

冻融周期囊胚移植的临床价值

陈京京,姜宏[△],李攀

(安徽医科大学解放军临床学院生殖医学中心,合肥 230031)

摘要:目的 探讨冻融囊胚移植、冻融卵裂期胚胎复苏后行囊胚移植的临床价值。方法 回顾性分析 2012 年 9 月至 2013 年 8 月在该院生殖医学中心接受冻融胚胎移植治疗患者共 518 个周期的临床资料,按移植冻融胚胎类型分为 3 组。A 组:冻融囊胚移植,共 129 个周期;B 组:卵裂期胚胎复苏后行囊胚培养后移植,共 123 个周期;C 组(对照):冻融卵裂胚移植,共 266 个周期。比较各组的临床结局及 A、B 两组间新鲜周期胚胎和冻融周期的囊胚形成率和取消率。结果 A、B 组的生化妊娠率、临床妊娠率和胚胎种植率(70.5%、61.2%、42.3%;67.5%、58.2%、40.2%)显著高于 C 组(53.0%、42.5%、23.1%)($P < 0.05$);3 组间流产率、异位妊娠率、多胎妊娠率差异无统计学意义($P > 0.05$)。新鲜周期第 3 天优质胚胎与冻融胚胎复苏后的囊胚形成率(62.5% vs. 57.7%)差异无统计学意义($P > 0.05$),均显著高于新鲜周期第 3 天非优质胚胎的囊胚形成率(20.3%)($P < 0.05$)。结论 冻融周期行囊胚移植可以获得较满意的临床结局;冻融卵裂期胚胎行囊胚培养后可获得较高的囊胚形成率和临床结局。

关键词:囊胚培养;冻融胚胎;囊胚移植;临床妊娠率;种植率

中图分类号:R714

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)34-4610-03

Clinical value of blastocyst transfer in vitrified-thawed cycles

Chen Jingjing, Jiang Hong[△], Li Pan

(Reproductive Medical Center, Clinical College of People's Liberation Army, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230031, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of frozen-thawed blastocyst transfer and the blastocyst derived from frozen-thawed cleavage stage embryo transfer. Methods The data of 518 cycles in reproductive medicine center of the hospital from September 2012 to August 2013 were analyzed retrospectively. According to the frozen-embryos type, all patients were divided into three groups, group A: frozen-thawed blastocyst transfer, 129 cycles; group B: blastocysts derived from frozen-thawed cleavage stage embryos transfer, 123 cycles; group C: frozen-thawed cleavage embryos transfer, 266 cycles. The clinical outcomes of all groups were compared with each other, and the rates of blastocyst formation and cancellation were compared between group A and group B. Results The rates of biochemical pregnancy, clinical pregnancy and embryo implantation in group A (70.5%, 61.2%, 42.3%) and group B (67.5%, 58.2%, 40.2%) were significantly higher than group C (53.0%, 42.5%, 23.1%) ($P < 0.05$); there were no significant differences in the rates of early abortion, ectopic pregnancy, multiple pregnancy among three groups ($P > 0.05$); there were no significant differences in the blastocyst formation rates of the high quality cleavage embryos at D3 in fresh cycles and the frozen-thawed cleavage embryos (62.5% vs. 57.7%) ($P > 0.05$) and those two groups were both significantly higher than the poor quality cleavage embryos at D3 in fresh cycles (20.3%) ($P < 0.05$). Conclusion Blastocyst transfer in vitrified-thawed cycles could get relatively satisfactory clinical outcomes. There are higher blastocyst formation rate and better clinical outcomes of transfer blastocyst derived from frozen-thawed cleavage embryo.

Key words: blastocyst culture; frozen-thawed embryo; blastocyst transfer; clinical pregnancy rate; implantation rate

随着玻璃化冷冻技术的发展和广泛应用,冻融胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer)不仅可提高胚胎利用率和累计妊娠率,而且有效降低了新鲜周期控制性超排卵所导致的并发症如卵巢过度刺激综合征等,已成为辅助生殖技术中重要的组成部分^[1]。近年来,序贯培养技术使囊胚培养和移植成为可能,囊胚移植使子宫内膜与胚胎发育同步,更符合子宫的生理着床环境,不仅提高胚胎种植率和临床妊娠率,并且可通过限制移植囊胚数目达到既可获得较高的累积妊娠率,又可减少多胎妊娠及其他母婴并发症发生的目的^[2]。冻融囊胚历经了冷冻和复苏的考验,能够存活表明其具有更强的生命力和发育潜能,有更高的种植率和临床妊娠率^[3]。本研究通过 518 个冻融胚胎移植周期临床资料的回顾性分析,旨在探讨冷冻周期囊胚移植的临床价值以及冻融卵裂期胚胎复苏后行囊胚移植的应

用前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2012 年 9 月至 2013 年 7 月在本院生殖医学中心接受冻融胚胎移植患者共 518 个周期的临床资料。纳入标准:(1)患者年龄均小于或等于 38 岁。(2)均采用长方案进行控制性超促排卵。按移植冻融胚胎类型分为 3 组,A 组:冻融囊胚移植,共 129 个周期;B 组:卵裂期胚胎复苏后行囊胚培养后移植,共 123 个周期;C 组(对照):冻融卵裂胚移植,共 266 个周期。比较 3 组间的临床结局及 A、B 两组新鲜周期胚胎和冻融周期的囊胚形成率和取消率。3 组间患者的平均年龄、不孕年限、体质指数(BMI)、转化日子宫内膜厚度、基础性激素水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

1.2 方法

1.2.1 胚胎评分和冷冻 根据卵裂球数目、形态和碎片数目将第 3 天的卵裂期胚胎分为 4 级: I 级: 碎片小于 5%; II 级: 5%~<20%; III 级: 20%~<50%; IV 级: 碎片大于或等于 50%, 其中 6/II 级以上定义为优质胚胎; 根据文献[1]进行囊胚分级, 将 3BB 以上囊胚定义为优质囊胚。按照知情同意的原则, 选择第 3 天剩余 3 枚以上 5/III 级的胚胎进行囊胚培养, 对第 3 天优质胚胎和第 5 天 3BC 或 3CB 以上囊胚进行冷冻。卵裂期胚胎和囊胚均采用玻璃化冷冻法进行冷冻, 囊胚冷冻前先行激光打孔人工皱缩。

1.2.2 胚胎复苏和冻融囊胚移植 胚胎冷冻 3 个月后进行冻融囊胚移植, 所有患者均采用激素替代法准备内膜, 即月经周期第 3 天起口服戊酸雌二醇(商品名: 补佳乐, 拜耳)4~6 mg/d, 第 10 天阴道超声监测子宫内膜厚度, 根据内膜生长情况调整戊酸雌二醇用量, 最大剂量 10 mg/d, 当内膜厚度大于或等于 8 mm 时, 给予肌内注射黄体酮 40 mg/d 转化内膜, 3 d 后选择 2~3 枚存活卵裂期胚胎移植, 或 5 d 后选择 1~2 枚存活囊胚移植。存活卵裂期胚胎标准: 完整细胞数大于 50%, 存活囊胚标准为囊胚腔的恢复和扩张。A 组与 C 组胚胎复苏后培养 2 h 移植, B 组卵裂期胚胎复苏后培养 2~3 d 移植, 移植后 14 d 测血或尿人绒毛膜促性腺激素, 阳性者为生化妊娠, 移植 5 周后 B 超检查发现孕囊确诊为临床妊娠, 妊娠 12 周内胚胎停止发育或流产定义为早期流产。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析; 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组患者的临床结局 A、B 组的生化妊娠率(70.5% vs. 67.5%)、临床妊娠率(61.2% vs. 58.2%)和胚胎种植率(42.3% vs. 40.2%)间差异无统计学意义($P > 0.05$), 但均显著高于 C 组(53.0%, 42.5%, 23.1%)($P < 0.05$)。3 组间早期流产率、异位妊娠率、多胎妊娠率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组患者的一般资料和临床结局比较

项目	A 组	B 组	C 组
周期数(个)	129	123	266
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	30.89 \pm 4.53	31.01 \pm 4.02	31.75 \pm 5.42
不孕年限($\bar{x} \pm s$, 年)	4.12 \pm 2.60	3.96 \pm 2.74	3.79 \pm 2.65
BMI($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	22.03 \pm 3.30	22.72 \pm 3.67	22.73 \pm 3.09
子宫内膜($\bar{x} \pm s$, mm)	10.15 \pm 1.61	9.83 \pm 1.25	10.00 \pm 1.41
基础性激素($\bar{x} \pm s$, IU/L)	6.63 \pm 1.96	6.01 \pm 1.85	6.51 \pm 1.52
平均移植胚胎数($\bar{x} \pm s$, 个)	1.87 \pm 0.47	1.86 \pm 0.90	2.51 \pm 0.78
生化妊娠率(% , n/n)	70.5(91/129)	67.5(83/123)	53.0(141/266) ^a
临床妊娠率(% , n/n)	61.2(79/129)	58.2(78/123)	42.5(113/266) ^a
胚胎种植率(% , n/n)	42.3(104/246)	40.2(92/229)	23.1(154/668) ^a
异位妊娠率(% , n/n)	1.6(2/129)	0.8(1/123)	4.5(12/266)
多胎妊娠率(% , n/n)	35.4(28/79)	33.3(26/78)	27.4(31/113)
早期流产率(% , n/n)	10.1(8/79)	9.0(7/78)	10.6(12/113)

^a: $P < 0.05$, 与 A、B 组比较。

2.2 新鲜胚胎与冻融胚胎的囊胚形成率比较 新鲜胚胎行囊

胚培养 237 个周期共 2 388 枚胚胎, 其中 11 个周期未形成囊胚放弃移植和冷冻, 周期取消率为 4.6%(11/237), 培养后获得囊胚 1 081 枚, 囊胚形成率为 45.3%(1 081/2 388)。根据第 3 天胚胎质量分为优质胚胎组和非优质胚胎组, 优质胚胎组共 1 413 枚胚胎, 培养后获 883 枚囊胚, 囊胚形成率为 62.5%(883/1 413); 非优质胚胎组共 975 枚胚胎, 培养后获 198 枚囊胚, 囊胚形成率为 20.3%(198/975)。冻融卵裂期胚胎行囊胚培养 139 个周期共 421 个胚胎, 其中 16 个周期未形成囊胚放弃移植, 周期取消率为 11.5%(16/139), 培养后获 243 枚囊胚, 囊胚形成率为 57.7%(243/421), 显著高于新鲜周期组($P < 0.05$)。优质胚胎组和冻融胚胎组的囊胚形成率均显著高于非优质胚胎组($P < 0.05$), 而前两者间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 冻融囊胚移植与冻融卵裂期胚胎囊胚培养的临床意义 囊胚是胚胎发育的重要阶段, 只有质量较好的胚胎才能发育到囊胚阶段, 而发育潜能差、染色体异常的胚胎常在 4~8 细胞阶段出现发育阻滞, 被自然淘汰。8 细胞前的胚胎主要依赖母源性基因生长, 8 细胞后胚胎基因组活化, 主要依赖胚胎自身基因生长, 有更高的发育潜能^[4]。通过囊胚培养可进一步淘汰发育潜能差和具有遗传缺陷的胚胎, 增加胚胎的体外筛选机会, 获得更好的临床结局。马文敏等^[5]的结果显示, 囊胚移植的胚胎数虽显著低于卵裂期胚胎, 但临床妊娠率却显著高于卵裂期胚胎(52.5% vs. 30.0%)。

在体外受精超促排卵过程中, 子宫内膜的成熟较自然周期提前 2~4 d, 而子宫内膜成熟提前 3 d 以上的移植周期均未获得妊娠^[6]。囊胚移植可使胚胎发育与子宫内膜“种植窗”同步, 更符合生理着床时间, 同时缩短胚胎植入子宫腔与着床的时间间隔, 且该阶段子宫收缩频率减少, 降低了胚胎被排出体外的概率, 有利于胚胎着床。本研究的结果也证实, 虽然 A 组移植胚胎数低于 C 组, 但生化妊娠率、临床妊娠率、胚胎种植率高达 70.5%、61.2% 和 42.3%, 均显著高于 C 组。

由于冻融囊胚移植具有较好的临床结局和累计妊娠率, 作者对部分复苏后存活 3 枚优质卵裂期胚胎的患者进行囊胚培养, 以探讨冻融后卵裂期胚胎的发育潜能及对冻融周期临床结局的改善作用。Eftekhari 等^[7]的结果显示, 复苏后卵裂期胚胎行囊胚培养能够提高继续妊娠率, 改善临床结局。本研究的结果显示, 复苏后存活卵裂期胚胎的囊胚形成率高于新鲜周期, 且临床妊娠率与冻融囊胚移植相近, 显著高于冻融卵裂期胚胎移植。推测可能与其冷冻前即为优质胚胎, 复苏后存活表明其能够经过低温冷冻和复苏的考验, 具有更高的发育潜能, 不仅囊胚形成率高而且移植后临床妊娠率也显著提高, 可获得与冻融囊胚相近的临床结局^[8]。建议冻融周期解冻有 3 个以上存活优质卵裂期胚胎行囊胚培养后移植, 不仅可对冻融胚胎进行体外筛选, 而且可获得更好的妊娠结局。

辅助生殖技术临床应用的并发症之一就是增加了异位妊娠的发生率, 可高达 5%^[9], 而自然妊娠仅为 1%~2%。日本学者加藤修^[10]发现, 卵裂期胚胎移植后可随子宫内膜分泌液强流进入输卵管, 在输卵管内发育成囊胚, 在孕激素的作用下, 子宫内膜分泌液变弱, 胚胎在输卵管纤毛的蠕动下重新回到子宫腔内着床。当输卵管发生病变, 蠕动功能异常时, 发生异位妊娠的可能性增大。而囊胚移植由于时间推后, 黄体酮水平

升高避开了子宫分泌液的强流和宫缩导致的负压,可有效降低异位妊娠的发生。本研究结果显示,冻融囊胚移植和冻融卵裂期胚胎行囊胚培养后移植的异位妊娠率均低于冻融卵裂期胚胎移植,但两者间差异无统计学意义。

3.2 胚胎质量与囊胚形成率 新鲜周期移植后剩余胚胎行囊胚培养不仅能够对剩余胚胎进行有效筛选,而且在冻融周期移植可显著提高种植率和临床妊娠率^[11]。由于只有 30%~50% 的优质胚胎能够形成囊胚^[12],囊胚培养的主要弊端就是培养过程中导致的胚胎损耗以及长时间培养导致透明带的变化,甚至出现无囊胚形成的潜在风险。Hardy 等^[13]认为,胚胎的质量影响囊胚形成率、囊胚质量和种植率。胚胎碎片不仅干扰细胞之间的连接,不利于细胞的融合、囊胚腔和囊胚的形成^[14],而且释放的有毒物质损伤其临近的细胞,减少胞质的体积并耗竭胚胎发育所需的细胞器,造成卵裂球或胞质的损失,最终凋亡。随着胚胎碎片的增多,囊胚形成率降低,囊胚质量下降。本研究也发现,第 3 天优质胚胎的囊胚形成率(62.5%)显著高于非优质胚胎(20.3%),因此,对第 3 天大于或等于 3 个优质胚胎进行囊胚培养,理论上至少可获得 1~2 枚囊胚,从而确保囊胚培养的成功。对于第 3 天形态学评分低的胚胎进行体外延长培养仍有一部分能越过阻滞期发育到囊胚,从中筛选出具有发育潜能、生存能力强、质量好的胚胎。本研究对 246 枚第 3 天 2 细胞或 3 细胞胚胎进行了观察,仅有 3 枚形成囊胚,囊胚形成率仅为 1.2%,表明该类胚胎几乎不具备发育为囊胚的潜能。

总之,本研究认为冻融囊胚移植与冻融卵裂期胚胎复苏后行囊胚培养后移植可获得较好的临床结局,尤其解冻卵裂期胚胎行囊胚培养可获得较高的囊胚形成率和妊娠率,建议对复苏后存活 3 枚优质卵裂期胚胎的患者行囊胚培养后移植。

参考文献:

[1] Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1155-1158.

[2] Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, et al. The graduated embryo score(GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(9): 1970-1975.

[3] Hong SW, Sepilian V, Chung HM, et al. Cryopreserved human blastocysts after vitrification result in excellent

implantation and clinical pregnancy rates[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(6): 2062-2064.

[4] Huang CC, Lee TH, Chen SU, et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(1): 122-128.

[5] 马文敏,李海仙,张静雯,等.囊胚期胚胎培养与移植的临床研究[J]. *中国妇幼保健*, 2008, 23(32): 4604-4605.

[6] Kuczyński W, Dhont M, Grygoruk C, et al. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(9): 2423-2427.

[7] Eftekhar M, Aflatoonian A, Mohammadian F, et al. Transfer of blastocysts derived from frozen-thawed cleavage stage embryos improved ongoing pregnancy[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286(2): 511-516.

[8] Wang YA, Chapman M, Costello M, et al. Better perinatal outcomes following transfer of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos: a population based study[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(6): 1536-1542.

[9] Sowter MC, Farquhar CM. Ectopic pregnancy: an update[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004, 16(4): 289-293.

[10] 加藤修.不孕症治疗的成功之路[M].上海:上海科学普及出版社, 2004: 80-90.

[11] 张顺吉,林戈,卢光琇.卵裂期胚胎、囊胚的玻璃化冷冻解冻的妊娠结果分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(8): 955-958.

[12] Behr B, Pool TB, Milki AA, et al. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(2): 454-457.

[13] Hardy K, Stark J, Winston RM. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(4): 1165-1169.

[14] Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Ashtiani SK, et al. Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos[J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(6): 823-832.

(收稿日期:2014-05-23 修回日期:2014-07-04)

(上接第 4609 页)

nodal metastasis in gastric cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(7): 695-702.

[8] Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni FC, Cury PM, et al. Annexin 1, differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(12): 2582-2589.

[9] Liang L, Qu L, Ding Y. Protein and mRNA characterization in human colorectal carcinoma cell lines with different

metastatic potentials[J]. *Cancer Invest*, 2007, 25(6): 427-434.

[10] Paravicini TM, Yogi A, Mazur A, et al. Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia[J]. *Hypertension*, 2009, 53(2): 423-429.

(收稿日期:2014-06-16 修回日期:2014-10-25)