

症患者的诊断有一定价值。(4)插管较深,不易脱出。(5)直视下探查精囊留置导管,利于炎性渗出物的引流,易于给药,且可以根据情况而掌控有效药物浓度。(6)利于有感染的患者治疗前后的分泌物检验对比取材。

**3.3 治疗问题:**由于精囊生理结构特点,精囊的管状腺体高度蟠曲,炎性渗出物引流不畅;精囊血运较差,局部难以达到有效的药物浓度,致使部分患者用药后仍然反复发作。开放手术或电切都有逆行射精、附睾炎、直肠损伤甚至不育等并发症<sup>[13]</sup>。常规药物治疗效果欠佳。本治疗方法采用经尿道输尿管镜精囊输精管探查置管冲洗术治疗血精,是一种新方法。

**3.4 手术注意事项:**因精道空间小,为减少手术并发症,在手术操作过程中,要注意动作轻柔,控制好冲洗液压力和速度,既要保证手术野清晰,又要防止冲洗液外渗,避免对正常的精道、前列腺及直肠的损伤。术后患者避免过多活动,防止置入精囊的导管脱出。注意密闭外侧精囊导管,防止逆行感染。

综上所述,经尿道精囊输精管插管术对精道疾病的诊断和治疗效果显著,并发症少,临床应用价值较高。

**参考文献**

1 薄学军,王 焯,王 萍,等.经尿道输尿管镜冲洗治疗慢性精囊炎的临床观察[J].中华男科学杂志,2009,15(5):465-466.

2 傅丰文,车建平,高 轶.输尿管镜技术在血精症诊断和治疗中的应用.中华男科学杂志,2010,16(12):1105-1107.

3 江少波,谢俊民.慢性前列腺炎的输精管精囊造影[J].中华男科学杂志,2000,6(1):25-27.

4 吴宏飞,尤国才,睦元庚,等.血精症的诊断和治疗(附56例报告)[J].男性学杂志,1992,6(3):168-170.

5 李顺强,朱金波,王庆仁,等.经阴囊皮肤直接穿刺输精管精道造影术[J].中华泌尿外科杂志,1980,1(3):193-197.

6 彭基刚,刘明汉,文宏修,等.121例无精子症的精道造影[J].临床泌尿外科杂志,1987,2(4):227-228.

7 Shimada M, Yoshida H. Ex vivo ultrathin endoscopy of the seminal vesicles[J]. J Urol 1996,156(4):1388-1390.

8 Okubo K, Maekawa S, Aoki Y, et al In vivo endoscopy of the seminal vesicle[J]. J Urol 1998,159(6):2069-2070.

9 李龙坤,李为兵,鄢俊安,等.经尿道逆行性输尿管镜技术诊治远端精道疾病:一种新术式[J].临床泌尿外科,2006,21(11):808-810.

10 莫 默,蒙有轩,黄 青,等.精囊镜治疗精囊结石的效果观察及护理要点[J].中国临床新医学,2013,6(12):1213-1215.

11 Purohit RS, Wu DS, Shinohara K, et al. A prospective comparison of 3 diagnostic methods to evaluate ejaculatory duct obstruction[J]. J Urol, 2004, 171(1): 232-236.

12 李顺强.经阴囊皮肤直接穿刺输精管精道造影术;附正常精道造影208例X线分析[J].中华泌尿外科杂志,1980,11(4):193-197.

13 Tan MO, Kordan Y, Deniz N, et al Papillary adenoma of the prostatic urethra: report of two cases[J]. Int J Urol, 2003, 10(8):459-462.

[收稿日期 2014-03-20][本文编辑 刘京虹 韦 颖]

课题研究·论著

# 囊胚期胚胎活检及玻璃化冻存的研究

薛林涛, 黄 莉, 何 冰, 谭卫红, 王世凯, 成俊萍, 覃 捷

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:桂卫 Z2012265); 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018302)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 薛林涛(1982-), 男, 在读博士, 助理研究员, 研究方向: 生殖医学。E-mail: ltxgxh@163.com

**[摘要]** 目的 探讨不同质量囊胚活检后的继续发育潜力和玻璃化冻融后的复苏能力。方法 选择体外受精-胚胎移植周期患者的剩余胚胎, 根据受精后第5/6天囊胚质量等级分为高质量囊胚组和低质量囊胚组, 两组囊胚根据活检与否分别分为活检组 and 对照组。其中活检组囊胚采用激光切割结合抽吸法活检滋养层细胞, 而后将活检成功囊胚进行玻璃化冷冻; 对照组囊胚不活检, 直接进行玻璃化冷冻。比较不同分组囊胚的活检结局及玻璃化冻融效果。结果 低质量囊胚活检成功率低于高质量囊胚, 但差异无统计学意义( $P = 0.183$ ), 低质量囊胚活检后玻璃化冻融复苏率显著低于高质量囊胚( $P = 0.001$ ), 但低质量囊胚和高质量囊胚活检组的玻璃化冻融复苏率与对照组相比差异均无统计学意义( $P = 0.597, P = 0.823$ )。结论 囊胚期活检不影响胚胎继续发育能力及玻璃化冻融复苏效果。

[关键词] 植入前胚胎遗传学诊断; 囊胚; 活检; 玻璃化冷冻

[中图分类号] R 715 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2014)07-0596-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.07.06

**Impact of blastocyst biopsy on the embryos development potential and survival rate after vitrification** XUE Lin-tao, HUANG Li, HE Bing, et al. Reproductive Medical and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of blastocyst biopsy on the development potential and survival rate after vitrification of different quality blastocysts. **Methods** The surplus embryos in IVF-ET cycles were allocated to good or poor quality blastocysts group by the embryo grade in day 5/6, and the same quality blastocysts were allocated to biopsy and control group. For the blastocysts from biopsy group trophectoderm removal was performed and then the survival blastocysts were vitrified, but for control group vitrification was performed without biopsy. The survival rate after blastocyst biopsy and warming were compared between different groups. **Results** For the poor quality blastocysts group the survival rate after blastocyst biopsy was lower than the good quality blastocysts group, but the difference was not significant ( $P=0.183$ ), and the survival rate after warming was significantly lower than the good quality blastocysts group ( $P=0.001$ ). But the survival rate after warming was similar between the biopsy group and control group ( $P=0.597, P=0.823$ ). **Conclusion** Blastocyst biopsy did not impair the development potential and survival efficient after vitrification.

[Key words] Preimplantation genetic diagnosis; Blastocyst; Biopsy; Vitrification

囊胚期活检植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 技术是近年来的研究热点, 由于其具有活检获取细胞材料多、操作安全性高等优点<sup>[1]</sup>, 在 PGD 治疗周期中的应用越来越广泛。但目前关于囊胚质量与活检结局相关性的研究较为少见, 因此本研究选择体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 周期中患者的剩余胚胎, 对不同质量囊胚活检后的继续发育能力和玻璃化冻融后的复苏能力进行探讨。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 实验所用胚胎来源于 2012-09 ~ 2013-05 在广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心接受体外受精技术或卵胞浆内单精子注射技术治疗患者移植或冷冻后的废弃胚胎, 包括: (1) 授精后第 3 天废弃的卵裂期胚胎, 延长培养至囊胚期用于本研究; (2) 授精后第 5/6 天废弃的囊胚期胚胎。所有胚胎均经患者知情同意且签署知情同意后用于本研究。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分组** 所有胚胎均继续培养至囊胚期, 根据授精后第 5/6 天囊胚质量等级分为高质量囊胚组和低质量囊胚组, 两组囊胚随机分为活检组和对照组, 其中活检组囊胚活检获取部分滋养层细胞, 而后将活检成功囊胚进行玻璃化冷冻。对照组囊胚则不活检, 直接进行玻璃化冷冻。囊胚质量评级方法如下: 根据囊胚腔大小和孵出程度分为 6 期, 3 期以上囊胚根据内细胞团和滋养层细胞数目进行评级,

分为 A、B、C 三级, 具体评级标准参见文献[2]。其中第 5/6 天囊胚分期 3 期以上且内细胞团或滋养层细胞评分  $\geq$  B 级的囊胚定义为高质量囊胚, 第 5/6 天囊胚分期 3 期以上且内细胞团及滋养层细胞评分均为 C 级的囊胚定义为低质量囊胚。

**1.2.2 囊胚活检及培养** 选择授精后第 5/6 天囊胚分期为 3 期以上的囊胚用于活检, 先用激光破膜仪在囊胚内细胞团对侧透明带上做一 10 ~ 15  $\mu\text{m}$  小孔进行辅助孵出, 继续培养 4 ~ 6 h, 待滋养层细胞孵出后采用激光切割结合抽吸法活检获取部分细胞, 未孵出囊胚则用活检针从透明带开口处负压抽吸部分滋养层细胞进行活检, 活检后囊胚继续培养 2 ~ 4 h。若囊胚腔重新扩张判定为活检成功, 选择活检成功囊胚进行玻璃化冷冻。

**1.2.3 囊胚玻璃化冷冻及解冻** 囊胚玻璃化冷冻及解冻均采用 COOK 冷冻解冻试剂盒 (澳大利亚 COOK 公司), 所有试剂使用前预热平衡至 37  $^{\circ}\text{C}$ , 具体操作过程参见文献[3]。解冻后囊胚移入预先配制好的 37  $^{\circ}\text{C}$ 、6%  $\text{CO}_2$  平衡后的囊胚培养微滴中继续培养, 4 ~ 6 h 后在倒置显微镜下观察囊胚复苏情况, 囊胚腔重新扩张定义为复苏成功。

**1.2.4 观察指标** 观察活检囊胚辅助孵出后的囊胚孵出率及活检成功率, 观察不同分组囊胚玻璃化冻融后的复苏率及复苏囊胚孵出率。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS17.0 进行数据统计分析, 计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差

异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同质量分组囊胚活检结果比较** 低质量囊胚活检组胚胎辅助孵出后囊胚孵出率与高质量囊胚活检组差异无统计学意义( $P=0.582$ ),低质量囊胚活检组胚胎活检成功率低于高质量囊胚活检组,但差异无统计学意义( $P=0.183$ )。见表1。

表1 不同质量分组囊胚活检结果比较[n(%)]

组别	囊胚数	辅助孵出数	囊胚孵出率	活检囊胚数	活检成功率
低质量囊胚活检组	31	26	14(53.85)	31	25(80.65)
高质量囊胚活检组	18	16	10(62.50)	18	17(94.44)
$\chi^2$	-	-	0.303	-	1.771
$P$	-	-	0.582	-	0.183

**2.2 不同质量分组囊胚活检后玻璃化冻融结果比较** 低质量囊胚活检后玻璃化冻融复苏率显著低于高质量囊胚( $P=0.001$ ),两组复苏囊胚孵出率差异无统计学意义( $P=0.465$ )。见表2。

表2 不同质量分组囊胚活检后玻璃化冻融结果比较[n(%)]

组别	冷冻囊胚数	囊胚复苏率	复苏囊胚孵出率
低质量囊胚活检组	25	9(36.00)	6(66.67)
高质量囊胚活检组	17	15(88.24)	12(80.00)
$\chi^2$	-	11.274	0.533
$P$	-	0.001	0.465

**2.3 不同质量囊胚活检组与对照组玻璃化冻融结果比较** 不同质量囊胚其活检组与对照组玻璃化冻融后复苏率差异均无统计学意义( $P=0.597, P=0.823$ ),但活检组复苏囊胚孵出率均显著高于对照组( $P=0.040, P=0.012$ )。见表3,4。

表3 低质量囊胚活检组与对照组玻璃化冻融结果比较[n(%)]

组别	冷冻囊胚数	囊胚复苏率	复苏囊胚孵出率
低质量囊胚活检组	25	9(36.00)	6(66.67)
低质量囊胚对照组	23	10(43.48)	2(20.00)
$\chi^2$	-	0.280	4.232
$P$	-	0.597	0.040

表4 高质量囊胚活检组与对照组玻璃化冻融结果比较[n(%)]

组别	冷冻囊胚数	囊胚复苏率	复苏囊胚孵出率
高质量囊胚活检组	17	15(88.24)	12(80.00)
高质量囊胚对照组	11	10(90.91)	3(30.00)
$\chi^2$	-	0.050	6.250
$P$	-	0.823	0.012

## 3 讨论

**3.1 PGD 周期可分别在卵子极体期、胚胎卵裂期及囊胚期活检**获取细胞组织进行遗传学分析,不同时期活检各有其优缺点:卵子极体产生于减数分裂过程,并不参与受精后的胚胎发育,因此极体活检不减少胚胎的遗传物质,但极体只能反应女方的遗传性状,无法检测男方因素的遗传缺陷;卵裂期胚胎活检1~2个卵裂球后可以继续发育并在子宫内种植形成胎儿,活检卵裂球的遗传性状可以反应整个胚胎的遗传状态,但卵裂期胚胎高比例的嵌合现象有可能造成误诊,而且卵裂期活检操作的安全性也存在争议。囊胚期活检可以提供较多的细胞用于检测,且活检滋养层细胞不参与胎儿的形成,因此活检操作对胚胎损伤较小,但体外囊胚培养会自发淘汰部分胚胎,另外由于可供诊断时间短,需进行囊胚冷冻。目前公开报道的PGD治疗周期大多选择卵裂期活检,而后继续培养至囊胚期并根据遗传学检测结果选择胚胎移植或冷冻,但随着激光系统在囊胚滋养层细胞活检中的成功应用<sup>[4]</sup>,囊胚活检操作更加简单,同时囊胚玻璃化冻存技术的不断提高,使得解冻周期可以取得和新鲜周期相似的临床结局<sup>[5]</sup>,因此囊胚期活检在PGD周期中开始得到更多应用,多个研究结果表明囊胚期活检相对于其他时期活检可以获得更好的妊娠结局<sup>[6,7]</sup>。

**3.2 本研究选择IVF-ET周期病人废弃的囊胚**作为研究对象,对不同质量等级囊胚对活检操作及玻璃化冻融的耐受性进行探讨,结果显示低质量囊胚的活检成功率低于高质量囊胚,但差异无统计学意义(80.65% vs 94.44%,  $P=0.183$ ),说明发育至3期以上的囊胚无论质量优劣均对活检操作有一定耐受性。这可能是由于囊胚期胚胎细胞数目较多,可以弥补滋养层细胞少量丢失对囊胚继续发育能力的影响,同时有研究认为囊胚形态学特征和胚胎染色体状态并不具相关性,形态学评级差并不代表囊胚染色体异常<sup>[8]</sup>,因此PGD周期中低质量囊胚有一定活检价值。

**3.3 囊胚活检后需将胚胎冻存**,待遗传学检测后再行解冻囊胚移植,因此活检囊胚的高效冻存至关重要。玻璃化冷冻是一种简单快速、不易形成冰晶的胚胎冻存技术,已在卵子、卵裂胚及囊胚的冻存中成功应用,但其对冷冻囊胚的质量要求较高,这可能是由于囊胚腔内液体的存在,会导致冻融过程冰晶形成,从而造成细胞损伤,而高质量囊胚较多的细胞数可以减小细胞损伤的不利影响,从而维持随后胚胎

发育进程。本研究结果也显示高质量活检囊胚的解冻复苏率显著高于低质量囊胚(88.24% vs 36.00%,  $P=0.001$ ),说明冷冻囊胚质量与解冻复苏结局具有相关性。但我们也发现低质量囊胚活检组与未活检对照组相比,玻璃化冻融结局并无差异,说明低质量囊胚解冻复苏率降低是冷冻操作过程造成的,而与活检操作无关。另外有研究认为采用人工皱缩技术去除囊胚腔内液体可以显著提高解冻复苏效果<sup>[9]</sup>,但其在活检囊胚中的应用效果有待进一步验证。

综上所述,囊胚期活检不影响胚胎的继续发育能力及玻璃化冻融能力,不同质量的囊胚活检滋养层细胞后均可继续发育,而低质量囊胚活检后冻融能力下降,主要是由于其对玻璃化冷冻过程的耐受性更差所造成,因此活检囊胚玻璃化冷冻技术的改进是提高PGD周期胚胎利用率的主要途径。

#### 参考文献

- 1 Scott KL, Hong KH, Scott RT, et al. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3): 608-614.
- 2 薛林涛,黄莉,何冰,等. 体外受精治疗周期中剩余胚胎囊胚培养的临床价值[J]. *中国临床新医学*, 2010, 3(1): 23-27.
- 3 薛林涛,黄莉,何冰,等. 玻璃化冷冻人活检后不同发育时期胚胎的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(36): 6010-6013.
- 4 Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, et al. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human[J]. *Zygote*, 1997, 5(4): 351-354.
- 5 Takahashi K, Mukaida T, Goto T, et al. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study[J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(1): 88-92.
- 6 Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study[J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(5): 1443-1449.
- 7 Scott RT, Upham KM, Forman EJ, et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3): 624-630.
- 8 Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(2): 520-524.
- 9 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.

[收稿日期 2014-02-07][本文编辑 杨光和 吕文娟]

## 课题研究·论著

# 新标准 GDM 血糖控制正常孕妇早产儿妊娠结局临床分析

龙禹, 唐卉, 陈悦, 黄玲玲, 杨芳

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2010354)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院产科

作者简介: 龙禹(1980-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 围产医学。E-mail: 1092867420@qq.com

**[摘要]** 目的 分析新标准诊断妊娠期糖尿病(GDM)血糖控制正常孕妇早产儿的胎肺成熟度及新生儿的出生结局与正常孕妇早产儿是否有差异。方法 选择90例孕周已满34周末足月难免早产或胎膜早破新标准诊断GDM血糖控制正常孕妇,从阴道后穹窿或剖宫产破膜时取羊水做羊水泡沫试验了解胎肺的成熟度,分成34周组、35周组、36周组。90名正常孕妇作为对照组,比较各组孕妇的年龄、分娩方式、胎肺的成熟度、新生儿体重、新生儿窒息、新生儿呼吸窘迫综合征(NRDS)、新生儿低血糖、新生儿肺炎等指标。结果 两组的产后出血的发生率、剖宫产率、胎儿体重、胎盘重量等指标差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组胎儿肺的成熟度和NRDS、新生儿窒息、新生儿低血糖及新生儿感染发生率差异亦无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 新标准诊断GDM血糖控制正常孕妇,34周以后的早产儿胎肺成熟度及新生儿的出生结局与正常孕妇早产儿相同。