

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.02.0141

· 论 著 ·

## 胚胎解冻移植对体外受精/卵胞浆内单精子显微注射助孕累积活产率的影响

刘瑾<sup>1</sup>, 谢多<sup>2</sup>, 苗叶<sup>1</sup>, 杨芳<sup>1</sup>, 肖西峰<sup>1</sup>, 王晓红<sup>1</sup>, 张琬琳<sup>1\*</sup>

1. 空军军医大学唐都医院妇产科, 西安 710038

2. 空军 986 医院妇产科, 西安 710038

**[摘要]** **目的** 考察胚胎解冻移植(FET)对卵巢正常反应人群首次促排周期累积活产率的影响。**方法** 选择2016年1月1日至12月31日就诊于空军军医大学唐都医院接受体外受精/卵胞浆内单精子显微注射(IVF/ICSI)的不孕症患者。纳入年龄20~39岁、卵巢储备功能正常及首次促排周期的患者,排除捐卵周期、卵巢储备功能低下、多囊卵巢综合征及首次促排周期后未行胚胎移植者。采用logistic回归分析研究FET对IVF/ICSI助孕的累积活产率和流产率的影响。**结果** 共纳入患者1141例,包括377个新鲜胚胎移植周期及764个FET周期。FET周期患者平均年龄为(29.85±3.68)岁,平均BMI为(22.06±2.81)kg/m<sup>2</sup>,平均促排天数为(11.28±2.16)d,平均促性腺激素使用量为(1862.04±863.21)U、平均获卵数为(15.14±5.45)个。新鲜胚胎移植周期和FET周期的累积活产率与流产率的差异均无统计学意义[68.44%(258/377)vs 66.10%(505/764),  $P=0.430$ ; 5.31%(20/377)vs 8.38%(64/764),  $P=0.062$ ]。Logistic回归分析结果显示,与新鲜胚胎移植相比,FET未改善IVF/ICSI助孕的累积活产率( $OR=0.99$ , 95%  $CI$  0.73~1.34,  $P=0.936$ ),有增加IVF/ICSI助孕流产率的趋势但无统计学意义( $OR=1.57$ , 95%  $CI$  0.87~2.82,  $P=0.130$ )。**结论** FET未能改善IVF/ICSI助孕的累积活产率,但有增加IVF/ICSI助孕流产率的趋势。建议医师和患者应慎重做出全胚冷冻的临床决策,仅在必要时,如有卵巢过度刺激综合征高风险因素、需进行胚胎植入前遗传学筛查或参与前瞻性随机对照试验的情况下可采用全胚冷冻的移植策略。

**[关键词]** 不孕症; 体外受精-胚胎移植术; 胚胎冷冻; 累积活产率; logistic回归分析

**[中图分类号]** R 711.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)02-0141-10

## Influence of frozen-thawed embryo transfer on cumulative live birth rate after *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection

LIU Jin<sup>1</sup>, XIE Duo<sup>2</sup>, MIAO Ye<sup>1</sup>, YANG Fang<sup>1</sup>, XIAO Xi-feng<sup>1</sup>, WANG Xiao-hong<sup>1</sup>, ZHANG Wan-lin<sup>1\*</sup>

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, No. 986 Hospital of Air Force, Xi'an 710038, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the influence of frozen-thawed embryo transfer (FET) on the cumulative live birth rate (cLBR) of the first cycle of controlled ovarian hyperstimulation in normal ovarian responders. **Methods** Infertile patients who received *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) in Tangdu Hospital of Air Force Medical University from January 1 to December 31, 2016 were enrolled in this retrospective cohort study. Inclusion criteria: aged 20-39 years, normal ovarian reserve, and the first controlled ovarian hyperstimulation. Exclusion criteria: donor cycles, impaired ovarian reserve, polycystic ovarian syndrome or no embryo transfer after the first oocyte retrieval cycle. Logistic analysis was employed to explore the influence of FET on the cLBR and miscarriage rate after IVF/ICSI. **Results** A total of 1141 patients who met the inclusion criteria were enrolled in this cohort, including 377 fresh embryo transfer cycles and 764 FET cycles. In FET cycles, the mean age of the patients was (29.85±3.68) years old, the mean body mass index was (22.06±2.81) kg/m<sup>2</sup>, the mean duration of controlled ovarian hyperstimulation was (11.28±2.16) d, the mean dose of gonadotropin was (1862.04±863.21) U, and the mean number of oocytes retrieved was 15.14±5.45. There was no statistical difference in the cLBR or miscarriage rate between fresh embryo cycles and FET cycles (68.44% [258/377] vs 66.10% [505/764],  $P=0.430$ ; 5.31% [20/377] vs 8.38% [64/764],  $P=0.062$ ). Logistic regression analysis results showed no beneficial effect of FET on the

**[收稿日期]** 2019-07-07 **[接受日期]** 2019-11-11

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81871182), 陕西省重点研发计划(2017SF-084). Supported by National Natural Science Foundation of China (81871182) and Key Research and Development Plan of Shaanxi Province (2017SF-084).

**[作者简介]** 刘瑾, 硕士, 主治医师. E-mail: liujinaxia@126.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 029-84717216, E-mail: 1843678023@qq.com

cLBR when compared to the fresh embryo transfer (odds ratio [OR]=0.99, 95% confidence interval [CI] 0.73-1.34,  $P=0.936$ ); however, there was a trend that FET could increase the risk of miscarriage rate ( $OR=1.57$ , 95% CI 0.87-2.82,  $P=0.130$ ).

**Conclusion** FET cannot improve the cLBR after IVF/ICSI, but it might increase the miscarriage rate. Patients and clinicians should be very cautious when the “freeze all” strategy is about to be chosen. FET can be recommended only in case of high risk of ovarian hyperstimulation syndrome, pre-implantation genetic testing or prospective randomized controlled trial.

**[Key words]** infertility; *in vitro* fertilization and embryo transfer; embryo freezing; cumulative live birth rate; logistic regression analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(2): 141-150]

自40年前世界上第1例试管婴儿在英国诞生以来,全世界已有超过800万人口通过体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)技术或其他辅助生殖(assisted reproductive technology, ART)技术出生<sup>[1-2]</sup>。卵巢的激素刺激及随后的外科取卵和实验室受精共同构成了体外受精过程。在此过程中形成的胚胎于体外培养2~5 d后移植进宫腔,剩余的胚胎则冷冻保存以备将来使用。新鲜周期未妊娠或有再次生育要求的女性将在自然排卵周期或激素替代周期中移植解冻胚胎。1984年,文献首次报道了解冻胚胎移植的活产案例<sup>[3]</sup>。随着胚胎冷冻技术的不断完善,冷冻胚胎移植数量不断增加。

然而,在胚胎解冻移植(frozen-thawed embryo transfer, FET)周期中,胚胎需接受低温冷冻保存及复苏的额外人为干预,其有效性和安全性问题逐渐受到关注。活产率是评估FET有效性的最重要的参考指标,同时也是使用全胚冷冻策略时参考的主要因素。近年来,FET能否提高体外受精/卵胞浆内单精子显微注射(*in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection, IVF/ICSI)助孕的活产率成为辅助生殖领域研究的热点,目前研究结论尚存在争议。我国山东大学陈子江团队于2016年、2018年和2019年分别在*N Engl J Med*和*Lancet*上发表了前瞻性随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)研究结果,比较了不同人群的FET和新鲜胚胎移植的临床结局。研究结果显示,在多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)患者及采用选择性单囊胚移植人群中,FET能显著提高IVF/ICSI的每周期活产率;而在正常排卵人群中,FET却并未改善每周期活产率<sup>[4-6]</sup>。Zhang等<sup>[7]</sup>于2018年完成的一项基于RCT的meta分析结果显示,FET能够显著增加IVF/ICSI的每周期活产率。早期的观察性研究表明

FET的活产率优于新鲜胚胎移植<sup>[8]</sup>,之后的一些观察性研究及meta分析的结果却并未提示FET能够提高IVF/ICSI助孕的活产率<sup>[5,9-10]</sup>。因此,FET能否改善IVF/ICSI助孕结局仍需更多的临床研究数据支持。

在临床实践中,基于经济和依从性考虑,患者及临床医师更关注首次取卵周期获得的所有胚胎最终获得活产的概率,即累积活产率。而RCT研究多以每周期活产率为主要观察指标。此外,回顾性研究多为病例对照研究,该研究类型在对照组的选择上存在较大的选择偏倚风险,影响研究结果的可靠性。本研究采用回顾性队列研究方法,利用logistic回归分析调整可能影响累积活产率的混杂因素后,考察FET对卵巢正常反应人群首次促排周期累积活产率的独立影响,作为对既往研究结果的补充,为临床移植策略的选择提供观察性研究证据。

## 1 资料和方法

**1.1 研究人群** 选择2016年1月1日至12月31日就诊于空军军医大学唐都医院生殖医学中心接受IVF/ICSI的不孕症患者。纳入年龄20~39岁、卵巢储备功能正常[窦卵泡数(antral follicle count, AFC)≥7个]<sup>[11]</sup>及首次促排周期的患者。排除捐卵周期、卵巢储备功能低下(AFC<7个)、根据鹿特丹标准诊断的PCOS及首次促排周期后未行胚胎移植者。本研究获得空军军医大学唐都医院伦理委员会审批。

**1.2 指标选择** 研究人群基线指标包括女方年龄、BMI、不孕年限、盆腹腔手术史、结核病史、流产史、分娩史;IVF相关基线指标包括基础AFC、基础卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)水平、基础雌二醇(estradiol, E2)水平、不孕因素(输卵管因素、轻度少弱精、双方或混合因素、子宫内膜异位症及不明原因不孕);

促排卵相关指标包括促排方案（长方案、拮抗剂方案及其他方案）、促排天数、促性腺激素（gonadotropin, Gn）用量、人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）日E2水平、hCG日卵泡数（直径 $\geq 14$  mm）；胚胎移植相关指标包括平均移植胚胎数、平均获卵数、胚胎级别（1个或2个1级胚胎、1个或2个2级胚胎、1个1级和1个2级胚胎、1个囊胚、胚胎+囊胚）、受精方式（IVF、ICSI、IVF和ICSI）。主要终点指标为累积活产率，次要终点指标为流产率。其他终点指标如分娩方式（剖宫产、阴道分娩）、早产、胎儿发育异常、新生儿死亡、低出生体质量儿、妊娠期高血压疾病、巨大儿、中-重度卵巢过度刺激综合征（ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS）、异位妊娠、宫内妊娠合并异位妊娠和胎儿性别均做简单的描述性统计。

本研究中的累积活产率定义为分娩有生命体征的新生儿的患者人数占总研究人数的比例；流产率定义为孕周 $< 27$ 周的妊娠丢失占总研究人数的比例。

### 1.3 IVF相关临床及实验室操作方法与技术

1.3.1 控制性超促排卵 促性腺激素释放激素激动剂（gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRHa）长方案一般从黄体中期（排卵后5~7 d，月经周期的18~20 d）开始皮下注射短效GnRHa 0.05~0.1 mg，每日1次，连续10~14 d。检查患者外周血，当血黄体生成素（luteinizing hormone, LH）水平 $< 5$  U/L、E2 $< 50$  pg/mL、卵泡直径 $\leq 5\sim 10$  mm或子宫内膜厚度 $\leq 5$  mm时即达到垂体降调节的目的。垂体降调节成功后开始加用Gn，一般采用FSH 112.5~300 U/d [主要根据体质量和卵巢储备功能指标如年龄、基础AFC、抗苗勒管激素（anti-Müllerian hormone, AMH）、基础FSH选择Gn启动剂量]皮下注射，每日1次，连续使用，可根据卵巢反应性适当调整Gn剂量，至2~3个主导卵泡直径达到18 mm、平均成熟卵泡E2水平为200~300 pg/mL时皮下注射5 000~10 000 U hCG进行扳机。GnRHa短方案一般从月经第2天开始同时给予短效GnRHa 0.1 mg和Gn 112.5~300 U/d启动卵巢刺激，Gn启动剂量选择同短效长方案，根据卵巢反应性适当调整Gn剂量，至2~3个主导卵泡直径达到18 mm、平均成熟卵泡E2水平为200~300 pg/mL时皮下注射5 000~10 000 U hCG进行扳机。GnRH拮抗剂方案一般于

月经周期第2天开始使用外源性Gn，启动剂量和参考指标同GnRHa短效长方案，在主导卵泡直径接近12~14 mm或血清E2 $> 150\sim 400$  pg/mL时开始使用GnRH拮抗剂0.25 mg/d直至扳机日，hCG扳机标准同GnRHa短效长方案。

1.3.2 胚胎玻璃化冷冻-解冻 将胚胎置入高浓度冷冻保护剂中短时间平衡后移入尼龙环，再直接投入液氮中保存。解冻时将装有胚胎的冷冻管从液氮中取出，在空气中停留40 s，然后置于30℃水浴箱中40 s。去封后将胚胎吹出，置入1 mol/L 1, 2-丙二醇（1, 2-propanediol, PROH）、0.2 mol/L蔗糖溶液中5 min，0.5 mol/L PROH、0.2 mol/L蔗糖溶液中5 min，0.2 mol/L蔗糖溶液中5 min，用培养液冲洗后置于胚胎移植皿中。

1.4 统计学处理 分类变量以例数及百分数表示，连续变量用 $\bar{x}\pm s$ 表示。连续变量数据分布采用Shapiro-Wilk正态性检验。偏态分布数据经对数转换后呈正态分布，偏态分布数据以中位数（最小值，最大值）表示。女方年龄、男方年龄、不孕年限、盆腹腔手术史、结核病史、移植胚胎数、胚胎级别、基础AFC、胚胎冷冻、流产史、分娩史、BMI、基础FSH水平、基础E2水平、不孕因素、促排方案、hCG日E2水平、hCG日卵泡数（直径 $\geq 14$  mm）、促排天数及Gn用量对累积活产率和流产率的影响采用单因素回归分析。FET对累积活产率和流产率的影响采用分层分析及logistic回归分析。回归结果采用OR及95% CI表示。检验水准（ $\alpha$ ）为0.05。

所有统计分析采用R 3.4.3统计软件包（<http://www.R-project.org>）和EmpowerStats软件（<http://www.empowerstats.com>）完成。校正模型I的调整变量为女方年龄、基础AFC、BMI；校正模型II的调整变量为女方年龄、移植胚胎数、胚胎级别、流产史、分娩史、男方年龄、不孕年限、盆腹腔手术史、BMI、hCG日E2水平、基础E2水平、促排天数、Gn用量、不孕因素、基础AFC、受精方式、促排方案和基础FSH水平。

## 2 结 果

2.1 研究人群基本特征 本研究共纳入年龄20~39岁、卵巢储备功能正常、首次促排并接受胚胎移植的非PCOS患者1 141例（新鲜胚胎移植周期377例，FET周期764例）。其中，

有妊娠结局及妊娠期并发症(包括胎儿发育异常、新生儿死亡、妊娠期高血压疾病、中-重度OHSS、异位妊娠、宫内妊娠合并异位妊娠)记录者共1 006例(新鲜胚胎移植周期332例,FET周期674例),有分娩记录者共918例(新鲜胚胎移植周期310例,FET周期608例)。新鲜胚胎移植周期患者及FET周期患者平均年龄分别为(30.21±3.76)岁、(29.85±3.68)岁,平均BMI为(22.05±2.71)kg/m<sup>2</sup>、(22.06±2.81)kg/m<sup>2</sup>,平均促排天数为(11.35±2.09)d、(11.28±2.16)d,中位不孕年限为3.0(1.0,16.0)年、3.0(1.0,18.0)年,以上指标两组间比较差异均无统计学意义(*P*均>0.05)。新鲜胚胎移植周期患者与FET周期患者相比,平均Gn使用量[(2 138.16±941.47)U vs (1 862.04±863.21)U]、平均获卵

数[(10.51±3.92)个 vs (15.14±5.45)个]、平均移植胚胎数[(1.93±0.26)个 vs (1.82±0.38)个]及中-重度OHSS患者占比[1.20%(4/332) vs 0.15%(1/674)]差异均有统计学意义(*P*均<0.05),但两组间累积活产率和流产率的差异均无统计学意义[68.44%(258/377) vs 66.10%(505/764),*P*=0.430; 5.31%(20/377) vs 8.38%(64/764),*P*=0.062]。两组基线指标、IVF相关基线指标、促排卵相关指标、胚胎移植相关指标和终点指标见表1。其中早产、胎儿发育异常、新生儿死亡、低出生体重儿、妊娠期高血压疾病、巨大儿、异位妊娠、宫内妊娠合并异位妊娠及胎儿性别在新鲜胚胎移植周期组和FET周期组间差异均无统计学意义(*P*均>0.05)。

表1 两组患者基本特征

Tab 1 General characteristics of the 2 groups

Characteristic	Fresh embryo transfer cycle	FET cycle	<i>P</i> value
Female age (year), $\bar{x} \pm s$	30.21 ± 3.76 <sup>a</sup>	29.85 ± 3.68 <sup>b</sup>	0.114
Body mass index (kg · m <sup>-2</sup> ), $\bar{x} \pm s$	22.05 ± 2.71 <sup>a</sup>	22.06 ± 2.81 <sup>c</sup>	0.931
Infertility duration (year), median (min, max)	3.0 (1.0,16.0) <sup>a</sup>	3.0 (1.0,18.0) <sup>b</sup>	0.722
History of pelvic/abdominal operation % ( <i>n/N</i> )	40.85 (154/377)	35.99 (275/764)	0.111
Tuberculosis % ( <i>n/N</i> )	4.24 (16/377)	3.93 (30/764)	0.798
History of miscarriage % ( <i>n/N</i> )	37.67 (142/377)	34.69 (265/764)	0.323
History of delivery % ( <i>n/N</i> )	9.81 (37/377)	10.47 (80/764)	0.731
Basal AFC $\bar{x} \pm s$	14.86 ± 5.98 <sup>a</sup>	17.68 ± 6.85 <sup>b</sup>	<0.001
Basal FSH (U), $\bar{x} \pm s$	7.68 ± 3.26 <sup>a</sup>	6.99 ± 2.66 <sup>b</sup>	<0.001
Basal E2 (pg · mL <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	54.07 ± 30.65 <sup>a</sup>	53.63 ± 37.74 <sup>b</sup>	0.842
Infertility factor % ( <i>n/N</i> )			0.753
Tubal	58.62 (221/377)	56.54 (432/764)	
Male	11.14 (42/377)	10.99 (84/764)	
Mixed	25.20 (95/377)	25.65 (196/764)	
Endometriosis	0.53 (2/377)	0.39 (3/764)	
Unexplained	4.51 (17/377)	6.41 (49/764)	
Ovarian stimulation protocol % ( <i>n/N</i> )			0.549
GnRH <sub>a</sub> long protocol	93.10 (351/377)	94.24 (720/764)	
GnRH antagonist protocol	6.90 (26/377)	5.63 (43/764)	
Others	0.00 (0/377)	0.13 (1/764)	
Duration of controlled ovarian stimulation (d), $\bar{x} \pm s$	11.35 ± 2.09 <sup>a</sup>	11.28 ± 2.16 <sup>b</sup>	0.589
Total dose of Gn (U), $\bar{x} \pm s$	2 138.16 ± 941.47 <sup>a</sup>	1 862.04 ± 863.21 <sup>b</sup>	<0.001
Peak E2 on hCG trigger day (pg · mL <sup>-1</sup> ), $\bar{x} \pm s$	3 265.70 ± 1 149.82 <sup>a</sup>	4 229.46 ± 1 256.03 <sup>b</sup>	<0.001
Follicle count (≥14 mm) on hCG trigger day $\bar{x} \pm s$	9.60 ± 3.32 <sup>a</sup>	12.02 ± 3.46 <sup>b</sup>	<0.001
Number of transferred embryo $\bar{x} \pm s$	1.93 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.38 <sup>b</sup>	<0.001
Number of oocytes retrieved $\bar{x} \pm s$	10.51 ± 3.92 <sup>a</sup>	15.14 ± 5.45 <sup>b</sup>	<0.001

(续表 1)

Characteristic	Fresh embryo transfer cycle	FET cycle	P value
Developmental stage of transferred embryo % (n/N)			<0.001
One or two grade 1 D3 embryo	29.22 (109/373)	16.22 (122/752)	
One or two grade 2 D3 embryo	43.43 (162/373)	43.22 (325/752)	
One grade 1 and one grade 2 D3 embryo	25.47 (95/373)	23.80 (179/752)	
Single blastocyst	1.61 (6/373)	15.69 (118/752)	
Blastocyst+cleavage embryo	0.27 (1/373)	1.06 (8/752)	
Fertilization method % (n/N)			0.019
IVF	72.94 (275/377)	72.77 (556/764)	
ICSI	23.61 (89/377)	19.90 (152/764)	
IVF and ICSI	3.45 (13/377)	7.33 (56/764)	
cLBR % (n/N)	68.44 (258/377)	66.10 (505/764)	0.430
Rate of miscarriage % (n/N)	5.31 (20/377)	8.38 (64/764)	0.062
Way of delivery % (n/N)			<0.001
Caesarian section	70.97 (220/310)	81.58 (496/608)	
Virginal	29.03 (90/310)	18.42 (112/608)	
Rate of preterm delivery % (n/N)	13.79 (52/377)	13.61 (104/764)	0.933
Maldevelopment of newborn % (n/N)	0 (0/332)	0.15 (1/674)	0.483
Death of newborn % (n/N)	0.60 (2/332)	0.15 (1/674)	0.320
Low birth weight infant % (n/N)	16.77 (52/310)	16.28 (99/608)	0.849
Gestational hypertension % (n/N)	0 (0/332)	0.15 (1/674)	0.483
Macrosomia % (n/N)	7.10 (22/310)	7.24 (44/608)	0.938
Moderate to severe OHSS % (n/N)	1.20 (4/332)	0.15 (1/674)	0.025
Ectopic pregnancy % (n/N)	0.30 (1/332)	0.15 (1/674)	0.609
Heterotopic pregnancy % (n/N)	0 (0/332)	0.30 (2/674)	0.320
Sex of newborn % (n/N)			0.301
Singleton			
Male	38.39 (119/310)	37.01 (225/608)	
Female	30.32 (94/310)	35.53 (216/608)	
Twins			
2 male babies	8.71 (27/310)	7.24 (44/608)	
2 female babies	9.03 (28/310)	6.09 (37/608)	
1 male and 1 female babies	13.55 (42/310)	13.98 (85/608)	

<sup>a</sup>: n=377; <sup>b</sup>: n=764; <sup>c</sup>: n=762. FET: Frozen-thawed embryo transfer; AFC: Antral follicle count; FSH: Follicle-stimulating hormone; E2: Estradiol; GnRHa: Gonadotropin-releasing hormone agonist; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; Gn: Gonadotropin; hCG: Human chorionic gonadotropin; D3: The third day of the menstrual cycle; IVF: *In vitro* fertilization; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; cLBR: Cumulative live birth rate; OHSS: Ovarian hyperstimulation syndrome

2.2 IVF/ICSI助孕累积活产率和流产率影响因素的单因素分析 单因素分析显示FET对IVF/ICSI助孕的累积活产率无影响( $OR=0.90$ , 95%  $CI$  0.69~1.17,  $P=0.431$ ), FET有增加流产率的趋势, 但无统计学意义( $OR=1.63$ , 95%  $CI$  0.97~2.74,  $P=0.064$ ); 随移植胚胎级别的降低, 累积活产率显著降低, 单囊胚移植的流产率与移植1级第3天卵裂期胚胎相比, 流产率升高1.32倍( $OR=2.32$ , 95%  $CI$  1.04~5.19,  $P=0.040$ ); 有流产史者的累积活产率较无流产史者低( $OR=0.75$ , 95%  $CI$  0.58~0.96,  $P=0.024$ ), 有分娩史者流产率显著

升高( $OR=2.04$ , 95%  $CI$  1.12~3.69,  $P=0.019$ ), BMI每增加1个单位, 累积活产率降低5%( $OR=0.95$ , 95%  $CI$  0.91~1.00,  $P=0.030$ ), 轻度少弱精子症者的累积活产率较单纯输卵管因素者高( $OR=1.58$ , 95%  $CI$  1.02~2.43,  $P=0.039$ )。女方年龄、男方年龄、不孕年限、盆腹腔手术史、结核病史、移植胚胎数、基础AFC、基础FSH水平、促排方案、基础E2水平、hCG日E2水平、hCG日卵泡数(直径 $\geq 14$  mm)、促排天数及Gn用量对累积活产率和流产率均无影响。见表2。

表2 IVF/ICSI助孕的累积活产率和流产率影响因素的单因素分析

Tab 2 Univariable analysis of influencing factors on cLBR and miscarriage rate after IVF/ICSI

Index	Data value	cLBR		Miscarriage rate	
		OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
Female age (year), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	29.97±3.71	0.98 (0.94, 1.01)	0.139	1.06 (1.00, 1.12)	0.069
Male age (year), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	31.74±4.44	0.99 (0.96, 1.01)	0.323	1.01 (0.96, 1.06)	0.633
Infertility duration (year), $n=1\ 141$ , median (min, max)	3 (1, 18)	1.02 (0.97, 1.06)	0.507	1.02 (0.94, 1.10)	0.635
History of pelvic/abdominal operation $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
No	712 (62.40)	1		1	
Yes	429 (37.60)	1.21 (0.93, 1.56)	0.149	0.87 (0.54, 1.38)	0.546
Tuberculosis $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
No	1 095 (95.97)	1		1	
Yes	46 (4.03)	1.60 (0.81, 3.19)	0.179	0.27 (0.04, 1.99)	0.199
Number of transferred embryo $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
1	162 (14.20)	1		1	
2	979 (85.80)	0.98 (0.69, 1.39)	0.904	0.68 (0.38, 1.21)	0.188
Developmental stage of transferred embryo $N=1\ 125$ , $n$ (%)					
One or two grade 1 D3 embryo	231 (20.53)	1		1	
One or two grade 2 D3 embryo	487 (43.29)	0.42 (0.29, 0.61)	<0.001	1.50 (0.77, 2.93)	0.236
One grade 2 and one grade 1 D3 embryo	274 (24.36)	0.52 (0.35, 0.78)	0.002	1.44 (0.69, 3.01)	0.336
Single blastocyst	124 (11.02)	0.55 (0.33, 0.89)	0.015	2.32 (1.04, 5.19)	0.040
Blastocyst+cleavage embryo	9 (0.80)	0.54 (0.13, 2.23)	0.393	NA	0.979
Basal AFC $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	16.75±6.70	0.98 (0.97, 1.00)	0.068	1.02 (0.99, 1.06)	0.117
Embryo transfer strategy $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
Fresh embryo transfer	377 (33.04)	1		1	
FET	764 (66.96)	0.90 (0.69, 1.17)	0.431	1.63 (0.97, 2.74)	0.064
History of miscarriage $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
No	734 (64.33)	1		1	
Yes	407 (35.67)	0.75 (0.58, 0.96)	0.024	1.25 (0.79, 1.96)	0.340
History of delivery $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
No	1 024 (89.75)	1		1	
Yes	117 (10.25)	0.74 (0.50, 1.10)	0.134	2.04 (1.12, 3.69)	0.019
Body mass index ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), $n=1\ 139$ , $\bar{x}\pm s$	22.06±2.78	0.95 (0.91, 1.00)	0.030	1.01 (0.93, 1.09)	0.821
Basal FSH (U), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	7.29±3.34	0.99 (0.95, 1.03)	0.639	0.98 (0.90, 1.07)	0.692
Basal E2 ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	53.77±35.54	1.00 (1.00, 1.00)	0.573	0.99 (0.98, 1.00)	0.140
Infertility factor $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
Tubal	653 (57.23)	1		1	
Male	126 (11.04)	1.58 (1.02, 2.43)	0.039	0.71 (0.31, 1.60)	0.409
Mixed	291 (25.50)	1.14 (0.85, 1.53)	0.376	1.18 (0.72, 1.94)	0.506
Endometriosis	5 (0.44)	0.80 (0.13, 4.85)	0.813	NA	0.984
Unexplained	66 (5.78)	1.00 (0.59, 1.71)	0.991	0.19 (0.03, 1.37)	0.098
Ovarian stimulation protocol $N=1\ 141$ , $n$ (%)					
GnRHa long protocol	1 071 (93.87)	1		1	
GnRH antagonist protocol	69 (6.05)	1.23 (0.72, 2.09)	0.458	0.98 (0.38, 2.51)	0.968
Others	1 (0.09)	NA	NA	NA	NA
Peak E2 on hCG trigger day ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	3 911.02±1 302.93	1.00 (1.00, 1.00)	0.822	1.00 (1.00, 1.00)	0.708
Follicle count ( $\geq 14$ mm) on hCG trigger day $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	11.22±3.60	1.02 (0.98, 1.05)	0.341	1.03 (0.97, 1.10)	0.278
Duration of controlled ovarian stimulation (d), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	11.30±2.14	0.98 (0.93, 1.04)	0.499	1.04 (0.94, 1.15)	0.468
Total dose of Gn (U), $n=1\ 141$ , $\bar{x}\pm s$	1 953.35±898.88	1.00 (1.00, 1.00)	0.878	1.00 (1.00, 1.00)	0.857

FET: Frozen-thawed embryo transfer; IVF: *In vitro* fertilization; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; cLBR: Cumulative live birth rate; D3: The third day of the menstrual cycle; AFC: Antral follicle count; FSH: Follicle-stimulating hormone; E2: Estradiol; GnRHa: Gonadotropin-releasing hormone agonist; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; Gn: Gonadotropin; OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; NA: Number of cases were too small to obtain any results

2.3 FET对累积活产率和流产率影响的分层分析 在调整了不孕年限和基础AFC后, FET对IVF/ICSI助孕累积活产率和流产率的分层logistic回归分析结果显示, 与新鲜胚胎移植相比, 在不

同女方年龄组、不同BMI组、不同不孕因素及不同促排方案的人群中, FET均不对以上各层人群IVF/ICSI助孕的累积活产率和流产率造成影响(表3)。

表3 FET对IVF/ICSI助孕的累积活产率和流产率影响的分层logistic回归分析

Tab 3 Stratification logistic regression analysis of the influence of FET on cLBR and miscarriage rate after IVF/ICSI

Stratification factor	n	cLBR		Miscarriage rate	
		OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
Female age (year)					
≥30	592	1.18 (0.82, 1.71)	0.367	1.24 (0.62, 2.44)	0.543
<30	549	0.73 (0.48, 1.09)	0.126	2.06 (0.88, 4.83)	0.098
Body mass index (kg · m <sup>-2</sup> )					
<20	258	0.84 (0.46, 1.54)	0.570	1.18 (0.40, 3.50)	0.770
20-24	743	0.91 (0.66, 1.27)	0.596	1.59 (0.83, 3.06)	0.162
≥25	138	1.29 (0.61, 2.74)	0.501	2.54 (0.50, 12.92)	0.262
Infertility factor					
Tubal	653	0.99 (0.70, 1.41)	0.968	1.89 (0.94, 3.80)	0.076
Male	126	0.79 (0.30, 2.04)	0.622	2.46 (0.30, 20.41)	0.405
Mixed	291	0.77 (0.44, 1.34)	0.352	1.48 (0.56, 3.88)	0.428
Endometriosis	5				
Unexplained	66	0.80 (0.24, 2.74)	0.728	NA	NA
Ovarian stimulation protocol					
GnRHα long protocol	1 071	0.95 (0.72, 1.26)	0.727	1.49 (0.87, 2.56)	0.151
GnRH antagonist protocol	69	0.88 (0.29, 2.62)	0.817	2.66 (0.28, 25.42)	0.396
Others	1	NA	NA	NA	NA

Adjustment factors included infertility duration and basal follicle count. FET: Frozen-thawed embryo transfer; IVF: *In vitro* fertilization-embryo transfer; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; cLBR: Cumulative live birth rate; GnRHα: Gonadotropin-releasing hormone agonist; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; Gn: Gonadotropin; OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; NA: Number of cases were too small to obtain any results

2.4 FET对累积活产率和流产率影响的logistic回归分析 在校正了女方年龄、移植胚胎数、胚胎级别、流产史、分娩史、男方年龄、不孕年限、盆腔手术史、BMI、hCG日E2水平、基础E2水平、促排天数、Gn用量、不孕因素、基础AFC、受精方式、促排方案和基础FSH水平的混杂因素后, 采用logistic回归分析研究FET对IVF/ICSI助孕累积活产率和流产率的影响, 结果显示, 与新鲜胚胎移植相比, FET不影响IVF/ICSI助孕的累积活产率( $OR=0.99$ ,  $95\% CI 0.73\sim 1.34$ ,  $P=0.936$ ), 冷冻胚胎移植有增加IVF/ICSI助孕流产率的趋势, 但无统计学意义( $OR=1.57$ ,  $95\% CI 0.87\sim 2.82$ ,  $P=0.130$ )。

### 3 讨论

本研究logistic回归分析结果提示, 在校正了女方年龄、移植胚胎数、胚胎级别、流产史、分娩史、男方年龄、不孕年限、盆腔手术史、BMI、

hCG日E2水平、基础E2水平、促排天数、Gn用量、不孕因素、基础AFC、受精方式、促排方案和基础FSH水平的混杂因素后, 与新鲜胚胎移植相比, FET不影响IVF/ICSI助孕的累积活产率, 但有增加IVF/ICSI助孕流产率的趋势, 而该趋势无统计学意义。

新鲜移植周期的超生理量性激素环境与子宫内膜容受性降低有关。新鲜移植周期的超生理量性激素水平可导致子宫内膜提前转化, 子宫内膜种植窗在胚胎移植前提前关闭<sup>[12]</sup>。而FET周期则规避了不同步发育的子宫内膜, 使得子宫内膜与胚胎之间建立起更有效的对话机制以保证胚胎成功着床及后续的正常发育。因此, FET组的胚胎种植及随后的继续发育从理论上讲要好于新鲜胚胎移植组。但我们注意到在山东大学陈子江团队于2016年和2018年发表于*N Engl J Med*的原始研究中, 非PCOS人群新鲜胚胎移植组的hCG日E2峰值均明显低于PCOS人群(3 000 pg/mL vs

5 000 pg/mL)<sup>[4-5]</sup>, 因此根据激素理论可以解释为什么该研究团队在PCOS和非PCOS人群中比较FET和新鲜胚胎移植临床结局时所得结论的不同。在非PCOS人群中,新鲜胚胎移植组较低的hCG日E2峰值可能与FET组的临床结局相似;而在PCOS人群中,新鲜胚胎移植组较高的hCG日E2峰值应该会导致新鲜胚胎移植组的临床结局不如FET组。但在同样情况下,激素理论却不能解释Shapiro等<sup>[13-14]</sup>在2011年发表的2篇在高反应人群和正常反应人群中比较FET和新鲜胚胎移植临床结局时所得的结论。Shapiro等<sup>[13-14]</sup>所研究的高反应人群hCG日E2峰值显著高于正常反应人群(5 000 pg/mL vs 3 000 pg/mL),理论上,因高反应人群的hCG日E2峰值高,对子宫内膜的负面影响更大,因此高反应人群的FET结局应该好于新鲜胚胎移植,但Shapiro等<sup>[13-14]</sup>得出的结论却认为FET和新鲜胚胎移植临床结局在高反应人群中相似;而在正常反应人群中,由于hCG日E2峰值相对较低,对子宫内膜的负面影响相对较小,因此新鲜胚胎移植应该与FET的结局相似或稍差(3 000 pg/mL的E2仍然高于生理量,因此对内膜也相应造成不同程度的不良影响),但Shapiro等<sup>[13-14]</sup>的结论却认为在正常反应人群中,新鲜胚胎移植的临床结局显著好于FET的临床结局。由于以上结果无法单纯用高E2理论解释,因此我们考虑到是冷冻技术本身对胚胎造成了负面影响,因而,虽然FET规避了新鲜周期子宫内膜不同步发育的弊端,但也同时增加了冷冻技术对胚胎造成影响的弊端,两者作用相互抵消,即表现为FET并未显著增加IVF/ICSI助孕的累积活产率,同时,由于FET对胚胎本身的伤害,FET周期的流产率反而有所增加。然而,两组激素水平的不匹配是比较2种移植技术临床结局的重要混杂因素,无论在前瞻性研究还是回顾性研究中均很难消除其对结果的偏倚性影响。建议通过改善卵巢刺激方案等方法控制新鲜胚胎移植周期子宫内膜不同步发育的影响,从而验证冷冻对胚胎本身的伤害是否会影响累积活产率。

近年来,临床专家也一直致力于卵巢刺激方案的改善,如GnRH拮抗剂方案逐渐取代激动剂方案成为主流促排方案、黄体期促排方案及针对低反应人群的来曲唑方案等,显著改善了促排卵对新鲜周期子宫内膜和卵母细胞的伤害,使得

新鲜胚胎移植结局逐渐可与FET临床结局相媲美。虽然胚胎冷冻技术也在不断进步和改善,但胚胎冷冻无疑增加了对胚胎的人为干预,因此增加了对胚胎造成不良影响的风险。在胚胎冷冻本身固有的对胚胎损伤的无法改变,而促排卵方案却不断完善的情况下,新鲜胚胎移植的临床结局很有可能最终超越FET方案。例如除了前文提到的文献提示FET和新鲜胚胎移植临床结局相似<sup>[5]</sup>,Roy等<sup>[15]</sup>完成的一项大样本回顾性研究也得出相同结论。Shi等<sup>[5]</sup>的研究对合并效应的异质性影响最大,很可能是因为研究结果的效应值方向发生了改变。未来有关FET和新鲜胚胎移植的临床结局仍需要更多的临床研究来揭示胚胎冷冻本身固有的胚胎损伤给临床结局带来的负面影响。

基础研究发现低温冷冻可能会对胚胎的表观遗传产生影响。研究发现,无论是全基因组的甲基化水平还是与胎儿生长发育相关基因的特异性位点的甲基化水平,在新鲜胚胎移植组均发生了紊乱,FET组各类甲基化水平却与自然妊娠组相似<sup>[16-18]</sup>。Ma等<sup>[19]</sup>的研究结果对该现象给出了一定解释,认为FET并非能够逆转新鲜胚胎移植对胚胎基因甲基化造成的影响,而是会对胚胎造成新的甲基化紊乱。Hiura等<sup>[19]</sup>对FET( $n=64$ )、新鲜胚胎移植( $n=16$ )及自然妊娠( $n=28$ )后获得足月单胎分娩的人胎盘进行了微阵列基因芯片分析,结果显示,FET组胎盘的miRNA-130a-3p、miRNA-149-5p、miRNA-423-5p和miRNA-487b-3p的表达水平显著下调,并且母源表达基因3-差异甲基化区域(maternally expressed gene 3-differential methylation region, MEG3-DMR)的DNA甲基化水平与人胎盘 $\delta$ 样非典型切迹配体1-碘甲状腺原氨酸脱碘酶3(delta-like non-canonical Notch ligand 1-iodothyronine deiodinase 3, DLK1-DIO3)区域的miRNA表达水平有关。Wang等<sup>[20]</sup>通过小鼠实验发现胚胎玻璃化冷冻能够加重14 d胎鼠体内由IVF导致的H19/胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, Igf2)差异甲基化结构域(differential methylation domain, DMD)的甲基化丢失,但可减轻由IVF导致的H19的表达紊乱。Zhao等<sup>[21]</sup>的研究显示,胚胎玻璃化冷冻能够显著增加牛2细胞期胚胎及由此发育而成的囊胚的H19印记基因控制



区的DNA甲基化水平。Jahangiri等<sup>[22]</sup>以小鼠2细胞胚胎为研究模型,将胚胎进行玻璃化冷冻后解冻并继续培养至囊胚,与正常体内发育的囊胚比较发现,冷冻组Igf2的表达水平显著增加,Igf2基因调控区的组蛋白H3K9甲基化水平显著下调而乙酰化水平显著上调;此外,与Igf2的表达情况相反,Oct4的表达水平在冷冻组显著下降,有机阳离子/肉毒碱转运体4(organic cation/carnitine transporter 4, *Oct4*)基因调控区的组蛋白H3K9甲基化水平显著上调而乙酰化水平显著下调。Saenz-de-Juano等<sup>[23]</sup>对冷冻胚胎移植后的兔胎盘进行蛋白质组学分析,结果显示在妊娠14d时冷冻组胎盘较正常组胎盘组织有11种蛋白表达出现差异,在妊娠24d时有13种蛋白表达出现差异,另外血清白蛋白、异柠檬酸脱氢酶1及磷酸甘油酸变位酶1的表达也发生了变化,提示胚胎玻璃化冷冻引起了胚胎发育过程中的异常。Sahraei等<sup>[24]</sup>研究发现8细胞胚胎玻璃化冷冻解冻移植后,印记基因*H19*、*Igf2*和中胚层特异性转录本(mesoderm specific transcript, *Mest*)的表达水平显著下调。Bartolac等<sup>[25]</sup>将猪囊胚使用不同的冷冻保护剂进行玻璃化冷冻,结果提示所有冷冻组囊胚的Igf2表达水平均显著下调,与冷冻保护剂无关,揭示了单纯的玻璃化冷冻对囊胚所造成的影响。Zhao等<sup>[26]</sup>研究了玻璃化冷冻对小鼠囊胚干性基因的表达及其基因启动子区域甲基化水平的影响,结果显示,玻璃化冷冻能显著增加干性基因*Oct4*和*Nanog*同源盒(*Nanog* homeobox, *Nanog*)启动子区域DNA甲基化水平,并且显著降低*Oct4*和*Nanog*的表达水平,心脏和神经嵴衍生物表达1(heart and neural crest derivatives-expressed 1, *Hand1*)基因的表达水平和甲基化水平均未受玻璃化冷冻的影响,尾型同源盒2(caudal type homeobox 2, *Cdx2*)基因的表达水平未受玻璃化冷冻的影响,但显著增加了*Cdx2*基因启动子区域的甲基化水平。

尽管大量研究结果提示胚胎冷冻对胚胎表观遗传的影响,但我们仍无法全面了解胚胎冷冻技术对胚胎基因及表型造成的近、远期影响。因此,未来仍需更多的研究来评估胚胎冷冻技术对胚胎基因表达调控及子代健康的近、远期安全性的影响,使我们能够更好地使用胚胎冷冻保存技术为人类的健康服务。

本研究结果提示,与新鲜胚胎移植相比,FET未能改善IVF/ICSI助孕的累积活产率,但FET有增加IVF/ICSI助孕流产率的趋势。结合其他研究提示的FET造成的其他风险,如FET会导致大于胎龄儿及孕妇产前发病风险增高等<sup>[27]</sup>,我们建议医师和患者应慎重做出全胚冷冻的临床决策,仅在非常必要时,如有OHSS高风险因素、需进行胚胎植入前遗传学筛查或参与前瞻性随机对照试验的情况下可采用全胚冷冻的移植策略。

#### [参 考 文 献]

- [1] CRAWFORD G E, LEDGER W L. *In vitro* fertilisation/intracytoplasmic sperm injection beyond 2020[J]. BJOG, 2019, 126: 237-243.
- [2] ZEGERS-HOCHSCHILD F, ADAMSON G D, DYER S, RACOWSKY C, DE MOUZON J, SOKOL R, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017[J]. Hum Reprod, 2017, 32: 1786-1801.
- [3] ZEILMAKER G H, ALBERDA A T, VAN GENT I, RIJCKMANS C M, DROGENDIJK A C. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos[J]. Fertil Steril, 1984, 42: 293-296.
- [4] CHEN Z J, SHI Y, SUN Y, ZHANG B, LIANG X, CAO Y, et al. Fresh versus frozen embryos for infertility in the polycystic ovary syndrome[J]. N Engl J Med, 2016, 375: 523-533.
- [5] SHI Y, SUN Y, HAO C, ZHANG H, WEI D, ZHANG Y, et al. Transfer of fresh versus frozen embryos in ovulatory women[J]. N Engl J Med, 2018, 378: 126-136.
- [6] WEI D, LIU J Y, SUN Y, SHI Y, ZHANG B, LIU J Q, et al. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial[J]. Lancet, 2019, 393: 1310-1318.
- [7] ZHANG W, XIAO X, ZHANG J, WANG W, WU J, PENG L, et al. Clinical outcomes of frozen embryo versus fresh embryo transfer following *in vitro* fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 298: 259-272.
- [8] MAHESHWARI A, PANDEY S, SHETTY A, HAMILTON M, BHATTACHARYA S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through *in vitro* fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. Fertil Steril, 2012, 98: 368-77.e1-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.019.
- [9] VUONG L N, DANG V Q, HO T M, HUYNH B G, HA D T, PHAM T D, et al. IVF transfer of fresh or frozen embryos in women without polycystic ovaries[J]. N

- Engl J Med, 2018, 378: 137-147.
- [10] MAHESHWARI A, RAJA E A, BHATTACHARYA S. Obstetric and perinatal outcomes after either fresh or thawed frozen embryo transfer: an analysis of 112,432 singleton pregnancies recorded in the human fertilisation and embryology authority anonymized dataset[J]. Fertil Steril, 2016, 106: 1703-1708.
- [11] CHRISTIANSON M S, SHOHAM G, TOBLER K J, ZHAO Y, CORDEIRO C N, LEONG M, et al. Measurement of antral follicle count in patients undergoing *in vitro* fertilization treatment: results of a worldwide web-based survey[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32: 1435-1440.
- [12] EVANS J, HANNAN N J, EDGELL T A, VOLLENHOVEN B J, LUTJEN P J, OSIANLIS T, et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence[J]. Hum Reprod Update, 2014, 20: 808-821.
- [13] 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 transfers in high responders[J]. Fertil Steril, 2011, 96: 516-518.
- [14] 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.
- [15] ROY T K, BRADLEY C K, BOWMAN M C, MCARTHUR S J. Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live-birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers[J]. Fertil Steril, 2014, 101: 1294-1301.
- [16] GHOSH J, COUTIFARIS C, SAPIENZA C, MAINIGI M. Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies[J/OL]. Clin Epigenetics, 2017, 9: 14. doi: 10.1186/s13148-017-0318-6.
- [17] ESTILL M S, BOLNICK J M, WATERLAND R A, BOLNICK A D, DIAMOND M P, KRAWETZ S A. Assisted reproductive technology alters deoxyribonucleic acid methylation profiles in bloodspots of newborn infants[J/OL]. Fertil Steril, 2016, 106: 629-639.e10. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.05.006.
- [18] MA Y, MA Y, WEN L, LEI H, CHEN S, WANG X. Changes in DNA methylation and imprinting disorders in E9.5 mouse fetuses and placentas derived from vitrified eight-cell embryos[J]. Mol Reprod Dev, 2019, 86: 404-415.
- [19] HIURA H, HATTORI H, KOBAYASHI N, OKAE H, CHIBA H, MIYAUCHI N, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in placentae from frozen-thawed blastocyst transfer[J/OL]. Clin Epigenetics, 2017, 9: 79. doi:10.1186/s13148-017-0379-6.
- [20] WANG Z, XU L, HE F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2[J]. Fertil Steril, 2010, 93: 2729-2733.
- [21] ZHAO X M, REN J J, DU W H, HAO H S, WANG D, LIU Y, et al. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on methylation of the putative imprinted control region of H19 during the *in vitro* development of vitrified bovine two-cell embryos[J]. Fertil Steril, 2012, 98: 222-227.
- [22] JAHANGIRI M, SHAHHOSEINI M, MOVAGHAR B. The effect of vitrification on expression and histone marks of Igf2 and Oct4 in blastocysts cultured from two-cell mouse embryos[J]. Cell J, 2018, 19: 607-613.
- [23] SAENZ-DE-JUANO M D, VICENTE J S, HOLLUNG K, MARCO-JIMENEZ F. Effect of embryo vitrification on rabbit foetal placenta proteome during pregnancy[J/OL]. PLoS One, 2015, 10: e0125157. doi:10.1371/journal.pone.0125157.
- [24] SAHRAEI S S, SHAHHOSEINI M, MOVAGHAR B. Vitrification has an effect like culture on gene expression and histone modification in mouse embryos[J]. Cryo Lett, 2018, 39: 102-112.
- [25] BARTOLAC L K, LOWE J L, KOUSTAS G, GRUPEN C G, SJOBLUM C. Vitrification, not cryoprotectant exposure, alters the expression of developmentally important genes in *in vitro* produced porcine blastocysts[J]. Cryobiology, 2018, 80: 70-76.
- [26] ZHAO X M, DU W H, HAO H S, WANG D, QIN T, LIU Y, et al. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts[J]. Mol Reprod Dev, 2012, 79: 445-450.
- [27] MAHESHWARI A, PANDEY S, AMALRAJ RAJA E, SHETTY A, HAMILTON M, BHATTACHARYA S. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer?[J]. Hum Reprod Update, 2018, 24: 35-58.