

冻融卵裂期胚胎复苏移植和冻融囊胚复苏移植的临床结局比较

陈小燕, 赵 纯, 凌秀凤^{1*}

(南京医科大学附属南京妇幼保健院生殖医学中心, 江苏 南京 210004)

[摘要] 目的: 比较 Cryotop 玻璃化冷冻的人类卵裂期胚胎、囊胚复苏移植的临床结局。方法: 回顾性分析 2009 年 1 月~2012 年 12 月南京医科大学附属南京妇幼保健院生殖医学中心完成的 1 307 例玻璃化冷冻解冻移植周期, 其中卵裂期胚胎复苏移植周期(A 组)337 例, 冻融囊胚复苏移植周期(B 组)970 例。比较两组临床妊娠率、种植率、妊娠结局及新生儿情况等各项指标。结果: ① A 组复苏率为 86.42%, B 组复苏率为 83.71%, 无显著统计学差异; ② A 组平均移植胚胎数(2.07 ± 0.47)个显著高于 B 组(1.68 ± 0.37)个; A 组临床妊娠率及种植率(45.99%、27.32%)显著低于 B 组(54.95%、42.64%); ③ A 组和 B 组的流产率、早产率、单胎率及多胎率分别为 16.77%、25.24%、64.08%、35.92%和 15.01%、25.34%、72.21%、27.29%, 两组孕龄为(265.41 ± 15.45) d 和(264.46 ± 16.12) d, 两组均无明显统计学差异。A 组异位妊娠率显著高于 B 组(3.23% vs 0.75%); ④ A 组和 B 组巨大儿、生长受限及新生儿出生缺陷发生率分别为 4.85%、1.94%、0.97%和 7.36%、3.81%、1.36%, 两组间无统计学差异。结论: 卵裂期胚胎和囊胚行 Cryotop 玻璃化冷冻后冻融复苏率无统计学差异, 冻融囊胚复苏移植周期具有更高的种植率、临床妊娠率和较低的异位妊娠率, 而两组新生儿的流产率、早产率及出生缺陷率无明显差异。

[关键词] 玻璃化冷冻; 卵裂期; 囊胚; 妊娠结局

[中图分类号] R711.6

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1587-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20141129

随着辅助生殖技术的发展, 冻融胚胎移植已成为体外受精——胚胎移植不可缺少的一部分^[1]。目前玻璃化冷冻技术已经逐渐成为最有效和稳定的冷冻剩余胚胎的方法之一, 已经被越来越多的中心所引进。本中心目前已经将 Cryotop 玻璃化冷冻技术成功应用于人囊胚及卵裂期胚胎的冷冻^[2-3]。本研究主要比较 Cryotop 玻璃化冷冻的卵裂期胚胎和囊胚的复苏情况、临床妊娠率及妊娠结局等, 探讨胚胎不同冷冻时期对胚胎移植临床结局、妊娠结局等方面的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2009 年 1 月~2012 年 12 月在南京医科大学附属南京妇幼保健院生殖中心行冻融胚胎移植的患者, 共 1 307 个周期。根据胚龄分为 2 组。A 组为前期采用 Cryotop 法冷冻卵裂期胚胎的冻融移植周期, 共 337 个周期, 患者年龄(31.15 ± 4.67)岁; B

组为前期采用 Cryotop 法冷冻囊胚期胚胎的冻融移植周期, 共 970 个周期, 年龄(30.39 ± 4.92)岁。所有患者前期均采用长方案或短方案按本中心常规促排卵、取卵、体外受精及培养^[2-3]。第 3 天移植后剩余的可利用胚胎在第 3 天或第 5 天进行冷冻。

1.2 方法

1.2.1 胚胎冷冻

冷冻前仔细观察胚胎, 在室温下将胚胎移至玻璃化平衡液 (ES, Vitrification KIT, Code.VT101-01, KITAZATO 公司, 日本)中平衡 10 min, 然后转移至玻璃化冷冻液 (VS, Vitrification KIT, Code.VT101-02, KITAZATO 公司, 日本)中平衡, 并迅速把胚胎放到 Cryotop (Cryotop package, KITAZATO 公司, 日本)的前端, 并迅速浸入液氮, 在浸入液氮前, 胚胎在 VS 液体内的时间控制在 30~60 s, 每支 Cryotop 装载 1~2 个胚胎。

1.2.2 胚胎复苏

在 37℃下, 将 Cryotop 从液氮中取出, 把 Cryotop 前端立即浸入 37℃的解冻液 (TS, Vitrification KIT, Code.VT102-01, KITAZATO 公司, 日本)中, 反复洗涤 1 min; 迅速将胚胎转移到稀释液 (DS, Vitrification KIT, Code.VT102-02, KITAZATO 公司, 日本)中平衡 3 min, 关闭恒温板的温度控制设施; 再迅速将胚胎

[基金项目] 国家自然科学基金(812707010); 南京医科大学重点实验室开放课题(SKLRM-KF-1203); 南京市卫生局十二五重大项目(ZDX12009)

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: lingxiufeng_njfy@163.com

转移到洗涤液1 (WS1, Vitrification KIT, Code.VT102-03, KITAZATO 公司, 日本)中平衡 5 min; 然后迅速将胚胎转移到洗涤液2 (WS2, Vitrification KIT, Code.VT102-04, KITAZATO 公司, 日本)中, 同时打开恒温板的温度控制设施, 平衡 5 min, 最后移入培养液 (Vitrolife 公司, 瑞典)中培养等待移植。冻融后胚胎培养 2~4 h 后, 在倒置显微镜下观察, 主要根据形态学, 判定冷冻胚胎是否存活。存活标准为: 细胞膜完整, 胞质折光性好, 透明带完整, $\geq 50\%$ 以上的卵裂球存活。

1.2.3 子宫内膜的准备

采用自然周期或口服戊酸雌二醇准备子宫内膜, 卵泡破裂或内膜厚度达到 8 mm 后, 开始给予黄体支持, 给予黄体酮后第 3 天或第 5 天下午复苏胚胎, 第 4 天或第 6 天进行胚胎移植。

1.2.4 妊娠结局判定

移植后 14 d, 尿妊娠试验阳性, 血 β -HCG 阳性为生化妊娠。移植后 4~5 周 B 超可见孕囊及心芽搏动为临床妊娠。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 统计软件进行卡方检验 ($R \times C$ 法或精确概率法), 组间比较采用 t 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况及临床妊娠结局比较

两组患者年龄及复苏率比较无统计学差异 ($P > 0.05$), A 组移植胚胎数显著高于 B 组 ($P < 0.05$), 而临床妊娠率和种植率均显著低于 B 组 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 两组的临床妊娠结局

| 项目 | A 组 | B 组 |
|--------------|------------------|--------------------|
| ET 周期(n) | 337 | 970 |
| 患者年龄(岁) | 31.15 \pm 4.67 | 30.39 \pm 4.92 |
| 复苏率(%) | 745/862 | 1 665/1 989 |
| 移植胚胎数(n) | 2.07 \pm 0.47 | 1.68 \pm 0.37* |
| 妊娠数(n) | 155 | 533 |
| 临床妊娠率(%) | 45.99(155/337) | 54.95(533/970)** |
| 种植率(%) | 27.32(191/699) | 42.64(696/1 632)** |

与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 两组分娩结局比较

两组流产率、早产率、孕龄、单胎率、多胎率等均无统计学差异 ($P > 0.05$), A 组异位妊娠率明显高于 B 组 ($P < 0.01$, 表 2)。

2.3 两组新生儿情况比较

两组巨大儿、生长受限及出生缺陷发生率均无

统计学差异 ($P > 0.05$, 表 3)。

表 2 两组的分娩结局比较

| 项目 | A 组 | B 组 |
|----------|--------------------|--------------------|
| 流产率(%) | 16.77(26/155) | 15.01(80/533) |
| 早产率(%) | 25.24(26/103) | 25.34(93/367) |
| 孕龄(d) | 265.41 \pm 15.45 | 264.46 \pm 16.12 |
| 单胎率(%) | 64.08(66/103) | 72.21(265/367) |
| 多胎率(%) | 35.92(37/103) | 27.29(102/367) |
| 异位妊娠率(%) | 3.23(5/155) | 0.75(4/533)* |

与 A 组比较, * $P < 0.01$ 。

表 3 两组新生儿情况比较

| 项目 | A 组 | B 组 |
|---------|-------------|--------------|
| 巨大儿(%) | 4.85(5/103) | 7.35(27/367) |
| 生长受限(%) | 1.94(2/103) | 3.81(14/367) |
| 出生缺陷(%) | 0.97(1/103) | 1.36(5/367) |

3 讨论

近年来, 由于胚胎冷冻保存具有提高临床累积妊娠率、预防卵巢过度刺激综合征, 降低多胎率等多个优点而逐渐成为辅助生殖领域中的一个重要组成部分^[4]。玻璃化冷冻是通过高浓度的冷冻液和较快的冷却速率使液体转变为非晶态的固化过程, 保持其溶液状态的分子和离子分布, 从而避免冷冻过程中细胞内冰晶形成, 减少冰晶给细胞带来的冷冻损伤, 使胚胎复苏率、细胞完整率明显提高^[5]。玻璃化冷冻较传统的程序化冷冻能获得更高的胚胎复苏率, 因此目前玻璃化冷冻技术已经成为胚胎冷冻保存的主要方法。本中心目前已经成功将玻璃化冷冻技术应用于人卵裂期胚胎和囊胚的冻存, 并获得较高的复苏率和存活率^[2-3]。然而对于玻璃化冷冻技术应用于人卵裂期胚胎和囊胚冻融后的临床结局比较却很少有人关注。

已知, 人类胚胎发育约有一半会停滞在 4~8 细胞阶段^[6], 而目前大部分中心卵裂期胚胎冷冻的选择主要根据胚胎形态进行评分, 会存在一部分细胞阻滞的胚胎被冷冻保存。此外, 囊胚是由有发育潜能的早卵裂期胚胎发育而来, 已经经过胚胎基因组的激活, 且囊胚移植更接近于人的生理状态, 胚胎发育与子宫内膜同步, 能够获得更好的妊娠率和着床率。因此囊胚移植可明显提高临床妊娠率^[7]。本研究也通过回顾性分析发现冻融囊胚的复苏移植周期能获得 54.95% 的临床妊娠率及 42.64% 的着床率, 明显高于卵裂期胚胎, 进一步证实了前人的研究结果。由于冻融囊胚每周期平均移植胚胎数明显

减少,有利于降低临床多胎妊娠率。尽管本研究数据显示两组的多胎发生率没有显著统计学差异,然而相比 A 组,B 组的多胎发生率有下降的趋势。此外,本研究结果发现 A 组的异位妊娠率明显高于 B 组,这可能由于冻融后卵裂期胚胎会随着子宫蠕动和子宫内膜分泌液的作用流进输卵管而发育成囊胚,而一些患者存在输卵管病变、盆腔粘连或内分泌因素,导致胚胎不能重新回到子宫内着床而造成异位妊娠的发生^[8]。而囊胚移植是在子宫近乎静止的状态时进行,可避免胚胎在宫腔内移位,从而减少异位妊娠的发生^[9]。本中心的数据还显示 A 组与 B 组有相似的妊娠结局,因为两组的流产率、早产率、孕龄、巨大儿发生率、胎儿生长受限率及出生缺陷率均无明显统计学差异。

综上所述,冻融囊胚复苏移植周期可以获得更好的临床妊娠率,且能够有效地降低异位妊娠率,同时囊胚冷冻-胚胎移植也使实现单囊胚移植以降低多胎妊娠成为可能。

[参考文献]

[1] 陈莉,刘琦. 玻璃化冷冻技术在人类辅助生殖中的应用[J]. 中华男科学杂志,2010,16(6):556-560

- [2] 张军强,武恂,李秀玲,等. Cryotop 玻璃化冷冻人类囊胚 79 例报告[J]. 生殖医学杂志,2009,18(6):516-519
- [3] 苏雁,张军强,李秀玲,等. Cryotop 玻璃化冷冻人类卵裂期胚胎的临床应用[J]. 江苏医药,2012,38(4):409-411
- [4] 黄国宁,孙海翔. 体外受精-胚胎移植实验室技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:278
- [5] 宫立国,刘吉. 人类囊胚玻璃化冷冻结局的影响因素[J]. 现代妇产科进展,2010,19(12):949-952
- [6] 郝桂琴,李蓉. 胚胎移植与囊胚移植的临床结局分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,31(15):5739-5742
- [7] Zhu DD,Zhang JJ,Cao SR,et al. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles time for a new embryo transfer strategy? [J]. Fertil Steril, 2011,95(5):1691-1695
- [8] 加藤修. 不孕症治疗的成果之路[M]. 上海:上海科学普及出版社,2004:88-90
- [9] Fanchin R,Ayoubi JM,Righini C,et al. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers [J]. Hum Reprod,2001,16(6):115-119

[收稿日期] 2014-04-29

(上接第 1581 页)

- monary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFR alpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1[J]. J Exp Med,2008,205(12):2711-2719
- [7] Tanaka T,Motoi M,Tsuchihashi Y,et al. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB [J]. J Med Genet,2011,48(3):205-209
- [8] Griese M,Brasch F,Aldana VR,et al. Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis[J]. Clin Genet,2010,77(2):119-130
- [9] Ceruti M,Rodi G,Stella GM,et al. Successful whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis secondary to lysinuric protein intolerance:a case report[J]. Orphanet J Rare Dis,2007,2:14
- [10] Trapnell BC,Whitsett JA,Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis[J]. N Engl J Med,2003,349(26):2527-2539
- [11] Kitamura T,Uchida K,Tanaka N,et al. Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis[J]. Am J Respir Crit Care Med,2000,162(2 Pt 1):658-662
- [12] Bonfield TL,Russell D,Burgess S,et al. Autoantibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

- are diagnostic for pulmonary alveolar proteinosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2002,27(4):481-486
- [13] Seymour JF,Dunn AR,Vincent JM,et al. Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor1 in acquired alveolar proteinosis[J]. N Engl J Med,1996,335(25):1924-1925
- [14] Alberti A,Luisetti M,Braschi A,et al. Bronchoalveolar lavage fluid composition in alveolar proteinosis. Early changes after therapeutic lavage[J]. Am J Respir Crit Care Med,1996,154(3 Pt 1):817-820
- [15] Xu Z,Jing J,Wang H,et al. Pulmonary alveolar proteinosis in China;a systematic review of 241 cases[J]. Respirology,2009,14(5):761-766
- [16] Byun MK,Kim DS,Kim YW,et al. Clinical features and outcomes of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis in Korean population[J]. J Korean Med Sci,2010,25(3):393-398
- [17] Beccaria M,Luisetti M,Rodi G,et al. Long-term durable benefit after whole lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis[J]. Eur Respir J,2004,23(4):526-531

[收稿日期] 2012-11-17