

不同受精方式及精子来源对剩余胚胎发育能力的影响*

李楠,唐永梅,梁明明,韦立红,唐妮,韦继红[△]

(广西壮族自治区柳州市妇幼保健院生殖健康助孕中心 545001)

[摘要] **目的** 探讨不同受精方式及 ICSI 中不同来源精子对胚胎继续发育能力的影响。**方法** 本研究回顾性分析该中心 2013 年 1 月至 2013 年 12 月 2 697 例患者剩余胚胎的囊胚率,按不同受精方式分为体外受精(IVF)胚胎组和显微受精(ICSI)胚胎组,其中 ICSI 胚胎组又根据精子来源不同再分为精液精子组胚胎和附睾精子组,序贯培养后比较不同受精方式及不同来源精子对剩余胚胎的囊胚形成率及优质囊胚率的影响。**结果** 2 697 例患者共培养胚胎 8 426 枚,其中 IVF 组 7 048 枚囊胚形成率 53.18%,ICSI 组 1 378 枚囊胚形成率 49.27%,IVF 组囊胚形成率和优质囊胚率之间差异无统计学意义($P>0.05$)。同时与常规 IVF 组相比补救受精组剩余胚胎的囊胚率差异无统计学意义($P>0.05$)。常规 ICSI 组与 PESA 组的剩余胚胎囊胚形成率和优质囊胚率之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 不同受精方式及 ICSI 精子来源的囊胚率之间差异不明显。

[关键词] 受精,体外;精子注射,细胞质内;精子;精液;存活率;胚胎发育

[中图分类号] R714.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)03-0366-03

Effects of fertilization methods and sperm sources on the developmental capacity of surplus embryos*

Li Nan, Tang Yongmei, Liang Mingming, Wei Lihong, Tang Ni, Wei Jihong[△]

(Department of Reproductive Medicine Center, Maternal and Child Health Care Hospital of Liuzhou City, Liuzhou, Guangxi Zhuang Autonomous Region 545001, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the effects of fertilization methods and sperm sources in intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) on the developmental capacity of surplus embryos. **Methods** A retrospective study was carried out to compare the blastocyst rate of the surplus embryos from 2 697 patients. According to the fertilization methods, the embryos were divided into IVF group and ICSI group. According to sperm sources, the ICSI group was divided into ejaculated group and testicular sperm group. The rates of blastocyst formation and good quality blastocysts were compared between different fertilization methods and sperm sources. **Results** There were 8 426 embryo developed in 2 697 patients. The blastocyst formation rate of surplus embryos was higher in the IVF group ($n=1 048, 53.18\%$) than that in the ICSI group ($n=1 378, 49.27\%$), but with no statistically significant different ($P>0.05$). The rates of blastocyst were not statistically significant different between the IVF group and in the rescue ICSI group ($P>0.05$). The rates of blastocyst were not statistically significant different between the ejaculated group and the testicular sperm group ($P>0.05$). **Conclusion** There were not statistically significant different of the rate of blastocyst between different fertilization methods and sperm sources in ICSI.

[Key words] fertilization in vitro; sperm injections, intracytoplasmic; spermatozoa; semen; survival rate; embryonic development

自 1978 年世界首例体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)成功以来,人类辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)得到了迅速地发展。1992 年,Palermo 首次利用显微受精(ICSI)治疗了严重男性因素的不育,获得妊娠。随后与经外科皮质附睾精子抽吸术(percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA)相结合,ICSI 被广泛应用于阻塞性和非阻塞性无精子等男性不育。因此,受精方式及精子来源对 ART 胚胎质量的影响开始受到研究人员的关注^[1-2]。一个辅助生殖周期通常会在胚胎移植和冷冻后仍有部分剩余胚胎,而囊胚培养具有可提供发育潜能较好的胚胎供移植,在囊胚培养过程中部分携带异常基因的胚胎进行自我修复,为移植前基因诊断(PGD)提供材料等优点。囊胚移植缩短了胚胎继续发育与种植的时间,更加符合自然的生理现象,同时单囊胚移植还可以进一步降低多胎率。对优质囊胚

行冷冻还可提高胚胎的利用率。随着体外受精(IVC)技术的发展,囊胚培养已经成为一种常规的胚胎培养技术。本研究主要探讨体外受精(IVF)与 ICSI 两种受精方式及 ICSI 中不同来源的精子(精液精子及附睾精子)对囊胚形成率的影响,为临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究回顾分析 2013 年 1 月至 2013 年 12 月在本中心行辅助生殖治疗的患者共 2 697 对夫妇,纳入患者需要在第 3 天(D3)移植后仍有新鲜胚胎行囊胚培养。本研究仅选取患者问题为男方因素、女方盆腔或输卵管因素,各组之间女方年龄、不孕年限、应用促性腺激素天数差异均无统计学意义($P>0.05$)。患者在 D3 新鲜移植后仍有胚胎行囊胚培养,所选择胚胎排除多原核(PN)胚胎(3 个原核及以上)、发育停滞及不分裂、碎裂等异常卵裂胚胎。本中心所有患者均签署

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2015GXNSFBA139177);广西卫生厅自筹经费科研项目(Z2015180、Z2201045);柳州市科学研究与技术开发计划资助课题(2015J030515)。 作者简介:李楠(1984—),助理研究员,博士,主要从事胚胎工程研究。 [△] 通讯作者, E-mail: wjh1121@126.com。

配子及胚胎去向知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的采集与受精 本中心常规促排卵方案,所有周期均从月经第 8 天起每天 B 超监测卵泡大小,至少 3 个主导卵泡直径大于或等于 18 mm 时,注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)5 000~10 000 U,34~36 h 后 B 超介导下取卵。

男方采用手淫法取精液于无菌无毒容器,在培养箱中液化后用 Isolate 密度梯度离心法(Irvine,美国)处理。IVF 患者采用加精法授精,浓度 1.5×10^6 个/mL。注射 HCG 后 39 h 后,根据临床指征进行常规 IVF/ICSI。除患者特殊要求外,本中心所有周期均行短时受精,卵子置于 IVF 液中培养 5 h,通过观察第二极体的形成判断是否受精,受精后 16~20 h 后对受精胚胎进行评分。

ICSI 患者的卵丘-卵母细胞经培养液洗涤数遍清除血清等杂质,置于 IVF 序贯培养液中预培养 3 h,用 80 U 透明质酸酶(Sigma,美国)去除卵母细胞周围的颗粒细胞,选择有第一极体的卵细胞注射活动的精子进行显微受精。在 200~400 的放大倍数下挑选形态相对正常精子,常规精子制动后行 ICSI 术。将 IVF/ICSI 受精卵去除颗粒细胞后放入覆盖矿物油的 G1 培养液滴,每 24 小时观察胚胎发育情况,于 D3 观察胚胎形态并选取优质胚胎移植。

1.2.2 PESA 对严重少弱精或者射精障碍患者行 PESA,此法可进行局部麻醉,用拇指和食指固定附睾,将接有注射器的针头插入附睾头部或体部,轻轻按摩附睾头部并抽吸直至有液体进入针管,吹打于培养液中并冲净针头。显微镜检查精子及其活动力后,离心备用。

1.2.3 胚胎评分及筛选 受精后每 24 小时观察胚胎发育情况,受精 D3 观察胚胎形态并选取选择优质胚胎进行移植和冷冻。于 D3 胚胎评估方法及标准:将胚胎培养皿置于莱卡(Leica,德国)倒置显微镜下观测胚胎发育情况。根据胚胎的形态及碎片所占比例来判断胚胎的级别,详述评分系统如下。I 级胚胎:胚胎卵裂球等大,形态规则,胞质均匀清晰,碎片无或少于 10%; II 级胚胎:胚胎卵裂球不均,形态欠规则,碎片

10%~<26%; III 级胚胎:胚胎卵裂球大小不均,形态欠规则,碎片 26%~50%; IV 级胚胎:胚胎卵裂球大小严重不均,碎片大于 50%。

1.2.4 囊胚培养及评分 将受精后 D3 剩余胚胎转移到囊胚培养液 G2 微滴中培养至 D5~7,观察囊胚形成情况。根据 Gardner 囊胚分级法对囊胚进行评分。根据囊胚扩张和孵出程度将囊胚分成 1~6 级。1 级:早期囊胚,囊胚腔体积小于囊胚总体积的一半; 2 级:囊胚腔体积大于囊胚总体积的一半; 3 级:完全扩张囊胚,囊胚腔占据整个囊胚; 4 级:扩张后囊胚,囊胚腔体积较早期囊胚明显扩大,透明带变薄; 5 级:正在孵出囊胚,囊胚正在从透明带破裂口孵出; 6 级:孵出囊胚,囊胚完全从透明带中脱出。3~6 级囊胚对内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养层(trophectoderm, TE)进行评分。ICM 评分:A 级,细胞数目多,结合紧密; B 级,细胞数目较少,结合较松散; C 级,细胞数目极少。TE 评分:A 级,细胞数目多,囊胚四周均有细胞分布; B 级,细胞数目较少,上皮细胞较松散; C 级,细胞数目极少。将 D5 评分为 3AA、3AB、3BA、3BB 或 D6 评分为 4AA、4AB、4BA、4BB 的囊胚定为优质囊胚。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件,计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IVF 和 ICSI 胚胎囊胚形成情况的比较 2 697 例患者共获得剩余胚胎 8 426 枚,其中 IVF 组 7 048 枚,囊胚形成率 53.18%。ICSI 组 1378 枚,囊胚形成率 49.27%。IVF 组囊胚形成率和优质囊胚率虽高于 ICSI 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 常规 IVF 组中常规受精及补救受精胚胎囊胚形成情况的比较 与常规 IVF 组相比,补救受精组剩余胚胎的囊胚形成率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 不同来源精子 ICSI 后囊胚形成情况的比较 常规 ICSI 组与 PESA 组之间剩余胚胎囊胚形成率和优质囊胚率之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 1 IVF 组与 ICSI 组囊胚形成情况的比较

组别	胚胎数 (n)	D3 可利用胚胎数 [n(%)]	D3 优胚数 [n(%)]	囊胚培养数 (n)	囊胚形成数 [n(%)]	优质囊胚数 [n(%)]
IVF 组	13 284	11 796(88.80)	6 349(47.79)	7 048	3 748(53.18)	914(24.39)
T-ICSI 组	2 724	2 361(87.67)	1 251(45.93)	1 378	679(49.27)	152(22.39)

优质囊胚率=优质囊胚数/囊胚数;囊胚形成率=囊胚数/囊胚培养数。

表 2 常规 IVF 组中常规受精及补救受精胚胎囊胚形成情况的比较

组别	胚胎数 (n)	D3 可利用胚胎数 [n(%)]	D3 优胚数 [n(%)]	囊胚培养数 (n)	囊胚形成数 [n(%)]	优质囊胚数 [n(%)]
IVF 组	12 624	11 220(88.88)	6 092(48.26)	6 702	3 581(53.43)	889(24.83)
R-ICSI 组	660	576(87.27)	267(40.45)	346	167(48.27)	34(20.36)

表 3 精液精子和 PESA 精组剩余胚胎的囊胚率

组别	胚胎数 (n)	D3 可利用胚胎数 [n(%)]	D3 优胚数 [n(%)]	囊胚培养数 (n)	囊胚形成数 [n(%)]	优质囊胚数 [n(%)]
T-ICSI 组	1 889	1 663(88.04)	881(46.64)	923	434(47.02)	95(21.89)
PESA 组	686	588(85.71)	296(43.15)	344	165(47.97)	31(18.79)

3 讨 论

近年来,囊胚培养与囊胚移植已经成为 ART 新的研究热点。临床数据显示囊胚移植可以显著地提高胚胎种植率及妊娠率,且降低多胎率^[3-4]。胚胎继续发育能力与胚胎质量有着密切的关系,多种因素如受精方式、胚胎培养系统、卵子质量、精子因素等均影响剩余胚胎继续发育能力。

本研究采用 G1-G2 序贯培养法,探讨不同的受精方式及精子来源对囊胚形成率的影响。结果显示,IVF 组囊胚形成率和优质囊胚率高于 ICSI 组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究结果与 van Landuyt 等^[2]在 2005 年的研究结果相似,IVF 组囊胚形成率略高于 ICSI 组,差异无统计学意义($P>0.05$)。但也有相反的结果,1998 年 Shoukir 结果显示 IVF 组囊胚形成率显著高于 ICSI 组。2000 年, Dumoulin 等^[1]也得到了相似的结论。其原因可能是在 ICSI 的操作过程中经历了如用透明质酸酶去除颗粒细胞、卵膜穿刺,在 ICSI 过程中带入 PVP 或培养液、精子的顶体等在 IVF 过程中所没有的杂质,这些物质均影响胚胎的发育;还有可能是由于早期补救卵子的质量问题。ICSI 囊胚率低于 IVF 的原因也可能来自精子,在 IVF 过程中卵子会对精子进一步筛选,能够与卵子相结合的精子,其活力、DNA 完整性要明显优于那些没有穿过透明带的精子。而在 ICSI 过程中仅对精子活力进行判断,无法保证每一个精子的 DNA 完整性,将有缺陷的精子注入卵细胞内,降低了胚胎的发育能力。重度精子畸形还影响 ART 的结局,增加复发性流产和 ICSI 后代患遗传病的风险。

ICSI 是针对男性生育力低下而出现的新一代辅助生育技术,其精子来源分为射出精子和睾丸、附睾穿刺精子,射出精子在数量、活动力和核成熟度等方面均高于睾丸/附睾穿刺的精子。本研究还探讨了不同来源的精子囊胚形成率的影响,结果显示,常规 ICSI 组囊胚形成情况与 PESA 组相似($P>0.05$),常规 ICSI 组优质囊胚率高于 PESA 组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。2006 年, Buffat 等^[5]研究结果显示睾丸/附睾精子组的可用胚胎数要低于常规精子 ICSI 组。同年 Dozortsev 等^[6]也得到相似的试验结果,与本研究结果相同。2011 年 Tsai 等^[7]研究表明不同来源的精子行 ICSI 受精,其受精率、卵裂率、胚胎质量等无显著差异。Greco 等^[8]比较睾丸精子与精液中精子行 ICSI 发现,在受精、卵裂、胚胎质量等方面没有差异。Verza 等^[9]在 2008 年的研究结果显示,附睾精子组与射出精子组 ICSI 后优胚率之间差异无统计学意义($P>0.05$)。Nicolopoulos 等^[10]通过 Meta 分析发现射出精子与 PESA 和 TESA 获得精子 ICSI 后,射出精子组的受精率、卵裂率、优质胚胎率等高于 PESA 组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。其原因可能是由于睾丸穿刺来源的精子成熟度低,进而造成胚胎发育能力下降,畸形精子的中心体功能低下是会引起胚胎卵裂障碍或胚胎染色体嵌合,当精子 DNA 碎片、染色体非整倍体性越高时其精子活力和正常形态正常率越低,同时还伴有基因印记的改变^[11]。随着 ART 技术的进展,ICSI 也可得到更为满意的临床结局。本研究结果显示 IVF 组胚胎的发育能力与 ICSI 组相比差异无统计学意义($P>0.05$),可获得相近的临床效果。但是,目前 ICSI 过程中对卵子的损伤、人为挑选的精子及对子代造成不良影响等问题的不确定性已开始受到关注,有研究显示 ICSI 后出生的婴儿存在较高出生缺陷率^[12]。

综上所述,ART 中心对于要严格 ICSI 指征,如原发不孕且不孕年限大于或等于 5 年、年龄大于或等于 40 岁、配偶间人工授精大于或等于 3 次的不孕患者。不提倡为完全受精

失败,而对所有不明原因不孕患者均行 ICSI。临床工作中为了避免受精完全失败,若患者获卵数大于 10 个,可行一半 IVF、一半 ICSI,胚胎移植时优先选择 IVF 受精的胚胎。同时还可以在行短时受精后拆蛋,将短时受精结合补救性 ICSI 术相结合,避免受精失败。还可对配子的质量、是否存在精卵结合障碍等进行评估,为下个周期选择正确的受精方式提供参考。对上周期行 IVF 受精率 30% 的患者,在下周期时选择行 ICSI 受精。这样可以在保证受精率的同时适当地减少 ICSI 的使用,利于降低出生缺陷,提高出生胎儿的安全性。

参考文献

- [1] Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, et al. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 2000, 15(2): 402-409.
- [2] van Landuyt L, De Vos A, Joris H, et al. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure[J]. Fertil Steril, 2005, 83(5): 1397-1403.
- [3] Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, et al. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos[J]. N Engl J Med, 2006, 354(11): 1139-1146.
- [4] della Ragione T, Verheyen G, Papanikolaou EG, et al. Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2007(5): 2-5.
- [5] Buffat C, Patrat C, Merlet F, et al. ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction[J]. Hum Reprod, 2006, 21(4): 1018-1024.
- [6] Dozortsev D, Neme R, Diamond MP, et al. Embryos generated using testicular spermatozoa have higher developmental potential than those obtained using epididymal spermatozoa in men with obstructive azoospermia[J]. Fertil Steril, 2006, 86(3): 606-611.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Verza SJr, Esteves SC. Sperm defect severity rather than sperm source is associated with lower fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection[J]. Int Braz J Urol, 2008, 34(1): 49-56.
- [10] Nicolopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, et al. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis [J]. Fertil Steril, 2004, 82(3): 691-701. (下转第 371 页)

者中有出血表现者, TEG 多项指标均较无出血者差异有统计学意义($P < 0.05$)。且当 $PLT < 30 \times 10^9$ 个/L 时, 通过比较急性白血病患者 TEG 指标(K 值、 α 角、MA 值)来评估患者出血风险, 具有更好的临床实用价值。其中 MA 值在诊断急性白血病患者出血方面具有较高的诊断价值(ROC 曲线下面积大于 0.7)。

综上所述, TEG 在评价急性白血病患者出血风险应用上, 多参数综合分析更能全面评估患者出血风险, 具有较好的临床实用性。当然, 该项研究由于数据来源受到不同工作人员临床观察记录详细情况, 临床检测有误差, PLT 与 TEG 检测有一定时间差等多因素的影响, 可能存在一定的局限性。

参考文献

- [1] Wozniak D, Adamik B. Thromboelastography[J]. Anestezjol Intens Ter, 2011, 43(4): 244-247.
- [2] Whiting D, Dinardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications[J]. Am J Hematol, 2014, 89(2): 228-232.
- [3] 周薇, 李幼生. 血栓弹力图的临床应用及进展[J]. 肠外与肠内营养, 2011, 18(5): 314-316, 318.
- [4] Tanaka KA, Bader SO, Sturgil EL. Diagnosis of perioperative coagulopathy—plasma versus whole blood testing[J]. Cardiothorac Vasc Anesth, 2013, 27(4 Suppl): S9-15.
- [5] Apelseth TO, Bruserud O, Wentzel-Larsen T, et al. Therapeutic efficacy of platelet transfusion in patients with acute leukemia; an evaluation of methods[J]. Transfusion, 2010, 50(4): 766-775.
- [6] Afshari A, Wikkelsø A, Brok J, et al. Thrombelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemotherapy versus usual care in patients with massive transfusion[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011(3): CD007871.
- [7] Johansson PI, Stissing T, Bochsén L, et al. Thrombelastography and thromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma[J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2009(17): 45.
- [8] Brazzel C. Thromboelastography-guided transfusion Therapy in the trauma patient[J]. AANA J, 2013, 81(2): 127-132.
- [9] Walsh M, Thomas SG, Howard JC, et al. Blood component therapy in trauma guided with the utilization of the perfusionist and thromboelastography[J]. J Extra Corpor Technol, 2011, 43(3): 162-167.
- [10] Sharma P, Saxena R. A novel thromboelastographic score to identify overt disseminated intravascular coagulation resulting in a hypocoagulable state[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(1): 97-102.
- [11] Kornblith LZ, Kutcher ME, Redick BJ, et al. Fibrinogen and platelet contributions to clot formation: implications for trauma resuscitation and thromboprophylaxis[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2014, 76(2): 255-256.
- [12] Schlimp CJ, Solomon C, Ranucci M, et al. The effectiveness of different functional fibrinogen polymerization assays in eliminating platelet contribution to clot strength in thromboelastometry[J]. Anesth Analg, 2014, 118(2): 269-276.
- [13] Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Current options in platelet function testing [J]. Am J Cardiol, 2006, 98(10A): 4N-10N.
- [14] Song JG, Jeong SM, Jun IG, et al. Five-minute parameter of thromboelastometry is sufficient to detect thrombocytopenia and hypofibrinogenaemia in patients undergoing liver transplantation[J]. Br J Anaesth, 2014, 112(2): 290-297.
- [15] Stravitz RT. Potential applications of thromboelastography in patients with acute and chronic liver disease[J]. Gastroenterol Hepatol (NY), 2012, 8(8): 513-520.
- [16] 孙李建. 血栓弹力图在肝病患者中的应用研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2013.
- [17] Zheng Q, Fu S, Chen D, et al. Predicting hemorrhage and obstruction in the elderly population using thromboelastographic indices [J]. Clin Interv Aging, 2013(8): 1405-1412.
- [18] Theusinger OM, Schröder CM, Eismón J, et al. The influence of laboratory coagulation tests and clotting factor levels on Rotation Thromboelastometry (ROTEM(R)) during major surgery with hemorrhage [J]. Anesth Analg, 2013, 117(2): 314-321.
- [19] 邓建川, 周慷, 罗云, 等. 高白细胞白血病患者血栓弹力图检测的临床意义[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(1): 5-6.
- [20] 王玉婷, 李艳, 郝一文, 等. 急性早幼粒细胞白血病患者血栓弹力图检测的临床意义[J]. 血栓与止血学, 2012, 18(6): 264-267.

(收稿日期: 2015-08-18 修回日期: 2015-10-26)

(上接第 368 页)

- [11] Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study [J]. Fertil Steril, 2008, 90(5): 1792-1799.
- [12] Hansen M, Bower C, Milne E, et al. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review[J]. Hum Reprod, 2005, 20(2): 328-338.

(收稿日期: 2015-08-12 修回日期: 2015-10-18)