

激光辅助孵化对冻融双胚胎移植后胚胎存活及双胎子代发育的影响

金 珍 徐维海 吴香丽 张 岭 夏 美 李施施 张 琳 吴丽梅 舒 静[▲]

浙江省人民医院生殖内分泌科,浙江杭州 310014

[摘要] 目的 通过分析来自激光辅助孵化(LAH)的冻融 D3 卵裂期双胚胎移植后胚胎存活情况、双胎新生儿发育及周岁婴幼儿发育情况,评估 LAH 技术对胚胎存活及新生儿与婴幼儿发育的影响。方法 选取 2017 年 1 月至 2019 年 12 月浙江省人民医院收治的 843 例双胚胎移植不孕症患者,根据移植前是否需激光辅助孵化(LAH)分为 LAH 组 381 例和非 LAH 组 462 例。LAH 组移植前采用 LAH 处理,非 LAH 组移植前无 LAH 处理步骤。比较两组妊娠结局,并选择双胚胎存活的 156 例患者(其中 LAH 组 65 例,非 LAH 组 91 例)双胎出生后的生长发育指标,包括出生孕龄、体重、畸形情况及周岁时身高、体重等,分析 LAH 对胚胎及婴幼儿发育的长期影响。结果 LAH 组与非 LAH 组胚胎存活率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);LAH 组与非 LAH 组 A 胎出生体重、B 胎出生体重、先天性畸形的比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);两组双胎婴幼儿 1 周岁时均无身高、体重、认知、出牙、运动能力的异常,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 LAH 的应用对冻融双胚胎移植后的胚胎存活率、双胎子代新生儿发育及 1 周岁婴幼儿发育影响均无明显影响,对于双胎新生儿畸形率的影响尚需更多病例的研究。

[关键词] 子代发育;体外受精;冻融胚胎移植;激光辅助孵化

[中图分类号] R321.3

[文献标识码] B

[文章编号] 1673-9701(2021)23-0096-05

Effects of laser-assisted hatching on embryo survival and twin progeny development after freeze-thaw double embryo transfer

JIN Zhen XU Weihai WU Xiangli ZHANG Ling XIA Mei LI Shishi ZHANG Lin WU Limei SHU Jing

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

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of LAH on embryo survival and neonatal and infant development by analyzing the embryo survival, twin neonatal development and 1-year-old infant development after double embryo transfer at D3 cleavage of freeze-thaw from laser-assisted incubation (LAH). **Methods** A total of 843 infertility patients with double embryo transfer who were admitted to Zhejiang Provincial People's Hospital from January 2017 to December 2019 were selected and divided into the LAH group($n=381$) and the non-LAH group($n=462$) according to the need for laser-assisted incubation (LAH) before transplantation. LAH treatment was used before transplantation in the LAH group, while no LAH treatment was used before transplantation in the non-LAH group. The pregnancy outcomes of the two groups were compared, and 156 patients with twin embryo survival (including 65 patients in the LAH group and 91 patients in the non-LAH group) were selected for the twin progeny growth and development indicators, including the gestational age at birth, weight, malformation, height and weight at the first year of life, etc., to analyze the long-term effects of LAH on the development of embryos and infants. **Results** No significant difference was observed in the embryo survival rate between the LAH group and the non-LAH group($P>0.05$). No significant differences were observed in the birth weight of A, birth weight of B and the proportion of congenital malformation between the LAH group and the non-LAH group ($P>0.05$). No abnormalities were observed in height, weight, cognition, teething and motor ability of twins in the two groups at the age of 1, and the differences were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** The application of LAH has no significant influence on the embryo survival rate, the development of twin babies and the development of infants at the age of 1 after the freeze-thaw double embryo transfer. The influence of LAH on the deformities rate of twin babies is still needed to be studied in more cases.

[Key words] Progeny development; In vitro fertilization; Freeze-thaw embryo transfer; Laser-assisted hatching

[基金项目] 浙江省卫生健康科技计划项目(2021RC001)

▲通讯作者

体外受精-胚胎移植(In vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)是不孕不育患者的主要助孕方法之一。胚胎着床是 IVF-ET 的关键环节,分为囊胚的孵化、定位、黏附和侵入四个环节,囊胚的成功孵化是胚胎植入的重要前提。在辅助生殖治疗过程中,使用促排卵药物、胚胎体外培养及冷冻-复苏过程等均可导致透明带硬化或增厚,引起囊胚孵化失败而不能着床^[1]。对于处于冻融胚胎移植(Frozen thawed embryo transfer, FET)周期的患者,为了囊胚孵化率和胚胎种植率的提升,通常可对早期胚胎行透明带削薄或打孔辅助孵化(Assisted hatching, AH)^[2],操作的方法包括机械法、酶消化法、化学法、激光辅助孵化(Laser-assisted hatching, LAH)等^[3]。20 世纪 90 年代早期,激光打孔和激光薄化等非接触性激光脉冲对胚胎透明带的辅助孵化处理已开始应用。与其他辅助孵化技术相比,激光法可更有效提高孵化率,且安全和方便,是最常用的辅助孵化技术之一^[4]。LAH 常用 1480 nm 的远红外波长,远离核酸的吸收峰 260 nm,避免对 DNA 造成损伤^[5]。然而由于 LAH 采用高能量操作,其安全性是长期备受关注的课题。另外,经 LAH 作用的囊胚孵出与自然状态下的囊胚孵出的机制也有较大的差异^[6],其对于出生后代的影响鲜有报道。目前少数已有的研究认为,LAH 对单胚胎移植的妊娠结局及出生后 1 年内子代发育无明显影响^[7],但对于孕期潜在风险更高的双胚胎移植还未有报道。在试管婴儿助孕过程中,部分医师或患者在胚胎移植过程中为提高妊娠率而选择双胚胎移植,使多胎妊娠率上升,同时也造成新生儿早产、低出生体重等健康风险的增加,而此时 LAH 对于胚胎发育及新生儿的潜在影响可能会更容易显示出来。为探讨 LAH 对于冻融双胚胎移植后胚胎存活率及双胎子代发育的影响,本研究收集 843 例 D3 双胎移植的患者,并对胚胎存活情况及 156 例双胎分娩的子代出生时及出生后 1 年的数据进行统计分析,对 LAH 在辅助生殖治疗中使用的安全性进行详细评估,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2017 年 1 月至 2019 年 12 月在浙江省人民医院生殖医学中心接受 D3 双胚胎移植的 843 例及妊娠结局为双胎分娩的 156 例 FET 周期资料,回顾性分析 LAH 操作对双胚胎移植后胚胎存活及双胎新生儿和后续婴幼儿生长发育的影响。根据是否对移植前的胚胎行辅助孵化操作,将研究对象分为两组,LAH 组 381 例,胚胎复苏后行 LAH 后进行双胚胎移

植;非 LAH 组 462 例,胚胎复苏后未行 LAH,直接行双胚胎移植。另外,妊娠结局为双胎分娩的研究对象共 156 例,也分为两组,LAH 组 65 例,非 LAH 组 91 例。该研究经医院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。纳入标准:①行 IVF-ET 治疗并成功临床妊娠;②胚胎移植数目为 2 个;③有 IVF-ET 治疗的详细信息、妊娠结局及婴儿生长发育情况记录^[8]。排除标准:①胚胎移植数量为 1 个或>2 个;②IVF-ET 治疗的详细信息、妊娠结局记录或婴儿生长发育情况记录不详;③行 IVF-ET 但未能成功临床妊娠^[8]。

1.2 方法

1.2.1 胚胎复苏、LAH 及胚胎移植 胚胎玻璃化冷冻和复苏的操作均在 37℃ 环境下进行,冷冻及复苏操作均按照 Vitrolife 公司的玻璃化冷冻及复苏试剂盒的说明书进行。胚胎复苏后在倒置显微镜下进行 LAH (Octax Laser Shot System, Vitrolife, Germany)操作,该激光参数为:近红外二极管波长 1480 nm,聚焦能量 150 J,激光脉冲长度 2.6 ms。操作部位选择胚胎与透明带间隙最宽处。依次发射激光(激光能量)削薄但不穿透胚胎透明带,削薄区域为透明带全长的 1/4,削薄深度为透明带厚度的 60%~80%。操作完成后将胚胎放置于 37℃、5%O₂、6%CO₂ 及饱和湿度环境中继续培养直至移植。

1.2.2 随访 由专业随访护士以电话问卷调查形式进行。随访项目包括新生儿出生时患者的孕龄、新生儿出生体重及出生缺陷等,生长发育的随访于出生 1 周年后进行,随访后代生长至 1 周岁为止的情况,包括身高及体重数据、出牙数目及出牙时间、运动能力、智力水平的评估。该随访表的 Cronbach's α 系数值为 0.884>0.7,提示该随访的信度较好。问卷回收率为 100%。

1.2.3 新生儿、婴幼儿体格生长发育标准 新生儿出生体重<2500 g 为低体重儿,孕周不足 37 龄为早产。周岁婴幼儿发育情况如身高、体重的评估以《中国 7 岁以下儿童生长发育参照标准》为参照^[9],周岁男童正常身高范围为 68.6~85.0 cm,周岁女童为 67.2~83.4 cm,低于该范围者为身高发育迟缓,高于该范围者为身高偏高;周岁男童正常体重范围为 7.21~12.54 kg;周岁女童为 6.87~11.73 kg,低于该范围者为体重偏轻,高于该范围者为体重偏重。周岁婴幼儿正常乳牙萌出数量 4~6 颗^[10],周岁乳牙未萌出者为乳牙迟萌。运动及心智根据 WHO 0~6 岁儿童体格发育评估参考标准进行评估^[11]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析,符合

正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,不符合正态分布者经过变量转换为正态分布后行统计学分析;计数资料结果以[n(%)]显示,组间比较采用 Pearson χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全部研究对象及妊娠结局为双胎分娩研究对象的临床基础资料比较

本研究共纳入 843 例研究对象,其中 LAH 组 381 例,非 LAH 组 462 例。LAH 组女方年龄(32.13±3.41)岁,与非 LAH 组(31.55±3.11)岁比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组间不孕类型、不孕年限、不孕指征及受精方案比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。另外,本研究妊娠结局为双胎分娩的研究对象共 156 例,其中 LAH 组 65 例,非 LAH 组 91 例。LAH 组女方年龄(31.63±4.19)岁,与非 LAH 组(30.35±3.51)岁比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组间不孕类型、不孕年限、不孕指征及受精方案比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 两组全部研究对象基础资料比较

参数	LAH 组(n=381)	非 LAH 组(n=462)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
女方年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	32.13±3.41	31.55±3.11	1.376	0.169
不孕类型[n(%)]			0.297	0.586
原发性不孕	175(45.93)	225(48.75)		
继发性不孕	206(54.07)	237(51.25)		
不孕年限($\bar{x}\pm s$, 年)	3.04±2.02	2.98±1.86	0.298	0.766
不孕指征[n(%)]			1.113	0.605
女方因素	115(30.18)	149(32.25)		
男方因素	53(13.92)	83(17.97)		
双方因素	179(46.98)	214(46.32)		
不明原因	34(8.92)	16(3.46)		
受精方案[n(%)]			0.158	0.690
IVF	120(31.50)	154(33.33)		
ICSI	261(68.50)	308(66.67)		

表 2 两组妊娠结局为双胎分娩的研究对象基础资料比较

参数	LAH 组(n=65)	非 LAH 组(n=91)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
女方年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	31.63±4.19	30.35±3.51	2.565	0.061
不孕类型[n(%)]			0.751	0.481
原发性不孕	29(44.62)	47(51.65)		
继发性不孕	36(55.38)	44(48.35)		
不孕年限($\bar{x}\pm s$, 年)	2.98±2.15	2.87±2.00	0.410	0.682
不孕指征[n(%)]			1.034	0.543
女方因素	17(26.15)	30(32.97)		
男方因素	11(16.92)	16(17.58)		
双方因素	31(47.69)	41(45.05)		
不明原因	6(9.24)	4(4.40)		
受精方案[n(%)]			0.000	0.860
IVF	20(30.77)	28(30.77)		
ICSI	45(69.23)	63(69.23)		

2.2 两组胚胎存活情况比较

双胚胎移植后妊娠的两组患者共 843 例作为研究对象,统计对比两组移植后妊娠结局。LAH 组与非 LAH 组患者活胎数为 0 个的比例分别为 30.97% 和 28.57%,活胎数为 1 个分别为 51.97% 和 51.73%,活胎数为 2 个的比例分别为 17.06% 和 19.70%,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 两组胚胎存活情况比较[n(%)]

组别	<i>n</i>	0 个活胎	1 个活胎	2 个活胎
LAH 组	381	118(30.97)	198(51.97)	65(17.06)
非 LAH 组	462	132(28.57)	239(51.73)	91(19.70)
χ^2 值			1.192	
<i>P</i> 值			0.551	

2.3 两组双胎新生儿出生时参数比较

双胚胎移植后妊娠结局为双活胎的两组患者共 156 例作为研究对象,统计对比两组间新生儿(共 312 例)出生时的参数。两组患者早产率、A 胎新生儿(共 156 例)出生体重、B 胎新生儿(共 156 例)及总体新生儿(共 312 例)出生体重、低体重儿比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。LAH 组双活胎出生孕龄为(36.55±1.48)周,长于非 LAH 组的(35.89±2.17)周,差异有统计学意义($P<0.05$)。LAH 组共有 2 例新生儿畸形,分属两组患者双胎后代之一,1 例为先天性喉结缺如,1 例为心脏房间隔缺损,畸形率为 1.54%,而非 LAH 组出生 1 例畸形新生儿,为室间隔缺损,畸形率为 0.55%,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),但均低于国内多中心研究报告的出生缺陷发生率(5.6%)。见表 4。

2.4 两组双胎婴幼儿周岁参数比较

双胚胎移植后妊娠结局为双活胎的两组新生儿共 312 例作为研究对象,统计对比两组间双胎婴幼儿周岁时的参数。双胎婴幼儿周岁体重均无异常,LAH 组周岁身高无异常,非 LAH 组有 2 例身高发育迟缓(1.10%)。所有随访者的体重、运动能力、出牙情况、智力评估均未见异常。见表 5。

3 讨论

透明带是包绕在哺乳动物卵子或早期胚胎周围由糖蛋白构成的膜状物质,在精卵识别和早期胚胎发育中起重要的作用。有研究提示,长时间的体外培养及胚胎的冷冻复苏等操作可使得透明带硬化,影响后续囊胚的孵化,造成着床失败,是 FET 周期失败的主要原因之一。

多项研究显示,采用 LAH 对胚胎进行移植前透

表 4 两组双胎新生儿出生时参数比较

参数	LAH 组(n=130)	非 LAH 组(n=182)	t/χ ² 值	P 值
孕龄($\bar{x}\pm s$,周)	36.55±1.48	35.89±2.17	3.193	0.003
早产[n(%)]	44(33.85)	66(36.26)	0.076	0.782
总体出生体重($\bar{x}\pm s$,g)	2633.58±585.70	2533.86±475.71	1.448	0.149
A 胎出生体重($\bar{x}\pm s$,g)	2669.69±642.38	2556.98±468.93	1.552	0.122
B 胎出生体重($\bar{x}\pm s$,g)	2597.46±553.52	2510.74±490.95	1.284	0.200
低体重儿[n(%)]	25(19.23)	40(21.98)	0.347	0.556
畸形[n(%)]	2(1.54)	1(0.55)	0.779	0.377

注:新生儿体重按出生前后分为 A 胎、B 胎新生儿两组分别统计,低体重比例和畸形率则按照全部 312 例新生儿的个体比例统计

表 5 两组患者的双胎婴幼儿周岁发育情况比较[n(%)]

组别	n	身高异常	体重异常	运动能力低下	出牙异常	智力低下
LAH 组	130	0	0	0	0	0
非 LAH 组	182	2(1.10)	0	0	0	0
χ ² 值		1.121				
P 值		0.631				

明带消融,可以提高治疗周期的胚胎着床率和临床妊娠率^[12],目前已经是 FET 周期的常规备选方案。由于 LAH 的热效应存在胚胎损伤的潜在风险,其安全性仍有争议^[9]。本研究曾对 FET 周期中使用 LAH 后单胚胎移植并成功妊娠的患者进行新生儿和 1 岁龄婴幼儿的生长发育状况进行研究,结果显示 LAH 后单胚胎移植后单胎新生儿及 1 岁龄婴幼儿的发育状况良好,与非 LAH 移植的患者并无明显差异,初步表明 LAH 在 FET 中常规使用的安全性。而 LAH 对双胎移植后双胎妊娠并活产婴幼儿的影响还鲜有报道。

有研究显示,在试管婴儿助孕患者双胚胎移植后,其分娩双活胎的比例达到 24.07%,分娩单活胎的比例为 58.98%,无活胎比例则为 16.96%,活胎率明显高于单胚胎移植^[12-14],表明与单胚胎移植相比,双胚胎移植的患者能够顺利生产至少 1 个活产胎儿的概率明显提高。但与此同时,双胚胎移植引起不良妊娠结局的比例也明显高于单胚胎移植^[15-17]。与单胚胎移植 7.64%的早产率相比,双胚胎移植患者分娩新生儿早产的比例增至 17.64%,且显著高于国家卫生健康委妇幼司报告的数据(约 7%)^[8]。同时,双胚胎移植出生婴儿低出生体重的比例也高于国家卫生健康委妇幼司“低出生体重发生率控制在 4%以下”的要求。单胚胎移植患者分娩的新生儿早产率及低出生体重率则与自然受孕者无明显差异^[9]。另外,研究显示,单胚胎移植患者分娩的新生儿出生缺陷发生率分别为 1.57%,而双胚胎移植患者的则为 1.64%,均低于国内多中心研究报告的新生儿出生缺陷发生率(5.6%)^[9]。

可见,双胎妊娠属于高危妊娠,与单胎相比有着更高的早产及低出生体重风险,LAH 对于胚胎发育的潜在影响也更容易显现。然而,为了提高临床妊娠率,改善妊娠结局,双胚胎移植往往是很多医生与患

者的共同选择。既往研究提示,对于双胚胎移植的患者,LAH 组着床率与双胎率相对非 LAH 组有明显提升^[9]。本研究选择 LAH 组和非 LAH 组胚胎移植的患者为研究对象,统计比较两组胚胎存活情况;并选择妊娠结局为双胎活产的患者作为研究对象,统计比较两组间双胎新生儿及 1 岁龄婴幼儿的发育状况。结果显示,LAH 组与非 LAH 组患者活胎数为 0 个的比例分别为 30.97% vs. 28.57%、活胎数为 1 个分别为 51.97% vs. 51.73%、活胎数为 2 个的比例分别为 17.06% vs. 19.70%,差异无统计学意义($P>0.05$)。妊娠结局为双胎活产的患者,LAH 组双胎新生儿出生孕龄长于非 LAH 组,早产率分别为 33.85%、36.26%。LAH 组与非 LAH 组的 A 胎、B 胎及总体新生儿的出生体重分别(2669.69±642.38)g vs. (2556.98±468.93)g、(2597.46±553.52)g vs. (2510.7±490.95)g 及(2633.58±585.70)g vs. (2533.86±475.71)g,与国内报道的活产双胎出生体重(2.50±0.53)kg 基本一致^[18]。本研究结果显示,LAH 组出生的双胎新生儿总体低体重率为 19.23%,非 LAH 组为 21.98%,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),略低于先前研究中双胎新生儿低体重率,分析可能与双胎剖宫产孕龄选择有关^[9]。另外,本研究结果显示,LAH 组与非 LAH 组的双胎新生儿畸形率分别为 1.54%、0.55%,差异无统计学意义($P>0.05$),且均显著低于 2012 年报道的我国出生缺陷率 5.6%^[15],与报道的双胚胎移植新生儿 1.64%的出生缺陷率相仿^[9],Shats 等^[16]的研究认为,LAH 不增加新生儿的围产期风险,本研究之前的单胚胎移植后出生新生儿的结果也显示,LAH 组与对照组新生儿畸形率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示 LAH 组双胎新生儿畸形率并未高于既往标准,但未来需增加研究病例数量获得更为准确可靠结果。

本研究曾对单胚胎移植后单胎活产的试管婴儿1周岁发育情况进行随访,结果显示,两组双胎婴幼儿周岁体重均无异常,LAH组周岁身高无异常,非LAH组有2例身高发育迟缓(1.10%)。所有随访者的体重、运动能力、出牙情况、智力评估均未见异常。此前的一项单胚胎移植后单胎活产的前瞻性队列研究也表明,ART后出生的婴儿与自然受孕出生的婴儿在2周岁时的认知、运动和语言能力方面比较无明显差异^[20]。本研究的研究对象为双胚胎移植后双胎活产的试管婴儿,结果提示即使是双胎妊娠的试管婴儿,LAH也不会引起婴幼儿发育迟缓或发育异常。

综上所述,对双胚胎移植后双胎分娩的试管婴儿研究中,LAH的应用对双胚胎移植着床后胚胎存活情况及双胎分娩的新生儿发育、1周岁婴幼儿发育均无明显影响,对于双胎新生儿畸形率的影响尚需更多病例的研究。至于LAH对双胎分娩子代发育的长期影响,课题组也将长期关注。另外,本研究对于患者的吸烟、居住环境、饮食等信息未予区分,因此上述因素是否对胚胎着床成功率、妊娠结局及婴幼儿正常发育造成一定影响尚未可知,在后续研究中将考虑更多变量对结局指标造成的影响。

[参考文献]

- [1] 王羽,惠宁. 辅助孵化在体外受精中的应用进展[J]. 中国妇幼保健,2014,29(14): 2295-2298.
- [2] Davidson LM,Liu Y,Griffiths T,et al. Laser technology in the ART laboratory:A narrative review[J]. *Reprod Biomed Online*,2019,38(5): 725-739.
- [3] Balaban B,Urman B,Alatas C,et al. A comparison of four different techniques of assisted hatching[J]. *Hum Reprod*,2002,17(5): 1239-1243.
- [4] 王慧,狄春光,王功发,等. 机械辅助孵化和激光辅助孵化对冻融卵裂期胚胎移植临床妊娠结局的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*,2019,27(10): 1260-1261, 1278.
- [5] Honguntikar SD,Uppangala S,Salian SR,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.
- [6] Shafei RA,Syrkasheva AG,Romanov AY,et al. Blastocyst hatching in humans[J]. *Ontogenez*,2017,48(1):8-20.
- [7] Knudtson JF,Failor CM,Gelfond JA,et al. Assisted hatching and live births in first-cycle frozen embryo transfers[J]. *Fertil Steril*,2017,108(4):628-634.
- [8] 张素群,倪琛,盛美萍,等. 体外受精-胚胎移植术中单胚胎移植与双胚胎移植的妊娠结局及影响因素分析[J]. *上海交通大学学报(医学版)*,2019,39(6): 642-647.
- [9] 中国卫生部妇幼保健与社区卫生司. 中国7岁以下儿童生长发育参照标准[S].北京:中国卫生部妇幼保健与社区卫生司,2009.
- [10] 王卫平,孙锟,常立文. 儿科学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社,2018:13.
- [11] Group WHOMGRS. WHO Motor Development Study: Windows of achievement for six gross motor development milestones[J]. *Acta Paediatr Suppl*,2006,450:86-95.
- [12] Zeng M,Su S,Li L. The effect of laser-assisted hatching on pregnancy outcomes of cryopreserved-thawed embryo transfer:A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Lasers Med Sci*,2018,33(3):655-666.
- [13] 国家卫生与健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴 2019[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2019:18.
- [14] Boulet SL,Kirby RS,Reefhuis J,et al. Assisted reproductive technology and birth defects among liveborn infants in florida, massachusetts, and michigan, 2000-2010 [J]. *JAMA Pediatr*, 2016,170(6):e154 934.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告[S].北京:中华人民共和国卫生部,2012:2-5.
- [16] Shats M,Fenichel D,Katz G,et al. Obstetric, neonatal and child development outcomes following as sisted hatching treatment:A retrospective cohort study[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2020,27(4):1-5.
- [17] 刘卫卫,韩伟,高洋,等. 解冻周期单囊胚移植与卵裂期双胚胎移植的比较:一项关于反复种植失败周期的研究[J]. *生殖医学杂志*,2020,29(1):18-21.
- [18] 米杰,林良明,刘玉林,等. 1988年中国活产儿出生体重抽样的调查结果[J]. *中国预防医学杂志*,2002,4(3): 154-157.
- [19] 夏燕,潘晖,魏兆莲. 试管婴儿双胎与自然受孕双胎产妇和新生儿的临床结局分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016,15(20):2049-2051.
- [20] Balayla J,Sheehy O,Fraser WD,et al. Neurodevelopmental outcomes after assisted reproductive technologies[J]. *Obstet Gynecol*,2017,129(2):265-272.

(收稿日期:2021-02-22)