



# 影响体外鼠胚试验标准化的要素分析

史建峰, 韩倩倩\*, 王春仁\*

(中国食品药品检定研究院, 医疗器械检定所, 生物材料室, 北京 102629)

**【摘要】** 不孕症已成为影响人类生殖健康的全球性问题, 作为治疗不孕症的一种重要治疗手段, 辅助生殖技术经过几十年的发展已经获得长足进步。辅助生殖技术用医疗器械产业快速发展, 对此类产品进行风险管理, 制定相应的安全性评价检测方法已势在必行。2016年行业标准 YY/T 1434-2016《人类体外辅助生殖技术用医疗器械体外鼠胚试验》已经发布, 本文就体外鼠胚试验中的关键节点和试验体系要素进行简要综述。

**【关键词】** 辅助生殖技术; 体外鼠胚试验; 2-细胞阻滞; 医疗器械

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0102-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.019

## Analysis of factors affecting the standardization of *in vitro* mouse embryo test

SHI Jian-feng, HAN Qian-qian\*, WANG Chun-ren\*

(Department of Biomaterials, Institute of Medical Device Verification, National Institutes for Food And Drug Control, Beijing 102629, China)

**【Abstract】** Infertility has become a global problem affecting human reproductive health. As an important treatment for infertility, assisted reproductive technology has made great progress over the past few decades. Rapid development has also taken place in medical devices for human assisted reproductive technology. It is imperative to establish the risk management and safety evaluation system of these products. In 2016, the industry standard YY/T 1434-2016 "Human *in vitro* Assisted Reproductive Technology With Medical Equipment *in vitro* Mouse Embryo Test" was officially released. In this paper, the key notes and elements of this *in vitro* mouse embryo test are briefly reviewed.

**【Key words】** Assisted reproductive technology; *In vitro* mouse embryo assay; 2-cell block; Medical devices

### 1 引言

生态环境恶化、生活节奏加快和工作压力增加导致不孕症的发病率升高, 已成为全球性问题, 在发展中国家尤为突出。我国不孕症的发病率约为15%, 数千万患者饱受疾病困扰, 并由此衍生出更深层的社会问题。人类生殖健康问题催生体外辅助生殖技术, 自第一例试管婴儿诞生

至今, 辅助生殖技术已获得长足进步, 应用日益广泛, 尤其在发达国家, 应用辅助生殖技术出生的婴儿占年度总出生人口的1%以上。同时, 辅助生殖技术用医疗器械市场也得到快速发展, 产品种类、产业规模和临床使用量均呈逐年上涨的趋势, 对辅助生殖技术用医疗器械的风险管理应予以高度重视。

[作者简介] 史建峰, 男, (1986-), 硕士, 主要从事医疗器械生物学检验工作。Email: shengwushi@163.com

[通讯作者] 王春仁, 男, 教授, 研究领域为医用生物材料和组织工程方面的安全性评价。Email: chunrenwang@263.net;

韩倩倩, 女, 副研究员, 研究领域为高风险生物材料和医疗器械的生物学评价。\* 共同通讯

## 2 辅助生殖技术及相关医疗器械

1978 年 Robert Edwards 利用体外受精-胚胎移植技术(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)培育了世界上第一个试管婴儿<sup>[1]</sup>,为不孕症患者带来福音。IVF-ET 是辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)中的一种,ART 是指通过对精子、卵子、受精卵和胚胎进行操作处理,治疗不孕不育的技术。除了 IVF-ET,ART 还包括卵子体外成熟(in vitro maturation, IVM)、人工授精(artificial insemination, AI)、胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)、精子和胚胎冻融和移植前遗传学诊断等技术。

细胞生物学技术带动 ART 不断发展完善的同时,辅助生殖技术用医疗器械也在迅速发展。辅助生殖技术用医疗器械主要包括手术类器械如取卵针、培养皿、胚胎移植导管等器具耗材类产品和与精子、卵子、受精卵和胚胎接触的操作液、缓冲液、洗涤液、培养液、保存液和冷冻液等液体类产品。辅助生殖技术用医疗器械中的液体类产品与配子和合子接触时间较长,应用种类繁多,在风险等级较高的产品中液体类产品居多。目前国内的液体类产品主要以进口为主,取得注册证的进口液体类产品均按照风险等级最高的三类医疗器械进行管理。

## 3 辅助生殖用医疗器械的安全性评价

辅助生殖技术的核心环节是用人工手段使卵子和精子结合成受精卵,待发育成 8-细胞早期胚胎后移入子宫继续发育直至分娩。早期胚胎的质量是保证胚胎移植成功和胎儿健康的关键,因此对相关辅助生殖用医疗器械进行风险管理必不可少,建立有效的安全性评价检测方法也势在必行。2016 年 1 月国家食品药品监督管理总局颁布了 YY/T 1434-2016《人类体外辅助生殖技术用医疗器械体外鼠胚试验》行业标准,为辅助生殖技术用医疗器械的监管提供了有力的技术支持。

## 4 体外鼠胚试验

### 4.1 体外鼠胚试验

体外鼠胚试验是指在体外培养体系中,使小鼠的受精卵培养发育到囊胚的过程,主要包括性腺激素促进卵子超排、交配合笼、受精卵采集和体外培

养以及囊胚形成率检测几个步骤。1956 年 Whitten 成功使小鼠 8-细胞胚胎在体外培养发育成囊胚<sup>[2]</sup>, McLaren 和 Biggers 将体外培养得到的囊胚移植入雌鼠子宫获得成体小鼠<sup>[3]</sup>,小鼠早期胚胎体外培养-胚胎移植入母体妊娠-成体小鼠分娩整个试验体系基本建立,为人类辅助生殖技术的发展提供了科学依据。

### 4.2 2-细胞阻滞

在大量的科学试验中,人们发现大多数近交系和封闭群小鼠的受精卵体外培养经过第一次分裂后就出现发育停滞,不再继续分裂发育成囊胚,这种现象称为 2-细胞阻滞。Whitten 和 Biggers 证明 2-细胞阻滞是由雌鼠的基因型决定的<sup>[4]</sup>。与近交系和封闭群小鼠相比,近交系杂交 F1 代小鼠通过 2-细胞阻滞能力大大增强,如 B6D2F1、B6AF1 和 B6D1F1 等,而近交系和封闭群杂交的小鼠也会发生 2-细胞阻滞,如 SJL/L,126/Br 和 DBA 等<sup>[4,5]</sup>。将非阻滞小鼠胚胎细胞质转移到阻滞小鼠后可以顺利通过 2-细胞阻滞,但是将非阻滞小鼠处于 G1 期的 1-细胞细胞质注射给阻滞品系却不能通过 2-细胞阻滞<sup>[6]</sup>,提示在这一阶段通过 2-细胞阻滞所需的因子没有表达,而将非阻滞小鼠处于 G1 和 G2 期(非 S 期)的 2-细胞的细胞质可以帮助阻滞小鼠通过 2-细胞阻滞<sup>[7]</sup>。而在体内经过一次分裂得到的 2-细胞可以在体外培养条件下顺利发育成囊胚,并且在体外发生阻滞的 2-细胞转入到含输卵管组织块中,能够继续分裂发育<sup>[8]</sup>,有研究证实输卵管可以提供受精卵发育到囊胚所需的激素、生长因子和抗氧化物质<sup>[9]</sup>。这些结果提示 2-细胞阻滞不仅受机体因素影响,也受到培养环境的调控。

### 4.3 几种常见的小鼠胚胎培养液

在 BMOC2 之后,科研人员对培养基进行了多次改良衍生出多种培养基,目前常用的有 M16、CZB 和 KSOM 三种。上世纪 70 年代 M16 培养基配制成功,通过试验证明,M16 可以支持几种近交系小鼠(如 C3H)和杂交 F1 代(如 B6D2F1)发育形成囊胚,而很多近交系小鼠在 M16 中会发生 2-细胞阻滞。为能使受小鼠胚胎通过 2-细胞阻滞,CZB 培养基和 KSOM 培养基应运而生其应用效果也得到证实<sup>[10,11]</sup>。培养液的主要能量底物是丙酮酸、乳酸和葡萄糖。丙酮酸是早期卵裂期的主要能量来源<sup>[12-14]</sup>;乳酸能够支持 2 细胞阶段后的胚胎发育并且培养基中乳酸盐可以影响丙酮酸盐的代谢<sup>[15]</sup>;葡

葡萄糖则为致密化期的主要供能物<sup>[16]</sup>, CZB 培养基在 4-细胞后加入葡萄糖成分, KSOM 降低了葡萄糖的浓度, 当葡萄糖浓度升高时, 非阻滞小鼠会发生 2-细胞阻滞现象<sup>[17]</sup>。将链脲霉素诱导的糖尿病雌鼠的受精卵和胚胎移植分别给正常假孕雌鼠妊娠 14.5 d 后发现胚胎神经管畸形率显著上升, 而将正常小鼠 2-细胞在体外高浓度葡萄糖环境下培养至囊胚再移植给正常小鼠发现胚胎畸形率没有上升但是吸收胎和移植成功率却显著下降<sup>[18]</sup>。

#### 4.4 影响小鼠胚胎体外培养的因素

##### 4.4.1 氧含量

培养环境的氧含量对早期胚胎发育有重要调控作用, 大气中氧气的浓度为 21% 左右, 而哺乳动物细胞中氧含量却为 2% ~ 8%, 已有研究证实在相对比 5% 氧浓度的培养环境, 20% 氧浓度的环境下哺乳动物囊胚形成率和质量都显著下降<sup>[19,20]</sup>, 高浓度氧导致胚胎发育延迟及对胚胎发育的副作用是积累性的, 产生的副作用是不可逆的, 在人的胚胎体外培养也得到类似的结果<sup>[21,22]</sup>。在高氧环境下加入抗氧化剂后, 小鼠胚胎的发育情况可以得到改善<sup>[23]</sup>。有研究证明高氧环境对卵子发育也有负调控作用<sup>[24]</sup>。培养基中的氧可以影响胚胎对碳水化合物和氨基酸的代谢, 并且在致密化前、后阶段表现出相反的调节作用, 在致密化前, 高氧环境下胚胎糖酵解和氨基酸代谢水平升高, 而致密化后反而降低<sup>[25,26]</sup>, 提示胚胎发育不仅受营养成分影响还受到营养代谢方式的影响。高氧浓度可以调控受精卵-囊胚阶段基因的表达和甲基化<sup>[27-29]</sup>, 并且诱导移植前胚胎细胞衰老标志表达和 DNA 损伤导致细胞周期停滞<sup>[30]</sup>。

##### 4.4.2 氨基酸

氨基酸在小鼠早期胚胎发育中也发挥重要作用, 受精卵在添加 Eagles 非必需氨基酸的培养基中, 囊胚形成率、细胞数和孵化率都显著提升<sup>[31]</sup>。研究表明在培养体系中加入甘氨酸可以调节渗透压从而促进 MII 卵细胞的细胞质成熟进而促进胚胎的体外发育<sup>[32]</sup>。但是氨基酸经过代谢产生的铵盐对胚胎发育是不利的, 当培养基中的铵盐浓度达到 75  $\mu\text{mol/L}$  就会对胚胎产生毒性作用, 也会影响胚胎发育的关键基因的表达<sup>[33]</sup>。作为培养液中的营养成分, 谷氨酰胺的代谢是铵盐的主要来源, 科学家为降低铵盐的浓度, 对谷氨酰胺进行修饰, 发现铵盐的产生很难完全避免, 培养基换液可以有效缓

解铵盐对胚胎的毒性作用, 研究表明高氧浓度对铵盐的产生也有促进作用<sup>[34]</sup>。

##### 4.4.3 渗透压

渗透压对小鼠胚胎发育有重要调节作用, 输卵管中的渗透压为 290 ~ 310 mOsm<sup>[35,36]</sup>, CZB 和 KSOM 培养基降低了无机盐浓度, 使动物对渗透压敏感性降低, 当渗透压升高时, 非阻滞小鼠也会发生阻滞现象<sup>[17]</sup>, 有报道证明渗透压对胚胎发育的阻滞效应主要是使 2-细胞不能进入 M 期<sup>[37]</sup>。石蜡油也是胚胎体外培养所需的材料, 小鼠从 1-细胞到检测囊胚形成率所需时间为 96 h, 石蜡油可以防止培养液蒸发带来的渗透压、pH 和温度对培养发育的副作用<sup>[38]</sup>, 但是石蜡油对胚胎有一定的毒性<sup>[39]</sup>。

#### 4.5 培养方法的选择

哺乳动物胚胎早期体外培养有单一培养和共培养两种方式, 共培养是将两种或两种以上的细胞在同一环境下共同培养, 通过细胞通讯和信号转导等方式相互作用, 支持生长的一种培养方式。前文提到将产生阻滞的 2-细胞转移至含输卵管组织块的培养基中可以通过 2-细胞阻滞。有学者将多种体细胞共培养, 建立更加接近体内微环境的培养体系可以促进昆明小鼠的胚胎发育<sup>[40]</sup>。在培养方式中可以选择单一培养或序贯培养, 序贯培养是根据胚胎发育到不同阶段的不同营养需求, 采用不同成分的培养基的培养方法。人类辅助生殖的培养基则更加细化, 在配子、合子和囊胚期分别使用不同的培养基, 可以有效提高胚胎移植成功率, 已经被广泛应用。

#### 5 体外鼠胚试验的标准化

体外鼠胚试验受内因和外因共同作用, 内因为小鼠遗传背景, 外因为培养体系和培养方法。在培养体系建立、培养成分调整、试验仪器耗材改进和操作方法优化中, 研究人员做了大量工作并取得很多成果, 但是小鼠自身调节胚胎发育机制还有待更加深入的研究。2-细胞阻滞是体外鼠胚试验的关键节点, 直接影响试验成败, 新的标准有 1-细胞和 2-细胞两种方法可供选择, 其中后者受 2-细胞阻滞的制约相对较小, 但是对产品的检验工作应从实际出发, 根据产品的预期用途、接触部位和接触时间合理评估风险并选择适当的检测方法。医疗器械的安全性评价要求试验体系具备足够的稳定性和敏感性, 所以应结合试验动物、培养体系、培养方法和

阳性对照等因素综合考虑。例如 ICR 雌鼠超排卵能力强,应用此品系小鼠可以减少实验动物用量,但是 ICR 属于阻滞系小鼠,对培养条件要求相对较高。杂交 F1 代小鼠抗阻滞能力较强,但其成本普遍较高。稳定的试验体系是检验工作的基础,而体系的敏感性是检验工作有效、可靠的保证。将近交系、封闭群和杂交 F1 代小鼠在不同的次优级培养环境下进行比较,发现封闭群小鼠相较其他两者对环境的反应更加敏感<sup>[41]</sup>。体外鼠胚试验的主要判定依据为囊胚形成率和囊胚质量,尤其是对囊胚质量的评价受检验人员经验等主观因素制约,进而研究人员在细化判定标准中做了更加深入的工作。现在普遍认为在 2-细胞后合子基因激活 (zygotic gene activation, ZGA),之后 *Pou5f* 和 *Cdx2* 在小鼠早期胚胎中发挥重要的调控作用,利用转基因动物对关键基因进行标记并在体外培养中对基因表达水平进行检测,在微观层面去评价胚胎发育是否受到影响<sup>[42]</sup>。物种间对培养环境的敏感性有一定差异,有研究发现小鼠受精卵在体外优化培养体系和较差培养环境下获得胚胎与在体内环境培养或是含输卵管组织块培养环境下获得胚胎相比,在移植成功率方面没有显著差异<sup>[43]</sup>,因此阳性物足够敏感,与产品相适应也是非常必要的。

## 6 总结

辅助生殖技术用医疗器械应用于配子-合子-胚胎-胚胎移植的各个阶段,产品创新和产业升级都要求产品安全、有效性评价工作与时俱进,与产业发展相适应。建立稳定可靠的评价方法,对现有标准进行改进和延展,为监管工作提供技术支持,助推行业发展是医疗器械检验工作从业人员的奋斗目标。

## 参考文献:

- [ 1 ] Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full term human pregnancy using leaving embryos grown in vitro[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1980, 87 (9): 737 -740.
- [ 2 ] Whitten WK. Culture of tubal mouse ova [J]. Nature, 1956, 177 (4498): 96.
- [ 3 ] McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early as early embryos[J]. Nature, 1958, 182(4639): 877 -878.
- [ 4 ] Whitten WK, Biggers JD. Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium[J]. J Reprod Fertil, 1968, 17(2): 399 -401.
- [ 5 ] Biggers JD. Metabolism of mouse embryos[J]. J Reprod Fertil Suppl, 1971, 14: 41 -54
- [ 6 ] Muggleton-Harris A. Whittingham DG. Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development in vitro in the mouse[J]. Nature, 1982, 299(5882): 460 -462.
- [ 7 ] Pratt HP, Muggleton-Harris AL. Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryo [J]. Development, 1988, 104(1): 115 -120.
- [ 8 ] Biggers JD. Reflections on the culture of the preimplantation embryo[J]. Int J Dev Biol, 1998, 42(7): 879 -884.
- [ 9 ] Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? [J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16(12): 896 -906.
- [10] Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1 - cell mouse embryos in vitro [J]. J Reprod Fertil, 1989, 86 (2): 679 -688.
- [11] Lawitts JA, Biggers JD. Culture of preimplantation embryos[J]. Methods Enzymol, 1993, 225: 153 -164.
- [12] Brinster RL. Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo[J]. Biochim Biophys Acta, 1965, 110(2): 439 -441.
- [13] Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source [J]. J Exp Zool, 1965, 158: 59 -68.
- [14] Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy source [J]. J Reprod Fertil, 1965, 10(2): 227 -240.
- [15] Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse [J]. Biol Reprod, 2003, 69(4): 1109 -1117.
- [16] Brinster RL, Thomson JL. Development of eight-cell mouse embryos in vitro [J]. Exp Cell Res, 1966, 42(2): 308 -315.
- [17] Hadi T, Hammer MA, Algire C, et al. Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2 - cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females [J]. Biol Reprod, 2005, 72(1): 179 -187.
- [18] Wyman A, Pinto AB, Sheridan R, et al. One-cell zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring [J]. Endocrinology, 2008, 149(2): 466 -469.
- [19] Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro [J]. J Exp Zool, 1978, 206(1): 73 -80.
- [20] Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, et al. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes [J]. Reprod Biomed Online, 2004, 9(4): 409 -417
- [21] Wale PL, Gardner DK. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients [J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(3): 402 -410.
- [22] Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen

- concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(3): 738 - 744.
- [23] Truong TT, Soh YM, Gardner DK. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(7): 1445 - 1454.
- [24] Cook DA, Edgar DH, Lewis K, et al. Impact of oxygen concentration on adult murine pre-antral follicle development in vitro and the corresponding metabolic profile [J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(1): 31 - 41.
- [25] Wale PL, Gardner DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development [J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(1): 24, 1 - 8.
- [26] Lee YS, Thouas GA, Gardner DK. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(3): 543 - 552
- [27] Gardner DK, Lane M. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(3): 361 - 370.
- [28] Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, et al. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(4 Suppl): 1252 - 1265.
- [29] Li W, Goossens K, Van Poucke M, et al. High oxygen tension increases global methylation in bovine 4 - cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2014, 28(7): 948 - 959.
- [30] Meuter A, Rogmann LM, Winterhoff BJ, et al. Markers of cellular senescence are elevated in murine blastocysts cultured in vitro; molecular consequences of culture in atmospheric oxygen [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(10): 1259 - 1267
- [31] Gardner DK, Lane M. Amino-acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture [J]. *Biol Reprod*, 1993, 48(2): 377 - 385.
- [32] Cao XY, Rose J, Wang SY, et al. Glycine increases preimplantation development of mouse oocytes following vitrification at the germinal vesicle stage [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37262.
- [33] Gardner DK, Hamilton R, McCallie B. Human and mouse embryonic development, metabolism and gene expression are altered by an ammonium gradient in vitro [J]. *Reproduction*, 2013, 146(1): 49 - 61.
- [34] Wale PL, Gardner DK. Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(3): 75, 1 - 10.
- [35] Dawson KM, Baltz JM. Organic osmolytes and embryos; substrates of the Gly and beta transport systems protect mouse zygotes against the effects of raised osmolarity [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56(6): 1550 - 1558.
- [36] Fiorenza MT, Bevilacqua A, Canterini S, et al. Early transcriptional activation of the hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(6): 1606 - 1613.
- [37] Wang F, Kooistra M, Lee M, et al. Mouse embryos stressed by physiological levels of osmolarity become arrested in the late 2 - cell stage before entry into M phase [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(4): 702 - 713.
- [38] Tae JC, Kim EY, Lee WD, et al. Sterile filtered paraffin oil supports in vitro developmental competence in bovine embryos comparable to co-culture [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2006, 23(3): 121 - 127.
- [39] Morbeck DE, Leonard PH. Culture systems; mineral oil overlay [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 912: 325 - 331.
- [40] 李娟, 盖凌, 魏斌, 等. 3 种体细胞共培养体系对昆明鼠早期胚胎体外发育潜力的影响研究 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2012, 20(7): 455 - 458.
- [41] Khan Z, Wolff HS, Fredrickson JR, et al. Mouse strain and quality control testing; improved sensitivity of the mouse embryo assay with embryos from outbred mice [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(3): 847 - 854. e2.
- [42] Gilbert RS, Nunez B, Sakurai K, et al. Genetic mouse embryo assay; improving performance and quality testing for assisted reproductive technology (ART) with a functional bioassay [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14: 13.
- [43] Piane LD, Lin W, Liu X, et al. Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an IVF mouse model [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(8): 2039 - 2046.