文章编号:1000-5404(2006)14-1535-04

论著

睾丸生精细胞完全体外成熟培养的研究

刘 锋,邹 彦,邓志华,檀大羡,丘 映,罗开玲 (广西医科大学第三附属医院生殖医疗中心,南宁 530031)

提 要:目的 在动物实验研究的基础上对人类睾丸生精细胞在体外培养分化、成熟进行初步探索,为临床治疗无精子症奠定基础。**方法** 将14例患者的睾丸组织分离成生精细胞混悬液,采用生精细胞与支持细胞共培养或分选出初级精母细胞和精子细胞培养,观察培养前后各级生精细胞的分化或成熟情况。**结果** 14例患者睾丸生精细胞经体外培养后均有不同程度的分化和成熟。初级精母细胞能分化为精子细胞,分化率平均为4.54%~6.51%;Sa期精子细胞能变形、成熟为Sc期精子细胞,成熟率为3.13%~5.74%。**结论** 人类生精细胞经体外培养能进一步分化、成熟。初级精母细胞能分化为早期精子细胞,Sa期精子细胞可变形为更成熟形式的Sc期精子细胞。甚至可以通过使用被拉长的精细胞或圆形细胞进行显微受精,以达到妊娠的目的。

关键词: 无精子症;生精细胞;体外培养
中图法分类号: R321.1;R322.64;R329.2 **文献标识码:** A

Differentiation and maturation of testicle spermatogonia *in vitro*

LIU Feng, ZOU Yan, DENG Zhi-hua, TAN Da-xian, QIU Ying, LUO Kai-ling (Reproductive Medical Center, The Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China)

Abstract: Objective To carry out *in vitro* culture and *in vitro* maturation of human spermatogonia for treating azoospermia infertility in clinic. Methods The testicle tissue from 14 patients was dissociated into spermatogonia cells mixture, co-cultured with sertoli cells, or the primary spermatocytes and sperm cells were selected out to co-culture. The maturation or differentiation of spermatogenic cells at different stages was observed before and after *in vitro* culture. Results There was differentiation and maturation of spermatogenic cells in many degrees after *in vitro* culture. Primary spermatocytes could grow into sperm cells, with differentiation rate of 4.54% to 6.51%; The sperm cells at Sa stage could growth into sperm cells, with maturation rate of 3.13% to 5.74%. Conclusion Human spermatogonia can differentiate and maturate during culture *in vitro*. Primary spermatocytes can grow into nonage sperm cells, and sperm cells at Sa stage can metamorphose and mature into sperm cells at Sc stage.

Key words: azoospermia; spermatocyte; *in vitro* culture

在男性不育症中有10%是由无精子症(azoospermia)引起的,无精子症分为精子通路梗阻或缺如导致的梗阻性无精子症(obstructive azoospermia,OA)和精子发生障碍导致的非梗阻性无精子症(nonobstructive azoospermia,NOA)。梗阻性无精子症患者睾丸或附睾内有成熟的精子,可应用卵胞浆内单精子显微注射(itrocytoplasmic sperm injection, ICSI),使其配偶妊娠而得到自己的后代。但是,有1%~2%的男性不育症患者,在精子形成过程中发育到圆形精子细胞阶段即终止进行,这些患者即使做睾丸切片取精往往也难找到成熟精子用于卵胞浆内单精子显微注射。1998年Tesarik等[1]提出将无精子症患者睾丸内的生精细胞在体外培养到精子细胞成熟阶段或成熟的精子,再通过显微注射技术使其获得妊娠,为非梗阻性无精子症患者的治疗提供了解决的途径。

本研究通过14例无精子症患者的睾丸组织分离出生精细胞,在体外成熟培养、分化的过程进行初步探索,为临床上无精子症的治疗提供实验基础。尝试着将体外培养后获得的长形精子细胞行卵胞浆内显微注射,结果14 h后观察出现受精的雌雄原核,32~72 h后分裂成8~16个细胞的早期胚胎。现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

14例前来接受生殖辅助治疗的无精子症的患者,这些患者被允许进行附睾穿刺取精术,但未能获得成熟精子。从而在睾

基金项目: 广西壮族自治区科技厅资助项目(桂科基0141014),南宁市科技局资助项目(200113D)
Supported by the Research Funds by Sci & Tech Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region(0141014) and the Research Funds by Sci & Tech Bureau of Nanning(200113D)

作者简介: 刘 锋(1956-),女,山东省邹平县人,副主任技师,主要从事生殖医学实验室方面的研究。电话:(0771)4824346,E-mail: lfyf2004@126.com

收稿日期: 2005-07-28;**修回日期:** 2006-05-11

丸活检组织中获得未成熟的生精细胞。

1.2 临床资料

本组14例无精子症患者的年龄为(32.7±14.3)岁,不育年限持续为(6.0±9.0)年,14例患者的睾丸体积是(17.19±6.81)ml。14例患者中,梗阻性无精子症的6例,非梗阻性无精子症的8例。

1.3 实验方法

1.3.1 睾丸细胞的获取与制备 将睾丸活检出的数小片睾丸组织置于一个含有10% HAB的Hepe + Earles的(Flecon 2003)培养皿中。均采用酶消化法制备生精细胞混悬液,具体操作如下:①在超净工作台上用机械分离的方法使组织在两块玻片之间展开,紧接着将其反复抽吸入1支1 ml的结核菌素注射器。除去体积比较大的组织碎片,用吸管反复吹打1~2 min,使精曲小管散开,再静置2~3 min,使精曲小管下沉,弃上清。加入相当于精曲小管10倍体积的(1 mg/ml)胶原酶Ⅳ,在32 ℃、1 mg/ml的胶原酶Ⅳ(Sigma Chemical Co., C-5138, St. Louis, MO)中进行孵育30 min,从而将细胞团消化分散成单个细胞。配制Percoll梯度分离液20%、30%、40%、50%、60%共5种梯度液[2],2 500 r/min离心25 min,取30%~40%液面的细胞混悬液。②将细胞混悬液移入15 ml的Flecon离心管中,以2 500 r/min离心5 min,弃上清。在沉淀中加入含有10% HAB的Hepe + Earles培养液2~3 ml重悬细胞,再次1 700 r/min离心5 min,弃上清后将细胞置于1 ml HTF 1020液中5% CO_2、32 ℃、湿度为95%的培养箱中,备用。

1.3.2 体外培养方案

1.3.2.1 培养条件 在5% CO_2、32 ℃、饱和湿度为95%的培养箱中培养,隔天换液1次。所有的细胞培养都是在[Quinn's Advanlage™ Fertitization (HTF) Medium]HTF1020改良人输卵管液中,添加基因重组人rFSH(瑞士Sernoo)加入后最终活力浓度分别为0、10、25、50、100 IU/L。另加入水溶性的无水睾酮(Sigma Chemical Co., C-5035),最终浓度为1 μmol/L。

1.3.2.2 生精细胞的培养 采用微滴养,将rFSH和T配成不同浓度的液体做上标志,并在Flecon(2003)培养皿中,做成含量15 μl的10个微滴,每个相同激素浓度的微滴各为2个。根据各病例睾丸组织分离获得的细胞情况采用下列两种培养方法:①支持细胞与生精细胞(初级母细胞/圆形精子细胞)共培养在检查生精细胞混悬液时含有支持细胞者采用此方法培养。生精细胞混悬液置改良的人类输卵管液中培养。②生精细胞分选培养 有各级生精细胞存在的细胞混悬液中、支持细胞少的病例中采用此方法,用显微分选法分选出少量初级精母细胞和/或精子细胞,分别置于改良人类输卵管液中培养。

1.3.3 观察项目和方法

1.3.3.1 睾丸精细胞的形态鉴别 在睾丸组织样本中,通过各种圆形精子细胞之间的差异来区别精细胞。在睾丸样本中含有未分化的原始细胞与其他的圆形细胞如:精母细胞、精原细胞、初级/次级精母细胞、红细胞、白细胞、单核细胞、淋巴细胞是有区别的。精细胞虽小但稍大于红细胞,直径为8~9 μm,有一个核,细胞质有规律地围绕在细胞核周围。在某些圆形的精细胞中可见正在发育的顶体颗粒,犹如一个闪亮的斑点与细胞核相邻。对于精母细胞,其核看起来比较平坦、细胞质细腻,它们唯一有可能是大小尺寸上易与淋巴细胞相混淆,因为淋巴细胞的核较大,从大小上不容易区别。初级精母细胞比次级精母细胞大2倍。圆形精子细胞是无鞭毛的正圆形。但是晚期或被变形的精细胞在近精子时期可见一个小小的鞭毛。

1.3.3.2 细胞涂片、HE染色 取部分细胞按常规方法涂片、HE染色,在光镜下观察细胞的种类、形态特点等。

1.3.3.3 生存活力检查 对用于细胞学分析的同一样本再进行取样,用0.4%台盼蓝进行染色,检查细胞生存活力(0.5 ml; F-8154, Sigma, Pole, UK)。

1.3.3.4 精子细胞体外培养的生长行为 每天在普通光学倒置显微镜和/或微分干涉相差倒置显微镜下观察精子细胞培养过程中的生长状态及形态变化。每隔3~5天用图像分析扫描仪拍照。

1.3.3.5 精子细胞体外培养的成熟情况 每天在倒置显微镜和/或微分干涉相差倒置显微镜下观察各组培养细胞的变化情况。第1、2组随机选择数个视野,计数300个细胞,分别记录各组发育成熟的Sc期精子细胞数(个),计数3次,取其平均值,并计算精子细胞体外成熟到Sc期精子细胞的百分率。实验结果数据以($\bar{x}\pm s$)%计算。

1.4 统计学方法

采用SPSS 10.0统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 体外培养前后生精细胞的鞭毛生长变化

在整个培养期间,初级精母细胞,延长的精母细胞和其他非生精细胞的形态没有发生变化,然而,在生精细胞混合物的体外培养中和分离的圆形精细胞部分的体外培养中约有22%的圆形精细胞显示出鞭毛的生长,除了鞭毛的生长外观察不到圆形精子细胞的其他形态变化。在混合细胞悬浮液和分离的圆形精细胞部分鞭毛生长的细胞,结果显示圆形精子细胞在培养阶段早期就开始了其鞭毛的生长。在分离的圆形精细胞部分中,4 h后约8%的圆形精细胞已完成了鞭毛生长;8 h后约22%的圆形精细胞显示出鞭毛生长,在随后的培养期间,显示鞭毛生长的圆形细胞百分数几乎保持恒定,揭示了在体外培养的最初8 h圆形精子细胞完成鞭毛生长。

2.2 体外培养前后生精细胞存活力评定实验

在体外培养期间,生精细胞的存活力只能保留较短的时间,表1显示出混合悬液及分离纯化的细胞在体外培养前后的4~72 h的生精细胞的存活力[($\bar{x}\pm s$)%]。结果表明,体外24 h开始,每组间细胞会逐渐丧失其存活力,此后细胞存活力逐渐丧失,体外培养24~48 h,大约有20%的细胞丧失存活力。到72 h,仅有40%的细胞能排斥台盼蓝。在培养过程中我们观察到,每个时间段,分选出的部分细胞存活力都显著高于混合细胞悬液组,无论是梗阻性和非梗阻性或分泌性的无精子症患者的睾丸组织获取的生精细胞体外培养结果都是十分相似的。

表1 体外培养后混合细胞和分离的纯化细胞的活力(%,$\bar{x}\pm s$)

时间(t/h)	混合细胞悬液	经分选纯化的精原细胞活力		
		初级精母细胞	圆形精子细胞	被拉长精子细胞
0	92.58±1.75	97.09±1.11	97.67±0.87	97.82±0.89
4	91.93±1.53	97.53±0.97	97.18±1.05	97.26±1.14
8	90.77±1.52	96.28±1.21	96.51±1.30	96.72±1.14
24	89.25±1.56	95.0±1.28	95.53±1.36	95.72±1.19
48	87.07±2.56	90.58±0.84	91.51±0.85	91.49±0.76
72	45.25±1.88	62.58±1.89	65.00±1.82	65.01±1.83

2.3　体外培养前后生精细胞的形态变化

本组病例中经睾丸病理活检确诊为非梗阻性无精子症 6 例，生精细胞发育阻滞在初级精母细胞阶段。经酶消化后，获得的细胞数约 1 275 个，镜下观察只有精原细胞、初级精母细胞和支持细胞、无次级精母细胞及各期精子细胞，其中初级精母细胞约占 38%。故采用生精细胞与支持细胞在改良人类输卵管液中共培养，体外培养 4 d，最后得到精子细胞。22 个，其中 Sb 精子细胞 15 个，初级精母细胞的分化率约3.1。见图 1 -4。

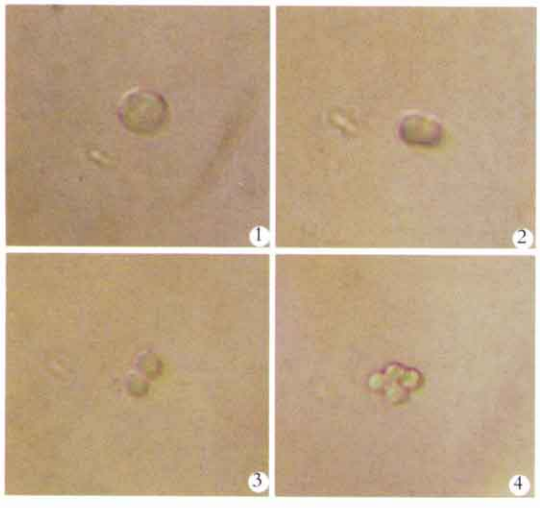


图 1　为培养第 1 天的初级精母细胞　（倒置显微镜×400）
图 2　培养后第 3 天处于分裂期中的次级精母细胞　（倒置显微镜×400）
图 3　培养后第 4 天处于分裂期中的次级精母细胞　（倒置显微镜×400）
图 4　为培养后第 6 天的圆形精子细胞(Sa 期)　（倒置显微镜×400）

经睾丸活检确诊为梗阻性无精子症 8 例，生精细胞混悬液中含有各级生精细胞和支持细胞。患者睾丸组织分离后共获得生精细胞 2 456 个，分为 2 组，一组通过显微镜将部分精子细胞和初级精母细胞筛选出来，分别置于改良的人输卵管液中培养，结果体外培养 4 d，最后得到精子细胞 160 个，其中 Sb 精子细胞 86 个，可见初级精母细胞可发育为次级精母细胞，并分化成早期精子细胞，分化率平均为 6.51%。精子细胞可从 Sa 期发育为更成熟形式的 Sc 期精子细胞，成熟率平均为 5.74%。另一组采用各种生精细胞混合悬液共培养的 2 种方法，结果，分选出的生精细胞与支持细胞共培养这组的精子细胞成熟率较混合细胞共培养的这组要高。表明精子细胞与支持细胞共培养的情况下能为精子细胞的体外成熟提供较好的培养条件。

经睾丸活检确诊为分泌性无精子症 5 例，制备的生精细胞混悬液中有各级生精细胞，此病例的支持细胞比较少，在 2% 以下。

2.4　FSH 对精子细胞成熟分裂和精子发生的影响

精子细胞在含有不同浓度的 FSH 的培养基中培养 24 h 后进行观察，在 10 IU/L 浓度的 FSH 时，没有观察精子细胞有什么变化。对精子细胞发生产生影响的最低 FSH 浓度是 25 IU/L。在 50 IU/L 浓度下，伸长的并能向更高阶段生长的精子细胞比例增大，特别那些是异常形态 Sbp 类型和 Scp 类型伸长的精子细胞的比例有很大的增加。而增加 FSH 的浓度并没有增强这种效果。在各个试验组之间，没有检测到细胞活力有差别。

从表 2 可以看到，分选后 Sa 期精子细胞体外培养能进一步向 Sb 、Sc 期 精子细胞变形、成熟。生精细胞和支持细胞共培养组，Sa 期精子细胞的成熟率比混合细胞培养高，在统计学上有显著性差异($P<0.05$，$n=16$)，表明在支持细胞存的在情况下，为精子细胞的体外成熟提供更好的培养条件。

表 2　精子细胞体外培养获得的 Sc 期精子细胞百分率比较
[$n=8$，($\bar{x}\pm s$)%]

培养方法	分化率	成熟率
生精细胞和支持细胞共培养	6.51 ± 1.56^{a}	5.74 ± 1.77^{a}
混合细胞培养	5.12 ± 1.23	4.53 ± 1.80

a：$P<0.05$，与混合细胞培养比较

2.5　FSH 和 T 对精子细胞成熟分裂、精子发生的单独及复合影响效果

从表 3 看到，体外培养加入 T，浓度达到 1 μl/L，对精子细胞的成熟分裂和精子发生没有产生任何影响。然而，当 T 和 FSH 同时加入培养基时，T 加强了 FSH 在精子细胞的成熟分裂和精子发生方面的作用，这种加强效果在培养 24 h 后就能体现，而且可以延续到培养 48 h 以后。T 对 FSH 的加强效果，T 在精子发生相关变化中的强化作用，可以从正常形态 Sd2 精子和异常形态 Scp 精子比例的增加上反映出来，而异常形态的 Sbp 精子比例在培养 24 h 后仅表现出细微的下降，其他形态的精子则没有检测到任何变化。

表 3　不同浓度的 FSH + T 对初级精母细胞体外培养分化为精子细胞的数量（$n=14$，单位：个）

培养时间(h)	F0(0 IU/L)	F1(10 IU/L)	F2(25 IU/L)	F3(50 IU/L)	F4(100 IU/L)
24	0.80 ± 0.22(0.26%)	2.14 ± 0.23(0.71%)^{a}	4.07 ± 0.22(1.36%)^{ab}	4.74 ± 0.27(0.91%)^{abc}	4.07 ± 0.22(1.36%)^{abd}
48	1.26 ± 0.23(0.42%)	2.64 ± 0.33(0.88%)^{a}	6.86 ± 0.69(2.29%)^{ab}	7.67 ± 0.26(1.56%)^{abc}	6.86 ± 0.69(2.29%)^{abd}
72	1.54 ± 0.23(0.51%)	4.40 ± 0.63(1.47%)^{a}	7.23 ± 0.64(2.41%)^{ab}	7.93 ± 0.48(1.64%)^{c}	7.23 ± 0.64(2.41%)^{abd}

F0 组仅添加睾酮 1 μmol/L，F1 -4 括号内为添加 FSH 的浓度且均添加了 1 μmol/L 的睾酮。a：$P<0.01$，与 F0 比较；b：$P<0.01$，与 F1 比较；c：$P<0.01$，与 F2 比较；d：$P<0.01$，与 F3 比较

2.6　精原细胞的卵胞浆内注射

选择培养了 72 h 的变长的精子细胞，用 10 μm 滴管吸取并一个一个转移到含 15 μl 的 HTF1020 培养基中，用于 ICSI 的注射针直径是 7 μm，ICSI 过程中，当圆形精细胞或拉长的精子细胞进入吸管时被压缩成卵圆形，在经过强有力的抽吸之后，精细胞被注入卵母细胞的细胞质中。以便于活化。由于它们的体积较大，精细胞在胞质内注射后可清楚地跟踪观察。我们共注射 10 个 MⅡ期的卵母细胞，被注射过的卵母细胞置于 10 IU/L的 HTF1026 培养液的微滴中置 37 ℃ ，5% CO_2 培养箱中继续培养。结果 14 h 观察有 3 个出现受精的雌雄原核，受精 16 h 后分裂为 4 细胞，32 h 3 个受精卵分裂成 8 ~ 16 个细胞不等的早期胚胎。

3　讨论

在人类最早利用精原细胞使卵子受精成功的是比

利时的 Vanderzawlmen 医生(1995)。同年 Fishel 利用长型精细胞使卵子受精怀孕成功。1996 年,法国的 Tesarik 等[3]在全球首例报道利用圆形精子细胞使卵子受精成功植回母体,并生下 1 对健康的女婴,使不孕夫妇能拥有自己的基因的后代。这说明人类生精细胞在体外培养能获得进一步的分化和成熟,为无精子症和弱精子症患者的治疗提供了新的治疗手段。1998 年,Aslam 等[4]从梗阻性及非梗阻性无精子症患者睾丸组织中分离出圆形精子细胞,培养 4 ~ 8 h 后约有 22% 的圆形精子细胞出现鞭毛。Cremades 等[5]将人类圆形精子细胞与 Vero 细胞共培养,圆形精子细胞能发育成长形精子细胞(Sc 期精子细胞),甚至成熟的精子。Tesarik 等[6]用阻滞于初级精母细胞阶段的生精细胞经体外培养,使其从减数分裂阶段发育到精子细胞变形阶段后,通过显微注射入其配偶的卵子内,获妊娠成功,产下发育正常的双胞胎婴儿。Sousa 等[7]用非梗阻性无精子症患者睾丸活检组织分离、纯化,获得初级精母细胞与支持细胞,置于 Vero 细胞条件培养基上共培养 2 ~ 3 周,结果初级精母细胞经减数分裂分化成圆形精子细胞,其分化率为 6.9%,而且这些圆形精子细胞进一步发育成熟为具有正常形态的长形的精子细胞。

在我们的研究中有 6 例是生精细胞发育在阻滞初级精母细胞阶段,标本中无次级精母细胞及各种精母细胞,经培养后初级精母细胞能分化为早期的精子细胞。另 8 例标本在改良的人输卵管液中培养后,初级精母细胞亦能分化为早期的精子细胞。表明在本研究的条件下,人类生精细胞能够在体外培养并分化、成熟,初级精母细胞的分化率为(6.51 ± 1.56)%,但实验结果与国外研究相比仍有一定差距。

在精子细胞的体外培养方面,Cremades 等[5]用 Vero 细胞作为饲养细胞培养人类精子细胞的成熟率为 19% ~46%;Tesarik 等[8]研究组则为 51.1%;Sousa 研究组为 22.7%。本研究考虑到 Vero 细胞为异体的非洲绿猴的肾上皮细胞,是否会对人的生精细胞带来其他的病毒以及造成基因突变的原因不详故未采用。而是采用精子细胞与支持细胞共培养以及细胞分选培养两种方法,结果显示人类生精细胞经体外成熟培养后,Sa 期精子细胞能进一步发育为更成熟形式的 Se 期精子细胞,精子细胞的成熟率为(5.74 ± 1.77)%,但精子细胞的成熟率及成熟程度低于国外研究组。

我们的研究结果表明,FSH 对抑制生精细胞的凋亡(apoptosis)有关[3],而睾酮可增强 FSH 对生精细胞凋亡的调控作用。在 72 h 体外培养的培养液中我们加入不同剂量的 FSH,结果观察到在添加了 25 ~ 50 IU/L 含量的 FSH 培养 8 ~ 16 h 后,部分圆形精子细胞可镜下观察出现鞭毛,而 10 IU 或 100 IU 的未见明显的改变。当 T 和 FSH 同时加入培养基时,T 加强了 FSH 在精子细胞的成熟分裂和精子发生方面的作用,这种加强效果在培养 24 h 后就能体现,而且可以延续到培养 48 h 以后。T 对 FSH 的加强效果,T 在精子发生相关变化中的强化作用,可以从正常形态 Sd2 精子和异常形态 Scp 精子比例的增加上反映出来,而异常形态的 Sbp 精子比例在培养 24 h 后仅表现出细微的下降,其他形态的精子则没有检测到任何变化。这与国外的研究结果是一致的。

本研究已经证实,使用早期(圆形)或晚期(长形的或正在变长的)精子细胞进行卵胞浆内显微注射,能使卵母细胞受精、卵裂。这一结果看来有望使无精子症患者终能拥有自己传统基因的宝宝。但是这种技术是否能将无精子症患者的某些遗传缺陷传给下一代?尽管国外已有利用圆形精子细胞行卵胞浆内显微注射后授精、卵裂、并妊娠生育健康婴儿的报道,但体外培养过程中,生精细胞短时间内的减数分裂是否存在着一些潜在的基因突变的因素呢?这一切尚是未知数。必须要依靠胚胎种植前诊断技术(preimplantaion genetic diagnosis,PGD)才能最终解决问题。

参考文献:

[1] TESARIK J,GRECO E,RIENZI L, *et al*. Differentiation of spermatogenic cells during *in-vitro* culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone[J]. Hum Reprod, 1998, 13(10): 2772 - 2781.

[2] GANDINI L, LENZI A, LOMBARDO F, *et al*. Immature germ cell separation using a modified discontinuous Percoll gradient technique in human semen[J]. Hum Reprod, 1999, 14(4): 1022 - 1027.

[3] TESARIK J, MENDOZA C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development [J]. Hum Reprod, 1996, 11(4): 772 - 779.

[4] ASLAM I, ROBINS A, DOWELL K, *et al*. Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men[J]. Hum Reprod, 1998, 13(3): 639 - 645.

[5] CREMADES N, BERNABEU R, BARROS A, *et al*. *In-vitro* maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells[J]. Hum Reprod, 1999,14(5): 1287 - 1293.

[6] TESARIK J, BAHCECI M, OZCAN C, *et al*. Restoration of fertility by *in-vitro* spermatogenesis[J]. Lancet, 1999, 353(9152): 555 - 556.

[7] SOUSA M, CREMADES N, ALVES C, *et al*. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells[J]. Hum Reprod, 2002, 17(1): 161 - 172.

[8] TESARIK J, BALABAN B. *In-vitro* spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: relationship with *in-vivo* blocking stage and serum FSH[J]. Hum Reprod, 2000, 15(6): 1350 - 1354.

(编辑 王 红)