

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.09.015

冻融囊胚体外培养时间对临床结局的影响^{*}

冼英杰,陈彩蓉[△],陈润强,周秀琴,颜秋霞,赵晓英

(广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院生殖医学中心,广东清远 511500)

摘 要:目的 探讨冻融囊胚复苏后体外培养时间对患者临床结局的影响。方法 回顾性分析 2013 年 1 月至 2017 年 12 月在该中心接受冻融囊胚移植的 425 例共 456 周期不孕症患者的临床结局,根据囊胚复苏后体外培养时间的不同分为 A 组(培养时间 ≤ 2 h)、B 组(培养时间 $> 2 \sim 4$ h)、C 组(培养时间 $> 4 \sim 6$ h);A、B、C 3 组按激素替代治疗(HRT)方案和自然周期(NC)方案再分为 6 个亚组,A1 组(培养时间 ≤ 2 h,HRT),A2 组(培养时间 ≤ 2 h,NC);B1 组(培养时间 $> 2 \sim 4$ h,HRT),B2 组(培养时间 $> 2 \sim 4$ h,NC);C1 组(培养时间 $> 4 \sim 6$ h,HRT),C2 组(培养时间 $> 4 \sim 6$ h,NC),比较各组的基本资料及临床结局。结果 A 组、B 组与 C 组及 6 个亚组患者各项临床结局指标比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 冻融囊胚在移植当天复苏,体外培养时长并不影响临床结局。

关键词:胚胎玻璃化冷冻; 囊胚移植; 冻融胚胎移植

中图法分类号:R715.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)09-1208-04

Impact of incubation time on the clinical outcomes of frozen-thawed blastocyst transfer^{*}

XIAN Yingjie, CHEN Cairong[△], CHEN Runqiang, ZHOU Xiuqin, YAN Qiuxia, ZHAO Xiaoying

(Center for Reproductive Medicine, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511500, China)

Abstract: **Objective** To investigate the impact of incubation time of vitrification-warming blastocysts transfer on the clinical outcomes. **Methods** Retrospective analysis was performed on 425 infertility patients with 456 FBT cycles from Jan 2013 to Dec 2017. It was divided into three groups according to incubation time of vitrification-warming blastocysts, group A ≤ 2 h, group B $> 2 \sim 4$ h, group C $> 4 \sim 6$ h. Group A, B and C were subdivided into 6 subgroups according to the HRT and NC, including group A1 (culture time ≤ 2 h, HRT) and group A2 (culture time ≤ 2 h, NC), Group B1 (culture time $> 2 \sim 4$ h, HRT) and group B2 (culture time $> 2 \sim 4$ h, NC); C1 group (culture time $> 4 \sim 6$ h, HRT) and C2 group (culture time $> 4 \sim 6$ h, NC). The basic data and clinical outcomes of each group were compared. **Results** There was no significant difference in the other basic data and clinical outcome indexes among the three groups and 6 subgroups ($P > 0.05$). **Conclusion** The frozen blastocysts are thawed on the day of transplant, the incubation time of vitrification-warming blastocysts does not affect the clinical outcomes.

Key words: embryo vitrification; blastocyst transfer; frozen-thawed embryo transfer

自 1985 年首例冻融胚胎移植(FET)健康婴儿出生以来,该技术已广泛应用于辅助生殖领域。FET 在临床上可按移植胚胎发育阶段的不同分为冻融卵裂期胚胎移植和冻融囊胚期胚胎移植(FBT),其中 FBT 是将卵裂期胚胎通过囊胚培养进一步筛选出更具发育潜力的囊胚,冷冻保存后择期移植的一项技术。该技术不仅可以预防卵巢过度刺激综合征(OHSS)的发生,还可减少对子宫内膜的影响,有利于提高成功率,降低多胎率,使辅助生殖技术更加安全、有效。因此,如何提高 FBT 临床妊娠率受到越来越多的关注。

影响 FBT 临床妊娠的因素有很多,主要是患者年龄、囊胚质量和子宫内膜容受性等,囊胚复苏及培

养时间也是影响因素之一^[1]。但囊胚复苏后在体外培养时长是否会影响临床结局尚存争议,有研究认为延长体外培养时间不会影响患者临床妊娠^[2-3];其他研究则认为培养时间过长或过短均会使患者临床妊娠率降低或流产率增加^[4-5]。本研究回顾性分析本中心 FBT 周期复苏囊胚体外培养时间对临床结局的影响,以期临床 FBT 技术的应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2013 年 1 月至 2017 年 12 月在本中心进行 FBT 治疗的 425 例共 456 周期不孕患者。纳入标准:(1)女性年龄 < 38 岁;(2)移植胚胎均为囊胚;(3)不孕原因为盆腔输卵管因素和男方

^{*} 基金项目:清远市科技计划项目(2013B015)。

作者简介:冼英杰,男,副主任技师,主要从事生殖免疫研究。 [△] 通信作者,E-mail:cairong1222@163.com。

因素;(4)移植日子宫内膜厚度为8~14 mm。排除标准:(1)有习惯性流产或反复种植失败病史;(2)子宫畸形或合并子宫腺肌病、子宫内膜异位症;(3)夫妇双方有遗传病史。按移植囊胚复苏后体外培养时间的不同分为3组,A组:培养时间≤2 h, $n=132$;B组:培养时间>2~4 h, $n=176$;C组:培养时间>4~6 h, $n=148$ 。

1.2 方法

1.2.1 囊胚培养 囊胚培养遵循知情同意原则,在LABOTECT C60(德国)三气培养箱低氧环境中进行,试剂采用 Vitrolife G5 系列序贯培养液。当胚胎发育至完全扩张的囊胚阶段时玻璃化冷冻保存,剩余的被丢弃。所有胚胎均在同等条件下培养。

1.2.2 囊胚分期及质量标准 根据 Gardner 提出的分级标准,对囊胚进行分期和质量分级^[6]。

1.2.3 囊胚玻璃化冷冻-解冻 所有囊胚冷冻前均使用激光使其皱缩。冷冻及复苏试剂、冷冻载体(Cryotop)均购自日本 Kitazato 公司,囊胚的冷冻及复苏步骤按试剂说明书进行操作。囊胚复苏后转入 G2 PLUS 培养液,置于三气培养箱中培养 1~6 h,囊胚腔扩张视为存活,适合用于移植。

1.2.4 FBT 患者子宫内膜准备方案 激素替代治疗(HRT)方案:月经或撤退性出血的第2~3天起给予患者口服戊酸雌二醇(德国拜耳医药保健公司)2~8 mg/d,7 d后根据B超监测子宫内膜厚度,若厚度≥7 mm,维持原剂量7 d;若厚度<7 mm,酌情增加戊酸雌二醇剂量,最高剂量为12 mg/d。当内膜≥8 mm时,肌肉注射黄体酮(P)40~80 mg/d行P转化,冷冻囊胚在给予P后第6天复苏,37℃囊胚培养液中培养1~6 h移植。移植后继续给予戊酸雌二醇和P支持黄体。自然周期(NC)方案:适用于平时月经周期规则,NC监测有排卵者。在自然月经周期第10天开始B超和血清黄体生成激素(LH)、雌二醇(E2)及P监测卵泡发育及内膜发育情况,至卵泡破裂,冷冻囊胚在排卵后5 d复苏,37℃囊胚培养液中培养1~6 h后移植。自排卵后给予P(浙江仙琚制药股份有限公司)20~40 mg/d。A、B、C 3组按治疗方案再分为6个亚组,A1组($n=108$,HRT),A2组($n=24$,NC);B1组($n=139$,HRT),B2组($n=37$,NC);C1组($n=116$,HRT),C2组($n=32$,NC)。

1.2.5 胚胎移植 移植手术均为同一操作者实施。

患者取膀胱截石位,经腹B超引导下胚胎移植,移植管选用 COOK 移植导管。

1.2.6 妊娠结局判断 胚胎移植后9 d查血人绒毛膜促性腺激素(β -HCG),≥10 IU/mL为生化妊娠,阳性者2周后超声检查,见孕囊即诊断为临床妊娠。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较。计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者基本资料的比较 3组患者的平均年龄、不孕年限、内膜厚度、基础FSH、体质量指数(BMI)及复苏率比较,组间差异无统计学意义($P>0.05$);B组平均移植胚胎数比A组和C组较多,但差异无统计学意义($P>0.05$);A组、B组和C组的HRT方案比例相互比较,差异有计学意义($P<0.05$),见表1。

表 1 基本资料在 3 组患者中的比较			
项目	A 组($n=132$)	B 组($n=176$)	C 组($n=148$)
平均年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	30.52±3.80	30.76±3.89	31.30±4.11
不孕年限($\bar{x}\pm s$,年)	4.09±2.52	3.59±2.47	3.68±2.72
内膜厚度($\bar{x}\pm s$,mm)	9.56±1.62	10.47±2.45	10.79±2.56
基础 FSH ($\bar{x}\pm s$,IU/L)	7.08±1.85	7.05±2.17	7.04±4.49
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	21.03±2.72	21.63±3.07	21.38±2.79
平均移植胚胎数($\bar{x}\pm s$,个)	1.61±0.49	1.74±0.44	1.64±0.48
优质囊胚率[%(n/n)]	72.17(153/212)	77.38(236/305)	77.78(189/243)
HRT 比例[%(n/n)]	31.82(42/132)*	51.70(91/176)*	65.54(97/148)
复苏率[%(n/n)]	99.53(212/213)	100.00(305/305)	99.59(243/244)

注:A组、B组与C组间比较,* $P<0.05$

2.2 3组患者临床结局比较 3组患者的临床妊娠率、种植率、生化妊娠率、流产率和多胎率比较,组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表 2 临床结局在 3 组患者中的比较[%(n/n)]			
项目	A 组($n=132$)	B 组($n=176$)	C 组($n=148$)
临床妊娠率	62.88(83/132)	64.77(114/176)	66.22(98/148)
种植率	50.00(106/212)	49.84(152/305)	51.85(126/243)
生化妊娠率	11.12(16/132)	13.07(23/176)	11.49(17/148)
流产率	16.87(14/83)	12.28(14/114)	11.22(11/98)
多胎率	27.71(23/83)	33.3(38/114)	28.57(28/98)

表 3 临床结局在 6 个亚组患者中的比较[%(n/n)]						
项目	A1 组($n=108$)	A2 组($n=24$)	B1 组($n=139$)	B2 组($n=37$)	C1 组($n=116$)	C2 组($n=32$)
临床妊娠率	62.96(68/108)	62.5(15/24)	65.47(91/139)	62.16(23/37)	68.10(79/116)	59.38(19/32)
种植率	50.84(89/177)	45.71(17/35)	50.00(123/246)	49.15(29/59)	53.09(103/194)	48.94(23/49)
生化妊娠率	11.11(12/108)	16.67(4/24)	14.39(20/139)	8.11(3/37)	11.21(13/116)	12.50(4/32)
流产率	14.71(10/68)	26.67(4/15)	12.09(11/91)	13.04(3/23)	12.66(10/79)	5.26(1/19)
多胎率	30.88(21/68)	13.33(2/15)	35.16(32/91)	26.09(6/23)	30.38(24/79)	21.05(4/19)

2.3 6 个亚组患者临床结局比较 HRT 方案的 A1 组、B1 组与 C1 组组间, NC 方案的 A2 组、B2 组和 C2 组组间, 患者的临床妊娠率、种植率、生化妊娠率、流产率和多胎率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 3。

3 讨 论

随着囊胚培养技术的不断改进及玻璃化冷冻方法的出现, FBT 广泛应用于临床, 并呈现快速增长的趋势^[7-8]。快速玻璃化冷冻是一种革命性冷冻技术, 在过去 10 年里正逐步替代传统的慢速冷冻, 成为各生殖中心低温保存胚胎的首选方法。该技术通过使用高浓度的冷冻保护剂和快速冷却来减少冰晶体的形成, 从而避免对胚胎的损害。有文献报道, 使用玻璃化冷冻技术保存囊胚, 可以将原来约 60% 的存活率提升至 90% 以上, 显著提高累积妊娠率^[9-11]。

影响 FBT 成功的因素有很多, 研究结果表明, 冷冻复苏后囊胚质量、患者子宫内膜容受性及胚胎发育与子宫内膜生长的同步性是主要因素^[12]。良好的质量是胚胎种植成功的关键。囊胚培养可以筛选出具有发育潜力的胚胎, 淘汰发育潜能差及染色体异常的胚胎, 许多研究已经证实, 与卵裂期胚胎移植相比, 囊胚移植能显著提高移植周期的临床妊娠率、种植率和活产率^[13-16]。此外, 由于控制性促排卵周期中卵巢刺激会对子宫内膜产生损伤, 导致胚胎发育与子宫内膜生长不同步, 加速种植窗的关闭。因此, 与新鲜囊胚移植相比, 将囊胚冷冻保存后择期移植妊娠结局明显更优^[17]。

在 FBT 周期中, 囊胚复苏后需要在培养液中继续培养一段时间再进行移植, 目的是进行胚胎发育潜能的观察和胚胎的选择。囊胚复苏后是否存活可以从形态学上判断, 但更准确的标准要依赖于发育能力的判断。因此, 复苏囊胚一般在体外培养约 2 h 观察, 判断其存活后再进行移植, 但目前关于囊胚在体外培养时长对临床妊娠率的影响一直有不同的报道。陶林林等^[4]研究提示, 囊胚复苏后体外培养 2~5 h 与小于 2 h 相比较, 患者的临床妊娠率有显著的提高。周静等^[5]指出, 囊胚复苏后培养 2~3 h 移植可以有效降低流产率, 改善妊娠结局。但岳超敏等^[2]通过对囊胚复苏后培养 2~3 h 与过夜培养移植的妊娠结局进行比较, 发现两组差异无统计学意义($P>0.05$), 提示囊胚复苏后在体外培养时间的长短并不影响 FBT 患者的妊娠结局。在本研究中, 所有囊胚均在移植当天复苏, 复苏后 A 组(培养时间 ≤ 2 h)、B 组($>2\sim 4$ h)及 C 组($>4\sim 6$ h)的临床结局比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 与岳超敏等^[2]的研究报道相一致。本研究将 A、B、C 3 组按治疗方案再分为 6 个亚组进行比较, HRT 方案的 A1 组、B1 组与 C1 组组间, NC 方案的 A2 组、B2 组和 C2 组组间, 临床结局比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。原因可能为复苏后的囊胚经

过较短时间培养即可观察到囊胚腔重新扩张, 1 h 后几乎所有存活囊胚均可见囊胚腔扩张, 2 h 后囊胚腔将基本充满透明带内^[18]。因此, 囊胚复苏后培养时间 ≤ 2 h 也可以根据形态学和发育潜能对囊胚进行选择, 提示囊胚复苏后体外培养时间长短对临床结局无显著性影响。

本研究结果显示, A2 组流产率为 26.67%, B2 组 13.04%, C2 组 5.26%, 虽然组间比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但有逐步降低的趋势, 提示在自然周期方案中延长冻融囊胚体外培养时间可能会降低流产率, 因此有待于行前瞻性或大样本量的临床研究进行验证。

综上所述, FBT 周期囊胚在移植当天复苏, 体外培养时长并不影响临床结局, 生殖中心可以根据自身的工作实际情况合理安排当天移植时间。

参考文献

- [1] 柴三明, 王琰, 倪亚莉. 过夜培养对冻融胚胎移植周期妊娠结局的影响[J]. 生殖与避孕, 2010, 30(7): 490-493.
- [2] 岳超敏, 方丛, 宫晓, 等. 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): 415-421.
- [3] 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): 97-101.
- [4] 陶林林, 李国臻, 杨志伟, 等. 冻融胚胎体外培养时间对临床结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(12): 1250-1253.
- [5] 周静, 廖宏庆, 周俊, 等. 解冻囊胚体外培养时间与妊娠结局的关系[J]. 中南医学科学杂志, 2015, 43(2): 150-152.
- [6] GARDNER D K, 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] STANGER J, WONG J, CONCEICAO J, et al. Vitrification of human embryos previously cryostored by either slow freezing or vitrification results in high pregnancy rates[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 24(3): 314-320.
- [8] RIENZI L, GRACIA C, MAGGIULLI R, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance[J]. Hum Reprod Update, 2017, 23(2): 139-155.
- [9] LOUTRADI K, KOLIBIANAKIS E M, VENETIS C, 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.
- [10] MICHELMANN H W, NAYUDU P. Cryopreservation of human embryos[J]. Cell Tissue Banking, 2006(7): 135-141.
- [11] VAN DEN ABBEEL E, CAMUS M, VERHEYEN G, et al. Slow controlled-rate freezing of sequentially(下转第 1214 页)

肠上皮细胞快速生长繁殖,恢复肠黏膜保护功能,提高肝功能。本研究结果表明,研究组患者的肝功能优于对照组($P<0.05$),这说明益生菌在提高患者的肝功能方面发挥了非常重要的作用。

很多研究结果表明,益生菌有很多优点:(1)可以有效地为人体提供有益菌,维持肠道菌群生态平衡。(2)通过调节肠道菌群生态平衡,加快患者胃肠功能的恢复,降低患者体内的血氨及内毒素水平^[12]。(3)消灭对人体有害的细菌,从而有效减少有害细菌产生血氨。(4)维持肠道正常 pH 值,进而降低血氨及内毒素水平,预防肝性脑病的发生。此外,益生菌可以为人体提供微量元素与维生素,通过加快体内蛋白质、脂肪、糖的分解代谢,使人体更容易吸收利用营养物质;同时增强患者的身体免疫力,改善肝脏功能,加快肠胃蠕动。

有学者认为,如果显性肝性脑病得不到及时的治疗,则很容易演变成肝性脑病。研究发现,运用益生菌对显性肝性脑病患者进行治疗,可以有效地降低发生肝性脑病的概率。这就提示患者如果发生了显性肝性脑病,就要及时去医院接受治疗,以免错过最佳的治疗时间,导致肝性脑病的发生,从而提高治疗的效果,保证患者的生活质量。

综上所述,慢性乙型肝炎肝硬化亚临床肝性脑病的治疗过程当中,益生菌的治疗效果更好,临床上应进一步推广应用。

参考文献

- [1] THOMSEN K L, MACNAUGHTAN J, TRITTO G, et al. Clinical and pathophysiological characteristics of cirrhotic patients with grade 1 and minimal hepatic encephalopathy[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146076.
- [2] 李劲松, 陈继军, 朱涛, 等. 俯卧位无创通气联合纳洛酮救治 COPD 并呼吸衰竭的疗效观察[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(3): 65-68.

- [3] ADAMO K B, WILSON S L, FERRARO Z M, et al. Appetite sensations, appetite signaling proteins, and glucose in obese adolescents with subclinical binge eating disorder[J]. Canadian J Diabet, 2017, 2014(3): 312826.
- [4] 王雷, 李成安. 幽门螺杆菌感染对鹿城区高氨血症和肝性脑病发病的影响分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 3(2): 150-152.
- [5] 王威巍, 张宇, 尤楠, 等. 粪便细菌移植对肝性脑病大鼠肝功能及血氨的影响[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(13): 1321-1326.
- [6] FERRO J M, VIANA P, SANTOS P. Management of neurologic manifestations in patients with liver disease[J]. Curr Treat Options Neurol, 2016, 18(8): 1-17.
- [7] 李颖, 欧梦莹, 龙凤娇, 等. 以循证为导向的预见性干预措施对轻微型肝性脑病患者肝功能及治疗依从性的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(16): 2792-2795.
- [8] DE M L, GROPELLI G, CORTI R, et al. Disabling portosystemic encephalopathy in a non-cirrhotic patient: Successful endovascular treatment of a giant inferior mesenteric-caval shunt via the left internal iliac vein[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(47): 8426-8431.
- [9] 聂军, 袁晓梅, 罗会平. 门冬氨酸鸟氨酸联合结肠透析治疗肝性脑病的疗效分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 6(3): 335-335.
- [10] MCGANN M, GROSSMAN E E, TAKESUE R K, et al. Arrival and expansion of the invasive foraminifera Trochammina hadai Uchio in Padilla Bay, Washington[J]. Northwest Sci, 2016, 86(1): 9-26.
- [11] 谢能文, 炉军, 何金秋, 等. HBV-ACLF 肝性脑病患者 IL-6、IL-10、TNF- α 水平表达及意义[J]. 重庆医学, 2017, 46(9): 1268-1271.
- [12] 周治明, 赵建农, 王康程, 等. 基于脑皮层厚度分析在肝性脑病结构改变的研究[J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(2): 171-175.

(收稿日期: 2018-09-13 修回日期: 2018-12-25)

(上接第 1210 页)

- cultured human blastocysts: an evaluation of two freezing strategies[J]. Hum Reprod, 2005(20): 2939-2945.
- [12] 刘艳丽, 李君芳, 张玉超, 等. 冻融胚胎移植周期临床结局的影响因素[J]. 郑州大学学报(医学版), 2017, 52(4): 434-438.
- [13] SHAW-JACKSON C, BERTRAND E, BECKER B, et al. Vitricification of blastocysts derived from fair to poor quality cleavage stage embryos can produce high pregnancy rates after warming[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(8): 1035-1042.
- [14] DE VOS A, VAN LANDUYT L, SANTOS-RIBEIRO S A, et al. Cumulative live birth rates after fresh and vitricified cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in the first treatment cycle[J]. Human Rep, 2016, 31

(11): 2442-2449.

- [15] 李楠, 赵冰玲, 唐妮, 等. 低级别胚胎囊胚培养及临床结局的研究[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(5): 802-804.
- [16] 唐永梅, 韦立红, 韦继红, 等. 选择性囊胚培养和移植的临床应用和效果分析[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(18): 2958-2960.
- [17] ZHU D D, ZHANG J J, CAO S R, et al. Vitricified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles—time for a new embryo transfer strategy? [J]. Fertil Steril, 2011, 95(5): 1691-1695.
- [18] 黄国宁, 孙海翔. 体外受精-胚胎移植实验室技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 279-280.

(收稿日期: 2018-09-20 修回日期: 2018-12-29)