

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.012

• 临床研究 •

源自睾丸精子冻融胚胎卵裂球完整性及恢复卵裂对生育结局的影响*

徐源 孙健 陈威 刘源 吴煜 张箴波[△]

(上海交通大学附属第一人民医院辅助生殖医学科 上海 201620)

摘要 目的:探讨源自睾丸活检或睾丸显微取精形成的胚胎冷冻复苏后卵裂球完整性及是否恢复卵裂与生育结局的关系。**方法:**回顾性分析 658 个冻融胚胎移植(FET)周期,根据精子来源将其分为手淫精子组(ICSI 组)445 周期,睾丸活检或睾丸显微取精组(TESA 组)213 周期。ICSI 组根据复苏 2 枚胚胎后完整个数(0、1、2 枚)分为 3 组(A、B、C 组),TESA 组也据此分为 D、E、F 组。ICSI 组根据 2 枚胚胎复苏后恢复卵裂个数(0、1、2 枚)分为 3 组(G、H、I 组),TESA 也据此分为 J、K、L 组。综合比较各组之间的生育结局。**结果:**① ICSI 组与 TESA 组复苏后胚胎完整率、复苏 18-20 h 后胚胎卵裂率、种植率、临床妊娠率、活产率、分娩孕周及出生体重比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但 ICSI 组早期流产率显著高于 TESA 组。② ICSI 中 B 组与 C 组上述妊娠结局指标比较差异无统计学意义($P>0.05$),但种植率、临床妊娠率、活产率均显著高于 A 组($P<0.05$)。TESA 三个亚组比较无统计学差异($P>0.05$)。ICSI 与 TESA 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。③ ICSI 中 I 组种植率、临床妊娠率、继续妊娠率均显著高于 H 组($P<0.05$),且 I 组与 H 组均显著高于 G 组($P<0.05$)。I 组活产率显著高于 G 组和 H 组($P<0.05$)。TESA 中 L 组种植率、临床妊娠率、继续妊娠率、活产率均显著高于 J 组($P<0.05$)。ICSI 与 TESA 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**尽管睾丸活检或睾丸显微取精的精子质量较差,但一旦形成有效胚胎,FET 结局与手淫精子来源的胚胎并无差异。至少移植一枚完整胚胎较移植两枚均破损胚胎具有更好的生育结局。至少移植一枚恢复卵裂的胚胎较两枚均不卵裂胚胎具有更好的生育结局。解冻后无完整胚胎且过夜培养后又均未恢复卵裂的胚胎应慎重考虑该周期是否取消移植。

关键词:冻融胚胎移植;睾丸精子;卵裂球完整性;恢复卵裂;生育结局

中图分类号:R321-33;Q132.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)09-1663-06

Effect of Blastomere Integrity and Resumption of Cleavage on the Reproductive Outcome of Freeze-thawed Embryo Generated from Testicular Spermatozoa*

XU Yuan, SUN Jian, CHEN Wei, LIU Yuan, WU Yu, ZHANG Zhen-bo[△]

(Department of Reproductive Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the blastomere integrity and reproductive outcome, the resumption of cleavage and reproductive outcome respectively, from the freeze-thawed embryo derived from testicular biopsy or testicular microspasm extraction. **Methods:** A retrospective analysis was performed of data from 658 patients who received frozen-thawed embryos transfer (FET). According to sperm source, these embryos were divided into 445 cycles of ejaculated sperm group (ICSI group) and 213 cycles of testicular biopsy or microdissection testicular sperm extraction (TESA group). When two embryos thawed, ICSI group was divided into three groups (A, B, C group) based on the number of integral embryos (0, 1, 2). Similarly, TESA group was also divided into D, E and F groups. ICSI group was divided into three groups (G, H, I group) according to the number of resumption of cleavages (0, 1, 2) after two embryo frozen-thawed. Similarly, TESA was also divided into J, K and L groups. The reproductive outcome were compared between the groups, respectively. **Results:** ① The integrity rate, cleavage rate of embryos cultured in vitro within 18-20 h after thawing, implantation rate, clinical pregnancy rate, live birth rate, gestational age and birth weight were not significant difference between ICSI and TESA group ($P>0.05$). However, the early miscarriage rate in ICSI group was significantly higher than TESA group. ② There was no statistical difference in reproductive outcome mentioned above between group B and group C ($P>0.05$). However, the implantation rate, clinical pregnancy rate and live birth rate were significantly higher than group A ($P<0.05$). The reproductive outcome showed no

* 基金项目:上海市优秀学术带头人计划项目(19XD1423100)

作者简介:徐源(1986-),男,博士,技师,主要研究方向:卵子质量与胚胎发育,电话:15902189741, E-mail: xuyuan0218@163.com

[△] 通讯作者:张箴波,男,博士,副研究员,主要研究方向:子宫内膜增生性病保留生育功能的治疗及后续辅助生殖治疗的临床和基础研究, E-mail: zhengzhenbozzb@aliyun.com

(收稿日期:2019-09-28 接受日期:2019-10-23)

statistical difference between three subgroups of TESA ($P>0.05$). There was no significant difference between ICSI and TESA groups ($P>0.05$). ④ The implantation rate, clinical pregnancy rate and ongoing pregnancy rate of group I were significantly higher than group H ($P<0.05$), and both groups were significantly higher than group G ($P<0.05$). The live birth rate was significantly higher in group I compared with group G and H ($P<0.05$). The implantation rate, clinical pregnancy rate, ongoing pregnancy rate and live birth rate of L group were significantly higher than group J ($P<0.05$). There was no significant difference between ICSI and TESA groups ($P>0.05$).

Conclusions: Although the sperm quality of testicular biopsy or microdissection testicular sperm extraction was poor, the FET outcomes were not different from those embryos derived from ejaculated sperm once effective embryos were formed. Transferring at least one integral embryo had better reproductive outcomes than transferring two blastomere damaged embryos. Similarly, better reproductive outcomes was observed in transferring at least one cleavage embryo than two non-cleavage embryos. If there was neither integral embryo after thawing nor cleavage after overnight culture, it should be carefully considered whether to cancel the FET.

Key words: Frozen-thawed embryo transfer (FET); Testicular spermatozoa; Blastomere integrity; Resumption of cleavage; Reproductive outcome

Chinese Library Classification: R321-33; Q132.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)09-1663-06

前言

随着玻璃化冷冻技术的发展,冻融胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer, FET)已广泛应用于临床,其可增加患者累计临床妊娠率,减轻卵巢过度刺激综合征的发病风险^[1-2],同时降低早产率,围生期死亡率以及新生儿低体重儿出生率^[3-5]。影响 FET 临床妊娠率的因素很多,但就胚胎而言,除了冷冻前胚胎形态学评价,还有复苏后胚胎的完整性以及复苏胚胎是否继续发生卵裂。目前,关于胚胎的完整性以及复苏胚胎是否继续发生卵裂与临床结局的报道大多只关注了胚胎种植率与临床妊娠率^[6,7],并未综合分析生育结局。此外,也未区分不同精子来源形成的胚胎。有研究表明源自睾丸精子和手淫精子的胚胎经受冷冻解冻的能力没有差异^[8],FET 临床妊娠率无明显差异^[9],但两项小样本量的研究睾丸精子均来自睾丸或附睾穿刺取精。而睾丸活检或睾丸显微取精相对前者获得的精子质量较差,且尚未见大样本的 FET 生育结局报道。本研究旨在综合探讨源自睾丸活检或睾丸显微取精形成的冷冻胚胎复苏后胚胎卵裂球完整性及复苏胚胎是否恢复卵裂与 FET 生育结局的关系,从而更好地为 FET 周期挑选较高发育潜能的胚胎提供参考,以提高 FET 的活产率。

1 材料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2015 年 1 月至 2018 年 9 月在本中心进行 FET 的患者资料,这些冷冻胚胎分别来自 343 个手淫精子行 ICSI 取卵周期和 170 个睾丸精子行 ICSI 取卵周期。经胚胎冷冻后分别进行了 445 个 FET 周期(ICSI 组)和 213 个 FET 周期(TESA 组)。

纳入及排除标准:女方患者年龄 ≤ 40 岁,患者所有冻融胚胎均为第 3 天(D3)卵裂期胚胎。睾丸精子均为睾丸活检取精(testicular biopsy)或睾丸显微取精(Microdissection Testicular sperm extraction, MD-TESE)获得的精子。手淫精子均为少弱精,排除受精因素的 ICSI 周期。排除染色体异常、生殖系统畸形、多囊卵巢综合征及排卵障碍。

1.2 胚胎冷冻及复苏

采用加藤(KITAZATO,日本)玻璃化冷冻复苏试剂盒,室温下将胚胎置 ES 液中 8-12 min,平衡结束后将 ES 中的胚胎转入 VS 液中,在 60-90 s 间将胚胎滴到冷冻载体(JY Straw,加拿大)尖端位置,套上套管后迅速浸入液氮。胚胎的复苏:将载杆在液氮中取掉套管后拿出;迅速置 37℃ 下 TS 液中 1 min;然后分别将胚胎移入 DS 液中 3 min,WS1 液中 5 min,WS2 液中 5 min,最后置于预先 37℃、5% CO₂ 培养箱内平衡好的胚胎培养液中,置于培养箱内培养 18-20 h 后移植。

1.3 内膜准备及黄体支持

月经周期规律、排卵正常的患者采用自然周期法,必要时采用来曲唑(芙瑞,江苏)或枸橼酸氯米芬(法兰地,塞浦路斯)微刺激促排卵治疗,阴道 B 超和血液中 LH 和 P 激素水平监测评估卵泡发育及排卵。在排卵后第 3 天解冻胚胎,选择 1-2 枚胚胎移植。既往排卵异常的患者采用激素替代法,即于月经第 3 天起以雌二醇片/雌二醇地屈孕酮片(芬吗通,荷兰)中雌二醇片口服 12-21 d 后,每日填塞黄体同阴道缓释凝胶(雪诺同,英国) 90 mg。使用雪诺同后第 3 天解冻胚胎,选择 1-2 枚胚胎移植。

1.4 妊娠结局判断及检测指标

移植 28-35 d 后进行超声检查,见孕囊和原始血管搏动,为临床妊娠,所有患者随访至胎儿出生后一个月。

可利用胚胎数=D3 所有移植加可冷冻胚胎总数。复苏完整率=完整胚胎数/复苏胚胎总数 $\times 100\%$ 。胚胎有效率=解冻胚胎卵裂球存活 $\geq 50\%$ 的胚胎数/复苏胚胎总数 $\times 100\%$ 。卵裂率=复苏后 18-20 h 恢复有丝分裂的胚胎数/复苏胚胎总数 $\times 100\%$ 。种植率=孕囊数/移植胚胎数 $\times 100\%$ 。临床妊娠率=临床妊娠周期数/移植周期数 $\times 100\%$ 。继续妊娠率=妊娠 12 周以上的临床妊娠周期数/移植周期数 $\times 100\%$ 。流产率=流产数/临床妊娠周期数 $\times 100\%$,早期流产为孕 12 周内的流产,反之则为晚期流产。活产率=活产周期数/移植周期数 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学分析

采用 spss19.0 统计软件进行数据分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)或%表示;组间率的比较根据样本量和期望频数采用 χ^2 或连续性校正 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法;计量数据组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基础数据及取卵周期情况

本研究 FET 的胚胎共来源于 513 个取卵周期, 其中手淫精子组(ICSI)343 周期, 睾丸精子组(TESA)170 周期。两组间患

者取卵年龄及不孕年限存在统计学差异(表 1), 基础 FSH、取卵前 E₂、原发不孕比例、BMI 指数及 Gn 总量没有统计学差异(表 1)。实验室数据中获卵数、MII 卵子数、可冷冻胚胎数也无统计学差异(表 1)。

表 1 两组患者基础数据及取卵周期比较

Table 1 Comparison of the clinical characteristics and oocyte retrieval cycles between two groups

	ICSI	TESA	P
No. of oocyte retrieval cycles (n)	343	170	
Age of oocyte retrieval (y)	30.0±3.7	28.5±3.4	<0.001
FSH (mIU/mL)	7.1±2.9	6.6±2.7	0.083
E2 before oocyte retrieval (pmol/L)	13649±10034	14914±9727	0.178
Primary infertility (% n/n')	81.0 (275/343)	87.6 (149/170)	0.060
Duration of infertility (y)	3.6±2.6	2.8±1.7	<0.001
BMI (kg/m ²)	21.4±3.3	21.5±2.8	0.802
Total dose of Gn (n)	22.6±11.5	23.4±9.8	0.476
No. of oocytes (n)	13.8±8.2	15.2±7.6	0.064
No. of oocytes injected (n)	11.4±6.9	12.2±6.3	0.229
No. of available embryos (n)	4.5±2.3	4.4±2.0	0.729

2.2 患者 FET 周期情况

ICSI 和 TESA 组分别复苏 445 和 214 周期, 除 TESA 中 1 例复苏后无有效胚胎且无剩余胚胎取消 FET 周期外, 其他周期均有可移植胚胎。两组间患者移植时年龄存在统计学差异(表 1)。此外, 两组 FET 周期内膜厚度, 人均复苏胚胎数、人均移植胚胎数、复苏后胚胎完整率、有效胚胎率及复苏 18-20 h 后胚胎卵裂率无统计学差异。两组胚胎种植率、生化妊娠率、临床妊娠率、继续妊娠率、活产率均无统计学差异(表 1)。但 ICSI 组流产率显著高于 TESA 组, 进一步研究发现这种差异主要发生在早期妊娠丢失, 而晚期流产无显著差异(表 1)。异位妊娠率、双胎率、分娩孕周、出生体重均无差异, 临床随访至新生儿出生一月内未见不良事件报道(表 1)。

2.3 胚胎卵裂球完整性对生育结局的影响

为进一步研究不同来源精子形成的胚胎冻融后的完整性对于生育结局的影响。由于仅移植 1 枚胚胎组样本量较小, 本研究在剔除移植 1 枚胚胎后, 将 ICSI 移植两枚胚胎分别分为三组。A 组: 2 枚胚胎均破损组, B 组: 1 枚破损胚胎和 1 枚完整胚胎, C 组: 2 枚完整胚胎。同理 TESA 也分为 D 组 E 组 F 组三个亚组。ICSI 组中 B 组和 C 组种植率、临床妊娠率、继续妊娠率、活产率无统计学差异, 但两组均显著高于 A 组(表 3)。TESA 三个亚组也具有相同趋势, 但并无统计学差异(表 3)。C 组流产率显著低于 B 组, 尽管 A 组流产率更高, 但样本量少无统计学差异, 异位妊娠率、双胎比例、分娩孕周、出生体重均无统计学差异(表 3)。ICSI 与 TESA 组间比较均无显著差异。以上结果表明 ICSI 与 TESA 至少移植一枚完整胚胎较移植两枚均破损胚胎具有更好的生育结局, 两枚完整胚胎较一枚完整胚胎并不显著提高临床妊娠率与活产率。

2.4 复苏后胚胎恢复卵裂对生育结局的影响

为进一步研究不同来源精子形成的胚胎冻融后是否恢复卵裂与生育结局关系。同样原因在剔除移植 1 枚胚胎后, 将 ICSI 组根据解冻后胚胎是否恢复卵裂又分为三个亚组。G 组: 2 枚未卵裂, H 组: 1 枚卵裂 1 枚未卵裂, I 组: 2 枚卵裂。同理 TESA 也分为 J 组 K 组 L 组三个亚组。ICSI 中 I 组种植率、临床妊娠率、继续妊娠率均显著高于 H 组, 且 I 组与 H 组均显著高于 G 组。I 组活产率显著高于 G 组和 H 组。TESA 三个亚组中 L 组种植率、临床妊娠率、继续妊娠率、活产率均显著高于 J 组(表 4)。ICSI 三个亚组流产率无统计学差异。TESA 组中 L 组显著低于 K 组, 主要表现在早期流产(表 4)。异位妊娠率和分娩孕周均无统计学差异, ICSI 中双胎率 I 组显著高于 H 组, 出生体重 L 组显著高于 K 组(表 4)。以上结果表明 ICSI 与 TESA 至少移植一枚恢复卵裂的胚胎较两枚均不卵裂胚胎具有更好的生育结局。

3 讨论

目前, 关于不同来源精子 ICSI 周期新鲜移植的报道较多, 有研究表明随着精子质量下降, 受精率和优秀胚胎率会随之下降^[10]。但也有研究表明睾丸穿或附睾穿刺精子与手淫获得精子行 ICSI 时, 在受精率、卵裂率及临床妊娠率等方面均无明显差异^[11-13]。但上述研究均表明一旦有可利用胚胎, 临床妊娠率, 活产率及新生儿情况并无显著差异。妊娠结局并不受精子来源和数量的影响。本研究也表明尽管无精症患者通过手术获得的精子质量较差, 但与手淫精子 ICSI 组比较可利用胚胎数并无差异, 仍有相同数量的有效胚胎按相同标准被选择进行冷冻。

近年来, 随着 FET 的广泛应用, 也有不同来源精子 FET 的

表 2 两组患者 FET 周期情况的比较
Table 2 Comparison of the FET cycles between two groups

	ICSI	TESA	P
No. of frozen-thawed embryo cycles (n)	445	214	
No. of FET cycles (n)	445	213	
Age of embryo transfer (y)	30.1±3.7	28.8±3.4	<0.001
Endometrial thickness (mm)	9.0±1.3	9.1±1.3	0.254
No. of frozen-thawed embryo (n)	1.99±0.47	1.95±0.44	0.302
Integrity embryo rate (% , n/n')	84.1 (746/887)	82.5 (344/418)	0.412
Available embryo rate (% , n/n')	97.5 (865/887)	98.1 (410/418)	0.524
Cleavage rate (% , n/n')	73.4 (654/887)	73.4 (307/418)	0.913
No. of embryo transferred (n)	1.91±0.29	1.90±0.30	0.791
Implantation rate (% , n/n')	28.0 (238/849)	26.9 (109/405)	0.678
Clinical pregnancy rate (% , n/n')	41.6 (185/445)	40.4 (86/213)	0.770
Ongoing pregnancy rate (% , n/n')	34.8 (155/445)	37.6 (80/213)	0.495
Miscarriage rate (% , n/n')	20.0 (37/185)	9.3 (8/86)	0.028
Early miscarriage rate (% , n/n')	15.7 (29/185)	7.0 (6/86)	0.031
Late miscarriage rate (% , n/n')	4.3 (8/185)	2.3 (2/86)	0.641
Live birth rate (% , n/n')	33.0 (147/445)	36.6 (78/213)	0.364
Ectopic pregnancy rate (% , n/n')	0.5 (1/185)	0 (0/86)	0.694
Twins birth rate (% , n/n')	23.1 (34/147)	16.7 (13/78)	0.256
Gestational age (w)	38.2±2.1	38.6±2.3	0.178
Birthweight (g)	3004±616	3146±608	0.073
Neonatal adverse events*	None	None	

* Neonatal mortality or congenital malformation during follow-up within 1 month of live birth

表 3 卵裂球完整性对 FET 生育结局的影响
Table 3 The impact of blastomere integrity on the reproductive outcome of FET

	ICSI				TESA	
Groups (No. of blastomere integrity embryo)	Group A (0)	Group B (1)	Group C (2)	Group D (0)	Group E (1)	Group F (2)
No. of FET cycles (n)	22	64	318	9	41	142
Implantation rate (% , n/n')	13.6 (6/44)	29.7 (38/128) ^a	28.8 (183/636) ^a	11.1 (2/18)	26.8 (22/82)	27.8 (79/284)
Clinical pregnancy rate (% , n/n')	18.2% (4/22)	48.4 (31/64) ^a	43.7 (139/318) ^a	22.2 (2/9)	43.9 (18/41)	42.3 (60/142)
Ongoing pregnancy rate (% , n/n')	9.1% (2/22)	34.4 (22/64) ^a	38.1 (121/318) ^a	22.2 (2/9)	36.6 (15/41)	38.7 (55/142)
Miscarriage rate (% , n/n')	50% (2/4)	32.3 (10/31)	15.8 (22/139) ^b	0 (0/2)	16.7 (3/18)	12.0 (5/60)
Early miscarriage rate (% , n/n')	50% (2/4)	29.0 (9/31)	12.2 (17/139) ^b	0 (0/2)	16.7 (3/18)	12.0 (5/60)
Late miscarriage rate (% , n/n')	0 (0/4)	3.2 (1/31)	3.6 (5/139)	0 (0/2)	0 (0/18)	0 (0/60)
Live birth rate (% , n/n')	9.1 (2/22)	32.8 (21/64) ^a	36.5 (116/318) ^a	22.2 (2/9)	36.6 (15/41)	38.7 (55/142)
Ectopic pregnancy rate (% , n/n')	0 (0/4)	0 (0/31)	0.7 (1/139)	0 (0/2)	0 (0/18)	0 (0/60)
Twins birth rate (% , n/n')	50 (1/2)	19.0 (4/21)	25.0 (29/116)	0 (0/2)	20.0 (3/15)	17.9 (10/56)
Gestational age (w)	34.6±2.7	38.0±2.4	38.2±2.0 ^a	39.8±0.1	38.7±2.1	38.5±2.4
Birthweight (g)	2416±76	2936±633	3003±618	3225±247 ^a	3125±673	3119±613

Transferred two embryos was included for statistical analysis. ^aP<0.05, compared with group A; ^bP<0.05, compared with group B.

表 4 胚胎复苏后恢复卵裂对 FET 生育结局的影响

Table4 The impact of cleavage resumption of freeze-thawed embryo on the reproductive outcome of FET

Groups (No. of cleavage resumption of freeze-thawed embryo)	ICSI			TESA		
	Group G (2)	Group H (1)	Group I (0)	Group J (2)	Group K (1)	Group L (0)
No. of FET cycles (n)	44	106	254	24	45	123
Implantation rate (% , n/n')	9.1 (8/88)	23.1 (49/212) ^s	33.5 (170/508) ^{ph}	16.7 (8/48)	21.1 (19/90)	30.9 (76/246) ^j
Clinical pregnancy rate (% , n/n')	18.2 (8/44)	37.7 (40/106) ^s	49.6 (126/254) ^{ph}	25.0 (6/29)	37.8 (17/45)	46.3 (57/123) ^j
Ongoing pregnancy rate (% , n/n')	13.6 (6/44)	29.2 (31/106) ^s	42.5 (108/253) ^{ph}	20.8 (5/24)	28.9 (13/45)	45.5 (56/123) ^j
Miscarriage rate (% , n/n')	25.0 (2/8)	25.0 (10/40)	17.5 (22/126)	16.7 (1/6)	23.5 (4/14)	5.3 (3/57) ^k
Early miscarriage rate(% , n/n')	25.0 (2/8)	22.5 (9/40)	13.5 (17/126)	16.7 (1/6)	23.5 (4/14)	1.8 (1/57) ^k
Late miscarriage rate(% , n/n')	0 (0/8)	2.5 (1/40)	4.0 (5/126)	0 (0/6)	0 (0/14)	3.5 (2/57)
Live birth rate(% , n/n')	13.6 (6/44)	28.3 (30/106)	40.6 (103/254) ^{ph}	20.8 (5/24)	28.9 (13/45)	43.9 (54/123) ^j
Ectopic pregnancy rate (% , n/n')	0 (0/8)	0 (0/40)	0.8 (1/126)	0 (0/6)	0 (0/17)	0 (0/57)
Twins birth rate (% , n/n')	0 (0/6)	10.0 (3/30)	30.1 (31/103) ^h	40.0 (2/5)	7.7 (1/13)	18.5 (10/54)
Gestational age (w)	39.3±0.9	38.9±1.3	37.9±2.3	38.2±1.1	38.8±1.8	38.5±2.5
Birthweight (g)	3342±552	3138±455	2924±644	3050±379	3438±648	3068±618 ^k

相关报道。研究表明 IVF 和不同来源精子行 ICSI 所得的优质胚胎经受冷冻复苏的能力没有差异^[8],FET 的临床妊娠率无明显差异^[9],但两项研究睾丸精子均来自睾丸或附睾穿刺取精,且样本量较小。此外,另一项小样本量的研究表明相对于新鲜睾丸精子,睾丸精子来源的胚胎冻融移植后妊娠结局也无显著性差异^[14]。本研究较大样本量的数据的表明尽管 TESA 组移植时女方年龄显著低于 ICSI 组,但似乎与临床关系不大,手淫少弱精与睾丸精子来源的胚胎 FET 具有相似的生育结局。一般认为与射出精子相比,从附睾或睾丸取出的精子出现减数分裂染色体异常和非整倍体的概率明显增加^[15]。睾丸精子来源的胚胎冻融移植后发生妊娠丢失的可能性增大^[16],但也有研究表明这种妊娠丢失并未增加^[18,17]。本研究与前人研究结论相反,ICSI 组流产率显著高于 TESA 组,进一步研究发现这种差异主要发生在早期妊娠丢失,而晚期流产无显著差异,且 ICSI 组生化妊娠率略低于 TESA 组,可能 TESA 组妊娠丢失更多地发生在胚胎着床前,后续还需要更大样本量的数据进一步研究。

卵裂球损伤是 FET 中最常见的现象,可直观地反映胚胎冻融过程中所受到的损伤。现一般认为至少 50%卵裂球数目保持完整的冻融胚胎为有效存活胚胎,适用于移植。研究表明卵裂球的存活状况是影响 FET 周期临床结局的重要因素^[18]。冷冻复苏后卵裂球完整的胚胎提示冻融过程对其造成的损伤较小且基本保持原有的发育能力。能更好地承受冷冻过程的胚胎有着更好的发育潜能^[19]。卵裂球丢失的冻融胚胎的移植结局往往不尽如人意,大量研究证实与卵裂球完整的冻融胚胎相比,卵裂球丢失胚胎的种植能力显著降低^[19,20]。本研究 ICSI 组中移植 1 枚完整和 1 枚破损胚胎较移植 2 枚完整胚胎临床妊娠率和活产率并未受到显著影响;而只有当所移植的 2 枚胚胎均有卵裂球损伤时才对其临床结局有较显著影响,与其它研究结果相近^[21-23]。TESA 组也具有类似的趋势,但由于 TESA 组 2 枚胚胎

均破损组样本量过小导致差异不显著。但值得注意的是,除掉 2 枚破损组样本量过小外,ICSI 组移植 1 枚完整和 1 枚破损胚胎得流产率显著高于较移植 2 枚完整胚胎,与之前的报道一致^[24]。TESA 组具有相同趋势但无统计意义。胚胎破损是否对新生儿产生不良影响,本研究中所有移植破损胚胎的新生儿随访至 1 月未见死亡和先天畸形。尽管分娩孕周中出现 C 组显著高于 A 组,以及新生儿出生体重 D 组显著高于 A 组,但同样因为 2 枚破损胚胎活产个数过低(A 组)并无临床意义。也有研究表明卵裂球丢失与卵裂球完整的冻融胚胎发育而来的单胎子代在童年时期体格发育方面并未表现出显著差异。两组儿童的发育商和智商均值都在正常范围内,智力发育水平也相当,说明人类早期卵裂胚胎冻融过程中发生的卵裂球丢失并未对单胎子代儿童期的生长发育和智力发育产生明显不利影响^[24,25]。本研究的局限之处是未研究破损卵裂球个数对应临床结局的关系。尽管上述研究表明卵裂球丢失胚胎的种植能力显著降低,但有研究表明卵裂球损伤 <25%的胚胎与完整胚胎具有相似的种植率和妊娠结局^[18,23,26-28]。

胚胎的发育潜能通过过夜培养后是否能够恢复卵裂来评判。有研究表明胚胎在解冻后 4 h 有丝分裂即可恢复,冻融胚胎卵裂的恢复预示着胚胎有良好的发育潜能和更好的临床结局^[29]。本研究中,无论 ICSI 还是 TESA 组,2 枚均卵裂组均有更好的妊娠结局,但 ICSI 组双胎率显著高于 H 组,TESA 组也具有相同趋势,这也导致了新生儿出生体重显著低于 K 组。既往也有研究表明无论胚胎是否破损,移植所有卵裂球均有生长的胚胎种植率和继续妊娠率最高^[7,23,30],本研究也证实了这一点,且 ICSI 与 TESA 组中至少移植一枚恢复卵裂的胚胎较不卵裂破损胚胎具有更好的生育结局。另外,针对胚胎完整性和是否恢复卵裂对于妊娠结局的综合分析。本研究中,无论 ICSI 还是 TESA 组移植 2 枚破损胚胎,若均未发生卵裂无一例临床妊娠

(0/10),若有1枚发生卵裂,仅有1例临床妊娠(1/11)且流产,若2枚胚胎均发生卵裂,尽管移植的是破损胚胎,但仍有较大几率临床妊娠(5/10)甚至活产(4/10),临床妊娠率和活产率显著高于至少一枚未卵裂的胚胎,提示2枚胚胎复苏若均破损,培养18-20 h后未恢复卵裂,可以考虑当天重新解冻其他冷冻胚胎或放弃本次移植。而对于复苏后的2枚完整胚胎,ICSI组若2枚胚胎均发生卵裂,临床妊娠率和活产率均显著高于仅有1枚卵裂组和2枚均不卵裂组。TESA组具有相同趋势,但样本量较小无统计学意义,提示尽管胚胎均未破损,但如果胚胎继续培养中没有进一步发育,多提示胚胎的发育潜力较低,临床预后较差。

综上所述,尽管睾丸活检或睾丸显微取精的精子质量较差,但一旦形成有效胚胎,FET结局与手淫精子来源的胚胎并无显著差异。至少移植一枚完整胚胎较移植两枚均破损胚胎具有更好的生育结局。至少移植一枚恢复卵裂的胚胎较两枚均不卵裂胚胎具有更好的生育结局。解冻后无完整胚胎且过夜培养后又均未继续发育的胚胎,应慎重考虑该周期是否取消。

参考文献(References)

- [1] Roque M, Haahr T, Geber S, et al. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes[J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(1): 2-14
- [2] Chen Z J, Shi Y, Sun Y, et al. Fresh versus Frozen Embryos for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome [J]. N Engl J Med, 2016, 375(6): 523-533
- [3] Zhang J, Du M, Li Z, et al. Fresh versus frozen embryo transfer for full-term singleton birth: a retrospective cohort study [J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1): 59
- [4] Wong K M, van Wely M, Mol F, et al. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 3: D11184
- [5] Vuong L N, Dang V Q, Ho T M, et al. IVF Transfer of Fresh or Frozen Embryos in Women without Polycystic Ovaries [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 137-147
- [6] 荆晓,王治鸿,田秀珠,等.解冻后胚胎质量对其临床妊娠结局的影响[J].中国药物与临床,2016,16(7): 951-954
- [7] 陆湘,李路,高晓红,等.卵裂球的完整性和生长与否则对冻融胚胎移植妊娠结局的影响[J].生殖与避孕,2007,27(8): 518-522
- [8] 贺贞,朱明辉,杨丹.不同来源精子行体外受精/卵胞浆内单精子显微注射所得胚胎冻融及移植后妊娠结局比较[J].实用医院临床杂志,2010,7(1): 41-43
- [9] de Cassia S F R, Madaschi C, Nichi M, et al. A comparison of post-thaw results between embryos arising from intracytoplasmic sperm injection using surgically retrieved or ejaculated spermatozoa [J]. Fertil Steril, 2009, 91(3): 727-732
- [10] Lu Y H, Gao H J, Li B J, et al. Different sperm sources and parameters can influence intracytoplasmic sperm injection outcomes before embryo implantation[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2012, 13(1): 1-10
- [11] 赵杰,朱小军,陈秀娟,等.精液参数及精子来源对妊娠结局的影响[J].中华妇幼临床医学杂志(电子版),2015,11(06): 713-718
- [12] 程兰兰,冯宗刚,马丽影,等.不同来源精子对卵胞浆内单精子显微注射助孕结局影响研究[J].中国实用妇科与产科杂志,2018,34(9): 1042-1046
- [13] Gnoth C, Markhinin V, Maxrath B, et al. Impact of sperm cell source on the results of intracytoplasmic sperm injection [J]. Arch Gynecol Obstet, 2015, 291(3): 663-669
- [14] Park Y S, Kim M K, Lim C K, et al. Efficacy of cryopreservation of embryos generated by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa from frozen testicular tissue [J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(10): 1331-1336
- [15] Calogero A E, Burrello N, De Palma A, et al. Sperm aneuploidy in infertile men[J]. Reprod Biomed Online, 2003, 6(3): 310-317
- [16] Pasqualotto F F, Rossi L M, Guilherme P, et al. Etiology-specific outcomes of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients [J]. Fertil Steril, 2005, 83(3): 606-611
- [17] Ku F Y, Wu C C, Hsiao Y W, et al. Association of sperm source with miscarriage and take-home baby after ICSI in cryptozoospermia: a meta-analysis of testicular and ejaculated sperm[J]. Andrology, 2018, 6(6): 882-889
- [18] Dupont C, Hafhouf E, Sermondade N, et al. Delivery rates after elective single cryopreserved embryo transfer related to embryo survival[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015, 188: 6-11
- [19] Yu L, Jia C, Lan Y, et al. Analysis of embryo intactness and developmental potential following slow freezing and vitrification[J]. Syst Biol Reprod Med, 2017, 63(5): 285-293
- [20] Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, et al. Developmental potential of fully intact and partially damaged cryopreserved embryos after laser-assisted removal of necrotic blastomeres and post-thaw culture selection[J]. Fertil Steril, 2005, 84(4): 888-894
- [21] 曾惠明,王珊珊,张宁媛,等.不同冷冻方法造成的冻融胚胎卵裂球损伤对于移植完整胚胎发育潜能的影响[J].山东医药,2014,54(41): 56-58
- [22] 王伟周,魏德莉,沈玉良,等.冻融胚胎移植妊娠结局的影响因素分析[J].生殖医学杂志,2016,25(6): 517-521
- [23] O'Shea L C, Hughes C, Kirkham C, et al. The impact of blastomere survival rates on developmental competence of cryo-thawed Day 2 embryos[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 197: 98-102
- [24] Wu Y T, Li C, Zhu Y M, et al. Outcomes of neonates born following transfers of frozen-thawed cleavage-stage embryos with blastomere loss: a prospective, multicenter, cohort study[J]. BMC Med, 2018, 16(1): 96
- [25] 王宇峰,曹芳,于春梅,等.冻融胚胎卵裂球损伤对移植结局及子代的影响[J].中国妇幼保健,2017,32(4): 801-804
- [26] Tang R, Catt J, Howlett D. Towards defining parameters for a successful single embryo transfer in frozen cycles [J]. Hum Reprod, 2006, 21(5): 1179-1183
- [27] Capodanno F, De Feo G, Gizzo S, et al. Embryo quality before and after slow freezing: Viability, implantation and pregnancy rates in 627 single frozen-thawed embryo replacement cycles following failure of fresh transfer[J]. Reprod Biol, 2016, 16(2): 113-119
- [28] Zheng X, Liu P, Chen G, et al. Viability of frozen-thawed human embryos with one-two blastomeres lysis [J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(7): 281-285
- [29] 孙娟娟,冯云,张爱军,等.冻融胚胎移植周期中胚胎因素的分析研究[J].生殖与避孕,2007,27(9): 577-580
- [30] 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