

## IVF-ET 治疗中短时受精对治疗结局的影响

马 兰, 杨晓玲, 陈静思, 孟 娇, 谭 颖  
(昆明医科大学第二附属医院生殖医学科, 昆明, 650101)

**[摘要]** **目的** 比较分析 IVF-ET 周期中短时受精对受精、胚胎质量和妊娠结局的影响, 明确短时受精在 IVF-ET 周期中的实施必要性。 **方法** 回顾性分析 2013 年 10 月至 2014 年 1 月就诊于昆明医科大学第二附属医院生殖医学科的 392 例 IVF 受精正常患者资料。患者平均年龄 ( $32.39 \pm 4.71$ ) 岁, 共获卵 5 696 枚, 每个患者的卵随机分为短时受精组 (A 组) 和过夜受精组 (B 组), A 组卵子 2 643 枚, B 组卵子 3 053 枚。分析 2 组正常受精率、成熟卵率、1PN 率、3PN 受精率、卵裂率、优质胚胎发育率、新鲜胚胎移植周期胚胎着床率和全胚冷冻周期行 FET 后妊娠率和胚胎着床率。 **结果** 分析 2 组之间成熟卵率、正常受精 2PN 率、1PN 率、3PN 率、卵裂率、优质胚胎率、新鲜胚胎移植周期妊娠率、胚胎着床率、全胚冷冻周期首次行 FET 后妊娠率和胚胎着床率, A 组分别为 88.84%、63.42%、2.88%、6.08%、98.56%、46.85%、44.57%、23.41%、49.06% 和 25.20%; B 组分别为 90.04%、65.56%、1.86%、5.87%、98.65%、42.49%、43.21%、23.23%、53.33% 和 33.33%。2 组之间卵子成熟率、正常受精率、卵裂率、3PN 率、新鲜胚胎移植周期妊娠率、胚胎着床率、全胚冷冻周期首次行 FET 后妊娠率和胚胎着床率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但短时受精组 1PN 率、优质胚胎率高于过夜受精组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 新鲜周期和 FET 临床妊娠率和胚胎着床率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 在 IVF-ET 的实施过程中, 根据患者的病史, 部分卵子选择短时受精-早期补救对于避免完全受精失败或者低受精率的发生具有一定的意义。短时受精增加异常受精率, 妊娠率与过夜受精无差异。由于样本量的限制, 此结果仍需要进一步的验证。

**[关键词]** IVF-ET; 短时受精; 受精率; 胚胎质量; 妊娠结局

**[中图分类号]** R321.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 11-0108-04

## The Study of Short-time Fertilization on Treatment Outcome in IVF-ET

MA Lan, YANG Xiao-ling, CHEN Jing-si, MENG Jiao, CHAN Ying

(Dept. of Reproductive Medicine, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the influence of short-time fertilization on the IVF-ET fertilization outcome and embryo quality and confirm the necessity of short-time fertilization during IVF-ET. **Methods** We retrospectively analyzed the data selected from the 392 IVF-ET patients with normal fertility rate treated in the 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University during Oct 2013 ~ Jan 2014, with the mean age was  $32.39 \pm 4.71$ . The oocytes of every patient were randomly divided into two groups, groups of short-time fertilization (group A) and overnight fertilization (group B). 2 643 oocytes of group A were fertilized after 40 hours of HCG injection and removed granulosa cells after about 6 hours to observe whether the second polar body had appeared, then 2PN was checked after 18 ~ 20 hours of insemination. The oocytes from group B were inseminated after 40 hours of HCG injection and 2PN were checked after 18 ~ 20 hours of insemination. Normal fertilization rate, maturation rate, 1PN rate, 3PN rate, cleavage rate, high-quality embryo rate, pregnancy rate of fresh embryo transfer, implantation rate, pregnancy rate of first FET cycle after cryopreservation of all embryos and its implantation rate were analyzed between the two groups. **Results** Maturation rate, normal fertilization rate, 1PN rate, 3PN rate,

**[基金项目]** 遗传资源与进化国家重点实验室开放课题 (GREKF10-07)

**[作者简介]** 马兰 (1970~), 女, 云南大理市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事生殖内分泌及不孕不育相关疾病的临床、教学及科研工作。

**[通讯作者]** 谭颖. E-mail: 15812029300@163.com

cleavage rate, good quality embryo rate, pregnancy rate of fresh embryo transfer, implantation rate, pregnancy rate of first FET cycle after cryopreservation of all embryos and its implantation were respectively group A: 88.84%、63.42%、2.88%、6.08%、98.56%、46.85%、44.57%、23.41%、49.06% and 25.20%; group B 90.04%、65.56%、1.86%、5.87%、98.65%、42.49%、43.21%、23.23%、53.33% and 33.33%. No significant difference was observed between the two groups of maturation rate, normal fertilization rate, cleavage rate, 3PN rate, pregnancy rate of fresh embryo transfer, implantation rate, pregnancy rate of first FET cycle after cryopreservation of all embryos and its implantation. But 1PN rate and high-quality embryo were higher in group A than that in group B and there was significant difference. There was a difference of pregnancy rate and implantation rate between fresh embryo transfer cycles and the first FET cycles. **Conclusion** According to the history of patients, it is important to select properly short-time fertilization and rescue ICSI way in order to avoid fertilization failure or low fertilization rate. Short-time fertilization increased 1PN and good-embryo rate, but this result needs further study for the limitation of sample size.

**[Key words]** IVF-ET; Short-time fertilization; Fertilization rate; Embryo quality; Pregnancy outcome

传统体外受精 - 胚胎移植 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 的受精方式造成约 5% ~ 10% 的取卵周期完全受精失败<sup>[1]</sup>. 短时受精合并早期补救 ICSI 可以有效降低完全受精失败和低受精率周期的数量, 进而提高卵子利用率. 短时受精缩短了精卵共孵育时间, 研究表明缩短受精时间不影响卵母细胞的受精和胚胎发育并且可以减少自发流产的发生<sup>[2, 3]</sup>, 但也有报道表明短时受精不能提高胚胎质量和妊娠率<sup>[4]</sup>. 当前国内很多从事人类辅助生殖技术机构实行短时受精 - 早期补救单卵胞浆内注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 技术. 短时受精对胚胎发育和妊娠结局的影响还未有定论, 仍需深入研究. 本研究分析了 IVF-ET 周期中同一患者的卵子随机分组进行短时受精和过夜受精, 单纯评估两种受精方式对受精、胚胎发育情况和临床妊娠结局的影响, 深入探讨短时受精早期补救技术临床应用的安全性和临床应用价值.

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

回顾性分析 2013 年 10 月至 2014 年 1 月就诊于昆明医科大学第二附属医院生殖医学科行 IVF-ET 治疗患者的数据. 纳入标准: (1) 获卵数大于 8 枚的 IVF 取卵周期; (2) 受精正常, 未进行早期补救 ICSI 的周期; (3) 使用同一培养系统的周期. 分析符合纳入标准的每个患者的短时受精和传统过夜受精组的数据. 共计 5 696 枚卵子, 其中 A 组为短时受精组, 共计 2 643 枚卵, 受精程序为 HCG 注射后 40 h 加精, 精卵共孵育 4 ~ 5 h 后剥除颗粒细胞观察第二极体排出情况, 受精 18 h 后观察原核确定受精情况; B 组为过夜受精组, 共计 3 053 枚卵, 受精程序为 HCG 注射后 40

h 加精并于受精后 16 h 拆除颗粒细胞观察原核确定受精情况. 对两组的正常受精率、3PN 率、1PN 率、卵裂率、优质胚胎率、新鲜胚胎移植周期妊娠率、胚胎着床率、全胚冷冻周期首次行 FET 后妊娠率和胚胎着床率进行统计分析. 本研究经昆明医科大学第二附属医院伦理委员会批准进行.

### 1.2 方法

**1.2.1 周期方案** 所有患者采用长方案或者短方案进行促排卵. 长方案于前次月经周期的黄体中期肌注长效达菲林进行垂体降调节, 短方案于月经周期第 2 天肌注达菲林, 第 3 天肌注促卵泡生成素 (FSH), 5 d 后 B 超监测卵泡生长情况和激素水平. 当主导卵泡直径大于 18 mm 或者同时 3 个卵泡直径超过 16 mm 时, 肌注绒毛膜促性腺激素 (hCG) 34 ~ 36 h 后阴道 B 超介导下行取卵术. 第 3 天根据胚胎发育和患者情况决定是否移植, 按照卫生部体外受精 - 胚胎移植及其衍生技术规范规定, 根据患者年龄、既往移植周期数和内分泌情况确定移植胚胎的数目. 解冻移植周期按照患者自身情况采用自然周期或者替代周期准备内膜, 移植术后行黄体支持. 移植后 35 d B 超观察确定临床妊娠结局.

**1.2.2 精子制备和体外受精 - 胚胎培养** 按照世界卫生组织 (WHO) 第 5 版男科精液常规检查手册标准方法处理精子, 并采用血细胞计数板确定精子密度. 短时受精组和过夜受精组均按照 5 ~ 80 000 条精子 /mL 于 HCG 注射后 40 h 行体外受精, 短时受精组于精卵孵育 4 ~ 5 h 后剥除颗粒细胞, 检查第二极体排出情况, 将精卵孵育 6 h 后第二极体排出率大于 30% 的周期纳入研究. 过夜受精组于受精后 18 ~ 20 h 进行原核和受精情况评估.

**1.2.3 胚胎质量评估及冷冻解冻** 胚胎培养至受精后第 3 天, 进行胚胎观察评分, 胚胎评分标准

为 1 级胚胎: 7~10 细胞, 碎片 < 10%, 卵裂球对称; 2 级胚胎: 7~8 细胞, 碎片 < 20%, 卵裂球不对称, 7~8 细胞, 碎片 < 10%, 卵裂球对称; 6 细胞, 碎片 < 10%, 卵裂球对称分布; 3 级胚胎:  $\geq$  6 细胞, 碎片 < 30% 或者 5 碎片 < 10%; 4 级胚胎:  $\geq$  5 细胞, 碎片 < 40% 或者 4 细胞碎片 < 20%; 5 级胚胎: 4 细胞, 碎片 > 20% 或者 < 4 细胞及碎片大于 40%。1 级和 2 级胚胎为优质胚胎。采用玻璃化冷冻方法将优质胚胎冷冻保存。

**1.2.4 ET 或者冷冻胚胎选择** 鲜胚移植或全胚冷冻胚胎选择: 优先选择优质胚胎数量多的 1 组; 如果 2 组胚胎质量相似, 则优先选择过夜受精组胚胎; 如果 2 组胚胎质量均无优质胚胎或者单组优质胚胎数量低于可移植胚胎数, 则优先选择 2 组中胚胎质量好的胚胎进行 ET。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 软件进行检验, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 形式表示; 组间比较采用 *t*-test; 计数资料采用 Chi-square 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

392 例 IVF 周期共计获卵 5 696 个, A 组和 B 组的卵子分别为 2 643 (46.40%) 和 3 053 个 (53.60%)。分析 2 组成熟卵率、正常受精 2PN 率、

1PN 率、3PN 率、卵裂率、优质胚胎率、新鲜胚胎移植周期妊娠率、胚胎着床率、全胚冷冻周期首次行 FET 后妊娠率和胚胎着床率, A 组分别为 88.84%、63.42%、2.88%、6.08%、98.56%、46.85%、44.57%、23.41%、49.06% 和 25.20%; B 组分别为 90.04%、65.56%、1.86%、5.87%、98.65%、42.49%、43.21%、23.23%、53.33% 和 33.33%。统计学分析表明, 2 组之间成熟卵率、正常受精率、3PN 率和卵裂率无显著性差异, 但 B 组 1PN 率和优质胚胎率高于 A 组, 具有统计学显著性差异,  $P < 0.05$ , 见表 1。

2 组的移植和妊娠结局比较结果, 见表 2, 鲜胚移植周期和 FET 周期分别为 259 和 133 个。新鲜周期和 FET 组内 A 组、B 组和 A+B 组的平均年龄、平均移植胚胎、内膜厚度、临床妊娠率和着床率均未见统计学差异; 组间分析表明 FET 组平均获卵数、临床妊娠率和着床率高于新鲜周期组, 差异具有统计学意义,  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

精子颗粒细胞代谢产生的活性氧 (ROS) 可能影响细胞膜流动性和 DNA 稳定性, 进而影响胚胎的发育潜能<sup>[9]</sup>。短时受精缩短了卵子与精子的共孵育时间, 使卵子减少暴露于高密度精子的培养环境中, 理论上可以提高胚胎质量, 因此在人类辅

表 1 受精和胚胎发育情况对比 [n (%)]

Tab. 1 Comparison of fertilization and embryo quality between two groups [n (%)]

组别	总卵子数	成熟卵数	2PN	1PN	3PN	卵裂数	优质胚胎
A 组	2 643 (46.40)	2 348 (88.84)	1 676 (63.42)	76 (2.88)	161 (6.08)	1 652 (98.56)	774 (46.85)
B 组	3 053 (53.60)	2 749 (90.04)	2 001 (65.56)	57 (1.86)*	179 (5.87)	1 974 (98.65)	839 (42.49)

与 A 组比较, \* $P < 0.05$ 。

表 2 不同受精方式胚胎移植结局比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of pregnancy outcome and basal information among three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	新鲜周期				FET			
	A 组	B 组	A+B 组	合计	A 组	B 组	A+B 组	合计
平均年龄(岁)	32.35 $\pm$ 4.85	32.65 $\pm$ 4.69	32.83 $\pm$ 5.32	32.62 $\pm$ 5.06	31.64 $\pm$ 4.92	31.64 $\pm$ 5.67	32.52 $\pm$ 4.86	31.94 $\pm$ 5.23
平均获卵数(个)	13.95 $\pm$ 5.89	14.89 $\pm$ 6.73	13.32 $\pm$ 5.76	14.42 $\pm$ 5.63	16.65 $\pm$ 6.83	17.48 $\pm$ 6.47	16.94 $\pm$ 5.39	17.06 $\pm$ 6.43*
移植周期数(次)	81	92	86	259	45	53	35	133
平均移植胚胎(个)	2.44 $\pm$ 0.62	2.23 $\pm$ 0.58	2.36 $\pm$ 0.64	2.36 $\pm$ 0.59	2.27 $\pm$ 0.56	2.32 $\pm$ 0.62	2.40 $\pm$ 0.67	2.32 $\pm$ 0.61
平均内膜厚度(mm)	9.82 $\pm$ 1.92	10.33 $\pm$ 2.01	10.29 $\pm$ 2.81	10.16 $\pm$ 2.06	10.42 $\pm$ 1.95	10.23 $\pm$ 2.04	10.35 $\pm$ 2.08	10.33 $\pm$ 2.01
临床妊娠率(%)	44.57	43.21	40.70	42.86	49.06	53.33	45.71	53.38*
胚胎着床率(%)	23.41	23.23	20.20	22.28	25.20	33.33	27.38	28.48*

与 FET 组比较, \* $P < 0.05$ 。

助生殖技术中得到了应用. 文献报道短时受精方式对正常受精率不会造成影响<sup>[6,7]</sup>, 但是优质胚胎率有显著性提升<sup>[3,8-11]</sup>, 本研究结果与其一致, 短时受精卵子的优质胚胎率显著高于过夜受精组.

短时受精早期补救需要在精卵孵育 4~5 h 剥除卵子外面的颗粒细胞和粘附的多余精子, 这一操作步骤的安全性还不确定. 有报道表明动物或人类卵子行短时受精早期剥除颗粒细胞可能增加多精受精卵的出现<sup>[7,12-14]</sup>. 笔者分析同一患者同一周期短时和过夜受精的卵子受精和胚胎发育情况, 结果表明短时受精组的 1PN 率显著高于过夜受精组. 短时受精在精卵孵育 4~5 h 剥离颗粒细胞, 此时期的操作本身对卵子或者受精卵的安全性还未明确, 可能是造成 1PN 率增高的因素. 卵子质量是造成异常受精的主要因素, 质量低下卵子不能有效诱发皮质反应、透明带反应和卵黄膜反应, 允许其他精子进入卵母细胞<sup>[15]</sup>. 由于短时受精组部分卵子还处于成熟阶段的早期即进行颗粒细胞的剥离, 此时卵浆基质功能差, 也是造成 1PN 率增高的因素之一.

本研究短时受精和过夜受精组的卵子来自同一取卵周期, 避免了因患者间个体差异造成的受精和胚胎发育结果的影响. 笔者单纯分析短时受精和过夜受精移植周期的临床妊娠率和着床率在新鲜周期和 FET 周期的分布频率, 结果未见差异. 这与有些研究的结果短时受精妊娠率升高不同<sup>[16]</sup>, 可能的原因是样本量的限制. FET 周期的总体妊娠率高于新鲜周期, 新鲜周期取消移植的原因主要是卵巢过度刺激, 这部分周期的自身卵巢反应性能优良决定了子宫内膜容受性.

为了明确 2 种不同受精方式对胚胎和妊娠结局的影响, 避免由于受精率低而影响后续胚胎发育和妊娠结局, 不受精或者低受精 (低于 30%) IVF 周期未纳入本研究. 为此笔者的分析结果能更客观的反映出短时受精的胚胎发育质量更好, 但是不能有效提升临床妊娠率. 短时受精可以避免完全受精失败和低受精率周期的发生, 为此在不影响治疗结局的情况下, IVF 周期采用短时受精结合早期补救的方式是可行的.

综上所述, 在 IVF 过程中, 由于 1PN 率的增高, 短时受精结合早期补救并不适用于所有 IVF 周期. 根据患者的病史, 有针对性地实行部分卵子短时受精结合早期补救是可行的. 获卵数多的周期, 采用部分卵子行短时受精, 减少完全不受精周期的发生率. 由于此技术的远期影响尚不明确, 还需要积累更多的资料进行评估以确定其安全性. 由于样本量有限, 还需要相关的后续研究

证实短时受精对胚胎发育潜能的影响.

### [参考文献]

- [1] MAHUTTE N G, ARICI A. Failed fertilization: is it predictable[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2003, 15(3): 211 - 218.
- [2] GUO H, YANG J, ZHANG C, et al. Analysis of clinical data of patients with different outcomes after short - time insemination [J]. *Andrologia*, 2012, 44(Suppl1): 667 - 671.
- [3] 邓志华. 短时受精失败早补救的临床应用[J]. *医学综述*, 2013, 17(19): 3 250 - 3 251.
- [4] 刁英. 短时受精并即刻脱颗粒细胞对 IVF - ET 治疗周期的影响 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2011, 2(19): 106 - 108.
- [5] IPOTHOVA Z. Subcellular localization of proflavine derivative and induction of oxidative stress - in vitro studies [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(21): 6 726 - 6 731.
- [6] 李涛, 任姿, 张敏芳, 等. 超短时受精对人类配子体外多精受精发生率的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2007, 21(28): 67 - 69.
- [7] ALMINANA C, GIL M A, CUELLO C, et al. Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm - oocyte co - incubation [J]. *Theriogenology*, 2005, 64(8): 1 783 - 1 796.
- [8] 纪冰, 马学工, 党小红, 等. 短时受精在体外受精胚胎移植中的应用 [J]. *青海医学院学报*, 2012, 4(33): 281 - 283.
- [9] 李娜, 苗聪秀, 向秋, 等. 短时受精在体外受精的临床应用[J]. *华夏医学*, 2011, 3(24): 247 - 249.
- [10] 何晶晶. 短时受精与传统受精的临床应用[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 1(46): 76 - 78.
- [11] KATTERA S, CHEN C. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study [J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(4): 1 017 - 1 021.
- [12] TANIHARA F. Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs [J]. *J Reprod Dev*, 2013, 59(4): 385 - 392.
- [13] AOKI V W. Correlation of sperm penetration assay score with polyspermy rate in in - vitro fertilization [J]. *J Exp Clin Assist Reprod*, 2005, 2(1): 3.
- [14] SUZUKI K. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro [J]. *Int J Androl*, 2000, 23(1): 13 - 21.
- [15] 张伦, 蒋小辉. 人未受精及受精未分裂卵母细胞超微结构研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 5(41): 810 - 813.
- [16] 严正杰, 蔡令波, 冯婷, 等. 对体外受精失败后不同受精时间进行补救 ICSI 的结局比较 [J]. *生殖与避孕*, 2009, 29(5): 329 - 332.

(2015 - 09 - 10 收稿)