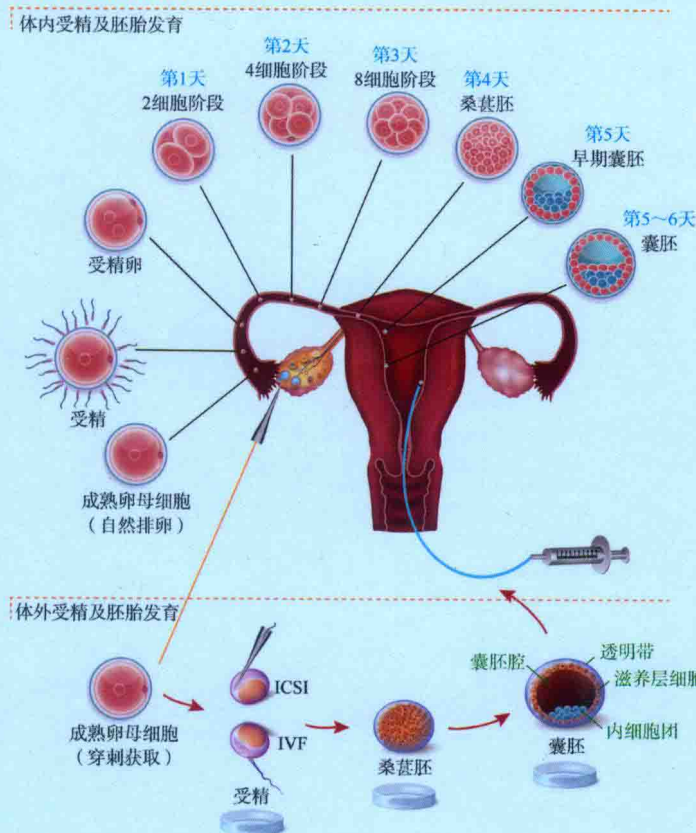


囊胚玻璃化冷冻

——从胚胎实验室到临床

主 编 王秀霞 李 达



科学出版社

囊胚玻璃化冷冻

——从胚胎实验室到临床

主 编 王秀霞 李 达

副主编 杨大磊 方媛媛

编 委 (以姓氏笔画为序)

王秀霞 中国医科大学附属盛京医院

方媛媛 中国医科大学附属盛京医院

冯 迪 中国医科大学附属盛京医院

李 达 中国医科大学附属盛京医院

杨大磊 中国医科大学附属盛京医院

焦 娇 中国医科大学附属盛京医院



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在讲解囊胚形成和发育相关理论的同时,在充分描述治疗过程和细节的背景下,首次将不孕因素(输卵管因素、排卵障碍、子宫内膜异位症、卵巢储备功能下降、男方因素、双方因素、不明原因等)、IVF 治疗策略、配子特征、囊胚发育及行玻璃化冷冻前后的形态学特征与移植后结局系统描述,同时通过实时收集的 500 余幅代表性图像使读者直观领会其中要点。

本书可供生殖医学、发育生物学、低温冷冻学及相关专业的医生、胚胎学工作者、科研人员、教师和学生阅读使用。

图书在版编目(CIP)数据

囊胚玻璃化冷冻:从胚胎实验室到临床 / 王秀霞,李达主编. —北京:科学出版社, 2019.8

ISBN 978-7-03-061426-1

I. ①囊… II. ①王… ②李… III. ①人体胚胎学—冷冻胚胎—实验胚胎学 IV. ①R321-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 111362 号

责任编辑:戚东桂 / 责任校对:张小霞
责任印制:肖 兴 / 封面设计:龙 岩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

三河市春园印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2019年8月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2019年8月第一次印刷 印张: 14 3/4

字数: 341 000

定价: 148.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

近 30 年，胚胎培养技术的迅速发展显著促进了囊胚培养与囊胚移植技术的临床应用。当前，在人类辅助生殖技术的实践过程中，单囊胚移植已被普遍采用，同时对需冷冻囊胚有效并可靠的低温保存方法也随之不断更新。相比细胞胚，囊胚存在囊腔和体积更大、细胞数量更多、结构更复杂的特点，因此对冷冻技术的要求也相应更高。在此背景下，囊胚的玻璃化冷冻技术应运而生。玻璃化冷冻即进入细胞内高浓度的冷冻保护剂，在快速降温过程中，使溶液呈现为一种极其黏稠、介于液体和晶体之间的“玻璃态”，从而阻止冰晶形成对细胞造成物理和化学损伤的冷冻方式。多年来的临床实践证明，玻璃化冷冻是一种可靠的囊胚冷冻技术，同时正是这种技术使囊胚复苏后实现了“近乎完美”的着床率、临床妊娠率和活产率，极大地促进了单囊胚移植的推广应用。

那么玻璃化冷冻的特点和优势在哪里？冷冻前后如何筛选出更具有发育潜能的囊胚？如何解读不同不孕因素来源的囊胚、具备不同发育和形态特点的囊胚与移植后结局的关系？这些仍是生殖工作中持续受到关注的热点和难点问题。截至目前，基于形态学的定性方法仍然是最简单、行之有效的囊胚评价手段。但由于客观条件和技术限制，我们无法利用实时成像分析系统了解胚胎在冷冻过程中的形态学变化。因此，目前尚未有书籍围绕囊胚玻璃化冷冻前后的形态学及细胞学特征，系统介绍囊胚发育及移植后结局相关的理论知识和前沿进展。

本书在编写上注重将理论与实践运用于一体，全面追踪最新进展，内容深入浅出且应用性强，以切实解决实践中的问题。希望本书的出版能够帮助广大的生殖医学工作者系统地理解囊胚相关知识，尤其是囊胚行玻璃化冷冻后从胚胎实验室到临床结局之间的潜在联系。

由于时间仓促和学识有限，书中疏漏之处在所难免，敬请读者斧正。

中国医科大学附属盛京医院

李 达

2019 年 3 月

目 录

第一章 囊胚概述	1
第一节 囊胚形态学评价	2
第二节 可利用囊胚与优质囊胚评价	8
第三节 囊胚培养体系评价	9
第四节 囊胚形态学评价与临床结局	10
第五节 囊胚辅助孵化	10
第六节 囊胚移植与卵裂期胚胎移植	12
第七节 辅助生殖技术、囊胚移植与单卵双胎	12
第二章 胚胎玻璃化冷冻与复苏技术	17
第一节 胚胎在冷冻及复苏过程中的损伤形式	17
第二节 冷冻保护剂的分类及技术原理	18
第三节 玻璃化冷冻	19
第四节 开放冷冻载体与封闭冷冻载体	20
第五节 囊胚的人工皱缩与玻璃化冷冻	21
第六节 自动玻璃化冷冻设备	22
第三章 临床诊治与冻融囊胚形态学特征	27
第一节 输卵管性不孕与冻融囊胚形态学特征	27
第二节 排卵障碍性不孕与冻融囊胚形态学特征	119
第三节 子宫内膜异位症不孕与冻融囊胚形态学特征	139
第四节 卵巢储备功能下降与冻融囊胚形态学特征	145
第五节 男性不育与冻融囊胚形态学特征	151
第六节 双方因素不孕与冻融囊胚形态学特征	189
第七节 不明原因不孕与冻融囊胚形态学特征	225
第四章 异常或特殊囊胚形态学特征	227
缩略词	229

第一章

囊胚概述

囊胚 (blastocyst) 是受精卵卵裂过程中, 由桑葚胚进一步发育所形成的球形幼胚, 它由内细胞团 (inner cell mass, ICM)、滋养层细胞 (trophectoderm cell, TE)、囊胚腔和透明带构成。在人类中, 囊胚常形成于受精后第 5 天, 直径介于 0.1 ~ 0.2 mm, 由 200 ~ 300 个细胞组成, 囊胚多于形成后 1 天 (受精后 5 ~ 6 天) 到达宫腔, 脱掉透明带后, 准备开始植入子宫, 囊胚完全嵌入子宫内膜通常发生于受精后的 11 ~ 12 天 (图 1-1, 图 1-2)。

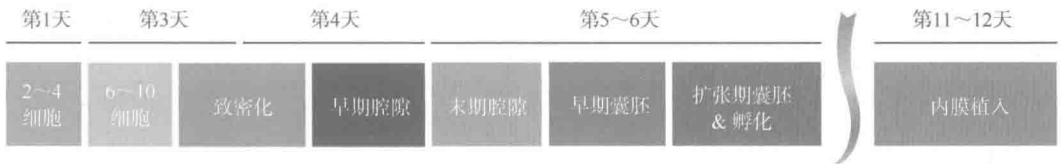


图 1-1 囊胚发育及植入

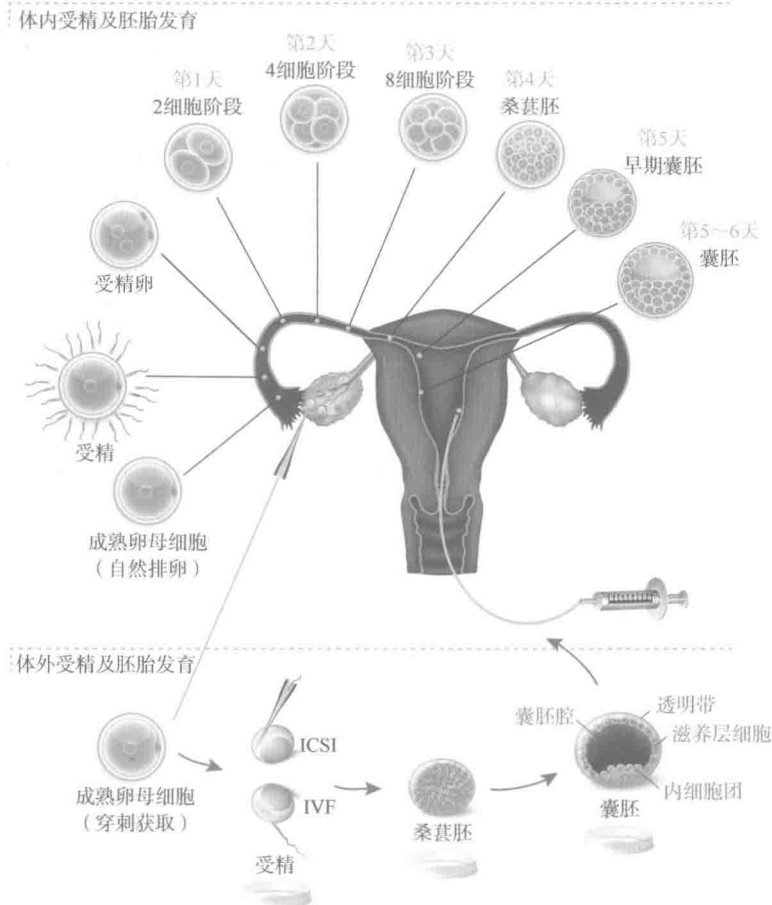


图 1-2 囊胚发育及移植

20 世纪 90 年代初, 胚胎培养技术的迅速发展显著促进了囊胚培养与囊胚移植技术的临床应用。在试管婴儿技术助孕的过程中, 囊胚培养有利于筛选更具有发育潜能的胚胎, 同时囊胚移植于子宫腔内, 其植入过程更接近于自然状态^[1,2], 因此, 在某种程度上, 囊胚培养可以获得更高的植入率, 进而减少胚胎移植数量和相应的多胎妊娠^[2]。

第一节 囊胚形态学评价

如何筛选出更具有发育潜能的囊胚, 如何判断不同期别和级别的囊胚与临床妊娠率之间的关系, 持续受到生殖界与学界的广泛关注。截至目前, 基于形态学的定性方法仍然是最简单、行之有效的囊胚评价手段。

1993 年, Dokras 提出了较为简易的三级评分法^[3] (表 1-1), 但该方法主观性较强, 几乎无任何量化指标, 因此较少被应用。1999 年 Schoolcraft 和 Gardner 提出的囊胚评分系统^[4] (表 1-2), 是从囊胚扩张程度、内细胞团和滋养层细胞的发育情况来进行评估, 因其具有更多详细及客观的指标, 很快便被大多数中心广泛应用。随后出现的一些评分系统也都是在 Gardner 评分系统基础上进行改良, 包括 2011 年提出的伊斯坦布尔共识^[5] (表 1-3), 即是以 Gardner 评分系统为基础进行了数字化转换, 目的是可以将评分录入数值型数据库, 便于统计分析。2016 年中国人类体外受精-胚胎移植实验室操作专家共识^[6] (表 1-4), 在 Gardner 评分的基础上做了更进一步的细化, 有效降低了人员主观因素导致的差异。该系统推荐在囊腔完全扩张的阶段进行评估, 因为此阶段的内细胞团和滋养层细胞更为清晰, 而且囊胚在此阶段发育的时间较长, 评估结果更为客观。该系统还加入了对内细胞团和滋养层细胞更为具体的量化评估指标 (如大小、数量等) (表 1-4), 但囊胚的发育速度及质量会受临床的促排方案、实验室的培养条件、培养液的品牌及观察的时间点等多因素影响, 因此这些量化指标能否作为划分囊胚质量的标准, 还需要大量数据和临床研究来支持。

表 1-1 Dokras 人类囊胚评级

评级	形态描述
BG1	典型的发育, 早期形成偏心囊腔, 随后完全扩张为具有清晰 ICM 和 TE 的囊胚
BG2	形成单个或多个过渡阶段的囊腔, 但通常在 24 ~ 48 小时后才形成与 BG1 形态相似的囊胚
BG3	ICM 见多处退化灶 (细胞呈现黑色和坏死样) 并且囊腔塌陷 24 小时内不恢复扩张, 或者虽然形成囊腔但退化灶广泛存在

注: BG, blastocyst grades, 囊胚分级。

表 1-2 Gardner & Schoolcraft 人类囊胚评级系统

根据囊胚扩张程度和孵出状态分为 6 期:

分期	名称	形态描述	例图
1 期	早期囊胚	囊胚腔 < 胚胎总体积的 1/2	图 1-3
2 期	早期囊胚	囊胚腔 ≥ 胚胎总体积的 1/2	图 1-4
3 期	囊胚	囊胚腔完全扩张充满整个胚胎	图 1-5
4 期	扩张期囊胚	胚胎体积明显增大且透明带变薄	图 1-6
5 期	孵出囊胚	滋养外胚层细胞开始从透明带疝出	图 1-7
6 期	完全孵出囊胚	囊胚全部从透明带中孵出	图 1-8

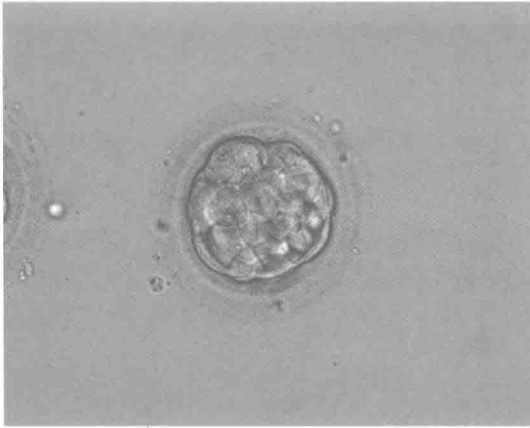


图 1-3 1期囊胚，囊胚腔 $<$ 胚胎总体积的 $1/2$ ，形成于D5 ($\times 200$)

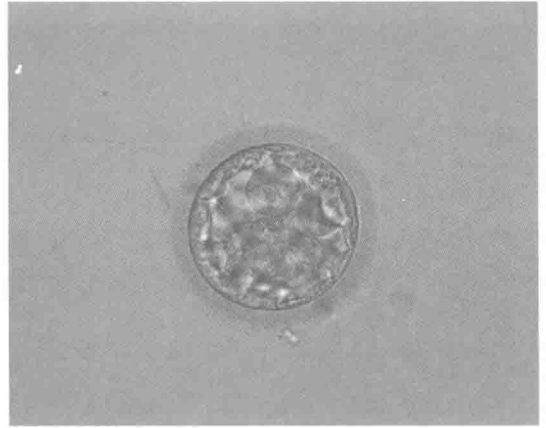


图 1-4 2期囊胚，囊胚腔 \geq 胚胎总体积的 $1/2$ ，形成于D5 ($\times 200$)

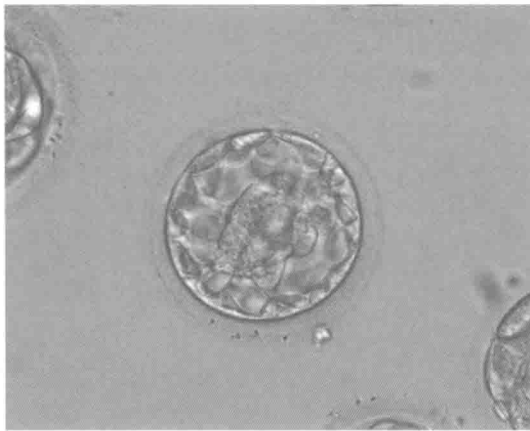


图 1-5 3期囊胚，囊胚腔完全扩张充满整个囊胚，形成于D5 ($\times 200$)

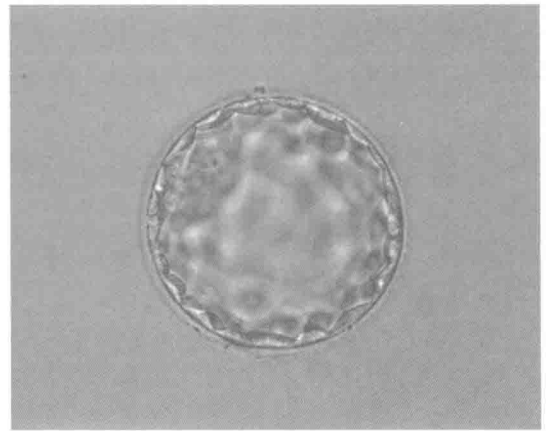


图 1-6 4期囊胚，囊胚体积明显增大且透明带变薄，形成于D5 ($\times 200$)

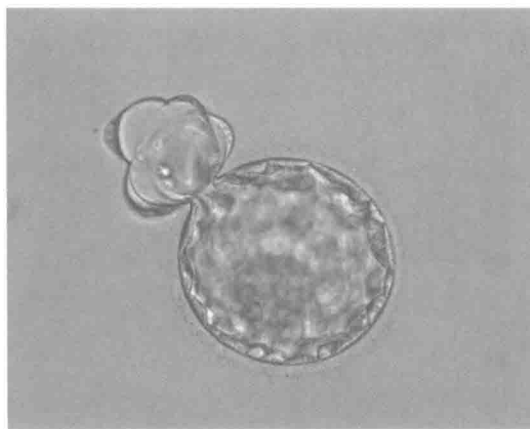


图 1-7 5期囊胚，部分滋养层细胞正在从透明带中孵出，形成于D5 ($\times 200$)

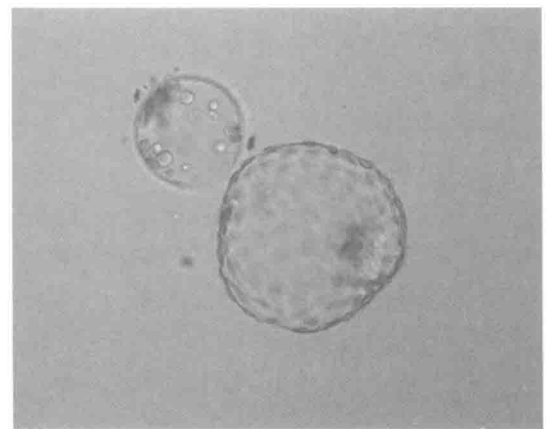


图 1-8 6期囊胚，囊胚全部从透明带中孵出，透明带内可见明显碎片残留，形成于D6 ($\times 100$)

3~6期囊胚还需对 ICM 和 TE 进行分级:

评级	ICM	例图	TE	例图
A	细胞数量多且紧致	图 1-9	较多细胞组成结合紧密的上皮细胞	图 1-12
B	少数细胞松散排列	图 1-10	少数细胞组成	图 1-13
C	细胞数极少	图 1-11	极少细胞组成的松散上皮细胞	图 1-14

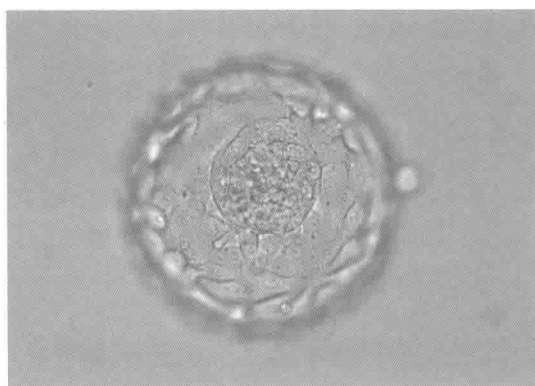


图 1-9 内细胞团细胞数多且紧致,为 A 级(×200)

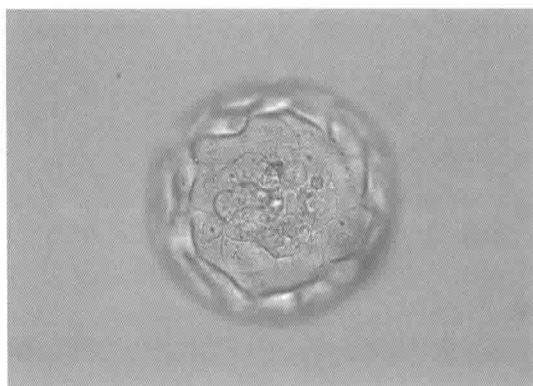


图 1-10 内细胞团少数细胞松散排列,为 B 级(×200)



图 1-11 几乎无法辨认内细胞团,且存在退化坏死灶,箭头所示(×200)

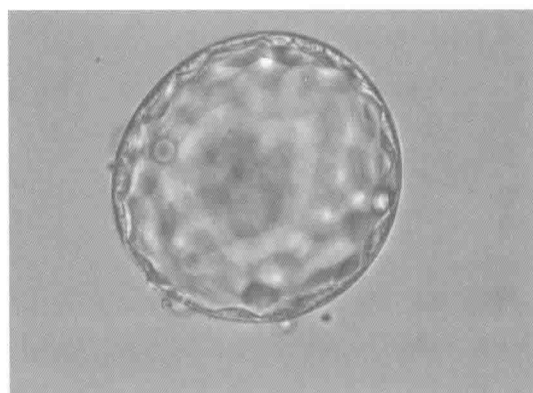


图 1-12 较多滋养层细胞且排列紧密,为 A 级(×200)



图 1-13 滋养层细胞较少,排列不够均匀,为 B 级(×200)

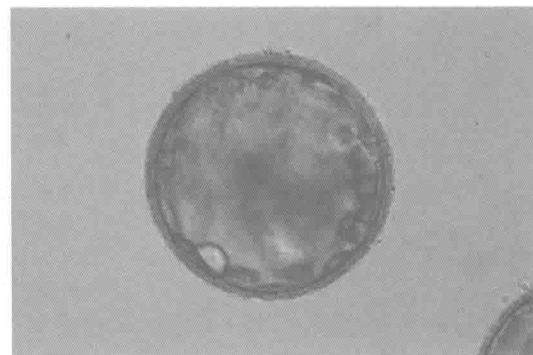


图 1-14 滋养层细胞极少,为 C 级。此胚胎透明带着色(×200)

表 1-3 Istanbul 共识囊胚评级系统

	评分	等级	形态描述
发育阶段	1		早期囊胚
	2		囊胚
	3		完全扩张囊胚
	4		正在孵出或完全孵出囊胚
ICM	1	好	清晰易辨, 有较多细胞融合且黏附紧密
	2	中等	易辨, 由较多细胞松散组合在一起
	3	差	难辨, 细胞很少
TE	1	好	较多细胞组成结合紧密的上皮细胞
	2	中等	少量细胞组成松散的上皮细胞
	3	差	细胞数极少

注: ICM 和 TE 的评分 1~3 分相当于 Gardner 的 A~C 级, 完全扩张的囊胚具有好的 ICM 和中等的 TE 评分, 即为 312。

表 1-4 2016 年中国专家共识细化的扩张期囊胚形态学评分标准

评分	ICM	例图
A	形态规则, 直径在 60 μm 以上, 细胞大小均匀, 融合	图 1-15
B	形态不规则, 直径在 60 μm 以上, 细胞大小不均匀, 有相当一部分没有融合	图 1-16
C	明显小于正常大小, 细胞数极少	图 1-17
评分	TE	例图
A	沿囊胚“赤道面”分布的细胞数明显超过 10 个, 大小均匀, 在囊胚底面全部形态清晰, 大多数可见细胞核	图 1-18
B	沿囊胚“赤道面”分布的细胞数 10 个左右, 大小欠均匀, 在囊胚底面的部分细胞形态清晰, 部分可见细胞核	图 1-19
C	沿囊胚“赤道面”分布的细胞数明显少于 10 个, 大小明显不均匀, 滋养层细胞与透明带之间有明显的碎片残留, 囊胚底面的细胞难以辨认	图 1-20

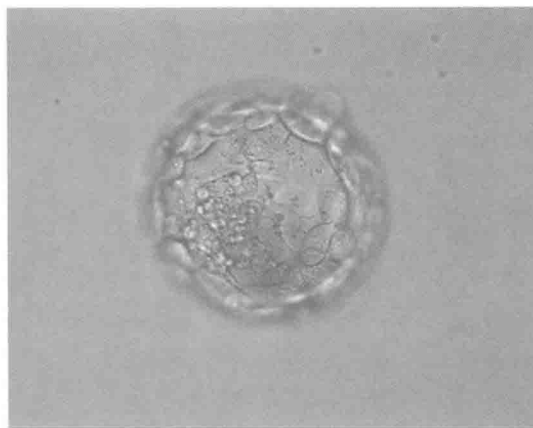
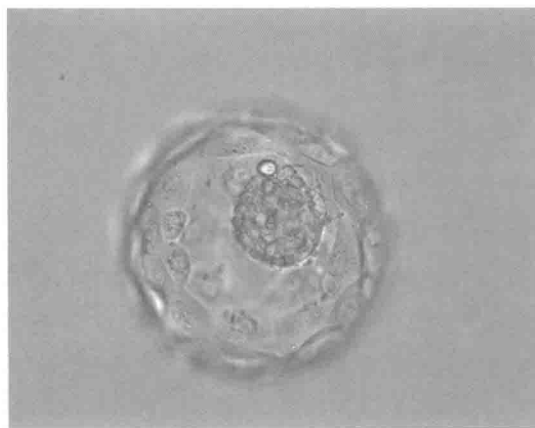


图 1-15 ICM 形态规则, 直径约 75 μm , 且细胞紧致、融合, 为 A 级 ($\times 200$)

图 1-16 虽然 ICM 直径短轴约 70 μm , 长轴约 90 μm , 但形态不规则, 且细胞排列松散, 大小不均, 为 B 级 ($\times 200$)

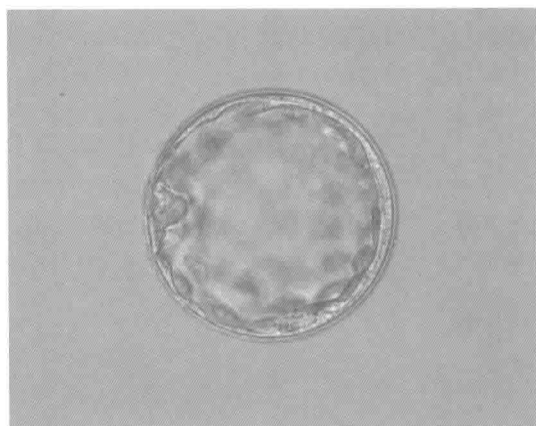


图 1-17 ICM 明显小于正常大小，细胞数极少，为 C 级 ($\times 200$)

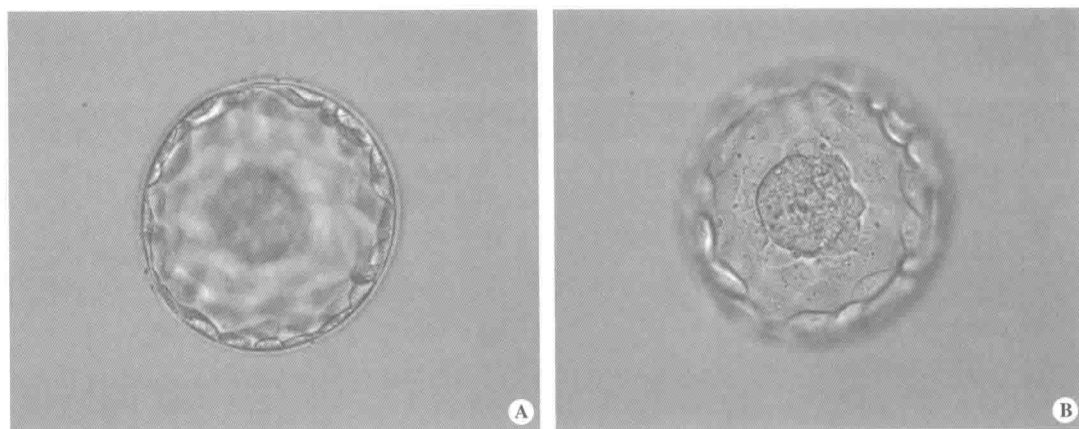


图 1-18 沿囊胚“赤道面”分布的滋养层细胞数约 15 个，大小均匀 ($\times 200$) (A)；囊胚底面细胞形态清晰，大多数可见细胞核 ($\times 200$) (B)，为 A 级囊胚

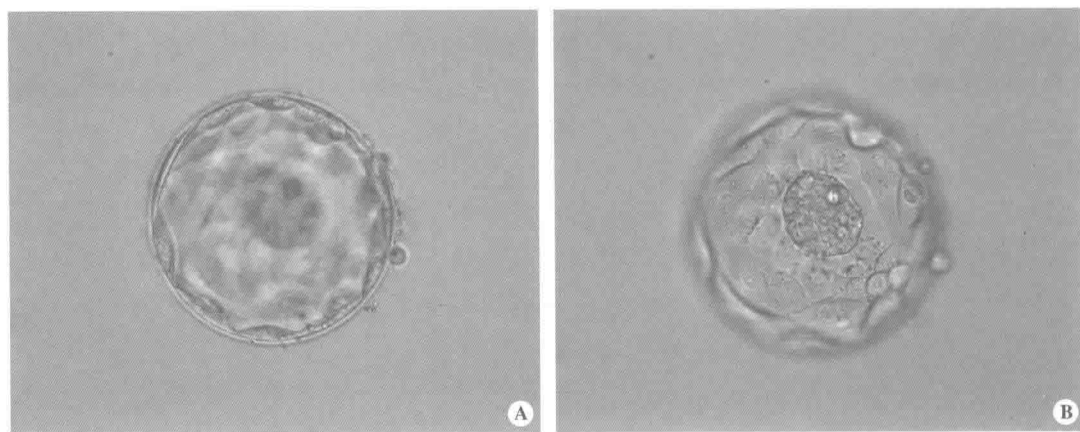


图 1-19 沿囊胚“赤道面”分布的滋养层细胞数约 10 个，大小欠均匀 ($\times 200$) (A)；在囊胚底面的部分细胞形态清晰，部分可见细胞核 ($\times 200$) (B)，为 B 级囊胚

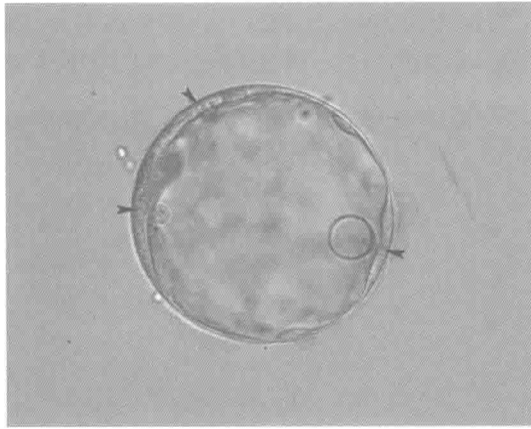


图 1-20 沿囊胚“赤道面”分布的滋养层细胞数明显少于 10 个，大小明显不均匀，为 C 级。滋养细胞与透明带之间有明显的细胞或碎片残留，箭头所示（×200）

另外，在囊胚的观察过程中还有一些在各评分系统中未被提及的其他现象。

1. 通过 time-lapse 观察会发现部分囊胚在扩张和孵出过程中会出现单次或多次不同程度的皱缩和再扩张，这种被认为是囊胚发育的正常现象。如果静态观察时，囊胚恰巧处于皱缩状态，可以等待 1~2 小时，待囊胚重新扩张后再行评估^[5,7]。但也有文献报道，出现囊腔塌陷的囊胚虽不影响孵出，但囊胚种植率显著下降，推测可能是由于反复皱缩再扩张产生的机械应力和大量的能量消耗影响了囊胚的后续发育^[8]。另一项研究则认为只有出现多次塌陷的囊胚才会影响其活产率，但这并不能作为独立的预测指标^[9]。

2. 细胞退化现象（图 1-21），Hardy 等研究显示囊胚死亡细胞的数量会随着体外培养时间的延长而增加，D5 和优质 D6 囊胚死亡细胞指数 < 10%，而 D6 的低质量囊胚细胞死亡指数增加至 27%^[10]。当囊胚大面积出现退化死亡细胞时，将是不可逆的且将持续退变，这类胚胎无种植潜能^[11]。

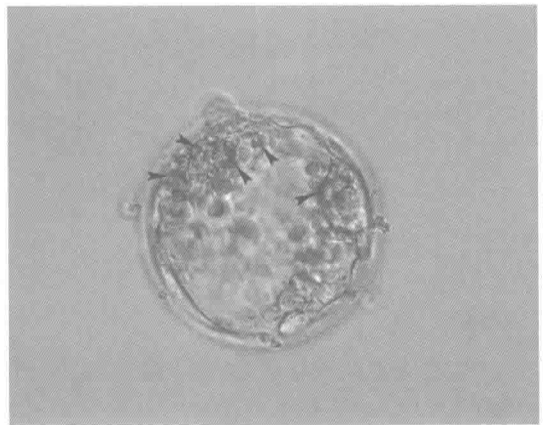


图 1-21 多处细胞呈黑色、退化样改变，箭头所示（×200）

3. 胚胎在卵裂期形成的碎片多数会在随后的胚胎致密化过程中被排除在细胞团外，还有部分未参与致密化的卵裂球也同样会被排除，这些碎片和大细胞便会残留在卵周间隙甚至囊胚腔内，尤其当囊胚出现自然塌陷或经过冷冻前的人工皱缩后会更加明显（图 1-22）。

Kovacic 等研究报道，与优质囊胚相比，含有碎片和大细胞残留的囊胚活产率显著降低^[12]。也有学者认为碎片和大细胞的残留对种植率没有明显影响，只是会影响囊胚评级^[7]，并且大细胞的残留也可能是一种胚胎自我修复的机制^[13]。

4. 正在孵出的囊胚在观察时往往会呈现两种不同的孵出类型：一种是细胞从透明带

开口很小处孵出，形成类似“8”字形的状态（图 1-23）；另一种则是从透明带开口较大处孵出，形成类似“U”字形的状态（图 1-23）。截至目前，“8”字形孵出、“U”字形孵出与单卵双胞胎的关系仍有争议^[14-16]，值得关注。

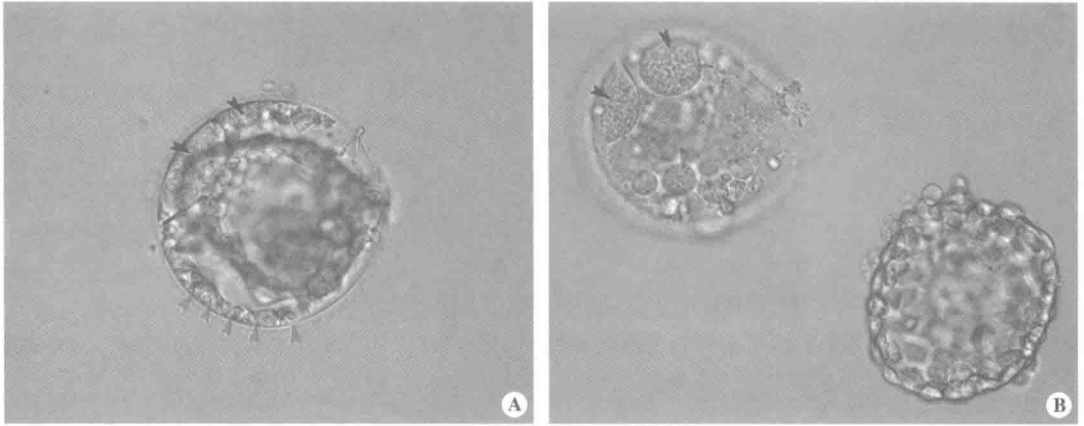


图 1-22 冷冻前行人工皱缩后的囊胚，可见大量细胞（蓝色箭头）和碎片残留（绿色箭头）（×200）（A）；自然孵出的 6 期囊胚，透明带（左上）内可见大量细胞（蓝色箭头）和碎片残留（绿色箭头）（×200）（B）

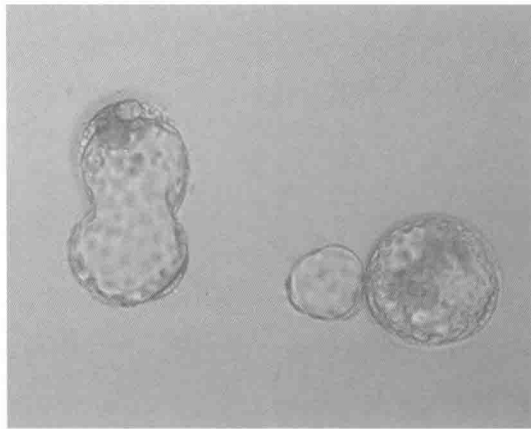


图 1-23 图中两枚正在孵出的 5 期囊胚，左侧囊胚透明带开口较大，形似“U”字；右侧囊胚透明带开口较小，形似“8”字（×100）

总之，客观量化指标越详细，囊胚评价的主观性差异就越小，预测胚胎种植潜能的意义就更大。

第二节 可利用囊胚与优质囊胚评价

早在 2004 年，Gardner 建议 3BB 以上级别的囊胚具有移植或冷冻价值^[17]。然而伴随着囊胚培养体系和冷冻技术的不断进步，以及工作中时常观察到的内细胞团或滋养层细胞在 C 级时的囊胚移植后成功妊娠（排除内细胞团和滋养层细胞同时 C 级），3BB 这

一较高标准对囊胚的“错杀”似乎已不适用于大多数中心。因此我们在与国内外同行广泛交流后,建议可以将D5和D6 3BB以上级别囊胚定义为优质囊胚(AA, AB, BA, BB);将3期以上除外细胞团和滋养层细胞同时为C级别的囊胚定义为可利用囊胚(AA, AB, AC, BA, BB, BC, CA, CB)^[18],但鉴于可利用囊胚这一概念的主观性,维也纳共识里也较宽泛地将可利用胚胎/囊胚定义为用于冷冻及移植的胚胎。

第三节 囊胚培养体系评价

众所周知,对于囊胚的形态学描述和评价受限于多种因素,尤其会受培养液成分、培养条件(如 PO_2)、观察时间、观察人员的专业素质等因素影响。在某些层面上,由于胚胎培养方式的不同,国际上对于囊胚培养的评价和国内略有不同。

2017年ESHRE及Alpha专家制定的维也纳共识(The Vienna Consensus)建议将如下4个参数作为囊胚培养和移植的评价指标(表1-5):囊胚形成率(blastocyst development rate)、优质囊胚形成率(good blastocyst development rate)、优质囊胚比率(the proportion of good quality blastocysts)、D5囊胚移植率(day 5 embryo transfer rate)。然而,针对囊胚培养体系评价指标的计算,由于囊胚培养策略不同,在中国和国际上有一个显著差异。中国大多数中心会选择性地进行囊胚培养,然而在国际上,以美国为例,大多数中心所获得的D3胚胎中极高比例,甚至全部进行囊胚培养,因此这些中心较容易以2PN合子数作为评价囊胚形成率的分子,而中国的中心则多以卵裂期胚胎数($D3 \geq 4$ 细胞的胚胎数)作为分母进行计算。

表 1-5 维也纳共识囊胚培养质量评价

	计算方式	能力值 / 基准值	指标价值
囊胚形成率	D5 囊胚 / 2PN 合子 D5 囊胚: 受精后(116 ± 2)小时, 由正常受精卵发育形成的囊胚, 不考虑囊胚分期及质量	≥ 40% / ≥ 60%	评价从受精卵到囊胚形成的培养效能
优质囊胚形成率	D5 优质囊胚 / 2PN 合子	≥ 30% / ≥ 40%	评价从受精卵到优质囊胚形成的培养效能
优质囊胚比率	优质囊胚数 / 形成的囊胚数	NA	NA
D5 囊胚移植率	在 D1 ≥ 1 枚 2PN 的周期中, D5 至少具有 1 枚可利用囊胚周期的比例	NA	反映培养体系效能, 但干扰因素众多(受囊胚培养体系及条件、观察及评价时间和标准、移植策略、PGD/PGS 的使用等影响), 因此不同中心指标变异范围较大

注: NA. not applicable, 不适用。

2018年9月中华医学会生殖医学分会制定的“胚胎实验室关键指标质控专家共识”建议: 将囊胚形成率作为胚胎实验室的关键指标; 将优质囊胚形成率、优质囊胚比率、

D5 囊胚移植率作为胚胎实验室的一般指标。

囊胚形成率中的囊胚定义为受精后 (116±2) 小时, 由正常受精卵发育形成的囊胚, 不考虑囊胚分期及质量。囊胚形成率 = (D5/D6/ 总的囊胚数) / 正常受精卵子数 × 100%。

优质囊胚定义为 Gardner 评分标准中 3 期及 3 期以上且内细胞团和滋养层评分不含 C 的囊胚。优质囊胚形成率 = 优质囊胚数 / 正常受精卵子 × 100%。

优质囊胚比率 = 优质囊胚数 / 囊胚形成数 × 100%。

D5 囊胚移植率 = 至少有 1 个由正常受精卵发育而来 D5 可利用囊胚的周期数 / 囊胚培养周期数 × 100%。

第四节 囊胚形态学评价与临床结局

在体外受精 - 胚胎移植 (IVF-ET) 的治疗中, 胚胎发育潜能的正确评价是未来获得良好妊娠结局的基本保障^[19]。迄今为止, 基于形态学的评价方法仍是最简单、行之有效的囊胚筛选手段, 如上已详细介绍囊胚形态学评分, 如下将系统评述近些年来囊胚形态学特征与临床结局的可能关系。

桑葚胚阶段的胚胎进一步发育, 细胞开始分化, 聚集在胚胎一侧的细胞团, 称为内细胞团, 将发育成胎儿的各种组织, 而沿透明带内壁扩展和排列的细胞, 称为滋养层细胞, 将发育成胚膜和胎盘。理论上来说, 虽然内细胞团和滋养层细胞的发育潜能不同, 但对后期胎儿的发育均至关重要。然而更多的研究支持滋养层细胞的形态学特征, 对囊胚的发育潜能和生殖结局更具预测价值^[20-24], 而以内细胞团作为预测手段的证据并不多见^[25]。

随着胚胎的进一步发育, 胚胎的内部开始出现含有液体的囊胚腔, 这个时期的胚胎叫做囊胚, 伴随着囊胚腔的不断扩张, 囊胚的发育日渐成熟。值得注意的是, 大量研究建议囊胚的发育速度 (D5 囊胚显著优于 D6 囊胚)^[26,27]、新鲜囊胚囊胚腔的扩张速度和冷冻复苏囊胚囊胚腔的再扩张速度与生殖结局关系密切^[20,24,26,28,29], 甚至有研究建议囊胚的扩张程度与染色体倍性有一定联系^[30], 可见囊胚扩张这一动态过程似乎更能反映囊胚的发育潜能。

另外, 仍然有一些非主流的研究建议: 囊胚的形态与染色体的倍性有关^[31,32]; 囊胚发育的速度与染色体非整倍体有关^[31]; 性别与囊胚级别有关, 男性胚胎发育更快速^[33]; 更高评级的滋养层细胞与男性倾向可能有一定联系^[30], 但这些证据的可靠性仍值得商榷。

第五节 囊胚辅助孵化

人为地破坏透明带的技术被称为辅助孵化, 就是利用激光、机械或化学等方法在胚

胎透明带上制造一处缺损或裂隙(图 1-24),有利于胚胎从透明带孵出,增加着床的可能性。然而辅助孵化技术是否能改善临床妊娠结局仍存在风险和争议^[34]。

辅助孵化可能通过下列三种机制改善胚胎植入:①体外受精、冷冻保存或细胞培养会引起透明带硬化^[35,36],辅助孵化可以解决这类问题;②辅助孵化可能与胚胎植入预期有关^[37],用外源性促性腺激素进行卵巢刺激的患者植入窗口期相比自然周期患者提前了1~2天^[38];③人工开放透明带也可以促进胚胎和子宫内膜之间的代谢产物、生长因子和信息的交换^[39]。

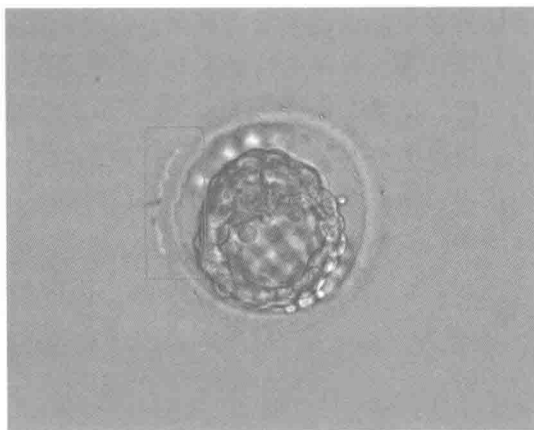


图 1-24 复苏后 4 期囊胚,利用激光将透明带打掉其周长的 1/5 ~ 1/4 (红框处)($\times 200$)

就辅助孵化技术是否能够改善其他重要的临床结局,如活产率、多胎妊娠率等,以及是否与一些不良妊娠结局如流产率相关等,早期两篇 Meta 分析提出了这些问题的分析结果^[40,41]。然而这两篇研究存在一些显著的研究限制,例如,Carney 等使用的是固定效应模型,而没有采用更合理的随机效应模型来分析和报道关于辅助孵化的研究结果^[40];同时这两项研究使用了差异的风险评估体系,包括不同的数据源论文,因此得出的结论需要谨慎理解。

近期的研究遵循国际公认的 PRISMA 声明,对最新的涉及辅助孵化的随机对照试验进行了系统回顾,在增加研究统计学效能的同时,对以往的研究结果进行了更新,该研究结果显示^[42]:

1. 就临床妊娠率而言,辅助孵化能够适度提高临床妊娠率(证据 B 级);相比 IVF, ICSI 可以适度提高临床妊娠率(证据 A 级);既往有不良 IVF 结局的新鲜胚胎移植可以适度提高临床妊娠率(证据 B 级);既往无不良 IVF 结局的冻融胚胎移植可以明显提高临床妊娠率(证据 A 级)。

2. 就活产率而言,没有证据提示辅助孵化能够增加活产率(证据 C 级)。

3. 就多胎妊娠率,辅助孵化可以明显提高多胎妊娠率(证据 B 级);相比化学法和机械法,激光法可以明显提高多胎妊娠率(证据 A 级);相比 IVF, ICSI 可以明显提高多胎妊娠率(证据 B 级);相比冻融胚胎移植,新鲜胚胎移植可以明显提高多胎妊娠率(证据 B 级);既往无不良 IVF 结局的新鲜胚胎移植可以显著提高多胎妊娠率(证据 A 级)。

4. 就流产率而言,没有证据提示辅助孵化能够增加流产率(证据 C 级)。

结果的证据级别定义为:A 级,支持或反对该建议的证据强有力;B 级,支持或反对该建议的证据中等强度;C 级,没有足够的证据来支持或反对该建议。

一项临床对照试验评估了 134 名应用激光辅助孵化技术后的新生儿结局,该研究发现主要先天畸形率(2.2%)和轻度先天畸形率(10.4%)并未显著增加,同期同机构的所有新生儿这两项畸形率分别为 3.0% 和 11.1%^[43]。未来仍需开展更多临床对照试验,进一

步研究新生儿其他系统的畸形。另外，由于还没有充分证据能够证明辅助孵化确实有利于妊娠结局，美国生殖技术协会和美国生殖医学会建议： ≥ 38 岁的女性或胚胎质量较差的女性，在至少有两个移植周期失败的基础上，选择性地应用辅助孵化技术。

据目前研究分析，辅助孵化可能会提高部分特殊人群的临床妊娠率和多胎妊娠率，但未来仍需更多更广的更高级别的试验来研究辅助孵化技术对活产、流产和其他长期妊娠结局的影响。

第六节 囊胚移植与卵裂期胚胎移植

首先比较确定的是，囊胚培养更适宜应用于在 IVF 过程中获卵数和胚胎数较多或胚胎需要进行遗传学诊断和筛查的人群。另外，虽然有研究建议，与卵裂期胚胎相比，在新鲜移植周期^[1,44]和解冻移植周期中^[45]，囊胚移植会提高活产率（证据级别均不高）；也有研究报道，在 Good-Prognosis 人群中，囊胚移植会提高活产率^[46]，但值得注意的是：

1. 在 Unselected 和 Poor-Prognosis 人群中，囊胚移植没有显著优势，并且会增加无胚胎可利用的风险^[46]。

2. 囊胚移植并未增加累计妊娠率^[47,48]。

3. 在新鲜移植周期中，囊胚移植会增加早产率^[2,49,50]。

4. 延长胚胎体外培养时间，仍然会让我们顾虑其对性别比^[49]，胚胎发育过程中的表观遗传学改变^[49]，甚至未来胎儿安全性和出生缺陷的影响^[2,49,51]。

5. 我们也不能忽略：延长胚胎体外培养时间会提高对技术人员素质的要求、产生其他原因所导致的无胚胎可冻和可用的情况^[47]，以及对患者造成的额外的经济和精神负担^[2]。

第七节 辅助生殖技术、囊胚移植与单卵双胞胎

单卵双胞胎是指一个受精卵在孕前期分裂发育为两个独立胚胎（图 1-25）。近 30 年的研究证实，辅助生殖技术的应用与单卵双胞胎的发生密切相关^[52-54]（图 1-26）。

截至目前，主流观点认为囊胚移植与单卵双胞胎妊娠发生有关^[49,52,55-60]。然而，截然相反的结论也时有报道^[61-63]。另外值得关注的是，部分研究建议囊胚内细胞团的松散程度^[64]、培养条件变化^[52,61]、延长体外培养时间^[53,65]与单卵双胞胎妊娠发生有关。而促排卵方案的运用^[57]、ICSI^[57,65]和 PGD 技术的使用^[66]、针对胚胎透明带的操作^[57,58,65,67]与单卵双胞胎无关，其中胚胎解冻移植与单卵双胞胎妊娠发生的关系仍存有异议^[58,65,67]。双胎消失综合征（vanishing twin syndrome, VTS）在 1945 年被首次确认，指双胎或多胎在孕期中，其中一胎儿组织被另一胎、胎盘或母体吸收，其机制尚不清楚，发病率在多胎妊娠中占 21% ~ 30%，但有报道建议囊胚移植可以降低 VTS 风险^[2]。