

玻璃化解冻和慢速解冻在程序化冷冻胚胎解冻移植中的比较研究

王建业¹, 唐宁², 吕丹^{3*}

作者单位: 1. 100700 北京, 中国人民解放军总医院第七医学中心生殖医学中心; 2. 250031 山东 济南, 中国人民解放军

联勤保障部队第九六〇医院生殖医学中心; 3. 300192 天津, 天津市第一中心医院疼痛科

作者简介: 王建业, 毕业于华北理工大学, 本科, 副主任医师, 主要研究方向为生殖医学和辅助生殖技术

* 通信作者, E-mail: lvdan918@163.com

【摘要】目的 探讨玻璃化解冻(vitrificative thawing, VT)和慢速解冻(slow thawing, ST)对程序化冷冻胚胎解冻移植的影响, 优化程序化冷冻胚胎的解冻方案, 从而提高不孕不育临床治疗效果。**方法** 选取2016年1月至2018年12月解放军第九六〇医院生殖医学中心行解冻胚胎移植的400例患者, 使用随机数分配的方式(Excel数据随机分组), 分为VT组(200例)和ST组(200例), 比较两组患者最初施行体外受精-胚胎移植(invitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)时的基本情况、胚胎发育情况及本次移植胚胎复苏情况、移植情况和临床妊娠结局。**结果** 两组患者年龄、不孕年限、获卵数、促性腺激素(gonadotropins, Gn)用量和基础促卵泡成熟激素(follicle stimulating hormone, FSH)值等基本情况比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 两组MⅡ卵率(metaphase II egg rate)、受精率、卵裂率、优质胚胎率、可用胚胎率和冷冻胚胎率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。但VT组的胚胎复苏完整率和复苏可用率(88.34%、97.51%)明显高于ST组(72.47%、82.23%), 差异有统计学意义($P < 0.001$); 两组患者胚胎移植日移植次数、移植胚胎数和内膜厚度比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 两组临床妊娠结局比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** VT可以显著提高程序化冷冻胚胎的复苏效果, 提高程序化冷冻胚胎患者的胚胎利用率, 可以考虑成为ST的较好替代方案。

【关键词】 玻璃化解冻; 程序化冷冻; 慢速解冻; 胚胎移植

【中图分类号】R 321 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-4020(2021)01-071-04

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.01.18

Comparative study of vitrification and slow thawing in programmed frozen embryo thawing transfer

WANG Jianye¹, TANG Ning², LYU Dan^{3*}

1. Reproductive Medicine Center, No. 7 Medicine Center of the General Hospital of PLA, Beijing 100700; 2. Reproductive Medicine Center, the 960th Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force, Jinan Shandong 250031; 3. Pain Management Department of Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: lvdan918@163.com

【Abstract】Objective To discuss the influence of vitrificative thawing (VT) and slow thawing (ST) on programmed frozen embryo thawing transfer, optimize the thawing program of programmed frozen embryo, and improve the clinical treatment effect of infertility. **Methods** From January 2016 to December 2018, 400 patients who underwent thawing embryo transfer at Reproductive Medicine Center, the 960th Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force were selected and divided into VT groups (200 cases) and ST group (200 cases) (randomized by Excel data) using random number assignment, compare the basic conditions, embryo development and embryo recovery and transfer situation and clinical pregnancy outcome of the two groups during the initial invitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Results** There were no statistically significant differences between the two groups of patients

in basic conditions such as age, years of infertility, number of eggs obtained, gonadotropins (Gn) dosage and basic follicle stimulating hormone (FSH) values ($P > 0.05$). There were no significant difference between the two groups of MII egg rate (metaphase II egg rate), fertilization rate, cleavage rate, high-quality embryo rate, usable embryo rate and frozen embryo rate ($P > 0.05$). However, the embryo recovery complete rate and recovery availability rate (88.34%, 97.51%) of the VT group were significantly higher than those of the ST group (72.47%, 82.23%), and the differences were statistically significant ($P < 0.001$). There were no statistically significant difference in the number of transfers, the number of embryos transferred and the thickness of the intima on the day of embryo transfer ($P > 0.05$). There was no significant difference in the clinical pregnancy outcome between the two groups ($P > 0.05$).

Conclusion VT can significantly improve the recovery effect of programmed frozen embryos and increase the embryo utilization rate of patients with programmed frozen embryos. It can be considered as a better alternative to ST.

【Key words】vitrification and thawing; programmed freezing; slow thawing; embryo transfer

玻璃化冷冻是生殖医学领域应用最广也是最为普遍的冷冻方式,它广泛应用于卵裂期胚胎、囊胚期胚胎、卵母细胞,甚至是精子的冷冻^[1-5],极大地提高了冷冻胚胎移植(frozen embryo transfer, FET)周期患者的胚胎复苏率和患者的累计妊娠率^[6-7],保障了FET周期患者成功率,减少了患者并发症,也进一步降低了不孕不育患者治疗的总费用。但早期不孕不育患者在接受体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)治疗时多采用程序化的冷冻方式,对于这部分胚胎如果按照标准的慢速解冻(slow thawing, ST)方式进行操作,解冻后胚胎有较高的卵裂球坏死率,胚胎利用率相对较低;按照玻璃化解冻(vitrificative thawing, VT)方式解冻玻璃化冷冻的胚胎,解冻后胚胎存活率高,胚胎利用率也相对较高^[8-9]。但是否能用VT方式解冻程序化冷冻的胚胎,目前还在探讨之中。本研究将比较VT和ST对程序化冷冻胚胎的影响,以期对程序化冷冻胚胎寻求更好的解冻方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究对象为2016年1月至2018年12月解放军第九六〇医院生殖中心接受IVF-ET技术进行助孕治疗的胚胎解冻移植患者。使用随机数生成软件产生随机分组数值,患者按照就诊先后顺序所对应的随机数分为VT组(200例,解冻液使用日本加藤的玻璃化解冻液)和ST组(200例,解冻液使用Quinn's的慢速解冻液)。两组患者夫妇的胚胎在冷冻时均为程序化冷冻方式。纳入研究的患者年龄 < 37 岁,不孕原因为输卵管因素,超促排卵方案为短方案。所有患者均按照医院生殖伦理委员会要求,每一步操作都签订相应的知情同意书。

1.2 方法

使用本中心常规方法,但略有改进^[10],具体如下。

1.2.1 超促排卵 采用本生殖中心常规超促排卵方案,当主导卵泡直径达18 mm时,肌内注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)5 000 ~ 10 000 U。

1.2.2 取卵、受精和胚胎观察 hCG注射后36 h在超声引导下经阴道取卵,取卵后3 ~ 5 h行体外受精(in vitro fertilization, IVF),19 ~ 20 h观察受精情况,6 ~ 7 h

行卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI),17 ~ 18 h观察受精情况。授精后68 ~ 70 h观察胚胎卵裂球和碎片数量,并以此判定卵裂期胚胎的级别。① I级胚胎:卵裂球大小均匀,胞浆碎片 $< 10\%$;② II级胚胎:卵裂球大小略不均匀,胞浆碎片 $< 15\%$;③ III级胚胎:胞浆碎片 $< 50\%$,卵裂球情况类似于II级胚胎;④ IV级胚胎:胞浆碎片 $> 50\%$ 。胚胎达6细胞以下,胚胎评级降低一个级别。解冻后胚胎有卵裂球死亡,胚胎评级降低一个级别。I级和II级胚胎为优质胚胎。I ~ III级胚胎为可用胚胎。两组胚胎均在Labotect C 200培养箱中培养。所有洗精和受精用培养液均使用Vitro Life产品。

1.2.3 所有解冻移植胚胎均使用程序化冷冻方法。

1.2.4 移植日测定患者子宫内膜厚度,低于10 mm不予移植,不计入本研究统计范围。

1.3 观察指标

① 比较两组患者最初进入IVF-ET周期时的基本情况,包括年龄、不孕年限、获卵数、促性腺激素(gonadotropins, Gn)用量和基础促卵泡成熟激素(follicle stimulating hormone, FSH)值;② 比较两组患者最初进入IVF-ET周期时胚胎发育情况,包括MII卵率、受精率、卵裂率、优质胚胎率、可用胚胎率和冷冻胚胎率;③ 比较两组患者胚胎复苏情况,包括胚胎复苏完整率和复苏可用率;④ 比较两组患者胚胎移植情况和临床妊娠结局,包括胚胎移植日移植次数、移植胚胎数、内膜厚度和临床妊娠结果。

1.4 统计学分析

使用SPSS 15.0统计学软件进行分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用成组设计的 t 检验,定性资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.001$ 表示差异有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本情况

所有患者均曾在中心接受IVF助孕。最近一次IVF周期检查显示:两组患者年龄、不孕年限、获卵数、Gn用量和基础FSH值差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见下页表1。

2.2 胚胎发育情况

最近一次IVF周期胚胎发育情况显示:两组患者M

Ⅱ卵率、受精率、卵裂率、优质胚胎率、可用胚胎率和冷冻胚胎率差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表2。

2.3 胚胎复苏情况

VT组患者胚胎复苏完整率和复苏可用率明显高于ST组,两组差异均有非常显著的统计学意义($P<0.001$),详见表3。

2.4 胚胎移植及妊娠结局

胚胎移植日,两组患者移植次数、移植胚胎个数和子宫内膜厚度、移植后两组患者临床妊娠率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见78页表4。

3 讨论

自1978年第1例试管婴儿诞生以来,越来越多不孕不育患者受益于辅助生殖技术。在众多的辅助生殖技术中,冷冻和解冻技术是最重要的技术之一,最常用的冷冻和解冻方法包括程序化冷冻与ST及玻璃化冷冻与VT。程序化冷冻是最早使用的冷冻方法,采用“植冰”方式防止细胞内冰晶形成,使用麦管作为冷冻载体,程序化降温方式;玻璃化冷冻是后来使用的冷冻方法,采用高浓度冷冻保护剂,在极速降温中形成玻璃态方式防止细胞内冰晶形成,使用冷冻环、冷冻钩或者冷冻片作为冷冻载体,急速降温方式。ST使用冷冻保护剂梯度递降的方式置换细胞内外液体,避免解冻时的冰晶损伤;VT同样使用冷冻保护剂梯度递降的方式置换细胞内外液体,避免解冻时的冰晶损伤。现在多数学者和临床胚胎学家认为,玻璃化冷冻更适合胚胎的冷冻保存,玻璃化冷冻和解冻应该全面代替程序化冷冻和ST^[11-12]。只是两种解冻方式使用的冷冻保护剂有所不同。这为我

们使用VT方式代替ST方式,解冻程序化冷冻的胚胎,提供了一定的理论基础。

本研究中,所有进入冷冻周期的患者都是最近接受IVF周期并有冷冻胚胎,随机数分配形成VT组和ST组。两组患者在年龄、不孕年限、获卵数、Gn用量和基础FSH值方面没有差异,有共同的比较基础。进一步的胚胎发育比较显示MⅡ卵率、受精率、卵裂率、优质胚胎率、可用胚胎率和冷冻胚胎率差异无统计学意义。而在影响冷冻和解冻的因素中,胚胎质量和数量非常重要,胚胎发育的一致性使得两组在比较解冻方法对冷冻效果的影响上有了较好的共同基础,增加了比较的可行度。解冻结果显示VT组患者胚胎复苏完整率和复苏可用率明显高于ST组,这表明了VT能达到比ST较好的解冻结果,这也意味着解冻同样数量的冷冻胚胎,经过VT可以获得更多的优质胚胎和可用胚胎用于胚胎移植。在实际的临床实践中,我们总是尽可能的保证在一次移植时有两个优质胚胎,因此使用慢速冷冻意味着要解冻更多的胚胎。本研究中VT组解冻了523个胚胎,而ST组则解冻了603个胚胎。80个胚胎可能来自ST组解冻后的不可用胚胎,也可能来自复苏后的多余可用胚胎。这表明ST不仅会造成更多的胚胎坏死,而且考虑到随后的胚胎移植,还会造成更多的胚胎浪费。由于两组患者的移植次数、移植胚胎个数和子宫内膜厚度没有差异,移植后的临床妊娠率也没有差异,但VT组移植胚胎数(2.13 ± 0.26)还是略低于ST组(2.48 ± 0.42),而VT组临床妊娠率(55.0%)却略高于ST组(53.5%),这表明VT比ST对临床妊娠结果有一定提高,虽然这种提高并没有明显的统计学意义。

表1 患者基本情况($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	不孕年限(年)	获卵数(个)	Gn用量(支,75 IU/L)	基础FSH值(IU/L)
VT组	200	30.27±1.67	3.76±0.97	13.28±3.56	28.64±1.87	5.67±1.08
ST组	200	31.49±1.89	3.45±0.76	14.64±3.92	27.89±1.78	5.77±1.13
<i>t</i> 值		0.484	0.252	0.257	0.291	0.064
<i>P</i> 值		0.314	0.401	0.399	0.386	0.475

表2 胚胎发育情况(%)

组别	例数	MⅡ卵率	受精率	卵裂率	优质胚胎率	可用胚胎率	冷冻胚胎率
VT组	200	84.79	75.23	96.50	54.82	64.37	76.50
ST组	200	85.21	75.85	95.86	53.97	63.79	75.50
χ^2 值		0.163	0.242	0.996	0.264	0.124	0.0137
<i>P</i> 值		0.686	0.609	0.318	0.607	0.724	0.907

表3 胚胎复苏情况(%)

组别	例数	复苏完整率	复苏可用率	胚胎数(个)
VT组	200	88.34	97.51	523
ST组	200	72.47	82.23	603
χ^2 值		42.821	66.897	
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	

总之,对于程序化冷冻的胚胎,VT比ST提升解冻效果明显,能够更好地提高冷冻胚胎的利用率,进而提高不孕不育患者的累计妊娠率,降低患者的妊娠花费,是相对较好的胚胎解冻方法。但由于本研究样本量有限,加之缺乏相关机理的深入探讨,对玻璃化方法解冻程序化冷冻胚胎的研究还需要进一步探究。(下转第78页)

[4] 卢娜,富宏怡,王琰. 高龄不孕女性二胎生育压力与个体应对方式的中介效应 [J]. 中国医药导报,2018,15(14):62-66.

[5] Ying L, Wu X, Wu L-h, et al. A partnership and coping enhancement program for couples undergoing in vitro fertilization treatment: an intervention study [J]. Journal of Sex & Marital Therapy, 2018, 44(6): 533-551.

[6] Newton C R, Sherrard W, Glavac I. The fertility problem inventory: measuring perceived infertility-related stress [J]. Fertility and Sterility, 1999, 72(1): 54-62.

[7] Peng T, Coates R, Merriman G, et al. Testing the psychometric properties of Mandarin version of the fertility problem inventory (M-FPI) in an infertile Chinese sample [J]. Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology, 2011, 32(4): 173-181.

[8] Haviland J, Sodergren S, Calman L, et al. Social support following diagnosis and treatment for colorectal cancer and associations with health-related quality of Life: Results from the UK ColoREctal Wellbeing (CREW) cohort study [J]. Psycho-Oncology, 2017, 26(12): 2276-2284.

[9] 黎欢. 医疗社会支持量表简体中文版在艾滋病患者中的心理测量学评定及应用研究 [D]. 长沙,中南大学,2013.

[10] Sherbourne C D, Stewart A L. The MOS social support survey [J]. Social Science & Medicine, 1991, 32(6): 705-714.

[11] Feifel H, Strack S, Nagy V T. Coping strategies and associated features of medically ill patients [J]. Psychosomatic Medicine, 1988, 49(6): 616-625.

[12] 沈晓红,姜乾金. 医学应对方式问卷中文版 701 例测试报告 [J]. 中国行为医学科学,2000,9(1):18-20.

[13] 史莉,罗丽燕,宋东红,等. 体外受精-胚胎移植术后未妊娠患者生育压力与生活质量相关性研究 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2018,37(3):191-195.

[14] Jin X, Wang G, Liu S, et al. Survey of the situation of infertile women seeking in vitro fertilization treatment in China [J]. BioMed Research International, 2013, 2013:179098.

[15] 倪颖,童琛晖,韩迟迟. 体外受精-胚胎移植助孕患者治疗期间心理体验的质性研究 [J]. 解放军护理杂志,2017,34(3):26-29.

[16] 于磊,盛艳秋,彭涛. 不孕不育夫妇的婚姻质量和性状况的研究 [J]. 中国性科学,2012,21(3):43-45, 53.

[17] Drosdzol A, Skrzypulec V. Evaluation of marital and sexual interactions of Polish infertile couples [J]. The Journal of Sexual Medicine, 2009, 6(12): 3335-3346.

[18] 史潇,全松. 体外受精-胚胎移植前妇女情绪、社会支持状态对疾病应对方式影响的调查 [J]. 中国妇产科临床杂志,2015,16(2):142-144.

[19] 龙玲,李静,彭倩,等. 女性不孕症患者心理弹性、社会支持与生育应激的相关研究 [J]. 重庆医学,2015,44(3):426-427, 432.

[20] 邓桂英,王文兰,欧阳结颜,等. 71 例不孕症患者婚姻调适与医学应对方式分析 [J]. 护理学报,2013,20(14):67-68.

[21] 刘述珍,乔海燕,王笠环. 女性不孕患者社会支持水平及应对方式对其抑郁情绪影响的调查分析 [J]. 中国实用护理杂志,2014,30(3):59-61.

[22] 蔡艳娜,董悦芝. 不孕女性生活事件、压力反应、应对方式与生育压力的关系及应对方式的中介效应 [J]. 中国全科医学,2017,20(6):715-719.

(收稿日期:2020-02-14 编辑:吕永胜)

(上接第 73 页)

表 4 胚胎移植及妊娠结局($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	移植次数(次)	移植胚胎数(个)	内膜厚度(mm)	临床妊娠率(%)
VT 组	200	2.67 ± 0.68	2.13 ± 0.26	10.34 ± 1.57	55.00
ST 组	200	2.87 ± 0.89	2.48 ± 0.42	10.25 ± 1.43	53.50
t/χ^2 值		0.179	0.709	0.0424	0.0403
P 值		0.429	0.240	0.483	0.841

【参考文献】

[1] 王珂. 奶牛卵母细胞玻璃化冷冻方法及胚胎程序化冷冻研究 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2008.

[2] 王月春. 小鼠卵母细胞程序化和 OPS 玻璃化冷冻效果的比较 [D]. 大连:大连医科大学,2007.

[3] Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, et al. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? [J]. Reproductive BioMedicine Online, 2003, 7(6): 623-633.

[4] Saito H, Ishida G M, Kaneko T, et al. Application of vitrification to human embryo freezing [J]. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2000, 49(3): 145-149.

[5] Horta F, Alzobi H, Jitanantawittaya S, et al. Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice [J]. Asian Journal of Andrology, 2017, 19(1): 107-112.

[6] Rezazadeh V M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian, et al. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos [J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2009, 26(6): 347-354.

[7] Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, et al. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program [J]. Human Reproduction, 2010, 25(5): 1199-1205.

[8] 孙燕萍,牛向丽,陈自洪,等. 玻璃化与程序化两种不同胚胎冻融方法的临床应用效果比较 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2011,3(1):22-25.

[9] 薛亚梅,李坤,葛红山,等. 程序化与玻璃化冷冻保存人 D2 和 D3 胚胎的临床结局比较 [J]. 医学研究杂志,2011,40(3):44-48.

[10] 唐宁,王建业,吕丹,等. 授精后 24-25h 原核融合与 IVF/ICSI-ET 中胚胎早期发育和妊娠结局的相关性研究 [J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(3):121-123.

[11] Vajta G, Nagy Z P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification [J]. Reproductive BioMedicine Online, 2006, 12(6): 779-796.

[12] Yu L, Jia Chanwei, Lan Yonglian, et al. Analysis of embryo intactness and developmental potential following slow freezing and vitrification [J]. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2017, 63(5): 285-293.

(收稿日期:2019-08-23 编辑:向晓莉)