

·技术研究·

小鼠精子激活力减弱模型制备技术的初步研究

苗聪秀¹, 燕志光², 杨红梅¹, 龙慧⁴, 柴蔚然⁴, 梁红星², 于莎³, 匡延平⁴, 吕祁峰^{4*}

(1.长治医学院附属和平医院,山西长治,046000;2.亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室//广西大学动物繁殖研究所,广西南宁,530004;3.上海中医药大学附属曙光医院妇科,上海200021;4.上海交通大学医学院附属第九人民医院辅助生殖科,上海200011)

摘要:【目的】人类辅助生殖技术中,低受精率的发生机理及辅助激活提高受精率的安全性尚不清楚,缺乏激活力减弱的精子模型是其中一个主要研究障碍。本研究拟探索减弱小鼠精子激活力的新技术。【方法】首先,分别对精子进行化学破膜、机械脱尾及其联合操作于37℃孵育12h,比较各操作对显微授精后的受精率的影响;然后进一步结合时间因素,观察处理时间与精子激活力减弱程度的联系。同时,对操作后的胚胎早期发育的影响也进行了相应观察。【结果】①化学破膜法与机械脱尾法对精子破膜并温育后,均能有效降低精子受精率;②相对于正常的精子,对小鼠精子进行吹打机械脱尾,37℃下温育2、4、8、12h后,受精率和卵裂率均出现程度逐步增加的显著降低($P < 0.01$);③与对照相比,以吹打机械脱尾并37℃下温育后的精子进行显微授精后,其受精卵的囊胚率和孵出率也显著降低($P < 0.001$)。【结论】将小鼠精子机械脱尾并在37℃下温育,精子激活力随温育时间增加而显著降低,同时其胚胎发育能力下降。本研究初步探索了程度可控的降低精子受精激活力的新技术,其安全性及导致精子激活力下降的机制尚需进一步研究。

关键词:精子激活力;卵胞浆内单精子显微注射;卵子激活;受精率;小鼠

中图分类号:R715.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2013)03-0621-06

A Primary Study for Establishment of Mouse Sperm Model with Decreased Oocyte Activation Capability

MIAO Cong-xiu¹, YAN Zhi-guang², YANG Hong-mei¹, LONG Hui⁴, CHAI Wei-ran⁴, LIANG Hong-xing²,
YU Sha³, KUANG Yan-ping⁴, LÜ Qi-feng^{4*}

(1.Heping Hospital of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2.State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources/Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai TCM University, Shanghai 200021, China; 4.Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract:【Objective】Due to absence of sperm model with decreased oocyte activation capability, the mechanism of low rate of fertilization and the safety of artificial activation techniques applied in intracytoplasmic sperm injection are unclear. The current research focuses on a novel technique of decreasing oocyte activation capability of mouse sperms in controlled manner. 【Methods】First, sperm membrane was damaged with chemical interference, mechanical sperm tail-cutting off, or combing both manipulations respectively, and then incubated for 12 h at 37℃ followed by intracytoplasmic sperm injection. The fertilization rates were analyzed to figure out the most effective method of decreasing the capability of sperm's activation. Second, following the most effective treatment, the membrane-damaged sperms were incubated for different time to find out the association between the time and sperm's activation capability decreasing. Embryos' early development was also observed after intracytoplasmic sperm injection with activation capability decreased sperms.【Results】1) Both of chemical interference and the mechanical tail-cutting off decreased fertilization rate

收稿日期:2012-07-16

基金项目:国家自然科学基金(31071275,81270749);国家自然科学基金青年项目(31101070);上海市科委项目(09411962900,11411950105,12ZR1416600)

作者简介:苗聪秀,硕士,副教授,E-mail:mexms@163.com; *通信作者:吕祁峰,博士,副研究员,E-mail:lyuqifeng@126.com

significantly. 2) When sperm tails were cut off mechanically and then incubated at 37 °C for 2 h, 4 h, 8 h or 12 h, the rates of fertilization and cleavage were decreased significantly with the increase of incubation time ($P < 0.01$) accordingly. 3) Compared with control group, the percentage of blastocyst population and hatching ($P < 0.001$) also decreased significantly while intracytoplasmic sperm injection were applied using tail-cut sperms after incubation. 【Conclusion】 When sperm tails were cut off and incubated at 37 °C, the capability of sperms to activate oocytes had significantly decreased with the increase of incubation time, and the embryo development was also disrupted. In this study, a novel technique of decreasing the sperm activation capability in controlled manner has been build up primarily. However the safety and the underlying mechanism need further explored.

Key words: activation capability of sperm; intracytoplasmic sperm injection (ICSI); oocyte activation; fertilization rate; mouse [J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3): 621-626]

虽然人类显微授精 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 有助于提高因精子问题导致的不育症的受精率, 但仍有约 2% ~ 3% 的完全受精失败^[1], 尤其在一些圆头精子症、睾丸穿刺无活动精以及既往显微授精受精失败或极低受精率病例中, 辅助受孕的失败率更高。研究表明, 有多达 3% 的夫妇进行显微授精辅助受精后仍发生受精失败, 有些夫妇显微授精后的受精率不超过 50%^[2]。辅助激活可帮助低或无激活能力的精子或卵子激活, 提高受精率^[3], 并在临床应用中逐渐推广。因此, 激活力不足被认为是受精率降低的重要原因。然而, 目前还罕见关于激活力降低的研究。人类精子质量随着社会发展、环境与工作压力的加大而呈现降低, 授精能力下降。目前, 关于精子活力的影响因素、激活力降低的机理、辅助激活的安全性等相关问题, 由于缺乏合适的研究模型而尚不清楚。缺乏制备弱激活力动物精子尤其是简便易得的小鼠精子的技术是该领域研究的主要障碍之一。有研究表明, 精子头部存在活化因子, 如: PLC zeta 等, 其随精子进入卵子后释放入卵子, 激活卵子发育^[4-6]。既然是精子头部一种可释放性的因子, 那么对精子头部进行胞膜损伤等操作是否会导致 PLC zeta 一定程度的流失, 进而降低其激活能力呢? 这尚未见研究报道。本研究基于这一设想, 拟通过对小鼠精子进行膜损伤及温育一定时间等方法, 研究人为可控地降低精子活力的因素, 通过对显微授精后双原核形成率及卵裂率等指标的观察来判断精子活力的减弱程度, 以初步探索精子激活力减弱程度可控的新技术。

1 材料与方 法

1.1 促排卵及试剂准备

对 6-8 周龄的清洁级昆明白雌鼠 (购自上海

中科院动物学部) 每只腹腔注射 10IU 的孕马血清促性腺激素 (PMSG, 宁波三生制药), 48 h 后再注射 10IU 的人绒毛膜促性腺激素 (HCG, 宁波三生制药) 促排卵, 12 ~ 14 h 后脱白法处死小鼠, 剪取输卵管收集卵子。

1.2 卵子的获取及附睾尾精子的分离

获取卵子: 从输卵管膨大部挑出卵丘卵子复合体, 用透明质酸酶溶液 (150 IU/mL, Sigma 公司) 消化去除卵丘颗粒细胞, 选取形态好的成熟卵子, 转入含 100 mL/L 血清替代品 (SSS, Irvine 公司) 的人胚胎卵裂培养基 (ECM, Irvine 公司), 置于 37°C、5.0% CO₂ 培养箱中预孵备用。

附睾尾精子的分离: 取大于 8 周龄的昆明白雄鼠的附睾尾, 置于含 100 mL/L SSS 的 MHTF (即 HTF 中含 25 mmol/L 的 HEPES) 培养基 (Irvine 公司) 中漂洗后将附睾尾中的内容物挤出, 精子即活跃游动于 MHTF 内, 然后吸取含精子的 MHTF, 上游 30 min 后取上清备用。

1.3 改良的新型持卵管的制备

本研究显微注射针 (Humagen, USA) 采用的是商品化的用于人卵显微授精的尖口显微注射针, 其尖端的内径约 5 μm。所使用的持卵管详见我们已发表论文^[7], 即: 用 G-100 型玻璃毛细管 (Narishige, Japan, 外径: 1.0 mm, 内径 0.75 mm), 先通过拉针仪 (PN-30; Narishige Instrument, Japan) 加热并手动拉长拉细局部毛细管管壁。然后, 垂直置于煅针仪 (MF-900; Narishige Instrument, Japan) 上, 在内径约为 60 μm 处加热, 使其收缩并变弯。然后转动毛细管 180°, 致使该处另一侧被加热收缩并变直。然后再转动 90°, 重复上述加热过程, 使得该处管壁内径均匀收缩至约 15 μm。然后在该处向末端方向的约 45 ~ 55 μm 内径处, 用煅针仪进行断针并加热使断口轻微钝化。最后, 在近末端约 500 μm 处加热使其弯曲至 35° 左右。至此, 一

根开口为喇叭形状的末端内径为 45 ~ 55 μm 的持卵管制作完成。

1.4 减弱精子激活力的因素研究

收集小鼠附睾精子, 分组处理以减弱精子激活力。对照组(control组):将正常精子在 MHTF 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 12 h, 浓缩备用; 化学破膜组 (Triton-100 处理组): 将精子用 10 mL/L 的 Triton-100 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 12 h, 离心洗涤 3 次, 浓缩备用; 吹打机械脱尾组(Tail-cut 组):将精子在离心管中用小口径的巴斯德管反复吹打 10 min, 可使得部分精子的头部与精子尾部断开, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置于含 100 mL/L SSS 的 MHTF 培养基中 12 h, 离心浓缩备用; 复合处理组(both manipulations 组):精子如上操作吹打机械脱尾后, 再用 Triton-100 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 12 h, 离心洗涤 3 次, 浓缩备用。

1.5 减弱精子激活力的综合因素处理

在上述实验发现减弱精子激活力关键最佳方法的基础上, 综合时间因素(即处理后的精子于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别孵育 0、2、4、8、12 h 后浓缩应用于显微授精)进一步作观察减弱精子激活力程度的可控性。

1.6 培养基及显微授精操作皿的制备

本研究使用 MHTF 培养基作为卵子体外操作及显微授精操作的缓冲液; 使用含 100 mL/L SSS 的 ECM 培养基进行小鼠卵子预孵和胚胎培养。显微授精操作皿(BD 公司)用 MHTF 和 10% 浓度的 PVP(Irvine 公司)制成滴后覆盖矿物油(Oil, Irvine 公司)。操作滴加在相邻 PVP 滴的多处, 将处理后的浓缩精子一小滴直接加入各 PVP 滴中, 进行显微授精操作。

1.7 显微授精操作

对于对照组和化学破膜组, 用显微注射针在 PVP 滴中选择活力较好、形态正常的精子, 制动后用显微注射针在小鼠精子头尾连接处划动, 获得脱尾的精子头部(显微授精前对精子进行机械性脱尾是小鼠显微授精的常规操作需要)。收集多个(每次约 3 ~ 4 个)小鼠精子头, 转至另一未加精子的 PVP 滴进行漂洗后, 即可用于显微授精操作。对于机械吹打脱尾的实验组, 则可直接收集精子头漂洗后进行显微授精。显微授精操作采用我们新建技术, 即持卵时用喇叭形持卵管轻轻将卵子部分吸入管内约 50 μm , 将尖口注射针直接扎入卵

子深入喇叭开口内, 形成约 90 μm 深的凹陷, 然后负压破膜并注射精子头。详见我们已发表论文^[7]。

1.8 受精观察及其胚胎发育观察

显微授精后当时或次日卵子有漏浆变黑等特征者判为死亡。将行显微授精后存活的卵子分别单独或以 10 枚左右一起置入一个含 100 mL/L SSS 的 ECM 培养基 10 μL 微滴中培养。显微授精后 7 ~ 8 h 观察受精原核情况, 36 h 后观察卵裂情况。以倒置显微镜下观看到双原核 (Pronuclear, PN) 或出现卵裂作为受精成功的标志。于 d 4.5 观察囊胚形成, d 5.5 观察孵化情况。

1.9 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件, 采用精确概率法的双侧 χ^2 检验, 当 P 值少于 0.05 时, 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 减弱小鼠精子激活力的主要影响因素分析

为建立有效的减弱精子激活力技术, 发现通过损伤精子胞膜而降低精子激活力的方法, 我们比较了不同膜损伤方式。结果显示, 以 Triton-100 破膜、吹打机械脱尾或复合处理后的精子做小鼠卵的显微授精后, 双原核形成率以及卵裂率均下降, 与对照组相比均有显著差异(表 1, $P < 0.01$)。其中吹打机械脱尾组以及联合操作组, 对精子激活力的影响最显著。对照组双原核形成率为 74.7%, 卵裂率为 90.1%, 而机械脱尾组双原核形成率为 16%, 卵裂率为 21%, 联合处理组双原核形成率和卵裂率下降到 17.6% 和 23.5% (表 1)。化学处理组的激活率和卵裂率均高于联合处理组和机械脱尾组 ($P < 0.01$), 联合处理组与单纯的机械脱尾组相比, 其差异无统计学意义。相对化学破膜处理, 单纯吹打机械脱尾操作简单; 而且相对小鼠显微授精操作, 机械性脱尾本身是一项常规操作, 只是在脱尾后温育放置的时间上各有不同, 常规操作不作温育或温育放置时间很短, 而本实验处理是 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育一定时间。因此, 单纯吹打机械脱尾加 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育一定时间可能相对安全, 因此在进一步的实验中, 探讨其精子激活力减弱程度的可控性。

2.2 温育时间因素对脱尾精子激活力的影响

为探讨精子处理后温育放置时间对精子激活

表 1 影响精子活力的主要因素分析

Groups	Fertilization rate (2 PN)	Cleavage rate
Control	74.7(68/91) ¹⁾	90.1(82/91) ⁴⁾
Triton-100	39.6(38/96) ²⁾	45.8(44/96) ⁵⁾
Head-cut	16.0(19/119) ³⁾	21.0(25/119) ⁵⁾
Both manipulations	17.6(18/102) ³⁾	23.5(24/102) ⁶⁾

2), 3) versus 1), and 5), 6) versus 4) $P < 0.01$, by χ^2 test.

力的影响,我们将经过机械脱尾处理的精子,37℃放置不同的时间。结果显示,常规显微授精组(对照组)与实验未温育组(0 h组)相比,受精率与卵裂率无差异;相对常规显微授精组(对照组)及实验未温育组(0 h组),精子机械脱尾操作后于37℃下放置2 h即有明显的受精率及卵裂率降低效果,4 h后,双原核形成率就已显著下降到42.5%,分裂率下降到47.1%(表2)。当放置时间达到12 h后,双原核形成率和分裂率进一步显著下降到13.8%和21.5%(表2)。以上表明,随着精子在吹打机械脱尾后放置于37℃的时间的延长,精子活力呈逐渐下降的趋势。

2.3 人为降低精子活力后对胚胎发育的影响

为检测减弱精子活力后对胚胎发育的影响,我们以机械脱尾处理并于37℃放置2 h、4 h以及12 h的精子进行显微授精,观察胚胎的早期发育。结果表明:精子活力降低后,与对照组相比卵裂率和成囊率均显著下降($P < 0.001$),且发育延迟(表3)。在形态上与对照组相比,激活力减弱组(4 h)的分裂细胞可见较多的碎片,分裂大多不均;卵裂及囊胚发育迟滞,囊腔较小(图1)。以上结果提示,精子活力的降低时,胚胎早期的发育也受到了明显影响。

表 2 精子吹打机械脱尾后于 37℃下放置时间对精子活力的影响

Groups	Fertilization (2 PN)	Cleavage
Control	72.0(54/75) ¹⁾	89.3(67/75) ⁴⁾
0 h	77.4(89/115) ¹⁾	87.8(101/115) ⁴⁾
2 h	51.6(48/93) ²⁾	55.9(52/93) ⁵⁾
4 h	42.5(37/87) ²⁾	47.1(41/87) ⁵⁾
8 h	25.0(32/128) ³⁾	45.3(58/128) ⁵⁾
12 h	13.8(9/65) ³⁾	21.5(14/65) ⁶⁾

2), 3) versus 1), and 5), 6) versus 4) $P < 0.01$; 2) versus 3), and 5) versus 6), $P < 0.01$, by χ^2 test.

3 讨 论

在辅助生殖技术的临床应用中,显微授精以及显微授精加辅助激活技术的应用常常能帮助大部分因精子原因导致的不育症获得受孕机会,但是,研究表明经显微授精后的卵的受精率大约为50%~70%^[2,8]。精子活力不足可能是显微授精辅助受孕失败的重要原因,但由于缺少能模拟弱活力精子的动物模型,关于精子活力降低的影响因素以及机制,以及显微授精辅助激活技术的安全性研究仍少有报道。本研究首次发现精子经机械脱尾处理并温育后,可显著降低其活力,其活力与37℃放置时间呈负相关。本研究结合机械脱尾处理以及37℃放置时间的长短,建立了温和可控的精子活力减弱的处理方法,为研究建立模拟弱活力精子的小鼠模型探索了新技术途径。

在小鼠显微授精操作中,由于小鼠精子尾部相对小鼠卵子大小而言比较粗而长,不适合全部

表 3 降低精子活力后显微授精胚胎的发育情况

Groups	No. of oocytes Survived	Cleavage	Blastocyst	Hatch %
Control	59	89.8(53/59)	59.3(35/59)	30.5(18/59)
Sperm activity weakened (2 h)	83	55.4(46/83) ¹⁾	13.3(11/83) ¹⁾	1.2(1/83) ¹⁾
Sperm activity weakened(4 h)	87	44.8(39/87) ¹⁾	3.4(3/87) ¹⁾	0(0/87) ¹⁾
Sperm activity weakened (12 h)	121	19.0(23/121) ¹⁾	0.8(1/121) ¹⁾	0(0/121) ¹⁾

Note: 1) $P < 0.001$ (χ^2 test), compared with control group.

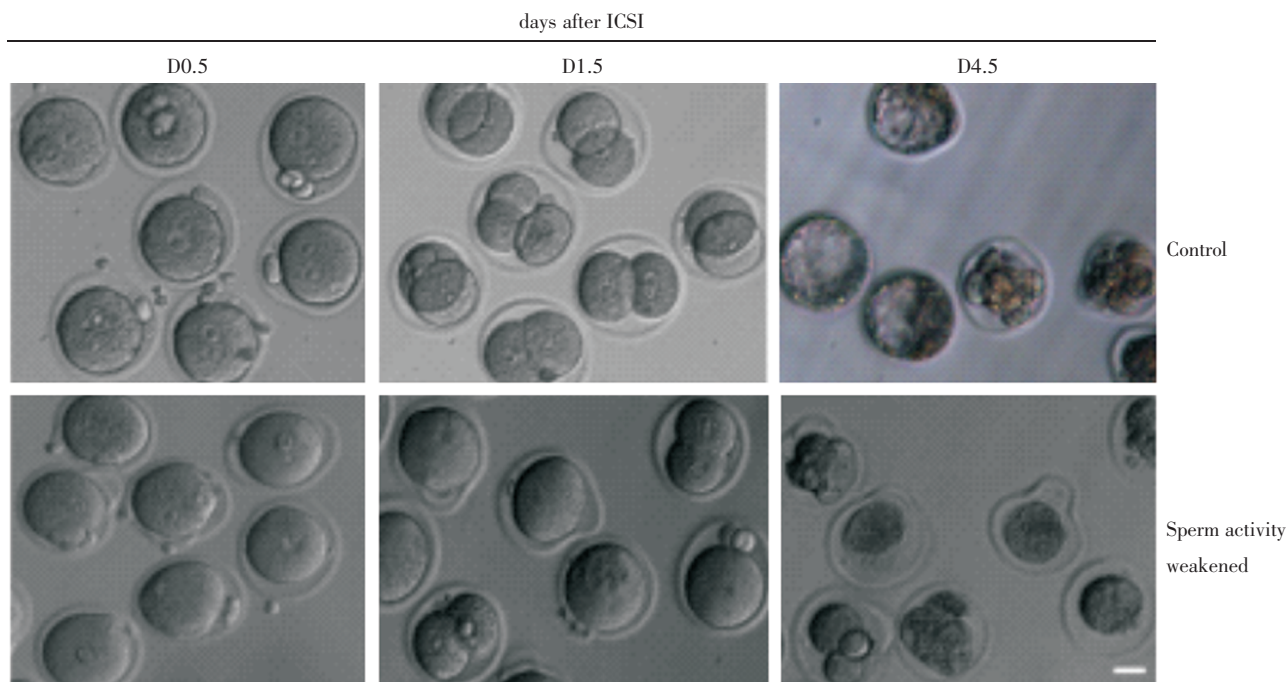


图1 降低精子激活力后显微授精胚胎的发育情况

Fig.1 The development of embryos after intracytoplasmic sperm injection with activation capability weakened sperms

(incubation at 37 °C for 4 h). Embryos at day 0.5, day 1.5 and day 4.5 (B) after ICSI with activation capability weakened sperms showed smaller cyst cavity, asymmetric division and embryonic retardation, as compared with embryos in control group (A). Scare Bar: 25 μm .

注射入卵子,因此,对精子进行机械脱尾是其一种常规操作^[9-10];37 °C下培养也是各种生物培养的一种适宜条件。本研究将这两种操作综合起来,理论上是温和与安全的。我们的结果显示,机械脱尾以及 Triton-100 处理后的精子的受精率以及分裂率均显著下降($P < 0.01$)。当两种方法联合应用时,精子的受精率和分裂率比单纯的 Triton-100 处理进一步显著降低($P < 0.01$),但与单纯的机械脱尾组相比其差异无统计学意义,这提示机械脱尾处理后,精子活力的降低可能已经达到下限,这可能也是联合 Triton-100 处理后,没有显现叠加效应的原因。

受精后卵子的激活作为胚胎发育的启动开关,会促进减数分裂的完成,并进入到受精卵的有丝分裂阶段^[11]。受精过程中,进入到卵子中的精子会释放其头部的活化因子,如:PLC zeta1,从而激发下游 IP3 的合成,导致细胞内钙信号的振荡,完成一系列发育过程^[4,6]。以前的研究表明,在牛、兔以及小鼠中,将分离的精子头进行 ICSI 后,获得正常的受精率和胚胎发育率^[10,12-13]。然而,这种脱尾

所造成的头部开放处会否在久置的情况下导致精子头部的激活因子的逐步缓释而降低了精子激活能力尚未见研究。本研究发现,对小鼠精子实施脱尾处理后,37 °C下放置 12 h 以上,其受精率显著降低(见表 1)。进一步研究发现,脱尾处理后精子,37 °C下放置不同的时间,其受精率随着放置时间延长而相应显著下降。这些似乎提示,精子头部的激活因子可能是一种在 37 °C可溶性因子,且其所处部位能从头颈部断裂处逐步缓释。但这一推测尚需更进一步研究证实。

本研究发现对精子反复吹打而机械性脱尾操作在不作温育时,其显微授精的受精率和卵裂率与常规显微授精(其也存在机械脱尾,为显微操作下脱尾)间的差异无统计学意义(见表 2),这说明反复吹打法机械脱尾对精子的受精能力未见明显危害性。由于小鼠精子 DNA 的高度凝集以及特异性鱼精蛋白交联程度高,这可能导致小鼠精子对超声波等机械外力的耐受性较强,以分离的小鼠精子头进行 ICSI 后,能获得正常的受精率、成囊率以及出生率^[9]。我们的研究表明,精子在脱尾处理

后的 37 °C 下温育, 不仅导致受精率下降, 而且原核出现的时间也有所推迟, 以致我们观察到的卵裂率高于受精率, 也可能是由于部分 1PN、3PN 或多 PN 在后期的发育中也发生了卵裂。由于我们建立的小鼠 ICSI 系统, 实验操作时间长于传统的 Piezo 驱动的操作系统, 原核观察的最佳时间有待进一步研究, 但是该系统几乎没有自发激活的存在^[7], 可以排除由自发激活导致的卵裂率增高。从另一角度来看, 有研究表明总体钙振荡强度影响受精质量^[14], 目前多数受精研究关注卵子是否被激活, 而很少关注卵子被激活的强度这一量变问题与受精能力和胚胎发育的关系。本研究建立的精子激活强度可控的方法或许能对此提供一种新的思路和技术途径。

总之, 本研究初步探索了一种可控的降低小鼠精子活力的新技术, 为进一步研究精子活力降低的机制提供了新的模型, 也将为模拟人类弱活力精子以及辅助激活临床安全性研究提供小鼠精子模型。然而, 该操作的安全性以及作用机制尚有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalae M. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection [J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 94(2): 520-526.
- [2] Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, et al. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracyto-plasmic sperm injection (ICSI)[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1995, 7(2): 197-210.
- [3] Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore[J]. *Fertility and Sterility*, 1995, 63(2): 343-349.
- [4] Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development[J]. *Development*, 2002, 129(15): 3533-3544.
- [5] Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, et al. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca²⁺ release and are unable to initiate the first step of embryo development[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11): 3671-3681.
- [6] Nomikos M, Swann K, Lai FA. Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility[J]. *Bioessays*, 2012, 34(2): 126-134.
- [7] Lyu QF, Deng L, Xue SG, et al. New technique for mouse oocyte injection via a modified holding pipette [J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2010, 21(5): 663-666.
- [8] Javed M, Esfandiari N, Casper RF. Failed fertilization after clinical intracytoplasmic sperm injection [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(1): 56-67.
- [9] Said S, Han MS, Niwa K. Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 2003, 60(2): 359-369.
- [10] Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, et al. Fertilization and Development of Mouse Oocytes Injected with Isolated Sperm Heads [J]. *Biology of reproduction*, 1996, 55(4): 789-795.
- [11] Evans JP, Robinson DN. The spatial and mechanical challenges of female meiosis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(10-11): 769-777.
- [12] Bourne H, Richings N, Liu DY, et al. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1995, 7(2): 177-183.
- [13] Lee KB, Niwa K. Fertilization and development in vitro of bovine oocytes following intracytoplasmic injection of heat-dried sperm heads[J]. *Biol Reprod*, 2006, 74(1): 146-152.
- [14] Toth S, Huneau D, Banrezes B, et al. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse [J]. *Reproduction*, 2006, 131(1): 27-34.

(编辑 张恩健)