产前诊断与优生优育 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001151

精液参数和来源对 ICSI 助孕患者胚胎质量及临床结局的影响

刘艳丽，路芳鸣，孙丽君，王文英，王兴玲
（郑州大学第三附属医院生殖中心，郑州 450052）

【摘 要】目的：分析精子因素对卵胞质内单精子注射（intracytoplasmic sperm injection，ICSI）临床结局的影响。**方法**：回顾性分析不同来源和参数精液行 ICSI 助孕的临床资料，A 组为因精卵结合障碍重复周期行 ICSI 授精者 228 周期，B 组少弱精子组 790 周期，C 组为附睾穿刺取精（percutaneous epididymal sperm aspiration，PESA）/睾丸穿刺取精（testicular sperm aspiration，TESA）组 225 周期，比较各组患者行 ICSI 助孕的胚胎质量及临床结局。**结果**：3 组患者的正常受精率和卵裂率均无统计学差异，A 组患者可利用胚胎率明显低于 B 组，A 组患者的优质胚胎率明显低于 B、C 2 组；新鲜移植周期中 A 组患者胚胎种植率明显低于 B、C 2 组，临床妊娠率、多胎率、早期流产率、早产率、活产率及新生儿男女性别比例均无显著差异（$P>0.05$），A 组患者新生儿体质量高于 B、C 2 组，且 B 组高于 C 组；复苏移植周期 A 组患者临床妊娠率和胚胎种植率明显低于 B、C 2 组，且 C 组大于 B 组，C 组活产率明显大于 A、B 2 组（$P<0.05$），其他临床指标无统计学差异（$P>0.05$）。**结论**：精子的参数及来源不影响 ICSI 治疗的受精、卵裂及早期妊娠；ICSI 能够改善受精障碍组的受精情况（A 组），但胚胎的质量和发育潜能较低；PESA/TESA 组有相对较高的临床妊娠率和种植率。

【关键词】精液参数；卵胞质内单精子注射；胚胎质量；经皮附睾穿刺取精术/睾丸精子抽吸术；临床妊娠率
【中图分类号】R711.6 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-04-28

Effects of semen factors and origin on embryo quality and clinical outcome of patients received ICSI treatment

Liu Yanli, Lu Fangming, Sun Lijun, Wang Wenying, Wang Xingling
(Reproductive Medicine Center, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effects of sperm with different qualities on the outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). ***Methods***: The clinical data of patients received ICSI treatment with different sources and parameters of semen were retrospectively analyzed. Group A were patients who received 228 cycles due to sperm-egg combination obstacles. Group B were patients who received 790 cycles due to oligo-asthenospermatism. Group C were patients who received percutaneous epididymal aspiration (PESA)/testicular sperm extraction (TESA) for 225 cycles. The embryonic development and pregnancy outcomes were compared. ***Results***: There was no statistical difference in rate of fertilization rate and cleavage among three group. The rate of available embryo of group A was lower than that in group B; the rate of good-quality embryo of group A is lower than that in group B and C; group A has a significantly lower implantation rate than group B and C; there was no significant difference in clinical pregnancy rate, rate of multiplets, early miscarriage, premature birth rate, live birth rate and newborn sex ratio among three groups in the fresh transplantation cycles ($P>0.05$). The neonatal weight of group A was higher than that of groups B and C, while the neonatal weight of group B is higher than that of group C. In the vitrified-thawed cycles, the clinical pregnancy rate and the implantation rate of group A were lower than those of group B and group C, and the clinical pregnancy rate and the implantation rate of group C were higher than those of group B; group C has a higher live-birth rate than group A and group B; there was no statistical difference in other indexes. ***Conclusion***: The parameters and source of sperm does not affect the ICSI fertilization, cleavage and early pregnancy. ICSI can improve the fertilization rate of sperm-egg combination obstacles (group A), but the quality and developmental potential of embryos is lower. PESA/TESA groups have a relatively higher clinical pregnancy and implanation rate.

【Key words】sperm parameters; intracytoplasmic sperm injection; percutaneous epididymal sperm aspiration/testicular sperm aspiration; clinical pregnancy rate

作者介绍：刘艳丽，Email：liuyanli0209@163.com，研究方向：胚胎发育。
通信作者：王兴玲，Email：wangxl208@126.com。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1659.054.html（2017-01-03）

在人类辅助生殖技术（assisted reproductive technology，ART）中，因男方精液因素导致的不孕不育占 30%~50%[1]，自 Palermo 等[2]于 1992 年首次使用卵胞质内单精子注射（intracytoplasmic sperm injection，ICSI）技术辅助授精获得成功妊娠以来，该技术作为解决男性不育的有效治疗措施已广泛应用于临床。此外，约有 20%的精液质量正常患者，在第一次试管受精（in-vitro fertilization，IVF）助孕周期中，存在完全不受精或低受精等受精障碍情况，这些患者在第二次助孕时的受精方式将改为 ICSI 授精。不同参数和来源的精液行 ICSI 助孕胚胎质量、临床妊娠结局及新生儿情况如何？一些文献报道存在相悖的观点，值得进一步深入研究。现将本中心 2012 至 2014 年第一周期和重复周期行 ICSI 助孕治疗的临床结局分析如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在郑州大学第三附属医院生殖中心行助孕治疗的患者，其中 A 组为第一周期 IVF 不受精或低受精（2PN 受精率≤30%），重复周期行 ICSI 授精的患者 228 例，B 组为单纯性少弱精症[精子浓度<5×10 个 /mL 和（或）a+b 级<10%]患者 790 例，C 组为梗阻性无精症患者 225 例[（经附睾穿刺取精（percutaneous epididymal sperm aspiration，PESA）/睾丸穿刺取精（testicular sperm aspiration，TESA）]，所有患者年龄均≤38 岁，FSH≤10 IU/L，排除染色体核型异常。

1.2 控制性超促排卵及取卵

根据患者情况采用常规长方案/短方案/微刺激方案，当有 2 个以上优势卵泡的直径达到 18 mm 时，注射绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，HCG）250 μg，36~40 h 后行阴道超声引导下穿刺取卵术，取卵 2 h 后用透明质酸酶进行脱颗粒，然后置于 G1 培养液中备用，选取成熟卵子（MII 期）行 ICSI 注射。

1.3 精子获取及处理

射精组在取精前禁欲 3~7 d，取卵日以手淫的方式留取精液标本，根据精液质量采用 Puresperm 密度梯度离心法或直接离心法处理精液。PESA/TESA 组患者取仰卧位，利多卡因麻醉后，手术穿刺附睾或睾丸组织留取附睾液或睾丸组织，处理后显微镜下观察，并离心待用。

1.4 ICSI 操作和胚胎培养

在倒置显微镜下选择形态正常的精子进行制动，并轻柔地注射卵母细胞，16~18 h 后观察卵母细胞的受精情况，观察到雌雄两原核者（2PN）为正常受精，第 2 天、第 3 天观察并记录卵裂情况，根据胚胎卵裂球数目、碎片及均一性进行质量评估，第 3 天综合患者自身情况和胚胎质量，进行移植和冷冻，或行囊胚培养后移植或冷冻保存。

1.5 胚胎的冷冻和复苏

因各种原因取消新鲜胚胎移植的患者，经玻璃化冷冻保存，首先在 ES（含体积分数 7.5%DMSO 和 7.5%EG）中平衡 7 min，再在 VS（含体积分数 15%DMSO 和 15%EG）中平衡 1 min 中，采用封闭式载体（CryoBio System，France）冷冻，投入液氮保存。复苏时将胚胎从液氮中取出迅速浸入 37 ℃预热的 WS1（含 1.0 mol/L 蔗糖）洗涤 3 次，1 min 后投入 WS2（含 0.5 mol/L 蔗糖）3 min，然后在 WS3（含 0.25 mol/L 蔗糖）、WS4（无蔗糖）中各 3 min，最后转移至复苏培养皿中，对解冻存活的胚胎进行移植。冷冻液和复苏液均采用 Medicult Media（Denmark）。

1.6 复苏胚胎移植

对于月经周期正常且排卵规律的患者采用自然周期，超声监测卵泡和内膜发育情况，在内膜厚度≥8 mm 时于排卵后给予黄体酮 40 mg/d 肌内注射；若月经周期不正常或排卵不规律患者采用人工周期，从月经第 3 天口服补佳乐 6 mg/d，当内膜厚度≥8 mm 时加用黄体酮 60 mg/d 肌内注射，第 3天或第 5 天复苏胚胎或囊胚移植；各组患者均在移植后给予黄体支持。

1.7 妊娠结局判断

至移植后 14 d，检查尿 HCG 和血 β-HCG（≥30 IU/L），移植 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。

1.8 指标的检测

分析各组之间的正常受精率、卵裂率、优质胚胎率、种植率、临床妊娠率、早期流产率、活产率及新生儿情况。正常受精率=2PN 卵子数/ICSI 患者 MII 卵子数；卵裂率=卵裂数/2PN 卵子数；可利用胚胎率=可移植胚胎数/2PN 卵子数；优质胚胎率=优质胚胎数/2PN 卵子数；临床妊娠率=孕 5 周 B 超下见孕囊数/移植周期数；种植率=孕囊数/移植胚胎数；多胎率=多胎周期数/临床妊娠数；早期流产率=孕 12 周内的流产数/临床妊娠数；活产率=活产的周期数/临床妊娠周期数。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，3 组计量资料之间的差异采用单因素方差分析，2 组计量资料之间采用 LSD-t 检验；计数资料采用卡方检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 3 组患者基本资料比较

3 组患者体质指数（body mass index，BMI）值、基础FSH

和 E2 值均无统计学差异（$P>0.05$）；A 组患者的年龄和不孕年限均明显高于 B 组和 C 组；差异均具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

2.2 3 组患者胚胎的实验室结局比较

3 组患者卵子的 MII 率、正常受精率和卵裂率均无统计学差异（$P>0.05$）；B 组患者的可移植胚胎率和优质胚胎率明显大于 A 组患者；C 组患者的优质胚胎率明显大于 A 组患者，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。

2.3 3 组患者新鲜周期移植结局比较

A 组患者新鲜周期移植的胚胎种植率明显低于 B 组和 C 组；3 组患者出生的新生儿体质量均具有统计学差异，且 A 组明显高于 B 组和 C 组，B 组明显高于 C 组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4 3 组患者复苏周期移植结局比较

A 组患者复苏周期移植的临床妊娠率和胚胎种植率均明显低于 B 组和 C 组，且 C 组明显高于 B 组；C 组患者的活产率明显高于 A 组和 B 组；差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

表 1 3 组患者基本资料比较

Tab.1 General data of the patients in the three groups

指标	A组	B组	C组	F 值	P 值
周期数（n）	228	790	225	-	-
女方年龄（岁）	32.44 ± 3.96	28.33 ± 4.45[a]	27.99 ± 4.49[b]	85.697	0.000
不孕年限（年）	4.68 ± 2.92	3.50 ± 2.11[c]	3.38 ± 1.99[d]	37.080	0.000
女方 BMI（kg/m^2）	22.72 ± 2.68	22.52 ± 3.20	22.23 ± 3.23	2.902	0.089
基础 FSH（IU/L）	6.75 ± 1.96	6.59 ± 2.26	6.48 ± 2.02	0.614	0.541
基础 E2（ng/L）	41.84 ± 20.88	40.32 ± 27.83	37.65 ± 20.91	1.594	0.204

注：a，B 组患者女方年龄与 A 组相比，$P=0.000$；b：C 组患者女方年龄与 A 组相比，$P=0.000$；c：B 组患者不孕年限与 A 组相比，$P=0.000$；d：C 组患者不孕年限与 A 组相比，$P=0.000$

表 2 3 组患者的胚胎发育情况比较

Tab.2 Embryo conditions of the patients in the three groups

指标	A组	B组	C组	χ^2 值	P 值
周期数（n）	228	790	225	-	-
MII（%）	90.55（1 839/2 031）	90.68（8 474/9 345）	91.28（2 492/2 730）	1.122	0.571
正常受精率（%）	69.00（1 269/1 839）	67.93（5 756/8 474）	67.58（1 684/2 492）	1.080	0.583
卵裂率（%）	98.50（1 250/1 269）	98.64（5 678/5 756）	98.46（1 658/1 684）	0.411	0.814
可移植胚率（%）	72.10（915/1 269）	76.06（4 378/5 756）[a]	75.12（1 265/1 684）	8.786	0.012
优质胚胎率（%）	41.29（524/1 269）	45.73（2 632/5 756）[b]	47.80（805/1 684）[c]	12.780	0.002

注：a，B 组可移植胚胎率与 A 组相比，$P=0.003$；b：B 组优质胚胎率与 A 组相比，$P=0.004$；c：C 组优质胚胎率与 A 组相比，$P=0.000$

表 3 ICSI 助孕患者新鲜移植的临床结局

Tab.3 Clinical outcomes of the patients who received fresh embryo transfer with ICSI

指标	A组	B组	C组	F/χ^2 值	P 值
周期数（n）	145	550	152	-	-
内膜厚度（mm）	10.57 ± 2.04	10.93 ± 2.16	10.76 ± 1.80	1.835	0.160
移植胚胎个数（个）	2.00 ± 0.54	1.95 ± 0.35	1.93 ± 0.28	2.285	0.131
临床妊娠率（%）	49.66（72/145）	50.00（275/550）	56.58（86/152）	2.213	0.331
种植率（%）	38.46（90/234）	53.72（361/672）[a]	48.32（115/238）[b]	16.327	0.000
多胎率（%）	23.61（17/72）	33.09（91/275）	33.72（29/86）	2.586	0.274
早期流产率（%）	12.50（9/72）	6.91（19/275）	8.14（7/86）	0.839	0.657
活产率（%）	76.39（55/72）	86.18（237/275）	87.21（75/86）	5.739	0.057
早产率（%）	10.91（6/55）	13.92（33/237）	14.67（11/75）	0.432	0.806
男女婴比例	36/30	148/158	47/50	0.861	0.650
新生儿体质量（g）	3 185.47 ± 597.89	2 991.90 ± 627.28[c]	2 822.86 ± 635.45[de]	6.604	0.001

注：a，B 组胚胎种植率与 A 组相比，$P=0.000$；b：C 组胚胎种植率与 A 组相比，$P=0.031$；c：B 组新生儿体质量与 A 组相比，$P=0.024$；d：C 组新生儿体质量与 A 组相比，$P=0.000$；e：C 组新生儿体质量与 B 组相比，$P=0.021$

表 4 ICSI 助孕患者复苏周期移植的临床结局

Tab.4 Clinical outcomes of the patients who received frozen embryo transfer with ICSI

指标	A组	B组	C组	F/χ^2 值	P 值
周期数（n）	161	560	138	-	-
内膜厚度（mm）	9.60 ± 1.52	9.82 ± 1.75	9.81 ± 1.58	1.065	0.345
移植个数（个）	1.94 ± 0.59	1.92 ± 0.56	1.89 ± 0.45	0.356	0.701
临床妊娠率（%）	33.33%（54/162）	52.85%（296/560）[a]	64.49%（89/138）[bc]	31.060	0.000
种植率（%）	22.54%（71/315）	35.53%（382/1075）[d]	49.42%（128/259）[ef]	45.131	0.000
多胎率（%）	34%（17/50）	34.12%（101/296）	33.33%（32/89）	0.054	0.973
早期流产率（%）	24.07%（13/54）	13.85%（41/296）	14.61%（13/89）	3.727	0.155
活产率（%）	70.37%（38/54）	72.97%（216/296）	88.76%（79/89）[gh]	10.327	0.006
早产率（%）	21.05%（8/38）	19.91%（43/216）	25.32%（20/79）	1.011	0.603
男女比率	18/33	135/152	58/46	5.910	0.052
新生儿体质量（g）	2 876.27 ± 693.36	3 048.79 ± 670.10	3 017.98 ± 854.89	1.243	0.290

注：a，B 组临床妊娠率与 A 组相比，P=0.000；b：C 组临床妊娠率与 A 组相比，P=0.000；c：C 组临床妊娠率与 B 组相比，P=0.014；d：B 组胚胎种植率与 A 组相比，P=0.000；e：C 组胚胎种植率与 A 组相比，P=0.000；f：C 组胚胎种植率与 B 组相比，P=0.000；g：C 组活产率与 A 组相比，P=0.006；h：C 组活产率与 B 组相比，P=0.002

3 讨 论

ICSI技术跨越了精子主动进入卵子的复杂受精过程，大大降低了对精子质量及受精能力的要求。理论上，只要找到一条形态正常的活动精子，就可能使卵子受精[3]。严重少弱畸精子症或 IVF 不受精/低受精及梗阻性无精子症患者都可用 ICSI 技术进行成功助孕。那么，是不是可以推测精子参数与 ICSI 胚胎质量和临床移植结局并无明显相关性？

既往文献报道不同精液质量和来源对胚胎受精及发育情况的影响不尽相同，有文献报道 ICSI 助孕后胚胎发育情况和精子来源无关，Amirjannati[4]、谭巧[5]和高洋[6]等研究认为不同参数和来源精子行 ICSI 助孕，受精率、卵裂率和优质胚胎率无明显差异；亦有报道显示正常精液组 ICSI 受精和胚胎质量要高于少弱精子症组，赵杰[7]和 Lu[8]等研究表明随着精子质量的降低，ICSI 的正常受精率和优胚率也随之降低，人睾丸/附睾穿刺精子和极度少弱精子组 ICSI 后的受精率和正常受精率均明显低于正常精液组；但也有学者持不同的观点，冯翠娥等[9]认为人睾丸/附睾精子的受精率和临床妊娠率高于射出精子组；蔡素芬等[10]认为梗阻性无精子组较严重少弱畸精子症组受精率、着床率及移植出生率均明显升高。

上述文献报道的数据多为样本量较小或为多中心资料，目前仍需要大样本量、来自同一中心的资料进行研究。本研究纳入我中心 3 年的数据，通过比较 3 组不同参数的精液 ICSI 不同的临床结局，显示 3 组患者正常受精率和卵裂率均无统计学差异，精子的参数及来源不影响 ICSI 治疗的受精和卵裂。本研究中，IVF 不受精或低受精率患者在随后周期行 ICSI 治疗的受精率和卵裂率与因男方因素行 ICSI 助孕结局相似，提示其低受精的原因可能只是精卵结合障碍，而 ICSI 治疗可以直接跨越这一过程，避免受精失败，从而改善治疗效果。但 A 组患者可移植胚胎率（72.10%）和优质胚胎率（41.29%）相对其他 2 组较低；推测可能与 A 组患者年龄较大，卵子质量下降有关。ICSI 能够改善受精障碍组的受精情况（A 组），但胚胎的质量和发育潜能较低。

胚胎种植率和临床妊娠率是移植胚胎在体内发育潜能的重要指标。本研究显示采用不同来源的精子进行 ICSI 助孕虽可获得相似的受精率和卵裂率，新鲜移植周期中 A 组患者胚胎种植率（38.46%）明显低于 B 组（53.72%）和 C 组（48.32%），分析可能原因为 A 组患者年龄偏大、不孕时间较长，因精液质量正常接受保守治疗时间过长，心理压力较大导致的性生活次数减少、夫妻关系紧张等有关；A 组患者新生儿体质量高于 B 组和 C 组，推测与多胎妊娠率高低直接相关。本研究各组之间临床妊娠率、多胎率、早期流产率、早产率、活产率及新生儿男女性别比例均无统计学差异，Tsai[11]和 Xie[12]等研究表明，睾丸精子组和少弱精症患者 ICSI 后妊娠率、种植率、活产率和流产率均无统计学差异；Oldereid 等[13]研究显示梗阻性无精子症患者、非梗阻性无精子症患者及少弱精子症组的临床结局显示性别比、新生儿出生

体质量、流产率和先天畸形率均无显著性。Lu 等[8]认为不同精液质量组临床受精率、流产率、活产率、早产率、低体质量出生率、出生体质量和性别比无统计学差异。他们认为 ICSI 受精完成后，胚胎的发育与精子无关。周玮等[14]认为完全受精失败和低受精患者行 ICSI 治疗后的胚胎种植率明显低于少弱精子症组，与本文数据一致。

既往研究多是新鲜周期的数据，本研究纳入新鲜周期和复苏周期的全部数据进行分析。复苏移植周期显示出不同的临床结局：A 组患者临床妊娠率和胚胎种植率(33.33% vs. 22.54%)明显低于 B、C 2 组，且 C 组(64.49% vs. 49.42%)大于 B 组(52.85% vs. 35.53%)，C 组活产率(88.76%)明显大于 A 组(70.37%)和 B 组(72.97%)；PESA/TESA 组除了较高的种植率外，其临床妊娠率和活产率也明显高于其他 2 组。进一步分析 PESA/TESA 组优质胚胎率较高及复苏周期 PESA/TESA 组临床妊娠率、胚胎植入率较高的原因：①附睾、睾丸精子由于受到营养支持，DNA 损伤发生率较射出精子低[15]；②梗阻性无精子症患者具有正常的精子发生，而少弱精子症者不仅精子数量有限，还可能伴有精子遗传物质的异常；Nakumura 等[16]发现异常精子中心体功能差，造成受精失败、胚胎染色体异常及着床率下降；③复苏周期，患者选取较好质量的胚胎进行移植，内膜准备较为充分，PESA/TESA 组患者年龄相对较小，受孕能力相对较强。

总之，对于常规 IVF 受精失败及低受精患者，采用 ICSI 授精方式可明显改善卵子受精情况，提高卵子的利用率，但优质胚胎的数量和发育潜能较低。睾丸/附睾来源的精子不会降低 ICSI 的治疗效果。可见，ICSI 技术是治疗男性梗阻性无精子症和少弱精子症的有效方法，但精子参数和来源对出生个体的影响仍需长时间和大样本量的进一步随访研究。此外，ICSI 本身为机械性穿透卵子的过程，可能存在表观遗传学改变等风险，同时 ICSI 取代了卵子对精子的天然筛选过程，可能会将异常精子信息传递给下一代，所以对于无精子症患者治疗前必须进行染色体检查、遗传学咨询、移植前遗传学诊断和产前检查等，以达到无精子症患者优生优育的治疗目的。

参 考 文 献

[1] Shin DH, Turek PJ. Sperm retrieval techniques[J]. Nat Rev Urol, 2013, 10(12): 723-730.

[2] Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte[J]. Lancet, 1992, 340(8810): 17-18.

[3] 董瑞娜，郭艺红，孙莹璞，等. 3 106 个不同来源精子 ICSI 周期临床妊娠结局分析[J]. 生殖与避孕，2013，33(4)：233-238.

[4] Amirjannati N, Heidari-Vala H, Akhondi MA, et al. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes between spermatozoa retrieved from testicular biopsy and from ejaculation in cryptozoospermic men[J]. Androloqia, 2012, 44(S1): 704-709.

[5] 谭 巧，刘能辉，李艳萍，等. 不同精子来源及参数对卵胞浆内单精子注射结局的影响[J]. 中南大学学报医学版，2011，36(2)：149-153.

[6] 高 洋，黄国宁，王亚平，等. 精液常规参数对卵胞浆内单精子显微注射治疗结局的影响[J]. 重庆医科大学学报，2013，38(9)：1081-1084.

[7] 赵 杰，朱小军，陈秀娟，等. 精液参数及精子来源对妊娠结局的影响[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版)，2015，11(6)：713-718.

[8] Lu YH, Gao HJ, Li BJ, et al. Different sperm sources and parameters can influence intracytoplasmic sperm injection outcomes before embryo implantation[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2012, 13(1): 1-10.

[9] 冯翠娥，丛 林，章志国，等. 不同来源精子对卵胞浆内单精子注射助孕结局的影响[J]. 安徽医科大学学报，2010，45(1)：112-114.

[10] 蔡素芬，龚 斐，卢光琇，等. 卵胞浆内单精子注射治疗严重性因素不育症 428 个周期的临床分析[J]. 生殖医学杂志，2013，22(4)：276-279.

[11] Tsai CC, Huang FJ, Wang LJ, et al. Clinical outcomes and development of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using extracted testicular sperm or ejaculated extreme severe oligo-astheno-teratozoospermia sperm: a comparative study[J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 567-571.

[12] Xie D, Qiu Z, Luo C, et al. Effect of spermatozoa from different sources on normal fertilization of oocytes and embryoquality and development in intracytoplasmic sperm injection cycles[J]. J South Med Univ, 2014, 34(6): 857-861.

[13] Oldereid NB, Hanevik HI, Bakkevig I, et al. Pregnancy outcome according to male diagnosis after ICSI with non-ejaculated sperm compared with ejaculated sperm controls[J]. Reprod Biomed Online, 2014, 29(4): 417-423.

[14] 周 玮，黄学锋，周 颖，等. 单精子卵浆内注射应用于前周期常规体外受精失败和低受精的治疗结果[J]. 温州医学院学报，2008，38(4)：353-355.

[15] Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa [J]. Hum Reprod, 2005, 20(1): 226-230.

[16] Nakumura S, Terada Y, Horiuchi T, et al. Analysis of the human sperm centrosomal function and the oocyte activation ability in a case of globozoospermia, by ICSI into bovine oocytes[J]. Hum Reprod, 2002, 17(11): 2930-2934.

（责任编辑：冉明会）