治疗疗效的影响，使得对肝肾囊肿硬化治疗的总有效率及治愈率都有明显提高。同时，在安全性等方面也有明显提高，并发症，尤其是严重并发症大大减少或避免发生。因此，减量空气暂时置换法在肝肾囊肿硬化治疗中值得借鉴和推广。

参考文献：

[1] 冯威健. CT介导的微创诊疗技术在肿瘤临床的应用[J]. 中国现代医生，2007，45(7)：1－3.

[2] 张人姝，王连庆，刘连祥，等. CT导引下经皮穿刺活检的意义及体会——附124例报告[J]. 介入放射学杂志，1994，3(4)：204－206.

[3] 钟涛，于红光，王勇，等. CT引导下经皮肺穿刺检术后气胸发生率的相关因素分析[J]. 中华放射学杂志，2007，41(11)：1232－1236.

[4] 张雪哲，曾林祥，彭如臣，等. CT导引下肝囊肿硬化剂治疗[J]. 中华放射学杂志，1995，29(5)：316－318.

[5] 吴正宇，王兴华，卢亮. 改良后CT引导下肝、肾囊肿的硬化剂治疗[J]. 实用医学影像杂志，2008，9(6)：398－399，402.

[6] 许守利，马永华，张世忠，等. CT导引下肾囊肿硬化剂治疗[J]. 当代医学，2009，15(23)：457－458.

[7] 杨继团，胡旭萍，张定义，等. CT导引下肝肾囊肿介入治疗的效果观察[J]. 宁夏医学杂志，2007，29(12)：1113.

[8] 曹林德. CT引导下肾囊肿硬化治疗操作探讨[J]. 实用放射学杂志，2008，24(11)：1573－1574.

[9] Vieillard M H, Boutry N, Chastanet P, et al. Contribution of percutaneous biopsy to the definite diagnosis in patients with suspected bone tumor[J]. Joint Bone Spine, 2005, 72(1): 53－60.

（收稿：2010-04-13 修回：2010-07-05）

（编辑 邓强庭）

经验交流

文章编号：1000-5404(2010)16-1804-02

玻璃化冷冻技术在人卵裂期胚胎冷冻保存中的应用结局分析

蒋晓明，沙爱国，周友泉，李 萍，那旭红，纪 红，邓 星 （361003 福建 厦门，解放军第174医院生殖医学中心）

【关键词】 人卵裂期胚胎；玻璃化冷冻

【中图法分类号】 R321-33；R321.1 【文献标志码】 B

低温冷冻保存技术是人类辅助生殖技术的重要组成部分，胚胎冷冻技术的应用大大提高了临床治疗的效果、丰富了临床治疗方案[1,2]。目前主要应用的是胚胎冷冻技术，包括程序冷冻和玻璃化冷冻。程序冷冻技术已相对成熟和稳定并已得到广泛应用，而玻璃化冷冻技术作为一项新技术备受关注。我们对本中心开展的人卵裂期胚胎玻璃化冻融-胚胎移植后的治疗结局进行了回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

选择2008年12月至2009年10月在本中心接受胚胎玻璃化冻融-胚胎移植的全部199个周期作为实验组，2008年1月至2008年12月接受胚胎程序冻融-胚胎移植的全部215个周期及2008年1月至2009年10月实施的全部974个体外受精/单精子卵胞浆内注射-胚胎移植（*in-vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer，IVF/ICSI-ET）周期作为对照组。所有冷冻、移植胚胎为第3天卵裂期胚胎。

1.2 胚胎玻璃化冷冻保存及复苏[3]

1.2.1 冷冻保存液的配制 冷冻平衡液：羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）缓冲的合成人输卵管液（m-HTF）中添加7.5%乙二醇（EG）+7.5%二甲基亚酚（DMSO）+20%血清蛋白替代物（SPS）；冷冻液：m-HTF中添加15% EG + 15% DMSO + 20% SPS + 0.5 mol/L蔗糖。

1.2.2 复苏液的配制 复苏液Ⅰ：m-HTF中添加20% SPS；复苏液Ⅱ：m-HTF中添加20% SPS + 1 mol/L蔗糖；复苏液Ⅲ：m-HTF中添加20% SPS + 0.25 mol/L蔗糖；复苏液Ⅳ：m-HTF中添加20% SPS + 0.125 mol/L蔗糖。

1.2.3 玻璃化冷冻 室温下，胚胎在平衡液中停留4 min后移入冷冻液，20 s内装载并直接投入液氮保存。胚胎冷冻载体使用自制的塑料麦管片。

1.2.4 胚胎复苏 37 ℃下，直接将冷冻胚胎的麦管片插入复苏液Ⅱ，让胚胎滑落到培养液中，停留5 min。室温下，将胚胎依次移入复苏液Ⅲ、复苏液Ⅳ，并分别停留23、12 min；37 ℃下，用复苏液Ⅰ洗涤数次后移入胚胎培养液待移植。

1.2.5 胚胎冻融后存活标准 复苏后存活的卵裂球数目超过冷冻前卵裂球数目的50%判定为胚胎存活。

1.3 内膜准备及黄体支持

1.3.1 内膜准备 平素月经周期规则，自然周期卵泡发育正常者，月经来潮第9天左右开始进行B超下排卵监测，优势卵泡发育至直径11～13 mm开始配合尿LH检测，尿LH试纸出现双线时抽血查LH值。多数患者在出现LH峰后第2天排卵，排卵后第3天移植；不排卵者选择LH峰后第4天移植。平素月经周期不规则，自然周期卵泡发育不良者，月经来潮第1天开始口服戊酸雌二醇片（4 mg/d起始，如内膜薄，可增量至8 mg/d），第9天左右开始进行B超监测内膜厚度，内膜发育至7 mm（少数患者6 mm）以上开始肌注黄体酮，第5天移植。

1.3.2 黄体支持 选择自然周期内膜，于排卵后每天肌注黄体酮40 mg。激素替代周期者，在内膜达到标准当天肌注黄体酮60 mg，以后每天肌注黄体酮100 mg。

1.4 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件对独立样本率的比较行 χ^2 检验，对计量资料行两样本 t 检验。

2 结果

2.1 玻璃化冻融与程序冻融胚胎移植助孕结局比较

与传统程序冻融比较，经玻璃化冻融的胚胎复苏后存活率显著增高（$P<0.01$），移植取消率显著降低（$P<0.05$）；在平均

ET 数没有明显差异的情况下($P>0.05$),玻璃化冻融-胚胎移植的移植周期妊娠率($P<0.05$)、胚胎种植率($P<0.01$)都显著高于程序冻融。见表 1。

表 1 玻璃化冻融胚胎移植与程序冻融胚胎移植助孕结局的比较

组别	复苏存活率(%)	移植取消率(%)	平均移植数(个)	妊娠率(%)	种植率(%)
程序冻融对照组	76.07 (499/656)	7.44 (16/215)	2.11 (419/199)	27.14 (54/199)	15.27 (64/419)
玻璃化冻融实验组	90.93 (471/518) b	2.51 (5/199) a	2.21 (428/194)	39.69 (77/194) a	23.6 (101/428) b

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与程序冻融组比较

2.2 玻璃化冻融与 IVF/ICSI 新鲜周期胚胎移植结局比较

玻璃化冻融-胚胎移植后移植周期妊娠率达到了与新鲜周期移植相似的水平,种植率也接近新鲜周期移植的水平($P>0.05$)。见表 2。

表 2 玻璃化冻融胚胎移植结局与 IVF/ICSI 新鲜周期胚胎移植结局的比较

组别	平均 ET 数(个)	妊娠率(%)	种植率(%)
玻璃化冻融实验组	2.21(428/194)	39.69(77/194)	23.60(101/428)
新鲜周期对照组	2.03(1 976/974)	39.53(385/974)	26.42(522/1 976)

3 讨论

低温保存技术为患者每个促排卵周期提供了更多的胚胎移植机会,减少了患者对外源性激素的使用,增加了患者每个促排卵周期的累积妊娠率[1,2]。其中玻璃化冷冻技术作为一项新技术,因其无需价格昂贵的精密控温仪器、操作简便、冻融存活率高等特点而受到关注[4,5]。

传统的程序冷冻需要昂贵的精密温度控制仪器用超过 1 h 的时间实现缓慢降温。玻璃化冷冻只需将带有微量冷冻保护剂的胚胎直接投入液氮即可,一次冷冻仅需几分钟,不仅操作简单而且缩短了胚胎离开培养箱到实现低温保存的间隔时间。同时由于玻璃化冷冻完全手工操作、时间短、操作简单的特点,避免了使用仪器可能出现的因仪器故障带来的严重后果。超快速的降温速率和高浓度的冷冻保护剂是实现玻璃化冷冻的 2 个关键条件。在使用了特殊的载体后,胚胎能不到 1 s 就从 37 ℃ 进入 -196 ℃环境,降温速率 > 10 000 ℃/min。在高浓度冷冻保护剂作用下,由于降温速率极快,细胞内外溶液中的水分子还来不及结晶就快速固化,形成无结构的玻璃态,从而避免了细胞内外产生冰晶造成对细胞的物理损伤。同时,由于在玻璃态下质点不规则排列,能始终保持溶液的水分子以及其他各种离子的分布,使跨膜物质的浓度相差不大,从而避免了对细胞的化学性损伤[6]。因此,采取玻璃化冷冻保存理论上能获得更高的复苏存活率。但文献报道的玻璃化冷冻在人类辅助生殖技术中主要是用于囊胚的冷冻保存[7-9];卵裂期胚胎的玻璃化冷冻保存仅有少量报道[10]。本研究采用庄广伦[3]介绍的早期卵裂胚胎玻璃化冷冻方法,对第 3 天卵裂期胚胎实施玻璃化冷冻保存,胚胎复苏存活率达到 90.93%,较本中心既往开展的常规程序化降温冷冻保存技术而言,胚胎复苏后存活率显著提高。由于复苏存活率的大幅度提高,使得因胚胎冻融后死亡引起的胚胎移植取消也得到了显著减少。经过程序冷冻的胚胎在复苏后,会造成细胞明显的损伤,新陈代谢遭到破坏,使得细胞的活力下降,胚胎发育潜能降低;而经过玻璃化冷冻的胚胎细胞对丙酮酸的摄取能力显著高于程序冷冻复苏后的胚胎,说明其新陈代谢能力受损较小,胚胎发育潜能得到了较好的保护。从我们临床结局可以看出,在平均移植胚胎数没有显著差异的情况下,采取了玻璃化冷冻保存的胚胎,在冻融移植后能获得较常规程序冷冻显著提高的妊娠率和胚胎种植率,达到了与新鲜胚胎移植周期相似的妊娠率和胚胎种植率水平,再次说明了玻璃化冷冻能减小对胚胎造成的损伤,更好的保护胚胎发育的潜能。

第 3 天卵裂期胚胎的玻璃化冷冻较常规程序冷冻而言,对细胞造成的损伤小,复苏存活率、移植后的妊娠率、胚胎种植率都得到显著提高,可以作为首选的胚胎冷冻保存技术应用于辅助生殖临床治疗。但是,由于玻璃化冷冻技术是一项新技术,使用高浓度的冷冻保护剂以及开放式的保存环境等技术环节是否会带来安全隐患,还需要进一步对助孕结局进行随访观察。

参考文献:

[1] Veeck L L. Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw?[J]. Reprod Biomed Online, 2003, 6(3):367-374.
[2] Anderson A R, Wilkinson S S, Price S, *et al*. Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(3):402-405.
[3] 庄广伦. 现代辅助生育技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:262.
[4] Rama-Raju G A, Haranath G B, Krishna K M, *et al*. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 11(4):434-437.
[5] Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, *et al*. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 14(2):208-213.
[6] Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems[J]. Theriogenology, 2006, 65(1):236-244.
[7] Lane M, Schoolcraft W B, Gardner D K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique[J]. Fertil Steril, 1999, 72(6):1073-1078.
[8] 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.
[9] Takahashi K, Mukaida T, Goto T, *et al*. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study[J]. Fertil Steril, 2005, 84(1):88-92.
[10] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method[J]. Theriogenology, 2007, 67(1):73-80.

(收稿:2010-03-02;修回:2010-04-19)
(编辑 王小宴)