

二步胚胎移植在反复种植失败中的临床应用价值

梁怡娅, 吴泽璇, 李 予, 王文军, 杨冬梓, 张清学
(中山大学孙逸仙纪念医院生殖中心, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探究二步胚胎移植在反复种植失败中的临床应用价值。【方法】回顾性分析 2013 年 7 月至 2015 年 7 月因既往体外受精-胚胎移植(IVF-ET)失败至本生殖中心再次 IVF 的患者资料,进行二步胚胎移植的有 359 例(二步移植组),单纯移植第 3 天胚胎的 362 例(D3 移植组),单纯移植第 5 天胚胎的 101 例(D5 移植组)。其中,二步胚胎移植和单纯移植第 3 天胚胎中各有 110 个和 130 个周期患者既往有 3 个或 3 个以上 IVF 失败周期。【结果】①对于既往有 IVF 失败的患者,二步移植组的胚胎种植率、临床妊娠率与 D3 移植组、D5 移植组相近(20.5% vs 23.2% vs 28.2%、47.1% vs 49.7% vs 44.6%, $P > 0.05$)。②对于反复种植失败患者,二步移植组的胚胎种植率和 D3 移植组相近(19.2% vs 19.4%, $P > 0.05$),而临床妊娠率稍高于 D3 移植组,但差异无统计学意义(44.5% vs 38.5%, $P > 0.05$)。【结论】对于反复种植失败患者,二步胚胎移植有可能提高 IVF 的胚胎种植率和临床妊娠率。

关键词: 二步胚胎移植;反复种植失败;胚胎种植率

中图分类号: R711.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2016)01-0110-05

Analysis of Clinical Effectiveness of Two-step Embryo Transfer on Patients with Repeated IVF-ET Failure

LIANG Yi-hua, WU Ze-xuan, LI Yu, WANG Wen-jun, YANG Dong-zi, ZHANG Qing-xue

(Reproductive Medical Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Corresponding to: ZHANG Qing-xue, E-mail: zhangqingxue666@aliyun.com

Abstract: 【Objective】 To evaluate the effect of two-step embryo transfer in the patients with repeated IVF-ET failure. 【Methods】 A retrospective study was performed in the patients with a history of IVF-ET failure in our reproductive centre from July 2013 to July 2015, of which 359 women underwent two-step embryo transfer (two-step group), 362 women underwent day-3 embryo transfer only (D3 transfer group), and 101 women underwent day-5 embryo transfer only (D5 transfer group). Among them, there were 110 and 130 women had at least 3 IVF-ET failed cycles in two-step group and D3 transfer group respectively. 【Results】 1. For the patients had IVF-ET failed cycles, the implantation and pregnancy rate were similar in three groups (two-step group vs D3 transfer group vs D5 transfer group, 20.5% vs 23.2% vs 28.2%, 47.1% vs 49.7% vs 44.6%, $P > 0.05$, respectively). 2. For the patients with repeated IVF-ET failure, the implantation rate was similar in two-step group and D3 transfer group. (19.2% vs 19.4%, $P > 0.05$). The clinical pregnancy rate in two-step group was higher than D3 transfer group, but there was no statistical significance (44.5% vs 38.5%, $P > 0.05$). 【Conclusion】 For the patients with repeated IVF-ET failure, two-step embryo transfer may improve IVF implantation and pregnancy rate.

Key words: two-step embryo transfer; repeated IVF-ET failure; implantation rate

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2016, 37(1): 110-114]

辅助生殖技术为许多不孕不育的家庭带来了福音,尽管体外受精-胚胎移植(in vivo fertilization-

embryo transfer, IVF-ET) 的临床妊娠率已大幅度提高,但如何提高胚胎种植率仍然是临床工作者

收稿日期: 2015-05-27

作者简介: 梁怡娅, 硕士研究生, 研究方向: 生殖内分泌, E-mail: evaliang1218@163.com; 张清学, 通信作者, 中山大学孙逸仙纪念医院生殖中心, 主任医师, 博士生导师, E-mail: zhangqingxue666@aliyun.com

面对的难题。根据欧洲生殖协会的调查统计,全欧洲生殖医学中心 2010 年的 IVF 胚胎种植率仅为 33% 左右^[1],低胚胎种植率制约着 IVF-ET 成功率的提高。为提高胚胎种植率,获得更高的 IVF 成功率,二步胚胎移植被尝试运用至临床中。二步胚胎移植,亦称序贯移植,把卵裂期胚胎移植和囊胚移植相结合,即先移植第 3 天胚胎,随后再移植囊胚。本研究旨在探究二步胚胎移植在 IVF-ET 中的临床价值,为广大临床工作者提供参考。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

回顾性分析 2013 年 7 月至 2015 年 7 月期间因既往 IVF-ET 失败再来我院生殖中心行新鲜及冷冻胚胎移植患者的资料,其中进行二步胚胎移植的有 359 个周期(二步移植组)。进行二步胚胎移植的患者为:夫妻双方染色体正常、既往有 IVF-ET 失败周期、有可利用的第 3 天卵裂期胚胎和第 5 天囊胚期胚胎、移植时无阴道流血、宫腔积液及生殖道感染、排除宫腔粘连及生殖系统畸形等。根据患者年龄 ≤ 40 岁、基础 FSH ≤ 20 mU/mL、既往失败 IVF 周期 ≥ 1 个、获卵数 ≥ 3 个,分别筛选出与二步移植组相匹配的单纯移植第 3 天胚胎 362 个周期(D3 移植组)、单纯移植第 5 天胚胎 101 个周期(D5 移植组)。进行二步移植的 110 个周期患者曾有 3 个或 3 个以上既往失败周期,在 D3 移植组中选取基线资料与之匹配的患者,共有 130 个周期,进一步探讨二步胚胎移植对于反复种植失败患者的临床效果。

1.2 控制性超促排卵方案、卵子采集及受精

控制性超促排卵(COH)采用常规长方案,所有研究对象均在前一月经周期的黄体中期使用促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)进行垂体降调节,达到降调节标准后根据患者的年龄、基础卵巢激素及窦卵泡数使用促性腺激素促排卵。当有 2 个卵泡直径达到 18 mm 或 3 个直径达到 17 mm 时,当晚肌肉注射人促绒毛膜性腺激素(HCG) 5 000 ~ 10 000 U,36 h 后经阴道 B 超引导下穿刺取卵,经体外受精或卵胞浆内单精子显微注射(IVF/ICSI)授精,受精后 18 h 观察原核形成情况,并继续培养 3 d。

1.3 胚胎移植

授精 18 h 后观察受精情况,第 3 天上午评估卵裂期胚胎,优质胚胎:胞质颗粒均匀、较细,形态规则,卵裂速度正常,卵裂球均匀,碎片 $< 5\%$ 。根据 Gardner 等^[2]评分系统对第 5 天囊胚期胚胎进行评级,评级 $\geq 3BB$ 为优质囊胚。D3 移植组移植 1 ~ 3 个第 3 天(D3,卵裂期)胚胎,D5 移植组移植 1 ~ 2 个第 5 天(D5,囊胚期)胚胎,二步移植组则是先移植第 3 天卵裂期胚胎,2 d 后再移植第 5 天囊胚期胚胎。3 组患者总移植胚胎数均不多于 3 个。胚胎移植(ET)后 14 d 根据尿妊娠试验或验血判断是否生化妊娠,移植术后 35 d 超声见到孕囊为临床妊娠,多胎妊娠协商讨论酌情减胎。

1.4 统计学分析

采用 SPSS19.0 进行统计学分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,定性资料用率(%)表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,两两间比较时使用 Bonferroni 法,定性资料采用 Kruskal-Wallis 非参数检验, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 既往 IVF-ET 失败患者的助孕结局比较

二步移植组、D3 移植组及 D5 移植组在女方年龄、原发不孕比例、基础 FSH、既往失败周期数、不孕年限及获卵数的差异无统计学意义($P > 0.05$)。二步移植组、D3 移植组和 D5 移植组患者移植胚胎中优质胚胎比重分别为 28.5%、28.6%、23.4%,3 者相近($P > 0.05$)。D5 移植组移植胚胎数明显少于二步移植组及 D3 移植组(1.86 ± 0.45 vs 2.45 ± 0.59 ; 1.86 ± 0.45 vs 2.36 ± 0.56 , $P < 0.001$)。尽管 D5 移植组胚胎种植率(28.2%)稍高于二步移植组(20.5%)及 D3 移植组(23.2%),但差异无统计学意义($P > 0.05$)。二步移植组与 D3 移植组、D5 移植组有相近的临床妊娠率、早期流产率和多胎妊娠率($P > 0.05$,表 1)。

2.2 反复种植失败患者的助孕结局比较

二步移植组和 D3 移植组的反复种植失败患者的年龄、原发性不孕比例、既往失败周期数、不孕年限、基础 FSH 及获卵数无显著差异($P > 0.05$)。二步移植组和 D3 移植组患者移植胚胎中优质胚胎比重分别为 25.2%、21.0%,两者差别无统计学意义($P > 0.05$)。二步移植组移植胚胎数目明显多于 D3 移植组(2.60 ± 0.56 vs 2.38 ± 0.59 , P

表 1 二步胚胎移植与第 3 和 5 天胚胎移植患者的基线资料和 IVF 助孕结局情况

Table 1 The baseline and IVF outcomes of patients underwent two-step embryo transfer, D3 embryo transfer only and D5 embryo transfer only

	Two-step group	D3 transfer group	D5 transfer group	F or χ^2 value	<i>P</i> value
Number of cases/ <i>n</i>	359	362	101		
Age/years	33.49 ± 3.71	33.60 ± 3.38	33.26 ± 3.15	0.40	0.67
Primary infertility/%	56.7(203/359)	63.5(230/362)	59.1(59/101)	3.42	0.18
Basal FSH/(mU/mL)	8.25 ± 2.53	8.47 ± 2.54	7.93 ± 2.54	2.00	0.14
Previous IVF-ET failed cycles	2.38 ± 1.30	2.42 ± 0.85	2.28 ± 1.23	0.65	0.52
Duration of infertility/years	6.08 ± 3.80	6.94 ± 3.52	6.23 ± 5.2	0.065	0.94
Retrieved oocytes	10.09 ± 5.59	10.21 ± 5.16	10.32 ± 5.51	0.086	0.92
Transferred embryos	2.45 ± 0.59	2.36 ± 0.56	1.86 ± 0.45	43.24	< 0.001 ¹⁾
Good-quality embryos in transferred/%	28.5(250/878)	28.6(244/853)	23.4(44/188)	2.22	0.33
Implantation rate/%	20.5(180/878)	23.2(198/853)	28.2(53/188)	5.76	0.056
Clinical pregnancy rate/%	47.1(169/359)	49.7(180/362)	44.6(45/101)	1.03	0.60
Early miscarriages rate/%	7.1(12/169)	5.6(10/180)	4.4(2/45)	0.614	0.74
Multiple pregnancy rate/%	20.7(35/169)	21.2(42/198)	28.9(13/45)	1.48	0.48

1) two-step group compared with D3 transfer group, $P = 0.10$, two-step group compared with D5 transfer group, $P < 0.01$, D3 transfer group compared with D5 transfer group, $P < 0.01$

< 0.05)。二步移植组的胚胎种植率为 19.2%，临床妊娠率为 44.5%，早期流产率为 14.3%，多胎妊娠率为 24.5%，与 D3 移植组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

3 讨论

胚胎成功植入需要优质胚胎、良好的内膜容

受性及胚胎和内膜间的相互作用这三个因素共同作用。二步移植的初衷在于提高反复种植失败患者的胚胎种植率,以增加 IVF-ET 的成功率。研究者们基于以下理论基础认为二步移植可通过改善内膜容受性增加,更利于胚胎种植;二步移植中初次移植的胚胎,胚胎细胞发育时分泌的 HCG 可诱使内膜细胞分泌 IL-1,其后 IL-1 促进白血病抑制因子(LIF)、前列腺素 2(PGE2)等促进胚胎着床的

表 2 反复种植失败患者二步胚胎移植与第 3 天胚胎移植的基线资料和 IVF 助孕结局情况

Table 2 The baseline and IVF outcomes of patients with repeated IVF-ET failure in two-step group and D3 transfer group

	Two-step group	D3 transfer group	<i>t</i> or χ^2 value	<i>P</i> value
Number of cases	110	130		
Age/years	34.56 ± 4.65	34.83 ± 4.17	0.47	0.64
Primary infertility/%	57.1(63/110)	62.0(81/120)	0.55	0.46
Basal FSH/(mU/mL)	8.77 ± 2.92	8.64 ± 2.87	0.35	0.73
Previous IVF-ET failed cycles	3.50 ± 0.80	3.50 ± 0.79	0.00	1.00
Duration of infertility/years	6.85 ± 3.88	7.22 ± 3.70	0.73	0.47
Retrieved oocytes	7.60 ± 4.87	7.00 ± 3.39	1.12	0.26
Transferred embryos	2.60 ± 0.56	2.38 ± 0.59	2.99	0.003
Good-quality embryos in transferred/%	25.2(72/286)	21.0(65/309)	1.44	0.23
Implantation rate/%	19.2(55/286)	19.4(60/209)	0.003	0.95
Clinical pregnancy rate/%	44.5(49/110)	38.5(50/130)	0.91	0.34
Early miscarriages rate/%	14.3(7/49)	16.0(8/50)	0.057	0.81
Multiple pregnancy rate/%	24.5(12/49)	22.0(11/50)	0.086	0.77

细胞因子表达,从而增加内膜容受性^[3];早期胚胎可增进胚胎和内膜间的相互作用,诱使内膜进入“种植窗”状态,促进胚胎植入^[4];此外,初次移植时的宫腔操作刺激内膜可能可利于胚胎着床^[5]。然而,二步移植的实际临床效果仍存有争议,尚未有明确的定论。Ashkenazi等^[6]认为相对于传统的卵裂期胚胎移植,二步移植是不利于提高胚胎种植率和临床妊娠率的,这可能是由于重复的宫腔操作会导致感染和内膜损伤。Fang等^[7]的研究则中指出对于反复种植失败患者,与卵裂期胚胎移植相比,二步移植能显著提高胚胎种植率和临床妊娠率(23.1% vs 9.3%、43.9% vs 22.4%, $P < 0.05$)。Machtinger等^[8]亦认为二步移植可改善反复种植失败人群的胚胎种植率和临床妊娠率。

从本研究的分析结果可看到,对于大部分曾有IVF失败的不孕患者,二步移植相较于传统的卵裂期胚胎移植或囊胚移植,并不能明显提高胚胎种植率、临床妊娠率及改善IVF-ET助孕结局。而针对反复种植失败患者,进行二步胚胎移植可使胚胎种植率与卵裂期胚胎移植相近,临床妊娠率高于单纯卵裂期胚胎移植,由此提示二步移植可能有利于改善反复种植失败患者的胚胎种植率和临床妊娠率。虽然在本研究中此差别无统计学意义,可能是由于样本量较小所导致,需要进一步扩大样本量进行前瞻性的研究来验证。

我们的研究发现囊胚移植尽管移植胚胎数量较少,但仍然有较高的胚胎种植率。囊胚移植自运用于临床后便备受关注,多个研究表明囊胚移植无论是在提高临床妊娠率、胚胎种植率,还是在降低早期流产率和多胎妊娠率、改善围产结局等方面,都有明显的优越性。在Kaur等^[9]的前瞻性研究中,囊胚移植的临床妊娠率和胚胎种植率分别为66%和35.17%,明显高于卵裂期胚胎移植。多个荟萃分析提示囊胚移植与卵裂期胚胎移植相比有更高的新生儿活产率^[10-11]。国内学者对囊胚和卵裂期胚胎的早期流产率进行分析,认为无论是新鲜胚胎移植还是冻融胚胎移植,囊胚移植均比第3天胚胎移植早期流产风险降低^[12]。同时,囊胚移植尤其是单囊胚移植是降低多胎妊娠风险的有效方法。有学者对比了单囊胚移植和双卵裂期胚胎移植的临床结局,单囊胚移植的胚胎种植率显著高于双卵裂期胚胎移植(52.4% VS 43.4%, $P < 0.05$),而多胎妊娠率则明显下降(3.3% VS 45.2%,

$P < 0.05$),提示囊胚移植是实现单胚胎移植较理想的方法^[13]。

然而囊胚移植也有其缺点,单纯囊胚移植可能会出现囊胚培养不成功导致无可利用胚胎而取消移植的风险,这不但会对患者造成精神打击亦同时增加了经济负担。培养囊胚意味着胚胎需要在体外环境培养的时间更长,体外胚胎培养体系并不能百分百地复制体内环境,体外培养对胚胎的远、近期影响仍未能确定。有研究指出,体外胚胎培养液中的蛋白质可能会影响胎儿体质量,使用蛋白质含量较高的培养液培养的胚胎更容易出现巨大儿的情况^[14]。故进行囊胚移植前仍需要慎重考虑及告知患者其中的风险。而二步移植将卵裂期胚胎移植和囊胚移植相结合,既可以防止出现无胚胎移植的情况出现,降低移植取消率,也能利用囊胚移植的优点,可能有利于提高反复种植失败患者的IVF成功率,但也有增加多胎妊娠的风险。

综上所述,对于大部分不孕患者,二步移植并不能提高IVF临床妊娠率,而对于反复种植失败患者,若有足够的可利用胚胎,尝试二步移植,有可能提高胚胎种植率和临床妊娠率。

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 ESHREdagger[J]. Hum Reprod, 2014, 29(10):2099-2113.
- [2] 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.
- [3] BOURDIEC A, CALVO E, RAO CV, et al. Transcriptome analysis reveals new insights into the modulation of endometrial stromal cell receptive phenotype by embryo-derived signals interleukin-1 and human chorionic gonadotropin: possible involvement in early embryo implantation[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64829.
- [4] EYHEREMENDY V, RAFFO FGE, PAPAYANNIS M, et al. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure[J]. Fertil Steril, 2010, 93(3):769-773.
- [5] YEUNG TWY, CHAI J, LI RHW, et al. The effect of

- endometrial injury on ongoing pregnancy rate in unselected subfertile women undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial [J]. *Human Reprod*, 2014, 29(11): 2474–2481.
- [6] ASHKENAZI J, YOELI R, ORVIETO R, et al. Double (consecutive) transfer of early embryos and blastocysts: aims and results [J]. *Fertil Steril*, 2000, 74 (5): 936–940.
- [7] FANG C, HUANG R, LI T, et al. Day-2 and day-3 sequential transfer improves pregnancy rate in patients with repeated IVF -embryo transfer failure: a retrospective case-control study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26(1): 30–35.
- [8] MACHTINGER R, DOR J, MARGOLIN M, et al. Sequential transfer of day 3 embryos and blastocysts after previous IVF failures despite adequate ovarian response [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(3): 376–379.
- [9] KAUR P, SWARANKAR ML, MAHESHWARI M, et al. A comparative study between cleavage stage embryo transfer at day 3 and blastocyst stage transfer at day 5 in in-vitro fertilization/intra-cytoplasmic sperm injection on clinical pregnancy rates [J]. *J Hum Reprod Sci*, 2014, 7(3): 194–197.
- [10] GLUJOVSKY D, BLAKE D, FARQUHAR C, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 7: D2118.
- [11] PAPANIKOLAOU EG, KOLIBIANAKIS EM, TOURNAYE H, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis [J]. *Human Reprod*, 2007, 23(1): 91–99.
- [12] 林明媚, 罗璐, 李涛, 等. 囊胚和卵裂期胚胎的早期胚胎流产率比较 [J]. *生殖与避孕*, 2013(5): 311–316.
- LIN MM, LU L, TAO L, et al. Comparison of the First Trimester Miscarriage Rate between Cleavage Stage Embryo and Blastocyst [J]. *Reprod Contrac*, 2013(5): 311–316.
- [13] 张波, 冯贵雪, 周红, 等. 选择性单囊胚移植与双卵裂胚移植的临床结局比较 [J]. *生殖医学杂志*, 2013(1): 30–33.
- ZHANG B, FENG GX, ZHOU H, et al. Comparison of clinical outcomes of elective single blastocyst transfer with double cleavage embryo transfer [J]. *J Reprod Med*, 2013(1): 30–33.
- [14] ZHU J, LI M, CHEN L, et al. The protein source in embryo culture media influences birthweight: a comparative study between G1 v5 and G1-PLUS v5 [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(7): 1387–1392.

(编辑 徐杰)

(上接第 109 页 from page 109)

- [15] ARAI E, NISHIDA Y, WASA J, et al. Inhibition of hyaluronan retention by 4 -methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(12): 1839–1849.
- [16] RIZZARDI AE, VOGEL RI, KOOPMEINERS JS, et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors [J]. *Cancer*, 2014, 120(12): 1800–1809.
- [17] NIEDWOROK C, KRETSCHMER I, ROCK K, et al. The impact of the receptor of hyaluronan-mediated motility (RHAMM) on human urothelial transitional cell cancer of the bladder [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75681.
- [18] GOLSHANI R, LOPEZ L, ESTRELLA V, et al. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion and angiogenesis through CD44 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 483–491.
- [19] KRAMER MW, ESCUDERO DO, LOKESHWAR SD, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2 and HYA -1) with bladder cancer diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Res*, 2011, 117(6): 1197–1209.
- [20] KRAMER MW1, ESCUDERO DO, LOKESHWAR SD, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis [J]. *Cancer*, 2011, 117(6): 1197–1209.

(编辑 王晓鹰)