

反复种植失败实验室影响因素

张超凡,赵铭鹏,刘洁,石玉华

(南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)生殖医学科,广东 广州 510080)

摘要:目的 探讨实验室因素在反复种植失败(recurrent implantation failure, RIF)患者中的影响。方法 回顾性分析2017年1月至2021年12月在南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)生殖医学科行常规体外受精或卵胞浆内单精子显微注射(*in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection, IVF/ICSI)反复种植失败的患者57例,其中自第3次胚胎移植失败后,将在第4或第5次胚胎移植后妊娠的患者作为A组(24例)和未妊娠的作为B组(33例),采用独立样本 t 检验或秩和检验以及Logistic回归分析,比较两组患者实验室与临床相关因素。结果 两组患者资料分析结果显示,A组与B组比较移植胚胎数差异具有统计学意义(1.67 ± 0.48 vs 1.36 ± 0.49 , $P=0.024$),但两组间在基线资料、临床因素和胚胎评分方面差异无统计学意义($P>0.05$),实验室因素中移植不同发育阶段的胚胎(卵裂胚、囊胚)、卵子授精方式(IVF/ICSI)和累计可利用胚胎数差异无统计学意义($P>0.05$)。进一步分析两组患者从第1个周期到最后1个周期的移植数目,结果显示移植2枚囊胚将有助于改善其妊娠结局。结论 对于RIF患者,移植2枚胚胎会提高妊娠成功率。

关键词:反复种植失败;实验室因素;胚胎移植数;卵裂胚;囊胚

中图分类号:R711.6

文献标志码:A

Laboratory influencing factors of recurrent implantation failure

ZHANG Chaofan, ZHAO Mingpeng, LIU Jie, SHI Yuhua

(Department of Reproductive Medicine, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of laboratory factors on patients with recurrent implantation failure (RIF). **Methods** Clinical data of 57 cases of RIF *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) during 2017 and 2021 were retrospectively analyzed. After the failure of the 3rd embryo transfer, patients who were pregnant after the 4th or 5th embryo transfer were divided into the pregnant group (group A, $n=24$) and non-pregnant group (group B, $n=33$). The laboratory and clinical factors of the two groups were compared with independent sample t test, rank sum test and Logistic regression. **Results** There was statistically significant difference in the number of embryos transferred between groups A and B (1.67 ± 0.48 vs. 1.36 ± 0.49 , $P=0.024$). However, there were no significant differences in baseline data, clinical factors, and embryo scores ($P>0.05$); there were no significant differences in the transfer of embryos at different developmental stages (cleavage embryo, blastocyst), ovum insemination methods (IVF/ICSI), and the cumulative number of available embryos ($P>0.05$). Further analysis of the number of transplants from the first to the last cycle indicated that transfer of two blastocysts helped improve the pregnancy outcomes. **Conclusion** For patients with RIF, transfer of two embryos will improve the success rate of pregnancy.

Key words: Recurrent implantation failure; Laboratory factors; Number of embryo transfer; Cleavage embryo; Blastocyst

研究表明,体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)及其衍生技术

已经帮助越来越多的不孕患者实现了拥有孩子的梦想^[1]。据报道经过3个周期的治疗后,累计活产率

可达到52%^[2]。尽管如此,反复种植失败(recurrent implantation failure, RIF)影响全球约10%的IVF-ET患者^[3],给不孕症夫妇带来一定的经济负担及心理压力。迄今为止,对RIF的定义有争议,其精确定义尚未达成共识,既往的定义通常是基于未能获得妊娠的IVF-ET周期次数、移植胚胎的数目或两者的结合^[4]。

RIF是生殖医学临床领域的多发、高发难题,对女性妊娠成功率具有重大影响,但由于RIF病因复杂,涉及母体、男性、胚胎等不同主体和生殖、免疫、妇产、内分泌等多个学科,RIF的可能病因涉及到配子、胚胎质量及其发育潜能和子宫内膜的微环境以及自身免疫机能等多方面^[5-6]。本研究根据发表在2023年《中华医学杂志》的RIF定义^[7],重点从实验室视角对RIF人群进行病例对照分析,找出其成功治疗的相关实验室因素,为临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2017年1月至2021年12月期间于南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)生殖医学科接受IVF-ET或卵胞浆内单精子显微注射-胚胎移植(intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer, ICSI-ET)的RIF患者57例,其中自第3次胚胎移植失败后,将在第4或第5次胚胎移植后妊娠的患者作为A组(24例),平均(32.79±4.75)岁,体质指数(body mass index, BMI)为20.79±2.37,未妊娠的作为B组(33例),平均(33.00±4.10)岁,BMI为20.56±2.43。

纳入标准:①40岁以下的妇女;②在3个新鲜或冷冻周期内移植至少3枚优质胚胎后仍未能实现临床妊娠,其中优质胚胎包括:第3天胚胎(细胞数≥8个、卵裂球大小均匀、碎片率<10%)和囊胚(≥3BB);③移植当日子宫内膜厚度≥8 mm。

排除标准:①子宫内膜息肉、黏膜下子宫肌瘤、宫腔粘连等宫腔内病变;②双方中有一方染色体异常;③子宫发育畸形;④合并其他内外科疾病及精神疾病等治疗中的患者。

1.2 方法

1.2.1 促排卵方案和卵母细胞采集

所有参与者均接受了促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)激动剂或GnRH拮抗剂方案的治疗。当至少有3个卵泡直径

达到16 mm,或至少有2个卵泡直径≥18 mm时,给予人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)和/或GnRH激动剂扳机,36 h后经阴道和超声引导下进行取卵,随后将卵丘卵母细胞复合物置于培养液中培养,等待授精。

1.2.2 胚胎发育及评分标准

在卵母细胞采集后第3天评估胚胎形态。胚胎按文献[8]进行评分:优级为碎片<10%,细胞数量和大小与发育阶段相符,无多核现象,评分为1;中等为碎片含量为10%~25%,多数细胞的大小与发育阶段相符,无多核现象,评分为2;差为大量碎片(>25%),细胞大小与发育阶段不相符,有多核现象,评分为3。第3天优质胚胎的定义为来源于2PN的受精卵、由7~9个卵裂球组成、评分为1的胚胎。囊胚评分参照Gardner等^[9]评分标准,优质囊胚为3期及3期以上且内细胞团和滋养层评分不含C的囊胚。

1.2.3 解冻周期患者的内膜准备及内膜形态

1.2.3.1 自然周期

适用于既往月经规律或曾经B超监测有排卵的患者。月经周期10~12 d开始B超监测卵泡发育和内膜情况。当卵泡直径<10 mm时,可每3天监测1次;当卵泡直径为10~16 mm时,可每2天监测1次;当优势卵泡直径>16 mm时,应每天监测1次,同时抽血查促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E₂)和孕激素(progesterone, P)水平,直至血LH出现峰值或排卵。当卵泡直径≥18 mm时,可适时注射HCG诱发排卵。胚胎移植时机选择根据胚胎冷冻时间决定。第3天的胚胎选择在排卵后第3天解冻移植。

1.2.3.2 HRT周期

适用于既往月经不规律、不排卵的患者。月经周期第3~4天开始口服补佳乐2~4 mg,2次/d,服药7~10 d后开始B超监测内膜厚度,并根据内膜厚度,调整用药剂量。当子宫内膜厚度达到8 mm或以上加用孕激素类药物进行内膜转化。胚胎移植时机根据胚胎冷冻时间决定。移植后,继续用药,确定妊娠后仍应维持雌、孕激素的剂量,至妊娠第7~8周开始逐步减量,妊娠12周停药。

1.2.3.3 促排卵周期

适应证同激素替代方案。周期第3~5天开始口服来曲唑2.5~5 mg/d,或给予Gn 37.5~75 IU,用药5 d后开始B超监测卵泡发育,监测方案同自然周期,期间根据卵泡生长速度及数量调整Gn用量。胚胎移植时机选择根据解冻胚胎胎龄决定。第3天

胚胎选择在排卵后第3天解冻移植。

1.2.3.4 内膜形态分类

根据超声的回声强度将子宫内膜的回声强度与肌层的回声强度相比较,将子宫内膜分为 I、II、III 型,分别代表子宫内膜在各阶段的形态。

1.2.4 观察指标

女方年龄,BMI,hCG 日或孕激素类药物开始时内膜厚度、形态、LH、E₂ 和 P 值水平、移植胚胎发育阶段、新鲜周期授精方式、移植胚胎数、优质胚胎数、优质囊胚数、中等质量胚胎数、中等质量囊胚数、累计可利用胚胎数。其中累计可利用胚胎数为所有新鲜周期内可利用胚胎数和囊胚数的总和,移植胚胎发育阶段、新鲜周期授精方式、移植胚胎数、优质胚胎数、优质囊胚数、中等质量胚胎数、中等质量囊胚数和累计可利用胚胎数为实验室因素,中等质量胚胎和中等质量囊胚分别表示除去优质胚胎和优质囊胚后剩下的可利用胚胎与可利用囊胚。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件。计数资料采用频数和构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验,或 χ^2 检验的校正法或确切概率检验;服从正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$

表示,组间差异分析采用独立样本 *t* 检验,不符合正态分布采用秩和检验。设定检验水准 $\alpha=0.05$,双侧检验。对临床及实验室因素进行单因素 Logistic 回归分析,对实验室因素进行多因素 Logistic 回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者资料比较

如表 1 所示,A 组与 B 组比较,基线资料、临床因素、胚胎因素差异无统计学意义 ($P>0.05$),实验室因素中移植胚胎的发育阶段、新鲜周期授精方式和累计可利用胚胎数差异无统计学意义 ($P>0.05$),两组间的移植胚胎数差异具有统计学意义 ($P=0.024$)。

为进一步分析临床及实验室因素与两组的关系,又进行了单因素和多因素分析,见表 2。单因素分析 ($OR=1.25,95\%CI$) 和多因素分析 ($OR=1.63,95\%CI$) 结果显示 A 组和 B 组间移植胚胎数差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 两组第 4 次或第 5 次胚胎移植周期情况对比/*n*(%)

Table 1 Comparison of the 4th or 5th embryo transfer cycle between the two groups/*n*(%)

项目	内膜厚度 /mm	内膜形态				新鲜 移植 占比	解冻移植方案			LH/ (mIU/mL)	E ₂ / (pg/mL)	P/ (ng/mL)
		I 型	I - II 型	II 型	II - III 型		排卵 周期	HRT 周期	自然 周期			
A 组	9.10±1.36	8 (33.3)	10 (41.7)	5 (20.8)	1 (4.2)	1 (4.2)	4 (17.4)	13 (56.5)	6 (26.1)	4.35 (0.585, 9.36)	215 (101, 277)	0.75 (0.41, 3.28)
B 组	8.74 ±1.16	16 (48.5)	7 (21.2)	9 (27.3)	1 (3.0)	1 (3.0)	7 (21.9)	19 (59.4)	6 (18.8)	7.98 (0.900, 19.96)	292 (123, 483)	0.85 (0.36, 1.55)
P	0.287	0.283				>0.999	0.785			0.216	0.121	0.538

项目	授精方式		累计可利用 胚胎数/ 枚	移植 胚胎数/ 枚	移植胚胎发育阶段		卵裂胚		囊胚	
	IVF	ICSI			卵裂胚	囊胚	优质 胚胎	中等质 量胚胎	优质 囊胚	中等质 量囊胚
A 组	18 (75.0)	6 (25.0)	8.92 ±2.75	1.67 ±0.48	6 (25.0)	18 (75.0)	6 (100.0)	0 (0.0)	11 (61.1)	7 (38.9)
B 组	22 (66.7)	11 (33.3)	8.27 ±2.73	1.36 ±0.49	8 (24.2)	25 (75.8)	7 (87.5)	1 (12.5)	15 (60.0)	10 (40.0)
P	0.700		0.385	0.024*	>0.999		>0.999		>0.999	

* $P<0.05$ 。

表 2 两组临床及实验室因素单因素、多因素分析

Table 2 Univariate and multivariate analyses of clinical and laboratory factors between the two groups

项目	单因素分析			多因素分析		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
累计可利用胚胎数	0.09	-0.11~0.29	0.38	0.02	-0.22~0.26	0.87
囊胚移植占比	0.04	-1.22~1.26	0.95	-0.93	-2.53~0.57	0.23
授精方式	0.41	-0.75~1.63	0.50	0.37	-0.88~1.67	0.57
移植胚胎数	1.25	0.17~2.40	0.03	1.63	0.28~3.11	0.02
年龄	-0.01	-0.13~0.11	0.86	—	—	—

续表

项目	单因素分析			多因素分析		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
BMI	0.04	-0.18~0.27	0.72	—	—	—
LH	-0.02	-0.07~0.01	0.24	—	—	—
E ₂	0.00	0.00~0.00	0.34	—	—	—
P	0.35	-0.04~0.81	0.09	—	—	—
D3 移植胚胎数	12.31	-7.14~0.00	>0.999	—	—	—
囊胚移植胚胎数	0.03	-0.84~0.93	0.94	—	—	—
新鲜移植占比	0.33	-2.93~3.60	0.82	—	—	—
内膜厚度	0.24	-0.19~0.70	0.29	—	—	—
内膜形态	-0.11	-1.49~1.32	0.88	—	—	—

2.2 两组各周期移植胚胎数比较

进一步分析两组患者从第1个周期到最后1个周期的移植数目,见图1。每次移植周期中A组的单胚胎移植数都是低于B组,结合表1中A组移植

囊胚的占比(75%),对于RIF患者,适当的增加胚胎移植的数目,即移植2枚囊胚将有助于改善其妊娠结局。

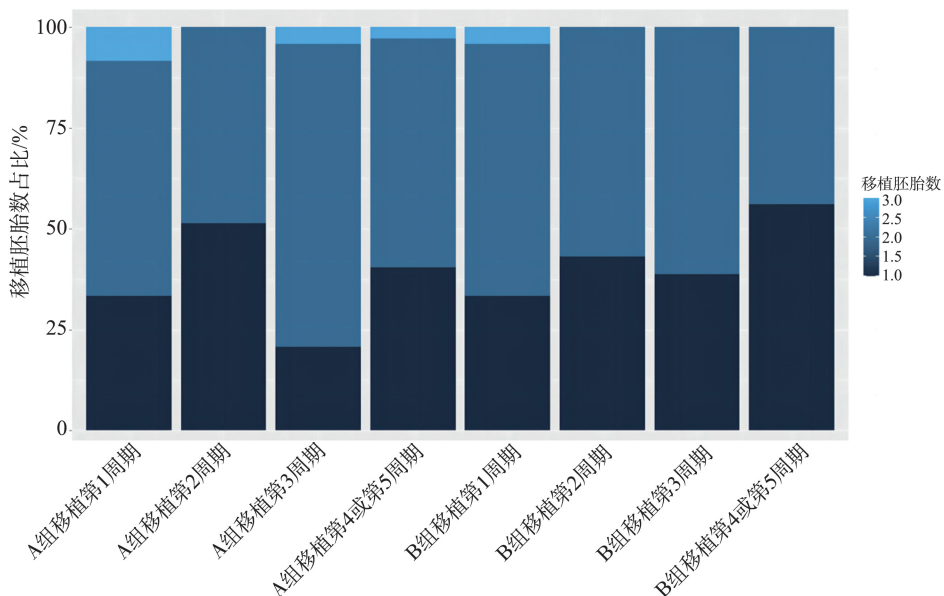


图1 两组各周期移植胚胎数

Figure 1 Number of embryos transferred in each cycle between the two groups

3 讨论

本研究分析了RIF患者的临床数据和实验室因素等,并着重从实验室因素角度探讨了RIF的影响,结果显示RIF患者再次胚胎移植后妊娠者(A组)的胚胎移植数量显著高于RIF患者再次胚胎移植后未妊娠者(B组),同时,本研究结果还显示,RIF患者再次胚胎移植后妊娠、未妊娠两组中囊胚的移植占比都达到甚至超过了75%,提示增加囊胚移植数目有助于改善RIF患者的妊娠结局,建议移植2枚囊胚。尽管目前比较流行的单囊胚移植可以有效降低多胎率的比例^[10-13],但是对RIF患者来说,移植2枚囊胚可能是更好的选择。

对于非RIF患者,已报道胚胎移植数量的增多能增加种植率和临床妊娠率^[14-15]。然而在RIF患者的研究中,胚胎移植数对治疗的影响鲜有报道。本研究结果显示增加移植胚胎数有助于改善RIF患者妊娠率,推测可能是因为更多的胚胎会更好刺激子宫内膜,从而影响子宫内膜的容受性和胚胎着床^[16]。

Zhang等^[17]对RIF人群研究发现移植囊胚组的临床妊娠率、着床率和持续妊娠率均显著高于移植2枚卵裂期胚胎组。有研究也建议RIF患者进行囊胚移植临床结局会更好^[18-19]。首先,囊胚培养能够起到一个筛选胚胎的作用,淘汰掉那些因发育阻滞而无法形成囊胚的卵裂期胚胎;其次,选择囊胚移植能够促进与子宫内膜的生理同步和实现“植入窗

口”的能力。另外的研究给出了不同的观点:在 RIF 患者中囊胚移植并不比卵裂期胚胎产生更好的结果^[20]。本研究中 A、B 两组中囊胚的移植占比都达到甚至超过了 75%,但缺乏足够多卵裂期胚胎移植数据,致使我们无法得出移植囊胚优于卵裂期胚胎的结论。

ICSI 已被广泛用于男性因素不孕夫妇的体外受精治疗。由于精液质量受损可能会对胚胎的发育产生负面影响,因此 ICSI 对囊胚发育的影响仍存在争议。有研究认为 ICSI 胚胎质量低于 IVF 的胚胎^[21],而其他研究没有观察到任何差异^[22]。本研究对比了 RIF 患者再次胚胎移植后妊娠者与未妊娠者两组授精方式中 ICSI 的比例,并未发现有统计学差异,这也可能是由于其样本量小的缘故,不足以揭示其中的差异。男性因素与生殖结局密切相关,但目前缺乏男性精子质量与 RIF 关联的临床证据。建议 RIF 患者配偶合理膳食、控制体质量、适量运动、戒烟限酒,适当补充维生素 C 和 E 等天然抗氧化剂及铁、硒和锌等微量元素^[7]。卵胞浆内形态学选择精子注射(intracellular plasmic morphological selected sperm injection, IMSI)是一种在高放大倍率观察下通过形态学对精子进行筛选的技术,但未有充足证据支持对 RIF 患者常规使用 IMSI^[23]。

综上所述,本研究采用病例对照的回顾性分析,发现了胚胎移植数量的增加与 RIF 治疗成功有关联,然而本研究存在样本量小、回顾偏移、纳入因素局限等因素,其结果还需要进一步的大型前瞻性队列研究证实。

参考文献:

[1] Johnson M. Human in vitro fertilisation and developmental biology: a mutually influential history [J]. *Development*, 2019, 146(17): dev183145. doi: 10.1242/dev.183145.

[2] Gnoth C, Maxrath B, Skonieczny T, et al. Final ART success rates: a 10 years survey [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(8): 2239-2246.

[3] Busnelli A, Reschini M, Cardellicchio L, et al. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40(1): 91-97.

[4] Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(1): 14-38.

[5] Frasiak JM, Aleksandru D, Forman EJ, et al. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure

[J]. *Fertil Steril*, 2021, 116(6): 1436-1448.

[6] Günther V, Otte SV, Freytag D, et al. Recurrent implantation failure—an overview of current research [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(7): 584-590.

[7] 李蓉, 石玉华, 李达. 反复种植失败临床诊疗中国专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2023, 103(2): 89-100.
LI Rong, SHI Yuhua, LI Da. Expert consensus on diagnosis and treatment of recurrent implantation failure [J]. *National Medical Journal of China*, 2023, 103(2): 89-100.

[8] 中华医学会生殖医学分会第一届实验室学组. 人类体外受精-胚胎移植实验室操作专家共识(2016) [J]. *生殖医学杂志*, 2017(1): 1-8. doi: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.01.001.

[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] Cutting R. Single embryo transfer for all [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018, 53: 30-37. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.07.001.

[11] 李菲, 师娟子, 薛侠, 等. 选择性单囊胚移植在高龄女性辅助生殖助孕中的应用及效果分析[J]. *生殖医学杂志*, 2022(5): 632-637.

[12] Wei D, Liu JY, Sun Y, et al. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 393(10178): 1310-1318.

[13] Pan Y, Li B, Wang Z, et al. Hormone replacement versus natural cycle protocols of endometrial preparation for frozen embryo transfer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 546532. doi: 10.3389/fendo.2020.546532.

[14] 石玉华, 王秋敏, 戚丹. 辅助生殖技术前沿研究热点及进展[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2021, 59(9): 97-102.
SHI Yuhua, WANG Qiumin, QI Dan. Frontier research hotspot and progress in assisted reproductive technology [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2021, 59(9): 97-102.

[15] 石玉华, 蒋琪. 辅助生殖治疗中卵巢过度刺激综合征的防治[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2019, 57(10): 13-19.
SHI Yuhua, JIANG Qi. Prevention and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive therapy [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2019, 57(10): 13-19.

[16] Tsampalás M, Grídelet V, Berndt S, et al. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties [J]. *J Reprod Immunol*, 2010, 85(1): 93-98.

- [17] Zhang X, Gao Y, Liu W, et al. Frozen blastocyst embryo transfer vs. frozen cleavage-stage embryo transfer in couples with recurrent implantation failure: a cohort study [J]. *Hum Fertil (Camb)*, 2021, 24(4): 284-289.
- [18] Mascarenhas M, Jevé Y, Polanski L, et al. Management of recurrent implantation failure: British Fertility Society policy and practice guideline [J]. *Hum Fertil (Camb)*, 2022, 25(5): 813-837.
- [19] Glujovsky D, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, et al. Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022, 5(5): CD002118. doi: 10.1002/14651858.CD002118.pub6.
- [20] Martins WP, Nastri CO, Rienzi L, et al. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017, 49(5): 583-591.
- [21] 薛侠, 张四林, 施文浩, 等. 不同授精方式的选择性单囊胚移植的妊娠结局分析 [J]. *生殖医学杂志*, 2014(9): 760-762.
- [22] Karacan M, Ulug M, Arvas A, et al. Comparison of the transfer of equal numbers of blastocysts versus cleavage-stage embryos after repeated failure of in vitro fertilization cycles [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(3): 269-274.
- [23] Lukaszuk K, Jakiel G, Wocławek Potocka I, et al. IM-SI-Guidelines for sperm quality assessment [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(1): 192. doi: 10.3390/diagnostics12010192.

(编辑:刘霞)

读者·作者·编者

正文中参考文献的标注

按文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编码,并将序号置于方括号中。可根据具体情况分别按下述3种格式之一标注。a. 薛社普等^[1]指出棉酚从体内排泄缓慢。b. 麦胶敏感性肠病的发病有3种机制参与^[2,4,6]。c. 间质细胞cAMP含量测定方法见文献[7]。正文指明原始文献作者姓名时,序号标注于作者姓名右上角(如例a);正文未指明作者或非原始文献作者时,序号标注于句末(如例b);正文直接述及文献序号将之作为语句的组成部分时,不用角码标注(如例c)。

(本刊编辑部)