

改良程序化慢冻提高活检人胚胎的冻存率

郑闻亭, 庄广伦, 周灿权, 方丛, 张敏芳

(中山大学附属第一医院妇产科生殖医学研究中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨及 Jericho 改良方案用于冷冻活检后胚胎的效能。【方法】将 92 个质量相对较好的废弃人胚胎随机分配到单纯冷冻组($n=30$), 胚胎活检后标准程序化慢冻组($n=32$)及胚胎活检后 Jericho 改良程序化慢冻组($n=30$)。将活检后的胚胎继续培养 6~10 h, 3 组胚胎同时进行冷冻。观察各组胚胎冷冻解冻后的冻存率及囊胚形成率。【结果】活检胚胎采用 Jericho 改良方案冷冻后, 胚胎存活率、完整率及囊胚率分别为 73%, 40% 和 23%, 较活检后标准冷冻组(16%, 13% 和 3%)显著提高(P 值分别 $< 0.001, 0.05, 0.05$), 达到单纯冷冻组的水平(P 均 > 0.05)。【结论】采用 Jericho 改良方案冷冻活检人胚胎优于目前的标准化慢冻方案, Jericho 方案冷冻后的胚胎具备良好的发育潜能。

关键词: 冷冻; 胚胎; 活检; 种植前诊断

中图分类号: R321.33

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)02-0193-04

Modified Programmed Slow Cryopreservation Improves Cryosurvival Rate of Biopsied Human Embryos

ZENG Wen-ting, ZHUANG Guang-lun, ZHOU Can-quan, FANG Cong, ZHANG Ming-fang

(Assisted Reproductive Medicine Department, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effectiveness of Jericho modified programmed slow cryopreservation protocol in cryopreservation of the biopsied human embryos. 【Methods】Ninty-two discarded human embryos were allocated randomly to three groups: cryopreservation group without biopsy ($n = 30$); standard slow cryopreservation after biopsy ($n = 32$); Jericho modified slow cryopreservation after biopsy ($n = 30$). Embryos were frozen 6-10 h after biopsy. The cryosurvival rate, intact rate, and blastocyst formation rate were observed. 【Results】The cryosurvival rate, intact rate, and blastulation rate of biopsied embryos in Jericho modified group were improved significantly than those of standard group (73% versus 16 %, $P < 0.05$; 40% versus 13 %, $P < 0.05$; and 23 % versus 3%, $P < 0.05$; respectively), and reached the levels of non-biopsied group. 【Conclusion】Jericho modified programmed slow cryopreservation protocol is more effective than standard protocol in cryopreservation of the biopsied human embryos and the embryos development potential is satisfying after cryopreservation by Jericho protocol.

Key words: cryopreservation; embryo; biopsy; preimplantation genetic diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(2): 193-196]

活检后人胚胎的冻存率低是种植前诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 的一个明显制约因素^[1,4]。活检胚胎程序化慢冻方案的改良及成功妊娠由澳大利亚的 Jericho 于 2003 年报

道^[4]。本实验采用生殖中心废弃的人胚胎, 进行标准化方案和 Jericho 改良方案冻存活检胚胎的对照研究, 为临床试用改良方案提供进一步的依据。

收稿日期: 2004-08-31

基金项目: 卫生部重点学科基金资助项目(2001321)

作者简介: 郑闻亭(1974-), 女, 江西赣州人, 博士生. E-mail: sunnnyjenny@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组

实验胚胎选自在我中心进行 IVF 或单精子卵胞浆内注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 后第 3 天, 由于受精异常或质量差而不适合移植或冷冻的胚胎。选择其中细胞数 ≥ 4 并 ≤ 12 细胞(卵裂球), 细胞大小比较均匀, 且碎片 $\leq 30\%$ 的胚胎共 92 个作为实验对象。实验胚胎被分次随机分配到以下的 3 个组中: 未活检胚胎进行标准程序化慢冻作为对照($n=30$); 胚胎活检后行标准程序化慢冻($n=32$); 胚胎活检后行 Jericho 改良程序化慢冻($n=30$)。

1.2 方法

1.2.1 胚胎活检 采用机械法去除部分透明带 (partial zona pellucida dissection, PZD), 使透明带具有 1 个开口, 然后取出并去除 1 或 2 个卵裂球, 同时尽量去除胚胎碎片。

1.2.2 胚胎冻融过程 活检后的胚胎培养 6~12 h 再进行冷冻。以下的冷冻和解冻液均是采用添加 20% (体积比) 灭活胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; 杭州四季青生物公司) 的 PBS (phosphate-buffered saline; Sigma, St. Louis, MO, USA) 的基础液配制。标准程序化慢冻方案: 胚胎于室温下置于 1.5 mol/L 的丙二醇 (1,2-propanediol, PROH; Sigma, St. Louis, MO, USA) 中平衡 10 min, 然后移入 1.5 mol/L PROH+0.1 mol/L 蔗糖冷冻液中, 吸胚胎入麦管。降温在程序化冷冻仪上进行 (Kryo 10

Series); 从室温到 -7°C 降温速率 $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$; -7°C 人工植冰; 以 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 -30°C , 以 $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降到 -150°C , 将麦管投入液氮。胚胎在液氮内贮存 3~7 d 进行解冻。解冻过程如下: 室温 30 s, 30°C 水浴 30~45 s; 然后放置在 1.0 mol/L PROH+0.2 mol/L 蔗糖、0.5 mol/L PROH+0.2 mol/L 蔗糖、0.2 mol/L 蔗糖各 5 min, 基础液 10 min, 使冷冻保护剂逐步稀释去除。Jericho 改良程序化慢冻方案^[4]: 冷冻液蔗糖浓度由 0.1 mol/L 提高为 0.2 mol/L。稀释步骤如下: 0.75 mol/L PROH+0.3 mol/L 蔗糖, 5 min; 0.3 mol/L 蔗糖, 5 min; 0.2 mol/L 蔗糖, 10 min。

1.2.3 观察指标 冻融胚胎培养 2 h 后在倒置显微镜下观察, 进行完整性和存活卵裂球的评估。解冻后的胚胎卵裂球数 $\geq 50\%$ 是完整者定义为存活胚胎, 其中 100% 卵裂球均完整者定义为完整胚胎。胚胎存活率=存活胚胎/冷冻胚胎数。将存活胚胎进一步培养 3 d 后, 镜下观察囊胚形成情况; 囊胚形成率=囊胚数/冷冻胚胎数; 孵出囊胚率=孵出囊胚数/囊胚数

1.2.4 统计学方法 采用 χ^2 检验分析结果。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

改良方案组活检胚胎冻融后存活率比标准方案组显著提高 ($P < 0.001$), 完整胚胎率显著提高 ($P < 0.05$), 形成囊胚的百分率显著提高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 胚胎冷冻结局

Table 1 Embryos after cryopreservation

Group	Cryopreservation	Embryos	n	Survival (%)	Intact (%)	Blastocysts (%)	Hatched (%)
I	Standard	Non-biopsied	30	26(87)	8(27)	6(20)	4(67)
II	Standard	Biopsied	32	5(16)	4(13)	1(3)	1(100)
III	Modified	Biopsied	30	22(73) ^{1),2)}	12(40) ^{2),3)}	7(23) ^{2),3)}	5(71) ⁴⁾

Compared with the group II, 1) $P < 0.001$; Compared with the group I, 2) $P > 0.05$; Compared with the group II, 3) $P < 0.05$; Compared with the group I, 4) $P = 1.0$

未活检标准慢冻组 4/6(67%)囊胚具有内细胞团; 活检后改良慢冻组 4/7(57%)囊胚具有内细胞团; 活检后标准慢冻组 1/1(100%)囊胚具有内细胞团。

活检胚胎在进行冻融后, 形成囊胚的孵出率分别为 67% 和 71% (活检后标准慢冻组的囊胚样

本数过少, 比较孵出率时予删除处理), 差异无统计学意义 ($P = 1.0$)。但两组孵出胚胎的透明带的形态有区别: 未活检组自然孵出囊胚的透明带较卵裂期胚胎明显扩张变薄; 活检组囊胚得以辅助孵出, 透明带的厚度及形态较卵裂期胚胎相比无明显扩张 (图 1、2)。

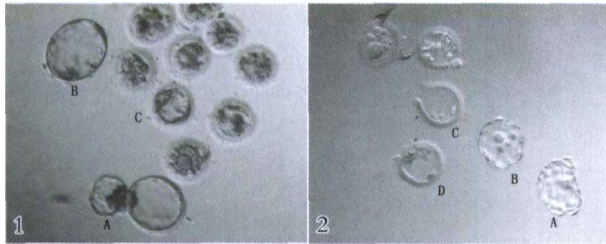


图1 未活检组囊胚

图2 活检组囊胚

Fig.1 Blastocysts of non-biopsied group

A: Hatched blastocyst; B: Expanded blastocyst; C: Blastocyst;
Other: Blocked cleavage stage embryos ($\times 200$)

Fig.2 Blastocysts of biopsied group

A, B: Hatched blastocysts; C, D: Zona pellucida of A and B;
Others: Blocked cleavage stage embryos ($\times 200$)

3 讨论

3.1 活检胚胎冷冻的必要性和现状

在体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 助孕治疗周期中, 由于促性腺激素等药物的使用, 在一个卵巢刺激周期通常可获得多个卵子, 从而使受精后形成的胚胎数多于一次移植所需的量。大约 60% 的 IVF-ET 治疗周期有剩余的胚胎。将这部分胚胎成功冻存, 以后放回宫腔, 可以给新鲜胚胎移植周期妊娠失败的妇女再次提供妊娠机会。冻融胚的第 1 例妊娠及相关冷冻技术于 1983 年由澳大利亚学者 Trounson 报道之后, 冷冻胚胎技术得以迅速地在全球推广。联合使用 PROH 和蔗糖的胚胎标准程序化慢冻方法在长期的应用当中被确认为可靠且稳定, 目前国内外的生殖中心大多采用该方法冷冻人胚胎。在 PGD 周期中, 经过卵裂球活检、淘汰一部分基因不正常的胚胎行移植术后, 往往仍有“基因正常”的胚胎剩余, 需要进行冷冻保存。此外, 活检胚胎冷冻尚适用于: 发生或有可能发生严重的卵巢过度刺激综合征的 PGD 周期中, 为了避免症状进一步加重, 可以将胚胎冻存, 留待以后移植; 胚胎移植时插管入宫腔非常困难者; 在目前一些前沿的 PGD 的技术如比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 或 DNA 芯片应用中, 必需将活检后的胚胎进行冷冻以等待结果^[5,6]。

由于冻存胚胎具备妊娠的可能, 所以提高胚胎的冻存率可以提高单个取卵周期的效率^[7]; 同

时因为冻融过程中卵裂球丧失会造成胚胎移植后的种植率下降, 即冻融过程中有卵裂球裂解的胚胎的种植率比胚胎保持完整者显著下降^[8,9], 因而维持胚胎的完整性对冷冻结局同样有重要意义。实验中未活检胚胎经标准程序化慢冻的存活率、完整率达 87% 和 27%, 与我们中心日常胚胎标准程序化冷冻效率相符, 但是活检后的胚胎采用该方案, 其存活率和完整率明显降低为 16% 和 13%, 与既往研究报道^[1-4]一致。

3.2 改良方案提高活检胚胎冻存率的可能机制

有研究认为活检后胚胎耐受冷冻的能力下降, 可能与透明带打孔和卵裂球取出有关^[3]。实验中观察到活检后胚胎进行标准程序化慢冻后, 裂解卵裂球的分布有明显倾向性: 于透明带开口附近卵裂球存活率远较远离开口处低。推测在解冻过程中, 水分子进入位于透明带开口附近的卵裂球和远离开口处的卵裂球的速度不同。解冻过程中, 随着冰晶的迅速融解消失, 胚胎周围的渗透压急剧下降, 由于其它介质经过质膜的速度比水分子慢, 细胞内的高浓度的渗透性冷冻保护剂此时还来不及渗出细胞外, 细胞内仍然保持高渗透压, 所以细胞外水分子快速渗入细胞内以保持细胞内外渗透压平衡。失去透明带保护的卵裂球直接暴露在浓度降低的液体中, 大量水分子直接渗入卵裂球内造成卵裂球胀破, 从而降低了胚胎的存活率。我们考虑透明带在解冻过程中延缓了水分子进入细胞的时间, 起了不完全的屏障作用, 这种推测也可以解释为什么透明带保护下的卵裂球具有相对较高的冻存率。

将冷冻液的非渗透性冷冻保护剂蔗糖的浓度由 0.1 mol/L 提高到 0.2 mol/L, 冷冻过程中可以将更多的细胞内水份脱出, 使细胞收缩更明显。因此在复温过程中细胞吸水体积膨胀复原所需要的时间更长; 同时因为提高的蔗糖浓度使细胞外的溶液渗透压增高, 减缓了水分子进入细胞的速度和程度, 为细胞内高浓度渗透性冷冻保护剂及时渗出赢得了时间, 从而减轻了细胞的过度膨胀和破裂, 使活检胚胎的冻存率、完整率、囊胚率从标准冷冻组的 16%, 13%, 3% 显著提高到 73%, 43%, 23% (P 值分别 $< 0.001, 0.05, 0.05$), 达到未活检胚胎标准化冷冻的水平 (87%, 27%, 20%, P 值均 > 0.05)。

3.3 透明带开口是否提高囊胚孵出率

关于“冷冻造成透明带变硬,使囊胚孵出率降低,如果在卵裂早期胚胎透明带上开口,可以辅助囊胚的孵出,并提高种植率”的观点目前仍然是有争议的^[10-12]。本实验中观察到经过透明带活检和未经过透明带活检的胚胎在囊胚期孵出时透明带的形态有差别:未活检组自然孵出囊胚的透明带较前扩张变薄;活检组辅助孵出囊胚的透明带的厚度及形态与活检时相比无明显扩张;见图 1、2。而孵出率接近,分别为 71%和 67%,经统计学检验无显著差异,但也可能跟囊胚样本量过小有关。透明带开口是否增加冷冻胚胎的囊胚孵出的结论,需要增加样本量作进一步的统计。

3.4 改良方案的可行性

近些年在进行人卵子冷冻的探索表明:将冷冻液的蔗糖浓度从 0.1 mol/L 提高到 0.2 mol/L 将显著地提高卵子冻存率^[13],并可以由此发育正常的婴儿。由于活检人胚胎行标准慢冻的冻存率差,因此 Jericho 等试行将蔗糖的浓度提高为 0.2mol/L,并相应地改变了解冻液的配方,结果提高活检胚胎冻存率并成功妊娠。本实验采用 Jericho 改良方案冷冻活检人胚胎,囊胚率达 23%,较标准慢冻组 3%的囊胚率显著提高($P < 0.05$),其中一半以上的囊胚可以见到内细胞团,表明了改良方案冷冻的效能显著提高,冻融后的活检胚胎具备良好的发育潜能,为采用 Jericho 改良方案取代标准方案冷冻活检人胚胎的安全性和有效性提供了进一步的证据。

参考文献:

- [1] 舒益民,庄广伦,徐艳文,等.慢速程序冷冻对透明带显微操作后人类胚胎冻存率及发育的影响[J].中山大学学报,2001,22(5):352-5.
- [2] Ciotti PM, Lagalla C, Ricco AS, *et al.* Micromanipulation of cryopreserved embryos and cryopreservation of micromanipulated embryos in PGD[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169(1-2): 63-7.
- [3] Joris H, Van den Abbeel E, Vos AD, *et al.* Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(11): 2833-7.
- [4] Jericho H, Wilton L, Gook DA, *et al.* A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(3): 568-71.
- [5] Munne S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation-a review[J]. *Placenta*, 2003, 24 (Suppl B): S70-6.
- [6] Wells D. Advances in preimplantation genetic diagnosis [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004,115 (Suppl):S 97-101.
- [7] Jones HW J, Out HJ, Hoomans EH, *et al.* Cryopreservation: the practicalities of evaluation [J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(7):1522-4.
- [8] El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, *et al.* Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(5):1106-11.
- [9] Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, *et al.* A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(1):175-9.
- [10] 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):2258-62.
- [11] Primi MP, Sennl A, Montag M, *et al.* A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19 (10):2325-33.
- [12] De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction[J]. *Cells Tissues Organs*, 2000, 166(2):220-7.
- [13] Josiame Van der Elst. Oocyte freezing: here to stay?[J]. *Hum Reprod*, 2003, 9(5): 463-70.

(编辑 张恩健)