

- Clinical Endoscopy, 2017, 50(6):585-591.
- [4] 申玉翠, 韩冰, 徐建华, 等. 1990例社区结直肠癌筛查高危人群的结肠镜检查检查结果分析[J]. 中华消化杂志, 2015, 35(3): 179-182.
- [5] 秦和平, 程天明, 智发朝, 等. 直肠类癌32例临床及病理分析[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(2): 86-88.
- [6] KLÖPPEL G. Neuroendocrine neoplasms: dichotomy, origin and classifications [J]. Visc Med, 2017, 33(5): 324-330.
- [7] RINDI G, PETRONE G, INZANI F. The 2010 WHO classification of digestive neuroendocrine neoplasms: a critical appraisal four years after its introduction [J]. Endocrine Pathology, 2014; 25(2): 186-192.
- [8] SEKIGUCHI M, SEKINE S, SAKAMOTO T, et al. Excellent prognosis following endoscopic resection of patients with rectal neuroendocrine tumors despite the frequent presence of lymphovascular invasion [J]. J Gastroenterol, 2015, 50(12): 1184-1189.
- [9] 徐玮, 燕敏, 刘文韬. 胃肠道神经内分泌肿瘤诊疗进展[J]. 外科理论与实践, 2016, 21(05): 434-438.
- [10] SOGA J. Early-stage carcinoids of the gastrointestinal tract: an analysis of 1914 reported cases [J]. Cancer, 2005, 103(8): 1587-1595.
- [11] CONCERNERS SJ, SINNAMON AJ, FOLKERT IW, et al. Predictors of metastases in rectal neuroendocrine tumors: results of a national cohort study [J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(12): 1372-1379.
- [12] DELLE FAVE G, O'TOOLE D, SUNDIN A, et al. ENETS consensus guidelines update for gastroduodenal neuroendocrine neoplasms [J]. Neuroendocrinology, 2016, 103(2): 119-124.
- [13] O'NEILL CH, PLATZ J, MOORE JS, et al. Transanal endoscopic microsurgery for early rectal cancer: a single-center experience [J]. Dis Colon Rectum, 2017, 60(2): 152-160.
- [14] ALLAIX ME, AREZZO A, MORINO M. Transanal endoscopic microsurgery for rectal cancer: T1 and beyond? An evidence-based review [J]. Surg Endosc, 2016, 30(11): 4841-4852.
- [15] KIM SH, YANG DH, LEE JS, et al. Natural course of an untreated metastatic perirectal lymph node after the endoscopic resection of a rectal neuroendocrine tumor [J]. Intest Res, 2015, 13(2): 175-179.

(收稿日期: 2019-12-01, 修回日期: 2019-12-25)

引用本文: 刘双, 程东凯, 于洪君, 等. 高龄女性单囊胚冷冻复苏周期中囊胚腔大小及孵化程度对妊娠及出生结局的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(2): 293-296. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.021.

◇临床医学◇



高龄女性单囊胚冷冻复苏周期中囊胚腔大小及孵化程度对妊娠及出生结局的影响

刘双, 程东凯, 于洪君, 李宝山

作者单位: 沈阳东方医疗集团菁华医院生殖实验室, 辽宁 沈阳 110005

通信作者: 程东凯, 男, 研究员, 研究方向为辅助生殖实验室技术, Email: edk73@163.com

摘要: **目的** 分析高龄女性单囊胚冷冻复苏周期中囊胚腔大小及孵化程度对妊娠结局及出生结局的影响。**方法** 选择2014年1月至2017年12月于沈阳东方医疗集团菁华医院进行单囊胚冷冻复苏移植周期共4 103个, 根据囊胚腔大小和是否孵化将其分为4期囊胚、5期囊胚和6期囊胚。分别比较三组的囊胚复苏后的移植结局是否存在差异; 之后对年龄>35岁亚组单独分析, 分为4期囊胚、5期囊胚和6期囊胚并比较三组囊胚复苏后的移植、妊娠及出生结局。**结果** 单囊胚冷冻复苏周期中囊胚腔大小及孵化程度在移植结局和出生结局各项指标中差异无统计学意义($P>0.05$); 年龄>35岁以上亚组中, 4期囊胚临床妊娠率(48.35%比34.38%、36.59%)和活产率(32.94%比20.32%、19.51%)高于5期和6期, 4期新生儿低出生体重质量率小于5期和6期(5.03%比23.07%、12.5%), 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 不分年龄段, 单囊胚冷冻复苏周期囊胚腔大小及孵化程度对临床结局的影响差别不大, 但在35岁以上女性单囊胚冷冻复苏周期中, 4期囊胚移植后的妊娠结局及出生结局更佳。

关键词: 单胚胎移植; 冷冻; 高龄女性; 单囊胚; 囊胚腔大小; 孵化

Effect of blastocyst size and incubation degree on the pregnancy and birth outcomes during cryopreservation cycle of single blastocyst in elderly women

LIU Shuang, CHENG Dongkai, YU Hongjun, LI Baoshan

Author Affiliation: The Reproductive Laboratory, Shenyang Dongfang Jinghua Hospital, Shenyang, Liaoning 110005, China

Abstract: **Objective** To analyze the effect of blastocyst size and hatching degree on the pregnancy and birth outcomes in the cryopreservation cycle of single blastocysts in elderly women. **Methods** A total of 4103 single-vesicle embryo cryopreservation transplanta-

tion cycles in Shenyang Oriental Green Reproductive Hospital from January 2014 to December 2017 were performed. According to the size of the blastocyst and whether it was hatched, it was assigned into 4 blastocysts, 5 blastocysts and 6 blastocysts. The differences in the transplant outcomes of blastocysts after resuscitation of the three groups were compared. The age group >35 years old was analyzed separately and it was assigned into 4 blastocysts, 5 blastocysts and 6 blastocysts and the transplant, pregnancy and birth outcomes of blastocysts after resuscitation in three groups were compared. **Results** The size and hatching degree of blastocysts in the single-vesicle embryo cryopreservation cycle were not significantly different between clinical outcomes and birth outcomes ($P>0.05$). In the subgroup of age >35 years old, the clinical pregnancy rate (48.35% vs. 34.38%, 36.59%) and live birth rate (32.94% vs. 20.32%, 19.51%) in stage 4 blastocysts were higher than those of stage 5 and stage 6. The neonatal low birth weight rate was less than stage 5 and stage 6 (5.03% vs. 23.07%, 12.5%), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Regardless of age group, the effect of blastocyst size and hatching on the clinical outcome of the single-vesicle embryo cryopreservation cycle is not significant, but in the single-blast embryo cryopreservation cycle of women over 35 years old, the pregnancy outcomes and birth outcomes after stage 4 blastocyst transfer are better.

Key words: Single embryo transfer; Freezing; Older women; Single blastocyst; Blastocyst size; Hatching

权衡辅助生殖技术的好处和风险,在接受卵巢刺激IVF/胞质内精子注射(ICSI)的病人中,生下一个健康的孩子是最终目标^[1-2]。选择性单胚胎移植(eSET)已被越来越多的人提倡^[3-4]。玻璃化冷冻是一种成功的囊胚冷冻保存方法^[5-6]。玻璃化前囊胚腔的人工收缩可提高玻璃化冷冻/复苏囊胚的存活率^[6]。随着玻璃化和人工收缩的应用,玻璃化冷冻/复苏囊胚移植的活产率与新鲜囊胚移植的活产率相似。研究表明,单囊胚移植后的临床妊娠和活产的发生率与双囊胚移植相似,但高于单卵裂期胚胎移植^[7]。此外,无论是新鲜周期单囊胚移植还是玻璃化冷冻/复苏周期单囊胚,均可以降低多胎妊娠的发生,并且移植单个优质囊胚移植可以保证临床妊娠率^[8]。目前,常用的囊胚评分系统为Gardner评分系统。在这个系统中,根据囊胚扩张和孵化(EH)阶段、内细胞质量(ICM)和滋养外胚层(TE)的形态学参数对囊胚进行评级^[9]。目前研究多侧重于内细胞质量(ICM)和滋养外胚层(TE)形态对囊胚移植后的结局影响,而对于囊胚腔大小及孵化程度对临床结局的影响研究较少^[10-11]。本研究主要通过分析35岁以上女性单囊胚冷冻复苏周期中囊胚腔大小及孵化程度对临床结局的影响,以期为高龄女性囊胚移植提供一定的指导意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析2014年1月至2017年12月于沈阳东方医疗集团菁华医院进行单囊胚冷冻复苏移植周期共4 103个,根据囊胚腔大小和是否孵化将其分为4期囊胚共3 706个周期、5期囊胚共242个周期和6期囊胚共155个周期。随后对年龄>35岁亚组单独分析,分为4期囊胚共941个周期、5期囊胚共64个周期和6期囊胚共41个周期。所有囊胚均采用玻璃化冷冻和解冻方法。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法 囊胚腔大小及孵化程度的评级:根据Gardner评分系统将囊胚分为6个时期。I期:囊胚具有早期腔室,囊胚腔体积小于胚胎总体积的1/2;II期:囊胚腔体积超过或等于胚胎总体积的1/2;III期:囊胚腔占据了整个胚胎;IV期:囊胚腔扩张,整个胚胎由囊胚腔占满,胚胎扩张,总体积变大,透明袋变薄;V期:囊胚正要孵出,有一部分囊胚从透明袋中孵出,但未完全脱离透明袋;VI期:完全孵出的囊胚,囊胚已经完全脱离透明袋。

囊胚的玻璃化冻融和解冻:冻融:囊胚在Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水(DPBS, Thermo, Carlsbad, CA, USA)+20%血清代用品(SSS;美国加州圣安娜湾科学公司)+20%乙二醇(Sigma, Saint Louis, MO, USA)放置45 s达到平衡。然后,将平衡后的囊胚移入由40%EG, 18%Ficoll(Sigma, Saint Louis, MO, USA)和0.3 M蔗糖(Sigma)溶解于DPBS补充20%SSS的玻璃化溶液中放置20 s。随后将囊胚迅速装入冷冻载杆,放入液氮中。

解冻:将载杆上的胚胎转移到含0.5 M蔗糖(含20%SSS)的增温液中3 min,然后转移到含0.25 M蔗糖(含20%SSS)的增温液中持续5 min。然后将胚胎在1029培养基中清洗3次,在倒置显微镜下观察升温1~2 h后胚胎解冻后的存活情况。

1.3 观察指标 妊娠结局主要比较各组的临床妊娠率、流产率、多胎率和活产率。

出生结局主要比较新生儿男女比例、低出生体质量率、出生缺陷发生率。

临床妊娠:移植6~8周后阴道B超观察到孕囊或流产物病理证实。临床妊娠率=临床妊娠周期数/移植囊胚周期数 $\times 100\%$;流产率=妊娠周期流产的周期数/临床妊娠周期数 $\times 100\%$;多胎妊娠率=多胎妊娠周期数/临床妊娠周期数 $\times 100\%$ 。活产率=活产分娩数/移植周期 $\times 100\%$ 。低出生体质量率=出生体

质量在2 500 g以下数/活产分娩数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学方法 应用SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料采用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同囊胚腔大小及孵化程度对移植周期妊娠结局的比较 三组移植妊娠结局各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 不同囊胚腔大小及孵化程度对移植周期出生结局的比较 三组移植后出生结局各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 不同囊胚腔大小及孵化程度对移植出生结局的比较

囊胚期数	分娩数/例	新生儿出生数/例	新生儿男性占比/%	低出生体重率/%	出生缺陷/%
4期	1 594	1 602	55.81	4.49	0.25
5期	105	110	60.00	9.09	0.91
6期	64	64	57.81	3.13	0
χ^2 值			0.81	5.21	1.79
P 值			0.667	0.074	0.410

2.3 >35岁亚组不同囊胚腔大小及孵化程度对移植周期妊娠结局的比较 >35岁亚组中,各期分组之间平均年龄无明显统计学意义($P > 0.05$)。4期囊胚临床妊娠率和活产率高于其他两组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.4 >35岁亚组不同囊胚腔大小及孵化程度对移植周期出生结局的比较 >35岁亚组中,4期囊胚的低出生体质量率明显低于其他两组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

既往报道显示囊胚腔扩张对临床结果有着重

要的意义^[7]。Goto等研究了1 488个单次冷冻囊胚转移周期,发现囊胚等级(主要由扩张等级决定)显著影响妊娠结局,在相同的囊胚扩张内,内细胞质量和滋养外胚层均不影响妊娠结局^[7]。Thompson和Ahlstrom等报道,在一个新鲜周期单个囊胚移植周期的多变量逻辑模型中,胚泡扩张阶段显著并独立地预测了活产率^[8-9]。Ahlstrom等在对解冻后的形态特征与玻璃化冷冻/解冻的囊胚转移周期后的活产之间的相关性的研究中发现扩张程度是活产率的最佳预测指标^[9]。本文研究结果显示,不分年龄段中,单囊胚冷冻复苏周期中囊胚腔大小及孵化程度对临床结局的影响差别不大,4期囊胚的临床妊娠率略高于5期囊胚和6期囊胚,但差异无统计学意义;此外,4期囊胚的活产率与5期囊胚和6期囊胚之间差异无统计学意义。与既往的研究报道有不同,这可能与种族、生活环境、用药方案等因素有关。

在我们的研究中,囊胚的冷冻时期均在4期以上,并且囊胚腔复苏后膨胀的程度几乎与玻璃化前的扩张程度相同。本研究中所有囊胚冷冻前均给与了人工皱缩,玻璃化前的人工收缩提高了囊胚扩张和孵化的存活率,降低了存活囊胚再扩张的平均时间。之所以可能出现这种结果,是因为具有更快地重新膨胀的胚泡具有更快地发育动力学,而Na⁺/K⁺-ATPase(泵)负责胚泡的重新膨胀^[10]。囊胚的发育速度和囊胚腔的发育阶段与囊胚植入的成功与否有关。先前的一项研究发现,在玻璃化前没有人工收缩的情况下,扩张/孵化的囊胚的存活率和活产率低于早期囊胚^[11]。然而,扩大程度越大的囊胚,应用人工囊胚腔收缩,存活率和妊娠率越高。囊胚腔的扩张程度可能是重要的,因为细胞分裂数量的增加导致小细胞数量的增多,细胞连接质量的增

表1 不同囊胚腔大小及孵化程度对移植妊娠结局的比较

囊胚期数	周期数	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	临床妊娠率/%	流产率/%	多胎率/%	活产率/%
4期	3 706	32.56 $\pm$ 4.63	58.12	21.08	1.39	43.01
5期	242	32.93 $\pm$ 4.62	57.85	20.71	1.43	43.39
6期	155	32.59 $\pm$ 4.67	56.13	24.14	1.15	41.29
$\chi^2(F)$ 值		(0.74)	0.25	0.49	0.04	0.20
P 值		0.476	0.884	0.784	0.981	0.906

表3 >35岁亚组不同囊胚腔大小及孵化程度对移植周期妊娠结局的比较

囊胚期数	周期数	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	临床妊娠率/%	流产率/%	多胎率/%	活产率/%
4期	941	38.55 $\pm$ 2.41	48.35	26.59	0.88	32.94
5期	64	38.8 $\pm$ 2.70	34.38	36.36	0.00	20.32
6期	41	38.34 $\pm$ 2.76	36.59	40.0	0.00	19.51
$\chi^2(F)$ 值		(0.47)	6.57	2.23	0.33	7.65
P 值		0.627	0.037	0.328	0.849	0.022

表4 >35岁亚组不同囊胚腔大小及孵化程度
对移植出生结局的比较

囊胚期数	分娩数/例	新生儿出生数/例	新生儿男性占比/%	低出生体质量率/%	出生缺陷/%
4期	313	318	55.97	5.03	0.63
5期	13	13	53.85	23.07	0.00
6期	8	8	50.0	12.5	0.00
χ^2 值			0.03	7.97	
P值			0.985	0.019	

加,囊胚腔的增大。扩张程度越高的囊胚细胞越小。由于囊胚表面体积比较大,细胞较小,这些囊胚更容易被冷冻保护剂渗透,从而免受渗透胁迫和损伤^[12-17]。因此,扩张程度越高的囊胚对玻璃化和低温保护剂毒性的耐受性越好。在新鲜和玻璃化冷冻/复苏中,囊胚腔由于液体的流入而扩张,而滋养层细胞的紧密连接阻止了液体的泄漏。此外,扩大的囊胚更可能有轮廓更好的细胞。

本研究结果显示在35岁以上女性单囊胚冷冻复苏周期中,4期囊胚移植后的临床妊娠率和活产率高于5期和6期,并且子代低出生体质量率也低于其他两组。可能是因为在移植过程中,没有透明带的保护,孵化的胚胎在移植过程中很容易受到创伤。在移植过程中胚泡暴露的高压可能会破坏滋养外胚层,导致囊胚腔液泄漏,而透明带的存在则会保护囊胚,不被高压破坏,因此4期囊胚活产率较高。本身高龄女性中由于卵子质量下降等因素增加了子代低出生体质量率的发生。此外高龄女性体内应激水平更高,缺少透明带保护的胚胎耐受应激的能力较差,胎儿发育迟缓,可能是造成4期囊胚子代低出生体质量率较低的原因。

综上所述,35岁以上女性单囊胚冷冻复苏周期中,4期囊胚移植后的妊娠结局及出生结局更佳。在平常工作中,应当选择在囊胚扩张到4期的时候冷冻,以期在后续的移植中获得更好的活产率。本文35岁以上病人比较时,5期、6期囊胚移植例数较少,后续应积攒更多的样本量进行进一步验证。

参考文献

[1] 胡咏梅,夏小凤,马子凤,等.心理干预对输卵管性不孕病人心理健康及体外受精-胚胎移植临床结局的影响[J].安徽医药,2019,23(8):1547-1549.

[2] 罗桂英,陈嫦娥,辛利红,等.体外受精-胚胎移植1742个周

期临床分析[J].安徽医药,2014,18(8):1457-1461.

[3] 朱玉蓉,刘春玲,吴晓云,等.选择性单囊胚移植在高龄女性中的应用价值研究[J].中国高等医学教育,2018(5):140,142.

[4] 王伟周,徐继强,李敏,等.单囊胚移植在新鲜移植周期与冻融移植周期中的应用比较[J].生物技术通讯,2017,28(2):145-148.

[5] 杨逸尘,任海琴,刘玲,等.辅助生殖助孕技术中胚胎冻存年限对冻胚复苏移植临床结局的影响[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(11):120-122.

[6] 薛林涛,王世凯,覃捷,等.透明带激光操作对玻璃化冻融囊胚复苏及孵出动态模式的影响[J].生殖医学杂志,2019,28(11):1340-1345.

[7] 王琪,曾咏梅,雷平,等.复苏周期中单/双囊胚移植患者的临床结局比较[J].生殖与避孕,2016,36(10):802-806.

[8] 余秋锋,贾晓丽.复苏周期单囊胚移植与双囊胚、双卵裂胚移植的临床结局比较[J].中国当代医药,2017,24(26):90-92.

[9] 陈清汾,林典梁,杜生荣.冻融周期非优质单囊胚移植妊娠结局的比较[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2017,36(4):283-286.

[10] 王华,徐继强,梁坤,等.单囊胚质量和发育天数对冻融胚胎移植临床结局的影响[J].中国优生与遗传杂志,2019,27(10):1264-1267.

[11] 蒋益群,李东,王珊珊,等.囊胚整体质量对冻融单囊胚移植妊娠和新生儿结局的影响[J].生殖医学杂志,2019,28(8):896-900.

[12] DU Q Y, WANG E Y, HUANG Y, et al. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles [J]. Fertility & Sterility, 2016, 105(4):910-919.

[13] AHLSTRÖM A, WESTIN C, REISMER E, et al. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer[J]. Hum Reprod, 2011, 26(12):3289-3296.

[14] CHEN X, ZHANG J, WU X, et al. Trophectoderm morphology predicts outcomes of pregnancy in vitrified-warmed single-blastocyst transfer cycle in a Chinese population [J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(11):1475-1481.

[15] CAO S, ZHAO C, ZHANG J, et al. Retrospective clinical analysis of two artificial shrinkage methods applied prior to blastocyst vitrification on the outcome of frozen embryo transfer[J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(5):577-581.

[16] EBNER T, OPPELT P, RADLER E, et al. Morphokinetics of vitrified and warmed blastocysts predicts implantation potential [J]. J Assist Reprod Genet, 2017, 34(2):239-244.

[17] 柳亚南,薛侠,张四林,等.囊胚形态对冻融单囊胚移植临床结局的影响[J].生殖医学杂志,2016,25(11):1002-1005.

(收稿日期:2019-11-24,修回日期:2019-12-18)