

辅助生殖技术中 HBV 携带者胚胎发育和 IVF 结局的回顾分析

杜红姿, 刘寒艳, 李 莉, 康祥锦, 张伟良, 陈欣洁*

(广州医科大学附属第三医院生殖医学中心//广东省生殖医学重点实验室//广东省产科重大疾病重点实验室//广东省普通高校生殖与遗传重点实验室, 广东 广州 510150)

摘 要:【目的】探讨乙肝病毒(HBV)感染以及不同感染模式的夫妇胚胎发育情况和体外受精/卵胞浆内单精子显微注射(IVF/ICSI)结局。【方法】回顾性分析行 IVF/ICSI 治疗, 637 个 HBV 感染患者周期与 1 892 个未感染者周期的基础参数以及临床结局, 同时进一步比较不同模式 HBV 感染者之间的临床结局。基础参数包括女方年龄、月经第 3 天基础内分泌水平、不孕原因、原发还是继发不孕、不孕年限、第几次周期、卵巢刺激方案是长方案还是短方案、IVF 还是 ICSI。临床结局包括比较各组人群在获卵数、受精率、卵裂率、着床率、临床妊娠率、流产率方面有无差异。【结果】一方或双方感染 HBV 的夫妻与未感染的夫妻在基础参数方面没有显著性差异。获卵数、受精数、卵裂数、优质胚胎数、冷冻胚胎数、着床率、妊娠率以及流产率与未感染组比较没有差异(P 均 > 0.05), 不同模式的 HBV 感染者之间着床率、妊娠率和早期流产率均没有显著差异(P 均 > 0.05)。【结论】HBV 感染夫妇的胚胎继续发育的潜能和 IVF 结局与未感染者相似。不同模式的 HBV 感染者 IVF 结局相似。

关键词: 辅助生殖技术; 体外受精; 胚胎移植; 胚胎发育; 流产率; 临床妊娠率; HBV

中图分类号: R512.62

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)04-0570-05

Retrospective Analysis for Embryo Development and IVF Outcome of HBV Infected Couples in Assisted Reproduction Treatment

DU Hong-zi, LIU Han-yan, LI Li, KANG Xiang-jin, ZHANG Wei-liang, CHEN Xin-jie*

(Center for Reproductive Medicine, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University//Key Laboratory for Reproductive Medicine of Guangdong Province// Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province//Key Laboratory of Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510150, China)

Abstract:【Objective】 To evaluate embryo development and IVF/ICSI outcome of HBV infected couples compared with uninfected couples and different serological profile types with HBV.【Methods】 Analysis of the characters and outcomes of 637 HBV infected couples compared with 1892 uninfected couples and the outcomes of different serological profile types with HBV after IVF or ICSI treatment was performed retrospectively. Characters were including: maternal age, the time of the procedure, serum FSH at day 3, LH, E2, PRL, T, etiology of the infertility, primary or secondary infertility, duration of the infertility, number of previous cycles, type of pituitary inhibition, IVF procedure. Embryo development criteria such as number of oocytes, fertilization rate, cleavage rate, number of good embryos and used for vitrification, implantation rate, clinical pregnancy rate and miscarriage rate were compared between the two groups or subgroups.【Results】 There were no differences between the two groups of patients for the characters. There were no difference in embryo development parameters, implantation rate, clinical pregnancy rate and miscarriage rate between the two groups ($P > 0.05$). There were no differences in implantation rate, clinical pregnancy rate and abortion rate among HBV infected subgroups ($P > 0.05$).【Conclusion】 The embryo development and IVF outcome of HBV infected couples seeking for assisted reproduction treatment were similar to the uninfected couples. HBV infected patients with different serological profile types had the similar outcome.

Key words: assisted reproduction technique; in vitro fertilization; embryo transfer; embryo development; miscarriage rate; pregnancy rate; hepatitis B virus

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4):570-574]

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 广东省教育厅科技创新项目(2012KJCX0087)

作者简介: 杜红姿, 硕士, 副主任医师, 研究方向为生殖医学, E-mail: dhz-gz@hotmail.com; * 通信作者: 陈欣洁, E-mail: lucychen23@sina.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者行辅助生殖技术治疗, 其对子代的安全性以及对妊娠结局的影响, 一直以来尚无定论。有研究认为, HBsAg 阳性影响男性的精子质量以及卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)结局。有研究认为行体外授精(in vitro fertilization, IVF)胚胎移植的女性中, 继续妊娠率和活产率以及着床率在 HBV 组显著高于未感染组。但是另外一些研究认为夫妻一方或者夫妇双方 HBV 阳性患者对继续妊娠率和活产率没有影响^[1-3]。目前对于 HBV 不同模式感染患者对 IVF 妊娠结局的影响尚未见相关报道, 因此, 本研究旨在探讨 HBV 感染患者与未感染人群的 IVF 结局, 以及 HBV 不同模式感染患者的 IVF 治疗结局进行分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象

我们收集 2012.09–2013.09 期间在广州医科大学附属第三医院生殖中心进行辅助生殖技术治疗(IVF/ICSI)患者的临床资料, 满足以下条件: 新鲜 IVF 或者 ICSI 促排卵周期, 患者夫妇一方或者双方 HBV 血清学五项标志物检查结果提示 HBV 感染阳性。

收集病人的基本资料, 治疗方案, 胚胎发育以及治疗结局。病人收集的信息包括: 女方年龄、基础内分泌水平、不孕年限、不孕类型、不孕原因、助孕方式、助孕方案、周期数、降调剂量、降调日激素水平、超排卵时间、Gn 用量、Gn 总时间、HCG 日子官内膜厚度、HCG 日血激素水平、卵子数目、受精数目、优质胚胎个数、冷冻胚胎数、移植胚胎时间、移植胚胎数以及妊娠监测情况。

收集同时期 HBV 血清学 5 项标志物检查结果提示 HBV 感染阴性的患者为未感染组。

HBV 血清学 5 项标志物包括: ①乙肝表面抗原 HBsAg, ②乙肝表面抗体 HBsAb, ③乙肝 e 抗原 HBeAg, ④乙肝 e 抗体 HBeAb, ⑤乙肝核心抗体 HBc-IgG Ab。

1.2 方法

采用本中心常规的 IVF-ET 超排卵方案进行控制性超排卵。月经第 19~21 天起用达菲林(法国 Pharma Biotech 药厂)1.0~1.8 mg 进行垂体降调节; 降调 14 d 后或者月经第 3~5 天给予重组

卵泡刺激素(r-FSH, 果纳芬, 瑞士 Sereno 公司)或者国产卵泡刺激素(u-FSH, 丽申宝, 中国丽珠制药公司)150~300 U 启动。卵泡径线 2 个达 18 mm 或 3 个达 16 mm 以上时注射人绒毛膜促性腺激素(hCG, 瑞士 Sereno 公司)5 000~10 000 U。注射 hCG 后 34~36 h 取卵。取卵后 4~6 h 授精。授精后 16~18 h 观察受精情况, 授精第 2~6 天进行胚胎质量评分及胚胎移植。根据卵裂球的数量和形态以及胞浆碎片的百分比来判断胚胎的质量。囊胚评分采用 Gardner 囊胚评分标准, 以数字 1~6 对囊胚的扩张度和孵化状态评分, 以字母 A、B、C 对内细胞团及滋养外胚层细胞评分^[4]。≤37 岁患者, 前 3 个周期治疗最多移植 2 个胚胎, >37 岁患者以及第 3 周期以上患者移植胚胎数不超过 3 个, 囊胚最多移植 2 个。根据胚胎发育情况选择 1~3 个可利用胚胎移植入宫腔。

胚胎移植 14 d 后进行血 HCG 检测, 血 HCG >25 U/L 定义为 HCG 阳性, 阳性者妊娠 6 周, 8 周行 B 超监测, 观察到妊娠囊的为临床妊娠, 未观察到妊娠囊为生化妊娠。6 周 B 超确定妊娠随后于 12 周前 B 超提示失去所有胚胎定义为早期自然流产。

统计 HBV 感染组和未感染组的临床结局, 分析两组的基础参数, 并统计不同模式 HBV 感染组之间的临床结局。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)或率(%)表示。R×C 列联表行 χ^2 检验, 计量资料用单因素方差分析或 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

共有 601 个 HBV 感染患者共 637 个移植周期纳入研究, 对照组为 1 817 个未感染 HBV 患者共 1 892 个周期。

HBV 感染患者平均年龄(31.23±4.21)岁。HBV 感染组与未感染组相比, 着床率分别为 36.28% vs 34.69%, 妊娠率 51.65% vs 51.27%, 早期自然流产率 9.42% vs 9.79%, 异位妊娠率为 2.74% vs 3.09%, 均没有统计学差异($P > 0.05$, 表 1)。

通过对 HBV 感染组和未感染组的基础及临床参数比较, 发现两组患者年龄、不孕类型、不孕因素、不孕年限以及方案名称、周期数、启动剂量、

表 1 HBV 感染组和未感染组的临床结局比较
Table 1 IVF/ICSI outcome of HBV infected couples compared with uninfected couples [% (n/N)]

	HBV infected couples	HBV uninfected couples	P
ET cycles	637	1892	
Implantation rate	36.28(468/1 290)	34.69(1 314/3 788)	0.301
Clinical pregnancy per ET	51.65(329/637)	51.27(970/1 892)	0.868
Early abortion rate	9.42(31/329)	9.79(95/970)	0.844
Ectopic pregnancy rate	2.74(9/329)	3.09(30/970)	0.743

ET: embryo transfer

Gn总量以及总时间、HCG 日内膜厚度、激素水平、获卵数、受精情况以及移植情况均没有统计学差异($P > 0.05$, 表 2), 基础内分泌水平中, 内分泌 E2、内分泌 LH 两组比较有统计学差异($E2: 144.28 \pm 123.49$ vs 134.02 ± 106.61 ; $LH: 3.79 \pm 2.58$ vs 3.53 ± 1.90 ; $P < 0.05$)。降调日的 FSH, E2 水平两组有统计学差异 (FSH: 1.73 ± 1.07 vs 1.85 ± 1.22 ; $E2: 46.79 \pm 22.17$ vs 49.81 ± 34.88 ; $P < 0.05$, 表 2)。

进一步对不同模式 HBV 感染患者进行组间比较她们的临床结局, 发现男性患者 HBV 感染的比例高于女性, 不同模式 HBV 感染的发生率男性也高于女性, 着床率、妊娠率、早期自然流产率、异位妊娠率不同模式的 HBV 感染组间均没有统计学差异($P > 0.05$, 表 3)。

3 讨 论

3.1 HBV 感染对卵巢反应以及 IVF 结局的影响

在动物实验中, HBV 转基因小鼠的超排卵数明显低于野生型小鼠的超排数^[5]。我们在对 HBV 感染组和未感染组的基本参数以及实验室数据进行分析之后, 发现基础血清 E2, LH 以及超排卵第 1 天的血清 FSH, E2 水平在 HBV 感染组和未感染组存在显著差异, 但是仍然在正常值范围内, 对卵巢反应没有产生不良影响, 基础 FSH 以及超排卵第 1 天的 LH 两组相似, 说明 HBV 感染状态对妇女卵巢储备能力以及卵巢对促排卵治疗的反应性无影响, 这种激素水平的差异可能与样本量有关, 并不会直接影响卵巢反应性和妊娠结局。本研究着床率和妊娠率在感染组和未感染组也没有显著影响。Oger 等^[6]认为男性携带 HBV 病毒降低可移植胚胎数目。有研究认为继续妊娠率和活产率

以及着床率在 HBV 组显著高于未感染组^[2]。不足的是, 这两项分析样本量太少, 仅 32 ~ 34 例 HBV 感染患者。也有研究认为 HBV 感染夫妇和未感染夫妇比较, 除了卵裂率较低外, HBV 感染夫妇的胚胎继续发育的潜能和 IVF 结局与未感染者相似^[8]。我们的大样本量研究发现, 与未感染组比较, HBV 感染患者的获卵数, 卵裂数, 优质胚胎数, 冷冻胚胎数以及着床率, 妊娠率均没有显著差异, HBV 感染患者可获得与未感染患者相似的妊娠结局。

3.2 HBV 感染对男性精液形态学以及质量的影响

有研究认为与正常男性相比, HBV 感染男性患者精液体积低, 精子活力弱, 形态差^[1, 3, 6]。也有研究认为男方 HBV 慢性感染对体外受精 - 胚胎移植治疗结局无影响^[8]。本研究没有对男性 HBV 携带者的精子形态以及质量进行分析, 但是从基础参数的分析可以看出, HBV 感染组 ICSI 的比例与未感染组相比没有显著增加, 说明 HBV 感染者并不会导致患者严重的少弱畸精子症。

3.3 不同模式 HBV 感染的 IVF 结局

目前, 仅有文献报道夫妻一方或者双方为 HBV 感染者时的 IVF 结局^[1-3, 6-8], 尚未对夫妻一方或者双方不同模式的 HBV 感染进行 IVF 结局的比较, 本研究发现在夫妻一方不同模式的 HBV 感染者以及夫妻双方均为 HBV 感染者的各组之间, IVF 结局没有显著差异, 说明不同模式 HBV 感染的夫妻患者行 IVF 治疗时不会影响治疗结局, 对患者的临床妊娠以及早期继续妊娠不会产生影响。

3.4 HBV 感染行 IVF 的安全性

关于 HBV 阳性患者行 IVF 的安全性问题, 是否会造成胚胎的早期流产, 以及垂直传播和交叉传播? 以及 HBV 患者配子以及胚胎的甲基化状态是否会发生改变? 我们没有发现 HBV 患者会导致流产率的增加。有研究发现乙肝大三阳患者血清、卵泡液、精子上游液和 IVF 培养液中 HBV DNA 阳性率高, 但 IVF 培养环境乙肝病毒检出率逐渐降低, 提示体外培养没有增加病毒垂直传播风险^[9]。另外有研究发现 HBsAg 阳性的男性或者女性患者的胚胎中均能部分检测到 HBV DNA 或 HBV RNA^[10-11], 说明在卵子和胚胎中 HBV 的存在可能导致种系的垂直传播。也有研究发现 IVF 周期中, HIV、HCV、HBV 血清学阳性患者在卵子或者胚胎培养和玻璃化冷冻后没有检测到病毒序列, 没有

表 2 HBV 感染组和未感染组的基础及临床参数比较

Table 2 Analysis of the basic and clinical characters of HBV infected couples compared with uninfected couples

	HBV infected couples	HBV uninfected couples	P
Age/years	31.23 ± 4.21	31.39 ± 4.36	NS
T on day 3/ (nmol/L)	3.03 ± 13.67	2.31 ± 5.53	NS
PRL on day 3/ (ng/ml)	25.45 ± 40.79	26.60 ± 40.93	NS
E2 on day 3 /(pmol/L)	144.28 ± 123.49	134.02 ± 106.61	0.04
LH on day 3 /(U/L)	3.79 ± 2.58	3.53 ± 1.90	0.02
FSH on day 3/ (U/L)	5.97 ± 0.86	6.20 ± 0.30	NS
Primary infertility	340(53.4%)	993(52.5%)	NS
Reason of infertility			NS
Tubal factor	347(54.5%)	1071(56.6%)	
Ovulation disorders	30(4.7%)	75(3.96%)	
Endometriosis	18(2.8%)	45(2.38%)	
Spermatozoa factor	105(16.5%)	304(16.1%)	
Both sides factor	134(21.2%)	391(20.7%)	
Unexplained	3(0.47%)	6(0.32%)	
Length of infertility/years	4.64 ± 3.04	4.72 ± 3.28	NS
IVF cycles	508(79.7%)	1485(78.5%)	NS
Cycles of this treatment	1.30 ± 0.66	1.30 ± 0.64	NS
FSH on day 1 of stimulation /(U/L)	1.73 ± 1.07	1.85 ± 1.22	0.03
E2 on day 1 of stimulation /(pmol/L)	46.79 ± 22.17	49.81 ± 34.88	0.01
LH on day 1 of stimulation/ (U/L)	1.33 ± 2.88	1.21 ± 0.79	NS
GnRHa dose/mg	1.17 ± 0.49	1.21 ± 0.59	NS
Time of start stimulation	5.53 ± 2.40	5.70 ± 2.71	NS
Start dose of gonadotropin /U	164.88 ± 58.33	165.47 ± 60.11	NS
Time of ovarian stimulation/d	12.30 ± 2.04	12.24 ± 2.19	NS
Total dose of gonadotropin/U	2 551 ± 1 000	2 509 ± 1 001	NS
Endometrial thickness on day of hCG/mm	10.70 ± 1.97	10.64 ± 3.85	NS
No. of follicle>15 mm on day of hCG	10.88 ± 5.66	11.01 ± 5.74	NS
E2 on day of hCG /(pmol/L)	10 945 ± 4 661	10 720 ± 5 597	NS
LH on day of hCG /(U/L)	0.96 ± 0.98	1.10 ± 0.98	NS
Progesterone on day of hCG/(nmol/L)	2.61 ± 1.47	2.62 ± 1.83	NS
No. of oocytes fertilized	9.35 ± 4.96	9.01 ± 4.88	NS
No. of oocytes cleaved	9.15 ± 4.90	8.82 ± 4.83	NS
No. of oocytes retrieved	11.89 ± 5.78	11.77 ± 5.71	NS
No. of high-quality embryos	2.52 ± 2.32	2.38 ± 2.23	NS
No. of embryo cryopreserved	3.33 ± 3.48	3.04 ± 3.33	NS
Time of embryo transferred/d	3.04 ± 0.37	3.04 ± 0.33	NS
No. of embryo transferred	2.03 ± 0.47	2.00 ± 0.38	NS
No. of embryo implantation	1.42 ± 0.54	1.36 ± 0.49	NS

证据说明病毒血清学阳性患者存在交叉传播的风险^[12]。本研究仅根据患者血清 HBV 标记物的不同进行分组研究, 尚没有对卵泡液和精液进行 HBV 标记物的研究。但是, 采用血清 HBV 标记物进行分组研究, 更能反映 HBV 患者不同模式在中国人

群中的分布, 也能比较好的说明 HBV 血清学携带者行 IVF 对妊娠结局的影响程度。本研究不足之处在于, 尚无法证明 HBV 血清学携带者行 IVF 治疗是否会对子代的安全性以及垂直传播产生影响, 这需要行进一步的研究。

表 3 不同亚型 HBV 感染患者临床结局比较

Table 3 IVF/ICSI outcome of different serological profile types with HBV infected couples [% (n/N)]

	Type						
	1	2	3	4	5	6	7
ET cycles	96	43	172	104	101	57	51
Implantation rate	35.45(67/189)	35.71(30/84)	35.83(129/360)	28.17(60/213)	38.50(77/200)	38.46(45/117)	42.06(45/107)
Clinical pregnancy per ET	48.96(47/96)	51.16(22/43)	49.42(85/172)	42.31(44/104)	56.44(57/101)	54.39(31/57)	64.71(33/51)
Early abortion rate	6.38(3/47)	13.64(3/22)	8.24(7/85)	2.27(1/44)	17.54(10/57)	16.13(5/31)	9.09(3/33)
Ectopic pregnancy rate	6.38(3/47)	0.00	2.35(2/85)	0.00	1.75(1/57)	0.00	6.06(2/33)

Type 1: paternal HBsAg(+)HBeAg(+)HBc-IgG Ab(+); type 2: Female HBsAg(+)HBeAg(+)HBc-IgG Ab(+); type 3: paternal HBsAg(+)HBeAb(+)HBc-IgG Ab(+); type 4: Female HBsAg(+)HBeAb(+)HBc-IgG Ab(+); type 5: paternal HBsAg(+)HBc-IgG Ab(+); type 6: Female HBsAg(+)HBc-IgG Ab(+); type 7: paternal HBsAg(+) and Female HBsAg(+). All $P > 0.10$ among different serological profile types

综上,HBV 患者行 IVF 治疗对妊娠结局没有影响,不同模式的 HBV 感染患者妊娠结局相似。但是本研究尚无法证明不同模式 HBV 感染患者的子代安全性以及垂直传播风险。

参考文献

[1] Zhou XP, Hu XL, Zhu YM, et al. Comparison of semen quality and outcome of assisted reproductive techniques in Chinese men with and without hepatitis B[J]. Asian J Androl, 2011, 13(3): 465-469.

[2] Lam PM, Suen SH, Lao TT, et al. Hepatitis B infection and outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer treatment[J]. Fertil Steril, 2010, 93(2): 480-485.

[3] Lee VC, Ng EH, Yeung WS, et al. Impact of positive hepatitis B surface antigen on the outcome of IVF treatment[J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(5): 712-717.

[4] Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 1999, 11(3): 307-311.

[5] 尚书江,孔德强,王冬平,等. HBV 转基因小鼠胚胎玻璃化冷冻保存研究[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(3): 139-142.

Shuang SJ, Kong DQ, Wang DP, et al. Cryopreservation of Embryos of HBV Transgenic Mice in a Vitrification Solution[J]. Chin J Comp Med, 2005, 15(3): 139-142.

[6] Oger P, Yazbeck C, Gervais A, et al. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF[J]. Reprod Biomed Online, 2011, 23(2): 207-212.

[7] 吴娟子,刘佳,朱桂金. 关于辅助生殖技术中 HBV 感染者胚胎发育和 IVF 结局的研究[J]. 中国优生与遗

传杂志, 2008, 16(10), 99-103.

Wu JZ, Liu J, Zhu GJ. The embryo development and IVF outcome of HBV infected couples seeking for assisted reproduction treatment[J]. Chin J Birth Health Heredity, 2008, 16(10), 99-103.

[8] 赵二勇,陈士岭,孙玲,等. 男方 HBV 慢性感染对体外受精—胚胎移植治疗结局的影响[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(12): 1827-1830.

Zhao EY, Chen SL, Sun L, et al. Influence of chronic HBV infection in the husband on the outcome of IVF-ET treatment[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2007, 27(12): 1827-1830.

[9] 罗莉,刘平,廉颖,等. 乙肝病毒携带者实施体外受精处理的垂直传播风险[J]. 现代妇产科进展, 2007, 12(16): 901-904.

Luo L, Liu P, LianY. Vertical transmission risk in the patient with hepatitis B virus in vitro fertilization [J]. Prog Obstet Gynecol, 2007, 12(16): 901-904.

[10] Nie R, Jin L, Zhang H, et al. Presence of hepatitis B virus in oocytes and embryos: a risk of hepatitis B virus transmission during in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 2011, 95(5): 1667-1671.

[11] Ye F, Jin Y, Kong Y, et al. The presence of HBV mRNA in the fertilized in vitro embryo of HBV patients confirms vertical transmission of HBV via the ovum [J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(5): 926-930.

[12] Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ, et al. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles[J]. Fertil Steril, 2012, 97(1): 74-78.

(编辑 徐杰)