[8] Blanchard C, Durual S, Estienne M, *et al*. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis[J]. J Immunol, 2004, 172(6): 3775 - 3783.
[9] Furuta G T, Turner J R, Taylor C T, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia[J]. J Exp Med, 2001, 193(9): 1027 - 1034.
[10] Loncar M B, Al-azzeh E, Sommer P S, *et al*. Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide[J]. Gut, 2003, 52(9): 1297 - 1303.
[11] Miki K, Unno N, Nagata T, *et al*. Butyrate suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic conditions[J]. Shock, 2004, 22(5): 446 - 452.
[12] Seib T, Dooley S, Welter C. Characterization of the genomic structure and the promoter region of the human intestinal trefoil factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214(1): 195 - 199.
[13] Seib T, Blin N, Hilgert K, *et al*. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22. 3[J]. Genomics, 1997, 40(1): 200 - 202.
[14] Sanjabi S, Williams K J, Saccani S, *et al*. A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation[J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2138 - 2151.
[15] Wang J, Wang X, Hussain S, *et al*. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 6777 - 6788.

(**收稿**:2009-12-31;**修回**:2010-02-04)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2010)10-1027-01

个案与短篇

冷冻胚胎复苏后体外培养时间对妊娠的影响

马 博[1],许丽萍[2],张 红[1] (518029 广东 深圳,广东公安边防总队医院生殖科[1];253000 山东 德州,山东省德州市德城区妇幼保健院妇产科[2])

[关键词] 冷冻胚胎;冷冻胚胎复苏移植;优质胚胎;妊娠
[中图法分类号] R711.6;R321.1 **[文献标志码]** B

胚胎冷冻保存增加了体外受精-胚胎移植的成功率,降低了多胎妊娠的可能,也使得有剩余胚胎的患者在助孕失败后减少了反复控制性超促排卵产生的痛苦及经济压力,并为临床医生在面对有可能发生卵巢过度刺激综合征的患者时提供了一种有效解决办法,还为接受放疗或化疗的患者保留了生育后代的可能[1-3]。现在如何提高冷冻胚胎复苏移植的妊娠率,又成为一个生殖领域工作者必须面对的问题,现就我科对冷冻胚胎移植前 18 h 复苏与冷冻胚胎移植前 2 h 复苏对妊娠结局的影响报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对本科 2009 年 3 月至 2010 年 2 月行冷冻胚胎复苏移植的 219 个周期进行回顾分析,患者年龄 24 ~ 38(31.2 ± 5.8)岁,不孕 2 ~ 15(4.3 ± 3.6)年。根据复苏时间不同分为提前 18、2 h 复苏组,再将每个组细分为非优胚(复苏后所有存活胚胎均为非优质胚胎)和优胚(复苏后存活胚胎至少有 1 枚为优质胚胎[1])两个亚组。提前 18 h 复苏 103 个周期,其中优胚组 71 个周期,非优胚组 32 个周期;提前 2 h 复苏 116 个周期,其中优胚组 75 个周期,非优胚组 41 个周期。

1.2 胚胎冷冻及解冻

取卵后第 3 天在移植后剩余胚胎中选择细胞数≥4,碎片率≤20% 的胚胎行玻璃化冷冻,并在复苏时行快速解冻法。

1.2.1 冷冻方法 保护剂为乙二醇、二甲基亚砜和蔗糖。在 37 ℃ 的热台上将胚胎移至含 5% SPS 的 HEPES-HTF(SAGE,美国)溶液中平衡 5 min,然后将胚胎移至含 7.5% 二甲基亚砜、7.5% 乙二醇和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 2 min,后将胚胎转移至含 15% 二甲基亚砜、15% 乙二醇、0.65 mol/L 蔗糖和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中反复洗涤并在 30 s 内将胚胎装入载体中,直接放入液氮,最后将胚胎移入储存罐中保存。

1.2.2 解冻方法 将胚胎载体从液氮中取出后直接浸入置于 37 ℃ 的热台上含有 0.35 mol/L 蔗糖和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 2 min,然后转入含 0.2 mol/L 蔗糖和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 3 min,后将胚胎转移至仅含 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 5 min,最后将胚胎移入卵裂液(SAGE,美国)中并放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。

1.3 子宫内膜准备

1.3.1 自然周期法 用于月经周期规律,排卵正常的患者,即于月经第 12 天开始用阴道 B 超和尿黄体生成素(luteinizing hormone,LH)试纸监测卵泡发育及排卵,于排卵当天开始每日肌肉注射黄体酮针剂(浙江仙居)20 ~ 60 mg。在排卵后第 3 天解冻胚胎,选择 2 ~ 3 枚优质胚胎移植。

1.3.2 激素替代法 用于排卵异常的患者,即于月经第 3 天起以递增法口服戊酸雌二醇片(先灵广州),B 超监测子宫内膜,子宫内膜厚度达 9 ~ 12 mm 时,开始每日肌肉注射黄体酮 20 ~ 60 mg。注射黄体酮第 3 天解冻胚胎,选择 2 ~ 3 枚优质胚胎移植。胚胎移植均在 B 超引导下进行。

1.4 观察指标

胚胎移植后 14 d 测晨尿 HCG,阳性为生化妊娠,移植后 35 d B 超见孕囊为临床妊娠。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

(下转 1037 页)

[通信作者] 马 博,电话:(0755)82267770,E-mail:mb235000@yahoo.com

ior during vertebrate development[J]. Trends Genet, 1997, 13(4): 157 - 162.
[4] 刘晓红, 周航波, 马恒辉, 等. 肝细胞肝癌中 Wnt5a、β-catenin 和 E-cadherin 蛋白的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(4): 400 - 403.
[5] Iozzo R V, Eichstetter I, Danielson K G. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy[J]. Cancer Res, 1995, 55(16): 3495 - 3499.
[6] Huang C L, Liu D, Nakano J, *et al*. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(34): 8765 - 8773.
[7] Kremenevskaja N, von-Wasielewski R, Rao A S, *et al*. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma [J]. Oncogene, 2005, 24(13): 2144 - 2154.
[8] Roman-Gomez J, Cordeu L, Agirre X, *et al*. Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2007, 109(8): 3462 - 3469.
[9] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Cordeu L, *et al*. Wnt5a, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(18): 2736 - 2746.
[10] 袁媛, 李招权, 司维柯, 等. Wnt5a 与髓细胞白血病发生关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2056 - 2059.
[11] Thiago L S, Costa E S, Lopes D V, *et al*. The Wnt signaling pathway regulates Nalm-16 b-cell precursor acute lymphoblastic leukemic cell line survival and etoposide resistance[J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(1): 63 - 72.
[12] 上海市中美联合白血病协作组. 上海市成人急性白血病 572 例世界卫生组织分型的临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(7): 444 - 448.
[13] Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, *et al*. Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol[J]. Int J Hematol, 2008, 87(2): 144 - 151.
[14] 曾智杰, 欧阳文婷, 孙艳虹, 等. 胸苷激酶 1 在白血病患者化疗过程中的临床意义探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(1): 28 - 30.
[15] Jiang Y, Dunbar A, Gondek L P, *et al*. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML[J]. Blood, 2009, 113(6): 1315 - 1325.
[16] Rodrigues P C, Oliveira S N, Viana M B, *et al*. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer. 2007, 49(2): 133 - 138.

(**收稿**:2009-12-24;**修回**:2010-03-18)
(编辑 汪勤俭)

(上接 1027 页)

2 结果

219 个周期共复苏胚胎 539 枚胚胎,存活 448 枚,胚胎复苏存活率为 83.1%,胚胎移植 219 个周期,移植胚胎(2.42 ± 0.31)枚,移植胚胎 448 枚,种植 113 枚,种植率 25.2%(113/448),移植后妊娠 94 例,妊娠率为 42.9%(94/219)。提前 18 h 复苏组种植率为 24.5%(52/212),临床妊娠率为 40.8%(42/103)。提前 2 h 复苏组种植率为 25.8%(61/236),临床妊娠率为 44.8%(52/116),两组间有差异,但无统计学意义($P>0.05$)。提前 18 h 复苏优胚组与提前 2 h 复苏优胚组在种植率(26.5% *vs* 30.6%)、患者年龄[(30.1 ± 3.7)岁 *vs*(30.7 ± 2.9)岁]、移植日子宫内膜厚度[(10.1 ± 1.1)mm *vs*(9.8 ± 1.9)mm]方面的差异不显著($P>0.05$),两组妊娠率的差异(43.7% *vs* 56.0%)显著($P<0.05$)。

提前 18 h 复苏非优胚组与提前 2 h 复苏非优胚组在种植率(21.3% *vs* 18.0%)、患者年龄[(31.2 ± 4.6)岁 *vs*(31.0 ± 3.9)岁]、移植日子宫内膜厚度[(9.9 ± 1.2)mm *vs*(9.8 ± 1.7)mm]方面的差异不显著($P>0.05$),两组妊娠率的差异(34.4% *vs* 24.4%)显著($P<0.05$)。

3 讨论

冷冻胚胎复苏移植是辅助生殖技术中较成熟的一项技术,可以充分利用新鲜移植后剩余的大量胚胎,提高了体外受精-胚胎移植的累积妊娠率,且不需要反复促排卵,减轻了患者的痛苦并节约了大量的资金。很多研究表明,患者年龄、胚胎冷冻前状况及复苏存活率是影响冷冻胚胎复苏移植结局的主要因素[4-6],也有学者认为延长复苏后体外培养时间,观察胚胎是否继续分裂并进行移植胚胎选择,可有助于进一步提高冷冻胚胎移植后妊娠率[7],但是在实际操作中这并不是十分适用。在本次研究中通过数据对比,可以看到将冷冻胚胎移植前 18 h 复苏与移植前 2 h 复苏所产生的种植率及临床妊娠率的差别并无统计学意义。而根据胚胎冷冻时的分裂状态,设定不同的移植前体外培养时间,所获得的种植率与临床妊娠率的差异有统计学意义。因此可以考虑移植时胚胎与子宫内膜的同步性应该是影响冷冻胚胎复苏移植妊娠率的另一主要因素[1]。因此建议当胚胎冷冻时卵裂球≥6,胚胎复苏应在移植前约 2 h 进行;若胚胎冷冻时卵裂球 <6,胚胎复苏应在移植前约 18 h 进行,使其有时间分裂至 6 ~ 8 细胞,达到胚胎第 3 天正常分裂状态,有利于胚胎与子宫内膜的一致,从而提高妊娠率。

参考文献:

[1] 李媛. 人类辅助生殖实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2008: 139 - 140.
[2] 马学工,党小红,纪冰. 胚胎冷冻复苏移植技术的临床应用[J]. 青海医药杂志, 2008, 38(1): 41 - 42.
[3] 苗本郁,周灿权,方丛,等. 自然周期冷冻胚胎解冻移植临床分析[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2005, 26(5): 573 - 577.
[4] 李路,孙晓溪,陈军玲,等. 影响冷冻胚胎移植妊娠率相关因素分析[J]. 生殖与避孕, 2004, 24(4): 218 - 221.
[5] 余兰,王树玉,贾婵维,等. 冷冻胚胎解冻复苏的影响因素[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(8): 90 - 91.
[6] 何畏,俞炽阳,王凤英,等. 适当的降调节在体外受精-胚胎移植长方案治疗中的价值[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2081 - 2083.
[7] 李志强,李艳,田之莹,等. 胚胎复苏后体外孵育时间对妊娠结局的影响[J]. 中国医疗前沿,2008, 3(2): 29 - 30.

(**收稿**:2010-04-12;**修回**:2010-04-20)
(编辑 栾 嘉)