

· 妇幼保健 ·

非优质胚胎囊胚激光辅助孵化对新生儿出生体重的影响

李施施¹, 朱忠林², 舒崇医¹, 徐维海³

1. 浙江省人民医院生殖内分泌科, 浙江 杭州 310014; 2. 安徽理工大学, 安徽 淮南 232001;

3. 浙江大学医学院附属第一医院生殖医学中心, 浙江 杭州 310003

摘要: **目的** 探讨非优质胚胎进行囊胚培养时应用激光辅助孵化(LAH)技术对子代围产期结局的影响, 为提升非优质胚胎利用效率、改善胚胎发育质量提供依据。**方法** 选择在浙江省人民医院接受体外受精/单精子卵胞浆内注射后移植解冻囊胚获得单活胎出生的子代369例为研究对象, 根据囊胚培养第4天是否实施LAH分为常规组(51例)和LAH组(318例), 收集胎龄、出生体重、出生缺陷及母亲围产期相关资料; 两组采用倾向得分匹配后, 分析早产、出生体重和出生缺陷情况。**结果** 匹配后, 常规组和LAH组各49例, 母亲年龄、体质指数、不孕类型和囊胚龄等基本资料差异均无统计学意义($P>0.05$), 匹配有效。LAH组子代出生体重为($3\ 261.08\pm 432.24$)g, 低于常规组的($3\ 464.18\pm 444.46$)g($P<0.05$)。**结论** 非优质胚胎进行囊胚培养时应用LAH可能降低子代的出生体重。

关键词: 不孕症; 囊胚; 激光辅助孵化; 出生体重; 巨大儿

中图分类号: R714.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087(2024)02-0169-04

Effect of laser-assisted hatching on birth weight in blastocyst culture of low-grade cleavage embryos

LI Shishi¹, ZHU Zhonglin², SHU Chongyi¹, XU Weihai³

1. Department of Reproductive Endocrinology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China;

2. Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui 232001, China; 3. Reproductive Medicine Center,

The First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310003, China

Abstract: Objective To examine the impact of laser-assisted hatching (LAH) technique on perinatal outcomes in blastocyst culture of low-grade cleavage embryos, so as to provide insights into improving the utilization of low-grade cleavage embryos and embryo quality. **Methods** A total of 369 single live births after transfer of thawed blastocysts following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection at Zhejiang Provincial People's Hospital were selected as subjects, and they were divided into 51 conventional culture blastocysts and 318 LAH blastocysts based on whether LAH was performed on day 4 of blastocyst culture. Gestational age, birth weight, birth defects and maternal perinatal information were collected, and the prevalence of premature birth, birth weight and birth defects were analyzed after propensity score matching (PSM). **Results** After PSM, 98 matched cases were included in the study. There were no statistically significant differences in maternal age, body mass index, type of infertility and blastocyst age ($P>0.05$), indicating effective matching. The birth weight of offspring in the LAH group was lower than that in the conventional culture group [$3\ 261.08\pm 432.24$] g vs. [$3\ 464.18\pm 444.46$] g; $P<0.05$]. **Conclusion** The birth weight of offspring can be reduced by using LAH during blastocyst culture of low-grade cleavage embryos.

Keywords: infertility; blastocyst; laser-assisted hatching; birth weight; macrosomia

移植第3天的优质胚胎是体外受精(in vitro fertilization, IVF)和单精子卵胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术获得较高妊娠率

的关键因素之一, 但也会产生大量的非优质胚胎。非优质胚胎发育潜力较差, 移植后妊娠率不高, 因此临床上通常将非优质胚胎培养筛选出囊胚后择机进行囊胚移植, 以提高移植周期的妊娠率, 但非优质胚胎囊胚形成率较低^[1]。有研究显示, 囊胚培养第4天进行激光辅助孵化(laser assisted hatching, LAH)干预可提高非优质胚胎的囊胚形成率, 且不影响囊胚移植

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.02.020

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LGF21H040008)

作者简介: 李施施, 博士, 副主任技师, 主要从事辅助生殖实验工作

通信作者: 徐维海, E-mail: 1523069@zju.edu.cn

妊娠率^[2], 但该技术也存在潜在风险, 例如胚胎承受激光热效应, 透明带开孔使胚胎内部细胞过早暴露于培养液中, 所形成囊胚的孵出时机和孵出机制均与自然孵出存在明显差异等, 由此导致的子代安全性问题值得研究探讨^[3-5]。本研究收集 369 例移植冷冻囊胚后出生的单活胎子代的围产期随访资料, 评估非优质胚胎在囊胚培养时应用 LAH 技术对子代围产期结局的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2016 年 3 月—2021 年 11 月在浙江省人民医院接受 IVF/ICSI 后移植解冻囊胚获得单活胎出生的子代 369 例为研究对象, 其中移植囊胚均来自非优质胚胎培养后形成。排除父母任何一方存在染色体数目和结构异常、接受供精或供卵及采用补救 ICSI 受精者。研究对象分为 2 组, 实施常规囊胚培养为常规组, 51 例; 培养第 4 天胚胎实施 LAH 为 LAH 组, 318 例。本研究通过浙江省人民医院生殖伦理委员会审查 (SZ2017011)。

1.2 方法

1.2.1 囊胚培养和移植

控制性促排卵方案、体外受精、胚胎/囊胚培养和 LAH 操作参照既往报道^[2, 6], LAH 组在第 4 天胚胎的透明带上利用激光孵化形成一个 10 μm 的小孔。胚胎和囊胚分别根据欧洲人类生殖与胚胎学协会评分标准^[7]和囊胚评分标准^[8]进行分级, 所形成的囊胚进行玻璃化冷冻保存。根据母亲月经周期的规律性、排卵情况及卵泡与内膜发育的同步性, 选择自然周期、激素替代方案或诱导排卵方案^[9]准备冻融囊胚移植子宫内膜, 并在排卵或内膜转化后的第 5 天进行囊胚移植, 每次移植 1~2 个囊胚, 移植 9 d 后检测血清人绒毛膜促性腺激素 ($\beta\text{-hCG}$) 确定生化妊娠, 4 周后行 B 超检查明确临床妊娠结果。

1.2.2 出生结局和围产期资料随访调查

由经过培训的专科护士在预产期后 1 个月通过电话随访收集子代胎龄、出生体重、出生缺陷及母亲围产期相关资料。胎龄 < 37 周为早产; 新生儿出生体重 2 500~4 000 g 为正常, >4 000 g 为巨大儿, < 2 500 g 为低体重儿, 巨大儿和低体重儿定义为出生体重异常。

1.2.3 LAH 对子代围产期结局的影响评价

为减少混杂因素的影响, 采用倾向得分匹配法 (propensity score matching, PSM) 对两组研究对象进行配对。以是否实施 LAH 为因变量, 以母亲年龄、体质指数 (BMI)、不孕原因、不孕类型、不孕年限、受精方式、获卵数、内膜准备方案、子宫内膜厚度、移植囊胚数、移植优质囊胚数和囊胚龄为自变量, 建立 logistic 回归模型计算倾向得分; 采用最邻近匹配法, 在 0.02 的卡钳范围内, 按 1:1 比例进行抽样匹配; 匹配后检验两组控制变量间是否存在差异以评价匹配效果。完成匹配后, 比较两组早产、巨大儿、低体重儿和出生缺陷等结局的发生情况, 以评价 LAH 对围产期结局的影响。

1.3 统计分析

采用 Stata 17.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布的采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 组间比较采用 t 检验和配对 t 检验; 定性资料采用相对数描述, 组间比较采用 χ^2 检验和配对 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常规组和 LAH 组基本资料比较

PSM 前, 常规组和 LAH 组母亲年龄和囊胚龄差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组完成匹配 49 例, 匹配后两组母亲年龄、母亲 BMI、不孕类型和囊胚龄等基本资料比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 匹配有效。见表 1。

表 1 匹配前后两组基本资料比较

Table 1 Comparison of basic characteristics between the two groups before and after propensity score matching

项目	PSM 前				PSM 后			
	常规组 (n=51)	LAH 组 (n=318)	χ^2/t 值	P 值	常规组 (n=49)	LAH 组 (n=49)	χ^2/t 值	P 值
母亲年龄/岁 ^①	32.92 \pm 4.60	31.37 \pm 3.95	2.547	0.011	32.84 \pm 4.45	33.04 \pm 4.16	0.235	0.815
母亲 BMI/ (kg/m ²) ^①	21.40 \pm 2.31	21.73 \pm 2.89	0.768	0.443	21.35 \pm 2.20	21.25 \pm 3.38	0.159	0.874
不孕原因			4.682	0.197			1.067	0.785
女方因素	26 (50.98)	112 (35.22)			25 (51.02)	25 (51.02)		
男方因素	6 (11.76)	52 (16.35)			6 (12.24)	4 (8.16)		
双方因素	17 (33.33)	137 (43.08)			16 (32.65)	16 (32.65)		
不明原因	2 (3.92)	17 (5.35)			2 (4.08)	4 (8.16)		

表 1 (续) Table 1 (continued)

项目	PSM前				PSM后			
	常规组 (n=51)	LAH组 (n=318)	χ^2/t 值	P值	常规组 (n=49)	LAH组 (n=49)	χ^2/t 值	P值
不孕类型			1.300	0.288			0.367	0.544
原发不孕	26 (50.98)	135 (42.45)			26 (53.06)	23 (46.94)		
继发不孕	25 (49.02)	183 (57.55)			23 (46.94)	26 (53.06)		
不孕年限/年 ^①	3.27±2.14	2.68±2.14	1.817	0.070	3.38±2.11	2.93±2.18	1.025	0.308
受精方式			0.047	0.870			<0.001	>0.999
IVF	35 (68.63)	223 (70.13)			33 (67.35)	33 (67.35)		
ICSI	16 (31.37)	95 (29.87)			16 (32.65)	16 (32.65)		
获卵数/个 ^①	10.82±6.24	12.55±6.94	1.675	0.095	11.04±6.27	13.71±8.55	1.765	0.081
内膜准备方案			1.872	0.392			0.347	0.841
自然周期	10 (19.61)	62 (19.50)			10 (20.41)	10 (20.41)		
激素替代方案	40 (78.43)	234 (73.58)			38 (77.55)	37 (75.51)		
诱导排卵方案	1 (1.96)	22 (6.92)			1 (2.04)	2 (4.08)		
子宫内膜厚度/mm ^①	10.25±1.97	10.02±2.21	0.703	0.482	10.40±1.86	10.03±2.62	0.805	0.423
移植囊胚数/个 ^①	1.35±0.48	1.33±0.48	0.271	0.786	1.33±0.47	1.33±0.47	<0.001	>0.999
移植优质囊胚数/个 ^①	1.00±0.63	1.06±0.48	0.829	0.407	1.00±0.61	0.98±0.43	0.191	0.849
囊胚龄			8.138	0.010			1.089	0.297
第5天	40 (78.43)	291 (91.51)			47 (95.92)	42 (85.71)		
第6天	11 (21.57)	27 (8.04)			2 (4.08)	7 (14.29)		

注：^①表示采用 $\bar{x}\pm s$ 描述，统计量为t值；其他项采用n (%)描述，统计量为 χ^2 值。

2.2 常规组和 LAH 组围产期结局比较

PSM 前后，LAH 组新生儿出生体重低于常规组 ($P<0.05$)；两组胎龄、早产发生率、低体重儿发生率

和巨大儿发生率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 匹配前后两组子代围产期结局比较

Table 2 Comparison of perinatal outcomes between the two groups before and after propensity score matching

项目	PSM前				PSM后			
	常规组 (n=51)	LAH组 (n=318)	χ^2/t 值	P值	常规组 (n=49)	LAH组 (n=49)	χ^2/t 值	P值
胎龄/周 ^①	38.71±1.09	38.47±1.81	0.941	0.347	38.74±1.09	38.49±1.30	1.008	0.316
出生体重/g ^①	3 452.84±439.19	3 262.19±557.43	2.328	0.020	3 464.18±444.46	3 261.08±432.24	2.293	0.024
早产	2 (3.92)	38 (11.95)	2.931	0.087	2 (4.08)	7 (14.29)	3.059	0.080
低体重儿	0	20 (6.29)	3.391	0.066	0	2 (4.08)	0.510	0.475
巨大儿	6 (11.76)	21 (6.60)	1.726	0.189	6 (12.24)	1 (2.04)	2.463	0.117
出生缺陷	0	1	—	—	0	0	—	—

注：^①表示采用 $\bar{x}\pm s$ 描述，统计量为t值；其他项采用n (%)描述，统计量为 χ^2 值。

3 讨论

本研究结果提示，在非优质胚胎进行囊胚培养第 4 天实施 LAH 技术，可能降低囊胚移植后子代的出生体重，且不增加异常出生体重儿风险。

移植非优质胚胎后出生子代的安全性问题长期受到关注，其中之一是子代出生体重的增加。LI 等^[10] 研究显示来自较差质量胚胎的子代出生体重为 (3 415.8±562.0) g，高于优质胚胎的 (3 202.7±

639.9) g；CAI 等^[11] 也发现与移植优质胚胎相比，移植非优质胚胎所形成囊胚的子代出生体重增加了 168.8 g。胚胎质量下降造成子代出生体重增加的机制尚未阐明，目前认为可能与胚胎内有害物质导致囊胚内细胞团过度发育及内细胞团/滋养细胞层发育不平衡有关^[12-13]。子代出生体重增加导致代谢性疾病发生风险增高，尤其是巨大儿容易造成儿童期肥胖、葡萄糖耐受不良及代谢综合征的发生风险升高^[14-15]，需要采取相应措施进行干预。

本研究显示, 实施 LAH 后形成囊胚的子代出生体重低于未实施 LAH 者, 平均降低了 203 g, 提示 LAH 可改善非优质胚胎子代的出生体重。进一步比较子代异常出生体重的比例变化, 发现常规组巨大儿发生率为 12.24%, LAH 组为 2.04%, 但由于样本量较少, 两组巨大儿发生率差异无统计学意义。应用 LAH 切开透明带更有利于胚胎内有害物质向外扩散从而缓解胚胎内部不良环境对囊胚发育的影响^[16], 并且囊胚在未经扩张即通过开口提前孵出, 缩短了内细胞团/滋养细胞层在透明带不良环境中的暴露时间^[15]。现有数据未提示激光热效应、胚胎内部细胞过早暴露于培养液及囊胚过早孵出存在风险。

参考文献

- [1] SALLEM A, SANTULLI P, BARRAUD-LANGE V, et al. Extended culture of poor-quality supernumerary embryos improves ART outcomes [J]. *J Assist Reprod Gen*, 2017, 35 (2): 311-319.
- [2] XU W H, ZHANG L, ZHANG L, et al. Laser-assisted hatching in lower grade cleavage stage embryos improves blastocyst formation: results from a retrospective study [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14 (1): 1-9.
- [3] HONGUNTIKAR S D, UPPANGALA S, SALIAN S R, et al. Laser-assisted hatching of cleavage-stage embryos impairs developmental potential and increases DNA damage in blastocysts [J]. *Lasers Med Sci*, 2015, 30 (1): 95-101.
- [4] SHAFEI R A, SYRKASHEVA A G, ROMANOV A Y, et al. Blastocyst hatching in humans [J]. *Russ J Dev Biol*, 2017, 48 (1): 5-15.
- [5] 周易尔, 徐维海, 李施施, 等. 激光辅助孵化对冻融胚胎移植子代发育的影响 [J]. *预防医学*, 2020, 32 (12): 1236-1238.
- [6] JI M X, JIN B H, GUO X Y, et al. It is not worth postponing frozen embryo transfers after oocyte pickup: a retrospective cohort study based on propensity score matching [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1-10.
- [7] Balaban B, Brison D, Calderon G, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26 (6): 1270-1283.
- [8] Gardner D K, 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.
- [9] YANG J D, WEN Y X, LI D P, et al. Retrospective analysis of the endometrial preparation protocols for frozen-thawed embryo transfer cycles in women with endometriosis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2023, 21 (1): 1-9.
- [10] LI M, SINGH B, BAKER V L. Association between embryo morphological quality and birth weight for singletons conceived via autologous fresh embryo transfer: an analysis using Society for Assisted Reproductive Technology Clinical Outcomes Reporting System [J]. *Fertil Steril*, 2022, 118 (4): 715-723.
- [11] CAI J L, LIU L L, CHEN J H, et al. Day-3-embryo fragmentation is associated with singleton birth weight following fresh single blastocyst transfer: a retrospective study [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1-11.
- [12] LEESE H J, DONNAY I, THOMPSON J G. Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13 (4): 184-202.
- [13] HARDY K, STARK J, WINSTON R M. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68 (4): 1165-1169.
- [14] SPARANO S, AHRENS W, DE HENAUW S, et al. Being macrosomic at birth is an independent predictor of overweight in children: results from the IDEFICS Study [J]. *Matern Child Health J*, 2013, 17 (8): 1373-1381.
- [15] GU S Y, AN X F, FANG L, et al. Risk factors and long-term health consequences of macrosomia: a prospective study in Jiangsu Province, China [J]. *J Biomed Res*, 2012, 26 (4): 235-240.
- [16] CHI H J, KOO J J, CHOI S Y, et al. Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96 (1): 187-192.

收稿日期: 2023-09-25 修回日期: 2023-12-22 本文编辑: 徐文璐

(上接第 161 页)

- [7] 何诗琪, 贺勇, 纪天鹏, 等. 2019—2021 年荆州市食源性疾病主动监测结果分析 [J]. *应用预防医学*, 2023, 29 (2): 122-125.
- [8] 张海波, 王波, 黄飞飞, 等. 2018—2021 年苏州市食源性疾病主动监测结果 [J]. *江苏预防医学*, 2023, 34 (3): 331-333.
- [9] 何其栋. 2016—2021 年安阳市食源性疾病主动监测流行病学特征 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2023, 34 (4): 97-100.
- [10] 王庆国, 田甜, 王雯雷, 等. 2018—2021 年新疆食源性疾病监测分析 [J]. *疾病预防控制通报*, 2023, 38 (3): 31-35.
- [11] 王黎荔, 林丹, 高四海, 等. 温州市食源性疾病流行特征分析 [J]. *预防医学*, 2021, 33 (3): 306-308.
- [12] 方子悦, 刁文丽, 王凯琳, 等. 2018—2021 年辽宁省哨点医院食源性疾病诺如病毒感染监测分析 [J]. *现代疾病预防控制*, 2023, 34 (6): 404-407.
- [13] 荣晓凤, 马瑞杰, 蒋清莉, 等. 阿克苏地区食源性疾病诺如病毒感染监测分析 [J]. *疾病预防控制通报*, 2021, 36 (2): 64-66.
- [14] 郑美惠, 赖天兵, 贾华云, 等. 湖南省 2017—2021 年食源性疾病主动监测病原学及流行特征分析 [J]. *现代预防医学*, 2023, 50 (7): 1327-1332.
- [15] 马红朋, 姜亚伟, 侯粉粉, 等. 禹州市食源性疾病病例监测结果分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33 (11): 1391-1394.
- [16] 韩东方, 俞丹丹, 李晨晨, 等. 2014—2020 年金山区食源性疾病监测结果 [J]. *预防医学*, 2022, 34 (1): 91-94.

收稿日期: 2023-10-17 修回日期: 2024-01-14 本文编辑: 徐亚慧