

冻融后不同时期和数目胚胎移植的临床妊娠结局比较

易艳红,董梅,黄莉

(广东省妇幼保健院生殖健康与不孕症科,广东 广州 510010)

【摘要】 目的 比较冻融后对不同时期和数目的胚胎进行移植的临床妊娠结局。方法 选取广东省妇幼保健院2014年7月至2015年7月期间进行玻璃化冷冻并复苏培养的胚胎作为研究对象,共992个移植周期,均对D3卵裂期胚胎进行玻璃化冷冻后复苏,培养1 d后进行移植。根据移植胚胎数目和桑椹胚数目分为单个胚胎移植[非桑椹胚组(移植1个非桑椹胚, $n=41$)、桑椹胚组(移植1个桑椹胚, $n=28$)]和两个胚胎移植[桑椹胚M0组(移植2个非桑椹胚, $n=290$)、桑椹胚M1组(移植1个非桑椹胚和1个桑椹胚, $n=378$)、桑椹胚M2组(移植2个桑椹胚, $n=255$)],分析各组间临床妊娠率、流产率、宫外孕率以及早产率。结果 单个胚胎移植时,桑椹胚组和非桑椹胚组的临床妊娠率(28.57% vs 29.27%)、流产率(5.00% vs 33.33%)、宫外孕率(0 vs 0)和早产率(12.50% vs 8.33%)比较差异均无统计学意义($P>0.05$);两个胚胎移植时,随着移植桑椹胚数目的增加(桑椹胚M0组→桑椹胚M1组→桑椹胚M2组),临床妊娠率显著增加(42.41%→53.17%→66.27%),差异均有统计学意义($P<0.05$);桑椹胚M0组、桑椹胚M1组和桑椹胚M2组的宫外孕率(2.44% vs 3.98% vs 2.37%)、流产率(11.38% vs 10.06% vs 12.94%)和早产率(19.51% vs 17.41% vs 24.26%)比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 进行体外受精-胚胎移植时,选择D3胚胎解冻培养至桑椹胚期再行移植,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。

【关键词】 妊娠;胚胎;移植;玻璃化冷冻;桑椹胚

【中图分类号】 R714.12 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)14-2291-03

Clinical outcome of embryo transfer in different periods and numbers after freezing and thawing. *YI Yan-hong, DONG Mei, HUANG Li. Department of Reproductive Health and Infertility, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, Guangdong, CHINA*

【Abstract】 Objective To investigate the clinical outcome of transfer after in different periods and numbers embryofreezing and thawing. **Methods** A total of 992 transplanting cycles of D3 cleavage stage embryo on vitrification from July 2014 to July 2015 in our hospital were selected. Embryos were recovered and then cultured for 1 day before transplantation. According to the number of transplanted embryos and morula embryos, they were divided into single embryo transfer which included the non-morula group (transplanted 1 non-morula, $n=41$) and the morula group (transplanted 1 morula, $n=28$) and two embryos transfer which included the morula group M0 (transplanted 2 non-morula, $n=290$), the morula group M1 (transplanted 1 non-morula and 1 morula, $n=378$) and the morula group M2 (transplanted 2 morula, $n=255$). The clinical pregnancy rate, abortion rate, ectopic pregnancy rate and premature delivery rate were analyzed. **Results** In single embryo transfer, there was no significance in clinical pregnancy rate (28.57% vs 29.27%), miscarriage rate (5.00% vs 33.33%), ectopic pregnancy rate (0 vs 0) and preterm birth rate (12.50% vs 8.33) between the non-morula group and the non-morula group ($P>0.05$), indicating the transplanted morula has nothing to do with pregnancy outcome. In two embryos transfer, the clinical pregnancy rate increased significantly (42.41%, 53.17%, 66.27%)

基金项目:广东省人口计生委科研项目(编号:20132009)

通讯作者:易艳红。E-mail:yingsenchen@126.com

参考文献

[1] 叶大勇,梁勇,陈伟. URL、MPCNL及ESWL治疗对上尿路结石患者血流动力学及血气指标的影响[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(4): 661-664.

[2] 陈志,王桂林,陈湘,等. 微型腹腔镜下肾盂成形术联合输尿管镜辅助肾盂切开取石术治疗肾盂输尿管连接部梗阻合并肾结石[J]. 中国内镜杂志, 2015, 21(6): 663-665.

[3] 袁荫田,王志勇,潘爱民,等. 输尿管治疗输尿管中上段结石术中上尿路尿动力学研究[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版), 2013, 7(5): 41-44.

[4] 袁广全,欧阳骏. URL治疗输尿管上段结石术中结石逃逸的风险因素分析[J]. 临床泌尿外科杂志, 2015, 30(11): 981-984.

[5] 杨卫平,黄敏,夏滨祥,等. 四秒散加味治疗下焦湿热型尿路感染65例临床观察[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(3): 85-86.

[6] Martin X, Murat FJ, Feitosa LC, et al. Severe bleeding after nephrolithotomy: results of hyperselective embolization [J]. Eur Urol, 2000, 37(2): 136-139.

[7] 卓蕴雄,秦建国,钟东亮. 微创经皮肾输尿管镜取石术治疗上尿路结石临床观察[J]. 广州医药, 2011, 42(3): 52-54.

[8] KostakoPoulos A, Stavropoulos NJ, Picramenos D, et al. The Swiss lithoclast: an ideal intracorporeal lithotripter [J]. Urol Int, 1995, 55(1): 19-20.

[9] 蒋胜利. 经皮肾输尿管镜碎石取石术治疗上尿路结石的疗效观察[J]. 航空航天医学杂志, 2014, 25(5): 657-658.

[10] 孙成亮,甘伟,张少峰,等. 内镜下不同术式治疗嵌顿性输尿管上段结石的对比研究[J]. 中国内镜杂志, 2014, 20(5): 540-543.

[11] Denstedt JD, Razvi HA, Rowe E, et al. Investigation of the tissue effects of a new device for intracorporeal lithotripsy—the Swiss Lithoclast [J]. J Urol, 1995, 153(2): 535-537.

[12] 曾国华,万肖蓬,陈文忠,等. 超微经皮肾镜取石术治疗31例肾结石的初步体会[J]. 中华泌尿外科杂志, 2014, 35(1): 6-9.

(收稿日期:2017-01-03)

with the increase of the number of transplanted morula (the morula group M0, the morula group M1 and the morula group M2) ($P < 0.05$). There was no significant difference in the rate of ectopic pregnancy (2.44%, 3.98%, 2.37%), abortion rate (11.38%, 10.06%, 12.94%) and preterm birth rate (19.51%, 17.41%, 24.26%) among the those groups ($P > 0.05$).

Conclusion For *in vitro* fertilization and embryo transfer, it is recommended that D3 embryos are thawed and cultured for 1 day to morula before transplantation, which can effectively improve the clinical pregnancy rate and do not increase the risk of abortion rate, ectopic pregnancy rate and premature delivery rate.

【Key words】 Pregnancy; Embryo; Transplantation; Vitrification; Morula stage

随着生活和工作压力的增加,不孕症、晚育等情况日益严重。近些年随着辅助生殖技术的发展,有学者提出胚胎冷冻技术,该技术是女性保有生育能力的有效方式,同时是提高临床妊娠率的重要手段^[1]。目前临床对女性卵母细胞冷冻保存方式分为玻璃化冷冻、快速程序化冷冻,但有学者研究发现前者在胚胎、胚母细胞保存上优于后者。现今胚胎冷冻多对卵裂期胚胎、原核、囊胚期胚胎进行,对于胚胎冷冻复苏后培养至桑葚期的研究还较少^[2-3]。我院对 D3 期胚胎冻融后在体外培养 1 d 达到桑葚期再行胚胎移植,发现患者妊娠率上升,且为增加各种孕产妇并发症的发生率,现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广东省妇幼保健院 2014 年 7 月至 2015 年 7 月期间进行玻璃化冷冻并复苏培养 1 d 的胚胎作为研究对象,共 992 个移植周期。患者均对第 3 天卵裂期胚胎(D3)玻璃化冷冻后进行复苏,培养 1 d 后进行移植。根据移植胚胎数目和桑葚胚数目分为单个胚胎移植[非桑葚胚组(移植 1 个非桑葚胚, $n=41$)、桑葚胚组(移植 1 个桑葚胚, $n=28$)]和两个胚胎移植[桑葚胚 M0 组(移植 2 个非桑葚胚, $n=290$)、桑葚胚 M1 组(移植 1 个非桑葚胚和 1 个桑葚胚, $n=378$)、桑葚胚 M2 组(移植 2 个桑葚胚, $n=255$)]。行体外受精胚胎移植患者无相关精神病史,可积极配合医生治疗,有良好依从性,入选患者均签署知情同意书并通过医院伦理学委员会批准。所有患者前期均按常规进行排卵、取卵、体外受精、培养,各组接受胚胎移植者年龄相当,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 胚胎冷冻标准 本次所选用的胚胎均根据国际第 3 天胚胎形态特征,选择卵裂期胚胎碎片小于 15%且细胞数在 5 个以上,细胞卵裂球均匀,同时征得患者同意并进行保存。

1.2.2 冷冻方法 本次所有胚胎均采用玻璃化冷冻,试剂购自广州尊博医疗器械有限公司。将冷冻试剂取出放置至室温,将 1~3 枚胚胎放入 V1 液中 5 min,接着将胚胎移入 V2 液中 2 min,然后移入 V3 液中 30 s,吹打 3 次后迅速将胚胎放入自制冷冻载体上,封管并将其置入液氮中,需注意从封管到移入液氮整个过程要迅速,不能超过 70 s。

1.2.3 胚胎解冻方法 使用无菌手术剪剪掉麦管封口,取出胚胎并置于 1 mol/L 蔗糖复苏液 1 中,需

注意此过程要迅速进行,浸泡 1 min 后将胚胎移入 0.5 mol/L 蔗糖复苏液 2 中,浸泡时间为 2 min,后将胚胎移入 0.25 mol/L 蔗糖复苏液 3 中,此次浸泡时间为 3 min,最后将胚胎移入囊胚培养液并置于 37℃ 培养箱中培养 1 d。

1.2.4 患者准备 对于排卵无异常、经期规律者采用自然周期,在阴道超声技术辅助下监测患者内膜、卵泡发育情况,在患者子宫内膜厚度达到 8 mm 以上、卵泡直径在 16 mm 以上时,检查机体是否出现黄体生成素(LH)峰。一般卵巢排卵在 LH 峰后 36 h 左右,患者排卵日开始黄体支持(黄体酮 20 mg/d 肌注或 HCG 2 000 IU, 3 d 一次,共 5 次,或雪诺酮阴道栓 90 mg/d 置阴道),并在排卵后第 3 天解冻胚胎。对于有排卵障碍、经期无规律、子宫内膜发育异常患者使用激素替代周期,患者于经期第 3 天开始口服激素药物戊酸雌二醇,采用递增法服药,同时监测其内膜厚度,当内膜厚度达到 8 mm 以上时开始黄体支持,并于 3 d 后解冻胚胎。

1.3 观察指标 患者胚胎移植 2 周后,对血人绒毛促性腺激素(HCG)进行检测,阳性者判断为生化妊娠,对于此类移植者可在 2 周后进行阴道 B 超检查,临床以 B 超检查发现孕囊、心管搏动为妊娠标准。统计分析不同组别患者临床妊娠率、流产率、宫外孕率以及早产率。

1.4 统计学方法 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计数资料用百分比表示,所有理论数 $T \geq 5$ 并且总样本量 $n \geq 40$,用 χ^2 检验;如有理论数 $1 \leq T < 5$,并且 $n \geq 40$,用校正 χ^2 检验;如果有理论数 $T < 1$ 或 $n < 40$,则用确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 单个胚胎移植时两组临床结局比较 单个胚胎移植时,桑葚胚组和非桑葚胚组的临床妊娠率、流产率、宫外孕率和早产率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 单个胚胎移植时两组患者妊娠结局比较[例(%)]

组别	移植周期数	临床妊娠	宫外孕	流产	早产
非桑葚胚组	41	12 (29.27)	0 (0)	4 (33.33)	1 (8.33)
桑葚胚组	28	8 (28.57)	0 (0)	2 (25.00)	1 (12.50)
χ^2 值		0.004		0.064	
P 值		>0.05	>0.05*	>0.05	>0.05*

注: *为确切概率法。

2.2 两个胚胎移植时三组临床结局比较 移植2个胚胎时的临床妊娠率显著提高,且流产率有所下降,而宫外孕率和早产率的变化不大。根据移植桑葚胚数量不同可发现,两个胚胎移植时,随着移植桑葚胚数目的增加(桑葚胚M0组→桑葚胚M1组→桑葚胚M2组),临床妊娠率明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$),宫外孕率、流产率和早产率组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 移植两个胚胎患者妊娠结局比较[例(%)]

组别	移植周期数	临床妊娠	宫外孕	流产	早产
桑葚胚M0组	290	123 (42.41)	3 (2.44)	14 (11.38)	24 (19.51)
桑葚胚M1组	378	201 (53.17)	8 (3.98)	26 (10.06)	35 (17.41)
桑葚胚M2组	255	169 (66.27)	4 (2.37)	17 (12.94)	41 (24.26)
χ^2 值		31.060	1.012	0.748	4.534
P 值		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

随着辅助生殖技术的快速发展,不孕不育的情况得到了极大改善,而胚胎质量在其中具有关键性的作用。因此,如何通过提高胚胎质量来增加不孕不育患者的妊娠率是辅助生殖技术中迫切需要改善的问题。

目前临床上对胚胎的保存多采用玻璃化冷冻技术,此冷冻方式是通过冷冻保护剂将胚胎细胞中水分置换出来,并对其进行急速降温,使水分由液态转化为外观玻璃状的非晶体化固体状态,起到避免细胞受损的作用。临床多采用第3天卵裂期胚胎进行冷冻,其胚胎复活率高、妊娠率高,但对于胚胎解冻后在体外培养1~4 d进入桑葚期再行胚胎移植的报道并不多见^[4-5]。桑葚期胚胎指胚胎细胞在此时期出现融合、半融合或出现腔很小的囊胚,桑葚期临床可分为三个阶段,桑葚早期胚胎细胞一般在8个左右,且各细胞之间会出现融合迹象,但单个细胞仍可较好辨认出现;桑葚中期有90%以上胚胎细胞融合在一起,并形成近似正圆形的细胞球,此时期各细胞之间膜界限不再清晰,整个胚胎像一个大细胞;但到了晚期各胚胎细胞之间界限会再次显现,细胞数量明显增多,同时部分细胞会呈现月牙形、梭形,且有小腔隙在各细胞之间出现,从而形成初期囊胚^[5]。有学者认为,桑葚期胚胎细胞处于融合、半融合状态,部分细胞还会形成早期囊胚,各细胞之间膜紧密连接形成了网状结构,形成了胚胎骨架,对母体出现的一些剧烈变化有良好抵御效果,避免临床出现流产等不良反应,从而提高妊娠率^[6]。

本研究中,移植2个胚胎时的临床妊娠率显著比移植单个胚胎时高,且流产率有所下降,而宫外孕率和早产率的变化不大。当移植的2个胚胎均为非桑葚胚时临床妊娠率最低,而随着移植桑葚胚数量的增加,其临床妊娠率也随着增长,且不会增加宫外孕率、流产率和早产率。因此,D3胚胎复苏培养1 d至桑葚

胚再行移植具有良好的临床效果,能显著增加临床妊娠率。但移植单个胚胎时,是否移植桑葚胚并不影响临床妊娠率,这可能与研究的例数少有关。虽然Rato等^[7]的研究认为,胚胎解冻后培养2~5 h进行移植,其种植率及活产率均高于解冻后培养24 h,说明延长体外培养时间并无显著效果。但近年来越来越多的研究表明,对于慢速冷冻的D3胚胎或囊胚,延长培养时间有利于提高胚胎种植成功率^[8-9]。发育潜力高的胚胎与子宫内膜成熟度的提高,均有利于胚胎着床^[10]。龚绍琼^[11]认为提前解冻培养、选择进一步卵裂的胚胎进行移植,有助于提高FET周期临床妊娠率,改善妊娠结局。不少研究表明,延长胚胎复苏后的体外培养时间,相比于解冻当日移植的胚胎,其妊娠率和种植率均可明显提高^[12-14]。

综上所述,临床上对患者进行体外受精胚胎移植时,选择体外培养1 d进入桑葚期胚胎细胞进行移植,可有效保证胚胎质量,提高临床妊娠率,值得临床推广。

参考文献

- [1] 张梦苑,陈柯屹,腊晓琳,等.新鲜胚胎与冷冻胚胎移植在体外受精周期中疗效比较的Meta分析[J].中国组织工程研究,2013,17(53):9245-9250.
- [2] 刘艳丽,王兴玲,郝大勇,等.不同冷冻方案对人早期胚胎发育潜能的影响[J].中国妇幼保健,2013,28(25):4175-4178.
- [3] 曹金凤,崔娜,赵志明,等.桑葚期胚胎玻璃化冷冻在体外受精-胚胎移植中的应用[J].实用妇产科杂志,2013,29(10):785-787.
- [4] 赵晓徽,岳天孚,随笑琳.玻璃化冷冻小鼠桑葚胚期和囊胚期胚胎的效果观察[J].中华妇产科杂志,2004,39(8):526-528.
- [5] 曹金凤,赵志明,郝桂敏,等.玻璃化冷冻法在人桑葚胚期和卵裂期胚胎冻融周期中的临床研究[J].河北医药,2012,34(10):1448-1450.
- [6] 赵忠伟,白晓红,吕睿,等.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(10):681-684.
- [7] Rato ML, Gouveia-Oliveira A, Plancha CE. Influence of post-thaw culture on the developmental potential of human frozen embryos [J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(8): 789-795.
- [8] Guerif F, Cadoret V, Poindron J, et al. Overnight incubation improves selection of frozen-thawed blastocysts for transfer: preliminary study using supernumerary embryos [J]. Theriogenology, 2003, 60(8): 1457-1466.
- [9] 李瑞岐,王文军,麦美琪,等.慢速冷冻胚胎TET周期当天与解冻后培养1d移植结果分析[J].中山大学学报:医学科学版,2011,32(6):824-827.
- [10] 邢琼,周平,章志国,等.辅助孵化与培养时间对冻融胚胎移植结局的影响[J].生殖医学杂志,2007,16(1):16-19.
- [11] 龚绍琼.移植复苏后进一步卵裂胚胎可提高冻融胚胎移植临床妊娠率[J].现代医院,2012,12(7):11-13.
- [12] 程立子,吴日然,于文娟,等.体外培养1d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(27):45-47,51.
- [13] 王宁怡,孙晓溪,陆朱娣,等.影响冻融胚胎发育潜能及妊娠结局因素的探讨[J].生殖与避孕,2012,32(8):533-539.
- [14] 柴三明,王琰,倪亚莉.过夜培养对冻融胚胎移植周期妊娠结局的影响[J].生殖与避孕,2010,30(7):490-493.

(收稿日期:2016-12-07)