

· 论 著 ·

## 激光辅助孵化对冻融胚胎着床潜能的影响

吕 群, 张小建, 杨业洲, 李晓洁, 闵丽华

(四川省医学科学院/四川省人民医院辅助生殖医学中心, 成都 610072)

**摘要:**目的 探讨激光辅助孵化(AH)对冷冻胚胎移植(FET)的临床结局影响。方法 回顾性分析 2007 年 4 月至 2009 年 5 月接受 FET 的 88 个周期, 其中 57 个周期在移植前进行透明带(ZP)80  $\mu\text{m}$  激光辅助孵化(AH 组), 31 个周期未进行辅助孵化(未孵化组)。结果 AH 组妊娠率、着床率显著高于未孵化组( $P=0.007$ )。结论 冷冻移植周期中进行激光辅助孵化可促进胚胎孵出, 提高胚胎植入及妊娠率。

**关键词:**人类冷冻胚胎; 激光辅助孵化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.014

中图分类号: R321.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3185-02

## Effects of laser-assisted hatching on the ability of frozen-thawed embryo implantation

LV Qun, ZHANG Xiao-Jian, YANG Ye-zhou, et al.

(Assisted Reproductive Technology Center, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of the zona pellucida thinning by laser assisted hatching for outcome of frozen-thawed embryo transfers(FET). **Methods** Of 88 consecutive procedures from department of assisted reproductive medical center, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, 31 cycles declined to perform assisted hatching and were selected as control group, 57 patients had 80  $\mu\text{m}$  of the zona thinning. **Results** The pregnancy and implantation rates were significantly higher in 80  $\mu\text{m}$  thinning group compared to control group respectively (16.13% vs 40.35%,  $P=0.03$ ; 7.50% vs 21.54%,  $P=0.007$ ). **Conclusion** The zona pellucida thinning by laser assisted hatching may increase the pregnancy and implantation rates of frozen-thawed cleaved embryo transfer.

Key words: human freezing embryo; laser-assisted hatching

体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗过程中移植胚胎 70% 以上都不能发生着床, 既有子宫环境因素也有胚胎自身原因。透明带(ZP)作为重要的生殖屏障, 是包裹在卵母细胞外的一层蛋白质基质阻止异种精子、多精受精以及白细胞的渗入<sup>[1]</sup>, 同时维持细胞的正常排列, 避免分裂期卵裂球脱离胚胎, 确保正常发育。然而, 要完成着床, 囊胚期内细胞团必须从 ZP 中孵出, 从动物模型得知, 孵化涉及 ZP 被胚胎自身或生殖道分泌的酶类溶解。ZP 异常是阻碍 IVF 治疗中囊胚成功孵出的一个重要环节, 可能是影响辅助生殖技术成功率的一个重要因素。在胚胎质量和囊胚形成率没有显著差异的前提下, 冷冻胚胎移植(FET)的妊娠率及胚胎种植率仍然比新鲜胚胎移植低<sup>[2]</sup>。人工培养基环境本身能够促使 ZP 变硬, 同时在行冷冻、解冻过程中这种 ZP 硬化现象进一步加剧, 降低了冷冻移植周期的临床结局。本文分析了激光辅助孵化在 FET 周期中的应用价值, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 选择 2007 年 4 月至 2009 年 6 月在本院生殖中心施行 FET 的患者, 所有患者移植胚胎均为第 3 天行冷冻的分裂期胚胎, 排除解冻后无移植胚胎的患者, 共 85 例患者 88 个周期纳入分析。根据患者知情同意后的选择将其分为 80  $\mu\text{m}$  激光辅助孵化(57 个周期)为 AH 组和未孵化组(31 个周期)。

**1.2 IVF-ET 程序** 患者采用常规长方案或短方案<sup>[3]</sup>, 用促性腺激素激动剂(GnRH-a, 达必佳, 德国)降调, 重组促卵泡素(rFSH, 果纳芬, 瑞士)或人绝经期促性腺激素(HMG, 丽珠制

药)促排卵, 阴道超声监测卵泡发育, 当双侧卵巢有 2 个以上卵泡直径大于 18 mm 时, 注射绒促性素 250  $\mu\text{g}$ (HCG, 艾泽, 瑞士), 36 h 后取卵。取卵后 3~4 h 行常规 IVF 或单精子卵胞浆注射(ICSI)。16~18 h 后观察受精情况, 2 个原核为正常受精, 72 h 后行新鲜周期移植或冷冻。

**1.3 FET 方法** 采用人工周期准备内膜, 月经第 3 天予戊酸雌二醇(补佳乐 拜耳先灵)3 mg, 每天 2 次, 当内膜达 8 mm 以上, 予黄体酮 40 mg 肌注, 72 h 后移植。

**1.4 胚胎冷冻、解冻方案** 第 3 天新鲜周期移植后, 剩下的可利用胚胎行慢速程序冷冻, 冷冻及解冻操作均在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行。冷冻程序: 0.5 M 丙二醇 5 min、1.0 M 丙二醇 5 min、1.5 M 丙二醇 10 min、1.5 M 丙二醇和 0.5 M 蔗糖溶液装管。用 Planer 程度冷冻仪, 每分钟降 2  $^{\circ}\text{C}$  从 37  $^{\circ}\text{C}$  降温至 -6  $^{\circ}\text{C}$ , 常规植冰, 保持 10 min, 每分钟降 0.3  $^{\circ}\text{C}$  降温至 -35  $^{\circ}\text{C}$ , 投入液氮容器保存。解冻程序: 胚胎冷冻管在室温下 30 s, 30  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 s。将胚胎依次放入 1.0 M 丙二醇、0.2 M 蔗糖液中 10 min; 0.5 M 丙二醇、0.2 M 蔗糖 10 min; 平衡液 15 min。解冻后行激光辅助孵化, 然后转入囊胚培养液培养直至移植。解冻后胚胎卵裂球存活数:  $\geq 50\%$  为存活胚胎<sup>[4]</sup>。

**1.5 激光辅助孵化程序** 使用 RI(research instruments, 英国)激光辅助孵化系统, 用 1.48  $\mu\text{m}$  二极体激光发射汽化 ZP, 作用时间 800  $\mu\text{s}$ , 依次发射激光削薄 ZP, 使削薄区域约为 80  $\mu\text{m}$  ZP 周长, 削薄程度大于 ZP 厚度的 50%, 孵化后用含 5% 人血清蛋白(HSA)的囊胚培养液(SAGE Biopharma<sup>TM</sup>, USA)洗

涤数次,移入囊胚培养液培养 4 h 后移植。

**1.6 临床结局判定** 移植后 4 周 B 超检查有孕囊确定为临床妊娠。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS11.0 软件行非配对样本均数  $t$  检验,各组均数以  $\bar{x} \pm s$  表示,对组间百分率行  $\chi^2$  检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 两组常规数据比较**,两组常规数据无差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 两组常规指标比较

指标	未孵化组( $n=31$ )	AH 组( $n=57$ )
冷冻时女性年龄(岁)	31.13±0.77	30.32±0.57
解冻移植时女性年龄(岁)	34.81±0.90	32.51±0.67
不孕年限(年)	5.16±0.66	5.23±0.48
原发/继发数(%)	10/21(38/62)	23/34(40/60)
平均取卵数(个)	16.26±1.31	17.12±0.96
平均 MII 卵数(个)	13.12±1.54	14.07±0.97
平均受精卵数(个)	11.87±1.10	13.12±0.81
平均胚胎数(个)	10.58±1.09	10.83±0.81
平均冷冻胚胎数(个)	6.42±0.90	7.21±0.67

**2.2 两组冷冻胚胎相关指标比较** 见表 2。

表 2 两组间冷冻胚胎相关指标比较

指标	未孵化组( $n=31$ )	AH 组( $n=57$ )
解冻胚胎( $n$ )	98	161
存活胚胎( $n$ )	80(81.63)	130(80.75)
平均移植胚胎( $\bar{x} \pm s$ )	2.58±0.12	2.28±0.09
临床妊娠(%)	5(16.13)	23(40.35) <sup>a</sup>
胚胎着床(%)	6(7.50)	28(21.54) <sup>b</sup>
双胎(%)	1(20.00)	5(21.74)

<sup>a</sup>: $P=0.03$ ,与未孵化组比较;<sup>b</sup>: $P=0.007$ ,与未孵化组比较。

## 3 讨 论

本研究结果表明,在两组患者一般资料、IVF/ICSI 的一般结果差异无统计学意义的情况下(表 1),胚胎解冻存活率、平均移植胚胎数两组比较差异无统计学意义(表 2),但是 AH 组在妊娠率及胚胎着床率方面都有显著优势,这一结论证实 AH 对处于分裂期冷冻的胚胎移植的患者能有效提高临床治疗结局。

1990 年首次提出胚胎孵出失败可能是由于 ZP 厚度增加或是变硬引起的,AH 后的胚胎往往孵出时间提前。由于提前孵出,能更早地与子宫内膜接触并建立活性因子间的交流,从而更易着床。尽管在 IVF 反复失败、高龄妇女等周期中 AH 已取得一定的优势<sup>[5-6]</sup>,但是否适于常规应用,仍然值得探讨,特别是 AH 能进一步引起多胎妊娠等并发症的产生。Edi-Osagie 等<sup>[7]</sup>研究表明,AH 能提高临床妊娠率,特别是对反复 IVF 失败患者尤为明显,但是对活产率并没有显著提高。本研究结果显示,尽管 AH 组与未孵化组多胎数并无显著差异,但由于统计样本有限,仍需大样本分析。

冷冻移植周期中冷冻、解冻过程以及过长的体外培养时间

使 ZP 糖蛋白基质变性,引起 ZP 变硬,因此理论上认为 AH 能够提高 FET 的结局。但是,在发表的文献中仍然存有争议,Check 等<sup>[8]</sup>采用酸溶液对冷冻移植胚胎孵化以后,妊娠率及着床率都有显著提高,同样的结论在 Gabrielsen 等<sup>[9]</sup>和周平等<sup>[10]</sup>研究中得到证实。但是不同的结论也有报道,Edirisinghe 等<sup>[11]</sup>的研究认为部分 ZP 切开对改善 FET 周期并没有意义。尽管有研究证实不同孵化方法的治疗结局并没有差异,但是孵化的操作细节及操作的熟练程度的差异、冷冻胚胎的入选标准及冷冻胚胎发育时期和胚胎解冻培养时间都有可能造成临床结局不一致的原因<sup>[12]</sup>。

常规 AH 研究主要集中在探讨各种孵化方法对治疗结局的影响,比如最早使用的机械切割技术,以及随后的酸性液、酶等化学消化技术和目前较为普遍的激光孵化技术等,都对治疗结局起到了一定的作用。但是针对胚胎 ZP 的处理参数方面的研究较少。如 AH 过程中就采用打孔或者削薄,以及打孔的大小和削薄的尺寸目前都没有较明确的定论。本研究结果表明对 ZP 进行约 80  $\mu\text{m}$  周长、50% 厚度处理,与未孵化组比较能够取得较好效果,与孙玲等<sup>[13]</sup>报道结果趋于一致。对 ZP 处理程度的报道较少,同时存在不同的结论,Hiraoka 等<sup>[14]</sup>对解冻后培养至囊胚期的胚胎进行 50% 及 40  $\mu\text{m}$  的 ZP 打孔处理,移植后 50% ZP AH 组临床结局显著优于 40  $\mu\text{m}$  AH 组及未孵化组。对 ZP 操作的尺寸,目前研究较少,可能原因是孵化方法上存在差异,以及在试验前对胚胎的处理不同导致孵化作用对 ZP 的损伤也存在不同,导致后期胚胎的发育潜能不同。同时由于本研究纳入患者周期数较少,在单、双胎方面没有差异,这与报道存在出入<sup>[15]</sup>。

综上所述,对 ZP 处理的范围大,临床效果相对较佳,但这并不意味着将 ZP 剔除就更有利于胚胎的孵出。相关结论还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules[J]. Biol Reprod,1992,46(2):186.
- [2] Mantoudis E,Podsiadly BT,Gorgy G,et al. A comparison between quarter,partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients[J]. Hum Reprod,2001,16(10):2182.
- [3] 张中书,商学军. 促性腺激素释放激素及其类似物在生殖系统的应用[J]. 重庆医学,2009,38(5):604.
- [4] Freeman L,Trounson A,Kirby C. Cryopreservation of human embryos: process on the clinical use of the technique in human in vitro fertilization[J]. J Assist Reprod Genet,1986,3(1):53.
- [5] 罗亚宁,肖西峰,王晓红,等. 激光辅助孵化在前次 IVF-ET 失败患者中的应用[J]. 武警医学院学报,2008,17(5):420.
- [6] 黄志辉,朱元,许定飞,等. 胚胎行激光透明带辅助孵化 13 例临床妊娠报道[J]. 江西医学,2010,45(5):460.
- [7] Edi-Osagie E,Hooper L,Seif MW. The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception;a systematic review[J]. Hum Reprod,2003,18(9):1828.

作为术前检查,电子鼻咽镜检查还可以观察鼻咽部结构及黏膜的细微改变,以及鼻咽部 X 线侧位片很难显示的腺样体的形态及其与咽鼓管圆枕、后鼻孔等鼻咽部重要结构的关系。但并非所有临床症状可疑的患儿都有条件进行电子鼻咽镜检查,随着影像技术的发展,CT 扫描也能够观察咽隐窝、咽鼓管咽口及后鼻孔压迫阻塞的状况<sup>[15]</sup>,三维重建、动态 CT 电影扫描在鼻咽部检查中的运用都值得期待。在临床工作中,需要兼顾可靠和易实施两方面的要求,根据患儿具体情况选用恰当的腺样体检查方式。

#### 参考文献:

[1] 邹明舜. 儿童增殖腺——鼻咽腔比率测定的临床价值[J]. 中华放射医学杂志,1997,31(3):190.

[2] Franco RAJ, Rosenfeld RM, Rao M. First place-resident clinical science award 1999. Quality of life for children with obstructive sleep apnea[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,2000,123(1 pt 1):9.

[3] Li AM, Wong E, Kew J, et al. Use of tonsil size in the evaluation of obstructive sleep apnea[J]. Arch Dis Child, 2002,87:156.

[4] Tezer MS, Karanfil A, Aktas D. Association between adenoidal-nasopharyngeal ratio and right ventricular diastolic functions in children with adenoid hypertrophy causing upper airway obstruction[J]. Pediatr Otorhinolaryngol, 2005,69(9):1169.

[5] Tuncer U, Aydogan B, Soyulu L, et al. Chronic rhinosinusitis and adenoid hypertrophy in children[J]. Otolaryngol, 2004,25(1):5.

[6] Huang SW, Giannoni C. The risk of adenoid hypertrophy

in children with allergic rhinitis[J]. Ann Allergy Asthma Immunol,2001,87(4):350.

[7] 董金霞, 苏金柱. 鼻后滴漏综合征致儿童慢性咳嗽 36 例临床分析[J]. 重庆医学,2010,39(6):733.

[8] Mitchell RB, Kely J. Long-term changes in behavior after adenotonsillectomy for obstructive sleep apnea syndrome in children[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,2006,134(3):374.

[9] 李华斌, 许万云, 邢光前, 等. 鼻内镜下腺样体切除术对儿童慢性鼻窦炎和分泌性中耳炎转归的影响[J]. 临床耳鼻喉科杂志,2005,19(13):596.

[10] 詹力行, 张亚梅. 腺样体、扁桃体切除术对超体质量的阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患儿影响[J]. 重庆医学,2009,37(9):1020.

[11] 沈翎, 王旭萌, 陈慧萍, 等. 电子鼻咽喉镜在小儿腺样体肥大诊治中的应用[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2007,13(1):54.

[12] 惠莲, 阎艾慧, 于刚. 纤维鼻咽镜检查在评价儿童腺样体肥大中的价值[J]. 临床耳鼻喉科杂志,2006,20(4):166.

[13] Wang DY, Bemheim N, Kaufman L, et al. Assessment of adenoid size in children by fiberoptic examination[J]. Clin Otolaryngol Allied Sci,1997,22(2):172.

[14] 邵剑波, 胡道予. 126 例儿童腺样体肥大的磁共振测量分析[J]. 中国实用儿科杂志,2007,22(3):214.

[15] 陈宏. 腺样体指数在 CT 诊断儿童腺样体肥大方面的探讨[J]. 中国临床医学影像杂志,2009,20(10):770.

(收稿日期:2010-07-07 修回日期:2010-08-17)

(上接第 3186 页)

[8] Check JH, Hoover L, Nazari A, et al. The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer[J]. Fertil Steril,1996,65:254.

[9] Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, et al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study[J]. Hum Reprod, 2004,19(10):2258.

[10] 周平, 曹云霞, 章志国, 等. 激光辅助孵化联合囊胚培养提高冻胚移植的妊娠率[J]. 中国妇幼保健,2010,25(1):74.

[11] Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, et al. A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zonal thickness of embryos, and previous failed attempts[J]. J Assist Reprod Genet,1999,16(6):294.

[12] 邢琼, 周平, 章志国, 等. 辅助孵化与培养时间对冻融胚胎移植结局的影响[J]. 生殖医学杂志,2007,16(1):16.

[13] 孙玲, 陈士岭, 李劲, 等. 两种不同激光辅助孵化方法对体外受精-胚胎移植妊娠结局的影响[J]. 广东医学,2007,28(5):733.

[14] Hiraoka K, Fuchiwaki M, Hiraoka K, et al. Effect of the size of zona pellucida opening by laser assisted hatching on clinical outcome of frozen cleaved embryos that were cultured to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failures of embryo transfer: a retrospective study[J]. J Assist Reprod Genet,2008,25(4):129.

[15] 张晓慧, 曹云霞, 魏兆莲, 等. 辅助生育技术中单卵双胎及其妊娠相关因素分析[J]. 生殖医学杂志,2008,17(2):135.

(收稿日期:2010-06-08 修回日期:2010-07-22)