

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.03.0334

· 短篇论著 ·

冻融胚胎复苏后培养时间对临床妊娠率的影响

冯书改, 刘苾莹, 张慧琴, 颜宏利, 朱 旻, 杜 惠, 张文静, 印惠荣, 松 迪, 刘 敏, 林莎莎, 胡婷婷, 王 玲, 洪 毅, 施敏凤*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨卵裂期冻融胚胎复苏后体外培养时间对冻融胚胎移植(FET)周期临床妊娠率的影响。**方法** 收集2016年1月至12月在海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心接受FET助孕的692例患者的临床资料。根据胚胎复苏后至移植前体外培养的天数将患者分为3组: 复苏后未培养组、复苏后培养1 d组、复苏后培养2 d组, 分析比较3组患者的妊娠结局。**结果** 3组患者的年龄、体质量指数、不孕年限、基础卵泡刺激素水平和子宫内膜准备方案差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。复苏后未培养组、复苏后培养1 d组、复苏后培养2 d组胚胎丢失率分别为0.0% (0/706)、13.3% (64/481)、43.0% (114/265), 3组间差异有统计学意义($P<0.01$)。3组胚胎移植数和移植日子宫内膜厚度差异均无统计学意义(P 均 >0.01); 复苏后培养2 d组和复苏后培养1 d组优质胚胎移植率均低于复苏后未培养组(P 均 <0.01), 复苏后培养2 d组临床妊娠率高于复苏后未培养组($P<0.01$)。**结论** 卵裂期冻融胚胎复苏后体外培养1~2 d后移植, 虽然增加胚胎丢失率, 但可筛选具有发育潜能的胚胎, 提高临床妊娠率。

[关键词] 体外培养; 卵裂; 桑葚胚; 囊胚; 冻融胚胎移植**[中图分类号]** R 321.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)03-0334-04

Effect of culture time of frozen embryo after thawing on clinical pregnancy rate

FENG Shu-gai, LIU Yi-xuan, ZHANG Hui-qin, YAN Hong-li, ZHU Min, DU Hui, ZHANG Wen-jing, YIN Hui-rong, SONG Di, LIU Min, LIN Sha-sha, HU Ting-ting, WANG Ling, HONG Yi, SHI Min-feng*

Department of Reproductive Medicine Center, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of *in vitro* culture time of frozen cleavage embryo after thawing on clinical pregnancy rate during frozen-thawed embryo transfer (FET) cycles. **Methods** The clinical data of 692 patients were analyzed; they received FET in the Department of Reproductive Medicine Center, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University) from January to December in 2016. According to the days of *in vitro* culture between thawing and transferring, the patients were divided into three groups: no *in vitro* culture group, 1-day *in vitro* culture group and 2-day *in vitro* culture group. The pregnancy outcomes were compared between the three groups. **Results** There were no significant differences in age, body mass index, infertile duration, basic follicle-stimulating hormone (FSH) level or endometrial preparation protocol between the three groups (all $P>0.05$). The embryo loss rates of the no *in vitro* culture group, the 1-day *in vitro* culture group and the 2-day *in vitro* culture group were 0.0% (0/706), 13.3% (64/481) and 43.0% (114/265), respectively, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). There were no significant differences in number of transferred embryo or endometrial thickness on transplantation day between the three groups (both $P>0.05$). The good-quality embryo transfer rates in the 2-day *in vitro* culture group and 1-day *in vitro* culture group were significantly lower than that in the no *in vitro* culture group (both $P<0.01$), and the clinical pregnancy rate in the 2-day *in vitro* culture group was significantly higher than that in the no *in vitro* culture group ($P<0.01$). **Conclusion** *In vitro* culture for 1-2 days after thawing frozen cleavage embryos may increase the embryo loss rate, but it can improve the clinical pregnancy rate by screening the embryos with developmental potential.

[Key words] *in vitro* culture; cleavage; morula; blastula; frozen-thawed embryo transfer

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(3): 334-337]

[收稿日期] 2017-09-18 **[接受日期]** 2018-01-26**[基金项目]** 长海医院青年启动基金(CH201809). Supported by the Youth Initial Fund of Changhai Hospital (CH201809).**[作者简介]** 冯书改, 硕士, 主治医师. E-mail: 1335529460@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162048, E-mail: minfengshi@163.com

冻融胚胎移植 (frozen-thawed embryo transfer, FET) 作为辅助生殖助孕中重要的衍生技术之一, 可避免体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 周期卵巢过度刺激综合征 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS), 且子宫内膜过薄、子宫内膜息肉等不适合新鲜移植者也可行胚胎冷冻。新鲜胚胎周期移植未妊娠患者进行 FET 可有效提高临床累积妊娠率^[1]。对于 FET 周期中胚胎移植前卵裂期冻融胚胎进行体外培养的时间, 各中心均有不同标准, 冻融胚胎复苏后培养时间对临床妊娠率影响的相关研究结果也各不相同^[2-6]。本研究回顾性分析海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院生殖医学中心接受 FET 助孕患者的 FET 周期资料, 探讨卵裂期冻融胚胎复苏后, 不同培养时间进行 FET 对临床妊娠率的影响。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 1 月至 12 月于海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院生殖医学中心接受 FET 助孕的不孕患者。纳入标准: FET 周期; 复苏冷冻胚胎为第 3 天卵裂期胚胎。排除标准: (1) 因非胚胎因素放弃 FET 周期; (2) 卵裂期冻融胚胎复苏后培养 3 d, 胚胎裂解无可移植胚胎周期; (3) 移植日子宫内膜偏薄 (小于 7 mm)。纳入患者均在医师充分告知后签署知情同意书。本研究通过海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院医学伦理委员会审批。

1.2 研究方法

1.2.1 胚胎冷冻、复苏及胚胎评价方法 上周期可用胚胎均采用玻璃化冷冻方法进行冻存。复苏日采用快速复温的方式复苏玻璃化冷冻的胚胎, 复苏后重新评价胚胎; 接受复苏后继续体外培养的胚胎在移植日再次评价胚胎, 具体评价方法及优质胚胎定义同参考文献 [7]。

1.2.2 子宫内膜准备方案 既往月经周期规律的患者采用自然周期方案, 月经周期不规律者采用激素替代或小剂量药物促排卵方案准备子宫内膜。(1) 自然周期方案: 既往月经周期规律者, 在月经周期第 10~12 天开始用 B 型超声监测, 当卵泡直径 > 18 mm 时予注射用绒促性素 (国药准字 H44020673, 丽珠集团丽珠制药厂, 2 000 U/支)

6 000 U 肌内注射诱排卵, 排卵后开始口服黄体酮胶丸 (国药准字 H20031099, 浙江爱生药业有限公司, 100 mg/粒) 100 mg/次、2 次/d, 并肌内注射黄体酮注射液 (国药准字 H44020229, 广州白云山明兴制药有限公司, 20 mg/支) 40 mg/d 或者阴道塞黄体酮阴道缓释凝胶 (批号 C1643C, 英国 Fleet Laboratories Limited, 90 mg/支) 90 mg/d。在黄体酮转化的第 4 天移植第 3 天胚胎, 第 5 天移植桑葚胚, 第 6 天移植囊胚。(2) 激素替代方案: 月经周期第 3 天开始口服戊酸雌二醇片 (国药准字 J20130009, 法国 DELPHARM Lille S.A.S., 1 mg/片), 起始剂量为 2 mg/次、1 次/d, 连用 5 d 后增加为 2 mg/次、2 次/d 连用 5 d, 用药第 11 天用 B 型超声监测子宫内膜, 如果内膜厚度 < 7.5 mm, 可加量至 6 mg/d; 或月经周期第 3 天开始于大腿内侧皮肤外用雌二醇凝胶 (H20090763, 法国法杏制药厂, 80 g/支), 起始剂量为 2.5 g/次、1 次/d, 5 d 后增加为 2.5 g/次、2 次/d 连用 5 d, 若用药第 11 天时子宫内膜厚度 < 7.5 mm, 可加量至 2.5 g/次、3 次/d。直至超声检查提示子宫内膜厚度 ≥ 8 mm 时, 开始给予黄体酮转化内膜, 黄体支持方法同前。(3) 小剂量药物促排卵方案: 月经周期第 5 天开始口服来曲唑片 (国药准字 H19991001, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 2.5 mg/片) 2.5 mg/次、1 次/d, 连用 5 d。第 10 天开始监测卵泡发育情况, 若有优势卵泡出现, 等待卵泡继续生长; 若无优势卵泡, 予注射用尿促性素 (批号 170604, 丽珠集团丽珠制药厂, 75 U/支) 75 U/d, 待优势卵泡直径 ≥ 18 mm 后, 予注射用绒促性素 6 000 U 肌内注射诱排卵, 排卵后开始使用黄体酮, 黄体支持方法同前。

1.2.3 研究分组 根据胚胎复苏后至移植前体外培养的天数将患者分为 3 组: 复苏后未培养组、复苏后培养 1 d 组、复苏后培养 2 d 组。

1.2.4 胚胎移植及临床妊娠判断 腹部超声引导下完成胚胎移植。妊娠标准: 胚胎移植 14 d 后检测血清人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG), 移植后 30~35 d 超声检查观察到妊娠囊为临床妊娠。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组间比较采用方差分析; 计数资料以例数和百分数表示, 组间比较

采用 χ^2 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 3组一般情况比较 3组患者一般情况见表1。共 692 周期纳入研究,其中 381 周期复苏后未培

养于当天移植,228 周期复苏后培养 1 d 移植,83 周期复苏后培养 2 d 移植。3 组患者年龄、不孕年限、体质量指数 (body mass index, BMI)、基础卵泡刺激激素、内膜准备方案的差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。

表 1 3组一般情况比较

项目	复苏后未培养组 N=381	复苏后培养 1 d 组 N=228	复苏后培养 2 d 组 N=83	F/ χ^2 值	P 值
年龄 (岁), $\bar{x} \pm s$	32.66 \pm 5.16	32.32 \pm 5.03	31.20 \pm 3.90	2.943	0.053
不孕年限 (年), $\bar{x} \pm s$	4.12 \pm 3.06	4.10 \pm 3.04	3.95 \pm 2.18	0.106	0.899
体质量指数 ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$), $\bar{x} \pm s$	22.28 \pm 3.41	22.06 \pm 2.72	21.41 \pm 3.46	2.215	0.110
基础卵泡刺激激素 $z_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$	6.64 \pm 2.62	6.75 \pm 3.30	6.03 \pm 1.63	1.690	0.185
子宫内膜准备方案 n (%)				4.400	0.355
自然周期方案	29 (7.6)	18 (7.9)	3 (3.6)	1.852	0.396
激素替代方案	318 (83.5)	197 (86.4)	75 (90.4)	2.933	0.231
小剂量药物促排卵方案	34 (8.9)	13 (5.7)	5 (6.0)	2.432	0.296

2.2 3组移植情况及妊娠结局比较 复苏后未培养组、复苏后培养 1 d 组和复苏后培养 2 d 组复苏后存活的卵裂期胚胎数量分别为 706、481 和 265 枚,分别经过 0、1、2 d 体外培养后,胚胎丢失数分别为 0 枚 (0.0%)、64 枚 (13.3%)、114 枚 (43.0%),3 组间差异有统计学意义 ($\chi^2=332.240, P<0.01$); 两两比较发现,复苏后培养 1 d 组胚胎丢失率高于复苏后未培养组 ($\chi^2=99.291, P<0.01$),复苏后培养 2 d 组胚胎丢失率高于复苏后未培养组和复苏后培养 1 d 组 ($\chi^2=344.114、83.035, P$ 均 <0.01)。3 组胚胎移植数及移植日子宫内膜厚度差异均无统计学意

义 (P 均 >0.05)。3 组优质胚胎移植率差异有统计学意义 ($\chi^2=190.000, P<0.01$); 两两比较发现,复苏后未培养组优质胚胎移植率高于复苏后培养 1 d 组和复苏后培养 2 d 组 ($\chi^2=156.614、106.660, P$ 均 <0.01),复苏后培养 1 d 组和复苏后培养 2 d 组差异无统计学意义 ($\chi^2=0.717, P>0.05$)。3 组移植后临床妊娠率差异有统计学意义 ($\chi^2=16.376, P<0.01$); 两两比较发现,复苏后未培养组与复苏后培养 1 d 组临床妊娠率差异无统计学意义 ($\chi^2=2.562, P>0.05$),复苏后培养 2 d 组高于复苏后未培养组和复苏后培养 1 d 组 ($\chi^2=16.118、7.433, P$ 均 <0.01)。见表 2。

表 2 3组移植情况及妊娠结局比较

项目	复苏后未培养组	复苏后培养 1 d 组	复苏后培养 2 d 组	χ^2/F 值	P 值
胚胎丢失率 ^a % (n/N)	0.0 (0/706)	13.3 (64/481)**	43.0 (114/265)** $\Delta\Delta$	332.240	<0.001
胚胎移植数 $\bar{x} \pm s$	1.85 \pm 0.36 ($n=381$)	1.83 \pm 0.38 ($n=228$)	1.82 \pm 0.39 ($n=83$)	0.475	0.622
移植日子宫内膜厚度 $d/\text{mm}, \bar{x} \pm s$	10.76 \pm 2.02 ($n=381$)	10.71 \pm 2.05 ($n=228$)	10.70 \pm 2.13 ($n=83$)	0.067	0.935
优质胚胎移植率 ^a % (n/N)	83.1 (587/706)	47.7 (199/417)**	43.7 (66/151)**	190.000	<0.001
临床妊娠率 % (n/N)	38.6 (147/381)	45.2 (103/228)	62.7 (52/83)** $\Delta\Delta$	16.376	<0.001

^a: N 为复苏后存活胚胎数. ** $P<0.01$ 与复苏后未培养组比较; $\Delta\Delta P<0.01$ 与复苏后培养 1 d 组比较

3 讨论

随着玻璃化冷冻技术的成熟, FET 因其降低了 OHSS 风险而在辅助生殖技术领域发挥着重要作用。但有关复苏后移植前是否需要行体外培养及不同体外培养时间对移植后妊娠率的影响尚不明确,

且相关研究极少。

罗金等^[8]和唐永梅等^[9]认为延长解冻后体外培养时间可淘汰一部分发育潜能差、自身发育异常或染色体异常胚胎。本研究也发现,随着复苏第 3 天卵裂期胚胎后培养时间的增加,胚胎丢失率增加。可见,卵裂期冻融胚胎复苏后体外培养时间延长可

增加无发育潜能胚胎的剔除率, 从而减少胚胎因素导致的助孕失败。理论上, 通过增加胚胎体外培养时间筛选具有发育潜能的胚胎, 有助于提高移植后临床妊娠率。

FET 周期胚胎质量是影响 FET 临床妊娠率的重要因素。第 3 天卵裂期冻融胚胎在被复苏并经历 2 d 体外培养后, 可达到囊胚期。近年来随着 IVF-ET 实验室技术的提高, 囊胚体外培养体系逐渐优化, 囊胚形成率逐渐提高。目前认为囊胚培养是筛选卵裂期具有优质潜力胚胎的重要方法, 且具有更好的胚胎发育和子宫内膜的同步性。囊胚移植经历了严格的胚胎淘汰过程, 因此与卵裂期胚胎相比, 移植更有发育潜力的囊胚能获得更好的临床妊娠结局。本研究结果显示, 尽管复苏后培养 2 d 组优质胚胎移植率低于复苏后未培养组, 但卵裂期胚胎复苏后体外培养胚胎 2 d (达到第 5 天囊胚期) 组的临床妊娠率仍高达 62.7% (52/83), 远远高于复苏后未培养组 (第 3 天卵裂期胚胎) 及复苏后培养 1 d 组 (达到第 4 天桑葚胚)。因此, 对于第 3 天有效胚胎数目较多的患者, FET 周期建议在卵裂期胚胎解冻后行囊胚培养, 以提高临床妊娠率。

第 3 天卵裂期胚胎复苏后接受 1 d 的体外培养可形成桑葚胚, 胚胎细胞在该时期会出现融合、半融合或者腔很小的囊胚, 各细胞之间膜紧密连接形成的网状结构形成了胚胎骨架, 可以抵御母体出现的一些剧烈变化, 避免流产等不良反应, 从而提高妊娠率^[10]。易艳红等^[11]研究也发现进行 IVF-ET 时, 选择第 3 天胚胎解冻培养至桑葚胚期再行移植, 能有效提高临床妊娠率, 且不增加宫外孕、流产和早产的风险。本研究结果显示, 复苏后培养 1 d 组优质胚胎移植率低于复苏后未培养组, 虽然差异无统计学意义, 但临床妊娠率增加, 提示桑葚胚移植有利于提高临床妊娠率, 考虑原因可能与桑葚胚本质是由具有发育潜能的卵裂期胚胎进一步发育而来有关, 这种胚胎有进一步发育成囊胚的极大潜能。本研究中复苏后体外培养 1 d 增加胚胎丢失率, 进一步提示复苏后培养 1 d 后可在一定程度上筛选更优质的胚胎, 从而增加临床妊娠率。

综上所述, 临床 FET 助孕治疗中, 应根据患者的实际情况综合评价, 进行个体化治疗, 并与患者充分沟通交流, 经过其知情同意后决定是否在复苏冻胚后继续体外培养及确定培养的时间, 以减小

患者经济及精神压力。本研究结果表明, 解冻卵裂期胚胎进行体外培养 1~2 d 后移植, 可以进一步筛选具有发育潜能的胚胎, 并提高临床妊娠率。因此, 对于有较多优质卵裂期胚胎的患者, 建议在复苏后适当增加体外培养时间, 从而筛选高发育潜能的胚胎, 提高移植率和临床妊娠率。本研究为回顾性研究, 且复苏后再培养有胚胎丢失风险, 存在一定的偏倚, 因此需要大样本、前瞻性的随机对照临床试验进一步验证。

[参考文献]

- [1] 李媛. 人类辅助生殖实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2008:139-140.
- [2] 骆荣,胡慧,洪焱,黄绘. 玻璃化冻融胚胎提前解冻与当日解冻结局比较[J]. 生殖医学杂志,2015,24:17-20.
- [3] 赵杰,陈秀娟,刘芳,梁琳,梁磊,王萨仁,等. 冷冻胚胎解冻后质量对临床妊娠结局的影响[J]. 生殖医学杂志,2014,23:981-985.
- [4] 惠董娜,任文娟,雷鑫,刘建荣,王怀秀,李弘. 卵裂期冻融复苏胚胎进一步发育情况对临床结局的影响[J]. 生殖医学杂志,2017,26:19-23.
- [5] 孟繁玉,成玉春. 不同体外培养时间对受精第 3 天 4~5 细胞冻融胚胎妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健,2013,28:1308-1310.
- [6] 程立子,吴日然,于文娟,徐建亚,廖月婵,杜静. 体外培养 1 d 对玻璃化解冻卵裂期胚胎移植效果的影响[J]. 中国当代医药,2015,22:45-47.
- [7] 刘苡萱,张慧琴,冯书改,朱旻,印惠荣,松迪,等. 改良超长激素替代方案改善胚胎种植失败患者冻融胚胎移植妊娠结局[J]. 第二军医大学学报,2017,38:846-851. LIU Y X, ZHANG H Q, FENG S G, ZHU M, YIN H R, SONG D, et al. Modified super-long hormone replacement protocol improves pregnancy outcome of previously failed implantation patients undergoing frozen-thawed embryo transfer[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38: 846-851.
- [8] 罗金,杨菁,徐望明. 胚胎冻融后体外培养时间对妊娠结局的影响[J]. 生殖与避孕,2011,31:97-101.
- [9] 唐永梅,韦继红,牟联俊,徐丽湘,秦祖兴,唐妮. 体外培养时间对冻融囊胚移植结局的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2014(4):113-115.
- [10] 赵忠伟,白晓红,吕睿,吕永焕,宋学茹,赵晓微. 体外受精-胚胎移植中胚胎种植影响因素的 logistic 回归分析[J]. 中国计划生育学杂志,2013,21:681-684.
- [11] 易艳红,董梅,黄莉. 冻融后不同时期和数目胚胎移植的临床妊娠结局比较[J]. 海南医学,2017,28:2291-2293.

[本文编辑] 杨亚红