

# 胚胎动力学参数与胚胎发育潜能关系的初步研究

王世凯, 薛林涛, 何冰, 成俊萍, 谭卫红, 覃捷, 黄红艺

基金项目: 广西卫计委科研课题(编号:Z2013343); 广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻1140003B-66)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 王世凯(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 生殖医学。E-mail: wskgxu@163.com

**[摘要]** **目的** 探讨胚胎动力学参数与胚胎发育潜能之间的关系, 为筛选发育潜能更好的胚胎提供依据。**方法** 回顾性分析在该中心接受 IVF/ICSI 治疗的患者, 来源为 2PN 的胚胎, 采用 time-lapse 技术培养, 共 165 枚。按照卵裂期和囊胚期常规胚胎评分标准进行分组, 比较各组间胚胎动力学参数的差异。**结果** (1) 根据受精后第 3 天评分分为两组: 1~2 级胚胎组( $n=85$ )和 3~4 级胚胎组( $n=80$ )。3~4 级胚胎组在 tPNa、tPNf 和 t2 等参数比 1~2 级胚胎组有所延迟, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 而在第二次卵裂(t3/t4)上 3~4 级胚胎组要比 1~2 级胚胎组有所提前, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(2) 根据受精后第 5~6 天评分分为三组: 优质囊胚组( $n=20$ )、可冻囊胚组( $n=17$ )和劣质囊胚组( $n=23$ )。可冻囊胚组 tPNa 和 t2 参数较优质囊胚组的发育速度稍微延迟, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 劣质囊胚组比优质囊胚组的发育速度显著延迟, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。在 tSC、tMf/p 和 tSB 参数方面, 可冻囊胚组和劣质囊胚组较优质囊胚组的发育速度都显著延迟, 三组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** t2、tSC、tMf/p 和 tSB 等时间参数可能与囊胚的形成具有相关性, 可以用来预测胚胎的发育潜能。

**[关键词]** 时差成像技术; 胚胎发育; 妊娠率; 胚胎选择

**[中图分类号]** R 711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)09-0763-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.09.01

**Preliminary study of the relationship between the kinetic parameters and the developmental potential of embryo** WANG Shi-kai, XUE Lin-tao, HE Bing, et al. Reproductive and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship between the kinetic parameters and the developmental potential of embryos, and to provide the evidences for the selection of better developmental potential embryos. **Methods** A retrospective analysis of 165 2PN embryos was performed in our center using time-lapse technology. The embryos were divided into different groups according to the criteria of the embryo scores and the kinetic parameters were compared among the groups. **Results** (1) The embryos were divided into two groups according D3 embryo scores: grade 1~2 group( $n=85$ ) and grade 3~4 group( $n=80$ ). The development of the grade 3~4 group in the parameters of tPNa, tPNf and t2 was delayed than that of the grade 1~2 group, but without a significant difference between the two groups( $P>0.05$ ). The time of t3/t4 in the grade 3~4 group was less than that in the grade 1~2 group, but without a significant difference( $P>0.05$ ). (2) The embryos were divided into three groups according D5 embryo scores: high quality blastocysts group( $n=20$ ), frozen blastocysts group( $n=17$ ) and poor quality blastocysts group( $n=23$ ). The parameters of tPNa and t2 in the frozen blastocyst group were slightly delayed than those in the high quality blastocysts group( $P>0.05$ ). The time of tPNa and t2 was significantly delayed in the poor quality blastocysts group than that in the high quality blastocysts group( $P<0.05$ ). There were significant differences among the three groups in the parameters of tSC, tMf/p and tSB( $P<0.05$ ). **Conclusion** The time parameters of t2, tSC, tMf/p and tSB may be related to the formation of the blastocyst, which can be used to predict the developmental potential of the embryos.

**[Key words]** Time-lapse; Embryo development; Pregnancy rate; Embryo selection

近年来,随着体外受精-胚胎移植(In Vitro Fertilization-Embryo transform, IVF-ET)技术的广泛应用,

已帮助很多不孕不育夫妇实现生育的梦想。尽管临床工作者们不论在临床和实验室技术方面都在不断

优化 IVF 程序,但 IVF-ET 的胚胎种植率仍然较低。2008 年欧洲人类生殖和胚胎学学会(European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) 统计分析了 1 051 个生殖中心共 532 260 个治疗周期,平均每周期的 IVF 的妊娠率为 28.5%<sup>[1]</sup>。大量研究表明 IVF-ET 的周期妊娠率受很多因素影响,其中胚胎质量是重要因素之一,也是能直接观察的因素。一直以来,卵裂期和囊胚期的胚胎评分都采取静态评分系统,主要采用原核数目与形态、细胞的数目和均一性、囊胚腔的大小以及内细胞团和滋养外胚层情况进行评分。尽管这种评分标准广泛应用于各个生殖中心,但也有其一定的局限性。胚胎的发育是一种持续的动态过程,静态评分系统并不一定能真实反映胚胎的发育潜能。时差成像技术(time-lapse)是一种瞬时曝光连续拍摄的成像技术,能与胚胎培养装置进行整合,可以观察各个胚胎发育阶段的形态,并将所有记录照片合成动态视频。通过 time-lapse 获取的胚胎发育信息量要远远多于静态评分,这些生物学变化包括原核的形成及消失,各个卵裂时期的分裂时间点,卵裂过程中的异常行为和胚胎碎片的产生等各种发育事件,这些事件更有利于移植胚胎的选择。本文统计分析了与胚胎发育潜能相关的数种胚胎动力学参数,希望可以找到一种或几种有利于评估胚胎发育潜能的事件,能更好指导移植胚胎的选择。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 回顾分析 2015-08 ~ 2015-10 到我院生殖医学与遗传中心行体外受精(IVF)或卵胞浆内单精子注射(ICSI)治疗周期的不孕夫妇,采用 time-lapse 技术培养,来源为 2PN 的胚胎,共 165 枚。治疗前男女双方均按卫计委相关要求完善各项检查,均无 IVF 禁忌证。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 胚胎培养和时差成像** 所有患者按本中心常规促排卵方案,注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)后 36 h 后行卵泡穿刺,获得卵母细胞复合物(OCCs),冲洗干净后置于 G-IVF (Vitrolife, Sweden) 培养液中,注射 hCG 40 h 后受精。受精后 6 h 去除颗粒细胞,移入预先在 Primo Vision dish(9 well, Vitrolife)培养皿中 37 °C,6% CO<sub>2</sub> 平衡过夜的 G-1 (Vitrolife, Sweden) 培养液中,放入 Primo Vision (Vitrolife, Sweden) 时差培养箱培养,培养箱环境为 37 °C,6% CO<sub>2</sub>,5% O<sub>2</sub>。受精后第 3 天对胚胎进行常规胚胎评分,待胚胎移植或冷冻后,剩余胚胎迅速一对一地移入预先

在 Primo Vision dish(9 well)培养皿中 37 °C,6% CO<sub>2</sub> 平衡过夜的 G-2 (Vitrolife, Sweden) 培养液中,置于时差培养箱内继续培养,受精后第 5 ~ 6 天进行常规囊胚质量评分。培养箱内安装好 Primo Vision 时差系统并连接 Analyzer 图像分析软件,设置拍摄间隔频率为 10 min,7 个等距的焦平扫描间隔频率 1 h,连续拍摄 6 d。

**1.2.2 胚胎评分标准** 受精后第 3 天参考 Peter<sup>[2]</sup> 的标准对卵裂期胚胎质量评分,根据分裂速度、卵裂球的均匀性和碎片比例等分为 4 个等级,其中 1、2 级为优质胚胎(≥6 cell),3 级为可用胚胎,4 级为劣质胚胎;受精后第 5 ~ 6 天参考 Gardner<sup>[3]</sup> 的标准对囊胚质量评分,根据囊胚腔大小和孵出程度分为 6 期,其中 4 期以上囊胚根据内细胞团和滋养层细胞数目进行评分,分为 A、B、C 3 级,其中评分 ≥4 BB 定义为优质囊胚,评分 >4 CC 定义可冻囊胚,评分 ≤4 CC 定义为劣质囊胚。

**1.2.3 数据收集和分析** 采用 Analyzer 图像分析软件收集来源于 2PN 胚胎的视频和图像,记录每个胚胎的原核出现时间(tPNa)、原核消失时间(tPNf)、第一次卵裂时间(t2)、第二次卵裂时间(t3/t4)、开始融合时间(tSC)、融合时间(tMf/p)和开始进腔时间(tSB)。各个时间点命名方法参考 Ciray 等<sup>[4]</sup> 建议的时差培养时间点命名原则。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同组别卵裂期胚胎动力学参数比较** 根据受精后第 3 天的常规评分分为两组:1 ~ 2 级胚胎组和 3 ~ 4 级胚胎组。3 ~ 4 级胚胎组在 tPNa、tPNf 和 t2 等参数上要比 1 ~ 2 级胚胎组有所延迟,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而在第二次卵裂(t3/t4)上 3 ~ 4 级胚胎组要比 1 ~ 2 级胚胎组有所提前,差异也无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同组别卵裂期胚胎动力学参数比较[( $\bar{x} \pm s$ ),h]

组别	例数	tPNa	tPNf	t2	t3/t4
1 ~ 2 级胚胎组	85	7.8 ± 1.1	23.4 ± 3.0	25.8 ± 2.9	36.8 ± 3.8
3 ~ 4 级胚胎组	80	8.0 ± 1.9	24.3 ± 5.0	26.9 ± 5.2	35.4 ± 7.7
<i>t</i>	-	0.460	1.503	1.714	1.478
<i>P</i>	-	0.646	0.135	0.088	0.142

**2.2 不同组别囊胚期胚胎动力学参数比较** 根据受精后第 5 ~ 6 天的常规评分分为三组:优质囊胚

组、可冻囊胚组和劣质囊胚组。优质囊胚组和可冻囊胚组在 tPNa 和 t2 参数方面比较,可冻囊胚组的发育速度稍微延迟,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );但劣质囊胚组要比优质囊胚组的发育速度显著延

迟,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在 tSC、tMf/p 和 tSB 等时间参数方面,可冻囊胚组和劣质囊胚组较优质囊胚组的发育速度都显著延迟,三组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 不同组别囊胚期胚胎动力学参数比较[( $\bar{x} \pm s$ ),h]

组别	例数	tPNa	tPNf	t2	t3/t4	tSC	tMf/p	tSB
优质囊胚组	20	7.5 ± 1.7	21.7 ± 2.7	24.2 ± 2.7	34.3 ± 4.4	79.7 ± 7.5	87.2 ± 6.5	93.6 ± 6.8
可冻囊胚组	17	7.7 ± 1.6	22.7 ± 2.8	25.1 ± 2.9	36.1 ± 4.3	84.2 ± 6.8	92.5 ± 6.2	99.0 ± 6.7
劣质囊胚组	23	8.1 ± 1.8	24.0 ± 2.4	26.9 ± 1.9	36.7 ± 5.5	94.3 ± 7.0	103.0 ± 8.3	110.2 ± 8.6
<i>F</i>	-	0.766	4.183	6.739	1.388	23.868	27.344	27.304
<i>P</i>	-	0.469	0.020	0.002	0.258	0.000	0.000	0.000

注:数据中可冻囊胚不包括优质囊胚

### 3 讨论

Time-lapse 技术可以记录胚胎发育过程中的动态变化,胚胎发育过程中的各个关键事件,如本文选择的几个胚胎发育事件都可以得到精确的记录。对于移植胚胎的选择,可以把常规的静态评分和动态评分相结合,可提高临床妊娠率,因此动态评分可作为选择胚胎的辅助方法。本研究系通过回顾分析胚胎的动态发育变化,记录相关的时间参数,比较各组间胚胎动力学参数的差异。研究结果说明,3~4 级胚胎会比 1~2 级胚胎的发育速度有所减慢,但差异无统计学意义;而在囊胚培养上,可冻囊胚和劣质囊胚与优质囊胚相比在原核的消失、第一次卵裂、开始融合、完成融合和开始形成囊胚腔等时间参数上发育速度会大大延迟。

**3.1 原核期到卵裂期胚胎动力学评估** 卵子受精后,从原核期到卵裂期,胚胎发生了一系列的变化,如原核的出现、原核的消失、第一次卵裂等事件,这些事件有些提前完成,有些会延迟完成,这些情况都可能会影响胚胎的发育。2008 年 Lemmen 等<sup>[5]</sup>选取 102 个正常受精卵的胚胎,通过时差技术发现,原核消失较早(约受精后 25 h)的胚胎比原核消失较晚(约受精后 27~28 h)有更好的发育潜能,这与我们的研究结果基本一致,都显示原核消失较早的胚胎可能具有更好的发育潜能。目前大多数的生殖中心在卵裂期评分多是在受精后第 3 天进行,但胚胎的静态形态学评分预测胚胎的发育潜能有一定局限性,如果能提供更多的发育参数就可以更好地预测胚胎的发育潜能。从原核消失到受精后第 3 天,这期间的各个发育阶段哪个更能预测胚胎的发育潜能,这需要以后大数据的前瞻性研究。本研究仅选用第一次卵裂和第二次卵裂来进行分析,研究表明,

对第一次卵裂较早的胚胎可以有效预见胚胎的发育潜力,多数研究者认为这些胚胎能够得到较高的优胚率和囊胚形成率<sup>[6]</sup>。Liebermann 等<sup>[7]</sup>比较早期卵裂的胚胎与早期未卵裂的胚胎发育为囊胚的几率,发现前者明显高于后者。这些研究结果和本研究的结果相符,第一次卵裂时间较早的胚胎(24.2 ± 2.7)h 发育为优质囊胚的可能性较大,可见 t2 可以预测胚胎的发育潜能。

**3.2 融合期胚胎动力学评估** 融合是胚胎发育的一个阶段,是细胞分裂的最后阶段,也是进入囊胚期的开始阶段。Ivec 等<sup>[8]</sup>研究表明胚胎融合的时间和程度与囊胚的形成和囊胚质量密切相关。2013 年 Le Cruguel 等<sup>[9]</sup>在受精后第 3 天移植单个早期融合的胚胎比移植单个未早期融合的胚胎周期妊娠率要高(50% vs 30%,  $P < 0.05$ )。2006 年 Skiadas 等<sup>[10]</sup>研究表明,在受精后第 3 天移植完全融合、部分融合和未融合的胚胎,种植率分别为 47%、33% 和 25%,结果显示胚胎的融合程度与胚胎的种植潜能有密切关系。本研究也发现形成优质囊胚的胚胎其 tSC、tMf/p 的时间要早于可冻囊胚和劣质囊胚,说明融合时间稍早的胚胎具有更好的发育潜能。

**3.3 囊胚期胚胎动力学评估** 囊胚形成的关键点包括囊胚腔的形成、囊胚腔的扩张和囊胚的孵出等。2013 年 Nagorny 等<sup>[11]</sup>研究表明不论女方年龄是 <35 岁还是 >35 岁,非整倍体囊胚的形成时间(融合期到扩张囊胚期的时间, tExp-tM)都比整倍体囊胚所需时间(h)要长[ <35 岁:(27.5 ± 9.3) vs (23.5 ± 6.6); >35 岁:(29.0 ± 9.4) vs (24.2 ± 6.6)]。我们的数据显示优质囊胚在 tSC、tMf/p 和 tSB 等时间参数上都要早于劣质囊胚,我们可以根据这些时间参数和现有的囊胚评分相结合,选择发育潜能更好

的囊胚用于移植,提高临床妊娠率。

**3.4 时差培养的安全性** 时差培养系统为胚胎的选择提供了丰富的信息,但作为一种新的医学技术,其安全性也需要严格评估。时差培养和常规的评估方法不同的就是频繁的拍照和曝光。有研究表明频繁的曝光可能对胚胎的发育不利<sup>[12]</sup>,但现在商品化的时差成像系统所需的曝光时间很短,平均每枚胚胎的曝光时间和常规的观察方法暴露在显微镜光源下的时间基本相同。2012年 Kirkegaard 等<sup>[13]</sup>将 Time-lapse 和常规培养方法进行比较,其前瞻性研究表明,两组的胚胎质量和妊娠结局无统计学差异,说明 time-lapse 技术是比较安全的。

综上所述,时差成像技术可以实时监测胚胎发育的动态过程,不需要频繁开关培养箱,能为胚胎培养提供稳定的培养环境。本文研究发现 t2、tSC、tMf/p 和 tSB 等时间参数可能与囊胚的形成具有相关性,可以用来预测胚胎的发育潜能,但因数据较少,这几个时间参数是否能真实反映胚胎的发育潜能,还需要大量的随机对照研究。通过 time-lapse 技术可以获取胚胎发育的更多信息,对于移植胚胎的选择,可以把常规的静态评分和 time-lapse 技术相结合,选择发育潜能更好的胚胎,提高临床妊娠率,因此 time-lapse 技术可作为选择移植胚胎的补充方法。

**参考文献**

- 1 Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE[J]. Hum Reprod, 2012, 27(9): 2571 - 2584.
- 2 Peter RB. Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction [M]. Third edition, New York: The Parthenon Publishing Group Inc, 1999: 196 - 197.
- 3 Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implan-

- tation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. Fertil Steril, 2000, 73(6): 1155 - 1158.
- 4 Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group[J]. Hum. Reprod, 2014, 29(12): 2650 - 2660.
- 5 Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes[J]. Reprod Biomed Online, 2008, 17(3): 385 - 391.
- 6 Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, et al. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos[J]. Fertil Steril, 2006, 85(2): 358 - 365.
- 7 Liebermann J, Knopff E, Matthews J, et al. Developmental potential of early-cleaved embryos associated with higher rates of blastocyst formation and utilization for cryopreservation[J]. Fertil Steril, 2005, 84(Suppl 1): S289.
- 8 Ivec M, Kovacic B, Vlaisavljevic V, et al. Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction[J]. Fertil Steril, 2011, 96(6): 1473 - 1478.
- 9 Le Cruguel S, Feeré-L'Hottellier V, Morinière C, et al. Early compaction at day 3 may be a useful additional criterion for embryo transfer[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(5): 683 - 690.
- 10 Skiadas CC, Jackson KV, Racowsky C. Early compaction on day 3 may be associated with increased implantation potential[J]. Fertil Steril, 2006, 86(5): 1386 - 1391.
- 11 Nagorny V, Mazur P, Mykytenko D, et al. Time-lapse imaging for selection of euploid embryos with regard to patient age and type of aneuploidy[J]. Fertil Steril, 2013, 100(Suppl 3): S208 - S209.
- 12 Takenaka M, Horiuchi T, Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(36): 14289 - 14293.
- 13 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(6): 565 - 572.

[收稿日期 2016-01-26][本文编辑 黄晓红]

## 书写文稿摘要、关键词和作者简介的要求

根据国家新闻出版广电总局发出的(1999)17号文件精神,入编正式期刊要执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》,为此,来稿中请书写摘要、关键词和作者简介。论著摘要采用结构式摘要,内容包括目的、方法、结果、结论,“四要素”连排,不分段。其他文体可采用报道指示性摘要。摘要均用第三人称写法。关键词尽可能选用《医学索引》(Index Medicus)的医学主题词表(MeSH)中的词语。重点文稿还须增加英文摘要及关键词。作者简介包括姓名、出生年、性别、学历、学位、职称、研究方向(任选)等。