

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.041

冻融胚胎移植中三种不同内膜准备方法的妊娠结局比较

曾 静 蒋元华 段金良 曾琼芳 王 蕾

(中国人民解放军第一八一中心医院生殖中心 广西 桂林 541002)

摘要 目的:比较三种不同内膜准备方法中复苏胚胎移植的妊娠结局。**方法:**对因女方输卵管因素不孕的 248 个冻融囊胚移植周期的临床资料进行回顾性分析。将内膜准备方法分为自然周期组、全激素替代周期组和半激素替代周期组三种,分别对各组的着床率、临床妊娠率、生化妊娠率和早期流产率进行分析比较。**结果:**自然周期组的子宫内膜厚度显著高于全激素周期组和半激素替代周期组($P<0.05$),差异有统计学意义。而这三组病人在年龄、不孕年限和移植胚胎数目上则均无明显差异($P>0.05$)。另外,三种内膜准备方法的着床率、临床妊娠率、早期流产率及生化妊娠流产率亦无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**冻融胚胎移植中,对于排卵正常患者我们建议采用自然周期法更为经济、方便。而对于月经周期不正常,排卵障碍的病人应依实际情况采用全激素周期或半激素周期方案。

关键词:冻融胚胎;胚胎移植;子宫内膜准备

中图分类号:R714 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1550-04

Comparison of the Effect of Three Different Endometrial Preparation Methods on the Pregnancy Outcome

ZENG Jing, JIANG Yuan-hua, DUAN Jin-liang, ZENG Qiong-fang, WANG Lei

(Reproductive Center, 181st hospital of Chinese People's Liberation Army, Guilin, Guangxi, 541002, China.)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of three different endometrial preparation methods on the pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer (FET). **Methods:** 248 FET cycles those factors of infertility due to the woman's fallopian tubes were retrospectively analyzed and divided into three groups: natural cycle group, completely hormone replacement treatment cycle and partial hormone replacement treatment cycle group. The implantation rate, clinical pregnancy, biochemical pregnancy abortion rate and early abortion rate were compared between these three different groups. **Results:** The natural cycle endometrial thickness group was significantly higher than the completely hormone replacement treatment cycle and partial hormone replacement treatment cycle group ($P<0.05$). The difference was statistically significant. There were no significant differences among the nature cycle group, completely hormone replacement treatment cycle and partial hormone replacement treatment cycle group on the age, duration of infertility and the number of embryos transferred ($P>0.05$). The difference was not statistically significant. The FET cycle outcomes were similar during the nature cycle group, completely hormone replacement treatment cycle and partial hormone replacement treatment cycle group on the implantation rate, clinical pregnancy rate, biochemical pregnancy abortion rate and early abortion rate. There were no significant differences among them ($P>0.05$). The difference was not statistically significant. **Conclusions:** It is proposed that the patients who have normal ovulation to adopt the normal natural cycle method that were more economical and convenient. The patients who have ovulation disorders should be in accordance with the actual situation of the completely hormone replacement treatment cycle or the partial hormone replacement treatment cycle. The doctors choose the best treatment plan should be based on the actual situation of the patients.

Key words: Frozen-thawed embryo; Embryo transfer; Endometrial preparation

Chinese Library Classification(CLC): R741 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1550-04

前言

目前体外受精-胚胎移植治疗已经成为现代社会治疗多种不孕症的最终方法,而基于新鲜胚胎移植后大约有 40%-60%的患者会剩下多余良好的胚胎^[1-2]的现象,为增加胚胎的利用率,减少病人的痛苦,节省病人的花费,澳大利亚 Trouson 等于 1983 年采用冻融人胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer,

FET)获首例妊娠^[3]。之后随着近年来人们对冻融胚胎技术不断完善和改进,冻融胚胎进行体外受精-胚胎移植已经发展成为辅助生育的常规治疗手段之一^[4]。而子宫内膜准备在冻融胚胎移植中是最关键的步骤之一,因此本文将三种不同子宫内膜准备方案的冻融胚胎移植的妊娠结局进行回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 患者资料

回顾性分析 2011 年 1-12 月在我中心进行冻融胚胎移植的 248 位因输卵管因素不孕的患者的资料。其中,原发性不孕

作者简介:曾静(1972-),女,硕士研究生,主治医师,主要从事生殖医学临床研究,E-mail:1422476004@qq.com

(收稿日期:2013-06-07 接受日期:2013-06-30)

有 68 人,继发性不孕有 180 人。

1.2 方法

1.2.1 囊胚获取及培养 采用 2011 年本中心常规长方案 COH (Controlled Ovarian Hyperstimulation,控制性超促排卵),在卵泡直径达 $18\text{ mm} \geq 1$ 个或 $17\text{ mm} \geq 2$ 个或 $16\text{ mm} \geq 3$ 个时,注射 HCG6000~10000 IU,36 h 后取卵,采用常规体外受精方法受

精,24 h 观察受精情况,72 h 观察卵裂球胚胎情况并行 D3 胚胎移植,若胚胎 5 个以上行囊胚培养,并于取卵后第 5 天行囊胚移植,其中将剩余囊胚或因 OHSS、内膜因素等取消鲜胚移植的全部囊胚行冷冻保存。冷冻胚胎标准参照 Gardnen 囊胚评分系统(见表 1、表 2)。

表 1 囊胚分级

Table 1 Blastocyst grading

Grade	Blastocyst expansion process	Blastocyst expansion characteristics
I	Early blastocyst	Blastocoel volume < the blastocyst total volume of 1/2
II	Expanding blastocyst	Blastocoel volume > blastocyst total volume of 1/2
III	Fully expanded blastocyst	The blastocoel occupy the entire blastocyst
IV	Expanded blastocyst	The blastocoel volume expanded significantly over the early blastocyst, zona thinning
V	Being hatched blastocyst	The blastocyst are being hatched from the zona pellucida rip
VI	Hatched blastocyst	The blastula completely escape from the zona pellucida

表 2 内细胞团和滋养层细胞分级

Table 2 Inner cell mass and trophoblast cell fractionation

Grade	The inner cell mass	Trophoblast cells
A	Cell number, arranged compactly	Cell number, dense structure
B	A small number of cells, arranged in loose	Small number of cells loosely structured
C	Very few number of cells	Very few number of cells

1.2.2 胚胎冷冻方法 胚胎冷冻采用 Vitrification cooling 试剂盒(Kitazato, 日本)行玻璃化冷冻方法。操作过程严格按照试剂盒说明进行。冷冻液分为 ES (equilibration solution) 液和 VS (vitrification solution)液,4℃ 保存。使用前必须上下倒置轻轻晃动两下(不可起泡),使之均匀分布,在 37℃ 平衡 30 min,将胚胎放在 ES 液体表面,胚胎会先向下沉,然后出现皱缩再回复,当胚胎膨大到最大程度时,迅速用巴氏吸管取出胚胎。此过程大约需 5~15 min,一般不超过 15 min。然后将其放入 VS 液,在 VS 液中三个不同的位置做吸放(胚胎进入 VS 液的操作必须在 1 分钟内完成),将胚胎放在 Cryotop 时,要将 VS 液量减到最低,用巴氏吸管尽量吸出残留液体,迅速放入液氮中保存。

1.2.3 胚胎复苏方法 胚胎的复苏采用 Vitrification warming 试剂盒(Kitazato 公司,日本)。解冻液(4℃ 保存)分为 TS(warming solution)液、DS(diluent solution)液、WS-1(washing solution1)液和 WS-2(washing solution-2)液。使用前,TS 液与 WS2 液需先预热,37℃ 平衡 30min,将装液氮和 Crytop 的容器尽量靠近显微镜,已取得进入 TS 液之间最短距离。复苏时以最快的速度将载体 Crytop 从液氮中取出插入 TS 液体中,并在显微镜下确定胚胎已从载体上落到 TS 液中,然后将载体拿开(此过程共 1 min)。随后转移到 DS 液中,必须要带有少量的 TS 液,从液体底部放入,液体会慢慢扩散,在 DS 液中操作 5 min。接着转移到 WS-1 液,必须带有少量的 DS 液,从液体底放入,液体将慢慢扩散,在 WS-1 液中操作 3 min。最后转移到 WS-2 液中,将胚胎放入液体表面,且必须将 WS-1 的量减到最少量,在 WS-2 中

操作 3 min。待胚胎细胞形态复苏,将胚胎转入培养液中洗涤干净,放置培养箱培养待移植。解冻后的胚胎有 3 种表现:全部卵裂球完整、部分卵裂球完整和所有卵裂球损伤死亡。通常以解冻后胚胎复苏的卵裂球细胞数 $\geq 50\%$ 总细胞数作为可移植胚胎的标准。复苏后行激光辅助孵化。采用激光在囊胚期胚胎的透明带间隙处打整个囊胚的四分之一大小的孔,使之容易孵出。

1.2.4 用药方案及分组 取卵周期未孕或因其他原因未行鲜胚移植的患者于取卵后 2~3 个周期行冻胚复苏移植。子宫内膜的准备方法如下:(1)自然周期组(NC):既往月经规则者于月经周期第 9~12 天开始经阴道 B 超监测排卵,自然排卵后第 5 天超声测内膜厚度 $\geq 6.5\text{ mm}$ 且回声均匀者于当日行 FET,并于 FET 日开始予黄体酮注射液 20 mg 肌注 qd×14 天黄体支持;(2)全激素替代周期组(HRT):既往月经不规则者于月经周期第三天开始口服戊酸雌二醇片 1mg bid,5 天后超声监测内膜厚度,若已达 7mm,则继续原剂量服用,否则增加至 2 mg bid,最多加量至 3mg tid,至少持续使用戊酸雌二醇片时间达 10-12 天以上,至内膜至少达 6.5 mm 后行内膜转换:D0、D1、D2 黄体酮注射液 20 mg 每日肌注一次;D3、D4 黄体酮注射液 40 mg 每日肌注一次,D5 行 FET,并继续黄体酮注射液 40 mg 肌注 qd×14 天黄体支持;(3)半激素替代治疗组:既往月经规则原拟自然周期准备内膜,a 于月经第 12~15 天尚无发育卵泡,则加予口服戊酸雌二醇片,其方法同激素替代治疗组;b 超声监测卵泡发育达 13 mm 但内膜厚度 < 6.0 mm 加予戊酸雌二醇片 1 mg bid,排卵后 5 天行 FET,于 FET 日开始予黄体酮 20 mg

肌注 qd× 14,同时继续戊酸雌二醇片 1 mg bid。移植后 12~14 天测血β-HCG,2 周后 B 超检测见孕囊为临床妊娠。妊娠后均黄体支持至孕 10 周左右。

1.2.5 统计学方法 结果采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组患者的一般情况比较

表 3 三组患者一般情况比较

Table 3 Comparison of general data of patients in the three groups

Group	N	Age (years)	Duration of infertility (years)	Endometrial thickness (mm)	Average number of embryos transferred
Natural cycle group	153	30.97± 4.01	4.48± 3.24	9.93± 1.65	2.04± 0.46
Completely hormone replacement treatment cycle	48	30.21± 3.21	4.65± 2.99	9.32± 1.54*	2.02± 0.48
Partial hormone replacement treatment cycle group	47	30.64± 4.13	4.32± 3.2	9.15± 1.2*	2.04± 0.51

*注:与自然周期组相比 $P < 0.05$ 。

*Note: compared with natural cycle group, $P < 0.05$.

表 4 三种方案冻融胚胎移植妊娠结局比较

Table 4 Comparison of pregnancy outcomes

Group	implantation rate (%)	clinical pregnancy rate (%)	early abortion rate (%)	biochemical pregnancy abortion rate (%)
Natural cycle group	46.47 (145/312)	66.01 (101/153)	8.91 (9/101)	0.65 (1/153)
Completely hormone replacement treatment cycle	50.52 (49/97)	70.83 (34/48)	5.88 (2/34)	2.08 (1/48)
Partial hormone replacement treatment cycle group	40.63 (39/96)	63.82 (30/47)	7.69 (3/39)	4.25 (2/47)

3 讨论

随着科技的进步,冻融胚胎移植技术已经成为基于新鲜胚胎移植后试管婴儿体外受精的重要突破^[5-6]。近年来,胚胎冷冻技术得到了不断的发展和完善,它突破了新鲜胚胎移植数的限制,同时能完好的保存胚胎以避免二次取卵给卵巢带来的过度刺激^[7-8],既能够提高累积妊娠率又能够减少患者的痛苦,降低患者费用,现今胚胎冻融技术已经成为各大医院采取辅助生殖技术的重要方法,甚至一些生殖中心全部均为 FET 助孕。国内外已经有大量的报道证明,冻融胚胎移植与新鲜胚胎移植在妊娠率和种植率方面没有显著差异,同时本次研究中三种方案的临床妊娠率也均达到了 60%以上,提示本中心实验室已经掌握了胚胎冻融移植技术的最佳可靠移植时机。

胚胎培养过程中,随着囊胚的扩展透明带变薄被蛋白水解酶降解消化,从而囊胚孵出进入子宫内膜正常妊娠。任何使透明带性质改变的因素均可使囊胚孵出失败。为解决这一问题,就冷冻复苏的胚胎进行人工辅助性孵化被提出,虽然这一观点目前仍有很大争议,但已经有文献报道将冷冻复苏的胚胎进行

表 3 所示,自然周期组的子宫内膜厚度显著高于全激素周期组和半激素替代周期组($P < 0.05$),差异有统计学意义。而三组病人在年龄、不孕年限和移植胚胎数目上均无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 冻融胚胎移植三种方案的妊娠结局比较

由表 4 可以得出自然周期组,全激素周期组和半激素替代周期组的着床率、临床妊娠率、早期流产率、生化妊娠流产率三组无显著差异($P > 0.05$)。

人工辅助孵化可以提高胚胎的着床率^[9-10]。现今人工辅助孵化主要有机械、化学和用激光束三种方法,对透明带行部分切除或开窗打洞或消融使之变薄。本中心采用激光辅助孵化法成功也恰恰印证了这一观点的可行性。子宫内膜准备过程中,从经济和安全两方面考虑,自然周期法无疑是最可靠的,因为自然周期法准备子宫内膜的状态是最符合生理要求的,同时对内分泌的干扰最小,而且子宫内膜容受性较好^[11]。同时本次研究统计也发现自然周期组准备的子宫内膜厚度明显厚于其他两组,差异显著,这与 El-Toukhy T 等^[12]和李豫峰等^[13]报道的结论一致。

另外,由结果 2 可以看出本次课题三种冻融胚胎内膜准备方案,自然周期法较其它两组在着床率、临床妊娠率、生化妊娠率以及早期流产率四方面差异均无统计学意义(表 4),这与相关报道一致^[14,15]。而子宫内膜准备是冻融胚胎技术的一个非常重要的环节^[16,17]。目前,用药物和激素来进行子宫内膜准备的方案在冻融胚胎移植周期中的应用已经非常普遍^[18,19]。从经济基础上来说自然周期法无疑是首先方法,但是自然周期法也有局限性,它主要是针对既往排卵正常的病人优先采取的。但是对

于一些排卵障碍或者月经不调的患者,需要通过药物刺激卵巢排卵,使其内分泌状态类似于自然周期排卵状态准备内膜,这种方法需要长时间应用大剂量的外源性激素,费用较自然周期^[20]相对较高。能够正常排卵的自然周期的内膜是最理想的胚胎移植环境,因此对于排卵正常的患者,我们应优先选择经济方便的自然周期法进行冻融胚胎移植。而本次我们还采用了半激素替代周期方法进行胚胎内膜准备,这个方法是介于自然周期及全激素周期之间,即针对一些既往能够正常排卵但是卵泡发育达不到理想水平或卵泡发育良好而内膜偏薄的患者,可以采用半激素替代周期的方法,用激素刺激内膜到能够进行冻融胚胎移植的理想状态,此方法较全激素周期外源性激素类药物少,对患者的副作用也稍少,药物费用也较全激素周期低,一般患者更容易接受。表4的结果提示我们所采用的三种胚胎内膜准备方法都是可行的。

因此,对于能够正常排卵而且月经规则的患者应优先选用经济方便的自然周期法进行子宫内膜准备,而对于月经不规律和有排卵障碍的患者,要根据患者自身的实际情况选择全激素或者半激素周期进行子宫内膜准备。

参考文献(References)

- [1] 陈士岭,孔令红,黄敏珍. 冻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): 74-76
Chen Shi-ling, Kong Ling-hong, Huang Min-zhen. Clinical application of frozen-thawed embryo transfer (Analysis of 36 cases) [J]. First Military Medical University reported. 2000, 20(1): 74-76
- [2] 王晓兰, 刘能辉, 李艳萍. 3 种子宫内膜准备方案对冻融胚胎移植的临床结局比较 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(4): 431-434
Wang Xiao-lan, Liu Neng-hui, Li Yan-ping. Comparison of pregnancy outcome of three endometrial preparation protocols for frozen-thawed embryo transfer [J]. China journal of modern medical. 2011, 21(4): 431-434
- [3] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo [J]. Nature, 1983, 305 (5936): 707-709
- [4] Ghobara T, Vandekerckhove P. Cycle regimens for frozen thawed embryo transfer [DB]. Cochrane Database Syst Rev (online), 2008, 1: CD003414
- [5] 董曦, 傅薇, 徐军, 等. HMG 在改善冷冻胚胎移植周期子宫内膜反应中的应用 [J]. 复旦学报(医学版), 2004, 11 (6): 600-602
Dong Xi, Fu Wei, Xu Jun, et al. An clinical application human menopausal gonadotropin for improvement of poor response of endometrium undergoing frozen-thawed embryo transfer cycles [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2004, 11 (6): 600-602
- [6] 陈华, 孙海翔, 王慧焱, 等. 自然周期与替代周期准备内膜对冷冻胚胎移植结局的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30 (2): 245-248
Chen Hua, Sun Hai-xiang, Wang Hui-yan, et al. The effect of nature cycle and hormone replacement treatment cycle on the outcome of frozen-thawed embryo transfer [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nangjing (Natural Science), 2010, 30(2): 245-248
- [7] Tarek G, Luciano N, Helen H, et al. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study [J]. Fertil Steril, 2006, 85(3): 603-609
- [8] Verwoerd GR, Mathews T, Brinsden PR. Optimal follicle and oocyte numbers for cryopreservation of all embryos in VF cycles at risk of OHSS [J]. Reprod Biomed Online, 2008, 17(3): 312-317
- [9] 李善国. 人类胚胎和助孕技术 [M]. 上海科学技术文献出版社, 1998: 38
Li Shan-guo. Human embryos with assisted reproductive technology [M]. Shanghai Science and Technology Culture Press, 1998: 38
- [10] Liu HC, Cohen J, Alikani M, et al. Assisted hatching facilitates earlier implantation [J]. Fertil Steril, 1993, 60(5): 871-875
- [11] Liu Y, Kodithuwakku SP, Ng PY, et al. Excessive ovarian stimulation up-regulates the Wnt-signaling molecule DKK1 in human endometrium and may affect implantation: an invitro coculture study [J]. Hum Reprod, 2010, 25(2): 479-490
- [12] El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, et al. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles [J]. Fertil Steril, 2008, 89(4): 832-839
- [13] 李豫峰, 朱桂金, 章汉旺, 等. 三种冻融胚胎移植内膜的准备方法比较 [J]. 生殖与避孕, 2009, 29(2): 113-116
Li Yu-feng, Zhu Gui-jin, Zhang Han-wang, et al. Three frozen embryo transplant method of preparation of the endometrium [J]. Reproduction and contraception, 2009, 29(2): 113-116
- [14] Oehninger S, Mayer J, Muasher S. Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo cryopreservation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 169(1-2): 73-77
- [15] 陈士岭, 何锦霞, 宋华东, 等. 应用四种用药方案进行冻融胚胎移植的临床结局比较 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(3): 303-306
Chen Shi-ling, He Jinxia, Song Huadong, et al. Comparison of clinical outcomes of four protocols for frozen-thawed embryo transfer cycle [J]. Journal of Southern Medical University, 2007, 27(3): 303-306
- [16] Guzeloglu K, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation [J]. Reprod Biomed Online, 2007, 15(6): 728-739
- [17] Soares SR, Velasco JA, Fernandez M, et al. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles [J]. Fertil Steril, 2008, 89(3): 491-501
- [18] Glujovsky D, Pesce R, Fiszbaun G, et al. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010, 1: CD006359
- [19] Givens CR, Markun LC, Ryan IP, et al. Outcomes of natural cycles versus programmed cycles for 1677 frozen-thawed embryo transfers [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(3): 380-384
- [20] Eftekhari M, Rahsepar M, Rahmani E. Effect of progesterone supplementation on natural frozen-thawed embryo transfer cycles: a randomized controlled trial [J]. Int J Fertil Steril, 2013, 7(1): 13-20