

非强效卵巢刺激的地中海贫血患者胚胎种植前遗传学 诊断助孕治疗结局

袁媛, 袁茜, 徐艳文, 周灿权*

(中山大学附属第一医院生殖医学中心//广东省生殖医学重点实验室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】观察非强效卵巢刺激的地中海贫血(地贫)患者胚胎种植前遗传学诊断助孕治疗结局,探讨特殊助孕目的下地贫患者卵巢反应性及合适的刺激强度。【方法】收集 70 名因地中海贫血行胚胎种植前遗传学诊断治疗(实验组)及 57 名因男方因素行单精子卵胞浆内注射患者(对照组),比较其在同等强度刺激下的卵巢反应及临床结局。【结果】在基础内分泌水平及卵巢刺激强度可比情况下,实验组可移植胚胎数显著少于对照组,差异具有统计学意义($P=0.021$);两组患者的获卵数、临床妊娠率、每移植周期活产率均没有统计学差异。【结论】地贫状态不影响患者卵巢反应性,在非强效卵巢刺激下,行胚胎种植前遗传学诊断助孕治疗的地贫患者也可获得满意的临床结局。

关键词:地中海贫血;胚胎种植前遗传学诊断;卵巢刺激;临床结局

中图分类号:R715.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2014)05-0753-05

Assisted Reproductive Outcomes of Thalassemia Carriers Undergoing Preimplantation Genetic Diagnosis with Routine Ovarian Stimulation

YUAN Yuan, YUAN Xi, XU Yan-wen, ZHOU Can-quan*

(Reproductive Research Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University//Key Laboratory of Reproductive Medicine of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the assisted reproductive outcomes of thalassemia carriers undergoing preimplantation genetic diagnosis with routine ovarian stimulation, and to explore the ovarian response characteristics of thalassemia carriers and the proper ovarian stimulation intensity if they sought after PGD treatment. 【Method】 We reviewed the outcome of couples that both carried mutation attributed to thalassemia (study group) and couples in which with male factors underwent ICSI (control group). All patients received routine ovarian stimulation. Ovarian response, oocyte number and pregnancy outcome were recorded. 【Results】 No difference was observed for patient demographic and baseline clinical characteristics. No difference in COS parameters was observed for the total dose of recombinant FSH and the number of retrieved oocytes. However, the number of embryos transferable was significant lower in study group than in the control ($P = 0.021$). For both groups, pregnancy outcomes including clinical pregnancy rate and live birth rate were similar per cycle. 【Conclusion】 Ovarian response is not impaired by thalassemia carrier status and satisfactory clinical outcomes could be achieved with routine ovarian stimulation for thalassemia carriers undergoing preimplantation genetic diagnosis.

Key words: thalassemia; preimplantation genetic diagnosis; ovarian stimulation; clinical outcomes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5): 753-757]

地中海贫血(地贫)是中国东南部沿海地区最常见的单基因遗传病,人群中 α -地中海贫血及

β -地中海贫血的发病率分别为 10.3% 及 2.8%^[1]。由于重型地贫患儿给家庭及社会带来沉重负担,

收稿日期:2014-05-06

基金项目:广州市科技计划项目(201300000097)

作者简介:袁媛,医学博士,住院医师,研究方向:辅助生殖,E-mail:christy.beauty.yuan@gmail.com; *通信作者:周灿权,E-mail:zhoucanquan@hotmail.com

目前广泛应用胚胎种植前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD) 技术降低其发病率及改变其带来的不良妊娠结局^[2]。因 PGD 而行的助孕治疗周期, 约 70% 起始周期可获得成功移植, 每移植周期种植率及临床妊娠率分别为 17% 及 25%^[3]。由于 PGD 可移植胚胎比例低; 既往报道胚胎活检影响胚胎后期发育潜能^[4]; 且商业化诊断芯片及胚胎相关操作使得 PGD 治疗成本较高; 因各种遗传病导致反复妊娠失败及已有患儿家庭沉重的经济及社会负担等多种因素的综合考虑, 目前为提高 PGD 治疗临床妊娠率及活产率, 国内普遍倾向采用强效的卵巢刺激方案以获得更多可用于体外受精的卵细胞。但强效的卵巢刺激易导致卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulationsyndrom, OHSS) 发生^[5], 且获得的大量卵细胞其质量参差不齐^[6], 卵巢高反应也影响子宫内膜的容受性^[7], 强效卵巢刺激方案在 PGD 治疗是否必须, 目前仍存争议。本研究将探讨非强效卵巢刺激方案是否影响地中海贫血患者 PGD 助孕治疗结局, 为 PGD 助孕治疗周期卵巢刺激强度选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究为回顾性研究, 实验组选择 2011 年 10 月至 2012 年 9 月在中山大学附属第一医院生殖中心因地中海贫血行 PGD 治疗的 70 名患者, 其夫妇双方均为轻型地贫患者; 对照组选择同期因男方因素行单精子卵胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 的 57 名患者。所有研究对象年龄在 21 ~ 45 岁之间, 月经周期正常, 均无生殖系统及其他基础疾病, 行第一周期助孕治疗。实验组及对照组移植胚胎均为第 5 天囊胚。本研究通过了中山大学附属第一医院伦理委员会的审查, 并得到参与患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 控制性超排卵方案 所有研究对象均采用长方案进行卵巢刺激。确认排卵或使用口服避孕药第 15 ~ 16 天的黄体中期, 一次性给予曲普瑞林(达菲林, 伊普生, 法国) 1.0 mg 皮下注射降调节, 确认降调节水平后 [血清促卵泡生成素(follicular stimulation hormone, FSH) < 5 mU/mL, 促黄体生成

素(luteinizing hormone, LH) < 5 mU/mL, 雌二醇(estradiol, E₂) < 50 pg/mL], 当阴道 B 超下卵巢内可见窦卵泡直径为 5 ~ 6 mm 时, 根据患者基础窦卵泡数及体重情况, 予合适剂量重组促卵泡生成素(recombined follicular stimulation hormone, rFSH; 果纳芬, 雪兰诺, 瑞士) 启动卵巢刺激, 其后每隔 3 ~ 5 d 根据需要进行经阴道 B 超及血清 FSH、LH、E₂ 水平检测监测卵泡发育情况, 根据卵泡发育情况可适当增加 FSH 剂量。当血清 LH < 0.5 mU/mL 时, 适量添加人尿促性腺激素(human menopausal gonadotropin, HMG; 注射用尿促性素, 丽珠, 中国)。

1.2.2 取卵和受精 当 ≥ 3 个卵泡的平均直径 ≥ 18 mm, 于当天停用促性腺激素, 于外源性促性腺激素最后一次给药后的 36 h 注射重组人绒毛膜促性腺激素(recombined human chorionic gonadotrophin, rHCG) 250 μg(艾泽, 雪兰诺, 瑞士), 36 h 后行经阴道超声显像引导下穿刺取卵术。受精、胚胎培养均按照本中心工作常规进行。

1.2.3 胚胎活检、移植及黄体支持 胚胎体外培养第 3 天, 实验组患者所有 5 细胞及以上胚胎以机械法取 1 个细胞活检, 通过 PCR 技术诊断是否为重型地贫胚胎。所有非重型地贫胚胎定义为可移植胚胎, 体外培养至第 5 天, 形成囊胚, 择优质囊胚 2 ~ 3 枚移植。对照组患者胚胎无需活检, 全部体外培养至第 5 天, 择优移植 2 ~ 3 枚囊胚。所有患者取卵当天即开始黄体支持, 阴道用黄体酮(雪诺酮, 雪兰诺, 瑞士) 90 mg, 每日 1 次。胚胎移植后第 12 天, 血清 β-HCG 检测确定生化妊娠状态。血清 β-HCG 为阳性, 则继续黄体支持至胚胎移植后 4 ~ 5 周行超声检查确认临床妊娠状态, 计数胚囊数、胚芽数、有无胎心活动, 其后宫腔内活胎的患者黄体支持至妊娠 10 周。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理数据, 对各组患者的定量资料, 如年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、基础 FSH、LH、E₂、总睾酮(testosterone, T)、催乳素(prolactin, PRL) 水平、启动日 FSH、LH、E₂ 水平、卵巢刺激时间、起始 FSH 剂量、FSH、LH 总量、HCG 日 FSH、LH、E₂、孕酮(progesterone, P) 水平、HCG 日子宫内膜厚度、获卵数、可利用胚胎数、可移植胚胎数、移植胚胎数使用独立样本 *t* 检验; 比率类定量资料, 如受精率、卵裂率使用方差齐性 Levene 检验后再采用定量资料的单因素方差分

表1 两组患者基础特征比较

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients

Characteristic	PGD	ICSI	P
Female age/years	31.03 ± 3.95	31.32 ± 4.58	0.705
BMI/(kg/m ²)	20.77 ± 2.31	20.60 ± 1.81	0.652
Basal FSH/(mU/mL)	6.03 ± 2.08	5.90 ± 1.60	0.711
Basal LH/(mU/mL)	3.25 ± 1.52	3.21 ± 1.42	0.892
Basal E ₂ /(pg/mL)	32.11 ± 20.51	33.15 ± 11.04	0.737
Basal PRL/(μg/mL)	18.52 ± 11.98	17.76 ± 7.53	0.688
Basal T/(ng/mL)	0.60 ± 0.34	0.61 ± 0.29	0.855

析;对各组患者的定性资料,如妊娠率、植入率、临床妊娠率、流产率、异位妊娠率、每移植周期活产率、多胎妊娠率及OHSS发生率使用卡方检验; $P < 0.05$ 定义为差异具有统计学意义。其中统计量定义为:受精率 = 受精卵数/获卵数;卵裂率 = 卵裂胚胎数/受精卵数;妊娠率 = 血 β -HCG 阳性周期数/移植周期数;种植率 = 种植胚胎数(以孕囊计)/移植胚胎数;临床妊娠率 = 出现孕囊(宫内或宫外)周期数/移植周期数;流产率 = 流产周期数/总临床妊娠周期数;异位妊娠率 = 宫外孕囊的周期数/总临床妊娠周期数;每移植周期活产率 = 活产儿

数/总移植周期数;多胎率 = 宫内胚芽 ≥ 2 个的周期数/总临床妊娠周期数;OHSS率 = OHSS例数/完成取卵的病例数。

2 结果

共计 127 个助孕周期纳入回顾性研究分析,其中 70 个 PGD 助孕周期为实验组,57 个 ICSI 助孕周期为对照组。两组患者的年龄、BMI、基础 FSH、LH、E₂、T 水平无统计学差异(表 1)。

在卵巢刺激过程中,两组患者卵巢刺激起始

表2 两组患者卵巢刺激过程中相关数据比较

Table 2 Clinical parameters of patients during ovarian stimulation

Parameters	PGD	ICSI	P
FSH at stimulation/(mU/mL)	2.34 ± 1.54	1.83 ± 0.94	0.056
LH at stimulation/(mU/mL)	0.95 ± 0.42	1.03 ± 0.58	0.429
E ₂ at stimulation/(pg/mL)	12.06 ± 5.95	12.37 ± 6.77	0.813
FSH at HCG administration/(mU/mL)	15.98 ± 6.01	13.27 ± 5.04	0.015
LH at HCG administration/(mU/mL)	0.70 ± 0.59	0.82 ± 0.55	0.255
E ₂ at HCG administration/(pg/mL)	3 060.8 ± 1 241.8	3 406.7 ± 1167.3	0.121
P at HCG administration/(ng/mL)	0.73 ± 0.33	0.66 ± 0.27	0.175
Duration of stimulation/d	10.99 ± 2.03	11.30 ± 2.01	0.388
Starting dose of FSH/U	201.77 ± 46.06	189.89 ± 48.35	0.160
Total FSH dose/U	2 396.9 ± 735.8	2 301.5 ± 762.6	0.476
Total LH dose/U	263.03 ± 228.27	287.91 ± 219.29	0.535
Endometrial thickness on HCG day/mm	11.30 ± 2.35	12.17 ± 2.24	0.045
Oocytes retrieved	14.93 ± 5.62	14.26 ± 5.88	0.517
Fertilization rate /%	82.85%	78.93	0.098
Cleavage rate /%	97.00%	94.89	0.216
Embryos utilizable	8.67 ± 3.42	7.60 ± 3.44	0.081
Embryos transferable	3.03 ± 1.81	4.25 ± 3.56	0.021
Embryos transferred	2.00 ± 0.54	2.14 ± 0.40	0.104

表 3 两组患者临床结局比较

Outcome	Table 3 Clinical outcomes of participants		
	PGD	ICSI	[n/N(%)]
Pregnancy rate	34/70(48.6)	31/57(51.4)	0.514
Implantation rate	46/140(32.9)	40/122(32.8)	0.990
Clinical pregnancy rate	31/70(44.3)	28/57(49.1)	0.587
Miscarriage rate	3/31(9.7)	7/28(25.0)	0.117
Ectopic pregnancy rate	1/31(3.2)	0	0.338
Live birth rate per transfer	39/70(55.7)	32/57(56.1)	0.553
Multiple pregnancy rate	12/31(38.7)	12/28(42.9)	0.746
OHSS rate	4/70(5.7)	0	0.067

日及 HCG 日的生殖激素水平没有统计学差异,两组患者起始 FSH 用量、总 FSH 及 LH 用量及卵巢刺激时间也没有统计学差异,但实验组 HCG 日子宫内膜厚度 $[(11.30 \pm 2.35) \text{ mm}]$ 显著低于对照组 $[(12.17 \pm 2.24) \text{ mm}]$,差异具有统计学意义($P=0.045$)。实验组可移植胚胎数 (3.03 ± 1.81) 显著少于对照组 (4.25 ± 3.56) ,差异具有统计学意义($P=0.021$),但两组患者的获卵数、受精率、卵裂率、可利用胚胎率及移植胚胎数均没有统计学差异(表 2)。

实验组 31 名患者获得临床妊娠(44.3%),27 名患者足月妊娠,共获得 39 名活产儿,无出生缺陷者,对照组为 28 名患者获得临床妊娠(49.1%),21 名患者足月妊娠,共获得 32 名活产儿,无出生缺陷者。两组患者的妊娠结局,如妊娠率、胚胎着床率、临床妊娠率、流产率、异位妊娠率、每移植周期活产率、多胎妊娠率及 OHSS 发病率均没有统计学差异(表 3)。

3 讨 论

目前 PGD 技术广泛应用于染色体异常、X 染色体连锁性疾病及单基因病患者^[8],诊断治疗流程日臻完善,卵巢刺激获得适量高质量卵细胞是优化助孕治疗结局的关键步骤^[9]。但遗传性疾病对卵巢反应的影响至今未完全阐明,2005 年有研究分析了 61 个因女性相互易位及 46 个因男性相互易位而行 PGD 治疗的周期,结果提示,女性染色体平衡易位状患者卵巢反应不良比例较高^[10];而 2011 年研究分析了 79 个因女性相互易位及 116 个因男性相互易位而行 PGD 治疗的周期,结

果提示两组患者卵巢刺激结局及临床治疗结局不存在差异^[11]。目前,对于单基因病对超排卵中卵巢反应的影响尚未有报道,本研究分析了 70 个因地贫行 PGD 治疗及 57 个因男方因素行 ICSI 治疗的周期,在两组患者年龄、BMI 及基础生殖激素水平没有显著性差异的情况下,采用同等剂量的卵巢刺激,两组患者的获卵率及可利用胚胎率没有显著性差异,提示地贫基因携带状态不影响女性患者的卵巢反应性及后期胚胎发育潜能。

胚胎活检作为 PGD 的重要操作,其对胚胎后期的发育潜能的影响一直是 PGD 技术发展的重要研究方向。从 1990 年 PGD 应用于临床以来,较多的回顾性研究提示胚胎活检操作并不会对植入前胚胎的发育造成损害^[12-14],但是相较于自然妊娠,通过 PGD 助孕诞生的婴儿出生缺陷的比例较高^[15-18]。同借助体外受精胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF)/ICSI 等助孕技术出生的婴儿比较,PGD 婴儿人群出生缺陷的比例并没有明显增加^[19-20],也从另一个侧面证实胚胎活检技术的安全性。本研究中,PGD 诊断后实验组的可移植胚胎数明显低于对照组,但这主要来自于基础疾病状态带来的胚胎损耗,在后期移植胚胎数目相当的情况下,实验组及对照组的临床妊娠率及每移植周期活产率均没有显著性差异,说明活检操作对胚胎后期发育的影响可忽略不计。

目前尚没有研究报道地贫患者行助孕治疗卵巢的反应性,在临床操作中,常规将地中海贫血等单基因疾病同染色体病等同,采用强效的卵巢刺激以获得大量的卵细胞。本研究首次阐释了地贫状态并不影响患者卵巢反应性,在非强效卵巢刺

激下,地贫患者可获得满意的促排卵结果。在目标获卵数为6~15个的卵巢刺激下^[21],地贫患者行PGD助孕治疗的临床结局并不因为胚胎活检造成的胚胎损耗而明显降低,与同等剂量因单纯男性因素行ICSI助孕治疗的患者临床结局相当,以此为今后地贫患者PGD治疗的卵巢刺激强度提供参考。

参考文献

- [1] Cai R, Li L, Liang X, et al. Prevalence survey and molecular characterization of alpha and beta thalassemia in Liuzhou city of Guangxi[J]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2002, 23(4): 281-285.
- [2] Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view[J]. *Hum Reprod Update*, 2002, 8(5): 11-20.
- [3] Bsille C, Frydman R, Aly AE, et al. Preimplantation genetic diagnosis: State of the art[J]. *Eur J Obstet Gyn R B*, 2009, 145(9): 9-13.
- [4] Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, et al. Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2723-2728.
- [5] Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(2): 389-400.
- [6] Tarín JJ, Sampaio MC, Calatayud C, et al. Relativity of the concept 'high responder to gonadotrophins'[J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(1): 19-22.
- [7] Chen QJ, Sun XX, Li L. Effects of ovarian stimulation on endometrial integrin beta 3 and leukemia inhibitory factor expression in the peri-implantation phase [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(3): 1357-1363.
- [8] Verpoest W, Haentjens P, De Rycke M, et al. Cumulative reproductive outcome after preimplantation genetic diagnosis: a report on 1498 couples[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(9): 2951-2959.
- [9] Fauser BC, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment[J]. *Lancet*, 2005, 365(9): 1807-1816.
- [10] Chen SH, Escudero T, Cekleniak NA, et al. Patterns of ovarian response to gonadotropin stimulation in female carriers of balanced translocation[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1504-1509.
- [11] Dechanet C, Castelli C, Reyftmann L, et al. Do female translocations influence the ovarian response pattern to controlled ovarian stimulation in preimplantation genetic diagnosis? [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(5): 1232-1240.
- [12] Hardy K, Martin K, Leese H, et al. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage[J]. *Hum Reprod*, 1990, 5(6): 708-714.
- [13] Gianaroli L, Magli M, Ferraretti A, et al. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos[J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(8): 1128-1131.
- [14] De Vos A, Staessen C, De Rycke M, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(12): 2988-2996.
- [15] Rimm A, Katayama A, Diaz M, et al. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2004, 21(9): 437-443.
- [16] Hansen M, Bower C, Milne E, et al. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(9): 328-338.
- [17] Lie R, Lyngstadaas A, Orstavik K, et al. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods: a meta-analysis[J]. *Int J Epidemiol*, 2005, 34(9): 696-701.
- [18] Wen J, Jiang J, Ding C, et al. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(6): 1331-1337.
- [19] Liebaers I, Desmyttere S, Verpoest W, et al. Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(1): 275-282.
- [20] Desmyttere S, De Rycke M, Staessen C, et al. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(1): 288-293.
- [21] Ji J, Liu Y, Tong XH, et al. The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China[J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(10): 2728-2734.

(编辑 徐杰)