

囊胚解冻过夜培养后移植对妊娠结局的影响

岳超敏¹, 方丛^{1*}, 宫晓², 李俐琳¹, 李婷婷¹, 梁晓燕¹

(中山大学 1.附属第六医院生殖中心 广东 广州 510610; 2.公共卫生学院医学统计与流行病学系 广东 广州 510080)

摘要:【目的】比较行囊胚移植的复苏周期中,解冻后经2~3 h培养或过夜培养后移植对妊娠结局的影响。【方法】回顾性分析本中心2010年9月至2012年10月进行复苏周期囊胚移植的523个周期资料,按照解冻后至移植前时间不同分为2组:解冻2~3 h后当天移植(OTET, $n = 247$)、提前1 d解冻过夜培养后移植(1TET, $n = 276$),对其妊娠结局进行比较。【结果】1TET组与OTET组相比移植了较少的胚胎个数(1.6 vs. 1.8, $P < 0.001$),获得较高的妊娠率(57.6% vs. 56.3%)、种植率(46.3% vs. 44.1%)和较低的流产率(9.4% vs. 12.2%)、多胎率(28.3% vs. 36.7%)。但除移植胚胎个数外,其他各妊娠结局指标的差异无统计学意义。人工周期(HRT)作内膜准备获得较高的妊娠率(62.8% vs. 53.0%, $P = 0.027$)。单囊胚移植周期分析发现,第5天发育为囊胚的胚胎比第6天的囊胚具有较高的种植率(57.6% vs. 36.1%, $P = 0.004$)。【结论】提前1 d解冻囊胚过夜培养后再移植不会影响主要妊娠结局。影响妊娠率的因素有内膜准备方法和发育为囊胚的天数。降低多胎率可考虑D5单囊胚移植。

关键词: 胚胎玻璃化冷冻;囊胚移植;复苏胚胎移植;自然周期;人工周期

中图分类号: R711.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)03-0415-07

Impact of Pregnancy Outcomes for Overnight Cultured Thawed-Frozen Blastocyst transfer

YUE Chao-min¹, FANG Cong^{1*}, GONG Xiao², LI Li-lin¹, LI Ting-ting¹, LIANG Xiao-yan¹

(Reproductive Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510160, China; Department of Medical statistics and Epidemiology, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To compare the impact of pregnancy outcomes when frozen blastocyst was transferred 2 to 3 hours after being thawed or 16 to 20 hours after being cultured overnight. 【Methods】 Retrospectively analyze the 523 cycles of thawed blastocyst transfer from September 2010 to October 2012. All the cycles are divided into two groups based different culture time before transfer: those blastocysts transferred 2 to 3 hours after being thawed are labeled as OTET group ($n = 247$) and those cultured overnight before being transferred the next day are included in 1TET group ($n = 276$). The pregnancy outcomes are compared between the two groups. 【Results】 Compared with OTET group, 1TET group with less embryo transferred (1.6 vs. 1.8, $P < 0.001$) has higher clinical pregnancy rate (57.6% vs. 56.3%), implantation rate (46.3% vs. 44.1%) and lower miscarriage rate (9.4% vs. 12.2%) as well as lower multiple-pregnancy rate (28.3% vs. 36.7%). However, all differences between the two groups have not yet reached the statistical significance except number of blastocyst transferred. Hormone replaced treatment as endometrium preparation method for blastocyst transfer has higher clinical pregnancy rate (62.8% vs. 53.0%, $P = 0.027$). Blastocysts frozen at the fifth day after fertilization have higher implantation potential than those frozen at the sixth day (implantation rate 57.6% vs. 36.1%, $P = 0.004$) based analysis of cycle data of single blastocyst transfer. 【Conclusion】 Overnight culture of thawed blastocyst before transfer does not affect the main pregnancy outcomes. The factors related with pregnancy outcomes are endometrium preparation methods and blastocyst developmental stages. To decrease the multiple-pregnancy rate, single embryo transfer of D5 should be encouraged.

Key words: embryo vitrification; blastocyst transfer; thawed embryos transfer; natural cycle; hormone replaced treatment

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3): 415-421]

收稿日期: 2013-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(81070495)

作者简介: 岳超敏, 硕士生, 生殖医学专业, email: ycm@sdu.edu.cn; * 通信作者: 方丛, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: fangcong@163.com

由于人类辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 水平的不断提高及体外培养体系的日趋稳定,将移植后剩余胚胎冷冻,或为避免或加重卵巢过度刺激综合征 (ovarian hyper-stimulation syndrome, OHSS) 而将新鲜周期获得的胚胎进行冷冻保存已经成为常规。随之而来的冷冻胚胎复苏周期移植(thawed embryo transfer, TET)也越来越普遍。随着冷冻技术的进展,玻璃化冷冻由于对胚胎的损伤较小,已被广泛应用于卵裂期胚胎、囊胚甚至卵子的冷冻^[1-3]。最近的研究显示,胚胎培养至囊胚阶段进行玻璃化冷冻保存比卵裂期胚胎冷冻可获得更高的复苏成功率及妊娠率^[4],因此囊胚冷冻成为更好的选择。冷冻囊胚提前复苏过夜培养后再移植一方面可以方便工作安排;另一方面,可以更好地观察囊胚解冻后的质量,选择继续发育的胚胎进行移植,以筛选有发育潜能的胚胎,获得更高的每移植周期妊娠率,提高移植效率。本研究回顾性分析本中心近 2 年的囊胚解冻复苏周期的病例资料,观察囊胚提前解冻过夜培养后移植对妊娠结局的影响,以期更好地指导临床工作。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2010 年 9 月至 2012 年 10 月于本中心进行囊胚 TET 的 484 名患者共 533 个周期数据资料进行分析。期间共解冻 919 枚胚胎,解冻后凋亡 13 枚 (4 个周期解冻 5 枚胚胎全部凋亡致周期取消,8 个周期 1 枚胚胎凋亡致移植胚胎数少于解冻胚胎数),复苏成功率 98.6%。提前解冻进行观察的胚胎共 464 枚,其中停止发育的胚胎有 48 枚,持续发育比例为 89.7%。停止发育的 48 枚胚胎中有 6 个周期取消移植共废弃 9 枚胚胎,有 14 个周期的 14 枚胚胎停止发育废弃后,移植胚胎个数少于解冻胚胎个数,还有 22 个周期中 25 枚胚胎虽然观察到发育停滞仍然进行了移植。最终有 523 个周期共移植了 883 枚胚胎。

以上操作均按照本中心常规,对胚胎冷冻、复苏、移植或废弃均充分告知患者,获得同意并签署知情同意书。

1.2 囊胚培养和胚胎评分

按照本中心常规进行控制性超排卵

(controlled ovarian hyperstimulation, COH)^[5]。授精方式采用常规体外受精或单精子胞浆内注射。囊胚培养采用商业化的序贯培养液 (G5 series, Vitrolife AB company, Sweden)。囊胚的评分按照 Gardner 评分系统^[6]进行,简述如下:根据囊腔扩张程度进行分期:囊腔不足胚胎体积的 50%为 1 期;超过 50%为 2 期;占满整个胚胎为 3 期;囊腔扩张、透明带变薄为 4 期;囊胚开始从透明带里孵出为 5 期;囊胚完全孵出为 6 期。处于 3~6 期的囊胚,再对内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophectoderm, TE)进行评分。ICM 评分:细胞数量多且分布紧密为 A;细胞数量较少且分布松散为 B;细胞数量非常少则为 C。TE 评分:较多的细胞形成连接紧密的上皮层为 A;较少的细胞连接松散为 B;细胞少且体积大为 C。为便于评估移植胚胎质量,我们对 2 期胚胎也按照以上原则进行了评分。冷冻胚胎的标准为:选择受精后第五天(D5)达 3BB 及以上的囊胚进行冷冻,若 D5 未达以上标准,则培养至 D6 再按照以上标准观察和冷冻。特殊情况下,对未达以上标准的部分囊胚也进行了冷冻。评分在 3BB 及其以上的胚胎被定义为优质胚胎(good embryo)。1、2 期囊胚及 ICM 或 TE 仅一项评为 C 级的胚胎定义为次级胚胎(inferior embryo)。D5 或 D6 仍停留在卵裂期或桑葚胚阶段或者 ICM 和 TE 同时被评为 C 级的胚胎归为不建议移植胚胎(poor embryo)。

1.3 囊胚冷冻复苏和移植

囊胚冷冻复苏采用本中心常规玻璃化冷冻操作方法^[7]。简述如下:在 37℃下将囊胚转移到 A 液(含 200 mL/L 血清蛋白替代物 SPS 的缓冲液 HEPES)中平衡 2 min,后转入 B 液(含 75 mL/L 乙二醇和 75 mL/L 二甲亚砷的 HEPES)平衡 2 min,最后转入 C 液(含 150 mL/L 乙二醇和 150 mL/L 二甲亚砷的 HEPES)作用 1 min 后,30 s 内将胚胎移至冷冻载体,尽快浸入液氮中保存。复苏时将囊胚从液氮中取出,浸入 0.33 mol/L 液(含 0.33 mol/L 蔗糖和 200 mL/L SPS 的 HEPES)平衡 2 min,然后转移至 0.2 mol/L 液中平衡 3 min,最后转至无蔗糖的平衡液中平衡 5 min 后转移至囊胚培养液中继续培养。3 级及以上的囊胚在冷冻前进行了人工皱缩囊腔,即采用激光系统(ZILOS-tk Laser Zona Drill System; Hamilton Thorn Bioscience, Inc., Beverly, MA, USA)在远离内胚层的一侧透明带进

行打孔(300 μs),将囊胚液释放,囊腔缩小,然后进行冷冻。2级及以下胚胎未进行激光人工皱缩。本中心对评分为优质的囊胚不超过2枚/管冷冻;未达冷冻标准进行冷冻的囊胚不超过3枚/管冷冻。根据患者冷冻保存胚胎的数量和质量,复苏周期解冻1~3枚移植。复苏后观察,移植解冻成功的所有胚胎。

1.4 分组方法

根据移植前提前解冻时间的不同,分为提前1d解冻过夜培养后ET(1TET)和当天解冻2~3h后ET(0TET)共2组。根据复苏周期内膜的准备方法,分为人工周期(hormone replaced treatment, HRT)、自然周期(natural cycle, NC)、促排周期(COH)3组。根据囊胚冷冻时发育天数(embryo developmental stage, Embryo Stage)的不同,分为受精后第5天(D5)、第6天(D6)或第7天(D7)冷冻3组。根据囊胚形态学评分评估囊胚质量(embryo score),分为优质胚胎、次级胚胎、不建议移植胚胎3组。

1.5 内膜准备(endometrium preparation, EmPrep)

内膜准备采用COH,或NC的方法时,定期进行阴道B超监测卵泡直径及内膜厚度,待内膜厚度达到7mm及以上且卵泡直径超过18~20mm时,用或不用肌肉注射人绒毛促性腺激素诱导排卵。观察到排卵后即加用肌肉注射黄体酮20mg/d,排卵后第5天进行移植。采用HRT准备内膜时,自月经第5天开始使用戊酸雌二醇(补佳乐,拜耳医药,德国),根据内膜生长情况调整剂量及用药天数。内膜达到7mm及以上且雌激素作用时间不少于10d时即以肌肉注射黄体酮60~80mg/d转化内膜。使用黄体酮后的第5天移植。

1.6 妊娠结局评价

ET后12d监测血清 β -HCG水平,若 β -HCG>50U/L,则定义为生化妊娠。生化妊娠阳性者移植35d后行阴道B超,见孕囊为临床妊娠(clinical pregnancy, CP)。孕20周以前的非人为因素胚胎丢失定义为流产(miscarriage, Mis)。

本研究进行妊娠结局观察的指标有:临床妊娠率(为临床妊娠例数/移植周期数, clinical pregnancy rate, CPR)、流产率(为流产例数/临床妊娠例数, miscarriage rate, MisR)、种植率(为孕囊数/移植胚胎数, implantation rate, IR)、多胎率(为超过1枚孕囊的妊娠例数/临床妊娠例数, multiple pregnancy rate, MultiPR)。

1.7 统计学处理

采用SPSS18.0软件包对患者的基本资料及TET周期的相关因素进行分析。对于满足正态分布的连续型资料采用独立样本 t 检验,对于分类变量采用卡方检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 当天解冻移植(0TET)与提前1d解冻过夜培养后移植(1TET)两组间基本资料比较

患者年龄范围为21~45岁,基础卵泡刺激素(basal follicle stimulating hormone, basal FSH)水平为1.11~23.16IU/L,基础雌二醇(basal estradiol, basal E₂)浓度为9.48~100pg/mL,移植胚胎个数(number of transferred embryo, No. of embryo)为1~3个。此类指标均为近似正态分布的连续型变量,采用均数和标准差描述其分布(表1)。两组年龄、基础FSH、基础E₂差别无统计学意义。移植胚胎个数0TET组多于1TET组($P < 0.001$)。

表1 当天解冻ET和提前1d解冻过夜培养后ET两组基本情况比较

	0TET <i>n</i> = 247	1TET <i>n</i> = 276	<i>t</i>	<i>P</i>
Age(years)	32.0 \pm 4.4	32.2 \pm 4.3	-0.313	0.755
BMI	22.0 \pm 2.8	22.0 \pm 2.8	0.504	0.615
Basal FSH(IU/L)	5.8 \pm 2.1	5.7 \pm 2.1	-0.065	0.949
Basal E2(pg/mL)	44.6 \pm 19.7	42.5 \pm 18.4	1.248	0.213
No. of embryo	1.8 \pm 0.6	1.6 \pm 0.5	4.033	<0.001

2.2 当天解冻移植与提前1d解冻过夜培养后移植两组间妊娠结局比较

1TET组与0TET组相比,妊娠率和种植率略高,流产率和多胎率略低,但均无统计学差异(具体见表2)。如将过夜培养后观察发现胚胎停止发育而取消移植的6个周期9枚胚胎,及14个移植周期14枚废弃胚胎一起纳入分析,则两组妊娠率(56.4% vs. 56.3%)和种植率(44.0% vs. 44.1%)更为接近。

另外,移植25枚停滞发育胚胎的22个周期中:移植胚胎之一为停滞胚胎的14个周期中,有4个周期获得单胎妊娠,1个周期获得双胎妊娠;移

表 2 当天解冻 ET 和提前 1 d 解冻培养过夜后 ET 两组妊娠结局的比较

Table 2 Comparison of pregnancy outcomes between 0TET and 1TET group (%)

	0TET	1TET	χ^2	<i>P</i>
CPR ¹⁾	56.3(139/247)	57.6(159/276)	0.0945	0.758
IR ²⁾	44.1(195/442)	46.3(204/441)	0.4085	0.523
MisR	12.2(17/139)	9.4(15/159)	0.605	0.437
MultiPR ³⁾	36.7(51/139)	28.3(45/159)	2.39	0.122

1) The difference between the two groups is not significant. If including the 6 cases of cancelled ET due to embryo arrest, the CPR of 1TET group was 56.4%. 2) If the 23 abandoned embryos were included, the IR of 1TET was 44.0%, closer to that of 0TET. 3) MultiPR of 0TET is higher than 1TET with no statistical significance ($P = 0.122$).

植胚胎均为停滞胚胎的 8 个周期中, 5 个单囊胚移植周期有 2 个周期获得妊娠, 3 个双囊胚移植周期有 1 个周期获得单胎妊娠。

2.3 当天解冻移植与提前 1 d 解冻过夜培养后移植两组移植胚胎质量比较

本研究中对胚胎质量进行评估的指标有胚胎评分和囊胚发育天数, 其在 0TET 和 1TET 中的构成比见表 3。0TET 和 1TET 两组中, 前者优质胚胎比例低于后者, 但是 D5 胚胎比例高过后者。

2.4 当天解冻移植与提前 1 d 解冻过夜培养后移植两组不同内膜准备方法的妊娠率比较

不同内膜准备方法在 0TET 组和 1TET 组所占的比例及相应的妊娠率见表 4。1TET 使用 NC 准备内膜所占比例高于 0TET 组 ($P = 0.006$), 其所获得的妊娠率也较高 (55.8% vs. 49.2%, $P = 0.272$), 但差异未达统计学意义。HRT 在 0TET 和 1TET 组的妊娠率相似, 均高于 NC。不考虑囊胚移植前培养时间的不同, 仅比较 HRT 和 NC 妊娠率的差异, 可见 HRT 妊娠率高于 NC (62.8% vs. 53.0%, $P = 0.027$)。但因为 0TET 中 NC 的比例低于 1TET, 因此最终两组妊娠率相似。

2.5 单囊胚移植妊娠率比较

523 个周期中, 有 185 个周期进行了单囊胚的移植, 将进行 D7 胚胎移植的 1 例和不建议移植胚胎的 2 例剔除, 共 182 个周期纳入分析。通过表 5 可以看出, 用 NC 或 COH 准备内膜时, 1TET 组妊娠率高于 0TET 组, 但差异未达统计学意义。用 HRT 方法准备内膜可获得较高的妊娠率 (58.2%

表 3 当天解冻 ET 和提前 1 d 解冻培养过夜后 ET 两组优质胚胎及胚胎发育天数比例比较

Table 3 Comparison of the constituent ratio of embryo score and embryo stages between 0TET and 1TET group

	0TET	1TET	χ^2	<i>P</i>
Embryo Score ¹⁾				
good	77.1(341/442)	83.4(368/441)	5.5328	0.019
fair	21.0(93/442)	15.0(66/441)	5.5175	0.019
poor	1.8(8/442)	1.6(7/441)	0.0655	0.798
Embryo Stages ²⁾				
D5	59.0(261/442)	52.2(230/441)	4.252	0.039
D6	39.1(173/442)	47.2(208/441)	5.7958	0.016
D7	1.8(8/442)	0.7(3/441)	2.2899	0.130

1) The percentage of good embryos in 1TET group is higher than 0TET group. 2) The percentage of D5 embryos in 0TET group is higher than 1TET group. Accordingly, the percentage of D6 embryos in 0TET group is lower than 1TET group.

vs 39.1%, $\chi^2 = 6.200$, $P = 0.013$)。评分为优质胚胎的囊胚在 0TET 组妊娠率低于 1TET 组, 但无统计学差异。D5 或 D6 囊胚的妊娠率在 0TET 和 1TET 组间无差异, 但是 D5 种植率高于 D6 (57.6% vs. 36.1%, $\chi^2 = 8.4769$, $P = 0.004$)。

本研究对不同内膜准备方案移植胚胎按质量和发育天数的不同进行了比较, (NC+COH) 准备方法与 HRT 准备方法相比: 523 个周期 883 枚胚胎分析, 前者优质胚胎比例稍高于后者但差异未达统计学意义 (82.5%(414/502) vs. 77.4%(295/381), $\chi^2 = 3.4806$, $P = 0.062$); 前者 D5 胚胎比例与后者无统计学差异 (53.4%(268/502) vs. 58.5%(223/381), $\chi^2 = 2.3216$, $P = 0.128$)。对单囊胚移植的 185 个周期进行比较: 前者优质胚胎比例和 D5 胚胎比例均与后者无统计学差异 (87.1%(101/116) vs. 87.0%(60/69), $\chi^2 = 0.0005$, $P = 0.982$; 43.1%(50/116) vs. 50.7%(35/69), $\chi^2 = 1.0118$, $P = 0.314$)。因此, 不同内膜准备方法各组的移植胚胎评分质量和发育天数具有可比性, 其妊娠率的差异主要由于内膜准备方法的不同引起的。

3 讨论

随着辅助生育技术水平的不断提高, 妊娠率、活产率均逐年上升^[8], 治疗过程的安全性越来越受到临床工作者的关注。由于患者的反应性不同,

表4 当天解冻 ET 和提前 1 d 解冻过夜培养后 ET 两组不同内膜准备方法比例及其妊娠率的比较

Table 4 Comparison of constituent ratio and CPR between 0TET and 1TET based different EmPrep (%)

	Total	0TET	1TET	χ^2	<i>P</i>
Constituent Ratio					
NC	54.2(283/523)	47.8(118/247)	59.8(165/276)	7.5709	0.006
HRT	41.7(218/523)	47.4(117/247)	36.6(101/276)	6.2248	0.013
COH	4.3(22/523)	4.9(12/247)	3.7(10/276)	0.4935	0.482
CPR					
NC ¹⁾	53.0(150/283)	49.2(58/118)	55.8(92/165)	1.2049	0.272
HRT ²⁾	62.8(137/218)	63.2(74/117)	62.4(63/101)	0.0176	0.894
COH	50.0(11/22)	58.3(7/12)	40.0(4/10)	0.7333	0.392
Total	57.0(298/523)	56.3(139/247)	57.6(159/276)	0.0945	0.758

1). The CPR of 1TET is higher than that of 0TET for NC methods with no significance. 2). In total, HRT group has higher CPR than NC group(62.8% vs. 53.0%, $\chi^2 = 4.873, P = 0.027$).

表5 单囊胚移植 0TET 组和 1TET 组不同内膜准备方法和胚胎发育天数妊娠率的比较

Table 5 Comparison of CPR based different endometrium preparation methods, embryo quality and stages between 0TET and 1TET group

	Total	0TET	1TET	χ^2	<i>P</i>
EmPrep Methods ¹⁾					
NC+COH	39.1(45/115)	32.6(14/43)	43.1(31/72)	1.2455	0.264
HRT	58.2(39/67)	56.7(17/30)	59.5(22/37)	0.0531	0.818
Embryo Score					
Good	45.5(75/165)	38.5(25/65)	50.0(50/100)	2.1154	0.146
Inferior ²⁾	52.9(9/17)	75.0(6/8)	33.3(3/9)	-	0.153
Embryo Stages ³⁾					
D5	57.6(49/85)	56.7(17/30)	58.2(32/55)	0.0183	0.893
D6	36.1(35/97)	32.6(14/43)	38.9(21/54)	0.416	0.519

1) While the CPR is higher in 1TET group than 0TET group with no statistical significance for (NC+ COH) or HRT methods, the CPR is higher for HRT (58.2%(39/67) vs.39.1%(45/115), $P = 0.013$) in total; 2) Fisher exact probability test is applied; 3) While no statistical difference is observed between 0TET and 1TET group based different embryo developmental stages, the CPR of D5 is higher than that of D6 with significance(57.6%(49/85) vs. 36.1%(35/97), $\chi^2 = 8.4769, P = 0.004$).

促排卵过程中 OHSS 难以完全避免。通过胚胎冷冻可以避免移植后加重对患者健康的不利影响,从而使胚胎冷冻成为一个选择^[9]。由于胚胎体外培养体系的不断完善,越来越多的胚胎能够被顺利培养至囊胚后进行移植。随着囊胚培养和囊胚移植的推广,ART 后多胎妊娠逐渐引起关注,因此近几年单胚胎移植作为降低多胎妊娠的重要举措,也被学者提议^[10]。这势必会增加囊胚冷冻的数量,也使冷冻囊胚复苏周期移植越来越普遍。

囊胚复苏后至恢复活力的时间根据冷冻时胚胎发育阶段和质量不同可需要 4~6 h^[4],在实际工作中多有不便,而且由于不能观察胚胎解冻后

复苏情况及继续发育潜能,且不利于工作时间安排,因此我们也越来越多地在移植前 1 d 将囊胚解冻过夜培养后,选择继续发育的胚胎进行移植。这样不仅可以给实际工作带来便利,解冻后的囊胚经过约 16~20 h 的培养后,具有发育潜能的囊胚可以更好地恢复活力,并且继续发育,这样对胚胎多了一次选择,可以挑选到更高成活率的胚胎进行移植。

虽然 Guerif 等^[11]认为囊胚提前解冻培养 20 h 与培养 4 h 相比,妊娠率明显提高(27% vs. 8%, $P < 0.05$)。但本研究提示两种方法具有相似的妊娠率、种植率、流产率。可能是由于本研究采用了玻

璃化冷冻复苏技术所以可以获得较高的复苏成功率。另外,随着各项辅助生育技术的进步,囊胚的妊娠率和种植率都获得了较大的提高,这些都会对研究结论产生影响。

提前 1 d 解冻过夜培养后移植与当天解冻培养 2 ~ 3 h 再移植相比,多胎率有下降趋势,但是差异没有达到统计学意义 (28.3% vs. 36.7%, $P = 0.122$),可能是由于我们观察到仅 10.3%的胚胎没有继续发育,最终仅废弃了 5.0%的胚胎,因此这种差异带来的妊娠结局的改变并不显著。

提前解冻周期共解冻 464 枚胚胎观察到 48 枚胚胎停滞发育,282 个周期中有 6 个周期因此取消移植(取消率 2.1%)。提前解冻可带来取消周期的风险。通过对移植了的发育停滞胚胎的结局进行观察,发现停滞胚胎的种植潜能可能会下降(但并非降至 0)。另外虽然两组间妊娠结局的差异没有达到统计学意义,通过提前 1 d 解冻过夜培养后选择继续发育的胚胎移植可以使部分患者避免移植发育潜能低下的胚胎所带来的费用支出和身心影响,仍具有一定的现实意义。因此应充分告知患者利弊,在有较多胚胎可选择时,可以考虑提前解冻囊胚过夜培养后移植,以提高移植效率;在可选择胚胎极为有限时,经观察未发育的胚胎进行移植也有一定意义。

我们同时对内膜的准备方法做了比较,我们的结果显示 HRT 方法可以获得较高的妊娠率(62.8% vs. 53.0%, $P = 0.027$)。另外,虽然无统计学差异,使用 NC 方法时,提前 1 d 解冻过夜培养后移植妊娠率有高于当天解冻移植的趋势(43.3% vs. 30.0%, $P = 0.163$)。相反,HRT 则对两组几乎没有影响。提前解冻过夜培养与当天解冻移植两种做法唯一的区别是前者延长了体外培养时间。因此,我们推论自然周期可能影响了内膜的种植窗,使其与胚胎发育不同步(内膜发育提前于胚胎发育天数)。

Chang 等^[12]报道在囊胚复苏周期移植中,自然周期具有较高的妊娠率 (41.9% vs. 30.4%, $P = 0.008$)及持续妊娠率(38.1% vs. 27.5%, $P = 0.013$)。与本研究黄体支持方案不同的是,除了该研究使用阴道给药进行黄体支持外,其自然周期是在 ET 日开始使用黄体支持的。更多的研究是对受精后第一天(2PN 期)或卵裂期冷冻的胚胎复苏周期移植,自然周期具有较高或与人工周期相似的妊娠率^[13-15]。以上研究所采用的自然周期多是在移植

日或者排卵后 1 日或者移植前 1 ~ 2 d 开始使用黄体支持。移植前内膜接受外源性孕酮作用的时间为 0 ~ 2 d,对内膜的外源性影响作用时间短,因此并未观察到对妊娠率的影响。

其机制可能为自然周期或卵巢刺激周期中,体内孕激素的转化早在 LH 峰或 HCG 扳机前即已开始,因此内膜转化时间可能稍早于激素替代周期。自然周期 B 超检测卵泡直径的同时,进行血清雌激素、黄体生成素及孕激素水平监测,对移植时机做出合理安排,可能会改善自然周期囊胚复苏周期妊娠结局。

为了更好地研究胚胎质量与妊娠率的关系,我们对只移植了 1 枚囊胚的 182 个周期进行分析。单囊胚移植的结果再次验证了 HRT 准备内膜临床妊娠率高于 NC 和 COH(58.2% vs. 39.1%, $P = 0.013$)。移植不同发育天数的胚胎妊娠率不同:D5 妊娠率高于 D6(57.6% vs. 36.1%, $P = 0.004$)。提示发育速率正常可预示较高的胚胎种植潜能。D5 囊胚复苏周期可获得较高的妊娠率,为减少多胎率,有 D5 冷冻优质囊胚患者可考虑单囊胚移植。

本研究结论与 Mesut 等^[16]的研究结论类似(D5 和 D6 囊胚复苏周期种植率分别为 51.3%和 44.2%)。但是 El-Toukhy 等^[17]研究认为 D5 和 D6 囊胚的妊娠结局相似(活产率分别为 29%和 28.5%, $P = 0.93$)。另外,Sunkara 等^[18]人对 1995~2008 年间发表的关于冷冻囊胚复苏周期移植的研究进行 meta 分析得到结论认为 D5 囊胚与 D6 囊胚相比有较高的临床妊娠率和持续妊娠率,但是敏感性分析后认为在评分一致的情况下,D6 囊胚与 D5 囊胚具有相似的妊娠率。这些研究结论与本研究结论存在不一致,可能与本研究采用的方法不同有关。玻璃化冷冻被认为在囊胚冷冻中具有更高的复苏率和妊娠率。El-Toukhy 等^[17]使用的冷冻方法为慢速冷冻。Liebermann 等^[19]的研究发现使用玻璃化冷冻 D5 和 D6 囊胚复苏周期妊娠率有差异(33.4% vs. 25.9%),而使用慢速冷冻后种植率下降,同时差异变得不显著(29.6% vs. 28.2%)。另外,根据 Mukaida 等^[20]的报道,囊胚冷冻前进行人工皱缩减小囊腔可以显著提高复苏成功率和复苏囊胚种植率。本研究对所有符合标准的囊胚冷冻前均进行了人工皱缩囊腔。这些方法的不同可能导致结论的不一致。但是随着技术的发展及更新更有效的方法的推广,冷冻囊胚的复

苏周期移植将会获得更高的复苏成功率及胚胎种植率,也可能得到不同的结论。

综上,本研究认为提前解冻囊胚过夜培养对妊娠结局并无不利影响,可选择胚胎数量有限的患者需权衡利弊。自然周期黄体支持方案可能会影响胚胎和子宫内膜的同步性导致胚胎种植率的下降。受精后第5天发育为正常囊胚的胚胎比第6天发育为囊胚的胚胎有更高的种植率。因此在实际工作中,可以根据工作时间安排决定是否对囊胚进行提前1d解冻过夜培养后移植。在移植胚胎的选择上也尽量优先选择D5冷冻的囊胚。对于有D5冷冻优质囊胚的患者,可以考虑单囊胚移植,以降低多胎率。

参考文献:

- [1] Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(1): 186-193.
- [2] Youssry M, Ozmen B, Zohni K, et al. Current aspects of blastocyst cryopreservation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2008, 16(2): 311-320.
- [3] Koutlaki N, Schoepper B, Maroulis G, et al. Human oocyte cryopreservation: past, present and future [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(3): 427-436.
- [4] Kader AA, Choi A, Orif Y, et al. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification [J]. *Reprod Biol Endocrin*, 2009, 7(9): 99-99.
- [5] Huang R, Fang C, Xu SY, et al. Premature progesterone rise negatively correlated with live birth rate in IVF cycles with GnRH agonist: an analysis of 2,566 cycles [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(3): 664-670.
- [6] 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.
- [7] Ma WH, Yang X, Liang XY. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: a prospective study [J]. *Reprod Bio Endocrin*, 2012, 10(8): 68-68.
- [8] Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, et al. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(7): 1768-1774.
- [9] D' Angelo A. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention strategies: cryopreservation of all embryos [J]. *Semin Reprod Med*, 2010, 28(6): 513-518.
- [10] The Society of British Fertility. Multiple births from fertility treatment in the UK: a consensus statement [J]. *Hum Fertil (Camb)*, 2011, 14(3): 151-153.
- [11] Guerif F, Cadoret V, Poindron J, et al. Overnight incubation improves selection of frozen-thawed blastocysts for transfer: preliminary study using supernumerary embryos [J]. *Theriogenology*, 2003, 60(8): 1457-1466.
- [12] Chang EM, Han JE, Kim YS, et al. Use of the natural cycle and vitrification thawed blastocyst transfer results in better in-vitro fertilization outcomes: cycle regimens of vitrification thawed blastocyst transfer [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(4): 369-374.
- [13] Xiao Z, Zhou X, Xu W, et al. Natural cycle is superior to hormone replacement therapy cycle for vitrified-preserved frozen-thawed embryo transfer [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2012, 58(2): 107-112.
- [14] Hancke K, More S, Kreienberg R, et al. Patients undergoing frozen-thawed embryo transfer have similar live birth rates in spontaneous and artificial cycles [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(5): 403-407.
- [15] Morozov V, Ruman J, Kenigsberg D, et al. Natural cycle cryo-thaw transfer may improve pregnancy outcome [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24(4): 119-123.
- [16] Mesut N, Ciray HN, Mesut A, et al. Cryopreservation of blastocysts is the most feasible strategy in good responder patients [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(5): 1121-1125.e1.
- [17] El-Toukhy T, Wharf E, Walavalkar R, et al. Delayed blastocyst development does not influence the outcome of frozen-thawed transfer cycles [J]. *BJOG-Int J Obstet Gy*, 2011, 118(13): 1551-1556.
- [18] Sunkara SK, Siozos A, Bolton VN, et al. The influence of delayed blastocyst formation on the outcome of frozen-thawed blastocyst transfer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(8): 1906-1915.
- [19] Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(1): 20-26.
- [20] Mukaida T, Oka C, Goto T, et al. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(12): 3246-3252.