

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

舒益民, 庄广伦, 徐艳文, 方丛, 张敏芳

(中山医科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】探讨慢速程序冷冻对透明带显微操作后胚胎冻存率及继续发育的影响。【方法】将96个II级以上人类多精受精胚胎随机分为单纯透明带打孔组($n=24$), 胚胎活检组($n=40$)及对照组($n=32$)。为模拟临床种植前诊断活检后胚胎冷冻过程, 将透明带显微操作后胚胎继续培养6~10h再进行慢速程序冷冻, 观察各组胚胎冷冻解冻后的冻存率及胚胎继续发育能力。【结果】活检及透明带打孔后冻融胚胎中发生裂解的卵裂球多位于透明带破口附近。活检组胚胎完整率、胚胎存活率及卵裂球存活率分别为10%, 25.0%和29.0%, 较对照组(43.7%, 66.0%和62.4%)明显降低($P<0.01$)。虽然单纯透明带打孔组冷冻后胚胎完整率及胚胎存活率与活检组无明显差异, 但卵裂球存活率较胚胎活检组高(分别为40.9%和29.0%)($P<0.01$), 以上各组存活胚胎继续发育率差异无显著性($P>0.05$)。【结论】以丙二醇和蔗糖为冷冻保护剂的人类分裂期胚胎慢速冷冻程序并不适用于化学法透明带打孔活检胚胎的冷冻保存, 有关人类活检后胚胎的冷冻保存方法值得进一步探讨。

关键词: 冷冻; 透明带; 显微操作; 活检

中图分类号: R321.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)05-0352-04

Effects of Slow Freezing on Embryo Survival Rate and Development after Zona Pellucida Micromanipulation

SHU Yi-min, ZHUANG Guang-lun, XU Yan-wen, FANG Cong, ZHANG Min-fang

(Reproductive Medical Center, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University
of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of freezing and thawing procedure on human embryos survival rate and development after zona pellucida micromanipulation. 【Methods】 96 polyspermic human embryos were randomly divided into three groups: drilling-only group ($n=24$), biopsy group ($n=40$), and control group ($n=32$). To mimic the cryopreservation process of biopsied embryos in preimplantation genetic diagnosis embryos were cryopreserved for 6~10 hours after zona pellucida micromanipulation. Intact embryo rate, embryo surviving rate, blastomere surviving rate and embryo further developmental rate were observed after embryo freezing and thawing. 【Results】 Degenerated blastomeres were mainly located around the drilling holes on zona pellucida in both drilling-only group and biopsy group. Intact embryo rate, embryo surviving rate and blastomere surviving rate in biopsy group were 10%, 25% and 29% respectively, much lower than that in control group (43.7%, 66.0%, 62.4%, respectively.) ($P<0.01$). Though similar intact embryo rate and embryo surviving rate were obtained between drilling-only group and embryo biopsy group, blastomere surviving rate in embryo biopsy group were significantly lower than that in drilling-only group (40.9%, 29.0%) ($P<0.01$). The embryo further developmental rates were similar among three groups ($P>0.05$). 【Conclusion】 Conventional freezing program using 1,2-propanediol and sucrose as cryoprotectants for cleavage stage embryos is not

收稿日期: 2000-09-04

作者简介: 舒益民(1971-), 男, 湖北咸宁人, 博士生, 妇产科生殖内分泌专业。 <http://www.cnki.net>

suitable for biopsied human embryos after chemical zona drilling. More attention should be paid to increase embryo surviving rate after biopsy.

Key words: freezing; zona pellucida; microsurgery; biopsy

1983年 Trounson 等^[1]首次报道人类冷冻解冻胚胎移植获得成功妊娠,此后人类胚胎冷冻技术广泛应用于辅助生育领域。近年来随着分子遗传学和胚胎学的飞速发展,种植前遗传诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)被逐步应用于遗传性疾病和染色体疾病的预防^[2]。PGD会淘汰一些不符合要求的胚胎,因而能够用于移植的胚胎数目大大减少,然而有些患者在胚胎移植后仍会有剩余的正常胚胎,对于这部分胚胎如能采用确实有效的办法进行冷冻将有助于提高患者胚胎移植的成功机会和减少PGD治疗周期。由于PGD中的胚胎活检为创伤性操作,有关活检对胚胎继续发育的影响已逐步引起人们的注意。虽然人类胚胎的冷冻保存已应用于临床并取得了明显成效^[3],但是有关冷冻对活检后人类胚胎发育能力影响的研究目前尚不多见,本文将观察两种透明带显微操作后胚胎对冷冻的耐受能力,以期寻找一种合理的活检后胚胎冷冻方法提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验对象及分组

所有胚胎均来自本中心常规体外受精或单精子卵浆内注射多精受精胚胎,于受精后第3天根据 Alakani 等^[4]胚胎分级标准挑选 II 级以上 6~10 细胞阶段胚胎 96 个作为研究对象,其中 32 个胚胎不作任何处理直接进行冷冻作为对照组,24 个胚胎仅进行单纯透明带打孔作为单纯透明带打孔组,另外 40 个胚胎透明带打孔后吸取 1~2 个卵裂球作为活检组。单纯透明带打孔及活检于受精后第3天上午进行,透明带显微操作后胚胎继续培养 6~10 h 再进行程序冷冻,冷冻前进行胚胎分级和评分。

1.2 方 法

1.2.1 透明带显微操作 所有透明带显微操作均在配备有 RI 显微操作系统的 Olympus IX 70 倒置显微镜上进行。以 Gamate-20 (IVF Science, Sweden)为操作液,先以外径为 120 μm ,内径为 30 μm 的显微固定针固定胚胎。然后,将吸有 Tyrode's 酸(pH 2.4)的喷酸针在胚胎 3 点钟位置灼烧透明

带,一旦透明带开始溶解即停止喷酸并对透明带破口附近残余酸液进行回吸,同时迅速移开胚胎,一般透明带破口直径为 30~40 μm 。随后,换用胚胎活检针(外径 42 μm ,内径 35 μm)经过透明带破口吸取卵裂球,8 细胞以前胚胎活检 1 个卵裂球,8 细胞以后每个活检胚胎吸取 2 个卵裂球。对于单纯透明带打孔的胚胎则不吸取卵裂球。为了模拟种植前诊断胚胎活检后胚胎冷冻过程,透明带显微操作后胚胎在 G2.2 (IVF Science, Sweden)中培养 6~10 h 后再进行冷冻。

1.2.2 胚胎冷冻及解冻过程 冷冻液及解冻液均以含有体积分数 20% 人血清的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, DPBS)为母液配制。胚胎冷冻采用慢速程序冷冻^[5],室温下先将待冷冻胚胎在 DPBS 中洗数次后转移至含 1.5 mol/L 丙二醇的 DPBS 中停留 10 min,然后移入含 0.1 mol/L 蔗糖和 1.5 mol/L 丙二醇的冷冻保护液中平衡并装管,上述整个过程约需 20 min。胚胎装管后置 Planer II 型程序冷冻仪中进行程序冷冻。冷冻程序以 20 $^{\circ}\text{C}$ 为起始温度并以 -2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 下降至 -7 $^{\circ}\text{C}$,于 -7 $^{\circ}\text{C}$ 人工植冰后停留 10 min,然后以 -0.3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 下降至 -30 $^{\circ}\text{C}$,最后以 -10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -150 $^{\circ}\text{C}$ 结束程序并将冷冻管保存于 -196 $^{\circ}\text{C}$ 液氮罐中。所有冷冻胚胎在解冻前至少在液氮罐中保存 4 周。解冻过程采用快速解冻方法,胚胎冷冻管从液氮罐中取出后在室温下停留 40 s,继之于 31 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 s,然后依次于含 0.1 mol/L 蔗糖 1.0 mol/L 丙二醇,0.1 mol/L 蔗糖 0.5 mol/L 丙二醇及 0.1 mol/L 蔗糖的解冻液中各 5 min,最后移入 DPBS 中复温至 37 $^{\circ}\text{C}$ 。所有冻存胚胎均于同一天采用同一批解冻液进行解冻。对解冻后 1 个以上卵裂球存活的胚胎进行评分后于 G2.2 中继续培养 3 d,每天观察并记录胚胎的发育情况,比较各组间解冻后胚胎完整率,胚胎存活率,卵裂球存活率以及胚胎继续发育率。

1.2.3 结果评定 解冻后具有完整清晰的细胞膜和均质光泽胞浆的卵裂球计为存活卵裂球,胚胎完整率指解冻后全部卵裂球均存活的胚胎占有所有冷冻胚胎的百分率,以解冻后有一半以上卵裂球存活

的胚胎所占百分率作为胚胎存活率, 卵裂球存活率为解冻后存活卵裂球数占冷冻前所有卵裂球总数的百分比。将解冻后有 1 个以上存活卵裂球的胚胎再继续培养 2 d, 计算卵裂球数目增加的胚胎所占比例即为胚胎继续发育率。

1.3 资料分析

各组间率的差异性采用 χ^2 检验进行

2 结果

2.1 各组冷冻胚胎解冻结局的比较

从形态学上看, 透明带显微操作后存活卵裂球的分布特点与对照组有显著不同。对照组中解冻

后存活卵裂球在胚胎中散在分布而无明显规律性, 而单纯透明带打孔及活检后胚胎中存活卵裂球呈区域性分布, 发生裂解的卵裂球多位于透明带缺口附近, 而远离透明带破口的卵裂球存活率明显改善。

对照组, 单纯透明带打孔组和活检组每个胚胎平均卵裂球数目分别为 6.7 个, 6.8 个和 7.1 个, 与对照组相比, 单纯透明带打孔组和胚胎活检组冷冻解冻后胚胎完整率, 胚胎存活率以及卵裂球存活率均显著下降 ($P < 0.01$), 胚胎活检组与单纯透明带打孔组胚胎完整率及胚胎存活率无显著差异 ($P > 0.05$), 但其卵裂球存活率均较单纯透明带打孔组为低 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组胚胎冷冻结局的比较

Table 1 Comparison of embryo outcome after freezing-thawing procedure among three groups n (%)

Group	Embryos	Blastomeres	Intact embryos	Surviving embryos	Surviving blastomeres
Control	32	218	14(43.7)	21(66.0)	136(62.4)
Drilling-only	24	162	3(12.5) ²⁾	8(33.3) ¹⁾	77(40.9) ²⁾
Biopsy	40	283	4(10.0) ²⁾	10(25.0) ²⁾	82(29.0) ^{2), 3)}

1) $P < 0.05$, compared to control group; 2) $P < 0.01$, compared to control group; 3) $P < 0.05$, compared to drilling-only group

2.2 各组解冻后存活胚胎继续发育率的比较

将解冻后 1 个以上卵裂球存活的胚胎在体外继续培养 3 d, 各组胚胎继续发育率之间的差异无显著性 ($P > 0.05$), 观察到对照组及单纯透明带打孔组各有 1 个囊胚形成(表 2)。

表 2 各组胚胎继续发育率的比较

Table 2 Embryo further developmental rate among three groups n (%)

Group	Embryo number	Further development	Blastocyst number
Control	26	10(43.1)	1
Drilling-only	21	10(47.0) ¹⁾	1
Biopsy	16	7(43.7) ¹⁾	0

1) $P > 0.05$, compared to control group

3 讨论

3.1 透明带对早期胚胎发育的生理性保护作用

透明带对于卵子和早期胚胎发育具有重要保护意义^[6]。体外培养条件如培养液的酸碱度, 渗透压以及某些金属离子浓度的变化都会影响胚胎的

发育, 透明带的存在使得胚胎在体外有一个相对比较稳定的培养环境而不易受培养环境变化的影响。

3.2 透明带损伤影响胚胎冻存效果的机制

研究表明, 冷冻对活检后小鼠胚胎囊胚发育率无明显影响^[7]。Joris 等^[8]将在体外培养 2~3 h 后的活检后人类胚胎进行慢速程序冷冻后发现活检后胚胎耐受冷冻的能力较差, 本研究模拟种植前诊断胚胎的冷冻过程, 发现即使将活检后胚胎在体外培养 6~10 h 胚胎冻存结局仍很差。这种现象出现的原因一方面可能与人、鼠胚胎之间不同的生理特性有关, 另一方面也与人胚活检时透明带破口较大有关^[8]。已有的研究表明, 透明带下精子注射, 卵浆内单精子注射以及单纯机械法透明带部分切除等对透明带损伤较小的操作并不会明显影响胚胎的冷冻结局^[3]。这提示, 并非所有的透明带损伤都会影响胚胎的冻存效果, 透明带显微操作对胚胎冻存效果的影响与透明带损伤大小有关, 有可能当透明带损伤达到一定程度时才会影响其对胚胎的保护作用。到底透明带上多大口径的损伤才会对胚胎的冻存有严重影响尚有待进一步研究。

透明带损伤影响人类胚胎冻存效果的具体机制目前尚不大清楚。推测透明带上较大的破口可

能会削弱其对卵裂球的屏障保护作用,胚胎冻融过程中卵裂球由于缺少透明带的保护而不正常地暴露于冷冻保护剂(蔗糖、丙二醇或二甲基亚砷等)中,卵裂球细胞骨架形态发生改变,部分卵裂球因为不能耐受而于冷冻或解冻过程中裂解^[9]。我们在实验中观察到单纯透明带打孔及活检后胚胎中存活卵裂球的分布有明显倾向性,透明带破口附近的卵裂球复苏率远较远离破口处低,这也从形态学角度证实了透明带上的缺口对卵裂球复苏的直接影响。除此之外,活检过程中的机械挤压也会影响胚胎空间结构和卵裂球内部形态,这也许是单纯透明带打孔较胚胎活检卵裂球存活率高的一个重要原因。

3.3 活检后胚胎冷冻方案的改进

目前人们对人类胚胎冷冻生物学尚缺乏全面和深入的了解,虽然最近有作者报道极体活检后冷冻胚胎冻融后移植获得成功分娩^[10],但总的来说,目前采用卵裂期胚胎冻存方案冷冻保存活检后胚胎结局仍令人失望。寻找更为有效的胚胎冷冻方法是摆在人们面前的一个课题。由于现在所用的化学法透明带打孔对胚胎及卵裂球影响较大,今后可试用机械法透明带部分切除或激光打孔等损伤较小的方法进行透明带打孔^[11]。胚胎的冷冻解冻方案本身的改进如超快速冷冻以及应用 Percoll 等对透明带具有保护作用的冷冻剂也可能对提高活检后胚胎的冻存效果会有所帮助^[12]。此外将活检后胚胎在体外继续培养至囊胚阶段再进行冷冻不仅有利于挑选出更具发育潜能的胚胎,而且囊胚的冻存效果也会明显提高。这些改进措施尚有待于在今后的研究中进一步探讨和应用。

参考文献:

[1] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo [J]. *Nature*, 1983, 305(5936): 707.

[2] Verlinsky Y. Preimplantation diagnosis: an alternate to prenatal diagnosis of genetic and chromosome disorders [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1999, 16(4): 161.

[3] Cedars M I. Embryo cryopreservation [J]. *Semina Reprod Endocrin*, 1998, 16(3): 183.

[4] Alikali M, Cohen J, Tomcin G, *et al.* Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation [J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(5): 836.

[5] Van Der Elst J, Camus M, Abbeel V D E, *et al.* Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1, 2-propanediol protocols [J]. *Fertil Steril*, 1995, 63(1): 92.

[6] Ashwood-Smith M J, Morris G W, Fowler R, *et al.* Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedure [J]. *Hum Reprod*, 1988, 3(6): 795.

[7] Snabes M C, Cota J, Hughes M R, *et al.* Cryopreserved mouse embryos can successfully survive biopsy and re-freezing [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1993, 10(8): 513.

[8] Joris H, Abbeel E V D, Vos A D, *et al.* Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(10): 2833.

[9] Magli M G, Giananoli L, Fortini D, *et al.* Impaction of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(3): 770.

[10] Lee M, Munne S. Pregnancy after polar body biopsy and freezing and thawing of human embryos [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(3): 645.

[11] Boada M, Carrera M, Iglesia C D L, *et al.* Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1998, 15(5): 302.

[12] Dumoulin J C M, Bergers-Janssen J M, Pieters M H, *et al.* The protective effects of polymers in the cryopreservation in human and mouse zonae pellucidae and embryos [J]. *Fertil Steril*, 1994, 62(4): 793.

(编辑 关淡庄)

·简讯·

中国首届国际干细胞学术研讨会论文征集通知

于2002年3月在北京举行中国首届国际干细胞学术研讨会暨北京生物工程学会干细胞专业委员会成立大会。内容:①分离、纯化、体外培养、鉴定和建库。②促增殖分化分子调控机制,生物特性。③临床应用。④细胞克隆和组织克隆。⑤回顾和前景展望。⑥社会价值、影响和相关伦理问题。要求:①近3年研究成果。②真实可靠,论点鲜明,文字通顺。③寄800~1000字摘要1份,包括“目的、方法、结果、结论”。④按“论文题目、作者单位、邮编、姓名、正文”顺序排列。⑤稿纸誊写(打印),或软盘、光盘,或至 meeting@stemcell.com.cn 或 www.stemcell.com。⑥不退稿。⑦2001年12月31日前寄至北京大学医学部会议中心南侧北京生物工程学会陈蕾收,信封请注明“干细胞学术研讨会征文”字样。电话:010-62092490,62092491。传真:010-62092515。地址:北京海淀区学院路38号北京大学医学部会议中心一层(南侧)100083。

(学讯)