

人类睾丸组织冻融及其应用研究进展

薛凯 刘睿智

(吉林大学基础医学院细胞生物学教研室, 吉林省生殖医学研究所, 长春, 130021)

【摘要】 睾丸组织冷冻有望成为辅助生殖领域的一项新技术。以恰当的方法取得适量的睾丸组织, 经过必要的冷冻前准备, 加入恰当的冷冻保护剂, 通过一定的冷冻及复苏程序及必要的睾丸组织培养和生殖细胞提取, 结合临床辅助生殖技术, 为保障成人和青春期前癌症、隐睾及非阻塞性无精症等患者的生育能力提供了一条有效途径。虽然目前睾丸组织冻融技术还不成熟, 但其优势和可行性表明其具有广阔的应用前景。

关键词: 睾丸组织; 冷冻技术; 不育

中图分类号: R699 文献标识码: A 文章编号: 0253-357X(2008)02-0108-005

在精子冻融技术广泛应用于辅助生殖领域的同时, 睾丸组织冻融正逐渐显出其优势和必要性。癌症放、化疗可能会影响精子形成过程^[1], 大部分癌症患者化疗后2-3个月会发展为无精症^[2]。由于一些癌症本身会影响生殖细胞成熟和分化, 在放、化疗前冷冻精子也只能得到很低的受孕率^[3]。此外, 隐睾患儿正常精子形成过程可能会受到影响^[4]; 绝大多数青春期前男性还不能射精, 冷冻精子并不现实。当然, 对于能得到一定质量精液的患者来说, 冷冻精子仍是首选方案^[5]。冻融睾丸组织并进行体外培养完成精子形成过程, 或进行睾丸精子提取(TESE), 结合ICSI技术, 为不育患者提供了新的治疗途径。

1 睾丸组织冻融

1.1 取材

睾丸组织样本可通过穿刺或外科手术取得。一般认为睾丸穿刺取样次数最好不超过3次, 但对

于发育不全、成熟停滞及唯支持细胞综合征等患者, 若活检次数过少, TESE时得不到足够的配子, 则需进行多次活检取样^[6]。非阻塞性无精症患者睾丸中具有生精功能的组织分散于睾丸中, 约30%-50%非阻塞性无精症患者睾丸组织中提取不到精子^[7], 因此也应进行多次穿刺。青春期前男性性腺组织没有进入快速增殖期, 组织取样可能会影响性腺正常发育^[7], 所取睾丸组织应尽量小, 次数应尽量少。Kvist等认为0.5-1.0 mm³大小睾丸组织能较好地抵抗深低温冷冻损伤, 较为适宜^[4]。在对不育、隐睾或癌症等患者取睾丸组织常规活检时, 剩余组织可用于冷冻。

1.2 冷冻前准备

1.2.1 组织病理学检查和培养 取得睾丸组织后, 组织病理学检查是非常必要的, 因为睾丸组织病理状况和能否从中得到配子有直接相关性^[6]。冷冻前最好先对睾丸组织进行培养, 以增加活动精子数量及提高复苏率^[8]。

1.2.2 细胞悬液制备和睾丸精子筛选 进行睾丸组织细胞悬液冷冻时, 可将睾丸组织先放入含胶原酶、透明质酸酶、胰蛋白酶和DNase I的PBS溶液中, 使其充分分离^[9], 制备成细胞悬液。用于

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(20060724)

通讯作者: 刘睿智; Tel: +86-431-88883399;

E-mail: lrz420@126.com

冷冻的睾丸精子，通常依据活力和形态进行筛选。当无精症患者睾丸组织中无活动精子时，可改用其它筛选方法，如：筛选时加入己酮可可碱、机械刺激、激光触诊技术、改良低渗膨胀(modified hypo-osmotic swelling MHOS)试验等来筛选不活动的活精子^[10]。

冷冻睾丸组织和睾丸细胞悬液各有利弊。若睾丸组织中含受损细胞或癌细胞，可能影响生殖细胞存活率或移植时引入癌细胞，这时冷冻睾丸细胞悬液效果更好^[11]，但会增加所需样本量，且酶解处理会影响细胞存活率、机械分离会破坏细胞间连接而加重细胞缺氧，冷冻睾丸组织则能避免这些负面影响^[12]。

1.3 冷冻保护剂

睾丸组织冷冻中所用冷冻保护剂可分为渗透性保护剂和非渗透性保护剂，其中常用渗透性保护剂有：1,2-丙二醇、乙二醇、甘油和二甲亚砜(DMSO)^[13]。1,2-丙二醇渗透性强且毒性较DMSO低；乙二醇可快速进入细胞内置换细胞内水分而减少渗透应激^[14]；甘油及卵黄广泛应用于精液和睾丸细胞悬液冷冻^[12]，对精子有很好的保护作用。DMSO分子量小，有较强组织穿透性，对睾丸组织等固体组织及细胞悬液能起到较好的保护作用^[15,16]。非渗透性保护剂中最常用的是蔗糖，其保护机制目前还不明确。

Keros等比较DMSO、1,2-丙二醇和甘油对睾丸组织的保护效果，结果显示DMSO保护作用最好。1,2-丙二醇曾用来保存卵巢组织，对睾丸组织保护效果并不理想；甘油对睾丸组织保护效果最差^[12]。用甘油作冷冻保护剂时，生精小管基底部、细胞间连接及睾丸基质受损严重，大部分精原细胞从基底膜脱离^[12]。

渗透性冷冻保护剂和非渗透性冷冻保护剂联合应用可提高保护效果。Izadyar等用含10%DMSO、10%胎牛血清(FCS)和0.07 mol/L蔗糖的MEM培养液为冷冻保护剂，结合非温控冷冻方案冻存牛精原细胞，解冻后得到70%活细胞^[17]。

冷冻保护剂浓度也会影响冷冻效果。Jahnukainen等将冻融的恒河猴睾丸组织移植到免疫力低下的裸鼠背部皮下，观察到1.4 mol/L(10%)的DMSO能较好地保护睾丸组织，并能启动精子形成过程，而0.7 mol/L(5%)DMSO保护作用则较差^[13]。

文献表明，以DMSO作为睾丸组织冷冻保护

剂具有较好的应用前景，而且10%DMSO较其它浓度可能更为适宜。

1.4 冷冻及复苏

Keros等采用程序降温法得到了较好的睾丸组织冷冻效果^[18]，具体方法如下：从4℃起始，以-1℃/min的速度降至0℃，保持5 min；继以-0.5℃/min的速度降至-8℃，保持15 min；再以-0.5℃/min的速度降至-40℃，保持10 min；最后以-7℃/min的速度降至-80℃，然后放入液氮中。复苏时多采取37℃水浴冻融，然后洗涤。

Jahnukainen等认为，睾丸组织深低温保存中程序降温不像冷冻保护剂那样直接影响睾丸组织存活率，在没有程序降温条件情况下也可进行睾丸组织冻存^[13]。而Brook等研究表明，冷冻保护剂对人类睾丸组织影响较小，主要影响因素是冷冻速度^[19]。慢速降温能更好地使细胞脱水，避免细胞内形成冰晶，但会增加细胞内外溶液浓度，使细胞膜高度皱缩。降温速度过快将加重精原细胞损伤^[18]，当降温速度0.4℃/min时，睾丸组织中细胞死亡数将会增加^[19]。

动物实验表明，浅低温(-4℃)比深低温(液氮)保存时睾丸组织存活率和精子形成发生率高，且浅低温保存对精原干细胞有较好的保护作用^[13]。冷冻时间长短对睾丸组织没有明显影响^[4]。Frederickx等研究表明，降温至-40℃时放入液氮中比降温至-80℃时细胞存活率更高^[11]。

复苏过程中影响细胞存活的因素有：冰晶再形成和渗透性休克。此外，解冻后睾丸组织培养也很重要，因为大部分活精子在解冻后1-2 h内可恢复活力^[20]。

1.5 睾丸组织冻融结果评价

睾丸组织冷冻最终目的是要保持睾丸组织中生殖细胞、支持细胞和间质细胞的活性。Sofikitis等指出，支持细胞是生精小管中唯一的体细胞，具有重要功能，主要体现在其分泌多种生物活性物质及与生殖细胞直接接触^[21]。支持细胞分泌多种糖蛋白，在维持精原细胞活力和促进生殖细胞减数分裂中起重要作用。在支持细胞基底部表达的膜结合干细胞因子与在相应精原细胞表面表达的c-kit为配体和受体关系，当它们的结合被阻断时，精原细胞和精母细胞凋亡数将会增加。阻塞性无精症患者睾丸组织体外培养能增加活动精子数量，也可能源于支持细胞和生殖细胞间相互作用^[8]。睾丸间质细胞

分泌睾酮,其浓度过低时会导致生殖细胞凋亡^[22]。除冷冻因素外,睾丸组织体外操作可直接造成生殖细胞功能紊乱^[18]。睾丸组织本身的性质也会影响冷冻结果, Brook 等观察到,啮齿类睾丸组织比人类睾丸组织冷冻后细胞存活率高^[23]。睾丸组织冷冻结果可通过对其长期培养来检测,在培养过程中损伤细胞逐渐被分解,存活细胞则是未损伤或损伤较轻的细胞^[18]。

睾丸组织冻融结果主要从光镜、电镜、免疫组化和激素水平 4 个方面进行评价。具体参考指标为:以精原细胞从基底膜、支持细胞和精母细胞脱离的百分数作为评价生精小管冻存损伤指标^[12];以抑制素 B 和睾酮水平作为支持细胞和间质细胞功能检测指标^[4];以 MAGE-A4、波形蛋白染色和抗 CD34 抗体是否阳性来检测精原细胞、支持细胞和睾丸基质冷冻损伤^[18]。

1.6 解冻后睾丸组织培养和生殖细胞提取

1.6.1 睾丸组织培养 睾丸组织体外培养旨在保持和增强睾丸组织细胞活性、完成未成熟睾丸组织体外精子形成过程。在 FSH 和睾酮存在条件下,支持细胞能促进生殖细胞分化。无支持细胞的体外培养不能诱导精细胞成熟^[21]。高浓度 FSH 是体外培养睾丸组织必需条件,FSH 可促进精子形成过程早期事件的发生,如精原细胞增殖和减数分裂^[24],并能促进生殖细胞增殖,但它不能增加生殖细胞活力^[25],而且对未成熟睾丸组织,FSH 不能引起精原细胞明显的形态变化^[21]。睾酮可增强 FSH 的作用,可能源于其防止支持细胞凋亡的作用^[21]。

在饲养板上培养睾丸组织细胞,借助于饲养细胞与生殖细胞直接接触或饲养细胞释放一些生长因子或细胞因子而优化培养过程。在由 STO 细胞组成的饲养细胞上培养睾丸组织细胞,能增加精原细胞数量。由 Vero 细胞系组成的饲养细胞通过分泌一些小分子代谢产物、白细胞介素和生长因子等,诱导生殖细胞减数分裂和部分精子形成过程,对于伴有早期或晚期精子成熟停滞的非阻塞性无精症患者具有重要意义^[21]。

生殖细胞体外培养面临的主要问题是:细胞活力逐渐下降;细胞增殖速度较慢或不增殖;

在培养过程中细胞生化和形态特征改变,给细胞鉴别带来困难^[21];长时间培养后,可能会因自身营养细胞(主要是支持细胞)老化而使细胞群落逐渐消失^[9]。可通过下述方法改进:在培养基中

加入胎牛血清(FCS)和胶质细胞源神经营养因子,增强生殖细胞活力^[26];利用特定培养基;将生殖细胞放在饲养板上培养;将生殖细胞和支持细胞一起培养;加入正常条件下支持细胞分泌的生长因子及其他因子;加入激素等。

1.6.2 生殖细胞提取 睾丸精子提取(TESE)主要适用于已完成精子形成过程的患者。对接受了放、化疗的癌症患者甚至血液系统癌症患者的睾丸组织能实现一定程度精子复苏^[1],从发育不全、成熟停滞和唯支持细胞综合征等引起的非阻塞性无精症患者睾丸组织中也能提取到精子^[6]。

TESE 结合 ICSI 技术为不育患者提供了新的治疗途径。睾丸组织冻存对 ICSI 结果没有直接影响^[27],新鲜和冻融睾丸精子 ICSI 结果(原核受精率、胚胎分裂率、胚胎种植率等)没有显著性差别^[28]。先冷冻睾丸组织再提取睾丸精子比先提取睾丸精子再进行冷冻行 ICSI 效果好^[29]。

睾丸组织生殖细胞亚群筛选有多种方法,如利用 c-kit/SCF 系统方法、“硅石胶态悬浮液梯度离心”法、体外定向诱导培养、免疫磁珠技术等^[21,30]。另外还有基于细胞大小和形态的筛选方法,此方法只适用未成年个体,他们的睾丸组织细胞种类较少,对睾丸组织细胞进行分离较为困难^[31]。有些细胞表面标志不具有特异性,目前利用细胞表面标志分离生殖细胞的方法还不够精确^[21]。

2 睾丸组织冻融应用前景

睾丸组织冻融有广阔的应用前景,源于其明显的优势,主要表现在:可保持睾丸组织中不同细胞间相对完整的微环境,对于后继精子形成过程至关重要^[19];可减少精原细胞丢失^[12];可避免反复穿刺对睾丸的损伤;行 ICSI 时间不受限制^[5];

降低 ICSI 时得不到精子的几率,并可避免在 ICSI 时其配偶不必要的促排卵^[7]。

睾丸组织冷冻根据其适用对象可分为:胎儿睾丸组织冷冻、青春期前睾丸组织冷冻和成人睾丸组织冷冻;而根据患者患病性质大体可分为:癌症、无精症及隐睾等患者睾丸组织冷冻。

2.1 自体移植、异体移植及异种移植

2.1.1 自体移植 治愈的青春期前男性癌症患者或隐睾患者在达到生育年龄时,有望实现冻融睾丸组织自体移植,以完成精子形成过程,保障其生育能力。

2.1.2 异体移植 冻融睾丸组织通过异体移植可用于纠正不育或性功能低下患者的激素水平。将冻融的胎儿睾丸组织移植到患者皮下,可提高患者血清睾酮水平并能改善其精液质量^[19]。

2.1.3 异种移植 睾丸组织异种移植具有广阔的应用前景。将来有望在免疫力低下的动物体内完成精子形成过程,再借助辅助生殖技术使不育患者得到后代^[32]。异种异位移植睾丸组织是研究未成熟灵长类睾丸组织精原干细胞功能的一种简单而实用的方法^[13]。通过观察睾丸组织移植后是否有精子形成来推断精原干细胞是否存活^[11]。动物实验表明,精原干细胞本身在受体动物体内只能增殖而不能分化^[32],移植后只有5%-10%的精原干细胞能克隆出生精小管^[33]。移植睾丸组织能提供未受破坏的微环境,完成精子形成过程。异种移植为检测癌症患者睾丸组织中是否含有癌细胞及研究不育动物和人类精子形成失败机制提供了便捷途径^[32]。

虽然精子形成过程中激素调节具有种属差异^[21],异种动物移植可能带来病毒感染或抗原-抗体不相容等不良后果,但动物支持细胞能通过自分泌或旁分泌维持人类生殖细胞的存活^[33],并促进其减数分裂,对于非阻塞性无精症患者具有一定意义。有些少精或无精症患者没有基因方面缺陷,而是由于支持细胞和间质细胞分泌功能低下,使精子形成过程受到影响^[34]。

目前,将分离后的牛、人和其它灵长类睾丸组织移植到小鼠睾丸中,还没有报道其能完成精子形成过程,但将新鲜和冻融的鼠、兔和猪睾丸组织移植到裸鼠体内,恢复了精子形成过程^[12]。另外,将大鼠精原干细胞移植到裸鼠生精小管中也完成了大鼠精子形成过程^[21]。

2.2 保障癌症患者生育能力

癌症患者化疗时,药物可能会影响支持细胞和间质细胞分泌功能,造成生精小管微环境变化,雄激素结合蛋白和睾酮含量下降,导致精子形成过程发生量或质的改变^[21]。化疗后永久性无精症患者可通过TESE,结合ICSI得到后代。目前已有10多例由于化疗引起非阻塞性无精症患者,通过TESE-ICSI成功得到后代^[1]。

癌症患者可选择冻存睾丸组织或睾丸细胞悬液。免疫磁珠或密度梯度离心等技术可用于睾丸细胞悬液提纯^[4],以防其中混入癌细胞。睾丸组织冻融后可通过异种移植,检测其中是否含有癌细胞^[11],

相对于冷冻睾丸细胞悬液更为安全。对于成年癌症患者来说,冷冻睾丸组织优于冷冻精子,主要表现在:在冷冻前及复苏后培养过程中精原干细胞可增殖和分化,增加精原干细胞和精子数量;精子是精原干细胞分化终产物,冻存精子就意味着保存有限的基因型,而睾丸组织中精原干细胞能自我更新并通过减数分裂和染色体交叉产生新的基因型,从而得到更多遗传类型^[21]。

综上所述,虽然人类睾丸组织冻融目前还存在很多难题有待克服,其继发问题还不确切,但目前的研究结果已显示出其广泛的潜在应用价值,我们相信将来这一领域必然能给不育患者带来福音。”

参考文献:

- [1] Meseguer M, Garrido N, Pellicer A, et al. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in atients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod*, 2003, 18 (6): 1281-5.
- [2] Schrader M, Straub B, Miller K, et al. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol*, 2001, 15 (6): 611-7.
- [3] Radford JA, Shalet SM, Lieberman BA. Fertility after treatment for cancer. *BMJ*, 1999, 319 (7215): 935-6.
- [4] Kvist K, Thorup J, Byskov AG, et al. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod*, 2006, 21 (2): 484-91.
- [5] Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, et al. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. *Hum Reprod*, 1999, 14 (4): 1034-8.
- [6] Sousa M, Cremades N, Silva J, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod*, 2002, 17 (7): 1800-10.
- [7] Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, et al. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 1999, 14 (7): 1794-801.
- [8] Emiliani S, vandenBergh M, Vannin AS, et al. Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum Reprod*, 2000, 15 (11): 2371-4.
- [9] Lee DR, Kim KS, Yang YH, et al. Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive

- azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells *in vitro*. *Hum Reprod*, 2006, 21 (2): 471-6.
- [10] Sallam HN, Farrag A, Agameya AF, et al. The use of the modified hypo-osmotic swelling test for the selection of immotile testicular spermatozoa in patients treated with ICSI: a randomized controlled study. *Hum Reprod*, 2005, 20 (12): 3435-40.
- [11] Frederickx V, Michiels A, Goossens E, et al. Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. *Hum Reprod*, 2004, 19 (4): 948-53.
- [12] Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod*, 2005, 20 (6): 1676-87.
- [13] Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, et al. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Hum Reprod*, 2007, 22 (4): 1060-7.
- [14] Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, et al. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod*, 2002, 17 (8): 2146-51.
- [15] Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod*, 2005, 20 (6): 1676-87.
- [16] Frederickx V, Michiels A, Goossens E, et al. Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. *Hum Reprod*, 2004, 19 (4): 948-53.
- [17] Izadyar F, Marrijs-Rijssenbilt JJ, den Ouden K, et al. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J Androl*, 2002, 23 (4): 537-45.
- [18] Keros V, Hultenby K, Jahnukainen K, et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod*, 2007, 22 (5): 1384-95.
- [19] Brook PF, Radford JA, Shalet SM, et al. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*, 2001, 75 (2): 269-74.
- [20] Kastelic D, Stanovnik M, Kmetec A, et al. Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved-thawed testicular tissue. *Hum Reprod*, 2000, 15 (4): 861-4.
- [21] Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, et al. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum Reprod Update*, 2005, 11 (3): 229-59.
- [22] Kim JM, Ghosh SR, Weil AC, et al. Caspase-3 and caspase activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology*, 2001, 142 (9): 3809-16.
- [23] Brook PF, Radford JA, Shalet SM, et al. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*, 2001, 75 (2): 269-74.
- [24] Sousa M, Cremades N, Alves C, et al. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod*, 2002, 17 (1): 161-72.
- [25] Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, et al. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia *in vitro*: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction*, 2002, 124 (6): 791-9.
- [26] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2004, 71 (3): 722-31.
- [27] Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, et al. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169 (1-2): 15-9.
- [28] Friedler S, Raziell A, Strassburger D, et al. Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod*, 2001, 16 (12): 2616-20.
- [29] Perraguin-Jayot S, Audebert A, Emperaire JC, et al. Ongoing pregnancies after intracytoplasmic injection using cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, 1997, 12 (12): 2706-9.
- [30] van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, et al. Immunomagnetic isolation and long term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl*, 2001, 22 (4): 696-704.
- [31] Meachem S, von Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction*, 2001, 121 (6): 825-34.
- [32] Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and *in-vitro* microinsemination. *Hum Reprod*, 2002, 17 (12): 3039-45.
- [33] Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*, 2000, 6 (1): 29-34.
- [34] Sofikitis N, Kaponis A, Mio Y, et al. Germ cell transplantation: a review and progress report on ICSI from spermatozoa generated in xenogeneic testes. *Hum Reprod Update*, 2003, 9 (3): 291-307.

(2007年8月21日 收稿)