

自然周期冷冻胚胎解冻移植临床分析

苗本郁, 周灿权, 方 丛, 庄广伦

(中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨影响自然周期冷冻胚胎解冻移植妊娠率的因素。【方法】回顾性分析本中心 2003 年 1 月到 2004 年 1 月 233 个病人进行的 268 个自然周期冷冻胚胎解冻移植周期, 对年龄、子宫内膜厚度和回声类型、LH 峰日激素水平以及移植胚胎个数和妊娠率等因素进行分析。【结果】268 个周期中 58 例妊娠, 妊娠率 21.6%。年龄在妊娠组和未妊娠组间有显著性差异[(30.8 \pm 3.0)岁 vs (31.9 \pm 4.0)岁, $P=0.035$]。年龄 35 岁组其 LH 峰日子宫内膜厚度显著厚于>35 岁组(10.2 \pm 1.8 mm vs 9.3 \pm 2.0 mm, $P=0.007$)。移植 1、2、3 个胚胎的妊娠率分别为 13.3%、18.2%和 23.8%, 三组间妊娠率没有显著性差别。LH 峰日子宫内膜厚度和类型在妊娠组和未妊娠组间没有显著性差异($P>0.05$)。【结论】年龄显著影响自然周期冷冻胚胎移植妊娠率。移植胚胎的个数和子宫内膜的类型及厚度对妊娠率没有显著影响。

关键词: 冷冻/解冻胚胎移植; 妊娠率; 自然周期; 年龄; 子宫内膜

中图分类号: R715.9

文献标识: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0573-05

A Clinical Analysis of Frozen/thawed Embryo Transfer in Spontaneous Cycles

MIAO Ben-yu, ZHOU Can-quan, FANG Cong, ZHUANG Guang-lun

(Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To analyze the impact of a number of factors on the pregnancy rate of frozen/thawed embryo transfer in spontaneous cycles.【Methods】A database was analyzed retrospectively concerning frozen/thawed embryo transfer in spontaneous cycles from January 2003 to January 2004 that covered 268 cycles in 233 patients. The factors investigated were maternal age, endometrial thickness, echogenic pattern, hormone levels of luteinizing hormone (LH) surge day, the number of embryos transferred and pregnancy rate per embryo transfer.【Results】The pregnancies were occurred in 58 cycles of all 268 natural cycles, the pregnancy rate per embryo transfer was 21.6%. The mean age of the patients with pregnancy were statistically significant younger than that of the patients without pregnancy (30.8 \pm 3.0 years vs 31.9 \pm 4.0 years, $P=0.035$). The endometrial thickness on the day of LH surge at the age of less than 35 years was significant thicker than that at the age of more than 35 years (10.2 \pm 1.8 mm vs 9.3 \pm 2.0 mm, $P=0.007$). The pregnancy rates were 13.3%, 18.2%, and 23.8% in the cycle of transferred 1, 2, and 3 embryos, respectively. However, there was no significant difference in these three groups. There was no significant difference of endometrial thickness and echogenic pattern, between the pregnancy and the non-pregnancy group.【Conclusion】Our study suggests that the age of female partners can significantly affect the pregnancy rate of frozen/thawed embryo transfer in spontaneous cycles. The pregnancy rate was not influenced by the number of embryos transferred per cycle, endometrial thickness nor echogenic pattern.

Key words: frozen/thawed embryo transfer, pregnancy rate, spontaneous cycle, age, endometrium

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(5):573- 577]

随着体外受精和胚胎移植 (In vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 在全世界范围内的迅速开展, 人们也逐渐认识到它所带来的一些变化, 如多胎妊娠率明显增加。因此开始限制胚胎

移植的数目, 并将剩余胚胎进行冷冻保存, 等待适当时机进行解冻胚胎移植。冷冻胚胎解冻移植 (frozen/thawed embryo transfer, TET) 不仅保存了大量胚胎, 也提高了 IVF-ET 的累积妊娠率。冷冻胚

收稿日期: 2004-09-20

基金项目: 广东省科技攻关基金资助项目 (2003A3020305)

作者简介: 苗本郁(1973-), 女, 安徽蚌埠人, 博士研究生, 主治医师。

胎移植已经经历了 20 多年的历史^[1],但是,和新鲜胚胎移植相比,它的妊娠率仍然较低。影响冷冻胚胎移植成功的因素很多,可能与受者年龄、胚胎形态和细胞数、上次新鲜周期是否妊娠等有关^[2-4]。对于冷冻胚胎的妊娠率,国内外报道差别很大^[2-6],这可能也与各中心选择胚胎进行冷冻的标准不同有关^[7]。本文主要对 2003-2004 年度自然周期冷冻胚胎解冻移植周期进行回顾性分析,探索可能影响自然周期冷冻胚胎移植妊娠率的因素,为提高冷冻胚胎移植妊娠率提供资料。

1 资料和方法

1.1 临床资料

本研究对在中山大学附属第一医院生殖中心所进行的自然周期 FET 周期进行回顾性分析。自然周期移植方案如下:既往月经规则者,于月经第 11 天至中心进行 B 超监测,当卵泡直径>14 mm 时,开始每日检测晨尿黄体生成素(luteinizing hormone, LH),出现尿 LH 峰(T C)日则检测血 LH、雌二醇(estradiol, E₂)、黄体酮(progesterone, P)水平,当血 LH>20 IU/L,认为出现血 LH 峰。以血 LH 峰出现当天为 0 天,在第 3 天进行胚胎移植。14 d 后验尿 HCG,尿 HCG 阳性且 B 超监测到妊娠囊为临床妊娠。

1.2 冷冻方法

移植新鲜胚胎当天(取卵后第 3 天),对剩余胚胎进行分级。标准如下: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;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%;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%;级:细胞大小严重不均,胞质可有严重的颗粒现象,碎片>50%。冷冻胚胎的选择标准为:胚胎细胞数达到或超过 5 细胞,分级为 1~2 级;或 4 细胞 1 级胚胎,均被冷冻。采用慢速程序冷冻法进行冷冻,快速法解冻。解冻后胚胎存活的细胞数>50%总细胞数,认为胚胎复苏,孵育 1~3 h 后即进行移植。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件包进行统计学分析。统计学方法包括独立样本 t 检验、chi-square 检验、one-way ANOVA 等。检验水准 α 取 0.05。

2 结果

2.1 一般结果

从 2003 年 1 月至 2004 年 1 月,233 个病人共进行了 268 个 FET 周期,其中 58 个周期获得妊娠,妊娠率 21.6%。年龄 22~45(31.8 \pm 4.0)岁;共解冻胚胎 1113 个,平均解冻胚胎(4.2 \pm 1.5)个/周期;复苏胚胎 878 个,复苏率 78.9%;移植胚胎 704 个,移植胚胎 1~3 (2.63 \pm 0.6)个/周期。移植胚胎细胞数为 5.65 \pm 1.62。移植日期在月经周期的第 12~44(18.7 \pm 4.0)天。将移植周期分为妊娠组和未妊娠组,比较年龄等多个因素在两组之间的差别(见表 1)。

表 1 妊娠组和未妊娠组的临床资料

Table 1 Clinical results in the pregnancy group and the non-pregnancy group

		Pregnancy (n=58)	Non-pregnancy (n=210)	t	P ¹⁾
Age (yr)		30.8 \pm 3.0	31.9 \pm 4.0	2.452	0.016
Day of LH surge	LH (IU/L)	63 \pm 38	59 \pm 33	-0.652	0.515
	E2 (pg/mL)	328 \pm 134	307 \pm 120	-1.021	0.308
	P (ng/mL)	1.9 \pm 1.5	1.7 \pm 1.4	0.926	0.463
	Endometrial thickness (cm)	10.2 \pm 2.1	10.1 \pm 1.8	-0.363	0.717
Day of ET	E2 (pg/mL)	141 \pm 63	135 \pm 54	-0.674	0.501
	P (ng/mL)	12.1 \pm 10.5	11.2 \pm 8.6	-0.668	0.505
Average no. of blastomeres per transferred embryos		6.0 \pm 1.4	5.6 \pm 1.7	-1.897	0.061
Total no. of blastomeres in transferred embryos		50 \pm 26	48 \pm 29	-1.958	0.051
No. of embryos transferred per cycle		2.7 \pm 0.5	2.6 \pm 0.6	-1.534	0.128

1) independent-samples t test

2.2 年龄对妊娠率的影响

统计结果显示未妊娠组年龄(31.9 \pm 4.0)岁,妊娠组年龄(30.8 \pm 3.0)岁,两组的年龄之间具有显著性差异(P=0.035)。若按年龄分为 35 岁和>35 岁

两组(表 2),前者 234 个周期中 55 例妊娠,后者 34 个周期仅 3 例妊娠,妊娠率分别为 23.5%和 8.8%,但统计学上并没有显著性差异(P>0.05)。前者 LH 峰日子宫内膜厚度较后者明显厚,具有显著性差

异 ($P=0.007$)。而移植胚胎个数, 胚胎平均细胞数, 异 ($P > 0.05$)。LH 峰日和 ET 日 LH、E₂、P 水平都没有显著性差

表 2 2 个年龄组的临床资料
Table 2 Clinical results in two defined age groups

	Age		t	P
	35	>35		
Day of LH surge				
LH (IU/L)	61 ±35	49.51 ±1.82	2.499	0.016 ¹⁾
E2 (pg/mL)	313 ±124	303 ±121	0.355	0.723 ¹⁾
P (ng/mL)	1.8 ±1.4	1.4 ±1.3	1.131	0.308 ¹⁾
Endometrial thickness (mm)	10.2 ±1.8	9.3 ±2.0	0.592	0.007 ¹⁾
Average no. of blastomeres per transferred embryos	5.6 ±1.6	5.8 ±1.9	-0.739	0.460 ¹⁾
Total no. of blastomeres in transferred embryos	47 ±26	54 ±36	-1.019	0.309 ¹⁾
No. of embryos transferred per cycle	2.61 ±0.61	2.74 ±0.57	-1.182	0.243 ¹⁾
Pregnancy rate (%)	23.5(55/234)	8.8(3/34)		0.052 ²⁾

1) independent-samples t test; 2) Pearson chi-square value is 3.773

表 3 移植胚胎个数对 TET 结局的影响
Table 3 The effect of number of transferred embryos on TET outcome

	No. of transferred embryos			F	P
	1	2	3		
Age (yr)	31.8 ±4.5	31.4 ±3.2	31.8 ±4.0	0.181	0.834 ¹⁾
Average no. of blastomeres per transferred embryos	5.3 ±2.0	5.4 ±1.6	5.8 ±1.6	1.785	0.170 ¹⁾
Pregnancy rate (%)	13.3(2/17)	18.2(12/66)	23.8(44/185)		0.378 ²⁾

1): one-way ANOVA; 2) Pearson chi-square value is 1.944

2.2 移植胚胎个数对妊娠率的影响

妊娠组每周期移植胚胎的个数稍多于非妊娠组, 但是没有统计学差异(表 1)。在 268 个移植周期中, 251 个周期是移植 2 个或 3 个冷冻胚胎, 17 个周期移植 1 个冷冻胚胎。移植一个胚胎的妊娠率是 13.3%, 移植 2 个胚胎为 18.2%, 而移植 3 个胚胎为 23.8%。但是, 移植不同胚胎个数的周期之间妊娠率并没有显著性差别(表 3)。而且三组间的年龄也没有显著性差别。统计显示, 移植 1 个胚胎, 其平均细胞数与移植 2 个和 3 个胚胎组之间均没有显著性差异。

2.3 LH 峰日内膜类型和厚度与妊娠率的关系

LH 峰日 B 超监测内膜回声类型, 268 个周期中 248 个周期内膜均显示明显三线征 (即 A 型内膜^[8]), 其中 55 个周期发生妊娠。13 个周期表现为非三线征, 表现为内膜与周围肌层等回声或强回声, 仅 1 个周期妊娠, 另有 7 例缺失。虽然 A 型内膜组妊娠率 (22.0%) 要高于非 A 型内膜组 (7.7%), 但并没有统计学差异。比较同日血激素水平, LH 和 E₂ 水平在 A 型内膜中相应较高, 在 B 型内膜患者则较低, 但是还没有达到显著性差别。LH 峰日子宫内膜厚度在妊娠组和未妊娠组间没有显著性差异 ($P=0.336$)。

表 4 LH 峰日内膜回声类型对 TET 结局的影响
Table 4 The effect of echogenic pattern of endometrium of day LH surge on TET outcome

	A type	Non-A type	t	P
LH (IU/L)	60 ±34	47 ±27	1.165	0.245 ¹⁾
E2 (pg/mL)	314 ±124	267 ±106	1.176	0.241 ¹⁾
P (ng/mL)	1.7 ±1.4	1.7 ±1.0	-0.067	0.424 ¹⁾
Pregnancy rate (%)	22.0(55/250)	7.7(1/13)		0.235 ²⁾

1): independent-samples t test; 2): chi-square test, Pearson chi-square value is 1.409, 7 cases were missing

2.4 冷冻胚胎性质和移植操作对妊娠的影响

冷冻胚胎来自于常规 IVF 者共移植了 153 个

周期,其中 31 例妊娠,而来自 ICSI 者共 115 个冷冻周期,其中 27 例妊娠。解冻胚胎能否妊娠,与其来自常规 IVF 或是 ICSI 并没有关系($P=0.527$)。在冷冻胚胎移植过程中移植管是否血染、是否需要使用宫颈钳都与妊娠与否没有显著性差异($P=0.602, P=0.949$)。

3 讨论

本中心在 2003-2004 年度共进行了 268 例自然周期冷冻胚胎移植,其中 58 例临床妊娠,妊娠率为 21.6%。这和国外其它中心报道的冷冻胚胎移植妊娠率基本一致。虽然冷冻胚胎妊娠率仍然低于中心进行新鲜胚胎移植的妊娠率^[9],但由于它的成本远远低于新鲜周期,因此 20%左右的成功率也是可以接受的。

3.1 年龄对 TET 周期结局的影响

大量研究显示新鲜胚胎移植周期中随着年龄的增长,妊娠率逐渐下降。但是在冷冻胚胎移植周期中,年龄是否也是影响妊娠结局的重要因素呢?本研究发现,妊娠组患者年龄较未妊娠组年轻,具有统计学意义。这与其它学者的研究结果是一致的^[2-3]。研究结果提示,35 岁以下(含 35 岁)患者接受冷冻胚胎移植治疗的妊娠率为 23.5%,而 35 岁以上者仅为 8.8%,40 岁以上者则无 1 例妊娠。这些妊娠率并没有显著性差异,也许是因为高龄组样本较小的缘故。随着年龄增大,患者获卵数目明显减低,因此在新鲜胚胎移植后仍然可以有冷冻胚胎者也明显减少,所以扩大高龄组样本量相对比较困难。本文也发现,35 岁以上患者,虽然在 LH 峰日 E_2 水平与 35 岁以下组没有显著性差别,但是血 LH 峰值明显降低,内膜明显变薄。是否随着年龄增长,子宫内膜的雌激素受体也逐渐衰减呢?这些有待进一步研究。

3.2 移植胚胎数目和质量对 TET 周期结局的影响

大多数学者认为移植胚胎的数目越多,妊娠率也越高,但多胎妊娠率也显著升高。因此,提高胚胎质量,限制移植胚胎个数已成为共识。根据我国法律规定,在冷冻胚胎移植中,最多可移植 3 个胚胎。Hazlett 等^[10]对冷冻胚胎移植数目对妊娠率的影响进行分析,34 个周期移植 2 个胚胎,而 24 个周期移植 3 个胚胎,两组的年龄、胚胎细胞数都没有差异。结果发现,移植 2 个冻融胚胎和移植 3 个组,妊娠率并没有差别,而多胎率却有所下降。在本研究中,虽然移植 1 个胚胎的妊娠率较移植

两个和 3 个胚胎者低,但是并没有统计学差异。但移植 1 个胚胎的样本量较小,还需要继续跟踪,总结资料。另外,移植 1 个胚胎组与移植 2 个和 3 个者平均细胞数目上都没有显著差异,提示当胚胎质量较好时,移植 1 个胚胎并不会明显降低妊娠率,但却可以显著降低多胎率。

3.3 LH 峰内膜类型和厚度对 TET 结局的影响

许多学者报道,IVF-ET 周期超声监测下内膜呈三线征回声可以提高妊娠率,但也有学者并不认同^[11,12]。对于冷冻胚胎的影响,目前尚无定论。Check 等^[13]研究发现,在移植冷冻胚胎 3 d 后,内膜回声不均者妊娠率明显下降。本中心则是在 LH 峰日对内膜进行 B 超监测,268 个移植周期中,250 个周期表现为 A 型三线征内膜,仅 13 个周期表现为非 A 型内膜,其妊娠率仅为 7.7%,低于 A 型内膜组(22.0%),但是没有显著型差异。比较同日血激素水平,LH 和 E_2 水平在 A 型内膜中相应较高,在非 A 型内膜患者则较低,但是还没有达到显著性差别。也许这和非 A 型内膜组例数较少有关。而非 A 型组样本较小,需要继续积累资料,进一步研究统计。可以推测当自然周期中血 LH 浓度和 E_2 浓度不能达到一定水平时,内膜就不能表现为显著的三线征,从而影响妊娠率。

关于子宫内膜厚度对 IVF-ET 妊娠的影响的研究众多,多数认为内膜过厚或过薄都降低妊娠率。但对接受自然周期冷冻胚胎移植者的研究较少。有学者认为,自然周期中内膜 < 8 mm 并不会导致低妊娠率^[14]。本文资料显示,妊娠组和非妊娠组患者在 LH 峰日子宫内膜的平均厚度均在 10 mm 左右,没有显著性差异。这可能与中心对自然周期冷冻胚胎移植患者进行 B 超监测有关。当超声检查发现患者内膜过薄(LH 峰日内膜 < 6 mm)时,均建议患者采用激素替代周期治疗下接受冷冻胚胎移植。因此自然周期内膜超过 6 mm 时,患者进行冷冻胚胎移植的成功率并不会受到影响。

参考文献:

- [1] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo[J]. *Nature*, 1983, 305(5936): 707-9.
- [2] Piette C, de Mounzon J, Bachelot A, et al. In vitro fertilization: Influence of a woman's age on pregnancy rates[J]. *Hum Reprod*, 1990, 5(1): 56-9.
- [3] Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program[J]. *Fertil Steril*, 1993, 59(5): 1070-4.

- [4] White LB, Kelk A, Hahn SJ, et al. Pregnancy outcome from an In Vitro Fertilization-Embryo transfer (IVF-ET) cycle is not a predictor for frozen embryo transfer success[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(9) suppl 3: S246.
- [5] 于红玲, 张慧琴, 邓晓惠, 等. 冷冻复苏胚胎自然周期与激素替代周期移植妊娠率的比较 [J]. *山东医药*, 2003, 43(32): 16-7.
- [6] 陈士岭, 孔令红, 黄敏珍. 冷融胚胎移植的临床应用 (附 36 例分析) [J]. *第一军医大学学报*, 2000, 20(1): 74-6.
- [7] American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1993 results generated from the American Society for reproductive medicine/society for Assisted Reproductive Technology Registry [J]. *Fertil Steril*, 1995, 64(1): 13-21.
- [8] Khalifa E, Brzyski RG, Oehninger S, et al. Sonographic appearance of the endometrium: the predictive value for the outcome of in-vitro fertilization in stimulated cycles [J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(5), 677-80.
- [9] 钟依平, 周灿权, 庄广伦, 等. 黄体生成素在控制性超排卵中的应用 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2003, 24(3): 164-7.
- [10] Hazlett W, Karande V, Vietzke M. How many frozen embryos should be transferred: Is 3 better than 2? [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(3) suppl 1: S126-7.
- [11] Check JH, Nowroozi K, Choe JK, et al. Influence of endometrial thickness and echo patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 1991, 56(6): 1173-5.
- [12] 苗本郁, 周灿权, 庄广伦. 体外受精与胚胎移植治疗周期中子宫内膜厚度和回声类型与妊娠结局的关系 [J]. *新医学*, 2000, 31(增刊): 74-75.
- [13] Check JH, Dietterich C, Nazari A, et al. Non-homogeneous hyperechogenic pattern three days after frozen embryo transfer is associated with low pregnancy rates [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(3) suppl 1: S128.
- [14] Dietterich C, Wang W, Shucoski K, et al. The relationship of endometrial thickness and pregnancy in infertile women treated without in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(3) suppl 3: S29.

(编辑 张恩健)

(上接第 544 页 from page 544)

的致病原因推测可能是编码的精氨酸残基 (Arg) 突变为亮氨酸残基 (Leu) 后, 导致 ATP7B 第 4 跨膜区蛋白折叠发生错误, 影响了整个蛋白在细胞内的定位, 进而影响了蛋白的铜转运功能^[9]。

Arg778Leu 突变和临床表型的关系分析目前仍然存在一些争议, 但多数人认为该型突变病人发病较早, 以肝型为主。如 Nanji^[9]等对 28 例 WD 患者和同胞进行 WD 所有外显子测序, 发现 3 例有 Arg778Leu 的 WD 患者, 这些患者均有明显的肝脏损害且起病年龄较早 (4 到 16 岁)。国内刘晓青等^[10]报道了 15 例纯合的 Arg778Leu 突变的 WD 患者的临床表型都以肝脏损害为主。

参考文献:

- [1] 梁秀龄. 肝豆状核变性的分子生物学研究 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2):86-9.
- [2] 徐评议, 梁秀龄, 马少春. 肝豆状核变性基因突变分析 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(2): 97-9.
- [3] 丰岩清, 国宁, 王莹, 等. 应用 USE 定点诱变技术制备 Wilson 病突变体 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2003, 24(6):585-8.
- [4] Chino MS, Lennard MS, Tucker GT, et al. The expression of human cytochrome P450IA1 in the yeast *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991,

42(3):753-8.

- [5] Forbes JR, Cox DW. Functional characterization of missense mutation in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? [J]. *Am J Hum Genet*. 1998, 63(6): 1663-74.
- [6] 丰岩清, 王莹, 黄帆, 等. 肝豆状核变性基因表达蛋白的多克隆抗体制备和纯化 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2002, 28(4):241-4.
- [7] Yuan DS, Stearman R, Dancis A, et al. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(7):2632-6.
- [8] 侯国庆, 梁秀龄, 陈嵘, 等. Wilson 病基因产物在人肝细胞内存在和定位的研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 26(4):202-4.
- [9] Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(6): 1423-9.
- [10] 刘晓青, 张建明, 顾学范, 等. Wilson 病 ATP7B 基因 Arg778Leu 突变与临床表型之相关性探讨 [J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(6):359-61.

(编辑 刘清海)