

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.05.0577

• 短篇论著 •

## 受精第3天胚胎卵裂速度和囊胚发育潜能的关系

汪伟伟, 松迪, 许亚军, 胡婷婷, 林莎莎, 王及珉, 袁雪菲, 印惠荣\*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨受精第3天胚胎卵裂速度是否可以预测囊胚发育潜能及辅助生殖临床结局。**方法** 回顾性分析2016年1月1日至2018年12月31日于我中心行体外受精/卵胞质内单精子注射-胚胎移植(IVF/ICSI-ET)治疗的150例不孕症患者的临床资料及所有366枚新鲜囊胚移植的胚胎数据。根据受精第3天卵裂球的细胞数目将胚胎分为慢发育组(细胞数目 $\leq 6$ 个,  $n=78$ )、正常发育组(细胞数目7~9个,  $n=230$ )和快发育组(细胞数目 $\geq 10$ 个,  $n=58$ )。分析比较3组的囊胚形成率、优质囊胚形成率、胚胎种植率、临床妊娠率及活产率。**结果** 慢发育组、正常发育组和快发育组囊胚形成率分别为7.7%(6/78)、55.7%(128/230)和29.3%(17/58), 其中正常发育组的囊胚形成率最高, 与其他两组比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ ); 3组优质囊胚形成率分别为0(0/6)、7.0%(9/128)和11.8%(2/17), 其中快发育组最高, 与正常发育组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 胚胎种植率分别为0(0/18)、50.6%(80/158)和63.3%(19/30), 其中快发育组最高, 与正常发育组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。正常发育组临床妊娠率为53.7%(58/108)、活产率为41.4%(24/58); 快发育组临床妊娠率为63.0%(17/27), 活产率为47.1%(8/17); 正常发育组与快发育组临床妊娠率和活产率比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。**结论** 受精第3天细胞数目7~9的卵裂胚囊胚形成率最高, 细胞数目 $\geq 10$ 的卵裂胚优质囊胚形成率、胚胎种植率、临床妊娠率及活产率较高, 提示快速发育的胚胎有正常的发育潜能。

**[关键词]** 第3天胚胎; 卵裂; 囊胚形成率; 胚胎种植率; 优质囊胚形成率; 临床妊娠率; 活产

**[中图分类号]** R 321-33

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2021)05-0577-04

### Relationship between embryo cleavage rate on day 3 of fertilization and blastocyst development potential

WANG Wei-wei, SONG Di, XU Ya-jun, HU Ting-ting, LIN Sha-sha, WANG Ji-meng, YUAN Xue-fei, YIN Hui-rong\*

Department of Reproductive Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether the embryo cleavage rate on day 3 of fertilization can predict the blastocyst development potential and clinical outcome of assisted reproduction. **Methods** The embryo implantation data of 366 fresh blastocysts and the clinical data of 150 infertility patients undergoing *in vitro* fertilization or intracytoplasmic single sperm injection-embryo transfer (IVF/ICSI-ET) in our center from Jan. 1, 2016 to Dec. 31, 2018 were retrospectively analyzed. According to the cell number of the blastomere on the third day of fertilization, embryos were divided into slow development group ( $\leq 6$  cells,  $n=78$ ), normal development group (7-9 cells,  $n=230$ ) and fast development group ( $\geq 10$  cells,  $n=58$ ). The blastocyst formation rate, high quality blastocyst formation rate, embryo implantation rate, clinical pregnancy rate and live birth rate of the 3 groups were compared. **Results** The blastocyst formation rates of the slow, normal and fast development groups were 7.7% (6/78), 55.7% (128/230) and 29.3% (17/58), respectively, and the normal development group had the top rate, with significant difference when comparing with those in the other two groups (both  $P<0.01$ ); the high quality blastocyst formation rates of the 3 groups were 0 (0/6), 7.0% (9/128) and 11.8% (2/17), respectively, and the highest rate was found in the fast development group, with significant difference when comparing with that in the normal development group ( $P<0.05$ ); the embryo implantation rates of the 3 groups were 0 (0/18), 50.6% (80/158) and 63.3% (19/30), respectively, and the highest rate was found in the fast development group, with significant difference when comparing with that in the normal development group ( $P<0.05$ ); the clinical pregnancy rate and live birth rate were 53.7% (58/108) and 41.4% (24/58) in the normal development group, and were 63.0% (17/27) and 47.1% (8/17) in the fast development group, respectively; there were

**[收稿日期]** 2019-08-31

**[接受日期]** 2020-11-09

**[作者简介]** 汪伟伟, 硕士, 技师. E-mail: 1245980154@qq.com

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 021-31162484, E-mail: topyin@126.com

significant differences in clinical pregnancy rate and live birth rate between the normal and fast development groups (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The cleavage embryos with 7-9 cells on day 3 of fertilization have the highest blastocyst formation rate, and cleavage embryos with  $\geq 10$  cells on day 3 have much higher rates of high quality blastocyst formation, embryo implantation, clinical pregnancy and live birth, suggesting that fast development embryos have normal development potential.

[**Key words**] day 3 embryo; cleavage; blastocyst formation rate; embryo implantation rate; high quality blastocyst formation rate; clinical pregnancy rate; live birth

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(5): 577-580]

胚胎质量评估是判断胚胎发育潜能及辅助生殖临床结局的重要手段。移植胚胎形态学评估是目前临床上最常用的胚胎质量评估方法,主要观察指标为胚胎碎片比例和卵裂球细胞数目及其对称性、多核情况。卵裂球细胞数目是反映胚胎发育速度最重要的指标,受精后第3天的8细胞胚胎是进行卵裂期胚胎移植的最佳选择,细胞数目 $\leq 6$ 个提示胚胎卵裂速度过慢, $\geq 10$ 个被认为发育速度过快<sup>[1]</sup>。动物实验结果提示早期分裂胚的数量与囊胚形成率有关,分裂速度快的胚胎可显著提高妊娠率<sup>[2]</sup>。虽然有报道认为发育速度快的胚胎具有较高的发育潜力<sup>[3]</sup>,但也有研究认为发育速度较快的胚胎妊娠率较低<sup>[4]</sup>,因此分裂速度快的胚胎是否具有较高的发育潜能目前仍有争议。研究发现,受精第3天卵裂球细胞数目直接影响囊胚形成率和种植率<sup>[5]</sup>。本研究根据受精第3天卵裂球细胞数目将胚胎分为慢发育、正常发育和快发育胚胎,分析比较不同发育速度胚胎的囊胚形成率、优质囊胚形成率、胚胎种植率、临床妊娠率及活产率,以期为辅助生殖的胚胎选择提供依据。

## 1 资料和方法

1.1 研究对象及分组 回顾性收集并分析2016年1月1日至2018年12月31日在海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心行体外受精/卵胞质内单精子注射-胚胎移植(*in vitro* fertilization/intracytoplasmic single sperm injection-embryo transfer, IVF/ICSI-ET)治疗的原发性不孕症患者的临床资料。纳入标准:(1)原发性不孕;(2)新鲜胚胎囊胚培养至第5天移植的病例;(3)受精第3天胚胎卵裂球大小均一,胚胎碎片比例 $\leq 20\%$ ,胚胎等级1或2级。排除标准:未形成囊胚的周期,放弃囊胚移植的周期。根据受精第3天卵裂球的细胞数目,将胚胎分为慢发育组(细胞数目 $\leq 6$ 个)、正常发育组(细胞数目7~9个)和快发育组(细胞数目 $\geq 10$ 个)。本研究通过海军军医大学(第二军医大学)长海医院

伦理委员会审批。

1.2 囊胚评价方法 根据Gardner和Schoolcraft分级系统,对培养至第5天的囊胚囊腔扩张程度、内细胞团质量和滋养外胚层进行评分<sup>[6]</sup>。囊腔扩张程度分为6期。1期:囊腔小于胚胎体积的一半;2期:囊腔扩张至胚胎体积的一半或一半以上;3期:囊腔完全扩张,充满整个胚胎;4期:囊腔扩张体积大于早期胚胎,并伴随透明带变薄;5期:滋养外胚层突出透明带;6期:囊胚囊腔完全突出透明带。内细胞团分为4级。A级:细胞数目多,排列紧密;B级:细胞数目少,排列松散;C级:细胞数目很少;D级:没有细胞。囊腔扩张3~6期的囊胚滋养外胚层分为4级。A级:上皮细胞层由较多细胞组成,结构紧密;B级:上皮细胞层由数量较少的细胞组成,结构松散;C级:上皮细胞由稀疏的细胞构成;D级:没有细胞。优质囊胚定义为发育至第5天囊腔扩张至4期或5期、内细胞团为A级或B级、滋养细胞层为A级或B级的囊胚。桑葚胚定义为体外培养的第4天,卵裂球之间的界限开始模糊,形成一团无法区分的单个细胞边界的细胞团。胚胎停止发育定义为卵裂胚囊胚培养至第5天时其胚胎级别与第3天无异。囊胚形成率(%)=囊胚形成数/囊胚培养胚胎数 $\times 100\%$ ,优质囊胚形成率(%)=优质囊胚形成数/囊胚形成数 $\times 100\%$ ,桑葚胚形成率(%)=桑葚胚形成数/囊胚培养胚胎数 $\times 100\%$ ,胚胎发育停止率(%)=停止发育胚胎数/囊胚培养胚胎数 $\times 100\%$ 。

1.3 胚胎移植与结局随访 挑选可移植胚胎,在超声引导下宫腔内胚胎移植。胚胎移植后2周血清人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)阳性,移植后第33~35天超声检查示宫内孕囊,见胎心,视为临床妊娠。胚胎种植率(%)=超声下见孕囊数(包括异位妊娠活检有胚胎植入证据或诊刮有滋养细胞证据)/移植胚胎数 $\times 100\%$ ,临床妊娠率(%)=临床妊娠周期数/移植周期数 $\times 100\%$ ,活产率(%)=活产周

期数/临床妊娠周期数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 应用GraphPad Prism 5.0软件处理数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;计数资料以例数和百分数表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 患者基本资料 共150例患者入组,年龄21~50岁,平均 $(31.62\pm 4.62)$ 岁,平均子宫内膜厚度为 $(10.86\pm 2.02)$  mm。慢发育组27例、正常发育组108例、快发育组15例。

2.2 卵裂胚囊胚培养情况 共获得366枚第3天卵裂胚,其中慢发育组78枚、正常发育组230枚、快发育组58枚,3组卵裂球细胞数目分别为 $5.30\pm 0.88$ 、 $7.87\pm 0.52$ 、 $11.31\pm 1.56$ 。慢发育组、正常发育组、快发育组囊胚形成率分别为7.7%(6/78)、55.7%(128/230)、29.3%(17/58),正常发育组最高,与其他两组比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ );桑葚胚形成率分别为15.4%(12/78)、18.7%(43/230)、

22.4%(13/58),3组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );胚胎发育停止率分别为76.9%(60/78)、25.7%(59/230)、48.3%(28/58),正常发育组最低,与其他两组比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ )。

2.3 囊胚囊腔扩张程度、内细胞团发育情况、滋养细胞层发育情况和优质囊胚形成率比较 慢发育组囊胚的囊腔扩张主要在1、2或3期;扩张至4或5期者主要集中在正常发育组和快发育组,正常发育组与慢发育组、快发育组比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ,表1)。内细胞团A或B级的囊胚主要集中在正常发育组和快发育组,正常发育组与慢发育组、快发育组比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ,表2)。滋养细胞层A或B级主要集在正常发育组和快发育组,正常发育组与慢发育组、快发育组比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ ,表3)。慢发育组、正常发育组和快发育组4AA或5AA优质囊胚形成率分别为0(0/6)、7.0%(9/128)和11.8%(2/17),快发育组与正常发育组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表1 囊胚囊腔扩张程度分布情况

| 组别    | N   | n (%)    |           |           |           |           |    |
|-------|-----|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|
|       |     | 1期       | 2期        | 3期        | 4期        | 5期        | 6期 |
| 慢发育组  | 6   | 4 (66.7) | 1 (16.7)  | 1 (16.7)* | 0*        | 0*        | 0  |
| 正常发育组 | 128 | 8 (6.3)  | 13 (10.2) | 24 (18.8) | 48 (37.5) | 35 (27.3) | 0  |
| 快发育组  | 17  | 1 (5.9)  | 1 (5.9)   | 4 (23.5)* | 6 (35.3)* | 5 (29.4)* | 0  |

\* $P<0.05$ 与正常发育组比较。1期:囊腔小于胚胎体积的一半;2期:囊腔扩张至胚胎体积的一半或一半以上;3期:囊腔完全扩张,充满整个胚胎;4期:囊腔扩张体积大于早期胚胎,并伴随透明带变薄;5期:滋养外胚层突出透明带;6期:囊胚囊腔完全突出透明带。

表2 囊胚内细胞团发育情况

| 组别    | N   | n (%)     |            |           |          |
|-------|-----|-----------|------------|-----------|----------|
|       |     | A级        | B级         | C级        | D级       |
| 慢发育组  | 6   | 0*        | 0*         | 4 (66.7)  | 2 (33.3) |
| 正常发育组 | 128 | 46 (35.9) | 65 (50.8)  | 17 (13.3) | 0        |
| 快发育组  | 17  | 4 (23.5)* | 10 (58.8)* | 3 (17.6)  | 0        |

\* $P<0.05$ 与正常发育组比较。A级:细胞数目多,排列紧密;B级:细胞数目少,排列松散;C级:细胞数目很少;D级:没有细胞。

2.4 平均移植胚胎数及胚胎种植率比较 慢发育组27例患者共移植18枚胚胎,正常发育组108例患者共移植158枚胚胎,快发育组15例患者共移植30枚胚胎。慢发育组、正常发育组、快发育组平均移植胚胎数分别为 $0.67\pm 0.81$ 、 $1.46\pm 0.76$ 、 $1.11\pm 0.67$ ,胚胎种植率分别为0(0/18)、50.6%(80/158)、

63.3%(19/30),正常发育组与快发育组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表3 囊胚滋养细胞层发育情况

| 组别    | N   | n (%)     |            |           |           |
|-------|-----|-----------|------------|-----------|-----------|
|       |     | A级        | B级         | C级        | D级        |
| 慢发育组  | 6   | 0*        | 0*         | 3 (50.0)* | 3 (50.0)* |
| 正常发育组 | 128 | 26 (20.3) | 81 (63.3)  | 20 (15.6) | 1 (0.8)   |
| 快发育组  | 17  | 3 (17.6)* | 12 (70.6)* | 2 (11.8)* | 0*        |

\* $P<0.05$ 与正常发育组比较。A级:上皮细胞层由较多细胞组成,结构紧密;B级:上皮细胞层由数量较少的细胞组成,结构松散;C级:上皮细胞由稀疏的细胞构成;D级:没有细胞。

2.5 临床妊娠率及活产率分析 快发育组临床妊娠率为63.0%(17/27),活产率为47.1%(8/17);正常发育组临床妊娠率为53.7%(58/108),活产率为41.4%(24/58);慢发育组临床妊娠率为0(0/14)。正常发育组与快发育组比较临床妊娠率和活产率的差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。

### 3 讨 论

研究表明,卵裂过慢或过快的胚胎有较高的染色体异常率和较低的着床率,因而认为培养至第3天的胚胎中,细胞数目7~9个的胚胎质量最好,但质量最好不代表其最具发育潜能<sup>[7]</sup>。Edwards等<sup>[8]</sup>首次提出分裂速度快的胚胎比分裂速度慢的胚胎更容易妊娠。Shapiro等<sup>[9]</sup>发现第3天分裂至8细胞或更多细胞的胚胎形成囊胚的概率接近76%,而第3天分裂速度较慢的5细胞胚胎有87%没能形成囊胚。文献报道,第3天分裂大于10细胞的胚胎达到囊胚阶段的成功率与7~9细胞相似<sup>[9]</sup>,但也有研究认为发育速度较快的胚胎妊娠率低于正常发育速度的胚胎<sup>[10]</sup>。由此可见发育速度快的胚胎其发育潜能还存在一定争议。

在临床实践中,快速发育的胚胎通常不被选择用于移植,因为大家普遍认为发育较快的胚胎不是最优胚胎,可能存在发育不正常的风险。本研究根据受精第3天卵裂胚的细胞数目,将胚胎分为慢、正常、快发育3组。对符合纳入标准的366枚胚胎单独培养,结果显示第3天发育速度快的胚胎与正常发育组相比囊胚形成率较低,但在第5天形成的囊胚质量等级更高,正常发育组有7.0%(9/128)的胚胎形成4AA或5AA的优质囊胚,而快发育组有11.8%(2/17),这一结果表明快发育组的胚胎有正常的囊胚发育潜能。

本研究中快发育组胚胎种植率、临床妊娠率、活产率均优于正常发育组。本研究为回顾性研究,仅在发育速度快的胚胎中选了30枚用于移植,可供移植的快速发育胚胎数量较少,因此本研究结果具有一定局限性,但也能一定程度说明发育速度较快的胚胎具有较高的发育潜能。以往认为这些快速发育的第3天胚胎是不能正常发育的,本研究结果提示这些快速分裂的胚胎也可用于临床移植。有文献提示染色体异常的胚胎也能形成高质量的胚胎,但仅是个例<sup>[7]</sup>。第3天胚胎继续培养至第5或第6天,在体外延长培养期间,染色体基因异常的胚胎会停止发育,而发育成优质囊胚的胚胎发育潜能最大,临床妊娠结局最好。

由于选择胚胎移植时存在一定偏倚,本研究结论还需大样本、前瞻性的随机对照临床试验进一步验证。我们在研究过程中已尽可能控制单因素对研究结果的影响,但等级高的胚胎还是会受少量碎片的影响,故后续研究将分析第3天细胞碎片和多核

情况对囊胚发育潜能的影响,并通过考察胚胎整体倍体的植入潜能分析胚胎的最终发育能力。

### [参 考 文 献]

- [1] MILEWSKI R, SZPILA M, AJDUK A. Dynamics of cytoplasm and cleavage divisions correlates with preimplantation embryo development[J]. *Reproduction*, 2018, 155: 1-14.
- [2] LI M Q, YAO M N, YAN J Q, LI Z L, GU X W, LIN S, et al. The decline of pregnancy rate and abnormal uterine responsiveness of steroid hormones in aging mice[J]. *Reprod Biol*, 2017, 17: 305-311.
- [3] BOS-MIKICH A, MATTOS A L, FERRARI A N. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16: 2658-2661.
- [4] CARVALHO B R, BARBOSA M W, BONESI H, GOMES D B, CABRAL Í O, BARBOSA A C, et al. Embryo stage of development is not decisive for reproductive outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2017, 21: 23-26.
- [5] MACHTINGER R, BORMANN C L, GINSBURG E S, RACOWSKY C. Is the presence of a non-cleaved embryo on day 3 associated with poorer quality of the remaining embryos in the cohort?[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32: 677-683.
- [6] GARDNER D K, SCHOOLCRAFT W B. *In vitro* culture of human blastocyst[C]//JANSEN R, MORTIMER D. Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999: the plenary proceedings of the 11<sup>th</sup> world congress on *in vitro* fertilization and human reproductive genetics. Carnforth, NY: Parthenon Press, 1999: 378-388.
- [7] SANDALINAS M, SADOWY S, ALIKANI M, CALDERON G, COHEN J, MUNNÉ S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16: 1954-1958.
- [8] EDWARDS R G, FISHEL S B, COHEN J, FEHILLY C B, PURDY J M, SLATER J M, et al. Factors influencing the success of *in vitro* fertilization for alleviating human infertility[J]. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1984, 1: 3-23.
- [9] SHAPIRO B S, HARRIS D C, RICHTER K S. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73: 582-586.
- [10] FENWICK J, PLATTEAU P, MURDOCH A P, HERBERT M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17: 407-412.

[本文编辑] 魏莎莎, 孙 岩