

人类卵母细胞与胚胎玻璃化冷冻中国专家共识(2023 年)

中国医师协会生殖医学专业委员会

通信作者:李蓉,北京大学第三医院妇产科生殖医学中心,北京 100191, Email: roseli001@sina.com; 李达,中国医科大学附属盛京医院生殖医学中心,沈阳 110022, Email: leeda@sina.cn; 吴克良,山东大学附属生殖医院 IVF 实验室,济南 250012, Email: wukeliang_527@163.com

【摘要】 人类卵母细胞和胚胎玻璃化冷冻是辅助生殖技术的重要组成部分。由中国医师协会生殖医学专业委员会发起,参考最新国际指南和共识,结合中国临床实践现状,经充分讨论后形成该共识,旨在加强玻璃化冷冻技术质量控制,进一步改善卵母细胞及胚胎冷冻结局,提升辅助生殖服务质量。

【关键词】 生殖技术; 辅助; 卵母细胞; 卵裂胚; 囊胚; 玻璃化冷冻; 共识

Chinese expert consensus on vitrification of human oocytes and embryos (2023)

Chinese Association of Reproductive Medicine

Corresponding authors: Li Rong, Center of Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China, Email: roseli001@sina.com; Li Da, Center of Reproductive Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China, Email: leeda@sina.cn; Wu Kelian, IVF Laboratory, Hospital for Reproductive Medicine Affiliated to Shandong University, Jinan 250012, China, Email: wukeliang_527@163.com

【Abstract】 Vitrification of human oocytes and embryos is an important component of assisted reproductive technology. This consensus is initiated by the Chinese Association of Reproductive Medicine, with reference to the latest international guidelines and consensus, combined with the current situation of clinical practice in China. The expert group formed this consensus after fully discussion, aiming at strengthening the quality control of vitrification technology, further improving the outcome of vitrification of oocytes and embryos, and improving the quality of assisted reproduction services.

【Key words】 Reproductive techniques, assisted; Oocytes; Cleavage-stage embryo; Blastocyst; Vitrification; Consensus

卵母细胞和胚胎玻璃化冷冻保存是人类辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的重要环节。相较于传统的程序化冷冻,玻璃化冷冻技术以其简单快速、不依赖昂贵设备,且复苏率极高的显著优点,在国内外各大生殖医学中心迅速普及推广,从而为人类生育力保存、胚胎植入前遗传学检测以及全胚冷冻策略的广泛临床应用,提供了必要的核心技术支持。卵母细胞及胚胎的冷冻复苏结局受诸多因素影响,包括冷冻保护剂种类、样本平衡时间、降温/升温速率和冷冻载体类型等,造成各生殖中心间冷冻结局的差异。有鉴于此,参考

最新指南和共识^[1-7],结合中国临床实践,由中国医师协会生殖医学专业委员会发起,组织本领域专家对人类卵母细胞与胚胎玻璃化冷冻技术流程和细节进行归纳总结,以期提供一套全面系统的玻璃化冷冻操作规范指导意见,提升生殖医学中心服务质量。

一、人员资质培训

初学者培训采用导师负责制,以经验丰富的胚胎学家作为指导老师,由指导老师依据质控指标和经验判断初学者达到标准后,方可进入下一阶段培训。整个培训过程形成书面记录存档。

DOI: 10.3760/ema.j.cn101441-20230405-00135

收稿日期 2023-04-06 本文编辑 王李艳

引用本文:中国医师协会生殖医学专业委员会.人类卵母细胞与胚胎玻璃化冷冻中国专家共识(2023 年)

[J]. 中华生殖与避孕杂志. 2023, 43(9): 879-886. DOI: 10.3760/ema.j.cn101441-20230405-00135.



1. 理论学习:初学者应理解玻璃化冷冻的基本原理,掌握冷冻保护剂浓度、操作温度、降温/升温速率等基本概念及控制方法^[8]。

2. 动物样本:建议初学者在指导老师监督下使用动物样本进行为期 1~2 个月的培训。以小鼠 8-细胞胚胎为样本不断练习冷冻和解冻操作,以熟练掌握试剂耗材的使用方法^[4]。鉴于小鼠胚胎对冷冻和解冻操作的敏感性低于人类胚胎^[9],建议对初学者的要求设为操作 50 例小鼠 8-细胞胚胎的复苏率不低于同中心人类卵裂期胚胎(第 3 天)复苏率,且复苏后的小鼠 8-细胞胚胎需继续培养 24~48 h,其囊胚形成率应 $\geq 80\%$ ^[10]。由于鼠与人的种属差异,动物样本操作应在单独设置的培养室开展,不宜在人类体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)实验室进行。

3. 人类废弃卵母细胞或胚胎:使用常规废弃人类卵母细胞或胚胎进行培训,如不成熟卵母细胞、多精受精卵母细胞、废弃的卵裂胚或囊胚(多精受精卵母细胞来源),以熟悉人类卵母细胞或胚胎形态体积及冷冻解冻操作。

4. 临床实践操作:初学者通过使用动物样本和人类废弃样本熟练掌握技术,在复苏率达到控制标准后,由指导老师带领初学者开展临床实践操作,分配患者的小部分卵母细胞/胚胎交由初学者处理,建议初始比例不超过 20%。

二、试剂与耗材的选择使用

1. 玻璃化冷冻保护剂:主要包括渗透性和非渗透性冷冻保护剂。前者具有较好的水溶性和膜渗透性。高浓度渗透性冷冻保护剂所形成的高渗透压环境可促使细胞快速脱水,同时渗透性冷冻保护剂能迅速进入细胞内并置换水分子,这既能避免降温过程中大冰晶的形成,又能确保在极低温度下细胞内呈玻璃化状态,最终实现在液氮中长期保存。常用的渗透性冷冻保护剂有乙二醇、丙二醇、丙三醇和二甲基亚砜等^[11]。非渗透性冷冻保护剂不能通过细胞膜,通过在细胞外形成适度的渗透压促使细胞进一步脱水。非渗透性冷冻保护剂的使用既减少了渗透性冷冻保护剂使用浓度,又缩短了细胞在冷冻保护剂中的暴露时间。在解冻过程中,非渗透性冷冻保护剂可以防止细胞过度膨胀而崩解。常用的非渗透性冷冻保护剂有蔗糖和海藻糖^[12]。

玻璃化冷冻试剂套装一般包括基础液、平衡液和冷冻液。基础液通常含有人血清白蛋白和 pH 缓冲体系,如 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES)和 3-吗啉丙磺酸(3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid, MOPS);平衡液是在基础液中添加渗透性冷冻保护剂制成;冷冻液是在基础液中添加更高浓度的渗透性和非渗透性冷冻保护剂制成。解冻试剂套装通常包括解冻液、稀释液和基础液,解冻液和稀释液

分别是在基础液中添加高浓度和低浓度非渗透性冷冻保护剂制成。

建议选择带有注册信息的商品化冷冻和解冻试剂,不推荐自行配制;首选鼠胚实验、内毒素检测、无菌性检测、pH 和渗透压检测等质控项目齐全的产品。有条件的中心常备两套不同品牌的玻璃化冷冻和解冻试剂,以应对突发性事件,如批次质量不合格或供货不稳定等问题。

2. 冷冻载体:按照储存方式分为开放式和封闭式两类。开放式载体,如商品化的 Cryotop 载体、VitrifiFit 载体,可达到较高的降温速率;由于样本直接接触液氮,存在交叉污染的可能性^[13],但目前尚无样本污染报道^[17]。封闭式载体,如商品化的 HSV 载体、Rapid-i 载体,可阻止生物样本间交叉污染^[14],但降温速率较开放式载体有所降低^[15]。开放式拉伸套管载体(如 OPS 载体)兼具开放式载体的降温速率、封闭式储存和恒定冷冻装载液体量等特点^[16]。开放式和封闭式载体进行卵母细胞和胚胎冷冻的效果相当^[17,20],建议感染检查阳性或携带者使用封闭式载体或单独液氮罐储存。

三、卵母细胞、卵裂胚和囊胚的玻璃化冷冻和解冻操作

1. 卵母细胞玻璃化冷冻

(1) 准备:冷冻试剂提前预热至室温(24~26℃)。卵母细胞冷冻时间应在人绒毛膜促性腺激素注射后 38~40 h^[2]。冷冻前应进行脱颗粒细胞操作^[2],并评估成熟度,但也有报道称冷冻过程中放射冠细胞保留对解冻后卵母细胞发育有积极意义^[23-25]。成熟卵母细胞特征是卵周间隙见第一极体。对于未成熟卵母细胞,先进行 24~48 h 的体外成熟培养,发育成熟后进行玻璃化冷冻保存^[23-24]。建议单个载体装载的卵母细胞数量不多于 5 枚。

(2) 操作步骤示例:卵母细胞玻璃化冷冻操作在室温下进行,参考步骤详见图 1。①在 60 mm 培养皿上,制作等体积的基础液和平衡液液滴,体积不小于 150 μ L;将卵母细胞移入基础液后,桥接 2 个液滴,卵母细胞移到连通液滴中间位置,静置 3 min。冷冻试剂使用前充分混匀。②在连通液滴正下方,制作 1 个新的平衡液液滴,并与上方液滴桥接,将卵母细胞移至连通液滴中间位置,静置 3 min。③另取一个 35 mm 的培养皿,制作新的平衡液液滴并覆盖培养油,将卵母细胞移入液滴后静置 6~9 min,卵周间隙恢复至初始状态即可结束此步操作(图 2A-C)。为维持液滴渗透压稳定,建议单个液滴体积不小于 40 μ L,并覆盖至少 3 mL 培养油,此步骤操作皿即做即用,并在 1 h 内完成使用^[23-26]。④另取一培养皿制备数个个体积不小于 40 μ L 的冷冻液液滴,将卵母细胞在冷冻液中至少转移 3~5 个不同位置,以去除残留的平衡液。⑤按所用冷冻载体操作方法进行装载和液氮冻存(步骤



图4 卵裂胚的渗透平衡过程

A示初始形态卵裂胚;B示平衡液中1 min;C示卵裂胚渗透平衡

一培养皿制备数个个体积不小于40 μL 的冷冻液液滴,将胚胎在冷冻液中至少转移3~5个不同位置,以去除残留的平衡液。④按所用冷冻载体操作方法进行装载和液氮冻存。6期囊胚粘油后易飘浮至液面上层,导致胚胎吸取转移困难,因此需确保转移管中与胚胎接触的液体不含油。

3. 卵母细胞、卵裂胚和囊胚的解冻操作

(1)准备:提前制备操作皿并充分预热,参考步骤见图5。①解冻液操作皿:培养皿中制备一个解冻液液滴($\geq 200 \mu\text{L}$),充分预热至37 $^{\circ}\text{C}$,覆盖培养油有助于在解冻第一步中维持液滴温度稳定。②稀释液及基础液操作皿:培养皿中制备数个个体积不小于40 μL 的稀释液和基础液液滴,覆盖培养油并于室温备用。

(2)操作步骤示例:①按所用载体操作方法将卵母细胞或胚胎快速(1 s内)从液氮取出并浸入解冻液45~60 s,并将漂浮于解冻液上层的样本移至液滴中央。②样本转移至稀释液中,静置3 min。③样本转移到基础液中,静置5 min。④样本转移到新的基础液中,静置5 min。转移样本时携带少量原液体,以减缓浓度变化。

(3)解冻后相关操作时间点:建议卵母细胞解冻后2~3 h行卵胞质内单精子注射^[1]。卵裂胚可在移植前一天或当天解冻;囊胚解冻与移植时间间隔对妊娠结局的影响尚无充分证据^[27],建议培养2 h后移植,以观察囊胚复苏状况并预测妊娠结局。

四、冷冻和解冻相关操作

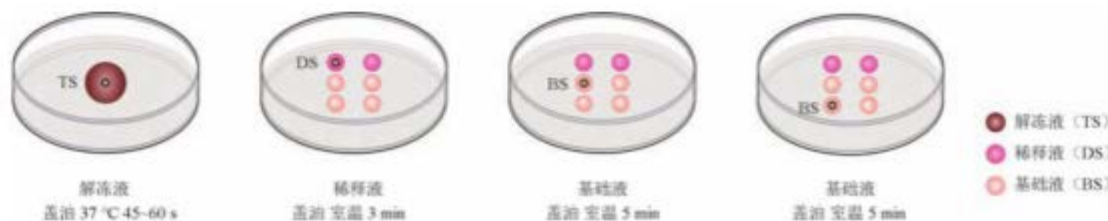
1. 囊胚人工皱缩:囊胚腔液在冷冻时形成的冰晶可损伤胚胎发育潜能。人工皱缩是指在囊胚玻璃化冷冻之前使用穿刺法或激光法使囊胚腔皱缩

的技术,激光法因其简便性而得到广泛应用。人工皱缩能否改善妊娠结局尚存争议,随机对照研究表明人工皱缩不影响囊胚种植率^[28],但对囊胚复苏率有所改善^[28-29]。尽管目前尚无人工皱缩导致不利结局的临床证据^[30-32],但仍需进一步观察其远期安全性。激光打孔位置选择远离内细胞团的滋养层细胞间隙(图6),不同品牌激光破膜仪的输出功率存在差异,需根据效果设定激光强度,击打1~2次为宜。囊胚在实施激光皱缩10~15 min后即可冷冻,不宜时间过长,预防囊胚再扩张。

2. 辅助孵化:复苏胚胎移植前是否行辅助孵化尚存争议,尽管有研究显示其对临床妊娠率有一定改善作用^[33-35],但仍存在增加双胎妊娠的风险^[33]。对于卵裂期或致密化期胚胎,不同透明带消融程度(削薄法或打透法)的效果尚无明确结论^[36-40],多项随机对照研究结论不尽相同。为兼顾辅助孵化技术的安全性,推荐采用削薄法对卵裂期或致密化期胚胎进行辅助孵化,削薄范围为透明带周长的25%~50%,深度为透明带厚度的50%~80%^[40-44]。复苏周期囊胚的辅助孵化通常是在皱缩状态下进行,4期以上囊胚的透明带较薄,多采用打透法行辅助孵化。为保证囊胚顺利孵出,避免内细胞团卡顿,建议消融透明带周长的25%~50%^[45-47],且激光灼烧处与胚胎细胞保持安全距离。早期囊胚透明带较厚,可行削薄法辅助孵化。

五、质量控制

1. 复苏成功的定义:根据卵母细胞、卵裂胚和囊胚解冻后的形态学表现判断是否成功复苏。①卵母细胞:成功复苏的标志为细胞膜形态正常且细胞质清晰透亮。如出现细胞质变暗、细胞质内大



注:液滴数量及布局仅供参考

图5 卵母细胞、卵裂胚和囊胚的解冻操作示意图

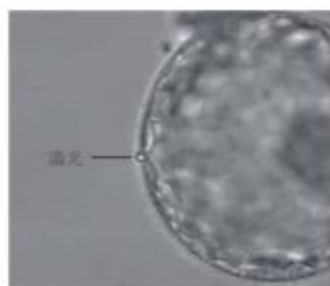


图6 激光打孔位置位于滋养层细胞间隙

量空泡化、细胞质渗漏或卵周间隙异常等现象,表明冷冻复苏过程中出现细胞结构损伤甚至死亡。如解冻后卵母细胞透明带轻微损伤破裂,但细胞膜完整无异常,不会严重影响卵母细胞发育。②卵裂胚:复苏后的卵裂胚可表现为全部卵裂球存活、部分卵裂球存活和全部卵裂球死亡。卵裂胚复苏存活定义为解冻后至少半数卵裂球存活;卵裂胚复苏完整存活定义为复苏后所有卵裂球存活。③囊胚:囊胚复苏存活定义为至少75%的细胞存活,也可通过解冻后1~2 h观察囊胚是否再次扩张来判断是否复苏成功。

2. 质控指标:持续周期性监测冷冻和解冻相关质控指标,有助于及时发现安全隐患,确保玻璃化冷冻和解冻技术稳定有序开展。参考国内外最新进展及共识^[1-7],推荐的卵母细胞、卵裂胚和囊胚玻璃化冷冻和解冻质控指标见表1。质控指标的统计需基于适当样本量,并参照能力值(标准下限)和基准值(理想指标)开展评价^[2]。判断某一质控指标是否出现异常波动基于三项重要参数,分别是该指标能力值、上一年度平均值及基准值。在如下情况发生时启动异常数据分析路径:①质控指标低于能力值;②质控指标低于或高于上一年度平均值的2个标准差。

3. 数据异常分析路径:卵母细胞与胚胎玻璃化冷冻复苏的结局与人员操作水平、培养环境、试剂和耗材等多个环节密切相关。关键指标异常时可按图7所示路径进行分析。

六、冷冻保存时限

胚胎冷冻保存时间对妊娠结局的影响尚无定论^[48-50],近期不断有研究提示冷冻保存时间延长对胚胎的不利影响^[52-55]。Hu等^[52]报道妊娠结局开始下降的时间点是保存时间达到6个月,Cui等^[54]报道的时间点是5年。现阶段卵母细胞冷冻复苏结局仍无法与胚胎相媲美,且对于卵母细胞冷冻时限研究的数据较少,部分研究报道卵母细胞冷冻保存1~48个月似乎不影响复苏结局^[57]。基于有限证据,从冷冻复苏结局、ART治疗效果、伦理学、节约医疗资源等方面综合考虑,建议卵母细胞的最佳冷冻保存时限为1年,胚胎的最佳冷冻保存时限为5年^[58]。

七、冷冻储存室的管理

IVF冷冻储存室存有人类配子和胚胎等重要生物样本,需建立严格的管理制度以确保安全运行^[59-61],其管理条例应遵循(但不限于)如下内容:

1. 人员培训和权限:使用液氮前对相关工作人员开展培训并记录存档。冷冻储存室设置安全锁,只有通过培训的工作人员和授权人员可以进入。对于有条件的实验室,液氮罐可采用双锁双人管理或电子锁双指纹管理的模式。

2. 冷冻储存室的配置:冷冻储存室较理想的位置是IVF实验室外围房间,需配备通风装置、手套、护目镜、防护罩等设备。冷冻储存室需在门上安装观察窗,地面采用压花钢板等防滑耐冻材质;在距地面高度1.5~2.0 m的墙壁上安装氧气浓度报警器,并确保氧气气体体积百分比不小于19.5%。

表1 卵母细胞、卵裂胚和囊胚玻璃化冷冻和复苏质控指标

质控指标	能力值	基准值
卵母细胞		
复苏率=存活卵母细胞数/解冻卵母细胞数×100%	70%	85%
正常受精率=第1天出现2PN卵母细胞数/注射卵母细胞数×100%	与同中心新鲜卵母细胞正常受精率相比不低于10个百分点	
第3天胚胎形成率=第3天8-细胞胚胎数/正常受精卵母细胞数×100%	与同中心新鲜卵母细胞第3天胚胎形成率相比差异无统计学意义	
第5/6天囊胚形成率=第5/6天囊胚(≥2期)数/行囊胚培养的卵裂胚数×100%	与同中心新鲜卵母细胞第5/6天囊胚形成率相比差异无统计学意义	
种植率=孕囊数/移植卵裂胚或囊胚数×100%	不低于同中心新鲜胚胎种植率的70%~90%	
卵裂胚和囊胚		
复苏存活率=存活卵裂胚或囊胚数/解冻卵裂胚或囊胚数×100%	85%(卵裂胚)	95%(卵裂胚)
	80%(囊胚)	95%(囊胚)
复苏完整存活率=完整存活卵裂胚数/解冻卵裂胚数×100%	70%(卵裂胚)	85%(卵裂胚)
种植率=孕囊数/移植卵裂胚或囊胚数×100%	不低于同中心新鲜胚胎种植率的90%	与同中心新鲜胚胎种植率相比差异无统计学意义

注:“复苏卵裂胚的种植率”的计算仅纳入复苏完整存活卵裂胚;2PN示双原核



图7 数据异常分析路径

3. 冷冻储存室的日常检测和维护

(1) 液氮含量监测: 建议每周2次手动检查储存罐液氮量, 有条件的实验室安装液氮液位监控报警系统, 每季度至少测试一次该系统的有效性。冷冻储存室的日常检测和维护需书面形式记录。

(2) 液氮罐巡查: 需每天观察液氮罐外观是否存在冷凝水、锈迹、裂痕及损坏, 并触碰罐体感知温度, 初步判断罐内真空系统有效性。常备空置液氮罐(装满液氮)以应对突发状况, 记录每个液氮罐加注液氮量用来评估液氮损失率, 及时更换液氮损失率严重超过预期的液氮罐。

八、结语

本共识包含人员资质培训、试剂耗材的选择使用、卵母细胞及不同阶段胚胎冷冻和解冻常规操作、质量控制、冷冻保存时限以及冷冻储存室管理等方面内容。人类卵母细胞和胚胎玻璃化冷冻是辅助生殖技术的重要组成部分, 只有不断加强其操作过程的规范、质量控制和管理, 同时建立长期有效的质量评价体系, 才能确保其安全运行。

顾问专家组成员: 陈子江(山东大学附属生殖医院)、曹云霞(安徽医科大学第一附属医院)

执笔专家: 李达(中国医科大学附属盛京医院)、吴克良(山东大学附属生殖医院)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)、高英卓(中国医科大学附属盛京医院)

参与编写共识的专家组成员(按姓氏汉语拼音排序): 毕星宇(山西省妇幼保健院)、蔡令波(南京医科大学第一附属医院)、晁岚(山东大学齐鲁医院)、陈曦(北京大学人民医院)、程东晓(沈阳普华医院)、崔龙(浙江大学医学院附属妇产科医院)、高英卓(中国医科大学附属盛京医院)、顾亦凡(中信湘雅生殖与遗传专科医院)、郝大勇(郑州大学第三附属医院)、黄博(华中科技大学同济医学院附属同济医院)、蒋晓明(厦门大学附属成功医院)、金波(北京中医药大学深圳医院)、李博(空军军医大学唐都医院)、李达(中国医科大学附属盛京医院)、李磊(广州医科大学第三附属医院)、李梅(山东大学第二医院)、李萍(厦门市妇幼保健院)、李蓉(北京大学第三医院)、李友筑(厦门大学附属第一医院)、刘丽英(沈阳市妇婴医院)、卢伟英(海南省妇女儿童医学中心)、马燕琳(海南医学院第一附属医院)、孟祥黔(成都西园妇科医院)、本良善(复旦大学附属中山医院)、秦刚(四川大学华西第二医院)、邱兵兵(厦门市妇幼保健院)、史彬彬(大连市妇女儿童医疗中心)、孙宁霞(海军军医大学第二

附属医院)、谭季春(中国医科大学附属盛京医院)、汤小哈(哈尔滨医科大学附属第六医院)、王桂泉(厦门大学附属妇女儿童医院)、王天任(香港大学深圳医院)、王喜良(中国人民解放军北部战区总医院)、王秀霞(中国医科大学附属盛京医院)、王羽(上海市第一妇婴保健院)、吴克良(山东大学附属生殖医院)、吴琰婷(复旦大学附属妇产科医院)、武泽(云南省第一人民医院)、习海诗(温州医科大学附属第二医院)、夏曦(北京大学深圳医院)、薛侠(西北妇女儿童医院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)、叶英辉(浙江大学医学院附属妇产科医院)、尹太郎(武汉大学人民医院)、张宁媛(南京大学医学院附属鼓楼医院)、张润卿(浙江大学医学院附属妇产科医院)、张德(武汉大学人民医院)、张耀耀(四川大学华西第二医院)、章美玲(上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)、赵志明(河北医科大学第二医院)、周祥(贵州医科大学附属医院)

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明: 陈子江、曹云霞负责论文评阅; 李蓉、李达、吴克良负责论文撰写、文献指导、论文修改; 章志国、高英卓负责论文撰写; 其他共识专家组成员参与了共识的讨论、修改及定稿

参考文献

- [1] 中华医学会生殖医学分会第一届实验室学组. 人类体外受精-胚胎移植实验室操作专家共识(2016)[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(1): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.01.001. Embryologist Group, China Society of Reproduction Medicine, Chinese Medical Association. Consensus on human IVF-ET laboratory manipulations [2016][J]. J Reprod Med, 2017, 26(1): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.01.001.
- [2] Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(2): 146-167. DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.05.006.
- [3] 孙青, 黄国宁, 孙海翔, 等. 胚胎实验室关键指标质控专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(9): 836-851. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.09.003. Sun Q, Huang GN, Sun HX, et al. CSR consensus on key indicators for quality control in IVF laboratory[J]. J Reprod Med, 2018, 27(9): 836-851. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.09.003.
- [4] 中国医师协会生殖医学专业委员会. 人类卵裂期胚胎及囊胚形态学评价中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022, 42(12): 1218-1225. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20220619-00266.

- Chinese Association of Reproductive Medicine. Expert consensus on human embryo morphological assessment: cleavage-stage embryos and blastocysts grading criteria[J]. Chin J Reprod Contracept, 2022, 42(12): 1218-1225. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20220619-00266.
- [5] De los Santos MJ, Apter S, Cotichio G, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)[J]. Hum Reprod, 2016, 31(4): 685-686. DOI: 10.1093/humrep/dew016.
- [6] Hughes C. Association of clinical embryologists-guidelines on good practice in clinical embryology laboratories 2012[J]. Hum Fertil (Camb), 2012, 15(4): 174-189. DOI: 10.3109/14647273.2012.747891.
- [7] Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society of Reproductive Biologists and Technologists. A review of best practices of rapid-cooling vitrification for oocytes and embryos: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2021, 115(2): 305-310. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.11.017.
- [8] Montag M, Morbeck D. Principles of IVF Laboratory Practice[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2017.
- [9] Esfandiari N, Gubista A. Mouse embryo assay for human *in vitro* fertilization quality control: a fresh look[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37(5): 1123-1127. DOI: 10.1007/s10815-020-01768-9.
- [10] 韩倩倩, 冯晓明, 戴建武, 等. YY/T 1434—2016 人类体外辅助生殖技术用医疗器械 体外鼠胚试验[S]. 北京: 国家食品药品监督管理总局, 2016.
Han QQ, Feng XM, Dai JW, et al. YY/T 1434—2016 Medical devices for human *in vitro* assisted reproductive technology—*in vitro* mouse embryo assay[S]. Beijing: State Administration for Food and Drug Regulation of People's Republic of China, 2016.
- [11] Edashige K. Permeability of the plasma membrane to water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: its relevance to vitrification[J]. Reprod Med Biol, 2017, 16(1): 36-39. DOI: 10.1002/rmb2.12007.
- [12] Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures[J]. Cryobiology, 2017, 76: 74-91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004.
- [13] Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, et al. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen [SLN2][J]. Fertil Steril, 2012, 98(4): 870-875. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.028.
- [14] Pujol A, Zamora MJ, Obradors A, et al. Comparison of two different oocyte vitrification methods: a prospective, paired study on the same genetic background and stimulation protocol[J]. Hum Reprod, 2019, 34(6): 989-997. DOI: 10.1093/humrep/dez045.
- [15] Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, et al. How does closed system vitrification of human oocytes affect the clinical outcome? A prospective, observational, cohort, noninferiority trial in an oocyte donation program[J]. Fertil Steril, 2016, 106(6): 1348-1355. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1066.
- [16] Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification[J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(6): 779-796. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61091-7.
- [17] Youm HS, Choi JR, Oh D, et al. Closed versus open vitrification for human blastocyst cryopreservation: a meta-analysis[J]. Cryobiology, 2017, 77: 64-70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.05.006.
- [18] Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y, et al. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 26(5): 470-476. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.01.016.
- [19] De Munck N, Santos-Ribeiro S, Stoop D, et al. Open versus closed oocyte vitrification in an oocyte donation programme: a prospective randomized sibling oocyte study[J]. Hum Reprod, 2016, 31(2): 377-384. DOI: 10.1093/humrep/dev321.
- [20] Cai H, Niringiyumukiza JD, Li Y, et al. Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 123. DOI: 10.1186/s12958-018-0440-0.
- [21] Jin HX, Song WY, Xin ZM, et al. Effects of cumulus cells on vitreous cryopreservation of human mature oocytes and clinical pregnancy outcomes[J]. Reprod Sci, 2012, 19(2): 216-220. DOI: 10.1177/1933719111424450.
- [22] Tong XH, Wu LM, Jin RT, et al. Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes[J]. Hum Reprod, 2012, 27(11): 3208-3214. DOI: 10.1093/humrep/des295.
- [23] Lee JA, Barritt J, Moschini RM, et al. Optimizing human oocyte cryopreservation for fertility preservation patients: should we mature then freeze or freeze then mature?[J]. Fertil Steril, 2013, 99(5): 1356-1362. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.042.
- [24] Fasano G, Demeestere I, Englert Y. *In-vitro* maturation of human oocytes: before or after vitrification?[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(6): 507-512. DOI: 10.1007/s10815-012-9751-9.
- [25] Swain JE, Cabrera L, Xu X, et al. Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 24(2): 142-147. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.10.008.
- [26] Mullen SF. Toward a predictive theoretical model for osmolality rise with non-humidified incubation: a randomized, multivariate response-surface study[J]. Hum Reprod, 2021, 36(5): 1230-1241. DOI: 10.1093/humrep/deab015.
- [27] Ciaffaglione M, Reschini M, Balli M, et al. Post-thaw day 5 blastocyst culture time prior to transfer does not affect assisted reproduction technology (ART) outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles[J]. J Clin Med, 2022, 11(24): 7444. DOI: 10.3390/jcm11247444.
- [28] Van Landuyt L, Polyzos NP, De Munck N, et al. A prospective randomized controlled trial investigating the effect of artificial shrinkage (collapse) on the implantation potential of vitrified blastocysts[J]. Hum Reprod, 2015, 30(11): 2509-2518. DOI: 10.1093/humrep/dev218.
- [29] Gala A, Ferrières A, Assou S, et al. Effects of artificial shrinkage prior to vitrification in a closed system: a randomized controlled trial[J]. Gynecol Obstet Fertil, 2014, 42(11): 772-778. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2014.09.006.
- [30] Boyard J, Reignier A, Chtourou S, et al. Should artificial shrinkage be performed prior to blastocyst vitrification? A systematic review of the literature and meta-analysis[J]. Hum Fertil (Camb), 2022, 25(1): 24-32. DOI: 10.1080/14647273.2019.1701205.
- [31] Kovačić B, Taborin M, Vlaisavljević V. Artificial blastocoe collapse of human blastocysts before vitrification and its effect on re-expansion after warming—a prospective observational study using time-lapse microscopy[J]. Reprod Biomed Online, 2018, 36(2): 121-129. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.10.111.
- [32] Iwayama H, Hochi S, Yamashita M. *In vitro* and *in vivo* viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification[J]. J Assist Reprod Genet, 2011,

- 28(4): 355-361. DOI: 10.1007/s10815-010-9522-4.
- [33] Lacey L, Hassan S, Franik S, et al. Assisted hatching on assisted conception (*in vitro* fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)) [J/CD]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 3(3): CD001894. DOI: 10.1002/14651858.CD001894.pub6.
- [34] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The role of assisted hatching in *in vitro* fertilization: a guideline [J]. Fertil Steril, 2022, 117(6): 1177-1182. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.02.020.
- [35] Li D, Yang DL, An J, et al. Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Sci Rep, 2016, 6: 31228. DOI: 10.1038/srep31228.
- [36] Mantoudis E, Podsiadly BT, Gorgy A, et al. A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients [J]. Hum Reprod, 2001, 16(10): 2182-2186. DOI: 10.1093/humrep/16.10.2182.
- [37] Padula F, Capriglione S, Iaconianni P, et al. Laser-assisted hatching of human embryos: may two alternative approaches (thinning versus drilling) impact on implant rate [J]. Lasers Med Sci, 2017, 32(7): 1663-1666. DOI: 10.1007/s10103-017-2242-6.
- [38] Wang Y, Chen C, Liang J, et al. A comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching [J]. Lasers Med Sci, 2022, 37(1): 1-9. DOI: 10.1007/s10103-020-03230-9.
- [39] Le MT, Nguyen T, Nguyen T, et al. Thinning and drilling laser-assisted hatching in thawed embryo transfer: a randomized controlled trial [J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45(3): 129-134. DOI: 10.5653/cepm.2018.45.3.129.
- [40] Ng EHY, Lau EYL, Yeung WSB, et al. Randomized double-blind comparison of laser zona thinning and breaching in frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage [J]. Fertil Steril, 2008, 89(5): 1147-1153. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.016.
- [41] Hiraoka K, Hiraoka K, Horiuchi T, et al. Impact of the size of zona thinning area on vitrified-warmed cleavage-stage embryo transfers: a prospective, randomized study [J]. J Assist Reprod Genet, 2009, 26(9/10): 515-521. DOI: 10.1007/s10815-009-9350-6.
- [42] Balakier H, Mandel R, Sojceki A, et al. Laser zona thinning in women aged ≤ 37 years: a randomized study [J]. Fertil Steril, 2009, 91(4 Suppl): 1479-1482. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1729.
- [43] Ge HS, Zhou W, Zhang W, et al. Impact of assisted hatching on fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles: a prospective, randomized study [J]. Reprod Biomed Online, 2008, 16(4): 589-596. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60466-x.
- [44] Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, et al. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning [J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(2): 224-229. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60944-3.
- [45] Lyu QF, Wu LQ, Li YP, et al. An improved mechanical technique for assisted hatching [J]. Hum Reprod, 2005, 20(6): 1619-1623. DOI: 10.1093/humrep/deh809.
- [46] Hiraoka K, Fuchiaki M, Hiraoka K, et al. Effect of the size of zona thinning opening by laser assisted hatching on clinical outcome of frozen cleaved embryos that were cultured to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failures of embryo transfer: a retrospective study [J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(4): 129-135. DOI: 10.1007/s10815-008-9214-5.
- [47] Watanabe H, Suzuki R, Kobayashi M, et al. To what degree should the zona thinning be cut open in assisted hatching for best clinical results [J]. Fertil Steril, 2015, 104(3): e185.
- [48] Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, et al. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos [J]. Fertil Steril, 2010, 93(1): 109-115. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.084.
- [49] Wirleitner B, Vandezwalmen P, Bach M, et al. The time aspect in storing vitrified blastocysts: its impact on survival rate, implantation potential and babies born [J]. Hum Reprod, 2013, 28(11): 2950-2957. DOI: 10.1093/humrep/det361.
- [50] Liu Q, Lian Y, Huang J, et al. The safety of long-term cryopreservation on slow-frozen early cleavage human embryos [J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(4): 471-475. DOI: 10.1007/s10815-014-0197-0.
- [51] Canosa S, Cimadomo D, Conforti A, et al. The effect of extended cryo-storage following vitrification on embryo competence: a systematic review and meta-analysis [J]. J Assist Reprod Genet, 2022, 39(4): 873-882. DOI: 10.1007/s10815-022-02405-3.
- [52] Hu KL, Hunt S, Zhang D, et al. The association between embryo storage time and treatment success in women undergoing freeze-all embryo transfer [J]. Fertil Steril, 2022, 118(3): 513-521. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.06.003.
- [53] Li J, Yin M, Wang B, et al. The effect of storage time after vitrification on pregnancy and neonatal outcomes among 24 698 patients following the first embryo transfer cycles [J]. Hum Reprod, 2020, 35(7): 1675-1684. DOI: 10.1093/humrep/deaa136.
- [54] Cui M, Dong X, Lyu S, et al. The impact of embryo storage time on pregnancy and perinatal outcomes and the time limit of vitrification: a retrospective cohort study [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 724853. DOI: 10.3389/fendo.2021.724853.
- [55] Mao Y, Tang N, Luo Y, et al. Effects of vitrified cryopreservation duration on IVF and neonatal outcomes [J]. J Ovarian Res, 2022, 15(1): 101. DOI: 10.1186/s13048-022-01035-8.
- [56] Lin R, Zhou H, Wang C, et al. Does longer storage of blastocysts with equal grades in a cryopreserved state affect the perinatal outcomes? [J]. Cryobiology, 2021, 103: 87-91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2021.09.003.
- [57] Parmegiani L, Garello C, Granella F, et al. Long-term cryostorage does not adversely affect the outcome of oocyte thawing cycles [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(3): 374-379. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60171-x.
- [58] 全松, 黄国宁, 孙海翔, 等. 冷冻胚胎保存时限的中国专家共识 [J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(10): 925-931. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.10.001.
- Quan S, Huang GN, Sun HX, et al. CSRM committee opinions regarding the time limit of embryo cryopreservation [J]. J Reprod Med, 2018, 27(10): 925-931. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.10.001.
- [59] Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, Society for Reproductive Biologists and Technologists, and Society for Assisted Reproductive Technology. Cryostorage of reproductive tissues in the *in vitro* fertilization laboratory: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2020, 114(3): 486-491. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.06.019.
- [60] Schiewe MC, Freeman M, Whitney JB, et al. Comprehensive assessment of cryogenic storage risk and quality management concerns: best practice guidelines for ART labs [J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(1): 5-14. DOI: 10.1007/s10815-018-1310-6.
- [61] 王秀霞, 李达. 辅助生殖技术实验室质量控制与风险管理 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021.
- Wang XX, Li D. Quality Management in the Assisted Reproduction Laboratory [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2021.