

DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2019.08.005

利用 Time-lapse 技术筛选早期胚胎对 IVF-ET 妊娠结局的影响

丁洁, 孟庆霞, 郑爱燕, 蒲艳, 廖桂芝, 许咏乐, 李红, 王玮*

(南京医科大学附属苏州医院, 苏州市立医院生殖与遗传中心, 苏州 215002)

【摘要】 目的 探索利用 Time-lapse 系统筛选早期胚胎的临床应用价值。方法 回顾性分析本中心 2016 年 7 月至 2017 年 12 月, 第一次新鲜或复苏周期 D3 卵裂期胚胎移植的患者资料, 根据胚胎评估方法分为 Time-lapse 系统组(TLM 组, $n=74$)和传统形态学评分组(CMA 组, $n=951$), 比较这两种不同胚胎筛选方法对临床结局的影响。结果 患者的不孕年限、体重指数、基础 FSH、基础 LH、 E_2 、AMH、窦卵泡数、内膜厚度和周期类型等一般情况, 在 TLM 组和 CMA 组均无显著差异(P 均 >0.05); TLM 组年龄显著高于 CMA 组 [(31.8 ± 4.2) vs. (30.8 ± 4.4) , $P < 0.05$], 而平均移植胚胎数显著少于 CMA 组 [(1.7 ± 0.5) vs. (1.9 ± 0.3) , $P < 0.05$]; 患者的临床结局, 包括临床妊娠率、种植率、流产率、宫外孕率、双胎率和移植两个胚胎的双胎率等在两组间均无显著差异(P 均 >0.05)。进一步按照年龄分层分析, 在 <35 岁患者, 患者的一般情况在两组间均无显著差异(P 均 >0.05), TLM 组的平均移植胚胎数显著少于 CMA 组 [(1.7 ± 0.5) vs. (1.9 ± 0.3) , $P < 0.05$], 而患者临床结局在两组间亦无显著差异($P > 0.05$); 在 ≥ 35 岁患者, TLM 组的平均移植胚胎数显著少于 CMA 组 [(1.7 ± 0.5) vs. (1.9 ± 0.4) , $P < 0.05$], 而患者的一般情况和临床结局在两组间亦无显著差异($P > 0.05$)。结论 利用 Time-lapse 技术选择早期胚胎, 可以在显著减少移植胚胎数的基础上, 维持稳定的临床妊娠结局。因此, 认为 Time-lapse 技术可以在一定程度上优选出更具发育潜能的胚胎, 为早期胚胎单胚胎移植提供新方法。

【关键词】 Time-lapse; 早期胚胎; 临床妊娠率; 种植率

【中图分类号】 711.6 **【文献标识码】** A

Effect of selecting early-stage embryos by time-lapse technique on pregnancy outcome of IVF-ET

DING Jie, MENG Qing-xia, ZHENG Ai-yan, PU Yan, LIAO Gui-zhi, XU Yong-le, LI Hong, WANG Wei*

Center for Reproduction & Genetics, Suzhou Municipal Hospital, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002

【Abstract】

Objective: To explore the clinical value of time-lapse monitoring system in selecting early-stage embryos.

Methods: A retrospective analysis of the first fresh or frozen-thawed Day 3 transferred embryo in our center from July 2016 to December 2017 was performed. According to the embryo evaluation methods, they were divided into time-lapse monitoring system group (TLM, $n = 74$) and conventional morphological assessment group (CMA, $n = 951$). The clinical outcomes were compared between the two different embryo assessment methods.

Results: There were no significant differences in the clinical characteristics of patients, including duration of infertility, body mass index, basic levels of FSH, LH, E_2 & AMH, antral follicle number,

【收稿日期】 2018-12-03; **【修回日期】** 2019-02-02

【基金项目】 江苏省妇幼健康科研项目(F201820);南京医科大学科技发展基金面上项目(2016NJMU147);江苏省妇幼重点人才(FRC201725)

【作者简介】 丁洁, 女, 湖南株洲人, 硕士, 副主任医师, 妇产科学专业。(* 通讯作者)

endometrial thickness and cycle type between TLM group and CMA group ($P > 0.05$). The age of TLM group was significantly higher than that of CMA group [(31.8 ± 4.2) vs. (30.8 ± 4.4) years] ($P < 0.05$). The number of transferred embryos in TLM group was significantly less than that in CMA group [(1.7 ± 0.5) vs. (1.9 ± 0.3)] ($P < 0.05$). There was no significant difference in clinical outcomes, including clinical pregnancy rate, implantation rate, miscarriage rate, ectopic pregnancy rate, twin pregnancy rate, and twin pregnancy rate of two embryos transplanted between the two groups ($P > 0.05$). According to age stratification, there was no significant difference in clinical characteristics between the two subgroups in <35 years old patients ($P > 0.05$). The average number of embryos transferred in TML group was significantly less than that in CMA group [(1.7 ± 0.5) vs. (1.9 ± 0.3)] ($P < 0.05$), but there was no significant difference in clinical outcomes between the two subgroups ($P > 0.05$). In ≥ 35 years old patients, the average number of embryos transferred in TML group was significantly less than that in CMA group [(1.7 ± 0.5) vs. (1.9 ± 0.4)] ($P < 0.05$). There was also no significant difference in general condition and clinical outcome between the two subgroups ($P > 0.05$).

Conclusions: Selection of early embryos by time-lapse can significantly reduce the number of transferred embryos and maintain stable clinical pregnancy outcomes. Therefore, time-lapse technology can be used to select embryos with more developmental potential, which provides a new method for single embryo transfer of early-stage embryos.

Key words: Time-lapse; Early-stage embryo; Clinical pregnancy rate; Implantation rate

(*J Reprod Med* 2019,28(08):872-877)

胚胎选择技术是体外受精胚胎移植技术的关键步骤。目前,绝大多数中心利用传统胚胎形态学评分方法选择胚胎,即根据特定时间点的胚胎形态对胚胎进行评级、选择。但该技术仅观察特定的胚胎发育时间点,不能获得胚胎发育的全部信息,且需要将胚胎反复取出培养箱,暴露于外界环境中,使得 pH 值和温度发生改变,进而可能影响胚胎发育潜能。

而近年来兴起的胚胎实时观测技术(time-lapse monitoring, TLM)可以对胚胎进行动态监测,不仅能够保证胚胎观察、评估过程中培养环境的稳定,而且可以获得胚胎连续动态发育图,以及胚胎发育过程中的非正常发育行为,如多核、异常分裂、混乱分裂、逆分裂等,进而为胚胎筛选提供更多参考信息。研究表明,利用 TLM 观察到的胚胎形态动力学参数和特殊分裂模式可以预测囊胚的形成^[1-5]。本中心前期研究也发现利用 TLM 技术可以预测 6 细胞以上碎片少的形态学优质 D3 胚胎的发育潜能^[6]。但是,关于利用 TLM 预测临床妊娠结局,结果不尽相同。一些研究认为细胞分裂时间点和分裂间期可以预测移植后胚胎的临床结局^[1,4,7],而另一些研究则认为不能预测^[3,8]。因此,本研究欲利用 TLM 系统对早期发育胚胎进行筛选,分析其对临床结局的影响,探索其在临床应用中的价值。

资料与方法

一、研究对象

回顾性分析本中心 2016 年 7 月至 2017 年 12 月,第一次新鲜或复苏周期移植,且移植 D3 胚胎的患者资料。排除标准:受精方式为早补救或补救 ICSI;移植胚胎评分为非优质;行植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)。最后共筛得 1 025 例患者,根据胚胎筛选方案分为 Time-lapse 系统组(TLM, $n=74$)和传统形态学评分组(CMA, $n=951$)。

二、研究方法

1. 取卵受精:患者进行常规促排卵后取卵,待优势卵泡直径达 18~20 mm 时,注射重组 HCG(艾泽,默克雪兰诺,瑞士)250 μg ,注射 34~36 h 后在阴道 B 超引导下取卵,获得的卵丘卵母细胞复合物洗涤干净后置于 G-IVF Plus(Vitrolife, 瑞典),4~6 h 后行 IVF 或 ICSI。

2. 胚胎培养:受精后的 2PN 胚胎,CMA 组放入普通培养箱(COOK, 美国),培养箱环境:6.0% CO_2 , 5.0% O_2 , 37 $^\circ\text{C}$; TLM 组放入 Embryoslide 培养皿,置于 Embryo Scope 时差培养箱(Vitrolife, 瑞典),培养箱环境:6.0% CO_2 , 5.0% O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 。设置拍摄间隔为 10 min,连续拍摄 6 d。

3. 胚胎选择和移植: CMA 组根据传统胚胎评分方法选择优质胚胎, 本中心 D3 优质胚胎的标准为: 细胞数 6~10 个, 胚胎碎片 ≤ 20%, 卵裂球均匀。TLM 组根据 Embryo Scope D3 评分原则^[9], 选择得分为 5 或 4 的胚胎。每组根据移植要求选出 1~2 枚最优质胚胎, 行新鲜周期移植; 不适合新鲜移植的患者将选出的优质胚胎冷冻, 随后行复苏周期移植。

4. 临床结局: 移植后 14 d 测血 β-HCG, 阳性者于 4~6 周后 B 超检查见孕囊者为临床妊娠。

三、统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。组间均数比较符合正态分布的采用 *t* 检验, 不符合正态分布的采用秩和检验; 率的比较采用卡方检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、患者一般情况比较

在所有 1 025 个周期中, 患者的不孕年限、体重指数、基础激素(FSH、LH、E₂、AMH)水平、窦卵泡数、内膜厚度和周期类型, 在两组间均无显著差异 (*P* 均 > 0.05); 而 TLM 组年龄显著大于 CMA 组 (*P* < 0.05)(表 1)。

二、胚胎筛选方式对临床结局的影响

TLM 组的平均移植胚胎数显著少于 CMA 组 (*P* < 0.05), 但临床妊娠率在两组间无显著差异 (*P* > 0.05); TLM 组种植率略高于 CMA 组, 但无显著差异 (*P* > 0.05); 其余各项临床指标在两组间无显著差异 (*P* 均 > 0.05)(表 2)。

表 1 患者的一般情况[($\bar{x} \pm s$), %]

组 别	病例数	年龄	不孕年限	BMI (kg/m ²)	基础 FSH (U/L)	基础 E ₂ (pmol/L)	基础 LH (U/L)	基础 AMH (ng/ml)
TLM 组	74	31.8 ± 4.2*	4.8 ± 3.1	22.2 ± 3.3	7.3 ± 1.8	171.8 ± 88.4	5.1 ± 2.2	3.0 ± 1.7

组 别	病例数	窦卵泡数	内膜厚度 (mm)	移植方案		不孕类型	
				新鲜周期	复苏周期	继发	原发
CMA 组	951	8.3 ± 4.8	9.1 ± 1.9	49.8(474/951)	50.2(477/951)	44.0(418/951)	56.0(533/951)
TLM 组	74	7.7 ± 3.2	9.2 ± 1.6	58.1(43/74)	41.9(31/74)	54.1(40/74)	45.9(34/74)

注: 与 CMA 组比较, **P* < 0.05

表 2 胚胎筛选方式对临床结局的影响[($\bar{x} \pm s$), %]

组 别	病例数	优胚率	HCG 阳性率	临床妊娠率	种植率
CMA 组	951	64.2(3 966/6 180)	66.4(631/951)	57.7(549/951)	40.2(731/1 817)
TLM 组	74	63.7(319/501)	63.5(47/74)	55.4(41/74)	43.7(55/126)

组 别	病例数	流产率	异位妊娠率	平均移植胚胎数	双胎率	移植两个胚胎的双胎率
CMA 组	951	13.1(72/549)	3.5(19/549)	1.9 ± 0.3	36.2(199/549)	40.3(199/494)
TLM 组	74	14.6(6/41)	0(0/41)	1.7 ± 0.5*	34.1(14/41)	51.9(14/27)

注: 与 CMA 组比较, **P* < 0.05

三、胚胎筛选方式对不同年龄患者临床结局的影响

1. 胚胎筛选方式对 < 35 岁患者临床结局的影响: 所有一般情况, 包括年龄、不孕年限、体重指数、基础激素(FSH、LH、E₂、AMH)水平、窦卵泡数、内膜厚度和周期类型, 在两组间均无显著差异 (*P* 均 > 0.05)(表 3); TLM 组的平均移植胚胎数显著少于

CMA 组 (*P* < 0.05), 但临床妊娠率在两组间无显著差异 (*P* > 0.05); TLM 组种植率略高于 CMA 组, 但无显著差异 (*P* > 0.05); 其余各项临床指标在两组均无显著差异 (*P* 均 > 0.05)(表 4)。

2. 胚胎筛选方式对 ≥ 35 岁患者临床结局的影响: 所有一般情况, 包括年龄、不孕年限、体重指数、基础 FSH、基础 LH、E₂、AMH、窦卵泡数、内膜厚

度和周期类型,在两组间均无显著差异(P 均 >0.05)(表 5);TLM 组的平均移植胚胎数显著少于 CMA 组($P<0.05$),但临床妊娠在两组间无显著差

异($P>0.05$);TLM 组种植率略高于 CMA 组,但无显著差异($P>0.05$);其余各项临床指标在两组间无显著差异(P 均 >0.05)(表 6)。

表 3 <35 岁患者的一般情况[($\bar{x}\pm s$),%]

组别	病例数	年龄	不孕年限	BMI (kg/m ²)	基础 FSH (U/L)	基础 E ₂ (pmol/L)	基础 LH (U/L)	基础 AMH (ng/ml)
CMA 组	783	29.2±2.8	4.0±2.2	22.3±3.2	7.3±2.3	160.0±70.8	5.4±3.4	4.1±3.3
TLM 组	51	29.5±2.6	4.0±2.1	21.7±2.9	7.4±1.9	166.7±88.4	5.6±2.1	3.3±1.8

组别	病例数	窦卵泡数	内膜厚度 (mm)	移植方案		不孕类型	
				新鲜周期	复苏周期	继发	原发
CMA 组	783	8.7±5.0	9.2±1.9	53.4(365/783)	46.6(365/783)	40.0(313/783)	60.0(470/783)
TLM 组	51	8.2±3.4	9.3±1.7	60.8(31/51)	39.2(20/51)	51.0(26/51)	49.0(25/51)

表 4 胚胎筛选方式对<35 岁患者临床结局的影响[($\bar{x}\pm s$),%]

组别	病例数	优胚率	HCG 阳性率	临床妊娠率	种植率
CMA 组	783	63.9(3466/5426)	69.9(547/783)	61.2(479/783)	42.9(646/1506)
TLM 组	51	63.8(231/362)	70.6(36/51)	58.8(30/51)	47.7(42/88)

组别	病例数	流产率	异位妊娠率	平均移植胚胎数	双胎率	移植两个胚胎的双胎率
CMA 组	783	12.9(62/479)	3.5(17/479)	1.9±0.3	38.2(183/479)	40.6(183/451)
TLM 组	51	6.7(2/30)	0(0/30)	1.7±0.5*	40.0(12/30)	57.1(12/21)

注:与 CMA 组比较,* $P<0.05$

表 5 ≥35 岁患者的一般资料[($\bar{x}\pm s$),%]

组别	病例数	年龄	不孕年限	BMI (kg/m ²)	基础 FSH (U/L)	基础 E ₂ (pmol/L)	基础 LH (U/L)	基础 AMH (ng/ml)
CMA 组	168	38.1±2.9	6.0±4.1	22.6±3.1	8.4±3.5	179.8±107.5	4.5±2.3	2.1±1.9
TLM 组	23	36.9±1.7	6.5±4.1	23.3±3.7	7.2±1.6	182.4±88.8	4.0±1.9	2.4±1.3

组别	病例数	窦卵泡数	内膜厚度 (mm)	移植方案		不孕类型	
				新鲜周期	复苏周期	继发	原发
CMA 组	168	6.3±3.2	9.1±1.8	33.3(56/168)	66.7(112/168)	62.5(105/168)	37.5(63/168)
TLM 组	23	6.3±2.4	8.9±1.3	52.2(12/23)	47.8(11/23)	60.9(14/23)	39.1(9/23)

表 6 胚胎筛选方式对≥35 岁患者临床结局的影响[($\bar{x}\pm s$),%]

组别	病例数	优胚率	HCG 阳性率	临床妊娠率	种植率
CMA 组	168	66.3(500/754)	50.0(84/168)	41.7(70/168)	27.3(85/311)
TLM 组	23	63.3(88/139)	47.8(11/23)	47.8(11/23)	34.2(13/38)

分组	病例数	流产率	异位妊娠率	平均移植胚胎数	双胎率	移植两个胚胎的双胎率
CMA 组	168	14.3(10/70)	2.9(2/70)	1.9±0.4	22.9(16/70)	37.2(16/43)
TLM 组	23	36.4(4/11)	0(0/11)	1.7±0.5*	18.2(2/11)	33.3(2/6)

注:与 CMA 组比较,* $P<0.05$

讨 论

近年, TLM 已被部分生殖中心引入并应用于临床, 该技术被认为是一项能够监测胚胎发育的安全的胚胎培养体系^[10-12]。大部分研究认为 TLM 记录胚胎形态动力学指标能够预测胚胎发育潜能和囊胚形成效率, 但是关于 TLM 选择胚胎能否改善临床结局, 说法不一^[13-15]。

本研究中, TLM 组的年龄显著高于 CMA 组, 且 TLM 组的平均移植胚胎数显著少于 CMA 组, 但两者的临床妊娠率之间无显著差异 ($P > 0.05$)。表明利用 TLM 选择胚胎, 可以在显著减少移植胚胎数的基础上, 维持稳定的临床妊娠率, 提示 TLM 技术可以为早期胚胎单胚胎移植技术的开展提供一定手段。虽然 TLM 组种植率比 CMA 组高, 但两者无显著差异 ($P > 0.05$), 该结果与 Wu 等^[16] 研究结果一致。另外, 就移植两个胚胎的双胎率, TLM 组和 CMA 组分别为 51.9% 和 40.3%, 虽然两者无显著差异 ($P > 0.05$), 但是 TLM 组移植两个胚胎的双胎率有增高的趋势。这与 Insua 等^[14] 的研究结果一致, 他们发现 TLM 组的多胎分娩率高于 CMA 组。母体子宫环境和胚胎质量是影响胚胎种植的两大因素。基于本研究结果, 有理由认为在子宫容受条件好的患者中, TLM 选择的胚胎种植效率更高, TLM 可能对胚胎的选择起了正效应。但是, 需要进一步扩大和平衡样本数来证实此推论。

另外, 考虑到不同年龄段患者胚胎生长发育的规律和模式不尽相同。本文进一步将患者按年龄分层, 分为 < 35 岁组和 ≥ 35 岁组。结果, 无论是在 < 35 岁患者还是 ≥ 35 岁患者, 女方年龄、临床妊娠率和种植率在两组间均无显著差异 ($P > 0.05$), 而平均移植胚胎数 TLM 组均显著少于 CMA 组 ($P < 0.05$)。就移植两个胚胎的双胎率, 尽管两个年龄段患者间均无显著差异 ($P > 0.05$), 但 < 35 岁患者 TLM 组有上升趋势, ≥ 35 岁患者 TLM 组有下降趋势。但是 ≥ 35 岁患者仅 6 例移植 2 个胚胎, 因此该结果有待扩大样本进一步研究。

本研究中, < 35 岁患者利用 TLM 选择 D3 胚胎移植后, 其种植率为 47.7%, 移植两个胚胎后双胎率为 57.1%。但是鉴于双胎对母婴健康安全会产生不利影响, 导致妊娠高血压和早产等产科和新生儿科问题。因此, 在 < 35 岁患者, 利用 TLM 选择胚胎进行早期胚胎单胚胎移植具有一定可行性。但

是对于 ≥ 35 岁患者, TLM 组种植率为 34.2%, 因此利用 TLM 筛选胚胎行早期胚胎单胚胎移植还需进一步研究。本研究中两个年龄段患者, TLM 组和 CMA 组临床妊娠率和种植率均无显著差异。但是, 在降低移植胚胎数的基础上, TLM 能维持稳定的临床妊娠率, 且 TLM 组种植率和移植两个胚胎后的双胎率与 CMA 组比较无显著差异, 但均有上升趋势。由于本研究中 TLM 组和 CMA 组的样本量差异较大, 因此若将两组样本数平衡, 也许统计学差异会显现。

综上所述, 利用 Time-lapse 技术选择早期胚胎, 可以在显著减少移植胚胎数的基础上, 维持稳定的临床妊娠结局。因此, 认为 Time-lapse 技术可以在一定程度上优选出更具发育潜能的胚胎, 为早期胚胎单胚胎移植提供新方法。

【参 考 文 献】

- [1] Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, et al. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study [J]. Hum Reprod, 2013, 28: 2643-2651.
- [2] Dal Canto M, Coticchio G, Mignini RM, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation [J/OL]. Reprod Biomed Online, 2012, 25: 474-480.
- [3] Conaghan J, Chen AA, Willman SP, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial [J]. Fertil Steril, 2013, 100: 412-419. e5.
- [4] Hashimoto S, Kato N, Saeki K, et al. Selection of high-potential embryos by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging [J]. Fertil Steril, 2012, 97: 332-337.
- [5] Hlinka D, Kal'atová B, Uhrinová I, et al. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability [J]. Physiol Res, 2012, 61: 513-525.
- [6] 郑爱燕, 孟庆霞, 丁洁, 等. 利用胚胎实时观测技术预测早期胚胎的发育潜能 [J]. 生殖医学杂志, 2018, 27: 957-961.
- [7] Meseguer M, Herrero J, Tejera A, et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation [J]. Hum Reprod, 2011, 26: 2658-2671.
- [8] Rubio I, Galán A, Larreategui Z, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope [J]. Fertil Steril, 2014, 102: 1287-1294. e5.
- [9] Petersen BM, Boel M, Montag M, et al. Development of a

- generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3[J]. *Hum Reprod*,2016,31:2231-2244.
- [10] Cruz M,Gadea B,Garrido N,et al. Embryo quality,blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging[J]. *J Assist Reprod Genet*,2011,28:569-573.
- [11] Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, et al. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator [J]. *J Assist Reprod Genet*,2012,29:565-572.
- [12] Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment[J]. *Hum Reprod*,2012,27:1277-1285.
- [13] Goodman LR,Goldberg J,Falcone T,et al. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial[J]. *Fertil Steril*,2016,105:275-285. e10.
- [14] Insua MF, Cobo AC, Larreategui Z, et al. Obstetric and perinatal outcomes of pregnancies conceived with embryos cultured in a time-lapse monitoring system[J]. *Fertil Steril*, 2017,108:498-504.
- [15] Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss;a meta-analysis[J/OL]. *Reprod Biomed Online*,2017,35:511-520.
- [16] Wu L,Han W, Wang J, et al. Embryo culture using a time-lapse monitoring system improves live birth rates compared with a conventional culture system;a prospective cohort study [J]. *Hum Fertil(Camb)*,2018,21:255-262.

[编辑:张蔚]