

胚胎植入前遗传学检测治疗后移植结局相关因素分析

朱晓倩^{1,2,3}, 徐文娟^{1,2,3}, 周平^{1,2,3}

摘要 目的 探讨不孕不育患者行胚胎植入前遗传学检测(PGT)治疗后与移植结局相关的因素。方法 对接受染色体结构异常检测/单基因病检测(PGT-SR/PGT-M)治疗后进行冻融胚胎移植的148个周期的相关资料进行回顾性分析。根据移植结果分为妊娠组(74例)和未妊娠组(74例)。对资料中男性年龄、女性年龄、不孕时间、流产次数、女方BMI、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)、孕酮(P)、血糖、胰岛素、白蛋白、总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白(HDL)、父母不孕不育原因、染色体异常类型、获卵数、MII数、受精数、2PN数、移植日子宫内膜厚度、内膜准备方式、胚胎天数、是否存在优质胚胎使用Mann-Whitney U检验和Pearson卡方检验进行单因素分析,与移植结果有相关性的因素用多因素logistic回归模型进行筛选。结果 单因素分析结果显示E2、胰岛素、总胆固醇、三酰甘油和内膜准备方式与PGT-SR、PGT-M周期的移植结局显著相关($P < 0.05$)。多因素logistic回归分析显示,女性较低水平的胰岛素($OR = 0.14, 95\% CI = 0.03 \sim 0.27$)和三酰甘油($OR = 1.38, 95\% CI = 0.14 \sim 2.78$)有利于PGT周期的移植结局。在内膜准备方面,与自然周期相比,人工周期($OR = 3.52, 95\% CI = 2.54 \sim 4.65$)是改善移植结果的另一个因素。结论

在PGT周期中胰岛素和三酰甘油水平、子宫内膜准备和移植结果之间存在相关性。具体来说,较低的胰岛素和三酰甘油水平,以及人工周期可以带来更好的移植结果。

关键词 胚胎植入前遗传学检测;移植结局;胰岛素;三酰甘油;人工周期

中图分类号 R 715.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0140-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.023

世界卫生组织曾报道^[1],全球范围内有15%的夫妻都受到不孕不育问题的困扰。自1978年世界

上第一例试管婴儿诞生,到2011年全球范围内已有400万试管婴儿出生^[2]。1990年Handyside et al^[3]首次报道利用胚胎植入前的性别筛选避免移植携带X染色体连锁隐性遗传病的胚胎,最终获得健康女婴后,胚胎植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)蓬勃发展。根据检测疾病的种类不同,PGT被分为非整倍体检测(PGT for aneuploidies, PGT-A)、染色体结构重排检测(PGT for structural rearrangements, PGT-SR)、单基因疾病检测(PGT for monogenic, PGT-M)^[4]。对于存在单基因疾病、染色体结构异常问题的患者来说,单一的ICSI-ET常常不能达到好的移植结局,PGT能在囊胚移植前判断囊胚的遗传信息,挑选出正常囊胚进行移植,最终获得好的妊娠结局。对于采取PGT筛选正常胚胎进行移植的患者,如何提高移植成功率是值得探究的问题。该研究针对接受PGT-SR、PGT-M治疗后进行冻融胚胎移植的148个周期的相关资料进行回顾性分析,以探究影响移植结局的相关因素。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2018年3月至2020年6月于安徽医科大学第一附属医院生殖中心接受冻融胚胎移植共9664个周期,其中接受PGT治疗后移植的共363例,本研究主要针对PGD周期,即PGT-SR、PGT-M周期,共获得148个周期作为研究对象。纳入标准:①夫妻双方经诊断后符合PGT-SR、PGT-M治疗的标准(染色体结构异常、单基因病等),且双方签署知情同意书;②病例完整,基础信息真实可信,可随访;③PGT-SR、PGT-M后选择正常胚胎进行移植,排除选择嵌合体胚胎移植者;④胚胎移植后可追溯到移植结局。排除标准:①不符合上述纳入标准者;②除PGT-SR、PGT-M诊疗标准外女方有其他疾病者。

1.2 移植结局分类 移植成功包括:胚胎移植后尿妊娠试验阳性者且8周阴道B超示:子宫内可见妊娠囊及原始心管搏动者;妊娠28周以上获得活产者。移植失败包括:胚胎植入后尿妊娠试验阴性者

2022-08-12 接收

基金项目:安徽省科技重大专项项目(编号:202003a07020012)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

²国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥 230032

³出生人口健康教育重点实验室,合肥 230032

作者简介:朱晓倩,女,硕士研究生;

周平,女,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zhoup_325@ aliyun.com

为未孕;胚胎移植后尿妊娠试验阳性且超声检查无妊娠囊者为生化妊娠;胚胎移植后尿妊娠试验阳性且8周阴道超声示:子宫内可见妊娠囊无原始心管搏动为胚停。

1.3 资料的具体分类 148个周期中,内膜准备方式分为自然周期和人工周期(使用补佳乐、芬吗通、黄体酮等药物);囊胚发育天数分为5d和6d;优质囊胚的划分:首先采用Gardner评分标准^[5]对囊胚进行分级,囊胚在5d且评分为3BB及以上和囊胚在6d且评分为4BB及以上的为优质囊胚,其余为否;父母不孕不育原因分为:男方染色体疾病(如染色体易位、染色体数目异常、Y染色体微缺失)、女方染色体疾病、单基因疾病(如MUT基因突变、SMN1基因突变)、其他(严重少弱畸精子症、梗阻性无精子症等);染色体易位类型分为平衡易位、罗氏易位、其他(非染色体疾病)。

1.4 统计学处理 使用SPSS 22.0版软件对上述变量进行单因素分析。数据不符合正态分布,连续变量比较采用秩和检验(Mann-Whitney *U*)检验,以中位数和四分位差表示;分类变量比较采用Pearson卡方检验。使用R软件对具有统计学意义的因素进行多因素logistic回归分析,并将结果表示为优势比(OR)和95%置信区间(95%CI)。利用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)、ROC曲线下面积(area under curve, AUC)和标定曲线对预测性能进行检验,最后制作诺莫图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对148个PGT周期冻融胚胎移植结局的相关因素进行单因素分析 妊娠组与未妊娠组中的男性年龄、女性年龄、不孕时间、流产次数、女方体质量指数(body mass index, BMI)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteotropic hormone, LH)、孕酮(progesterone, P)、血糖、白蛋白、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、父母不孕不育原因、染色体异常类型、获卵数、MII数、受精数、2PN数、移植日子宫内膜厚度、胚胎天数、是否存在优质胚胎的差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。两组的雌激素(estrogen, E2)、胰岛素、总胆固醇、三酰甘油及内膜准备方式的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 相关因素多因素logistic分析 对PGT周期移植结局相关因素进行多因素logistic回归分析,绘

制PGT患者胚胎移植后移植结局森林图。与未妊娠组相比,妊娠组E2基础水平和总胆固醇与移植结局无显著相关性;更高水平的胰岛素和三酰甘油与不良移植结果有明显相关性($P < 0.05$);子宫内膜准备方式中,人工周期周期比自然周期更容易获得更好的妊娠结果($P < 0.05$)。见图1。

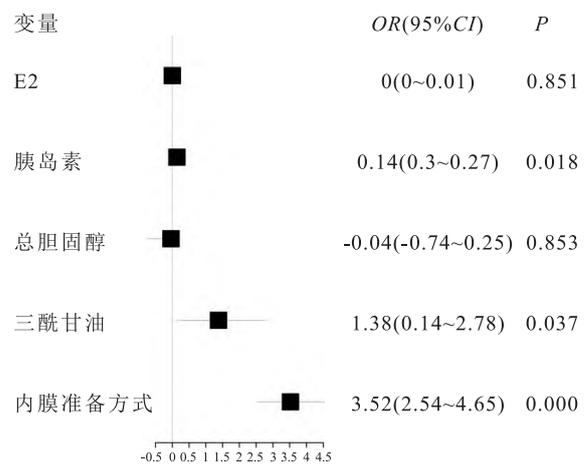


图1 PGT-SR、PGT-M患者胚胎移植后妊娠结局的多因素Logistic回归分析

2.3 检验多因素logistic回归分析的可信度 ROC曲线分析显示,基于多因素logistic回归分析,PGT-SR、PGT-M周期移植结局的AUC为0.903,具有较好的预测价值,见图2。与患者实际情况相比,预测结果与标定曲线拟合程度较高,进一步说明了该预测模型的可信度,见图3。

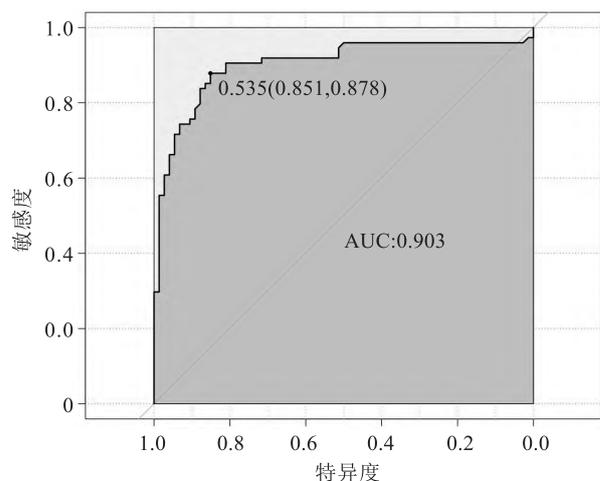


图2 在多因素logistic回归分析中,PGT-SR、PGT-M患者胚胎移植后妊娠结局的ROC曲线和AUC值

2.4 构建多因素预测模型并预测相关因素与不良妊娠结局的关系 通过构建一个多因素逻辑回归分

表1 PGT-SR、PGT-M 周期中不同胚胎移植结局的特征比较[$M(P_{25}, P_{75}), n(\%)$]

因素	妊娠组(n=74)	未妊娠组(n=74)	Z/ χ^2	P 值
男方年龄(岁)	30.00(27.75~32.25)	30.00(28.00~35.00)	-1.420	0.156
女方年龄(岁)	29.00(26.00~32.00)	28.00(26.75~31.50)	-0.192	0.847
不孕时间(年)	2.00(1.00~3.00)	2.00(1.00~3.00)	-0.391	0.696
流产次数	1.00(0.00~2.00)	1.00(0.00~2.00)	-0.140	0.889
BMI(kg/m ²)	21.30(19.65~23.35)	21.95(19.60~26.10)	-1.517	0.129
FSH(mIU/L)	6.82(6.11~7.74)	6.79(5.67~7.96)	-0.297	0.766
LH(mIU/L)	4.34(3.16~5.90)	4.00(3.03~5.60)	-0.988	0.323
E2(pmol/L)	137.00(90.18~191.25)	156.50(125.00~249.50)	-2.248	0.025
P(nmol/L)	1.56(0.85~2.43)	1.69(1.25~2.54)	-1.183	0.237
血糖(mmol/L)	5.24(5.00~5.43)	5.23(5.11~5.41)	-0.736	0.461
胰岛素(mU/L)	8.59(6.96~9.76)	11.00(7.55~17.22)	-3.281	0.001
白蛋白(g/L)	46.65(44.79~47.98)	46.25(43.88~48.13)	-0.924	0.355
总胆固醇(mmol/L)	4.31(3.94~4.67)	4.67(4.12~5.15)	-2.211	0.027
三酰甘油(mmol/L)	0.91(0.79~1.05)	1.15(0.84~1.80)	-3.569	0.000
HDL(mmol/L)	1.34(1.24~1.54)	1.32(1.22~1.45)	-1.055	0.291
父母不孕不育原因			5.228	0.156
父方染色体异常	27(18.24)	32(21.62)		
母方染色体异常	21(14.19)	19(12.84)		
单基因病	5(3.38)	11(7.43)		
其他	21(14.19)	12(8.11)		
染色体异常类型			0.472	0.790
平衡易位	41(27.70)	45(30.40)		
罗氏易位	3(2.03)	3(2.03)		
其他	30(20.27)	26(17.57)		
获卵数	18.50(12.00~24.25)	18.50(12.00~24.00)	-0.255	0.799
MII	15.00(10.00~22.00)	16.00(10.75~22.00)	-0.138	0.890
受精数	12.00(9.00~18.00)	13.00(9.75~18.00)	-0.540	0.589
2PN	10.00(7.75~16.00)	11.00(7.00~15.00)	-0.225	0.822
移植日内膜厚度(mm)	10.70(9.50~11.30)	10.00(9.10~11.30)	-1.679	0.093
内膜准备方式			64.999	0.000
人工周期	63(42.57)	14(9.46)		
自然周期	11(7.43)	60(40.54)		
胚胎天数(d)			2.019	0.155
5	55(37.16)	47(31.76)		
6	19(12.84)	27(18.24)		
是否优质囊胚			0.668	0.414
是	68(45.95)	65(43.92)		
否	6(4.05)	9(6.08)		

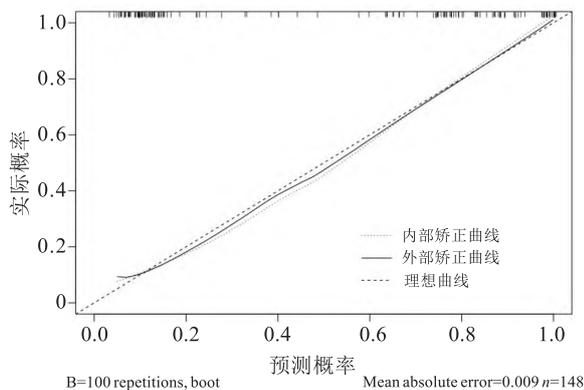


图3 多因素 logistic 回归分析的校准曲线

析模型,将 PGT 周期中与移植结果相关的各个因素的值水平赋值,将每个因素的得分相加,根据总得分对应的风险概率,预测 PGT 患者获得不良移植结局的概率。诺莫图表示患者体内的胰岛素和三酰甘油的水平越高以及选择自然周期有更大的移植失败风险。见图4。

3 讨论

本研究表明,在冷冻胚胎解冻移植过程中,女性的胰岛素水平、三酰甘油水平和子宫内膜准备方式与 PGT-SR、PGT-M 周期中患者移植单个胚胎后的移植结局显著相关。

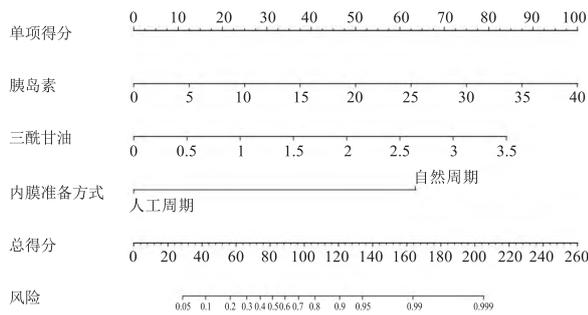


图4 诺莫图

自1921年胰岛素被发现是治疗糖尿病的有效药物以来,已有100年的历史,胰岛素作为体内唯一的降血糖物质,在葡萄糖、脂肪和蛋白质的合成和代谢中发挥着至关重要的作用。目前的研究^[6]表明,参与胰岛素依赖型葡萄糖摄取的葡萄糖转运蛋白存在于子宫内膜中,其功能与胚胎植入时子宫内膜的分化以及子宫内膜耐受有关。本研究显示两组血糖和胰岛素水平均在正常范围内,数值相似但无统计学意义,未妊娠组胰岛素水平明显高于妊娠组。Matthews et al^[7]在1985年创建了稳态模型评估(homeostasis model assessment, HOMA),利用空腹血糖水平、胰岛素水平评估机体胰岛素抵抗(HOMA-IR)和胰岛β细胞功能(HOMA-β)。HOMA-IR计算公式: $HOMA-IR = FPG(\text{mmol/L}) \times FINS(\text{mIU/L}) / 22.5$ 。有文献^[8]证明HOMA-IR对正常体质量不孕妇女的IVF结果有不利影响,并以2.2作为区分HOMA-IR高和低的截断值。尽管HOMA-IR的阈值可能因种族、年龄、性别、疾病和并发症而异,但HOMA-IR值越高,胰岛素抵抗的严重程度越高。本研究用HOMA-IR值来评估两组的胰岛素抵抗水平,按照公式计算后,未妊娠组(2.56)的HOMA-IR值比妊娠组(2)的HOMA-IR值高。因此推测,未妊娠组患者比妊娠组患者更接近胰岛素抵抗状态。有研究^[9]表明,正常妊娠过程本身与胰岛素抵抗的发生有关。并且对于孕妇来说,胰岛素抵抗与妊娠期高血压、先兆子痫、妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)等相关,对孕妇自身及胎儿均有不良影响^[10]。因此,有必要避免在妊娠期间和妊娠早期出现胰岛素抵抗。

血脂参数如总胆固醇和三酰甘油在怀孕期间本身便会升高,且妊娠期间血脂过高与孕产妇和新生儿不良结局相关^[11]。Arbib et al^[12]证实,妊娠前三酰甘油/HDL > 3与妊娠期间GDM和子痫前期风险

增加,以及与胎龄较大(large for gestational age, LGA)、巨大儿和新生儿黄疸独立相关。本研究中,两组的三酰甘油水平都在正常范围内,且未妊娠组三酰甘油水平更高。多因素logistic分析显示,较高的三酰甘油水平与PGT周期胚胎移植后不良妊娠相关,与以往研究的结论一致。因此,对于希望获得更好妊娠结局的不孕患者来说,在进入周期前将血脂水平控制在正常范围是至关重要的。

子宫内膜有一个窗口期,在此期间胚胎可以被植入准备好的子宫内膜,然后怀孕,称为理想的28 d周期的第22天到24天。子宫内膜和胚胎的同步发育对于建立妊娠而言至关重要。自然周期中,由于个体的差异,卵泡期长短的不同,胚胎移植时间很难被准确预测^[13];而人工周期通过外源性激素建立可靠的周期,与自然周期相比,具有较少的超声监测次数、灵活的周期控制和较低的周期取消率^[14]。除此之外,研究^[13]表明人工周期与自然周期虽然在内膜厚度上存在显著差异,但并没有影响两组的妊娠率,因此推断子宫内膜只要达到一定的厚度就可以进行移植;该研究还证明了人工周期可能引起的体内高E2水平与移植结果不存在相关性。因此,人工周期获得了更高的临床使用频率。本研究表明,在PGD周期中,人工周期更有可能获得更好的移植结局。

本研究对148个PGT周期的分析显示,较低水平的胰岛素、三酰甘油和人工周期与良好的移植结局显著相关,并且基于这些数据做出的多因素logistic分析模型也显示出较高的可信度。本研究做出的预测模型能为PGT患者移植前的准备工作提供参考价值。由于只加入了单中心来源的周期,且周期例数有限,本研究还存在不足之处,之后将进一步随访及统计以完善研究。

参考文献

- [1] 孙文希,胡凌娟. 国内外不孕不育症现状及我国的干预策略探讨[J]. 人口与健康, 2019(12): 19-23.
- [2] Biggers J D. IVF and embryo transfer: historical origin and development[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(2): 118-27.
- [3] Handyside A H, Kontogianni E H, Harly K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification[J]. Nature, 1990, 344(6268): 768-70.
- [4] Zegers-Hochschild F, Adamson G D, Dyer S, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017[J]. Hum Reprod, 2017, 32(9): 1786-801.
- [5] Gardner D K, Lane M, Stevens J, et al. Reprint of: Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. Fertil Steril, 2019, 112(4 Suppl1): e81

- 4.
- [6] von Wolff M, Ursel S, Hahn U, et al. Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium; expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(8): 3885-92.
- [7] Matthews D R, Hosker J P, Rudenski A S, et al. Homeostasis model assessment; insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man [J]. *Diabetologia*, 1985, 28(7): 412-9.
- [8] Song H, Yu Z, Li P, et al. HOMA-IR for predicting clinical pregnancy rate during IVF [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2022, 38(1): 33-8.
- [9] Hodson K, Man C D, Smith F E, et al. Mechanism of insulin resistance in normal pregnancy [J]. *Horm Metab Res*, 2013, 45(8): 567-71.
- [10] Sun Y Y, Juan J, Xu Q Q, et al. Increasing insulin resistance predicts adverse pregnancy outcomes in women with gestational diabetes mellitus [J]. *J Diabetes*, 2020, 12(6): 438-46.
- [11] Zheng W, Huang W, Zhang L, et al. Changes in serum lipid levels during pregnancy and association with neonatal outcomes: A large cohort study [J]. *Reprod Sci*, 2018, 25(9): 1406-12.
- [12] Arbib N, Pfeffer-Gik T, Sneh-Arbib O, et al. The pre-gestational triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol ratio is associated with adverse perinatal outcomes: A retrospective cohort analysis [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2020, 148(3): 375-80.
- [13] Zheng Y, Dong X, Huang B, et al. The artificial cycle method improves the pregnancy outcome in frozen-thawed embryo transfer: a retrospective cohort study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(1): 70-4.
- [14] An J, Li L, Zhang X, et al. A clinical and basic study of optimal endometrial preparation protocols for patients with infertility undergoing frozen-thawed embryo transfer [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2191-9.

Factors correlating to frozen-thawed embryo transfer outcomes in preimplantation genetic testing cycles

Zhu Xiaoqian^{1,2,3}, Xu Wenjuan^{1,2,3}, Zhou Ping^{1,2,3}

¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Key Laboratory of Gametes and Reproductive Tract Abnormalities, National Health Commission, Hefei 230032;

³Key Laboratory of Ministry of Birth Health Education, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the factors associated with the transplant outcomes after the treatment of preimplantation genetic testing (PGT) for infertile patients. **Methods** A retrospective analysis of data of frozen-thawed embryo transfers in PGT for structural rearrangements/PGT for monogenic (PGT-SR/PGT-M) cycles was performed. According to the transplant outcomes, it was divided into the pregnancy group (74 cases) and the non-pregnancy group (74 cases). The factors including male age, female age, duration of infertility, number of abortion, female BMI, follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), progesterone (P), blood glucose, insulin, albumin, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), parents' causes of infertility, type of chromosomal abnormality, number of retrieved oocyte, number of meiosis II (MII), number of fertilization, number of two pronuclei (2PN), endometrial thickness on embryo transfer day, endometrial preparation, day of embryo development, presence of a top quality embryo (TQE) or not were analyzed by the Mann-Whitney U test and Pearson's chi-square test. The probability of transplant outcomes in correlation with the relevant parameters analyzed was measured with multivariate logistic regression analysis. **Results** Univariate analysis indicated that E2, insulin, total cholesterol, triglycerides and endometrial preparation were significantly associated with transplant outcomes in PGT-SR, PGT-M cycles ($P < 0.05$). Multiple logistic regression analysis revealed that lower levels of insulin ($OR = 0.14$, $95\% CI = 0.03 - 0.27$) and triglycerides ($OR = 1.38$, $95\% CI = 0.14 - 2.78$) in women were beneficial to transplant outcomes in PGT cycles. For endometrial preparation, compared with natural cycles, hormone replacement therapy (HRT) cycles ($OR = 3.52$, $95\% CI = 2.54 - 4.65$) were another factor to improve transplant outcomes. **Conclusion** There is a correlation between the levels of insulin and triglycerides, endometrial preparation and transplant outcomes in PGT cycles. In detail, lower levels of insulin and triglycerides, and the HRT cycle can lead to a better transplant outcome.

Key words preimplantation genetic testing; transplant outcomes; insulin; triglycerides; hormone replacement therapy cycles