

·临床研究·

## 不同受精方式对第六天囊胚解冻移植周期妊娠结局的影响

刘燕, 王辉田, 李涛

(中山大学附属第三医院生殖中心, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】比较常规体外受精(IVF)和卵胞质内单精子注射(ICSI)两种不同授精方式对解冻移植第六天(D6)囊胚患者妊娠结局的影响。【方法】回顾性队列研究分析中山大学附属第三医院生殖中心2018年1月至2020年4月期间解冻移植第六天囊胚移植患者的临床资料,按受精方式分为常规IVF组(446例)和ICSI受精组(200例)。按是否有第五天(D5)囊胚移植史,分为仅有D6囊胚冷冻及移植的患者,以及有D5囊胚移植史的患者。比较两组患者基本资料、囊胚质量及妊娠结局。【结果】IVF组和ICSI组患者BMI,不孕年限,基础FSH差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。ICSI组患者年龄小于IVF组患者,原发性不孕的比例高于常规IVF组,获卵数和正常受精卵子数高于常规IVF受精组( $P < 0.001$ )。常规IVF组五期和六期囊胚比例高于ICSI组(21.6% vs. 3.14%,  $P < 0.001$ )。ICSI组ICM评分为A级的囊胚高于IVF组(23.8% vs. 14.3%,  $P = 0.01$ )。ICSI组HCG阳性率和临床妊娠率均高于IVF组(65.5% vs. 48.4%,  $P < 0.001$ ; 56% vs. 41.3%,  $P = 0.001$ ),ICSI组胚胎种植率和活产率也高于常规IVF组(43.8% vs. 30.9%,  $P < 0.001$ ; 43.0% vs. 31.8%,  $P = 0.006$ )。校正两组间年龄、获卵数等影响因素后,ICSI组临床妊娠率仍高于常规IVF组(OR: 1.590, 95% CI: 1.030, 2.455,  $P = 0.036$ )。ICSI组出生婴儿体质量低于IVF组( $P = 0.016$ ),早产率、性别比与分娩方式在两组间差异无统计学意义。【结论】ICSI受精的D6囊胚解冻移植后的临床妊娠率高于常规IVF受精的D6囊胚,活产率有升高的趋势,可能与IVF与ICSI病人导致囊胚发育慢的因素不同有关。ICSI受精的D6囊胚解冻移植后相对好的妊娠结局,可在一定程度上弥补ICSI周期囊胚发育相对较慢导致的妊娠结局的差异。

**关键词:**第6天囊胚;体外受精-胚胎移植;卵胞质内单精子注射;妊娠率;活产率

中图分类号:R714.8

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)04-0704-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0422

## Effect of Insemination Methods on Pregnancy Outcomes of Day 6 Blastocyst Transfer in Frozen Cycles

LIU Yan, WANG Hui-tian, LI Tao

(Fertility Center, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: LI Tao; E-mail: ltiao@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To compare the effects of two different insemination methods, conventional in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), on pregnancy outcomes in patients with frozen-thawed D6 (day 6) blastocyst transfer.【Methods】A retrospective cohort study was conducted to analyze the clinical data of patients with thawed D6 blastocyst transfer between January 2018 and April 2020 at the Fertility Center of the Third Hospital of Sun Yat-sen University, divided into conventional IVF group (446 cycles) and ICSI fertilization group (200 cycles) according to the fertilization method. Patients were divided into those with a history of D5 (day 5) blastocyst transfer and those without. The patients' general characteristics, blastocyst quality, and pregnancy outcomes of the two groups were compared.【Results】BMI, years of infertility, and basal FSH were not statistically significant in the IVF and ICSI groups ( $P >$

收稿日期:2023-02-14

作者简介:刘燕,研究方向:生殖医学,E-mail:lanfu12@126.com;李涛,通信作者,副研究员,研究方向:生殖医学,E-mail:ltiao@mail.sysu.edu.cn

0.05). Regardless of the history of D5 transfer, patients in the ICSI group were younger than those in the IVF group ( $P < 0.001$ ), the proportion of primary infertility was significantly higher in the ICSI group ( $P < 0.001$ ), and the number of oocytes obtained and the number of normally fertilized oocytes in the ICSI group were higher than those in the conventional IVF fertilization group ( $P < 0.001$ ). The proportion of stage V and VI blastocysts was significantly higher in the conventional IVF group than in the ICSI group (21.6 % vs. 3.14 %,  $P < 0.001$ ). High-quality blastocysts with an ICM score of A were significantly higher in the ICSI group than in the IVF group (23.8 % vs. 14.3 %,  $P = 0.01$ ). The HCG-positive and clinical pregnancy rates were significantly higher in the ICSI group than in the IVF group (65.5 % vs. 48.4 %,  $P < 0.001$ ; 56 % vs. 41.3 %,  $P = 0.001$ ), and embryo implantation and live birth rates were also higher in the ICSI group than in the conventional IVF group (43.8 % vs. 30.9 %,  $P < 0.001$ ; 43.0 % vs. 31.8 %,  $P = 0.006$ ). After correcting for age and number of oocytes obtained between the two groups, the clinical pregnancy rate was still significantly higher in the ICSI group than in the conventional IVF group (OR: 1.590, 95 % CI: 1.030, 2.455,  $P = 0.036$ ). Infant birth weight was lower in the ICSI group than in the IVF group ( $P = 0.016$ ), and the differences in preterm birth rate, sex ratio, and mode of delivery were not statistically significant between the two groups.【Conclusions】 Clinical pregnancy and live birth rates after thawing and transfer of D6 blastocysts fertilized by ICSI are higher than those of D6 blastocysts fertilized by conventional IVF, which may be related to the different factors contributing to the slow development of blastocysts in patients who received different fertilization methods. The relatively good pregnancy outcome after the transfer of thawed D6 blastocysts fertilized by ICSI may compensate to some extent for the difference in pregnancy outcome due to the relatively slow blastocyst development and a relatively higher proportion of D6 blastocysts after ICSI fertilization in male infertility patients.

**Key words:** D6 blastocyst; in vitro fertilization-embryo transfer; intracytoplasmic sperm injection; clinical pregnancy rate; live birth rate

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(4): 704-711]

人类配子体外受精(in vitro fertilization, IVF)方式分为常规IVF受精和单精子卵胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)受精。两种受精方式各有利弊。近年来ICSI受精在国外的应用有逐渐增加的趋势,包括用于非男性不孕的病人,尤其在欧洲和美国<sup>[1-2]</sup>,这促使我们进一步客观评价受精方式对胚胎发育和妊娠结局的影响。不同受精方式对胚胎的发育和妊娠结局的影响在临床上一直存在争议<sup>[1-6]</sup>。早期的研究主要比较不同受精方式对卵裂期胚胎移植结局的影响。由于人类胚胎自身的基因组在四至八细胞阶段之后才开始激活,因此囊胚的发育更能反映胚胎真正的发育潜能;另一方面,近年来囊胚培养和单囊胚移植在临床上得到广泛应用,不同受精方式对囊胚形成及囊胚移植妊娠结局的影响受到较多关注。2001年Miller报道男性不孕因素和/或ICSI受精影响囊胚发育和囊胚质量<sup>[3]</sup>。2005年Landuyt比较了行一半IVF一半ICSI的病病人的囊胚发育,发现ICSI受精并不影响囊胚发育<sup>[4]</sup>。2019年Stimpfel在轻度和中度畸形精子症的病人中比较不同受精方式对囊胚发

育的影响,发现常规IVF受精可获得更好的囊胚形成率,囊胚质量更好<sup>[5]</sup>。这些研究主要比较总的第五天(day5, D5)和第六天(day 6, D6)的囊胚形成率,和/或可用囊胚率,未单独分析D5、D6囊胚的妊娠结局;此外对囊胚形成的定义,以及可用囊胚/优质囊胚的标准也存在不同程度的差异。近年来时差技术在IVF领域得到广泛的应用<sup>[6-7]</sup>。较多研究利用时差技术详细分析不同外界因素对囊胚体外发育速度的影响。Cruz等在接受供卵的病人中比较了常规IVF受精和ICSI受精获得的囊胚的发育速度,发现ICSI囊胚发育较慢,但差异无统计学意义<sup>[8]</sup>。Bodri等比较了500枚在时差培养箱中培养的囊胚的发育情况,发现ICSI受精的囊胚的发育速度显著慢于IVF受精的囊胚,平均比IVF受精的囊胚慢3.2到5.7 h,差异主要体现在胚胎体外发育后期,即囊胚发育阶段<sup>[9]</sup>,在临床上囊胚发育相对较慢主要表现为D5囊胚的形成率相对较低,D6囊胚比例升高,这种D5/D6囊胚比例的变化可能影响ICSI病人的妊娠结局。已有的研究表明发育快的D5囊胚比发育慢的D6囊胚具有更高的发育和种

植潜能,及更好的妊娠结局<sup>[10]</sup>。目前有关不同受精方式对囊胚移植后妊娠结局的研究主要涉及新鲜D5囊胚移植,比如Wang C等报道在反应好的病人中,ICSI受精影响囊胚形成率和可用胚胎率,但不影响新鲜D5囊胚移植周期的临床妊娠率和活婴出生率<sup>[11]</sup>。但是,仅比较D5囊胚移植的妊娠结局不能很好的反映ICSI周期囊胚发育相对较慢的特征<sup>[10]</sup>。由于D6囊胚发育滞后1 d,与子宫内膜发育不同步,极少新鲜移植。因此,本研究主要关注不同受精方式对解冻D6囊胚移植结局的影响。目前较少文章单独分析解冻D6囊胚的移植结局,对D6囊胚的发育潜能和妊娠结局的分析可以更全面地比较不同受精方式对IVF病人妊娠结局的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

本研究已取得中山大学附属第三医院生殖伦理委员会批准(中大附三医伦[2022]02—151—01),患者均签署知情同意。回顾性分析2018年1月至2020年4月在中山大学附属第三医院生殖中心行D6囊胚解冻移植的患者资料。纳入标准:①女方年龄 $\leq 42$ 岁;②FET移植为D6囊胚;③囊胚评分为三期囊胚及其以上级别。排除标准:有子宫畸形,子宫内膜异位症,子宫内膜炎等子宫病变的患者;以及年龄大于42者;IVF受精失败进行late ICSI者;行部分卵子ICSI受精的患者以及资料不齐的患者不纳入本研究。按受精方式分为常规IVF组和ICSI受精组。按是否仅有D5囊胚移植史,分为仅有D6囊胚冷冻及移植的患者,以及有D5囊胚移植史的患者。本研究共纳入646例解冻D6囊胚移植周期,其中IVF组446例,ICSI组200例。

### 1.2 研究方法

1.2.1 囊胚培养与评分 患者取卵日当天为第0天(D0),正常受精的卵子在G-1 plus培养液(Vitrolife,瑞典)中培养至第3天,根据胚胎卵裂球数目、卵裂球的大小均一性及碎片量对胚胎质量进行评分。经患者知情同意后转移到G-2 plus(Vitrolife,瑞典)培养液中继续培养至囊胚阶段(D5/D6),囊胚质量评估采用Gardner<sup>[12]</sup>评分法,对于D5评分在3BC及以下的囊胚则继续培养到D6,选取3BB及

以上级别的囊胚进行冷冻保存。

1.2.2 囊胚冷冻 所有囊胚冷冻前均进行激光辅助孵化皱缩。冷冻液采用商品化冷冻液套装,操作方法根据试剂盒(KITAZATO,日本)的标准操作程序,将囊胚放入ES(1液),计时10 min,然后移入VS(2液)中反复吹吸1 min,当还剩20 s左右时,左手拿载杆,右手用玻璃吸管将囊胚放在载杆叶片黑色标记的上方,用玻璃吸管吸走多余的液体,立即将载杆投入液氮中,整个过程需在60~90 s之内完成<sup>[13]</sup>。

1.2.3 囊胚解冻 使用商品化解冻液套装试剂盒(KITAZATO,日本)解冻D6囊胚。将囊胚从液氮中取出,立即置入1 mL预热至37℃的WS1液中,将载杆叶片在WS1液中轻轻晃动,直至胚胎脱离叶片,1 min后立即将胚胎转移到WS2液,计时3 min,接着转移至WS3,计时5 min,再转移至2个WS4孔中,各3 min。除WS1液外,其余步骤均在室温操作,即WS2,WS3,WS4<sup>[14]</sup>。

1.2.4 内膜准备方案 内膜准备方案分为自然周期和人工周期方案(HRT)。自然周期:于月经周期第10天开始B超监测排卵及内膜厚度,当卵泡直径 $> 14$  mm时,每天监测尿LH,同时监测血清LH、E2、P水平,当血LH值大于基础值2倍以上或者 $> 20$  U/L,则认为血LH出峰(D0),D6囊胚移植时间在LH峰值后的第5天(D5)<sup>[15]</sup>。

人工周期方案:从月经第3天开始,口服戊酸雌二醇2~8 mg/d,8~14 d后根据B超监测的内膜情况,调整剂量。如果内膜厚度小于8 mm,或者E2水平 $< 200$  pg/mL,添加芬吗通1~2 mg阴道给药。当内膜达到8 mm后,抽血查E2,当E2 $\geq 200$  pg/mL时每天肌注40~60 mg黄体酮,黄体酮注射第5天移植D6囊胚<sup>[16]</sup>。

1.2.5 妊娠判断及分析指标 囊胚移植后12 d,测定血HCG水平以判断是否妊娠。移植后5周行阴道B超检查,超声下见孕囊为临床妊娠。种植率=种植胚胎数/移植胚胎数 $\times 100\%$ ,临床妊娠率=临床妊娠周期数/移植周期数 $\times 100\%$ ,活产率=活产的分娩周期数/移植周期数 $\times 100\%$ ,流产率=(早期流产周期数+晚期流产周期数)/临床妊娠周期数 $\times 100\%$ 。异位妊娠率=异位妊娠周期数/临床妊娠周期数 $\times 100\%$ ;活产率=活产周期数/移

植周期数 $\times 100\%$ ;多胎妊娠率=多胎妊娠周期数/临床妊娠周期数 $\times 100\%$ 。小于37周分娩为早产,出生体质量低于2 500 g为低出生体质量儿。

### 1.3 统计学分析

使用SPSS23.0软件进行统计学分析。若计量资料服从正态分布,则使用 $(\bar{x}\pm s)$ 来表示,组间比较使用 $t$ 检验;若连续变量不服从正态分布,则使用中位数(四分位间距) $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示,组间比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验;计数资料采用率( $\%$ )来表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。采用logistic回归分析D6囊胚移植妊娠结局相关影响因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 纳入解冻D6囊胚周期的病人基本情况

本研究共纳入646例解冻D6囊胚移植周期,其中IVF组共446例解冻移植周期,ICSI组共200例解冻D6囊胚移植周期。在所有D6囊胚移植病人中,ICSI组病人相对年轻,在仅有D6囊胚可移植的病人中,ICSI组病人也相对年轻;ICSI组原发性不孕的比例更高,获卵数更多,正常受精卵子数更多, $P < 0.001$ 。但两组间BMI,不孕年限,基础FSH无差异(附表1,附表2)。

### 2.2 解冻移植D6囊胚质量

IVF组共解冻D6囊胚693枚,ICSI组解冻320枚D6囊胚,解冻的囊胚均可移植,复苏率100%。ICSI组囊胚发育速度仍然慢于IVF组,尤其是囊胚的扩张和TE孵出,即使ICSI组囊胚的透明带上已有穿刺的针孔,IVF组五期和六期比例仍然显著高于ICSI组(21.6%:3.14%),且三期囊胚率低于ICSI组(8.8%:13.1%), $P < 0.001$ 。内细胞团(inner cell mass, ICM)评分为A级的优质囊胚在ICSI组更高(23.8%:14.3%),C级更低, $P = 0.01$ ;IVF组滋养层细胞(trophectoderm, TE)TE评分为C级的囊胚比例高于ICSI组,但差异无统计学意义, $P = 0.074$ ,附表3。两组间总体4BB及以上的囊胚比例无差异(67.2%:67.2%),但ICSI组三期囊胚率高于IVF组。

### 2.3 解冻移植D6囊胚周期的妊娠结局和logistic回归分析

本研究中移植解冻D6囊胚得到较好的妊娠结

局,总体临床妊娠率为45.8%,活产率为35.3%,其中ICSI组HCG阳性率高于IVF组(65.5%:48.4%, $P < 0.001$ ),临床妊娠率高于IVF组(56%:41.3%, $P = 0.001$ ),胚胎种植率更高(43.8%:30.9%, $P < 0.001$ ),活产率也高于常规IVF组(43%:31.8%, $P = 0.006$ ),表1。校正两组间年龄、获卵数等影响因素后,ICSI组临床妊娠率仍显著高于常规IVF组,OR 95% CI为1.59(1.030, 2.455)。在亚组分层分析中,有D5囊胚移植史的病人中,结果与整体病人的趋势一致,ICSI组生化妊娠率显著高于常规IVF组,表2;仅有D6囊胚可移植的病人,我们发现ICSI组HCG阳性率,临床妊娠率,种植率和活产率均有高于常规IVF组的趋势,但经校正其他混杂因素后均无统计学意义(表3)。

两组间流产率均较高,22%左右,高于本中心D3卵裂胚移植及D5囊胚移植的流产率,但两组间无明显差异;本研究中解冻D6囊胚移植的异位妊娠率极低,IVF组中为0,ICSI组中仅1例发生异位妊娠。

### 2.4 解冻移植D6囊胚周期出生婴儿随访情况

本研究中解冻D6囊胚移植共有228名健康婴儿出生,两组均未发现出生婴儿畸形,出生体质量在两组间存在差异,ICSI组体质量较轻(表4, $P = 0.016$ ),早产率在两组间无差异,性别比与分娩方式在两组间无明显差异,表4。

## 3 讨论

本研究共纳入646例解冻D6囊胚移植周期,其中IVF组共446例解冻移植周期,ICSI组共200例解冻D6囊胚移植周期,两组间周期比例约为2.2:1,本中心IVF周期与ICSI周期之比约为5:1,因此,解冻D6囊胚移植周期中ICSI周期的占比明显增加,提示ICSI周期的囊胚发育相对较慢,D6囊胚的比例相对较高。本研究未分析不同受精方式对囊胚体外发育的影响,即比较两组之间的囊胚的发育速度,D5/D6囊胚形成率,可用囊胚率和优质囊胚率,主要目的是分析在ICSI病人中占比相对较高的D6囊胚移植后的妊娠结局。

比较ICSI和IVF的受精方式对妊娠结局的影

表1 Logistic 回归分析不同受精方式对所有D6囊胚解冻移植周期妊娠结局的影响

Table 1 Multivariate regression analysis of factors associated with the different fertilization methods on the pregnancy outcome of thawed D6 blastocyst transfer [n(%)]

Outcomes	IVF group(n = 446)	ICSI group(n = 200)	P	OR	OR 95% CI
HCG positivity rate	216/446(48.43)	131/200(65.50)	0.011	1.784	(1.143, 2.785)
Clinical pregnancy rate	184/446(41.26)	112/200(56.00)	0.036	1.59	(1.030, 2.455)
Live birth rate	142/446(31.84)	86/200(43.00)	0.201	1.34	(0.856, 2.099)
Multiple pregnancy	15/184(8.15)	15/112(13.39)	0.479	1.45	(0.518, 4.061)
Miscarriage	42/184(22.83)	25/112(22.32)	0.197	1.581	(0.789, 3.168)
Implantation rate	214/693(30.88)	140/320(43.75)	<0.001		
Ectopic pregnancy rate	0/184	1/112(0.89)			

表2 Logistic 回归分析不同授精方式对有D5移植史的病人D6囊胚FET的妊娠结局的影响

Table 2 Multivariate regression analysis of factors associated with the different fertilization methods on the pregnancy outcome of D6 FET with a history of D5 blastocyst transfer [n(%)]

Outcomes	IVF group(n = 212)	ICSI group(n = 78)	P	OR	OR 95% CI
HCG positivity rate	100/212(47.17)	54/78(69.23)	0.037	2.053	(1.045, 4.036)
Clinical pregnancy rate	83/212(39.15)	46/78(58.97)	0.095	1.745	(0.907, 3.355)
Live birth rate	64/212(30.19)	34/78(43.59)	0.542	1.232	(0.630, 2.408)
Multiple pregnancy	9/83(10.84)	7/46(15.21)	0.661	1.357	(0.347, 5.304)
Miscarriage	19/83(22.89)	11/46(23.91)	0.115	2.274	(0.818, 6.321)
Implantation rate	97/344(28.20)	55/110(50.00)	<0.001		
Ectopic pregnancy rate	0/83	1/46(2.17)			

表3 Logistic 回归分析不同授精方式对仅有D6囊胚解冻移植周期妊娠结局的影响

Table 3 Multivariate regression analysis of factors associated with the different fertilization methods on the pregnancy outcome of day 6 blastocyst transfer only [n(%)]

Outcomes	IVF group(n = 234)	ICSI group(n = 122)	P	OR	OR 95% CI
HCG positivity rate	117/234(50.00)	76/122(62.30)	0.116	1.639	(0.885, 3.036)
Clinical pregnancy rate	101/234(43.16)	66/122(54.10)	0.104	1.663	(0.901, 3.070)
Live birth rate	78/234(33.33)	52/122(42.62)	0.185	1.534	(0.814, 2.891)
Multiple pregnancy	6/234(2.56)	8/122(6.56)	0.142	3.520	(0.657, 18.869)
Miscarriage	23/101(22.77)	14/66(21.21)	0.565	1.328	(0.504, 3.497)
Implantation rate	116/349(33.66)	80/188(42.55)	0.032		
Ectopic pregnancy rate	0/101	0/66			

响时,精子质量可能是其中主要的影响因素。虽然严重少弱精或者睾丸精的精子可通过ICSI技术使卵子正常受精,但是到4~8细胞阶段、人胚胎基因组激活后,精子对胚胎发育的影响才开始显现<sup>[17]</sup>。

Balaban等的研究表明,严重男性因素不孕的ICSI患者囊胚形成率降低,提示男性不孕因素对囊胚体外发育存在负面影响<sup>[18]</sup>。但是,本研究的结果显示,在校正年龄、获卵数等因素的影响后,ICSI组发

表4 解冻移植D6囊胚周期出生婴儿情况  
Table 4 Neonatal outcomes of day 6 blastocyst transfer in frozen cycles [M (P<sub>25</sub> ~ P<sub>75</sub>), n(%)]

Variables	IVF	ICSI	$\chi^2$	P
Birth weight/g	3200(2750 ~ 3580)	3000(2550 ~ 3450)	2.405	0.016
Neonatal anomaly	0	0		
Preterm delivery	17/142(11.97)	10/86(11.63)	0.006	0.938
Sex ratio	79:78(1.01)	52:49(1.06)	0.033	0.855
Mode of delivery			0.246	0.620
Cesarean	105/142(73.94)	61/86(70.93)		
Vaginal birth	37/142(26.06)	25/86(29.07)		

育慢的D6囊胚解冻移植后的临床妊娠率高于常规IVF组发育慢的D6囊胚,活婴出生率有高于常规IVF组的趋势,但差异无统计学意义。为排除D5囊胚移植史对D6囊胚移植结局的影响,我们进行了亚组分析,得到与总体病人一致的结果。表明只要有可移植的D6囊胚,ICSI受精的D6囊胚在解冻移植周期可得到较好的妊娠结局,提示严重男性不孕因素和ICSI受精可能主要影响囊胚形成率和囊胚的体外发育速度,对移植后囊胚的种植及后续发育影响相对较小。本研究中流产率、早产率和畸形率两组间无差异。

除男性不孕因素外,导致囊胚发育延迟的主要原因是卵母细胞质量以及体外培养环境的影响。本研究中,ICSI组和IVF组的胚胎在相同的培养环境中生长,因此,对于缺乏男性不孕因素的常规IVF组病人,囊胚发育滞后的主要原因可能是女性不孕因素影响卵母细胞的发育潜能。据报道,女性吸烟与D6囊胚的比例升高有关,可能是通过影响卵母细胞质量起作用<sup>[19]</sup>。本研究中,我们的结果显示ICSI组临床妊娠率高于常规IVF组,活产率也有更高的趋势,提示某些女性不孕因素不仅影响囊胚体外发育速度,也影响囊胚移植后的临床妊娠结局。与常规IVF组病人相比,ICSI受精组患者可能有相对更好的卵子质量,形成的D6囊胚具有相对更高的发育潜能。

有关单纯的ICSI受精操作对胚胎发育的影响,尤其是对囊胚形成的影响,目前仍存在争议。与国内IVF中心不同,国外行ICSI受精的周期比例很高,根据最近发表的美国和欧洲的登记数据,ICSI

周期约占所有IVF周期的三分之二(为67%~68%)<sup>[20]</sup>,Dumoulin等<sup>[21]</sup>在一项大型回顾性研究中分析了1628个周期中剩余胚胎的养囊资料,结果显示ICSI组鲜胚移植后,剩余胚胎发育到囊胚的比例明显下降(23% vs. IVF的31.8%),然而ICSI组解冻囊胚移植的妊娠率和种植率与常规IVF组相似,此研究没有区分D5或D6囊胚。也有部分研究使用同胞卵母细胞比较不同受精方式对囊胚发育的影响,即两组的卵母细胞来自同一患者,无男性不孕因素,有些文章报道ICSI组囊胚率降低<sup>[22-23]</sup>,某些文章报道ICSI与IVF囊胚率没有区别<sup>[24-25]</sup>,也有少数报道显示ICSI组的囊胚率更高<sup>[26]</sup>。提示单独的ICSI操作可能对囊胚发育的影响相对较小,且与不同的ICSI操作者的操作技术有关。

在解冻移植的D6囊胚中,IVF受精的D6囊胚的发育速度仍然快于ICSI受精的D6囊胚,常规IVF组移植的解冻五期和六期囊胚(已孵出和正在孵出)的D6囊胚是ICSI组的7倍(21.6%:3.14%),而三期囊胚的比例也更低(8.8%:13.1%)。但是,校正年龄等混杂因素后IVF组CPR低于ICSI组,表明D6囊胚的发育速度和孵出状态并不显著影响D6囊胚移植后的妊娠结局。另一方面,ICSI组ICM评分更高,尤其是A级(23.8%:14.3%),滋养层评分A级在两组间无差异,但ICSI组的B级比例有更高的趋势(70.6%:64.2%,附表2)。表明ICSI组的囊胚ICM和TE评分更高,质量更好,这可能也是ICSI组妊娠结局更好的原因之一。此外,虽然本研究排除了已知的影响子宫内膜种植的因素,但常规IVF组可能存在其他潜在的女

性不孕因素,这些未知因素可能通过影响子宫内膜的容受性,从而影响IVF组病人解冻D6囊胚移植的妊娠结局。

与第5天的囊胚相比,发育慢的第6天的囊胚具有一些不同的特征。文献报道D6囊胚的非整倍体的发生率更高。本研究得到相似的结果,即解冻D6囊胚的流产率显著高于本中心D3卵裂胚移植和D5囊胚移植的流产率,但本研究中两组之间的流产率无差异。此外,D6囊胚可能具有特定的胚胎-子宫内膜同步性,具有不同的子宫内膜种植窗WOI<sup>[27]</sup>,我们的结果显示D6囊胚异位妊娠率明显低于本中心D5囊胚,IVF组的D6囊胚移植异位妊娠率为0,ICSI组仅1例异位妊娠,可能与D6囊胚粘附、定位及侵入子宫内膜有关的基因表达不同有关,研究D6囊胚与子宫内膜的相互作用的分子机制,可能可以找到避免异位妊娠的方法。

目前的延长囊胚培养主要将发育慢的桑葚胚/早期囊胚培养到D6。有研究表明发育慢的囊胚继续培养到第7天(Day 7),获得的D7囊胚移植后仍可获得一定的妊娠率,但是他们没有提供这些D7囊胚的受精方式<sup>[28]</sup>。考虑到较多文献报道ICSI囊

胚发育速度较慢,且我们的结果显示ICSI组的D6囊胚ICM和TE的评分更好,移植后的临床妊娠率更高,由此我们推测,ICSI受精的病人获得可利用的D7囊胚的机会更高,尤其对于胚胎数目少的ICSI病人,发育慢(未停滞)的胚胎可考虑延长胚胎培养到D7。目前本中心移植ICSI受精的D7囊胚的例数较少,暂未分析其发育潜力。囊胚发育慢与非整倍体率升高有关,移植整倍体的D7囊胚可以得到更好的结局<sup>[29]</sup>。

总之,我们的结果显示,ICSI受精的D6囊胚解冻移植后的妊娠结局优于常规IVF受精的D6囊胚,在校正年龄、获卵数等因素后临床妊娠率仍然高于常规IVF病人,可能与接受不同受精方式的病人导致囊胚发育慢的因素不同有关,这些不同的因素可能对D6囊胚移植后的种植与妊娠也存在不同影响。ICSI受精的D6囊胚解冻移植后相对好的妊娠结局,可在一定程度上弥补ICSI组患者囊胚发育相对较慢,D6囊胚比例相对更高导致的妊娠结局的差异。



附表  
Appendix table

#### 参考文献

- [1] Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE[J]. Hum Reprod, 2014, 29(10): 2099-2113.
- [2] Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2020; 114(2): 239-245.
- [3] Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro [J]. Hum Reprod, 2001, 16(5): 918-924.
- [4] van Landuyt L, de Vos A, Joris H, et al. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure[J]. Fertil Steril, 2005, 83(5): 1397-1403.
- [5] Stimpfel M, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, et al. Conventional IVF improves blastocyst rate and quality compared to ICSI when used in patients with mild or moderate teratozoospermia[J]. Syst Biol Reprod Med, 2019, 65(6): 458-464.
- [6] Rubio I, Galán A, Larreategui Z, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope [J]. Fertil Steril, 2014, 102(5): 1287-1294. e5.
- [7] Conaghan J, Chen AA, Willman SP, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial[J]. Fertil Steril, 2013, 100(2): 412-419. e5.
- [8] Cruz M, Garrido N, Gadea B, et al. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model[J]. Reprod Biomed Online. 2013, 27(4): 367-375.
- [9] Bodri D, Sugimoto T, Serna JY, et al. Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocysts [J]. Fertil Steril,

- 2015, 104(5): 1175–1181. e2.
- [10] Bourdon M, Pocate-Cheriet K, Finet de Bantel A, et al. Day 5 versus Day 6 blastocyst transfers: a systematic review and meta-analysis of clinical outcomes[J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(10): 1948–1964.
- [11] Wang C, Feng G, Zhang B, et al. Influence of the insemination method on the outcomes of elective blastocyst culture[J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2017, 44(2): 85–89.
- [12] 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.
- [13] 张小霞, 王辉田, 李涛. 囊胚培养为主时解冻卵裂期胚胎移植的妊娠结局分析[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(2): 253–260.  
Zhang XX, Wang HT, Li T. Pregnancy outcome of frozen cleavage-stage embryo transfer when blastocyst culture is the main treatment of IVF patients[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(2): 253–260.
- [14] Wang HT, Hong PP, Li HY, et al. Use of a new set of key performance indicators for evaluating the performance of an in vitro fertilization laboratory in which blastocyst culture and the freeze-all strategy are the primary treatment in patients with in vitro fertilization[J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(9): 3000605211044364.
- [15] Zhu J, Li T, Xing W, et al. Chronological age vs biological age: a retrospective analysis on age-specific serum anti-Müllerian hormone levels for 3280 females in reproductive center clinic[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(10): 890–894.
- [16] 王辉田, 张小霞, 朱洁茹, 等. 高龄女性新鲜与冷冻胚胎移植后妊娠及围产结局[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(5): 795–806.  
Wang HT, Zhang XX, Zhu JR, et al. Pregnancy and perinatal outcomes after fresh versus frozen embryo transfer cycles in women of advanced age[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(5): 795–806.
- [17] Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5): 918–924.
- [18] Balaban B, Urman B, Isiklar A, et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(1): 125–129.
- [19] Bourdon M, Ferreux L, Maignien C, et al. Tobacco consumption is associated with slow-growing day-6 blastocysts[J]. *F&S Rep*, 2020, 1(1): 30–36.
- [20] Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, et al. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection[J]. *JAMA*, 2015, 313(3): 255–263.
- [21] Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, et al. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 402–409.
- [22] Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(7): 1592–1596.
- [23] Yoeli R, Orvieto R, Ashkenazi J, et al. Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25(1): 23–28.
- [24] Westphal LM, Hinckley MD, Behr B, et al. Effect of ICSI on subsequent blastocyst development and pregnancy rates[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2003, 20(3): 113–116.
- [25] Van Landuyt L, De Vos A, Joris H, et al. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1397–1403.
- [26] Sauerbrun-Cutler MT, Huber WJ, Has P, et al. Is intracytoplasmic sperm (ICSI) better than traditional in vitro fertilization (IVF): confirmation of higher blastocyst rates per oocyte using a split insemination design[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2020, 37(7): 1661–1667.
- [27] Roelens C, Santos-Ribeiro S, Becu L, et al. Frozen-warmed blastocyst transfer after 6 or 7 days of progesterone administration: impact on live birth rate in hormone replacement therapy cycles[J]. *Fertil Steril*, 2020, 114(1): 125–132.
- [28] Insogna IG, Lanes A, Ginsburg ES, et al. Quality of embryos on day 7 after medium refreshment on day 6: a prospective trial[J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(5): 1253–1259.
- [29] Hernandez-Nieto C, Lee JA, Slifkin R, et al. What is the reproductive potential of day 7 euploid embryos?[J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(9): 1697–1706.