

人类卵裂期胚胎及囊胚形态学评价中国专家共识

中国医师协会生殖医学专业委员会

通信作者:李达,Email:leeda@sina.cn;李蓉,Email:roseli001@sina.com

【摘要】 目前,胚胎形态学评价方法仍是辅助生殖实验室评估胚胎质量的主要手段。然而,由于评价标准细节尚未达成共识且缺乏精准的量化评级指标,现已严重限制了各生殖医学中心间的标准化室间质评与控制管理,更制约了对全国范围内大规模胚胎评级数据的深度挖掘和广泛应用。为进一步完善辅助生殖实验室质量管理体系,提升辅助生殖技术的服务质量,由中国医师协会生殖医学专业委员会发起,并联合全国多家生殖医学中心共同编撰了本共识。

【关键词】 生殖技术, 辅助; 卵裂期胚胎; 囊胚; 形态学评价; 共识

Expert consensus on human embryo morphological assessment: cleavage-stage embryos and blastocysts grading criteria

Chinese Association of Reproductive Medicine

Corresponding authors: Li Da, Email: leeda@sina.cn; Li Rong, Email: roseli001@sina.com

【Abstract】 Up to now, morphological assessment of embryos is still the main method to screen embryos with the most potential for implantation in *in vitro* fertilization (IVF) laboratories. However, due to the lack of a unified consensus and quantitative indicators, the subjective differences among laboratories limit the comparison of inter-laboratory quality among reproductive medicine centers, and it restricts the in-depth analysis and wide application of massive embryo data nationwide. In order to refine the quality system of IVF laboratories and improve the service of assisted reproductive technology, this consensus is initiated by the Chinese Association of Reproductive Medicine, and co-edited with other reproductive medicine centers.

【Key words】 Reproductive techniques, assisted; Cleavage-stage embryos; Blastocyst; Morphological assessment; Consensus

近二十年,延时成像系统(time-lapse)、各类组学技术(基因组学、代谢组学等)、人工智能等胚胎种植潜能评价方法不断涌现,但上述评价方法均存在不同程度的缺陷或争议^[1-3]。因此,目前仍将传统的胚胎形态学指标作为主要评级参数或标准。但迄今为止,尚缺乏统一且简便易行的人类卵裂期胚胎及囊胚形态学评价标准体系。本共识的主要目的在于规范卵裂期胚胎及囊胚的形态学评价标准,完善各中心培养室间的质量控制,整体提升辅助生殖技术的服务质量。

一、卵裂期胚胎评级的主要参考指标及标准共识

卵裂期胚胎评级标准以卵裂球数量、碎片程度、卵裂球均匀度及多核现象等形态学指标为主要依据^[4](表1~2,图1~2)。

1. 卵裂球数量:卵裂球数量标志着胚胎发育速度,也被视为胚胎评级的最重要指标^[5],而高质量的卵裂期胚胎表现为适当的分裂动力学和时序一致性。

2. 碎片程度:碎片程度与妊娠结局密切相关

DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20220619-00266

收稿日期 2022-06-23 本文编辑 王李艳

引用本文:中国医师协会生殖医学专业委员会.人类卵裂期胚胎及囊胚形态学评价中国专家共识[J].中华生殖与避孕杂志,2022,42(12):1218-1225. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20220619-00266.



表1 卵裂期胚胎(第2日)评级标准共识

评级	细胞数	均匀度	碎片	多核
I 级	4-细胞	均匀	<10%	无
II a 级	4-细胞	均匀	10%~25%	无
	2/3/5-细胞	具备阶段特异性卵裂模式	<10%	无
II b 级	2/3/5-细胞	具备阶段特异性卵裂模式	10%~25%	无
III 级	2~5-细胞	不具备阶段特异性卵裂模式或细胞间大小差异较大	<25%	/
	2~5-细胞	/	26%~50%	/
	≥6-细胞	/	<50%	/
IV 级	/	/	>50%	/

注: I 级、II a 级、II b 级、III 级、IV 级优劣层级依次降低;“/”示不受该条件限制

关^[6]。碎片程度通常以卵裂球碎片占胚胎总体积的百分比表示,以<10%为佳。当较大碎片与卵裂球难以区分时,建议将第2日直径<45 μm及第3日直径<40 μm的圆形胞质定义为碎片^[7](图3)。

3. 卵裂球均匀度:理论上,胚胎有丝分裂产生的子细胞大小均等。卵裂球均匀的胚胎已被证明具有较低的多核和非整倍体率以及显著提升的植入率^[8]。但胚胎卵裂球的均匀度和大小也取决于胚胎发育的规律和特定阶段,即阶段特异性卵裂模式^[8](表3)。

4. 多核:如果一个及以上卵裂球出现多于1个细胞核,即为多核胚胎。但由于第3日胚胎卵裂球较小、数量较多且重叠,大大增加了观察难度。因此,可以结合第2日的多核观察结果进行评级。

二、囊胚评级标准共识

囊胚培养是实现胚胎优选和选择性单胚胎移

植的有效手段。因此,完善囊胚形态学评价系统对于准确评价囊胚发育潜能尤为重要。本共识以 Gardner 和 Schoolcraft 囊胚评分系统为基础^[10],结合 2016 年体外受精-胚胎移植实验室操作中国专家共识^[11],根据囊胚扩张程度和孵出状态将评级分为 6 个期别,同时增加了内细胞团(inner cell mass, ICM)D 级评级(表 4~6,图 4)。

三、胚胎观察时间点设置

参照 Istanbul 共识胚胎观察时间点^[12]:卵裂期为受精后(44±1)h(第2日)和(68±1)h(第3日);囊胚第5日、第6日及第7日分别为受精后(116±2)h、(140±2)h及(164±2)h。同时各中心可以根据本中心的胚胎发育特点及工作时间安排进行合理调整,但建议做到每日观察时间一致。

四、胚胎评级的记录方式

1. 卵裂期胚胎评级的书写格式:细胞数+级别(例如:I/8或8I)。鉴于细胞数是胚胎评级最重要的指标,因此本共识将细胞数整合进评级标准,但同时在书写格式上体现出细胞数量。

2. 卵裂球细胞核的标记:并非所有胚胎在观察时均可见卵裂球细胞核(包括单核或多核)。胚胎中卵裂球可见单核,及单核卵裂球占总卵裂球的比例可能与胚胎发育潜能及活产率呈正相关^[13-14],因此可以对这一现象进行特殊记录。可用N代表单核,MN代表多核,数字代表出现单核或多核的数量,无核则不用记录。例如:8-细胞I级,其中6个球可见单核,则记录为I/8^{6N};6-细胞III级,其中1个

表2 卵裂期胚胎(第3日)评级标准共识

评级	细胞数	均匀度	碎片	多核	图示
I 级	8-细胞	均匀	<10%	无	图 1A
II a 级	8-细胞	均匀	10%~25%	无	图 1B
	≥8-细胞	大部分细胞相对均匀	<10%	无	图 1C
	6~7-细胞	具备阶段特异性卵裂模式	<10%	无	图 1D
II b 级	≥8-细胞	大部分细胞相对均匀	10%~25%	无	无
	6~7-细胞	具备阶段特异性卵裂模式	10%~25%	无	图 1E
III a 级	4~5-细胞	具备阶段特异性卵裂模式	<25%	无	图 1F~G
III b 级	≥4-细胞	细胞间大小差异较大或不具备阶段特异性卵裂模式	<25%	/	图 1H~J
	≥4-细胞	/	26%~50%	/	图 1K~L
IV 级	<4-细胞	/	/	/	图 1M
	/	/	>50%	/	图 1N

注: I 级胚胎应为无多核现象的4-细胞(第2日)发育至8-细胞(第3日); I 级胚胎同时还应具有胞质均匀(无空泡等)、细胞间连接紧密、透明带正常(无着色深、过厚/薄、蜡样等)等特征。但一些特殊/异常形态对胚胎发育的影响缺乏有力的数据支持,因此未纳入主要评级指标(常见特殊/异常形态见图2);细胞相对均匀,即大细胞和小细胞的直径差/大细胞直径<20%^[9]; I 级、II a 级、II b 级、III a 级、III b 级、IV 级优劣层级依次降低;“/”示不受该条件限制

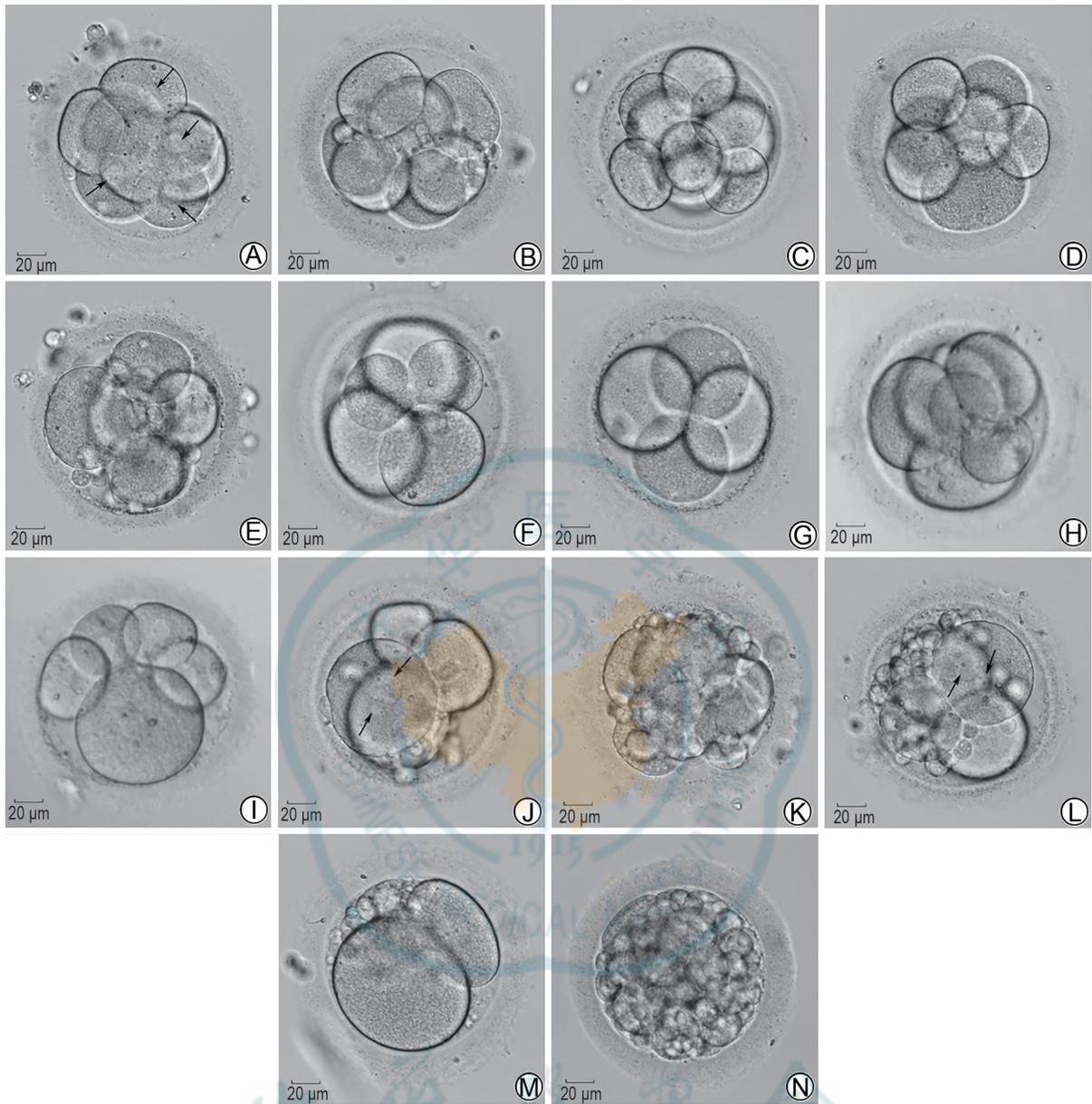


图1 第3日 I~IV 级卵裂期胚胎(×200)

A 示 8 I 级(均匀、无碎片、细胞排列紧密且多数卵裂球可见单核,箭头所示为卵裂球单核);B 示 8 II a 级(碎片 10%~15%);C 示 10 II a 级;D~G 示 7 II a 级、7 II b 级(碎片 15%~20%)、5 III a 级、4 III a 级(均为阶段特异性卵裂模式);H~J 示 6 III b 级、5 III b 级、4 III b 级(均为非阶段特异性卵裂模式,箭头所示为卵裂球多核);K 示 8 III b 级(卵裂球相对均匀,碎片>25%);L 示 4 III b 级(碎片>25%且可见多核,箭头所示为卵裂球多核);M 示 IV 级(发育停滞);N 示 IV 级(碎片>50%)

球可见多核,则记录为 III/6^{1MN}。这一标注方式可能有助于胚胎的进一步优选,但是否可见单核及其数量不作为胚胎评估的主要参考指标。

3. 囊胚评级的书写格式:囊胚评级的书写格式比较一致,但同时可以对滋养层细胞(trophectoderm, TE)和 ICM 的各级评分通过标注“+”或“-”进一步细化,如 4B⁺A、4BB⁻等。这一标注方式可能有助于多层次实现胚胎的进一步优选,但不作为室间胚胎质量控制标准。

五、优质胚胎、可利用胚胎的定义

1. 卵裂期胚胎:根据维也纳共识^[15]并结合多家中心的实际工作经验,本共识建议将卵裂期优质胚胎、可利用胚胎重新定义,详见表 7 及图 5。

2. 囊胚:根据 Gardner 和 Schoolcraft 囊胚评分系统^[10],并结合多家中心的实际工作经验,本共识建议将优质囊胚、可利用囊胚重新定义,详见表 8。

本共识在传统的 Gardner 囊胚评分系统中增加了 ICM 的 D 级评分,目的是对 ICM 传统的 C 级评分

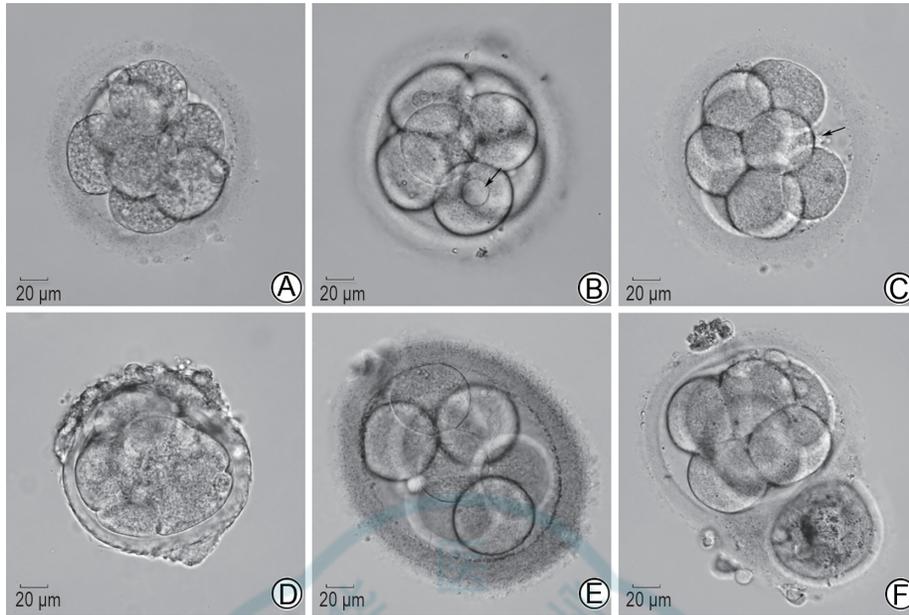
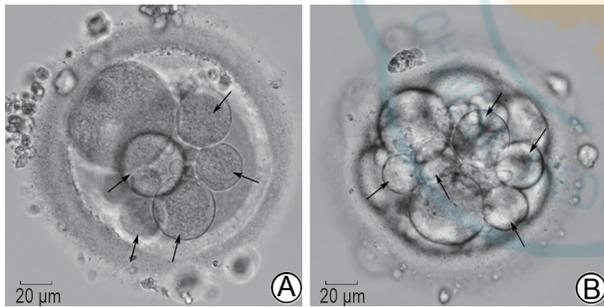


图2 第3日胚胎特殊/异常形态(×200)

A 示胞质点蚀样变(pitting), 颗粒感增加, 表面布满约 1.5 μm 的小凹; B 示胞质空泡(箭头所示), 直径 > 10 μm; C 示箭头所示卵裂球之间可见明显的间隙; D 示透明带呈蜡样/琼脂样; E 示透明带着色深、增厚、椭圆且细胞间连接不够紧密; F 示连体胚胎(透明带相连)。出现上述特殊/异常形态的胚胎, 均不评为 I 级或不作为首选



注: 箭头示较大的碎片, 直径 < 40 μm

图3 卵裂期胚胎中的碎片(×200)

A 示第2日胚胎; B 示第3日胚胎

加以细化。对于 ICM 为 C 级的低质量囊胚, 各中心所报道的临床结局差异较大^[18], 除了 TE 评分差异产生的影响外, 传统评分方法未对细胞少和完全无 ICM 的囊胚加以区分, 也是导致临床结局差异较大的重要原因。对于本共识中 ICM 评分为 D 级的囊胚, 建议直接丢弃, 从而减轻患者不必要的经济负担和实验室人员的工作量。

六、小结及说明

1. 关于胚胎的异常或特殊形态学特征: 建议将异常或特殊形态学特征作为胚胎进一步筛选的参考, 例如: 卵裂球胞质特征(pitting、空泡等)、卵裂球空间排列(四叶草样或细胞间隙过大)、透明带异常(厚、着色深、蜡样/琼脂样)、卵裂期胚胎的早期融合、

表3 具有阶段特异性卵裂模式的胚胎形态模式图

胚胎	图示	描述
4-细胞胚胎		4个卵裂球大小均等
5-细胞胚胎		2个卵裂球较小且均等(紫) 3个卵裂球较大且均等(蓝)
6-细胞胚胎		4个卵裂球较小且均等(紫) 2个卵裂球较大且均等(蓝)
7-细胞胚胎		6个卵裂球较小且均等(紫) 1个卵裂球较大(蓝)
8-细胞胚胎		8个卵裂球大小均等

注: 除此之外的分裂模式被定义为非阶段特异性卵裂模式^[8]; 上述 4~7-细胞具有阶段特异性卵裂模式的胚胎, 仅表明其细胞的分裂模式更合理, 但它们仍存在发育速度或卵裂同步性相对较差的问题; 特异性或非特异性卵裂模式主要是通过细胞大小来推测胚胎发育是否符合动态分裂规律, 无须通过时差成像系统进行观察判断

连体胚胎(共用透明带或透明带相连的具有两个独立胞质的胚胎)、囊胚透明带下的细胞或碎片残留、5期囊胚的孵出方式等。但鉴于上述异常或特殊形态对胚胎质量及植入潜能的预测价值尚不明确,因此未作为胚胎评价的主要参考指标纳入本共识。

2. 对于5期囊胚的定义:本共识建议只要有TE细胞孵出即可评为5期。但对于少量TE细胞孵出的囊胚是否定义为5期一直存在争议。有研究显示,部分囊胚在透明带的一处或多处所出现的少量TE细胞孵出,并非囊胚最终孵出的位点^[19]。因此

表4 囊胚(第5/6/7日)分期标准

分期	名称	形态描述	图示
1期	早期囊胚 I	囊胚腔<胚胎总体积的 1/2	图4A
2期	早期囊胚 II	囊胚腔>胚胎总体积的 1/2	图4B
3期	扩张期囊胚	囊胚腔完全扩张充满整个胚胎	图4C
4期	充分扩张期囊胚	胚胎体积明显增大且透明带变薄 ^a	图4D
5期	孵化囊胚	滋养外胚层细胞开始从透明带孵出	图4E~F
6期	孵出囊胚	囊胚全部从透明带中孵出	图4G

注:^a示通常透明带厚度<5 μm

少量且无腔的TE细胞孵出,似乎不能完全预示囊胚的自然孵化能力。故本共识同时建议,在5期评

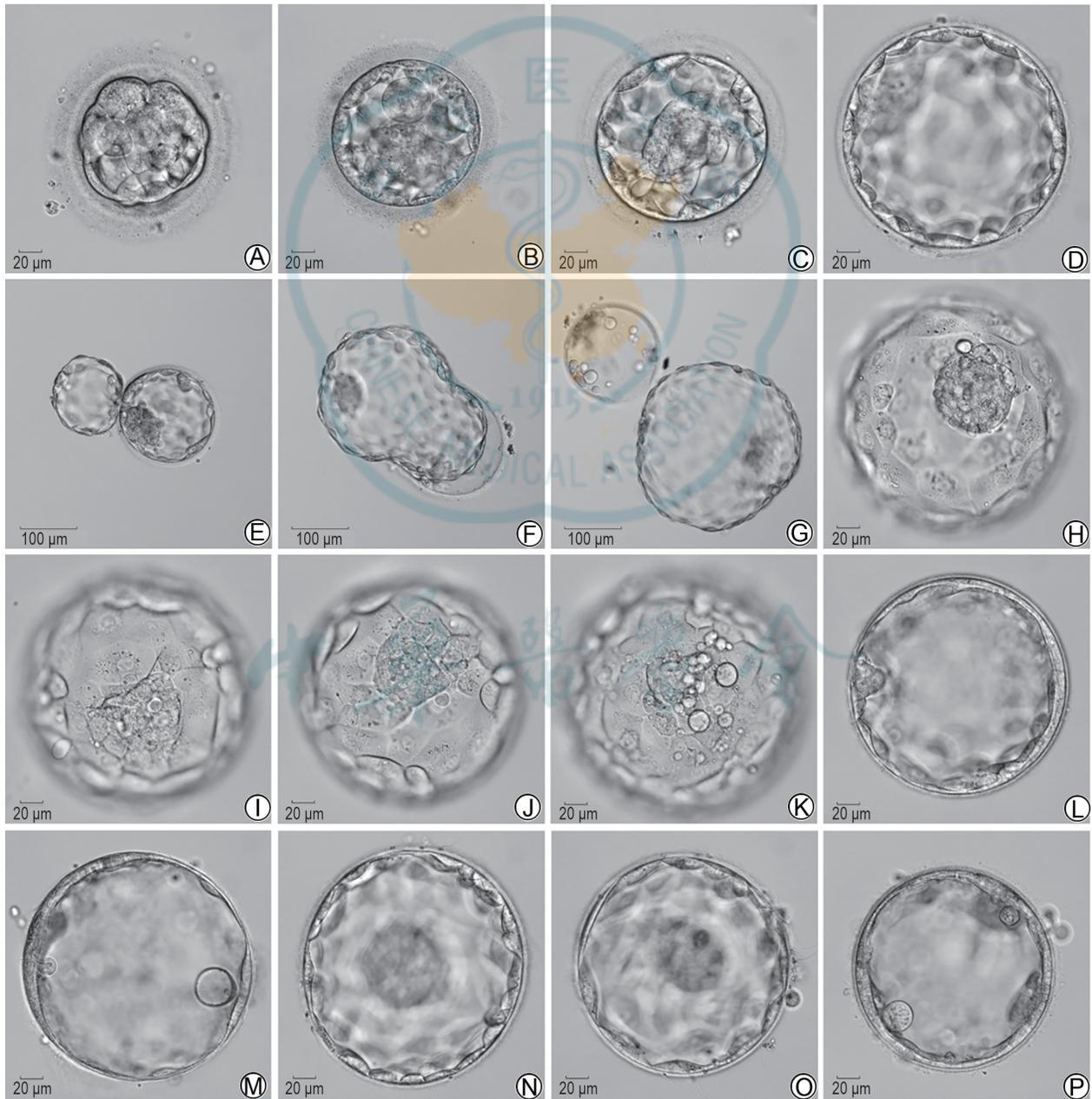


图4 不同发育阶段和各期别评级的囊胚(A~D、H~P×200, E~G×100)

A示1期;B示2期;C示3期;D示4期;E示5期(8字型孵出);F示5期(花生型孵出);G示6期;H示 ICM-A级;I~J示 ICM-B级;K~L示 ICM-C级;M示 ICM-D级;N示 TE-A级;O示 TE-B级;P示 TE-C级

表 5 3~6 期囊胚 ICM 评级

评级	形态描述	图示
A	细胞数量多, 紧致且融合, 形态规则(4~6 期囊胚直径>60 μm)	图 4H
B	细胞数量尚可, 但细胞间连接较松散、形态不规则(4~6 期囊胚直径>60 μm)	图 4I~J
C	细胞数极少, 细胞团小或不明显, 部分细胞出现退化或凋亡现象	图 4K~L
D	不可见任何 ICM 样细胞团或完全退化	图 4M

注: ICM 示内细胞团

分的基础上对花生型孵出(透明带开口较大)、8 字型孵出(TE 细胞孵出部分成腔)、少量 TE 孵出(TE 细胞孵出部分未成腔)等不同类型 5 期囊胚加以特殊标记, 有助于胚胎的区别与优选(图 6)。

3. 对于延迟受精、晚期补救及 OPN、1PN 来源胚胎的评级: 延迟受精、晚期补救、OPN 及 1PN 来源的胚胎均可采用本共识评级标准进行评级。①对于延迟受精和晚期补救[体外授精过夜受精失败后行卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)补救, 或 ICSI 受精失败后行卵子激活]的胚胎, 应进行相应的备注, 在选择胚胎移植时不作优先考虑。②对于 OPN 来源的胚胎(第 1 日未

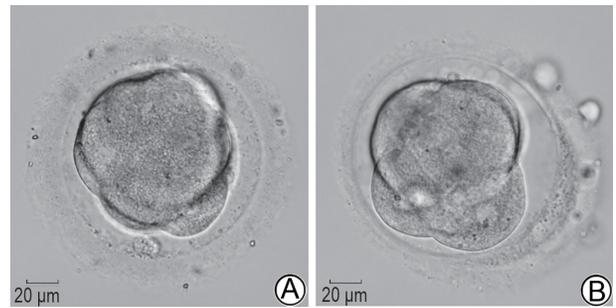


图 5 第 3 日早期融合胚胎(×200)

A 示约 10-细胞的早期融合胚胎(优质胚胎), 该胚胎最终发育成优质囊胚; B 示约 5-细胞的早期融合胚胎(非优质胚胎), 该胚胎最终未形成囊胚

见 PN, 但发生正常卵裂), 无论级别如何, 均不作为移植首选。鉴于高质量 OPN 来源胚胎具有与 2PN 来源胚胎近似的正常染色体发生率、双亲二倍体比例以及妊娠结局^[20], 本共识建议对高质量 OPN 来源胚胎行囊胚培养, 如果形成可利用囊胚, 应为患者提供必要的遗传咨询, 经充分知情同意后再行移植或冷冻保存。③对于 1PN 来源的胚胎, 同样不作为移植首选。建议对常规体外受精来源的高质量 1PN 胚胎进行囊胚培养, 如果形成可利用囊胚, 应

表 6 3~6 期囊胚滋养层细胞评级

评级	形态描述	图示
A	沿囊胚“赤道面”分布的细胞数较多, 排列致密, 大小均匀, 在囊胚底面全部形态清晰, 大多数可见细胞核(4 期囊胚赤道面细胞数>15 个)	图 4N
B	沿囊胚“赤道面”分布的细胞数尚可, 排列相对松散, 大小欠均匀, 在囊胚底面的部分细胞形态清晰, 部分可见细胞核(4 期囊胚赤道面细胞数 8~15 个)	图 4O
C	沿囊胚“赤道面”分布的细胞数极少, 大小明显不均匀, 滋养细胞与透明带之间有明显的碎片残留, 囊胚底面的细胞难以辨认(4 期囊胚赤道面细胞数<8 个)	图 4P

注: 囊胚滋养层细胞细胞核的观察, 可以通过显微镜变焦来实现, 扩张充分的高质量囊胚滋养层细胞经过拉伸会比较容易地观察到细胞核的存在

表 7 第 2/3 日优质胚胎、可利用胚胎、废弃胚胎的定义

胚胎	第 2 日	第 3 日	用途
优质胚胎	I/4、II a/2-5	I/8、II a/7-14、早融 ^a (≥7-细胞)	移植、冷冻或囊胚培养, 其中 I/4(第 2 日)发育至 I/8(第 3 日)的无碎片胚胎为最优胚胎, 可作为移植首选
可利用胚胎	I~III 级	I~III 级	移植、冷冻或囊胚培养。其中第 3 日的 III b 级胚胎建议行囊胚培养
废弃胚胎	IV	IV	不建议用于移植或冷冻

注: ^a示第 3 日胚胎发生早期融合是比较常见的现象(图 5); 较多细胞且碎片<10% 的早期融合胚胎具有较好的妊娠结局^[16-17]; 参考相关研究并结合多家中心经验, 本共识建议将≥7-细胞且碎片<10% 的早期融合胚胎归为优质胚胎

表 8 优质囊胚、可利用囊胚的定义

胚胎	第 5 日	第 6 日	第 7 日
优质囊胚	≥3 期评级为 AA、AB、BA、BB	≥4 期评级为 AA、AB、BA、BB	/
可利用囊胚	优质囊胚、≥3 期评级为 AC、CA、BC、CB	优质囊胚、≥3 期评级为 AC、CA、BC、CB	≥4 期评级为 AA、AB、BA、BB

注: 第 5/6 日的 3 期及以上、评级为 CC 的低质量囊胚, 可以根据患者具体情况及各中心的低质量囊胚应用策略决定是否移植、冷冻或废弃; 第 6 日仍为 1 期或 2 期的早期囊胚, 建议培养至第 7 日; 如果细胞折光性较好, 无大面积退化灶, 并且能达到 4 期及以上、评级为 AA、AB、BA、BB 则可用于移植或冷冻; “/”示不适用

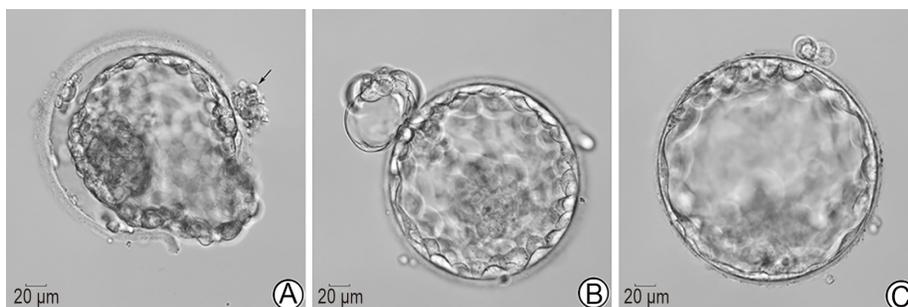


图6 不同孵出类型的5期囊胚($\times 200$)

A 示花生型孵出,同时可见透明带其他位点少量TE细胞孵出(箭头所示);B 示8字型孵出,孵出的TE细胞明显成腔;C 示TE细胞少量孵出,未成腔

为患者提供必要的遗传咨询,经充分知情同意后再行移植或冷冻保存^[20-21]。

上述来源胚胎在进行关键绩效指标(key performance indicator, KPI)相关统计时,可单独进行计算。

4. 关于第4日胚胎(桑葚胚)的评级:桑葚胚通常被认为是一个短暂且信息相对匮乏的发育阶段。事实上,第4日胚胎移植近期也得到了关注^[22]。Istanbul 共识将第4日胚胎分为三级^[12]。1级:发生第四次有丝分裂,且胚胎整体发生致密化;2级:发生第四次有丝分裂,胚胎大部分发生致密化;3级:不到一半的胚胎发生致密化,且伴随2~3个游离的卵裂球。然而,通过time-lapse的观察显示,胚胎融合是一个动态变化的过程,同一胚胎在不同的时间点可能出现不同的级别。因此结合time-lapse能够比较客观、准确地对第4日胚胎进行评价。

虽然本共识尽量做到指标的数字化和客观化,但部分指标评价依然受到客观条件和主观因素的影响:①碎片比例,碎片通常呈现出大小不一、分布不均、随着细胞分裂过程而动态变化的特点,且主观性评价差异较大;②对于阶段特异性卵裂模式,通过time-lapse可以发现部分发育潜能较好的卵裂期胚胎也可能与理论上的阶段特异性卵裂模式并不完全相符,这可能是细胞分裂并非完全均匀一致所致;③ICM评级,虽然对ICM的评级进行了部分量化,但即使A级ICM形态也只是相对规则,而非绝对圆形或椭圆形。

执笔专家 李达(中国医科大学附属盛京医院)、李蓉(北京大学第三医院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)

参与编写共识的专家组成员(按姓氏汉语拼音排序) 蔡令波(南京医科大学第一附属医院)、曹云霞(安徽医科大学第一附属医院)、陈曦(北京大学人民医院)、陈子江(山东大学附属生殖医院)、程东凯(沈阳菁华医院)、高英卓(中国医科

大学附属盛京医院)、顾亦凡(中信湘雅生殖与遗传专科医院)、李博(空军军医大学唐都医院)、李达(中国医科大学附属盛京医院)、李蓉(北京大学第三医院)、刘丽英(沈阳市妇婴医院)、刘平(北京大学第三医院)、马燕琳(海南医学院第一附属医院)、孟祥黔(成都西囡妇科医院)、乔杰(北京大学第三医院)、史艳彬(大连市妇女儿童医疗中心)、汤小晗(哈尔滨医科大学附属第一医院)、王喜良(中国人民解放军北部战区总医院)、王秀霞(中国医科大学附属盛京医院)、吴克良(山东大学附属生殖医院)、吴琰婷(复旦大学附属妇产科医院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)、尹太郎(武汉大学人民医院)、张艳(武汉大学人民医院)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李达和李蓉负责论文撰写、文献指导、论文修改;杨大磊负责论文撰写;其他共识专家组成员均参与了共识的讨论、修改及定稿

参 考 文 献

- [1] Armstrong S, Bhide P, Jordan V, et al. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction[J]/CD. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 5(5): CD011320. DOI: 10.1002/14651858.CD011320.pub4.
- [2] Brouillet S, Martinez G, Coutton C, et al. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review[J]. Reprod Biomed Online, 2020, 40(6): 779-796. DOI: 10.1016/j.rbmo.2020.02.002.
- [3] Zaninovic N, Rosenwaks Z. Artificial intelligence in human *in vitro* fertilization and embryology[J]. Fertil Steril, 2020, 114(5): 914-920. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.09.157.
- [4] Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers[J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(4): 459-471. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.06.026.
- [5] Machtinger R, Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 26(3): 210-221. DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.10.021.
- [6] Ebner T, Yaman C, Moser M, et al. Embryo fragmentation

- in vitro* and its impact on treatment and pregnancy outcome[J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(2): 281-285. DOI: 10.1016/s0015-0282(01)01904-5.
- [7] Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2003, 20(8): 309-313. DOI: 10.1023/a:1024805407058.
- [8] Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG, et al. The cleavage stage embryo[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27 Suppl 1: i50-i71. DOI: 10.1093/humrep/des224.
- [9] Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(2): 313-318. DOI: 10.1093/humrep/16.2.313.
- [10] Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, et al. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two *in vitro* fertilization programs[J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(4): 604-609. DOI: 10.1016/s0015-0282(99)00311-8.
- [11] 中华医学会生殖医学分会. 人类体外受精-胚胎移植实验室操作专家共识(2016)[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(1): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.01.001. Embryologist Group, China Society of Reproduction Medicine, Chinese Medical Association. Consensus on human IVF-ET laboratory manipulations (2016)[J]. *J Reprod Med*, 2017, 26(1): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.01.001.
- [12] 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. DOI: 10.1093/humrep/der037.
- [13] Rhenman A, Berglund L, Brodin T, et al. Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(1): 28-36. DOI: 10.1093/humrep/deu295.
- [14] Setti AS, Figueira RCS, Braga D, et al. Blastomere nucleation: predictive factors and influence of blastomere with no apparent nuclei on blastocyst development and implantation[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2018, 22(2): 102-107. DOI: 10.5935/1518-0557.20180028.
- [15] ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators[J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 35(5): 494-510. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.06.015.
- [16] Skiadas CC, Jackson KV, Racowsky C. Early compaction on day 3 may be associated with increased implantation potential[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(5): 1386-1391. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.03.051.
- [17] Iwata K, Yumoto K, Sugishima M, et al. Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(4): 421-426. DOI: 10.1007/s10815-014-0195-2.
- [18] Kemper JM, Liu Y, Afnan M, et al. Should we look for a low-grade threshold for blastocyst transfer? A scoping review[J]. *Reprod Biomed Online*, 2021, 42(4): 709-716. DOI: 10.1016/j.rbmo.2021.01.019.
- [19] Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Hatching of *in vitro* fertilized human embryos is influenced by fertilization method[J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(5): 1277-1282. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.005.
- [20] Li M, Huang J, Zhuang X, et al. Obstetric and neonatal outcomes after the transfer of vitrified-warmed blastocysts developing from nonpronuclear and monopronuclear zygotes: a retrospective cohort study[J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(1): 110-117. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.07.019.
- [21] Si J, Zhu X, Lyu Q, et al. Obstetrical and neonatal outcomes after transfer of cleavage-stage and blastocyst-stage embryos derived from monopronuclear zygotes: a retrospective cohort study[J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(3): 527-533. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.045.
- [22] Simopoulou M, Sfakianoudis K, Tsioulou P, et al. Should the flexibility enabled by performing a day-4 embryo transfer remain as a valid option in the IVF laboratory? A systematic review and network meta-analysis[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(6): 1049-1061. DOI: 10.1007/s10815-019-01475-0.