

·临床研究·

辅助卵母细胞激活对经睾丸显微取精术获取活动精子患者卵胞浆单精子注射治疗结局的影响

张希, 李磊, 罗阳, 李莉, 张文红

(广州医科大学附属第三医院妇产科//生殖医学中心//广东省产科重大疾病重点实验室//广东省生殖医学重点实验室, 广东广州 510150)

摘要:【目的】探讨辅助卵母细胞激活(AOA)对经睾丸显微取精术(micro-TESE)成功获得活动精子患者行卵母细胞胞质内单精子注射(ICSI)治疗的实验室和临床结局影响。【方法】回顾性分析2018年至2020年间经micro-TESE已获取活动精子的非梗阻性无精子症男性患者167人,配偶经常规超排卵获得成熟卵母细胞行ICSI治疗230个周期,比较分析ICSI后是否经钙霉素行AOA处理的实验室和临床结局差异。【结果】激活组(G1)和未激活组(G2)的女方平均年龄(29.96 ± 4.61 vs. 30.59 ± 4.50 , $P=0.297$),平均移植胚胎数(1.51 ± 0.50 vs. 1.56 ± 0.50 , $P=0.154$),移植囊胚数占比(24.37% vs. 25.00% , $P=0.915$),差异均无统计学意义。G1组的总受精率和2PN受精率、首次移植妊娠率高于G2组(72.77% vs. 67.59% , $P=0.005$; 64.33% vs. 60.22% , $P=0.036$; 67.09% vs. 50.00% , $P=0.039$)差异有统计学意义。G1组的无可孕胚周期发生率(10.85% vs. 9.90% , $P=0.815$)、D3可用胚率(41.29% vs. 40.74% , $P=0.817$)、种植率(34.87% vs. 32.05% , $P=0.533$)和临床妊娠率(43.87% vs. 41.00% , $P=0.651$)均高于G2组,但差异无统计学意义;G1组的优胚率(13.44% vs. 15.44% , $P=0.265$)和持续妊娠率(36.13% vs. 40.00% , $P=0.533$)却低于G2组,组间差异无统计学意义。【结论】AOA处理可以提高经micro-TESE获取活动精子患者ICSI治疗的2PN受精率,有增加Day3可用胚胎数的趋势,但未改善胚胎质量和持续发育能力。对于使用活动micro-TESE精子行ICSI之后的AOA处理应仅用在精子形态畸形可疑受精低下的情况。

关键词:非梗阻性无精子症;睾丸显微取精术;卵母细胞胞质内单精子注射;辅助卵母细胞激活

中图分类号:R698.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2022)02-0261-07

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0212

Effect of Assisted Oocyte Activation on the Outcome of ICSI in Patients with Mobile Sperm Obtained by Micro-testicular Sperm Extraction

ZHANG Xi, LI Lei, LUO Yang, LI Li, ZHANG Wen-hong

(Department of Obstetrics and Gynecology//Center for Reproductive Medicine//Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province//Key Laboratory for Reproductive Medicine of Guangdong Province, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China)

Correspondence to: ZHANG Wen-hong; E-mail: zhangwh98@139.com

Abstract:【Objective】To investigate the effects of assisted oocyte activation (AOA) on the laboratory and clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in patients who successfully obtained motile sperm through micro-testicular sperm extraction (Micro-TESE).【Methods】Retrospective analysis was performed on 167 non-obstructive azoospermia male patients with motile sperm obtained by micro-TESE between 2018 and 2020, and 230 ICSI cycles for the ma-

收稿日期:2021-11-24

基金项目:国家自然科学基金(81871211, 81502507)

作者简介:张希,助理研究员,硕士,研究方向:男性不育症,E-mail: zhangxi@gzhmu.edu.cn;张文红,通信作者,副主任技师,研究方向:人辅助生殖胚胎实验室工作及研究,E-mail: zhangwh98@139.com

tured oocytes obtained from partner by routine superovulation. The differences in laboratory and clinical outcomes of AOA treatment with or without calcomycin after ICSI were compared.【Results】 There were no significant differences in the average age of women (29.96 ± 4.61 vs. 30.59 ± 4.50 , $P=0.297$), the average number of embryos transferred (1.51 ± 0.50 vs. 1.56 ± 0.50 , $P=0.154$) and proportion of the number of transferred blastocysts (24.37% vs. 25.00% , $P=0.915$) between the activated group (G1) and the non-activated group (G2). The total fertilization rate and 2PN fertilization rate and pregnancy rate of first ET in G1 group were higher than those in G2 group (72.77% vs. 67.59% , $P=0.005$; 64.33% vs. 60.22% , $P=0.036$; 67.09% vs. 50.00% , $P=0.039$), the differences were statistically significant. The incidence of no available embryo cycle (10.85% vs. 9.90% , $P=0.815$), D3 available embryo rate (41.29% vs. 40.74% , $P=0.817$), implantation rate (34.87% vs. 32.05% , $P=0.533$) and clinical pregnant rate (43.87% vs. 41.00% , $P=0.651$) in G1 group were all higher than those in G2 group, and the differences were not statistically significant. However, the optimal embryo rate (13.44% vs. 15.44% , $P=0.265$) and the sustained pregnant rate (36.13% vs. 40.00% , $P=0.533$) in G1 group were lower than those in G2 group, and the differences were not significant between the two groups.【Conclusion】 Assisted oocyte activation can significantly improve the 2PN fertilization rate of ICSI in patients with motile sperm obtained by micro-TESE, and obtain a relatively large number of available Day 3 embryos, but no significant beneficial effect on embryo development quality and sustainable development ability. AOA treatment after ICSI using mobile Micro-Tese sperm should only be used in cases of teratospermia and suspected low fertilization.

Key words: microdissection testicular sperm extraction; non-obstructive azoospermia; intracytoplasmic sperm injection; assisted oocyte activation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(2): 261-267]

1999年Schlegel^[1]报道在手术显微镜放大作用下切开睾丸寻找可能具有生精功能的曲细精管获取睾丸精子,这是睾丸显微取精术(microdissection testicular sperm extraction, micro-TESE)首次应用于辅助生殖技术领域,为非梗阻性无精子症(non-obstructive azoospermia, NOA)男性患者带来了福音。Micro-TESE以较高的精子获得率和手术方式的独特优势,逐渐成为NOA患者获取精子的主要方式。与精子发生正常的男性相比^[2],NOA患者的睾丸精子进行ICSI周期的受精率和妊娠率显著降低。精子发生受损的男性的睾丸精子由于精子的成熟度低于精子发生正常的男性^[2],其ICSI后的受精率可能会降低,也可能因为精子不能触发卵母细胞激活而受精失败^[3]。含钙离子载体的人工卵母细胞激活(assisted oocyte activation, AOA)可以增加细胞内游离钙^[4-6],从而模仿导致卵母细胞激活的生理细胞信号机制^[7]。Nasr-Esfahani^[8]等使用AOA联合离子霉素提高了畸形精子症患者的受精率和卵裂率。也有生殖中心在比较梗阻性无精子症患者(obstructive azoospermia, OA)和NOA患者的附睾精子与睾丸精子行ICSI联合AOA的效果时发现,AOA可以改善OA患者的附睾精子ICSI后的胚胎质量^[9]。AOA在国内通常用于至少有1次ICSI

受精失败或受精低下(受精率 $<30\%$)的患者,有研究显示AOA可以改善射出精子头部畸形与可疑ICSI受精失败及低下患者的受精率^[10-11]。由于可开展micro-TESE手术的中心少,且获得的精子数量极少,未见AOA处理micro-TESE精子ICSI的报道。本研究对2018年至2020年间,在我院行micro-TESE成功获得活动精子的患者行ICSI治疗过程中,是否行AOA处理的实验室和临床数据进行回顾性分析,为临床治疗方案的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 一般资料

研究对象为2018年至2020年间来广州医科大学附属第三医院生殖医学中心进行辅助生殖治疗的夫妇,因男性配偶为非梗阻性无精子症且常规睾丸穿刺术无法获得精子,在我院生殖中心经micro-TESE已获取活动精子,并根据本中心常用方法冷冻保存^[12]睾丸精子1管或多管的患者167例。女性配偶通过常规长方案或拮抗剂方案促排卵^[13]获取卵子,取卵日解冻睾丸精子行ICSI治疗共230个周期。卵子激活技术经医院伦理委员会讨论通过且患者知情同意。

1.2 取卵日解冻睾丸精子

在配偶经手术获得卵子后,从液氮罐对应位置取出至少1管冷冻睾丸精子,室温放置10 min左右,液化完全后将冻存液转移至15 mL离心管,缓慢逐滴加入2 mL精子洗涤液,轻缓混匀,室温400×g离心5 min;弃上清,用1~2 mL精子洗涤液重悬底部沉淀,室温400×g离心5 min;弃上清,小心移除上层液体,50~100 μL G-IVF plus液(Vitrolife公司)重悬精子,CO₂培养箱放置待用。

1.3 ICSI方案及分组

取卵当天按本实验室操作常规准备显微注射皿,37℃培养箱(无CO₂)预热不少于30 min。行ICSI操作前将处理好的睾丸精子加入注射皿的G-MOPS plus液滴中孵育,同时加入一滴含3.6 mmol/L己酮可可碱(Pentoxifylline)的精子激动剂^[14]。显微镜下寻找活动精子转移到PVP液滴中,在获取到足够可用精子后,依次制动精子行ICSI。

2018年1月到2020年12月间的micro-TESE患者中,共129个ICSI治疗周期行ICSI后因精子形态畸形可疑受精低下即行AOA处理,再转移至胚胎培养皿液滴中培养,为激活组(G1),101个ICSI治疗周期行ICSI后,直接转移至胚胎培养皿液滴中培养,为未激活组(G2)。

1.4 辅助卵母细胞激活(AOA)

参照Nasr-Esfahani^[8]等方法,完成ICSI后的所有卵母细胞即刻转移至离子霉素(Sigma,美国)终浓度为10 μmol/L的G-IVF plus培养液中,37℃、6%CO₂培养箱中静置作用15 min,再在G-IVF plus培养液中依次洗涤3次,转移至在胚胎培养箱中平

衡过夜的G-1.5 plus (Vitrolife, 瑞典)培养液滴中常规培养。

1.5 结果评定标准和计算算式

Day 3可利用胚胎标准参照本中心实验室操作常规进行,即Day 1原核(pronucleus, PN)数目为2,Day 3胚胎卵裂球数≥5,卵裂球大小差异≤30%,碎片比例≤20%属可利用胚胎,其中卵裂球数为7~9且大小均匀的可用胚即为优胚。受精率为Day 1所有观察到原核的受精卵与ICSI注射卵数间的比值;Day 3可用胚率为可用胚数与受精卵数间的比值,优胚率是优胚数与2PN受精卵数间的比值,无可用胚周期率为无可用胚ICSI周期数与总ICSI周期数比,临床妊娠率为临床妊娠周期数与总移植周期数间的比值,持续妊娠率是正常妊娠12周以上周期数与总移植周期数的比值。

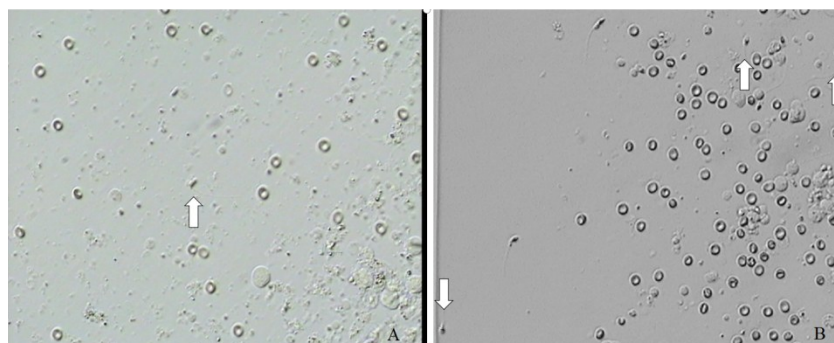
1.6 统计分析

数据分析处理采用SPSS 17.0统计软件。连续性变量使用均数±标准差表示,使用 t 检验比较两组间的连续性变量差异。率的差异性分析则采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NOA患者micro-TESE精子情况

倒置显微镜下非梗阻性无精子症患者micro-TESE精子的形态严重畸形(图1A),常为小头、梨形头、锥形头。经睾丸精子抽吸术可以获得较多头部形态正常精子(图1B)。



A: sperm obtained by micro-TESE (↑); B: sperm collection by testicular sperm extraction (↑); ×200.

图1 micro-TESE精子的异常头部形态

Fig. 1 Abnormal head morphology of sperm obtained by micro-TESE

2.2 micro-TESE 精子行 ICSI 联合 AOA 的胚胎情况

观察 micro-TESE 患者使用活动精子行 ICSI 联合 AOA 的原核形成、胚胎发育情况。Day 1 观察到

2PN 为正常受精(图 2A),偶尔可见 1PN 受精(图 2B)及 3PN 受精。只有 2PN 发育来的可利用胚胎(图 2C)可用于移植。



A: 2PN: diploid zygote; B: 1PN: monopronucleus zygote; C: availability of Day3 embryo; D: discarded embryo; $\times 200$.

图 2 micro-TESE 精子注射后的卵子受精及胚胎发育情况

Fig. 2 Fertilized ovum and embryo development after micro-TESE sperm injection

2.3 ICSI 后是否行 AOA 的实验室结局比较

激活组(G1)和未激活组(G2)女方平均年龄分别为 29.96 ± 4.61 和 30.59 ± 4.50 ($P=0.297$),此外患者每 ICSI 周期的平均 M II 数分别为 10.85 ± 5.91 和 10.75 ± 5.44 ($P=0.469$),数据符合正态分布,差异均无统计学意义。两组的 1PN 受精率(7.49% vs. 5.89% , $P=0.117$)、多 PN 受精率(0.94%

vs. 1.47% , $P=0.218$)、D3 可用胚率(41.29% vs. 40.74% , $P=0.817$)、优胚率(13.44% vs. 15.44% , $P=0.265$)和无可胚周期发生率(10.85% vs. 9.90% , $P=0.815$)差异均无统计学意义,但 G1 组的总受精率(72.77% vs. 67.59% , $P=0.005$)和 2PN 受精率高于 G2 组(64.33% vs. 60.22% , $P=0.036$),两组间差异有统计学意义。详细结果见表 1。

表 1 ICSI 后是否行 AOA 实验室结果比较

Table 1 Comparison of laboratory results of AOA after ICSI $[(\bar{x} \pm s), n, \% (n/N)]$

	G1 group	G2 group	t/χ^2	P
NO. of ICSI cycles	129	101		/
Maternal age/years	29.96 ± 4.61	30.59 ± 4.50	-1.044	0.297
NO. of M II	10.85 ± 5.91	10.75 ± 5.44	0.132	0.469
Fertility rate	72.77 (1 010/1 388)	67.59 (734/1 086)	7.857	0.005
Fertility rate of 2PN	64.33 (893/1 388)	60.22 (654/1 086)	4.406	0.036
Fertility rate of 1PN	7.49 (104/1 388)	5.89 (64/1 086)	2.463	0.117
Fertility rate of 3PN	0.94 (13/1 388)	1.47 (16/1 086)	1.515	0.218
Availability of Day3 embryo	41.29 (417/1 010)	40.74 (299/734)	0.053	0.817
Rate of good Day3 embryo	13.44 (120/893)	15.44 (101/654)	1.356	0.265
Rate without an embryo for transfer cycle	10.85 (14/129)	9.90 (10/101)	0.055	0.815

AOA: assisted oocyte activation; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; M II :mature oocyte; 2PN:diploid zygote; 1PN: monopronucleus zygotes; 3PN: triploid zygotes.

2.4 ICSI 后是否行 AOA 的临床结局

由于有部分 ICSI 周期进行了超过 1 次的胚胎移植,G1 组共 155 个移植周期,移植胚胎总数为

238 个,其中囊胚 58 个(24.37%),平均移植胚胎数为 1.51 ± 0.50 ;G2 组共 100 个移植周期,移植胚胎总数 156 个,其中囊胚 39 个(25.00%),平均移植胚

胎 1.56 ± 0.50 , 两组间平均移植胚胎数 ($P=0.154$) 及移植囊胚占比 ($P=0.915$) 差异均无统计学意义。G1 组的平均移植周期数 (1.20 ± 0.74 vs. 0.99 ± 0.61 , $P=0.009$) 和首次移植成功获得妊娠的比例 (67.09% vs. 50.00% , $P=0.039$) 高于 G2 组。两组平均移植周期数及平均移植胚胎数服从正态分布。

比较两组胚胎种植率 (34.87% vs. 32.05% , $P=$

0.533)、临床妊娠率 (43.87% vs. 41.00% , $P=0.651$) 和早期流产率 (17.65% vs. 2.44% , $P=0.018$), 其中 G2 组早期流产率低于 G1 组, 差异有统计学意义。虽然 G2 组持续妊娠率为 40.00% , 高于 G1 组的 36.13% , 但组间差异无统计学意义 ($P=0.533$), 详细结果见表 2。

表 2 ICSI 后是否行 AOA 临床结局比较

Table 2 Comparison of clinical outcomes of AOA after ICSI $[(\bar{x} \pm s), n, \% (n/N)]$

	G1 group	G2 group	t/χ^2	P
No. of ET cycles	155	100		/
No. of average ET cycles	1.20 ± 0.74	0.99 ± 0.61	2.315	0.009
Maternal age/years	29.96 ± 4.61	30.59 ± 4.50	-1.044	0.297
No. of average ET embryos	1.51 ± 0.50	1.56 ± 0.50	-0.784	0.154
Rate of blastocyst transferred	24.37 (58/238)	25.00 (39/156)	0.200	0.915
Implantation rate	34.87 (83/238)	32.05 (50/156)	0.388	0.533
Clinical pregnancy rate	43.87 (68/155)	41.00 (41/100)	0.205	0.651
Miscarriage rate	17.65 (12/68)	2.44 (1/41)	5.632	0.018
Pregnancy rate of first ET	67.09 (53/79)	50.00 (32/64)	4.283	0.039
Ongoing pregnancy (>12 weeks)	36.13 (56/155)	40.00 (40/100)	0.388	0.533

AOA: assisted oocyte activation; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; ET: embryo transfer.

3 讨论

辅助卵母细胞激活在辅助生殖治疗中使用的临床指征主要包括:患者前次 ICSI 治疗完全受精失败或受精率低于 30% ^[15], 患者精子严重畸形(如圆头精子症、顶体缺陷等)^[8,10]。AOA 方法有机械刺激法和化学激活法,机械刺激法即在行卵胞浆单精子注射时,利用注射针对卵母细胞胞浆的抽吸辅助激活卵母细胞,改善 ICSI 受精率^[16]。化学激活法主要是使用钙离子载体辅助激活卵母细胞,即利用一定浓度钙离子载体(钙霉素 A23187 或离子霉素)与 ICSI 后的卵母细胞共孵育 $10 \sim 15 \text{ min}$ ^[8,17]。这些辅助卵母细胞激活的研究结果提示, AOA 能有效改善 ICSI 受精率,但 Meerschaut 等^[17]研究也认为并不是所有 ICSI 受精率低患者都能从中获益。Borges 等^[9]描述了 ICSI 周期中含钙离子载体的 AOA 对注射睾丸或附睾精子的卵母细胞的影响,他们认为

AOA 并不能改善 OA 或 NOA 患者的睾丸精子 ICSI 结果;但是当注射来自 OA 的附睾精子时, AOA 可以改善优质胚胎率。

由于绝大多数 NOA 男性患者生精功能很差,通过 micro-TESE 手术获取的精子往往活动力极弱且存在顶体缺陷及其他形态畸形,这常导致 ICSI 后因无法激活卵子启动第二次减数分裂使得受精率低,胚胎发育质量不理想,临床妊娠率低^[18]。为提高这种极端异常精子条件下 ICSI 治疗的实验室和临床结局,通过医院伦理委员会讨论且患者知情同意,我们对部分 micro-TESE 手术已获取活动精子患者行 ICSI 后卵母细胞行 AOA 处理,比较分析是否行 AOA 处理 ICSI 治疗的实验室和临床结局差异。

在我院生殖医学中心经 micro-TESE 术成功获取活动睾丸精子的 167 例 NOA 患者,共进行了 230 个 ICSI 治疗周期。比较分析发现,129 个进行 AOA

处理的 ICSI 周期总受精率 ($P=0.005$) 和正常受精率 ($P=0.036$) 均高于 101 个未行 AOA 处理周期, 这与研究认为^[19]在射出精 ICSI 受精异常患者是否行 AOA 处理的研究结论一致, 提示 AOA 处理可显著提高 micro-TESE 术获得活动精子患者 ICSI 的受精结局。但我们的数据显示, AOA 处理未降低无可用胚周期发生率, 对 Day3 可利用胚胎率和优胚率的影响无统计学意义, 对临床妊娠率 ($P=0.651$) 和种植率 ($P=0.533$) 的影响也没有统计学意义, 且由于 AOA 组早期流产率高于未行 AOA 组 (17.6% vs. 2.4%, $P=0.018$), AOA 组的持续妊娠率低于未行 AOA 组 (36.1% vs. 40.0%, $P=0.533$), 但差异无统计学意义。这与王跃等^[10]认为圆头精子症或受精失败患者, AOA 处理可以改善 ICSI 的受精率及胚胎发育质量的结果并不一致。因为如果 ICSI 操作者能找到正常形态的活动精子进行注射, 那么不需要 AOA 处理仍然可以帮助卵子获得受精得到可以用于移植的胚胎, 而且对受精卵后续胚胎发育到优胚的影响没有显著性, 对临床妊娠率和持续妊娠率

的影响无统计学意义。辅助卵子激活对于有胚胎发育问题的患者没有益处^[20], 若 micro-TESE 患者胚胎质量差不存在受精异常, 则不需要 AOA 处理。

我们的结果显示 AOA 处理可以显著提高患者的首次移植妊娠率, 对患者可移植次数的增加有显著性, 这可能与激活组患者的可利用胚胎数有增加的趋势有关。AOA 处理的患者首次移植获得妊娠的比例更高对于减轻患者生育的经济压力以及再次生育均有帮助。

利用 micro-TESE 术获取睾丸精子是男科学领域对 NOA 男性患者行辅助生殖治疗的方法突破, 它帮助众多通过常规睾丸穿刺取精术无法获得精子的 NOA 男性患者获得了精子, 精子的质量参差不齐。对于已经通过 micro-TESE 术成功获得活动精子的患者, 在行 ICSI 治疗过程中, AOA 可改善受精情况, 但是对临床结局的有效性并不确定, 因此对于使用活动 micro-TESE 精子行 ICSI 之后的 AOA 处理应仅用在精子形态畸形可疑受精差的情况, 仅有胚胎发育问题者不建议行 AOA。

参考文献

- [1] Schlegel PN. Testicular sperm extraction: Microdissection improves sperm yield with minimal testis excision [J]. Hum Reprod, 1999, 14(1): 131-135.
- [2] Giovanni C, Suks M, Aleksander G, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis [J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(6): 733-757.
- [3] Karabulut S, Aksünger Ö, Ata C, et al. Artificial oocyte activation with calcium ionophore for frozen sperm cycles [J]. Syst Biol Reprod Med, 2018, 64(5): 381-388.
- [4] Fawzy M, Emad M, Mahran A, et al. Artificial oocyte activation with SrCl₂ or calcimycin after ICSI improves clinical and embryological outcomes compared with ICSI alone: results of a randomized clinical trial [J]. Hum Reprod, 2018, 33(9): 1636-1644.
- [5] Miller N, Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, et al. Oocyte activation by calcium ionophore and congenital birth defects: a retrospective cohort study [J]. Fertil Steril, 2016, 106(3): 590-596.
- [6] Ferrer-Buitrago M, Dhaenens L, Lu Y, et al. Human oocyte calcium analysis predicts the response to assisted oocyte activation in patients experiencing fertilization failure after ICSI [J]. Hum Reprod, 2018, 33(3): 416-425.
- [7] Wang J, Zhang JT, Sun XP, et al. Novel bi-allelic variants in ACTL7A are associated with male infertility and total fertilization failure [J]. Hum Reprod, 2021, 36(12): 3161-3169.
- [8] Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Javdan Z, et al. Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection [J]. Fertil Steril, 2008, 90(6): 2231-2237.
- [9] Borges E Jr, de Almeida Ferreira Braga DP, de Sousa Bonetti TC, et al. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa [J]. Fertil Steril, 2009, 92(1): 131-136.
- [10] 王跃, 曹明雅, 周亮, 等. 辅助卵母细胞激活技术在体外受精中的临床应用 [J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(12): 1409-1412.
Wang Y, Cao MY, Zhou L, et al. Clinical application of assisted oocyte activation in vitro fertilization [J]. J Hebei Med Univ, 2019, 40(12): 1409-1412.

- [11] 杜红姿,刘寒艳,龙晓林.对前次体外受精失败患者行部分卵胞浆内单精子显微注射的临床结局分析[J].广东医学,2011,32(10):1292-1294.
Du HZ, Liu HY, Lng XL. Clinical outcome analysis of partial intracytoplasmic sperm microinjection in patients with previous in vitro fertilization failure [J]. Guangdong Med, 2011, 32(10):1292-1294.
- [12] Guo FX, Fang AP, Fan Y, et al. Role of treatment with human chorionic gonadotropin and clinical parameters on testicular sperm recovery with microdissection testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection outcomes in 184 Klinefelter syndrome patients[J]. Fertil Steril, 2020, 114(5): 997-1005.
- [13] 范琪,林海燕,蓝洁,等.两种促排卵方案在超重多囊卵巢综合征患者中助孕效果的比较[J].生殖医学杂志,2021,30(2):139-144.
Fan Q, Lin HY, Lan J, et al. Comparison of two different control ovarian hyperstimulation protocols on pregnancy outcome in overweight patients with polycystic ovarian syndrome[J]. J Reprod Med, 2021, 30(2): 139-144.
- [14] Nabi A, Khalili MA, Fesahat F, et al. Pentoxifylline increase sperm motility in devitrified spermatozoa from asthenozoospermic patient without damage chromatin and DNA integrity [J]. Cryobiology, 2017, 76(4): 59-64.
- [15] Bonte D, Ferrer-Buitrago M, DhaenensL, et al. Assisted oocyte activation significantly increases fertilization and pregnancy outcome in patients with low and total failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection: a 17-year retrospective study [J]. Fertil Steril, 2019, 112(2): 266-274.
- [16] Dai J, Dai C, Guo J, et al. Novel homozygous variations in PLCZ1 lead to poor or failed fertilization characterized by abnormal localization patterns of PLCζ in sperm [J]. Clin Genet, 2020, 97(2):347-351.
- [17] Meerschaut FV, Nikiforaki D, De Gheselle S, et al. Assisted oocyte activation is not beneficial for all patients with a suspected oocyte-related activation deficiency [J]. Hum Reprod, 2012, 27(7): 1977-1984.
- [18] 杨竣,任新玲,谷龙杰,等.不同病因非梗阻性无精子症患者显微切开睾丸取精及ICSI结局比较[J].中华男科学杂志,2018,24(10):887-892.
Yang J, Ren XL, Gu LJ, et al. Results of micro-TESE and outcomes of ICSI in patients with different etiological types of non-obstructive azoospermia [J]. Natl J Androl, 2018, 24(10): 887-892.
- [19] Lv M, Zhang D, He X, et al. Artificial oocyte activation to improve reproductive outcomes in couples with various causes of infertility: a retrospective cohort study [J]. Reprod Biomed Online, 2020, 40(4): 501-509.
- [20] Yin MR, Li MH, Li WZ, et al. Efficacy of artificial oocyte activation in patients with embryo developmental problems: a sibling oocyte control study [J]. Arch Gynecol Obstet, 2021, Online ahead of print.

(编辑 余菁)