

囊胚玻璃化冻存前激光打孔对冻融后移植效果的影响*

方健叶, 杨菁, 尹太郎, 程琰, 赵庆红, 邹宇洁, 黄伟

Effect of laser drilling before vitrified cryopreservation on transplantation of frozen-thawed blastocysts

Fang Jian-ye, Yang Jing, Yin Tai-lang, Cheng Yan, Zhao Qing-hong, Zou Yu-jie, Huang Wei

Abstract

BACKGROUND: A series of studies have demonstrated that artificially reduced blastocoelic cavity can greatly increase the vitrified frozen-thawed effects of blastocysts, but different physical methods and materials used during the process of reduction can lead to mechanical injury to blastocysts.

OBJECTIVE: To investigate the effects of laser drilling before vitrified cryopreservation of transplantation of frozen-thawed blastocysts.

METHODS: Blastocysts from three dysgenesis patients who averaged 30 years old were subjected to laser drilling before vitrified cryopreservation to reduce the blastocoelic cavity for 1 year on average. Before transplantation, these blastocysts were thawed.

RESULTS AND CONCLUSION: Two patients acquired satisfactory pregnancy and one patient did not get pregnancy. The results showed that laser drilling before vitrified cryopreservation reduces blastocoelic cavity and transplantation of frozen-thawed blastocysts is safe and effective.

Fang JY, Yang J, Yin TL, Cheng Y, Zhao QH, Zou YJ, Huang W. Effect of laser drilling before vitrified cryopreservation on transplantation of frozen-thawed blastocysts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(31): 5731-5734. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 一系列研究均表明人工皱缩囊胚腔能明显提高囊胚的玻璃化冻融效果,但在皱缩过程中采用的物理方法和使用材料的不同可能会造成囊胚细胞的机械性损伤。

目的: 探讨囊胚玻璃化冻存前激光打孔对冻融后移植效果的影响。

方法: 3例不孕患者,平均年龄30岁,于囊胚玻璃化冻存前行激光打孔使囊胚皱缩,平均冻存时间为1年,确定移植前给予解冻。

结果与结论: 3例患者中有2例取得了满意的妊娠结局,1例未妊娠。说明采用激光辅助打孔的方法使囊胚皱缩,结合玻璃化冻融后行囊胚移植安全有效。

关键词: 激光辅助孵化;人工皱缩;玻璃化冻融;囊胚;移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.31.007

方健叶, 杨菁, 尹太郎, 程琰, 赵庆红, 邹宇洁, 黄伟. 囊胚玻璃化冻存前激光打孔对冻融后移植效果的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(31):5731-5734. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

随着体外受精胚胎移植技术的发展,如何有效地控制多胎妊娠,提高临床妊娠率已成为该技术的最大问题。囊胚培养使胚胎与子宫内膜更趋于同步,选择种植潜能高的单囊胚进行移植可以降低多胎妊娠率,有利于胚胎植入,提高临床妊娠率。玻璃化冷冻法是近年来兴起的一项简单、经济、快速的冷冻技术,但是由于囊胚腔内含有大量的水分使得囊胚的玻璃化冷冻一直停滞不前,有学者依据囊胚的特点,在玻璃化冷冻前,用玻璃微细管反复吹打、显微针刺入囊胚腔抽吸、显微针在滋养层上打孔等人工皱缩的方法来减少囊胚腔容积,但易造成细胞的机械性损伤,且不适合融合胚胎^[1],

此外这些方法的安全性和经济性有待考虑。本中心采取激光辅助打孔的方法使囊胚达到了上述同样的皱缩效果,并进行玻璃化冻融,取得了满意的妊娠结局。

1 对象和方法

设计: 回顾性临床病例分析。

时间及地点: 于2008/2011在武汉大学人民医院生殖医学中心进行。

对象: 选自武汉大学人民医院生殖医学中心自2008年来开展囊胚玻璃化冻融技术的3例不孕患者。患者A, 33岁,病因“原发不孕,双侧输卵管炎,男方无精子症”;患者B, 27岁,病因“原发不孕,男方少弱精子症”;患者C, 30岁,病因“原发不孕,双侧输卵管炎,男方

Reproductive Medical Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Fang Jian-ye★, Studying for master's degree, Reproductive Medical Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Yang Jing, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Reproductive Medical Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China dryangqing@hotmail.com

Received: 2011-03-29
Accepted: 2011-05-18

武汉大学人民医院生殖医学中心, 湖北省武汉市430060

方健叶★, 女, 1987年生, 湖北省武汉市人, 硕士生, 主要从事生殖医学研究。

通讯作者: 杨菁, 博士, 教授, 博士生导师, 武汉大学人民医院生殖医学中心, 湖北省武汉市430060 dryangqing@hotmail.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)31-05731-04

收稿日期: 2011-03-29
修回日期: 2011-05-18
(20110329031/M·S)

弱精子症”。

主要仪器和试剂:

主要仪器、试剂	来源
透明带 OCTAX-Laser Shot 激光打孔	MTG, Germany
Virification Cooling 试剂盒、Vitrification warming 试剂盒、玻璃化冷冻载体 Crytop	KITAZATO 公司, 日本

方法:

控制性超排卵及体外受精方式:

患者A, 以短方案促排卵, 获卵17个, 以donate-ICSI受精, 受精14个, 经培养后, 获得胚胎4个, 分别为6B 1个, 5B 1个及囊胚两个, 后行鲜胚移植2个(未孕), 囊胚玻璃化冷冻2个。

患者B, 以长方案促排卵, 获卵15个, 以ICSI受精, 受精13个, 经培养后获得胚胎4个, 分别为4B 2个及囊胚2个, 后行鲜胚移植2个(未孕), 囊胚玻璃化冷冻2个。

患者C, 以长方案促排卵, 获卵21个, 以ICSI受精, 受精13个, 经培养后获得胚胎11个, 分别为8A 1个, 8B 6个, 7B 2个及囊胚2个, 因OHSS取消移植, 行全胚胎玻璃化冷冻11个。

囊胚质量: 根据囊胚腔的扩张大小和是否孵化, 将囊胚的发育分为0~6级。1级: 早期囊胚, 囊胚腔小于胚胎总体积的1/2; 2级: 囊胚腔体积大于或等于胚胎总体积的1/2; 3级: 完全扩张囊胚, 囊腔充满整个胚胎的总体积; 4级: 扩张囊胚, 囊腔扩张, 直径大于最初的胚胎直径, 透明带变薄; 5级: 正在孵出的囊胚, 滋养层正从透明带中孵出; 6级: 孵出的囊胚, 囊胚完全从透明带中孵出。处于3~6级的囊胚, 还需对其内细胞团和滋养层细胞进行质量分级。内细胞团分级: A级, 细胞数目多, 排列紧密; B级, 细胞数目少, 排列松散; C级, 细胞数目很少。滋养层细胞分级: A级, 上皮细胞层由较多的细胞组成, 结构致密; B级, 上皮细胞层由不多的细胞组成, 结构松散; C级, 上皮细胞层由稀疏的细胞组成。

根据Gardner囊胚评分标准^[2], 患者A, 冷冻前囊胚均为1级, 解冻后均为1级; 患者B, 冷冻前囊胚均为1级, 解冻后均为1级; 患者C, 冷冻前囊胚为3BA和4BA, 解冻后为3BA和4BA。

囊胚的激光打孔人工皱缩: 在冷冻前进行激光打孔, 将扩张囊胚行人工皱缩。具体过程如下: 采用透明带OCTAX-Laser Shot激光打孔(MTG, Germany), 操作过程严格按照说明。使用340~599 S波长的非接触式激光在滋养细胞较薄弱区(远离内细胞团)打孔, 打孔处形成疝样鼓起, 可见囊腔迅速皱缩, 水分流出, 见图1。

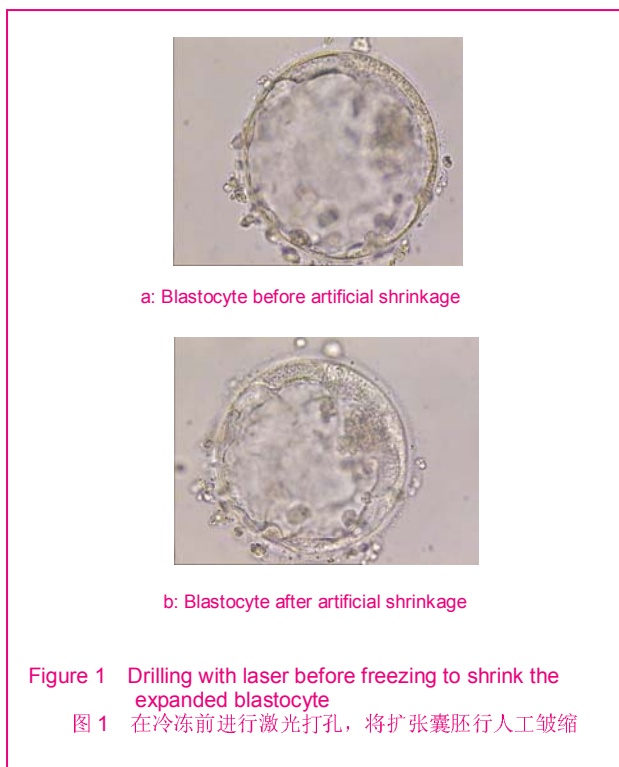


Figure 1 Drilling with laser before freezing to shrink the expanded blastocyst
图1 在冷冻前进行激光打孔, 将扩张囊胚行人工皱缩

囊胚的冻融:

囊胚冷冻: 采用Virification Cooling试剂盒, 严格按照说明书进行。具体如下: 冷冻液分为ES液和VS液, 均在4℃保存, 使用前取出, 在室温25℃平衡30 min。早期囊胚及皱缩囊胚在200 μL ES液中平衡2 min, 对于未皱缩囊胚, 则在37℃平衡3 min。再将囊胚放入VS液中平衡, 时间小于30 s, 将胚胎以最小液滴体积转移至玻璃化冷冻载体Crytop叶片上, 立即放入液氮中, 插进一个预冷的麦管中, 标记保存。

囊胚解冻: 采用Vitrification warming试剂盒, 严格按照说明书进行。解冻液(4℃保存)分为TS液、DS1液, DS2液, WS-1液和WS-2液。使用前, TS液在37℃平衡30 min, 其他解冻液室温(25℃)平衡30 min。将载体Crytop从液氮中取出, 迅速将尖端叶片浸入TS液中, 在1 min内囊胚移至DS1液3 min, 后移至DS2液3 min, 此时囊胚细胞形态仍未恢复至冻胚前的形态。最后依次将囊胚置于WS1和WS2液中各5 min, 此时囊胚形态完全恢复, 再转入Quinn's囊胚培养液中, 行激光辅助孵化, 等待移植。

子宫内膜准备: 对于月经不规则的患者A和C, 行人工周期; 对于月经规则患者B, 行自然周期, B超观察子宫内膜情况, 并结合卵泡监测及血或尿黄体生成素值, 确定移植时机。移植后, 给予黄体酮60 mg/d, 或给予雌激素(同移植前剂量)及黄体酮60 mg/d。移植后第12天查血绒毛膜促性腺激素水平。

主要观察指标: 血绒毛膜促性腺激素水平, 移植后30 d B超检查情况。

2 结果

2.1 血绒毛膜促性腺激素水平 3例患者行激光辅助孵化皱缩囊胚结合玻璃化冻融囊胚移植后, 第12天查血绒毛膜促性腺激素水平, 分别为597.8 IU/L, 466.0 IU/L, 0.5 IU/L。正常值为0~10 IU/L, 即患者A和B为生化妊娠, 患者C未孕。

2.2 移植后30 d B超检查结果 患者A和B于孕45 d (即移植后30 d)行B超检查示可见孕囊, 其内可见胚芽, 胎心搏动好。均为临床妊娠, 见图2。

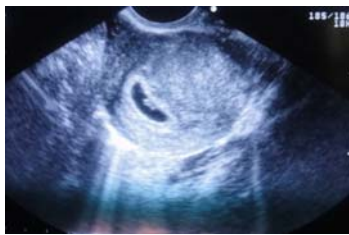


Figure 2 B-ultrasound examination of patient A of pregnancy for 45 d
图2 患者A, 孕45 d B超检查

2.3 分娩后婴儿体质量 患者A和B均于孕38周时剖腹顺利产健康婴儿, 体质量分别为3.1 kg, 3.4 kg。

3 讨论

在辅助生殖技术领域, 如何选择胚胎进行移植以降低多胎妊娠率, 提高临床妊娠率一直存在争议。囊胚培养的优势在于具有较好的种植潜能, 移植囊胚可明显降低多胎妊娠率, 提高临床妊娠率, 但是因囊胚腔内含大量的水分使得囊胚的玻璃化冻融移植妊娠率一直停滞不前。

3.1 囊胚移植可以有效提高妊娠率 Marek等^[3]通过对790个周期的受精后第3天分裂期胚胎移植与受精后第5天囊胚移植的比较发现, 着床率分别为23.3%和32.4%, 妊娠率分别为35.9%和43.8%, 差异均有显著性意义。且Panpanikolaou等^[4]通过对282篇共1 654个周期的受精后第5天囊胚移植与受精后第3天分裂期胚胎移植比较的文章进行Meta分析发现, 囊胚移植与卵裂期移植婴儿出生率(OR: 1.39, 95%CI: 1.10~1.76, $P=0.005$)、临床妊娠率(OR: 1.27, 95%CI: 1.03~1.55, $P=0.02$)均显著升高。这些文献均提示囊胚移植能提高着床率和妊娠率。Balaban等^[5]通过研究350例囊胚移植病例, 发现移植囊胚或早期孵化囊胚将提高着床与妊娠比例。囊胚冻融后进行移植, 可以使其移植窗与自然受孕达到一致, 这样更适合胚胎着床, 比卵裂期胚胎移植更有优势。

Fanchin等^[6]前瞻性地研究了45例IVF患者子宫收缩频率, 结果在卵巢刺激周期的黄体期子宫收缩频率持续下降, 达到囊胚期几乎为静止状态, 可避免胚胎在宫腔内移位。但目前很多中心都是选择了卵裂期胚胎移植, 此时的子宫状态并不是最佳, 而囊胚冻融后移植, 此时的子宫环境更接近自然生理状态。

3.2 囊胚冻融方法与囊胚移植结局有关 在胚胎发育的不同阶段, 胚胎细胞的代谢变化使细胞质和冷冻保护剂之间的相互作用也随之变化。玻璃化冷冻与传统冷冻方法相比, 不产生结晶, 使细胞损伤达到最低程度。但是囊胚在与冷冻保护剂作用过程中, 其脱水皱缩速度较卵裂期胚胎慢, 从而导致了扩张期囊胚冷冻后复苏效果不及早期囊胚。Huang等^[7]观察脱水皱缩后囊腔的体积, 发现早期囊胚在与冷冻保护剂作用后, 其囊腔变得更小甚至消失。这提示囊胚冷冻效果与囊腔的扩张程度呈负相关, 可能因为囊胚腔越大, 就越有可能脱水不充分, 而在玻璃化冷冻时易形成冰晶, 使细胞受到损伤。此外, Stehlik等^[8]研究认为玻璃化冻融技术与慢速冷冻相比较, 能有效改善冻融囊胚复苏率与种植潜能。

3.3 激光辅助孵化结合玻璃化冻融囊胚的优点 一系列研究均表明了囊胚腔的扩张程度明显影响玻璃化冷冻的效果^[9]。因而人工皱缩囊胚腔能明显提高囊胚的玻璃化冻融效果, 但在皱缩过程中由于采用的物理方法和使用材料的不同可能会造成囊胚细胞的机械性损伤, 以往多用玻璃微细管反复吹打、显微针刺入囊胚腔抽吸、显微针在滋养层上打孔等人工皱缩的方法来减少囊胚腔容积。有研究发现, 使用机械法辅助孵化, 狭窄的裂隙容易引起胚胎孵出嵌顿, 且当卵周隙小时, 很难切割30~40 pm的裂隙而不伤及卵裂球, 故不适合融合胚胎^[1]。

张宁媛等^[10]分别用注射针抽吸、拉细管吹打、激光打孔这三种方法处理小鼠囊胚, 复苏后囊胚存活率分别为72.9%, 72%, 94%, 囊胚孵出率分别64.6%, 32.0%, 62.0%, 提示激光打孔囊胚皱缩对细胞的损伤影响最小, 而且激光操作简便, 控制精确、快速, Chatzimeletio等^[11]研究发现激光辅助孵化对小鼠卵裂球的生存能力或发育不会造成威胁。但该技术对人类后代的安全性目前尚不清楚。Germond等^[12]已报道了激光辅助孵化是安全的, 大量人体研究提示激光辅助孵化应用于人类胚胎时相对不存在风险^[13-15]。本实验采用激光辅助孵化结合玻璃化冻融囊胚出生的2个婴儿均为健康婴儿, 而且Obruca等^[16]通过对129例反复IVF失败的患者行激光辅助孵化与对照组167例反复IVF失败未行激光辅助孵化的患者比较, 着床率分别为14.4%和7%, 临床妊娠率分别为40%和14.2%, 差异有显著性意义, 其中37个行激光辅助孵化的患者生育出了44个健康婴儿, 提示激光辅助孵化技术能提高胚胎着床率及临床妊娠, 且该技术安全有效, 值得推广。

综上所述, 囊胚移植时宫腔环境更接近生理阶段, 只移植1个或2个囊胚可以有效的降低多胎妊娠率, 提高临床妊娠率。囊胚腔内含有大量水分, 其扩张程度明显影响冻融的效果。采用激光辅助孵化人工皱缩囊胚技术能提高着床率和妊娠率, 且经济安全。目前该技术尚未大量应用于临床, 临床资料较少, 该技术需要大样本资料进一步分析, 但激光辅助孵化法人工皱缩结合玻璃化冻融囊胚技术在辅助生殖技术的发展中具有良好的前景。

4 参考文献

[1] Sun W, Li J, Wen J. Zhongguo Yousheng yu Yichuan Zazhi. 2007;15(12): 3-4. 孙伟, 李静, 闻姬. 人胚胎透明带与辅助孵化的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(12):3-4.

[2] Zhuang GL. Beijing: People's Medical Publishing House. 2005:403-404. 庄广伦. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005:403-404.

[3] Marek D, Langley M, Gardner DK, et al. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. Fertil Steril. 1999;72(6):1035-1040.

[4] Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 2008;23(1):91-99.

[5] Balaban B, Urman B, Sertac A, et al. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. Fertil Steril. 2000; 74(2):282-287.

[6] Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, et al. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. Hum Reprod. 2001; 16(6):1115-1119.

[7] Huang CC, Lee TH, Chen SU, et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. Hum Reprod. 2005;20(1):122-128.

[8] Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, et al. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. Reprod Biomed Online. 2005;11(1):53-57.

[9] Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. Hum Reprod. 2003;18(2):384-391.

[10] Sun NY, Sun HX, Hu YL, et al. Zhonghua Nanxue Zazhi. 2009;15(3): 228-231. 张宁媛, 孙海翔, 胡娅莉, 等. 3种囊腔人工皱缩技术在小鼠扩张期囊胚玻璃化冷冻中的比较研究[J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(3): 228-231.

[11] Chatzimeletiou K, Picton HM, Handyside AH. Use of a non-contact, infrared laser for zona drilling of mouse embryos: assessment of immediate effects on blastomere viability. Reprod Biomed Online. 2001;2(3):178-187.

[12] Germond M, Nocera D, Senn A, et al. Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. Fertil Steril. 1995;64(3): 604-611.

[13] Antinori S, Selman HA, Caffa B, et al. Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. Hum Reprod. 1996;11(11):2488-2492.

[14] Antinori S, Panci C, Selman HA, et al. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. Hum Reprod. 1996;11(3):590-594.

[15] Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, et al. Laser zona pellucida thinning—an alternative approach to assisted hatching. Hum Reprod. 2001;16(9):1959-1964.

[16] Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, et al. Use of lasers in assisted fertilization and hatching. Hum Reprod. 1994;9(9):1723-1726.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 实验设计为方健叶, 实验实施为方健叶, 实验评估为杨菁, 资料收集为方健叶、程琰、赵庆红、邹宇洁、黄伟。方健叶成文, 尹太郎审校, 方健叶对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 患者已经签署了知情同意书。

本文创新性: 与以往的人工皱缩囊胚的方法相比, 激光打孔更准确迅速, 且方便安全, 并与玻璃化冻融技术相结合, 能有效改善冻融囊胚复苏率与种植潜能, 提高妊娠率, 为囊胚冷冻提供了新的方法。目前尚无将囊胚冻融移植大规模应用于临床的研究报道, 对囊胚行激光打孔人工皱缩后冻融移植的报道也较少。

CRTER 杂志关注“肝移植后并发症”内容: 本刊学术部

<p>胆道并发症</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 从胆道内镜角度分析和认识原位肝移植后的胆道并发症 ○ 肝移植后胆道铸型4例全蛋白质的表达 ○ 肝移植术后胆道并发症33例分析 ○ 肝移植治疗特发性成人肝内胆管狭窄1例并文献复习 ○ 原位肝移植后经皮胆道内治疗胆管狭窄 ○ 原位肝移植后胆管损伤的病理学改变 ○ 原位肝脏移植后胆道狭窄的病因分析与处理 ○ 原位肝移植后胆管狭窄与胆道内镜下球囊扩张及支撑管治疗 <p>肺部感染</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 肝移植后急性肺损伤26例危险因素分析 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 肝移植术后肺部感染的防治 ○ 肝移植术后急性肺损伤特点 ○ 原位肝移植术后早期肺部感染55例分析 ○ 胸腺肽α I 治疗肝移植后巨细胞病毒肺炎17例 <p>肾脏并发症</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 肝移植后肾功能不全37例 ○ 肝移植后肾功能损害58例相关因素分析 <p>移植后乙肝</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 肝移植后乙肝再感染的因素分析及其防治 ○ 肝移植后乙型肝炎复发核苷类抗乙肝药物联合小剂量乙肝免疫球蛋白可能防治吗? ○ 乙型肝炎相关性终末期肝移植后乙型肝炎复发19例:同一治疗机构43个月资料回顾 	<p>真菌及病毒感染</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 肝移植后早期深部真菌感染16例 ○ 肝移植后真菌感染9例次分析 ○ 更昔洛韦对原位肝移植术后巨细胞病毒感染的预防和治疗:19例临床资料回顾 ○ 肝移植术后巨细胞病毒感染的特点 <p>其他并发症</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 肝移植后急性排斥反应的诊断及防治 ○ 原位肝移植术后并发症10例报告 ○ 婴幼儿肝移植后的近期并发症 ○ 肝移植术后神经精神系统并发症: 3例回顾性分析及文献复习 ○ 肝移植后胰腺炎的诱因分析 ○ 肝移植后淋巴管炎3例 ○ 肝移植治疗晚期肝硬化伴门静脉高压症18例
---	---	---