

解冻后囊胚形态学评分对复苏单囊胚人工周期移植临床妊娠的影响

李为玉 陈攀宇 方丛 梁晓燕

【摘要】 目的 分析在玻璃化冷冻复苏单囊胚移植周期中,解冻后囊胚扩张程度、内细胞团和滋养细胞质量对临床妊娠的影响。**方法** 收集 1 005 例第一周期复苏单囊胚移植的资料,进行囊胚扩张、内细胞团和滋养细胞评分,采用二分类 Logistic 回归(Enter 法)分析,评估 3 项评分及年龄对临床妊娠的影响。**结果** 解冻后第 5 日单囊胚(D5)移植组、第 6 日单囊胚(D6)移植组的临床妊娠率分别为 54.61%、38.49%,组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),D5 移植组女方年龄低于 D6 组($P < 0.01$);D5 单囊胚解冻后内细胞团评分低和年龄大是临床妊娠结局的危险因素($OR = 1.733$, 95% CI : 1.213 ~ 2.475; $OR = 0.938$, 95% CI : 0.906 ~ 0.972, P 均 < 0.001),囊胚扩张程度及滋养细胞与妊娠结局无关(P 均 > 0.05);D6 囊胚解冻移植中妊娠与非妊娠组的囊胚扩张程度、内细胞团、滋养细胞均与妊娠结局无关。**结论** 在进行冷冻复苏单囊胚移植时,D5 囊胚优先考虑内细胞团质量。

【关键词】 单囊胚移植;冷冻复苏胚胎移植;形态学评分;内细胞团;滋养层细胞

Effect of blastocyst morphological scoring on clinical pregnancy in single frozen-thawed blastocyst transfer cycles Li Weiyu, Chen Panyu, Fang Cong, Liang Xiaoyan. Reproductive Center, the Sixth Affiliated

Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510610, China

Corresponding author, Fang Cong, E-mail: fangconggd@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of embryo expansion, inner cell mass and trophectoderm quality on clinical pregnancy during single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. **Methods** A total of 1 005 cycles of single blastocyst transfer were collected for grading of embryo expansion, inner cell mass and trophectoderm scoring. Binary logistic regression was utilized to assess the effect of these morphological scores on clinical pregnancy. **Results** Clinical pregnancy rate in the embryo at 5 d after single embryo transfer (D5) was 54.61%, significantly higher compared with 38.49% in the D6 ($P < 0.01$). The age of patients in the D5 transfer group were significantly younger than those in the D6 group ($P < 0.01$). Low-inner cell mass scoring and high-age were risk factors of clinical pregnancy in D5 single frozen-thawed blastocyst transfer ($OR = 1.733$, 95% CI : 1.213 ~ 2.475; $OR = 0.938$, 95% CI : 0.906 ~ 0.972, both $P < 0.001$), whereas embryo expansion and trophectoderm were not correlated with clinical pregnancy (both $P > 0.05$). Embryo expansion, inner cell mass and trophectoderm scoring were not associated with clinical pregnancy in D6 single blastocyst transfer between pregnant and non-pregnant groups. **Conclusion** In D5 frozen-thawed single blastocyst transfer, inner cell mass scoring should be emphasized.

【Key words】 Single blastocyst transfer; Frozen-thawed embryo transfer; Morphological scoring; Inner cell mass; Trophectoderm

随着体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术的飞跃发展以及治疗经验的不断积累,多胎妊娠发生率不断升高,单胚胎移植已成为国内外专家的共识^[1-2]。囊胚培养有利于挑选发育潜能较高的胚

胎^[3]。其中如何挑选囊胚进行单胚胎移植成为临床的关键。囊胚质量有 3 项评价指标:胚胎扩张程度、内细胞团和滋养细胞质量^[4]。当这 3 项指标达到最佳状态时妊娠率最高,然而每一项指标预测

妊娠结局的能力仍不清楚。有研究认为胚胎发育和扩张等级是预测种植成功与否的重要指标^[5,6]。Shapiro 等^[7]认为内细胞团质量与种植率相关, Gardner 等^[8]认为滋养细胞质量与种植率呈正相关。本研究回顾分析了本中心 1 005 例玻璃化冷冻复苏第一周期单囊胚移植的临床妊娠结果, 探讨临床妊娠结局与囊胚扩张程度、内细胞团、滋养细胞质量的相关性, 以期更好地指导临床工作。

材料与方法

一、研究对象

2010 年 6 月至 2015 年 4 月在我中心第一周期行冷冻复苏单囊胚移植 1 005 例。其中第 5 日单囊胚 (D5) 移植 727 周期 (D5 移植组), 第 6 日单囊胚 (D6) 移植 278 周期 (D6 移植组)。纳入标准: ①患者既往无冷冻移植周期, 此次为第一周期复苏单囊胚移植; ②女方年龄小于或等于 45 岁; ③已使用激素替代治疗 (HRT) 周期进行内膜准备。排除标准: 有子宫腺肌症、宫腔粘连、移植日子宫内膜小于 7 mm 者。

二、方 法

1. 囊胚培养及囊胚评分

常规体外受精或单精子胞浆内注射受精 (IC-SI), 受精后第 3 日将符合囊胚培养评分标准的胚胎转移至囊胚培养基 (G5 series, 瑞典) 行囊胚培养^[9]。第 5、6 日观察胚胎并按照 Gardner 评分系统对胚胎扩张进行评分: 根据囊腔扩张程度进行分期, 囊腔小于胚胎体积的 50% 为 1 期, 超过 50% 为 2 期, 占满整个胚胎为 3 期, 囊腔扩张、透明带变薄为 4 期, 囊胚开始从透明带里孵出为 5 期, 囊胚完全孵出为 6 期^[10]。对处于 3~6 期的囊胚内细胞团和滋养外胚层进行评分: ①内细胞团评分, 细胞数量多且分布紧密为 A、细胞数量较少且分布松散为 B、细胞数量极少则为 C; ②滋养外胚层评分, 较多的细胞形成连接紧密的上皮层为 A、较少的细胞连接松散为 B、细胞少且体积大为 C。以 A 为高、B 为中、C 为低。本中心胚胎冷冻的标准为: D5 评分达 3BB 及以上的进行冷冻, 若第 5 日未达以上标准, 则继续培养至第 6 日再按照以上标准冷冻。当患者无符合 3BB 以上标准的囊胚时, 经告知后并签署知情同意书后对次级胚胎进行冷冻。

2. 囊胚的冷冻与复苏

冷冻、复苏囊胚采用本中心常规玻璃化冷冻及复苏方法操作, 囊胚在冷冻复苏后采用激光系统

(ZILLOS-tk Laser Zona Drill System, 美国 Hamilton Thorn Bioscience) 进行辅助孵化, 体外培养 2~3 h 后进行胚胎移植。

3. 内膜准备

采用 HRT 准备内膜, 自月经第 3 日开始使用戊酸雌二醇 (补佳乐, 拜耳), 根据内膜生长情况调整用量。内膜达到 7 mm 及以上且雌激素作用时间不少于 10 d 时开始肌肉注射黄体酮 40 mg/d, 黄体酮注射后的第 5 日或第 6 日进行移植。

4. 妊娠结局评价

移植后 12 日测血清 β -人绒毛膜促性腺激素 (β -HCG), 若 β -HCG > 50 U/L, 则定义为妊娠。妊娠阳性者移植 35 d 后行阴道 B 超, 见孕囊为临床妊娠。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 无序分类资料组间比较采用 χ^2 检验, 有序分类资料组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。多因素分析采用多变量 Logistic 回归分析模型 (Enter 法)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、D5、D6 移植组的一般情况及移植结局比较
根据纳入和排除标准筛选出 1 005 个周期。D5、D6 移植组患者不孕年限、不孕类型、BMI、移植日子宫内膜厚度、胚胎复苏率、流产率、早产率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 D6 移植组相比, D5 移植组患者年龄较低、临床妊娠率较高 (P 均 < 0.01), 见表 1。

二、D5、D6 复苏囊胚评分与临床妊娠关系分析

D6 复苏囊胚的妊娠与非妊娠组间年龄比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 2 组间胚胎扩张程度、内细胞团及滋养细胞比例比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。D5 复苏囊胚的妊娠与非妊娠组间的胚胎扩张程度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 2 组间内细胞团、滋养细胞和年龄比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 见表 2。Logistic 回归分析 (赋值: 妊娠 = 1; 非妊娠 = 0) 发现低内细胞团评分对临床妊娠的 OR 值最高 (1.733, 95% CI: 1.213 ~ 2.475, $P < 0.01$), 年龄大也是临床妊娠结局的危险因素 (OR = 0.938, 95% CI: 0.906 ~ 0.972), 而滋养细胞及胚胎扩张程度与临床妊娠结局无关 (P 均 > 0.05), 见表 3。

表 1D5、D6 移植组的一般情况及妊娠结局比较					
项 目	周期数	D5 移植组（727 周期）	D6 移植组（278 周期）	χ^2/t 值	P 值
年龄（岁）	1 005	31.8 ±4.5	33.7 ±4.9	5.827	<0.001
不孕年限（年）	1 005	3.98 ±2.98	4.15 ±3.28	0.786	0.432
不孕类型〔周期（%）〕					
原发性不孕症	431	320（44.0）	111（39.9）	1.372	0.241
继发性不孕症	574	407（56.0）	167（60.1）		
BMI（kg/m ² ）	1 005	20.5 ±2.3	20.7 ±2.4	1.27	0.204
子宫内膜厚度（mm）	1 005	11.2 ±0.8	11.2 ±0.6	0.567	0.571
胚胎复苏率〔例（%）〕	1 005	727（100）	278（100）		
临床妊娠〔例（%）〕					
是	504	397（54.6）	107（38.5）	20.9	<0.001
否	501	330（45.4）	171（61.5）		
流产〔周期（%）〕					
是	60	47（11.8）	13（12.1）	0.008	0.930
否	444	350（88.2）	94（87.9）		
早产〔周期（%）〕					
是	12	9（3.4）	3（3.2）	0.108	0.742
否	432	341（97.4）	91（96.8）		

注：胚胎复苏率 = 复苏胚胎数/解冻胚胎数

表 2D5、D6 移植组囊胚评分与临床妊娠结局的单因素分析								
项 目	临床妊娠（D5 移植组，727 周期）				临床妊娠（D6 移植组，278 周期）			
	－	＋	Z/t 值	P 值	－	＋	Z/t 值	P 值
胚胎扩张			－1.331	0.183			－0.837	0.402
3 期	0	1			21	10		
4 期	39	39			38	25		
5 期	70	101			42	22		
6 期	86	74			70	50		
内细胞团			－3.281	0.010			－0.747	0.455
A	135	182			44	23		
B	153	255			125	83		
C	177	142			2	1		
滋养细胞			－3.935	<0.001			－1.808	0.071
A	90	156			14	12		
B	224	237			126	84		
C	16	4			31	11		
年龄	32.4 ±4.5	31.1 ±4.2	4.042	<0.01	34.2 ±5.1	32.9 ±4.6	2.122	0.035

表 3 D5 移植组囊胚评分与临床妊娠结局的多因素分析

项 目	β 值	<i>SE</i> 值	Wald 值	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>
内细胞团	0. 550	0. 182	9. 134	0. 003	1. 733	1. 213 ~ 2. 475
滋养细胞	0. 277	0. 177	2. 429	0. 119	1. 319	0. 931 ~ 1. 867
胚胎扩张	0. 027	0. 073	0. 141	0. 707	1. 028	0. 891 ~ 1. 185
年龄	-0. 064	0. 018	12. 729	<0. 01	0. 938	0. 906 ~ 0. 972

讨 论

研究发现，在 25 ~ 37 岁患者中单囊胚与双囊胚移植后妊娠率分别为 73.8%、77.5%，活产率分别为 59.0%、60.7%，而后者双胎率高达 47.6%^[11]。多胎妊娠会导致一系列的产科并发症，如早产、流产、妊娠期高血压疾病等^[12]。具有较高发育潜能的优质单囊胚在保证妊娠率的同时可有效降低双胎妊娠率，降低了产妇与围生儿的危险。我中心第一周期复苏单囊胚移植 1 005 周期数据显示，临床妊娠率为 50.15%（504/1 005）。

囊胚的选择是单胚移植技术的关键，现阶段国内普遍采用囊胚 Gardner 形态学评分这一经典方法。胚胎扩张程度、内细胞团、滋养细胞这三者之间具有相对独立性，移植时给囊胚选择带来困惑^[13]。Honma 等^[14]对 1 087 例冷冻复苏第一周期单囊胚移植进行分析，认为滋养细胞与继续妊娠率有关，而内细胞团以及胚胎扩张程度对继续妊娠率没有影响，考虑以后发育为胎盘的滋养细胞在着床过程中起着至关重要的作用，同时胎盘分泌 HCG 介导母胎界面的免疫抑制，为胚胎的继续发育提供保障，所以滋养细胞质量对临床妊娠有重要的预测作用。Kovacic 等^[15]对 1 396 个囊胚和桑椹胚分析发现内细胞团与植入潜能相关性最大，Takahashi 等^[16-18]也有相似的结论，认为内细胞团将来发育成为胎儿，是妊娠的关键因素，胎儿的异常直接影响滋养层细胞功能以及胚胎发育速度，由此认为内细胞团比滋养细胞层和胚胎扩张程度有更重要的意义。本中心数据显示，1 005 周期冷冻复苏第一周期单囊胚移植中，内细胞团、滋养细胞及年龄与临床妊娠率均有相关，囊胚扩张程度与妊娠率没有相关性，这与 Kovacic 和 Takahashi 等报道一致。根据胚胎发育天数分为 D5 和 D6，分别对两亚组分析，数据显示在 D5 单囊胚解冻后内细胞团评分低、年龄大均是临床妊娠结局的独立危险因素，滋养细胞及囊胚扩张程度与妊娠结局无关，D6 囊胚解冻移植中妊娠组与非妊娠组的囊胚扩张程度、内细胞

团、滋养细胞比较差异均没有统计学意义，说明 D6 单囊胚妊娠结局除胚胎形态学评分之外仍有其他重要的影响因素，但不排除由于样本量较少而得不到有意义的统计学差异。同时本研究还发现在冷冻复苏第一周期单囊胚移植中，D5 囊胚移植的临床妊娠率显著高于 D6 囊胚，这与李城等^[19]的报道一致。

综上所述，第一周期解冻后 D5 内细胞团评分以及患者年龄升高是影响临床妊娠率的危险因素，其中内细胞团评分低的相对风险值更高，提示我们在进行冷冻复苏单囊胚移植时，对于 D5 胚胎优先考虑内细胞团质量。

参 考 文 献

[1] Goto S, Kadowaki T, Tanaka S, Hashimoto H, Koeguchi S, Shiotani M. Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1, 488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril*, 2011, 95 (3): 948-952.

[2] Harbottle S, Hughes C, Cutting R, Roberts S, Brison D; Association Of Clinical Embryologists & The (ACE) British Fertility Society (BFS). Elective Single Embryo Transfer: an update to UK Best Practice Guidelines. *Hum Fertil (Camb)*, 2015, 18 (3): 165-183.

[3] Ahlström A, Westin C, Reisner E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod*, 2011, 26 (12): 3289-3296.

[4] Ahlström A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod*, 2013, 28 (5): 1199-1209.

[5] Parks JC, McCallie BR, Janesch AM, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Blastocyst gene expression correlates with implantation potential. *Fertil Steril*, 2011, 95 (4): 1367-1372.

[6] 林海燕, 李予, 王文军, 陈向红, 阙文清, 陈玉珍, 杨冬梓, 张清学. 超促排卵周期中获卵数多于 20 个患者的临床分析. *新医学*, 2012, 43 (9): 655-657.

[7] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfers in high responders. *Fertil Steril*, 2011, 96 (2): 516-518.

[8] Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft

- WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, 2000, 73 (6): 1155-1158.
- [9] 贾磊, 岳超敏, 宫晓, 方丛, 张敏芳, 梁晓燕. 移植复苏周期第 5 日和第 6 日冻融囊胚发育潜能的比较. *新医学*, 2013, 44 (11): 748-751.
- [10] 岳超敏, 方丛, 宫晓, 李俐琳, 李婷婷, 梁晓燕. 囊胚解冻过夜培养后移植对妊娠结局的影响. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2013, 34 (3): 415-420.
- [11] Ubaldi FM, Capalbo A, Colamaria S, Ferrero S, Maggiulli R, Vajta G, Sapienza F, Cimadomo D, Giuliani M, Gravotta E, Vaiarelli A, Rienzi L. Reduction of multiple pregnancies in the advanced maternal age population after implementation of an elective single embryo transfer policy coupled with enhanced embryo selection: pre- and post-intervention study. *Hum Reprod*, 2015, 30 (9): 2097-2106.
- [12] 连伟玲, 金海霞, 孙莹璞, 辛志敏, 宋文妍. 新鲜周期选择性移植单个囊胚对降低多胎妊娠风险的作用. *生殖与避孕*, 2012, 32 (6): 382-386.
- [13] Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophoctoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril*, 2013, 99 (5): 1283-1289.
- [14] Honnma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Ohno H, Fukunaga T, Endo T, Saito T, Asada Y. Trophoctoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2012, 98 (2): 361-367.
- [15] Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online*, 2004, 8 (6): 687-694.
- [16] Takahashi T, Igarashi H, Amita H, Hara S, Kurachi H. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging. *Reprod Med Biol*, 2011, 10 (4): 239-249.
- [17] Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer. *Hum Reprod Update*, 2011, 17 (1): 107-120.
- [18] 薛侠, 施文浩, 师娟子, 张四林, 赵皖秋, 孙宏志, 周寒鹰, 田莉, 刘珊. D5 选择性的单囊胚移植和双囊胚胎移植妊娠结局比较. *生殖医学杂志*, 2014, 23 (4): 276-279.
- [19] 李城, 李梅, 马水英, 吴克良, 赵海滨, 陈子江. 不同发育天数冻融单囊胚移植的临床结局比较. *现代妇产科进展*, 2014, 23 (2): 121-123.

(收稿日期: 2015-11-20)

(本文编辑: 林燕薇)

