

植入前无创胚胎选择技术：从培养基中提取的 miRNA 到 AI 的多维评估

陈芷若*, 农 夏, 彭丽思, 王玉霞#

暨南大学附属第一医院妇产科, 广东 广州

收稿日期: 2025年9月21日; 录用日期: 2025年10月14日; 发布日期: 2025年10月20日

摘 要

辅助生殖技术(ART)为不孕夫妇带来新的希望, 但胚胎选择方法仍是影响妊娠结局的关键因素。本文综述了无创胚胎选择的主要研究进展, 包括培养基中的miRNA与cfDNA检测、延时成像(TLI)和人工智能(AI)分析。传统形态学评估和PGT-A虽被广泛应用, 但分别存在主观性强与侵入性高等局限。相比之下, 无创技术在保障胚胎安全的同时, 能够从分子、生物学及形态学多维度提供更客观的评估。当前证据表明, 这些方法在提高胚胎筛选准确性、缩短妊娠周期和提升活产率方面具有潜力。然而技术标准化不足、结果一致性差及成本效益不明仍是推广的主要障碍。未来研究应聚焦多模态数据融合与大规模临床验证, 以推动无创技术在ART中的临床转化, 并为个体化胚胎选择提供可靠依据。

关键词

辅助生殖技术, 无创, 胚胎选择

Non-Invasive Preimplantation Embryo Selection: From Culture Medium miRNA to Multidimensional Evaluation with AI

Zhiruo Chen*, Xia Nong, Lisi Peng, Yuxia Wang#

Department of Gynaecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou Guangdong

Received: September 21, 2025; accepted: October 14, 2025; published: October 20, 2025

Abstract

Assisted reproductive technology (ART) has brought new hope to infertile couples, yet embryo

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 陈芷若, 农夏, 彭丽思, 王玉霞. 植入前无创胚胎选择技术: 从培养基中提取的 miRNA 到 AI 的多维评估[J]. 临床医学进展, 2025, 15(10): 1885-1893. DOI: 10.12677/acm.2025.15102959

selection remains a critical factor influencing pregnancy outcomes. This review summarizes recent advances in non-invasive embryo selection, including microRNA (miRNA) and cell-free DNA (cfDNA) detection in spent culture media, time-lapse imaging (TLI), and artificial intelligence (AI)-based analysis. Conventional approaches, such as morphological assessment and preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A), are widely used but limited by subjectivity and invasiveness, respectively. In contrast, non-invasive techniques ensure embryo safety while providing multidimensional evaluation from molecular, biological, and morphokinetic perspectives. Current evidence suggests their potential to improve selection accuracy, shorten time to pregnancy, and increase live birth rates. However, lack of technical standardization, inconsistent reproducibility, and unclear cost-effectiveness remain major barriers to clinical application. Future research should focus on multimodal data integration and large-scale clinical validation to promote the translation of non-invasive technologies in ART and support individualized embryo selection strategies.

Keywords

ART, Non-Invasive, Embryo Selection

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

辅助生殖技术在过去四十年中为全球数百万不孕夫妇带来希望，但活产率仍徘徊在 25%~30% [1] 众多因素影响着 IVF/ICSI 周期后的妊娠率，多数观点认为胚胎质量是主要因素[2] [3]，非整倍体可导致植入失败或早期流产[4]-[6]，现如今该问题的核心在于胚胎选择技术的局限性。

传统的胚胎选择方法主要依赖于形态学评估(如观察细胞均一性、分裂速度)和侵入性遗传学检测(如 PGT-A)。形态学评估胚胎发育的缺点主要为主观性强且预测价值有限，PGT-A 则需通过活检获取胚胎一部分细胞，存在损害胚胎发育潜力、引起伦理问题及费用高昂、对检测人员专业技术要求较高等弊端[2] [7] [8]。胚胎嵌合也可能会导致 PGT-A 的假阳性和假阴性，因为产生胎儿的内细胞团(ICM)没有被检测 [7]。

由于上述原因，学界更倾向于开发和实施非侵入性胚胎选择技术，通过分析胚胎培养基中的培养液所含生物标志物或利用非侵入性动态监测手段，以实现安全、精准、可重复的胚胎评估。其次，通过发掘更精准安全的胚胎选择技术，也可减少患者移植胚胎的次数及成功妊娠所需的时间。近年基于废培养基(SECM)的 miRNA 分析、cfDNA 检测、延时成像(TLI)及人工智能(AI)整合技术成为研究热点，但存在的优点与不足也较为明显。这些技术提供了互补的不同维度的胚胎信息，miRNA、cfDNA 揭示了分子与遗传层面的状态，TLI 捕捉了动态发育的形态学表型，而 AI 则提供了融合多模态数据、实现精准预测的计算框架。本文旨在系统综述上述无创技术的原理、应用与局限性，并探讨多种技术协同应用，以期优化 ART 结局提供合理的综合方案及理论依据。

2. 基于生物学标志物的无创检测技术

2.1. 培养基 miRNA 分析

胚胎发育潜能的评估需要可靠的分子标记物，而长度约 19~25 个核苷酸的非编码 RNA 因其独特的生物学特性展现出显著优势。这类高度保守的短链分子不仅可作为生理/病理预测标志物调控发育的关键

过程,还能通过外泌体和微囊泡的特异性包装机制保持稳定[9][10],在 SECM 中长期保存而不易降解。研究表明,其在整倍体与非整倍体胚胎中的差异表达可间接反映胚胎的染色体状态、代谢活性及发育潜能[11],以及与胚胎干细胞未分化状态的相关性,为无创胚胎评估提供了新的研究方向。

在辅助生殖领域,miRNAs 的无创检测展现出独特的临床应用价值。相较于传统蛋白质标志物,其稳定的特性允许通过标准化流程进行高效提取和精准定量,结合 qRT-PCR 或 NGS 测序技术可实现可靠分析。这种检测方法完全规避了侵入性操作的风险,在确保胚胎安全的同时,为从卵裂期到囊胚期的连续发育评估提供了可能。现有的前瞻性研究设计进一步验证了其临床实用性,使胚胎移植手术能够与分子分析在同日内完成,大大提升了诊疗效率。

尽管培养液 miRNA 表达谱在一定程度上可反映胚胎质量,但 miRNAs 标志物的选择仍未得出确定性结论。研究发现在非整倍体胚胎的 SECM 中存在 2 种 miRNA,即 miR-191 和 miR-372 具有特异性,其中较高水平的 miR-191 与非整倍体培养基样本和失败的 IVF 周期相关,推测 miR-191 可能是胚胎非整倍体和随后妊娠失败的生物标志物[11]。miR-372 虽与倍性无关,但其高浓度同样预示不良妊娠结局。进一步研究发现 miR-191 和 miR-372 在 ICSI 受精的培养基中表达含量更高,研究者提出可能是 ICSI 后引起的胚胎物理损伤或胚胎细胞应激造成更多的 miRNA 分泌到培养基中,因此 ICSI 可能改变 miRNA 的分泌模式,可能降低其作为普适性预测标志物的可靠性[11],未来或许需区分 IVF/ICSI 来源建立独立数据库。

差异表达的 miRNAs 不仅是评估胚胎质量和预测妊娠结局的潜在生物标志物,更是揭示胚胎与母体着床微环境间复杂对话机制的关键介质。MiRNAs 的调控角色首先体现在囊胚阶段,在 SECM 中鉴定出特定的 miRNA 群体,其中一部分被预测参与子宫内膜功能调控,为 miRNA 介导胚胎着床前交互提供了直接依据[12]。植入失败囊胚的 SECM 中 hsa-miR-661、hsa-miR-21-5p 和 hsa-miR-372-5p 显著高表达,进一步表明这些 miRNAs 的异常升高可能不利于着床[13]。在更早的卵裂期,成功妊娠胚胎的培养液中 Hsa-miR-26b-5p 和 hsa-miR-21-5p 表达显著降低,提示其低表达可能预示良好结局[9]。也有研究报道 miRNAs 的表达模式与胚胎质量和妊娠结局的关联呈现出双向性,如 miR-19b-3p 的丰度被报道与妊娠结局显著相关[14],而颗粒细胞来源的 hsa-miR-320a-3p 和 hsa-miR-483-5p 的高表达则与优质胚胎率和活产率呈负相关[15]。综合来看,这些在不同胚胎阶段、不同来源样本中发现且表达差异与特定结局紧密关联的 miRNAs,共同构成了一个潜在的“双相表达特征”体系。不仅为无创胚胎筛选和妊娠预测提供了丰富的候选标志物,其差异表达图谱为我们未来深入解析胚胎发育潜能、着床准备状态以及两者间精密的分子对话机制开辟了新的、极具价值的研究视角。

尽管以上多项研究报道了 miRNAs 与胚胎发育结局相关,但研究间结论存在显著差异。导致这种不一致的关键方法学因素包括样本来源与采集时点、受精方式差异、培养基配方、是否清除颗粒细胞或精子残留、miRNA 提取与定量等。此外,样本量小和单中心队列也降低了结果的可重复性。为提高可比性,未来研究建议采用明确统一的样本收集与处理流程、报告平台与方法,并在多中心队列中进行验证。

2.2. cfDNA 基因检测

胚胎在体外生长过程中会向培养液中释放游离 DNA,胚胎也可能通过细胞裂解、细胞凋亡、细胞碎片或分裂细胞主动释放[16]-[18],并在释放过程中形成了胚胎来源的特征性 cfDNA。2013 年有研究者首次报道了 SECM 中存在 cfDNA,并发现低形态等级胚胎的 SECM 中双链 DNA 浓度显著高于优质胚胎,且进一步分析表明这些 DNA 主要来源于线粒体(mt DNA),其含量与胚胎碎片化程度正相关,提示 cfDNA 可能主要来自无核的细胞质碎片而非凋亡小体[19]。还有研究者进一步证实了胚胎 cfDNA 的这种片段化特征,他们观察到提取的 cfDNA 片段大小呈现双峰分布:一个主峰位于 160 至 220 bp 区间,符合典型的

凋亡片段特征；另一个较宽的次峰则位于 300 至 400 bp 区间，表明 cfDNA 可能同时源于凋亡和非凋亡机制[20]。这一发现得到活体成像实验的支持，他们观察到滋养外胚层(TE)在扩张过程中因机械压力导致核 DNA 脱落[21]。

关于 cfDNA 的细胞来源及其代表性问题的研究取得了重要进展，但不同研究团队的结果存在明显分歧。甲基化特征分析发现培养液中的 cfDNA 同时来源于 ICM 和 TE，但在检测过程中可能受到极体、精子及颗粒细胞 DNA 的污染[22]。整倍体与非整倍体胚胎的 ICM 和 TE 在细胞凋亡和增殖水平上存在显著差异，与非整倍体胚胎相比，整倍体胚胎的 TE 和 ICM 表现出较低的细胞增殖和凋亡水平[23][24]。但有研究表明整倍体胚胎反而较非整倍体胚胎释放了更多的 cfDNA [16]，这一发现与传统认为凋亡是非整倍体校正机制的观点相矛盾，提示我们需要重新审视 cfDNA 释放的调控机制。然而，以上两种观点都认同凋亡主要发生在 ICM，表明若 cfDNA 主要来源于凋亡细胞，可能更偏向反映 ICM 而非整个 TE 的遗传信息，从而影响其代表性。

非侵入性 PGT (niPGT-A)可利用囊胚液(BF)或 SECM 中的 cfDNA 评估胚胎遗传状态，但 niPGT-A 的临床应用潜力仍面临准确性挑战。BF 虽被早期研究[25]证实含有 cfDNA，但其获取需抽吸微量囊胚液[26]，本质上属于微创操作，且样本量极小因而可能导致扩增效率低下。更重要的是，关于 BF-DNA 与 TE 活检结果一致性的研究结论存在矛盾，相关报告的一致性范围极宽(37.5%~93.8%) [27][28]，表明其作为临床可靠遗传来源的适用性存疑。相比之下，SECM 中 cfDNA 的获取是真正无创的，且其扩增成功率通常较高(77.3%~100%) [29]-[32]。虽然基于 SECM cfDNA 的 niPGT-A 与 TE 活检在某些研究中显示出高度一致性，但不同研究间的一致性率波动巨大(33%~100%) [28][32]。关于 niPGT-A 结果差异，大多数研究认为影响准确性的关键因素包括母体和培养基 DNA 污染[32][33]、自我校正机制[34]、TE 嵌合现象等。特别需要强调的是，由于 cfDNA 可能主要反映 ICM 的遗传信息，这种 ICM 偏向性将直接影响检测结果对整体胚胎的代表性。为澄清上述问题，开展一项多中心、前瞻、配对设计研究很有必要。研究者可以在相同囊胚上同时采集 TE 活检、BF 与 SECM 样本，使用统一的提取/扩增/测序平台，盲法生信分析并报告一致性率及 95%置信区间，同时预先登记并在事后按受精方式、培养天数、胚胎碎片化程度等因子做分层分析，从而可以解析各因素对研究结果一致性的贡献。

niPGT-A 能否在临床中广泛应用的关键问题是 SECM 中 DNA 的检测结果是否能够反映胚胎的遗传学状态。大多数研究认为 SECM 结果和对照胚胎中通常发生的不一致主要归因于母体来源的 cfDNA 污染及培养基原有的 cfDNA 污染[29][30]，囊胚期自我校正机制和 TE 嵌合现象等也是影响检测结果准确性的因素。此外，通过优化一致性的定义、抽样方法、分析方法等也能够提升该技术的准确性。综上，niPGT-A 技术的未来发展及其临床转化一方面依赖于从源头优化胚胎培养条件以减少背景 DNA 释放、并建立严格标准化的 SECM 采集与处理流程，以最大限度降低污染风险和技术偏倚；另一方面，研究者也应在严格设计的临床研究框架下，系统性地验证优化后技术的性能，特别是在复杂背景下的稳健性。

3. 基于形态动力学的无创检测技术

3.1. 延时成像技术(Time-Lapse Imaging)

延时成像技术(TLI)的核心价值在于其能够通过完全无干扰的连续动态监测，突破传统静态形态学评估的固有局限，为胚胎发育潜能提供基于完整发育轨迹的分析。传统胚胎评估依赖胚胎学家在固定时间点对形态进行观察和评分，然而这种方法面临多重挑战，囊胚形态分级标准尚欠精细且存在解读差异，确定最佳观察时间点存在争议[35]，且胚胎状态可能在数小时内发生显著变化，关键发育事件如异常分裂、碎片化等极易发生在观察间隔期而被遗漏[36]。理论上增加观察频率可改善信息获取，但频繁移出培养箱进行人工检查会将胚胎暴露于温度、湿度和气体波动等不良变化中，潜在地损害其活力[37]。TLI 技术则

从根本上解决了这一矛盾，它利用集成于培养箱内的高分辨率摄像系统和计算机图像处理，在不扰动胚胎培养环境的前提下，定时自动捕获图像并合成发育视频[38]。这不仅完整记录了从受精到囊胚形成的整个连续过程，更能精准捕捉细胞分裂同步性、碎片产生与吸收、囊胚腔形成与扩张等关键动态事件的时间节点和细节特征[37][39]。TLI 超越了传统主观的“快照式”评估，通过分析这些连续影像生成的量化形态动力学参数如分裂周期时长、囊胚扩增速率等，为胚胎学家提供了反映胚胎内在发育活力的高维度动态数据集。TLI 将胚胎评估从依赖有限的静态观察转向基于连续发育轨迹的客观分析，以提升体外受精的成功率。

尽管 TLI 为胚胎评估引入了方法论层面的革新，其临床应用仍需客观审视其面临的成本、培训要求及循证医学挑战。TLI 首要的实践障碍在于昂贵的专用设备投入以及对实验室人员进行的必要专门培训，更关键的限制在于当前支持 TLI 广泛取代传统培养的核心临床证据尚存在分歧。部分研究直接比较了 TLI 培养箱与传统培养箱的临床结局，未能发现 TLI 在持续培养或基于形态动力学分级方面带来显著优势[40]。另一些分析则发现尽管活产率未见差异，但使用 TLI 可显著提高持续妊娠率和活产率并减少早期妊娠丢失[41][42]。以上两种观点的分歧可能是由于设备灵敏度差异及关键形态动力学参数的阈值设定缺乏国际共识，导致研究间可比性降低。此外，成像技术所积累的海量动态数据高度依赖 AI 算法进行分析挖掘，AI 不成熟也是未能充分发挥 TLI 的全信息潜力的重要因素之一。因此，在方法学部分应明确报告设备型号、成像频率、关键时间点定义与注释流程，且未来的验证性 RCT 应采用多中心随机化、盲法结局评估，并在统计分析前预先登记形态学阈值与次要分析项，以提高结论的可比性与可重复性。

3.2. 人工智能预测

AI 技术代表了一种极具前景的非侵入性胚胎评估方法，其核心优势在于能够融合来自 TLI 的形态动力学参数与培养基中的关键生物标志物如 miRNAs、cfDNA，构建胚胎发育的多维全景视图。AI 算法一方面可深度解析 TLI 系统捕获的胚胎动态发育过程细节，另一方面又能同步整合源自同一培养环境的生物分子信息。这种对多源异质数据的综合处理能力，使 AI 能够生成超越单一模态的、更客观且精准的胚胎评估模型，为无创筛选提供了强大的决策支持基础。

AI 驱动的胚胎评估的核心突破在于通过机器学习深度挖掘并融合形态动力学、生物分子、遗传片段，构建超越传统方法的精准预测模型。相较于依赖特定发育阶段静态形态学观察且易受观察者差异影响的手动评估[43][44]，AI 算法能够从海量数据中自主学习与胚胎发育潜能高度关联的复杂特征模式，其预测准确性已通过多项研究证实显著优于传统方法[45]-[47]。首先，AI 与 TLI 的深度结合将 TLI 从单纯的发育记录仪转变为强大的预测引擎。AI 算法能够解析 TLI 实时捕获的完整发育轨迹，包括细胞分裂时序、囊胚扩张速率等关键参数[48]，并建立这些动态特征与植入成功及持续妊娠概率的定量关联。此外 AI 可同步分析 SECM 中的关键生物标志物，例如，通过解析反映胚胎染色体状态与发育调控的 miRNAs 表达谱，或结合指示遗传状态的 cfDNA 丰度，AI 能够将这些分子信息与形态动力学参数进行多模态融合。最终，这种对 TLI 形态学、miRNAs 调控信息及 cfDNA 遗传片段等多维数据的综合建模能力，有望使 AI 能够生成更为全面、客观且精准的胚胎评估体系[49]，为优化无创胚胎筛选和提升体外受精成功率提供了革命性的决策支持工具。

尽管 AI 在提升胚胎评估的客观性与效率方面潜力巨大，其迈向成熟临床应用的关键瓶颈在于模型可解释性缺失与数据依赖性风险。机器学习(ML)作为 AI 的核心子领域，其进一步发展的分支深度学习(DL)通过构建具有多个隐藏层的人工神经网络，在复杂的识别和分析任务中展现出显著优势。然而深度学习模型的多层决策过程缺乏透明度，从而产生了“黑匣子”一词[50]。AI 模型的“黑匣子”性质导致人们难以阐明特定胚胎被判定为优质的生物学依据，这严重影响了临床医生和患者对 AI 决策逻辑的理解与信

任[51]。AI 模型的可靠性高度受限于其训练数据的规模和质量,而现有模型多数基于单中心或同质化人群数据构建,因此当 AI 筛选胚胎技术应用于具有不同人种或患有子宫内膜异位症或多囊卵巢综合征等复杂生殖问题的患者群体时,存在因数据偏差导致误判的风险[52]。因此,构建具有广泛代表性和多样性的高质量大型数据集是开发普适性 AI 模型的基石,然而严格的隐私保护、数据共享壁垒以及样本获取难度都将成为现实制约。尽管 AI 有望成为优化胚胎选择、最终提升辅助生殖健康活产率的理想工具,但广泛落地应用的前提在于进行进一步的多中心临床验证以确认其普适性与可靠性,并通过开发可解释 AI 提升决策透明度,从而确保其在临床实践中的伦理合规性与技术可信度。未来关于人工智能进行胚胎选择的研究应在方法与结果中报告并比较下列性能指标: AUC、灵敏度/特异度、准确率、PPV/NPV、F1 值、校准曲线、Brier 分数与决策曲线分析等。此外,研究人员需提供交叉验证结果与独立外部验证结果以检验泛化能力,并采用 SHAP 或 LIME 等方法展示模型可解释性。

4. 挑战与未来方向

4.1. 共同问题

尽管以上无创胚胎选择技术展现出巨大潜力,其临床应用仍面临多重标准化与验证挑战。首先,技术流程缺乏统一标准,miRNA 和 cfDNA 标志物的选择存在争议,如 miR-191 是否优于 miR-372 用于非整倍体筛查,TLI 的关键动态参数尚未形成国际共识,而不同 AI 模型的算法架构与训练数据差异导致横向比较困难。其次,现有研究多局限于回顾性小样本分析,缺乏大规模前瞻性随机对照试验(RCT)验证无创技术对活产率的提升效果。niPGT-A 与 PGT-A 的一致性在一定条件下虽然可以得到较为理想的结果,但尚无证据表明其可显著改善妊娠结局。此外,成本效益分析仍不明确:尽管无创技术避免了活检费用,高通量测序与 AI 平台的高昂投入可能抵消其经济优势。未来需通过多中心协作建立标准化协议,并开展相应临床试验,以明确各技术的临床价值与适用场景。

4.2. 伦理问题

随着胚胎筛选与基因编辑技术的快速发展,辅助生殖领域也面临前所未有的伦理挑战。无创胚胎选择技术的普及,虽为不孕夫妇带来希望,却也潜藏非医学目的的胚胎基因筛选等伦理危机。目前,基于 PGT 的胚胎遗传筛查已可识别数百种单基因疾病,若技术监管缺位,可能催生以优化智力、外貌甚至运动能力为目标的非医学目的的胚胎基因筛选,这不仅违背生物多样性原则,更将加剧社会阶层固化,富裕家庭可通过支付高昂费用选择优质后代,弱势群体被迫承受自然生育风险[53]。例如,2018 年“基因编辑婴儿”事件已引发全球对技术滥用的强烈谴责。此外,胚胎基因信息的所有权与隐私风险构成另一大争议,胚胎在筛选过程中产生的基因组数据涉及未来个体的核心生物信息,但现行法律尚未明确此类数据的归属权。

面对这些挑战,亟需构建全球协同的伦理治理框架。立法限制非医学用途筛选,确立“胚胎数据主权”归属未来个体,并通过公众参与平衡技术进步与社会伦理以避免技术霸权侵蚀人文价值。

4.3. 未来突破点

展望未来,新的非侵入性方法的开发加上先进的 AI 算法将导致胚胎选择的预测能力得到显著提高。人工智能算法通过同步分析 miRNAs、cfDNA 这两类生物标志物和 TLI 形态学数据,可建立三维评估模型,即在同一项研究中同时采集培养基中的 miRNA 和 cfDNA、TLI 形态学数据以及患者的临床资料,包括年龄、激素水平和受精方式等,将形态学观察、分子生物学指标与临床信息进行融合。对分子信号进行质量控制和标准化处理,挑选出最有意义的指标,影像资料提取出关键的发育时间点和形态学特征,

临床信息则作为额外的辅助参考。在数据整合时,可以将所有数据直接合并后建立一个统一的预测模型,或分别分析不同来源的数据再在中间环节进行交叉关联,亦或者在最后阶段把各自的预测结果综合在一起得出结论。由于样本量往往有限,研究人员还需要使用交叉验证、迁移学习或数据扩充等方法以确保结果更可靠。同时应特别注意多中心研究之间的差异、不同类型数据可能缺失的问题,以及模型结果的可解释性。明确展示每一类数据在预测中的作用,能够使结论更透明、更容易被临床采纳。

参考文献

- [1] Datta, A.K., Campbell, S., Diaz-Fernandez, R. and Nargund, G. (2024) Livebirth Rates Are Influenced by an Interaction between Male and Female Partners' Age: Analysis of 59 951 Fresh IVF/ICSI Cycles with and without Male Infertility. *Human Reproduction*, **39**, 2491-2500. <https://doi.org/10.1093/humrep/deae198>
- [2] Mutia, K., Wiweko, B., Abinawanto, A., Dwiranti, A. and Bowolaksono, A. (2023) MicroRNAs as a Biomarker to Predict Embryo Quality Assessment in *in Vitro* Fertilization. *International Journal of Fertility & Sterility*, **17**, 85-91.
- [3] Kamijo, S., Hamatani, T., Sasaki, H., Suzuki, H., Abe, A., Inoue, O., *et al.* (2022) MicroRNAs Secreted by Human Preimplantation Embryos and IVF Outcome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **20**, Article No. 130. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00989-0>
- [4] Harton, G.L., Munné, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D.H., *et al.* (2013) Diminished Effect of Maternal Age on Implantation after Preimplantation Genetic Diagnosis with Array Comparative Genomic Hybridization. *Fertility and Sterility*, **100**, 1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.2002>
- [5] Maxwell, S.M. and Grifo, J.A. (2018) Should Every Embryo Undergo Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy? A Review of the Modern Approach to *in Vitro* Fertilization. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **53**, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.07.005>
- [6] Hawke, D.C., Watson, A.J. and Betts, D.H. (2021) Extracellular Vesicles, microRNA and the Preimplantation Embryo: Non-Invasive Clues of Embryo Well-Being. *Reproductive BioMedicine Online*, **42**, 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.11.011>
- [7] Huang, L., Bogale, B., Tang, Y., Lu, S., Xie, X.S. and Racowsky, C. (2019) Noninvasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy in Spent Medium May Be More Reliable than Trophectoderm Biopsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 14105-14112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907472116>
- [8] del Arco de la Paz, A., Giménez-Rodríguez, C., Selntigia, A., Meseguer, M. and Galliano, D. (2024) Advancements and Challenges in Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies: In the Pathway to Non-Invasive Techniques. *Genes*, **15**, Article No. 1613. <https://doi.org/10.3390/genes15121613>
- [9] Fang, F., Li, Z., Yu, J., Long, Y., Zhao, Q., Ding, X., *et al.* (2021) MicroRNAs Secreted by Human Embryos Could Be Potential Biomarkers for Clinical Outcomes of Assisted Reproductive Technology. *Journal of Advanced Research*, **31**, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.01.003>
- [10] Rødgaard, T., Heegaard, P.M.H. and Callesen, H. (2015) Non-Invasive Assessment of *In-Vitro* Embryo Quality to Improve Transfer Success. *Reproductive BioMedicine Online*, **31**, 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.003>
- [11] Rosenbluth, E.M., Shelton, D.N., Wells, L.M., Sparks, A.E.T. and Van Voorhis, B.J. (2014) Human Embryos Secrete microRNAs into Culture Media—A Potential Biomarker for Implantation. *Fertility and Sterility*, **101**, 1493-1500. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.058>
- [12] Capalbo, A., Ubaldi, F.M., Cimadomo, D., Noli, L., Khalaf, Y., Farcomeni, A., *et al.* (2016) MicroRNAs in Spent Blastocyst Culture Medium Are Derived from Trophectoderm Cells and Can Be Explored for Human Embryo Reproductive Competence Assessment. *Fertility and Sterility*, **105**, 225-235.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.014>
- [13] Omes, C., Conti, A., Benedetti, L., Tomasoni, V., De Marchi, D., Nappi, R.E., *et al.* (2024) Expression of miRNA from Spent Pre-Implantation Embryos Culture Media. *Reproductive Biology*, **24**, Article ID: 100847. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100847>
- [14] Abu-Halima, M., Khaizaran, Z.A., Ayeshe, B.M., Fischer, U., Khaizaran, S.A., Al-Battah, F., *et al.* (2020) MicroRNAs in Combined Spent Culture Media and Sperm Are Associated with Embryo Quality and Pregnancy Outcome. *Fertility and Sterility*, **113**, 970-980.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.028>
- [15] Liu, Y., Mei, Q., Yang, J., Shen, Q., Zou, M., Li, J., *et al.* (2022) hsa-miR-320a-3p and hsa-miR-483-5p Levels in Human Granulosa Cells: Promising Bio-Markers of Live Birth after IVF/ICSI. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **20**, Article No. 160. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-01037-7>
- [16] Xu, J., Fang, R., Chen, L., Chen, D., Xiao, J., Yang, W., *et al.* (2016) Noninvasive Chromosome Screening of Human Embryos by Genome Sequencing of Embryo Culture Medium for *in Vitro* Fertilization. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, **113**, 11907-11912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613294113>
- [17] Magli, M.C., Pomante, A., Cafueri, G., Valerio, M., Crippa, A., Ferraretti, A.P., *et al.* (2016) Preimplantation Genetic Testing: Polar Bodies, Blastomeres, Trophectoderm Cells, or Blastocoelic Fluid? *Fertility and Sterility*, **105**, 676-683.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.018>
- [18] Grabuschnig, S., Bronkhorst, A.J., Holdenrieder, S., Rosales Rodriguez, I., Schliep, K.P., Schwendenwein, D., *et al.* (2020) Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 8062. <https://doi.org/10.3390/ijms21218062>
- [19] Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P.L. and Scaruffi, P. (2013) Mitochondrial DNA Content in Embryo Culture Medium Is Significantly Associated with Human Embryo Fragmentation. *Human Reproduction*, **28**, 2652-2660. <https://doi.org/10.1093/humrep/det314>
- [20] Zhang, Y., Li, N., Wang, L., Sun, H., Ma, M., Wang, H., *et al.* (2016) Molecular Analysis of DNA in Blastocoele Fluid Using Next-Generation Sequencing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **33**, 637-645. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0667-7>
- [21] Domingo-Muelas, A., Skory, R.M., Moverley, A.A., Ardestani, G., Pomp, O., Rubio, C., *et al.* (2023) Human Embryo Live Imaging Reveals Nuclear DNA Shedding during Blastocyst Expansion and Biopsy. *Cell*, **186**, 3166-3181.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.06.003>
- [22] Chen, Y., Gao, Y., Jia, J., Chang, L., Liu, P., Qiao, J., *et al.* (2021) DNA Methylome Reveals Cellular Origin of Cell-Free DNA in Spent Medium of Human Preimplantation Embryos. *Journal of Clinical Investigation*, **131**, e146051. <https://doi.org/10.1172/jci146051>
- [23] Bolton, H., Graham, S.J.L., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo, E., *et al.* (2016) Mouse Model of Chromosome Mosaicism Reveals Lineage-Specific Depletion of Aneuploid Cells and Normal Developmental Potential. *Nature Communications*, **7**, Article No. 11165. <https://doi.org/10.1038/ncomms11165>
- [24] Victor, A.R., Tyndall, J.C., Brake, A.J., Lepkowsky, L.T., Murphy, A.E., Griffin, D.K., *et al.* (2019) One Hundred Mosaic Embryos Transferred Prospectively in a Single Clinic: Exploring When and Why They Result in Healthy Pregnancies. *Fertility and Sterility*, **111**, 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.019>
- [25] Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M., *et al.* (2013) Genomic DNA in Human Blastocoele Fluid. *Reproductive BioMedicine Online*, **26**, 603-610. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.012>
- [26] Hammond, E.R., Shelling, A.N. and Cree, L.M. (2016) Nuclear and Mitochondrial DNA in Blastocoele Fluid and Embryo Culture Medium: Evidence and Potential Clinical Use. *Human Reproduction*, **31**, 1653-1661. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew132>
- [27] Rubio, C., Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C.M., Ocali, O., Cimadomo, D., Venier, W., *et al.* (2020) Multicenter Prospective Study of Concordance between Embryonic Cell-Free DNA and Trophectoderm Biopsies from 1301 Human Blastocysts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **223**, 751.e1-751.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.04.035>
- [28] Kuznyetsov, V., Madjunkova, S., Abramov, R., Antes, R., Ibarrientos, Z., Motamedi, G., *et al.* (2020) Minimally Invasive Cell-Free Human Embryo Aneuploidy Testing (miPGT-A) Utilizing Combined Spent Embryo Culture Medium and Blastocoel Fluid—Towards Development of a Clinical Assay. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 7244. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64335-3>
- [29] Rubio, C., Rienzi, L., Navarro-Sánchez, L., Cimadomo, D., García-Pascual, C.M., Albricci, L., *et al.* (2019) Embryonic Cell-Free DNA versus Trophectoderm Biopsy for Aneuploidy Testing: Concordance Rate and Clinical Implications. *Fertility and Sterility*, **112**, 510-519. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.038>
- [30] Jiao, J., Shi, B., Sagnelli, M., Yang, D., Yao, Y., Li, W., *et al.* (2019) Minimally Invasive Preimplantation Genetic Testing Using Blastocyst Culture Medium. *Human Reproduction*, **34**, 1369-1379. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez075>
- [31] Yeung, Q.S.Y., Zhang, Y.X., Chung, J.P.W., Lui, W.T., Kwok, Y.K.Y., Gui, B., *et al.* (2019) A Prospective Study of Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies (NiPGT-A) Using Next-Generation Sequencing (NGS) on Spent Culture Media (SCM). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **36**, 1609-1621. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01517-7>
- [32] Shamonki, M.I., Jin, H., Haimowitz, Z. and Liu, L. (2016) Proof of Concept: Preimplantation Genetic Screening without Embryo Biopsy through Analysis of Cell-Free DNA in Spent Embryo Culture Media. *Fertility and Sterility*, **106**, 1312-1318. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112>
- [33] Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., *et al.* (2018) Origin and Composition of Cell-Free DNA in Spent Medium from Human Embryo Culture during Preimplantation Development. *Human Reproduction*, **33**, 745-756. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey028>
- [34] Hammond, E.R., McGillivray, B.C., Wicker, S.M., Peek, J.C., Shelling, A.N., Stone, P., *et al.* (2017) Characterizing

- Nuclear and Mitochondrial DNA in Spent Embryo Culture Media: Genetic Contamination Identified. *Fertility and Sterility*, **107**, 220-228.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.015>
- [35] Kirkegaard, K., Ahlström, A., Ingerslev, H.J. and Hardarson, T. (2015) Choosing the Best Embryo by Time Lapse versus Standard Morphology. *Fertility and Sterility*, **103**, 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.003>
- [36] Montag, M., Liebenthron, J. and Köster, M. (2011) Which Morphological Scoring System Is Relevant in Human Embryo Development? *Placenta*, **32**, S252-S256. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.07.009>
- [37] Mandawala, A.A., Harvey, S.C., Roy, T.K. and Fowler, K.E. (2016) Time-Lapse Embryo Imaging and Morphokinetic Profiling: Towards a General Characterisation of Embryogenesis. *Animal Reproduction Science*, **174**, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.015>
- [38] Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K.M., Ramsing, N.B. and Remohi, J. (2011) The Use of Morphokinetics as a Predictor of Embryo Implantation. *Human Reproduction*, **26**, 2658-2671. <https://doi.org/10.1093/humrep/der256>
- [39] Apter, S., Ebner, T., Freour, T., Guns, Y., Kovacic, B., Le Clef, N., et al. (2020) Good Practice Recommendations for the Use of Time-Lapse Technology. *Human Reproduction Open*, **2020**, hoaa008. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>
- [40] Sacks, G.C., Mozes, H., Ronn, R., Elder-Geva, T., Schonberger, O., Ben-Ami, I., et al. (2024) Time-Lapse Incubation for Embryo Culture-Morphokinetics and Environmental Stability May Not Be Enough: Results from a Pilot Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Medicine*, **13**, Article No. 1701. <https://doi.org/10.3390/jcm13061701>
- [41] Pribenszky, C., Nilselid, A. and Montag, M. (2017) Time-Lapse Culture with Morphokinetic Embryo Selection Improves Pregnancy and Live Birth Chances and Reduces Early Pregnancy Loss: A Meta-Analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, **35**, 511-520. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.022>
- [42] 高洋, 刘军霞, 朱家红, 等. 时差成像系统对囊胚培养及妊娠结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(9): 1198-1203.
- [43] Paternot, G., Wetsels, A.M., Thonon, F., Vansteenbrugge, A., Willemsen, D., Devroe, J., et al. (2011) Intra- and Interobserver Analysis in the Morphological Assessment of Early Stage Embryos during an IVF Procedure: A Multicentre Study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**, Article No. 127. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-127>
- [44] Glatstein, I., Chavez-Badiola, A. and Curchoe, C.L. (2023) New Frontiers in Embryo Selection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **40**, 223-234. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02708-5>
- [45] Khosravi, P., Kazemi, E., Zhan, Q., Malmsten, J.E., Toschi, M., Zisimopoulos, P., et al. (2019) Deep Learning Enables Robust Assessment and Selection of Human Blastocysts after *in Vitro* Fertilization. *NPJ Digital Medicine*, **2**, Article No. 21. <https://doi.org/10.1038/s41746-019-0096-y>
- [46] Bormann, C.L., Kanakasabapathy, M.K., Thirumalaraju, P., Gupta, R., Pooniwalla, R., Kandula, H. and Shafiee, H. (2020) Performance of a Deep Learning Based Neural Network in the Selection of Human Blastocysts for Implantation. *elife*, **9**, e55301.
- [47] Dirvanauskas, D., Maskeliunas, R., Raudonis, V. and Damasevicius, R. (2019) Embryo Development Stage Prediction Algorithm for Automated Time Lapse Incubators. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **177**, 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.05.027>
- [48] Boucret, L., Tramon, L., Riou, J., Ferré-L'Hôtellier, V., Bouet, P. and May-Panloup, P. (2022) Influence of Diminished Ovarian Reserve on Early Embryo Morphokinetics during *in Vitro* Fertilization: A Time-Lapse Study. *Journal of Clinical Medicine*, **11**, Article No. 7173. <https://doi.org/10.3390/jcm11237173>
- [49] Tsui, W.H.A., Ding, S.C., Jiang, P. and Lo, Y.M.D. (2025) Artificial Intelligence and Machine Learning in Cell-Free-DNA-Based Diagnostics. *Genome Research*, **35**, 1-19. <https://doi.org/10.1101/gr.278413.123>
- [50] Tu, J.V. (1996) Advantages and Disadvantages of Using Artificial Neural Networks versus Logistic Regression for Predicting Medical Outcomes. *Journal of Clinical Epidemiology*, **49**, 1225-1231. [https://doi.org/10.1016/s0895-4356\(96\)00002-9](https://doi.org/10.1016/s0895-4356(96)00002-9)
- [51] Rudin, C. and Radin, J. (2019) Why Are We Using Black Box Models in AI When We Don't Need to? A Lesson from an Explainable AI Competition. *Harvard Data Science Review*, **1**, 1-9. <https://doi.org/10.1162/99608f92.5a8a3a3d>
- [52] Kulkarni, S., Seneviratne, N., Baig, M.S. and Khan, A.H.A. (2020) Artificial Intelligence in Medicine: Where Are We Now? *Academic Radiology*, **27**, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2019.10.001>
- [53] 李建军, 王添. 人类胚胎基因编辑研究引发的伦理争辩[J]. 科学与社会, 2016, 6(3): 32-41.