

·临床研究·

囊胚培养为主时解冻卵裂期胚胎移植的妊娠结局分析

张小霞, 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】探讨以囊胚培养及解冻囊胚移植为主流时, 移植解冻卵裂期胚胎的妊娠结局, 评价冻存卵裂期胚胎的价值, 以及影响解冻卵裂期胚胎移植妊娠率的因素。【方法】回顾性分析本中心2015年9月至2020年6月共1 607例解冻卵裂期胚胎移植的临床结局, 根据是否行囊胚培养及是否有可用囊胚, 分为3组, 即无养囊组、养囊失败组、养囊成功组。分析3组人群的年龄、不孕年限、基础FSH、BMI、获卵数、D3优胚数等基本资料, 以及使用logistic回归分析影响解冻卵裂期胚胎移植临床妊娠率的因素。【结果】解冻D3卵裂期胚胎移植的总体临床妊娠率较低(35.2%, 565/1 607), 未养囊组随着女方年龄的增加妊娠率显著下降。养囊失败组例数较少(98例), 妊娠组与未妊娠组间临床资料及胚胎发育情况差异无统计学意义。养囊成功但有移植囊胚失败史的病人, 解冻卵裂期胚胎的总体临床妊娠率高于其他两组, 为46.9%, 年龄、获卵数、D3优胚数、可用囊胚数、移植胚胎评分不影响此组妊娠率。与囊胚已解冻完相比, 剩余冻存囊胚数 ≥ 1 的妊娠率显著升高, OR 95%CI为3.789(2.088, 6.877), $P < 0.001$ 。ICSI病人临床妊娠率略高于常规IVF病人, OR 95%CI为1.783(0.987, 3.224), $P = 0.055$ 。【结论】对于卵巢反应差无养囊的病人, 临床妊娠率与年龄和胚胎质量有关; 于养囊病人, 即使养囊失败, 或者移植囊胚失败(未妊娠), 解冻卵裂期胚胎移植仍有相当的临床妊娠机会。因此在养囊为主流的情况下, 建议D3冻存部分卵裂期胚胎, 可根据患者自身条件及中心的囊胚培养效率, 选择一定数量及质量的卵裂期冻存。

关键词: 卵裂期胚; 解冻胚胎移植; 囊胚培养

中图分类号: R771.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2022)02-0253-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0211

Pregnancy Outcome of Frozen Cleavage-stage Embryo Transfer When Blastocyst Culture Is the Main Treatment of IVF Patients

ZHANG Xiao-xia, 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 analyze the pregnancy outcome of thawed cleavage staged embryo transfer (TET) cycles and factors affecting the clinical pregnancy rate of these TET cycles when blastocyst culture and transfer are the main treatment of IVF patients, and to analyze the value of freezing 1 to 2 cleavage staged embryos on day 3 before blastocyst culture. 【Methods】 We retrospectively analyzed the clinical outcome of 1 607 cleavage staged TET cycles in our IVF center from September 2015 to June 2020, which were divided into three groups: no extended culture group, and extended culture groups with or without usable blastocysts. Basic data such as patients, age, years of infertility, basic FSH, BMI, number of retrieved oocytes and day 3 good quality embryos of the three groups were analyzed. Multivariate logistic regression was used to analyze factors affecting clinical pregnancy rates of the three groups. 【Results】 The overall clinical pregnancy rate of all cleavage staged TET was low (35.2%, 565/1 607). The clinical pregnancy rate was associated with the patient's age and quality of transferred embryos for the group without blastocyst culture. There were only 98 patients

收稿日期: 2021-12-06

基金项目: 国家自然科学基金(82060176)

作者简介: 张小霞, 学士, 初级检验师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: zhangxx93@mail.sysu.edu.cn; 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

included in the extended culture group without usable blastocysts, and there was no statistical difference in patients' data, embryonic development and quality of transferred embryos between the pregnant and non-pregnant patients. Patients with a history of blastocysts transfer and failed pregnancy had a higher clinical pregnancy rate than those of the other two groups, 46.9%. The age, oocyte number, number of day 3 good quality embryos, number of usable blastocysts, and quality of transferred embryos did not affect the clinical pregnancy rate in this group, while the remaining number of frozen blastocyst had effects on the pregnancy rate [≥ 1 versus 0, OR 95% CI: 3.789(2.088, 6.877), $P < 0.001$]. The clinical pregnancy rate of ICSI patients was slightly higher than that of conventional IVF patients, OR 95% CI: 1.783(0.987, 3.224), $P = 0.055$. 【Conclusions】 For patients with no extended culture, the pregnancy rate is associated with the patient age and quality of transferred embryos. For the extended culture groups with or without transferrable blastocysts, transferring the cryopreserved cleavage staged embryos could achieve a good chance of clinical pregnancy. Therefore, cryopreserve a minimal number of cleavage staged embryos before extended culture could increase the chance of clinical pregnancy when blastocyst culture and transfer are the main treatments of IVF patients. The number and quality of cleavage staged embryos cryopreserved on day 3 should be decided according to the patients' characteristics and the blastocyst culture efficiency of IVF center.

Key words: cleavage stage embryo; frozen embryo transfer; extended culture

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(2): 253-260]

近年来囊胚培养已成为各生殖中心的主流,延长胚胎培养至囊胚阶段可以更好地评估胚胎的发育潜能,选择最优的胚胎移植,让病人更快获得妊娠,尤其是单囊胚移植,可以在控制多胎妊娠的同时维持高的临床妊娠率;另一方面,囊胚移植时子宫内膜更接近生理状态,容受性更好;囊胚比卵裂胚更耐受低温冻存,具有解冻复苏率更高等优势^[1-2]。但是,全部卵裂胚行囊胚培养存在一定风险,一旦养囊失败,病人面临无胚胎移植的风险^[3]。因此,为最大限度地鼓励患者接受囊胚培养,保证病人有胚胎移植的机会,本中心对大部分病人在胚胎发育第三天冷冻保存1~2枚胚胎,剩余胚胎全部行囊胚培养。囊胚移植可以获得相对更高的种植率和妊娠率,因此,在解冻移植周期,通常优先选择移植囊胚,本中心解冻单囊胚移植的总体临床妊娠率65%左右,与国内外报道的囊胚移植的妊娠率近似^[4-5]。但在总的解冻胚胎移植周期中,仍有相当比例的解冻卵裂期胚胎移植。因此,在以单囊胚移植为主的移植策略下,这些冷冻卵裂期胚胎来自哪些人群、胚胎质量如何、妊娠结局如何?本研究根据是否行囊胚培养及是否有可用囊胚,将解冻卵裂期胚胎移植分为无养囊组、养囊失败组、养囊成功组,对近5年解冻卵裂期胚胎移植结局进行了相应的分析。我们纳入了本中心2015年9月至2020年6月共1 607例卵裂期胚胎解冻周期,分析了不同群体的患者基本特征,妊娠情况,影响妊娠结局的因素等,评估D3卵裂胚冷冻及移植的临床价值,为目前以养囊为主的临床方案提供反馈,为进一步优化胚胎冷冻及移植策略提供思路。

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,患者均签署知情同意。回顾性分析本中心2015年9月至2020年6月的解冻卵裂期胚胎移植周期,排除女方伴有子宫内膜、宫腔粘连等宫腔疾病,以及解冻胚胎来源于不同取卵周期、冻卵周期、晚补救卵裂胚等特殊状况,共包括1 607例解冻卵裂期胚胎移植。根据是否在第三天进行囊胚培养及是否有可用囊胚,分成无养囊组(1 200例)、养囊失败组(98例)和养囊成功组(309例)三个组。养囊失败组定义为无可利用囊胚形成,无囊胚移植史;养囊成功组为有可用囊胚,且有移植冷冻囊胚但未能妊娠史。养囊成功组共486例,但本研究仅纳入至少有一次解冻囊胚移植失败史的病例(309例),本组也不包括D5新鲜移植后无冻存囊胚,或解冻时优先解冻卵裂胚,以及解冻囊胚成功妊娠(解冻卵裂胚生育二孩/三孩)的患者。

1.2 方法

1.2.1 体外受精与胚胎培养 当2~3个主导卵泡直径达到18 mm时,当日抽血查性激素促卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)、孕酮(P),使用的仪器是罗氏Cobas e602化学发光仪检测,使用人绒毛膜促性腺激素(HCG)4 000~10 000 U或者重组hCG 250 μ g进行扳机,注射后36~38 h取卵。根据常规体外受精(IVF)和卵胞浆内单精子注射(ICSI)的适应症,结合男方当日精液优化

处理后情况选择授精方案。

1.2.2 胚胎评分 根据胚胎卵裂球数目,卵裂球大小均一性以及碎片量对胚胎进行评分。卵裂球1级:细胞大小均匀,形态规则,胞质均匀清晰;2级:细胞大小略不均匀,形态略不规则;3级:细胞大小明显不均;碎片评分:1分:碎片<10%;2分:大多数碎片局部分布,碎片量10%~25%;3分:碎片量>25%,≤50%。卵裂球数目小于四个同时碎片量≥50%时为不可用胚胎。优质卵裂期胚胎为第三天卵裂球数目6~10个,细胞大小均匀,碎片量<10%。

1.2.3 胚胎的冷冻及解冻 所有胚胎冷冻、解冻均采用日本加藤商品化试剂套装。胚胎冷冻时将胚胎放入平衡液(equilibration solution, ES),计时,室温10 min,接着将胚胎移入玻璃化冷冻液(vitrification solution, VS)60 s,当时间还剩10 s左右时,将胚胎放在载杆尖端处,立即投入液氮中。胚胎解冻时找出患者需要解冻的胚胎,双人核对载杆标签上胚胎个数、胚胎阶段、冷冻日期,将载杆立即浸入解冻液1(warming solution 1, WS1)中37℃,轻轻晃动使胚胎从载杆滑入解冻皿,1 min后将胚胎转移至WS2液中,室温计时3 min,接着转移至WS3,室温5 min,再移至2个WS4中,室温各3 min,最后转移至3037移植皿,放入培养箱等待移植,卵裂期胚胎解冻后至少一半及以上卵裂球复苏定为胚胎存活。

1.2.4 内膜的准备 主要的内膜准备方案是自然周期和人工周期方案(HRT)。自然周期适合于排卵正常的患者,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,同时监测激素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。在尿LH峰出现当天(D0)抽血查激素LH、E₂、P,移植时间在LH峰值后的第三天(D3)或者第五天(D5)。人工周期方案(HRT)主要适用于各种原因导致的低雌激素水平或者无自然排卵等,从月经周期或者撤退性出血的第1~3天开始,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≥200 pg/mL时每天肌注40~60 mg黄体酮,黄体酮注射第4天移植第三天卵裂期胚胎。

1.2.5 妊娠检查 胚胎移植后14 d,晨尿查hCG或测定血β-hCG水平判定是否妊娠。临床妊娠定义

为孕7周B超探及孕囊,活产为获得孕28周以上活产胎儿。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 23.0统计分析软件分析,定量资料基本服从正态分布用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3组比较采用单因素方差分析,不符合正态分布数据用中位数和四分位数 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,3组间采用非参数检验。率与构成比采用 χ^2 检验;有临床意义的因素采用logistic回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入解冻胚胎移植周期的基本情况

本中心2015年9月至2020年6月总共5 327例解冻胚胎移植周期,其中3 378例解冻囊胚移植周期,解冻卵裂期胚胎移植周期总共1 907例,排除子宫内膜因素及特殊情况如积攒胚胎等的卵裂期胚胎移植,本研究共包括1 607例解冻卵裂期胚胎移植,占总解冻周期的30.2%,本中心近年来高龄病人增加,相应增加了解冻卵裂胚移植在总的解冻周期中的比例,以及无养囊组在总研究人群中的占比(表1)。

2.2 三组人群的基本临床特征及妊娠结局比较

共纳入1 607个解冻卵裂胚周期,其中未养囊组1 200例、养囊失败组98例(占总养囊周期数的2.1%)、养囊成功但移植解冻囊胚失败组共309例(占总体养囊周期数的6.6%)。分析3组人群的年龄、不孕年限、女方BMI、授精方式、不孕类型、获卵数、D3优胚数、移植胚胎数等基本资料,结果发现3组间的女方年龄、基础FSH、BMI、原发不孕占比、获卵数、D3优胚数均有统计学差异。未养囊组女方年龄更高,基础FSH更高,原发不孕占比更低,获卵数、D3优胚数均显著低于其他两组。3组人群的不孕年限、IVF受精占比差异无统计学意义, $P > 0.05$ (表1)。3组间移植胚胎数无明显差异。至少移植1枚优胚的比例在无养囊组最低,但差异无统计学意义,HRT的比例在3组间差异无统计学意义。临床妊娠率在3组间存在统计学差异, $P < 0.001$ (表1),养囊成功组即使有移植解冻囊胚失败史,移植卵裂期胚胎的临床妊娠率仍然显著高于其他两组,即46.9% vs. 36.7%(养囊失败组) vs. 32.0%(未养囊组)。但是当病人年龄<35岁时,3组间临床妊娠率差异无统计学意义,病人年龄在35~40之间时,临床妊娠

率有显著差异,养囊成功组显著高于其他两组, $P=0.012$,年龄大于40岁时仍然存在此趋势,由于病例数

较少,差异无统计学意义。3组间异位妊娠率、早期流产率、多胎率差异无统计学意义(表1)。

表1 解冻卵裂期胚胎移植患者基本资料及临床结局分析

Table 1 Baseline characteristics and clinical outcome of the patients undergoing thawed cleavage-stage embryo transfer
[($\bar{x} \pm s$), n(%)]

| | Patients without blastocyst culture | Patients without usable blastocysts | Patients with history of blastocyst transfer | F/χ^2 | P |
|--|--|--|---|------------|--------|
| No. of patients | 1 200 | 98 | 309 | | |
| Age/years | 36.48±5.98 | 34.73±6.05 | 32.67±5.14 | 101.78 | <0.001 |
| Infertility years | 3(1,5) | 3(1,6) | 3(2,4) | 0.912 | 0.634 |
| Basel FSH/(U/L) | 8.52±4.22 | 6.79±2.23 | 6.77±1.92 | 68.91 | <0.001 |
| BMI/(kg/m ²) | 22.03±4.72 | 21.67±4.79 | 21.21±3.35 | 4.158 | 0.016 |
| Percentage of primary infertility/% | 440/1 200(36.7) | 43/98(43.9) | 143/309(46.3) | 10.610 | 0.005 |
| Percentage of IVF insemination/% | 942/1 200(78.5) | 71/98(72.4) | 237/309(76.7) | 2.181 | 0.336 |
| No. of oocytes retrieved | 6.46±4.85 | 11.85±4.80 | 14.01±5.96 | 467.78 | <0.001 |
| No. of transferred embryos | 1.98±0.55 | 1.89±0.38 | 1.97±0.24 | 2.88 | 0.237 |
| No. of good-quality embryos | 2(1,3) | 2(1,4) | 4(2,5) | 143.05 | <0.001 |
| Percentage of transfer with at least one good-quality embryo /% | 72.8 | 75.5 | 78.3 | 4.083 | 0.130 |
| Percentage of HRT cycle/% | 54.0 | 51.0 | 60.5 | 4.911 | 0.086 |
| Clinical pregnancy rate/% | 384/1 200(32.0) | 36/98(36.7) | 145/309(46.9) | 24.126 | <0.001 |
| Patients <35 year/% | 222/453(49.0) | 22/46(47.8) | 98/199(49.2) | 0.030 | 0.995 |
| Patients 35~40 year/% | 113/372(30.4) | 11/34(32.4) | 41/87(47.1) | 8.905 | 0.012 |
| Patients >40 year/% | 49/375(13.1) | 3/18(16.7) | 6/23(26.1) | 3.178 | 0.075 |
| Ectopic pregnancy rate/% | 5/384(1.3) | 1/36(2.8) | 7/145(4.8) | 5.194 | 0.075 |
| Early abortion rate/% | 93/384(24.2) | 9/36(25.0) | 27/145(18.6) | 1.875 | 0.373 |
| Multiple pregnancy rate/% | 93/384(24.2) | 5/36(13.9) | 41/145(28.4) | 2.871 | 0.238 |
| Live birth rate/% | 286/1 200(23.8) | 26/98(26.5) | 111/309(35.9) | 18.519 | <0.001 |

BMI: body mass index; FSH: follicle-stimulating hormone; IVF: in-vitro fertilization; HRT: hormone replacement therapy.

2.3 影响未养囊组妊娠结局的多因素回归分析

未养囊组的临床妊娠率随年龄增加而明显降低,<35岁临床妊娠率为49.0%,35~40岁妊娠率30.4%,>40岁妊娠率13.1%,差异有统计学意义,与<35岁人群相比,>40岁人群妊娠率下降明显,OR 95%CI为0.143(0.096,0.212), $P<0.001$ 。72.8%患者至少有1枚优胚移植,移植至少一枚优胚妊娠率

显著增加,OR 95%CI为1.565(1.076,2.276), $P=0.019$ 。此组病人影响妊娠率的主要因素是病人年龄,及移植胚胎质量(是否移植优胚)。获卵数、D3优胚数、受精方式及内膜准备方案不影响妊娠结局。此组病人异位妊娠率1.3%,早期流产率24.2%,双胎率24.2%(表2)。

表2 未养囊患者中影响解冻卵裂期胚胎移植妊娠结局的logistic分析

Table 2 Multiple logistic regression analysis of factors associated with the clinical pregnancy rate of patients without blastocyst culture

| Variables | | <i>b</i> | <i>S_e</i> | Wald χ^2 | <i>P</i> | OR | OR 95%CI |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------|----------------------|---------------|----------|-------|---------------|
| Constant | | -0.639 | 0.225 | 8.042 | 0.005 | 0.528 | |
| Age | <35 | | | 93.99 | 0.000 | | |
| | 35~40 | -0.852 | 0.159 | 28.668 | 0.000 | 0.427 | (0.312,0.583) |
| | >40 | -1.946 | 0.202 | 92.401 | 0.000 | 0.143 | (0.096,0.212) |
| No. of oocytes retrieved | <4 | | | 0.586 | 0.746 | | |
| | 4~6 | 0.026 | 0.179 | 0.022 | 0.883 | 1.027 | (0.723,1.457) |
| | >6 | 0.127 | 0.185 | 0.469 | 0.493 | 1.135 | (0.790,1.631) |
| No.of good-quality embryos on day 3 | 0 | | | 2.368 | 0.306 | | |
| | 1~3 | 0.163 | 0.217 | 0.565 | 0.452 | 1.177 | (0.769,1.802) |
| | >3 | 0.412 | 0.281 | 2.155 | 0.142 | 1.510 | (0.871,2.618) |
| Infertility type | Primary=0, Secondary=1 | 0.142 | 0.151 | 0.893 | 0.345 | 1.153 | (0.858,1.549) |
| ART method | IVF=0, ICSI=1 | -0.044 | 0.161 | 0.076 | 0.783 | 0.957 | (0.698,1.311) |
| Quality of transferred embryos | No good-quality=0, at least one=1 | 0.448 | 0.191 | 28.668 | 0.019 | 1.565 | (1.076,2.276) |

ART: assisted reproductive technology.

2.4 影响养囊失败组妊娠结局的多因素回归分析

养囊失败组病例数较少(98例),临床妊娠率略高于未养囊组(36.7% vs. 32.0%)。75.5%患者至少有1枚优胚移植,临床妊娠率随年龄增加有逐渐降低的趋势,<35岁妊娠率47.8%,35~40岁妊娠率32.4%,>40岁妊娠率16.7%,差异无统计学意义。移植胚胎质量(是否移植优质胚胎)不影响妊娠率,33.3% vs. 37.8%。此外,获卵数、D3优胚数、受精方式均不影响该组妊娠率(表3)。

2.5 影响养囊成功组妊娠结局的多因素回归分析

养囊成功组临床妊娠率最高,46.9%。年龄不影响妊娠结局,<35岁妊娠率与35~40岁妊娠率无差异(49.2% vs. 47.1%),>40岁妊娠率略低(26.1%),但是病人例数较少,差异无统计学意义。获卵数、D3优胚数、可用囊胚数、移植胚胎质量(是否移植优胚)均不影响该组妊娠率, $P>0.05$ 。剩余冻存囊胚数 ≥ 1 的妊娠率显著高于无囊胚剩余组,OR 95%CI为4.991(2.558, 9.739), $P<0.001$,此外,ICSI组临床妊娠率略高于常规IVF组,OR 95%CI为1.78(0.99, 3.22), $P=0.055$ (表4)。

3 讨论

解冻胚胎移植已经有超过30年的历史,临床妊娠率逐年提高,尤其是近年来采用玻璃化冷冻技术,囊胚复苏率超过95%^[6]。玻璃化冷冻采用高浓度的冷冻保护剂,在快速降温过程中形成玻璃态,防止冰晶形成导致的细胞内结构损伤^[7]。另一方面,随着胚胎培养技术的进步,囊胚培养、囊胚移植逐渐常态化,成为较多IVF中心的主要移植模式,尤其是解冻单囊胚移植。为鼓励病人选择囊胚培养及移植,本中心为养囊病人常规冻存1至2枚卵裂期胚胎(年轻反应好,或不适宜双胎者冷冻1枚;D3胚胎质量稍差者冷冻2枚,1枚优胚加1枚质量中等的胚胎),其余胚胎养囊,以防止养囊失败患者无胚胎移植。高龄或者卵巢储备差的患者仍然常规行卵裂期胚胎冻存或移植。因此,本研究的目的是分析在目前以养囊及解冻囊胚移植为主的情况下,解冻卵裂期胚胎移植的妊娠结局及影响结局的因素。

本研究将解冻卵裂期胚胎移植周期分为无养

表3 养囊失败病人中影响卵裂胚冻胚移植妊娠结局的logistic分析结果

Table 3 Multiple logistic regression analysis of factors affecting the clinical pregnancy rate of patients who had no transferable blastocysts

| Variables | | <i>b</i> | <i>S_b</i> | Wald χ^2 | <i>P</i> | \widehat{OR} | OR 95%CI |
|--------------------------------------|------------------------------------|----------|----------------------|---------------|----------|----------------|----------------|
| Constant | | 0.637 | 1.173 | 0.295 | 0.587 | 1.891 | |
| Age | <35 | | | 3.288 | 0.193 | | |
| | 35~40 | -0.486 | 0.526 | 0.854 | 0.355 | 0.615 | (0.220, 1.724) |
| | >40 | -1.467 | 0.820 | 3.201 | 0.074 | 0.231 | (0.046, 1.150) |
| No. of oocytes retrieved | <6 | | | 2.532 | 0.282 | | |
| | 6~10 | -1.627 | 1.031 | 2.490 | 0.115 | 0.196 | (0.026, 1.483) |
| | >10 | -1.472 | 0.992 | 2.200 | 0.138 | 0.229 | (0.033, 1.605) |
| No. of good-quality embryos on day 3 | 0 | | | 1.245 | 0.537 | | |
| | 1~2 | 0.894 | 0.886 | 1.018 | 0.313 | 2.444 | (0.431, 13.87) |
| | >2 | 0.587 | 0.978 | 0.360 | 0.548 | 1.799 | (0.27, 12.23) |
| Infertility type | Primary=0, Secondary=1 | -0.276 | 0.530 | 0.272 | 0.602 | 0.759 | (0.269, 2.142) |
| ART method | IVF=0, ICSI=1 | 0.565 | 0.505 | 1.251 | 0.263 | 1.760 | (0.654, 4.74) |
| Quality of transferred embryos | No good-quality =0, at least one=1 | -0.040 | 0.713 | 0.003 | 0.955 | 0.961 | (0.238, 3.89) |

表4 养囊成功患者影响解冻卵裂胚移植临床妊娠率的logistic回归分析

Table 4 Multiple logistic regression analysis of factors affecting the clinical pregnancy rate of patients who had failed pregnancy with frozen blastocyst transfer(s)

| Variables | | <i>b</i> | <i>S_b</i> | Wald χ^2 | <i>P</i> | \widehat{OR} | OR 95%CI |
|--------------------------------------|------------------------------------|----------|----------------------|---------------|----------|----------------|----------------|
| Constant | | -1.191 | 0.472 | 6.365 | 0.012 | 0.304 | |
| Age | <35 | | | 1.458 | 0.482 | | |
| | 35~40 | 0.203 | 0.315 | 0.417 | 0.519 | 1.225 | (0.661, 2.272) |
| | >40 | -0.442 | 0.562 | 0.619 | 0.431 | 0.643 | (0.214, 1.933) |
| No. of oocytes retrieved | <10 | | | 4.532 | 0.104 | | |
| | 10~15 | -0.010 | 0.323 | 0.001 | 0.976 | 0.990 | (0.526, 1.864) |
| | >15 | 0.590 | 0.351 | 2.829 | 0.093 | 1.804 | (0.907, 3.587) |
| No. of good-quality embryos on day 3 | 0 | | | 0.530 | 0.767 | | |
| | 1~5 | -0.082 | 0.520 | 0.025 | 0.874 | 0.921 | (0.332, 2.554) |
| | >5 | 0.149 | 0.615 | 0.059 | 0.809 | 1.160 | (0.348, 3.870) |
| Available blastocyst | ≤2=0, >2=1 | 0.181 | 0.296 | 0.373 | 0.479 | 1.198 | (0.671, 2.140) |
| Remained frozen blastocyst | 0=0, ≥1=1 | 1.332 | 0.304 | 19.190 | 0.000 | 3.789 | (2.088, 6.877) |
| Infertility type | Primary=0, Secondary=1 | -0.019 | 0.286 | 0.004 | 0.948 | 0.981 | (0.560, 1.720) |
| ART method | IVF=0, ICSI=1 | 0.579 | 0.302 | 3.669 | 0.055 | 1.783 | (0.987, 3.224) |
| Quality of transferred embryos | No good-quality =0, at least one=1 | 0.299 | 0.411 | 0.528 | 0.467 | 1.348 | (0.602, 3.017) |

囊组、养囊失败组及养囊成功组,D3无养囊组主要为高龄患者,以及卵巢储备差的年轻患者。我们的结果与既往研究一致,影响妊娠率的主要因素是年龄以及胚胎质量(表2)。小于35岁,临床妊娠率可达49.0%(222/453)。如果同时移植优质胚胎,临床妊娠率可达54.9%。因此,年轻少卵、胚胎评分高的患者无需养囊,解冻卵裂胚移植可获得与囊胚移植相似的临床结局,而囊胚培养的结果受体外培养条件的影响,培养液PH、渗透压、培养环境的氧浓度、温度、不同品牌的培养液、不同批号的培养液等均影响胚胎体外发育,造成一定程度的胚胎损耗^[8-9]。因此,对于获卵数及D3胚胎数有限的患者,卵裂期胚胎冷冻及移植是更安全的选择。

囊胚培养是通过延长胚胎培养,选择更有发育潜能的胚胎,因此囊胚移植周期的种植率和活产率明显高于卵裂期胚胎移植^[10-11]。虽然体外胚胎培养技术逐年提高,但是目前尚不能完全模拟体内环境,尤其是培养环境易于波动的实验室,延长胚胎培养至囊胚阶段可能进一步影响胚胎发育潜力。另外部分患者的胚胎对外界环境可能更加敏感,早期冻存卵裂期胚胎可以保存胚胎的发育潜能。因此,为防止养囊失败病人无胚胎移植,同时保证囊胚培养的效果,本中心通常仅冷冻1枚优质卵裂期胚胎或者1枚优胚加1枚质量中等的胚胎,目的是把尽可能多的优质卵裂期胚胎用于囊胚培养,同时尽量降低解冻移植时的双胎率。本研究中有98例养囊失败,占总养囊周期数的2.1%。此组病人无可用囊胚形成,提示此组病人总体D3胚胎质量较差,发育潜能较低,解冻移植后此组病人的临床妊娠率明显低于养囊成功组(36.7% vs. 46.9%),但是略高于无养囊组,表明即使部分病人的胚胎体外无法发育到囊胚,早期移植后体内可以继续发育并成功种植。此组病人例数较少,多因素回归分析显示年龄、获卵数、D3优胚数、受精方式及移植胚胎质量(是否移植优胚)不影响妊娠结局(表3),提示目前的常规指标,尤其是D3胚胎形态评分不能预测胚胎的发育潜能,以及妊娠结局。与全部胚胎养囊相比,在D3常规冷冻1至2枚胚胎可以给部分病人带来额外的妊娠机会。

对于养囊成功组的病人,已经优先移植了1至多枚囊胚,部分病人已经移植完所有囊胚,有一次或者多次囊胚移植失败史后选择解冻卵裂胚移植。临床妊娠共145例,其中99例有一次囊胚移植失败史,36例有两次囊胚移植失败史,8例有移植三次

囊胚失败史,2例有移植四次囊胚失败史。此组病人,虽然有囊胚移植一次或多次失败的病史,但总体妊娠率最高,各个年龄阶段的妊娠率均高于另外两组。可能原因是此组病人有可用囊胚形成,表明总体胚胎的发育潜能较高,即使冻存的卵裂期胚胎没有经过囊胚培养筛选^[12]。对于这些移植囊胚未能成功妊娠,而移植解冻卵裂期胚胎获得临床妊娠的病人,影响妊娠的主要因素可能是子宫内膜与胚胎发育不同步。因此,当有反复囊胚移植失败时,解冻移植卵裂期胚胎可以增加胚胎种植的机会。本组病人中,回归分析显示年龄、获卵数、D3优胚数、可用囊胚数及移植胚胎质量(是否移植优胚)不影响妊娠结局,而是否有剩余囊胚影响临床妊娠率(表4)。我们认为,在总体胚胎质量都很好的情况下,剩余囊胚数更多提示更少的囊胚移植失败次数,内膜条件更好,胚胎质量可能更好,因此临床妊娠率更高,尚需在后续的研究中进一步具体分析。另外,ICSI病人的妊娠率有增加的趋势,可能在胚胎质量较好的情况下,ICSI病人女方因素更少,内膜接受性更好。

辅助生殖技术的最终目标是获得单胎、足月、健康活产婴儿。双胎妊娠属于高危妊娠,可增加孕产妇妊娠期糖尿病、高血压等并发症,造成新生儿生长受限、早产、低出生体质量等风险^[13-17]。本中心的解冻卵裂胚多胎率为24.6%(139/565),略低于中华医学会生殖医学分会2018年上报的新鲜与解冻周期双胎率(新鲜周期28.64%;解冻周期26.9%)^[18],可能与我们选择冻存的卵裂期胚胎质量有关(1枚优胚+1枚质量中等的胚胎)。虽然现阶段单卵裂期胚胎移植在临床实施上仍有一定阻力^[19],我们已经开始在年轻病人中开始行单卵裂期胚胎移植,降低卵裂期胚胎移植的多胎妊娠率,保证母婴安全。

总之,我们的结果显示,D3冷冻卵裂胚移植的临床妊娠率显著低于常规的解冻单囊胚移植。但是,在养囊的基础上冻存部分卵裂期胚胎,保证患者有胚胎移植,尤其对于养囊失败的患者,即使体外培养没有囊胚形成,移植冻存的卵裂期胚胎也有一定的临床妊娠机会。对于反复解冻囊胚移植失败的患者,移植卵裂期胚胎也可获得较高的临床妊娠率。因此,在目前养囊为主流的情况下,对于不同情况的患者在D3冻存少数卵裂期胚胎均可增加胚胎移植及妊娠的机会,是临床开展囊胚培养、囊胚移植方案的有力补充及保障。

参考文献

- [1] Zhu QQ, Zhu J, Wang Y, et al. Live birth rate and neonatal outcome following cleavage-stage embryo transfer versus blastocyst transfer using the freeze-all strategy [J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 19(2): 139-144.
- [2] Holden EC, Kashani BN, Morelli SS, et al. Improved outcomes after blastocyst-stage frozen-thawed embryo transfers compared with cleavage stage: a Society for Assisted Reproductive Technologies Clinical Outcomes Reporting System study [J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(1): 89-94.
- [3] Fournier A, Andreeva A, Gala A, et al. Usable blastocyst development rate is influenced by maternal age and ultra-low oxygen tension in extended culture [J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(3): e144-e145.
- [4] 曹苹, 张丹, 蔡炳, 等. 单胚胎移植临床结局分析 [J]. *中山大学学报(医学版)*, 2019, 40(5): 754-760.
Cao P, Zhang D, Cai B, et al. Clinical outcome analysis of single embryo transfer [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2019, 40(5): 754-760.
- [5] Simon C, Gomez C, Cabanillas S, et al. A 5-year multicentre randomized controlled trial comparing personalized, frozen and fresh blastocyst transfer in IVF [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 41(3): 402-415.
- [6] Trounson A, Morthr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell stage embryo [J]. *Nature*, 1983, (305): 707-709.
- [7] Cobo A, Santos M, Castellò D, et al. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3, 150 warming cycles [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(5): 1138-1146.e1131.
- [8] Swain JE. Controversies in ART: can the IVF laboratory influence preimplantation embryo aneuploidy? [J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 39(4): 599-607.
- [9] Werner MD, Hong KH, Franasiak JM, et al. Sequential versus Monophasic Media Impact Trial (SuMMIT): a paired randomized controlled trial comparing a sequential media system to a monophasic medium [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(5): 1215-1221.
- [10] Cameron NJ, Bhattacharya S, McLernon DJ. Cumulative live birth rates following blastocyst- versus cleavage-stage embryo transfer in the first complete cycle of IVF: a population-based retrospective cohort study [J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(10): 2365-2374.
- [11] Shi WH, Zhang W, Li N, et al. Comparison of perinatal outcomes following blastocyst and cleavage-stage embryo transfer: analysis of 10 years' data from a single centre [J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 38(6): 967-978.
- [12] Hammond ER, Morbeck DE. Tracking quality: can embryology key performance indicators be used to identify clinically relevant shifts in pregnancy rate? [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(1): 37-43.
- [13] Yang YW, Deng CY, Huang XX, et al. Annual report on assisted reproductive technology of Chinese Society of Reproductive Medicine in 2018 [J]. *J Reprod Med*, 2021, 30(4): 419-424.
- [14] 孙贻娟, 黄国宁, 孙海翔, 等. 关于胚胎移植数目的中国专家共识 [J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(10): 21-26.
Sun YJ, Huang GN, Sun HX, et al. Chinese expert consensus on numbers of embryos transferred [J]. *J Reprod Med*, 2018, 27(10): 21-26.
- [15] Pécheux O, Garabedian C, Drumez E, et al. Maternal and neonatal outcomes according to gestational weight gain in twin pregnancies: are the Institute of Medicine guidelines associated with better outcomes? [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2019, 234(3): 190-194.
- [16] Goeckenjan M, Madej D, Klimova A, et al. Are two children at once better than one? Risk analysis of twin pregnancies and births after assisted reproduction [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2021, 264(9): 76-82.
- [17] Ashwal E, Berger H, Hirsch L, et al. Gestational diabetes and fetal growth in twin compared with singleton pregnancies [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2021, 225(4): 420.e1-e13.
- [18] 杨静薇, 邓成艳, 黄学锋, 等. 中华医学会生殖医学分会2018年度辅助生殖技术数据报告 [J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(4): 419-424.
Yang JW, Deng CY, Huang XF, et al. Annual report on assisted reproductive technology of Chinese Society of Reproductive Medicine in 2018 [J]. *J Reprod Med*, 2021, 30(4): 419-424.
- [19] 徐蓓, 靳镭. 现阶段中国实行选择性单胚胎移植的时机是否成熟 [J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(9): 879-883.
Xu B, Jin L. Is it the time to implement elective single embryo transfer in China? [J]. *J Reprod Med*, 2018, 27(9): 879-883.

(编辑 孙慧兰)