

## 卵胞浆内单精子注射治疗畸形精子症的妊娠结局

魏思达, 欧建平\*, 骆春启, 刘雅峰, 徐艳文, 周灿权, 庄广伦  
(中山大学附属第一医院妇产科生殖医学中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】分析畸形精子症患者行卵胞浆内单精子注射(ICSI)后的妊娠结局。【方法】回顾性分析因男性因素行 ICSI 治疗的 445 个新鲜取卵周期,根据精子形态学分析结果将研究对象分为:精子形态正常组(A 组,正常形态率 $\geq 4\%$ , $n = 296$ ),非极度畸形精子症组(B 组,正常形态率 $\geq 1\%$ 且 $< 4\%$ , $n = 74$ )和极度畸形精子症组(C 组,正常形态率 $< 1\%$ , $n = 75$ ),比较 3 组的受精率、卵裂率、优质胚胎率、胚胎种植率及临床妊娠率、流产率、异位妊娠率、多胎妊娠率。【结果】3 组的卵子成熟率分别为 85.7%(3367/3927),82.7%(645/762) 和 85.9%(773/900),受精率分别为 75.5%(2543/3367),81.1%(523/645) 和 80.1%(619/773),临床妊娠率分别为 44.9%(133/296),41.9%(31/74) 和 46.7%(35/75)。3 组的卵子成熟率、卵裂率、优质胚胎率、胚胎种植率、临床妊娠率、异位妊娠率、流产率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。在 3 组中,极度畸形精子症组有最高的优质胚胎率(67.6%,405/599),种植率(32.1%,53/165)和临床妊娠率(46.7%,35/75)。【结论】ICSI 可用于畸形精子症的治疗。按照 WHO5 标准评估,不同程度的精子畸形率对治疗结局影响较小,极度畸形精子症患者行 ICSI 后仍可获得较好的妊娠结局。

**关键词:** 畸形精子症;精子形态;卵胞浆内单精子注射(ICSI)

中图分类号:R715.9 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)03-0451-05

### Teratozoospermia on Clinical Outcomes in Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles

WEI Si-da, OU Jian-ping<sup>1\*</sup>, LUO Chun-qi, LIU Ya-feng, XU Yan -wen, ZHOU Can-quan, ZHUANG Guang-lun  
(Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics & Gynecology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To evaluate the effect of teratozoospermia on the outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). 【Methods】 A total of 445 ICSI cycles were reviewed retrospectively for the pregnancy outcome between October 2009 and July 2012 in our IVF center. ICSI cycles were classified into 3 groups based on sperm morphology according to the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (2010, the 5th edition): Group A (normal sperm  $\geq 4\%$ ,  $n = 296$ ); Group B (normal sperm  $\geq 1\%$  and  $< 4\%$ ,  $n = 74$ ); Group C, severe teratozoospermia (normal sperm  $< 1\%$ ,  $n = 75$ ). The observational outcomes included oocyte maturation rate, fertilization rate, cleavage rate, implantation rate, clinical pregnancy rate, ectopic pregnancy rate, multiple pregnancy rate and miscarriage rate. 【Results】 The oocyte maturation rate of group A, B, and C were 85.7% (3367/3927), 82.7% (645/762), and 85.9% (773/900), the fertilization rates of group A, B, and C were 75.5% (2543/3367), 81.1% (523/645), and 80.1% (619/773), respectively, and the corresponding clinical pregnancy rates were 44.9% (133/296), 41.9% (31/74), and 46.7% (35/75). There was no statistical difference in the oocyte maturation rate, the cleavage rate, the high quality embryo rate, the implantation rate, the clinical pregnancy rate, the ectopic pregnancy rate, and the miscarriage rate among the three groups. However, the high-quality embryo rate (67.6%, 405/599), the implantation rate (32.1%, 53/165) and the pregnancy rate (46.7%, 35/75) were observed in group C with the most severe teratozoospermia. 【Conclusion】 ICSI is a method of choice in patients with teratozoospermia. The percentage of morphologically normal sperm is not statistically correlated with clinical outcomes. Sperms selected for ICSI allowed excellent outcomes even in the samples with severe teratozoospermia.

**Key words:** teratozoospermia; sperm morphology; intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(3):451-455]

收稿日期:2013-02-02

基金项目:广东省科技计划项目(2007B030502007, 2010B031600081)广东省生殖医学重点实验室专项基金资助

作者简介:魏思达,在读硕士研究生,生殖医学专业,\*通信作者:欧建平,博士,副教授,生殖医学专业,E-mail:dr.oujianping@gmail.com

目前, 卵胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 技术日益成熟, 不孕夫妇在体外受精胚胎移植失败后, 可根据精液分析的结果行 ICSI 治疗<sup>[1]</sup>。Kruger 等<sup>[2]</sup>人提出精子形态学评估标准, 作为精子质量的一项重要指标。2010 年世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册第 5 版<sup>[3]</sup> (以下简称 WHO5) 重新修订了精子形态学标准, 形态正常精子百分率的参考值范围发生很大的变化, WHO4 的 15% 下降到 WHO5 的 4%。一项荟萃分析显示, 精子正常形态  $\geq 4\%$  在人工授精 (IUI) 治疗中可获得较好的妊娠结局<sup>[4-5]</sup>, 严重弱精症患者 IVF 周期受精率较低<sup>[2]</sup>, 然而其与 ICSI 结局的关系尚有争议。近年来文献报道多认为精子畸形率不能准确预测 ICSI 受精率和妊娠结局<sup>[6-7]</sup>。对于极度畸形精子症 (正常形态率  $< 1\%$ ) 患者, ICSI 治疗可获得较好的受精率和妊娠率<sup>[8]</sup>。本研究探讨 2010 年 WHO5 标准不同程度畸形精子率行 ICSI 治疗的临床结局。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2009 年 10 月至 2012 年 7 月间在本中心因男方因素行 ICSI 治疗的新鲜取卵周期的 445 个临床资料, 排除女方卵巢反应不良、多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症者。

### 1.2 方法

1.2.1 精子形态学检测方法 用生理盐水洗涤精液,  $1\ 500\ \text{r}/\text{min}$  ( $r = 14\ \text{cm}$ ), 离心 5 min, 如此重复两次。第二次洗涤完毕, 倒去上清液, 加入适当生理盐水, 使得液体浓度达到要求 (不超过  $80 \times 10^6/\text{mL}$ ), 涂在洁净的玻璃片上自然风干。把涂有标本的玻璃片依次泡在染液 I、染液 II、染液 III 中, 每个染液的浸泡时间为 5 s, 自然风干。将玻片至于检测平台进行扫描, 总共计数 200 个精子, 经过软件和人工的相关分析, 得出结果。

1.2.2 分组 根据进入 ICSI 周期前的男方精子形态将 445 个新鲜取卵周期分为 3 组: 其中 A 组共 296 个周期, 均为严重少弱精子症患者, 精子形态学正常; B 组共 74 个周期 (精子正常形态率  $\geq 1\%$  且  $< 4\%$ ), 包括单纯畸形精子症患者和少弱精子症合并畸形精子症患者; C 组 75 个周期, 为极度畸形精子 (正常形态  $< 1\%$ )。

1.2.3 ICSI 指征 男方禁欲 3~7 d, 手淫获得精液, 待完全液化混匀后按 WHO5 评估精液质量, 严重少弱精子症 (3 次检查内精液常规至少有 2 次以上符合以下任一标准者): 两次精子浓度  $< 5 \times 10^6/\text{mL}$ ; 少弱畸精症: 精子浓度  $< 15 \times 10^6/\text{mL}$ , 同时前向精子活动率  $< 20\%$ , 或正常形态精子比率  $< 1\%$ ; 弱畸精症: 精子浓度  $> 20 \times 10^6/\text{mL}$ , 前向精子活动率  $< 15\%$ , 和 (或) 正常形态精子比率  $< 0.5\%$ ; 或精液处理后 a + b 级运动活精浓度  $< 1 \times 10^6/\text{mL}$  者行 ICSI。

1.2.4 控制性超排卵和卵子收集 根据女方的年龄, 卵巢功能水平, 基础窦卵泡数选择行 GnRH-a/Gn/hCG 超长方案, GnRH-a/Gn/hCG 长方案, GnRH-a/Gn/hCG 短方案或拮抗剂方案, 当主导卵泡的直径  $\geq 18\ \text{mm}$  肌注 hCG 6 000 IU 或 10 000 IU 触发排卵, 注射后 36 h 左右在 B 超引导下经阴道穿刺取卵, 立即放入培养液培养、处理。选取 M II 成熟卵子, 去除卵母细胞周围的颗粒细胞后, 加入准备好的培养皿中进行 ICSI, 方法参照文献<sup>[9]</sup>。

1.2.5 精子制备 所有男性患者取卵前禁欲 3~7 d, 于取卵日留取精液标本。采用 puresperm 密度梯度离心法处理精液后置于  $37\ ^\circ\text{C}$ 、体积分数  $5\% \text{CO}_2$  培养箱中。

1.2.6 ICSI 精子选择 在倒置显微镜 (日本 Olympus TH4-200)  $\times 400$  倍下观察精子形态。选择顶体完整, 头部形态正常的精子行 ICSI。

1.2.7 ICSI 受精、胚胎培养与胚胎移植 行 ICSI 后 16~18 h 观察卵子受精情况, 受精 16~18 h 观察原核发育, 48 h 或 72 h 观察胚胎发育情况。根据形态学参数, 可将早期胚胎划分为 4 级。I 级: 细胞大小均等, 形状规则, 透明带完整, 胞质均匀清晰, 没有颗粒现象, 碎片少于  $5\%$ ; II 级: 细胞大小略不均匀、形状略不规则, 胞质可有颗粒现象, 碎片占  $10\% \sim 20\%$ ; III 级: 细胞大小明显不均, 可有明显的形状不规则, 胞质可有颗粒现象, 碎片占  $21\% \sim 50\%$ ; IV 级: 细胞大小严重不均匀, 胞质可有严重脱颗粒现象, 碎片占  $50\%$  以上。选择优质胚胎进行移植, 每次移植 1~3 个胚胎, 并同时给予黄体支持。

1.2.8 妊娠结局判断 移植后 2 周测血  $\beta\text{-hCG}$ , 阳性者为生化妊娠, 妊娠者给予黄体酮或 hCG 进行黄体支持, 3 周后 B 超检查, 有孕囊及原始心管搏动即诊断为临床妊娠。流产: 妊娠丢失发生在孕

28周前;异位妊娠:经超声或腹腔镜确诊。如宫内活胎胎数目 $\geq 3$ 个,经阴道行选择性减胎术<sup>[10]</sup>。

### 1.3 统计学方法

所有计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,计数资料以率(%)表示。采用SPSS13.0统计软件进行数据录入和统计学处理。差异比较采用方差分析,率的比较采用 $\chi^2$ 检验,对于例数小于5的采用Fisher精确概率法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。ICSI均由本中心3名工作 $> 3$ 年有经验的人员操作,以排除操作者水平不同带来的偏倚。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

本研究共有445个ICSI周期,女方年龄为( $31.7\pm 4.9$ )岁,男方年龄为( $35.4\pm 6.2$ )岁,不育时间( $4.8\pm 3.1$ )年。其中A组共296个周期,均为严重少弱精子症患者,精子形态学正常;B组共74个周期(精子正常形态率 $\geq 1\%$ 且 $< 4\%$ ),包括单纯畸形精子症患者和少弱精子症合并畸形精子症患者;C组75个周期,为极度畸形精子(正常形态 $< 1\%$ )。各组间患者男,女双方年龄和不孕年限差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。详见表1。

表1 3组患者一般情况

Table 1 Characteristics of the patients in the 3 groups (mean  $\pm$  SD)

	A	B	C
Cycles	296	74	75
Maternal age, years	$31.3\pm 4.8$	$32.3\pm 3.7$	$31.3\pm 4.9$
Paternal age, years	$35.1\pm 6.3$	$36.3\pm 5.4$	$34.2\pm 4.7$
Infertility period, years	$4.6\pm 3.2$	$5.4\pm 3.6$	$4.4\pm 2.7$

Maternal age, paternal age, infertility period are similar in the three groups.

### 2.2 妊娠结局

获卵数A,B组差异有统计学意义( $P = 0.002$ ),成熟卵子数A,B组差异有统计学意义( $P = 0.002$ )。卵子成熟率A组为85.7%(3367/3927),B组为82.7%(645/762),C组为85.9%(773/900),3组无统计学差异( $P > 0.05$ )根据WHO5精子形态学评估标准,畸形精子行ICSI后仍可获得较好的受精率(80.1%~83.0%)。A组在受精率与

B,C组有统计学差异,分别为75.5%,83.0%,80.1%(A组与B组, $P < 0.001$ ;A组与C组 $P < 0.001$ )。各组均有较好的妊娠率,分别为44.9%,41.9%,46.7%。3组的种植率分别为26.2%,22.9%,32.1%。3组的卵裂率(分别为94.2%,95.0%,96.8%)优质胚胎率,胚胎种植率、临床妊娠率、异位妊娠率(分别为1.0%,1.4%,1.3%),流产率(分别为4.7%,4.1%,8.0%)差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

数据显示在极度畸形精子行ICSI后临床结局与其他各组并无统计学差异,相反,极度畸形精子症组有最高优质胚胎率(67.6%),种植率(32.1%)和临床妊娠率(46.7%),详见表2。

优质胚胎定义为D3胚胎卵裂球数 $\geq 7$ 个且 $\leq 9$ 个,细胞碎片 $\leq 20\%$ 。优质胚胎率A,B组与C组均无统计学差异(分别为65.4%,64.8%,67.6%)。多胎妊娠率A组与C组有统计学差异(分别为29.8%,52.9%, $P = 0.01$ )。

## 3 讨论

1992年布鲁塞尔自由大学中心的Palermo等进行了ICSI辅助授精获得成功妊娠,后广泛应用于辅助生殖领域中<sup>[11]</sup>。ICSI是在体外显微镜下将单个精子直接注入成熟卵母细胞胞质内,使精、卵结合的一种显微操作技术。ICSI在全世界经过大量的临床实践,有其自身的特点:①受精率高;②无多精受精;③精子浓度对受精无显著影响。该技术主要应用于男性因素不育,成为男性严重少弱精子症、畸形精子症及阻塞性无精症的有效治疗方法。Kruger等<sup>[2]</sup>首先提出严格的形态学标准分类用来评估精子质量,近年来多采用WHO5评估精子并用于指导辅助生育治疗,因其对形态学的评估标准更为严格,形态正常精子百分率的参考值范围由WHO4的15%下降到WHO5的4%。尽管有研究证实在IUI<sup>[12]</sup>和IVF<sup>[13]</sup>周期中,精子畸形率可影响受精率,但其在ICSI周期中对妊娠结局的预测价值却存在争议。某些患者精子畸形率极高,此类畸形精子症患者的行ICSI后临床结局受到关注。传统观点认为在显微镜下可挑选形态较正常的精子行ICSI,可以获得较好的临床结局。Hotaling等<sup>[14]</sup>研究认为单独的畸形精子症的患者采用部分ICSI或全部ICSI治疗时,不同程度的畸

表 2 3 组畸形精子症患者 ICSI 后妊娠结局的比较

Table 2 ICSI cycle outcomes of the 3 groups

Group	A	B	C
No. of oocytes	13.3 ± 6.4	10.4 ± 6.5 <sup>1)</sup>	12.0 ± 6.2
No. of M II oocytes	11.6 ± 8.0	8.4 ± 5.3 <sup>1)</sup>	10.2 ± 5.8
Oocyte maturation rate	85.7%(3367/3927)	82.7%(645/762)	85.9%(773/900)
Fertilization rate	75.5% <sup>2)</sup> (2543/3367)	81.1%(523/645)	80.1%(619/773)
Cleavage rate	94.2%(2396/2543)	95.0%(497/523)	96.8%(599/619)
High quality embryo rate(D3)	65.4%(1568/2396)	64.8%(322/487)	67.6%(405/599)
No. of embryos Transferred	2.2 ± 0.55	2.4 ± 0.64	2.2 ± 0.55
Implantation rate	26.2%(174/663)	22.9%(41/179)	32.1%(53/165)
Clinical pregnancy rate	44.9%(133/296)	41.9%(31/74)	46.7%(35/75)
Ectopic pregnancy rate	1.0%(3/296)	1.4%(1/74)	1.3%(1/75)
Multiple pregnancy rate	29.8%(39/131)	32.3%(10/31)	52.9% <sup>3)</sup> (18/34)
Miscarriage rate	4.7%(14/296)	4.1%(3/74)	8.0%(6/75)

Oocyte maturation rate, cleavage rate, implantation rate, clinical pregnancy rate, ectopic pregnancy rate and miscarriage rate are similar in the three groups. 1) Group B significantly different from group A ( $P < 0.05$ ); 2) Significantly different from other groups ( $P < 0.05$ ); 3) Significantly different from group A ( $P < 0.05$ )

形精子对妊娠结局无影响。本研究结果显示,在正常精子形态,非极度畸形精子症,极度畸形精子症 3 组之间,卵裂率、优质胚胎率、胚胎种植率、临床妊娠率、异位妊娠率,流产率差异均无统计学意义,相反本研究中极度畸形精子症组有较高的受精率(83.4%),优质胚胎率(67.6%),种植率(32.1%)和临床妊娠率(46.7%),这与 Berger 等<sup>[15]</sup>研究结果相似,他们的研究也发现正常形态率<1%的患者,ICSI 治疗可获得较好的受精率和妊娠率,这些结果均提示在 ICSI 周期中,WHO5 标准精子畸形率对妊娠结局影响较小。可能的解释为在放大 400 倍的显微镜下挑选形态正常的精子行 ICSI,可使卵子正常受精并发育成胚胎,这与整体精液中精子畸形率无明显关系,畸形精子受精失败的主要原因是:①精子与卵子透明带结合,顶体反应和穿透透明带的能力低下或缺陷;②精子其他缺陷(染色体异常,精子因子缺陷,与卵浆膜不能融合等)。精子形态学与精子功能,精子 DNA 损伤,染色体完整性相关性的大小可预测精子畸形率对 ICSI 后临床结局的评估价值。有研究数据显示畸形精子并不导致染色体异常<sup>[16]</sup>。畸形精子影响体外受精的机制尚未完全明了,目前多数学者认为畸形精子由于缺乏顶体和顶体酶,无法穿透卵子透明带,从而缺乏自然受精的能力导致男性不育<sup>[17]</sup>,故对极度畸形精子行 ICSI 时,优先选择

头部形态相对正常的精子,可获得较理想的临床结局。精子 DNA 碎片可能影响胚胎发育和囊胚形成<sup>[18]</sup>,但目前的研究没有证实精子畸形率与精子 DNA 碎片的关系<sup>[19]</sup>。Demir<sup>[6]</sup>,Fan 等<sup>[20]</sup>研究显示,根据 WHO5 标准,精子畸形率行 ICSI 治疗后不影响胚胎质量。本研究也同样显示,3 组均有较好的优质胚胎率。且在极度畸形精子症组,优质胚胎率最高。然而 ICSI 虽然克服了精子形态缺陷导致的受精失败,使精、卵人为地“结合”到了一起,但其过程可能导致印迹基因的损伤<sup>[21]</sup>,使父源或者母源基因过度表达或微缺失,从而引起例如 Angelman 综合征等印迹基因缺失疾病。

夫妇双方的年龄,不孕年限可影响受精率和胚胎质量。故本研究对 3 组的一般情况(女方年龄,男方年龄,不孕年限)进行比较,3 组的差异无统计学意义。非极度畸形精子症组获卵数与成熟卵子数与精子形态正常组相比较少,因 3 组女方年龄无统计学差异,故对卵子质量的影响较小,且 3 组卵子成熟度无统计学差异,行 ICSI 后卵子数目并不影响受精率,卵裂率,优质胚胎率,种植率,妊娠率等临床结局,但仍需要扩大样本量行进一步的研究。

总之,ICSI 可用于畸形精子症的治疗,精子正常形态率与 ICSI 妊娠结局无必然联系,即使极度畸形精子症患者(正常形态率<1%)也可以通过

ICSI获得理想的临床结局。然而目前 ICSI 技术诞生子代的健康状况与自然妊娠子代是否有明显差异,尤其是畸形精子行 ICSI 后出生子代的安全性,仍需进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Simon L, Wilcox A, Carrell DT. Intracytoplasmic morphology-selected sperm injection [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 92(7): 247-256.
- [2] Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization[J]. *Fertil Steril*, 1986, 46(6): 1118-1123.
- [3] World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen [M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010, 100.
- [4] Lee RK, Hou JW, Ho HY, et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination [J]. *Int J Androl*, 2002, 25(5): 277-280.
- [5] Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, et al. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(5): 495-500.
- [6] Demir B, Arikan II, Bozdogan G, et al. Effect of sperm morphology on clinical outcome parameters in ICSI cycles [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2012, 39(2): 144-146.
- [7] French DB, Sabanegh EJ, Goldfarb J, et al. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4): 1097-1103.
- [8] McKenzie LJ, Kovanci E, Amato P, et al. Pregnancy outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with profound teratospermia [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(4): 847-849.
- [9] 欧建平,庄广伦,周灿权,等. 反复附睾或睾丸取精的无精子症病人妊娠结局[J]. *中华男科学*, 2003(7): 524-526.  
OU JP, Zhuang GL, Zhou CQ, et al. Outcome of repeated epididymal sperm aspiration or testicular sperm extraction in azoospermic patients [J]. *Nat J Andrology*, 2003(7): 524-526.
- [10] 欧建平,赵伟娥,徐艳文,等. 辅助生育治疗后多胎妊娠减胎术 67 例临床分析 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31(5): 672-675.  
OU JP, Zhao WE, Xu YW, et al. Analysis of clinical outcomes of transvaginal ultrasound-guided multifetal pregnancy reduction in 67 cases after assisted reproduction [J]. *J Sun Yat-Sen Uni (Med Sci)*, 2010, 31(5): 672-675.
- [11] 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.
- [12] Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(3): 777-781.
- [13] Guérif F. Which assisted reproduction technique as a function of sperm morphology [J]? *Gynecol Obstet Fertil*, 2010, 38(9): 508-510.
- [14] Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, et al. The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1141-1145.
- [15] Berger DS, Abdelhafez F, Russell H, et al. Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology, embryonic cleavage and compaction [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9(8): 37-45.
- [16] Viville S, Mollard R, Bach ML, et al. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? Case report [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(12): 2563-2566.
- [17] Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(2): 371-383.
- [18] Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(2): 378-383.
- [19] Trisini AT, Singh NP, Duty SM, et al. Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(6): 1623-1632.
- [20] Fan W, Li SW, Li L, Huang Z, et al. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in the case of isolated teratozoospermia [J]. *Assist Reprod Genet*, 2012, 29(9): 905-910.
- [21] Kurinczuk JJ. Safety issues in assisted reproduction technology. From theory to reality—just what are the data telling us about ICSI offspring health and future fertility and should we be concerned? [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(9): 925-931.