两种助孕方式下 D5、D6 囊胚行冻融移植后妊娠结局的比较

冷 芹, 周 平, 陈蓓丽, 章志国, 陈大蔚, 曹云霞, 魏兆莲

摘要 目的 比较体外受精-胚胎移植(IVF-ET)与胚胎植入前遗传学诊断或胚胎植入前遗传学筛查(PGD/PGS)周期中 D5、D6 囊胚形成情况及妊娠结局,同时探究 D5、D6 囊胚的发育潜能及两种助孕方式的优劣。方法 回顾性分析行 IVF-ET 助孕的 138 个周期及 PGD/PGS 筛查助孕的 148 个周期,按移植胚胎的发育天数分为 IVF-D5 组、IVF-D6 组、PGD/PGS-D5 组和 PGD/PGS-D6 组,分析比较各组的一般情况、囊胚形成情况及冻融移植后的种植率、临床妊娠率、流产率等。结果 IVF-D5 组与 IVF-D6 组相比、PGD/PGS-D5 组与 PGD/PGS-D6 组相比, D5 组囊胚形成率、优质胚胎率、种植率、临床妊娠率均高于 D6 组($P < 0.05$); PGD/PGS 周期中 D5 组整倍体囊胚检出率高于 D6 组($P < 0.05$); IVF-D5 组与 PGD/PGS-D5 组相比、IVF-D6 组与 PGD/PGS-D6 组相比,两组间的囊胚形成率、优质胚胎率、种植率及临床妊娠率均差异无统计学意义。结论 两种助孕方式下冻融移植 D5 囊胚比 D6 囊胚可获得较好的临床妊娠结局;与 IVF 相比, PGD/PGS 并未明显改善患者的妊娠结局。

关键词 胚胎植入前遗传学诊断; 胚胎植入前遗传学筛查; 冻融胚胎移植; 囊胚时期; 妊娠结局

中图分类号 R 321.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1864-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.025

随着辅助生殖技术的发展,胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)或胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)为染色体异常、复发性流产及反复种植失败等不孕症患者提供了可行的治疗方案。对胚胎进行 PGD/PGS 选择整倍体胚胎移植,可降低辅助生殖技术中因非整倍体囊胚植入而发生的种植失败、早期流产等^[1]。然而,越来越多的研究^[2]提示 PGD/PGS 能否改善妊娠结局存在较多的争议。该文分别比较外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-

embryo transfer, IVF-ET)与 PGD/PGS 周期中 D5、D6 胚胎形成情况及移植后的妊娠情况,然后再对两种助孕方式的妊娠结局进行比较,以此探究 D5、D6 胚胎的发育潜能及两种助孕方式的优劣。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2014 年 1 月~2016 年 5 月在安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖中心因输卵管因素行 IVF-ET 治疗的 138 个周期,有指征行 PGD/PGS 助孕的 148 个周期,其中 PGD 周期中女方染色体异常者 43 例,男方染色体异常者 60 例,男女双方均染色体异常共 8 例;PGS 周期中反复种植失败 6 例,不明原因的复发性流产 14 例。排除了生殖道畸形或其他免疫因素导致的流产、明确诊断的单基因遗传病等患者。所纳入患者在一个周期只移植一枚胚胎,本周期有多枚可移植胚胎者,选取优质胚胎进行移植,剩余胚胎给予冷冻保存。按助孕方式及移植胚胎的发育天数分组:IVF-D5 组、IVF-D6 组、PGD/PGS-D5 组、PGD/PGS-D6 组。所有患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床治疗方案 本中心采用常规的控制性促排卵方案,然后阴道超声监测卵泡的发育情况,当优势卵泡中有 1 个 $\phi \geq 18$ mm 或 2 个卵泡 $\phi \geq 17$ mm 或 3 个卵泡 $\phi \geq 16$ mm 时,则在当晚注射人绒毛膜促性腺激素 10 000 IU,36 h 左右在阴道 B 超引导下取卵。

1.2.2 囊胚活检与微阵列比较基因组杂交技术检测 对 PGD/PGS 周期者,当培养至第 5 天或第 6 天的胚胎发育成囊胚形成时,抽取每个囊胚 3~8 个滋养层细胞进行活检,对每个活检的囊胚进行玻璃化冷冻。本中心对每一个活检到的滋养层细胞进行微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization, aCGH)检测,先进行细胞的全基因组扩增,再对扩增产物进行基因芯片杂交,最后再扫描分析获得每个细胞的所有染色体数目及每条染色体全长情况^[3]。

1.2.3 囊胚选择及评分 胚胎等级评分按 Gardner

2017-07-18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1708085MH214)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心,合肥 230022

作者简介:冷 芹,女,硕士研究生;

魏兆莲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: Weizhaolian_1@126.com

表1 4组患者一般临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

项目	IVF-ET 周期		PGD/PGS 周期		F 值	P 值
	D5 组(n=89)	D6 组(n=49)	D5 组(n=110)	D6 组(n=38)		
平均年龄(岁)	27.5 ± 3.2	28.9 ± 3.4	28.7 ± 3.9	29.2 ± 4.4	3.069	0.280
体质量指数(kg/m ²)	22.38 ± 2.59	22.67 ± 3.16	22.79 ± 3.23	22.11 ± 2.97	0.640	0.590
不孕年限(年)	3.0 ± 1.8	3.3 ± 2.5	2.7 ± 1.9	2.9 ± 2.6	0.984	0.401
基础促卵泡激素值(U/ml)	7.03 ± 2.10	6.88 ± 1.42	6.29 ± 1.52	6.41 ± 1.62	2.812	0.400
获卵数(枚)	16.3 ± 8.2	14.1 ± 5.2	17.5 ± 8.1	18.2 ± 7.3	10.886	0.105
移植日内膜厚度(mm)	10.85 ± 1.89	10.33 ± 1.42	10.81 ± 1.75	10.33 ± 1.58	1.682	0.171

标准^[4], 主要根据囊胚扩张等级和孵出程度、内细胞团、滋养外胚层细胞三个主要方面评分。根据囊腔扩张孵化将囊胚分为1~6个等级:1级:囊腔体积 < 胚胎总体积的1/2;2级:囊腔体积 ≥ 胚胎总体积的1/2;3级:囊腔占满胚胎的总体积;4级:囊腔充满整个胚胎, 胚胎体积变大, 透明带变薄;5级:正在孵出的囊胚, 滋养层从透明带中逸出;6级:囊胚完全从透明带中孵出。对3~6期的囊胚, 内细胞团评分:A级细胞数量多且排列紧密;B级细胞数量较少且排列松散;C级为细胞数量极少。滋养外胚层细胞评分:A级细胞数量多且结构致密;B级细胞数量不多且结构稀疏;C级细胞数目很少。≥3BB定义为优质胚胎。如有多个囊胚可供移植, 则挑选优质囊胚予以移植。PGD/PGS移植周期中仅移植经aCGH活检后的整倍体囊胚, 但不排除移植嵌合体胚胎的可能。

1.2.4 移植周期内膜准备 自然周期:月经周期的10~12d阴道超声下监测卵泡发育, 当内膜厚度 ≥ 8mm时, 用或不用人绒毛膜促性腺激素诱导排卵, 监测到排卵后每日使用黄体酮20mg肌内注射, 于排卵后第5天冻融囊胚移植。人工周期:于月经2~5d起口服补佳乐(广州拜耳医药公司), 阴道超声监测内膜厚度 ≥ 8mm时每日加用黄体酮60mg转化内膜, 转化日5d后予以冻融胚胎移植。

1.2.5 妊娠结局 移植后14d抽血测人绒毛膜促性腺激素阳性者为生化妊娠, 移植后35d在阴道B超下见一孕囊及原胚芽和原始心管搏动者为临床妊娠。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组或多组间均数的差异性检验用t检验或方差分析。计数资料采用构成比(%)表示, 采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组患者一般临床资料比较

D5移植组共89个周期, D6移植组共49个周期, 年龄21~34岁, 不孕年限最长者14年;PGD/PGS周期中D5移植组共110个周期, D6移植组共38个周期, 年龄24~42岁, 不孕年限最长者14年。比较各组的平均年龄、体质量指数、不孕年限、基础促卵泡激素值、获卵数、移植日的内膜厚度差异无统计学意义。见表1。

2.2 IVF组D5、D6囊胚情况及妊娠结局比较

IVF周期中D5组的囊胚形成率、优质胚胎率均高于D6组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。所有纳入研究者未有双胞胎妊娠者。D5组的种植率、临床妊娠率和生化妊娠率高于D6组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组的早期流产率差异无统计学意义。见表2。

表2 IVF周期D5、D6囊胚情况及妊娠结局比较[n(%)]

项目	IVF-D5组	IVF-D6组	χ^2 值	P 值
	(n=89)	(n=49)		
囊胚形成率	523/1447(36.14)	722/1921(37.58)	16.276	0.029
优质胚胎率	512/523(97.89)	699/722(96.81)	53.791	<0.001
种植率	48/89(53.93)	53/110(48.18)	6.927	0.008
临床妊娠率	48/89(53.93)	53/110(48.18)	6.927	0.008
生化妊娠率	52/89(58.43)	60/110(54.55)	7.120	0.008
早期流产率	2/89(2.25)	9/11(8.18)	0.006	0.937

2.3 PGD/PGS组D5、D6囊胚活检情况及妊娠结局比较

经PGD/PGS后, D5组的囊胚形成率、优质胚胎率和整倍体胚胎检出率高于D6组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。D5组的种植率及临床妊娠率明显高于D6移植组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组的生化妊娠及早期流产率差异无统计学意义。见表3。

2.4 两种助孕方式下D5冻融移植囊胚情况及妊娠结局比较 D5冻融囊胚移植, IVF周期与PGD/PGS相比, 两组的囊胚形成率、优质胚胎率、种植率、临床妊娠率、生化妊娠率和早期流产率差异均无统计学意义。见表4。

2.5 两种助孕方式下D6冻融移植囊胚情况及妊

娠结局比较 D6 冻融囊胚移植 ,IVF 周期与 PGD/PGS 相比 ,两组的囊胚形成率、优质胚胎率、种植率、临床妊娠率、生化妊娠率和早期流产率均差异无统计学意义。见表 5。

表 3 PGD/PGS 周期 D5、D6 囊胚情况及妊娠结局比较 [n(%)]

项目	PGD/PGS-D5 组 (n=110)	PGD/PGS-D6 组 (n=38)	χ^2 值	P 值
囊胚形成率	722/1921 (37.58)	217/691 (31.40)	8.432	0.004
优质胚胎率	699/722 (96.81)	192/217 (88.48)	23.898	<0.001
整倍体囊胚率	266/722 (36.84)	74/217 (34.10)	0.000	0.046
种植率	53/110 (48.18)	11/38 (28.95)	4.257	0.039
临床妊娠率	53/110 (48.18)	11/38 (28.95)	4.257	0.039
生化妊娠率	60/110 (54.55)	16/38 (42.11)	1.750	0.186
早期流产率	9/110 (8.18)	2/38 (5.26)	0.350	0.554

表 4 两种助孕方式 D5 冻融移植囊胚情况及妊娠结局比较 [n(%)]

项目	IVF-D5 组 (n=89)	PGD/PGS-D5 组 (n=110)	χ^2 值	P 值
囊胚形成率	523/1447 (36.14)	722/1921 (37.58)	0.735	0.391
优质胚胎率	512/523 (97.89)	699/722 (96.81)	1.338	0.247
种植率	48/89 (53.93)	53/110 (48.18)	0.651	0.420
临床妊娠率	48/89 (53.93)	53/110 (48.18)	0.651	0.420
生化妊娠率	52/89 (58.43)	60/110 (54.55)	0.301	0.583
早期流产率	2/89 (2.25)	9/110 (8.18)	3.318	0.068

表 5 两种助孕方式 D6 冻融移植囊胚情况及妊娠结局比较 [n(%)]

项目	IVF-D6 组 (n=49)	PGD/PGS-D6 组 (n=38)	χ^2 值	P 值
囊胚形成率	189/691 (27.35)	217/691 (31.40)	2.734	0.819
优质胚胎率	157/189 (83.07)	192/217 (88.48)	2.450	0.372
种植率	15/49 (30.61)	11/38 (28.95)	0.028	0.866
临床妊娠率	15/49 (30.61)	11/38 (28.95)	0.028	0.866
生化妊娠率	17/49 (34.69)	16/38 (42.11)	0.499	0.480
早期流产率	1/49 (2.04)	2/38 (5.26)	0.667	0.414

3 讨论

目前 ,PGD/PGS 已广泛应用于辅助生殖领域。随着 PGD/PGS 的发展 ,有较多的文献^[5] 阐述了不同活检时间、活检的技术、活检部位对其妊娠结局的影响 ,然而对于活检后不同时期冻融移植的妊娠结局却少有文献报道。本文对不同助孕方式及不同囊胚时期胚胎进行分组 ,分析比较各组间的胚胎情况及冻融移植后的妊娠结局。

本文两种助孕方式下 D5 囊胚形成率均优于 D6 ,这与多数研究结果^[6] 一致 ,其原因可能是随着培养时间的增加 ,培养环境及培养液的变化导致胚

胎质量变差。两种助孕方式下每一个移植周期均为囊胚移植 ,PGD/PGS 周期中在体外受精后的第 5 天或第 6 天取滋养外胚层 3~8 个细胞进行检测 ,囊胚期活检保证了胎儿内胚层细胞的完整性 ,所以取囊胚期滋养外胚层细胞活检对胚胎的发育潜能影响较小 ,加上囊胚时期的胚胎发育与子宫内膜有更好的同步性 ,所以囊胚期胚胎比卵裂期胚胎移植有更好的妊娠结局^[7]。

PGD/PGS 周期中每个囊胚均行 aCGH 检测 ,此技术具有自动化、高通量、高密度探针的特点 ,其可以显示小片段的基因组微失衡^[8] ,在获取胚胎滋养外胚层细胞 24 h 内可完成检测 ,而且一次性检测 24 条染色体的非整倍体数目及染色体重复或缺失的异常^[9]。囊胚期胚胎经 aCGH 后 ,D5 组整倍体囊胚检出率明显高于 D6 组 ,且差异有统计学意义 ,原因可能是培养时间延长 ,导致胚胎细胞 DNA 的损伤^[6] ,且整倍体胚胎在优质胚胎中的检出率较高 ,这与 Al-farawati et al^[10] 研究结果一致 ;然而 Capalbo et al^[11] 的研究结果表明 D5 囊胚的非整倍体检出率低于 D6 囊胚 ,但差异无统计学意义 ,这与本研究结果不同。

本研究中两种助孕方式下 D5 组种植率及临床妊娠率均高于 D6 组 ,这与 Marek et al^[12] 的研究结果一致。推测可能原因有 :① 发育到 D5 囊胚即使继续培养到 D6 ,其在发育时间上的滞后可能导致了细胞质量的改变 ;② 第 5 天子宫内膜对 D5 囊胚有更好的内膜容受性 ;③ 随着培养时间增加 ,细胞发育的变化影响了细胞玻璃化冷冻后的效果^[13]。在 PGD/PGS 周期中由于 D5 囊胚整倍体检出率高 ,首选 D5 胚胎移植 ,也增加了 D5 冻胚移植的种植率及临床妊娠率。

然而不管移植囊胚为第几天 ,都有嵌合体整倍体移植后出现临床妊娠者 ,其中 D5 组临床妊娠中有 5 例嵌合体整倍体囊胚移植 ,D6 组中有 2 例为嵌合体整倍体移植。Greco et al^[14] 在研究 18 例行嵌合体胚胎移植的患者中 ,有 6 例获临床妊娠 ,且分娩后检测胎儿绒毛染色体 ,结果均为正常核型。在早期人类胚胎发育过程中出现嵌合体是一种常见现象^[15] ,囊胚时期较分裂胚时期嵌合体出现概率较低 ,但是即使是囊胚评分较高的优质胚胎仍有嵌合体的可能。目前 ,通过 PGD/PGS 检出后的嵌合体胚胎是否可以移植及移植后是否影响妊娠率及活产率仍有争议。

参考文献

[1] Handyside A H. 24-chromosome copy number analysis:a compari-

- son of available technologies [J]. *Fertil Steril* 2013 ,100(3) :595 -602.
- [2] Lee H L ,McCulloh D H ,Hodes-Wertz B ,et al. *In vitro* fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43 [J]. *J Assist Reprod Genet* , 2015 ,32(3) :435 -44.
- [3] 陈大蔚 ,章志国 ,魏兆莲 等. 反复种植失败患者经植入前遗传学筛查获妊娠的研究 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)* 2015 , 6(9) :905 -8.
- [4] Gardner D K ,Schoolcraft W B ,Wagley L ,et al. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in vitro* fertilization [J]. *Hum Reprod* ,1998 ,13(12) :3434 -40.
- [5] Fiorentino F ,Bono S ,Biricik A ,et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles [J]. *Hum Reprod* 2014 ,29(12) :2802 -13.
- [6] Kadar A ,Agarwal A ,Abdelrazik H ,et al. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing [J]. *Fertil Steril* 2009 ,91(5 Suppl) :2087 -94.
- [7] Mangalraj A M ,Muthukumar K ,Aleyamma T ,et al. Blastocyst stage transfer vs Cleavage stage transfer [J]. *Hun Reprod Sci* , 2009 ,2(1) :23 -6.
- [8] 汪 静 ,郭 柳 ,蔡春泉 等. 应用微阵列比较基因组杂交技术探讨颅部神经管畸形与基因组拷贝数变异的相关性 [J]. *安徽医科大学学报* 2016 ,51(5) :686 -90.
- [9] 黄伟伟 ,卢 建 ,董云巧 等. 应用 aCGH 技术建立胚胎植入前遗传学筛查 [J]. *中国产前诊断杂志 (电子版)* 2016 ,3(8) :21 -4.
- [10] Alfarawati S ,Fragouli E ,Colls P ,et al. The relationship between blastocyst morphology ,chromosomal abnormality and embryo gender [J]. *Fertil Steril* 2011 ,95(2) :520 -4.
- [11] Capalbo A ,Rienzi L ,Cimadomo D ,et al. Correlation between standard blastocyst morphology ,euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts [J]. *Hum Reprod* 2014 ,29(6) :1173 -81.
- [12] Marek D M ,Langley M T ,McKean C ,et al. Frozen embryo transfer (FET) of day 5 blastocyst embryos compared to transfer of day 6 blastocyst embryos [J]. *Fertil Steril* 2000 ,74 :S52 -3.
- [13] Huang B ,Hu D ,Qian K ,et al. Is frozen embryo transfer cycle associated with a significantly lower incidence of ectopic pregnancy? An analysis of more than 30 000 cycles [J]. *Fertility Steril* 2014 , 102(5) :1345 -9.
- [14] Greco E ,Minasi M G ,Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of Mosaic aneuploid blastocysts [J]. *N Engl J Med* , 2015 ,373(21) : 2089 -90.
- [15] Zheng H ,Jin H ,Liu L ,et al. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos [J]. *Mol Cytogenet* 2015 ,8 :38.

Comparison of pregnancy outcome after D5 and D6 blastocysts under freeze-thawing in two kinds of ART

Leng Qin ,Zhou Ping ,Chen Beili ,et al

(*Reproductive Medicine Center ,Dept of Obstetrics and Gynecology ,
The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022*)

Abstract Objective To compare the embryogenesis and the outcome of pregnancy about D5 and D6 blastocyst of *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) and preimplantation genetic diagnosis/preimplantation genetic screening (PGD/PGS) cycles ,meanwhile explore the development potential of D5 and D6 blastocysts and the advantages and disadvantages of the two methods. **Methods** 138 cycles of *in vitro* fertilization-embryo transfer and 148 cycles of preimplantation genetic diagnosis/preimplantation genetic screening were analysed retrospectively. According to the development of transplanted embryos ,the patients were divided into four groups: IVF-D5 group ,IVF-D6 group ,PGD/PGS-D5 group and PGD/PGS-D6 group. The general situation of each group ,the formation of blastocyst and the implantation rate after freeze-thawing ,clinical pregnancy rate ,abortion rate were analysed. **Results** Compared with IVF-D6 group ,PGD/PGS-D6 group ,IVF-D5 group and PGD/PGS-D5 group had higher blastocyst formation rate ,high quality embryo rate ,implantation rate and clinical pregnancy rate ($P < 0.05$). The detection rate of euploid blastocysts in D5 group was higher than that in D6 group in preimplantation genetic diagnosis/preimplantation genetic screening cycles ($P < 0.05$) ,and there was no significant difference in blastocyst formation rate ,high quality embryo rate ,implantation rate and clinical pregnancy rate in each groups. **Conclusion** D5 blastocysts are able to obtain better clinical outcomes than D6 blastocysts under two kinds feeding methods. Compared with IVF ,PGD/PGS don't significantly improve the pregnancy outcome.

Key words preimplantation genetic diagnosis; preimplantation genetic screening; freeze-thawed embryo transfer; blastocyst period; pregnancy outcomes