

• 临床检验研究论著 •

3 种不同受精方式的冻融胚胎和囊胚对妊娠结局的影响

牟联俊, 韦继红, 唐永梅, 李楠

(广西科技大学附属妇产医院生殖中心, 广西柳州 545001)

摘要:目的 比较 3 种不同受精方式的冻融胚胎和囊胚对解冻移植后妊娠结局的影响。方法 回顾分析 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在该中心行胚胎解冻移植(FET)治疗的 3 586 个周期,按受精方式分 3 组:A 组常规体外受精(IVF)冻融胚胎解冻移植 2 008 例、囊胚解冻移植 954 例;B 组卵胞浆单精子注射(ICSI)冻融胚胎解冻移植 361 例、囊胚解冻移植 129 例;C 组早期补救卵胞浆单精子注射(r-ICSI)冻融胚胎解冻移植 87 例、囊胚解冻移植 47 例。比较解冻胚胎和囊胚复苏率、妊娠率、流产率、宫外孕率等指标是否存在差异。结果 3 种不同受精方式的胚胎和囊胚解冻复苏率、妊娠率、流产率、宫外孕率等比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 与常规体外受精和卵胞浆单精子注射相比,早期补救卵胞浆单精子注射(r-ICSI)是一种有效的治疗手段。

关键词:体外受精; 卵胞浆单精子注射; 早期补救

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)15-2018-03

Effect of three different fertilization modes of frozen-thawed embryos and blastocysts on pregnancy outcome

Mou Lianjun, Wei Jihong, Tang Yongmei, Li Nan

(Reproductive Center, Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, Guangxi Science and Technology University, Liuzhou, Guangxi 545001, China)

Abstract: **Objective** To compare the effect of three different fertilization modes of frozen-thawed embryos and blastocysts on the pregnancy outcome after thawed transplantation. **Methods** 3 586 cycles of frozen embryos transplantation(FET) treatment in our center from January 2012 to December 2013 were retrospectively analyzed and divided into 3 groups according to the fertilization modes. The group A adopted the conventional in vitro fertilization(IVF) of frozen-thawed embryo transfer in 2 008 cases and blastocysts transfer in 954 cases. The group B adopted intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of frozen-thawed embryo transfer in 361 cases and blastocysts transfer in 129 cases; the group C was given early remedy intracytoplasmic sperm injection(r-ICSI) of frozen-thawed embryo transfer in 87 cases and blastocysts transfer in 47 cases. The recovery rate of embryo and blastocyst, pregnancy rate, abortion rate, ectopic pregnancy rate were compared for determining whether the differences among the indexes existed. **Results** The thawing recovery rate, pregnancy rate, abortion rate and ectopic pregnancy rate in the three different fertilization modes of embryo and blastocyst had no statistically significant differences($P>0.05$). **Conclusion** Compared with conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, early r-ICSI is one of effective treatment means.

Key words: in vitro fertilization; intracytoplasmic sperm injection; early recovery

体外受精-胚胎移植(IVF-ET)控制性促超排卵技术的应用,使多余胚胎的处理日益受到重视。胚胎解冻移植(FET)可冻存因疾病、子宫内膜异常及卵巢过度刺激综合征高风险不能移植的胚胎,减少移植胚胎数目,增加累积妊娠率,避免了反复促排卵、穿刺卵巢对患者的创伤,减轻患者的创伤,减轻患者经济负担,降低发生重度卵巢过度刺激综合征及多胎妊娠的风险,增加辅助生育技术的安全性^[1-2],对提高辅助生殖技术成功率颇有贡献。但在体外受精过程中有常规体外受精(IVF)、卵胞浆单精子注射(ICSI)、早期补救卵胞浆单精子注射(r-ICSI)等 3 种不同的受精方式,其胚胎在冷冻后解冻移植的结局是否存在差异,以及卵胞浆单精子注射、早期补救卵胞浆单精子注射治疗是否存在遗传风险,都是临床需要解决的问题。本研究比较 3 种受精方式的冻融胚胎移植结局的差异,为临床治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在本中心行 FET 治疗的 3 586 个周期,按受精方式分 3 组:A 组常规体外受精(IVF)冻融胚胎解冻移植 2 008 例、囊胚解冻移植 954

例;B 组卵胞浆单精子注射(ICSI)冻融胚胎解冻移植 361 例、囊胚解冻移植 129 例;C 组早期补救卵胞浆单精子注射(r-ICSI)冻融胚胎解冻移植 87 例、囊胚解冻移植 47 例。平均年龄 32.3 岁,不孕年限 1~20 年。A 组指征为输卵管因素、子宫内位、多囊卵巢等,而男方精子正常形态用改良巴氏染液染色,按严格精子形态学标准,精子正常形态百分率大于或等于 2%,精子密度大于 5×10^6 /mL 或者手术当日精子回收总数大于 10×10^6 条。B 组指征为梗阻性无精子症、体外受精失败或者男方精子用改良巴氏染液染色,按严格精子形态学标准,精子正常形态百分率小于 2%,精子密度小于 5×10^6 /mL 或者手术当日精子回收总数小于 5×10^6 条等。C 组指征为常规 IVF 受精,在精卵结合 6 h 后机械脱颗粒细胞,倒置显微镜检查第二极体的释放,见第二极体为受精。当第二极体释放率大于或等于 30% 为 IVF 受精良好,当第二极体释放率小于或等于 30% 或完全未见第二极体时判定 IVF 受精低下和 IVF 受精失败,对未受精卵立即进行 r-ICSI 操作。

1.2 方法

1.2.1 胚胎及囊胚评分及选择 移植新鲜胚胎当天(取卵后

第 3 天),对剩余胚胎进行分级。标准如下:Ⅰ级,细胞大小均匀,形状规则,透明带完整,胞质清晰,无颗粒现象,碎片率小于 5%卵裂球面积;Ⅱ级,细胞大小略不均,形态略不规则,胞质可有颗粒现象,碎片率 10%~20%;Ⅲ级,细胞大小严重不均,可有明显的形态不规则,胞质可有颗粒现象,碎片率 21%~50%;Ⅳ级,细胞大小严重不均,胞质可有严重的颗粒现象,碎片率大于 50%。囊胚评分按照 Gardner 评分系统进行^[3],根据囊胚扩张程度进行分期,简述如下:囊腔不足胚胎体积的 50%为 1 期;超过 50%为 2 期;占满整个胚胎为 3 期;囊胚扩张、透明带变薄为 4 期;囊胚开始从透明带孵出为 5 期;囊胚完全孵出为 6 期。处于 3~6 期的囊胚,再对内细胞团(ICM)和滋养外胚层(TE)进行评分。ICM 评分:细胞数量多且分布紧密为 A;细胞数量较少且分布松散为 B;细胞数量非常少为 C。TE 评分:较多的细胞形成连接紧密的上皮层为 A;较少的细胞连接松散为 B;细胞少且体积大为 C。冷冻标准:由于囊胚培养是移植后剩余的所有优劣胚胎进行培养,所以选择受精后第 5 天达 3CC 及以上囊胚都冷冻,若第 5 天未达到以上标准,则培养至第 6 天再按照以上标准观察和冷冻。

1.2.2 胚胎及囊胚的冷冻和解冻 胚胎及囊胚的冷冻采用本中心常规玻璃化冷冻方法操作^[4]。具体操作如下:在 37℃下降将胚胎或囊胚转移到 B 液(含 200 mL/L 血清蛋白替代物 SPS 的缓冲液 HEPES)中平衡 1 min,后转 E 液(含 75 mL/L

乙二醇和 75 mL/L 二甲亚砷的 HEPES)平衡 5 min,最后转 V 液(含 150 mL/L 乙二醇和 150 mL/L 二甲亚砷的 HEPES)作用 1 min,30 s 内转胚胎至冷冻载体,尽快浸入液氮保存。3 级及以上囊胚在冷冻前行人工皱缩囊腔^[5]。复苏时将胚胎或囊胚从液氮取出,浸入 0.33 mol/L 液(含 0.33 mol/L 蔗糖和 200 mL/LSPS 的 HEPES)平衡 3 min,然后转入 0.2 mol/L 液平衡 3 min,最后转至无蔗糖的平衡液中平衡 5 min 后移至囊胚培养液,培养 1~3 h ET。

1.2.3 妊娠结局评价 ET 后 14 d 监测血清 β -HCG 水平,若 β -HCG>50 U/L 为生化妊娠。35 d B 超见孕囊为临床妊娠。孕 20 周以前的非人为因素胚胎丢失为流产。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2012 年 1 月至 2013 年 12 月在本中心行 FET 治疗的 3 586 个周期,按受精方式分 3 组:A 组冻融胚胎解冻移植 2 008 例、囊胚解冻移植 954 例;B 组冻融胚胎解冻移植 361 例、囊胚解冻移植 129 例;C 组冻融胚胎解冻移植 87 例、囊胚解冻移植 47 例。3 种不同受精方式的冻融胚胎和囊胚移植患者平均年龄、平均内膜厚度、平均 ET 数比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。3 种不同受精方式的复苏率、妊娠率、流产率、宫外孕率等比较差异无统计学意义($P>0.05$)。具体见表 1、2。

表 1 3 种不同受精方式的冻融胚胎解冻移植后妊娠结局

组别	平均年龄(岁)	复苏率(%)	移植取消率(%)	平均 ET 数(个)	平均内膜厚度(cm)	妊娠率(%)	流产率(%)	宫外孕率(%)
A 组	33.3	97.1	0.6	2.03	10.4	33.1	14.1	5.5
B 组	33.2	95.8	0.8	1.99	10.6	32.7	15.4	3.4
C 组	33.3	97.7	0	1.91	10.7	27.6	4.2	4.2
χ^2	—	4.0	0.83	—	—	1.14	2.12	0.89
P	—	>0.05	>0.05	—	—	>0.05	>0.05	>0.05

—:无数据。

表 2 3 种不同受精方式的冻融囊胚解冻移植后妊娠结局

组别	平均年龄(岁)	复苏率(%)	移植取消率(%)	平均 ET 数(个)	平均内膜厚度(cm)	妊娠率(%)	流产率(%)	宫外孕率(%)
A 组	31.6	96.2	1.6	1.83	10.3	53.2	12.8	2.0
B 组	31.4	96.8	1.6	1.84	10.6	51.2	10.7	4.6
C 组	32.2	96.5	2.1	1.72	10.6	50.0	0.0	0.0
χ^2	—	0.26	3.12	—	—	0.35	3.51	2.36
P	—	>0.05	>0.05	—	—	>0.05	>0.05	>0.05

—:无数据。

3 讨 论

自从 1983 年人类首例冷冻胚胎移植取得成功以来^[6],胚胎冷冻技术已成为人类辅助生殖技术中重要组成部分^[7]。玻璃化冷冻是采用快速降温和高浓度的冷冻保护剂,使冷冻过程中溶液变得十分黏稠和坚固,从而形成玻璃样物质来减少细胞冰晶的形成,从而减少冰晶给细胞带来的冷冻损伤^[8]。经过二十多年的发展,玻璃化冷冻经历了不同冷冻保护剂的配伍和浓度的改变,现已获得较高的解冻复苏率。到目前为止,玻璃化冷冻已广泛应用在人类卵子、原核期胚胎、卵裂期胚胎和囊胚的冷冻^[9-12]。

本研究显示,无论是卵裂期胚胎还是囊胚的玻璃化冷冻,均获得较高的复苏率,差异无统计学意义($P>0.05$)。IVF、ICSI 和 r-ICSI 等 3 种不同受精方式获得的胚胎和囊胚,复苏率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。由于 ICSI 本身操作的非自然性,如卵子外颗粒的去除、卵膜的穿刺、PVP 或培养液进入卵子、带顶体的精子留在卵胞浆内等均可影响卵子及其后胚胎的发育,理论上推测 ICSI 对胚胎发育会有影响。但陆智勇等^[13]报道 IVF 组和 ICSI 组的 8 细胞胚胎以后的发育速度及潜能方面相同,两组胚胎在体内形成囊胚、发育成胎儿的潜能无明显不同,ICSI 操作对胚胎突破囊胚阶段无影响。梁学

芬等^[14]报道显示 ICSI 的优质胚胎较 IVF 高。r-ICSI 与常规 ICSI 相比,在胚胎发育上仅相隔数小时,胚胎的生长发育、碎片数量、胚胎评分等比较差异无统计学意义($P>0.05$),正常的胚胎发育速度保证了胚胎的质量。本研究的数据同样显示, r-ICSI 组的妊娠率比 IVF、ICSI 组低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。IVF、ICSI 和 r-ICSI 不同受精方式获得的胚胎的复苏率、流产率、宫外孕率也没有明显差异。同样 3 种不同受精方式获得囊胚的复苏率、妊娠率、流产率、宫外孕率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

同时数据显示,冻融胚胎与囊胚的妊娠率有明显不同。自然生理状态下,早期胚胎在输卵管中发育,直到接进囊胚期才进入子宫腔^[15],随着辅助生殖技术的发展,囊胚期胚胎培养移植技术的应用使胚胎的发育潜能能进一步筛选,并且囊胚期胚胎的形成在形态上经历小细胞融合、囊胚腔出现及囊胚腔扩张的变化,在基因水平上经历了由母型调节向胚胎型调节的转变。因此囊胚期胚胎具有更好的发育潜能。据 Fanchin 等^[16]研究发现推测子宫收缩频率(UC)随时间的延长而降低,在 HCG 日后 8 d 的 UC 显著降为每分钟(1.5 ± 0.20)次,这表明囊胚移植时子宫近乎静止的状态可避免胚胎在宫腔内移位,从而更有利于胚胎种植。

综上所述,在目前越来越趋于完善的辅助生殖技术发展前景下,IVF 治疗女性不孕症、ICSI 治疗男性不育症及 r-ICSI 补救 IVF 受精失败都可获得相近的临床效果。但是否增加后代异常的危险性有待进一步研究。

参考文献

[1] Anderson AR, Wilkinson SS, Price S, et al. Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(3): 402-405.

[2] Balaban B, Urman B, Ata B, et al. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification; vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation[J]. Hum Reprod, 2008, 23(9): 1976-1982.

[3] 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.

[4] Ma WH, Yang X, Liang XY. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: a prospective study[J]. Reprod Bio Endocrin, 2012, 10(8): 68.

[5] 岳超敏, 方丛, 宫晓, 等. 囊胚解冻过夜培养后移植对妊娠结局的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2013, 34(3): 415-421.

[6] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thaw and transfer of an eight-cell embryo[J]. Nature, 1983, 305(5936): 707-709.

[7] Cohen J, Jones HW. How to avoid multiple pregnancies in assisted reproductive technologies[J]. Semin Reprod Med, 2001, 19(3): 269-278.

[8] Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification[J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(4): 779-796.

[9] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method[J]. Theriogenology, 2007, 67(2): 73-80.

[10] Kumasako Y, Kumon JY, Gilbert L. Successful pregnancy after the vitrification of zygotes using commercial vitrification solution and conventional straws to protect against infections in liquid nitrogen[J]. Assist Reprod Genet, 2005, 22(4): 33-35.

[11] 朱桂金, 靳镭, 章汉望, 等. 玻璃化冷冻人早期胚胎的效果观察[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(10): 82-84.

[12] Youssry M, Ozmen B, Zohni K, et al. Current aspects of blastocyst cryopreservation[J]. Reprod Biomed Online, 2008, 16(5): 311-320.

[13] 陆智勇, 杨嫦玉, 杨如春, 等. 卵胞浆单精子注射与体外受精的胚胎发育速度及妊娠率的比较[J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(5): 298-300.

[14] 梁雪芬, 方伟芬, 冯贵雪, 等. 不同受精方式对妊娠结局的影响[J]. 微创医学, 2008, 3(6): 569-571.

[15] Thomas MR, Sparks AE, Ryan CL, et al. Clinical prediction of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer[J]. Fertil Steril, 2010, 94(2): 543-548.

[16] Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, et al. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers[J]. Hum Reprod, 2001, 16(6): 105-109.

(收稿日期: 2014-02-20)

(上接第 2017 页)

杂志, 2011, 18(2): 142-144.

[2] 杨光华. 病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 125.

[3] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System; terminology for reporting results of cervical cytology[J]. JAMA, 2002, 287(16): 2114-2119.

[4] Solomon D, Nayar R. 子宫颈细胞学 Bethesda 报告系统定义标准和注释[M]. 2 版. 黄受方, 译. 北京: 人民军医出版社, 2004: 37-40.

[5] Renshaw AA, Young NA, Irdson GG, et al. Comparison of performance of conventional and thin prep gynecologic preparation in the college of American Pathologists Gynecologic Cytology Program[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(1): 1-12.

[6] 吕京滢, 宋芳, 许伟伟, 等. 24 687 例宫颈液基薄层细胞学检查结果分析[J]. 中国实用医药, 2013, 8(26): 10-11.

[7] 王晓英, 黄永宏, 杨晓峰. 阴道镜活检与 TCT 对宫颈癌前病变诊

断中的价值[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(7): 1270-1271.

[8] 刘军防, 王娜, 尚延慧, 等. 宫颈液基细胞学检测分级与病理活检结果的对应关系研究[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(4): 614-616.

[9] 贾英, 吴瑾, 唐良苕, 等. 宫颈液基细胞学检查对宫颈病变的筛查价值——附 38 088 例分析[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(12): 1492-1495.

[10] 吕京滢, 宋芳, 许伟伟, 等. 24 687 例宫颈液基薄层细胞学检查结果分析[J]. 中国实用医药, 2013, 8(26): 11.

[11] 王丽, 罗金芳, 叶宣光. 197 例宫颈非典型鳞状细胞与组织学诊断的对照研究及 10 例误诊分析[J]. 诊断病理学杂志, 2014, 21(1): 14.

[12] 田立霞, 周梦云, 徐莲薇, 等. 3 966 例液基细胞学检查结果分析[J]. 中外医疗, 2013, 32(32): 192.

(收稿日期: 2014-02-11)