

## 不明原因不孕妇女卵子受精方式的选择及结局分析

黄洁,丁卫,严正杰,王焯,冒韵东\*,刘嘉茵

(南京医科大学第一附属医院生殖医学中心,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:了解 3 周期以上宫腔内人工授精(IUI)失败的不明原因,探讨不孕夫妇采取何种卵子受精方式更为安全有效。方法:回顾性分析本中心 5 年间 3 周期以上 IUI 失败的不明原因不孕共 321 例。根据不孕夫妇对于卵子受精方式的选择,将其分为 3 组:体外受精(IVF)(备 Rescue-ICSI)组(213 例)、一半行卵细胞胞浆内单精子注射(Half-ICSI)组(69 例)、卵细胞胞浆内单精子注射(ICSI)组(39 例)。结果:3 组中年龄、基础促卵泡激素(FSH)、促性腺激素(Gn)天数、Gn 用量无统计学差异。IVF 组妇女不孕年限与其他两组相比有差异,Half-ICSI 组妇女窦卵泡计数和获卵数较其他两组多,ICSI 组最少。IVF 完全不受精发生率为 18.8% (53/282)。3 组总受精率、卵裂率无统计学差异,3 组临床妊娠率、种植率和活产率相似,但 3 组的优质胚胎率、流产率有统计学差异。其中 IVF(备 Rescue-ICSI)组优质胚胎率高于 ICSI 组,而流产率较 Half-ICSI 组低( $P < 0.05$ )。结论:对于不明原因不孕妇女卵子受精方式的选择,与 Half-ICSI 和 ICSI 相比,IVF 后短时受精联合补救 ICSI 是一个相对更安全、经济、有效的受精方式。

**[关键词]** 不明原因不孕;短时受精;补救;卵子胞浆内单精子注射

**[中图分类号]** R711.6

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-687-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150518

不明原因不孕在不孕症的不孕病因中是一个常见病因诊断,发生率占 15%~37%,文献报道发生率的不同与年龄和选择的诊断标准有关<sup>[1]</sup>。当不孕症夫妇所有不孕症的基础检查包括正确精液分析、规则排卵记录、子宫输卵管检查未发现异常,不孕原因又无法解释的时候,即诊断为不明原因的不孕症,这是一种排除性诊断。由于病因不明,针对这类患者常采用经验治疗:期待治疗、促排卵治疗、宫腔内人工授精(IUI)、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)<sup>[2]</sup>。研究报道 3 周期 IUI 失败的不明原因不孕夫妇行常规 IVF 存在低受精率,而完全受精失败风险高达 20%<sup>[3]</sup>。直接行卵细胞胞浆内单精子注射(ICSI)可以获得较高受精率,避免完全受精失败;但 ICSI 作为一项侵入性操作,同时增加了不孕症夫妇的治疗费用。本文通过总结本院生殖中心 5 年的回顾性资料,提出对于 IUI 失败后的不明原因不孕症夫妇如何选择—一个相对更安全、有效的受精方式,既降低受精失败、无可移植胚胎的风险,又不影响治疗的成功率,且不增加额外的治疗费用。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

回顾性分析本科 2007 年 2 月~2012 年 1 月期间不明原因不孕夫妇接受辅助生育治疗共 321 例。不明原因不孕诊断包括:女性内分泌激素指标正常、月经周期规则 21~35 d、B 超监测示自然周期有排卵,子宫输卵管碘油造影或腹腔镜检查证实双侧输卵管通畅,精液分析结果各项指标符合 WHO 正常精液标准,盆腔检查或腹腔镜检查基本排除子宫内膜异位症。入选标准:女性原发性不孕、年龄 $\leq 39$  岁、3 次以上 IUI 失败、以往无 IVF/ICSI 治疗、无明显影响胚胎种植的宫腔形态异常、无染色体异常需行胚胎植入前遗传学诊断治疗。由临床医师告知可采取的卵子受精方式,在不孕夫妇充分知情同意的情况下,取卵日根据获卵数由不孕夫妇决定最终卵子受精方式。根据最终选择分为 3 组:IVF(备短时受精+补救 ICSI,简称备 Rescue-ICSI)组、Half-ICSI 组、ICSI 组。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 超促排卵方案(短效长方案或短方案)

长方案即黄体中期开始促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a,达必佳,辉凌公司,德国)0.1 mg 皮下注射连用 3 d 后改 0.05 mg 或 0.05 mg 皮下注

**[基金项目]** 江苏省卫生厅科教兴卫工程项目(ZX201110);江苏省高校优势学科(PAPD)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: drmaoyd@aliyun.com

射至月经第3 d, E2<200 pmol/L时给予促性腺激素(Gn);短方案即月经第3天起同时给予短效GnRH-a 0.1 mg和Gn。Gn药物果纳芬(Gonal F, 默克-雪兰诺公司, 瑞士)起始剂量112.5~225.0 IU或普丽康(Puregon, 默沙东-欧加农公司, 荷兰)起始剂量150~200IU肌肉注射, 刺激5 d后阴道B超检查, 之后根据卵泡生长情况调整Gn剂量。至少2个卵泡直径达18 mm时, 给予艾泽0.25 mg(rh-HCG, 默克-雪兰诺公司, 瑞士)注射。拮抗剂方案参见文献<sup>[4]</sup>。

### 1.2.2 取卵、精子处理、卵母细胞受精、胚胎培养

hCG注射后35~36 h阴道B超引导下17 G或18 G取卵针(Cook公司, 澳大利亚)穿刺取卵。精液处理采用密度梯度离心法+上游法处理, 最终加入受精液中的精子密度为(5~10)×10<sup>5</sup>个/ml。卵母细胞受精:①IVF(备Rescue-ICSI)组:取卵后卵母细胞在胚胎培养液中培养2~3 h加精, 精卵孵育6 h后去除卵周颗粒细胞, 观察第2极体是否排出, 所有卵母细胞均无第2极体排出, 判断为完全不受精, 排出第2极体卵母细胞数与成熟卵母细胞数相比低于20%判断为低受精率, 对MⅡ期卵行补救ICSI受精;②Half-ICSI组:取卵后将获得的卵母细胞随机选择一半行IVF, 一半行ICSI, 行IVF后不再备Rescue-ICSI, 加精后精卵孵育16~18 h后去除卵周颗粒细胞, 检查原核以确认受精, 排除形态异常卵子和不成熟卵(GV卵、MI卵);③ICSI组:取卵后2~3 h, 去除卵母细胞周围颗粒细胞, 对MⅡ期卵母细胞行ICSI, 16~18 h后观察原核, 评价受精情况。胚胎培养:16~18 h观察原核, 42 h观察卵裂, 72 h后观察胚胎形态进行评分。本中心优质胚胎的评定标准参见文献<sup>[5]</sup>。

### 1.2.3 胚胎移植及黄体支持

取卵后3 d行胚胎移植, 所有胚胎移植操作均在腹部超声引导下进行。黄体支持根据本中心常规

黄体支持方案进行<sup>[4]</sup>。

### 1.2.4 结局判断

临床妊娠为妊娠6~7周B超见妊娠囊和卵黄囊, 继续妊娠为妊娠10~12周B超见胚芽和胎心, 活产为分娩活婴(双胎按1个计算)。

### 1.3 统计学方法

数据检索来自辅助生殖管理数据库系统10.0版本, 采用SPSS18.0软件进行统计分析。服从正态分布的资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用方差分析与SNK-*q*检验。不服从正态分布的资料用中位数表示, 进行非参数Kruskal-wallis检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不明原因不孕妇女的一般情况

321例妇女均为原发性不孕, 第1次行IVF/ICSI治疗, 平均年龄为(30.3 ± 3.3)岁(23~39岁), 平均不孕年限为(5.4 ± 2.9)年(1~20年)。根据不同的卵子受精方式分为3组:IVF(备Rescue-ICSI)组(213例)、Half-ICSI组(69例)、ICSI组(39例)。3组中年龄、基础FSH、Gn天数、Gn用量无统计学差异。IVF组妇女不孕年限与其他两组相比有差异, 较Half-ICSI组不孕年限长, 较ICSI组不孕年限短;窦卵泡计数和获卵数3组比较有统计学差异, Half-ICSI组为最多, IVF组次之, ICSI组最少;ICSI组移植胚胎数多于IVF组, 少于Half-ICSI组, 两两相比有显著性差别( $P < 0.05$ , 表1)。

### 2.2 不明原因不孕妇女的各项临床结果分析

统计IVF(备Rescue-ICSI)组和Half-ICSI组两组IVF完全不受精发生率为18.8%(53/282)。IVF(备Rescue-ICSI)组213例妇女取卵后, 因卵子完全不受精(35例)和低受精者(7例)行短时受精补救ICSI共42例(19.7%), 其中IVF正常受精数为1122枚, 补救ICSI的正常受精数为232枚, Res-

表1 不明原因不孕妇女的一般情况

	IVF(备Rescue-ICSI)组	Half-ICSI组	ICSI组	检验统计量	P值
例数( <i>n</i> )	213	69	39		
年龄(岁)	30.3 ± 3.5	29.7 ± 2.5	31.0 ± 3.4	1.851	0.159
基础FSH(IU/ml)	7.7 ± 2.4	7.3 ± 1.8	7.9 ± 1.6	1.263	0.284
Gn用量(IU)	1 771.9 ± 605.5	1 736.6 ± 466.4	1 958.9 ± 725.5	1.945	0.145
不孕年限(年)	5*	5	6	8.064	0.018
窦卵泡计数(个)	11	7	5	87.786	0.000
Gn天数(d)	9	9	9	1.282	0.527
获卵总数(枚)	9	14	6	73.926	0.000
移植胚胎数(枚)	2	2	2*	7.569	0.023

与其他两组比较, \* $P < 0.05$ 。

cue-ICSI 正常受精率 74.4%(232/312), 该组总的正常受精率 72.9%; Half-ICSI 组 69 例, IVF 完全不受精共 18 例(26.1%)未行短时受精补救 ICSI, 其 IVF 正常受精率为 60.7%(249/410), ICSI 正常受精率为 82.2%(381/460), 该组总的正常受精率为 72.4%; ICSI

组正常受精率为 77.8%。3 组总受精率、卵裂率无统计学差异, 3 组临床妊娠率、种植率和活产率相似, 但 3 组间比较, 优质胚胎率、流产率有统计学差异其中 IVF(备 Rescue-ICSI)组优质胚胎率高于 ICSI 组, 而流产率较 Half-ICSI 组低( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 3 组不明原因不孕妇女的临床结果分析

	IVF(备 Rescue-ICSI)组	Half-ICSI 组	ICSI 组	卡方	DF	P 值
IVF 完全不受精(例)	35	18				
总正常受精率(%)	72.9(1354/1858)	72.4(630/870)	77.8(179/230)	2.87	2	0.238
卵裂率(%)	96.9(1312/1354)	95.6(602/630)	97.2(174/179)	2.58	2	0.275
优质胚胎率(%)	57.2(774/1354)	56.8(342/630)	47.1(82/179)*	8.684	2	0.013
临床妊娠率(%)	45.5(97/213)	44.9(31/69)	33.3(13/39)	2.03	2	0.362
种植率(%)	28.0(112/400)	28.1(39/139)	18.7(14/75)	2.928	2	0.232
流产率(%)	2.1(2/97)	19.2(5/31)*	15.4(2/13)	9.027	2	0.010
活产率(%)	42.3(90/213)	36.2(25/69)	28.2(11/39)	3.065	2	0.216

与 IVF 组比较, \* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

根据英国国家卫生与临床优化研究所(NICE) 2012 年不孕最新指南<sup>[6]</sup>提出:有正常性生活未避孕的不明原因不孕患者建议观察 2 年, 如果观察 2 年以上仍不孕的建议行 IVF。在临床工作中, 由于不孕夫妇对怀孕的迫切要求, 完全期待治疗常无法实施, 因而对于不明原因不孕夫妇常采取促排卵治疗和或促排卵+IUI 治疗, 3 次 IUI 失败后行 IVF 治疗。针对不明原因不孕有 IVF 的受精失败风险和 ICSI 潜在的出生缺陷及不确定性, 本中心以往决定 IVF 治疗方案时采用:在不孕夫妇充分理解和知情同意的情况下, 其有权利选择常规 IVF 或 ICSI 方案治疗; 而有条件的夫妇(获卵数大于等于 10 枚), 可以将卵母细胞平均分组, 分别采用 IVF 和 ICSI 处理(Half-ICSI), 既防止 IVF 完全受精失败而本周期无胚胎的情况, 又可以避免不必要的 ICSI 技术带来的风险<sup>[7]</sup>。然而在实际应用中, Half-ICSI 对于多数不孕夫妇而言则是增加了治疗费用。

IVF 受精失败的原因是多方面的, 精卵成熟, 精子透明带结合, 配子融合等任何过程发生障碍都可导致受精失败。对于受精失败, 多数生殖中心采用补救 ICSI 来挽救受精失败的卵母细胞, 以降低周期取消率。2003 年 Chen<sup>[8]</sup>报道对加精后 6 h 未排出第二极体的卵母细胞行补救 ICSI, 获得较高妊娠率。本中心采用短时受精联合补救 ICSI 的方法, 正常受精率 70.8%, 临床妊娠率为 21.4%<sup>[5]</sup>。

本文回顾性分析了 5 年间 3 次 IUI 失败的不明原因不孕夫妇行 IVF 治疗的资料, 常规 IVF 完全

受精失败的发生率为 18.8%, 与文献报道相似。由于卵子受精方式由不孕夫妇知情后自行选择结合取卵日获卵数综合决定, 3 组的例数分布不均匀, IVF(备 Rescue-ICSI)组例数最多, ICSI 组最少。3 组中年龄、基础 FSH、Gn 天数、Gn 用量等一般情况无统计学差异。ICSI 组妇女因为不孕年限长, 获卵数少可能影响到其最终卵子受精方式的选择。Half-ICSI 组卵泡计数较其他两组多, 其获卵数在 3 组中为最多, 因而不孕夫妇能够选择 Half-ICSI 这种卵子受精方式。平均移植胚胎数在 Half-ICSI 组较 ICSI 组增加可能也与获卵数多, 可移植胚胎数增多有关。IVF(备 Rescue-ICSI)组流产率较 Half-ICSI 组低, 这还需要进一步的随机研究及更大样本研究证实。本文研究显示 ICSI 组正常受精率并未高于 IVF(备 Rescue-ICSI)组和 Half-ICSI 组的总正常受精率, 3 组临床妊娠率、种植率和活产率相似, 而 ICSI 组的优质胚胎率有下降, 这可能与获卵数较少有关, 但也反映 ICSI 受精方式并未改善临床结局; Half-ICSI 的临床结局与 IVF 相似, 考虑到其增加了患者不孕治疗费用且需要较多的卵子数目, 因而并不建议作为常规选择。

综上所述, 对于 3 次 IUI 失败后的不明原因不孕症夫妇, 直接选择 ICSI 受精, 并不能改善临床结局; 选择 Half-ICSI 受精, 可以防止 IVF 完全受精失败而本周期取消的情况, 但增加不孕夫妇经济负担; IVF 后短时受精联合补救 ICSI 作为一个相对更安全、经济、有效的受精方式, 既降低受精失败、无可移植胚胎的风险和不必要的 ICSI 技术带来的风险, 又不影响治疗的成功率, 同时也可以发现下一

周期最好的受精方式。

[参考文献]

[1] Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, et al. Diagnosis and management of unexplained infertility: an update[J]. Archives Gynecology Obstetrics, 2003, 267(4): 177-188

[2] Brandes M, Hamilton CJCM, van der Steen JOM, et al. Unexplained infertility: overall ongoing pregnancy rate and mode of conception[J]. Human Reproduction, 2011, 26(2): 360-368

[3] Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, et al. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of unexplained infertility should be limited to a maximum of three trials[J]. Fertility Sterility, 2001, 75(1): 88-91

[4] 黄洁, 丁卫, 王婍, 等. 拮抗剂与激动剂长方案

促排冻胚移植妊娠结局分析[J]. 生殖医学杂志, 2012, 21(1): 21-24

[5] 严正杰, 蔡令波, 冯婷, 等. 对体外受精失败后不同授精时间进行补救 ICSI 的结局比较[J]. 生殖与避孕, 2009, (5): 329-332

[6] National Institute for Health and Clinical Excellence. Fertility: Assessment and treatment for people with fertility problems(update)[S]. 2012

[7] 丁卫, 刘嘉茵, 钱云, 等. 不明原因原发性不孕者宫腔内人工授精失败后治疗方案的选择[J]. 中华男科学, 2004, 10(10): 737-742

[8] Chen C, Kattera S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6h post-insemination in conventional IVF [J]. Human Reproduction, 2003, 18(4): 2118-2121

[收稿日期] 2014-12-13

(上接第 665 页)

chemistry (Mosc), 2013, 78(4): 355-367

[6] Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis [J]. FEBS Lett, 2010, 584(7): 1427-1435

[7] Jassem E, Jassem J. Mutation of gene p53 in lung cancer [J]. Pneumonol Alergol Pol, 1996, 64(1-2): 5-10

[8] Gorzalczany Y, Gilad Y, Amihai D, et al. Combining an EGFR directed tyrosine kinase inhibitor with autophagy-inducing drugs: a beneficial strategy to combat non-small cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2011, 310(2): 207-215

[9] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing[J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720-5728

[10] He C, Levine B. The Beclin 1 interactome[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 140-149

[11] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2010, 90(4): 1383-1435

[12] Wang RC, Wei Y, An Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J]. Science, 2012, 338(6109): 956-959

[13] Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy[J]. Cell Signal, 2006, 18(12): 2089-2097

[14] Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(6): 1075-1083

[15] Han W, Pan H, Chen Y, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e18691

[16] Amaravadi RK, Lippincott SJ, Yin XM, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(4): 654-666

[收稿日期] 2014-12-19