doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.17.002

极严重少弱精症患者的新鲜周期移植中卵裂球数目对妊娠结局的影响 *

傅 悦 [#] 徐 源 [#] 柏明珠 孙 翟 张箴波 [△]
（上海交通大学附属第一人民医院辅助生殖医学科 上海 201620）

摘要 目的：探讨极严重少弱精症患者的新鲜周期移植中卵裂球数目对妊娠结局的影响。**方法：**回顾性分析 392 个新鲜胚胎移植周期，这些胚胎根据移植天数分为第二天移植(Day2)组 68 周期和第三天移植(Day3)组 324 周期，其中 Day2 组根据卵裂球数分为 <3 个(A 组，3 周期)，3～5 个(B 组，57 周期)，>5 个(C 组，8 周期)，Day3 组根据卵裂球数分为 <7 个(D 组，33 周期)，7～9 个(E 组，242 周期)，>9 个(F 组，49 周期)。每个组又根据胚胎评级分为三个亚组，亚组 1 均为移植 1～2 级的胚胎(A1～F1)，亚组 2 均为移植 3～4 级的胚胎(A2～F2)，亚组 3 为一个 1～2 级和一个 3～4 级移植胚胎(A3～F3)。综合比较各组和相应亚组之间的种植率，临床妊娠率，流产率及活产率的差别。**结果：**① 在 day2 组中，ABC 三组的胚胎种植率，临床妊娠率，流产率及活产率均无统计学差异(P>0.05)。在 Day3 组中，E 组的胚胎种植率，临床妊娠率及活产率均高于 D 组，差异具有统计学意义(P<0.05)。而 D 组和 F 组及 E 组和 F 组之间差异均无统计学意义。② 在相同卵裂球数组中，不同的胚胎分级各亚组之间(如 B1,B2,B3 间)的胚胎种植率，临床妊娠率，流产率及活产率均无统计学差异。不同卵裂球数其相应的同一亚组之间(A1,B1,C1 等)上述妊娠结局指标无统计学差异。**结论：**严重少弱精形成的胚胎优先推荐第二天卵裂球数为 3~5 个及第三天卵裂球数为 7~9 个的优质胚胎进行移植。

关键词：卵裂球数；新鲜胚胎移植；极严重少弱精症；胚胎评级；妊娠结局
中图分类号：R-33；R321-33 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2020)17-3207-05

Effect of Blastomere Number in Fresh Cycles on Pregnancy Outcomes in Patients with Severe Oligozoospermia*

FU Yue[#], XU Yuan[#], BAI Ming-zhu, SUN Zhai, ZHANG Zhen-bo[△]
(Department of Reproductive Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of the number of blastomeres in fresh embryos transfer on the outcome of pregnancy in patients with severe oligospermia. **Methods:** A retrospective analysis was performed of data from 392 patients who received fresh embryos transfer. According to the days of transplantation, these embryos were divided into 68 cycles of day2 transfer (group Day2) and 324 cycles of day3 transfer (group Day3). Then according to the number of blastomeres group Day2 was divided into 3 cycles of <3-cell group(group A), 57 cycles of 3~5-cell group(group B) and 8 cycles of >5-cell group(group C) , group Day3 was divided into 33 cycles of <7-cell group(group D), 242 cycles of 7~9-cell group(group E) and 49 cycles of >9-cell group(group F). Each group can be divided into three sub-groups according to the embryo grades. Embryos in sub-group1 all belonged to grade1~2 (A1~F1), sub-group2 had embryos which all ranked 3~4grade(A2~F2) and sub-group3 had one 1~2 and one 3~4 grade embryo(A3~F3). The implantation rate, clinical pregnancy rate, miscarriage rate and live birth rate were compared between the groups and corresponding sub-groups respectively. **Results:** ① There were no significant difference in implantation rate, clinical pregnancy rate, miscarriage rate and live birth rate among the ABC groups in group Day2(P>0.05). While in group Day3, the implantation rate, clinical pregnancy rate, live birth rate of group E were higher than group D, and the differences were statistically significant (P<0.05). But there were no significant differences between groups D and F, and between groups E and F. ② There were no significant differences in implantation rate, clinical pregnancy rate, miscarriage rate and live birth rate between different subgroups of different embryo grades within the same group of blastomere number (such as B1, B2, B3). Embryos in same sub-group but different groups of blastomere number had no significant differences in the pregnancy outcomes mentioned above (such as A1, B1, C1). **Conclusions:** In fresh cycle transfer of patients with severe asthenozoospermia, high quality embryos with 3~5-cell on day2 and embryos with 7~9-cell on day3 are preferentially recommended to transfer.

Key words: Number of Blastomeres; Fresh embryo transfer; Severe oligospermia; Embryo grade; Reproductive outcome
Chinese Library Classification: R-33; R321-33 Document code: A
Article ID:1673-6273(2020)17-3207-05

* 基金项目：上海交通大学医工交叉基金项目(YG2016MS27)
# 为共同第一作者
作者简介：傅悦(1992-)，女，硕士研究生，主要研究方向：妇科肿瘤生育功能的保留，电话：18616816792，E-mail：sherrykikyo@163.com；
徐源(1986-)，男，博士，技师，主要研究方向：胚子质量与胚胎发育，电话：15902189741，E-mail：xuyuan0218@163.com
△ 通讯作者：张箴波，男，博士，副研究员，主要研究方向：子宫内膜增生性病变保留生育功能的治疗及后续辅助生殖治疗的临床和基础研究，E-mail：zhengzhenbozzb@aliyun.com
(收稿日期：2020-02-27 接受日期：2020-03-23)

前言

男性因素导致的不育在全球不孕症病例中约占 50%[1],其中严重少弱精症是导致男性因素不育的一个重要原因。随着辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的发展,体外受精 - 胚胎移植 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)尤其是单精子卵细胞浆内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)被广泛应用于男性不育的治疗。而有研究表明,男性不育中随着精子质量下降,受精率和优秀胚胎率也会随之下降[2,3]。除此之外,为了有效评估获取的胚胎是否可用于移植,临床上需要对胚胎进行评分,通常根据胚胎的形态学进行评估[4,5]。有研究将卵裂球数,碎片率及对称性等形态学参数应用于建立高质量胚胎预测及筛选的模型[6]。目前关于胚胎形态学对妊娠结局影响的研究,多数集中在冻融胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer,FET)中[7,8],而在极严重少弱精形成的胚胎中未见报道。有研究发现,FET 中第三天卵裂球数为 6～9 细胞的胚胎其种植率高于 <6 细胞和 >9 细胞胚胎[8]。但是其将 <6 细胞和 >9 细胞胚胎合并为一组来与 6～9 细胞组比较,并不能很好的说明 6～9 细胞的胚胎种植率是均高于 <6 细胞和 >9 细胞还是只高于其中一组。有研究探讨了卵裂球数和细胞碎片对活产率的影响[9],但并未分别研究相同卵裂球数下的胚胎分级或相同胚胎分级下的卵裂球数对妊娠结局的影响。本研究旨在综合探讨在严重少弱精症患者的新鲜移植周期中,卵裂球数及相同卵裂球数下的胚胎级别对妊娠结局的影响,从而选择出更具有发育潜能的胚胎用于移植,以提高 ART 活产率。

1 材料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2015 年 1 月至 2018 年 12 月在本中心进行新鲜周期取卵并行胚胎移植的 392 例患者资料,纳入及排除标准:女方患者年龄≤ 38 岁,第一个取卵周期,排除染色体异常、生殖系统畸形、多囊卵巢综合征及排卵障碍等女方因素。男方极严重少弱精(所有精液样本离心至 100 μL,取 10 μL 显微镜观察评估,平均每 5 个 20 倍视野可见少于 1 条活动精子),睾丸精子均为睾丸活检取精 (testicular biopsy) 或睾丸显微取精(Microdissection Testicular sperm extraction, MD-TESE) 获得的精子,手淫精子均符合上述入组标准。

1.2 配子的采集与胚胎培养

采用拮抗剂促排卵方案,B 超监测卵泡生长,待主导卵泡直径达到 18-20 mm 后注射 HCG(丽珠,中国),36 -38 h 后行阴道 b 超引导下卵泡穿刺取卵术。卵子放置于 IVF(Vitrolife,瑞典)液中 2-4 h 后行常规卵细胞浆内单精子注射(ICSI) ,随后转移至含有 G1(Vitrolife,瑞典)培养液的培养皿中于 37℃、6 % CO_2、5 % O_2 培养 2-3 d。

1.3 胚胎选择标准

以取卵日为第 0 天(D0),D1(受精后 16-18 h)观察原核,D2(受精后 43-45 h)和 D3(受精后 67-69 h)观察胚胎卵裂情况,根据胚胎卵裂球数目、碎片及均一性进行质量评估。D2 或 D3 选择 1-2 枚胚胎进行移植。本中心将两原核(2PN) 受精卵,D2 发育为 3- 5 细胞, D3 发育为 7-9 细胞,评分在Ⅰ、Ⅱ级的胚胎定义为优质胚胎。Ⅰ级胚胎:细胞大小均匀,形状规则,透明带完整;胞质均匀清晰,无颗粒现象,碎片在 0 %-5 % 之间。Ⅱ级胚胎:细胞大小略不均匀,形状略不规则,胞质可有颗粒现象,碎片在 10 %-20 % 之间。若无优质胚胎,选择其他细胞数或Ⅲ级有效胚胎或 IV 级胚胎进行移植。Ⅲ级胚胎: 细胞大小明显不均匀,可有明显的形状不规则,胞质可有颗粒现象,碎片在 21 %-50 %之间。IV 级胚胎: 细胞大小均匀或明显不均匀,可有明显的形状不规则,胞质可有颗粒现象,碎片在 50 %以上。

1.4 胚胎分组及比较

胚胎根据移植天数分为第二天移植(Day2)组和第三天移植(Day3)组,其中 Day2 组根据卵裂球数分为 <3 个(A 组),3～5 个(B 组),>5 个(C 组),Day3 组根据卵裂球数分为 <7 个(D 组),7～9 个(E 组),>9 个(F 组)。每个组又根据胚胎评级分为三个亚组,亚组 1 均为移植 1～2 级的胚胎(A1～F1),亚组 2 均为移植 3～4 级的胚胎(A2～F2),亚组 3 为一个 1～2 级和一个 3～4 级移植胚胎(A3～F3)。◎ 分别总体比较第二天和第三天移植胚胎卵裂球数对妊娠结局的影响。◎ 比较相同卵裂球数分组下不同胚胎级别对妊娠结局的影响 (B1,B2,B3 等)。◎ 比较相同胚胎级别下不同卵裂球数对妊娠结局的影响(A1, B1,C1 等)。

1.5 精液处理

新鲜精液:所有精液样本直接离心至约 100 L,取 10 μL 显微镜观察评估后备用。睾丸冷冻精子:睾丸活检取精或睾丸显微取精经冷冻的样本解冻后置于 IVF(Vitrolife,瑞典)液中培养 1-2 h,离心至约 100 L,取 10 L 显微镜观察评估后备用。

1.6 妊娠结局判断及检测指标

移植 28-35 d 后进行超声检查,见孕囊和原始血管搏动,为临床妊娠,所有患者随访至胎儿出生后一个月。

种植率 = 孕囊数 / 移植胚胎数× 100%。临床妊娠率 = 临床妊娠周期数 / 移植周期数× 100%。流产率 = 流产数 / 临床妊娠周期数× 100%。活产率 = 活产周期数 / 移植周期数× 100%。

1.7 统计学分析

采用 spss19.0 统计软件进行数据分析。数据以均数± 标准差($\bar{x}\pm s$)或%表示;组间率的比较根据样本量和期望频数采用 x^2 或连续性校正 x^2 检验或 Fisher 精确概率法;计量数据组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵裂球数对严重少弱精症患者新鲜胚胎移植妊娠结局的影响

根据卵裂球数, D2 移植(68 周期)的胚胎分为:<3 细胞(A 组,3 周期),3～5 细胞(B 组,57 周期),>5 细胞(C 组,8 周期);三组间患者移植时年龄,移植个数间均无统计学差异。B 组的种植率,临床妊娠率及活产率均明显高于 A 组和 C 组,但因样本量较小均无统计学意义(表 1)。D3 移植(324 周期)的胚胎分为:<7 细胞(D 组,33 周期),7～9 细胞(E 组,242 周期),>9 细胞(F 组,49 周期);三组间患者移植时年龄,移植个数间无统计学差异。E 组的种植率,妊娠率及活产率均显著高于 D 组。F 组的上述妊娠结局指标明显高于 D 组, 但因样本量较小均无统计学意义(表 1)。而 E 组与 F 组间无统计学差异(表 1)。因此,

在极严重少弱精症患者的新鲜周期移植中,第二天优先推荐卵裂球数为 3～5 个的胚胎,而第三天则推荐卵裂球数为 7～9 个的胚胎进行移植。

2.2 胚胎级别对妊娠结局的影响

为了探讨极严重少弱精子形成的胚胎的级别对妊娠结局的影响,将 A~F 组的胚胎再根据胚胎级别分为 3 个亚组,亚组 1(A1～F1)为移植的胚胎级别均为 1～2 级,亚组 2(A2～F2)为移植的胚胎级别均为 3～4 级,亚组 3(A3～F3)为移植 1 个 1～2 级胚胎和 1 个 3～4 级胚胎。比较这三个亚组间种植率,临床妊娠率,流产率及活产率的差异。结果显示,在相同卵裂球数分组下,胚胎级别对上述妊娠结局指标无明显影响。

表 1 卵裂球数对新鲜胚胎移植生育结局的影响

Table 1 The impact of blastomere number on the reproductive outcome of fresh embryo transfer

Groups (No. of blastomere)	Day2			Day3		
	Group A (<3)	Group B (3~5)	Group C (>5)	Group D (<7)	Group E (7~9)	Group F (>9)
No.of fresh embryo tranfer(n)	3	57	8	33	242	49
Age	28.33± 0.6667	28.35± 0.4425	29.25± 1.800	29.61± 0.6306	28.90± 0.01504	28.53± 0.5322
No.of tranfer per cycle	2.00± 0.0	1.88± 0.04386	2.00± 0.0	1.88± 0.05770	1.94± 0.6667	1.98± 0.02041
Implantation rate (%, n/n')	0 (0/6)	30.84 (33/107)	12.50 (2/16)	16.13 (10/62)	30.43 (143/470)*	26.80 (26/97)
Clinical pregnancy rate (%, n/n')	0 (0/3)	50.88(29/57)	25.00 (2/8)	24.24 (8/33)	44.63 (108/242)*	38.78 (19/49)
Miscarriage rate (%, n/n')	--	13.79 (4/29)	0 (0/2)	12.5 (1/8)	15.74 (17/108)	5.26 (1/19)
Live birth rate (%, n/n')	0 (0/3)	43.86 (25/57)	25 (2/8)	18.18 (6/33)	37.19 (90/242)*	34.69 (17/49)
Fetal sex						
male(%, n/n')	--	39.29 (11/28)	50 (1/28)	57.14(4/7)	48.72 (57/117)	31.82 (7/22)
female (%, n/n')	--	60.71 (17/28)	50(1/2)	42.86(3/7)	51.28 (60/117)	68.18 (15/22)
Birthweight (g)	--	3024 ± 139.5	3125± 625.0	3309± 79.88	2947± 60.15	3060± 124.9

Note: *P<0.05, compared with group D.

表 2-1 胚胎级别对新鲜胚胎移植生育结局的影响

Table2-1 The impact of embryo grade on the reproductive outcome of fresh embryo transfer

Groups	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
No.of fresh embryo tranfer(n)	2	1	0	43	4	10	4	0	4
Age	28.00± 1.00	29.00± 0.00	--	28.47± 0.49	29.00± 1.35	27.60± 1.33	30.25± 2.96	--	28.25± 2.39
No.of tranfer per cycle	2.00± 0.0	2.00± 0.0	--	1.88± 0.05	1.50± 0.29^{B1}	2.00± 0.0^{B2}	2.00± 0.0	--	2.00± 0.0
Implantation rate (%, n/n')	0(0/4)	0(0/2)	--	30.86(25/81)	33.33(2/6)	30(6/20)	0(0/8)	--	25(2/8)
Clinical pregnancy rate (%, n/n')	0(0/2)	0(0/1)	--	48.84(21/43)	50(2/4)	60(6/10)	0(0/4)	--	50(2/4)
Miscarriage rate (%, n/n')	--	--	--	14.29(3/21)	0(0/2)	16.67(1/6)	--	--	0(0/2)
Live birth rate (%, n/n')	0(0/2)	0(0/1)	--	32.56(18/43)	50(2/4)	50(5/10)	0(0/4)	--	50(2/4)
Fetal sex									
male(%, n/n')	--	--	--	38.10(8/21)	50(1/2)	40(2/5)	--	--	50(1/2)
female (%, n/n')	--	--	--	61.90(13/21)	50(1/2)	60(3/5)	--	--	50(1/2)
Birthweight (g)	--	--	--	2949± 180.8	3125 ± 125	3300 ± 145.8	--	--	3125 ± 625.0

Note: ^{B1}P<0.05, compared with group B1; ^{B2}P<0.05, compared with groupB2.

3 讨论

在临床上，胚胎的发育过程中需要对胚胎的形态进行评估,目的是选择出更具有发育潜能的胚胎用于移植或冷冻。其

中卵裂球数目普遍被认为与妊娠结局密切相关[6-9]。在严重少弱精症患者中，其精子或数量少，或质量差。有研究表明，因男性因素导致的不孕夫妇中，种植失败和复发性流产的概率较非男性因素不孕组增加[10,11]。另有研究表明[12]，虽然少弱精患者其流产率明显高于非男性因素不孕患者，但两组间临床妊娠率相似。同时，也有研究表明，虽然男性因素不孕组的夫妇平均可用胚胎数量较非男性因素不孕组低，但在矫正了年龄等其他因素后轻度或重度男性因素不孕均不会影响单个卵裂期的持续时间或到囊胚期的总时间[13]。因此，针对男性因素不孕尤其是严重少弱精症患者这一人群的特殊性及其存在的争议，在考虑卵裂球数对胚胎妊娠结局的影响时，有必要将这一类患者单独讨论。

续表 胚胎级别对新鲜胚胎移植生育结局的影响

Continued The impact of embryo grade on the reproductive outcome of fresh embryo transfer

Groups	D1	D2	D3	E1	E2	E3	F1	F2	F3
No.of fresh embryo tranfer(n)	6	8	19	191	11	40	32	2	15
Age	29.83± 1.05	28.75± 1.61	29.89± 0.83	28.71± 0.25	28.91± 1.34	29.83± 0.46	28.53± 0.73	33.00± 4.00	27.93± 0.56
No.of tranfer per cycle	1.67± 0.21	1.75± 0.16	2.00± 0.0^{D1D2}	1.932± 0.02^{D1}	1.91± 0.09	2.00± 0.0	1.97± 0.03^{D1}	2.00± 0.0	2.00± 0.0
Implantation rate (%, n/n')	20(2/10)	21.43(3/14)	13.16(5/38)	32.25 (119/369)	28.57(6/21)	22.50(18/80)	33.33(21/63)	0(0/4)	16.67(5/30)
Clinical pregnancy rate (%, n/n')	16.67(1/6)	25(2/8)	26.32(5/19)	46.60 (89/191)	45.45(5/11)	35.00(14/40)	46.88(15/32)	0(0/2)	26.67(4/15)
Miscarriage rate (%, n/n')	0(0/1)	0(0/2)	20(1/5)	14.61(13/89)	20.00(1/5)	21.43(3/14)	0(0/15)	--	25.00(1/4)
Live birth rate (%, n/n')	16.67(1/6)	12.5(1/8)	16.67(3/18)	38.30 (72/188)	30.00(3/10)	27.50(11/40)	43.75(14/32)	0(0/2)	20.00(3/15)
Fetal sex									
male(%, n/n')	50(1/2)	100(1/1)	33.33(1.3)	55.32(52/94)	25(1/4)	20(3/15)	33.33(6/18)	--	25(1/4)
female (%, n/n')	50(1/2)	0(0/1)	66.67(2/3)	44.68(42/94)	75(3/4)	80(12/15)	66.67(12/18)	--	75(3/4)
Birthweight (g)	3155± 45.00	3100± 0.00	3483± 116.7	2931± 68.12	2743 ± 253.3	2898 ± 154.9	3061± 147.8	--	3058 ± 210.1

Note: $^{D1}P<0.05$, compared with group D1; $^{D2}P<0.05$, compared with group D2.

近年来，关于卵裂球数对妊娠率等的影响也有相关报道。有研究表明，第三天移植胚胎的活产率随着卵裂球数的增加而增加，到 8 细胞时最高，>8 细胞其活产率反而降低[9]。通常认为，第三天胚胎卵裂球数 <6 细胞可被认为胚胎发育缓慢[14]，这样的胚胎其囊胚形成率显著低于 7-9 细胞和 >10 细胞组[15]。但是，发育缓慢的胚胎一旦形成囊胚后，其种植潜力低的这种差异将不复存在[16]。这可能是由于，发育较慢的胚胎其非整倍体的风险较高，导致种植率低[17]。另外，胚胎可能具有很强的自我修复能力。一旦它们完成自我修复发育成为高质量的囊胚，就会恢复其种植潜能[16]。同样地，在培养过程中有些胚胎发育速度较快，第三天移植时可达到 10 细胞甚至更多。这样的胚胎通常不作为首选用于移植，因为对于第三天移植的卵裂球数 >9 细胞的胚胎来说，有研究发现其非整倍体比率显著增加[18]。但是，也有研究发现，第三天移植的胚胎中卵裂球数大于 10 细胞的优质胚胎与 8 细胞的胚胎具有相同的临床妊娠结局[16]。其前期的研究结果也证实，第三天移植卵裂球数 >10 细胞的胚胎与 8 细胞的胚胎具有相同的囊胚形成率。本研究结果也表明，在严重少弱精症患者的新鲜移植周期中，卵裂球数为 7～9 细胞的胚胎种植率，临床妊娠率及活产率均高于卵裂球数 <7 细胞组，差异具有统计学意义。而 7～9 细胞的临床妊娠结局并不明显优于 >9 细胞组(表 1)。在第二天移植的胚胎中，虽然卵裂球数为 3～5 细胞组的种植率，临床妊娠率及活产率均高于 <3 细胞组和 >5 细胞组(表 1)，但差异不具有统计学意义，可能是因为样本量较小的原因，后续还需要扩大样本量以进一步探究结果的可靠性。

除了卵裂球数，胚胎评分中细胞碎片也可能对妊娠结局产生影响。有研究发现，随着碎片率的增加，活产率也随之明显下降[9]。此外，发现细胞碎片可能会诱导细胞凋亡并抑制卵裂球的分裂，而去除这些碎片后将会有效改善卵裂球的分裂从而提高种植潜能[19]。还有研究表示，胚胎碎片率对种植率并无明显的影响[20]，而经去除碎片，在随后的发育过程中其形态参数如卵裂球的均匀度，胚胎等级等得到了显著改善，但是未改善临床结局[21]。随着延时成像技术的发展，越来越多的研究认为在胚胎发育的过程中，其碎片会逐渐内化消失[22]。本研究具体探讨

了在相同的卵裂球数分组下,不同的胚胎级别对妊娠结局的影响。结果发现,在卵裂球数相同的分组中,胚胎级别对严重少弱精症患者的新鲜胚胎移植的妊娠结局没有明显影响(表 2)。而在相同胚胎级别下卵裂球数对妊娠结局没有显著影响,但这可能是由于根据胚胎级别分组后样本数量变小的原因。然而,本实验也存在其局限性。即没有研究总的胚胎级别对妊娠结局的影响而是将卵裂球数作为主要研究指标,胚胎级别只是作为卵裂球数下的一个次要指标。

综上所述,严重少弱精形成的胚胎优先推荐第二天卵裂球数为 3~5 个及第三天卵裂球数为 7~9 个的优质胚胎进行移植。但对于严重少弱精症的患者来说，其精子数量少且质量差,有时难以获得级别较高的胚胎。在无法获得优质胚胎的情况下,尝试移植非优质胚胎,也有望获得较好的临床妊娠结局。

参 考 文 献(References)

[1] Agarwal A, Majzoub A, Parekh N, et al. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice [J]. World J Mens Health, 2019, 37[Epub ahead of print]

[2] Lu Yue-hong, Gao Hui-juan, Li Bai-jia, et al. Different sperm sources and parameters can influence intracytoplasmic sperm injection outcomes before embryo implantation[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2012, 13(1): 1-10

[3] Buffat C, Patrat C, Merlet F, et al. ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction [J]. Human reproduction (Oxford, England), 2006, 21(4): 1018-1024

[4] Milewski R, Kuc P, Kuczynska A, et al. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development [J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32 (4): 571-579

[5] Machtinger R, Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence [J]. Reproductive biomedicine online, 2013, 26(3): 210-221

[6] Yu Cheng-he, Zhang Ruo-peng, Li Juan, et al. A predictive model for high-quality blastocyst based on blastomere number, fragmentation, and symmetry[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(5): 809-816

[7] 王利红, 连方. 卵裂球数量及胚胎碎片对人冻胚卵裂球存活状况的影响[J].现代妇产科进展, 2016, (11): 20-22

[8] Sole M, Santalo J, Rodriguez I, et al. Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo score in a cryopreservation programme [J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(2): 129-136

[9] Racowsky C, Stern JE, Gibbons WE, et al. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate[J]. Fertil Steril, 2011, 95(6): 1985-1989

[10] Caseiro AL, Regalo A, Pereira E, et al. Implication of sperm chromosomal abnormalities in recurrent abortion and multiple implantation failure[J]. Reproductive biomedicine online, 2015, 31(4): 481-485

[11] Burrello N, Vicari E, Shin P, et al. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes [J]. Human reproduction (Oxford, England), 2003, 18(7): 1371-1376

[12] Denomme MM, McCallie BR, Parks JC, et al. Inheritance of epigenetic dysregulation from male factor infertility has a direct impact on reproductive potential[J]. Fertility & Sterility, 2018, 110(3): 419-428

[13] Sacha CR, Dimitriadis I, Christou G, et al. The impact of male factor infertility on early and late morphokinetic parameters: a retrospective analysis of 4126 time-lapse monitored embryos [J]. Human reproduction (Oxford, England), 2020, 35(1): 24-31

[14] Check JH, Amui J, Choe JK, et al. Blastomere number and pregnancy rates in the succeeding in vitro fertilization cycle in women who formed all embryos with < or = 5 blastomeres[J]. Clinical and experimental obstetrics & gynecology, 2011, 38(4): 320-321

[15] Luna M, Copperman AB, Duke M, et al. Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 (≥ 10 cells), bringing into question current embryological dogma[J]. Fertility and sterility, 2008, 89(2): 358-363

[16] Zhao Hai-bin, Liu Hui, Li Mei, et al. Over Ten-Cell Good Embryo Transfers on Day Three have Equivalent Clinical Outcomes with Those of Eight-Cell Embryos in Female Patients Aged </=35 Years: A Retrospective Cohort Study[J]. Gynecol Obstet Invest, 2019, 84(3): 298-304

[17] 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[J]. Human reproduction (Oxford, England), 2000, 15(10): 2190-2196

[18] Kroener LL, Ambartsumyan G, Pisarska MD, et al. Increased blastomere number in cleavage-stage embryos is associated with higher aneuploidy[J]. Fertility and sterility, 2015, 103(3): 694-698

[19] Keltz MD, Skorupski JC, Bradley K, et al. Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization [J]. Fertility and sterility, 2006, 86(2): 321-324

[20] Fernandez Gallardo E, Spiessens Carl, D'Hooghe T, et al. Effect of embryo morphology and morphometrics on implantation of vitrified day 3 embryos after warming: a retrospective cohort study [J]. Reproductive biology and endocrinology: RB&E, 2016, 14(1): 40

[21] Safari S, Khalili MA, Barekati Z, et al. Cosmetic micromanipulation of vitrified-warmed cleavage stage embryos does not improve ART outcomes: An ultrastructural study of fragments [J]. Reproductive Biology, 2017, 17(3): 210-217

[22] Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos [J]. Human reproduction (Oxford, England), 2001, 16(4): 719-729