

7 043 个体外培养 - 胚胎移植助孕周期中新鲜胚胎移植周期与全胚冷冻后首次冻融胚胎移植周期分析

陈巧莉, 张孝东, 熊 顺, 叶 虹, 裴 莉, 黄国宁

(重庆市妇幼保健院生殖与遗传研究所, 重庆 400013)

【摘要】目的:比较体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization, IVF-ET)助孕中,新鲜胚胎移植周期与全胚冷冻后首次冻融胚胎移植周期的助孕结局,以探讨全胚冷冻策略是否可以在临床常规开展。**方法:**回顾性分析 2016 年 1 月至 2016 年 12 月在我院接受 IVF/ICSI/FET 助孕的 7 043 个胚胎移植周期。患者根据移植胚胎来源分为 2 组:新鲜胚胎移植周期 (ovum pick up-embryo transfer, OPU-ET)组,采卵周期行新鲜胚胎移植,共 3 353 个周期;冻融胚胎移植组,取消新鲜胚胎移植,行全胚冷冻后首次冻融胚胎移植,共 3 690 个周期;比较 2 组间重度卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)发生率,临床妊娠率、着床率、生化/临床妊娠流产率、异位妊娠率等。**结果:**冻融胚胎移植组平均年龄明显低于 OPU-ET 组[(30.66 ± 4.16) vs. (31.78 ± 4.39), $P < 0.05$],但 2 组临床妊娠率比较无统计学差异[55.77%(2 058/3 690) vs. 55.41%(1 858/3 353), $P = 0.760$];OPU-ET 组重度 OHSS 发生率、异位妊娠率分别为 2.54%(85/3 353)、5.22%(97/1 858),均高于冻融胚胎移植组($P < 0.05$),但生化妊娠流产率低于冻融胚胎移植组,差异有统计学意义[11.82%(249/2 107) vs. 13.86%(331/2 389), $P = 0.040$]。**结论:**冻融胚胎移植可以明显降低异位妊娠率及重度 OHSS 发生率,但临床妊娠率无明显增高且生化妊娠流产率高于鲜胚移植周期,总体助孕结局无明显优势,建议仅对不适宜行新鲜胚胎移植的患者开展全胚冷冻策略。

【关键词】体外受精-胚胎移植;新鲜胚胎移植;全胚冷冻;助孕结局

【中图分类号】R698.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-20

Analysis on outcomes between fresh embryo transfer cycles and frozen all-thawed embryo transfer cycles in 7043 *in vitro* fertilization cycles

Chen Qiaoli, Zhang Xiaodong, Xiong Shun, Ye Hong, Pei Li, Huang Guoning

(Reproductive and Genetic Research Institute, Chongqing Maternal and Child Health Hospital)

【Abstract】Objective: To compare the *in vitro* fertilization (IVF) outcomes between fresh embryo transfer cycles and frozen all-thawed embryo transfer cycles and to evaluate the benefits of the “freeze-all” embryo strategy. **Methods:** A total of 7 043 embryo-transfer cycles performed from January 2016 to December 2016 in women aged less than 37 years were enrolled. Patients were divided into two groups: 3 353 fresh embryo-transfer cycles and 3 690 frozen all-thawed embryo transfer cycles. The demographic characteristics, biochemical /clinical pregnancy abortion rate, clinical pregnancy rate, ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) rate were compared between the two groups. **Results:** Although the patients receiving frozen all-thawed embryo transfer cycles had a significantly younger age than those having fresh embryo transfer cycles [(30.66 ± 4.16) vs. (31.78 ± 4.39) years, $P < 0.05$], no significant difference was found in the clinical pregnancy rate (55.77% vs. 55.41%, $P = 0.760$) between the two groups. The incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome was significantly higher in patients with fresh embryo transfer ($P < 0.05$), but the biochemical pregnancy abortion rate was significantly lower compared with the frozen all-thawed embryo transfer cycles. **Conclusion:** The fresh embryo-transfer cycle has the similar pregnancy outcome with those of frozen all-thawed embryo transfer cycle. Our results support that only the patients who can't receive fresh embryo transfer are suitable for the “freeze-all” embryo strategy.

【Key words】 *in vitro* fertilization; fresh-embryo transfer; freeze-all; pregnancy outcome

作者介绍: 陈巧莉, Email: wy_cql@163.com,

研究方向: 辅助生殖。

通信作者: 叶 虹, Email: yehong1210@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180913.1404.006.html>

(2018-09-14)

近年来随着胚胎冷冻技术的提高,冷冻胚胎移植技术已广泛应用于体外受精-胚胎移植(*in vitro fertilization*, IVF-ET)。关于冻融胚胎移植的研究层出不穷,许多研究结果显示冻融胚胎移植周期能获得与新鲜胚胎移植周期相近甚至更高的临床妊娠率^[1-4]且异位妊娠发生率及卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)的发生率均明显降低^[2-3]。因此,许多生殖中心逐渐将全胚冷冻策略作为临床常规方法应用于助孕患者中,但冷冻操作及冷冻保护剂对于胚胎及子代是否安全?全胚冷冻策略是否可以改善助孕结局?目前仍需要更多有力的证据,本研究纳入各种不孕原因接受 IVF 助孕的患者,比较全胚冷冻后首次冻融胚胎移植与新鲜胚胎移植助孕结局,通过对大样本量数据的回顾性分析,为全胚冷冻策略是否在临床推行提供参考。

1 资料和方法

本研究纳入 2016 年 1 月至 2016 年 12 月在重庆市妇幼保健院接受新鲜 IVF/ICSI-ET/FET 助孕的患者,为避免年龄等因素对助孕结局的干扰,本研究仅纳入年龄 <37 岁、全胚冷冻后首次接受冻融胚胎移植的患者,排除微刺激方案或自然周期助孕、PGD、受孕助孕,共 7 043 个胚胎移植周期,其中新鲜胚胎移植周期(OPU-ET 组)3 353 个;全胚冷冻后首次冻融胚胎移植周期(冻融胚胎组)3 690 个。

1.1 新鲜移植周期

患者均采用标准常规 GnRha 长方案、拮抗剂方案或超长方案促排卵(COH),当有 3 个以上卵泡直径达到 18 mm 以上时,停用 Gn,当晚肌内注射 r-HCG 250 μ g(默克-雪兰诺,德国),36~37 h 后在阴道 B 超引导下穿刺取卵,经常规体外受精或单精子卵胞浆内显微注射方法受精,培养 3 d 后移植 1、2 个胚胎,黄体支持采用阴道黄体酮栓 90 mg/d(默克-雪兰诺,德国)。

1.2 全胚冷冻标准

患者在采卵后 3 d 内出现以下情况之一,则取消新鲜胚胎移植,行全胚冷冻,根据具体原因分为以下几类:①OHSS 高危(2 777 个周期):获卵数 ≥ 20 个;有胸腔积液;双侧卵巢大于 8 cm 伴腹水;血常规 WBC $>15 \times 10^6$ 个/mL;血球压积 $>45\%$,出现上述任意 1 项取消新鲜胚胎移植;②子宫内膜因素(229 个周期):胚胎移植日子宫内膜 <0.7 cm 或怀疑有子宫内膜息肉、病变等;③Gn 期间任何一天血清 $P>2.0$ ng/mL(181 个周期);④胚胎移植日出现宫腔积液(165 个周期);⑤其他(338 个周期):感染、阴道出血、身体健康因素、个人原因等。

1.3 胚胎冷冻及解冻方法

所有的胚胎冷冻及复苏均采用标准的玻璃化冷冻方法及胚胎复苏操作流程^[5],选择发育第 2~3 天 4 细胞以上的 I、II、III 级卵裂期胚胎冷冻,移植前一天解冻胚胎,胚胎复苏成功的标准是:单个胚胎中至少一半卵裂球存活,所有冻融胚胎移植前均行激光辅助孵化。

1.4 冻胚内膜准备

所有冻融胚胎移植周期均采用人工周期,月经来潮或药物撤退性出血第 2 天检查,若血清性激素(雌二醇、促卵泡生成素、促黄体生成素、孕酮、泌乳素、人绒毛膜促性腺激素)处于基础状态,盆腔 B 超检查无异常,则开始口服补佳乐 4 mg/d,7 d 后 B 超检查:若子宫内膜厚度 <7 mm,补佳乐加量至 6~8 mg/d;若子宫内膜厚度 ≥ 7 mm,维持原用量,服用补佳乐累计达 14 d 后再次复查 B 超,若子宫内膜厚度 ≥ 7 mm 则加用阴道黄体酮栓 90 mg/d 转化子宫内膜,3 d 后行冻融胚胎移植。术后继续使用雌激素及黄体酮栓至移植后 14 d。

1.5 妊娠判定及随访

胚胎移植 14 d 后进行血清 HCG 检测,28 d 后行 B 超检查,临床妊娠随访至孕 12 周。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料比较采用 t 检验,计数资料的比较采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 控制性超排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)情况比较

冻融胚胎组患者平均年龄(30.66 ± 4.16)岁,其促排周期 Gn 用量仅($2\ 185 \pm 774$)IU,均明显低于 OPU-ET 组,但获卵数、MII 卵数、可移植胚胎数、移植胚胎数高于 OPU-ET 组,组间比较均有统计学差异($P<0.001$)。OPU-ET 组重度 OHSS 发生率为 2.54%(85/3 353),OHSS 住院人次为 131 人,其中 85 人为重度 OHSS,2 例并发血栓,冻融胚胎移植组无 1 例 OHSS 发生。见表 1。

表 1 2 组患者 COH 情况比较($\bar{x} \pm s, n, \%$)

指标	OPU-ET 组	冻融胚胎组	t 值	P 值
周期数(n)	3 353	3 690		
平均年龄(岁)	31.78 ± 4.39	30.66 ± 4.16	6.790	0.000
Gn 天数(d)	10.89 ± 1.45	10.91 ± 1.49	-0.580	0.230
Gn 量(IU)	2521.30 ± 781.17	2185 ± 774	18.110	0.000
获卵数(个)	9.24 ± 3.97	15.62 ± 6.50	-50.210	0.000
MI 卵数(个)	8.27 ± 3.74	14.15 ± 6.04	-49.520	0.000
可移植胚胎数(个)	3.58 ± 2.12	5.67 ± 3.49	-30.670	0.000
OHSS 住院人次($n, \%$)	131 (3.91)	0 (0.00)		
OHSS 重度人次($n, \%$)	85 (2.54)	0 (0.00)		
血栓人次(%)	2 (0.05)	0 (0.00)		

表 2 2 组妊娠结局分析 ($\bar{x} \pm s, n, \%$)

指标	OPU-ET组	冻融胚胎组	统计量	P 值
周期数	3 353	3 690		
移植胚胎数 (个)	1.89 $\pm$ 0.37	1.94 $\pm$ 0.31	-6.140 ^d	0.000
临床妊娠率 (% , n/n)	55.41 (1858/3353)	55.77 (2058/3690)	0.090 ^e	0.760
生化妊娠流产率 (% , n/n)	11.82 (249/2107) ^a	13.86 (331/2389) ^a	4.140 ^e	0.040
着床率 (% , n/n)	40.85 (2598/6360)	39.30 (2805/7137)	3.350 ^e	0.070
临床妊娠流产率 (% , n/n)	7.70 (143/1858)	9.09 (187/2058)	3.220 ^e	0.070
异位妊娠率 (% , n/n)	5.22 (97/1858) ^b	3.84 (79/2058) ^c	4.330 ^e	0.040
继续妊娠率 (% , n/n)	48.97 (1642/3353)	48.67 (1796/3690)	0.060 ^e	0.800

注:a,生化妊娠流产率=生化妊娠流产周期数/生化妊娠流产周期数+临床妊娠周期数;b:包括 24 个宫内合并外孕周期;c:包括 4 个宫内合并外孕周期,术后均继续妊娠,归入继续妊娠周期中;d:t 值;e: χ^2 值

2.2 助孕结局比较

2 组临床妊娠率、着床率、临床妊娠流产率、继续妊娠率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),OPU-ET 组异位妊娠发生率明显高于冻融胚胎组 [5.22% (97/1 858) vs. 3.84% (79/2 058), $P=0.037$],但生化妊娠流产率低于冻融胚胎组,差异有统计学意义 [11.82% (249/2 107) vs. 13.86% (331/2 389), $P=0.040$]。见表 2。

3 讨 论

OHSS 是由于控制性超促排卵的应用而产生的特有的医源性并发症^[6],重症患者处理不当或不及时可危及生命,目前临床上对 OHSS 尚无有效治疗措施,只能对症治疗,因此预防其发生是关键,对 OHSS 高危患者实施全胚冷冻是目前公认的最有效的措施之一^[7]。本研究因 OHSS 高危接受全胚冷冻的患者占冻融胚胎组 75.3%,该组患者平均年龄、Gn 用量均较新鲜胚胎移植组低,而获卵数却高于 OPU-ET 组 ($P<0.001$),提示该组患者年轻,卵巢反应性高,与 2016 年美国生殖协会发布的《预防和治疗中、重度 OHSS 指南》中提到的 OHSS 高危人群:年轻、低体质量、COH 中卵巢高反应性等特点一致^[7],但该组实施胚胎移植后无一例重度 OHSS 发生,而 OPU-ET 组重度 OHSS 发生率为 2.54%,证实全胚冷冻能确实有效降低了重度 OHSS 的发生率,与其他文献报道一致^[2-3]。

目前冻融胚胎与新鲜胚胎临床妊娠率是否有差异,国内外报道不一。Roque 等^[8]研究发现,冻融胚胎妊娠结局较新鲜胚胎有明显改善,其原因估计与较促排周期而言,冻胚移植周期机体处于近于自然

状态的种植模式下,子宫内膜容受性好,且胚胎与子宫内膜的同步性更佳有关。而 Shahrokh-Tehrani 等^[9] 1 项包含 11 201 名患者的回顾性研究中也未发现临床妊娠率在冻胚胎移植周期和新鲜胚胎移植周期有差异,且冻融胚胎组早产率明显增高。Shapiro 等^[9]也提出,即使选取优质胚胎进行冻融移植,其妊娠结局仍然与新鲜胚胎移植周期一样。国内有研究发现,因 OHSS 高危进行全胚冷冻后,首次冻融胚胎移植的 250 个周期的临床妊娠率和着床率均有下降,提示胚胎冷冻可能影响胚胎的发育潜能^[10]。年龄是影响 IVF 成功率的主要因素。本研究中虽然实施冻融胚胎移植的患者年龄条件优于新鲜胚胎移植组 ($P=0.000$),但结果显示临床妊娠率在 2 组间无统计学意义 ($P=0.760$)。随着冷冻技术的提高,冻融胚胎复苏率明显提高,但冷冻技术的安全性问题一直是人们所关注的焦点。冷冻过程中细胞内水分在降温时形成冰晶对细胞膜、细胞器的机械性损伤;降温、复温时细胞内外渗透压改变而造成的渗透性损伤;冷冻保护剂的细胞毒性;低温冷冻对早期胚胎的影响,等等。Park 等^[11]根据胚胎凋亡与凋亡基因表达之间的关系分析玻璃化冷冻胚胎质量变化,发现玻璃化冻存能使胚胎损伤,从而导致 DNA 碎片增多,凋亡相关基因转录,最终降低玻璃化冷冻胚胎发育能力。施晓黎等^[12]研究发现,胚胎冷冻过程中冰晶的形成、高浓度保护剂等因素可能导致胚胎出现甲基化异常,与新鲜胚胎比较,虽然冷冻胚胎甲基化异常率无统计学意义,但甲基化异常率有增高的趋势,因此作者也提出需要扩大样本量,扩展基因种类进一步研究。本研究也发现,冻融胚胎移植组生化妊娠流产率高于新鲜胚胎移植组

($P=0.040$), 不排除冷冻过程对胚胎发育的不利影响。

绝大多数研究均发现新鲜胚胎移植周期异位妊娠发生率较冻胚周期明显增高^[13-15], 与自然生理状态相比, 控制性超促排卵 (COH) 药物刺激大量卵泡发育, 机体处于高水平的雌激素状态, 使输卵管蠕动的强度、频率和方向发生改变, 导致胚胎逆行入输卵管^[13]。此外, 高雌激素状态下子宫内膜血管增生和血管通透性增加, 出现间质增生、水肿, 使间质发育早于腺体; 同时雌、孕激素比值变化使子宫内膜腺体发育迟于间质, 降低了内膜对胚胎的容受性, 最终增加异位妊娠风险^[14-15]。本研究结果也显示, 新鲜胚胎移植组患者异位妊娠发生率为 5.22%, 明显高于冻融胚胎移植组 ($P=0.037$), 与上述结论一致。

冻融胚胎移植虽可以有效降低重度 OHSS 发生率及异位妊娠发生率, 但生化妊娠流产率增高, 临床妊娠率也未有明显提高, 且增加患者经济及心理负担。因此, 建议根据患者的具体情况, 仅对不适合行新鲜胚胎移植的患者实施全胚冷冻策略, 这也是精准医疗意义所在。

参 考 文 献

- [1] Roque M, Lattes K, Serra S. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles; a systematic review and meta-analysis[J]. Fertil Steril, 2013, 99(1): 156-162.
- [2] Londra L, Moreau C, Strobino D. Ectopic pregnancy after in vitro fertilization; differences between fresh and frozen-thawed cycles[J]. Fertil Steril, 2015, 104(1): 110-118.
- [3] Mourad S, Brown J, Farquhar C. Interventions for the prevention of OHSS in ART cycles; an overview of cochrane reviews[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 23(6): 103.
- [4] Shahrokh-Tehranejad E, Vosoog Z, Farajzadeh-Vajari F. Comparison of outcomes of IVF cycles Between transferred frozen thawed embryos and fresh embryos by a 2 year survey[J]. Reprod Infertil, 2017, 18(4): 386-389.
- [5] Xiong S, Liu JX, Gao Y, et al. Shortened equilibration time can compromise clinical outcomes in human embryo vitrification[J]. Hum Fertil, 2016, 19(2): 114-119.
- [6] Blockeel C, Drakopoulos P, Santos-Ribeiro S, et al. A fresh look at the freeze-all protocol; a SWOT analysis[J]. Human Reproduction, 2016, 31(3): 491-497.
- [7] Practice Committee of the American Society for reproductive medicine. Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome; a guideline[J]. Fertil Steril, 2016, 106(7): 1634-1647.
- [8] Roque M, Lattes K, Serra S, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles; a systematic review and meta-analysis[J]. Fertility and Sterility, 2013, 99(1): 156-162.
- [9] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization; a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders[J]. Fertil Steril, 2011, 96(2): 344-348.
- [10] 龚 斐, 宗豫容, 张顺吉, 等. 全胚冷冻后行 FET 避免 IVF/ICSI-ET 助孕治疗中、重度 OHSS 发生风险[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(34): 4310-4312.
- [11] Park SY, Kim EY, Cui XS, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts[J]. Zygote, 2006, 14(2): 125-131.
- [12] 施晓鳌, 陈士岭, 郑海燕, 等. 冷冻胚胎印记基因 H19 的 DNA 甲基化状态研究[J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(5): 524-531.
- [13] Lesny P, Rillick SR, Robinson J, et al. Transcervical embryo transfer as a risk factor for ectopic pregnancy[J]. Fertil Steril, 1999, 72(2): 305-309.
- [14] Macklon NS, Gaast MHVD, Hamilton A, et al. The impact of ovarian stimulation with recombinant FSH in combination with GnRH antagonist on the endometrial transcriptome in the window of implantation[J]. Reproductive Sciences, 2008, 15(4): 357-365.
- [15] Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF[J]. Human Reproduction Update, 2003, 9(6): 515.

(责任编辑: 张辉洁)