

# 时差成像系统对胚胎培养效果的探讨

于婉莹, 苏 兴, 崔 静, 曾 彬, 郭婉茹, 韩宝生

**【摘要】目的** 比较时差成像(time-lapse imaging, TLI)技术与体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)传统培养方法二者的培养效果,探讨 TLI 技术能否为胚胎发育及评估提供更有利的条件,从而改善妊娠结局。**方法** 选取作者医院 2022-01~03 月行 IVF-ET 患者 57 例,为验证 TLI 系统的有效性及其可行性,将每位患者的成熟卵子随机等分纳入 TLI 培养组(T<sub>1</sub>组)和传统体外培养组(C<sub>1</sub>组)。比较两组成熟卵子的 2PN 受精率、可移植胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率有无差别。随后收集 2022-03~05 月完全行 TLI 培养 78 个移植周期(T<sub>2</sub>组)及同时期传统体外培养 146 个移植周期(C<sub>2</sub>组)患者的资料,比较两组患者的胚胎指标及妊娠结局。**结果** T<sub>1</sub>组与 C<sub>1</sub>组成熟卵子的 2PN 受精率、可移植胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。T<sub>2</sub>组与 C<sub>2</sub>组患者各胚胎指标差异无统计学差异( $P>0.05$ ),但 T<sub>2</sub>组患者的种植率、临床妊娠率显著高于 C<sub>2</sub>组( $P$ 均 $<0.05$ ),早期流产率显著低于 C<sub>2</sub>组( $P$ 均 $<0.05$ )。**结论** TLI 系统培养效果稳定,可将胚胎发育形态学与动力学相结合,选择发育潜能最优的胚胎进行移植,有效改善临床妊娠结局。

**【关键词】** 时差成像;传统体外培养;胚胎发育潜能;妊娠结局

**【中图分类号】** R 714.8 **【文献标识码】** A doi:10.13730/j.issn.2097-2148.2023.01.006

## Discussion on the Effects of Time-lapse Imaging System on Embryo Culture

YU Wanying, SU Xing, CUI Jing, ZENG Bin, GUO Wanru, HAN Baosheng. Department of Reproductive Genetics, Maternal and Child Health Hospital of Tangshan City, Tangshan Hebei 063000, China

**【Abstract】Objective** To compare the culture effects of time-lapse imaging (TLI) technology and in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) conventional culture methods, and to explore whether TLI technology can improve pregnancy outcomes by providing more advantageous conditions. **Methods** A total of 57 patients who underwent IVF-ET in author's hospital from January to March 2022 were selected. In order to verify the effectiveness and feasibility of the TLI system, the mature ovum of each patient were randomly divided into two groups: TLI culture group (T<sub>1</sub> group) and conventional culture group (C<sub>1</sub> group). The 2PN fertilization rate, transferable embryo rate, high-quality embryo rate, blastocyst formation rate and high-quality blastocyst rate of mature ovum were compared between the two groups. After that, patients' information, concluding 78 transplantation cycles with completely TLI culture (T<sub>2</sub> group) from March to May 2022 and 146 transplantation cycles with conventional culture (C<sub>2</sub> group) were collected during the same time, and the embryo parameters and pregnancy outcomes of the two groups were compared. **Results** There were no significant differences of 2PN fertilization rate, transferable embryo rate, high-quality embryo rate, blastocyst formation rate and high-quality blastocyst rate of mature ovum between T<sub>1</sub> and C<sub>1</sub> groups ( $P>0.05$ ). There were no significant difference in the embryo parameters between the T<sub>2</sub> and C<sub>2</sub> groups (all  $P>0.05$ ), but the implantation rate and clinical pregnancy rate in the T<sub>2</sub> group were significantly higher than those in the C<sub>2</sub> group (all  $P<0.05$ ), and the early miscarriage rate was significantly lower than that in the C<sub>2</sub> group (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** The TLI system has a stable culturing effects. It can combine embryonic morphology and dynamics to select embryos with the best developmental potential for transplantation, which can effectively improve clinical pregnancy outcomes.

**【Key words】** Time-lapse imaging; Conventional culture; Embryonic developmental potential; Pregnancy outcome

随着辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的成熟与推广,如何在多个可移植胚胎中挑选出最具发育潜能的优质胚胎进行移植,进而获

得较高妊娠率的同时降低多胎率已成为各生殖中心研究的重点。传统胚胎评分系统<sup>[1]</sup>依据形态学参数在特定时间点对胚胎质量进行评估,无法将原核过早消失、原核融合、异常卵裂、逆卵裂等胚胎动态发育过程全部观察清楚,且因技术人员评估胚胎具有较大主观性,往往挑选的移植胚胎达不到理想的妊娠结局<sup>[2]</sup>。时差成像(time-lapse imaging, TLI)技术是胚胎实验室近年

**【基金项目】** 河北省 2021 年度医学科学研究课题计划资助项目 (20210396)

**【作者单位】** 063000 河北唐山,唐山市妇幼保健院生殖遗传科(于婉莹、苏 兴、崔 静、曾 彬、韩宝生),产前诊断科(郭婉茹)

来出现的一种新型胚胎培养及观察技术,通过瞬时曝光连续拍摄,对胚胎体外发育过程进行全程监控,获取胚胎发育的动态信息,为筛选胚胎提供更多参数,成为新型无创的胚胎质量评估体系<sup>[3]</sup>。然而应用 TLI 技术培养和筛选胚胎的效果如何,该技术是否能有效改善临床妊娠结局,目前尚存在争议。有学者提出,TLI 培养箱中高频曝光或电磁场可能不利于胚胎生长<sup>[4]</sup>。并且 TLI 培养系统需在卵母细胞受精早期脱颗粒,由此带来的机械刺激是否影响后期胚胎发育也是胚胎学家们的顾虑之一。本文旨在观察 TLI 体系培养效果,比较 TLI 培养与传统体外培养的胚胎发育情况,探讨是否能通过该培养体系准确评估胚胎发育潜能进而改善临床妊娠结局。

## 1 对象与方法

### 1.1 一般对象及分组

将作者医院 2022-01~03 月接受体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)治疗的 57 例不孕患者作为研究对象。根据卵子的培养方式不同,将每位患者每周期的成熟卵子随机等分为 TLI 培养组(T<sub>1</sub>组)和传统方法培养组(C<sub>1</sub>组)。随后收集 2022-03~05 月完全行 TLI 培养 78 个移植周期(T<sub>2</sub>组)及同时期传统体外培养 146 个移植周期(C<sub>2</sub>组)患者的资料,分析患者的胚胎情况及妊娠结局。纳入标准:常规 IVF 周期,长方案促排卵者;女方年龄≤38 岁者;获卵数 10~30 枚者;促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)≤12 IU/L 者。排除标准:子宫内膜疾病或其他宫腔疾病者;反复流产者;男性因素所致不孕者。

### 1.2 研究方法

1.2.1 授精及胚胎培养 取卵后 2~4 h 行常规 IVF,加精浓度 1~2×10<sup>6</sup>/ml。授精后 5 h 将 T<sub>1</sub>组、T<sub>2</sub>组卵子去除颗粒细胞放入 Embryo-slide 培养皿(Vitrolife, 丹麦),置于 Embryoscope + TLI 培养箱(Vitrolife, 丹麦)培养。设置 TLI 培养箱的拍摄间隔为 10 min,曝光时间为 9 ms,连续培养 6 天。C<sub>1</sub>组、C<sub>2</sub>组直接捡入 G<sub>1</sub>培养液(Vitrolife, 丹麦),放入常规培养箱培养,培养 6 天。

1.2.2 胚胎选择及移植 T<sub>1</sub>组:动态观察并记录原核数目、评分、出现及消失的时间,卵裂球数目、均匀度、分裂模式、细胞周期持续时间,囊胚形成时间、内细胞团及滋养层评分等,综合形态学及各项胚胎发育动力学参数进行移植胚胎筛选;C<sub>1</sub>组:分别于 D1~D6 固定时间点对配子及胚胎进行观察,依据形态

学参数对胚胎进行评估,并选择形态学最优的胚胎进行移植。

### 1.3 实验室数据质控指标

IVF 2PN 受精率(2PN 卵子数/IVF 加精卵子总数×100%);D3 可利用胚胎率(D3 可利用胚胎数/卵裂胚胎数×100%);D3 优质胚胎率(D3 优质胚胎数/正常受精卵裂胚胎数×100%);囊胚形成率(2 期及 2 期以上囊胚数/培养囊胚数×100%);可利用囊胚率(可利用囊胚数/囊胚形成数×100%);优质囊胚率(优质囊胚数/囊胚形成数×100%);新鲜周期临床妊娠率(临床妊娠周期数/新鲜移植周期数×100%);种植率(孕囊数/新鲜移植胚胎数×100%);早期流产率(流产周期数/新鲜移植周期数×100%)。以上指标计算公式均来自人类 ART 胚胎实验室数据质控专家共识<sup>[5]</sup>。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。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,计数资料以百分比(%)表示,采用  $\chi^2$  检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两种培养方式对患者卵子培养效果比较

两组成熟卵子的 2PN 受精率、可移植胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 两组成熟卵子的培养效果比较(%)

Table 1 Comparison of culture effects of mature ovum between two groups (%)

项目	T <sub>1</sub> 组	C <sub>1</sub> 组	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
2PN 受精率	75.54(281/372)	75.07(277/369)	0.022	0.882
可移植胚胎率	85.20(236/277)	85.66(233/272)	0.024	0.878
优质胚胎率	27.44( 76/277)	24.27( 66/272)	0.720	0.396
囊胚形成率	61.68(103/167)	60.37( 99/164)	0.059	0.807
优质囊胚率	35.92( 37/103)	32.32( 32/ 99)	0.291	0.590

### 2.2 两组患者的基本资料比较

两组患者年龄、不孕年限、体质量指数(body mass index, BMI)、FSH、抗缪勒管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)、促性腺激素(gonadotropins, Gn)用药天数、平均获卵数、平均移植胚胎数差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。

### 2.3 两种培养方式胚胎质量的比较

T<sub>2</sub>组与 C<sub>2</sub>组的 2PN 受精率、可移植胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 3。

表 2 两组患者基本资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of basic data of patients between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	T <sub>2</sub> 组(n=78)	C <sub>2</sub> 组(n=146)	t 值	P 值
年龄(岁)	30.19±4.39	30.72±4.51	0.846	0.399
不孕年限(年)	3.61±3.24	3.54±2.97	0.163	0.871
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	21.67±3.33	21.59±3.41	0.169	0.866
FSH(mIU/ml)	6.21±1.55	6.35±1.87	0.565	0.572
AMH(ng/ml)	2.98±0.33	2.96±0.34	0.424	0.672
Gn 用药天数(天)	12.04±2.31	12.33±2.36	0.883	0.378
平均获卵数(个)	14.04±2.22	13.91±2.35	0.402	0.688
平均移植胚胎数(个)	1.75±0.15	1.74±0.20	0.387	0.699

表 3 两种培养方式胚胎质量比较 (%)

Table 3 Comparison of embryo quality between two culture modes (%)

项目	T <sub>2</sub> 组	C <sub>2</sub> 组	χ <sup>2</sup> 值	P 值
2PN 受精率	75.55(825/1092)	75.10(1535/2044)	0.078	0.780
可移植胚胎率	85.24(693/ 813)	85.07(1282/1507)	0.012	0.912
优质胚胎率	27.06(220/ 813)	24.02( 362/1507)	2.595	0.107
囊胚形成率	62.60(308/ 492)	59.63( 520/ 872)	1.162	0.281
优质囊胚率	35.71(110/ 308)	32.69( 170/ 520)	0.789	0.374

### 2.4 两种培养方式妊娠结局比较

与 C<sub>2</sub> 组相比, T<sub>2</sub> 组种植率、临床妊娠率均显著高于 C<sub>2</sub> 组(P 均<0.05), 早期流产率显著低于 C<sub>2</sub> 组(P<0.05), 见表 4。

表 4 两种培养方式妊娠结局比较 (%)

Table 4 Comparison of pregnancy outcomes between two culture modes (%)

项目	T <sub>2</sub> 组	C <sub>2</sub> 组	χ <sup>2</sup> 值	P 值
临床妊娠率	74.35(58/ 78)	60.27( 88/146)	4.444	0.035
种植率	54.02(74/137)	42.13(107/254)	5.059	0.024
早期流产率	3.45( 2/ 58)	13.64( 12/ 88)	4.186	0.041

### 3 讨论

TLI 技术将传统胚胎培养装置与光学成像技术相结合, 在培养箱内配置胚胎显微成像系统, 可在固定的时间间隔点采用不同焦距对胚胎进行数次拍摄, 获取不同层面的影像<sup>[6]</sup>, 实时记录从原核出现到囊胚结束的全部时间参数和胚胎各阶段的分裂过程, 现已被越来越多的生殖中心应用于胚胎培养和实验研究<sup>[7-9]</sup>。作者医院 2022-01 月启用 TLI 培养箱, 为验证培养体系的安全性及有效性, 前期将每位患者满足培养条件的卵子随机分为传统培养箱培养和 TLI 培养箱培养, 结果显示, 两种培养方法 2PN 受精率、可移植胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率无统计学差异, 但 TLI 培养组优质胚胎率、优质囊胚率及囊胚形成率均有上升趋势, 提示 TLI 培养体系安全可靠, 可放心

使用。

研究表明, TLI 培养技术不会影响胚胎发育, 其培养效果甚至优于传统培养体系<sup>[10-11]</sup>。本研究将 78 个 TLI 培养周期(T<sub>2</sub>组)与 146 个传统方法培养周期(C<sub>2</sub>组)患者的资料作比较, 结果显示, 两组 2PN 受精率、可移植胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率及优质囊胚率差异均无统计学意义(P>0.05), 提示两种培养体系均稳定, 培养效果无统计学差异。TLI 培养系统相对于传统培养方法, 可避免培养箱频繁开关及减少胚胎室温下暴露时间, 保持胚胎培养环境, 尤其是温度、湿度和 pH 值稳定, 有利于获得高质量的胚胎<sup>[12]</sup>。研究证实, 集合培养的胚胎分泌出来的生长因子能够相互作用带来更好的互利培养环境<sup>[13]</sup>。TLI 采用的集簇培养方式能使每个胚胎获得最佳的发育条件, 更利于囊胚形成。本研究中, T<sub>1</sub> 组优质胚胎率、优质囊胚率及囊胚形成率与 C<sub>1</sub> 组比较无统计学差异(P>0.05), 可能由于统计例数不足, 需扩大样本量继续观察。

胚胎的分裂及发育是一系列复杂的动态过程, 有研究表明, 两个形态学相同的胚胎可能经历完全不同的发育过程<sup>[14]</sup>。传统胚胎学评分仅在特定时间点对胚胎进行观察, 依据形态学参数对移植胚胎进行评估和筛选, 存在一定的局限性<sup>[15-16]</sup>。TLI 技术获取的胚胎动态发育信息量要远远多于传统静态评分, 包括原核的形成、消失及数量异常, 各卵裂期时间点, 卵裂行为异常等, 进而为选择高发育潜能胚胎移植提供更多参考信息<sup>[17]</sup>。Reignier 等<sup>[18]</sup>研究证明, TLI 应用形态动力学参数挑选胚胎显著提升了移植种植率和临床妊娠率。Kalleas 等<sup>[19]</sup>研究显示, 与传统培养组相比, TLI 培养组活产率显著升高, 临床早期流产率显著降低。本研究结果显示, 相对于 C<sub>2</sub> 组, 使用 TLI 技术挑选胚胎移植后, T<sub>2</sub> 组的临床妊娠率提高 14%, 种植率提高 12%, 早期流产率下降 10%, 差异均具有统计学意义(P<0.05)。非整倍体或基因异常是诱发胚胎异常卵裂的主要原因<sup>[20]</sup>, 通常表现为直接卵裂(1 个卵裂球直接裂解为 2 个以上的细胞)、逆卵裂(其中 2 个卵裂球融合为 1 个)、不均等卵裂等<sup>[21]</sup>。一些早期卵裂异常的胚胎可能并未表现出形态学上异常, 亦可发育成优质胚胎进行移植, 但此类胚胎可能具有较高的染色体异常风险, 通过传统培养方法无法对其进行识别和筛选, 往往此类胚胎移植后发育潜能较差, 导致低着床率、低妊娠率和高流产率<sup>[22]</sup>。这就解释了在优质胚胎率和成囊率无差别的情况下, TLI 组的胚胎种植率和临床妊娠率会显著高于传统培养组。研究证明, 逆卵裂胚胎的移植成功率几乎为 0%<sup>[23]</sup>, 由直接卵裂发

育而来的胚胎种植率下降,流产率增高<sup>[24]</sup>。TLI 可识别一些形态学正常而卵裂模式异常的胚胎,本研究在 T<sub>2</sub> 组选择移植胚胎时,通过卵裂模式筛选已将此类胚胎进行排除,故在妊娠率升高的同时降低了早期流产率。

TLI 系统保证培养环境稳定的同时采用动态指标联合形态学评估筛选优质胚胎,可降低非整倍体风险,继而提高胚胎着床潜能,改善临床妊娠结局,是胚胎培养安全有效的方法。但由于目前作者医院应用 TLI 时间较短,样本例数及随访周期有限,后续作者将扩大数据量继续观察 TLI 系统的临床应用价值,以便对 TLI 技术的安全性及有效性做出更全面的评估。

### 参 考 文 献

- [1] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting[J]. Hum Reprod, 2011, 26(6): 1270-1283
- [2] Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers[J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(4): 459-471
- [3] Barberet J, Chammas J, Bruno C, et al. Randomized controlled trial comparing embryo culture in two incubator systems: G185 K-System versus EmbryoScope[J]. Fertil Steril, 2018, 109(2): 302-309
- [4] Meseguer M, Herrero J, Tejera A, et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation[J]. Hum Reprod, 2011, 26(10): 2658-2671
- [5] 孙青, 黄国宁, 孙海翔, 等. 胚胎实验室关键指标质控专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(9): 836-851
- [6] Lundin K, Park H. Time-lapse technology for embryo culture and selection[J]. Ups J Med Sci, 2020, 125(2): 77-84
- [7] 李国臻, 耿亚松, 杨志伟, 等. 时差成像系统对 IVF-ET 结局的改善及其优选模型初探[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(1): 25-29
- [8] Alhelou Y, Mat Adenan NA, Ali J. Embryo culture conditions are significantly improved during uninterrupted incubation: A randomized controlled trial[J]. Reprod Biol, 2018, 18(1): 40-45
- [9] 郑爱燕, 王玮, 蒲艳, 等. 胚胎发育形态学和动力学特征在胚胎选择中的应用价值[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(5): 588-593
- [10] Chen M, Wu Y, Huang X, et al. Embryo incubation by time-lapse systems versus conventional incubators in Chinese women with diminished ovarian reserve undergoing IVF/ICSI: A study protocol for a randomised controlled trial[J]. BMJ Open, 2020, 10(11): e038657
- [11] Chera-Aree P, Thanaboonyawat I, Thokha B, et al. Comparison of pregnancy outcomes using a time-lapse monitoring system for embryo incubation versus a conventional incubator in in vitro fertilization: An age-stratification analysis[J]. Clin Exp Reprod Med, 2021, 48(2): 174-183
- [12] Meseguer M, Rubio I, Cruz M, et al. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study[J]. Fertil Steril, 2012, 98(6): 1481-1489
- [13] 唐永梅, 秦祖兴, 李忻琳. 胚胎培养密度对胚胎发育潜能的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(1): 118-120
- [14] Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(10): 1115-1121
- [15] Rubio I, Galán A, Larreategui Z, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: A randomized, controlled trial of the EmbryoScope[J]. Fertil Steril, 2014, 102(5): 1287-1294. e5
- [16] Boucrot L, Tramon L, Saulnier P, et al. Change in the strategy of embryo selection with time-lapse system implementation-impact on clinical pregnancy rates[J]. J Clin Med, 2021, 10(18): 4111
- [17] Gomez T, Feyeux M, Boulant J, et al. A time-lapse embryo dataset for morphokinetic parameter prediction[J]. Data Brief, 2022, 42: 108258
- [18] Reignier A, Girard JM, Lammers J, et al. Performance of Day 5 KIDScore? morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer[J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(11): 2279-2285
- [19] Kalleas D, McEvoy K, Horne G, et al. Live birth rate following undisturbed embryo culture at low oxygen in a time-lapse incubator compared to a high-quality benchtop incubator[J]. Hum Fertil (Camb), 2022, 25(1): 147-153
- [20] Yang ST, Shi JX, Gong F, et al. Cleavage pattern predicts developmental potential of day 3 human embryos produced by IVF[J]. Reprod Biomed Online, 2015, 30(6): 625-634
- [21] Ferraretto X, Hammam K, Llabador MA, et al. Early embryo development anomalies identified by time-lapse system: Prevalence and impacting factors[J]. Reprod Biomed Online, 2021, 43(4): 627-636
- [22] Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: High prevalence and association with embryo development[J]. Fertil Steril, 2014, 101(6): 1637-1648. e1-e5
- [23] Barrie A, Homburg R, McDowell G, et al. Preliminary investigation of the prevalence and implantation potential of abnormal embryonic phenotypes assessed using time-lapse imaging[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 34(5): 455-462
- [24] Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: A meta-analysis[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 35(5): 511-520

(2022-07-11 收稿)