55(9):2708 – 2718.
5 詹李彬,陈国燊. 新生儿院内感染败血症19例临床分析[J]. 中国临床新医学,2016,9(10):912 – 915.
6 Zhou M, Yang Q, Kudinha T, et al. An Improved In-house MALDI-TOF MS Protocol for Direct Cost-Effective Identification of Pathogens from Blood Cultures[J]. Front Microbiol, 2017, 8:1824.
7 Barnini S, Brucculeri V, Morici P, et al. A new rapid method for direct antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood cultures[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1):185.
8 谢小芳,周惠琴,郑　毅,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术直接鉴定血流感染病原菌的效果评价[J]. 中华临床感染病杂志,2016,9(2):152 – 155.
9 韦柳华,罗国兰,李梦薇, 等. VITEK MS 质谱仪错误鉴定福氏志贺菌1例[J]. 临床检验杂志,2016,34(4):315 – 316,320.
10 Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol,2010,48(5):1542 – 1548.

[收稿日期　2018 – 07 – 13][本文编辑　余　军　吕文娟]

课题研究 · 论著

人工皱缩对玻璃化冻融囊胚复苏结局的影响

周亭亭,　薛林涛,　王世凯,　谭卫红,　成俊萍,　毛献宝,　李政达,　张小慧,　韦娉嫔

基金项目:广西卫健委科研课题(编号:Z2015305)

作者单位:530021　南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心
作者简介:周亭亭(1991 –),女,硕士,技师,研究方向:生殖医学。E-mail:1070938352@qq.com
通讯作者:薛林涛(1982 –),男,博士,副主任技师,研究方向:生殖医学。E-mail:ltxgxh@163.com

[**摘要**]　**目的**　探讨不同人工皱缩方式对囊胚玻璃化冻融后复苏结局的影响。**方法**　收集体外受精(IVF)/卵泡浆内单精子注射(ICSI)治疗周期病人冷冻或移植后的246枚囊胚,随机分为对照组(囊胚不进行皱缩,直接玻璃化冻融)、激光皱缩组(囊胚采用激光打孔法使其完全皱缩后行玻璃化冻融)、机械皱缩组(囊胚采用机械挤压法使其完全皱缩后行玻璃化冻融),每组82枚。比较三组间的复苏率和孵出率。**结果**　激光皱缩组和机械皱缩组囊胚玻璃化冻融后的复苏率和孵出率均高于对照组($P<0.05$)。机械皱缩组和激光皱缩组的优质囊胚孵出率均高于对照组且差异有统计学意义($P<0.05$)。激光皱缩组优质囊胚复苏率及孵出率均高于机械皱缩组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。机械皱缩组和激光皱缩组的劣质囊胚复苏率、孵出率均高于对照组($P<0.05$),激光皱缩组劣质囊胚孵出率高于机械皱缩组($P<0.05$)。**结论**　人工皱缩去除囊胚腔液能够显著改善囊胚玻璃化冻融复苏结局,而激光法皱缩是最佳的人工皱缩方式。

[**关键词**]　人工皱缩;　囊胚;　玻璃化冷冻;　复苏率;　孵出率
[**中图分类号**]　R 715　[**文献标识码**]　A　[**文章编号**]　1674 – 3806(2019)05 – 0522 – 04
doi:10.3969/j.issn.1674 – 3806.2019.05.13

Effects of artificial shrinkage before vitrification on survival rate and hatching efficiency in human blastocysts freeze-thaw

ZHOU Ting-ting, XUE Lin-tao, WANG Shi-kai, et al. Reproductive Medical and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, *China*

[**Abstract**]　**Objective**　To investigate the effects of different artificial shrinking methods before vitrified cryopreservation on survival rate and hatching efficiency in human blastocysts freeze-thaw. **Methods**　Two hundred and forty-six surplus blastocysts after vitrification or transplantation in IVF/ICSI cycles were divided into control group (with untreated blastocysts), laser drilling group (with artificial shrinking performed by a laser pulse prior to vitrification), and pipetting group (with mechanical extruding the blastocyst prior to vitrification), with 82 cases in each group. The survival rate and hatching rate were compared among the three groups. **Results**　The survival rate and the hatching rate in the laser drilling group and the pipetting group were higher than those in the control group ($P<0.05$).

For good quality blastocysts, the hatching rates in the laser drilling group and the pipetting group were higher than those in the control group($P<0.05$), but there were no significant differences in the proportions of the survival rate and the hatching rate between the laser drilling group and the pipetting group($P>0.05$). For poor quality blastocysts, the survival rate and the hatching rate of the two artificial shrinking groups were higher than those of the control group($P<0.05$), and the hatching rate of the laser drilling group was higher than that of the pipetting group($P<0.05$). **Conclusion** The outcome of blastocysts freeze-thaw can be significantly improved by artificial shrinkage, which is used to help blastocoele collapse prior to blastocyst vitrification. Laser pulse artificial shrinkage is demonstrated to be a more effective method for blastocyst vitrification.

[**Key words**] Artificial shrinkage; Blastocyst; Vitrification; Survival rate; Hatching rate

随着辅助生殖技术的不断发展,囊胚玻璃化冷冻已经在临床上得到了广泛应用。囊胚玻璃化冻融效果受到多种因素的影响,而囊胚腔液则是其中最重要的影响因素之一。囊胚腔液容易导致玻璃化冷冻过程中囊胚细胞冷冻保护剂渗透不充分,不能充分脱水,从而致使冻融过程中形成冰晶,造成细胞损伤,影响囊胚复苏后的发育能力。有研究表明玻璃化冷冻前对囊胚行人工皱缩,释放囊胚腔液,可改善冻融囊胚的复苏及临床结局[1,2],并且不同的人工皱缩方式所获得的囊胚冻融结局存在差异[3~5]。本研究收集了体外受精-胚胎移植周期病人冷冻或移植后的囊胚,探讨人工皱缩及不同皱缩方式对囊胚玻璃化冻融后复苏结局的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入了 2014-05 ~ 2015-12 在广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心接受体外受精(in vitro fertilization,IVF)或卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)治疗的病人授精后第 5/6 天的废弃囊胚共 246 枚。所有用于本研究的囊胚均在患者签署知情同意书后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将纳入本研究的囊胚按顺序半随机分为激光皱缩组、机械皱缩组及对照组,每组 82 枚。囊胚质量评级采用 Gardner 评分系统[6],将授精后第 5/6 天囊胚腔分期为 3 期以上,且内细胞团或滋养外胚层细胞评级≥B 级的囊胚定义为优质囊胚;囊胚腔分期为 3 期以上,且内细胞团和滋养外胚层细胞评级均为 C 级的囊胚定义为劣质囊胚。

1.2.2 激光皱缩与机械皱缩 激光皱缩采用 OCTAX 激光破膜仪(MTG,德国),具体操作方法:打开激光靶标,将其放置于囊胚内细胞团对侧的滋养层细胞间与透明带连接处,给予能量为 3.5 ms 的单次激光打孔,囊胚有明显收缩感即放回培养箱等待冷冻,一般囊胚完全皱缩可在激光打孔后 1 ~ 5 min 内完成。机械皱缩采用小口径吸管对囊胚进行反复机械挤压,直至囊胚腔液释放囊胚皱缩,随后行囊胚玻璃化冷冻。对照组囊胚不进行人工皱缩,直接玻璃化冷冻。

1.2.3 囊胚玻璃化冷冻及复苏 使用囊胚冷冻/复苏试剂盒(COOK,澳大利亚),所有试剂使用前均置于 37 ℃培养箱(HERAcell 150i,Thermo,美国)中预热平衡 1 h。冷冻步骤:将完全皱缩的囊胚放入 V1 液平衡 5 min 后,转入 V2 液,2 min 后转入 V3 液,在 30 ~ 60 s 内将含囊胚的 V3 液装入 HSV 封闭式载杆(Cryo Bio System,法国)并加套外管封口后投入液氮保存。复苏步骤:将含囊胚的载杆从液氮取出,迅速放入 W1 液,轻微晃动载杆使囊胚脱落后将囊胚移入新的 W1 液中充分洗涤平衡 5 min,而后将囊胚依次在 W2 液和 W3 液中分别平衡 5 min。最后将囊胚移入 37 ℃、6% CO_2 培养箱中过夜平衡的囊胚培养液(COOK,澳大利亚)微滴中继续培养。

1.3 观察指标 显微镜(OLYMPUS IX71,日本)下观察囊胚解冻后 4 ~ 6 h 的复苏情况,囊胚腔重新扩张定义为复苏成功。解冻后次日观察囊胚孵出情况。分别记录每组囊胚及不同质量等级囊胚的复苏率及孵出率。

1.4 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用χ^2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同分组囊胚玻璃化冻融后复苏结局比较

激光皱缩组的冻融囊胚复苏率、孵出率均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。机械皱缩组的冻融囊胚复苏率、孵出率均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。激光皱缩组的冻融囊胚孵出率高于机械皱缩组,差异有统计学意义($P<0.05$),复苏率亦高于机械皱缩组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1　不同分组囊胚玻璃化冻融后复苏结局比较[n(%)]

组　别	囊胚数	复苏率	孵出率
激光皱缩组	82	61(74.39)	40(48.78)
机械皱缩组	82	55(67.07)	27(32.93)*
对照组	82	37(45.12)*#	8(9.76)*#
χ^2	–	19.165	29.854
P	–	0.000	0.000

注：与激光皱缩组比较，*$P<0.05$；与机械皱缩组比较，#$P<0.05$

2.2　不同分组优质囊胚玻璃化冻融后复苏结局比较　激光皱缩组、机械皱缩组、对照组优质囊胚数分别为 17 枚、21 枚、19 枚。激光皱缩组与机械皱缩组的优质囊胚冻融后复苏率均高于对照组，但差异无统计学意义（$P>0.05$），激光皱缩组与机械皱缩组的优质囊胚冻融后孵出率均高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$），激光皱缩组的优质囊胚复苏率及孵出率均高于机械皱缩组，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 2　不同分组优质囊胚玻璃化冻融后复苏结局比较[n(%)]

组　别	优质囊胚数	复苏率	孵出率
激光皱缩组	17	15(88.24)	12(70.59)
机械皱缩组	21	18(85.71)	12(57.14)
对照组	19	13(68.42)	4(21.05)*#
χ^2	–	2.798	9.665
P	–	0.247	0.008

注：与激光皱缩组比较，*$P<0.05$；与机械皱缩组比较，#$P<0.05$

2.3　不同分组劣质囊胚玻璃化冻融后复苏结局比较　激光皱缩组、机械皱缩组、对照组劣质囊胚数分别为 65 枚、61 枚、63 枚。激光皱缩组和机械皱缩组的劣质囊胚复苏率、孵出率均高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$），激光皱缩组的劣质囊胚冻融后复苏率高于机械皱缩组，但差异无统计学意义（$P>0.05$），激光皱缩组的劣质囊胚孵出率高于机械皱缩组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 3。

表 3　不同分组劣质囊胚玻璃化冻融后复苏结局比较[n(%)]

组　别	劣质囊胚数	复苏率	孵出率
激光皱缩组	65	46(70.77)	28(43.08)
机械皱缩组	61	37(60.66)	15(24.59)*
对照组	63	24(38.10)*#	4(6.35)*#
χ^2	–	14.504	23.101
P	–	0.001	0.000

注：与激光皱缩组比较，*$P<0.05$；与机械皱缩组比较，#$P<0.05$

3　讨论

随着囊胚培养技术的发展与培养体系的成熟，其在辅助生殖临床中已得到广泛应用，而对 IVF/ICSI 治疗周期获得的囊胚进行高效冻存，也有助于提高单次取卵周期的累积妊娠率。因此如何对体外发育形成的囊胚进行高效冻存成为了保障 IVF/ICSI 治疗成功的关键。

3.1　目前囊胚冷冻保存常规采用玻璃化冷冻技术，其通过高浓度的冷冻保护剂使囊胚细胞脱水，在快速降温过程中使细胞内水分子由液相直接转变为固态玻璃相，从而避免冷冻过程中出现冰晶而造成细胞损伤。但近年来也有研究提出，由于囊胚的特殊生理结构，其存在的大量囊胚腔液，无法与冷冻保护剂进行充分置换，而其残留的部分水分子容易在冷冻过程中形成冰晶，从而导致囊胚细胞损伤，这是囊胚玻璃化冻融的主要风险[7]。本研究通过探讨人工皱缩对玻璃化冻融囊胚复苏结局的影响，发现激光皱缩组和机械皱缩组的囊胚复苏率和孵出率均高于未皱缩对照组且差异有统计学意义（$P<0.05$），这与 Levi-Setti 等[8]的研究结果一致。本研究结果说明囊胚冷冻前通过人工皱缩方式使囊胚腔液充分释放，有助于冷冻过程中冷冻保护剂与胚胎内水分子充分置换，最大程度降低胚胎内残存水分子，从而降低玻璃化冻融过程中冰晶形成的风险，有助于改善玻璃化冻融结局。

3.2　目前囊胚人工皱缩的方式主要有显微穿刺法[4]、激光皱缩法[4,9]、机械皱缩法[10]三种，其中显微穿刺法是通过显微操作方式利用显微注射针吸取囊胚腔液使其皱缩；激光皱缩法是采用激光对囊胚滋养层细胞间与透明带连接处进行脉冲打孔，使囊胚腔液外流，从而达到皱缩的目的；机械皱缩法是采用小口径吸管对囊胚进行反复机械挤压，直至囊胚腔液去除，囊胚皱缩。目前显微穿刺法由于操作繁琐且需要显微操作仪，在临床较少使用。本研究比较了激光皱缩与机械皱缩两种不同的人工皱缩方式对囊胚玻璃化冻融效果的影响。结果显示，两种不同人工皱缩方式的囊胚玻璃化冻融后复苏率差异无统计学意义（$P>0.05$），但激光皱缩组囊胚冻融后的孵出率高于机械皱缩组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。这与 Wang 等[3]的研究结果相似，这可能是由于机械皱缩需要使用小口径吸管对囊胚反复挤压，使囊胚细胞间出现物理性缺口，从而达到释放囊胚腔液的目的。但实际操作过程中，该方法存在两个缺点：一是体外操作时间的延长使囊胚在非生理性环境中

停留时间延长,有可能降低其发育潜能;二是机械皱缩组囊胚皱缩后形态变化较大,尤其是透明带机械损伤较大,会影响玻璃化冻融效果。而激光皱缩法操作简便,一般单次激光脉冲即可完成囊胚皱缩,且激光脉冲的打孔位置处于细胞连接处,对囊胚细胞的损伤程度降低,不影响冻融囊胚发育潜能。

3.3　目前判断囊胚复苏成功与否主要依据冻融后囊胚腔是否复张等形态学指标,但其并不能准确量化反映不同冷冻方式对囊胚细胞损伤的具体程度。有研究通过 TUNEL 标记法对冻融囊胚凋亡细胞比例进行量化分析,以准确评价不同冷冻方式对复苏结局的影响[11]。囊胚腔形成基于一定数量的囊胚细胞,优质囊胚由于胚胎细胞数较多,即使冻融后有损伤,细胞也可重新复张成腔,但是劣质囊胚细胞数显著少于优质囊胚,对冻融后的细胞损伤更为敏感,这也使劣质囊胚成为探讨囊胚玻璃化冻融结局更好的研究对象。因此,本研究根据冻融囊胚质量进一步分为优质囊胚组和劣质囊胚组,探讨不同皱缩方式对其复苏结局的影响,结果发现激光皱缩和机械皱缩对优质囊胚冻融后的复苏率无明显改善,而对孵出率则有显著提高;而激光皱缩和机械皱缩劣质囊胚冻融后的复苏率和孵出率均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。本研究结果也进一步说明人工皱缩能够显著改善玻璃化冻融复苏结局。

综上所述,囊胚玻璃化冷冻前进行人工皱缩能显著改善其复苏结局,而激光皱缩是一种简单安全的人工皱缩方法,具有临床推广应用价值。

参考文献

1　Baillet S, Gala A, Loup V, et al. Artificial shrinkage of fresh blastocyst: impact on succes rates in IVF/ICSI[J]. Fertil Steril, 2016, 106(3):e319.

2　Van Landuyt L, Polyzos NP, De Munck N, et al. A prospective randomized controlled trial investigating the effect of artificial shrinkage (collapse) on the implantation potential of vitrified blastocysts[J]. Hum Reprod, 2015,30(11):2509-2518.

3　Wang C, Feng G, Zhang B, et al. Effect of different artificial shrinkage methods, when applied before blastocyst vitrification, on perinatal outcomes[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2017,15(1):32.

4　Cao S, Zhao C, Zhang J, et al. Retrospective clinical analysis of two artificial shrinkage methods applied prior to blastocyst vitrification on the outcome of frozen embryo transfer[J]. J Assist Reprod Genet, 2014,31(5):577-581.

5　张军强, 武　恂, 曹善仁, 等. 两种人工皱缩预处理方法在人囊胚玻璃化冻融中的应用[J]. 江苏医药, 2013,39(10):1147-1149.

6　薛林涛, 黄　莉, 何　冰, 等. 玻璃化冷冻人活检后不同发育时期胚胎的研究[J]. 中国妇幼保健, 2013,28(36):6010-6013.

7　Song WY, Wang XG, Jin HX, et al. Comparison of vitrified outcomes between human early blastocysts and expanded blastocysts[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2016,52(5):522-529.

8　Levi-Setti PE, Menduni F, Smeraldi A, et al. Artificial shrinkage of blastocysts prior to vitrification improves pregnancy outcome: analysis of 1028 consecutive warming cycles[J]. J Assist Reprod Genet, 2016,33(4):461-466.

9　高松城, 陈　艳, 陈亚军, 等. 中低强度激光人工皱缩在扩张期囊胚玻璃化冷冻复苏中的应用研究[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(22):5696-5698.

10　Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, et al. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts[J]. Hum Reprod, 2004,19(12):2884-2888.

11　Van Landuyt L, Stoop D, Verheyen G, et al. Outcome of closed blastocyst vitrification in relation to blastocyst quality: evaluation of 759 warming cycles in a single-embryo transfer policy[J]. Hum Reprod, 2011,26(3):527-534.

[收稿日期　2018-07-09][本文编辑　余　军　吕文娟]