

玻璃化冷冻技术在保存人类不同发育阶段 卵细胞和胚胎中的应用

丁 颖, 邓成艳

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院妇产科, 北京 100730

通信作者: 邓成艳 电话/传真: 010-65296223, 电子邮件: chydmd@hotmail.com

摘要: 玻璃化冷冻技术已逐渐成为辅助生育技术中重要的应用技术之一, 在保存未成熟卵细胞、成熟卵细胞、原核期胚胎、卵裂早期胚胎及囊胚方面均取得成功, 并相继有临床妊娠分娩的报道。本文总结了玻璃化冷冻技术在保存人类不同发育阶段卵细胞和胚胎方面的应用。

关键词: 玻璃化冷冻; 卵细胞; 胚胎; 辅助生育技术

中图分类号: R711.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2008)03-0348-06

Application of Vitrification of Human Oocytes and Embryos at Different Developmental Stages

DING Ying, DENG Cheng-yan

Department of Obstetrics and Gynecology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: DENG Cheng-yan Tel/Fax: 010-65296223, E-mail: chydmd@hotmail.com

ABSTRACT: Vitrification of human oocytes and embryos has become an important assisted reproductive technology. It can be used to cryopreserve immature oocytes, mature oocytes, pronuclear embryos, blastomeres, and blastocysts. This article reviewed the clinical application of vitrification of human oocytes and embryos at different developmental stages.

Key words: vitrification; oocytes; embryos; assisted reproductive technology

Acta Acad Med Sin, 2008, 30(3):348-353

玻璃化冷冻是一种快速冷冻技术, 是直接将细胞或组织投入冷冻保护剂和液氮, 利用高浓度的冷冻保护剂, 在 -196°C 把细胞或组织固定在玻璃状态的冷冻过程。在玻璃化冷冻过程中, 高浓度冷冻保护剂固化, 形成无结构的玻璃态, 由于其质点不规则排列, 始终保持溶液的水分子和离子分布, 使跨膜物质的浓度和渗透压差别不大, 因此可避免因细胞内产生冰晶而对细胞造成的机械性损伤, 同时也可以消除细胞外冰晶引起的理化损伤。与传统程序冷冻相比, 玻璃化冷冻具有冷冻速度快、过程简单和不需要使用昂贵的程序冷冻控制仪器等优点^[1],

已逐渐成为辅助生育技术 (assisted reproductive technology, ART) 中广泛应用的冷冻保存方法。

玻璃化冷冻的影响因素

玻璃化冷冻效果可受多种因素影响, 如: 冷冻速率、冷冻保护剂、冷冻载体、冷冻及复苏步骤等。玻璃化冷冻过程是将冷冻对象放在冷冻保护剂中, 待细胞脱水及渗透性冷冻保护剂进入细胞且二者达到平衡后, 再投入液氮进行冷冻保存。细胞从 37°C 快速降温至 -196°C 所需要的时间称为冷冻速率, 是

非常重要的参数。通过提高温度传导速率可缩短降温需要的时间,即越快越好,但在实际操作中,提高冷冻速率往往会受到限制。为避免在快速降温过程中对细胞的伤害,需要使用冷冻保护剂。冷冻保护剂分为两类:(1)渗透性冷冻保护剂:可进入细胞膜,包括甘油、二甲亚砜、丙二醇和乙二醇等,提高渗透性冷冻保护剂浓度有利于细胞形成玻璃化状态,但浓度越高,毒性越大,并可产生渗透损害。(2)非渗透保护剂:不能穿透细胞膜,如多聚糖,可协助细胞内液体移出,常与渗透性保护剂合用,可减少渗透性冷冻保护剂的用量,降低其毒性作用。冷冻操作时需要把细胞放在一个载体上进行处理,玻璃化冷冻使用的载体形式多样,除普通麦管外,更多的是使用电镜铜网(electron microscope grid, EM)、冷冻环、最小容量法(minimum volume cooling plates, MVC)、开放型拉细麦管(open pulled straw, OPS)和闭合型拉细麦管(closed pulled straw, CPS)等,其益处是可缩小体积、提高冷冻速率、缩短冷冻对象与冷冻保护剂接触时间、降低冷冻过程中的损伤。复苏过程是从细胞内移出渗透性保护剂,水分移入细胞恢复到正常生理状态的过程,加用蔗糖并采用逐渐降低复苏液浓度的分步复苏法可避免细胞水肿而发生渗透损伤。此外,具体操作过程还受到环境温度、每个步骤操作时间及间隔时间和操作熟练程度等因素影响。

总之,玻璃化冷冻过程中有多种因素影响冷冻效果。由于不同发育阶段卵细胞和胚胎有着各自的超微结构特点及冷冻特点,因此在应用玻璃化冷冻技术对其进行冷冻时,不仅应使用不同的平衡液预处理、不同组合及浓度的玻璃化液、不同的冷冻载体和不同浓度的蔗糖复苏步骤等,还要根据患者的具体情况,权衡利弊,来选择不同发育阶段的卵细胞及胚胎进行冷冻。

卵细胞玻璃化冷冻

辅助生育过程中,在下列特殊情况下,需要进行卵细胞冷冻:(1)有些国家因为法律、伦理或宗教的限制,不允许进行胚胎冷冻;(2)取卵当日不能提供精子;(3)为了建立卵细胞库;(4)未育的健康妇女要求储备生育力;(5)未育的妇女,目前不宜妊娠,但出现卵巢功能早衰趋势或者由于有卵巢病变如反复感染、卵巢复发囊肿、卵巢子宫内膜

异位症、卵巢恶性肿瘤等需要卵巢切除或放疗、化疗的患者的生育力的储存。卵细胞的冷冻保存可作为胚胎保存的替代方法,但由于目前卵细胞冻融后妊娠成功率低于胚胎冷冻,所以目前尚未成为临床常规应用技术。

未成熟卵细胞的玻璃化冷冻 未成熟卵细胞(germinal vesicle, GV)可以从儿童卵巢和多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)患者的卵巢或体外受精及胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)周期中获得。超微结构特点是停留在第1次减数分裂期,染色体分散,存在于核膜内^[2],没有纺锤体。在这个阶段进行冷冻,可以避免冷冻过程对纺锤体微管的损伤^[3],理论上可降低在此后分裂过程中发生细胞遗传学错误的可能性,与成熟卵细胞冷冻相比,似乎存在一定优势。然而,GV期卵细胞冻存,在存活率和成熟性方面,相对于成熟卵细胞存在更多问题,如复苏后必须经过体外培养发育至成熟卵细胞,受精发育成胚胎才能进行移植。

GV期卵细胞玻璃化冷冻经验非常有限,Cha等^[4]和Wu等^[5]采用5.5 mol/L乙二醇(ethylene glycol, EG) + 1.0 mol/L蔗糖的磷酸缓冲液为玻璃化液(vitrification solution, VS),以EM为冷冻载体进行冷冻,采用0.5、0.25、0.125、0.0625蔗糖溶液四步法复苏,其存活率分别为83%和59%,成熟率分别为68%和64%,受精率分别为68%和70%,妊娠率分别为0和7%。Isachemko等^[6]研究显示,在室温条件下短时间(1 min)接触二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)可提高复苏后成熟率,成熟率达到72%。但到目前为止,只有1例GV期卵细胞冷冻保存复苏后经体外成熟并获得活婴分娩的报道^[7]。

成熟卵细胞的玻璃化冷冻 成熟卵细胞(mature oocyte, M II)可取自IVF周期受刺激的卵巢及不成熟卵细胞经培养成熟获得。M II卵细胞的微结构特点为停留在第2次减数分裂中期,核膜溶解,染色体位于纺锤体上。由于其表面积与体积的比值小,对水渗透性低,易于发生冷冻损伤^[8]。冷冻损伤包括:(1)细胞膜渗透性低,更易受到冰晶损伤;(2)卵膜下方外层胞质中存在大量皮质颗粒,因脱颗粒造成透明带硬化,会阻止精子穿过并抑制胚胎孵化;(3)纺锤体动态变化过程中姐妹染色单体不分离,增加非整倍体胚胎形成^[2];(4)细胞骨架损伤。由于以上因素影响,冻融M II卵细胞的存活率及妊娠率也极低。

Chen 等^[9]比较了冷冻过程中使用或不使用 1.5 mol/L EG 做平衡液预处理、暴露于 EG 5.5 的时间为 60 s 或 120 s、复苏过程中采用三步或四步复苏法的冷冻后存活率,发现采用平衡液可缩短卵细胞暴露于 VS 的时间,减小毒性损伤,复苏后存活率可达 93%,明显高于不使用平衡液预处理的 65%。在最近的两个较大规模的临床回顾性研究中, Lucena 等^[8]用 15% EG + 15% DMSO 预处理, 15% EG + 15% DMSO + 0.5 mol/L 蔗糖为 VS, MVC 为冷冻载体,两步复苏,冷冻 707 个卵细胞,159 个卵细胞复苏后移植到 23 例患者,受精率 87.2%,卵裂率 94.3%,获 13 例妊娠,妊娠率 56.5%。Selman 等^[10]用 7.5% EG + 7.5% DMSO 预处理, 15% EG + 15% DMSO + 0.6 mol/L 蔗糖为 VS, OPS 为冷冻载体,二步复苏,冷冻 53 个 M II 卵子,复苏 24 个,存活率 75%,受精率 77.7%,妊娠率 33.3%。说明适当浓度的 EG + DMSO + 蔗糖配比组成的玻璃化液毒性小,冷冻和复苏过程中细胞体积变化小,细胞可以耐受,复苏后存活率及妊娠率均有所提高。

由于 M II 卵细胞的特点,以往采用程序冷冻后妊娠率较低,玻璃化冷冻技术则具有以下优点:(1)使其快速通过降温期,避免了纺锤体解聚。(2)采用 MVC、EM 和 OPS 等冷冻载体提高了冷冻及复苏速率,减少了对纺锤体和染色体的损伤。(3)采用毒性小的冷冻保护剂可减少对卵细胞结构和功能的损伤,研究证实用 DMSO 冷冻卵细胞有保护作用^[8]。(4)单精子胞浆受精 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 可弥补透明带硬化带来的受精困难^[5]。Oktay 等^[11]总结了 1997 年至 2005 年发表的文献,结果发现,2005 年 6 月前、后玻璃化冷冻 M II 卵细胞复苏后的受精率、临床妊娠率、活产出生率分别为 70.6%、29.4%、29.4% 和 75.4%、51%、39%。可见,玻璃化冷冻技术的临床应用及不断发展,使 M II 卵细胞冷冻后妊娠率及活产出生率得到明显提高。

胚胎玻璃化冷冻

在辅助生育中,胚胎的玻璃化冷冻是一项比较完善的技术。胚胎冷冻分为原核期 (pronuclear, PN) 胚胎、卵裂早期胚胎和囊胚的冷冻。其中,原核期胚胎是存在卵原核和精原核的受精卵,卵裂早期胚胎是 2 细胞到囊胚前阶段胚胎,囊胚即受精第

5、6 天发育到 32 细胞以上的胚胎。

PN 胚胎的玻璃化冷冻 由于一些国家法律和伦理原因不允许冷冻晚分裂期胚胎,只能在 M II 卵细胞受精后马上冷冻,即 PN 冷冻。PN 胚胎是有完整的透明带和 2 个清晰原核的胚胎。Nowshari 等^[12]认为 PN 胚胎处于雄原核与雌原核融合前的单细胞形态,无纺锤体,是冻融后高存活率和移植后发育潜能高的原因。Liebermann 等^[1]认为 PN 胚胎可耐受玻璃化冷冻及复苏过程,其原因可能是在受精和受精后,由于皮质反应和透明带变硬,使细胞膜对低温和渗透变化有着更好的稳定性。但也有研究发现,PN 胚胎对冷冻保护剂的渗透性低于分裂期胚胎,当胚胎复苏时,细胞内保护剂未能及时置换而使水分大量内流导致渗透性休克^[13]。

由于伦理原因,PN 胚胎玻璃化冷冻的前期实验多采用多原核胚胎,如 3PN 和 4PN 胚胎。3PN 和 4PN 胚胎是异常受精的胚胎,能够卵裂,但不能发育成正常胚胎,不能进行移植。Isachenko 等^[13]用 1PN 或 3PN 进行的前瞻性研究发现,直接一步复苏可导致致死性渗透损伤,而分步复苏法能获得 83% 的卵裂率。Liebermann 等^[14]用 1PN 和 3PN 获得的复苏后存活率为 87.6%,囊胚形成率为 31%。Jelinkova 等^[15]报道 1 例患者冷冻 6 个 PN 胚胎,复苏后试管内培养至 48 h,分裂为 5~6 细胞胚胎后移植,6 周后超声学证实为双胎妊娠。Selman 等^[16]报道了冷冻 4 例患者的 PN 胚胎,结果共复苏 27 个胚胎,存活率为 66.6%,卵裂率为 82.3%,2 例妊娠。

卵裂早期胚胎的玻璃化冷冻 在 IVF-ET 新鲜周期,移植卵裂球胚胎后,将剩余的 6~8 细胞胚胎直接进行冷冻保存。其优势是:早期胚胎的单个细胞具有全能性,经过冻融的早期胚胎即使仅有数个甚至 1 个细胞存在活力,仍能够发育^[17]。刘平等^[18]研究显示,早期胚胎细胞分裂速度和碎片含量等形态学特征可在一定程度上反映胚胎活力,临床妊娠率随细胞内碎片含量增加而降低,在冷冻前应进行胚胎筛选,细胞碎片 < 20% 的胚胎冻融后存活率较高。但 Rienzi 等^[19]研究发现,复苏后采用激光辅助技术祛除坏死细胞,其卵裂率、移植率和妊娠率差异无显著性。

Mukaida 等^[20]用 20% EG 预处理,40% EG + 0.3 mol/L 蔗糖 + 18% 聚蔗糖为 VS,普通麦管为载体,冷冻正常发育 (第 2 天 4 个,第 3 天 8 个) 及延迟发育 (第 2 天 2~3 个,第 3 天 2~7 个) 的卵裂球

共 52 个, 水、0.5 mol/L 蔗糖二步复苏, 存活率 81%, 两组形态学完整率分别为 85% ~ 86% 和 58%, 移植后, 1 例移植 4 个 4 细胞卵裂球获得双胎妊娠, 妊娠率及种植率为 5.5% 及 4.8%。El-Danasouri 等^[21] 用 10% EG 预处理, 40% EG + 0.6 mol/L 蔗糖为 VS, OPS 为载体, 冷冻 215 卵裂球, 用 1 mol/L、0.25 mol/L 蔗糖二步复苏, 存活率 49.3%, 其中 8 细胞、7 细胞、6 细胞卵裂球存活率分别为 79.2%, 39.7%, 21.1%。临床妊娠率 30.5%, 种植率 10.4%。说明正常发育胚胎冷冻抵抗力强。

存活率的判断标准依据复苏后的形态学评分, 如果有 50% 以上细胞存活, 即判定胚胎存活。Mukaida 等^[20] 比较了正常发育 (第 2 天 4 个细胞, 第 3 天 8 个细胞) 及延迟发育 (第 2 天 2 ~ 3 个细胞, 第 3 天 2 ~ 7 个细胞) 的胚胎, 结果显示冻融后两组的胚胎存活率分别为 92% 和 71%; El-Danasouri 等^[21] 研究发现, 8 细胞、7 细胞和 6 细胞胚胎冻融后的存活率分别为 79.2%、39.7% 和 21.1%, 说明正常发育胚胎冷冻抵抗力强。此外, Mukaida 等^[20] 和 El-Danasouri 等^[21] 的研究还显示, 正常发育的胚胎在存活胚胎数中所占比率分别为 29.3% 与 59.6%, 说明质量差的胚胎也可以存活, 但妊娠率低。正常发育的胚胎虽经过冻融, 但因其质量好, 妊娠率高。

复苏评分后, 继续培养 24 h, 如果细胞数目增加, 可进行移植^[22]。寻找保持胚胎内所有细胞存活的方法以及用显微操作技术吸出损伤的细胞或用辅助孵化提高复苏胚胎妊娠率, 会进一步促进玻璃化冷冻卵裂早期胚胎技术的发展^[23]。

囊胚的玻璃化冷冻 囊胚是受精后发育到第 5、6 天的胚胎, 含有充满液体的囊胚腔。囊胚与子宫发育同步, 跨越胚胎基因激活阶段, 序贯培养技术可使具有发育潜能的优质胚胎增多, 所以, 囊胚的种植率和妊娠率均较高, 并且可以通过移植有限的胚胎数 (每次 1 ~ 2 个) 而避免多胎妊娠^[24]。IVF 周期中多余胚胎可在序贯培养液中发育至囊胚, PCOS 患者不成熟卵细胞经体外培养成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 后受精也可发育至囊胚。

玻璃化冷冻囊胚技术较为成熟, 妊娠率高, 临床已普遍应用。Vanderzwalmen 等^[25] 冷冻 281 囊胚, 存活率 69%, 妊娠率 27%。比较复苏后辅助孵化与不进行辅助孵化组, 种植率、妊娠率分别为 22%、13% 和 38%、19%, 说明复苏后辅助孵化有助于种植和妊娠。Mukaida 等^[24] 和 Hu 等^[26] 研究分别获得

80.4% 和 83% 的存活率, 37% 和 31% 的临床妊娠率。将冷冻第 6 天囊胚的妊娠率与第 5 天囊胚的妊娠率相比较, 分别下降 10% 和 20%, 而流产率分别上升 27% 和 25%。说明囊胚冷冻存活率与胚胎发育速度有关, 正常发育的胚胎比延迟发育的胚胎抵抗冷冻能力强。第 5 天的囊胚可能更适合冷冻, 但为了更好的利用胚胎, 第 6 天形成的囊胚或延迟发育的胚胎也可以冷冻^[24]。Takahashi 等^[27] 总结 4 年临床研究结果: 435 周期冷冻 1 129 囊胚, 存活率 85.7%, 413 个移植周期中妊娠率、种植率、流产率分别为 44.1%、29.0%、22.0%。108 例分娩 147 个活婴。

Mukaida 等^[20] 研究发现, 在与冷冻保护剂作用过程中, 囊胚脱水、皱缩速度比卵裂早期胚胎慢, 表明在冷冻及复苏过程中囊胚细胞内更有可能形成冰晶。Vanderzwalmen 等^[28] 认为冰晶形成的可能性直接与囊胚腔体积成正比而与黏滞性和冷冻速率成反比, 通过减小囊内液体缩小囊胚腔可提高存活率。Mukaida 等^[29] 采用人工缩小囊胚腔技术冷冻了 502 个囊胚, 获得的存活率为 97.2%, 妊娠率为 60.2%, 种植率为 46.6%。随着序贯培养液及缩小囊胚腔体积、辅助孵化技术的不断发展, 囊胚玻璃化冷冻保存的成功率会得到进一步提高, 有望成为保存生育能力的首选方法。

问题与展望

辅助生育需要对不同发育阶段的卵细胞、胚胎及卵巢组织进行冷冻以保存女性生育能力, 然而这项技术的实施存在着许多伦理问题, 例如: 有的国家不允许冷冻胚胎, 只能冷冻卵细胞; 为了取得成熟卵细胞而进行的药物刺激卵巢和取卵过程有可能延误癌症的治疗; 药物刺激卵巢过程随着雌激素浓度的升高, 会促使雌激素依赖性肿瘤恶化等。另外, 已有研究发现, ART 出生的新生儿先天异常的发生率比非 ART 出生的新生儿高, 例如 IVF 中单胎男孩发生泌尿系统畸形和骨骼畸形高于非 IVF 新生儿, 这些先天异常有可能与父母双方不育本身有关, 如母亲高龄、男性不育; 或者与 IVF 过程中的用药、胚胎的冷冻复苏和 ICSI 等操作有关^[30]。使用某些类型的冷冻载体, 如 OPS, 玻璃化液与液氮的直接接触, 使冷冻对象存在被病原微生物污染的潜在风险。总之, 辅助生育及其相关技术的临床应用必须经过伦理论证, 其结果需要长时间的临床观察及经验总

结。玻璃化冷冻技术在诸多动物实验及初步临床研究中已阐明其作用原理并证实比程序冷冻具有更多的优势,已逐渐成为辅助生殖领域中重要的冷冻技术。寻求低毒性冷冻保护剂及提高冷冻和复苏速率的冷冻载体,提高临床妊娠率并减少冷冻带来的感染及染色体缺陷将进一步促进玻璃化冷冻技术发展。

参 考 文 献

- [1] Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, *et al.* Potential importance of vitrification in reproductive medicine [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(6):1671-1680.
- [2] Boiso I, Marti M, Santalo J, *et al.* A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(7):1885-1891.
- [3] Oktay K, Newton H, Aubard Y, *et al.* Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology [J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(1):1-7.
- [4] Cha K, Chung HM, Lim JM, *et al.* Freezing immature oocytes [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169(12):43-47.
- [5] Wu J, Zhang L, Wang X. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes [J]. *Reproduction*, 2001, 121(3):389-393.
- [6] Isachenko V, Montag M, Isachenko E, *et al.* Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(3):741-747.
- [7] Tucker MJ, Morton PC, Wright G, *et al.* Clinical application of human egg cryopreservation [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(11):3156-3159.
- [8] Lucena E, Bernal DP, Lucena C, *et al.* Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(1):108-111.
- [9] Chen SU, Lien YR, Chao Kh. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws [J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(4):804-808.
- [10] Selman H, Anqelini A, Bernocchi N. Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(4):997-1000.
- [11] Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(1):70-80.
- [12] Nowshari MA, Brem G. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(11):2368-2373.
- [13] Isachenko V, Montag M, Isachenko E, *et al.* Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(3):660-665.
- [14] Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, *et al.* Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette [J]. *Reproductive Bio-Medicine Online*, 2002, 4(2):146-150.
- [15] Jelinkova L, Selman HA, Arav A, *et al.* Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos [J]. *Fertil Steril*, 2002, 77(2):412-414.
- [16] Selman HA, El-Danasouri I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes [J]. *Fertil Steril*, 2002, 77(2):422-423.
- [17] 黄娟华, 刘炜培, 张羽虹, 等. 人早期胚胎卵裂球全能性的体外实验研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(2):89-90.
- [18] 刘平, 孙梅, 卢光琇, 等. 辅助生育技术进展-移植胚胎的选择与临床妊娠率的关系 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2001, 17(1):17-19.
- [19] Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, *et al.* Developmental potential of fully intact and partially damaged cryopreserved embryos after laser-assisted removal of necrotic blastomeres and post-thaw culture selection [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(4):888-894.
- [20] Mukaida T, Wada S, Takahashi K, *et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(10):2847-2849.
- [21] El-Danasouri, Selman H. Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(2):400-402.
- [22] Van Dan Abbeel E, Van Sterirteghem A. Zona pelucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and *in-vitro* viability [J]. *Hum Reprod*, 2005, 15(2):373-378.
- [23] 李娟, 孟祥阁, 江平, 等. 人类胚胎冻融技术及其影响因素 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2000, 9:393-396.
- [24] Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, *et al.* Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(2):384-391.
- [25] Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, *et al.* Vitrifi-

- cation of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(7):1504-1511.
- [26] Hu YX, Hoffman D, Waxson W, *et al.* Clinical application of vitrification on human blastocysts developed from super numerical embryos *in vitro* [C]. *International Congress Series*, 2004, 1271:159-162.
- [27] Takahashi K, Mukaida T, Goto T, *et al.* Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: 4-year follow-up study [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(1):88-92.
- [28] Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, *et al.* Births after vitrification at morula and blastocyst stages; effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(3):744-751.
- [29] 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.
- [30] Klemetti R, Gissler M, Sevón T, *et al.* Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(5):1300-1307.

(2007-06-12 收稿)