisted Reproduction
Laboratory and Clinical Insights

[美] Pasquale Patrizio
Michael j. Tucker 编著
Vanessa Guelman

翻译 王展宏 孙 倩
审校 刘令仪 王效军

Lippincott Williams & Wilkins Inc. 授权
天津科技翻译出版公司出版

著作权合同登记号:图字:02-2004-3

.....
图书在版编目(CIP)数据

人类辅助生殖彩色图谱:实验室和临床观念/(美)帕特里奇奥(Patrizio,P.),
(美)图克尔(Tucker, M.J.), (美)格尔玛(Guelman,V.)编著;王展宏,孙倩译.
天津:天津科技翻译出版公司,2005.1

书名原文: A Color Atlas for Human Assisted Reproduction: Laboratory and
Clinical Insights

ISBN 7-5433-1819-9

I. 人... II. ①帕... ②图... ③格... ④王... ⑤孙... III. 试管婴儿-技术-图
谱 IV. R321-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 087032 号
.....

Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins Inc.

All rights reserved.

中文简体字版权属天津科技翻译出版公司。

授权单位: Lippincott Williams & Wilkins Inc.

出 版: 天津科技翻译出版公司

地 址: 天津市南开区白堤路 244 号

邮政编码: 300192

电 话: 022-87894896

传 真: 022-87893482

网 址: www.tsttpc.com

印 刷: 山东新华印刷厂临沂厂

发 行: 全国新华书店

版本记录: 889×1194 16 开本 16.5 印张 488 千字

2005 年 1 月第 1 版 2005 年 1 月第 1 次印刷

定价: 148.00 元

(如发现印装问题,可与出版社调换)

序言(一)

在过去的 40 年间,生殖医学实践发生了非常显著的戏剧性的变化。实际上,我们对不育症的治疗手段不乏一些革命性的改变。在这一发展过程中,每项新的发明均成为下一项的基石。例如,可以想见,上个世纪中叶,当用做不育症治疗基础的人体排卵内分泌学知识是非常有限的,那时有关激素作用机制的知识至多是推测而来的,然而,这些已具备的有限的信息确实至少带来了生殖医学的一项重大突破——口服避孕药的研制成功。

几乎在同一时期,使用来源于非人类物种的促性腺激素未能对无排卵性不孕症患者刺激排卵。直至人体来源的卵泡刺激素具备以后才可以以可预料的方式诱导排卵。当用于排卵正常的妇女时,很快便明显地发现,在一个特定的周期内会有数个含卵子的卵泡可被挽救,导致多发排卵。这项突破使自一个以上的卵泡获取卵子成为可能,而且可以在受控制方式下应用于体外操作。对这些标本做体外观察,使人们对与卵泡内卵子成熟有关的活动的控制有了更精确的了解。

在体外受精(IVF)技术发展的早期阶段,该领域中的进展有赖于对愿意尝试新治疗方法的输卵管受损患者的观察。体外受精临床应用上的进展总的说来是通过反复试验取得的。适时地,人们开发了有效的排卵诱导方案,且用于卵子回收的方法得到改善。同时,用于创造受精和早期发育的适宜培养基的实验室技术亦得到不断地改进。在人体中实施的体外受精为对先前难以接近的,处于输卵管隐窝深处的过程做详细观察创造了条件。在这一临床进展迅速及成功率不断提高的时期内,以下情形变得清晰起来,即人们可以有效地探索和证实该过程的形态学特征——即伴随卵子成熟,受精及早期发育的某些结构改变。由 Arthur Hertig 和 John Rock 所做的引人入胜的工作代表了人们在此领域的早期成就,他们从接受必要的子宫切除的患者中采集了体内受精的卵子和胚胎。他们使用光镜证实了他们的所见,并提供了一些首次报告的人体卵子、输卵管内胚前期阶段和发育初期 16 天内的植入胚胎的图像。数年之后,电子显微镜由某些该领域的先驱,如 Pierre Soupart, Luciano Zamboni, 和 Alex Lopata,应用于卵子的研究。

自从这些早期观察结果取得以来,成像技术亦有了显著的进展。这可通过本书的作者,Pasquale Patrizio, Michael Tucker 和 Vanessa Guelman 收集的极佳的实例得到证实,他们邀请了一些该领域的世界级专家为这种尝试出谋划策。从受精过程本身这一主题切入,我们被一些从体外受精角度阐释精卵相互作用的文献资料所吸引。并使用一些本身质量极佳的照片和图片作为阐述这些过程的学术讨论的背景资料。本书中还包括了一些通过摄影师的镜头及时捕捉到的关于某些具有临床意义的活动的重大观察结果。对诸如细胞浆内精子注射、人体胚胎评分、囊胚的生长、辅助孵化、胚胎、卵子和卵巢组织的冷冻保存,及极体和胚胎活检等相关主题做了详细的回顾,并以图解作为背景资料。

包含在相关讨论中的临床观念当然与患者的治疗有关,有关实验室技术和质量控制的详尽观察结果亦然。

体外受精为不育症治疗的不断发展提供了无限的难以预料的机遇。近期的有关事件之一(即使此事件不是最引人注目)是:人们终于认识到,来源于人体胚胎的多能干细胞可生成某些特异的组织,这些特异的组织具备了治疗人体疾病的价值。干细胞生物学仅为有关配子和胚胎操作的伦理学意义的长期对话中的最近的一项话题。人体体外受精从一开始就成为伦理学家、神学家、哲学家和临床医师们所密切关注的主题。任何医学新进展的长期意义的思考不但有利用价值,而且实际上是必要的,因此,在本书的最后一章探讨干细胞治疗的伦理学问题是恰如其分的。

不同于任何其他研究和治疗领域,体外受精技术更强调这种对话的重要性。有关人类体外受精及这一研究领域前期发展活动的文献资料为促进这种互动做出了巨大贡献。本书中提供的文献资料证实我们目击了人体标本在实验室中获得的难以置信的协调发展。这些复杂过程及其细微改变的显像可作为继续探讨的基础。本书的出版大大地有助于我们对与新辅助生殖技术有关的总体情况的理解,并提供了有关这一快速发展的学科的可靠信息。

Luigi Mastroianni, Jr., M.D.

The William Goodell Professor of Obstetrics and Gynecology

University of Pennsylvania Medical Center

Philadelphia, Pennsylvania

序言(二)

本书提供了关于现代人体辅助受孕及其多种衍生技术的极受欢迎并具权威性的观点。带有大量图解的各个章节提供了最新信息,这些章节分别由一些卓越的研究者撰写,并表达了他们通过亲身实践获得的对有关方法和展望的理解。本书不仅对一些体外受精(IVF)领域的资深科学家和临床医师具有极高的价值,而且对于刚进入该领域的新手具有同样的价值。而且,毫无疑问,体外受精的某些新进展同样可使许多外行专业者惊奇不已。反复咀嚼本书的内容是一件令人愉快的事,以至于我不必提及每一作者的名字,因为所有作者和编辑显然作为一个成功且敬业的团队在通力合作。

开头几章确立了一些较高的标准。这些章节覆盖了有关人体妊娠的基础生物学,并提供了有关适当的临床和科学实践中必要且重要的细节。这些章节介绍了人体受精的生物学、细胞浆内精子注射(ICSI)成像技术的开发,及它们的现代进展。对卵母细胞的描述包括了它的超微结构、成熟过程、形态学特征、透明带及与卵丘细胞的联系。本书使用了大量的图解、一些优秀的照片、极佳的荧光图像及其他阐明细节的图片,详细介绍了人体受精和卵裂过程中的各个连续阶段。还对单个卵母细胞与胚胎间形成的变异做了介绍,并简要叙述了某些复杂的分子结构。使用大量的植入前各阶段中有关正常和异常人体发育的图片阐明了许多无规律的特征及它们影响胚胎质量的方式。

有几个章节专门介绍了有关人体辅助受孕的适宜实践技术,且有几位撰稿人解决了实验室实践中的必要基础问题。培养基设计发端于20世纪前叶,人们首先设计了经过适当平衡的必要的盐水溶液,然后又设计了复杂的培养基,用来维持哺乳动物的植入前期胚胎和某些特异的人体细胞系。在体外受精发端时,培养基的组成就是一个基本问题,且目前仍是这样。本书中做了详细介绍的不同培养基均设计用来支持体外卵母细胞的成熟、受精和胚胎的生长,人们还探讨了其与能量来源、离子构成、pH值和氨基酸组成的关系。尽管人们掌握的知识十分丰富,但关于是否需要一种或多种培养基来维持囊胚生长,仍存在不同的观点,且为什么仅有人体子宫才能维持伴有与透明带粘合在一起的精子的未受精卵子直至完成受精并实现分娩同样尚未明了。冷冻保存

在辅助生殖中同样是必需的,恰如许多年前人们所预料的那样。本书中有几章介绍了现代方法的相关观念和细节及某些极其重要的方案。目前,解冻后胚胎的植入率几乎与新鲜胚胎的植入水平相当,而且玻璃化技术最终会大行其道。

人体卵母细胞冷冻保存技术为那些患癌症或希望推迟生育年龄的妇女提供了贮存卵母细胞或卵巢组织片的机会。组织片冷冻保存成功与否取决于新生儿与产后期卵巢的卵泡分布和生长的性质、不同冷冻保存试剂在组织内的浸润程度,及解冻后卵泡的生存能力。在本书中通过图片详细介绍了卵巢移植的手术方法。目前小片卵巢组织移植可以取得最理想的结果,尽管始基卵泡的分离是人们希望达到的另一个目标。单个卵泡的保存仍然存在诸多问题,但不成熟和成熟卵母细胞的冷冻贮存现正在实际工作中应用。该领域的技术实践必然会大行其道,因为处于 50 或 60 岁年龄段的妇女通过使用解冻后的卵母细胞可将生育推迟至绝经以后;最近人们阐述了该类治疗的风险和效益。

其中许多章节对产生于人体胚胎学的某些重大机遇做了适当的讨论。机遇之一是改进胚胎的选择,以便使用单个高质量胚胎做替代治疗。其选择依赖于胚胎中的偏振化系统,这些系统可对原核中的核仁运动和结构或卵裂板提供并不太精细的计分,或取决于对特异性发育系统所需时间的测定与对形态学的精确测量的联合应用。囊胚转移可因新型培养基的开发而得以发展,而对胚胎孵化和膨胀的理解的加深则可导致在第 6 天时实施转移。

胚胎研究还包括一些手术操作程序。细胞浆内精子注射是早期的操作形式,且目前已成为每个体外受精诊所的主要治疗手段。细胞浆内精子注射已通过附睾或睾丸吸引术广泛地用于非阻塞性男性不育症的治疗,这些已做了详细的介绍,同时介绍的还有有关精子放置部位及卵黄膜破裂的意义的某些观念。辅助孵化通过极佳的图解具体地呈现在您的面前,但该技术尚未在实践中得到广泛的应用。然而,辅助孵化仍有利于防止牢固的透明带造成的某些孵化障碍及发育缓慢问题,从而减少胚胎孵化的能量需求,并改善植入状况。

使用切除极体或分裂球的实验程序与实施植入前遗传学诊断构成一个极其复杂的问题。与荧光原位杂交联合使用,其能使几乎一半的伴随非二倍体配对、易位、缺失或镶嵌性的人体卵母细胞的染色体数目和结构得到检测。不久所有的体外受精诊所都会采用这些方法避免三体婴儿的出生或提高植入率。更为深入的干预形式涉及克隆或卵浆转移;如果克隆胚胎异常的高发生率可减低至更能为人们所接受的水平,社会对这些技术的抵制可能会消除,如同体外受精的每一项进展中所遇到的情形。体细胞杂交或核转移有希望对那些缺乏配子的患者提供帮助。胚囊转移可重新构建卵质体(ooplast),而线粒

体转移则可以矫正卵母细胞的低质量问题。将来这些概念会吸引更多的科学或伦理学关注。

最后关于干细胞一章着重介绍了该研究是如何被错误地认为始于 20 世纪 90 年代的。实际上,有关干细胞的理论出现于 1965 年,在 20 世纪 70 年代,人们就已阐明了干细胞在小鼠中的治疗潜能。供体干细胞可进入并修复组织而不会造成炎症或癌症、明显的移植物排斥反应及跨物种间的障碍,从而提供一种简单易行的医疗手段。世界范围内的多项研究提出能够提供类似治疗的间充质或其他组织是如何取代胚胎干细胞的;较之使用人体囊胚制备胚胎干细胞(ES),这会产生较少的伦理学问题。胚胎干细胞为潜在患者提供了一种与体外受精相比毫不逊色的,潜力巨大的领域。

一个独立的由权威临床专家撰写的章节强调医师与患者交流的技巧与其用于操作胚胎的技术同样重要。恰当的会诊,检查,和诊断是必要的。不久患者就可能携带包括对胚胎、子宫内膜或受孕的其他环节构成危害的基因细节的他们自身的不育症遗传学诊断来到体外受精诊所就诊。这将是患者医疗条件的巨大提升。

本章还强调,即使是使用已公认的临床程序时,亦有必要对患者提供持续不断的关怀。对高龄的不育症,内分泌系统异常、感染及相关疾病,和子宫内膜的质量及性别的相关特征需做持续不断的关照。刺激方案仍在不断地发展,且将来当胚胎基本特征得到系统阐述的时期到来时,可以改善原始卵泡中新形成的卵母细胞,包括小分子形式,长效促性腺激素,及卵泡刺激素异构型在内的全新的内分泌学概念可能会出现。

日常关怀亦需要经常强调,恰如针对胚胎转移和多胎妊娠那样。临床医师必须有意识地进行针对母亲和儿童健康的随访研究,因为近来的分析表明,通过体外受精和细胞浆内精子注射技术受孕出生的儿童发生严重异常的风险几乎是自然受孕者的两倍。人们认为适宜的临床时机选择和同情心对于那些可能发生反复受孕失败的患者而言仍是必要的。给 60 岁出头的患者提供辅助受孕的机会可能会越来越普遍,因为体外受精技术会与越来越长的人类寿命及妇女生活方式的巨大变革让步。

最后,但绝非最不重要的一点,倒数第 2 章介绍了政府为体外受精实行立法的需要。由于质量必须得以保证,世界范围内的各个实验室就必须遵循并符合某些质量和水准鉴定标准、文件证据和操作规程、实行记录的国家标准、记录的可信性、试验程序及熟练程度试验。即使这样,亦可发生某些错误,正如最近在英国利兹市证实发生的一个事例,尽管实施了严格的管理,他们还是误用了不适当的精液样本。

本书是最好的专门阐述辅助生殖技术的著作之一,而且它的简洁的结构和对胚胎学的重视,使它在现时具有了重要的意义。作者们提供了在最初发

展阶段人们对体外受精的最透彻的阐释,而且还涉及将来的发展问题。他们可以为他们的工作而自豪。

Robert G. Edwards, Ph.D.
Chief Editor
Reproductive BioMedicine Online
Cambridge, United Kingdom

前 言

有三个充分的理由使我们合力撰写了本书。首先,很显然,考虑到在辅助生殖技术(ART)实验室和诊所中近来所形成的所有技术创新,对每项新方法做一材料翔实的综合性最新报道是有必要的。这些技术创新包括:在正常和异常受精过程中使卵母细胞及其基本组成部分显像的新型图像分析技术;一些改进后的对卵母细胞、合子和胚胎分类的方法,使用这些方法可通过转移较少的胚胎而获得最高水平的植入可能;及卵母细胞和胚胎的更有效的新型冷冻保存方法。

本书的临床部分阐明了医师们最常遇到的一些问题,并将目前临床决策的思路提供给读者。这包括了卵巢刺激、卵母细胞回收、胚胎转移,和黄体期支持措施等方面的内容,提供了有关如何处理复发性植入失败的独特见解。除了体外受精和胚胎转移(IVF-ET)治疗本身,还考虑到将来生殖潜能的保留(对那些遭受癌症侵袭的患者尤为重要),同时还讨论了卵巢组织冷冻保存和移植的可行性。本书还介绍了卵浆/胞核重新构建的光明前景和局限性,同时还对可确保这些技术顺利实施的有关实验室质量保证、控制和水准鉴定的基础知识做了更新报道。还包括一个重要的章节,该章节详细介绍了辅助生殖实践不可避免会引发的一些生物伦理问题。

促成本计划的第二个原因是我们相信在胚胎学实验室中所做的工作是辅助生殖诊所成功的关键所在。然而,尤其对于医师而言,接触体外受精实验室实际工作的机会是有限的,且完整的实验室科学报告并不总是在科学界公开。本书的目的在于打开实验室的大门,让读者亲自到显微镜的镜头后面去观察,并让他们参与到整个决策过程中去,自卵母细胞进入实验室那一刻起直至实现它的最终结局——一只胚胎接受转移,冷冻保存,或被选择出来淘汰掉。

本书的第三个目的是弥补实验室与临床环境间的差距。本着将胚胎学实验室与临床工作结合起来的宗旨,我们希望通过彼此间专业领域的理解的加深,有利于工作的协调开展,从而以尽可能高的水平为患者服务。

Pasquale Patrizio

Michael J. Tucker

Vanessa Guelman

致 谢

作者们非常感谢协助完成本书的,来自不同生殖医学中心的许多同事们。

要特别感谢来自巴西的 Bahia, Salvador, Clinica Genese 的 Bela Zausner 医学博士所做的有益的评论和支持。我们还要衷心地感谢 Lippincott Williams & Wilkins 出版公司,尤其要感谢 Lisa McAllister 和 Jenny Kim 的敬业精神和对本项计划的不间断的负责精神。

目 录

第一部分 通过实验室研究获得的观念

第1章 人类受精的生物学	3
第2章 应用于人体生殖的新型成像技术.....	15
第3章 卵母细胞.....	23
第4章 受精和卵裂.....	43
第5章 原核分类及合子极性:与结局的相关性	63
第6章 细胞浆内精子注射.....	79
第7章 人类胚胎的形态学评分及与胚囊转移的关系.....	87
第8章 辅助孵化.....	95
第9章 卵母细胞和胚胎的低温保存	115
第10章 人体卵巢组织贮藏实践方面的知识.....	133
第11章 极体活检,胚胎活检和用于荧光原位杂交分析的固定方法	149
第12章 在小鼠和人体卵母细胞中实施的胞核和胞浆转移	161

第二部分 临床观察

第 13 章	辅助生殖技术中的临床因素.....	173
第 14 章	卵巢移植技术:实验室和临床观念	187

第三部分 附加内容

第 15 章	辅助生殖技术实验室中应用的培养基.....	197
第 16 章	低温保存方案.....	209
第 17 章	质量控制和监测.....	223
第 18 章	干细胞治疗的伦理问题.....	237
缩写表		246

第一部分

**通过实验室研究
获得的观念**

第 1 章

人类受精的生物学

LAURA HEWITSON

GERALD P. SCHATTEN

对受精过程中细胞支架作用的理解在新型辅助生殖方法的设计和质量的提高,及受精失败原因的确定方面是至关重要的。可使用诸如常规的 epifluorescence 或激光扫描、同焦点显微镜检查和透射电子显微镜检查(TEM)等的复杂成像技术在固定后标本中得到有关这些情况的线索。人们已使用针对精子和卵子中的某些特异性蛋白质的荧光标记抗体研究了多种不同物种中的细胞支架重排、原核迁移和卵裂模式。本章探索了人体和灵长动物中某些精子和卵子成分在体外受精(IVF)和细胞浆内精子注射(ICSI)之后的结果。

精子和卵母细胞的贡献

在受精过程中,精子向卵母细胞贡献出 3 种关键

成分:(a)使代谢静止的卵母细胞活化所必需的信号或激活因子;(b)父方的单倍体基因组;(c)中心体,即细胞的微管组织中心(图 1-1A)^[1]。在精子发生过程中精子的中心体可缩减至一种前中心体(centrosome)的形式,前中心体可补足母体的储备而构成受精和早期发育过程中有丝分裂纺锤体极形成所必需的基因物质(图 1-1B)^[1]。人们通过对中心体进行分子学定性确定了数种涉及受精的成分。或许最重要的中心体蛋白是 γ -微管蛋白,其为微管蛋白之一,涉及微管成核及组成后的微管极性确定^[1]。人类精子的 γ -微管蛋白含量不可测出(图 1-1C-D)^[2,3],但在精子卵子结合后不久,母体的 γ -微管蛋白被吸引至精子中心体,使其转化成为具有功能的合子中心体,有助于精子星体的形成及随后的延长(图 1-1E)^[3]。

L. Hewitson: Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania.

G. P. Schatten: Pittsburgh Development Center; Magee-Women's Research Institute; and Departments of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences and Cell Biology and Physiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.

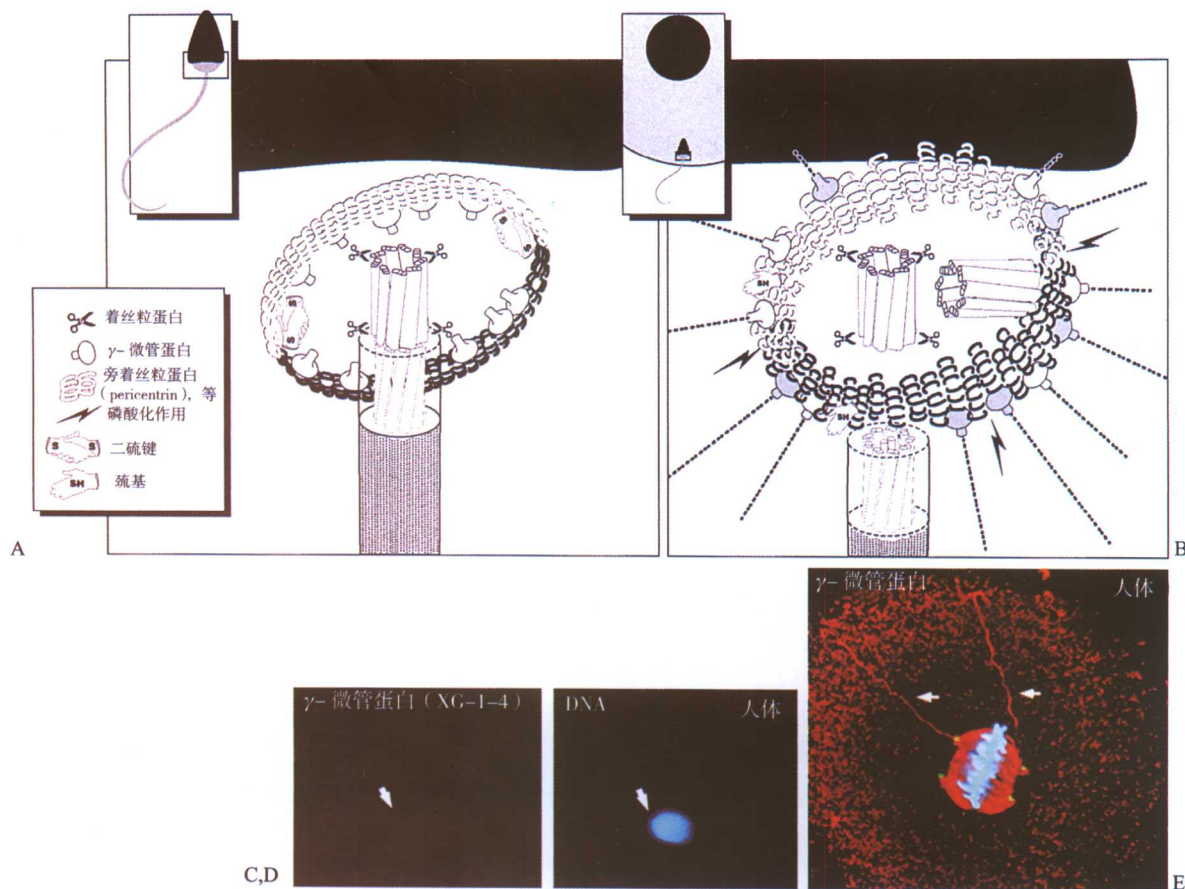


图 1-1 人类精子中心体的分子解析及其在合子中的重组。**A:**精子中心体。人类精子中心体对应于中心粒有 1 或 2 个聚集着丝粒蛋白 (centrin) 的部位。在人类的成熟精子中见不到 γ -微管蛋白,但在用二硫化物还原剂激活以后的精子中心体中则有可能检测到;这是一种新型的细胞浆获能形式。在完整的或经过超声波降解的人类精子中还可通过西部吸取法检测到 γ -微管蛋白。该类中心体未经磷酸化,而精子尾部微管可自中心粒延伸出来。中心体的螺旋状结构或许可使中心体固着在精子核上,并有调节 γ -微管蛋白的暴露及其结合部位的功能。**B:**合子中心体。经在来自非洲蟾蜍卵母细胞提取液中渗透化 (permeabilization) 和孵育之后,人类精子发生磷酸化,并可对 γ -微管蛋白的多种抗体形成强烈的免疫反应。人类精子的 γ -微管蛋白可能是来自父方,但主要是来自母体的蛋白组合体。人们推测卵活化中因瞬时增加所释放的钙离子与着丝粒蛋白 (centrin) 结合后不久,可导致着丝粒蛋白 (centrin) - 诱导的精子尾部微管二联体与中心粒微管三联体分离。或许尾部微管与基体 (basal body) 分离可使基体复合体获得自由,以便与其他的 γ -微管蛋白结合,并可发生中心粒转化。在人体中,钙介导的着丝粒蛋白 (centrin) 切除 (excision) 不能造成精子尾部与中心粒/中心体复合体完全分离。中心体盘绕的螺旋区在合子中被引导而散开,扩大并翻转;这可暴露出父方的 γ -微管蛋白,还可暴露出母方 γ -微管蛋白的结合部位。通过 γ -微管蛋白环的作用可使微管集结起来,后者可聚集成为精子的星体。人体精子中心体 (C 和 D) 及合子 (E) 中的 γ -微管蛋白免疫细胞化学染色。超过 98% 的人类精子在溶血卵磷脂渗透化 (permeabilization) 及甲醇固定后 (D) (DNA 通过 XG-1-4 微管蛋白抗体 (C) (箭头指向精子中心体区) 不能获得免疫染色。通过相或差异干涉对比光学 (phase or differential interference contrast optics) 观察到的精子中心体区。人体的二精入卵合子在授精后固定 26.5 个小时并对微管 (红色,使用 α -微管蛋白和乙酰化 α -微管蛋白抗体)、XG-1-4 微管蛋白抗体 (绿