

慢速冷冻胚胎 TET 周期当天与解冻后培养 1 d 移植结果分析

李瑞岐, 王文军*, 麦美琪, 欧阳能勇, 马芸, 陈静华, 张宁锋
(中山大学孙逸仙纪念医院妇产科生殖医学中心, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨第 3 天(D3)慢速冷冻胚胎解冻后当天行胚胎移植(ET)和体外培养 1 d 后 ET 在自然周期和人工周期中对临床结局的影响。【方法】回顾性分析本中心 2009 年 1 月至 2010 年 12 月期间的解冻胚胎数 ≥ 1 , 且 ≤ 3 的 552 个卵裂期冷冻胚胎 TET 周期的临床结果, 根据解冻后体外培养时间分为 A 组(当天 ET)和 B 组(培养 1 d 后 ET), 这两个组再分为自然周期组和人工周期组。【结果】D3 冷冻胚胎在自然周期和人工周期, A、B 两组女方年龄、平均移植胚胎数、胚胎评分以及妊娠率均没有统计学意义($P > 0.05$), 但是, 在自然周期和人工周期中 B 组种植率较 A 组均有统计学意义(17.9 vs 12.3, $P < 0.05$; 17.3% vs 8.7%, $P < 0.05$)。【结论】体外培养时间对 D2 冷冻胚胎临床结局没有影响, 而 D3 冷冻胚胎 TET 时, 解冻后培养 1 d 再进行 ET 有利于胚胎种植。

关键词: 冻融胚胎移植; 移植时间; 妊娠率; 种植率; 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(2011)06-0824-04

Outcome of Frozen-thawed Embryo Transfer between Different Culture Time In Vitro in Natural Cycles and Artificial Cycles

LI Rui-qi, WANG Wen-jun*, MAI Mei-qi, OUYANG Neng-yong, MA Yun, CHENG Jing-hua, ZHANG Ning-feng
(Reproductive Medical Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University,
Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To assess the outcome of slow-frozen/thawed embryo transfer (TET) between different culture time of the embryos frozen at day 3 (D3) in vitro in natural and artificial cycles. 【Methods】 A database was analyzed retrospectively concerning TET cycles covered 552 cycles, in which the number of thawed embryos ≥ 1 and ≤ 3 from February 2009 to December 2010. According to the different culture time after embryo thawing, they were divided into group A (ET at the thawing day) and group B (ET at the next day after embryo thawed). And these two groups were further divided into nature cycle and artificial cycle. 【Results】 Although there were not significantly different between the couples age, the number of embryos transferred and the embryos scale ($P > 0.05$). The implantation rates of D3 frozen embryos in group B were significantly higher than those in group A in both of the nature cycles and the artificial cycles (17.9 vs 12.3, $P < 0.05$; 17.3% vs 8.7%, $P < 0.05$), respectively. 【Conclusion】 The effect of extending incubation time of thawed embryos does not significantly effect the outcome of D2 freezing embryos. But in the TET cycles of D3 frozen embryos, ET at the next day of embryo thawed will be better for the embryo implantation.

Key words: frozen/thawed embryo transfer; embryo transfer time; pregnancy rate; implantation rate; nature cycle; artificial cycle

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(6): 824-827]

自 1983 年世界首例人类冷冻胚胎移植 (frozen-thawed embryo transfer, TET) 成功妊娠后, 胚胎冷冻技术在人类辅助生殖领域得到了广泛的应用, 大大提高了累计妊娠率, 降低了病人的治疗

收稿日期: 2011-04-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B031600043); 广东省人口计生委科研项目(2009231)

作者简介: 李瑞岐, 硕士, 研究实习员, E-mail: lirq07@sina.com; * 通信作者: 王文军, 副教授, 硕士生导师, E-mail: wenjungzen@163.com

费用。但是,冻融胚胎移植通常会获得比新鲜胚胎移植较低的临床妊娠率和胚胎种植率,即使两者的胚胎质量没有统计学意义^[1]。目前,卵裂期胚胎冷冻主要是冷冻第 2 天 D2 胚胎和第 3 天(D3)胚胎,解冻后又分当天行胚胎移植(embryo transfer, ET)、和体外培养 1 d 后 ET。TET 周期中,冷冻胚胎解冻后在体外培养时间对临床结局的影响国内较少报道。本研究通过回顾性分析本中心 2009–2010 年解冻胚胎数 ≥ 1 , 且 ≤ 3 的 552 个卵裂期冷冻胚胎 TET 周期的临床结果,探讨在自然周期和人工周期 TET 中,当天 ET 和解冻后在体外培养 1 d 之后 ET 对 D2 和 D3 冷冻胚胎临床结果的影响。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

选择对象为 2009 年 1 月至 2010 年 12 月本中心慢速冷冻卵裂期胚胎的 TET 周期,选择条件为解冻胚胎数 ≥ 1 , 且 ≤ 3 , 取消移植的周期除外,共计 552 个 TET 周期。取卵周期采用常规超促排卵方案,即长方案、短方案或超长方案,取卵后根据患者情况采用自然受精(IVF)或卵泡浆内单精子注射受精(ICSI),胚胎培养至取卵后 2~3 d 进行移植,将剩余的可用胚胎(I 级和 II 级)进行冷冻保存,冷冻方法为程序化慢速冷冻,冷冻保护剂和解冻液均为商品化冷冻液(Quinn's Advantage[®] Embryo Freeze Kit, 5 × 12 mL, ART-8014)和解冻液(Quinn's Advantage[®] Thaw Kit, 3 × 12 mL, ART-8016)。

1.2 方 法

根据体外培养时间不同分为解冻后当天 ET 组(A 组)和解冻后体外培养 1 d 后 ET 组(B 组),同时这两个组又分为自然周期组和人工周期组。“D2 胚胎”是指新鲜周期胚胎在 D2 移植时,剩余并当天进行冷冻的胚胎;“D3 胚胎”是指在新鲜周期胚胎 D3 冷冻的胚胎。

1.3 患者 TET 前的准备

根据患者是否有排卵选择自然周期或人工周期进行内膜准备。自然周期组:B 超监测卵泡发育至排卵,排卵后 2~3 d 根据新鲜周期冷冻时间解冻胚胎,解冻后部分当天 ET、部分体外培养 1 d 后 ET。人工周期组:于月经第 5 天开始口服戊酸雌二醇,根据患者以往的内膜情况,选择

不同的起始剂量;B 超监测至内膜厚度 ≥ 8 mm 时肌注黄体酮使内膜转化为分泌期。肌注黄体酮第 2 天解冻并当天移植 D2 卵裂期冷冻胚胎,肌注黄体酮第 3 天解冻并当天移植 D3 卵裂期冷冻胚胎;D2 和 D3 冷冻胚胎解冻后在体外培养 1 d 后移植,即分别在肌注黄体酮第 3 天移植和第 4 天移植。

1.4 胚胎评分及 TET 胚胎选择标准

I 级:细胞大小均匀,形状规则,透明带完整,胞质清晰,无颗粒现象,碎片 $< 5\%$ 卵裂球面积;II 级:细胞大小略不均,形态略不规则,胞质可有颗粒现象,碎片 10%~20%;III 级:细胞大小明显不均,可有明显的形态不规则,胞质可有颗粒现象,碎片 21%~50%;IV 级:细胞大小严重不均,胞质可有严重的颗粒现象,碎片 $> 50\%$ 。评分为 I~II 级的胚胎为可用胚胎,进行移植或者冷冻。A 组复苏后胚胎卵裂球存活数 $\geq 50\%$ 的胚胎可进行移植;B 组复苏后胚胎卵裂球存活数 $\geq 50\%$ 或者卵裂球数目有增加的胚胎可进行移植。另外,由于本中心有过妊娠的先例,所以,冷冻胚胎解冻后卵裂球存活数 > 0 , $< 50\%$ 者,根据患者意愿,经患者知情同意后也会选择 ET。

1.5 统计学处理

使用 SPSS13.0 统计软件采用独立样本 *t* 检验和 χ^2 检验进行数据分析。

2 结 果

2.1 自然周期 TET 结果

D3 冷冻胚胎自然周期 TET 共 304 个周期,如表 1 所示,A、B 两组女方年龄、平均移植胚胎数、胚胎评分和复苏率均没有统计学意义,但是,B 组种植率较 A 组有统计学意义(17.9% vs 12.3%, $P < 0.05$)。

2.2 人工周期 TET 结果

D3 冷冻胚胎人工周期 TET 共 171 个周期,数据如表 2 所示,女方年龄、平均移植胚胎数、移植胚胎评分、复苏率以及妊娠率均没有统计学差异($P > 0.05$),但是,B 组的种植率较 A 组有统计学意义(17.3% vs 8.7%, $P < 0.05$)。

2.3 D2 冷冻胚胎 TET 结果

D2 冷冻胚胎 TET 共 77 个周期,数据如表 3 所示,各项间均没有统计学意义。

表 1 自然周期 D3 冷冻胚胎 TET 结果

Table 1 TET results of D3 frozen embryos in nature cycle

	Group A	Group B	<i>t</i>	<i>P</i>
Age	31.1 ± 4.4	31.6 ± 4.6	-0.992	0.322 ¹⁾
Average no. of embryos transferred per cycle	2.5 ± 0.6	2.6 ± 0.6	-1.065	0.288 ¹⁾
No. of grade I embryos	0.3 ± 0.7	0.5 ± 0.8	-1.812	0.071 ¹⁾
No. of grade II embryos	2.1 ± 0.9	2.1 ± 0.9	-0.010	0.992 ¹⁾
Survival rate/%	93.8(454/484)	93.1(309/332)	$\chi^2 = 0.172$	0.678 ²⁾
Pregnancy rate/%	32.3(60/186)	40.7(48/118)	$\chi^2 = 2.235$	0.135 ²⁾
Implantation rate/%	12.3(57/462)	17.9(54/302)	$\chi^2 = 4.519$	0.034 ²⁾

1) independent-samples *t* test; 2) Pearson chi-square test

表 2 人工周期 D3 冷冻胚胎 TET 结果

Table 2 TET results of D3 frozen embryos in artificial cycle

	Group A	Group B	<i>t</i>	<i>P</i>
Age	30.5 ± 4.4	29.3 ± 4.1	1.845	0.067 ¹⁾
Average no. of embryos transferred per cycle	2.4 ± 0.6	2.4 ± 0.6	0.249	0.803 ¹⁾
No. of grade I embryos	0.4 ± 0.7	0.4 ± 0.6	-0.462	0.645 ¹⁾
No. of grade II embryos	2.1 ± 1.0	2.0 ± 0.8	0.512	0.609 ¹⁾
Survival rate/%	93.3(252/270)	89.0(162/182)	$\chi^2 = 2.638$	0.104 ²⁾
Pregnancy rate/%	30.8(32/104)	38.8(26/67)	$\chi^2 = 1.174$	0.279 ²⁾
Implantation rate/%	8.7(22/254)	17.3(28/162)	$\chi^2 = 6.954$	0.008 ²⁾

1) independent-samples *t* test; 2) Pearson chi-square test

表 3 D2 冷冻胚胎 TET 结果

Table 3 TET results of D2 frozen embryos

	Group A	Group B	<i>t</i>	<i>P</i>
Age	31.2 ± 3.5	30.4 ± 4.0	0.819	0.416 ¹⁾
Average no. of embryos transferred per cycle	2.4 ± 0.6	2.4 ± 0.6	-0.413	0.681 ¹⁾
No. of grade I embryos	0.4 ± 0.6	0.2 ± 0.5	1.923	0.058 ¹⁾
No. of grade II embryos	2.0 ± 0.8	2.3 ± 0.8	-1.611	0.111 ¹⁾
Survival rate/%	98.1(51/52)	92.3(144/156)	$\chi^2 = 2.215$	0.137 ²⁾
Pregnancy rate/%	28.6(6/21)	26.8(15/56)	$\chi^2 = 0.025$	0.875 ²⁾
Implantation rate/%	16.0(8/50)	10.9(15/137)	$\chi^2 = 0.866$	0.352 ²⁾

1) independent-samples *t* test; 2) Pearson chi-square test

3 讨 论

TET 周期结果会受到诸多因素的影响, 苗本郁^[2]指出, 女方年龄会显著影响自然周期冷冻胚胎移植妊娠率。通常冷冻胚胎解冻后在体外培养 2~3 h 后进行 ET, 有时由于时间安排以及观察解冻后胚胎发育潜能等原因, 将解冻胚胎培养 1 d 后再 ET。本中心在冷冻胚胎解冻后体外培养 1 d 之后 ET 时, 有时解冻胚胎数会 >3, 以便于挑选有

发育趋势的胚胎进行 ET。有研究显示, 胚胎发育潜能是影响 TET 的重要因素^[3], 因此, 为了排除此方面的影响, 本研究中只挑选解冻胚胎数 ≥ 1, 且 ≤ 3 的 TET 周期, 其中不包括取消周期, 共计 552 个周期进行分析。需要说明的是本中心 2009 年 1 月至 2010 年 12 月共有 782 个冷冻复苏周期, 复苏存活率为 76.32%, 取消周期数为 11, 占 1.41%(11/782), 在本研究范围内 (即解冻胚胎数 ≥ 1, 且 ≤ 3 的慢速冷冻 TET 周期) 的取消周期数 A 组有 2 例, B 组有 3 例, 占本研究设定范围的

TET周期比例分别为 0.36%(2/552) 和 0.54%(3/552)。由于本文的统计数据设定了选择条件,并且不包括因复苏效果达不到 ET 标准而取消的周期,所以本文数据中复苏率较全部周期的平均复苏率偏高。

有报道认为延长解冻后培养时间,有利于妊娠率的增高^[4]。Guerif 等^[5]研究显示,冷冻囊胚解冻后在体外培养 20 h 后再行 ET 能够显著提高胚胎种植率。而刘晓音等^[6]报道,体外培养时间对 D2 冷冻胚胎 TET 结局均没有显著影响。本研究对本中心卵裂期冷冻胚胎 TET 结果进行了分析,结果显示 D3 冷冻胚胎解冻后体外培养 1 d 后再进行 ET 可显著提高胚胎种植率。而解冻后体外培养 1 d 对于 D2 冷冻胚胎没有显著影响。因此,我们猜测胚胎在从 D3 到 D4 发育时,合子型基因已经开始在胚胎中表达,这时期的胚胎可能会产生某些妊娠识别信号,诱导子宫的孕向发育。Wang 等^[7]在对仓鼠胚胎种植进行研究中指出,囊胚可能能够释放雌激素或者其他一些未知信号因子来诱发子宫分泌 HB-EGF。另外,不同的冷冻方法也会对 TET 结果产生不同的影响,罗金等^[8]指出,延长冻融胚胎体外培养时间不能显著提高玻璃化冻融胚胎移植周期的妊娠率和种植率。而对于慢速冷冻胚胎有文章结果^[4]显示,提前 1 d 解冻周期的种植率较当天解冻周期有统计学意义。本文结果与之相同。

胚胎的冷冻时期也可能会对 TET 结局产生影响,Salumets 等^[9]的研究结果显示,在原核期、D2 和 D3 胚胎冻融后的 TET 周期中,临床妊娠率和种植率 D2 最高,原核期次之,D3 最低。但是,在本研究中自然周期和人工周期 D2、D3 冷冻胚胎妊娠率和种植率均没有统计学差异,与 Wang 等^[10]结果相似。这可能是由于周期准备方案、胚胎冷冻标准以及冷冻解冻过程不同等因素所产生的。

准备内膜的常用方式为外源性激素的替代周期、自然周期和促排卵周期。通常来说,自然周期属于生理状态,是 TET 周期内膜准备的较为合适的方式。但是,自然周期适用对象受限,首先必须有自发排卵,而且 B 超监测的次数多。Weissman 等^[11]指出,TET 周期中,自发排卵周期和 hCG 诱发排卵的自然周期成功率没有统计学差异,本研究结果与之相似。

总之,对于 D3 慢速冷冻胚胎,解冻后在体外

培养 1 d 之后进行 ET 可以更好的观察胚胎解冻后的发育潜能,而且,可能更有利于与子宫内膜的同步,诱发子宫的孕向发育,增加内膜对胚胎的容受性,有利于胚胎的种植。

参考文献:

- [1] Guerif F, Bidault R, Cadoret V, et al. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation a reappraisal [J]. Hum Reprod, 2002, 17(5): 1321-1326.
- [2] 苗本郁,周灿权,方丛,等. 自然周期冷冻胚胎解冻移植临床分析 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(5): 573-577.
- [3] 魏春霞,于丛一,麦美琪,等. 冷冻胚胎解冻移植 264 个周期临床分析 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(1): 101-104.
- [4] 邢琼,周平,章志国,等. 辅助孵化与培养时间对冻融胚胎移植结局的影响 [J]. 生殖医学杂志, 2007, 6(1): 16-19.
- [5] 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.
- [6] 刘晓音,薛松果,金炜,等. 人卵裂期胚胎玻璃化冻融体外培养时间对妊娠结局的影响 [J]. 生殖医学杂志, 2010, 19(2): 104-107.
- [7] Wang X, Wang H, Matsumoto H, et al. Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster [J]. Development, 2002, 129(17): 4125-4134.
- [8] 罗金,杨菁,徐望明. 胚胎冻融后体外培养时间对妊娠结局的影响 [J]. 生殖与避孕, 2011, 31(2): 97-100.
- [9] Salumets A, Tuuri T, Mäkinen S, et al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer [J]. Hum Reprod, 2003, (9): 1890-1895.
- [10] Wang JX, Yap YY, Matthews CD, et al. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception [J]. Hum Reprod, 2001, 16(11): 2316-2319.
- [11] Weissman A, Levin D, Ravhon A, et al. What is the preferred method for timing natural cycle frozen-thawed embryo transfer? [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(1): 66-71.

(编辑 张恩健)