

# 玻璃化冷冻法和程序化冷冻法对人卵裂期胚胎冷冻复苏效果及临床结局的比较

郑 群<sup>1</sup>, 程兆俊<sup>1</sup>, 邹立波<sup>1</sup>, 陈浩浩<sup>2</sup>

(1. 金华市人民医院生殖医学中心, 浙江 金华 321000;

2. 金华职业技术学院医学院分子生物学实验室, 浙江 金华 321000)

**摘要:**目的 比较辅助生殖技术中玻璃化和程序化2种冷冻方法对卵裂期胚胎的冷冻复苏效果及临床结局。方法 对 3396个玻璃化冷冻周期和685个程序化冷冻周期的相关资料进行回顾性统计学分析, 比较解冻后胚胎复苏率、优质胚胎率、临床妊娠率和胚胎着床率等指标。结果 玻璃化冷冻后的胚胎复苏率、优质胚胎率、临床妊娠率和胚胎着床率均显著高于程序化冷冻, 且复苏周期移植取消率显著低于程序化冷冻。结论 相对于程序化冷冻法, 玻璃化冷冻法具有更好的冷冻复苏效果以及临床结局, 更适用于卵裂期胚胎的冷冻保存。

**关键词:** 玻璃化冷冻; 程序化冷冻; 辅助生殖技术; 胚胎

中图分类号: R321-33

文献标识码: A

文章编号: 1006-9534 (2016) 01-0118-03

DOI:10.13404/j.cnki.cjbhh.2016.01.049

Comparing frozen recovery and clinical outcome of human cleavage stage embryos with vitrification and programmed freezing. ZHENG Qun<sup>1</sup>, CHENG Zhao-jun<sup>1</sup>, ZOU Li-bo<sup>1</sup>, CHEN Hao-hao<sup>2</sup>. (1.Jinhua People's Hospital Reproductive Center, Zhejiang, 321000; 2.Jinhua Vocational Techniqe College, Medical College, Molecular Biology Lab. Zhejiang, 321000)

**Abstract:** Objective: To compare the effects of vitrification and programmed freezing on survival rate and clinical outcomes of cleavage stage embryos in assisted reproductive technology. Methods: A retrospective statistical analysis about 3396 vitrification cycles and 685 freezing programmed cycles was performed to compare the embryos survival rate, high quality embryo rate, clinical pregnant rate, implantation rate and so on. Results: The embryos survival rate, high quality embryo rate, clinical pregnant rate and implantation rate after vitrification were significantly higher than programmed freezing, and cycle cancellation rate was significantly lower than programmed freezing. Conclusion: Compared to programmed freezing, vitrification has better effects on cryopreservation and clinical outcomes, which is more suitable for cleavage stage embryos freezing.

**Key words:** Vitrification; Programmed freezing; Assisted reproductive technology; Embryos

自 1984 年首例人类冷冻胚胎移植成功以来, 胚胎冷冻保存对人类辅助生殖技术的发展进步起到了巨大的推动作用, 它使患者在一个卵巢刺激周期中可以进行多次胚胎移植, 并减少卵巢刺激综合征以及多胎妊娠。目前应用于临床的胚胎冷冻技术方法主要有慢速程序化冷冻和玻璃化冷冻。慢速程序化冷冻法需要采用程序化冷冻仪, 降温耗时较长, 同时对冷冻仪要求较高。玻璃化冷冻操作简单、时间较短、冷冻效果较好<sup>[1]</sup>, 但是否具有与程序化冷冻法同样良好或者更佳的复苏效果, 尚需要更多的证据。本研究回顾性分析 4081 个胚胎复苏周期的各项指标, 比较玻璃化冷冻与程序化冷冻对人类胚胎冷冻复苏效果及临床结局的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2009 年 1 月~2014 年 12 月在浙江省金华市人民医院生殖中心接受体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 的患者, 胚胎冷冻后复苏 4081 个周期, 其中玻璃化冷冻胚胎复

苏 3416 个周期, 程序化慢速冷冻复苏 665 个周期。

### 1.2 研究方法

1.2.1 程序化冷冻 在含有胚胎的冻贮麦管中加入冷冻保护剂 (丙二醇, Sigma公司, 美国) 和蔗糖 (Sigma公司, 美国) 组成的, 后放入程序冷冻仪 (Cryologic公司, 澳大利亚) 中冷冻, 后入液氮中冻存。解冻时将贮麦管从液氮中取出, 置空气中 30s, 后入 37℃ 水浴中 45s, 剪断冷冻管两侧, 将胚胎吹入培养皿中, 再移入解冻液 (PROH、蔗糖), 最后移入培养液 (Vitrolife公司, 美国) 中。

1.2.2 玻璃化冷冻 采用 Vitrification Freeze Kit for Embryos (Irvine Scientific公司, 美国), 冷冻液有 ES (equilibration solution) 和 VS (vitrification solution), 4℃ 保存, 用前室温平衡 20min。将胚胎置于 ES 表面, 胚胎自然下沉, 轻轻转换位置 2-3 次, 待胚胎细胞体积恢复, 巴氏吸管轻轻移入 VS, 改变胚胎位置, 洗净胚胎, 将胚胎吸在吸管最前端, 将胚胎滴到冷冻载杆 (ORIGIO INC, 丹麦) 的前端标记的位置, 迅速置入液氮中, 标记保存。

胚胎的复苏采用 Vitrification Thaw Kit for Embryos (Irvine Scientific 公司, 美国), 解冻液包括孵育液 (thawing solution, TS)、稀释液 (dilution solution, DS)、洗脱液 (washing solution, WS)。使用前, TS 37℃ 平衡 30min, 其他室温平

**基金项目:** 本项目由浙江省教育厅科研项目 (NO. 2014YB020)

及金华市科学技术研究计划项目 (NO. 2014-3-036) 共同资助。

**通讯作者:** 陈浩浩

衡 20min。将载杆从液氮中取出，迅速浸入 TS 中，胚胎自然脱落，停留 1min，后将胚胎移至 DS 中，停留 3min，轻轻转换位置 2-3 次，随后移至 WS-1 和 WS-2 中各 5min，期间轻轻转换位置 2-3 次，最后转入已平衡的培养液中，等待移植。

1.2.3 解冻复苏周期的内膜准备

经期规律排卵正常者采用自然周期，在月经第 10 日开始检测黄体生成素和排卵情况，根据排卵及冷冻阶段，按常规解冻第 3 日冷冻胚胎。月经不规则或没有自发排卵者采用人工周期，从月经第 3 日给予戊酸雌二醇（补佳乐，拜耳药业）3 mg/d，定期 B 超监测，待子宫内膜厚度 ≥ 7mm 时，继续服用戊酸雌二醇，同时肌注黄体酮（60mg/d，丽珠医药），至第 4 日早晨，解冻第 3 日冷冻胚胎。所有患者均移植 1 ~ 3 个冻融胚胎，继续黄体支持，移植后 14d 检测 HCG，4 周行 B 超检查妊娠囊。

1.2.4 观察指标

胚胎复苏率 = 存活胚胎 / 解冻胚胎数 × 100%；平均移植胚胎数 = 移植胚胎数 / 移植周期数；周期取消率 = 取消移植的周期数 / 解冻周期数 × 100%；移植优质胚胎率 = 移植优质胚胎数 / 移植总胚胎数；复苏移植妊娠率 = 临床妊娠 / 移植周期数 × 100%；复苏胚胎着床率 = 宫内孕囊数 /

移植胚胎数 × 100%。

1.3 统计学方法 选用 SPSS16.0 统计软件进行统计学处理，率之间的比较采用卡方检验，计量资料采用单因素方差分析，P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 共收集到冷冻周期 4301 个，其中程序化冷冻周期 942 例，平均年龄 31.79±4.66 岁，玻璃化冷冻周期 3359 例，平均年龄 31.35±4.97 岁，组间年龄无统计学差异。

2.2 复苏周期共 4081 个，其中程序化冷冻复苏 685 个周期，解冻 2015 个胚胎，存活 1485 个（胚胎复苏率为 73.70%）；移植 632 个周期，其中优质胚胎占 63.52%（916/1442），临床妊娠 206 例（妊娠率 32.59%），着床胚胎 275 个（胚胎着床率 19.07%）。玻璃化冷冻复苏 3396 个周期，解冻 8192 个胚胎，存活 7475 个（胚胎复苏率为 91.25%）；移植 3316 个周期，其中优质胚胎占 79.33%（5607/7068），临床妊娠 1413 例（妊娠率 42.61%），着床胚胎 1847 个（胚胎着床率 26.17%），均明显高于程序化组，差异有统计学意义（P<0.05）。

程序化冷冻周期中周期取消率为 7.74%，玻璃化组为 2.36%，玻璃化组明显低于程序化组，差异有统计学意义（P<0.05）（表 1）。

表1 程序化冷冻和玻璃化冷冻胚胎各项指标的比较

	程序化冷冻	玻璃化冷冻	<sup>2</sup>	P
平均年龄 (岁)	31.79 ± 4.66	31.35 ± 4.97		
冷冻周期数	942	3359		
冷冻周期比例 (%)	62.53(942 /1504)	65.91(3359/5096)		
复苏周期数	685	3396		
胚胎复苏率 (%)	73.70(1485/2015)	91.25(7475/8192) *	464.469	<0.05
复苏移植周期数	632	3316		
周期取消率 (%)	7.74(53/685)	2.36(80/3396) *	50.361	<0.05
移植优质胚胎率 (%)	63.52(916/1442)	79.33(5607/7068) *	167.193	<0.05
平均移植胚胎数	2.28(1442/632)	2.13(7068/3316)		
复苏移植妊娠率 (%)	32.59(206/632)	42.61(1413/3316) *	22.016	<0.05
复苏胚胎着床率 (%)	19.07(275/1442)	26.17(1847/7068) *	31.903	<0.05

\* P<0.05, 与程序化冷冻组比较。

3 讨论

程序化冷冻是应用最早的经典胚胎冷冻方案，其主要通过使用程序冷冻仪缓慢降温来实现细胞的逐步脱水，然而在此过程中由于细胞内冰晶的形成而造成损伤。玻璃化冷冻法则使用高浓度的冷冻保护剂，通过液氮迅速降温，抑制胞内冰晶形成，减少冷冻损伤，从而提高细胞解冻复苏后的活力。而高浓度冷冻保护剂使用的同时会增加对胚胎的毒性及渗透性损害，这是否会影响胚胎的发育尚需进一步的研究<sup>[2]</sup>。

目前国内外的研究者对两种冷冻方法对胚胎的发育潜能以及临床结局进行了比较。Kuwayama<sup>[3]</sup>等研究表明玻璃化冷冻 4- 细胞胚胎能显著提高存活率，但临床妊娠率和胚胎种植率没有显著改善。Rama<sup>[4]</sup>等研究发现玻璃化冷冻 8- 细胞正常胚胎，其存活率、种植率、临床妊娠率都显著高

于程序化冷冻组。国内有研究发现玻璃化冷冻胚胎复苏率显著高于程序化冷冻，但临床妊娠率、着床率、活产率没有显著性差异<sup>[5]</sup>。而有其他研究认为玻璃化冷冻的复苏率、完整胚胎率、临床妊娠率、种植率显著性高于程序化冷冻<sup>[6, 7]</sup>，本研究的结果与其基本一致，而与王宇峰<sup>[5]</sup>等结果不同。原因首先可能是本中心的玻璃化冷冻于近些年才开展并逐步取代程序化冷冻，因而程序化冷冻胚胎的冻存时间相对来说比较长，且随着时间的推移逐渐加长，影响后期胚胎复苏率和优质胚胎率，而玻璃化冷冻的整体水平处于动态平衡中。此外，本中心结合临床用药剂量、用药时间、B 超检查等手段方法，不断改进冷冻胚胎移植技术，期望提高解冻胚胎移植的临床妊娠率和胚胎着床率，而移植后期以玻璃化解冻为主，这也是造成玻璃化解冻临床妊娠率提

(下转第 97 页)

良好的软组织分辨率<sup>[7]</sup>、可多平面成像及不受母体自身因素(如羊水少、肥胖、妊娠晚期等)的影响等因素,使其成为产前超声诊断侧脑室形态异常后进一步检查了解有无其它病因或合并症的重要方法。MRI 有助于发现侧脑室增宽胎儿超声检查中所不能发现的信息<sup>[9]</sup>。

通过观察分析 39 例非单纯性侧脑室形态异常胎儿 MR 图像并与单纯性脑室增宽对比,分析如下。单纯性侧脑室增宽多以侧脑室三角区为著,特别是单纯性轻度增宽侧脑室多仍基本保持原大体轮廓,脑室壁光整自然(图 1 见封四)。而其他病因造成的脑室增宽常会有一些特征的脑室形态改变或中线结构的改变。胼胝体发育不全的侧脑室增宽多以三角区及枕角为著,最具特征性的改变为双侧平行分离的“泪滴状”侧脑室,胼胝体发育不全者 MRI 还常表现为透明隔间腔消失、三脑室增大并上移等间接征象<sup>[8]</sup>,另外, MRI 也可直接显示部分或完全的缺如的胼胝体(图 2 见封四)。脑穿通畸形是一种特殊类型的脑积水,也称为“积水性空洞症”<sup>[8]</sup>,脑穿通畸形或脑室旁软化灶特征表现为病灶区脑室局部呈囊状或不规则状向外膨隆增宽,病变多发生在额角或体前部,可单侧也可双侧,病灶造成脑室增宽程度差异较大,部分病灶导致脑室局部增宽程度可 <10mm;虽软化灶不属于脑室增宽范畴,但胎儿影像学检查中有时不能显示软化灶与脑室间较薄的分隔,亦表现为脑室的局部增宽,且软化灶与脑穿通畸形病因相同,是同一病变的不同程度或不同时期的表现,故将两者一起收入分析(图 3 见封四)。透明隔缺如及前脑无裂导致的侧脑室改变根据病变类型不同,表现各不相同, MRI 观察双侧脑室有无融合、形态是否自然及中线结构的改变是此类畸形的诊断要点(图 4 见封四)。脑室旁-脑室内出血导致的脑室增宽形态无特异性,根据出血量、出血时期及位置的不同,表现亦不相同, MRI 检查应充分利用多序列成像的优势,其特征性的改变是病变区信号的异常。Dandy-walker 畸形是后颅窝的一种畸形,当其合并脑积水时第三脑室及侧脑室可增宽, MRI 正中矢状位能清晰的显示其第四脑室囊状扩大和小脑蚓部

发育不良的特点。另外,神经元移行异常、脑室内或旁各种囊肿等多种畸形有时亦可造成侧脑室的改变,本次研究病例中未收集到这些类型病例导致的胎儿侧脑室形态异常。

综上,当超声初诊为脑室形态异常时应行 MRI 进一步检查。MRI 检查时,除测量脑室增宽程度外,应充分利用 MRI 多平面成像、多序列成像及优越的组织分辨率等的优势,观察颅内结构的形态及信号的变化,特别是注意侧脑室的形态、轮廓、信号的改变特点及中线结构有无异常,尽量找出侧脑室形态异常的原因,这对产科更好、更全面的评估预后具有重要的临床意义。

## 参 考 文 献

- [1]Coakley FV, Glenn OA, et al. Fetal MRI :a developing technique for the developing patient[J].AJR,2004,182 (1) :243-252.
- [2]Levine D, Barnes PD, et al. Fast MR imaging of fetal central nervous system abnormalities[J].Radiology,2003,229 (1) :51-61.
- [3]D' Addario V, Rossi AC. Neuroimaging of ventriculomegaly in the fetal period[J].Semin Fetal Neonatal Med,2012,17 (6) :310-318.
- [4]Manganaro L, Savelli S, Francioso A, et al. Role of fetal MRI in the diagnosis of cerebral ventriculomegaly assessed by ultrasonography[J].Radiol Med,2009,114 (7) :1013-1023.
- [5]Ouahba J, Luton D, et al. Prenatal isolated mild ventriculomegaly : outcome in 167 cases[J].BJOG,2006,113 (9) :1072-1079.
- [6]孟华,姜玉新,戴晴. 胎儿轻度侧脑室增宽的超声诊断及临床意义 [J]. 中国超声医学杂志,2006,22 (4) :313-315.
- [7]徐丹,钱燕,黄丽密,等. 胎儿脑积水的 MRI 表现与预后关系 [J]. 临床儿科杂志,2011,29 (7) :682-684.
- [8]陈丽英,蔡爱露. 胎儿影像诊断学 [M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2014.132.
- [9]陶国伟,冯德朝,等. 超声联合 MRI 技术在诊断胎儿中枢神经系统畸形中的价值 [J]. 中华妇产科杂志,2012,47 (4) :299-300.

收稿日期:2015-09-11

(上接第119页)

高的一个外在因素。

综上所述,与程序化冻融法相比,玻璃化冷冻技术简化了胚胎冷冻程序,能显著提高胚胎实验室冷冻复苏效果和提高临床妊娠率,符合辅助生殖技术简单、高效、安全的要求,更利于胚胎冷冻。当然,在玻璃化冷冻成为常规方法之前,需对其母婴结局作充分的后续研究及详细的分析评价,仍然需要大量的后续研究及后代的长期随访。

## 参 考 文 献

- [1]Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, et al. Potential importance of vitrification in reproductive medicine[J].Biol Reprod,2002,67 (6) :1671-80.
- [2]Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates[J]. Fertil Steril,2014,102 (1) :19-26.

- [3]Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination[J].Reprod Biomed Online,2005,11 (5) :608-14.
- [4]Rama Raju GA, Haranath GB, Krishna KM, et al. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates[J].Reprod Biomed Online,2005,11 (4) :434-7.
- [5]王宇峰,于春梅,等. 程序化冷冻与玻璃化冷冻卵裂期胚胎移植的母婴结局对照分析 [J]. 生殖医学杂志,2014,23 (1) :11-5.
- [6]赵庆红,杨菁,等. 玻璃化冷冻法和程序化冷冻法对卵裂期胚胎冷冻复苏效果的比较 [J]. 生殖与避孕,2010,30 (9) :592-95.
- [7]郑爱燕,丁洁,顾斌,等. 玻璃化冷冻与程序化冷冻对胚胎发育潜能及临床结局的影响 [J]. 生殖与避孕,2013,33 (1) :16-20.

收稿日期:2015-10-10