

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.008.html>

低可利用胚胎患者的胚胎移植策略

文 琴 姜 宏 周 云 张文香

摘要 探讨受精后第2天(D2)行胚胎移植在低可利用胚胎患者体外受精或卵母细胞质内单精子显微注射(IVF/ICSI)周期的应用价值。选择接受IVF/ICSI治疗、年龄<40岁且可利用胚胎数≤3枚的患者作为研究对象,共191个周期;其中D2行胚胎移植99个周期(D2移植组),D3行胚胎移植92个周期(D3移植组),比较D2与D3移植组以及D2移植与其既往D3移植组的临床结局。D2移植组的获卵数及胚胎耗损率均显著低于D3移植组($P<0.05$),优胚率显著高于D3移植组($P<0.05$),但胚胎种植率、临床妊娠率、早期流产率及异位妊娠率均与D3移植组间差异无统计学意义。D2移植组的胚胎耗损率及周期取消率均显著低于既往D3移植周期($P<0.05$),但胚胎种植率及临床妊娠率均显著高于既往D3移植周期($P<0.05$)。对低可利用胚胎患者,选择D2行全胚胎移植不失为一个有价值、可供选择的胚胎移植策略。

关键词 体外受精-胚胎移植;胚胎耗损率;临床结局

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0319-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.035

目前,体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)已成为不孕症的常规治疗手段。随着促排卵方案、培养试剂及实验室技术的不断发展与完善,IVF-ET过程中绝大多数患者均可获得一定数量的优质胚胎,但不同胚胎移植时机对妊娠结局的影响尚存争议。目前国内外多数学者多选择受精后第3天(D3)进行新鲜周期卵裂胚移植,但部分患者由于可利用胚胎数较少,培养至D3往往因胚胎发育阻滞及质量差,导致周期取消率增加,临床结局不理想^[1],给患者和临床医师均带来极大的心理负担。该研究对部分低可利用胚胎患者选择D2移植,探讨其临床应用价值。

2017-10-30 接收

基金项目:安徽省科技攻关计划项目(编号:1604a0802095);南京军区医学科技创新重点项目(编号:ZD14)

作者单位:安徽医科大学解放军临床学院第105医院生殖中心,合肥 230031

作者简介:文 琴,女,硕士研究生;

姜 宏,男,博士后,博士生导师,主任医师,责任作者,E-mail: jiangh105@sina.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2015年12月~2017年2月在解放军105医院生殖中心接受体外受精或卵母细胞质内单精子显微注射(*in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection, IVF/ICSI)治疗、年龄<40岁且可利用胚胎数≤3枚的不孕患者作为研究对象,共191个周期;其中受精后D3行胚胎移植92个周期,受精后D2行胚胎移植99个周期,并对其中至少曾行1次D3移植(共50个周期)的D2移植组(41个周期)患者进行自身前后对照,比较D3与D2移植组及D2移植与既往D3移植周期的Gn用量和天数、移植日内膜厚度、获卵数、M II (metaphase II)率、优胚率、胚胎耗损率(embryo consumption rate, ECR)、胚胎着床率、临床妊娠率、早期流产率及异位妊娠率。

1.2 IVF-ET 患者采用的促排卵方案包括GnRH-a长方案、短方案及拮抗剂方案;根据卵泡发育速度及血黄体生成素、雌二醇水平酌情调整Gn用量,当2个以上卵泡直径≥18 mm时皮下注射重组人绒毛膜促性腺激素(商品名艾泽,德国默克雪兰诺公司)250 μg,36~38 h行超声引导下经阴道取卵术。2~4 h后行常规IVF或ICSI,受精后(44±1)h(D2)或(68±1)h(D3)观察并评估卵裂期胚胎。D2或D3选择2~3枚可利用胚胎进行移植,术后给予常规黄体支持。

1.3 胚胎评分 根据D2或D3胚胎形态和碎片将胚胎分为4级^[2]: I级,碎片<5%; II级,5%≤碎片<20%; III级,20%≤碎片<50%; IV级,碎片≥50%。以D2卵裂球细胞数目≥4的I、II级胚胎为优质胚胎,D3卵裂球细胞数目≥6的I、II级胚胎为优质胚胎。D2卵裂球数目≥2细胞III级以上胚胎视为可利用胚胎,D3≥5细胞III级以上胚胎视为可利用胚胎。 $ECR(\%) = (\text{卵裂数} - \text{移植数}) / \text{卵裂数} \times 100\%$ ^[3]。

1.4 妊娠诊断 胚胎移植后14 d血β人绒毛膜促性腺激素(beta human chorionic gonadotropin, β-HCG)≥20 mIU/ml为生化妊娠,移植后35 d左右B

超下见胚囊确诊为临床妊娠,妊娠 12 周内的流产及胚胎停止发育诊断为早期流产。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件包建立数据库做统计学分析。定量资料符合正态分布,组间比较采用 t 检验;不符合正态分布者,组间比较采用秩和检验;分类资料或率的比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本情况 由表 1 可见,两组间患者年龄、不孕年限、不孕因素、曾行 IVF/ICSI 次数、体重指数、基础黄体生成素(baseline luteinizing hormone, bLH)、基础雌二醇(baseline estradiol, bE2)、基础卵泡刺激素(baseline follicle-stimulating hormone, bF-

SH) 及抗苗勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)等差异均无统计学意义;但 D2 移植组的窦卵泡数(antral follicle count, AFC)显著低于 D3 移植组($P < 0.05$)。

2.2 两组临床结局比较 由表 2 可见, D2 移植组的获卵数及 ECR 均显著低于 D3 移植组($P < 0.05$),且 D2 移植组的优胚率显著高于 D3 移植组($P < 0.05$),但 Gn 用量和天数、移植日内膜厚度、M II 率、移植胚胎数、胚胎种植率、临床妊娠率、早期流产率及异位妊娠率均与 D3 移植组间差异均无统计学意义。

2.3 D2 移植组自身对照比较 由表 3 可见, D2 移植组 Gn 用量、Gn 天数、移植日内膜厚度、获卵数、M II 率、受精率、移植胚胎数及可用胚胎数与既往 D3 移植组差异均无统计学意义,但 D2 移植组的 ECR

表 1 两组患者一般情况的比较

项目	D2 移植组($n=99$)	D3 移植组($n=92$)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	32.51 $\pm$ 4.69	32.57 $\pm$ 4.57	0.090	0.929
不孕年限(年 $\bar{x} \pm s$)	4.28 $\pm$ 2.91	4.15 $\pm$ 2.69	0.383	0.701
不孕因素(%)				
女方因素	54.55(54/99)	54.35(50/92)	0.001	0.978
男方因素	10.10(10/99)	9.78(9/92)	0.005	0.941
双方因素	23.23(23/99)	22.83(21/92)	0.004	0.947
不明原因	12.12(12/99)	13.04(12/92)	0.037	0.848
曾行 IVF/ICSI 次数($\bar{x} \pm s$)	0.72 $\pm$ 1.23	0.79 $\pm$ 1.38	-0.018*	0.986
体重指数(kg/m^2 $\bar{x} \pm s$)	23.47 $\pm$ 3.97	23.05 $\pm$ 3.79	0.849	0.394
基础性激素				
bFSH(mIU/ml $\bar{x} \pm s$)	8.24 $\pm$ 3.13	8.79 $\pm$ 3.37	0.411	0.687
bLH(IU/L $\bar{x} \pm s$)	4.87 $\pm$ 2.76	4.95 $\pm$ 3.60	0.442	0.666
bE2(pg/ml $\bar{x} \pm s$)	44.95 $\pm$ 42.83	42.95 $\pm$ 34.88	0.185	0.853
AMH(ng/ml $\bar{x} \pm s$)	3.02 $\pm$ 4.29	4.11 $\pm$ 4.69	1.513*	0.118
AFC(个 $\bar{x} \pm s$)	8.78 $\pm$ 6.73	10.23 $\pm$ 7.41	-2.418	0.017

注: * 表示秩和检验结果 Z 值

表 2 两组患者临床结局的比较

项目	D2 移植组($n=99$)	D3 移植组($n=92$)	χ^2/t 值	P 值
Gn 用量(U $\bar{x} \pm s$)	2 468 $\pm$ 858.09	2 369 $\pm$ 958.56	0.755	0.451
Gn 时间(d $\bar{x} \pm s$)	11.34 $\pm$ 2.93	11.16 $\pm$ 3.49	0.387	0.698
移植日内膜厚度(mm $\bar{x} \pm s$)	11.29 $\pm$ 2.39	11.48 $\pm$ 2.95	-0.491	0.624
获卵数(个 $\bar{x} \pm s$)	6.14 $\pm$ 3.53	7.96 $\pm$ 4.88	-2.686*	0.007
M II 率(%)	70.39(428/608)	74.86(548/732)	3.352	0.067
优胚率(%)	66.18(180/272)	28.86(114/395)	90.995	<0.001
ECR(%)	15.44(42/272)	45.06(178/395)	63.943	<0.001
移植胚胎数(个 $\bar{x} \pm s$)	2.32 $\pm$ 0.53	2.36 $\pm$ 0.60	-0.635*	0.532
胚胎种植率(%)	19.13(44/230)	16.59(36/217)	0.490	0.484
临床妊娠率(%)	34.34(34/99)	31.52(29/92)	0.172	0.679
早期流产率(%)	5.88(2/34)	6.90(2/29)	0.027	0.869
异位妊娠率(%)	2.94(1/34)	3.45(1/29)	0.013	0.909

注: * 表示秩和检验结果 Z 值

表3 患者 D2 周期与既往周期自身配对比较

项目	D2 移植组($n=41$)	既往 D3 移植组($n=50$)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	32.34 $\pm$ 4.30	32.36 $\pm$ 4.53	-0.020	0.984
Gn 用量(U $\bar{x} \pm s$)	2 314 $\pm$ 834.47	2 379 $\pm$ 933.25	-0.791	0.431
Gn 时间(天 $\bar{x} \pm s$)	11.11 $\pm$ 2.04	11.52 $\pm$ 2.39	-0.818	0.416
移植日内膜厚度(mm $\bar{x} \pm s$)	10.98 $\pm$ 2.06	11.28 $\pm$ 2.51	-0.633	0.529
获卵数(个 $\bar{x} \pm s$)	5.78 $\pm$ 3.10	8.06 $\pm$ 5.85	-1.868*	0.062
M II 率(%)	69.62(165/237)	73.70(297/403)	1.236	0.266
受精率(%)	73.94(122/165)	78.79(234/297)	1.410	0.235
ECR(%)	27.87(34/122)	56.84(133/234)	27.021	<0.001
移植胚胎数(个 $\bar{x} \pm s$)	2.38 $\pm$ 0.55	2.14 $\pm$ 0.64	-1.515*	0.130
可用胚胎数(个 $\bar{x} \pm s$)	2.20 $\pm$ 0.98	2.12 $\pm$ 1.44	-0.620*	0.535
胚胎种植率(%)	14.77(13/88)	4.78(3/67)	4.355	0.037
临床妊娠率(%)	27.03(10/37)	6.45(2/31)	4.914	0.027
周期取消率(%)	9.76(4/41)	38.00(19/50)	9.515	0.002

注: * 表示秩和检验结果 Z 值

及周期取消率均显著低于既往 D3 移植组($P < 0.05$), 且胚胎种植率及临床妊娠率均显著高于既往 D3 移植组($P < 0.05$)。

3 讨论

在体外培养过程中胚胎发育的每一个阶段均可出现发育阻滞, 因此通过延长胚胎体外培养时间从 D2 到 D3 甚至到 D5 可以通过胚胎的发育速度及形态学挑选出发育潜能更高的胚胎, 改善临床结局^[4-5]。但多数胚胎在体外培养环境下处于应激状态, 只有那些适应该环境的胚胎能够存活和生长, 延长胚胎体外培养时间将增加胚胎损耗, 只有部分 D3 优质卵裂胚(30% ~ 50%) 可形成囊胚, 因未获得囊胚或囊胚质量差导致的周期取消率增高, 故囊胚移植多适用于 D3 优质卵裂胚较多的患者^[6-7]。鉴于胚胎发育阻滞多发生于 8 细胞前阶段, 延长体外培养时间有助于选择发育潜能更高的胚胎, 且受精后 D3 移植胚胎较 D2 更接近胚胎进入子宫的生理时间, 获得更高的种植率, 故目前多数学者在新鲜周期仍选择在受精后 D3 进行胚胎移植^[1-8]。

由于人类胚胎在 8 细胞以前的卵裂取决于卵细胞的质量并受母方贮存信息的控制, 而 8 细胞之后胚胎本身的基因组转录被激活, 控制胚胎的进一步发育, 因此, 无论是 D2 还是 D3 胚胎, 胚胎基因组都尚未完全启动, D3 胚胎优化筛选效果值得怀疑。有研究^[9-11]显示, 延长培养时间从 D2 至 D3, 胚胎评分明显降低, 且多核卵裂球明显增多, 而多核卵裂球的染色体异常率明显增高, 种植率明显降低。另有研究^[12-14]显示, D3 移植虽有更高的妊娠率, 但流产率也相应增加, 其活产率低于 D2 移植组, 且将体外

发育欠佳的胚胎提前移入体内可改善其发育潜能, 表明子宫才是维持胚胎生长发育的最佳环境^[9]。此外, 体外培养时间与胚胎透明带、表观遗传学及新生儿性别比的改变密切相关^[15]。

在 IVF 促排卵过程中常由于高龄、卵巢低储备及反应性降低、促排卵方案或 Gn 剂量不足等因素导致获卵数较少, 按国家卫生部 176 号文件(2003) 限定的胚胎移植数, 在 D2 移植后并无多余胚胎可供进一步培养、筛选。体外培养环境与体内环境尚存在某些未知的差异, 延长胚胎体外培养时间将降低胚胎的发育潜能, 增加胚胎损耗率, 减少可移植胚胎数^[16]。此外, 在胚胎体外培养过程中, 胚胎对 pH 值、温度、渗透压、电解质、必需氨基酸、微量元素、能源物质及多种生长因子十分敏感, 任何细微的变化都可能导致胚胎损伤, 影响其发育潜能, 增加胚胎损耗率。因此, 延长胚胎体外培养时间并不适用于所有患者, 尤其获卵数及可利用胚胎少的患者^[16]。Shen et al^[7]的结果表明, 对于 <40 岁且 D2 移植后无剩余胚胎的患者, 选择 D2 移植可降低流产率, 提高持续妊娠率。Bahceci et al^[16]的 RCT 研究也证实, 对于卵巢低反应患者, 选择 D2 移植其临床妊娠率显著高于 D3 移植。本研究结果也证实, 对 <40 岁且 D2 无多余可利用胚胎的患者(≤ 3 枚) 选择 D2 进行全胚胎移植, 在卵巢储备及获卵数均显著低于 D3 移植组的条件下, 显著降低了 ECR, 获得了与 D3 移植相似的临床结局, 再次证实延长胚胎体外培养时间, 增加了胚胎损耗, 并不能改善临床结局。通过对 D2 周期与既往 D3 移植周期自身配对研究, 本研究显示 D2 移植周期在获卵数显著低于既往 D3 移植周期的条件下, ECR 及周期取消率均显著降低,

而胚胎种植率和临床妊娠率显著增高,表明对于 D2 无多余可移植胚胎(≤3 枚胚胎)的患者,选择 D2 全胚胎移植,可降低 ECR 及周期取消率,获得更好的临床结局。

参考文献

- [1] 马丽影,李朋粉,项云改,等. D2/D3 移植对体外受精-胚胎移植周期妊娠结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2012, 21(2): 154-7.
- [2] Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment[J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(8): 309-13.
- [3] 刘敬,贾研,耿丽红,等. 体外受精-胚胎移植技术中高龄妇女的移植策略的选择[J]. 生殖医学杂志, 2013, 22(6): 426-9.
- [4] Blake D A, Proctor M, Johnson N P. The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a cochrane review[J]. Hum Reprod, 2004, 19(4): 795-807.
- [5] 偶健,王玮,马燕琳,等. 囊胚培养在植入前遗传学诊断中的价值[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(3): 312-7.
- [6] Behr B, Pool T B, Milki A A, et al. Preliminary clinical experience with human blastocyst development *in vitro* without co-culture[J]. Hum Reprod, 1999, 14(2): 454-7.
- [7] Shen S, Rosen M P, Dobson A T, et al. Day 2 transfer improves pregnancy outcome in *in vitro* fertilization cycles with few available embryos[J]. Fertil Steril, 2006, 86(1): 44-50.
- [8] 陈京京,姜宏,李攀. 冻融周期囊胚移植的临床价值[J]. 重庆医学, 2014, 43(34): 4610-2.
- [9] Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, et al. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF[J]. Hum Reprod, 2001, 16(3): 476-80.
- [10] Pickering S J, Taylor A, Johnson M H, et al. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos[J]. Hum Reprod, 1995, 10(7): 1912-22.
- [11] Pelinck M J, De Vos M, Dekens M, et al. Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 1998, 13(4): 960-3.
- [12] Gunby J L, Daya S, Olive D, et al. Day three versus day two embryo transfer following *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2004(2): CD004378.
- [13] Mahdavi A, Qashqaei A, Aleyasin A, et al. Embryo transfer in days 2 to 4 following intracytoplasmic sperm injection: a prospective cohort study[J]. Med J Islam Repub Iran, 2015, 29: 262.
- [14] 顾亦凡,陆长富,龚斐,等. 人类发育欠佳胚胎在卵裂期及囊胚期移植后的临床结局比较[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(17): 67-71.
- [15] 马黔红. 辅助生殖技术的新进展[J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9(1): 4-7.
- [16] Bahceci M, Ulug U, Ciray H N, et al. Efficiency of changing the embryo transfer time from day 3 to day 2 among women with poor ovarian response: a prospective randomized trial[J]. Fertil Steril, 2006, 86(1): 81-5.
- [17] Behr B, Wang H. Effects of culture conditions on IVF outcome[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004, 115(Suppl 1): S72-6.

Strategy of embryo transfer for the patients with low available embryos

Wen Qin, Jiang Hong, Zhou Yun, et al

(Clinical College of People's Liberation Army Affiliated to Anhui Medical University;
Reproductive Medicine Center, 105th Hospital of People's Liberation Army, Hefei 230031)

Abstract To investigate the clinical value of post-fertilization day two(D2) embryo transfer for the patients with low available embryo. The data of 191 *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection(IVF/ICSI) cycles in reproductive medicine center from Dec, with the enrolled criteria of the female's age less than 40 years old and available embryos number≤3. The clinical outcomes of D2 embryo transfer (99 cycles) and day three(D3) (92 cycles) embryo transfer as well as D2 embryo transfer with its previous D3 embryo transfer were compared. With significant increase in the number of eggs and consumption rate of embryo in D2 group were significantly lower compared with those in D3 group ($P < 0.05$). The optimal embryo rate was significantly higher than that of the D3 group ($P < 0.05$). There were no significant difference in embryo implantation rate, clinical pregnancy rate, early abortion rate and ectopic pregnancy rate between D2 and D3 groups. By self-control, it was found that consumption rate of embryo and cycle cancellation rate in D2 transfer cycles were significantly lower than previous D3 transfer cycles ($P < 0.05$), while the embryo implantation rate and clinical pregnancy rate in D2 transfer cycles were significantly higher compared with previous D3 transfer cycles($P < 0.05$). For low-availability embryos, selecting D2 for complete embryo transfer is a valuable alternative strategy.

Key words *in vitro* fertilization and embryo transfer; embryo consumption rate; clinical outcomes