

# 两种皱缩方法对囊胚冻融结局的影响

张红琴 孟祥黔 刘思瑶 黄军 钟影\*

四川省成都市锦江妇幼保健院 四川成都 610000

**【摘要】目的** 探讨两种人工皱缩方法对囊胚玻璃化冷冻复苏效果及临床妊娠和产科结局的影响。**方法** 2012年9月至2013年3月,在成都市锦江区妇幼保健院生殖中心行优质囊胚冷冻复苏移植379个周期,分为机械组128个周期(玻璃化冷冻前,用显微注射针刺入囊腔内抽出囊胚液使之皱缩)和激光组251个周期(玻璃化冷冻前用激光打孔使囊腔皱缩),进行回顾性分析,比较两组囊胚复苏存活率及移植后妊娠结局和产科结局。**结果** (1)两组临床结局比较:存活率和临床妊娠率,激光组显著高于机械组;双胞胎率,机械组显著高于激光组;着床率和早期流产率两组之间没有统计学差异。(2)单胎妊娠产科结局比较:机械组分娩新生儿43例,激光组分娩新生儿89例,早产率和低体重率两组之间没有统计学差异;平均孕龄、新生儿平均出生体重、新生儿平均出生身长激光组为显著高于机械组。(3)双胎妊娠产科结局比较:机械组24个周期分娩新生儿48例,激光组62个周期分娩新生儿124例,早产率、平均孕龄、新生儿平均出生体重、新生儿平均出生身长和新生儿低体重率,两组之间没有统计学差异。**结论** 在玻璃化冷冻前用激光打孔皱缩囊胚冷冻效果优于显微注射针刺入囊腔皱缩囊胚,两种皱缩方法都没有增加新生儿低体重儿、出生缺陷、死亡率。

**【关键词】** 囊胚移植;玻璃化冷冻;妊娠结局;产科结局**【中图分类号】** R714.8**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1672-0415(2020)07-004-03**【基金项目】** 2018四川省科技厅应用基础研究(面上)(编号:2018JY0357),成都市卫计委医学科研课题立项(编号:2018085)

2001年,日本学者Mukaida等<sup>[1]</sup>使用冷冻环进行玻璃化冷冻人类囊胚,获得了比较满意复苏率后,随着囊胚培养体系不断完善、玻璃化冷冻技术的成熟,现在越来越多的中心进行囊胚玻璃化冷冻,我们中心2007年开展囊胚玻璃化冷冻复苏。囊胚显著特点是囊腔充满液体,在玻璃化冷冻过程中,囊胚腔越大,就越有可能脱水不充分,会使冷冻保护剂的作用减弱,在降温及复温过程中囊胚细胞内有可能形成冰晶而造成不可逆的冷冻损伤。为此,有学者依据囊胚的特点,在玻璃化冷冻前,用显微注射针刺入囊腔抽吸囊腔液及激光打孔、显微针在滋养层上打孔、玻璃微细管反复敲打等人工皱缩的方法来减少囊胚腔容积,结果均表明,人工皱缩能明显提高扩张囊胚的冷冻效率,提高囊胚的体外及体内继续发育的能力。我们中

心于2012年7月至2012年8月采用显微注射针刺入囊胚腔抽吸方法和激光打孔方法进行囊胚冷冻。本文回顾性分析,2012年9月至2013年3月,在成都市锦江区妇幼保健院生殖中心行优质囊胚冷冻复苏移植379个周期,分为机械组128个周期(玻璃化冷冻前用显微注射针刺入囊腔内抽出囊胚液使之皱缩)和激光组251个周期(玻璃化冷冻前用激光打孔使囊腔皱缩),观察两组的临床和产科结局,旨在寻求最佳的囊胚腔皱缩方法,以提高囊胚冷冻复苏效果,使囊胚冷冻复苏移植有更好的临床结局和产科结局。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

2012年9月至2013年3月,在成都市锦江区妇幼保健院生殖中心行优质囊胚冷冻复苏移植379个周期,全部患者知情同意。其中,128个周期在玻璃化冷冻前用显微注射针刺入囊胚腔内抽出囊胚液使之皱缩,年龄为22-41岁(平均年龄 $31.2 \pm 3.97$ ) (机械组)。251个周期在玻璃化冷冻前用激光打孔使囊腔皱缩,年龄为21-43岁(平均年龄 $30.99 \pm 4.16$ ) (激光组)。两组比较无统计学差异,有可比性。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试剂及耗材

所用培养液都由Vitrolife公司提供;耗材由BD公司提供。

#### 1.2.2 促排卵方案

取卵周期中卵巢刺激采用长方案,短方案或超长方案。当主导卵泡直径 $\geq 18$  mm时,肌内注射人绒毛膜促性腺激素10 000

IU,36 h后超声引导下经阴道取卵。

#### 1.2.3 胚胎培养及评分

受精后(17±1)h观察受精情况,第二天在(44±1)h观察卵裂、多核等情况,第三天在(68±1)h观察卵裂期胚胎情况,根据病人情况决定移植或继续囊胚培养,第五天(D5)在(116±1)h和(或)第六天(D6)(140±1)h观察囊胚情况。内细胞团在B级以上、滋养层细胞在C级以上的囊胚将其冷冻保存。卵裂期胚胎按WHO等的标准进行评分,囊胚依据Gardner提出两步评分系统评分。

#### 1.2.4 囊胚皱缩及冷冻解冻

##### A、囊胚皱缩

机械法:用显微固定针固定囊胚,再用显微注射针从两个滋养层细胞连接较薄处刺入囊胚腔内抽出囊胚液,使之皱缩后再行玻璃化冷冻保存。

激光法:采用透明带OCTAX-Laser Shot激光打孔仪,在滋养层细胞连接较薄处(远离内细胞团)非接触式打孔,可见囊腔迅速皱缩,再行玻璃化冷冻保存。

##### B、玻璃化冷冻与解冻

囊胚先在含5%人血清白蛋白(HSA,美国SAGE公司产品)的缓冲液(美国SAGE产品)中洗涤2次,移入玻璃化冷冻保护液1(7.5%DMSO + 7.5%EG+5%HSA基础液)中2分钟,移入玻璃化冷冻保护液2(15%DMSO + 15%EG + 0.5M Sucrose)后,迅速将囊胚转载到冷冻环上,放入液氮,这个步骤需在30秒内完成。每个环上只能装载 $\leq 2$ 个囊胚。

囊胚冷冻复苏时将核对好患者信息的冷冻环迅速放入复苏液1(0.5M Sucrose)中1分钟,转至复苏液2(0.33M Sucrose)中1分钟,转至复苏液3(0.2M Sucrose)中3分钟,再转至5%HSA+MHTF基础液中5分钟,最后转入囊胚培养液中,放入37℃、6%CO<sub>2</sub>,培养箱中培养2 h后,于倒置显微镜下观察存活情况并行胚胎移植。

#### 1.2.5 囊胚存活评价标准与移植

复苏后培养2h,囊胚重新扩张至正常内细胞团和滋养外胚层视为存活,在B超引导下进行移植。

#### 1.2.6 妊娠结果判断

移植术后常规黄体酮支持,移植后40天B超见宫内孕囊诊断为临床妊娠,如果超声检查为三胎及以上,均行减胎术成双胎或单胎。

#### 1.2.7 随访

电话随访临床妊娠病例的妊娠合并症、并发症情况以及分娩

作者简介:张红琴(1980—),女,硕士,副研究员,主要研究领域:生殖医学。

情况,包括孕龄、新生儿体重及新生儿并发症。

### 1.2.8 统计学分析

采用 SPSS24.0 统计软件,计量资料采用 t 检验,计数资料采用卡方检验, P<0.05 为差异显著,有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组临床结局的比较

激光组存活率 98.29%,显著高于机械组 95.10%,差异显著 (P=0.014)。激光组临床妊娠率 76.09%,显著高于机械组 63.28%,差异极显著 (P=0.0087)。机械组移植冷冻复苏囊胚妊娠双胎率 45.68%,显著高于激光组 28.67%,差异极显著 (P=0.00416)。机械组和激光组的着床率分别为 52.36%、59.65%,早期流产率 9.87%、9.19%,两组之间没有统计学差异 (P=0.066, P=0.86)。

表 1: 两组临床结局的比较

组别	存活率 %	临床妊娠率 %	着床率 %	双胎率 %	早期流产率 %
机械组	95.10	63.28	52.36	45.68	9.87
	233/245	81/128	122/233	37/81	8/81
激光组	98.29	76.09	59.65	28.67	9.19
	461/469	191/251	275/461	78/272	25/272
P 值	0.014	0.0087	0.0667	0.00416	0.86

注: P<0.05 差异显著, P<0.01 差异极显著

### 2.2 产科结局比较

#### 2.2.1 单胎妊娠产科结局比较

机械组分娩新生儿 43 例,激光组分娩新生儿 89 例,早产率分别为 9.30%、8.98%,低体重率分别为 4.6%、3.4%,死胎率分别为 2.3%、1.3%,两组之间都没有统计学差异 (P=0.79、P=0.88、P=0.82)。平均孕龄、新生儿平均出生体重、新生儿平均出生身长激光组为 (271.25±9.49) 天、(3.44±0.47)KG、(50.19±1.33)CM,显著高于机械组为 (266.44±12.99) 天、(3.25±0.49)KG、(49.42±2.32)CM,有统计学差异 (P=0.017、P=0.034、P=0.048)。机械组有 1 例极低体重 (<1500g)、有 1 例死胎,因早产死亡;激光组没有极低体重、有 1 例死胎,因妊娠高血压死亡。两组都没有出生缺陷。

#### 2.2.2 双胎妊娠产科结局比较

机械组 24 个周期分娩新生儿 48 例,激光组 62 个周期分娩新生儿 124 例,早产率分别为 70.83%、69.35%,新生儿低体重率分别为 41.67%、45.16%,两组之间都没有统计学差异 (P=0.88、P=0.68)。机械组和激光组平均孕龄分别为 (252.75±8.81) 天、(252.02±11.58) 天,新生儿平均出生体重分别为 (2.53±0.38KG)、(2.53±0.43KG),新生儿平均出生身长分别为 (47.29±2.02)CM、(47.58±2.15)CM,两组之间都没有统计学差异 (P=0.78、P=0.918、P=0.423)。机械组没有极低体重、出生缺陷、死胎;激光组有极低体重 3 例、出生缺陷 2 例 (1 例鞘膜积液,1 例喉软骨未发育全)、死胎 3 例。

表 2: 单胎妊娠产科结局比较

组别	总数 (例)	早产率 %	平均孕龄 (天)	平均出生体重 (KG)	平均出生身长 (cm)	低体重 %	极低体重 %	死胎 %
机械组	43	9.30	266.44±12.99	3.25±0.49	49.42±2.32	4.6	1 例	2.3
		4/43				2 例		1 例
激光组	89	8.98	271.25±9.49	3.44±0.47	50.19±1.33	3.4	0 例	1.3
		8/89				3 例		1 例
P 值		0.79	0.017	0.034	0.048	0.88		0.82

注: 低体重 (<2500g)、极低体重 (<1500g)

表 3: 双胎妊娠产科结局比较

组别	总数 (例)	新生儿 (数)	早产率 %	平均孕龄 (天)	平均出生体重 (KG)	平均出生身长 (cm)	低体重 %	极低体重 %	出生缺陷 %	死胎 %
机械组	24	48	70.83	252.75±8.81	2.53±0.38	47.29±2.02	41.67	0 例	0 例	0 例
			17/24				20 例			
激光组	62	124	69.35	252.02±11.58	2.53±0.43	47.58±2.15	45.16	2.4	1.6	2.4
			43/62				56 例	3 例	2 例	3 例
P 值			0.88	0.78	0.918	0.423	0.68			

注: 低体重 (<2500g)、极低体重 (<1500g)

## 3 讨论

### 3.1 临床结局

目前,大量文献报道玻璃化冷冻囊胚前进行辅助皱缩能提高冷冻复苏效果。这是因为囊胚显著的特点囊腔充满液体,在玻璃化冷冻过程中,囊腔越大,就越有可能脱水不充分,会使冷冻保护剂的作用减弱,在降温及复温过程中更有可能形成冰晶而造成囊胚不可逆的冷冻损伤<sup>[2]</sup>。因此,在玻璃化冷冻前进行人工皱缩使囊腔缩小,以提高囊胚冷冻复苏效果。目前报道的人工皱缩方法有显微注射针抽吸囊腔液<sup>[2]</sup>,激光脉冲<sup>[2]</sup>,微细吸管重复吹吸挤压囊腔,酸化处理等。Balaban 等<sup>[3]</sup>报道,四种方法(机械方法、酸化处理、激光方法、链霉菌蛋白酶消薄透明带)处理囊胚,冷冻复苏后临床妊娠率、种植率、双胎率、早期流产率之间没有差异。Mukaiida 等<sup>[2]</sup>报道,应用激光脉冲和显微针穿刺囊腔辅助皱缩在存活率、临床妊娠率、种植率、早期流产率方面没有差异。Huai 等<sup>[4]</sup>报道,激光辅助皱缩比机械辅助皱缩有较高的临床妊娠率,且差异显著。本研究结果,激光皱缩冷冻复苏囊胚存活率、临床妊娠率显著高于显微注射针抽吸囊腔液皱缩,与 Huai 等<sup>[4]</sup>报道结果一致,但与 Mukaiida<sup>[2]</sup>、Balaban<sup>[3]</sup>报道的结果不同;

激光组和机械组早期流产率分别为 9.87%、9.19%,两组没有统计学差异,与 Mukaiida<sup>[2]</sup>、Balaban<sup>[3]</sup>报道的结果一致,低于冯贵雪等<sup>[5]</sup>报道的人工皱缩囊胚腔的流产率 (18.2%) 和 Takahashi 等<sup>[6]</sup>报道的流产率 (22.0%)。

目前,大家对辅助生殖技术导致多胎妊娠的风险已得到共识,绝大多数医生认为多胎妊娠是辅助生殖技术的一种并发症,尤其是单卵双胎的危害比双卵双胎大得多。本研究结果,机械组和激光组的着床率分别为 52.36%、59.65%,但机械组妊娠双胎率为 45.68%,显著高于激光组的 28.67%。可能原因是显微注射针抽吸囊腔皱缩时在透明带上形成的孔较小,在复苏后容易形成一部分内细胞团在透明带外一部分内细胞团在透明带内的“8”字形 5 期囊胚,着床后形成单卵双胎。有文献报道,在透明带上开口的大小和位置对评估辅助孵化是重要的,如果透明带开口小,内细胞团在孵出时会形成“8”字形,容易形成单卵双胎。Malter 等<sup>[7]</sup>也报道,运用机械辅助方法增加了单卵双胎率,因为在透明带开一小口,形成狭小的通道,内细胞团被分在透明带内外。Hershlag 等<sup>[8]</sup>也报道了,机械辅助孵化增加了单卵双胎率。即使激光皱缩囊胚的着床率高于显微注射针皱缩,但是由于显微注射针皱缩囊胚着床后可能形成较多单卵双胎,因此,显微注射针

皱缩囊胚的双胎率显著高于激光皱缩。

### 3.2 产科结局

尽管大量文献报道,应用辅助方法皱缩囊胚腔进行冷冻复苏,能提高存活率和临床妊娠率,但对于流产率、围产期和新生儿结局报道很少。这主要是在体外受精-胚胎移植时,影响因素不仅是辅助孵化,还有其它因素例如热损伤、诱导突变以及单卵双胎等。

在体外受精-胚胎冷冻复苏移植过程中,孕龄、新生儿出生体重、新生儿出生身长不仅受辅助孵化影响,还有其它因素影响:例如在体内或体外培养透明带缺口时,遭受有害因素的侵害(类毒素、微小有机体);体外培养时培养液中的抗生素影响,冷冻复苏时冷冻损伤等等。最近,Junna等<sup>[9]</sup>报道了无论是单胎妊娠还是双胎妊娠在辅助孵化组 and 没有辅助孵化组活产婴儿平均孕龄是没有差异的,平均出生体重辅助孵化组(3019±496)g显著高于没有辅助孵化组(2979±481)g。本研究结果显示,单胎妊娠时平均孕龄、平均出生体重、平均出生身长激光组显著高于机械组,且差异显著。双胎妊娠时平均孕龄、平均出生体重、平均出生身长,激光组与机械组相似,没有显著差异。

在辅助生殖技术中,不仅关注临床结局更注重产科结局,尤其是出生缺陷。Okanyo and Konc<sup>[10]</sup>回顾性分析了134个激光辅助孵化出生小孩大的或主要出生缺陷率是2.2%,较小的出生缺陷率是10.4%,而同一医疗机构自然妊娠大的或主要出生缺陷率3.0%,较小的出生缺陷率是11.1%,激光辅助孵化没有增加出生缺陷。Mukaida等<sup>[11]</sup>对囊胚玻璃化冷冻、复苏后分娩的新生儿进行分析,560例患者共分娩691个新生儿,出生缺陷率为3.0%,与新鲜囊胚移植出生缺陷率2.3%相当。Junna等<sup>[9]</sup>报道在辅助孵化组和没有辅助孵化组,出生缺陷没有显著差异。冯贵雪<sup>[5]</sup>报道了,人工皱缩囊胚腔的出生缺陷率为2.1%,与新鲜囊胚移植的出生缺陷率1.7%相比没有差异。本研究结果显示,机械组没有出生缺陷,激光组出生缺陷率为0.94%(2/213),低于文献报道,因此两种辅助皱缩方法都没有增加新生儿出生缺陷,是较为安全的方法。

综上所述,在玻璃化冷冻前用激光打孔皱缩囊胚腔冷冻效果优于显微注射针刺入囊腔皱缩囊胚,两种皱缩方法都没有增加新生儿低体重儿、出生缺陷、死亡率。但是显微注射针刺入囊腔皱缩囊胚明显增加了双胎妊娠的风险,本研究是回顾性分析而且大部分病人移植两个囊胚,因此很难准确统计是否是由于单卵双胎增

加而增加了机械组的双胎率,这需要在以后的工作中进行前瞻性大样本单囊胚移植来得以证实。

### 参考文献

- [1] Mukaida T, Nakamura T, Tomiuyama T, et al. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of acryoloop contactless Technique. *Fertil Steril*, 2001, 76(3): 618-620.
- [2] Mukaida T, Oka C, Goto T, et al. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*, 2006, 21: 3246-3252.
- [3] Balaban B, Urman B, Alatas C, et al. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod*, 2002, 17: 1239-43.
- [4] Huai L Feng, Avner Hershlag, Gerald M Scholl, et al. A retrospective study comparing three different assisted hatching techniques. *Fertility and Sterility*, 2009, 91: 1323-1325.
- [5] 冯贵雪, 张波, 舒金辉等. 人工皱缩囊胚腔对囊胚玻璃化冷冻后妊娠结局的影响. *中华妇产科杂志*, 2010, 45(11): 838-842.
- [6] Takahashi K, Mukaida T, Goto T, et al. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoioop: a 4-year follow up study. *Fertil Steril*, 2005, 84: 88-92.
- [7] Malter HE, Cohen J. Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res*, 1989, 24: 67-80.
- [8] Hershlag A, Paine T, Cooper GW, et al. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril*, 1999, 71: 44-146.
- [9] Junna Jwa, Seung Chik Jwa, Akira Kuwahara, et al. Risk of major congenital anomalies after assisted hatching: analysis of three-year data from the national assisted reproduction registry in Japan. *Fertil Steril*, 2015, 104: 71-78.
- [10] Kanyo K, Konc J. A follow-up study of children born after diode laser assisted Hatching. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 110: 176-80.
- [11] Mukaida T, Takahashi K, et al. Perinatal outcome of vitrified human blastocysts in 7 year experience (2670 attempted cycles). *Hum Reprod*, 2008, 23: 48.

(上接第2页)

30(17):1304-1308.

[14] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 成人肺炎支原体肺炎诊治专家共识[S]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33(9):643-645.

[15] Xu Jin. Clinical significance of detection of mycoplasma pneumoniae antibody titer in children with respiratory tract infection[J]. *Chin J Pharmacol*, 2018, 34(16):2001-2003.

(上接第3页)

后,患者的半衰期已经接近<sup>131</sup>I物理半衰期,≥115uSv/h患者的年龄、复发、全切所占比率和≤115uSv/h者比较有显著性差异(P<0.05)。综上所述,<sup>131</sup>I所造成的辐射剂量在治疗前期相对较高,患者在治疗1星期后相对逐渐平稳,因此,对患者实施<sup>131</sup>I治疗时要对其早期的辐射剂量预测起到足够的重视,及早的做好碘吸收量的分析与统计。

### 参考文献

- [1] 青春, 谭小欢. 分化型甲状腺癌<sup>131</sup>I治疗患者对公众的辐射剂量研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(6):993-995.
- [2] 孔宪荣, 秦春元, 刘于. DTC患者<sup>131</sup>I治疗后体内残留

[16] 李素芬, 陈贤华. 2465例呼吸道感染患者肺炎支原体IgM抗体检测分析[J]. *广西医科大学学报*, 2014, 31(4):629-630.

[17] 陈玲玲, 成云改, 陈志敏, 等. 肺炎支原体肺炎患儿混合感染的研究[J]. *中华儿科杂志*, 2012, 5(3):211-215.

[18] 闫超, 薛冠华, 孙红梅, 等. 肺炎支原体大环内酯类耐药基因突变与基因分型的相关性[J]. *中华微生物学与免疫学杂志*, 2018, 38(1):31-36.

辐射剂量影响因素的研究[J]. *当代医学*, 2020, 26(8):29-32.

[3] 袁海娟, 林主戈, 吴春兴, 等. <sup>131</sup>I治疗分化型甲状腺癌患者体内残留辐射剂量及病房辐射剂量的监测分析[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2019, 43(5):400-404.

[4] 陈伟娜, 韩星敏, 周纪妹, 等. 甲状腺癌患者行<sup>131</sup>I治疗后体外辐射剂量变化研究[J]. *中华护理教育*, 2019, 16(7):541-543.

[5] 洗嘉朗, 吴菊清, 卢建杏, 等. 甲状腺乳头状癌患者术后首次<sup>131</sup>I治疗后辐射剂量率的影响因素及出院时间的探讨[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2020, 44(2):73-80.

[6] 张慧娟. 临床核医学治疗中<sup>131</sup>I所致辐射剂量的研究[J]. *数理医学杂志*, 2018, 31(11):1600-1602.