



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

时差成像干式培养与传统湿式培养应用于不同年龄胚胎发育的效果

张豆豆, 王静, 刘淼, 卢大儒, 刘素英

引用本文:

张豆豆,王静,刘淼,卢大儒,刘素英. 时差成像干式培养与传统湿式培养应用于不同年龄胚胎发育的效果[J]. 中国临床医学, 2022, 29(4): 680–684.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220345>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高孕激素促排卵与克罗米芬微刺激方案在卵巢低储备患者取卵周期的可控性比较

Controllability comparison between progestin-primed ovarian stimulation and mild stimulation protocols in patients with diminished ovarian reserve in oocytes retrieval cycle

中国临床医学. 2021, 28(4): 539–543 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210409>

阴道超声引导下胚胎移植对反复种植失败患者妊娠结局的影响

Effect of transvaginal ultrasound-guided embryo transfer on pregnancy outcome in patients with repeated implantation failure

中国临床医学. 2020, 27(5): 761–763 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20192263>

三甲医院医务人员甲状腺超声特征分析

Analysis of thyroid ultrasonic characteristics of medical staff

中国临床医学. 2022, 29(1): 79–83 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20210030>

结节型与团块渗出型肺隐球菌病的临床特征分析

Clinical characteristics of nodular and massive exudative pulmonary cryptococcosis

中国临床医学. 2021, 28(6): 969–973 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20212161>

门诊无麻醉阴道内镜技术对绝经后女性宫腔病变的应用价值

The value of outpatient non-anesthesia vaginal endoscopic technique for uterine lesions in postmenopausal women

中国临床医学. 2022, 29(3): 459–463 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20212735>

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220345

· 技术与方法 ·

时差成像干式培养与传统湿式培养应用于不同年龄胚胎发育的效果

张豆豆^{1,2}, 王 静¹, 刘 森¹, 卢大儒^{2*}, 刘素英^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院生殖医学中心, 上海 200032

2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200000

引用本文 张豆豆, 王 静, 刘 森, 等. 时差成像干式培养与传统湿式培养应用于不同年龄胚胎发育的效果 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(4): 680-684. ZHANG D D, WANG J, LIU M, et al. Effects of time-lapse dry culture and conventional wet culture on embryonic development in different age females[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2022, 29(4): 680-684.

[摘要] **目的** 评价时差成像技术(time-lapse, TL)干式培养与传统湿式培养对不同年龄胚胎发育的影响。**方法** 回顾性分析2020年7月至2021年12月2390个周期体外胚胎培养情况。TL组共培养640个周期, 传统湿式培养组(对照组)共培养1750个周期。两组女方年龄、不孕类型、不孕因素、促排卵药物(gonadotropin, Gn)用量、受精方式差异均无统计学意义。比较不同年龄女方中, 两组间正常受精率、正常卵裂率、有效胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率和优质囊胚率。**结果** 20~29岁: TL组有效胚胎率(75.39% vs 70.15%)、优质胚胎率(49.79% vs 41.98%)均高于对照组($P<0.01$); 30~34岁: TL组优质胚胎率(46.70% vs 41.43%)、囊胚形成率(57.14% vs 52.74%)、优质囊胚率(35.82% vs 32.26%)均高于对照组($P<0.05$); ≥ 40 岁: TL组优质胚胎率(44.05% vs 48.96%)、囊胚形成率(34.9% vs 46.24%)及优质囊胚率(16.11% vs 21.77%)均低于对照组($P<0.05$)。**结论** 与常规湿式培养相比, 女方20~34岁时, TL培养可显著提高胚胎发育成功率, 女方 ≥ 40 岁时则效果较差。

[关键词] 时差成像技术; 胚胎培养; 囊胚培养; 渗透压**[中图分类号]** R 711.6 **[文献标志码]** A

Effects of time-lapse dry culture and conventional wet culture on embryonic development in different age females

ZHANG Dou-dou^{1,2}, WANG Jing¹, LIU Miao¹, LU Da-ru^{2*}, LIU Su-ying^{1*}

1. Reproductive Medicine Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200000, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of time-lapse (TL) dry culture and traditional wet culture on embryonic development in different age female groups. **Methods** From July 2020 to December 2021, retrospective analysis of data from 2390 cycles of embryo culture *in vitro*, including 640 cycles in the TL group and 1750 cycles in the traditional wet culture group (control group). There were no significant differences in age of females, infertility type, infertility factors, dosage of gonadotropin (Gn), and fertilization methods between the two groups. The rates of fertilization, cleavage, transferable embryo, high-quality embryo, blastocyst, high-quality blastocyst were compared between the two groups in different age females. **Results** In the 20-29 year old females: the effective embryo rate (75.39% vs 70.15%) and the high-quality embryo rate (49.79% vs 41.98%) in the TL group were significantly higher than those in the control group ($P<0.01$). In the 30-34 year females: the high-quality embryo rate (46.70% vs 41.43%), the blastocyst formation rate (57.14% vs 52.74%), the high-quality blastocyst rate (35.82% vs 32.26%) in the TL group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). In the ≥ 40 -year-old females: the high-quality embryo rate (44.05% vs 48.96%), the blastocyst formation rate (34.9% vs 46.24%) and the high-quality blastocyst rate (16.11% vs 21.77%) in the TL group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusions** Compared with conventional wet culture, TL culture can significantly increase the success rate of embryonic development in 20-34 years old females, while the effect is not good in the older females (≥ 40 years old).

[收稿日期] 2022-02-25 **[接受日期]** 2022-07-18**[基金项目]** 国家自然科学基金(81971345). Supported by National Natural Science Foundation of China (81971345).**[作者简介]** 张豆豆, 硕士生. E-mail: zhangdd021@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31246619, E-mail: drlu@fudan.edu.cn; Tel: 021-60265937, E-mail: lsy6592@163.com

[Key Words] time-lapse; embryo culture; blastocyst culture; osmolality

体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 是治疗不孕症的有效手段, 而胚胎体外培养是 IVF-ET 的关键环节。胚胎培养箱模拟体内环境, 保持 pH 值、温度、气体含量、渗透压和湿度与体内一致。尽管培养箱中覆盖油的培养皿消除了 pH 值和温度的变化, 但难以克服培养基渗透压变化的影响。Yumoto 等^[1]发现, 干式培养箱内培养基渗透压不稳定; Boumerdassi 等研究^[2]发现, 无论培养皿中矿物油含量如何, 干式培养箱中微滴的渗透压在培养 3 d 后都明显升高。此外, Fawzy 等^[3]的前瞻性随机对照研究表明, 干式培养与湿式培养相比显著降低了着床率及临床妊娠率。

时差成像 (time-lapse, TL) 技术是近年来发展的一种新型胚胎培养与胚胎实时观察技术, 其有效性和安全性备受关注^[4-6]。与传统培养时需频繁拿取胚胎至箱外观察不同, TL 能为胚胎提供更稳定的培养环境, 不用开箱即可动态观察受精及胚胎

发育情况^[5]。然而, 应用于干式 TL 培养箱培养时, 随着培养时间的延长, 渗透压也随之发生变化^[7]。TL 培养渗透压变化对胚胎发育的影响须进一步确定。因此, 本研究以传统湿式培养为对照, 结合培养 5 d 后微滴渗透压变化, 分析 TL 培养箱中不同年龄女性胚胎发育的效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性选择 2020 年 7 月至 2021 年 12 月在本院第 1 次行 IVF-ET 治疗的 2 390 对夫妻, 胚胎培养共 2 390 个周期, 其中 TL 组 640 对夫妻 640 个周期, 对照组 1 750 对夫妻 1 750 个周期。两组女方年龄、不孕类型、不孕因素、女方体质量指数 (BMI)、基础卵泡刺激素 (FSH) 水平、基础黄体生成素 (LH) 水平、促性腺激素 (Gn) 用量、受精方式和平均获卵数等差异均无统计学意义 (表 1)。

表 1 两组患者临床特征比较

项目	TL 组 (n=640)	对照组 (n=1 750)	P 值
女方年龄/岁	35.1±5.3	35.3±5.7	0.586
不孕类型 n(%)			0.353
原发	298(46.56)	832(47.54)	
继发	342(53.43)	918(52.45)	
不孕原因 n(%)			
女方	534(83.43)	1 466(83.77)	0.851
男方	63(9.84)	142(8.11)	0.187
双方	31(4.84)	103(5.89)	0.367
不明原因	12(1.88)	39(2.23)	0.749
女方 BMI/(kg·m ⁻²)	21.79±2.82	21.63±3.10	0.449
基础 FSH/(U·L ⁻¹)	6.52±2.88	6.31±2.64	0.362
基础 LH/(U·L ⁻¹)	3.88±3.04	3.96±2.67	0.162
受精方式			0.261
IVF	493(77.03)	1 307(74.68)	
ICSI	147(22.96)	443(25.31)	
Gn			0.465
总量/U	1 530.7±837.7	1 332.2±938.8	
应用天数	8.1±2.5	7.5±3.1	0.258
平均获卵数/枚	9.6±6.1	8.8±6.8	0.107

1.2 胚胎培养方法及渗透压的测量 两组分别应用 ASTEC APM-50D 湿式三气培养箱和 ESCO Miri-TL 干式培养箱, 采用一步法胚胎培养液 (vitrolife

GTL) 培养。采卵前 1 d 配液充分覆油并过夜平衡。渗透压检测: 取过夜平衡后的培养液 50 μL, 等分后放入渗透压计样品管中, 立即用德国

GONOTEC 冰点渗透压仪 OSMOMAT 030 进行渗透压测试,每份样品重复测试3次以确保测值准确性。对于每组测试样品,每次从培养箱中取出1个培养皿来测量渗透压,其他留在培养箱中。同一天要测量的培养皿放于培养箱同一腔室。测试前每天校准渗透压计,测试时间点保持一致。

1.3 胚胎获取 所有研究对象均采用拮抗剂方案,于月经后第2天或第3天,给予重组人促卵泡激素(rhFSH, G-F, 默克)75~300 U/d促排卵,根据患者年龄、窦卵泡数(AFC)、抗缪勒管激素(AMH)、BMI确定启动剂量。当主导卵泡直径达14 mm或LH>10 U/L时加用促性腺激素释放激素拮抗剂GnRH-ant至注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)日。扳机后36~38 h取卵。根据患者情况,于获卵后2~4 h行常规体外受精(IVF)或卵胞浆内单精子注射受精(ICSI);授精后16~18 h检查受精情况,并继续培养至第5天或第6天,根据临床情况进行新鲜胚胎移植或胚胎冷冻保存。

1.4 胚胎质量评估 常规湿式培养第2天或第3天评估卵裂期胚胎情况,第5天或第6天评估胚胎囊胚发育情况。受精后第3天参考Braiden标准对卵裂期胚胎质量进行评分,正常受精7~9个细胞、评分1~2级的胚胎为优质胚胎; ≥ 6 个细胞、评分3级及以上的胚胎为有效胚胎^[8]。受精后第5~6天参考Gardner等^[9]的方法对囊胚质量进行评分,优于3BB定义为优质囊胚。TL培养除卵裂期和囊胚期常规观察外,每5 min记录1次胚胎图像,生成动态胚胎发育视频^[5]。

比较两组正常受精率、正常卵裂率、有效胚胎率、优质胚胎率、囊胚形成率和优质囊胚率等。正常受精率=正常受精数/获卵数 $\times 100\%$;正常卵裂率=正常卵裂数/总受精数 $\times 100\%$;有效胚胎率=有效胚胎数/正常卵裂数 $\times 100\%$;优质胚胎率=优质胚胎数/正常卵裂数 $\times 100\%$;囊胚形成率=囊胚形成数/培养囊胚数 $\times 100\%$;优质囊胚率=优质囊胚数/培养囊胚数 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学处理 采用SPSS 19.0进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 渗透压测量结果 结果(图1)显示:两组微滴渗透压在培养期间均增加。培养第3天,TL组微滴的渗透压增加约14.6 mOsm/kg(5.4%),对照组增加约5.0 mOsm/kg(1.8%, $P=0.222$);培养第5天,TL组渗透压3次测量平均值约为300 mOsm/kg,达最高值,增加28.6 mOsm/kg(10.6%),对照组增加约12.0 mOsm/kg(4.4%, $P=0.052$)。

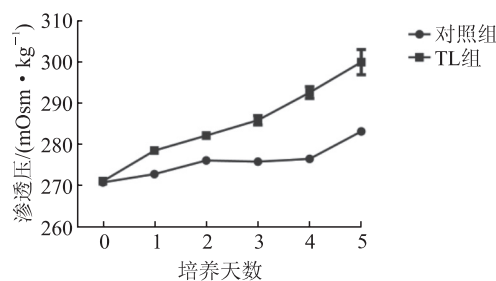


图1 两组渗透压变化

2.2 两组女方不同年龄胚胎发育情况比较 结果(表2)显示:20~29岁:TL组有效胚胎率、优质胚胎率均显著高于对照组($P<0.01$);30~34岁:TL组优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率均高于对照组($P<0.05$);35~39岁:TL组各指标与对照组差异无统计学意义; ≥ 40 岁:TL组优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率均低于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

一步法培养基结合台式TL培养近年来已在辅助生殖领域得到较多应用,其优点为不需要开箱即可动态观察胚胎发育,为胚胎选择提供更多依据。但是,其培养效果目前存在争议。2012年,Kirkegaard等^[10]将TL培养和常规湿式培养效果进行比较,以第2天4个细胞、第3天7~8个细胞、第5天囊胚形成率和种植率为评估指标,结果显示两组间差异无统计学意义。Sciorio等^[11]发现TL培养第2天和第3天的优质胚胎率高于常规培养方法,而第5天或第6天的优质囊胚率与常规培养方法差异无统计学意义。2018年Barberet等^[12]的随机对照研究显示,TL培养第3天优质胚胎率高于常规培养。

表2 女方不同年龄组两种培养箱胚胎发育比较

年龄	正常受精率	正常卵裂率	有效胚胎率	优质胚胎率	囊胚形成率	优质囊胚率	%
20~29岁							
TL组(<i>n</i> =99)	81.37(734/902)	96.87(711/734)	75.39(536/711)**	49.79(354/711)**	55.43(296/534)	33.33(178/534)	
对照组(<i>n</i> =265)	82.35(2 034/2 470)	96.51(1 963/2 034)	70.15(1 377/1 963)	41.98(824/1 963)	56.62(633/1 118)	32.47(363/1 118)	
30~34岁							
TL组(<i>n</i> =198)	83.05(1 298/1 563)	97.00(1 259/1 298)	74.66(940/1 259)	46.70(588/1 259)**	57.14(552/966)*	35.82(346/966)*	
对照组(<i>n</i> =580)	82.64(3 913/4 735)	98.21(3 843/3 913)	72.76(2 796/3 843)	41.43(1 592/3 843)	52.74(1 231/2 334)	32.26(753/2 334)	
35~39岁							
TL组(<i>n</i> =217)	81.53(1 068/1 310)	97.75(1 044/1 068)	71.93(751/1 044)	45.50(475/1 044)	50.80(381/750)	31.73(238/750)	
对照组(<i>n</i> =480)	80.97(2 046/2 527)	98.14(2 008/2 046)	72.71(1 460/2 008)	44.12(886/2 008)	51.68(553/1 070)	28.32(303/1 070)	
≥40岁							
TL组(<i>n</i> =126)	82.36(467/567)	97.22(454/467)	73.79(335/454)	44.05(200/454)*	34.9(104/298)**	16.11(48/298)*	
对照组(<i>n</i> =425)	82.78(1 125/1 359)	98.22(1 105/1 125)	76.83(849/1 105)	48.96(541/1 105)	46.24(240/519)	21.77(113/519)	
总计(<i>n</i> =2 390)							
TL组(<i>n</i> =640)	82.15(3 567/4 342)	97.22(3 468/3 567)	73.88(2 562/3 468)	46.63(1 617/3 468)**	52.32(1 333/2 548)	31.79(810/2 548)	
对照组(<i>n</i> =1 750)	82.21(9 118/11 091)	97.82(8 919/9 118)	72.68(6 482/8 919)	43.09(3 843/8 919)	52.71(2 657/5 041)	30.39(1 532/5 041)	

P*<0.05、*P*<0.01 同年龄段两组间相比。

目前这2种培养方式在不同女方年龄组的应用效果鲜见报道。本研究发现,在女方低龄(20~34岁)组,TL组胚胎发育情况优于常规培养;在高龄组(≥40岁),TL组优质胚胎率、囊胚形成率和优质囊胚率则显著降低;年龄34~39岁,两组间胚胎发育情况差异无统计学意义。随着培养时间的延长,TL组微滴渗透压明显增加,第5天渗透压接近培养基最高阈值,提示TL培养箱中微滴水分随培养时间延长逐渐蒸发,因此渗透压逐渐增加,虽然与对照组差异无统计学意义,但仍有参考价值。文献^[13]表明,渗透压增加至300 mOsm/kg时,小鼠胚胎发育潜能急剧下降。虽然该渗透压阈值在人类尚未明确,但人与鼠生殖道生理特性相似,提示人类与小鼠体外渗透压要求可能相当^[14]。本研究中,渗透压改变并没有影响年轻女性胚胎的发育,可能与年轻女性卵子质量佳,能对抗渗透压改变有关,但对于高龄(≥40岁)患者,胚胎发育潜能本身较差,对环境特别是渗透压的改变更为敏感,渗透压的增加显著抑制了胚胎的发育潜能,降低了囊胚形成率及优质囊胚率。

综上所述,本研究显示,干式TL结合一步法培养基较传统湿式培养在年轻女性体外胚胎培养中更有优势,但是随着培养时间的延长,渗透压逐渐升高,对高龄女性胚胎发育呈现不利影响,提示高龄女性胚胎培养可能更适用传统湿式方法。如

何充分利用TL培养优点,又能克服长时间培养后渗透压的改变可能须获得辅助生殖领域更多的关注,开发可加水的湿式TL培养箱可能有帮助。此外,本研究为单中心回顾性研究,未来需要多中心更大样本RCT研究验证TL培养对胚胎发育潜能的影响。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] YUMOTO K, IWATA K, SUGISHIMA M, et al. Unstable osmolality of microdrops cultured in non-humidified incubators[J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(8): 1571-1577.
- [2] BOUMERDASSI Y, HUET S, MILLIN M, et al. Impact of the type of incubator (non-humidified versus humidified) on embryo culture media osmolality[J]. Gynecol Obstet Fertil Senol, 2021, 49(6): 522-528.
- [3] FAWZY M, ABDELRAHMAN M Y, ZIDAN M H, et al. Humid versus dry incubator: a prospective, randomized, controlled trial[J]. Fertil Steril, 2017, 108(2): 277-283.
- [4] 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.
- [5] MOTATO Y, DE LOS SANTOS M J, ESCRIBA M J, et

- al. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system[J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(2): 376-384.e9.
- [6] YANG L L, CAI S F, ZHANG S P, et al. Single embryo transfer by Day 3 time-lapse selection versus Day 5 conventional morphological selection: a randomized, open-label, non-inferiority trial[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(5): 869-876.
- [7] MESTRES E, GARCIA-JIMENEZ M, CASALS A, et al. Factors of the human embryo culture system that may affect media evaporation and osmolality[J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(3): 605-613.
- [8] KRISHER R L, SCHLENKER T. Culture of human preimplantation embryos in a clinical ART Setting [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2006: 355-371.
- [9] GARDNER D K, SCHOOLCRAFT W B. Culture and transfer of human blastocysts[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1999, 11(3): 307-311.
- [10] KIRKEGAARD K, HINDKJAER J J, GRONDAHL M L, 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.
- [11] SCIORIO R, THONG J K, PICKERING S J. Comparison of the development of human embryos cultured in either an EmbryoScope or benchtop incubator[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(3): 515-522.
- [12] 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. e1.
- [13] RICHARDS T, WANG F, LIU L, et al. Rescue of postcompaction-stage mouse embryo development from hypertonicity by amino acid transporter substrates that may function as organic osmolytes[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(4): 769-777.
- [14] HARRIS S E, GOPICHANDRAN N, PICTON H M, et al. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract[J]. *Theriogenology*, 2005, 64(4): 992-1006.

[本文编辑] 姬静芳