

夫妻泡浆内单精子注射 (ICSI) 与传统的体外受精 (IVF) 和非严重不孕患者精子注射 (NSMI- ICSI) 的比较 : 多中心随机对照实验的方案

Danni Zheng,1,2,3,4,5,6 Lin Zeng ,7 Rui Yang,1,2,3,4,5,6 Ying Lian,1,2,3,4,5,6 Yi-Min Zhu,8 Xiaoyan Liang,9 Li Tang,10 Huichun Wang,11 Yunxia Cao,12 Guimin Hao,13 Jianqiao Liu,14 Junli Zhao,15 Rui Wang,16,17 Ben Willem Mol,17 Rong Li,1,2,3,4,5,6 He-Feng Huang,18 Jie Qiao1,2,3,4,5,6

摘要

简介

引用 : 郑 D , 曾 L , 杨 R , 等。胞浆内单精子注射 (ICSI) 与常规体外相比夫妻受精 (IVF) 非严重男性不育症 (NSMI-ICSI) : 协议多中心随机

对照试验。英国医学杂志公开赛 2019;9:e030366。doi:10.1136/bmjopen-2019-030366

► 出版前历史

该论文可在线获取。

要查看这些文件, 请访问

在线期刊 (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030366>)。

DZ、LZ、RY 先联合作者。

2019 年 3 月 11 日收到
2019 年 6 月 19 日修订
2019 年 8 月 23 日接受
2019 年 8 月 23 日接受

泡浆内单精子注射 (ICSI) , 最初是作为体内 (IVF) 的附加物而引起的对于男性严重不孕的夫妇, 目前的临床实践也用于男性轻度甚至不明原因不育的夫妇。然而, ICSI 涉及到的关于配子的选择和损害以及后代的健康状况仍未解决它是劳动密集型的, 因此比传统的体外受精更昂贵, 目前还缺乏高质量、良好的 ICSI 和体外受精的随机临床实验 (RCTs) 。

方法与分析 我们在中国 10 个生殖医学中心提出了一项多中心、开放标签的随机对照试验 (RCT) 。我们将研究夫妻非严重男性不育(定义为精液浓缩物 5-15 乘法 106 毫升或精子进行性活力 10%到 32%) , 计划第一次和第二次 ICSI 或体外受精期, 在这个人群中受精后低生育率更加频繁。这可能导致 ICSI 和传统 IVF 受精有争议, 在卵母细胞提取当天, 符合条件的参与者在知情同意后。按 1:1 比率接受 ICSI 或传统 IVF 和其他标准辅助生殖治疗, 两组之间是相似和平行的。我们持续妊娠第一个周期后的结果证明 ICSI 和传统 IVF 之间的差异为 7%。我们需要包括 2346 名女性 (每个干预组有 1173 名) 。此外, 我们将在术后随访新生儿分娩后的结果以确定 ICSI 对后代的影响。

伦理和传播 伦理批准是由北京大学第三医院医学科学研究伦理委员会颁发。研究调查结果将会通过会议介绍和同行评议的科学期刊向公众传播试验注册号 ClinicalTrials.gov 注册 (NCT03298633) 。

本研究的优势和局限性

- ▶ 这是首个大样本量的随机对照临床试验，在中国 10 个中心的非严重男性不孕患者中胞浆内精子注射 (ICSI) 和常规体外受精 (IVF) 的比较。
- ▶ 本研究将为 ICSI 或传统的 IVF 对于非严重男性不育是否是更好的受精方法提供证据。。
- ▶ 我们的研究中基于第五版世卫组织手册的精子参数范围 (精液浓缩 $5-15 \times 10^6/\text{mL}$ 或进行性运动 10–32% 的精子) 将尽可能多地适用于非严重男性不育夫妇。
- ▶ 样本量和功效计算侧重于本研究的主要结果，但检测其他次要结果的能力有限。

介绍

男性不育是有不同的先天性或后天因素导致的精子生产和功能受损造成的。估计 30% 不孕不育。

辅助生殖技术 (ART) 被认为是一种更成功的治疗方法。最初适用于 20 世纪七十年代输卵管损伤的女性。体外受精 (IVF) 现在被认为是一种有效的方法。(ART) 是治疗不孕症的主要组成部分。然而，当精液特征细菌明显低于 WHO 第四版精子参数值的标准值以及之前周期的受精率较低时，常规试管受精的效果会相差很多。

1992 年，引入胞浆内精子注射 (ICSI)，这种技术将单个精子机械注射到体外卵母细胞中以实现受精。据报道，对于男性中度不育症 (中度少精子症，中度弱精子症和畸形精子症) 传统 IVF 体外受精治疗失败高达 50%，但在接受 ICSI 的夫妇中，这种情况小于 3% 因此，ICSI 已经在世界范围内应用于治疗严重的男性不育症。

ICSI 的高成功率导致越来越多的人使用。而常规试管受精可能只是是一种选择，特别是非男性因素不孕。在欧洲，2012 年使用 ICSI IVF 周期高达 69%。而 1997 年为 35% 而在中东，南美和东南亚 ICSI IVF 周期使用率高达 100%。在美国，1996 年至 2012 年。ICSI 在 IVF 周期的使用率从 34% 增加到 76%。在此期间，男性因素不孕症的增加，ICSI 使用率从 15% 上升到 67%。

由于 ICSI 耗时，昂贵。而且涉及到未解决的问题，人们对 ICSI 的使用感到担忧。许多研究表明，不建议在非男性因素的不孕症中常规使用 ICSI 以改善临床结果，对于非中度男性因素推断效用。包括轻度和重度少精子症或不伴弱精子症。与传统 IVF 受精相比。ICSI 的受精和妊娠的结果尚未清楚。同胞卵母细胞随机化的研究显示了相互矛盾的结果。多项研究已经证明 ICSI 和传统 IVF 在胚胎质量、着床、临床妊娠或出生存活率方面没有明显的差异。这些研究也有局限性如样本量小、非随机夫妇或未做活产评估。此外，ICSI 在中国应用较少。可能非严重男性不育患者的生产率较低。关于在 ART 期间进行 ICSI 或者 IVF 受精备受争议。

鉴于这种情况，我们计划进行一项足够有力的多中心随机对照临床试验，以评估 ICSI 或 IVF 受精对非严重男性不育夫妇哪个更有效。

方法与分析

研究设计

我们计划进行一项多中心、平行、开放标签随机对照（1:1 治疗比例）的临床试验。流程图遵循标准协议项目：登记、分配、治疗和随访。此外，研究期间的登记干预和评估时间见表。

研究设置

本研究将从中国 10 个生殖医疗中心招募参与者：北京大学第三医院、上海交通大学国际和平妇幼健康医院、浙江大学妇女医院、中山大学第六附属医院、昆明医科大学第一附属医院、海淀区妇幼健康医院、安徽医科大学第一附属医院、河北医科大学第二医院、广州医科大学第三附属医院、宁夏医科大学总医院。

数据安全监测委员会（DSMB）将与具有临床和统计专业知识的成员一起监测试验进展和中期结果。

资格标准

在相关医院的生殖医疗中心就诊的夫妇将接受筛选，以便确定是否有资格参加我们的试验。

纳入的标准

1. 不孕夫妇计划进行第一次或第二次 IVF 体外受精/ICSI 周期。
2. 男性伴侣有非严重的男性不育症：定义为精液浓缩液 5-15 × 10⁶/ml 或具有进行性运动的精子（+b 型）10% 到 32%。
3. 女性接受促黄体生成素释放激素激动剂（GnRH-a）方案或促黄体生成素释放激素拮抗剂（GnRH-ant）作为控制卵巢过度刺激（COH 治疗）。
4. 获得知情同意权。

排除标准

1. 有体外受精或 ICSI 禁忌症，包括控制不良的一型和二型糖尿病；未诊断的肝病或功能障碍（基于血清肝酶检测结果）；肾脏疾病或血清肾功能异常；贫血；深静脉血栓形成；肺栓塞或脑血管意外史；未控制的高血压或已知症状性心脏病；（或疑似）宫颈癌、子宫内膜癌或乳腺癌史；以及不明原因的阴道出血。
2. 接受捐赠者精子或捐赠者卵子的夫妇。

3.接受植入前基因测试的夫妇。

4.精子浓度与渐进式运动的使用授精时，卵母细胞当天 $<0.1 \times 10^6/\text{mL}$ 收回。

5.回收了零个卵母细胞的女性。

6.前一个周期的受精程度较差 ($\leq 25\%$) 。

在这项研究中，将包括有各种女性试管受精指征的夫妇，定义非严重男性不育的精子参数，根据世卫组织第五版精子参数值进行评估。

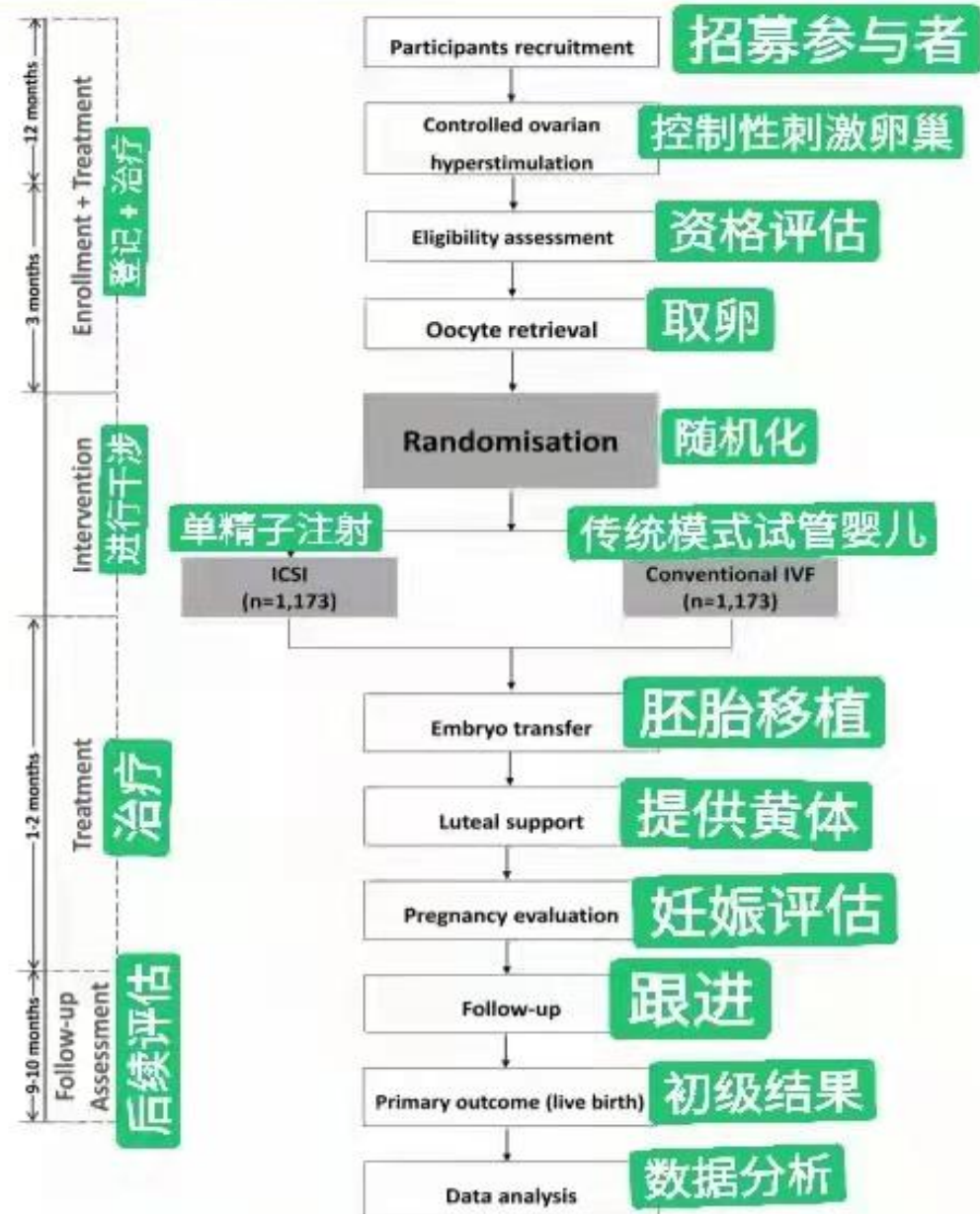


图 1 流程图遵循 SPIRIT 清单，显示了参与者的患者登记、分配、治疗和随访。ICSI，胞浆内精子注射；IVF，体外受精；SPIRIT，标准协议项目：建议介入试验。

精子参数以最新精子分析为准。37 位参与者有权拒绝参与在整个过程中，他们可以撤回他们的参与意愿他们同意或拒绝同意不会影响他们的常规临床治疗。

参与者招聘

来门诊就诊的不孕夫妇或接受过不孕不育夫妇的病历 COH 治疗将通过专门的研究进行筛选团队。符合条件的夫妇将在取卵之前，研究小组的成员解释了该试验的每个细节。在此信

息之后，将提供考虑后的决定是否有参加的时间。将询问同意参加的夫妇在他们下次计划的访问中进行签署同意书。将获得并存储所有招募到的患者的个人记录和排除原因。在取卵日，已签署患者的精液同意书将被再次分析排除标准。不符合条件的患者将被进一步排除在外我们的试验，继续他们的传统临床程序代替。

Table 1 Schedule of enrolment, interventions and assessments											
		研究阶段		注册，干预和评估时间表							
		注册		预分配	分配	员额分配					
		筛选和基线评估	控制性刺激卵巢巢	随机化取卵	胚胎评估	移植胚胎	妊娠评估	妊娠随访			
内容	时间点	T ₀ -3 month	T ₁ -1 month	T ₂ 0 month	T ₃ 1-3 days	T ₄ 3 days	T ₅ 1 month	T ₆ 3-10 months	T ₇ 12 months		
注册											
资格审查		x	x	x							
知情同意		x									
分配				x							
干预											
单精子注射				x							
传统的试管婴儿				x							
评估											
基线数据		x									
实验室测试		x	x	x		x	x	x	x		
滋养					x						
胚胎质量					x						
妊娠实验							x				
验孕结果								x	x		
胎儿信息								x	x		
新生儿信息								x	x		
安全评估			x	x		x	x	x	x		
单精子注射：胞浆内精子注射 / IVF 体外受精											

排除的原因将被获取和存储。在提取卵母细胞的当天,将再次分析已签署同意书的患者的精液,作为排除标准。不符合标准的患者将被进一步排除在我们的试验之外,继续他们的常规临床程序。

随机对照试验

在卵母细胞提取当天,将符合条件的患者随机分配到研究组,这个过程将由行政人员在试验中心不参与治疗过程中,使用一个在线试验系统与计算机生成随机列表分配夫妇 1:1 比例进行单精子注射或者试管婴儿,变量块大小的四或者六分层中心,分层排列的组块随机化将进行集中控制。

盲测

该试验最初被设计并实施为一项双盲测试,参与者和进行胚胎移植或随访的为临床医生或者护士以及研究人员和评估人员将被盲测,直到主要结果发生。而进行体外受精和 ICSI 实验的胚胎学家则是完全知晓情况的。由于双盲设计,招募速度缓慢,而参与者想尽快知道他们的受精方法的分配。因此,在招募了 115 名参与者后,将设计改为开放标签研究,在卵母细胞提取当天,试管受精实验室的管理人员将登录试验系统,随机分配参与者接受单精子注射或者体外受精。最初,只有胚胎学家会知道分配情况。参与者和临床医生将被告知在新鲜胚胎移植参与者的胚胎移植当天的随机分配,以及采用所有冷冻策略的夫妇的胚胎冷冻当天。在这些日期之前,参与者和临床医生仍然不知道随机分配的结果。

干预措施

控制卵巢过度刺激

所有的夫妇都讲接受受控超促排卵 (COH) 治疗,根据每个研究中心的标准常规进行。COH 疗包括促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a) 方案或促性腺激素释放激素拮抗剂(GnRH-ant) 方案,方案的选择将由医生完成。在 GnRH-ant 方案中,参与者将从第 2 天或第 3 天开始每天注射促性腺激素(Gonal-F 果纳芬或 poulquen 普林素或 HMG 尿促性素注射剂)。从周期的第二天或者第三天开始,当至少一个卵泡直径达到 12mm 或在卵巢刺激第 6 天,将给患者皮下注射 GnRH 抗体(西曲肽或甘尼利),直到触发日(包括触发日),对于超长的 GnRH-a 方案, GnRH-a (促性腺激素释放激素激动剂)将在以前的月经周期中使用,促性腺激素治疗在 GnRH-a 方案,对于长期的 GnRH-a 方案,垂体 GnRH-a 将在月经前 7-10 天开始下调。在 10-14 天后月经周期的第 2 天,将开始促性腺激素治疗,对于短期的 GnRH-a 方案,参与者将在月经周期第 2 天或第 3 天接受阿拉瑞林或者曲普瑞林的垂体下调,并且促性腺激素将同时使

用。对于上述治疗，患者的月经周期包括：周期性的自发子宫内膜脱落所引起的出血和使用口服避孕药或孕激素的所引起的月经周期。在促性腺激素治疗前,将测量基线盆腔超声,以及 基本血清激素(如 FSH 促卵泡生成素、黄体生成素、孕酮(P)和 B-人绒毛膜促性腺激素(β -HCG),以确认卵泡状态。初始剂量为促性腺激素(Gonal-F 或 Poulipquen 或 HMG)为 150-300mg/天，后续剂量将根据个体反应进行调整。促性腺激素治疗将持续到触发日。当两个或两个以上卵泡达到直径 $\geq 18\text{mm}$ 后，将在指定日期注射 250 μg hCG 人绒毛膜促性腺激素。

卵母细胞的提取以及准备

HCG 注射后 36 小时 (± 2)，常规的卵母细胞是经阴道超声引导下，经 17-18G 卵母细胞穿刺针，使用静脉镇静。将提取的卵母细胞复合物 (COCS) 置于轻质石蜡油覆盖的培养皿中，提取卵母细胞后立即在 37°C ，5%/6%， CO_2 的培育箱培养，此外 COCs 卵母细胞复合物授精或注射前孵育 2-6 个小时。

精液准备

新鲜精液的样本将在提取卵母细胞当天的 2-7 天后通过手淫获得新鲜射精精液样本。根据世卫组织第五版人类精液和精子实验室标准，通过计算机辅助精液分析来评估精子浓度和进行性运动。所有的精液样本均按照当地常规采用密度梯度离心法或者游泳法制备。使用显微镜 (200-400 次)，观察精子形态是否存在严重异常，如果存在严重异常，可能会导致受精失败，例如球形精子症。

卵泡浆内单精子注射组

被分配给卵泡浆内单精子注射的夫妇的卵母细胞将会经历单精子注射的全过程，简短来说，由于在卵母细胞的制备过程中进行了酶的去除，实验室检查剥去层的卵母细胞以评估其完整性和成熟度。只有那些第一个极体的卵母细胞 (中期 III 度的卵母细胞) 将进行卵泡浆内单精子注射

体外受精组

所有分配到体外受精的夫妇的卵母细胞将采用常规体外受精治疗，在注射 HCG 破卵针大约 39 到 42 个小时以后，会进行受精程序，每一个卵母细胞都会由具有前向运动能力的精子 $0.1-0.2 \times 10^6$ 进行受精。

受精和胚胎质量的评估

除了受精程序之外，两组的辅助生殖治疗的程序都相似，受精评估将会在受精后约 16-18 个小时进行评估，正常的受精是通过存在两个原核和一个第二极体来评估，受精卵在培养箱培养至第 3 天，在受精后 67-69 小时（第 3 天）观察受精卵质量，受精卵的评估主要通过受精卵分裂细胞的质量，数量，大小和碎片率进行评估。

胚胎的移植和黄体支持

将移植新鲜或经过冷冻解冻的胚胎由医生决定，当我们所有的研究中心都有新鲜胚胎时，移植新鲜胚胎是通常的做法，在某些情况下。所有的胚胎都可以进行冷冻保存而不进行新鲜胚胎移植，最常见的是为了防止卵巢过度刺激综合征（OHSS），此外，在以下情况将使用全冷冻策略：输卵管积水，HCG 日孕酮值升高。子宫内膜因素（子宫内膜息肉，子宫内膜腔液和子宫内膜薄），系统类疾病（胃痛，发烧或者感冒）和患者的突发意外事故

进行新鲜或冷冻胚胎移植将由医生在收集卵母细胞后 3 或 5 天接受新鲜胚胎移植，参与者在接受新鲜胚胎移植。参与者孕酮启动后 4-6 天进行冷冻解冻胚胎移植（卵母细胞抽吸后 6 个月内）。为了降低高阶多胎妊娠风险，在所有研究中心，移植的胚胎的数量将限制在两个高质量最好的胚胎，如果有子宫畸形，子宫手术或者剖腹产史，将只移植一个胚胎。黄体支持以及胚胎冷冻解冻是在每一个方案中按照标准的常规进行的，因为我们假设不同的方案将在干预组和对照组平均分布。

随访

在胚胎移植后 14 天测量尿液和血液 HCG 之后，阳性结果表示生化妊娠，如果在妊娠 7 周时通过超声观察到妊娠囊，将确认临床妊娠，持续妊娠的定义是在妊娠 12 周后出现伴有胎儿心跳的妊娠囊。在分娩后 6 周内，通过填写本次就诊设计的表格收集妊娠信息（妊娠并发症和胎儿信息），分娩信息（胎龄，分娩方式，胎盘异常或者分娩），婴儿信息（性别或者出生体重或者出生缺陷）

健康结果指标

主要结果

我们的主要结果将是第一次胚胎移植后的持续妊娠导致活产，活产的定义是生单个或者多个胎儿

次要结果

为了保证治疗的有效性，我们将记录这些次要结果的有效性

- 1.受精:定义为 2 个 PN 的受精卵数量(每个女性随机化，每个卵母细胞提取)
- 2.完全受精失败：定义为在这个周期没有卵母细胞形成 2PN
- 3.可用胚胎：定义为胚胎数量 ≥ 4 细胞，和 $\leq 30\%$ 的碎片率
- 4.优质胚胎：定义为第三天观察 2PN 受精卵中 ≥ 6 细胞和 $\leq 10\%$ 的碎片率
- 5.植入：定义为每个移植胚胎观察到妊娠囊的数量
- 6.临床妊娠：定义为妊娠 7 周时超声波检查发现的一个或者多个妊娠囊或者明确的妊娠临床体征（包括临床记录的异位妊娠）
- 7.多胎妊娠：定义为妊娠 7 周时有两个或两个以上的妊娠囊或者心跳阳性的妊娠
- 8.持续妊娠：定义为妊娠 12 周后出现妊娠囊和胎儿心跳

为了提高治疗的安全性，我们将把以下治疗并发症记录为次要结果

- 1.中度/重度 OHSS:定义为对卵巢刺激的全身反应, 具有广泛的临床和实验室表现。根据腹胀、卵巢肿大、呼吸系统、血流动力学和代谢性并发症的程度, 可分为轻度、中度、重度。
- 2.流产：定义为在 22 周之前自发失去宫内妊娠
- 3.异位妊娠：定义为在胚胎生长在宫腔在，经超声或者腹腔镜确认

我们还将收集以下产科和围产期并发症:1. 妊娠期糖尿病。 2.妊娠高血压疾病(包括妊娠高血压、子痫前期和子痫)。产前出血,包括前置胎盘、胎盘植入和不明原因的出血。4.早产:定义为在被确认为持续妊娠的参与者中，一个胎儿在 22 周到 37 周之前出生

5. 出生体重，包括低出生体重（定义为出生体重 $< 2500\text{g}$ ）、极低出生体重（定义为出生体重 $< 1500\text{g}$ ）、高出生体重（定义为出生体重 $> 4000\text{g}$ ）和超高出生体重（定义为出生体重 $> 4500\text{g}$ ）
6. 大于胎龄（定义为出生体重大于给定胎龄参考性别特定出生体重的第 90 个百分比）和小于胎龄（定义为出生体重小于胎龄的第 10 个百分比）
7. 先天性异常（定义为在子宫内生命中发生的结构或功能障碍，可在产前、出生时或出生后期发现），包括 13、18、21 三体、神经管缺陷、先天性心脏病、唇裂，过多的手指或脚趾，脑积水。先天性异常的临床诊断根据《国际疾病分类》第 10 版标准进行定义。

8. 围产期死亡率 (定义为胎儿或新生儿死亡, 发生在妊娠晚期。(在第 222 天完成孕周及以后, 分娩时或产后 7 天))。
9. 新生儿死亡率 (定义为出生后 28 天内死亡的婴儿) 。

数据管理

试验数据的收集将结合后续常规临床数据, 它是可验证的真实临床医学记录。为了保证真实可靠的研究结果, 我们所有的研究人员及临床医生需要掌握这方面的所有学习细节。我们研究的所有特征都收集通过标准的临床电子数据收集系统进行基线和随访。所有参与者可识别数据, 例如同意书、筛选和识别日志将存储在调查员站点文件中, 可访问仅限研究小组的委派成员。安全报告将按照计划和所有不良事件将被记录并通知 DSMB。这 DSMB 将在 3 个月后进行中期分析前 600 名随机参与者已完成胚胎转移。他们将使用端点持续妊娠来这样做, 因为将无法获得活产数据。此外, DSMB 将监督(SAE)已经发生的严重不良事件。

样本量

在患有非严重男性不育症的夫妇中, 2014-2015 年间所有研究地点的体外受精后平均活产率为 40%/周期。基于其他生育保健领域的研究以及讨论妇科医生和方法学家, 我们假设使 ICSI 优于 IVF 的最小临床重要差异为 7%。为了证明这种差异与双边测试, 5% alpha-error, 90% 统计功率并考虑到 10% 的 dropout, 我们将每组需要招收 1173 名参与者, 即一个共有 2346 名参与者 (组间的比例将为 1:1)。对于中期分析, 我们将使用 Haybit le-Peto 边界。中期显著性水平分析为 0.001, 最终分析为 0.05.40。

统计分析

对于连续变量, 通常分布的参数将表示为带有 SD 的平均值并进行比较使用学生 t 检验。如果参数不正常分布, 它们的中位数和 IQR 将被报告, Mann-Whitney U 检验也将用于检验这些变量的分布。对于分类变量, 我们将展示每组之间的比例和分布将使用 Pearson 的 χ^2 进行比较测试, 适当进行 Fisher 精确检验。数据分析本试验将遵循意向治疗原则, 在所有随机分配的女性都将被考虑治疗组之间的主要比较。每个协议分析将作为二次分析在遵守协议的参与者。对于缺失值, 一系列临床上合理的场景将用于估算缺失值, 以便检验结果的稳健性。对于损失的跟进和协议违规, 我们将尝试敏感分析探讨这些因素对试验结果的影响。

所有测试都是双尾的, 并且与 p 值的差异 <0.001 用于中期分析或 p 值 <0.05 用于最终分析被认为具有统计学意义。所有统计分析将使用 SAS 软件包进行 V.9.4。统计分析将由临床流行

病学监督的独立统计学家完成北京大学第三医院研究中心。该分析将在统计分析计划中详细描述

患者和公众参与

这项研究是在没有患者或公众参与的情况下完成的。患者和公众均未参与本次研究问题的发展，研究设计或实施本试验。不会邀请患者开发与患者相关的结果或解释结果，以及最终手稿的写作或编辑为了可读性或准确性。作为我们研究中的干预措施既是临床工作中的常规程序，又是负担干预措施由患者自己评估。

道德与传播

该研究已在 ClinicalTrials.gov 网上注册。知情之前将获得每个参与者的同意随机化。研究人员将允许访问与试验相关的监控、审计、监管检查、提供原数据和文档。这里将不会有本研究方案中提供的其他数据。

试验情况

实验的招聘将集中在 2018 年的四月，这项实验预计最后的招聘时间为 2020 年四月。