

论著·临床研究

胚胎质量对冻融周期中生化妊娠和胚胎早期停止发育的影响

夏 兰, 吴 娴, 徐慧慧, 赵 甡, 徐步芳, 张爱军

上海交通大学 医学院附属瑞金医院生殖医学中心, 上海 200025

[摘要] **目的**·探讨在体外受精-胚胎移植冻融周期中, 胚胎的质量是否会影响临床结局导致生化妊娠或早期胚胎停止发育。**方法**·回顾性分析 2015 年 1 月至 2016 年 6 月在上海交通大学医学院附属瑞金医院生殖中心行冻融胚胎移植治疗后生化妊娠的 115 个周期、早期胚胎停止发育的 64 个周期、继续妊娠的 871 个周期的临床资料, 比较移植后第 3 天 (D3) 胚胎质量及评分和囊胚发育速度、囊胚级别在 3 组之间的差异。**结果**·在男女双方年龄、不孕年限、排卵日子宫内膜厚度、移植日雌二醇和孕酮水平等方面 3 组之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。多数 D3 冻融胚的评分为 6~8 分, 且各分值所占比例在 3 组之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。3 组中移植的 D5 囊胚所占的比例均高于 D6 囊胚所占的比例, 但 3 组之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。评级为 A、B 的囊胚内细胞团比例和评级为 C 的囊胚内细胞团比例在 3 组中分别比较, 差异均无统计学意义; 但在胚胎停止发育组中, 评级为 C 的囊胚滋养层所占的比例为 52.2%, 明显高于生化妊娠组 (35%) 和继续妊娠组 (29.3%) 中相应的比例, 且差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论**·胚胎质量与生化妊娠没有必然关系, 而囊胚滋养层的评级可能是胚胎早期停止发育的主要原因之一。

[关键词] 胚胎质量及评分; 囊胚; 生化妊娠; 胚胎早期停止发育

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.03.012 **[中图分类号]** R321 **[文献标志码]** A

Effect of the quality of embryos on biochemical pregnancy or arrest of embryo development in the freezing and thawing cycles

XIA Lan, WU Xian, XU Hui-hui, ZHAO Shen, XU Bu-fang, ZHANG Ai-jun

Center of Reproductive Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate whether the quality of embryos will result in biochemical pregnancy or arrest of embryo development in the freezing and thawing cycles of *in-vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Methods**·The clinical data of patients who accepted IVF-ET in Center of Reproductive Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine from January 2015 to June 2016 were retrospectively studied. The data includes 115 cycles of biochemical pregnancy, 64 cycles of arrest of early embryonic development and 871 cycles of ongoing pregnancy after frozen thawed embryo transfer. We compared the embryo score on the third day after embryo transfer (D3), the blastocyst development rate and the blastocyst grade in the three groups. **Results**·There were no significant differences in the period of infertility, the age of the patients and their spouses, the endometrial thickness, the estrogen and progesterone levels of the day of transplantation among the three groups ($P>0.05$). The scores of most frozen thawed embryos on D3 were from 6 to 8, and the scores were not statistically significant among the three groups ($P>0.05$). The proportion of transplanted blastocyst on D5 was higher than that on D6 in the three groups, but there was no significant difference among the three groups ($P>0.05$). There was no significant difference in the proportion of inner cell mass of blastocysts which were scored as Grade A&B or Grade C among the three groups. Nevertheless, in the arrest of early embryonic development group, the proportion (52.2%) of the trophoblast of blastocysts which were cored as Grade C was significantly higher than the proportion (35%) in biochemical pregnancy group and the proportion (29.3%) in ongoing pregnancy group ($P<0.05$). **Conclusion**·The quality of embryos is not necessarily related to biochemical pregnancy, but the score of trophoblastic may be related to the arrest of early embryo growth.

[Key words] the quality and the score of embryos; blastocyst; biochemical pregnancy; arrest embryo development

体外受精-胚胎移植 (*in-vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 治疗的最终目的是出生健康婴儿。虽然全世界范围内 IVF-ET 的妊娠率已超过 40%, 但是抱婴回家率仍停留在 30% 左右^[1-2]。生化妊娠和早期胚胎停止发

育不但影响了体外受精 (IVF) 的结局, 也给患者带来了巨大的身心痛苦。生化妊娠、胚胎停止发育的相关影响因素较多, 可能与胚胎、内膜、免疫调节、促排卵方案等因素有关^[3-6], 但目前其发生机制仍不清楚。很多患者和临床

[基金项目] 国家自然科学基金 (81300548, 81370763) (National Natural Science Foundation of China, 81300548, 81370763)。

[作者简介] 夏 兰 (1980—), 女, 主管技师, 硕士; 电子信箱: summer_ldh@126.com。

[通信作者] 张爱军, 电子信箱: zhaj1268@163.com。



医生将生化妊娠和胚胎停止发育的主要因素归结为胚胎质量。那么,在 IVF-ET 冻融周期中,胚胎的质量是否会影响临床结局导致生化妊娠或早期胚胎停止发育?如果是有影响,实际工作中能否采取措施避免或改善生化妊娠或早期胎停的临床结局?本研究回顾性分析了 IVF-ET 助孕后生化妊娠患者、早期胚胎停止发育患者和继续妊娠患者的临床资料,探讨胚胎质量对生化妊娠和胚胎停止发育周期的影响,旨在最终提高抱婴率。

1 对象与方法

1.1 研究对象

对 2015 年 1 月至 2016 年 6 月在上海交通大学医学院附属瑞金医院生殖中心行冻融胚胎移植(frozen embryo transfer, FET)治疗后发生生化妊娠的 115 个治疗周期、早期胚胎停止发育的 64 个治疗周期、继续妊娠的 871 个治疗周期进行回顾性分析。从用药进行内膜准备到冻融胚胎移植即为 1 个治疗周期,所有周期的纳入标准:①年龄为 30 ~ 35 岁。②无流产史。③均为原发不孕且不孕年限小于 5 年。④均为单纯女方输卵管因素。⑤均为 IVF 助孕。⑥冻融周期所选方案均为人工周期。⑦均为第一周期冷冻复苏移植。患者接受 FET 前均签署相关知情同意书。

1.2 胚胎冷冻及移植

IVF 促排卵方案和 FET 前内膜准备人工周期方案同我中心常规诊疗方案^[7-8]。授精后第 3 天(D3)胚胎 5 分以上,且授精后第 5 ~ 6 天(D5/6)囊胚采用 Gardner 评分系统对囊胚进行评级^[9],3 期以上内细胞团(inner cell mass, ICM)或者滋养层(trophectoderm, TE)有一项达到 B 级质量,才予以冷冻。所有胚胎均进行玻璃化快速冷冻与复苏。复苏后胚胎培养 2 h 后移植。解冻后 D3 胚胎存活的细胞数 >50% 总细胞数,认为胚胎存活;选取培养 2 h 后再度扩张的 D5/6 胚胎予以移植。

1.3 评价标准

1.3.1 D3 胚胎评分标准 从细胞数目(cell numbers, C)、碎片程度(fragment, F)和卵裂球对称性(symmetric, S)3 个方面评价胚胎发育速度,将 3 个方面的对应评分量化相加(表 1)^[8]。如移植 2 枚胚胎,取评分的平均值。

1.3.2 D5/6 胚胎评分标准 采用 Gardner 评分系统对囊胚进行评级^[9]。根据囊腔扩张程度进行分期,囊腔不足胚胎 50% 的为 1 期,囊腔超过胚胎 50% 的为 2 期,囊腔占满整个胚胎的为 3 期,囊胚扩张透明带变薄的为 4 期,囊

表 1 D3 胚胎评分标准

Tab 1 The scoring standard for embryo on the third day after embryo transfer

项目	胚胎评分				
	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
C	—	2 ~ 4	5	6 ~ 7 或 >10	8 ~ 10
F	>50%	26% ~ 50%	11% ~ 25%	5% ~ 10%	无或 <5%
S	不对称	对称或略不对称	—	—	—

注:胚胎评分 = C + F + S。如 C = 8, F = 5%, S 为对称的,评分即为 4 + 3 + 1 = 8 分。— 表示此类别无此评分项。

胚开始孵化的为 5 期,囊胚完全孵出的为 6 期。ICM 评级: A 表示细胞数目多,排列紧密; B 表示细胞数目较少,排列松散; C 表示细胞数目很少。TE 评级: A 表示细胞数目多,囊腔四周均有细胞,排列紧密; B 表示细胞数较少,排列较松; C 表示细胞数目很少。基于这一标准,考虑评级为 A 或 B 的均可列为优质囊胚,因此,本研究中,将 ICM 评级或 TE 评级为 A、B 的归为同一组(AB),评级为 C 的归为另一组。

1.3.3 生化妊娠 D3 胚胎移植后第 11 天、D5/6 胚胎移植后第 9 天测定血清人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG),HCG 水平 >10 IU/L;移植后第 28 天行阴道 B 超检查,若阴道 B 超未见孕囊且复查血清 β -HCG 升高不明显或下降、月经来潮者^[5]。

1.3.4 早期胚胎停止发育 移植后 4 周, HCG 阳性, B 超检测到宫内孕囊、胚芽,但未见心管搏动;连续 2 次仍无心管搏动或移植后 4 周见心管搏动,孕 9 周内复查 2 次孕囊无发育及心管搏动消失者^[6]。

1.3.5 继续妊娠 移植后 4 周 B 超检测到宫内孕囊、卵黄囊及心管搏动者为临床妊娠且维持至 12 周无明显变化者^[6]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,定性资料采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

比较冻融胚胎移植后生化妊娠组、胚胎停止发育组和继续妊娠组 3 组在女方年龄、男方年龄、不孕年限及 FET 日内膜厚度,均无明显统计学差异($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 一般临床资料比较
Tab 2 General clinical characteristics of the patients

项目	生化妊娠组	胚胎停止发育组	继续妊娠组	χ^2 值	P 值
周期数 /n	115	64	871		
女方年龄 / 岁	33.1 ± 3.2	32.8 ± 4.3	32.3 ± 4.2	2.220	0.109
男方年龄 / 岁	34.6 ± 4.2	35.7 ± 3.9	35.2 ± 4.5	1.426	0.241
不孕年限 / 年	4.3 ± 3.0	4.0 ± 3.6	3.6 ± 3.5	2.322	0.099
FET 日内膜厚度 /mm	10.1 ± 1.9	10.4 ± 1.6	10.3 ± 1.7	0.844	0.430
FET 日内膜形态					
A 型 [n (%)]	79 (68.7)	45 (70.3)	655 (75.2)	3.991	0.407
B 型 [n (%)]	16 (13.9)	10 (15.6)	110 (12.7)		
C 型 [n (%)]	20 (17.4)	9 (14.1)	106 (12.1)		
平均移植胚胎数 /n	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.3	2.341	0.097
移植日雌二醇 / (pmol/L)	790.3 ± 290.6	769.2 ± 243.2	782.1 ± 252.3	0.140	0.869
移植日孕酮 / (nmol/L)	64.9 ± 24.7	63.2 ± 22.5	65.7 ± 23.1	0.382	0.682

2.2 D3 胚胎评分与生化妊娠和胚胎停止发育的关系

移植 D3 冻融胚后生化妊娠总周期数为 75，胚胎停止发育总周期数为 41，继续妊娠总周期数为 628。从表 3 可见，移植胚胎多数为 6 ~ 8 分胚，在 3 组中比较各分值分别所占比例，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 D3 胚胎评分与生化妊娠和胚胎停止发育的关系
Tab 3 Relationship between embryo score on D3 and biochemical pregnancy or arrest embryo development

项目	生化妊娠组	胚胎停止发育组	继续妊娠组	χ^2 值	P 值
周期数 /n	75	41	628		
胚胎评分					
5 ~ 6 分 [n (%)]	17 (22.7)	10 (24.3)	132 (21.0)	0.310	0.578
7 ~ 8 分 [n (%)]	48 (64.0)	26 (63.5)	404 (64.4)		
9 ~ 10 分 [n (%)]	10 (13.3)	5 (12.2)	92 (14.6)		

2.3 D5/6 囊胚质量与生化妊娠和胚胎停止发育的关系

根据囊胚的发育速度分为移植 D5 囊胚和移植 D6 囊胚。在生化妊娠组、胚胎停止发育组和继续妊娠组中，移植的 D5 囊胚所占的比例均高于 D6 囊胚所占的比例，但 3 组之间比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。根据 Gardner 评分标准将对 ICM 和 TE 评分，我们发现 ICM 评级为 AB 的囊胚所占的比例和评级为 C 的囊胚所占的比例，在 3 组中比较，差异均没有统计学意义 ($P>0.05$)；但在胚胎停止发育组中，TE 评级为 C 的囊胚所占的比例为 52.2%，明显高于生化妊娠组 (35%) 和继续妊娠组 (29.3%) 中相应的比例，且差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 4 D5/6 囊胚质量与生化妊娠和胚胎停止发育的关系
Tab 4 Relationship between the quality of blastocyst and the biochemical pregnancy or the arrest of embryo development

项目	生化妊娠组	胚胎停止发育组	继续妊娠组	χ^2 值	P 值
周期数 /n	40	23	243		
移植囊胚的速度					
D5 囊胚 [n (%)]	25 (62.5)	14 (60.9)	157 (64.6)	0.176	0.916
D6 囊胚 [n (%)]	15 (37.5)	9 (39.1)	86 (35.4)		
移植囊胚的级别					
ICM 评分 AB [n (%)]	29 (72.5)	17 (73.9)	175 (72.0)	0.039	0.981
ICM 评分 C [n (%)]	11 (27.5)	6 (26.1)	68 (28.0)		
TE 评分 AB [n (%)]	26 (65.0)	11 (47.8)	172 (70.7)	5.346	0.049
TE 评分 C [n (%)]	14 (35.0)	12 (52.2)	71 (29.3)		

3 讨论

生化妊娠是指 β -HCG 大于正常值，但 B 超检查宫腔内、外均未见孕囊而妊娠终止。胚胎停止发育是指妊娠早期胚胎因某种原因所致发育停止，B 超检查表现为妊娠囊内胎芽或胎儿形态不整，无胎心搏动，或表现为妊娠囊枯萎。在美国，调查显示人群总自然流产率为 10.9%^[10]，而辅助生育技术总流产率为 14.7%^[11]。辅助生育治疗中，胚胎经过人为筛选，择优移植，理论上流产率应当低于普通人群，然而事实上，其流产率依然较高。如何降低辅助生育妊娠的流产率，提高活产率，一直备受关注。另外，自然妊娠早孕胚胎停止发育发生率呈逐渐增加趋势，可能与感染、环境污染、辐射和长期暴露于有毒化学物质环境等不良环境因素增加有关^[12]。对于辅助生育技术助孕后妊

妊娠患者, 女性高龄、夫妇或胚胎染色体异常是早期自然流产的常见原因^[4]。但很多患者和临床医生都会把生化和胎停的主要因素归结为胚胎质量。那么, IVF-ET 冻融周期中, 胚胎的质量是否会影响临床结局导致生化妊娠或早期胚胎停止发育? 本研究在限定女方年龄、不孕原因、不孕年限、授精方式、内膜准备方案等后比较胚胎质量及评分在生化妊娠和早期胚胎停止发育中的意义。

3.1 胚胎质量不是生化妊娠的主要原因

评价胚胎质量的方法很多, 目前临床上主要是通过胚胎的形态学表现来评价胚胎质量, 并挑选移植/冷冻胚胎。本研究通过量化 D3 移植胚胎的质量, 发现所移植胚胎的质量在生化妊娠组和继续妊娠组之间没有统计学差异。这个结论与平时临床医生或患者持有的观点即生化妊娠是胚胎发育潜能欠佳不一致。当然, 通过胚胎发育速度、碎片程度、细胞均一度等形态学指标对 D3 移植胚胎评分存在一定的局限性。如何评价胚胎发育潜能选择优质胚胎移植是改善胚胎着床率、降低多胎妊娠率的关键环节。囊胚在体外培养过程中经历了胚胎的再次选择, 理论上囊胚移植能够达到更高的妊娠率和活产率。因此我们又比较了生化妊娠组和继续妊娠组在移植 D5 囊胚比例和移植 D6 囊胚比例上的差异, 以观察胚胎发育速度的差异是否会影响胚胎质量及评分进而导致生化妊娠。结果发现两者在胚胎发育速度上的差异没有统计学意义。那么所移植的囊胚的级别不同是否会导致生化妊娠? 结果我们发现 ICM 评级为 A/B 和 C 的移植囊胚所占的比例, 或 TE 评级为 A/B 和 C 的移植囊胚所占的比例, 在 2 组之间比较, 均没有统计学差异。我们的研究提示囊胚移植对于生化妊娠没有明显的改善。形态学上的评分主观性太强而并不能完全代表胚胎真实的发育潜能。2003 年 Troneoso 等^[5]通过胚胎植入前遗

传学筛查 (PGS) 筛选整倍体胚胎移植后, 对 62 例行 PGS 后妊娠病例与同期非 PGS 妊娠周期进行比较, 3 组人群生化妊娠比例比较, 无显著性差异, 表明 PGS 并未降低生化妊娠的发生。由此可见除了胚胎质量及评分, 胚胎染色体异常也可能不是生化妊娠的主要原因。

3.2 囊胚 TE 评级状况可能会影响早期胚胎停止发育

我们比较了早期胚胎停止发育组和继续妊娠组所移植胚胎, 发现 D3 胚胎评分, 及 D5/6 囊胚比例在 2 组之间的差异均无统计学意思, 也就是说早期胚胎停止发育与 D3 的胚胎质量及评分、囊胚的发育速度无关。但早期流产组 TE 评级为 C 的囊胚所占的比例要高于继续妊娠组, 2 组之间比较差异也有统计学意义, 这就意味着继续妊娠与否与囊胚的 TE 相关, 与文献报道一致。Ahlström 等^[13]认为 TE 的形态学与胚胎的种植率、妊娠率呈正相关。Honma 等^[14]发现 TE 的形态学与继续妊娠率呈明显的正相关。我们分析继续妊娠与否与囊胚的 TE 相关的原因可能有: ① TE 细胞能够产生 HCG, 而且高级别的 TE 细胞分泌 HCG 时间更早, 分泌量更多, HCG 能够刺激黄体合成和分泌更多孕激素, 能够调节子宫内膜对植入胚胎的容受性, 在母胎对话和成功维持妊娠中发挥着重要作用^[15]。② TE 细胞非整倍体的发生率与其评级呈明显的相关性, Alfarawati 等^[16]发现与评级为 A 的 TE 细胞相比, 评级为 C 的 TE 细胞非整倍体发生率明显升高。

综上所述, 胚胎质量可能不是生化妊娠的主要原因, 而 TE 的评级可能是胚胎早期停止发育的原因之一, 优质囊胚不仅可以提高妊娠率还可以降低流产率。因此, 我们建议尽可能行优质囊胚移植, 对于 TE 评级为 C 的胚胎如果有条件可以在移植前检查胚胎的染色体, 避免植入核型异常的胚胎, 这样有助于降低流产率; 在没有条件的情况下要充分告知患者, 知情同意下再选择 TE 为 C 的囊胚进行移植。

参 考 文 献

- [1] Ying LY, Wu LH, Loke AY. The experience of Chinese couples undergoing in vitro fertilization treatment: perception of the treatment process and partner support[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139691.
- [2] Vaiarelli A, Cimadomo D, Capalbo A, et al. Pre-implantation genetic testing in ART: who will benefit and what is the evidence[J]? J Assist Reprod Genet, 2016, 33(10): 1273-1278.
- [3] Wu T, Yin B, Zhu Y, et al. Molecular cytogenetic analysis of early spontaneous abortions conceived from varying assisted reproductive technology procedures[J]. Mol Cytogenet, 2016, 9: 79.
- [4] Schieve LA, Tatham L, Peterson HB, et al. Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States[J]. Obstet Gynecol, 2003, 101(5 Pt 1): 959-967.
- [5] Troncoso C, Bosch E, Rubio C, et al. The origin of biochemical pregnancies: lessons learned from preimplantation genetic diagnosis[J]. Fertil Steril, 2003, 79(2): 449-450.
- [6] 葛明晓, 张金玉, 关婷, 等. 体外受精-胚胎移植后妊娠早期胚胎停止发育相关因素分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2010, 11(3): 188-190.
- [7] 陈骞, 牛志宏, 张韶珍, 等. 体外受精周期中注射 hCG 日雌激素水平对妊娠结局的影响[J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2011, 31(7): 980-983.
- [8] 牛志宏, 夏丽群, 陈骞, 等. 子宫腺肌病冻融胚胎移植周期子宫内膜准备方案的选择[J]. 生殖医学杂志, 2011, 20(3): 197-200.
- [9] Gardner DK, 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.
- [10] Wilding M. Potential long-term risks associated with maternal aging (the role of the mitochondria)[J]. Fertil Steril, 2015, 103(6): 1397-1401.
- [11] Fisher JR, Rowe H, Hammarberg K. Admissions for early parenting difficulties among women with infants conceived by assisted reproductive technologies: a prospective cohort study[J]. Fertil Steril, 2012, 97(6): 1410-1416.
- [12] Guerra-Shinohara EM, Pereira PM, Kubota AM, et al. Increased MMA concentration and body mass index are associated with spontaneous abortion in Brazilian women: a pilot study[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(5-6): 423-427.
- [13] Ahlström A, Westin C, Reisman E, et al. Trophoblast morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer[J]. Hum Reprod, 2011, 26(12): 3289-3296.
- [14] Honma H, Baba T, Sasaki M, et al. Trophoblast morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 2012, 98(2): 361-367.
- [15] Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, et al. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties[J]. J Reprod Immunol, 2010, 85(1): 93-98.
- [16] Alfarawati S, Fragouli E, Coils P, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender[J]. Fertil Steril, 2011, 95(2): 520-524.

[收稿日期] 2016-12-04

[本文编辑] 崔黎明