

• 临床检验研究论著 •

冻融胚胎卵裂球损伤对于移植完整胚胎临床结局的影响

曾惠明, 王珊珊, 张宁媛, 孙海翔[△]

(南京大学医学院附属鼓楼医院生殖医学中心, 江苏南京 210008)

摘要:目的 探讨分裂期胚胎经玻璃化冷冻法冷冻复苏后, 不同胚胎卵裂球的存活状态与移植完整胚胎后临床结局的关系。方法 回顾性分析南京市鼓楼医院生殖医学科 2010 年 5 月至 2011 年 12 月冻融胚胎移植(FET)周期 648 例(共 1 736 枚分裂期胚胎), 根据复苏后胚胎的卵裂球完整与否分为 2 组: 胚胎卵裂球均完整组 508 例, 卵裂球部分损伤组 140 例, 均选择完整胚胎进行移植。比较 2 组的临床妊娠率、胚胎种植率及抱婴回家率。结果 FET 胚胎卵裂球部分损伤组复苏的胚胎数显著高于卵裂球完整组($P<0.01$), 在临床妊娠率、胚胎种植率和抱婴回家率的比较中, 卵裂球完整组具有显著优势($P<0.05$)。结论 经玻璃化冷冻技术冻融的优质胚胎中, 部分胚胎卵裂球损伤提示剩余完整胚胎的发育潜能低于复苏后均完整的胚胎。

关键词: 胚胎; 玻璃化冷冻; 卵裂球损伤; 妊娠率; 种植率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3339-02

The influence of blastomere damage of frozen-thawed embryos on clinical outcomes of complete embryo transplantation

Zeng huiming, Wang Shanshan, Zhang Ningyuan, Sun Haixiang[△]

(Reproductive Medicine Center, Drum-Tower Hospital Affiliated to Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of survival status of blastomeres in frozen-thawed embryos after vitrification and clinical outcomes of fully intact embryos transferred. **Methods** A total of 648 frozen-thawed embryos transfer(FET) cycles (including 1 736 embryos at cleavage stage) obtained from patients treated with IVF/ICSI at Reproductive Medicine Center of Drum-Tower Hospital from May 2010 to December 2011 were respectively analyzed, and divided into two groups according to the integrality of blastomeres: 508 FET cycles with fully intact blastomeres and 140 with partially damaged blastomeres, and embryos remain intact were transferred in both groups. The clinical pregnancy rate, implantation rate and birth rate of two groups were compared. **Results** The number of embryos recovery of FET cycles with partially damaged blastomeres was significantly higher than that of fully intact blastomeres($P<0.01$), in comparison of pregnancy rate, implantation rate and birth rate, the group with intact blastomeres had distinct advantage with statistic difference($P<0.05$). **Conclusion** During the vitrification procure of frozen-thawed embryos with good quality, partially damaged blastomeres suggest that the development ability of remained intact embryos is lower than that of fully intact embryos.

Key words: embryos; vitrification; blastomere damage; pregnancy rate; implantation rate

玻璃化冷冻技术以其操作简便, 耗时短, 冻融过程损伤小及存活、完整率高等优点, 逐渐成为辅助生殖领域中取代程序化冷冻的关键技术^[1-3]。玻璃化冻融的胚胎与新鲜胚胎移植, 在临床妊娠率、胎儿孕周、早产率、出生缺陷等方面均无显著性差异^[4]。同时, 冻融胚胎移植(FET)周期比新鲜周期具有更好的胚胎与子宫内膜同步性, 不仅明显提高 IVF 周期的累计妊娠率, 还可有效降低多胎妊娠率, 减少卵巢过度刺激综合征(OHSS)风险。胚胎冻融过程中经常会观察到卵裂球受损的现象, 通常认为超过 50% 卵裂球损伤的胚胎为复苏失败胚胎, 一般不予移植。卵裂球损伤程度对胚胎的发育潜能和临床结局的影响, 一直都是辅助生殖技术(ART)关注的焦点。因此, 本研究对本中心玻璃化冷冻复苏的 648 例 FET 周期进行回顾性分析, 研究种植前冻融胚胎的存活状态及临床结局, 进一步探讨 FET 后胚胎卵裂球损伤对胚胎发育潜能的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 5 月至 2011 年 12 月在南京市鼓楼医院生殖医学科进行 FET 的不孕患者。患者平均年龄(30.87 ± 4.28)岁。根据复苏后胚胎的卵裂球损伤与否分为 2 组: 胚胎卵裂球均完整组 508 例, 卵裂球部分损伤组 140 例, 2 组一共解冻复苏 1736 枚胚胎, 均选择完整胚胎进行移植, 移植胚胎数为(1.99 ± 0.12)枚。

1.2 胚胎玻璃化冷冻及保存

1.2.1 冷冻液的配制 冷冻基础液: 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲的合成卵管液(m-HTF)中添加 20% 人血清蛋白(SSS, SAGE); 冷冻液 I: m-HTF 中添加 10% 乙二醇(EG, SIGMA) + 10% 二甲亚砜(DMSO, SIGMA); 冷冻液 II: m-HTF 中添加 20% EG + 20% DMSO + 0.3 mol/L 蔗糖(SIGMA)。

1.2.2 解冻液的配制 解冻液 I: m-HTF 中添加 20% SSS + 1 mol/L 蔗糖; 解冻液 II: m-HTF 中添加 20% SSS + 0.5 mol/L 蔗糖; 解冻液 III: m-HTF 中添加 20% SSS + 0.25 mol/L 蔗糖; 解冻液 IV: m-HTF 中添加 20% SSS。

1.2.3 玻璃化冷冻 室温下, 胚胎在冷冻基础液中平衡 2 min 后, 先移入冷冻液 I 中 10 min, 再移入冷冻液 II, 60 s 内装载至冷冻载杆的塑料薄膜片上并直接投入液氮中保存。

1.2.4 胚胎复苏 37℃ 下, 直接将载杆的塑料薄膜片迅速浸入解冻液 I, 使胚胎滑落入培养液中。1 min 后, 按照浓度梯度递减的顺序, 将胚胎在室温下依次移入解冻液 II、解冻液 III、解冻液 IV, 并分别停留 3、5、5 min。最后在 37℃ 下将解冻液 IV 中的胚胎移入胚胎培养液(G2), 于 37℃、5% O₂、6% CO₂ 培养箱中培养 2 h 后移植。

1.2.5 胚胎冻融后存活标准 胚胎解冻复苏后, 以成活卵裂

球数大于或等于 50%，颜色明亮均一，立体感较强为判定胚胎存活的标准。以具有完整清晰的细胞膜，胞浆均匀光泽，立体感强为判定卵裂球存活的标准。

1.3 妊娠判断及监测 胚胎移植后 14 d 测定血或尿人绒毛膜促性腺激素(HCG)水平，若阳性则于停经 28 d 行 B 超检查，见孕囊及原始心管搏动诊断为临床妊娠，继续随访至妊娠结束。

1.4 观察指标 临床妊娠率=临床妊娠/移植周期数×100%；种植率=宫内孕囊数/移植胚胎数×100%；抱婴回家率=活产分娩数/移植周期数。

1.5 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 或率(%)表示，采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析，采用 t 检验和 χ^2 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料 共收集玻璃化冷冻复苏周期 648 例，其中复苏后胚胎卵裂球均完整组(A 组)508 例，解冻复苏 1 199 枚胚胎，平均年龄(31.06 ± 4.22)岁，卵裂球部分损伤组(B 组)140 例，解冻复苏 537 枚胚胎，平均年龄(30.18 ± 4.45)岁，组间年龄无统计学差异($P > 0.05$)。此外，A、B 组子宫内膜厚度分别为(9.85 ± 1.87)、(9.66 ± 1.83)mm；移植胚胎数分别为 1.99 ± 0.10 、 1.98 ± 0.19 ，差异均无统计学意义($P > 0.05$)，但 A 组解冻复苏胚胎数(2.36 ± 0.51)显著少于 B 组(3.84 ± 1.20)，差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 冻融胚胎卵裂球完整组与部分损伤组临床结局的比较 在临床妊娠结局方面，复苏后胚胎卵裂球均完整组(A 组)的临床妊娠率[55.31%(281/508)]、种植率[37.69%(381/1 011)]和抱婴回家率[46.26%(235/508)]均显著高于卵裂球部分损伤组(B 组)[相应比例分别为 46.43%(65/140)、31.41%(87/277)、36.43%(51/140)]，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

随着体外受精-胚胎移植(IVF-ET)及其衍生技术的飞速发展，胚胎冷冻技术已常规应用于人类辅助生殖领域。胚胎冻融技术经过不断改善，冻融胚胎的存活率也有所提高。据统计，玻璃化冷冻胚胎复苏后，其完整率已高达 95%^[2]。然而胚胎在玻璃化冻融过程中经历了渗透压的变化，可能会出现卵裂球的部分或全部受损。目前针对部分卵裂球损伤的胚胎发育潜能的研究仍存在争议^[5-9]。Edgar 等^[10]报道，复苏后胚胎卵裂球的损伤与临床结局有显著相关性，受损胚胎降低了胚胎的植入能力和临床妊娠率，移植部分受损胚胎的种植率比完整胚胎低 3 倍^[10]。也有学者认为，部分卵裂球受损的冻融胚胎与完整胚胎具有相同的种植潜能，因为卵裂期胚胎的每个卵裂球都具有全能型。在本院生殖医学科 FET 周期方案中，如果玻璃化解冻复苏后有胚胎发生部分卵裂球融解，会解冻更多胚胎以保证移植胚胎的完整性。解冻过程中部分卵裂球损伤的胚胎能否提示，移植同批解冻的完整胚胎的发育潜能是否已受到影响，尚鲜有报道。本研究发现，经玻璃化冷冻技术冻融的优质胚胎中，卵裂球部分损伤组完整胚胎的临床妊娠率、种植率及抱婴回家率显著低于卵裂球完整组的胚胎，提示剩余完整胚胎的发育潜能低于复苏后均完整的胚胎。

有文献报道，在植入前遗传学诊断(PGD)活检时，取出 1~2 个卵裂球后并不影响胚胎继续发育的潜能^[11]。Tang 等^[12]比较了慢速程序化解冻复苏后，卵裂球损伤小于 25%的胚胎和无损伤组胚胎的继续发育潜能，结果无统计学差异^[12]。本研究结果显示，在玻璃化冻融周期中虽然都植入完整胚胎，但卵裂球部分损伤组的妊娠率、种植率和抱婴回家率都显著低于

完整组($P < 0.05$)。在受损胚胎的继续发育潜能方面，是哪些因素导致 PGD 和程序化冷冻的处理结果与玻璃化冷冻法有明显区别？相关胚胎学家认为，此现象与 DMSO 的细胞毒性有关^[13-14]。研究表明，培养液中 DMSO 浓度为 10%时，细胞生长抑制率近 100%；1‰浓度时抑制率为 35%；即使是 0.04‰的浓度，DMSO 对细胞的生长也有不利影响^[15]。本研究中，在有卵裂球融解的解冻过程中，融解细胞释放出对胚胎发育有害的 DMSO，引起有损伤胚胎的进一步受损，也可以渗入培养液使完整胚胎受损。最终导致其妊娠结果显著低于完整组，而这种损伤可能是短时间内镜下无法观察到的。玻璃化过程中高浓度冷冻保护剂的使用使胚胎渗透压经历了一系列的改变，这种变化使卵裂球的细胞膜受到较大的损伤。Kopeika 等^[16]报道，胚胎暴露于浓度超过 30%的冷冻保护剂时，胚胎的发育潜能会降低。本研究认为，不同胚胎的卵裂球对冷冻保护剂的耐受性存在个体差异，这种差异具体表现为，不同胚胎在玻璃化冷冻液 I 中恢复时间的不同，以及胚胎冻融后，有的胚胎发生了卵裂球融解，有的胚胎虽然解冻当时没有发生卵裂球融解，但随着继续培养，会进一步发生卵裂球融解的可能。

迄今为止，玻璃化冷冻技术已常规应用于人类胚胎的保存。胚胎卵裂球的完整率是衡量玻璃化冷冻效果的关键指标。胚胎完整率越高，说明其耐受冷冻损伤的能力越强，故而胚胎着床和继续发育潜能越高。已有许多文献报道，比较卵裂球受损的胚胎与完整胚胎移植后的妊娠结局，说明卵裂球损伤对胚胎发育的影响。而本研究首次报道了玻璃化冷冻复苏的胚胎中，部分胚胎卵裂球受损组(A 组)与完整组(B 组)均移植完整胚胎后的妊娠结局比较。进一步提示冷冻保护剂 DMSO 的细胞毒性对胚胎继续发育潜能的不可逆损伤，具有一定研究价值。

综上所述，玻璃化冻融的优质胚胎中，卵裂球损伤与临床妊娠结局有显著相关性，胚胎质量是影响冻融胚胎移植妊娠结局的重要因素。如何根据胚胎的实际情况，选择适当的冷冻时机，尽可能减少高浓度高毒性的玻璃化冷冻保护剂对胚胎损伤等问题值得我们继续深入探讨。

参考文献

- [1] 丛晶. 玻璃化冷冻技术的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(3): 151-154.
- [2] Balaban B, Urman B, Ata B, et al. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation[J]. Hum Reprod, 2008, 23(9): 1976-1982.
- [3] 王兴玲, 覃瑶琴, 管一春, 等. 玻璃化冻融和程序化冻融胚胎移植的妊娠结局比较[J]. 生殖与避孕, 2012, 32(4): 273-276.
- [4] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 120-132.
- [5] Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, et al. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos [J]. Hum Reprod, 2000, 15(1): 175-179.
- [6] 王利红, 钟景琦, 石磊, 等. 冻融胚胎移植卵裂球数目及胚胎存活状态与临床妊娠的关系[J]. 山东医药, 2011, 51(38): 72-73.
- [7] Zhang SJ, Lu CF, Lin G, et al. The number of blastomeres in post-thawing embryos affects the rates of pregnancy and delivery in freeze-embryo-transfer cycles [J]. J Assist Reprod Gen, 2009, 26(11): 569-573.
- [8] 席青松, 朱丽霞, 任新玲, 等. 冻融胚胎卵裂球损伤与临床结局的关系研究[J]. 中国妇幼保健, 2011, 4(26): 558-560. (下转第 3342 页)

续表 1 各组术前、术后 D-D 水平变化($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	<i>n</i>	术前	术后 24 h 内	术后 3 d	术后 7 d
D 组	79	335.6±71.1	561.5±90.0*	583.1±96.1*	345.0±71.7
E 组	54	366.3±71.0	521.3±91.9*	501.4±95.7*	349.2±70.6

*: $P<0.01$, 与术前比较。

2.2 各组术前、术后 FIB 变化 见表 2。

表 2 各组术前、术后 FIB 变化($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	<i>n</i>	术前	术后 24 h 内	术后 3 d	术后 7 d
A 组	55	2.77±0.62	2.15±0.42 [#]	2.06±0.50 [#]	2.21±0.66 [#]
B 组	38	2.55±0.53	1.97±0.39 [#]	1.99±0.41 [#]	2.03±0.51 [#]
C 组	96	2.19±0.60	1.85±0.44 [#]	1.80±0.56 [#]	2.00±0.68 [#]
D 组	79	2.76±0.72	2.55±0.82	2.63±0.70	2.91±0.69
E 组	54	3.14±0.88	3.01±0.80	2.96±0.77	3.09±0.75

[#]: $P<0.05$, 与术前比较。

3 讨 论

D-D 是纤维蛋白单体经活化凝血因子Ⅻ(FⅫa)交联后,再经纤溶酶水解所产生的一种特异性降解产物,其含量的升高反映继发性纤溶活性的增强^[8]。本研究显示,与术前比较,手术治疗后各组 D-D 水平在 24 h 内、术后 3 d 明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。手术治疗过程中患者血液呈高凝和纤溶亢进状态。主要原因为:(1)在麻醉作用下肌肉处于松弛状态而失去收缩功能,致使血流滞缓。(2)大剂量应用止血药物。(3)术中可能发生的缺氧、酸中毒、休克等。(4)血管内皮细胞损伤可激活内源性凝血途径,组织液中的组织因子、凝血活酶激活物激活外源性凝血途径等。

本研究显示,术后 7 d 的 D-D 水平与术前比较差异无统计学意义($P>0.05$),手术治疗 7 d 后,随着凝血和纤溶系统的逐步平衡,且已经形成的 D-D 片断的降解,其水平明显下降。如果患者 D-D 水平未下降至术前水平且有升高趋势,提示继发性纤溶持续存在,临床医师应通过影像学检查术后是否有深静脉血栓形成及采取抗凝溶栓治疗。

FIB 是凝血因子 I 经肝脏合成的一种血浆糖蛋白,是血浆中含量最高的凝血因子,其在凝血酶的作用下释放出纤维蛋白肽 A 和纤维蛋白肽 B 后,生成纤维蛋白单体,沉积于血管壁,损伤血管内皮细胞,增加血液黏稠度和影响白细胞及游离脂肪酸,从而促使血栓形成。本研究显示,与术前比较,A、B、C 组术后 24 h 内、术后 3 d、术后 7 d 的 FIB 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。A 组颅脑手术治疗,脑组织损伤释放组织

因子、脑脊液血凝块分解产物进入血循环、颅内压升高不明确的神经源性或激素源性机制^[4];B 组心胸手术治疗,非生理性血流出现,内皮细胞的损伤,血小板激活及凝血因子活化^[5],须进行抗凝治疗;C 组骨科手术治疗,骨折时骨结构遭破坏挤压髓腔内容物入血,骨血管壁受损等^[6-7]。手术治疗过程中因为凝血和纤溶系统激活,消耗了大量的凝血因子,特别是 FIB。D、E 组术后 24 h 内、术后 3 d、术后 7 d 的 FIB 水平与术前比较差异无统计学意义($P>0.05$)。可能是因为 D、E 组手术治疗对患者组织及器官的损伤程度要远小于 A、B、C 组,所以 D、E 组术后 FIB 无明显下降。比较表 1 和表 2,D、E 组术后 24 h 内、术后 3 d 的 D-D 水平明显升高($P<0.01$),而 FIB 无明显降低($P>0.05$),反映了在继发性纤溶中 D-D 水平的变化比 FIB 更为敏感。

综上所述,临床医师必须密切关注手术后患者的凝血及纤溶状态,特别是颅脑手术、心胸手术、骨科手术,如果血浆 D-D 水平持续升高或 FIB 持续下降,应立即影像学检查是否有术后深静脉血栓形成,对预防术后并发症及评估预后有重要的临床意义。

参考文献

[1] 吴新民. 围术期深静脉血栓形成[J]. 临床外科杂志, 2006, 14(1): 22-26.

[2] 杨帆, 刘亚波, 王满宜, 等. 创伤患者深静脉血栓形成与 D-dimer 的相关性[J]. 山东医药, 2010, 50(44): 20-21.

[3] 雷蕾, 刘丹彦, 吴会生, 等. 动态监测 D-二聚体及凝血-纤溶参数对深静脉血栓的意义[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(20): 2218-2221.

[4] 唐万兵, 李梅笑, 李观强, 等. 血浆纤维蛋白原、IL-17 水平与脑梗死病程相关性的研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(17): 28-31.

[5] Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, et al. Prevention of venous-thromboembolism: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition) [J]. Chest, 2008, 133(6): 381-453.

[6] 叶斌, 陈友燕, 马辉, 等. 老年型骨质疏松患者转子间骨折治疗创伤分析[J]. 中华全科医学, 2012, 10(2): 1428-1430.

[7] Zhang LD, Liu HB, Li YN, et al. Correlation analysis between plasma D-dimer levels and orthopedic trauma severity[J]. Chin Med J, 2012, 125(17): 3133-3136.

(收稿日期: 2013-06-13)

(上接第 3340 页)

[9] 李砚, 黄艳红, 王海旭, 等. 解冻胚胎卵裂球损伤与胚胎发育潜能关系的研究[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2013, 34(3): 349-352.

[10] Edgar DH, Boume H, Jericho H, et al. The developmental potential of cryopreserved human embryos [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 169(1/2): 69-72.

[11] Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2000, 20(13): 1030-1037.

[12] Tang R, Catt J, Howlett D. Towards defining parameters for a successful single embryo transfer in frozen cycles [J]. Hum Reprod, 2006, 21(5): 1179-1183.

[13] 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.

[14] Prentice-biensch JR, Sing J, Mapletoft RJ, et al. Vittrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vittrification procedure and warming time on cleavage and embryo development [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 10(1): 73-79.

[15] Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vittrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(7): 1905-1912.

[16] Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, et al. Studies on the toxicity of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol to loach (Misgurnus fossilis) sperm and the effect on subsequent embryo development[J]. Cryo Letters, 2003, 24(6): 365-374.

(收稿日期: 2013-08-02)