

人类未成熟卵母细胞体外成熟技术（IVM）在不孕症治疗与生育力保存中的应用

IVM of human immature oocytes for infertility treatment and fertility preservation

英文原著作者：

Ri-Cheng Chian, Jian-Hua Li, Jin-Ho Lim, Hiroaki Yoshida

翻译：

唐传康、李建华；校对：千日成

杂志出处：

Reprod Med Biol. 2023;22:e12524. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12524>

摘 要

背景：已有数万名健康婴儿通过卵母细胞体外成熟技术(In Vitro Maturation, IVM)诞生，然而 IVM 技术的成功率会因所获取未成熟卵母细胞的来源不同存在差异。近年来，针对辅助生殖治疗不孕症和生育力保存，提出了多种不同的 IVM 技术方案。

方法：结合现有国内外文献，系统总结未成熟卵母细胞体外成熟技术的临床应用现状。

主要发现（结果）：对女性是否使用卵泡刺激素（Follicle-Stimulating Hormone, FSH）、人绒毛膜促性腺激素（Human Chorionic Gonadotrophin, hCG）或 FSH 与 hCG 的联合用药，均可从其体内获取未成熟卵母细胞。由 IVM 技术获得的成功妊娠率似乎与获取的未成熟卵母细胞来源和数量有关。根据未成熟卵子的来源和培养方法有多种 IVM 技术方案。未成熟卵子成熟率和质量受培养条件的影响，但是目前通过改进 IVM 培养液成份本身尚未取得突破性进展。因此，IVM 技术在临床上的应用仍在不断发展。

结论：IVM 技术是辅助生殖技术治疗不孕女性及生育力保存的有效方法。温和促排方案获取体内成熟卵和未成熟卵进行 IVM 结合治疗方案，也许这一治疗方案应该是辅助生殖技术治疗不孕不育的首选方案，因为业已证明这是一种有效的治疗方案。

关键词：临床应用；胚胎；体外受精；卵母细胞体外成熟；卵母细胞

1. 引言

卵母细胞成熟的生物学定义是指第一减数分裂重新启动并进入减数分裂 II 期 (Metaphase II, M-II) 阶段, 同时伴随细胞质成熟, 从而使卵母细胞为受精及早期胚胎发育做好充分准备, 直至合子和胚胎基因组激活¹。LH 峰值会触发卵母细胞从卵泡 (GV) 期向 M-II 期的成熟。人类未成熟卵母细胞在体外从卵泡中取出并置于适当的培养基中培养时, 可自发成熟至 M-II 期。

人类未成熟卵母细胞的 IVM 是一种最早于 20 世纪 30 年代尝试并实施的技术^{2,3}。与此同时, 人类体外受精 (In Vitro Fertilization, IVF) 也开始使用体外成熟的卵母细胞^{4,5}。然而, 利用人类未成熟卵母细胞进行的 IVM 里程碑式研究是在 20 世纪 60 年代进行的⁶⁻⁸, 人类体外受精 (IVF) 技术是利用体外成熟的卵母细胞建立起来的^{9,10}。尽管如此, 在首例由体外成熟卵子诞生的活产婴儿问世几十年后, 人类成熟卵子的 IVM 技术才作为一项临床操作得以发展起来¹¹, 这距离体外受精 (IVF) 后体内成熟卵子的操作已过去十多年¹²。

迄今为止, 辅助生殖技术 (Assisted Reproductive Technology, ART) 已帮助全球数百万女性克服了不孕症。尽管如 Trounson 等人¹³和 Chian 等人¹⁴的报告所示, 已有数千名健康婴儿通过 IVM 技术诞生, 但其成功率因所获取的未成熟卵母细胞来源的不同而存在显著差异¹⁵⁻¹⁸。2021 年, 美国生殖医学学会 (American Society For Reproductive Medicine, ASRM) 辅助生殖技术实践委员会建议, 不再将 IVM 技术视为实验性技术, 并指出 IVM 具有广泛的临床应用潜力。IVM 并不适用于所有患者, 只有那些卵泡数 (Antral Follicle Count, AFC) 较高的患者才被视为合适的候选人¹⁹。最近, 关于 IVM 方案中未成熟卵母细胞来源的最新信息报告陆续发布。因此, 本综述旨在分享我们对 IVM 技术临床应用的看法。

2. 人体未成熟卵母细胞的来源

在包括人类在内的哺乳动物中，转录在卵母细胞生长的最后阶段停止，只有在受精后合子基因组和胚胎基因组被激活时才会恢复^{20,21}。卵母细胞只能利用储存的 mRNA 合成新的蛋白质，以支持随后的早期胚胎发育。因此，在卵母细胞生长过程中对母源 mRNA 进行适当储存，是卵母细胞通过减数分裂成熟并产生成熟单倍体卵母细胞的关键所在。

普遍认为，卵泡腔一旦形成，其中的卵母细胞就已发育成熟，而完全发育的人类卵母细胞直径约为 120 μm 。有报道称，从 14 至 41 岁女性的卵巢组织中采集用于生育冷冻保存的人类未成熟卵母细胞，其直径范围为 60 至 171 μm ，平均值为 115 μm ，四分位距为 107 至 124 μm 。这表明，人类未成熟卵子的直径是 IVM 过程中卵子核成熟的一个关键决定因素²³。有趣的是，此前有报道称，当未成熟卵子分别采集自患有多囊卵巢综合征（Polycystic Ovary Syndrome, PCOS）且未经刺激的卵巢以及用于单精子注射（Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI）周期的经刺激卵巢时，这些未成熟卵子在体外成熟过程中仍会继续生长，这表明不同来源的人类未成熟卵母细胞在体外可能呈现不同的生长特征²⁴。因此，鉴于在获取未成熟卵母细胞时妥善保存母源 mRNA 至关重要，未成熟卵母细胞的来源似乎可被视为卵母细胞 IVM 的关键因素。

最近，还有报道指出，一种与线粒体相关的无膜区室控制着线粒体的分布，并调节母源 mRNA 的储存、翻译和降解，以确保哺乳动物的生育能力²⁵，这表明母源 mRNA 和 RNA 结合蛋白主要沉积在卵母细胞的线粒体周围。尽管许多 mRNA 在卵母细胞生长期间被储存，并在卵母细胞恢复减数分裂或受精后被翻译激活²⁶⁻²⁸，目前尚不清楚，卵母细胞减数分裂成熟过程中，线粒体的分布是否会发生改变，以及是否会合成新的蛋白质。（图 1）。

此外，IVM 的临床定义可能与上述的生物学定义有所不同。有人提出，临床 IVM 技术应定义为任何未成熟卵母细胞的 IVM，无论卵母细胞处于 GV 期还是 I 期

中期 (Metaphase I, M-I) 至 M-II 期, 因为它涉及未成熟卵母细胞 (GV 和 M-I) 的 IVM 程序¹⁶。因此, 临床 IVM 技术的定义应根据未成熟卵母细胞的来源来界定, 以帮助厘清来自不同来源的人类未成熟卵母细胞所产生的结果。在此值得一提的是, 通常将成熟卵母细胞称为“卵子”, 无论其是在体内还是体外成熟的。

IVM 技术对于不孕女性及生育力保存而言是一种有用的方法。IVM 对患有多囊卵巢 (Polycystic Ovary, PCO) 或 PCOS——相关不孕症的女性尤为有效, 因为该类女性卵巢内的抗穆勒管激素 (Anti-Mullerian Hormone, AMH) 水平较高。与卵巢功能正常的女性相比, 这部分女性对促性腺激素的卵巢刺激较为敏感, 且患卵巢过度刺激综合征 (Ovarian Hyperstimulation Syndrome, OHSS) 的风险更高。在经 FSH、hCG 或 FSH 与 hCG 联合预处理 (无论是否使用) 后, 可从女性体内取出未成熟卵母细胞。采用 IVM 技术时的妊娠成功率似乎也与获得的未成熟卵母细胞数量相关²⁹。

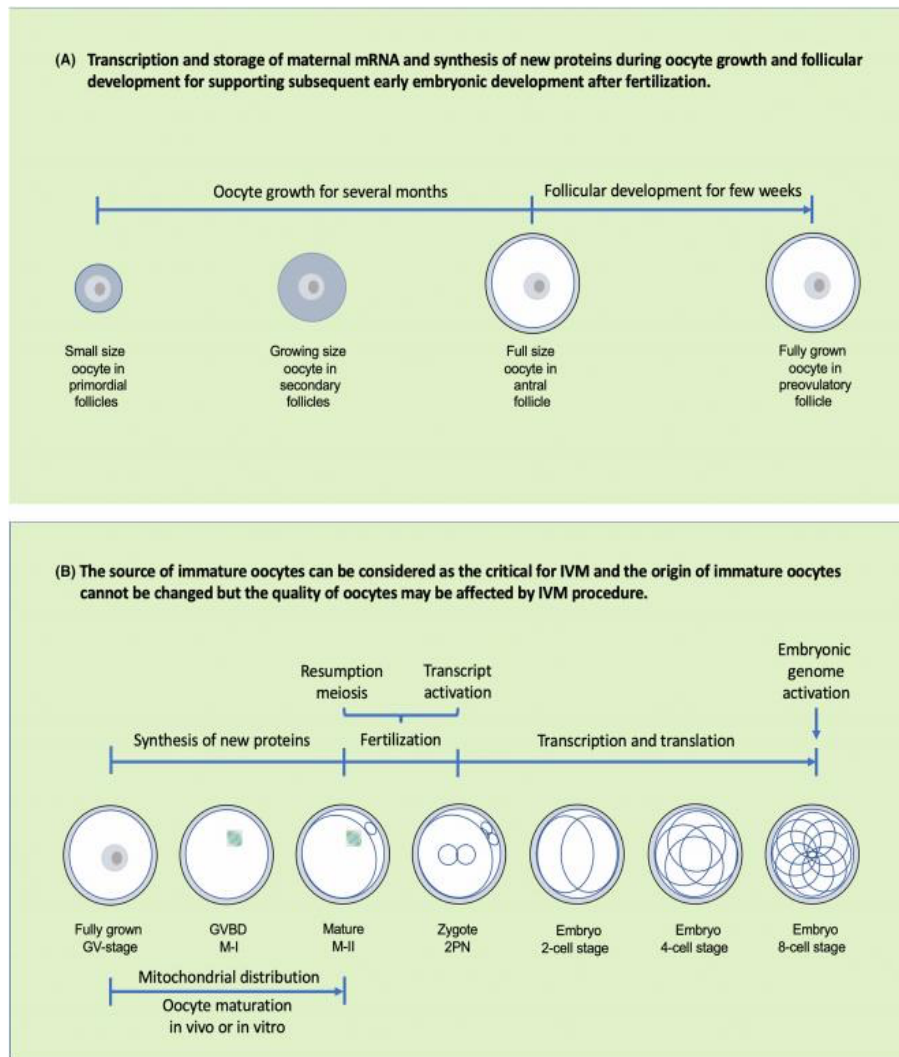


图 1 人类卵母细胞的生长与成熟

(A) 人类卵母细胞的生长需要从卵泡发育开始后持续数月。在卵母细胞生长的最后阶段，转录过程停止，卵母细胞只能利用储存的 mRNA 合成新蛋白质，以支持随后的早期胚胎发育。因此，在卵母细胞生长过程中对母源 mRNA 的妥善储存，是卵母细胞通过减数分裂成熟并产生成熟单倍体卵母细胞的关键；(B) 许多 mRNA 在卵母细胞生长过程中被储存起来，并在减数分裂开始时合成新的蛋白质。母源 mRNA 和 RNA 结合蛋白主要沉积在卵母细胞的线粒体周围，且线粒体的分布在卵母细胞成熟过程中可能会发生改变。母源转录受受精激活，翻译也可能在早期胚胎发育期间发生。然而，人类胚胎基因组仅在 8 细胞期才被激活。因此，未成熟卵母细胞的来源可被视为体外成熟的关键因素。

2.1 未接受激素预处理卵巢来源的未成熟卵母细胞

如上所述，针对患者自身未成熟卵母细胞进行 IVM 的最初尝试，对象是患有 PCO 和多囊卵巢综合征 PCOS 的女性¹³。这些未成熟卵母细胞是从卵巢的卵泡期和黄体期中获取的，吸取自直径为 2 - 10 毫米的卵泡。显然，这些未成熟卵母细胞均处于 GV 期，且其体外成熟率相对较低，这导致体外成熟技术在治疗不孕症方面的效率被认为较低。早期研究指出，减数分裂能力与卵泡大小相关，不仅取决于卵泡的大小，还取决于月经周期的阶段³⁰。这意味着，尽管可以从卵巢黄体期的卵泡中获取未成熟卵母细胞，但与从卵泡期卵泡中获取的未成熟卵母细胞相比，其质量和成熟率可能会有所不同。因此，就体外成熟潜力而言，卵泡的大小和所处阶段可能是影响未成熟卵母细胞质量的重要因素，成熟率与卵泡的大小和所处阶段直接相关³¹⁻³⁵。

由于从未经刺激的卵巢（尤其是多囊卵巢综合征患者）中获取的未成熟卵母细胞在体外成熟率较低，采用 IVM 技术时的临床妊娠率和活产率可能低于采用标准卵巢刺激试管婴儿周期的结果。从未经刺激的卵巢中取出时，其体外成熟率较低，尤其是来自 PCOS 患者的卵母细胞，所以与标准的促排卵试管婴儿周期相比，使用 IVM 技术的周期的临床妊娠率和活产率确实可能较低³⁶。然而，即使这些卵母细胞均取自同一组患有 PCOS 的不孕女性，但使用不同母体来源的成熟和未成熟卵母细胞进行比较并不恰当。如上所述，成熟和未成熟卵母细胞的来源是治疗成功的关键。除了卵泡的大小和发育阶段以及是否为促排卵周期外，未成熟卵母细胞的质量也与女性年龄直接相关¹⁸。

从怀孕到活产的过程十分复杂，多种因素都会影响不孕女性的妊娠成功率。在采用 IVM 技术治疗不孕女性时，必须将年龄视为影响治疗结果的关键因素。达到一定年龄（>35 岁）后，体内成熟卵子的质量会下降，这是影响 ART 治疗成功与否的重要因素。这一理论同样适用于 IVM 治疗的结果，而利用 IVM 技术成功治疗不孕症的关键障碍在于获取高质量未成熟卵子的过程¹⁸。IVM 仅是一种技术，

如果使用得当且结合高质量的未成熟卵子，其临床结果可与卵巢刺激周期中体内成熟的卵子相当¹⁷。

2.2 激素预处理周期来源的未成熟卵母细胞

体内减数分裂卵母细胞的恢复是由排卵前黄体生成素(Luteinizing Hormone, LH)峰值引发的。LH峰值促使卵母细胞从大卵泡(GV)阶段成熟至减数分裂第二期(M-II)阶段。在采用IVF治疗不孕症时，通常会给女性注射hCG，以诱导自然周期或促排卵周期中卵泡内卵母细胞的减数分裂完成。在体外受精治疗中，经卵泡刺激后，也可通过注射黄体生成素释放激素(Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, LHRH)激动剂来诱导卵母细胞减数分裂的最后阶段³⁷。因此，如果没有LH峰值，从排卵前大卵泡中获取的大部分卵母细胞将处于未成熟的GV期。

IVM技术还包括在取出未成熟卵母细胞前进行FSH或hCG的预处理。如前所述，IVM技术的成功妊娠率与取出的未成熟卵子数量相关²⁹。FSH预处理可促进未成熟卵子的有效获取并提高其成熟率³⁸。尽管从黄体期开始进行低剂量FSH预处理可提高未成熟卵子的获取效率，但月经周期规律的女性与月经周期不规律的PCOS女性之间，卵母细胞的成熟率和受精率并无差异³⁹。同样，有研究报道，在从PCOS女性体内取卵前，于卵泡期进行重组FSH(r-FSH)预处理，可提高卵母细胞的成熟潜能及裂球期胚胎的着床率⁴⁰。似乎在卵泡期或黄体期初期进行FSH预处理，可促进卵泡发育，并提高所获取的未成熟卵子的成熟能力^{41,42}。

研究表明，对PCOS患者在取卵前36小时进行hCG预处理，可加速体外卵母细胞的成熟过程，并提高卵母细胞的成熟率⁴³。似乎是这些卵母细胞可能促进体内卵母细胞成熟的启动，因为直径小至3.0毫米的抗苗勒管囊泡中，颗粒细胞和卵丘细胞中存在LH/hCG受体，这表明在未成熟卵母细胞取卵前进行hCG预处理对大多数卵泡都有益处⁴⁴。事实上，尽管经hCG预处理与未经hCG预处理的未成熟卵母细胞最终成熟率无显著差异，但其成熟的时间进程却有所不同¹。所以说，

在未成熟卵母细胞取卵前进行 hCG 预处理,可能有助于提高卵母细胞质量及随后的妊娠率⁴⁵。有趣的是,在 PCOS 患者中,当根据 hCG 预处理后卵丘细胞的形态将 GV 期卵母细胞分为不同组别时,其成熟时间进程和成熟率存在差异⁴⁶,这表明 hCG 预处理不仅能促进部分在体内已启动成熟过程的卵母细胞,还能增强部分来自小卵泡的 GV 期卵母细胞获得成熟和发育能力¹⁷。

尽管如此,还有报道指出,在 PCOS 患者接受 hCG 预处理的 IVM 周期中,未成熟卵母细胞的核成熟率显著提高,但在未成熟卵母细胞取卵前使用 hCG 并未改善后续胚胎的发育能力⁴⁷。一份综述报告指出,目前尚无确凿证据表明 hCG 预处理会影响 IVM 治疗中的活产率、妊娠率或流产率⁴⁸。最近一项大规模回顾性研究显示,在 921 名接受 hCG 预处理 IVM 治疗的女性中,首次胚胎移植后的活产率为 31.7%,各周期累计活产率为 33.7%,这表明对 PCOS 患者采用 hCG 预处理 IVM 治疗是可行的,且能获得可接受的活产率⁴⁹。一项针对 324 名 PCOS 患者的数据分析回顾性队列研究报告称,hCG 预处理组的卵子成熟率趋势高于非预处理组(52.7%对比 48.6%),但未发现统计学上的显著性差异⁵⁰。于是他们得出结论:两组在临床妊娠率方面无显著差异,流产率和活产率也相似,这些统计表明在未成熟卵母细胞取卵前进行 hCG 预处理,可能无法改善 PCOS 女性接受 IVM 治疗的临床结局。然而,必须说明的是,临床结果受多种因素影响,但已确认的关键因素是 hCG 预处理,它从百分比和时间进程两方面改善卵子成熟度¹。

有趣的是,对于接受 IVM 治疗的 PCOS 患者,在未成熟卵母细胞取卵前 36 小时进行 hCG 预处理,同时配合为期数天的 FSH 预处理,似乎并无其他益处⁵¹。即使进行了数天的 FSH 预处理,在 PCOS 患者的 IVM 治疗周期中,卵巢内也极少见到领头或优势卵泡。然而,在 hCG 预处理 36 小时后,实际上可以从卵泡中取出 M-I 期的卵母细胞,有时甚至能取出 M-II 期的卵母细胞。因此,需要特别指出的是,月经周期正常的女性和多囊卵巢综合征患者相对比,hCG 预处理后的卵巢状况及结果将存在显著差异。

鉴于 IVM 治疗的优势,该疗法已被应用于部分月经周期正常、卵巢功能正常且倾向于选择 IVM 治疗的不孕女性。在该类患者中,于未成熟卵母细胞取卵前进行 FSH 预处理,有概率能够获取更多的未成熟卵母细胞。然而,在 IVM 治疗中,若从月经周期第 3 天起连续 3 天使用固定剂量(150IU/天)的 FSH 进行预处理,且不进行 hCG 预处理,则并未增加每次获得的卵子数量,也未改善卵子成熟和胚胎发育情况^{52,53}。一项研究旨在确定对月经周期正常的卵巢患者,通过施用促性腺激素能否提高 IVM 治疗的效率,结果表明,通过 FSH 联合 hCG 预处理可获得更理想的临床结果,而仅采用 FSH 预处理或仅采用 hCG 预处理对临床结果均无明显影响⁵⁴。最近有报道称,在 IVM 周期中,受试者先接受 3 天、每日 100IU 的 FSH 治疗,随后注射 10000 IU hCG,首次胚胎移植后的活产率为 36.5%,这表明对于卵泡数(AFC)较高且正在接受 ART 治疗的女性而言,与常规促排卵试管婴儿周期相比,IVM 是一种有效的替代方案,同时还能消除卵巢过度刺激综合征(OHSS)的风险⁵⁵。

2.3 卵巢组织及妇产科手术中获取的未成熟卵母细胞

一般我们可以在卵泡期和黄体期的卵巢手术标本中可获取未成熟卵母细胞,人类 IVM 技术正是基于此发展而来的。正是从这些未成熟的卵细胞中,诞生了首批 IVM 婴儿¹¹。从目前看来似乎来自月经周期不同阶段的未成熟卵母细胞,不会对卵母细胞体外成熟以及随后的受精和胚胎发育产生不利影响。来自妇产科手术标本的未成熟卵母细胞,可能会为年轻女性通过未成熟卵母细胞采集进行生育力保存提供可能性。

玻璃化冷冻技术最近所取得的进展可以显著提高卵母细胞冷冻保存的疗效,无论是在卵母细胞存活率、妊娠率还是活产率方面,其水平现已可与体外受精治疗中使用新鲜卵母细胞所达到的水平相媲美。在过去的二十年里,由玻璃化冷冻卵母细胞产生的活产数迅速增加。迄今为止,大多数活产均来自标准卵巢刺激周期中体内成熟的卵母细胞,而来自冷冻保存的 IVM 卵母细胞的活产仅占极少数⁵⁶⁻

⁵⁸。目前而言，关于利用冷冻保存后的 IVM 卵母细胞为癌症患者进行生育力保存的周期，目前报告的妊娠案例寥寥无几⁵⁹⁻⁶¹。因此，我们现在必须考虑对体外成熟后由未成熟卵子产生的卵子或胚胎进行冷冻保存的效率。

此外，一个关键问题是：未成熟卵母细胞应在 IVM 前还是后进行冷冻保存。鉴于 GV 期末成熟卵母细胞与成熟 MII 期卵母细胞在结构上的差异，有研究提出，在未成熟的 GV 期进行冷冻保存可能减少冷冻过程对卵母细胞造成的损伤⁶²。从理论上讲，使用未成熟的 GV 期卵母细胞可规避多倍体和非整倍体的风险，因为在第一期前期双细期阶段，染色质呈弥散状，且被核膜包围，这可能避免纺锤体的解聚⁶²。然而，GV 期卵母细胞经冷冻-解冻后能否进行正常的 IVM 仍存疑。尽管存活率有提高的现象，但体外成熟卵母细胞的质量仍是与未成熟卵母细胞冷冻相关的主要问题⁶³。

随着玻璃化冷冻技术的发展，研究发现，在未成熟的 GV 期进行玻璃化冷冻的卵母细胞与在成熟的 M-II 期进行玻璃化冷冻的卵母细胞，其存活率并无差异⁶⁴。然而，对处于 GV 阶段的不成熟卵母细胞进行玻璃化冷冻处理会显著降低卵母细胞的成熟潜力，这表明卵母细胞应在 IVM 后的成熟 M-II 阶段进行玻璃化冷冻处理，而非在未成熟的 GV 阶段⁶⁵⁻⁶⁷。正如早期研究已知的那样，卵母细胞的正常成熟需要卵丘细胞通过间隙连接与卵母细胞胞质相连⁸。如果在未成熟的 GV 期对卵母细胞进行冷冻保存，卵丘卵母细胞复合体的结构将在冷冻和解冻过程中，因冷冻（或玻璃化冷冻）和解冻（加热）溶液的高渗透压而遭到破坏。因此，在未成熟卵母细胞的 IVM 过程中，经冷冻和解冻后，卵丘细胞与卵母细胞胞浆之间的间隙连接将消失。在这种情况下，卵母细胞的成熟率及正常的胞浆成熟可能因卵丘细胞与卵母细胞的连接中断而受到影响。

此外，在分娩时通过剖宫产手术可采集未成熟卵母细胞^{1,68,69}。经 IVM 处理后，所采集的未成熟卵母细胞具有相对较高的成熟率⁷⁰。一项针对 95 名接受剖宫产手术的孕妇的大型研究中，对她们进行了未成熟卵母细胞采集，结果表明，在剖宫

产时获取的卵母细胞中，有很高比例具有体外成熟的能力，并且能够受精并发育为优质囊胚⁷¹。值得注意的是，研究者还对比了来自剖宫产和妇科手术女性的体外成熟人类卵子的成熟率、受精率及胚胎发育率，结果显示这两组卵子的成熟率、受精率以及形成优质囊胚的比率均无显著差异，这表明孕妇与非孕妇之间的未成熟卵子发育能力并无差异⁷²。因此，在剖宫产手术期间采集未成熟卵子并进行IVM，可能为经剖宫产分娩的女性提供一种良好的生育力保存方案。与此同时，这些经IVM和玻璃化冷冻处理的未成熟卵子，可能成为卵子库的潜在来源，供有需要的育龄妇女捐赠使用。

此外，除了剖宫产外，在妇科手术过程中也可以取出未成熟卵母细胞⁷²。未成熟卵母细胞手术（IVM-surgery）提出在内窥镜妇科手术过程中经阴道取出未成熟卵母细胞^{73,74}。最近，有报道称，共纳入93例接受非刺激性IVM手术的难治性PCOS患者，并对临床结果进行了影响因素分析，结果表明，在腹腔镜和宫腔镜手术过程中进行非刺激性IVM手术，既为自然受孕提供了机会，也为ART治疗创造了条件⁷⁵。

卵巢组织冷冻保存是针对有早发性卵巢功能衰竭（Premature Ovarian Failure, POF）风险的青春期前女孩的主要生育力保存方法。对于因时间限制或禁忌症而无法进行卵巢刺激的青春期癌症患者，也可将其作为一种生育力保存方法，即先进行卵巢组织冷冻保存，随后进行移植。卵巢组织冷冻保存仅能保存原始卵泡和初级卵泡。

有报道指出，在卵巢楔形切除术或卵巢切除术后，从可见的卵泡腔卵泡中取出未成熟卵母细胞，并随后对这些卵母细胞进行IVM和玻璃化冷冻，这为生育力保存提供了一种额外策略，表明该生育力保存方法可作为卵巢组织冷冻库保存的辅助手段⁷⁶。此外，将卵巢组织冷冻保存与从组织中采集未成熟卵母细胞相结合，随后对卵母细胞进行IVM和玻璃化冷冻，对于患有镶嵌型特纳综合征的年轻女性而言，是一种极具前景的生育力保存方法^{77,78}。

3. 人类未成熟卵母细胞的体外成熟培养液

人类卵母细胞在卵泡发育（卵母细胞生长和成熟）过程中获得一系列能力，这些能力在受精及随后的早期胚胎发育中起着至关重要的作用。尽管未成熟卵母细胞的 IVM 成功率较高，但 IVM 卵母细胞的发育能力仍不尽如人意，这体现在其发育至囊胚阶段的比例相对较低，以及移植后的着床率较低。卵母细胞 IVM 深受培养条件的影响。迄今为止，研究已积累了大量数据，但目前选择特定培养液用于人类未成熟卵母细胞 IVM 的依据，基本主要源于对其他细胞类型培养方法的适应性调整。现有的卵母细胞 IVM 培养液，都是以复杂培养基为基础，并添加了不同物质。

这些复杂的培养液——包括能量源和氮源、维生素、抗氧化剂，经碳酸氢盐缓冲，并添加了各种血清（蛋白质）、促性腺激素（FSH 和 LH）、胰岛素、生长因子及类固醇——其已在未成熟卵母细胞 IVM 的研究和临床应用中得到广泛应用^{7,8,13,79,80}。然而，最好在使用前就将促性腺激素、生长因子、类固醇以及胰岛素等激素补充到 IVM 培养液中，因为这些激素和生长因子的活性半衰期在 IVM 培养液中较短。内源性和外源性信号（即促性腺激素、生长因子、胰岛素和皮质醇）作为上游调节因子，可以通过调节卵泡脂质代谢的稳态，从而维持卵子的减数分裂和卵泡发生。

有许多优秀的综述文章描述了 IVM 培养液的基本成分以及每种添加剂在 IVM 培养液中的功能作用。因此，在本综述中，我们将不涉及常见的补充成分，而是简要讨论卵泡液减数分裂激活固醇（Follicular Fluid Meiosis-Activating Sterol, FF-MAS）以及其他一些因子。

研究发现，FF-MAS 在哺乳动物卵泡液中浓度较高⁸¹，这表明它参与了减数分裂的调控^{82, 83}。动物研究表明，向培养液中添加 FF-MAS 可诱导减数分裂恢复，且该效应呈剂量依赖性⁸⁴。另有报道指出，向 IVM 培养液中添加 FF-MAS 可提高卵母细胞核与细胞质成熟的同步性⁸⁵⁻⁸⁷。然而，向 IVM 培养液中补充 FF-MAS 并未改

善人类未成熟卵母细胞在体外成熟和胚胎发育方面的结果。与此同时，研究结果显示胚胎染色体异常率较高⁸⁸。有趣的是，作者指出，在取卵时尚未成熟的大多数暴露于 hCG 的未成熟卵母细胞存在缺陷，这表明在 GV 期或 M-I 期取出的、暴露于 FSH/hCG 的卵母细胞不该用于不孕症治疗。

有报道称，FF-MAS 可促进猪卵母细胞的体外减数分裂，这表明减数分裂相关基因的相对表达水平因 FF-MAS 而上调⁸⁹。尽管这些结果表明，FF-MAS 的内源性积累有利于猪卵母细胞减数分裂的恢复，且 MAPK 信号传导参与了 FF-MAS 诱导的减数分裂恢复，但其对人类未成熟卵母细胞在 IVM 过程中的有益作用仍存疑，且尚无进一步的研究结果。MAS 是胆固醇代谢途径中 SC4MOL 和 NSDHL 的底物，对机体的正常发育至关重要⁹⁰。在产生代谢物的类固醇合成途径中，将角鲨烯转化为胆固醇是至关重要的，SC4MOL 和 NSDHL 催化 MAS 上 C4 甲基基团的两个连续氧化脱羧步骤^{91,92}。因此，人们已注意到，脂质代谢是卵泡发生和卵母细胞减数分裂期间卵泡微环境中的一项重要生物事件⁹³。尽管如此，FF-MAS 在 IVM 培养液中的确切结果尚需进一步证实。

在相关研究中，通过在 IVM 培养液中添加褪黑素以优化培养液的尝试取得了相对理想的成果，包括动物和人类未成熟卵母细胞⁹⁴⁻⁹⁶，这表明褪黑素可以通过保护线粒体功能，促进从促排卵周期中获取的人类未成熟卵母细胞发育，从而孕育出健康的后代^{97,98}。尽管有研究报道，不同培养液和补充剂会影响 IVM 卵母细胞的质量，但培养液中的某些因素如何在体外促进卵母细胞成熟和提高其质量，目前尚不清楚。大量研究表明，溶血磷脂酸也能促进体外卵母细胞的成熟、受精和胚胎发育^{70,99,100}。

家畜卵母细胞的成熟研究表明，应采用一种旨在维持卵母细胞核与细胞质成熟同步性的预成熟培养策略¹⁰¹。该思路是利用分子化合物在体外调节卵母细胞内的环腺苷酸（Cyclic Adenosine Mono Phosphate, cAMP）水平，因为需要较高的 cAMP 水平才能使卵母细胞在适当的培养液中保持减数分裂停滞状态足够长的

时间，从而获得发育能力。因此，在 C 型利钠肽（c-Type Natriuretic Peptide, CNP）存在的情况下进行更长的培养期（预成熟或“获能”培养），随后进行体外成熟（CAPA-IVM），以诱导阶段依赖性的成熟特征¹⁰²。有报道称，CAPA-IVM 可以显著改善来自小抗穆勒管卵泡（<6 毫米）的卵母细胞体外成熟，这些卵母细胞可以通过轻微的卵巢刺激从女性体内轻松取出⁴²。然而，在改善体外成熟培养液本身方面，似乎尚未取得突破。适用于未成熟卵母细胞的最佳体外成熟培养液，应与含有完全成熟卵母细胞的卵泡液中的生理条件相似。

4. 未成熟卵母细胞体外成熟（IVM）方案

为了获得令人满意的临床结果，通过促排方法让患者进行更充分的准备以及优化卵母细胞培养系统，对 IVM 方案进行了改进。

如上所述，未成熟卵母细胞的来源和培养体系是 IVM 技术最重要的特征。目前已提出了多种 IVM 方案¹⁰³。根据所获得的未成熟卵母细胞来源及培养过程，可将其分为：(a) 采用或不采用 FSH 或 hCG 预处理方案的 IVM；(b) 采用或不采用延长培养方案的 IVM 方案。

4.1 未使用促卵泡激素与人绒毛膜促性腺激素预处理的体外成熟方案

该方案针对未成熟卵母细胞的经典 IVM 方案。在此治疗中，不会给女性使用任何促性腺激素来刺激卵巢或诱导卵母细胞成熟及排卵。该方案最初源于妇科手术材料，并适用于患有 PCOS 的女性，无论其处于卵泡期还是黄体期¹³。未成熟卵母细胞从处于 GV 期的不同大小卵泡中取出，并需在体外培养至少 30 小时，才能达到成熟的 M-II 期^{1,7}。

4.2 采用促卵泡激素预处理的体外成熟方案

该方案的原理是：通过使用小剂量的 FSH 刺激卵泡增大，从而获取更多未成熟卵子，并提高其体外成熟潜能和发育能力。然而，关于 FSH 预处理的剂量和持续时间尚无共识。多项试验评估了 FSH 预处理的实用性，通常剂量为每天 150 IU FSH，持续 3 - 6 天，从月经周期的第 2 或第 3 天开始（在孕激素撤药出血后），随后在周期第 7 - 10 天进行卵子采集，无需注射 hCG¹⁰⁴。关于 FSH 预处理对 IVM 治疗的影响，其相关数据与未经 FSH 预处理的中期卵泡所获得的 IVM 未成熟卵母细胞率相比，存在矛盾之处。

4.3 采用人绒毛膜促性腺激素预处理的体外成熟方案

1999 年有报道称，hCG 触发法首次成功应用于 IVM⁴³，该研究对 PCOS 患者在

取卵前 36 小时注射了一次 10000 IU 的 hCG。研究发现，在从 PCOS 女性体内取出未成熟卵子之前，通过 hCG 预处理，可以加速卵子的成熟过程⁴⁵。事实上，在 PCOS 患者中，经黄体酮诱导引流出血后，于周期第 10 - 14 天在 hCG 给药下进行取卵，此时卵泡直径几乎未达到 10 毫米。在体外培养 24 小时后，超过一半的取出的未成熟卵子达到了 M-II 期。这意味着，在这组 PCOS 女性中，部分卵母细胞在注射 hCG 后的 36 小时内，已在体内开始了卵母细胞成熟过程。因此，在未成熟卵母细胞取卵前进行 hCG 预处理，有可能获得更多成熟的卵母细胞，并产生更多的胚胎。尽管关于对 PCOS 女性进行未成熟卵母细胞取卵前进行 hCG 预处理存在一些争议，但毫无疑问，hCG 预处理加快了卵母细胞 IVM 的时间进程，提高了卵母细胞成熟率，从而带来了更好的临床结果。

4.4 促卵泡激素联合人绒毛膜促性腺激素预处理的体外成熟方案

PCOS 患者可采用 FSH 与 hCG 联合方案进行预处理，以进行 IVM 治疗。一项针对 921 名 PCOS 女性进行 IVM 治疗的近期大型回顾性研究中，采用了单次 hCG 注射联合 FSH 预处理方案，卵母细胞成熟率达 71%。在 12 个月内完成一个 IVM 周期后的累计活产率为 33.4%⁴⁹。另一项针对 919 名卵泡储备量 (AFC) 较高的多囊卵巢综合征女性的研究，将 IVM (采用 FSH 联合 hCG 预处理方案) 与常规体外受精 (IVF) 进行了比较，结果发现，一个周期常规 IVM 和 IVF 后的累计活产率相当 (39.3% vs. 49.8%)，且各组在分娩时的孕周、早产率及平均出生体重方面均未发现显著差异⁵⁵。尽管如此，必须要说的是，对于 PCOS 或 AFC 值较高的女性而言，hCG 注射的时机是关键问题，因为卵泡大小是 hCG 注射后获得卵子的决定性因素。希望在 hCG 注射后 36 小时进行取卵时，能够收集到所有体内成熟的卵母细胞，因为相对较小的卵泡 (直径 12 - 14 毫米) 也能获得成熟的 M-II 期卵母细胞。

此外，必须特别强调的是，在常规卵巢刺激方案中从相对较大的卵泡中取出的未成熟卵母细胞可能不适合进行 IVM，因为这些卵母细胞本应在 hCG 注射后 36 小时进行取卵时达到成熟，但实际上并未成熟。这意味着所取出的未成熟卵母细

胞本身已经存在某些问题⁸⁸。

4.5 非延长培养式体外成熟方案

无论未成熟卵母细胞的来源如何（无论是否经 FSH 或 hCG 预处理），在取卵后，所获得的未成熟卵母细胞（包括 GV 期和 M-I 期的卵母细胞）均在体外培养 24 - 48 小时，尽管部分 M-I 期卵母细胞在体外培养 5 - 6 小时后即已成熟。由于在取卵时卵泡的大小各不相同，其成熟和早期胚胎发育的潜力可能有所不同^{35,104}，这一点已通过卵母细胞 IVM 的不同时间进程得到证实^{1,15,45}。处于 GV 期的卵母细胞从卵泡中取出后，需要在体外培养至少 30 小时^{1,7,45}。最近有报道称，与体内成熟的卵母细胞相比，该方法不会提高胚胎的非整倍体率，且能确保胚胎质量良好，表明胚胎的非整倍体率与女性年龄相关¹⁰⁵。

4.6 延长培养式体外成熟方案

鉴于 IVM 卵母细胞在核和细胞质成熟方面可能未同步¹⁰¹，针对未成熟卵母细胞的 IVM 提出了一种采用延长培养的新方案：一种突出的预成熟培养系统，也被称为双相 IVM 或获能-IVM (CAPA-IVM)⁴²。双相 IVM 系统包括两个步骤：预体外成熟培养：该阶段抑制卵母细胞自发恢复减数分裂，维持卵母细胞与 cumulus 细胞之间的间隙连接通讯，并促进卵母细胞获得发育能力；体外成熟培养阶段：该阶段诱导卵母细胞恢复减数分裂并成熟。通过补充环腺苷酸 (cAMP) 调节剂、环鸟苷酸调节剂、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 或 c 型利钠肽 (CNP)^{42,102}，用于阻断减数分裂恢复，并将卵母细胞维持在 GV 期长达 24 小时，直到将其转移至 IVM 培养基中培养 30 小时。

与未采用延长培养方案相比，该方案在 PCOS 患者中显示出更高的 IVM 率和临床妊娠率，且卵母细胞退化率有所降低¹⁰⁶。在基线卵泡计数 (AFC) 较高的患者中，IVM 组的临床妊娠率 (50.5%) 和活产率 (35.2%) 与常规体外受精组（分别为 56.4% 和 43.2%）在首次胚胎移植后的结果相当¹⁰⁷。同时，与自然受孕所生

的儿童相比，采用延长培养方案对儿童的身心发育没有显著影响^{108,109}。另有报告称，在常规促排卵方案与延长 IVM 培养方案所产生的囊胚中，印记 DNA 甲基化和基因表达未发现显著差异¹¹⁰。然而，必须考虑到，采用延长 IVM 培养方案的时间总计为 54 小时（24 小时抑制期和 30 小时体外成熟期），这比未采用延长培养方案的时间要长得多。

5. 体外成熟（IVM）技术的拓展应用

研究最初表明，对未成熟卵母细胞进行取卵后实施 IVM 治疗，是针对无排卵性 PCOS 不孕女性的一种有效疗法^{43,45}。随后该方法也被证实适用于卵泡储备量（AFC）较高的不孕女性。^{111,112}在月经周期规律的女性中，每个月经周期中约有 20 个抗穆勒管期卵泡被选中，并发育至排卵前阶段¹¹³。根据每日经阴道超声检查的结果，该组女性在月经周期内可出现两到三波卵泡发育，这挑战了传统理论——即仅有一批抗穆勒管期卵泡在月经周期的卵泡期生长^{114,115}。因此，对于月经周期规律的女性，在取卵前仅使用 hCG 进行预处理的显著优势在于，能够从领先或优势卵泡中获取成熟卵子，而不是获取未成熟卵子。需要知道的是，卵巢中存在优势卵泡不会对经 IVM 技术处理后的未成熟卵子的质量及其早期胚胎发育能力产生不利影响³¹⁻³³。基于这些发现，IVM 技术的临床应用一直在不断发展。

对于这一类女性，应考虑采用自然周期体外受精，并在领先或优势卵泡达到一定大小时注射 hCG。在这种情况下，可在取卵时获取一至两个成熟卵子以及若干个未成熟卵子，如上所述，在 hCG 诱导后 36 小时，即开发了自然周期体外受精结合 IVM 方案^{112,116}。因此，提高自然周期体外受精（IVF）治疗成功率的最具吸引力的方法似乎是联合使用体内成熟的卵母细胞与未成熟卵母细胞采集。若同时收集来自优势卵泡或主导卵泡的成熟卵母细胞以及来自小卵泡的未成熟卵母细胞，并使这些未成熟卵母细胞在体外成熟以产生更多具有发育潜能的胚胎，则妊娠机会可显著提高。

在自然周期体外受精（IVF）联合 IVM 治疗中，预防优势卵泡过早排卵可能至关重要。根据我们的经验，当优势卵泡直径达到 10 - 14 毫米时，我们在取卵前 36 小时注射 10000 IUhCG。对于选定的女性群体，采用自然周期体外受精结合 IVM 治疗后，每次胚胎移植的临床妊娠率可达约 45% - 50%¹¹²。此外，寻求体外受精治疗的不孕女性中，超过一半可采用自然周期体外受精结合 IVM 治疗或单独的 IVM 治疗。如果最初选择了自然周期体外受精结合 IVM 治疗，这可能表明该治疗方案是一种

有效的选择，特别是对于35岁以下的女性而言¹¹¹。这也可能表明，对于对促排卵周期治疗反应不佳或治疗失败的患者，自然周期体外受精结合IVM治疗可能更为理想¹¹⁷。有趣的是，一份最新报告指出，即使卵巢中存在优势卵泡或该卵泡发生排卵，也不会显著影响从小卵泡中获取的未成熟卵母细胞的发育和着床能力。因此，这进一步证实了自然周期体外受精结合未成熟卵母细胞培养（IVM）治疗，对于无需卵巢刺激的女性而言是一种极具前景的治疗方案³³。

如今，鉴于体外受精（IVF）技术的高效性及培养体系的改进，自然周期IVF或温和刺激方案可能更适用于接受IVF治疗的女性。与传统的试管婴儿治疗相比，温和刺激旨在制定更安全、更适合患者的方案，将治疗风险降至最低¹¹⁸，这表明，在所有临床情况下都应考虑采用轻度卵巢刺激进行试管婴儿治疗，因为就妊娠结果而言，它与传统试管婴儿一样有效，但更安全、耐受性更好且费用更低¹¹⁹。温和刺激或改良自然周期试管婴儿的定义是：使用低剂量外源性促性腺激素；在联合使用促性腺激素释放激素拮抗剂的周期中缩短治疗时间；或使用柠檬酸克罗米芬（CC）等口服制剂进行卵巢刺激，以期获取更多卵子^{120,121}。值得注意的是，采用CC联合低剂量促性腺激素进行温和刺激，也可被视为对预后良好的体外受精（IVF）患者的一种现实治疗方案¹²²。

尽管自然周期体外受精联合卵母细胞IVM的治疗方案以及单纯IVM治疗方案，在超过50%的不孕女性中可达到可接受的妊娠率和着床率，但在从优势卵泡和领先卵泡中取出成熟卵子后，从小型卵泡中取出未成熟卵子可能会遇到技术上的困难¹¹¹。因此，我们提出了一种基于自然周期试管婴儿结合IVM的改良治疗方案，即温和刺激试管婴儿结合IVM治疗^{16,17}。该方法规定先抽吸领先卵泡，然后抽吸次领先卵泡。如果精子质量参数正常，可采用体外受精（IVF）对成熟卵子进行受精；否则，可采用ICSI。

为了鉴定未成熟卵母细胞，必须同时分析卵泡的大小以及卵丘-卵母细胞复合体（Cumulus-Oocyte Complex, COC）的扩张形态。具有少量内层致密卵丘细

胞且外层卵丘扩张模式良好的卵丘复合体（COCs）可被观察到，因为它们可在受精培养基或 IVM 培养基中培养 4 - 6 小时后剥除表层，从而评估卵母细胞成熟度。当卵母细胞成熟后，可以通过 IVF 或 ICSI 进行受精，剩余的不成熟卵母细胞可以在 IVM 培养基中培养过夜。这些未成熟卵母细胞将在 IVM24 小时后再次检查，以确定是否可以进行受精。成熟的卵母细胞可使用前一天制备的精子样本进行 ICSI 受精，该精子样本需置于室温下，并用密封良好的试管保存¹²³。

现已制定了一套将改良自然周期体外受精或温和促排卵周期体外受精与卵母细胞 IVM 治疗相结合的方案（图 2）。我们的初步数据表明，改良自然周期体外受精或温和促排卵周期体外受精结合卵母细胞 IVM 治疗的方法是有效的。

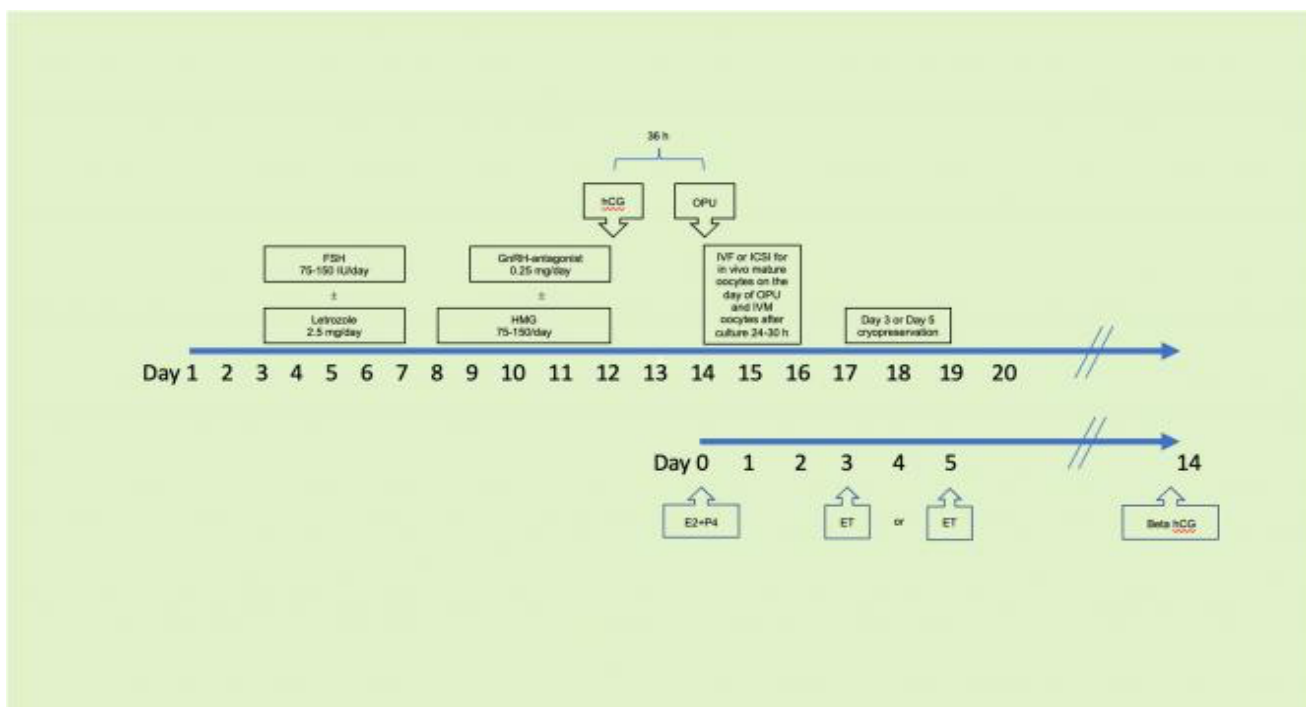


图 2 改良自然周期体外受精或温和刺激周期体外受精联合未成熟卵母细胞体外成熟（IVM）的治疗方案。E2，雌二醇；ET，胚胎移植；ICSI，卵胞浆内单精子注射；IVF，体外受精；IVM，体外成熟；OPU，取卵；P4，黄体酮。

6. 结 论

IVM 技术是一种治疗不孕及生育力保存有效及具有应用价值的辅助生殖技术。卵母细胞在生长过程中对其母源 mRNA 进行妥善保存, 因为卵母细胞只能利用储存的 mRNA 合成新的蛋白质以支持受精后的早期胚胎发育。临床 IVM 是指 GV 和 M-I 期未成熟卵在体外成熟培养过程。

未成熟卵母细胞的来源可被视为 IVM 的关键因素。除了卵泡的大小和发育阶段外, 未成熟卵母细胞的质量还与女性年龄直接相关。未成熟卵母细胞可从经 FSH、hCG 或 FSH 与 hCG 联合处理的女性体内获取。IVM 技术的妊娠成功率似乎与获取的未成熟卵子数量相关。基于未成熟卵母细胞的来源及培养条件, 目前已提出多种 IVM 方案。未成熟卵母细胞的 IVM 效果深受培养条件影响, 但通过改进 IVM 培养液本身尚未取得突破性进展。

IVM 技术的临床应用延伸拓展, 主要表现为自然周期体外受精或温和促排体内成熟卵与未成熟卵母细胞联合获取的治疗方案。这一辅助生殖技术可作为首选体外受精方案来治疗不孕不育。

参考文献

1. •Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes. Hum Reprod Update. 1998;4:103-120.
2. •Pincus G, Saunders B. Unfertilized human tubal ova. Anat Rec. 1937;69:163-169.
3. •Pincus G, Saunders B. The comparative behaviours of mammalian eggs. In vitro and in vivo. VI. The maturation of human ovarian ova. Anat Rec. 1939;75:537-545.
4. •Rock J, Menkin MF. In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Science. 1944;100:105-107.
5. •Menkin MF, Rock J. In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Am J Obstet Gynecol. 1948;55:440-452.
6. •Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature. 1965;208:349-351.
7. •Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet. 1965;2:926-929.
8. •Kennedy JF, Donahue RP. Human oocytes: maturation in chemically defined media. Science. 1969;164:1292-1293.
9. •Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA, Jones HJ. Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. Am J Obstet Gynecol. 1966;96:192-200.
10. •Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature. 1969;221:632-635.
11. •Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, et al. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril. 1991;55:109-113.
12. •Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet. 1978;2:366.
13. •Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertil Steril. 1994;62:353-362.
14. •Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med. 1999;341(1624):1626-1626.
15. •Chian RC. In vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. Reprod Biomed Online. 2004;8:547-552.
16. •Yang ZY, Chian RC. Development of in vitro maturation techniques for clinical applications. Fertil Steril. 2017;108:577-584.
17. •Chian RC, Wang L, Yang ZY. Strategies of infertility treatment with human immature oocytes. Reprod Dev Med. 2018;2:237-248.
18. •Chian RC. Source of human oocytes for infertility treatment and fertility preservation. Reprod Dev Med. 2022;1:6-12.
19. •Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, et al. In vitro maturation: a committee opinion. Fertil Steril. 2021;115:298-304.
20. •Jukam D, Shariati S, Skotheim JM. Zygotic genome activation in vertebrates. Dev

Cell. 2017;42:316–332.

21. • Chousal J, Cho K, Ramaiah M, et al. Chromatin modification and global transcriptional silencing in the oocyte mediated by the mRNA decay activator ZFP36L2. *Dev Cell*. 2018;44:392–402.
22. • Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development*. 2010;137:859–870.
23. • Pors SE, Nikiforov D, Cadenas J, et al. Oocyte diameter predicts the maturation rate of human immature oocytes collected ex vivo. *J Assist Reprod Genet*. 2022;39:2209–2214.
24. • Cavilla JL, Kennedy CR, Byskov AG, Hartshorne GM. Human immature oocytes grow during culture for IVF. *Hum Reprod*. 2008;23:37–45.
25. • Cheng S, Altmeppen G, So C, et al. Mammalian oocytes store mRNAs in a mitochondria-associated membraneless compartment. *Science*. 2022;378:q4835.
26. • Luong XG, Daldello EM, Rajkovic G, et al. Genome-wide analysis reveals a switch in the translational program upon oocyte meiotic resumption. *Nucleic Acids Res*. 2020;48:3257–3276.
27. • Zhang C, Wang M, Li Y, Zhang Y. Profiling and functional characterization of maternal mRNA translation during mouse maternal-to-zygotic transition. *Sci Adv*. 2022;8:j3967.
28. • Xiong Z, Xu K, Lin Z, et al. Ultrasensitive Ribo-seq reveals translational landscapes during mammalian oocyte-to-embryo transition and pre-implantation development. *Nat Cell Biol*. 2022;24:968–980.
29. • Siristatidis C, Sergentanis TN, Vogiatzi P, et al. In vitro maturation in women with vs. without polycystic ovarian syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10:e134696.
30. • Tsuji K, Sowa M, Nakano R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod*. 1985;32:413–417.
31. • Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, et al. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J Reprod Fertil*. 1996;106:193–199.
32. • Chian RC, Chung JT, Downey BR, Tan SL. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2002;4:127–132.
33. • Li JH, Sun TC, Zhang SW, et al. Effect of dominant follicle status at the time of retrieval on the clinical outcomes in natural cycle IVF combined with immature oocyte treatment. *Aging (Albany NY)*. 2022;14:4728–4738.
34. • Guzman L, Ortega-Hrepich C, Albuz FK, et al. Developmental capacity of in vitro-matured human oocytes retrieved from polycystic ovary syndrome ovaries containing no follicles larger than 6 mm. *Fertil Steril*. 2012;98:503–507.
35. • Sanchez F, Romero S, De Vos M, et al. Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum Reprod*. 2015;30:1396–1409.
36. • Zheng X, Guo W, Zeng L, et al. In vitro maturation without gonadotropins versus

in vitro fertilization with hyperstimulation in women with polycystic ovary syndrome: a non-inferiority randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2022;37:242–253.

37. •Emperaire JC, Ruffie A, Audebert AJ. Ovulation induction by endogenous LH released by the administration of an LHRH agonist after follicular stimulation for in vitro fertilization. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1992;21:489–494.
38. •Wynn P, Picton HM, Krapez JA, et al. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod.* 1998;13:3132–3138.
39. •Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, et al. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod.* 2000;15:747–751.
40. •Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction.* 2001;122:587–592.
41. •Choavaratana R, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, et al. Outcomes of follicle-stimulating hormone priming and nonpriming in in vitro maturation of oocytes in infertile women with polycystic ovarian syndrome: a single-blinded randomized study. *Gynecol Obstet Invest.* 2015;79:153–159.
42. •Sanchez F, Le AH, Ho V, et al. Biphasic in vitro maturation (CAPA-IVM) specifically improves the developmental capacity of oocytes from small antral follicles. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36:2135–2144.
43. •Chian RC, Buckett WM, Too LL, Tan SL. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril.* 1999;72:639–642.
44. •Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, et al. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E1524–E1531.
45. •Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2000;15:165–170.
46. •Yang SH, Son WY, Yoon SH, et al. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in hCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod.* 2005;20:2097–2103.
47. •Zheng X, Wang L, Zhen X, et al. Effect of hCG priming on embryonic development of immature oocytes collected from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:40.
48. •Reavey J, Vincent K, Child T, Granne IE. Human chorionic gonadotrophin priming for fertility treatment with in vitro maturation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;11:D8720.
49. •Ho V, Pham TD, Le AH, et al. Live birth rate after human chorionic gonadotropin priming in vitro maturation in women with polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res.* 2018;11:70.
50. •Lin Y, Zheng X, Ma C, et al. Human chorionic gonadotropin priming does not improve

pregnancy outcomes of PCOS-IVM cycles. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:279.

51. • Lin YH, Hwang JL, Huang LW, et al. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod*. 2003;18:1632-1636.
52. • Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod*. 1999;14:1847-1851.
53. • Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S. Time interval between FSH priming and aspiration of immature human oocytes for in-vitro maturation: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2003;6:416-420.
54. • Fadini R, Dal Canto MB, Mignini RM, et al. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:343-351.
55. • Ho V, Braam SC, Pham TD, et al. The effectiveness and safety of in vitro maturation of oocytes versus in vitro fertilization in women with a high antral follicle count. *Hum Reprod*. 2019;34:1055-1064.
56. • Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril*. 1998;70:578-579.
57. • Chian RC, Gilbert L, Huang JY, et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril*. 2009;91:372-376.
58. • Chian RC, Huang JY, Gilbert L, et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertil Steril*. 2009;91:2391-2398.
59. • Creux H, Monnier P, Son WY, Buckett W. Thirteen years' experience in fertility preservation for cancer patients after in vitro fertilization and in vitro maturation treatments. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35:583-592.
60. • Kedem A, Yerushalmi GM, Brengauz M, et al. Outcome of immature oocytes collection of 119 cancer patients during ovarian tissue harvesting for fertility preservation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35:851-856.
61. • Rodrigues P, Marques M, Pimentel S, et al. Oncofertility case report: live birth 10 years after oocyte in vitro maturation and zygote cryopreservation. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37:3089-3094.
62. • Toth TL, Baka SG, Veeck LL, et al. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril*. 1994;61:891-894.
63. • Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;113(Suppl 1):S17-S23.
64. • Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, et al. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:369-373.
65. • Cao YX, Chian RC. Fertility preservation with immature and in vitro matured oocytes. *Semin Reprod Med*. 2009;27:456-464.
66. • Borini A, Bianchi V. Cryopreservation of mature and immature oocytes. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53:763-774.
67. • Fasano G, Demeestere I, Englert Y. In-vitro maturation of human oocytes before or after vitrification? *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:507-512.

68. • Ben-Haroush A, Abir R, Sapir O, et al. Aspiration of immature oocytes during cesarean section for fertility preservation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30:2112–2114.
69. • Duarte AD, Gonsales VE, Conzatti M, et al. Selection of developmentally competent human oocytes aspirated during cesarean section. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31:735–739.
70. • Xie Q, Xing Y, Zhou J, et al. The effect of lysophosphatidic acid-supplemented culture medium on human immature oocytes matured in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021;19:83.
71. • Pongsuthirak P, Vutyavanich T. Developmental competence of human embryos derived from in vitro maturation of immature oocytes retrieved during cesarean section. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40:459–464.
72. • Pongsuthirak P, Vutyavanich T. Developmental competence of in vitro-matured human oocytes obtained from pregnant and non-pregnant women. *Clin Exp Reprod Med.* 2018;45:189–194.
73. • Song XL, Lu CL, Zheng XY, et al. Enhancing the scope of in vitro maturation for fertility preservation: transvaginal retrieval of immature oocytes during endoscopic gynaecological procedures. *Hum Reprod.* 2020;35:837–846.
74. • Liu T, Song X, Zheng X, et al. OP-IVM: combining in vitro maturation after oocyte retrieval with gynecological surgery. *J Vis Exp.* 2021.doi:10.3791/61647.
75. • Zhang W, Liang T, Han B, et al. Clinical outcomes of in vitro maturation after oocyte retrieval with gynecological surgery for refractory polycystic ovary syndrome: a retrospective cohort study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:842037.
76. • Xu J, Xu M, Bernuci MP, et al. Primate follicular development and oocyte maturation in vitro. *Adv Exp Med Biol.* 2013;761:43–67.
77. • Huang JY, Tulandi T, Holzer H, et al. Cryopreservation of ovarian tissue and in vitro matured oocytes in a female with mosaic turner syndrome: case report. *Hum Reprod.* 2008;23:336–339.
78. • Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Chian RC. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril.* 2008;89:567–572.
79. • Prins GS, Wagner C, Weidel L, et al. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil Steril.* 1987;47:1035–1037.
80. • Chian RC, Tan SL. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod Biomed Online.* 2002;5:125–132.
81. • Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature.* 1995;374:559–562.
82. • Leonardsen L, Wiersma A, Baltsen M, et al. Regulation of spontaneous and induced resumption of meiosis in mouse oocytes by different intracellular pathways. *J Reprod Fertil.* 2000;120:377–383.

83. • Grondahl C, Lessl M, Faerge I, et al. Meiosis-activating sterol-mediated resumption of meiosis in mouse oocytes in vitro is influenced by protein synthesis inhibition and cholera toxin. *Biol Reprod.* 2000;62:775-780.
84. • Grondahl C, Ottesen JL, Lessl M, et al. Meiosis-activating sterol promotes resumption of meiosis in mouse oocytes cultured in vitro in contrast to related oxysterols. *Biol Reprod.* 1998;58:1297-1302.
85. • Hegele-Hartung C, Kuhnke J, Lessl M, et al. Nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes after treatment with synthetic meiosis-activating sterol in vitro. *Biol Reprod.* 1999;61:1362-1372.
86. • Grondahl C, Hansen TH, Marky-Nielsen K, et al. Human oocyte maturation in vitro is stimulated by meiosis-activating sterol. *Hum Reprod.* 2000;15(Suppl 5):3-10.
87. • Marin BC, Grondahl C, Murray A, et al. Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. *Biol Reprod.* 2004;70:1458-1464.
88. • Lundin K, Ziebe S, Bergh C, et al. Effect of rescuing donated immature human oocytes derived after FSH/hCG stimulation following in vitro culture with or without follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS)—an embryo chromosomal and morphological analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:87-90.
89. • Guo R, Wang X, Li Q, et al. Follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS) promotes meiotic resumption via the MAPK pathway in porcine oocytes. *Theriogenology.* 2020;148:186-193.
90. • Gabitova L, Restifo D, Gorin A, et al. Endogenous sterol metabolites regulate growth of EGFR/ KRAS-dependent tumors via LXR. *Cell Rep.* 2015;12:1927-1938.
91. • Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chem Rev.* 2011;111:6423-6451.
92. • Acimovic J, Rozman D. Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis. *Molecules.* 2013;18:4002-4017.
93. • Liu T, Qu J, Tian M, et al. Lipid metabolic process involved in oocyte maturation during folliculogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:806890.
94. • Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *J Pineal Res.* 2009;47:318-323.
95. • Tian X, Wang F, Zhang L, et al. Beneficial effects of melatonin on the in vitro maturation of sheep oocytes and its relation to melatonin receptors. *Int J Mol Sci.* 2017;18:18.
96. • Li Y, Liu H, Wu K, et al. Melatonin promotes human oocyte maturation and early embryo development by enhancing clathrin-mediated endocytosis. *J Pineal Res.* 2019;67:e12601.
97. • Zou H, Chen B, Ding D, et al. Melatonin promotes the development of immature oocytes from the COH cycle into healthy offspring by protecting mitochondrial function. *J Pineal Res.* 2020;68:e12621.
98. • Zhang Z, Mu Y, Ding D, et al. Melatonin improves the effect of cryopreservation on human oocytes by suppressing oxidative stress and maintaining the permeability of the oolemma. *J Pineal Res.* 2021;70:e12707.

99. • Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Addition of lysophosphatidic acid to mouse oocyte maturation media can enhance fertilization and developmental competence. *Hum Reprod.* 2014;29:234–241.
100. • Boruszewska D, Torres AC, Kowalczyk-Zieba I, et al. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine oocytes: embryonic development and mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:670670.
101. • Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction.* 2016;152:R143–R157.
102. • Sanchez F, Lolicato F, Romero S, et al. An improved IVM method for cumulus–oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. *Hum Reprod.* 2017;32:2056–2068.
103. • De Vos M, Grynberg M, Ho TM, et al. Perspectives on the development and future of oocyte IVM in clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* 2021;38:1265–1280.
104. • Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction.* 2001;121:51–75.
105. • Li J, Chen J, Sun T, et al. Chromosome aneuploidy analysis in embryos derived from in vivo and in vitro matured human oocytes. *J Transl Med.* 2021;19:416.
106. • Vuong LN, Le AH, Ho V, et al. Live births after oocyte in vitro maturation with a prematuration step in women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37:347–357.
107. • Vuong LN, Ho V, Ho TM, et al. In-vitro maturation of oocytes versus conventional IVF in women with infertility and a high antral follicle count: a randomized non-inferiority controlled trial. *Hum Reprod.* 2020;35:2537–2547.
108. • Nguyen DL, Nguyen NA, Pham TD, et al. Development of children born after in vitro maturation with a pre-maturation step versus natural conception: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet.* 2022;39:1959–1965.
109. • Vuong LN, Nguyen M, Nguyen NA, et al. Development of children born from IVM versus IVF: 2-year follow-up of a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2022;37:1871–1879.
110. • Saenz-de-Juano MD, Ivanova E, Romero S, et al. DNA methylation and mRNA expression of imprinted genes in blastocysts derived from an improved in vitro maturation method for oocytes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients. *Hum Reprod.* 2019;34:1640–1649.
111. • Lim JH, Yang SH, Xu Y, et al. Selection of patients for natural cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes. *Fertil Steril.* 2009;91:1050–1055.
112. • Lim JH, Yang SH, Chian RC. New alternative to infertility treatment for women without ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2007;14:547–549.
113. • Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 1994;9:188–191.
114. • Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2003;80:116–122.
115. • Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of ovarian follicle wave

- dynamics in women. *Biol Reprod.* 2003;69:1023-1031.
116. •Chian RC, Buckett WM, Abdul JA, et al. Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertile treatment. *Fertil Steril.* 2004;82:1675-1678.
 117. •Li J, Xu Y, Zhou G, et al. Natural cycle IVF may be more desirable for poor responder patients after failure of stimulated cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:791-795.
 118. •Nargund G, Fauser BC, Macklon NS, et al. The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod.* 2007;22:2801-2804.
 119. •Nargund G, Datta AK, Campbell S, et al. The case for mild stimulation for IVF: recommendations from the International Society for Mild Approaches in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2022;45:1133-1144.
 120. •Hamdine O, Broekmans FJ, Fauser BC. Ovarian stimulation for IVF: mild approaches. *Methods Mol Biol.* 2014;1154:305-328.
 121. •Ho JR, Paulson RJ. Modified natural cycle in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2017;108:572-576.
 122. •Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, Devroey P. Mild ovarian stimulation with clomiphene citrate launch is a realistic option for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2015;104:333-338.
 123. •Yang YN, Wang L, Liu YB, et al. Changes in human sperm motility and DNA fragmentation index after density gradient centrifugation and swim-up procedures. *Reprod Dev Med.* 2022;4:243-248