

·临床研究·

短时受精后早剥卵对胚胎质量及妊娠结局的影响

汪翔, 方丛*, 贾磊

(中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨短时受精后早期剥除颗粒细胞对体外受精胚胎质量及妊娠结局的影响。【方法】回顾性分析 2012 年在本中心助孕的有早剥卵的 103 个 IVF 周期与 74 个 ICSI 周期,以 ICSI 组为对照,比较两组的 2PN 受精率、多 PN 受精率、可利用胚胎形成率、卵裂期优质胚胎形成率、种植率和临床妊娠率,再以 IVF 周期中的卵子是否进行早剥分为两组,比较早剥对 IVF 周期中 2PN 受精率、多 PN 受精率、可利用胚胎形成率、卵裂期优质胚胎形成率、种植率和临床妊娠率的影响。【结果】在 IVF 周期中共有 1 181 枚卵子纳入研究,其中早剥卵子 513 枚,非早剥卵子 668 枚,在 ICSI 周期中共有 619 枚成熟卵子纳入研究。结果显示,IVF 组的 2PN 受精率、卵裂期优质胚胎形成率低于 ICSI 组,多 PN 受精率高于 ICSI 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);其余比较均无统计学差异。而 IVF 的全部卵子中,早剥卵子组的 2PN 受精率、多 PN 受精率、可利用胚胎形成率、优质胚胎形成率、种植率、临床妊娠率与非早剥组相比,均无统计学差异($P > 0.05$)。【结论】与传统 ICSI 相比,短时受精后早期剥除卵丘颗粒细胞并未降低可利用胚胎形成率;与常规 IVF 相比,早剥也未提高多 PN 受精率;早剥卵是安全的,并能够使受精情况不明的患者受益。

关键词:短时受精;早剥卵;受精率;胚胎质量;妊娠结局

中图分类号:R711.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2014)03-0390-06

Impact of Early Removal of Cumulus Cells from Cumulus-oocyte Complexes after Short-term Insemination on Embryo Quality and Pregnant Outcome

WANG Xiang, FANG Cong*, JIA Lei

(Reproductive Medicine Research Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】 To discuss the impact of early removal of cumulus cells from cumulus-oocyte complexes (COCs) after short-term insemination on embryo quality and pregnant outcome. 【Methods】 To retrospectively analyze 103 IVF cycles and 74 ICSI cycles in our center in 2012. Oocytes undergoing ICSI was set as control, the 2PN rate, polypronucleate (PPN) rate, available embryo rate, good quality embryo of cleavage-stage rate, implantation rate and clinical pregnant rate between the ICSI group and IVF group were compared. In addition, the same indexes of data between early removal of cumulus cells group and not early removal of cumulus cells group were also compared. 【Results】 Totally, 1183 oocytes in IVF cycles and 619 M II oocytes in ICSI cycles were analyzed. In IVF cycles, 513 oocytes were early stripped cumulus cells. The 2PN rate and good quality of cleavage stage rate of IVF group was significantly lower than ICSI group ($P < 0.05$), and PPN rate was significantly higher ($P < 0.05$), while no significant differences were found in PPN rate, available embryo rate, implantation rate and clinical pregnant rate ($P > 0.05$). And in IVF cycles, no differences of all the indexes between early removal of cumulus cells group and not early removal of cumulus cells group were found significant. 【Conclusion】 Compared with conventional ICSI, early removal of cumulus cells after short-term insemination does not decrease available embryo rate; and neither does it increase PPN rate when compared with conventional IVF. The operation of early removal of cumulus cells is safe, and can benefit the patients with uncertain fertilization outcome.

Key words: short-term insemination; early removal of cumulus cells; fertilization rate; embryo quality; pregnant outcome.

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(3):390-395]

收稿日期:2014-02-09

基金项目:国家自然科学基金(81070495);广东省自然科学基金(S2013010013404)

作者简介:汪翔,硕士研究生,研究方向:生殖医学,E-mail:m13560318074@163.com; *通信作者:方丛,副教授,硕士生导师,研究方向:生殖医学,E-mail:fangcongfd@foxmail.com

辅助生殖技术应用于临床以来,胚胎培养室工作的核心重点之一便是如何提高正常受精率,降低异常受精率,提高胚胎质量,提高种植率及临床妊娠率。有文献报道,常规体外受精周期中,有1%~10%的周期会发生完全不受精的情况^[1],而在不明原因不孕的患者中,有5%~25%的常规体外受精助孕周期发生完全不受精^[2-3]。全部卵子不受精时,患者往往难以接受,临床工作也面临巨大压力。为减少全部卵子不受精的发生,目前有生殖中心采用短时受精后剥除颗粒细胞(早剥卵)以观察卵子成熟和第二极体排出情况,并以此来预测该患者的受精情况。成熟卵子与精子的质膜融合后,经由精子进入卵子的磷脂酶C ζ (PLC ζ)诱导卵子内钙震荡的发生,进一步激活钙调蛋白激酶II(CaMK II),使早期有丝分裂抑制剂2(EMI2)磷酸化,随后磷酸化的EMI2由SKP2-cullin 1-F-box蛋白(SCF)泛素连接酶诱导降解,从而解除对后期促进复合物(APC/C)的抑制作用,使细胞周期素B和分离酶抑制蛋白失活,一半姐妹染色单体被排入第二极体,卵母细胞完成第二次减数分裂,向卵周隙排出第二极体^[4]。既往的研究发现,约90%卵母细胞在受精后6 h内释放第二极体^[5],大部分卵母细胞在受精后4 h内可以观察到第二极体排出^[6-7],这就为早剥卵观察受精情况提供了可能。而早剥卵这一操作对胚胎受精情况、胚胎发育情况以及妊娠结局是否产生影响仍存在争议^[8-9]。本文的研究目的是通过回顾性分析在本中心进行体外受精(in vitro fertilization, IVF)及卵泡浆内单精子注射(wtracytoplasluic sperm injection, ICSI)助孕的患者,比较早剥卵对双原核(2PN)受精率、多PN受精率、卵裂期胚胎质量、种植率、临床妊娠率和活产率的影响,进一步探讨早剥卵的安全性及对体外受精状况不明患者的IVF助孕结局的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究对象是2012年1月至12月间在本中心行IVF助孕的夫妇及行ICSI助孕的夫妇,根据男方3次精液常规检查结果决定IVF或ICSI助孕。纳入标准:女方患者均为原发不孕,均于2012年

于本中心行第一周期IVF或ICSI助孕,受精情况尚不明确,获卵数 ≥ 3 枚,并移植新鲜卵裂期(D3)胚胎。根据助孕方式分为有早剥卵的IVF组和ICSI组,ICSI组为取卵日当日精液处理后浓度低于 $1 \times 10^6/\text{mL}$;根据是否早剥,在IVF组内又分为早剥组与非早剥组,早剥组的卵子剥除颗粒细胞后均未行补救ICSI。

1.2 控制性卵巢刺激方案

采用本中心常规长方案,于前一月经周期的黄体中期注射长效促性腺激素释放激素激动剂(gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRH-a) 1.3 mg(IPSEN制药,法国),14 d达垂体降调后每天予150~300 U重组卵泡促性腺激素(recombinant follicle-stimulating hormone, r-FSH)(Puregon, NV Organon, 荷兰,或Gonal-F, Serono, 瑞士),至少有2个以上卵泡直径达 ≥ 18 mm时,予10,000 U人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG; 丽珠制药, 中国珠海),36 h后取卵。

1.3 精子制备

对行IVF助孕的夫妇,精液处理方法如下:男方患者禁欲3 d后,采用手淫法取精。待精液液化后对精子密度、活力进行评估,并采用梯度离心法和上游法收集活动精子。行ICSI助孕的夫妇,精子制备方法如下:手淫法所取精液,待精液液化后对精子密度、活力进行评估,采用直接上游法收集活动精子;行附睾穿刺或睾丸穿刺所得精子,置于IVF受精液(Vitrolife, 瑞典)中,离心后收集沉淀。

1.4 常规受精

取卵日13:00,在加有卵丘-卵母细胞复合物(cumulus-oocyte complexes, COCs)的四孔皿(Falcon, 美国)中加入适量上游后的精子,使平均每个卵子周围精子数为 $1.2 \times 10^5/\text{mL}$,每个孔内所含COCs数不超过15枚。

1.5 ICSI受精

使用透明质酸酶将COCs脱颗粒细胞后进行观察,仅对M II卵子进行单精子胞浆内注射,置于体积分数为5%CO₂的培养箱,37℃恒温培养16~20 h后观察受精情况。

1.6 早剥卵

早剥卵于精卵共同孵育4~6 h后进行,剥除

获卵总数中 30% 的卵子的颗粒细胞: 将巴氏吸管拉管至内径约为 120 ~ 150 μm , 使吸管内径略大于卵子直径。反复吹吸 COCs 直至大部分颗粒细胞被剥除, 这一过程需轻柔操作以免损伤透明带和卵子。在同源的早剥卵子中, 若剥卵后发现有一枚卵子内出现 2 枚极体, 则认为该卵子已受精, 并认为该批卵子能够受精而不再剥除剩余卵子的颗粒细胞。将剥除颗粒细胞的卵子置于盖有石蜡油的 20 μL G1 培养液 (Vitrolife, 瑞典) 制作的微滴中, 过夜培养后再次观察受精情况, 其余未剥除颗粒细胞的卵子继续过夜培养。

1.7 胚胎培养与移植

常规受精的卵子于授精后 18 h 剥除卵子周围颗粒细胞, 观察受精情况后微滴培养至第 3 天, 对胚胎进行观察评分。本中心卵裂期 D3 胚胎评分标准^[10]为: I 级, 卵裂球大小均匀, 形状规则, 无明显 DNA 碎片; II 级, 卵裂球大小略不均, 形态略不规则, DNA 碎片 < 20%; III 级, 卵裂球大小明显不均, DNA 碎片 20% ~ 50%; IV 级, DNA 碎片 > 50%。卵裂期优质胚胎定义为: D3 胚胎评分为 I ~ II 级, 卵裂球数为 6 ~ 9 枚。可利用胚胎标准为取卵后 72 h 观察为 5 细胞以上, 分级为 I ~ II 级。取卵后第 3 天选择 2 ~ 3 枚可利用胚胎进行移植, 其中 35 岁以下第 1 周期只能移植 2 枚胚胎。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件分析, 对患者基本情况进行两组独立样本的 t 检验, 对卵子受精率、胚胎质量、种植率及妊娠结局进行 Pearson χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的基本情况

患者的基本情况见表 1 及表 2。两组患者的年龄、获卵数、胚胎移植数均没有统计学差异, 而不孕年限和不育年限 IVF 组均长于 ICSI 组, 差异有统计学意义。在不孕因素的比较中, IVF 组的不孕因素主要是盆腔输卵管因素 (48.54%), 而 ICSI 组的不孕因素则主要是男方因素 (52.70%), 这一差异与本中心行 ICSI 的指征相关。

表 1 患者基本情况统计

	IVF Group	ICSI Group	P
Female age / years	30.5 \pm 3.69	29.6 \pm 4.07	0.12
Male age / years	33.1 \pm 5.06	32.9 \pm 5.08	0.75
Female Infertility / years	5.20 \pm 3.32	4.07 \pm 3.02	0.02
Male Infertility / years	5.17 \pm 3.20	4.18 \pm 3.13	0.04
Number of retrieval oocytes	11.47 \pm 4.04	10.26 \pm 5.01	0.09
Number of transferred embryos	2.01 \pm 0.26	2.03 \pm 0.50	0.78

Independent samples t test; Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

表 2 不孕因素的统计

	IVF Group	ICSI Group
Male Infertile Factor		
Primary Sterility rate	80/103 (77.67)	67/74 (90.54)
Secondary Sterility rate	23/103 (22.33)	7/74 (9.46)
Infertile Factor		
Pelvic and Tubal Factor	50/103 (48.54)	9/74 (12.16)
Male Factor	3/103 (2.91)	39/74 (52.70)
Other Single Factor	16/103 (15.53)	8/74 (10.81)
Complex Factors	34/103 (33.01)	18/74 (24.32)

Other Single Factor is defined as one of PCOS, ovulation inhibition, decreased ovarian reserve or repeated IUI failure in other centers; Complex Factors are defined as which including two or above of the single factor.

2.2 IVF 组与 ICSI 组的受精率、胚胎质量、种植率、临床妊娠率及妊娠结局的比较

表 3 中统计了行早剥卵的 IVF 组与 ICSI 组的受精率、胚胎质量、种植率及临床妊娠率、流产率和活产率。其中 IVF 组中, 有一例患者在妊娠期间发生了自然减胎, 减灭一胎。IVF 组共获卵 1 181 枚, 均进行授精操作; ICSI 组共获卵 759 枚, 其中 619 枚 M II 卵子进行了单精子卵胞浆内注射, 因此, 两组分别有 1 181 枚和 619 枚卵子纳入分析。IVF 组和 ICSI 组的 2PN 受精率 (63.76% vs. 72.21%)、多 PN 受精率 (7.79% vs. 0.48%) 和卵裂期优质胚胎形成率 (40.98% vs. 47.50%) 均有统计学差异 ($P < 0.05$)。而两组的可利用胚胎形成率 (50.30% vs. 54.93%)、种植率 (34.30% vs. 40%)、临床妊娠率 (49.51% vs. 55.41%)、流产率 (6.80%

表3 IVF组与ICSI组的受精率、胚胎质量、种植率及临床妊娠率

Table 3 Comparison of fertilization rate, embryo quality and pregnant outcome between IVF Group and ICSI Group [n/N(%)]

	IVF Group	ICSI Group	χ^2	P
2PN rate	753/1 181 (63.76)	447/619 (72.21)	43.356	< 0.001
PPN rate	92/1 181 (7.79)	3/619 (0.48)	13.061	< 0.001
2PN cleavage rate	739/753 (98.14)	436/447 (97.54)	0.498	0.481
Available embryo rate	594/1 181 (50.30)	340/619 (54.93)	3.489	0.062
Good quality embryo rate at cleavage-stage	484/1 181 (40.98)	294/619 (47.50)	7.022	0.008
Implantation rate	71/207 (34.30)	60/150 (40.00)	1.217	0.270
Clinical pregnant rate	51/103 (49.51)	41/74 (55.41)	0.599	0.439
Miscarriage rate	7/103 (6.80)	6/74 (8.11)	0.109	0.741
Live birth rate	43/103 (41.75)	34/74 (45.95)	0.309	0.578

Peason Chi-square test; Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

表4 早剥组与非早剥组的受精率、胚胎质量、种植率及临床妊娠率

Table 4 Comparison of fertilization rate, embryo quality and pregnant outcome between early removal of cumulus cells group and not early removal of cumulus cells group [n/N(%)]

	Early Removal of Cumulus Cells Group	Not Early Removal of Cumulus Cells Group	χ^2	P
2PN rate	326/513 (63.55)	427/668 (63.92)	0.018	0.894
PPN rate	32/513 (6.24)	60/668 (8.98)	3.042	0.081
2PN cleavage rate	319/326 (97.85)	420/427 (98.36)	0.261	0.609
Available embryo rate	261/513 (50.88)	333/668 (49.85)	0.122	0.726
Good quality embryo rate at cleavage-stage	223/513 (43.47)	261/668 (39.07)	2.320	0.128
Implantation rate	20/64 (31.25)	17/61 (27.87)	0.171	0.679
Clinical pregnant rate	14/33 (42.42)	12/30 (40.00)	0.038	0.845
Miscarriage rate	3/33 (9.09)	1/30 (3.33)	0.938	0.333
Live birth rate	11/33 (33.33)	10/30 (33.33)	0.000	1.000

Peason Chi-square test; Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

vs. 8.11%) 和活产率 (41.75% vs. 45.95%) 均无统计学差异。

2.3 早剥组与非早剥组的受精率、胚胎质量、种植率、临床妊娠率及妊娠结局的比较

在行 IVF 的卵子中, 早剥卵子为 513 枚 (43.44%), 非早剥卵子为 668 枚。早剥卵子的平均受精时间为 (4.45±1.00)h。表 4 统计了在 103 个 IVF 助孕周期中, 早剥组与非早剥组的 2PN 受精率 (63.55% vs. 63.92%)、多 PN 受精率 (6.24% vs. 8.98%)、2PN 卵裂率 (97.85% vs. 98.36%)、可利用胚胎形成率 (50.88% vs. 49.85%)、卵裂期优质胚胎形成率 (43.47% vs. 39.07%)、种植率 (31.25%

vs. 27.87%)、临床妊娠率 (42.42% vs. 40.00%)、流产率 (9.09% vs. 3.33%) 及活产率 (33.33% vs. 33.33%), 两组间均无统计学差异, 其中种植率、临床妊娠率、流产率及活产率所比较的数据来自移植的胚胎全部来源于早剥卵子的夫妇 ($n = 33$) 或移植的胚胎全部来源于非早剥卵子的夫妇 ($n = 30$)。

3 讨论

3.1 与传统 ICSI 相比, 早剥卵未降低可利用胚胎形成率、种植率、临床妊娠率和活产率

在本中心, IVF 周期中进行早剥卵的标准是:

女方为原发不孕,行 IVF 助孕第 1 周期,获卵数 ≥ 3 枚,早剥卵子数约为该患者本次获卵总数的 30%,若早剥卵子均未见第二极体,亦未见透明带上有精子粘附、穿透,则继续早剥剩余卵子,评估受精情况,纳入本研究的早剥卵子均未行补救 ICSI。本中心的统计结果中,行早剥卵的 IVF 周期与 ICSI 周期相比,可利用胚胎形成率、妊娠结局均无统计学差异。

Johnson 等^[11]就 ICSI 是否能改善常规体外受精的受精率和减少卵子完全不受精的发生对 11 篇文献进行了系统回顾和荟萃分析,发现在同源卵子中,ICSI 每卵子受精率为 67.5%,常规体外受精每卵子受精率为 47.8%,尽管每篇文献都报道了完全不受精的情况,但 ICSI 却能明显降低完全不受精情况的发生。这无疑为 half-ICSI 策略提供了理论依据,但同时又扩展了 ICSI 的适应症。而在进行 ICSI 的过程中,有一些操作对卵子或胚胎可能并无益处,例如人为地以形态学筛选精子、对透明带和卵膜的机械穿透以及在注射过程中将培养液中的成分注射到卵胞浆等。无论采用何种策略来提高受精率,减少完全不受精的发生,其远期预后如临床妊娠率和活产率的文献报道都较少。Davies 等^[12]比较了自然妊娠与辅助技术助孕人群子代的出生缺陷情况,认为在进行亲本因素校正后,通过 IVF 助孕所获得的子代的出生缺陷率的升高不再具有统计学意义,而在进行多因素校正后,尽管不能除外其余的混杂因素,但通过 ICSI 助孕所获得的子代的出生缺陷率的升高仍具有统计学意义。我们认为对于受精情况不明确的患者,在第一个助孕周期选择受精策略时必须充分权衡利弊,而在第一个助孕周期选择 IVF 助孕并采用早剥卵的策略,并未影响其可利用胚胎形成率和妊娠结局,也与既往相关文献报道的情况^[11]相符。

3.2 与常规 IVF 相比,早剥卵未提高多 PN 受精率

既往研究认为常规 IVF 受精方式会因培养液中高密度精子释放的反应性氧自由基(ROS)的增多而对卵子产生不利影响^[13],导致多精受精的增加。有文献报道,短时受精能够改善受精结局^[14],短时受精后剥除颗粒细胞对正常受精率、临床妊娠率均没有影响^[15]。然而,也有研究指出,在精卵短时受精后早期脱颗粒细胞的操作可能影响胚胎

质量^[9],原因是这一操作过程可能损伤透明带^[16],也有可能损伤卵子的微管结构而导致染色体分离的异常^[17]等。因此,完全脱颗粒细胞可能比部分脱颗粒细胞更容易引起这些损伤^[18]。

本中心结果中,IVF 早剥组的多 PN 受精率高于 ICSI 组($P < 0.05$),但在早剥组与非早剥组的比较中,多 PN 受精率的差异则无统计学意义。因此,可以认为,多 PN 受精的发生最主要的原因是卵子自身质量的问题(即卵子不成熟、过熟或透明带的异常等^[18]),对于这种卵子,即使不进行剥除颗粒细胞的操作,也不能减少其多 PN 受精的发生。有文献报道,PPN 率与 M II 卵子率密切相关^[18]。在 ICSI 操作中,我们只对 M II 卵子进行单精子卵胞浆内注射,已进行了人工判断,而在 IVF 操作中,我们对所有的 COCs 进行了加精操作,这也就意味着 IVF 的受精过程能够筛选淘汰发育不良的卵子。

2012 年 1 月至 12 月间共有 8 对夫妇在本中心行 IVF 助孕第一周期,其受精情况不明确,符合本中心早剥卵标准,并拟行新鲜卵裂期(D3)胚胎移植。将其全部卵子($n = 99$)进行短时受精后[平均受精时间(5.16 ± 2.08) h],早期剥除颗粒细胞后未发现双极体或精子钻透、粘附等,挑取 M II 卵子($n = 63$)在早剥后立即行早补救 ICSI,仅 1 枚发生了多 PN 受精,2PN 受精 48 枚,其中 47 枚完成了正常卵裂,形成优质胚胎 25 枚,平均每夫妇移植胚胎(2.00 ± 0.53)枚,4 例宫内妊娠,其中 1 例为宫内双胎妊娠,并均分娩存活胎儿。

总体来说,早剥卵的操作不仅是安全的,而且可以为早期行补救 ICSI 提供可能,从而改善 IVF 助孕的结局,在增加既往 IVF 受精失败患者获益^[19]的同时,也能够使 IVF 受精情况不明确的患者获益。如能进行严格控制的前瞻性对照研究可能有助于进一步探讨早剥卵对辅助生殖技术的意义及明确其操作指征。

参考文献:

- [1] Mahutte NG, Arici A. Failed fertilization: is it predictable? [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2003, 15 (3): 211-218.
- [2] Tourmaye H, Verheyen G, Albano C, et al.

- Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(5): 1030-1037.
- [3] Bungum L, Bungum M, Humaidan P, et al. A strategy for treatment of couples with unexplained infertility who failed to conceive after intrauterine insemination [J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 8(5): 584-589.
- [4] Clift D, Schuh M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(9): 549-562.
- [5] Payne D, Flaherty SP, Barry MF, et al. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography[J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(3): 532-541.
- [6] Van den BM, Bertrand E, Englert Y. Second polar body extrusion is highly predictive for oocyte fertilization as soon as 3 hr after intracytoplasmic sperm injection (ICSI)[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12(4): 258-262.
- [7] Nagy ZP, Liu J, Joris H, et al. Time course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection[J]. *Hum. Reprod*, 1994, 9(9): 1743-1748.
- [8] Jin HX, Xin ZM, Song WY, et al. Effects of human cumulus cells on in vitro fertilization outcomes and its significance in short-term insemination [J]. *J Reprod Med*, 2013, 58(1-2): 51-54.
- [9] Wei D, Zhang C, Yin B, et al. Early cumulus cell removal could reduce the available embryo rate in human IVF[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(12): 1213-1216.
- [10] Fang C, Huang R, Li TT, et al. Day-2 and day-3 sequential transfer improves pregnancy rate in patients with repeated IVF-embryo transfer failure: a retrospective case-control study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26(1): 30-35.
- [11] Johnson LN, Sasson IE, Sammel MD, et al. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3): 704-711.
- [12] Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects [J]. *N Engl J Med*. 2012, 366(19): 1803-1813.
- [13] Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species[J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(3): 593-600.
- [14] Kattera S, Chen C. Short co-incubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(4): 1017-1021.
- [15] Xiong S, Han W, Liu JX, et al. Effects of cumulus cells removal after 6 h co-incubation of gametes on the outcomes of human IVF [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(12): 1205-1211.
- [16] Tucker MJ, Bishop FM, Cohen J, et al. Routine application of partial zona dissection for male factor infertility[J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(5): 676-681.
- [17] Matt DW, Ingram AR, Graff DP, et al. Normal birth after single-embryo transfer in a patient with excessive polypronuclear zygote formation following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(6): 1662-1665.
- [18] Lee TH, Liu CH, Huang CC, et al. The association between polypronucleate zygote formation with certain motion characteristics of sperm and IVF outcome [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25(1): 35-41.
- [19] Liu W, Liu J, Zhang X, et al. Short co-incubation of gametes combined with early rescue ICSI: An optimal strategy for complete fertilization failure after IVF [J/DB]. *Hum Fertil (Camb)*, 2014, 17(1): 50-55.

(编辑 徐杰)