

· 论 著 ·

卵子玻璃化冷冻复苏后行卵母细胞胞浆内单精子显微注射 27 例临床结局

孙小花, 陈海啸

[摘要] 目的 探讨卵子玻璃化冷冻技术在辅助生殖中的临床应用价值。方法 回顾性分析 2013 年 1 月-2015 年 12 月在解放军 174 医院生殖医学中心行体外受精, 取卵日因男方因素未取到精子而行卵子玻璃化冷冻保存的 27 对不孕夫妇的资料。卵子解冻后均行夫精卵母细胞胞浆内单精子显微注射, 记录卵子受精情况及临床结局。结果 27 例患者共冷冻卵子 245 枚, 并全部解冻, 解冻后存活 214 枚, 存活率 84.79%; 其中第二次减数分裂中期 (metaphase II, M II) 卵 198 枚, 并全部行 ICSI, 受精 138 枚, 受精率 74.49%; 卵裂 99 枚, 卵裂率 71.74%; 形成 87 枚 2PN (原核, pronucleus) 胚胎, 优质胚胎 34 枚, 优质胚胎率 39.08%。20 个移植周期移植胚胎 41 枚, 临床妊娠 6 例, 临床妊娠率 34.82%。结论 玻璃化冷冻技术应用于卵子冷冻保存, 并对复苏卵子进行卵母细胞胞浆内单精子显微注射可以取得一定的临床妊娠率, 在辅助生殖技术临床上具有很强的实用价值。

[关键词] 玻璃化冷冻; 卵子; 卵胞浆内单精子显微注射; 临床结局

[中图分类号] R713.7 **[文献标志码]** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-271X.2016.03.012

Clinical outcome of 27 intracytoplasmic sperm injection cycles with total oocytes cryopreserved using vitrification

SUN Xiao-hua, CHEN Hai-xiao. Reproductive Medicine Center, 174 Hospital of PLA, Xiamen, Fujian 361000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical application value of vitrification cryopreservation of egg in human assistant reproduction. **Methods** A retrospective study was performed on patients underwent IVF/ICSI treatment in the reproductive medicine center in 174 hospital of PLA from 2013 to 2015. 27 couples with infertility without sperm for fertilization or insemination were included. All oocytes were cryopreserved using vitrification and carried ICSI after oocyte were thawed. Basic characteristics, oocytes fertilization and clinical outcomes were analyzed. **Results** Totally 245 oocytes were cryopreserved using vitrification, and 214 oocytes survived. The survival rate was 84.79%; 198 mature oocytes performed ICSI treatment, and 138 oocytes fertilized. The fertilization rate was 74.49%; 99 embryo cleaved after ICSI, and the cleavage rate was 71.74%; 87 2PN embryos formed, and 34 embryos were high-quality embryos. The high-quality embryo rate was 39.08%. 20 cycles performed fresh embryo transfer, and 6 embryos got clinical pregnancy. The clinical pregnancy rate was 34.82%. **Conclusion** A certain clinical pregnancy rate can be achieved in ICSI cycles with total oocytes cryopreserved using vitrification, and oocyte vitrification is practically useful in human assistant reproduction.

[Key words] vitrification; oocyte; intracytoplasmic injection; clinical outcome

辅助生殖技术是 20 世纪医学的一大进展。在中国辅助生殖技术已经进入相对成熟阶段, 体外受精胚胎移植及其衍生技术等在中国已经非常成熟^[1]。但由于受到技术、伦理、法律、道德、宗教等多方面问题影响, 卵子冷冻在中国发展曲折且缓慢。目前玻璃化冷冻技术及卵胞浆内单精子显微注射技术 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 很大程度上解决了卵子冷冻的技术困难, 大大提高了冷冻卵子的复苏存活率及受精率。胚胎玻璃化冷

冻技术已经很成熟, 而卵子的玻璃化冷冻还在摸索阶段。本文回顾性分析 2013 年 1 月-2015 年 12 月在厦门解放军 174 医院生殖医学中心因男方原因未获得可用精子而接受卵子玻璃化冷冻的 27 例患者的妊娠结局, 探讨在体外受精-胚胎移植中, 面对未预期的取精失败行卵子玻璃化冷冻的临床可行性。

1 对象与方法

1.1 对象 2013 年 1 月-2015 年 12 月来厦门解放军 174 医院生殖中心实施体外受精-胚胎移植的 27 位不孕女性患者, 取卵日因男方取精困难未取到精、无精子症行睾丸或附睾穿刺取精失败、男方无法到场等原因未获得可用精子, 无法行体外受精,

作者单位: 361000 福建厦门, 解放军 174 医院生殖医学中心

引用格式: 孙小花, 陈海啸. 卵子玻璃化冷冻复苏后行卵母细胞胞浆内单精子显微注射 27 例临床结局 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(3): 262-264.

将其卵子全部进行玻璃化冷冻。冻卵者平均年龄 31.18 岁,平均不孕年限 4.82 年。冷冻卵子解冻后均进行卵胞浆内单精子注射治疗。

1.2 卵子玻璃化冷冻及解冻方法 本中心采用玻璃化冷冻技术对卵子进行冷冻保存,卵子冷冻在获卵后 2~4 h 内进行,不得超过 8 h。先在室温下准备平衡液(equilibration solution, ES)及冷冻液(vitrification solution, VS)。冷冻时将卵子置于平衡液中 5 min 后转入冷冻液中,在冷冻液中将卵子反复吸放,使卵子尽快下沉,用时不超过 60 s。然后迅速将卵子转移的玻璃化冷冻载体并浸入液氮冷冻。卵子复苏液由中心实验室配置,根据蔗糖浓度高低,将复苏液(warming solution, WS)分为 WS1(高糖)、WS2(中糖)、WS3(低糖)、WS4(无糖)。5 个培养皿第 1 个装 1 mL WS1 在温度 37 °C 下平衡 30 min,另 4 个分别装 1 mL WS2、1 mL WS3、0.5 mL WS4、0.5 mL S4 均在室温(20~25 °C)下平衡 30 min。将装有卵子的玻璃化冷冻载体从液氮中取出,迅速将卵子置入 WS1 中,1 min 后将卵子转移入 WS2 内,放置 3 min,再依次将卵子转移入 WS3、WS4、WS4,分别放置 3 min,卵子形态完全恢复后,将卵子转入培养液中培养。

2 结果

27 例患者共冷冻卵子 245 枚,全部接受卵子解冻。共解冻卵子 245 枚,存活 214 枚,复苏存活率 84.79%。其中 M II 卵 198 枚,并全部行 ICSI,受精 138 枚,受精率 74.49%。卵裂 99 枚,卵裂率为 71.74%,形成 87 枚 2PN 胚胎,优质胚胎 34 枚,优胚率 39.08%。27 例患者共移植胚胎 41 枚,平均移植胚胎数 2.11 个。20 个移植周期中临床妊娠 6 例,临床妊娠率为 34.82%。剩余 10 枚胚胎冷冻保存(表 1)。

27 例患者按年龄分为 4 组,患者年龄 26~35 岁,各年龄段患者卵子玻璃化冷冻复苏后行 ICS 妊娠率见表 1。

3 讨论

自 1986 年首例卵子冷冻-复苏并成功受孕后^[2],冷冻卵子成为保存妇女生育能力的有效储备方式之一。并且越来越多的学者推荐卵子冷冻做为辅助生殖技术重要的组成部分^[3]。因慢速冷冻法无法避免细胞冰晶形成造成的损伤,特别是对于卵子这种体表比例大的细胞^[4]。近年来,卵子玻璃化冷冻在临床上的应用不断扩大。玻璃化冷冻技术是超快冷冻技术,可导致溶液(如胚胎内外的溶液)的固化,低温最终可使溶液形成玻璃样固态物质。玻璃化过程使高浓度冷冻保护剂,保证获得超快冷冻,因此不会有冰晶形成,通过使细胞脱水更加充分,解决了卵子冷冻冰晶损害的问题^[5-7],是目前卵子冷冻的首选方法。本研究将行卵子玻璃化冷冻复苏并行 ICSI 的患者按照年龄分为 4 组,发现不同年龄阶段患者妊娠率不同。本中心卵子冻融后总的临床妊娠率超过 30%,接近冷冻胚胎复苏移植妊娠率。因为样本量较小,其临床可行性仍有待大样本量数据证实。但其在取卵日因男方原因无法获得可用精子的情况下进行卵子冷冻的临床可行性已经明确,并且十分有效。从程序化慢速冷冻到玻璃化冷冻,卵子冷冻方法不断改进和完善。冷冻技术的进展使得卵子冷冻后的复苏率、妊娠率以及出生率均明显提高。

相关文献报道,冷冻和新鲜卵子在胎儿及围产期并发症和先天异常的发生率上并没有显著差异^[8]。然而,目前卵子玻璃化冷冻复苏仍存在一定的临床局限性,如卵子玻璃化冷冻可对卵子造成一定程度的损伤,主要表现为染色体、纺锤体、透明带等损伤^[9]。目前医学上仍缺乏标准的玻璃化冷冻方案,复苏速率、冷冻保护剂浓度、温度控制等各种因素均会影响卵子冷冻复苏成功率^[10];冷冻导致卵子透明带硬化,精子穿透透明带能力下降,卵子冷冻复苏后行 IVF 受精率低^[11],异常受精率增加,ICSI 虽然能在一定程度上提高受精率,降低异常受

表 1 27 例患者卵子玻璃化冷冻复苏后行 ICSI-ET 数据表

年龄分组	卵子复苏 周期数	解冻 卵子数	存活 卵子数	存活率 (%)	M II 卵 子数	正常 受精数	受精率 (%)	2PN 胚胎	优质 胚胎	优质胚 胎率(%)	移植 胚胎数	移植 周期数	冷冻 胚胎数	临床妊 娠例数	妊娠率 (%)
≤25 岁	3	27	23	85.19	23	21	91.30	13	6	46.15	6	3	0	2	66.67
26~30 岁	10	86	81	94.19	65	39	60.00	25	15	60.00	13	6	5	2	33.33
31~35 岁	9	81	77	95.06	75	50	66.67	31	8	25.81	14	7	2	1	14.29
≥36 岁	5	51	33	64.71	35	28	80.00	18	5	27.78	8	4	3	1	25.00
合计	27	245	214	84.79	198	138	74.49	87	34	39.93	41	20	10	6	34.82

精率,但无法避免 ICSI 本身存在的风险。随着医疗技术的发展,卵子玻璃化冷冻不仅仅应用于男方因素无法行 IVF 的卵子保存,还可应用于为年轻未育患者保存生育力,为无卵、卵巢功能早衰患者提供卵子^[12]。冻存人类卵母细胞是一项极具价值和吸引力的技术,在辅助生殖领域上有相当广阔的发展前景。

【参考文献】

[1] 卞雯雯,梁 翠,王欢欢,等. 危机管理在医学生殖中心护理中的应用[J]. 东南国防医药,2013,15(5):534-535.

[2] Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation [J]. *Lancet*, 1986, 1 (8486): 884-886.

[3] Hosseini SM, Nasr-Esfahani MH. What does the cryopreserved oocyte look like? A fresh look at the characteristic oocyte features following cryopreservation [J]. *Repro Biomed Online*, 2016, 32(4): 377-387.

[4] Boldt J. Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte [J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23 (3): 314-322.

[5] Levi-Setti PE, Borini A, Patrizio P, et al. ART results with frozen oocytes: data from the Italian ART registry (2005-2013) [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33 (1): 123-128.

[6] Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(6): 1996-2000.

[7] Solé M, Santaló J, Boada M, et al. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(8):2087-2092.

[8] Levi Setti PE, Albani E, Morengi E, et al. Comparative analysis of fetal and neonatal outcomes of pregnancies from fresh and cryopreserved/thawed oocytes in the same group of patients [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(2):396-401.

[9] 朱伟杰,李 菁. 冷冻保存对人类卵子结构与功能的影响[J]. *生殖与避孕*, 2005, 25(7):418-424.

[10] Cai LB, Qian XQ, Wang W, et al. Oocyte vitrification technology has made egg-sharing donation easier in China [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(2):186-190.

[11] 孙贻娟,冯 云,张爱军,等. 人成熟卵母细胞玻璃化冷冻技术的临床应用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(7):111-113.

[12] 曹金凤,郝桂敏,赵志明,等. 卵子玻璃化冷冻在体外授精胚胎移植周期中的临床应用 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(16): 2599-2601.

(收稿日期:2016-03-04;修回日期:2016-03-16)

(本文编辑:齐 名; 英文编辑:王建东)

(上接第 258 页)

[8] Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2014, 6(5): 112-20.

[9] 胡团敏,郑溪水,黄永德,等. 内镜下置入不同型号食管支架疗效观察[J]. *东南国防医药*, 2006, 8(1): 25-26.

[10] 裴庆山,刘吉勇. 食管支架研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(30): 3410-3415.

[11] Vlegaar FP, Siersema PD. Expandable stents for malignant esophageal disease[J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2011, 21 (3): 377-388.

[12] Conio M, Repici A, Battaglia G, et al. A randomized prospective comparison of self-expandable plastic stents and partially covered self-expandable metal stents in the palliation of malignant esophageal dysphagia [J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102 (12): 2667-2677.

[13] Vanbiervliet G, Filippi J, Karimjee BS, et al. The role of clips in preventing migration of fully covered metallic esophageal stents: a pilot comparative study[J]. *Surg Endosc*, 2012, 26(1): 53-59.

[14] Nagaraja V, Cox MR, Eslick GD. Safety and efficacy of esophageal stents preceding or during neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2014, 5(2): 119-126.

[15] Mezes P, Krokidis ME, Katsanos K, et al. Palliation of

esophageal cancer with a double-layered covered nitinol stent: long-term outcomes and predictors of stent migration and patient survival [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2014, 37 (6): 1444-1449.

[16] Kim MD, Park SB, Kang DH, et al. Double layered self-expanding metal stents for malignant esophageal obstruction, especially across the gastroesophageal junction[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(28): 3732-3737.

[17] Park JG, Jung GS, Oh KS, et al. Double-layered PTFE-covered nitinol stents: experience in 32 patients with malignant esophageal strictures [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2010, 33 (4): 772-779.

[18] Freeman RK, Ascoti AJ, Wozniak TC. Postoperative esophageal leak management with the Polyflex esophageal stent[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133(2): 333-338.

[19] Hünerbein M, Stroszczyński C, Moesta KT, et al. Treatment of thoracic anastomotic leaks after esophagectomy with self-expanding plastic stents[J]. *Ann Surg*, 2004, 240(5): 801-807.

[20] Langer FB, Wenzl E, Prager G, et al. Management of postoperative esophageal leaks with the polyflex self-expanding covered plastic stent[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 79(2): 398-403.

(收稿日期:2016-01-16;修回日期:2016-02-25)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)