

解冻囊胚体外培养时间与妊娠结局的关系

周 静^{1,2}, 廖宏庆^{1,2*}, 周 俊^{1,2}, 聂玉林^{1,2}

(1. 南华大学附属第二医院妇产科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华星辉生殖健康专科医院)

摘要: **目的** 比较冻融囊胚周期解冻后体外培养的时间对妊娠结局的影响。 **方法** 回顾性分析 155 例首次接受冻融胚胎移植周期(FET)的患者, 其中 38 个囊胚解冻周期在排卵或肌注黄体酮后 4 天进行解冻复苏, 培养 16~18 h 后进行移植(16~18 h 组), 117 个囊胚解冻周期在排卵或肌注黄体酮后 4 天进行解冻, 培养 2~3 h 后移植(2~3 h 组), 对两组患者平均年龄、原发不孕比例、自然周期比例、移植胚胎枚数、移植优质囊胚比例、移植日内膜厚度、临床妊娠率、胚胎种植率、流产率等数据进行对照分析。 **结果** 两组患者平均年龄、原发不孕比例、自然周期比例、移植胚胎枚数、移植优质囊胚比例、移植日内膜厚度均无统计学差异($P>0.05$), 16~18 h 组临床妊娠率、种植率与 2~3 h 组无统计学差异($P>0.05$); 16~18 h 组的流产率显著高于 2~3 h 组($P<0.05$)。 **结论** 解冻囊胚培养 2~3 h 移植, 能够有效降低流产率, 改善妊娠结局。

关键词: 冻融囊胚移植; 临床妊娠率; 种植率

中图分类号: R71 文献标识码: A

Effect of the Culture Time for Thawed Blastocysts on Pregnancy Outcome

ZHOU Jing, LIAO Hongqing, ZHOU Jun, et al

(The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of culture time in vitro of thawed blastocysts on pregnancy outcome. **Methods** The frozen-thawed blastocysts which were thawed at 4 days after ovulation or intramuscular injection of progesterone were selected as study objects, 155 patients receiving frozen-thawed embryos transfer (FET) for the first time were analyzed retrospectively. 38 patients receiving FET at 16~18 hours after thawing were selected as 16~18 hours culture group, 117 patients receiving FET at 2~3 hours after thawing were selected as 2~3 hours culture group. The average age of the two groups of patients, the proportion of primary infertility, the proportion of the natural cycle, number of transfer embryos, the proportion of high quality transfer blastocyst, and endometrial thickness on transfer day, clinical pregnancy rate, implantation rate, abortion rate data were compared.

Results There were no statistical differences between two groups on the average age of the two groups of patients, the proportion of primary infertility, the proportion of the natural cycle, number of transfer embryos, the proportion of high quality transfer blastocyst, and endometrial thickness on transfer day ($P>0.05$). The clinical pregnancy rate and implantation rate had no statistical differences between 16~18 hours culture group and 2~3 hours culture group ($P>0.05$); the abortion rate in 2~3 hours culture group was significant lower than that in 16~18 hours culture group ($P<0.05$). **Conclusion** Thawed blastocysts cultured for 2~3 hours to transfer could effectively reduce the abortion rate and improve pregnancy outcome.

Key words: frozen-thawed blastocyst transfer; clinical pregnancy rate; implantation rate

随着序贯培养在生殖领域中的广泛应用, 囊胚培养和移植已经成为很多生殖中心的常规应用技术。囊胚培养是检测胚胎在体外发育潜能的有效筛选方

法, 能淘汰大部分发育潜能差及染色体异常的胚胎, 移植囊胚到宫腔更符合生理状态, 能提高移植周期的种植率、临床妊娠率和活产率^[1], 还可以通过减少移植优质囊胚的数量达到降低多胎率发生的目的。部分生殖中心认为囊胚解冻后培养过夜, 能进一步筛选有良好发育潜能的胚胎, 可增加胚胎植入子宫内膜的机会, 提高临床妊娠率和种植率^[2], 但这一方案延长

了体外培养时间,可能对其表观遗传学产生不确定影响。本研究回顾性比较了解冻囊胚体外培养 2~3 h 与 16~18 h 后移植对于妊娠结局的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性选择 2012 年 5 月~2014 年 1 月本中心行首次冻胚移植(FET)的夫妇,共解冻 155 个周期,女性患者平均年龄 31.0 ± 4.5 岁。

1.2 内膜准备及分组

月经周期规则/有排卵/卵泡监测内膜发育良好者(厚度 > 8 mm)采用自然周期法;行自然周期失败/无排卵或既往排卵障碍者采用激素替代法。16~18 h 组为排卵后或肌注黄体酮后第 4 天进行解冻复苏过夜培养 16~18 h 移植,2~3 h 组为排卵或肌注黄体酮后第 4 天进行解冻培养 2~3 h 后移植。

1.3 冻胚选择及冻融方法

囊胚评级按 Gardner 评分标准,分 3 个指标:囊胚腔的大小,内细胞团以及外胚滋养层。根据囊胚腔的大小分为 6 级,1 级早期囊胚:囊胚腔小于胚胎体积的 1/2;2 级囊胚:囊胚腔超过胚胎体积的 1/2;3 级完全囊胚:囊胚腔几乎占满了整个胚胎;4 级扩张囊胚:囊胚体积扩大,囊胚腔扩张,透明带变薄;5 级孵化囊胚:部分外胚滋养层细胞开始从透明带孵出;6 级孵出囊胚:囊胚完全从透明带中孵出,脱离透明带。根据内细胞团评分 A 级:细胞数多,紧密成团,突起明显;B 级:细胞数较少,疏散或成群;C 级:细胞数很少,难以辨别明显的内细胞团结构。根据滋养外胚层评分 A 级:3 级囊胚滋养层细胞 ≥ 10 个,细胞连续、饱满、分界清晰,4~6 级囊胚滋养层细胞 ≥ 15 个,细胞连续、饱满、分界清晰;B 级:3 级囊胚滋养层 10 > 细胞数 ≥ 5 个,4~6 级囊胚滋养层 15 > 细胞数 ≥ 10 个;C 级:3 级囊胚滋养层细胞数 < 5 个,4~6 级囊胚滋养层细胞数 < 10 个;评分 ≥ 3 BB 的囊胚为优质囊胚,如有一项评级为 C,也进行冷冻。

冻融采用快速冷冻—快速复苏法,囊胚玻璃化冷冻采用 Kitazato 公司玻璃化冷冻套装。按照说明书操作,冷冻时,首先将囊胚皱缩(采用激光打孔法),然后将皱缩好的囊胚依次放入平衡液(ES)中 5~10 min,随后转入玻璃化冷冻液(VS)中,60 s 以内以最小液滴量放到做好标记的(CVM)冷冻钩上,每杆装载 1~2 枚胚胎,迅速投入液氮中,套管保存。

玻璃化冷冻囊胚的解冻采用 Kitazato 公司 Vitrification warming 套装。将玻璃化解冻液(TS)37℃预热 30 min,稀释液(DS),洗涤液 1(WS1)和洗涤液 2(WS2)分别取 0.5 mL,置于培养皿内,室温下平衡 30 min。解冻:从液氮中取出冷冻载杆,迅速将装有胚胎的载杆前端浸入 TS 液中,1 min 内将胚胎转移至 DS 中,3 min 后将胚胎转移至 WS1 中,作用 5 min;最后将胚胎移入 WS2 中,并将培养皿移到 37℃热板上加热 5 min。解冻结束后将囊胚转入囊胚培养液中,置培养箱培养 2~3 h,囊胚腔开始扩张的囊胚适合移植。

1.4 妊娠判定

移植 4 周后 B 超见宫内孕囊为临床妊娠。

1.5 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计学软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 或 % 表示,组间比较采用 *t* 检验或卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

共行解冻患者 155 人,解冻 155 个周期,移植 155 周期,解冻胚胎 300 枚,复苏胚胎 298 枚,移植胚胎 296 枚,平均每周期移植胚胎 1.9 ± 0.3 枚,移植胚胎中优质囊胚比例为 82.8% (245/296),临床妊娠 104 例,周期临床妊娠率 67.1% (104/155),种植 145 枚,种植率 49.0% (145/296);流产 13 例,流产率 12.5% (13/104)。

2.1 复苏周期患者一般资料比较

两组患者平均年龄、原发不孕比例、自然周期比例、移植胚胎枚数、移植优质囊胚比例、移植日内膜厚度均无统计学差异(见表 1)。

2.2 两组妊娠结局比较

解冻后 2~3 h 组和 16~18 h 组在妊娠率和种植率上均无明显差异,2~3 h 组的流产率低于 16~18 h 组(7.7% 比 26.9%),差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 2)。

3 讨 论

目前,大多数生殖中心都采用囊胚培养技术来达到挑选优质胚胎,进而提高成功率、降低多胎率的目的。有研究显示在冻融周期和新鲜周期中移植囊胚数目相近的情况下,冻融周期能够获得更高的临

表1 复苏周期患者一般资料的比较

分组	n	解冻周 期数	年龄(岁)	原发不孕 (例,%)	自然周期 (例,%)	移植胚胎 数(枚)	移植优质囊胚 (枚,%)	移植日内膜 厚度(mm)
16~18h组	38	38	29.6±4.2	13/38(34.2)	26/38(68.4)	1.9±0.3	62/73(84.9)	9.9±1.4
2~3h组	117	117	31.5±4.5	45/117(38.5)	76/117(65.0)	1.9±0.3	183/223(82.1)	10.5±2.0
t值或卡方值			2.38	0.22	0.15	0	0.30	2.05
P值			P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

表2 解冻囊胚体外培养时间对妊娠结局的影响(例,%)

分组	周期数	妊娠率	种植率	流产率
16~18 h组	38	26/38(68.4)	35/73(46.6)	7/26(26.9)
2~3 h组	117	78/117(66.7)	110//223(49.3)	6/78(7.7)
卡方值		0.04	0.16	4.93
P值		P>0.05	P>0.05	0.01~0.05

床妊娠率和胚胎着床率^[3-4]。但囊胚解冻后体外培养时间的长短对于妊娠结局的影响尚无定论,有研究认为延长复苏后体外培养时间会导致流产率增加^[5],也有研究得出相反的结论,认为延长体外培养时间不会导致流产率增加^[2]。本研究结果支持前一种观点。囊胚解冻后培养2~3 h较培养16~18 h移植具有以下几点优势:①延长体外培养时间存在更大的移植取消风险。延长体外培养时间虽然能够进一步筛选发育良好的胚胎,但胚胎体外培养条件要求较高,囊胚培养受到空气质量、培养箱与培养液质量、胚胎操作等影响,延长培养16~18 h可能会因胚胎发育潜力下降甚至停止发育,导致移植取消;②存在表观遗传学隐患。多项研究表明种植前胚胎发育是表观遗传学重组的动力学阶段^[6],胚胎培养会改变印记基因调控^[7]。目前体外培养体系并非最理想的培养环境,胚胎会通过改变表观遗传学来适应这些变化。在体外培养的时间越长,胚胎所做的适应性改变就越多,胚胎发育受到的潜在影响也就越大。本研究发现解冻囊胚移植种植率和妊娠率均在较高水平,但16~18 h组的流产率要明显高于2~3 h组,提示更长时间的体外培养对于胚胎的发育潜能可能存在不良影响;③胚胎暂停理论。有研究表明在多种哺乳动物中都存在一种胚胎自我保护现象,即胚胎暂停(ED, embryonic diapause)现象^[8]。胚胎形成囊胚后如果植入的子宫内膜不适宜种植,胚胎会出现代谢降低发育暂停的现象,这种现象会一直维持到适合的子宫内膜种植窗出现后,再继续发育进行种植,即胚胎具有等待子宫内膜的能力,早移植的胚胎较晚移植的胚胎有更多种植的机会。本研究结果显示,培养2~3 h组种植率数值上高于培养16~18 h组但并无统计学差异,有待

进一步增加样本量进行研究;④与卵裂期胚胎相比,囊胚功能复苏的判断时间较短,复苏囊胚通常在2~3 h内就可以恢复膨胀,囊胚腔重新膨胀即标志着囊胚功能开始恢复。本研究结果证明囊胚腔恢复膨胀是一个在短时间内有效反映胚胎功能恢复的形态学指标,能够对复苏胚胎进行筛选判断。

综上,本研究认为解冻囊胚培养2~3 h进行移植能够获得良好的妊娠率和种植率。解冻后囊胚过夜培养会增加流产率导致不良结局,解冻后2~3 h囊腔膨胀后进行移植能够降低流产率,改善妊娠结局。

参考文献:

[1] Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012,7:2118-2231.

[2] 岳超敏,方丛,宫晓. 囊胚解冻过夜培养后移植对妊娠结局的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34(3):415-420.

[3] Zhu D, Zhang J, Cao S, et al. Vitified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles--time for a new embryo transfer strategy [J]. Fertility and sterility, 2011, 95:1691-1695.

[4] 刘闯,罗亚宁,李丽,等. 冻融周期与新鲜周期囊胚移植的临床结局分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(8):971-974.

[5] 李志强,李艳,田之莹,等. 胚胎复苏后体外孵育时间对妊娠结局的影响[J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(2):29-32.

[6] Shi L, Wu J. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009, 7:59.

[7] Rivera RM. Epigenetic aspects of fertilization and preimplantation development in mammals: lessons from the mouse[J]. Syst Biol Reprod Med, 2010, 56(5):388-404.

[8] Ptak GE, Modlinski JA, Loi P. Embryonic diapause in humans: time to consider [J]? Reprod Biol Endocrinol, 2013, 11:92.