

早期胚胎质量评估：提高预测胚胎发育潜能的敏感性和特异性

李楠, 黎靖宇, 唐永梅, 韦继红(广西柳州市妇幼保健院生殖健康助孕中心, 广西壮族自治区柳州市 545001)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 胚胎发育潜能的评估将直接影响胚胎移植的选择和辅助生殖的临床结局。形态学评估方法由于其快速、无创、简单等特点而得到广泛的应用。
- 2 文章增加的新信息: 形态学评分系统与实时成像分析系统相结合对早期胚胎发育过程连续观察便于选择优胚。通过分析培养液中的代谢产物变化来预测胚胎发育潜能、胚胎源性细胞因子; 针对基因、染色体异常而产生的植入前遗传学筛查法等以期找到更有效地评估胚胎发育潜能的标记物, 提高预测胚胎发育潜能的敏感性和特异性。
- 3 临床应用的意义: 总结早期胚胎发育能力评分方法, 对有效地提高辅助生殖技术的临床妊娠率并减少多胎率有重要意义。

关键词:

组织构建; 组织工程; 辅助生殖技术; 胚胎发育; 早期胚胎发育潜能评估方法

主题词:

生殖技术, 辅助; 胚胎发育; 技术评估, 生物医学

基金资助:

广西卫生厅自筹经费科研项目(Z22010457)

摘要

背景: 胚胎发育潜能的评估将直接影响胚胎移植的选择和辅助生殖的临床结局。

目的: 对早期胚胎发育潜能评估的方法进行归纳分析。

方法: 由第一作者检索 1990 年 1 月至 2013 年 12 月 PubMed 数据库相关文章, 检索词为“Assisted Reproductive Technology, ART; Pre-implantation Embryo; Embryonic development viability; Evaluation methods”, 文献语言限制在英文。根据纳入排除标准, 最终纳入 63 条进行分析探讨。

结果与结论: 形态学评估方法由于其快速、无创、简单等特点而得到广泛的应用。但随着辅助生殖技术的发展, 新的胚胎评估方法成为研究的热点, 形态学评分系统与实时成像分析系统相结合对早期胚胎发育过程连续观察便于选择优胚。通过分析培养液中的代谢产物变化来预测胚胎发育潜能(丙酮酸、葡萄糖、氨基酸等)、胚胎源性细胞因子(可溶性人白细胞抗原 G1、血小板活化因子等); 针对基因、染色体异常而产生的植入前遗传学筛查法等以期找到更有效地评估胚胎发育潜能的标记物。

李楠, 黎靖宇, 唐永梅, 韦继红. 早期胚胎质量评估: 提高预测胚胎发育潜能的敏感性和特异性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(42):6849-6855.

Assessment for early embryo quality improves the sensitivity and specificity to predicting embryonic development potential

Li Nan, Li Jing-yu, Tang Yong-mei, Wei Ji-hong (Reproductive Medicine Center, Maternal and Child Health Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Embryo viability assessment is directly related to the selection of embryo transplantation and clinical outcome of assisted reproduction.

OBJECTIVE: To summarize the assessment methods for early embryonic development.

METHODS: The first author searched PubMed database for relevant articles published from January 1990 to December 2013 using the keywords of “assisted reproductive technology, art; pre-implantation embryo; embryonic development viability; evaluation methods” in English. Finally, 63 articles were included in result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: In the embryo quality evaluation, the most widely used method is morphological evaluation method which is characterized as rapid, non-invasive, and simple. With the development of assisted reproductive technology, the morphological evaluation combined with time-lapse imaging analysis system has been recognized in embryo selection. Recently, targeted-metabolic analysis has been proposed as a useful tool for assessment of embryo development potential, involving pyruvate acid, glycometabolism, amino acid, and embryo-derived cytokines (soluble human leukocyte antigen G1, platelet-activating factor, etc.). Furthermore, the pre-implantation genetic screening method targeting gene and chromosome abnormality is expected to find more effective markers for evaluating embryo developmental potential.

Subject headings: reproductive techniques, assisted; embryonic development; technology assessment, biomedical

李楠, 男, 1984 年生, 河南省沁阳市人, 汉族, 2012 年广西大学毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事胚胎工程研究。

通讯作者: 韦继红, 硕士, 主任医师, 广西柳州市妇幼保健院生殖健康助孕中心, 广西壮族自治区柳州市 545001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.42.024

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)42-06849-07

稿件接受: 2014-09-25

Li Nan, M.D., Assistant researcher, Reproductive Medicine Center, Maternal and Child Health Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Wei Ji-Hong, Master, Chief physician, Reproductive Medicine Center, Maternal and Child Health Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Accepted: 2014-09-25

Funding: the Self-Financing Research Program of Guangxi Health Bureau, No. Z22010457

Li N, Li JY, Tang YM, Wei JH. Assessment for early embryo quality improves the sensitivity and specificity to predicting embryonic development potential. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(42):6849-6855.

0 引言 Introduction

随着辅助生殖技术的发展, 妊娠率的不断提高, 但是多胎率也随之增加。如何在维持妊娠率的同时又可以降低多胎率, 这就需要从多个胚胎中选择发育潜能最好的胚胎进行移植, 对非侵入性、耗时短评估胚胎的发育潜能提出了新的挑战。在辅助生殖技术实践中已经产生了多种胚胎质量评价方法, 包括配子、胚胎形态学、胚胎代谢组学、胚胎内源性因子和基因组学评估方法, 文章对各种胚胎发育潜能评估方法进行综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索1990年1月至2013年12月PubMed数据库, 检索词为“Assisted Reproductive Technology, ART; Pre-implantation Embryo; Embryonic development viability; Evaluation methods”组合后检索相关文献。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①与早期胚胎形态学评分系统相关的文献。②胚胎代谢组学相关研究。③基因组学相关研究。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取 文献语言限制在英文。根据纳入排除标准, 经过文题、摘要的筛选后, 最终纳入63条文献对早期胚胎质量评估方法研究进展进行分析探讨。

2 结果 Results

2.1 早期胚胎形态学评分系统 目前, 形态学评估系统是应用最广泛的胚胎质量评分方法, 主要包括以下方面卵母细胞形态(D0)、原核期胚胎(D1)、卵裂期胚胎(D2/D3)和囊胚期胚胎(D5/D6)形态学评分。

2.1.1 卵母细胞形态学评价 正常卵子的形态具有完整的Pb1、正常大小的卵周隙和胞质不含有空泡及包涵体, 若卵母细胞胞质中出现胞质颗粒(大小不均)、空泡、折光小体、坏死的区域、细胞器聚集或异常增大的卵周隙等现象会降低胚胎发育潜能。正常卵母细胞受精率、卵裂率和优质胚胎率要显著高于与形态异常的卵子^[1]。胚胎移植时, 该类胚胎其发育潜能、种植率和临床妊娠率也较高。

成熟的卵母细胞伴随着卵丘-卵母细胞复合体的扩张, 一般为旭日样卵丘细胞且充分扩张的卵母细胞处于第二次减少分裂中期(M II), 为“成熟”卵母细胞, 排出第一极体(1 polarbody, Pb1)。早在2002年, Ebner等^[2]就提出了完整、光滑的Pb1可作为预测胚胎发育潜能的指标。卵丘细胞倾向于黏附培养皿, 一般认为是高质量的卵母细胞。若卵母细胞具有致密的卵丘细胞时为不成熟卵母

细胞。

2.1.2 合子期评分系统 通常根据胚胎形态学来评估胚胎发育潜能。该方法是通过在不同发育时期的胚胎进行形态学评分, 通常包括: 授精后16-20 h的原核评估, 培养第2日、第3日的分裂期胚胎评估, 是一个动态的过程。

原核期评分系统(D1): 原核期通常出现在授精后16-20 h。原核评估法已成为一种常用的评分方法, 包括PN数目、大小及相互位置、核仁的数量、大小和分布及胞质情况等。该法最早由Van Blerkon提出^[3], 后来逐渐形成了Scott所提出的“合子评分系统”和Tesarik所提出的“原核评分系统”^[4-5]。

1999年, Tesarik和Greco等^[5]将原核形态分为0型和非0型两种, 强调两个原核的同步化。0型合子的评判标准为: ①两个核仁数目相差小于3。②核仁分布性一样, 或极性或非极性。③每个原核中至少有3个核仁。④两个原核核仁同时极性排列或同时散在排列。非0型有1-5级, 即: ①两个原核中核仁数目相差>3个。②至少一个原核中散在排列的核仁数目<7个。③至少一个原核极性排列的核仁数>7个。④至少一个原核中核仁数<3个。⑤一个原核核仁呈极性排列, 另一个非极性排列。

Z评分系统是Tesarik对Scott评分系统的改良, 根据原核期核及核仁大小、数目和分布来评分。简述如下: Z1为2 PN并列相连, 大小一致; 核仁大小、数目相同, 线性排列于原核连接处, 核仁数量为3-7个。Z2为2 PN并列相连, 大小一致, 数目相同, 分散排列于原核中, 核仁数量为3-7个。Z3为2 PN并列相连, 大小一致, 核仁数目相同或不同, 大小均匀或不均匀; 其中一个原核中核仁呈线性排列于原核连接处, 另一个原核中, 核仁分散不规则, 核仁数量为3-7个。Z4为PN大小不等或分离。Z1、Z2级合子通常会发育为较优质的胚胎, 可获得较高的妊娠率; Z3合子为低质胚胎, 种植潜力低下; Z4合子为胚胎染色体异常, 不用于移植。由于PN评分简单快速且无创伤, 该方法具有重要的临床应用价值。2007年, Arroyo等^[6]认为PN评分有利于优质胚胎的选择, 但是也有不同的观点, James等^[7]认为PN评分不能准确预测胚胎发育潜能。

早期卵裂: 早期胚胎的前几次卵裂依赖于卵母细胞内储存的母源性遗传物质的适时表达, 发育至一定阶段后依赖于合子型(胚胎型)基因的激活, 若合子型基因激活发生错误则出现发育阻滞。2细胞期是母型基因调控向合子型调控过渡的起始期。临床数据显示, 受精卵的第一次分裂时间和胚胎的发育潜能可能存在某种关联。在1997年, Shoukir等^[8]的研究显示, 受精后25 h完成第一次卵裂的胚

胎比起第一次卵裂较晚的胚胎具有较高的发育潜能。2001年, Lundin等^[9]认为早卵裂可作为胚胎质量的标志。2003年, Salumets等^[10]也提出胚胎移植有早期卵裂胚胎的妊娠率显著要高于移植非早期卵裂胚胎的妊娠率(50%, 26.4%, $P < 0.05$)。2006年, Ciray等^[11]认为合子第一次卵裂的时间及其时间跨度可作为囊胚发育潜能的标志之一。同年, Chen等研究显示, 移植日选择胚胎应把早期卵裂作为重要的参考条件。Biezinova等^[12]对研究认为, 早期卵裂胚胎可能来源于胞质和核同步性较好的卵子, 且质量较高, 储备了能够进行早裂的物质基础。因此, 早期卵裂可能是一种独立于胚胎细胞形态和细胞数之外的早期胚胎质量评价要素。

合子期评分时还要综合考虑合子胞质、透明带的厚度、胞质晕等。优质的合子应具有胞质晕, 但胞质晕对胚胎潜力的关系, 还有待于进一步探究。透明带(Zona Pellucida, ZP)厚度也是预测合子质量的指标。ZP是高度有序的生物大分子, 利用偏振光显微镜对其进行微观结构的观察, 结果显示ZP厚度与妊娠率具有相关性^[13]。ZP厚度不规则的胚胎, 其种植率高于ZP厚度均匀的胚胎。ZP厚度超过15 mm时种植率低下。

2.1.3 卵裂期胚胎评分系统 受精后第1天为2细胞期, 第2天为4-6细胞期, 第3天为7-9细胞期。卵裂期评分包括卵裂球的数目、卵裂球的对称性、碎片数目、是否含有空泡以及杂质等。临床数据显示发育较快的胚胎可能具有较高的妊娠率^[9], 胚胎发育速度过快或者卵裂球不均匀说明非整倍体等遗传缺陷比例较高, 会削弱胚胎发育潜能^[14]。碎片过多也会影响胚胎的发育潜能。碎片产生的机制尚不明确, 原因有很多胚胎在培养箱内外温度或pH的改变, 胚胎技术人员操作因素等。

第2、3天胚胎形态学评分(D2/D3): D2胚胎形态也是胚胎移植日重要的参考标准。D2胚胎处于4-6细胞期时发育潜能及着床率相对较高^[15]。2008年, Sundström等^[16]认为D2胚胎卵裂球核的评估可以预测胚胎发育能力和种植潜能。2009年, Racowsky等^[17]认为D2胚胎评分可以作为选择移植胚胎的一项参考标准。

D3胚胎评分作为胚胎移植的选择标准。Wetzels等将胚胎生长速度与形态学相结合^[18], 将D3胚胎评为以下5种: I级胚胎为 ≥ 8 细胞, 无碎片; II级胚胎, 细胞为奇数(≥ 7)或不均匀, 碎片不足10%; II-III级胚胎, 细胞数少(奇数或不均匀)和(或)碎片为10%-25%; III级胚胎, 细胞数少(奇数或不均匀)碎片为25%-50%; IV级(劣质)胚胎, 细胞数少(奇数或不均匀), 碎片 $> 50\%$ 。Dennis等^[19]认为胚胎分级能够高度预测胚胎植入潜能。Alikani等^[20]根据卵裂球数目、胚胎碎片的数量及其分布、对称性 etc 将受精后D3的胚胎分为5个类型, I型为碎片不足5%, 且局限于某个部位; II型为大多数的碎片局限在某个部位, 碎片数量超过5%; III型为碎片分散各处, 碎片体积较小,

且大小相近; IV型为碎片分散各处, 碎片体积较大, 且大小不均; V型为碎片分散各处, 呈现变性坏死外观。碎片的分布特征也影响胚胎植入潜能, I型和II型碎片胚胎种植率最高, III型胚胎的着床潜能减弱, 而IV型胚胎几乎不具有着床能力。D3胚胎还会出现其他影响胚胎发育的现象, Desai等^[21]观察D3胚胎出现胞质塌陷会严重影响胚胎发育潜能。

妊娠率与胚胎形态和发育速度关系密切^[22]。2003年, Scott等^[23]认为移植胚胎细胞数为8时临床妊娠率最高。2005年, Borini等^[24]认为D3移植8细胞胚胎妊娠率要高于其他非8细胞胚胎。但仅依靠D3胚胎形态学来预测胚胎的发育潜能不够精确^[25]。Graham等^[26]的试验显示, 在对符合D3传统胚胎选择标准的胚胎与不符合使用标准的剩余胚胎进行囊胚培养后发现, 其囊胚率差异不显著(48%, 41.7%, $P > 0.05$)。

临床实践中会联合原核评分、第一次卵裂和D3形态综合判断胚胎的发育潜能。2003年, Lan等^[27]研究显示根据原核评分和D3胚胎形态成功预测了胚胎的发育潜能, 显著提高了临床妊娠率和D5囊胚形成率。同年Nagy等^[28]也得到相似的结论。D3评分结合其他相互独立又相互联系的指标来判断胚胎的发育潜能可提高临床妊娠率。

胚胎发育是一个复杂的动态过程, 应结合从取卵到移植各时期的胚胎评分情况, 建立连续胚胎评分体系, 以选出最适胚胎进行移植。2003年Fisch等^[29]引入等级胚胎评分(graduated embryo score, GES)的概念, 从授精开始, 分别对16-18 h原核形态、25-27 h早期卵裂状态以及D3胚胎形态分析, 以上3个时间的胚胎分析经过加权后得到1个等级胚胎评分分数。2008年Loi等^[30]以简化的5分制评分体系为基础, 建立了累积胚胎评分系统(cumulative embryo score, CES), 将D3要移植胚胎逐一评分, 相加为累积胚胎评分。累积胚胎评分对胚胎的评估效果要明显优于移植日对胚胎的评估。根据累积胚胎评分分数分组, 结果显示分数高的患者临床妊娠率及活产率增高。2008年Qian等^[31]以等级胚胎评分为基础, 建立联合评分系统(combined scoring system, CSS), 将胚胎早期发育的3个阶段组合评估, 与等级胚胎评分相比较也可以有效地预测IVF结局。

第5、6天胚胎形态学评分(D5/D6): 随着囊胚形成率地提高, 囊胚移植逐渐被患者所接受。囊胚培养具有筛选胚胎的作用, 其非整倍体率明显低于D3胚胎, 有助于提高妊娠率。因此, 囊胚的形态学评分就显得尤为重要, 根据囊胚评分选择合适的胚胎进行移植或冷冻。

目前, 较广泛使用的是由Gardner等^[32]建立的评分方法, 该方法是综合了内细胞团(ICM)、滋养层(TE)的状态和囊胚的扩张状态来对囊胚进行评分。简述如下, 1期为早期有腔室囊胚, 囊胚腔小于胚胎总体积的1/2; 2期为囊胚腔体积大于或等于胚胎总体积的1/2; 3期为完全扩张囊

胚, 囊胚腔完全占据了胚胎的总体积; 4期为扩张囊胚, 囊胚腔完全充满胚胎, 胚胎总体积变大, 透明带变薄; 5期为正在孵出的囊胚, 囊胚的一部分从透明带中逸出; 6期为孵出的囊胚, 囊胚全部从透明带中逸出。1期、2期的囊胚由于囊腔较小, 难以准确区分内细胞团的界限。故3至6期的囊胚内细胞团根据细胞数目的多少及紧密程度分为: A级为细胞数目多, 排列紧密; B级为细胞数目少, 排列松散; C级为细胞数目很少。同时滋养层细胞根据细胞层数的多少分为: A级为上皮细胞层由较多的细胞组成, 结构致密; B级为上皮细胞层由不多的细胞组成, 结构松散; C级为上皮细胞层由稀疏的细胞组成。

2005年, Papanikolaou等^[33]研究显示, 囊胚期移植组患者的种植率和临床妊娠率显著高于卵裂期移植组。原因是由于囊胚与子宫内膜同步。同时囊胚在体外培养过程中经历了细胞融合、囊胚腔出现及囊胚腔扩张的变化, 进一步完成了胚胎的筛选, 具有更好的发育潜能。

2.1.4 延时摄像系统评分法 胚胎发育是一个复杂的动态过程, 人们经过大量研究建立了连续胚胎评分体系。但仍然需要从培养箱中取出进行观察, 这样就会造成胚胎培养环境的改变, 而环境的改变对胚胎的发育产生不利的影响。为解决以上问题, 创造了新的胚胎发育潜能评估系统。

目前已经出现的设备有, 一种是在倒置显微镜周围外接装置, 通气保温、外接高清数字摄像系统(如活细胞工作站等); 另一种是现在常用的放在培养箱内的显微观测系统(非侵入性早期胚胎活力评价系统, non-invasive early embryo viability assessment system, EEVA和Primo Vision系统)^[34-35]。2010年, Wong等^[36]利用非侵入性实时成像法成功预测了胚胎发育成囊胚或发育停滞。而Pribenszky等^[37]利用报道延时摄像系统筛选后的囊胚行单胚胎移植并获得健康婴儿。Kirkegaard等^[38]也认为使用延时摄像观察筛选的胚胎可以显著提高妊娠率。通过对胚胎发育进行连续观察, 可以得到更多有价值的信息, 同时减少人为操作造成的损害。但延时摄像系统价格昂贵, 观察的标本数量又有限等限制了该技术的发展。

虽然胚胎形态学评定方法有了一定发展, 但胚胎形态学评估存在诸多问题, 如胚胎形态学参数不能完全反映胚胎发育潜能; 缺少可量化的指标; 还受到实验室技术人员主观因素的影响; 形态正常的胚胎有可能存在遗传学或表观遗传缺陷等。因此如何增加预测方法、提高预测早期胚胎发育潜能的能力成为当务之急。

2.2 胚胎代谢组学 低相对分子质量($<1\ 000$)代谢物是细胞调控进程中的最终产物, 反映生物体对遗传、营养及环境因素的应答。对新陈代谢过程中所有的低分子量代谢物进行定性和定量研究来反映生物体对环境或基因修饰变化的学科称为代谢组学。如何测量胚胎代谢产物来评估胚胎发育潜能因其非侵入性、风险低等优点而成为研究热点。采用光谱和非光谱学检测胚胎培养液中

的丙酮酸^[39]、氨基酸的代谢^[40]、脂肪酸的摄入量和葡萄糖等的代谢产物可为评估胚胎发育潜能提供新的参考^[41-42]。2001年, Gardner等^[42]的研究显示, 形态学分级的较好的胚胎, D4丙酮酸的吸收量显著高于未能发育成囊胚的胚胎, 葡萄糖消耗量也比较高。Turner等^[43]的研究结果显示丙酮酸的吸收量可能与胚胎发育潜力存在密切有关。但Conaghan等^[44]却呈现出相反的结果。

学者们对胚胎内源性因子与胚胎发育潜能的相关性也进行研究。2002年, Fuzzi等^[45]检测培养基中是否表达有可溶性人白细胞抗原G(sHLA-G)发现, 培养滴中有sHLA-G因子的胚胎移植后植入和妊娠率要显著高于培养滴中无sHLA-G因子的胚胎。2007年Noriko等人认为胚胎培养液中的sHLA-G无法作为胚胎发育潜能的生物标记物。2004年, Brison等^[46]的研究结果显示甘氨酸的代谢水平与IVF临床妊娠率和活产率有关。2002年, Roudebush等^[47]用放射免疫法对血小板活化因子定量测量后发现妊娠组中培养基所含的血小板活化因子水平高于非妊娠组。耗氧量由于可以反映胚胎的代谢活动水平逐渐受到了生殖中心的关注。目前最新的呼吸率测定仪是由丹麦UnisenseFertiliTech公司生产并推广, 命名为Embryo scope。由于其高灵敏性、无创性等优点开始在部分中心使用, 期待未来可以更好地与胚胎发育潜能评估相结合。

目前, 代谢物分析方法的技术平台尚未完全建立, 只有当多种代谢物可以同时测量, 全面反映胚胎代谢物图谱的时候, 代谢物分析方法的预测价值才能完全体现^[48]。代谢组学在评估胚胎发育潜能方面才刚刚起步, 仍有待进一步研究。

2.3 基因组学 影响胚胎发育潜能的另一个因素是染色体。染色体异常率在40岁以上的妇女中高达50%以上^[49]。随着分子生物技术和第三代“试管婴儿技术”的发展, 染色体筛查在提高单基因病和染色体异常患者的妊娠率和流产率等方面已经成为共识^[50-51]。

20世纪90年代后期开始, 植入前遗传学诊断技术逐渐得到普及。活检材料主要来源于受精后D3胚胎卵裂球、囊胚期胚胎的内细胞团或取出成熟卵母细胞的极体。从最初仅可以检查个别染色体异常的荧光原位杂交技术到可以反映全基因组全貌的全基因组扩增技术。作为植入前遗传学诊断技术的一种表现形式同时又为了与诊断单基因疾病的植入前遗传学诊断技术相区分, 该技术被称为植入前遗传学筛查。

荧光原位杂交是20世纪80年代初期发展起来的非放射性原位杂交技术。1986年, Cremer等^[52]验证了将荧光原位杂交用于中期核检测染色体非整倍体的可行性。荧光原位杂交在灵敏度和分辨率有了显著地提高。2009年, Colls等^[53]经过反复多次杂交、洗脱后将荧光原位杂交可

以检测染色体的条数增加到12条。这已经是目前可以检测最多的染色体数目了。但2011年, Zamora等^[54]的研究认为用荧光原位杂交筛查IVF胚胎的非整倍体并不能提高临床植入率、妊娠率和活产率。研究结果显示, 经荧光原位杂交检测为非整倍体的胚胎, 有58%能够发育成囊胚, 且通过芯片技术分析24条染色体后未发现非整倍体。Mastenbroek等^[55]也认为荧光原位杂交反而会降低临床妊娠率。可见荧光原位杂交造成的误诊不容忽视。

1992年, Kallioniemi等^[56]创建了比较基因组杂交技术, 该技术的出现弥补了荧光原位杂交在检测染色体数目不足的缺陷。还可以通过计算机软件鉴定出比较基因组杂交结果, 提高了染色体鉴定的精度和准确度。在比较基因组杂交刚发明初期, 其所需检测时间长, 无法在移植时得到结果。随着冷冻技术特别是玻璃化冷冻技术的发展, 比较基因组杂交在临床上得到推广。2001年, Wilton等^[57]首次报道了经比较基因组杂交检测单卵裂球后成功妊娠且出生了一健康女婴的案例。

由于比较基因组杂交至少需要200 ng的DNA样品, 而单细胞DNA的量却仅为5-10 pg, 因此单细胞均需进行全基因组扩增, 将单个细胞的DNA扩增以达到比较基因组杂交分析的要求。而全基因组扩增过程中会出现等位基因脱扣等现象而降低了比较基因组杂交的临床应用。虽然将扩增技术改良可以减少等位基因脱扣现象, 如将扩增与实时定量PCR(qRT-PCR)技术相结合可提高扩增的保真性。但是仍需要更为简单、高效比较基因组杂交技术产生并应用于临床, 如微阵列技术。

微阵列技术又称为DNA芯片技术, 主要有微阵列比较基因组杂交芯片和单核苷多态性基因定型芯片。微阵列比较基因组杂交可检测到那些传统方法所检测不到的重复和缺失。将参考DNA与待测样本经过荧光标记、纯化、杂交、洗涤、扫描等相关步骤后获得影像, 然后用特定软件来分析染色体的组成确定胚胎的状态。2010年, Handyside等^[58]结合全基因组扩增技术, 首次将单卵裂球水平上的微阵列比较基因组杂交应用于临床并获得妊娠。与传统比较基因组杂交相比微阵列比较基因组杂交能在48 h内完成胚胎染色体的分析, 避免了胚胎冷冻解冻对移植胚胎的损伤。随着微阵列比较基因组杂交灵敏度的提高, 在临床上的应用也会慢慢普及。单核苷多态性是单个核苷酸改变的基因标记, 单核苷多态性基因定型芯片可以检出染色体上微小的差异, 分辨率高达1.5 kb, 远远高于其他几种方法, 准确性更高^[59-60]。单核苷多态性基因定型芯片是将检测样本与对照组标记荧光, 分别与芯片杂交做平行实验, 再收集数据并比较分析。这种方法可以鉴定出双亲的同源染色体, 确定该胚胎遗传了父母的哪条染色体。但要注意的是必须先检测胚胎父母亲的DNA, 做好预实验。2010

年, Treff等^[61]利用单核苷酸多态性技术对未移植胚胎在单卵裂球水平检测, 结果发现了多种非整倍体现象。但仍有研究人员对该技术的可靠性提倡质疑^[62]。其优点主要有: 待检测患者可以有新鲜胚胎可供移植; 检测灵敏性和准确性高; 检测实现程序化, 降低误诊风险; 可以检出整倍体或非整倍体的异常, 筛查单基因病及单亲二体等; 检测结果可以提供染色体拷贝和基因型数据, 得到胚胎的DNA指纹, 可将数据做进一步分析。目前芯片技术由于检测费用及各种设备条件(扫描仪及试剂、耗材)昂贵, 增加患者负担, 同时还存在2%-4%的误诊率, 尚未在临床应用中普及。

随着新一代高通量测序技术的产生及费用下降可实现早期胚胎的全基因组扩增、低覆盖度高通量测序。将新一代高通量测序技术应用于胚胎染色体异常分析, 为选择遗传学正常的胚胎提供依据, 能有效地提高妊娠率。2013年, Yin等^[63]对38例囊胚滋养层细胞进行染色体数目异常和不平衡易位检测, 即将大规模平行测序方法应用于人类胚胎染色体异常检测。结果显示, 新一代高通量测序技术可以更加准确、有效地检测胚胎染色体异常。优势在于, 该方法的准确性, 解决了基因芯片技术结果中全基因组扩增偏差而导致的问题。渡过科研与临床转化阶段, 新一代高通量测序技术将在植入前遗传学诊断技术/植入前遗传学筛查临床应用中具有广泛的前景。

3 总结与展望 Conclusion and prospects

综上所述, 胚胎质量是妊娠成功的关键因素之一, 而现有的胚胎发育潜能评价方法的敏感性和特异性仍有待提高, 因此方便、客观、精确且不太昂贵的评价系统用于选择胚胎更具临床意义。胚胎形态学评分系统仍是应用最广泛的评分系统, 其他评估系统如代谢组法、蛋白质组法、转录组学及基因组法等已经有所发展, 这些方法的应用为胚胎发育能力评估方法提供了新的方向。但是与传统的形态学评估方法的结果尚未完全一致, 将来可能会有一个或多个新兴指标与形态评分相结合, 为早期胚胎发育能力评分方法提供新的标准, 有效地提高辅助生殖技术的临床妊娠率并减少多胎率。但是仍面临巨大挑战。

作者贡献: 设计为第一作者和通讯作者, 资料收集为全体作者, 第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 染色体-是组成细胞核的基本物质, 是基因的载体。染色体异常(chromosome abnormalities)也称染色体发育不全(chromosome dysgenesis)。美籍华人蒋有兴(1956)查明人类染色体为46条, Caspersson等(1970)首次发表人类染色体显带照片。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名

和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Petersen CG, Oliveira JB, Mauri AL, et al. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(2): 235-243.
- [2] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod*. 2002;17(9): 2415-2418.
- [3] Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech*. 1990;16(4): 324-346.
- [4] Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 1998;13(4): 1003-1013.
- [5] Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*. 1999;14(5): 1318-1323.
- [6] Arroyo G, Veiga A, Santalo J, et al. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24(5): 173-181.
- [7] James AN, Hennessy S, Reggio B, et al. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod*. 2006;21(6): 1599-1604.
- [8] Shoukir Y, Campana A, Farley T, et al. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod*. 1997;12(7): 1531-1536.
- [9] Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*. 2001;16(12): 2652-2657.
- [10] Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod*. 2003;18(4): 821-825.
- [11] Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, et al. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril*. 2006; 85(2): 358-365.
- [12] Biezinova J, Svobodova M, Oborna I, et al. [Embryo quality evaluation according to the speed of the first cleavage after conventional IVF]. *Ceska Gynekol*. 2006;71(2): 105-110.
- [13] Shen Y, Betzendahl I, Sun F, et al. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod Toxicol*. 2005;19(4): 459-471.
- [14] Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*. 2001;16(2): 313-318.
- [15] Alikani M, Calderon G, Tomkin G, et al. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod*. 2000; 15(12): 2634-2643.
- [16] Sundstrom P, Saldeen P. Early embryo cleavage and day 2 mononucleation after intracytoplasmic sperm injection for predicting embryo implantation potential in single embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 2008; 89(2): 475-477.
- [17] Racowsky C, Ohno-Machado L, Kim J, et al. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day?. *Hum Reprod*. 2009;24(9): 2104-2113.
- [18] Wetzels AM, Bastiaans BA, Hendriks JC, et al. The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation. *Hum Reprod*. 1998; 13(5): 1325-1330.
- [19] Dennis SJ, Thomas MA, Williams DB, et al. Embryo morphology score on day 3 is predictive of implantation and live birth rates. *J Assist Reprod Genet*. 2006;23(4): 171-175.
- [20] Alikani M, Cohen J, Tomkin G, et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*. 1999;71(5): 836-842.
- [21] Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod*. 2000;15(10): 2190-2196.
- [22] Demirel L C, Evirgen O, Aydos K, et al. The impact of the source of spermatozoa used for ICSI on pronuclear morphology. *Hum Reprod*. 2001;16(11): 2327-2332.
- [23] Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online*. 2003;6(2): 201-214.
- [24] Borini A, Lagalla C, Cattoli M, et al. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(5): 653-668.
- [25] Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod*. 2007;22(7): 1973-1981.
- [26] Graham J, Han T, Porter R, et al. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril*. 2000;74(3): 495-497.
- [27] Lan KC, Huang FJ, Lin YC, et al. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Hum Reprod*. 2003;18(6): 1299-1306.
- [28] Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M, et al. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril*. 2003;80(1): 67-74.
- [29] Fisch JD, Sher G, Adamowicz M, et al. The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril*. 2003;80(6): 1352-1358.
- [30] Loi K, Prasath EB, Huang ZW, et al. A cumulative embryo scoring system for the prediction of pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Singapore Med J*. 2008;49(3): 221-227.
- [31] Qian YL, Ye YH, Xu CM, et al. Accuracy of a combined score of zygote and embryo morphology for selecting the best embryos for IVF. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008;9(8): 649-655.
- [32] Gardner D K, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000;73(6): 1155-1158.
- [33] Papanikolaou EG, D'Haeseleer E, Verheyen G, et al. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod*. 2005;20(11): 3198-3203.

- [34] Sultana F, Hatori M, Shimosawa N, et al. Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *J Am Assoc Lab Anim Sci.*2009;48(1): 52-56.
- [35] Wale PL, Gardner DK. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(3): 402-410.
- [36] Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.*2010;28(10): 1115-1121.
- [37] Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, et al. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(4): 533-536.
- [38] Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod.*2012;27(5): 1277-1285.
- [39] Seli E, Botros L, Sakkas D, et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008;90(6): 2183-2189.
- [40] Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod.*2002; 17(4): 999-1005.
- [41] Haggarty P, Wood M, Ferguson E, et al. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod.*2006;21(3): 766-773.
- [42] Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.* 2001;76(6): 1175-1180.
- [43] Turner K, Martin KL, Woodward BJ, et al. Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles. *Hum Reprod.*1994;9(12): 2362-2366.
- [44] Conaghan J, Hardy K, Handyside AH, et al. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet.*1993;10(1): 21-30.
- [45] Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol.* 2002;32(2): 311-315.
- [46] Brison DR, Houghton FD, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod.*2004;19(10): 2319-2324.
- [47] Roudebush WE, Winger JD, Jones AE, et al. Embryonic platelet-activating factor: an indicator of embryo viability. *Hum Reprod.*2002;17(5): 1306-1310.
- [48] Singh R, Sinclair K D. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology.*2007;68 Suppl 1: S56-62.
- [49] Seli E, Robert C, Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod.*2010;16(8): 513-530.
- [50] Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, et al. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril.*2009;92(1): 157-162.
- [51] Munne S, Chen S, Fischer J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 2005;84(2): 331-335.
- [52] Cremer T, Landegent J, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet.*1986;74(4): 346-352.
- [53] Colls P, Goodall N, Zheng X, et al. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy by testing 12 chromosomes. *Reprod Biomed Online.*2009;19(4): 532-538.
- [54] Zamora S, Clavero A, Gonzalvo MC, et al. PGS-FISH in reproductive medicine and perspective directions for improvement: a systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(8): 747-57.
- [55] Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, et al. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update.* 2011;17(4): 454-466.
- [56] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083): 818-821.
- [57] Wilton L, Williamson R, McBain J, et al. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med.* 2001;345(21): 1537-1541.
- [58] Handyside AH, Harton GL, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet.*2010;47(10): 651-658.
- [59] Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril.*2010;94(4): 1173-1177.
- [60] Treff NR, Northrop LE, Kasabwala K, et al. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. *Fertil Steril.* 2011;95(5): 1606-12 e1-2.
- [61] Treff NR, Su J, Tao X, et al. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril.*2010;94(6): 2017-2021.
- [62] Harper J, Coonen E, De Rycke M, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod.*2010;25(4): 821-823.
- [63] Yin X, Tan K, Vajta G, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod.* 2013;88(3): 69.