

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.07.0842

• 专题报道 •

新鲜周期与复苏周期囊胚移植效果的历史性队列研究

印惠荣^{1△}, 刘苡萱^{1△}, 唐少文², 松迪¹, 林莎莎¹, 胡婷婷¹, 叶红¹, 施敏凤¹, 孙方臻^{1,3*}

1. 第二军医大学长海医院生殖医学中心, 上海 200433

2. 南京医科大学流行病学系, 南京 211166

3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

[摘要] **目的** 比较新鲜周期和复苏周期囊胚移植的相关参数及其临床结局。**方法** 采用历史性队列研究方法, 将2015年3月—2016年12月在第二军医大学长海医院生殖医学中心接受助孕治疗的患者分为新鲜周期囊胚移植组(61例)和复苏周期囊胚移植组(372例), 收集其临床结局资料, 比较两组患者的囊胚种植率和临床妊娠率。根据移植天数将复苏周期囊胚移植组分为第5天组($n=308$)和第6天组($n=64$)2个亚组, 分析其临床结局的差异。

结果 新鲜周期和复苏周期囊胚移植组患者的年龄和移植囊胚数差异均无统计学意义, 复苏周期囊胚移植组患者的囊胚种植率高于新鲜周期囊胚移植组(40.2% vs 29.6%, $P=0.036$), 但两组患者的临床妊娠率差异无统计学意义(57.8% vs 47.5%, $P=0.134$)。复苏周期囊胚移植第5天组患者的囊胚种植率和临床妊娠率均高于第6天组(囊胚种植率42.3% vs 30.1%, $P=0.016$; 临床妊娠率60.7% vs 43.8%, $P=0.012$)。**结论** 复苏周期囊胚移植可比新鲜周期囊胚移植获得更好的妊娠结局, 且第5天移植者比第6天移植者效果更佳。

[关键词] 队列研究; 胚胎移植; 囊胚; 新鲜; 冻融; 妊娠结局

[中图分类号] R 321-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)07-0842-04

Clinical outcome of fresh or frozen-thawed blastocyst transfer: a historic cohort study

YIN Hui-rong^{1△}, LIU Yi-xuan^{1△}, TANG Shao-wen², SONG Di¹, LIN Sha-sha¹, HU Ting-ting¹, YE Hong¹, SHI Min-feng¹, SUN Fang-zhen^{1,3*}

1. Reproductive Medicine Center, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Epidemiology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China

3. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

[Abstract] **Objective** To explore the relevant parameters and clinical outcome of frozen-thawed blastocyst transfer compared with fresh blastocyst transfer. **Methods** A historic cohort study was conducted to analyze the blastocyst implantation rate and clinical pregnancy rate of 61 patients receiving fresh blastocyst transfer and 372 receiving frozen-thawed blastocyst transfer from Mar. 2015 to Dec. 2016 in Changhai Hospital of Second Military Medical University. And then the clinical outcomes of day five ($n=308$) or day six ($n=64$) embryo were analyzed in the frozen-thawed blastocyst transfer group. **Results** There was no significant difference in age or number of the transferred blastocysts between the two groups. Blastocyst implantation rate in frozen-thawed blastocyst transfer group was significantly higher than that in fresh blastocyst transfer group (40.2% vs 29.6%, $P=0.036$), while no significant difference was found in clinical pregnancy rate between the two groups (57.8% vs 47.5%, $P=0.134$). Blastocyst implantation rate and clinical pregnancy rate of day five embryo were significantly higher than those of day six (42.3% vs 30.1%, $P=0.016$, and 60.7% vs 43.8%, $P=0.012$, respectively). **Conclusion** The pregnancy outcome of frozen-thawed blastocyst transfer is better compared with fresh blastocyst transfer, especially when transferring on day five.

[Key words] cohort studies; embryo transfer; blastula; fresh; frozen-thawed; pregnancy outcome

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(7): 842-845]

[收稿日期] 2017-04-17 [接受日期] 2017-06-22

[作者简介] 印惠荣, 副主任技师. E-mail: topyin@126.com; 刘苡萱, 硕士, 住院医师. E-mail: 857272278@qq.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162048, E-mail: sunfangzhen@sina.com

随着辅助生育技术的发展和胚胎培养系统的改良,囊胚培养和移植得到越来越广泛的应用。囊胚培养既能筛选出更具发育潜能的胚胎,又能使胚胎与子宫内膜更为同步,移植后可获得较高的囊胚种植率和良好的妊娠结局。但是目前有关囊胚移植的策略仍存在一定的争议^[1],如是行新鲜周期直接进行囊胚培养后移植还是复苏周期囊胚移植? 胚胎培养至第5天或第6天行囊胚移植是否有差异? 本研究基于既往资料,将患者分组为新鲜周期和复苏周期囊胚培养组进行历史性队列研究,旨在比较两种移植方案下的囊胚种植率和临床妊娠率,为进一步优化囊胚移植方案提供依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象 纳入研究对象为2015年3月—2016年12月在第二军医大学长海医院生殖医学中心接受囊胚移植助孕的433例患者。纳入标准:体外受精/卵胞质内单精子注射-胚胎移植(*in vitro* fertilization/intra-cytoplasmic sperm injection and embryo transfer, IVF/ICSI-ET)助孕和冷冻胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer, FET)助孕,且移植胚胎为囊胚者。排除标准:囊胚培养未形成囊胚者、放弃囊胚移植者。根据移植方案将患者分为新鲜周期囊胚移植组(61例)和复苏周期囊胚移植组(372例),同时将复苏周期囊胚移植组患者根据行囊胚移植的时间分为复苏周期囊胚移植第5天组(308例)和第6天组(64例)。囊胚培养通过第二军医大学长海医院伦理委员会审批通过,且所有患者在囊胚培养前均签署知情同意书。

1.2 取卵 通过激素水平和阴道B超监测卵泡发育情况,适时注射注射用重组人绒毛膜促性腺激素(hCG; 商品名:艾泽,雪兰诺公司,0.25 mg/支)

250 μg,于34~36 h后在阴道超声探头引导下进行卵子抽吸采集。

1.3 囊胚培养与评分 将第3天胚胎转移至商品化的培养基(G5Series,瑞典 Vitrolife 公司)中进行囊胚培养,于胚胎第5天和第6天观察胚胎并评分,根据囊腔扩张程度进行分期。囊腔不足胚胎体积50%的为1期,超过50%为2期,占满整个胚胎为3期,囊腔继续扩张、透明带变薄为4期,囊胚部分从透明带孵出为5期,囊胚完全孵出为6期。

1.4 移植与结局随访 挑选正常受精的可移植囊胚在B超引导下行宫腔内移植。胚胎移植后第14天检测血hCG阳性、移植后第33~35天B超检查显示宫内妊娠,见胎心,视为临床妊娠。临床妊娠率(%)=临床妊娠周期数/移植周期数×100%;种植率(%)=孕囊数/移植胚胎数×100%。

1.5 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以构成比或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 患者一般情况 433例患者中新鲜周期囊胚培养后移植患者61例,复苏周期囊胚移植患者372例。患者年龄21~50岁,平均(31.61±4.59)岁。

2.2 新鲜周期与复苏周期囊胚移植患者的临床特征和妊娠结局 新鲜周期囊胚移植组与复苏周期囊胚移植组年龄和囊胚移植数目差异均无统计学意义(表1);但复苏周期囊胚移植组的囊胚种植率高于新鲜周期囊胚移植组($P<0.05$);复苏周期囊胚移植组的临床妊娠率略高于新鲜周期囊胚移植组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 新鲜周期囊胚移植组与复苏周期囊胚移植组临床特征及妊娠结局的比较

Tab 1 Comparison of clinical characteristics and pregnancy outcome between two groups

Index	Fresh blastocyst transfer	Frozen-thawed blastocyst transfer	t/χ^2 value	P value
Age (year), $\bar{x}\pm s$	31.67±5.06($n=61$)	31.60±4.52($n=372$)	-0.106	0.916
Number of blastocyst transfer $\bar{x}\pm s$	1.77±0.42($n=61$)	1.82±0.45($n=372$)	0.764	0.445
Implantation rate ^a %(n/N)	29.6(32/108)	40.2(272/676)	4.410	0.036
Clinical pregnancy rate %(n/N)	47.5(29/61)	57.8(215/372)	2.241	0.134

^a: Number of implanted embryos/number of transferred embryos

2.3 新鲜周期与复苏周期不同囊胚移植数目与妊娠结局 新鲜周期囊胚移植组与复苏周期囊胚移植组囊胚移植数目多为1~2枚,复苏周期囊胚移植组

中9例患者因高龄或胚胎质量差移植3枚囊胚(其中1例妊娠,单胎)。新鲜周期囊胚移植组中不同囊胚移植数目(1枚或2枚)患者的临床妊娠率差异无

统计学意义(35.7% vs 50.1%, $P=0.133$);而复苏周期囊胚移植组中移植2枚囊胚者的临床妊娠率高于移植1枚者(39.0% vs 64.3%, $P<0.001$)。进一步比较在相同囊胚移植数下采用不同移植方案患者的临床妊娠率,结果显示无论是移植1枚还是移植2枚囊胚,不同移植方案患者的临床妊娠率差异

均无统计学意义。

2.4 第5天及第6天囊胚移植患者的临床特征与妊娠结局 两组患者的年龄和囊胚移植数目差异均无统计学意义($P>0.05$),第5天组患者的囊胚种植率和临床妊娠率均高于第6天组($P<0.05$,表2)。

表2 第5天与第6天复苏周期囊胚移植患者的临床特征及妊娠结局比较

Tab 2 Comparison of clinical characteristics and pregnancy outcome between day five and day six transferring embryos

Index	Day five transferring	Day six transferring	t/χ^2 value	P value
Age (year), $\bar{x}\pm s$	31.63±4.51($n=308$)	31.48±4.63($n=64$)	0.234	0.815
Number of blastocyst transferred $\bar{x}\pm s$	1.83±0.43($n=308$)	1.77±0.50($n=64$)	0.934	0.353
Implantation rate ^a %(n/N)	42.3(238/563)	30.1(34/113)	5.810	0.016
Clinical pregnancy rate %(n/N)	60.7(187/308)	43.8(28/64)	6.252	0.012

^a: Number of implanted embryos/number of transferred embryos

3 讨论

近年来,辅助生殖技术已经成为临床治疗不孕不育的重要手段之一。临床工作者及实验人员也在不断改进技术和方法,以期提高临床妊娠结局。胚胎质量是影响临床妊娠率的关键因素之一,挑选具有发育潜能的胚胎极其重要。仅从形态学评价第3天胚胎的发育潜能不够准确,选取最具发育潜能的胚胎进行移植是胚胎实验室工作者面临的一大挑战^[2]。1998年 Gardner 等^[3]首次用序贯培养基将人胚胎体外培养至囊胚期后进行移植,取得了较理想的临床妊娠结局。囊胚培养延长了胚胎的体外培养时间,在体外继续培养的过程中没有发育潜能的胚胎和携带有异常染色体或基因的胚胎常被自然淘汰,只有优质胚胎才能发育至囊胚期。因此,囊胚培养是进一步筛选更具发育潜能胚胎的有效方法。

既往对于新鲜周期囊胚和复苏周期囊胚移植的妊娠结局尚存在一些争议。一些研究认为复苏周期囊胚移植率低于新鲜周期或与新鲜周期接近^[4],可能是因为部分复苏周期移植的囊胚来自新鲜周期剩余的可利用囊胚,质量通常不如新鲜周期,这在一定程度上降低了囊胚种植率和临床妊娠率。但越来越多的研究证实,复苏周期囊胚移植的囊胚种植率、临床妊娠率均优于新鲜周期^[5-7],可能的原因是:(1)复苏周期具有更好的内膜容受性以及胚胎与内膜发育的同步性,而新鲜周期大量促性腺激素的应用和超促排卵后期血孕酮水平的升高使子宫内膜发育提前,造成胚胎与子宫内膜发育不同步及内膜的容受性降低,导致新鲜周期胚胎妊娠率和种植率降低^[8];(2)新鲜周期子宫内膜许多基因异常表达、胚胎着床

过程中患者子宫内膜转化生长因子 β (TGF- β)表达异常以及大量白细胞聚集亦是复苏周期种植率和移植率高的原因^[5];(3)囊胚移植阶段子宫收缩减少,有利于胚胎种植和避免胚胎被宫缩排出;(4)玻璃化冷冻技术的普及和熟练掌握大大降低了冻融过程对胚胎的损伤^[7]。本研究结果显示,复苏周期囊胚移植组的囊胚种植率和临床妊娠率均高于新鲜周期囊胚移植组。本研究中新鲜周期囊胚移植患者的临床妊娠率相对偏低,考虑可能与选择囊胚培养的胚胎及人群有关,IVF/ICSI新鲜周期常规行卵裂期胚胎移植及冻存,有效胚胎数超过8枚者(优先冻存优质卵裂期胚胎,剩余胚胎行囊胚培养)、部分高龄患者及反复种植失败者、习惯性流产或多次不良孕产史者建议行囊胚培养及移植。

囊胚培养时通常会将胚胎培养至第5~6天时进行移植,本中心复苏周期移植的囊胚主要为卵裂期胚胎解冻后继续培养2~3d形成。目前关于移植不同发育阶段囊胚对妊娠结局的影响报道不一。有研究认为复苏周期第5、6天囊胚移植后的临床结局相似^[9];更多则认为移植第5天复苏囊胚的临床妊娠率、囊胚种植率、胎儿出生率均高于第6天^[10-11]。本研究结果显示复苏周期第5天囊胚移植患者的囊胚种植率和临床妊娠率均高于第6天移植者,表明第5天囊胚移植具有更好的发育潜能。可能的原因是:(1)第5天囊胚移植时,胚胎与内膜具有更好的同步性,而第6天囊胚移植时胚胎发育可能滞后于子宫内膜;(2)相比第5天,第6天囊胚的发育速度偏慢,发育潜能有可能下降;(3)通常在没有合适的第5天囊胚可以移植的情况下才会选择第6天的囊胚,此时胚胎的可选择性相对较小,移植

的囊胚质量亦会偏低。

本研究是基于既往临床资料开展的历史性队列研究,明确了复苏周期囊胚移植比新鲜周期可获得更好的妊娠结局,而且第5天移植者比第6天移植者效果更佳,这为建立合适的囊胚移植方案提供了依据。本研究因果论证能力强,但尚存在一定的局限性,如 Pereira 等^[12]开展的历史性队列研究中,新鲜周期和复苏周期囊胚移植分别有 918 和 1 273 个移植周期,而本研究新鲜周期囊胚组的样本量较小。另外,本研究旨在探讨不同移植方案对临床结局的影响,而影响临床妊娠的因素很多,因此不同研究者的研究结果也可能存在差异。许伟伟等^[13]研究发现年龄、优质胚胎数目、hCG 日子宫内膜的厚度是新鲜周期囊胚移植获得良好临床妊娠结局的独立影响因素;王丹丹等^[14]研究发现年龄是影响女性生育力的主要因素;黄晓卉等^[15]发现在玻璃化冻融胚胎移植周期中,年龄和胚胎质量对妊娠成功具有重要作用。因此,除囊胚移植方式外,我们仍需考虑胚胎质量、子宫内膜厚度、年龄对妊娠结局的影响。考虑囊胚主要由优质胚胎继续体外培养筛选而来,本研究纳入病例均是囊胚移植病例,因此移植的胚胎质量有保障。此外,本周期移植日子宫内膜厚度、形态不佳的患者均在知情后放弃移植,因此不存在内膜不佳时移植的病例。综上,本研究最终纳入了年龄、移植囊胚数目 2 个影响因素,但仍可能存在一定程度的偏倚。因此,本研究只为临床研究提供参考,仍需开展大样本、设计良好的前瞻性研究进行进一步验证。

[参考文献]

[1] WONG K M, VAN WELY M, MOL F, REPPING S, MASTENBROEK S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction [J/CD]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 3: CD011184. doi: 10.1002/14651858. CD011184. pub2.

[2] 刘艳丽,杨晓娜,许小燕,路芳鸣,杨悦,杨静静,等. 新鲜周期和复苏周期囊胚培养及移植的临床结局分析 [J]. 郑州大学学报(医学版),2015,50:264-267.

[3] GARDNER D K, VELLA P, LANE M, WAGLEY L, SCHLENKER T, SCHOOLCRAFT W B. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers[J]. Fertil Steril, 1998, 69: 84-88.

[4] KU P Y, LEE R K, LIN S Y, LIN M H, HWU Y M. Comparison of the clinical outcomes between fresh blastocyst and vitrified-thawed blastocyst transfer[J].

J Assist Reprod Genet, 2012, 29: 1353-1356.

[5] SHAPIRO B S, DANESHMAND S T, GARNER F C, AGUIRRE M, HUDSON C, THOMAS S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders [J]. Fertil Steril, 2011, 96: 344-348.

[6] ÖZGÜR K, BERKKANOĞLU M, BULUT H, ISIKLI A, COETZEE K. Higher clinical pregnancy rates from frozen-thawed blastocyst transfers compared to fresh blastocyst transfers; a retrospective matched-cohort study[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32: 1483-1490.

[7] 何巧花,李杭生,张国玲,张翠莲,崔世红. 新鲜囊胚与玻璃化冷冻囊胚复融周期移植的临床结局比较[J]. 生殖医学杂志,2014,23:809-812.

[8] XU B, LI Z, ZHANG H, JIN L, LI Y, AI J, et al. Serum progesterone level effects on the outcome of *in vitro* fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles[J]. Fertil Steril, 2012, 97: 1321-1327.

[9] EL-TOUKHY T, WHARF E, WALAVALKAR R, SINGH A, BOLTON V, KHALAF Y, et al. Delayed blastocyst development does not influence the outcome of frozen-thawed transfer cycles [J]. BJOG, 2011, 118: 1551-1556.

[10] 贾磊,岳超敏,宫晓,方丛,张敏芳,梁晓燕. 移植复苏周期第5日和第6日冻融囊胚发育潜能的比较[J]. 新医学,2013,44:748-751.

[11] MESUT N, CIRAY H N, MESUT A, AKSOY T, BAHCECI M. Cryopreservation of blastocysts is the most feasible strategy in good responder patients[J]. Fertil Steril, 2011, 96: 1121-1125.

[12] PEREIRA N, PETRINI A C, LEKOVICH J P, SCHATTMAN G L, ROSENWAKS Z. Comparison of perinatal outcomes following fresh and frozen-thawed blastocyst transfer[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2016, 135: 96-100.

[13] 许伟伟,许昌,祁秀娟,吕映频,汤秀明,谭慧芳,等. 影响体外受精-胚胎移植临床妊娠结局的多因素分析[J]. 中国现代医药杂志,2016,18:11-15.

[14] 王丹丹,王兴玲,张彩霞. 影响体外受精-胚胎移植临床结局多因素分析[J]. 中国妇幼保健,2009,24: 4270-4272.

[15] 黄晓卉,胡冬玲,刘美,张昌军. 年龄对玻璃化冻融胚胎移植结局的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19: 107-108.