

冷冻复苏胚胎卵裂球损伤因素分析

武文斌

(郑州大学第三附属医院生殖中心, 郑州 450052)

摘要:目的 探讨冷冻复苏胚胎移植(FET)周期中影响胚胎卵裂球完整性的相关因素。方法 回顾性分析 98 例移植两个胚胎的 FET 周期临床资料,移植的两个胚胎其中一个复苏后所有卵裂球完整,另一个胚胎部分卵裂球完整或全部卵裂球死亡。采用多因素 1:1 配对资料条件 Logistic 回归分析胚胎胞质颗粒化、胞质空泡、胚胎碎片、卵裂球数目、卵裂球均一度对冷冻复苏胚胎卵裂球完整性的影响。结果 胞质空泡($OR=13.413$)、胚胎碎片($OR=1.101$)增加了冷冻复苏胚胎卵裂球损伤的危险性,而卵裂球数目增加($OR=0.569$)降低了冷冻复苏胚胎卵裂球损伤的可能($P<0.05$)。结论 胞质空泡、胚胎碎片及卵裂球数目是影响冷冻复苏胚胎卵裂球损伤的重要因素。

关键词:空泡;卵裂球损伤;卵裂球数目;胚胎碎片

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.018 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)05-0558-03

Analysis of the influence factors of blastomere damage of frozen thawed embryos

Wu Wenbin

(Center for Reproductive Medicine, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To observe the factors that affect cryosurvival of frozen-thawed embryos. Methods A retrospective study was conducted on 98 patients undergoing FET with two embryos of which one was complete cryosurvival and the other not. 1:1 matched samples logistic regression analysis was employed to observe the influence of cytoplasm with granulation, vacuolar cytoplasm, embryo fragments, blastomere number and equality of size on the cryosurvival of frozen-thawed embryos. Results Presence of vacuolar cytoplasm($OR=13.413$) or embryo fragments($OR=1.101$) significantly increased blasstomere damage, but the increased blastomere number($OR=0.569$) decreased it($P<0.05$). Conclusion Embryos with vacuolar cytoplasm, or embryo fragments and blastomere number are very vital factors that affect the blastomere damage after cryopreservation.

Key words: vacuole; blastomere damage; blastomere number; embryo fragment

经体外受精(in vitro fertilization, IVF)获取多个卵子和胚胎的女性通过冷冻剩余胚胎, 不仅可降低新鲜移植周期多胎妊娠率, 避免再次获卵对卵巢过度刺激, 而且提高了抱婴回家率和累积妊娠率^[1]。冷冻复苏后全部卵裂球存活是胚胎发育潜力良好的一种标志, 而卵裂球损伤可降低胚胎的种植率和妊娠率, 其原因可能是受损卵裂球对其他存活卵裂球的继续发育产生有害影响^[2]。因此, 探讨冷冻复苏过程中影响胚胎卵裂球存活的因素对提高种植率和临床妊娠率是十分必要的。本研究对实施冷冻复苏胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer, FET)的 98 例临床资料进行回顾性分析, 旨在从形态学方面探讨影响冻融胚胎存活的因素及其机制, 为进一步提高冷冻胚胎质量提供依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 11 月至 2013 年 3 月, 本院 98 例 FET 临床资料, 对移植两个胚胎的复苏周期资料进行分析, 并且要求 1 次冷冻保存的两个胚胎复苏后一个胚胎所有卵裂球完整, 另一胚胎部分卵裂球完整或全部卵裂球死亡。98 对移植胚胎冷冻前胚胎评级构成为: I 级 45 个, II 级 57 个, III 级 94 个; 复苏后: 35 个 I 级、33 个 II 级、30 个 III 级胚胎所有卵裂球完整, 10 个 I 级、24 个 II 级、64 个 III 级胚胎卵裂球存在

损伤。

1.2 胚胎评价标准及复苏后胚胎卵裂球存活标准 根据形态学参数, 本中心将卵裂期胚胎划分为 4 级, I 级: 细胞大小均等, 形状规则, 透明带完整, 胞质均匀清晰, 没有颗粒现象, 碎片 0~5%; II 级: 细胞大小略不均匀、形状略不规则, 胞质可有颗粒现象, 碎片占 6%~20%; III 级: 细胞大小明显不均, 可有明显的形状不规则, 胞质可有颗粒现象或少数空泡存在, 碎片占 21%~50%; IV 级: 细胞大小严重不均匀, 胞质可有严重脱颗粒现象, 胞质中有多个空泡, 碎片占 50% 以上。第 3 天 4~5 个细胞胚胎由于分裂速度较正常慢, 胚胎评价增加一级。选择 I、II、III 级卵裂期胚胎进行冷冻。胚胎复苏后卵裂球存活标准为卵裂球仍能保持细胞大小正常, 细胞膜清晰, 细胞质折光性正常, 没有发生细胞解体、固缩、过度膨胀等情况。解冻后的胚胎有 3 种表现: 所有卵裂球完整、部分卵裂球完整和全部卵裂球死亡, 一般认为至少有 50% 完整的卵裂球胚胎才有价值移植。

1.3 方法

1.3.1 胚胎冷冻程序 玻璃化快速冷冻法: 采用 Embryo Vitrification System-Cooling(丹麦 Origio 公司)试剂盒, 按试剂说明进行操作。先将该试剂盒室温平衡 30 min, 将冷冻胚胎移入基础液(base solution, BS)中 1 min, 然后转入平衡液(equilibrium so-

lution,ES)3~5 min,再转入玻璃化冷冻液(vitrification solution,VS)中 30~50 s,迅速小心将胚胎转移至冻贮麦管后投入液氮中,冷冻全过程在室温下进行。

1.3.2 胚胎冷冻程序 复苏时先将 Embryo Vitri System-Warming 试剂盒中的复苏液(warming-solutin,WS)1 37 ℃平衡 30 min,其他试剂室温平衡 30 min。将冻贮麦管迅速移 WS1 中 1 min,再依次移入 WS2、WS3、WS4 中各 3 min,最后将胚胎移入胚胎移植培养液中进行培养。

1.4 研究因素数量化分级 解冻后的胚胎结局:所有卵裂球完整=0,部分卵裂球完整或全部卵裂球死亡=1。可能影响冷冻复苏胚胎卵裂球损伤因素包括胞质颗粒化(X1)、空泡(X2)、胚胎碎片(X3)、卵裂球数目(X4)、卵裂球均一度(X5),对其进行数量化分级,见表 1。

表 1 研究因素量化分级	
变量	数量化分级
X1	无颗粒化=0,颗粒化=1
X2	无空泡=0,空泡=1
X3	实际百分数
X4	实际细胞数
X5	均匀=0,稍不均=1,不均=2

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以胚胎复苏后所有卵裂球是否完整为因变量,以数量化分级后的 X1、X2、X3、X4、X5 为自变量,采用多因素 1:1 配对资料条件 Logistic 回归分析可能影响卵裂球完整的因素,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

98 例冷冻复苏胚胎中,所有卵裂球完整胚胎的卵裂球数目为(7.765±1.722),胚胎碎片为(12.041%±11.142%),稍不均 15 例,不均 5 例,胞质空泡 2 例,胞质颗粒 1 例;卵裂球损伤胚胎的卵裂球数目为(7.000±1.942),碎片为(16.684%±12.942%),稍不均 17 例,不均 7 例,胞质空泡 6 例,胞质颗粒 1 例。

多因素 1:1 配对资料条件 Logistic 回归分析结果显示,胚胎胞质空泡(OR=13.413)、胚胎碎片(OR=1.101)是冷冻复苏胚胎卵裂球损伤危险因素,而卵裂球数目增加(OR=0.569)是卵裂球损伤的保护因素,差异均有统计学意义($P<0.05$);卵裂球均一度(OR=1.234)与胚胎卵裂球的完整性无关,差异无统计学意义($P=0.537$),见表 2。

表 2 多因素 1:1 配对资料条件 Logistic 回归分析结果					
变量	回归系数	标准误	OR	95%CI	P
X1	1.609	1.921	4.997	0.116~215.667	0.402
X2	2.596	1.207	13.413	1.259~142.922	0.032
X3	0.096	0.026	1.101	1.047~1.157	0.000
X4	-0.565	0.145	0.569	0.428~0.756	0.000
X5	0.210	0.341	1.234	0.633~2.406	0.537

3 讨 论

卵裂球损伤可随机发生在胚胎冷冻和复苏过程中。卵裂球损伤通常是由于细胞内冰晶形成、渗透性损伤、渗透性休克

或者大幅度温度变化造成,与胚胎固有的发育能力有关。为了明确卵裂球损伤的因素,避免混杂因素的影响,笔者选取了 98 例临床资料,采用配对资料条件 Logistic 回归进行分析。

空泡是卵子常见的异常形态之一,是卵子、胚胎发育过程中的一种动态现象。其内充满与卵周间隙内成分相同的液体。空泡可能在卵子成熟过程中,大约在第一极体形成时快速形成;也可能由内质网或高尔基体所形成的囊泡进一步融合演变而成^[3]。目前,关于卵母细胞及胚胎胞质空泡对胚胎发育的影响尚存争议。Serhal 等^[4]研究发现,空泡存在降低了胚胎的种植潜能;Ebner 等^[5]认为空泡对受精和囊胚形成有显著的不利影响;Ten 等^[6]也认为空泡可以降低优质胚胎形成的比例。但也有学者研究认为,卵裂期自发空泡的形成可能并不降低早期胚胎的质量及发育潜能,而且这些胚胎可以正常着床及足月活产^[7]。本研究表明,胚胎内空泡明显增加了胚胎在冷冻复苏过程中损伤的风险。Balaban 等^[8]以卵母细胞胞质空泡发育而来的卵裂期胚胎为研究对象,研究空泡对胚胎冷冻保存的影响,得出与本研究一致的结论。由于空泡存在阻止了冷冻保护剂在细胞内的扩散可能是其增加卵裂球损伤风险的原因,当然,也可能与该胚胎本身存在非整倍染色体异常有关^[8]。

胚胎碎片是哺乳动物早期胚胎发育过程中的常见现象,是从受精卵或是早期胚胎中排出的由细胞膜包裹的、没有细胞核的胞浆结构。在胚胎的分裂过程中,有的碎片可以通过消融或者卵裂球的重吸收等机制而消失,并且碎片的位置、分布等可随卵裂球的运动而发生改变^[9]。细胞碎片产生的确切机制尚不明确,可能与细胞凋亡有关^[10-11]。此外,临床及实验研究还表明,胚胎碎片的产生不但与母体因素、卵子及精子质量有关,而且与实验室的培养环境及操作有关^[12]。本研究结果表明,随着胚胎碎片的增加,卵裂球损伤风险也增加。其可能的机制为胚胎碎片阻止了冷冻保护剂的渗透,或者碎片本身就是胚胎卵裂球内部结构异常的外部表现,从而使胚胎不能耐受常规的胚胎冷冻程序,这与文献的研究结果一致^[13]。

在卵裂球数目对冷冻复苏胚胎的影响方面,王利红等^[13]研究结果表明,卵裂球数目对卵裂球存活状态没有明显影响。而本研究显示,随着冷冻胚胎卵裂球数目的增加,卵裂球损伤危险性降低。作者分析其可能的原因为两者在冷冻胚胎时采用了不同的冷冻方法所致。前者采用了程序化冷冻,而本研究进行玻璃化冷冻时,卵裂球数目多的胚胎单位体积表面积小,冷冻保护剂平衡快,而卵裂球数目少的胚胎平衡相对慢,短时间内冷冻保护剂平衡相对不充分,致使出现随着冷冻胚胎卵裂球数目的减少,卵裂球损伤危险性增加。另外,由于前者只考虑了卵裂球数目与碎片两个因素,可能会有别的混杂因素引入偏倚。

胞质颗粒化是指细胞胞质较粗,呈现颗粒化状态。胞质颗粒化被认为与线粒体的分布有关。但由于本文研究对象中只有 2 例胚胎呈现颗粒化,没有充足的样本进行分析对比,限止了对胞质颗粒化在卵裂球复苏损伤中作用的认识。

卵裂球不均一是指卵裂球大小相差 1/3,一般由胚胎的不均衡分裂所致。不均衡分裂可能扰乱蛋白质、线粒体、mRNA 两极化分配。在冷冻复苏过程中,可能由于大小不均的卵裂球并不影响冷冻保护剂的渗透与扩散,因此在本实验中并没有观察到其增加卵裂球损伤的风险。

综上所述,胚胎碎片、胞质空泡和胚胎卵裂球数目的减少明显增加了胚胎冷冻复苏过程中损伤的风险,而卵裂球大小不均对其影响不明显。因此笔者选择第 3 天同级别胚胎进行冷冻保存时,应优先选择没有碎片和空泡、卵裂球数目较多的胚胎进行冷冻保存。

参考文献:

- [1] Ashrafi M, Jahangiri N, Hassani F, et al. The factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer cycle[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2011, 50(2): 159-164.
- [2] Nagy ZP, Taylor T, Elliott T, et al. Removal of lysed blastomeres from frozen-thawed embryos improves implantation and pregnancy rates in frozen embryo transfer cycles[J]. Fertil Steril, 2005, 84(6): 1606-1612.
- [3] 黄国宁. 体外受精-胚胎移植实验室技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 418.
- [4] Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, et al. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 1997, 12(6): 1267-1270.
- [5] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development[J]. Fertil Steril, 2005, 83(6): 1635-1640.
- [6] Ten J, Mendiola J, Vioque J, et al. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 14(1): 40-48.
- [7] 史中娜, 关如意, 任新玲, 等. 辅助生殖技术中卵母细胞及

卵裂期胞质空泡对胚胎生长发育的影响[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(29): 4587-4589.

- [8] Balaban B, Ata B, Isiklar A, et al. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos[J]. Hum Reprod, 2008, 23(8): 1778-1785.
- [9] Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos[J]. Hum Reprod, 2001, 16(4): 719-729.
- [10] Jurisicova A, Antenos M, Varmuza S, et al. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation[J]. Mol Hum Reprod, 2003, 9(3): 133-141.
- [11] Bencomo E, Perez R, Arteaga MF, et al. Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate[J]. Fertil Steril, 2006, 85(2): 474-480.
- [12] 康亚男, 刘冬娥. 辅助生殖技术中胚胎碎片形成原因及其处理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(1): 73-75.
- [13] 王利红, 连方. 卵裂球数量及胚胎碎片对人冻胚卵裂球存活状况的影响[J]. 现代妇产科进展, 2009, 21(11): 816-818.

(收稿日期: 2013-09-09 修回日期: 2013-11-17)

(上接第 557 页)

管粗细调整, 开孔过大不利于肠管与腹壁粘连闭合腔隙, 甚至有出现造口旁疝发生的可能; 也不能过小, 否则可能造成肠管受压, 甚至缺血坏死。(3)造口肠管末端脂肪组织要剔除干净, 必须保证全部是肠管与腹壁钉合, 但同时又须保护肠系膜内血管保证血供。(4)腹壁皮肤作荷包缝合收拢缝线后必须全部被吻合器管状末端覆盖至少 3 mm, 否则可能钉合不理想; 但也不能覆盖过多, 否则术后可能因张力过大导致皮肤与造口肠管肠黏膜分离。钉合后应仔细检查, 若有钉合不完全或出血情况用小三角针细线缝合即可。

综上所述, 管形吻合器乙状结肠单腔造口应用于 LAPR 疗效较好、简便实用, 可进一步减少患者创伤, 加快患者术后恢复, 是一种值得推广的临床新技术。

参考文献:

- [1] Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB 3rd, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer[J]. J Natl Compr Canc Natw, 2009, 7(8): 778-831.
- [2] Guillou PJ, Quirke P, Thorpe H, et al. Short-term end-points of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASICC

trial); multicentre, randomised controlled trial[J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1718-1726.

- [3] Veldkamp R, Kuhry E, Hop WC, et al. Colon cancer laparoscopic or open resection study group (COLOR). Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(7): 477-484.
- [4] 郑民华. 腹腔镜结直肠癌手术的现状与展望[J]. 中国实用外科杂志, 2011, 31(9): 841-843.
- [5] 丁卫星, 邓建中, 程龙庆. 管型吻合器在肠造口术的应用[J]. 大肠肛门病外科杂志, 2003, 9(1): 18-20.
- [6] 郭春华, 刘莉. 腹腔镜下直肠癌 Miles 术造口方式对比分析[J]. 中国医药科学, 2012, 2(4): 76-77.
- [7] 戴晓冬, 李华珠, 杨宁刚. 51 例 Miles 术后造口并发症的原因分析与护理[J]. 中华护理杂志, 2010, 45(9): 799-800.
- [8] 吴仙蓉, 钟玉莲. 直肠癌 Miles 术后结肠造口早期并发症的原因分析及处理对策[J]. 岭南现代临床外科, 2012, 12(5): 307-309.

(收稿日期: 2013-09-14 修回日期: 2013-10-22)