

小白鼠卵細胞透明層之顯微切割 可增進在低濃度精子之受精率

曾啓瑞 劉德良* 高承亨**

摘 要

目前全球各相關實驗室正發展卵細胞的顯微操作法，爲了幫助精蟲能更容易進入卵細胞的圍卵黃腔或直接注入卵細胞，以達到受精目的，而有效解決精蟲稀少的男性不孕病人的問題。本研究的目的著重於完成小白鼠卵細胞透明帶切割法，使精蟲穿過透明帶的機率增加，降低體外受精所需的精蟲濃度，藉此方法試圖治療精蟲稀少引起的不孕病患。

本實驗以 ICR 小白鼠爲材料，取得老鼠卵細胞後，藉 NARISHIGE NT-88 顯微操作系統在 NIKON DIAPHOT MICROSCOPE 鏡頭下，以玻璃顯微導管 Holding Pipette 吸住卵細胞，用 Cutting Pipette 將卵細胞的透明帶逐一刺穿出一破洞，再加入精蟲進行體外受精。

體外受精所用之精蟲濃度分三組： $0.25\sim 0.5\times 10^5/\text{ml}$ ， $1\sim 2\times 10^5/\text{ml}$ ， $3\sim 5\times 10^5/\text{ml}$ 。實驗組受精率各爲 32.5% (26/80, $p<0.025$)，29.9% (23/77, $p<0.025$) 和 29.8% (28/94, $p<0.025$)，三者在統計上無顯著差異。對照組各爲 18% (15/83)，13.4% (9/67) 和 11.1% (5/45)。此結果表示透明帶切割的卵只要 $0.25\times 10^5/\text{ml}$ 的精蟲濃度即可達到 $5\times 10^5/\text{ml}$ 精蟲濃度的受精水準。卵經透明帶切割的受精率 (30.7%，77/251, $p<0.05$) 顯著地高於未切割卵的受精率 (14.9%，29/195)。切割卵發育到桑椹期的耗損率與未切割的耗損率頗有顯著差異。

我們結論透明帶切割在相對低的精蟲濃度明顯地提高受精率，並且是一種對卵細胞無害且操作簡易的顯微操作方法，但並不建議把透明帶的洞穿刺太大。

爲了解決日趨嚴重的不孕問題，人工生殖科技包括試管嬰兒 (IVF)、禮物嬰兒 (GIFT) 相繼問世，但對於解決男性不孕 (Male Factor) 困擾仍多。男性不孕大致上包括精蟲稀少

症、死精症、精蟲活動不良症、抗精蟲抗體症等，爲了解決上述男性不孕問題，許多精卵的顯微操作技術相繼開發。

首先，卵細胞的精蟲顯微注射文獻報告在

台北醫學院附設醫院家庭計劃科、

省立桃園醫院小兒科*、東海大學生物學研究所**

民國八十一年六月一日受理

本研究由國科會專題研究計劃 NSC 79-0412-B 075-53 所贊助

1976年及1980年由 Uehara, Yanagimachi⁽¹⁾ 和 Thadani⁽²⁾前後發表,但1983年 Markert⁽³⁾ 則指出此種精蟲顯微注射技術將導致卵細胞相當比例之傷害,因為精蟲是以機械性方式注射進入卵細胞質,和自然生理狀況下精卵的結合差異甚鉅;且此種操作是相當費時的。

第二種方法是將精蟲注入圍卵黃腔,此文獻報告在1985年由 Metka⁽⁴⁾發表,此種方式較上述方式顯微注射傷害小,而由 Laws-King⁽⁵⁾等人的報告指出受精率約達50%。

第三種方法為1986年 Gordon⁽⁶⁾指出將卵細胞的透明帶以 Acidic Tyrode's Solution 穿孔,接着進行體外受精,結果和未穿孔的對照組比較,透明帶穿孔(Zona Drilling)實驗組達成體外受精成功所需精蟲濃度為未穿孔對照組的百分之一。雖然透明帶穿孔仍會造成少數受精卵和胚胎的不正常發育,但和對照組比較差異不顯著,因此 Gordon⁽⁷⁾認為透明帶穿孔應用於體外受精時,不失為一安全又有效的方法。

但用 Acidic Tyrode's 進行透明帶穿孔,其中酸 pH = 2.5 多少會對卵細胞質造成傷害。Malter 及 Cohen 在1989年指出 IVF 病人之未受精卵放入含 Acidic Tyrode's 的 Medium 中,雖然卵可以受精,但胚胎的發育卻會受到抑制。因此想到是否以其他機械性的方式在透明帶處理也可達到相同的目的,這種方法稱 "Partial Zona Dissection", 亦稱透明帶切割(Zona Cutting), Cohen 在1989年的報告已獲得相當好的結果。本實驗目的在開發透明帶切割法,並與對照組比較,試圖解決精蟲稀少症的問題並評估透明帶切割大小的影響,也對透明帶穿孔和透明帶切割兩者之結果進行比較。

研究目的

全球各相關實驗室正發展卵細胞的顯微操作法,為了幫助精蟲能更容易進入卵細胞的圍卵黃腔或直接注入卵細胞,以達到受精目的,

而有效解決精蟲稀少的男性不孕病人的問題。本實驗第二年的研究目的著重於完成小白鼠卵細胞透明帶切割法(Zona Cutting),使精蟲透過透明帶的機率增加,降低體外受精所需的精蟲濃度,藉此方法試圖治療精蟲稀少引起的不孕病患。

研究方法

(一)卵子的製備:

取八週 ICR 品系母鼠,先施以 10 IU PMSG 腹腔注射,48小時後再注射 10 IU HCG。HCG 注射 13.5 小時後宰殺母鼠,自輸卵管取卵,以玻尿酸酶清除卵周圍的顆粒細胞卵丘,可得外覆透明帶的卵細胞,接著以顯微操作進行卵細胞透明帶切割。

(二)精蟲的製備:

取一成熟 ICR 品系公鼠宰殺,剪取副睪前段和輸精管後段,剪成數小段後置於裝有 0.75 c.c. 培養液(T₆ 3% BSA)於離心小管內。1小時後吸取上層液約 0.4 c.c.,可收集到活動力良好的精蟲,再置於 37°C 之培養箱中待活能化後即可進行體外受精,並以精蟲計數器算出精蟲的濃度。

(三)培養液:

Whittingham's T₆ medium 3% and 0.4% Bovine Serum Albumin (BSA)

(四)顯微操作卵細胞透明帶切割:

1. 顯微玻璃管(Micropipette)之製備:以 NARICHIGE Micropipette Puller PB-7, Pipette Grinder EG-4, Micro Forge MF-9 製作合乎要求之 holding pipette 和 cutting pipette。

2. 分別將 holding pipette(左邊)與 cutting pipette(右邊)裝置於 NARISHIGE Micromanipulator System NT-88 上,於 NIKON Daiphot Microscope 鏡頭下,以 holding pipette 吸住卵細胞,利用 cutting pipette 穿入透明帶刺穿一個破洞或以 hold-

ing pipette 磨掉 cutting pipette 穿入透明帶之上面部分。依此方法重覆操作，逐一將培養皿中的卵細胞以最短的時間操作完畢。

(五)體外受精(實驗組和對照組)：

1. 透明帶未切割之對照組：

直接取經玻璃尿酸酶處理之卵細胞放入盛有培養液(T₆ 0.4% BSA)之 Falcon 3037 培養皿中，加入已活能化的精蟲，記錄精蟲濃度，經 2-3 小時後將卵細胞轉移至新鮮的培養皿中繼續培養，每隔 24 小時觀察體外受精的結果和受精後胚胎生長發育的情形並記錄之。

2. 透明帶切割之實驗組：

取經顯微操作透明帶切割處理之卵細胞，依上述 1. 之方式進行體外受精與觀察記錄。如此觀察並培養五天。

(六)精蟲活能化、體外受精卵細胞、受精卵及胚胎培養等過程，均在 37°C、5% CO₂ 培養箱內進行。

(七)實驗數據採用卡方分布(X² distribution)作生物統計分析。

結果

本實驗進行體外受精所用的精蟲濃度分成三組，如表一所示，0.25~0.5×10⁵ sperm/ml，1~2×10⁵ sperm/ml 和 3~5×10⁵ sperm/ml；受精率各為 32.5%、29.9%和 29.8%，三者統計上並無顯著差異，此結果表示經過切割處理過的卵只要 0.25×10⁵/ml 的精蟲濃度即可達到 5×10⁵/ml 精蟲濃度的受精率水準。而三組濃度的實驗組與對照組受精率比較在統計上均有顯著差異(P<0.025)，顯示透明帶切割對提高受精率有其應用的價值，此點與透明帶穿孔(Zona Drilling) (表四)之結果相似。

由表二之統計結果知實驗組共操作了 251 個卵，有 77 個卵受精，受精率為 30.7%；對照組共操作了 195 個卵，有 29 個受精，受精率為 14.9%。另外發育到桑椹期的比率各為 7.9% 和 3%，兩者比較在統計上均有顯著差異(P<0.05)。而受精後的卵發育為桑椹期之比率各為 27.7%和 20.7%，在統計上並無顯著差異。由此結果可知經透明帶切割的卵發育為桑椹期比

Table 1. In Vitro Fertilization of Zona Cutting Mouse Eggs

Sperm/ml inseminated	Zona-cutting		Controls	
	No. eggs inseminated	No. eggs fertilized	No. eggs inseminated	No. eggs fertilized
0.25-0.5 × 10 ⁵	80	26(32.5%) ^a	83	15(18%)
1-2 × 10 ⁵	77	23(29.9%) ^a	67	9(13.4%)
3-5 × 10 ⁵	94	28 (29.8%) ^a	45	5 (11.1%)

a: p < 0.025

Table 2. In Vitro Fertilization and Development of Zona Cutting Eggs

	No. Fertilized	No. Morulla	No. Morulla
	No. Inseminated	No. Inseminated	No. Fertilized
Zona Cutting	77/251(30.7%)	20/251(7.9%)	20/77(25.9%)
Control	29/195(14.9%)	6/195(3%)	6/29(20.7%)
	p < 0.05	p < 0.05	N. S.

N. S.; Non-significance

Table 3. Attrition Rate of Zona Cutting Embryos during Cleavage

	Zona-cutting (%)	Controls (%)	
2 cell	77	29	
4-6 cell	35/77(35.5%)	13/29(45%)	NS
8 cell-morula	20/77(25.9%)	6/29(20.7%)	NS

NS: non-significance

Table 4. Sperm Concentration in Relation to Mouse Eggs in Vitro Fertilization after Zona Drilling

Sperm/ml inseminated	No. of eggs			
	Drilled with IVF		Control with IVF	
	inseminated	Fertilized	Inseminated	Fertilized
0.25-0.5 × 10 ⁵	71	27(38.3%)	62	9(14.52%)
1.2 × 10 ⁵	92	48(52.17%)	81	15(18.52%)
3.5 × 10 ⁵	66	32(48.48%)	46	12(26.09%)
	p < 0.05	NS	p < 0.05	NS

NS: non-significance

率高乃因實驗組受精率較高之故。

表三為統計實驗組和對照組各個發育胚胎期的比率來比較發育過程的耗損率。實驗組/對照組：四～六細胞為 35/77(45.5%) vs 13/29(45%)；八細胞～桑椹期為 20/77(25.9%) vs 6/29(20.7%)，兩者在統計上均無明顯差異，由結果可知透明帶切割的卵受精後各期之發育率與未切割的卵並無不同。

討論

由表一的結果知透明帶切割明顯地提高受精率，可作為男性不孕提高受精率的另一項選擇。據 1989 年發表的文獻報告⁽⁹⁾指出當精蟲濃度降到 10⁴/ml，經過透明帶切割 (Zona Cracking) 後的受精率有明顯地上升，而且此技術並不會增加多重受精和孤雌生殖的比率。此種結果與本實驗的一些觀察結果相同。

此種新技術也有應用在人類的報告^(8,9,10)，因為人類卵的圍卵黃腔很小，因此須用蔗糖先

將卵細胞質縮水以增加卵黃腔，便利此顯微技術的操作。據 1989 年 Malter 及 Cohen⁽⁸⁾之報告均已獲得不錯的結果。

Malter⁽¹⁰⁾在 1989 年指出人類卵暴露在蔗糖的時間會影響到多重受精率，而卵的年齡也會影響到多重受精率。卵細胞的多重受精現象也有種別性，兔子卵抑制多重受精的地方被認為是在卵細胞膜上⁽¹¹⁾，小白鼠也是如此⁽¹²⁾。

用機械方式切割穿刺透明帶以利精蟲進入只要操作純熟是個相當簡易可行的方法。隨著不同技術的應用也可控制開洞的大小。本實驗與 Odawara, Lopata⁽⁹⁾應用微鉤 (Microhook) 在透明帶拉出一條窄溝和 Malter 及 Cohen⁽⁸⁾將針插入後僅拉出一個小洞的方法不同；本實驗將針插入透明帶的上面部分挑掉或磨掉，如此開的洞必然較大，想藉此並評估對於受精率的影響。雖然與 Odawara 所用的老鼠品系不同，而 Malter 用人類的卵結果無法比較，但其結果似乎較好。另外，透明帶穿孔組 (開口也較小) 的受精率也較本組受精率高。

此兩點說明了透明帶開口的大小會影響到受精率。卵細胞質滲透壓的改變和直接與對卵細胞有害物質接觸均為重要的因素。更正確的評估應該是以 Odawara 之 Microhook 和 Malter 之 Rolling 技術重覆進行本實驗以作為對照；甚至分析透明帶穿破後卵細胞質滲透壓的改變，有待將來完成。

至於受精後，各期分裂的存活率在統計上並無明顯差異。四~六細胞(Zona Cutting/Control 45.5% vs 45%，表三)顯示透明帶切割對受精卵的發育並無不良影響，只要細心操作不要刺到卵細胞質。至於表二受精卵繼續發育之比率有顯著差異是因實驗組之受精率較高之故。

操作此種實驗必須快速，因為卵對外在的溫度、酸鹼值相當敏感，均會影響到卵細胞的受精能力和受精後的存活率，因此分次少量快速操作以爭取時間均會對實驗結果有幫助。

新的家庭計劃政策，政府準備積極協助解決不孕的問題。為了解決男性不孕問題，透明帶切割穿刺法將是個操作簡易且對卵細胞無害的方法。但基於此實驗的初步結果，並不建議把透明帶的孔開的太大。

參考文獻

1. Uehara T, Yanagimachi R: Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 15; 467, 1976
2. Thadani V: A study of hetero-specific sperm-egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J Exp Zool* 212; 435, 1980
3. Markert CL: Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J Exp Zool* 228: 195, 1983
4. Metka M, Haromy T, Huber J, Schwin B: Artificial insemination using a micromanipulator. *Fertilizat I*; 41, 1985
5. Laws-King A, Trounson A, Sathanathan H, Kola I: Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril* 48; 637, 1987
6. Gordon JW, Talansky BE: Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool* 239; 347, 1986
7. Talansky BE, Gordon JW: Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after zona pellucida drilling. *Gamate Research* 21; 277, 1988
8. Malter HE, Cohen J: Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 51; 139, 1989
9. Odawara Y, Lopata A: A zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentration: a mouse model. *Fertil Steril* 51; 699, 1989
10. Malter HE, Talansky BE, Gordon JW, et al.: Monospermy and polyspermy after partial zona dissection of reinseminated human oocytes. *Gamate Research* 23; 377 1989
11. Schmell ED, Gulyas BJ, Hedrick JL: Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy. In *mechanism and control of animal fertilization*, Edited by JF Hartmann. New York, Academic Press, p. 365, 1983
12. Pavlok A, McLaren A: The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 29; 91, 1972

Improvement of Mouse Oocytes in Vitro Fertilization Rate by Low Sperm Concentrations after Partial Zona Cutting

Chii-Ruey Tzeng, Der-Liang Liour*, Cheng-Heng Kao**

ABSTRACT

A zona cutting procedure to facilitate mouse oocytes in vitro fertilization (IVF) at relatively low sperm counts is investigated. The eggs obtained from ICR mice cultured in T6 medium covered with paraffin oil were used for zona cutting. Under the Nikon Diaphot Microscope in conjunction with Narishige NT-88 Micromanipulator, a holding pipette and a cutting microneedle were introduced, then cutting procedure was conducted. The sperm concentrations to inseminate eggs after zona cutting were divided into three groups: $0.25-0.5 \times 10^5/\text{ml}$, $1-2 \times 10^5/\text{ml}$, $3-5 \times 10^5/\text{ml}$; fertilization rate was 32.5% (26/80, $p < 0.025$), 29.9% (23/77, $p < 0.025$) and 29.8% (28/94, $p < 0.025$) for each group and 18% (15/83), 13.4% (9/67) and 11.1% (5/45) for controls, respectively. This result also indicates that $0.25 \times 10^5/\text{ml}$ sperm counts can reach the fertilization rate of $5 \times 10^5/\text{ml}$ sperm counts with manipulated eggs. Eggs after zona cutting were fertilized at significant higher rate (30.7%, 77/251) than zona intact controls (14.9%, 29/195). Furthermore, a greater proportion of eggs inseminated after zona cutting (7.9%, 20/251) reached the morula stage than control (3.0%, 6/195). The attrition rate of zona cutting (25.9%) at morula stage did not differ significantly from controls (20.7%). We conclude that zona cutting technique apparently improve fertilization rate and is a fast easy and nontraumatic method especially in treating in case of oligospermia. We also advise not to open the zona large, which may cause the detrimental effects to eggs.

Key Words: Mouse, Zona Cutting, Oligospermia, In Vitro Fertilization.

Dept. of Obstetrics & Gynecology, Taipei Medical College Hospital, *Dept. of Pediatrics, Taiwan Provincial Tao-Yuan Hospital, **Graduate Institute of Biology, Tung-Hai University
Received for Publication: June 1, 1992.