

玻璃化对复苏囊胚移植单胎分娩结局的影响

刘寒艳, 陈仕萍, 杜红姿, 李莉, 陈蕊

(广州医科大学附属第三医院生殖医学中心//广东省生殖医学重点实验室//广东省产科重大疾病重点实验室//广东省普通高校生殖与遗传重点实验室, 广东广州 510150)

摘要:【目的】比较卵裂期胚胎复苏后囊胚培养移植与复苏囊胚移植的单胎分娩结局,探讨最佳冻存方案。【方法】回顾性分析2014年1月至2016年10月在本中心行复苏周期移植(FET)并单胎分娩的患者,囊胚复苏组1037个周期,卵裂胚复苏囊胚培养组690个周期。分析两组的新生儿分娩结局,其中包括平均孕周,平均体质量,男婴出生率,早产率,极早产率,低体质量率,极低体质量率,先天异常率。【结果】平均胎龄,新生儿平均体质量,活产、健康抱婴以及死胎的比例两组没有统计学差异($P>0.05$)。出生性别比差异没有统计学意义;早产率,极早产率,低出生体质量率,极低出生体质量率以及先天异常率两组没有统计学差异($P>0.05$);校正后,出生男婴率(AOR 1.07, 95% CI 0.86~1.34),早产率(AOR 0.7, 95% CI 0.49~1.01),极早产率(AOR 1.47, 95% CI 0.55~3.96),低出生体质量率(AOR 1.38, 95% CI 0.86~2.22),极低出生体质量率(AOR 0.76, 95% CI 0.20~2.83)以及先天异常率(AOR 1.58, 95% CI 0.66~3.76)两组仍然没有统计学差异($P>0.05$)。【结论】新鲜囊胚冷冻后择期复苏移植能获得较好的新生儿结局,是目前较佳的囊胚培养和移植方案。

关键词: 玻璃化冷冻;卵裂期胚胎;囊胚培养;囊胚移植;单胎分娩结局

中图分类号:R321-33 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)02-0238-07

Influence of the Single Live Birth Outcome Following Transfer of Vitrified Blastocyst and Blastocyst Cultured from Thawing Cleavage Embryo

LIU Han-yan, CHEN Shi-ping, DU Hong-zi, LI Li, CHEN Rui

(Center for Reproductive Medicine, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University//Key Laboratory for Reproductive Medicine of Guangdong Province//Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province// Key Laboratory of Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510150, China)

Corresponding to: DU Hong-zi, Email: dhz_gz@hotmail.com

Abstract: 【Objective】To compare the single live birth outcomes of blastocyst transfer between vitrified blastocyst and blastocyst cultured from thawing cleavage embryo, so as to choose the best scheme of blastocyst transfer. 【Methods】Retrospective analysis of the single live birth clinical data of 1037 vitrified blastocyst compared with 690 blastocyst cultured from thawing cleavage embryo undergoing frozen embryo transplantation (FET) from January 2014 to October 2016 was performed. Main outcome were including gestational age, neonatal weight, proportion of male neonate, preterm birth rate, very preterm birth rate, low birthweight rate, very low birthweight rate, congenital anomalies rate. 【Results】There were no differences between the two groups for gestational age, neonatal weight, proportion of Live birth, health baby and stillbirth ($P>0.05$). There were no differences in proportion of male neonate (AOR 1.07, 95% CI 0.86~1.34), preterm birth rate (AOR 0.7, 95% CI 0.49~1.01), very preterm birth rate (AOR 1.47, 95% CI 0.55~3.96), low birthweight rate (AOR 1.38, 95% CI 0.86~2.22), very low birthweight rate (AOR 0.76, 95% CI 0.20~2.83), congenital anomalies rate (AOR 1.58, 95% CI 0.66~3.76, $P>0.05$). 【Conclusion】The blastocyst may be the preferable stage for vitrifying and

收稿日期:2017-11-03

基金项目:广东省中医药局面上项目(20142097);广州医科大学青年项目(2014A18)

作者简介:刘寒艳,硕士,医师,研究方向:生殖医学,E-mail: liuhanyan_21@163.com;杜红姿,通信作者,E-mail: dhz_gz@hotmail.com

transfer currently which can obtain good neonatal outcomes.

Key words: vitrification; cleavage stage; blastocyst culture; blastocyst transfer; single live birth outcomes

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 238-244]

在辅助生殖技术中,胚胎冷冻在很多情况下都是必需的,尤其是对于卵巢反应良好,能获得更多胚胎的患者。然而,胚胎冷冻需要足够的空间以及胚胎学家大量的工作量。而且,患者在复苏周期中对妊娠的期望值更高^[1]。相对于胚胎移植,囊胚移植能提高妊娠率^[2]。但是对于复苏囊胚和复苏卵裂期胚胎后继续培养来的囊胚的新生儿结局,尚未见相关报道。本文旨在探讨不同时期玻璃化冷冻来源的囊胚,在复苏周期中获得单胎妊娠并分娩的新生儿结局。

1 材料与方法

1.1 研究对象

我们收集2014年1月至2016年10月期间在广州医科大学附属第三医院生殖中心进行辅助生殖技术治疗(Invitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection, IVF/ICSI)患者的临床资料,满足以下条件:复苏周期行囊胚复苏或者卵裂期胚胎复苏行囊胚培养,移植囊胚后获得单胎分娩的患者,二步移植不纳入本研究。同一患者只计入一次单胎分娩周期。

共有1 727名单胎分娩患者纳入本研究,其中复苏囊胚移植为1 037个周期,复苏卵裂胚行囊胚培养移植为690个周期。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者均签署同意用于研究的知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂和耗材 采用日本加藤公司玻璃化冷冻、解冻试剂盒(Kitazato Biophama Co.Ltd. Shizuoka, Japan)。冷冻试剂包括平衡液(Equilibration Solution, ES)、冷冻液(Vitrification Solution, VS);解冻试剂含有解冻液(Thawing Solution, TS)、稀释液(Diluent Solution, DS)、洗液1(Washing Solution 1, WS1)和洗液2(Washing Solution 2, WS2);冷冻载体为Cryotop(日本加藤公司生产)。

1.2.2 胚胎冷冻步骤 卵裂期胚胎冷冻过程为,取0.5 mL ES、VS于Falcon 3037皿内室温(24 ℃)

下平衡,将胚胎(一次最多2枚)移入平衡液ES中5 min,然后移入冷冻液VS中45~60 s,充分混匀后迅速将胚胎置于冷冻载体Cryotop顶端,并立刻投入液氮中。囊胚冷冻前利用激光辅助孵化系统(300 μs)在远离内细胞团一侧透明带进行人工皱缩囊腔,将囊胚液释放,待完全皱缩后进行玻璃化冷冻。冷冻过程在37 ℃下,ES液中2 min,VS中45~60 s,其余过程与卵裂期胚胎冷冻相同。

1.2.3 胚胎复苏及序贯囊胚培养 卵裂期胚胎和囊胚复苏步骤相同,将0.5 mL解冻试剂取出在室温下平衡,并取解冻液TS于Falcon 3653皿中置于37 ℃预温,将要解冻患者的胚胎从液氮中取出,迅速将Cryotop顶端置于TS中1 min,然后在室温下依次将胚胎转入DS、WS1、WS2中各3 min。最后将胚胎移入平衡过的培养液中,置于37 ℃、体积分数为6%的CO₂培养箱中培养2 h等待移植。行囊胚培养的胚胎,则将其移入预先平衡好的囊胚培养液中,于37 ℃、体积分数为6% CO₂和5% O₂的3种气体培养箱中培养。48~72 h后观察囊胚形成情况,囊胚培养采用商品化的序贯培养液(Vitrolife AB公司,瑞典)。

1.2.4 囊胚培养的指征 新鲜周期患者有7个及以上可利用卵裂期胚胎,则新鲜周期移植或冷冻两个卵裂期胚胎,剩余胚胎囊胚培养;复苏周期囊胚培养的指征为冻存有4个及以上的卵裂期胚胎和/或两次以上IVF失败。

1.2.5 囊胚评分标准 采用Gardner囊胚评分标准,以数字1~6对囊胚的扩张度和孵化状态评分,以字母A、B、C对内细胞团及滋养外胚层细胞评分^[3]。

1.2.6 子宫内膜准备 对于月经周期正常且排卵规律的患者采用自然周期,从月经第9~10天开始超声监测卵泡和内膜发育情况,当优势卵泡直径≥16 mm,子宫内膜≥8 mm,于排卵后给予黄体酮针40 mg/d肌内注射(浙江仙琚),第3~5天后复苏胚胎移植;月经周期不正常或排卵不规律的患者则采用人工周期,从月经的第3天口服补佳乐6 mg/d(Bayer, 1 mg/片),10 d后阴道B超监测内膜

情况,当子宫内膜 ≥ 8 mm,加用黄体酮针 60 mg,每天1次,肌肉注射,于第3~5天后复苏胚胎移植。移植后予黄体酮 20 mg,每天1次,肌注或地屈孕酮片每次 20 mg,口服,每天2次,黄体支持。

1.2.7 妊娠及分娩后情况的判断 胚胎移植 14 d 后进行血 HCG 检测,血 HCG >25 U/L 定义为 HCG 阳性,阳性者妊娠第 6、8 周行 B 超监测,观察到妊娠囊的为临床妊娠,未观察到妊娠囊为生化妊娠。妊娠 ≥ 25 周定义为分娩。健康抱婴周期是指:胎龄 ≥ 37 周,体质量 $\geq 2 500$ g,活胎分娩,产后 28 d 仍存活,且没有先天异常的新生儿。 $<2 500$ g 定义为低出生体质量, $<1 500$ g 定义为极低出生体质量。 <37 周分娩定义为早产, <32 周分娩定义为极早产。先天异常是指排除染色体疾病导致的其他异常。

1.3 数据收集

收集病人的基本资料、治疗方案、胚胎发育以及治疗结局。病人收集的信息包括:女方年龄、男方年龄、抗缪勒管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)水平、女方身高、体质量指数(body mass index, BMI)、不孕类型、不孕因素、不孕年限、周期数、复苏周期方案、取卵周期用药方案和授精方式、决定解冻日内膜厚度、移植胚胎数、移植胚胎天数以及妊娠监测情况和新生儿分娩结局,其中包括平均孕周、平均体质量、男婴出生率、早产率、极早产率、低体质量率、极低体质量率、先天异常率。

1.4 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差表示,对于正态或非正态分布资料分别采用两独立样本 Student's *t* 检验或 Mann-Whitney's *U* 检验,计数资料用率(%)表示,采用 chi-square 检验或 Fisher 精确概率计算法。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。使用单因素回归和多重 logistic 回归分析 OR 值及 AOR 值。

2 结果

单胎分娩周期中,复苏囊胚组平均年龄为 31.2 岁,AMH 为 6.64 ng/mL,复苏卵裂胚行囊胚培养组平均年龄为 31.9 岁,AMH 为 5.77 ng/mL,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。此外,两组的其他基础参数分布,包括原发不孕的比例、不孕的原

因、不孕年限、行 IVF/ICSI 周期数、取卵周期促排卵方案、取卵周期授精方式也有统计学差异($P<0.05$)。复苏周期内膜准备方式也有统计学差异,在复苏囊胚组 71.8% 为自然周期,27.4% 为人工周期,而在复苏卵裂胚行囊胚培养组,60% 为自然周期,39% 为人工周期($P<0.05$)。关于移植胚胎个数(1 个或 2 个)和移植胚胎天数(Day5 为第 5 天,Day6 为第 6 天),复苏囊胚组移植 2 个囊胚占 78.1%,Day5 囊胚移植占 63.3%,而复苏卵裂胚行囊胚培养组,93.9% 移植 2 个囊胚,98.3% 为 Day5 囊胚移植,两组也有统计学差异($P<0.05$)。男方年龄、女方身高、BMI 指数、决定解冻日内膜厚度,两组没有统计学差异($P>0.05$;表 1)。

比较两组单胎分娩结局(表 2),平均胎龄,新生儿平均体质量,活产、健康抱婴以及死胎的比例两组没有统计学差异($P>0.05$)。两组出生性别比(1.33/1.27)、早产率(12.05%/9.42%),极早产率(1.16%/1.45%),低出生体质量率(6.17%/6.67%),极低出生体质量率(0.77%/0.58%)以及先天异常率(1.06%/2.03%)没有统计学差异($P>0.05$;表 2)。

进一步通过单因素和多因素回归分析两组单胎分娩周期不良结局的优势比和校正优势比,发现出生男婴率(AOR 1.07, 95% CI 0.86~1.34),早产率(AOR 0.7, 95% CI 0.49~1.01),极早产率(AOR 1.47, 95% CI 0.55~3.96),低出生体质量率(AOR 1.38, 95% CI 0.86~2.22),极低出生体质量率(AOR 0.76, 95% CI 0.20~2.83)以及先天异常率(AOR 1.58, 95% CI 0.66~3.76)两组仍然没有统计学差异($P>0.05$;表 3)。

3 讨论

3.1 囊胚培养和玻璃化冷冻技术的应用

Gardner 等^[3]于 1998 年首次用序贯培养基将人胚胎体外培养至囊胚期后进行移植,临床妊娠率达 63%,胚胎种植率为 45.5%。囊胚培养包括新鲜周期囊胚培养和复苏卵裂胚后囊胚培养,两者的囊胚形成率无统计学差异^[4],说明复苏过程并不影响胚胎的发育潜能。而囊胚培养将会淘汰质量不好、发育潜能较差的胚胎,从而提高种植率及临床妊娠率。全世界第一例玻璃化囊胚复苏移植获得妊娠分娩是在 2000 年^[5],囊胚存活率也从早期的 67% 提高到 97%,种植率从 23% 提高到

表1 单胎分娩周期的基础参数

Table 1 Analysis of the basic and treatment characters of singleton birth compared between Thawed blastocyst and blastocyst from thaw cleavage [n(%), $\bar{x} \pm s$]

	Thawed blastocyst	Blastocyst from thaw cleavage	t/χ^2	P
<i>n</i>	1 037	690		
Female age/years	31.2±4.0	31.9±4.2	3.591	0.000
Paternal age/years	33.5±5.1	34.0±5.0	1.923	0.055
AMH/(ng/mL)	6.64±4.28	5.77±4.13	-3.932	0.000
Female height/m	1.58±0.05	1.58±0.05	-0.835	0.404
BMI/(kg/m ²)	21.61±3.01	21.44±2.75	-1.244	0.214
Primary infertility	520(50.1)	403(58.4)	11.364	0.001
Reason of infertility			22.617	0.000
Tubal factor	579(55.8)	371(53.8)		
Ovulation disorders	74(7.1)	56(8.1)		
Endometriosis	30(2.9)	23(3.3)		
Spermatozoa factor	100(9.6)	109(15.8)		
Both sides factor	22(2.1)	19(2.8)		
Unexplained	232(22.4)	112(16.2)		
Length of infertility/years	4.31±2.85	4.78±3.04	3.230	0.001
Previous IVF/ICSI attempts			29.683	0.000
1	885(85.3)	531(77.0)		
2	127(12.2)	109(15.8)		
≥3	25(2.4)	50(7.2)		
Type of FET cycle			26.346	0.000
Spontaneous	745(71.8)	414(60.0)		
Spontaneous, luteal support	284(27.4)	269(39.0)		
Hormonal substitution	8(0.8)	7(1.0)		
Oocyte insemination type			17.118	0.000
Conventional	891(85.9)	540(78.3)		
ICSI	146(14.1)	150(21.7)		
Ovarian stimulation protocol			60.271	0.000
Microflare	33(3.2)	60(8.7)		
Down-regulation	812(78.3)	578(83.8)		
GnRH antagonist	192(18.5)	52(7.5)		
Endometrial thickness on day of FET decision/mm	8.85±1.66	8.78±1.58	-0.887	0.375
No. of transferred embryos			78.686	0.000
1	227(21.9)	42(6.1)		
2	810(78.1)	648(93.9)		
Transfer day			288.765	0.000
Day 5 ET	656(63.3)	678(98.3)		
Day 6 ET	381(36.7)	12(1.7)		

47%^[6-7]。自然生理状态下早期卵裂期胚胎应在输卵管中发育,到近囊胚期才进入子宫腔,复苏周期囊胚移植更符合生殖生理,降低了异位妊娠率^[8]。和程序化冷冻相比,玻璃化能增加胚胎及囊胚的存活率,因此,玻璃化复苏移植周期能获得和新鲜

移植周期相似的着床率和妊娠率^[9]。

3.2 囊胚冷冻和移植的优势

单胚胎移植是辅助生殖技术中降低多胎妊娠的有效方法,同时降低围产期和新生儿风险,尤其是早产和低体质量儿的发生率。相对于单胚胎移

表2 两组单胎分娩周期不良结局的比较

Table 2 Outcomes and events in singleton live birth pregnancies [$\bar{x} \pm s$ or $n(\%)$]

Outcome	Thawed blastocyst	Blastocyst from thaw cleavage	t/χ^2	P
<i>n</i>	1 037	690		
Gestational age/weeks	38.7±2.0	38.7±1.8	-0.312	0.755
Neonatal weight/g	1 630±255	1 620±260	0.577	0.564
Live birth	1 032(99.52)	687(99.57)	0.000	1.0
Health baby	1 023(98.65)	672(97.39)	3.609	0.057
Still birth	5(0.48)	3(0.43)	0.000	1.0
Gender of neonate(male)	591(56.99)	386(55.94)	0.186	0.667
Sex ratio (male/female)	1.33	1.27		/
Preterm birth(<37 weeks)	125(12.05)	65(9.42)	2.935	0.087
Very preterm birth(<32 weeks)	12(1.16)	10(1.45)	0.281	0.596
Low birth weight(<2 500 g)	64(6.17)	46(6.67)	0.17	0.68
Very low birth weight(<1 500 g)	8(0.77)	4(0.58)	0.03	0.86
Congenital anomalies	11(1.06)	14(2.03)	2.723	0.099

表3 比较两组单胎分娩周期不良结局的优势比和校正优势比

Table 3 Odds ratios and adjusted odds ratios for adverse outcome in singleton birth

Outcome	OR(95%CI)	P for OR	AOR(95%CI)	P for AOR
Blastocyst from thaw cleavage	1.00		1.00	
Thawed blastocyst				
Gender of neonate(male)	1.04(0.86~1.27)	0.667	1.07(0.86~1.34)	0.561
Preterm birth(<37 weeks)	1.32(0.96~1.81)	0.087	0.7(0.49~1.01)	0.055
Very preterm birth(<32 weeks)	0.796(0.34~1.85)	0.596	1.47(0.55~3.96)	0.442
Low birth weight(<2 500 g)	0.92(0.62~1.36)	0.68	1.38(0.86~2.22)	0.188
Very low birth weight(<1 500 g)	1.33(0.4~4.45)	0.86	0.76(0.20~2.83)	0.676
Congenital anomalies	0.518(0.23~1.15)	0.099	1.58(0.66~3.76)	0.303

Adjusted for the female age, primary infertility, reason of infertility, previous IVF/ICSI attempts, type of FET cycle, oocyte insemination type, ovarian stimulation protocol, No. of transferred embryos, transfer day.

植,单囊胚移植在降低多胎妊娠风险的同时,保证了种植率和临床妊娠率^[10]。本中心复苏周期囊胚移植有两种形式,第一种为直接复苏囊胚进行移植,第二种是复苏卵裂胚,进行囊胚培养后再移植,复苏周期囊胚培养的指征为有两次及以上移植失败史,且患者冻存有4个及以上卵裂期胚胎,相对于复苏周期囊胚培养,新鲜周期行囊胚培养并冷冻,能节省储存空间,降低工作量,而复苏周期囊胚培养存在不能形成囊胚而取消移植的风险,同时面临多余囊胚再次冷冻问题,而目前双冻的风险仍然未知。因此本中心更推荐新鲜周期囊胚培养并冷冻,复苏周期囊胚移植。

3.3 囊胚玻璃化冷冻的安全性

囊胚冷冻保存能节省储存空间和工作量,但是为了确定囊胚玻璃化冷冻的安全性,必须重视除了存活率和发育潜能,玻璃化冷冻对囊胚可能产生的其他损害。已有报道表明玻璃化冷冻降低人囊胚纺锤体正常形成率^[11];导致小鼠囊胚DNA损伤^[12],改变线粒体分布状态以及氧化还原反应状态^[13]。

既往关于复苏周期囊胚移植结局说法不一,有研究认为卵裂期解冻胚胎后囊胚移植更优,也有研究认为解冻囊胚移植更好。有研究发现,复苏周期囊胚移植妊娠率和围产结局优于新鲜周期囊胚移植^[14-16],而复苏卵裂期胚胎行囊胚培养移

植妊娠率和分娩率优于解冻囊胚移植,流产率低于解冻囊胚移植,因此更推荐新鲜周期移植囊胚及冷冻卵裂胚^[14,17],并在复苏周期中行囊胚培养移植。有研究认为复苏囊胚移植能获得更好的新生儿结局^[16],显著降低早产率,低出生体质量以及小于胎龄儿的发生率,但是增加大于胎龄儿的发生率,同时增加母亲胎盘植入以及妊娠期高血压疾病的风险^[15]。但也有研究发现囊胚移植较第3天移植单胎早产率增加^[18-19],先天畸形增加^[18]。关于复苏囊胚移植和复苏卵裂胚行囊胚培养移植的单胎分娩新生儿的结局,尚未见报道,本文首次比较了这两者的单胎分娩的新生儿结局及不良结局,没有发现两组的胎龄、出生体质量、性别比、早产率、极低早产率、低出生体质量率、极低出生体质量率之间差异有统计学意义。活产比例、健康抱婴比例、死婴比例差异没有统计学意义。在复苏卵裂胚行囊胚培养组,患者年龄较大,AMH水平较低,早产率和极低出生体质量率与复苏囊胚组相比下降,但是尚无统计学差异,且由于影响新生儿结局和不良的因素很多,本文在校正了相关

因素,如女方年龄、不孕类型(原发/继发)、不孕原因,IVF/ICSI周期数、FET周期内膜准备方式、取卵周期用药方案、取卵周期授精方式、移植胚胎个数、移植胚胎天数(Day5/Day6)后,两组结局及不良结局仍然没有统计学差异,说明相对于卵裂胚玻璃化冷冻,新鲜周期囊胚培养行囊胚冷冻,解冻周期复苏囊胚是相对安全,较佳的囊胚培养和移植方案^[20]。

综上分析,新鲜周期囊胚培养并冷冻,后复苏移植能获得较好的分娩结局及新生儿结局,是目前最佳的囊胚培养和移植方案,对于胚胎较多、反应好的患者,可在复苏周期使患者子宫内膜呈现出更好的容受性,提高与胚胎发育同步性。但囊胚培养存在着无囊胚形成的风险,对于胚胎较少的患者,并不建议行囊胚培养。而对于复苏卵裂期胚胎后因特殊意外原因不能及时移植患者,可以考虑行复苏卵裂期胚胎囊胚培养移植,给患者缓冲的时间,尽量避免胚胎再次冷冻情况的发生。因此,各中心应根据实际情况,有指征的进行囊胚培养。

参考文献:

- [1] Check JH, Choe JK, Katsoff D, et al. Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1999, 16(8): 416-420.
- [2] Langley M, Marek DM, Gardner DK, et al. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5): 902-908.
- [3] Gardner DK, Vella P, Lane M, et al. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers [J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(1): 84-88.
- [4] 唐永梅, 韦继红, 姚春玲, 等. 冻融囊胚及冻融胚胎培养囊胚后移植的临床效果分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(8): 125-126.
Tang YM, Wei JH, Yao CL, et al. Clinical analysis of frozen-thawed blastocysts and blastocysts cultured from frozen-thawed embryos [J]. *Chin J Birth Health Hered*, 2012, 20(8): 125-126.
- [5] Yokota Y, Sato S, Yokota M, et al. Successful pregnancy following blastocyst vitrification: Case report [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15: 1802-1803.
- [6] Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: Application of assisted hatching after thawing [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(7): 1504-1511.
- [7] Mukaida T, Oka C, Goto T, et al. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(12): 3246-3252.
- [8] Ishihara O, Kuwahara A, Saito H. Frozen-thawed blastocyst transfer reduces ectopic pregnancy risk: An analysis of single embryo transfer cycles in Japan [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(6): 1966-1969.
- [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] Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(1): 91-99.
- [11] Chatzimeletiou K, Morrison EE, Panagiotidis Y, et al. Cytoskeletal analysis of human blastocysts by confocal laser scanning microscopy following vitrification [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(1): 106-113.
- [12] Li L, Zhang X, Zhao L, et al. Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing [J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(3): 229-236.
- [13] Somoskoi B, Martino NA, Cardone RA, et al. Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 22.
- [14] Wang YA, Chapman M, Costello M, et al. Better perinatal outcomes following transfer of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos: A population-based study [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(6): 1536-1542.
- [15] Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, et al. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: An analysis of 277, 042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(1): 128-133.
- [16] Roy TK, Bradley CK, Bowman MC, et al. Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live-birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(5): 1294-1301.
- [17] Wang YA, Costello M, Chapman M, et al. Transfers of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos are associated with fewer miscarriages [J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(6): 777-788.
- [18] Källén B, Finnström O, Lindam A, et al. Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: differences in neonatal outcome? [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(5): 1680-1683.
- [19] Dar S, Librach CL, Gunby J, et al. IVF directors group of canadian fertility and andrology society. Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies after blastocyst versus Day 3 embryo transfer: Canadian ART register (CARTR) analysis [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(4): 924-928.
- [20] 刘艳丽, 杨晓娜, 许小燕, 等. 新鲜周期和复苏周期囊胚培养及移植的临床结局分析 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2015, 50(2): 264-267.
- Liu YL, Yang XN, Xu XY, et al. Analysis of clinical outcomes of blastocyst culture and transfer between fresh cycles and vitrified-thawed cycles [J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2015, 50(2): 264-267.

(编辑 余菁)

(上接第214页 from page 214)

- [24] Ratelade J, Verkman AS. Inhibitor(s) of the classical complement pathway in mouse serum limit the utility of mice as experimental models of neuromyelitis optica [J]. *Mol Immunol*, 2014, 62(1): 104-113.
- [25] Wang Z, Guo W, Liu Y, et al. Low expression of complement inhibitory protein CD59 contributes to humoral autoimmunity against astrocytes [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 65(9): 173-182.
- [26] Tradtrantip L, Zhang H, Anderson MO, et al. Small-molecule inhibitors of NMO-IgG binding to aquaporin-4 reduce astrocyte cytotoxicity in neuromyelitis optica [J]. *FASEB J*, 2012, 26(5): 2197-2208.
- [27] Tradtrantip L, Zhang H, Saadoun S, et al. Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica [J]. *Ann Neurol*, 2012, 71(3): 314-322.

(编辑 徐杰)