

稀少精子冷冻研究进展

陈春华, 沙艳伟 综述; 李萍 审校
(厦门市妇幼保健院生殖医学中心, 福建 厦门 361005)

【摘要】精子冷冻是人类辅助生殖领域中日益成熟的技术,但是常规精子冷冻方案却不适用于稀少精子冷冻,解决稀少精子冷冻技术将在很大程度上改善临床治疗少、弱精子症和无精子症患者的不育问题。寻找合适冷冻载体是目前稀少精子冷冻的研究重点之一。本文就近年来稀少精子不同载体冷冻方法:空卵膜载体冷冻法、微滴冷冻法、其他微型载体冷冻法和睾丸组织冷冻以及睾丸精子和附睾精子的冷冻效果作一综述。

【关键词】精子冷冻;空卵膜;玻璃化冷冻;睾丸组织

中图分类号: R321.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-3591 (2013) 08-0753-05

Current progress in cryopreservation of small numbers of sperm

CHEN Chun-hua, SHA Yan-wei, LI Ping

Center of Reproductive Medicine, Xiamen Maternity and Child Health Care Hospital, Xiamen, Fujian 361003, China

【Abstract】 Human sperm cryopreservation is an increasingly mature technique in assisted reproduction. However, conventional sperm cryopreservation is not suitable for the cryopreservation of small numbers of sperm. The solution to the cryopreservation of small numbers of sperm may contribute a lot to the clinical treatment of asthenospermia, oligospermia and azoospermia. Recently, many researchers focus on searching for appropriate carriers for the cryopreservation of small numbers of sperm. This article outlines the effects of current cryopreservation methods including empty zona pellucida, microdrops, other microcarriers, testicular tissue cryopreservation and testicular sperm and epididymal sperm refrigeration. *Natl J Androl*, 2013, 19 (8): 753-757

【Key words】 sperm cryopreservation; empty zona pellucida; vitrification; testicular tissue

Supported by grant from the Youth Research Project of Fujian Provincial Department of Public Health (2010-2-408).

Correspondence to: LI Ping, email: saarc2001@sina.com

Received: January 5, 2013; accepted: May 28, 2013

近年来,随着环境污染的恶化和激素滥用等因素导致男性精子质量和数量不断下降,男性不育比例日益增高,其中将近60%~75%的男性不育患者表现为少精子、弱精子、无精子症等精子质量异常^[1]。临床上少精子症患者可以通过射精获得微量精子,而无精子症患者主要通过睾丸精子抽吸术

(TESA)、显微附睾精子抽提术(MESA)和经皮附睾抽吸术(PESA)等获得少量的睾丸或附睾精子,这些精子数量有限而且来之不易,如果将这些患者受精当日剩余或取出的微量精子冷冻保存,不但可以避免下个周期因为精子缺乏而造成受精失败或卵子浪费,为取卵当日成功受精提供了一定的保障,同时减

①基金项目:福建省卫生厅青年科研课题(2010-2-408)

作者简介:陈春华(1984-),女,河南周口市人,硕士,从事生殖医学胚胎实验室工作。Email: chunhua.1984@163.com

通讯作者:李萍,Email: saarc2001@sina.com

少反复穿刺取精给患者带来的躯体、精神的痛苦和经济上的负担。

传统的精子冷冻方法会造成冻融精子不同程度的丢失,不适合微量精子的冷冻,因此人们不断尝试探索针对稀少精子的冷冻方案。本文就目前常用的稀少精子冷冻方法:空卵膜冷冻法、微型载体玻璃化冷冻法、睾丸组织冷冻^[2]等及其受精结局等作一综述。

1 空卵膜载体冷冻方法

透明带是包裹在哺乳动物卵细胞外面的一类糖蛋白膜,保护卵子阻止精子进入。运用显微操作技术将透明带内的细胞成分全部清除,成为一空囊,随后将单个精子或稀少精子采用卵细胞胞质内单精子注射(ICSI)注入到空透明带内,再转入冷冻保护剂中,接着进行液氮熏蒸或程序化慢速冷冻,最后储存在液氮中或是直接投入液氮保存,这种方法称为空卵膜载体冷冻。Walmsley等^[3]采用TESA和MESA将无精子症、少精子症患者的微量精子冷冻保存在卵透明带内,随后解冻采用ICSI受精,诞生了第一例通过空卵膜为载体冷冻精子出生的双胞胎女婴。

1.1 空卵膜载体来源 目前常用的空卵膜载体主要来自于人和鼠,研究发现这两类载体的精子冻融结局不具有统计学差异。但是人精子会因黏在人透明带上发生顶体反应,导致复温后精子丢失和受精率低^[4-5];而人精子不和鼠透明带粘合^[6],因此采用鼠空卵膜冷冻人精子或许可以减少顶体反应的发生,降低复温后精子损失率。但是小鼠卵透明带较小而且较透明,在操作中容易造成丢失,因此有研究者推崇使用金黄地鼠透明带,该透明带较大,利于操作和观察。虽然目前主要采用鼠空透明带作为人类少量精子的冷冻保存载体,但是和采用人空透明带作为冷冻载体相比,两者复苏后的精子存活率并没有显著差异,这在一定程度上提示了鼠空透明带作为人类精子冻贮载体的生物安全性^[7]。

1.2 冷冻保护剂 在冷冻保护剂的选择上多采用甘油作为冷冻保护剂,甘油-卵黄复合型保护剂是目前常用冷冻保护剂,但是卵黄可能会造成冻融后碎片产生等影响镜下精子观察。朱伟杰等^[7]采用无卵黄-甘油保护剂,分别将附睾精子和正常射出的精子取微量(5~10个/空卵膜)利用显微注射针注入鼠空卵透明带内,复温后发现附睾精子的活动率及存活率与对照组(正常射精)没有差别,认为采用去卵黄保护剂易于微量精子(附睾精子)的活率维持及微量精子的观察与注入,空卵膜是冷冻微量精子

的合适载体。Hassa等^[8]推荐使用Osmangazi-Turk液(内含人血清蛋白、平衡盐溶液、囊胚培养液、卵泡液、甘油和卵胞质等),认为该保护剂更有利保护精子染色体和活力。关于冷冻保护剂的加入顺序,有研究显示冷冻保护剂亦可以提前加入空透明带,Levi-Sett等^[9]将TYB冷冻保护剂提前加入空卵膜内,认为这种做法有利于维持精子活力和避免精子丢失。

空卵透明带内精子冻融后在显微镜下容易观察和寻找,而且单个或少量精子冷冻-复温后的存活率和活动率都取得较好的结果,但是该类型冷冻载体不易获得,制作较复杂,人力以及经济成本较高,因此限制了该冷冻方法应用。

2 微型载体玻璃化冷冻法

目前精子冷冻常采用传统慢速冷冻法(以冷冻管为冷冻载体),但是慢速冷冻法无法避免降温过程中冰晶形成造成的损伤,而且复温后精子回收率较低,精子损伤程度较大,特别不适用于稀少精子冷冻。玻璃化冷冻是采用高浓度保护剂对细胞进行快速降温,使细胞内外达到玻璃化状态,避免冰晶形成造成的冷冻损伤,目前主要用于胚胎、卵子和组织等冷冻。基于慢速冷冻法的不足和玻璃化冷冻的优点,近年来有学者关注玻璃化冷冻微量精子,认为玻璃化冷冻中采用的微型载体所需冷冻样本体积小,在一定程度上可以解决微量精子的冷冻问题,其中冷冻环、微滴等微型载体常用于微量精子的冷冻^[10]。

2.1 冷冻环载体冷冻法 冷冻环由于所需样本体积小,样本体表比例大能达到快速降温/复温,常作为卵子、胚胎等的玻璃化冷冻载体,并且取得较好的冷冻效果。Schuster等^[2]尝试以冷冻环作为冷冻载体,甘油-卵黄复合体型为冷冻保护剂,分别采用液氮熏蒸、玻璃化冷冻和慢速冷冻进行微量精子的冷冻,结果显示冷冻环是一种方便快捷的微量精子冷冻载体。玻璃化冷冻为避免冰晶形成,采用了高浓度冷冻保护剂,但是保护剂浓度高会对细胞产生毒性,研究发现液氮熏蒸和慢速冷冻法的冻融结果无差异,但是玻璃化冷冻-复温后精子存活率低,主要与高浓度保护剂造成精子细胞器和骨架冷冻损伤有关^[2]。近来有研究认为在玻璃化冷冻中当冷冻速率极快使温度降低到玻璃态起始温度下时,在没有保护剂的情况下,细胞内外有可能达到玻璃化状态^[11]。依据此理论,Nawroth等^[12]首次尝试无保护剂情况下玻璃化冷冻精子并获得成功。在此之后,

研究者陆续进行此方面的研究,蒋凌英等^[13]采用冷冻环进行无保护剂玻璃化冷冻人精子,发现冻融精子的存活率和活力与常规慢速冷冻法结果相同,证明冷冻环无保护剂冷冻人精子的可行性,同时为冷冻微量精子提供了可能。Isachenko等^[10]和Woods等^[14]采用冷冻环作为冷冻载体进行人微量精子的无冷冻保护剂玻璃化冷冻,复温后发现精子的DNA完整性和新鲜精子相当,而精子DNA损伤程度决定胚胎质量。

冷冻环玻璃化冷冻稀少精子减少了复温后精子损失,操作方便和快捷,优于空卵膜载体^[15],冷冻环无保护剂玻璃化冷冻进一步提高了微量精子的冷冻效果,但是目前关于通过冷冻环冷冻微量精子出生婴儿的报告很少,而且由于冷冻环属于开放式载体,避免不了与液氮的直接接触,造成一定程度的污染,因此尝试采用封闭式冷冻环可能是未来研究的重点。

2.2 微滴玻璃化冷冻法 微滴冷冻法即将精子悬液制成微量液滴进行玻璃化冷冻储存,该方法冷冻的稀少精液复温后回收率较高,可以达到90%以上,在一定程度上克服了传统的精子冷冻方法复温后普遍存在的精子损失率高等现象^[2,4]。Sereni等^[16]采用类似微滴载体进行的睾丸精子冷冻,冻融复苏率达到100%,冷冻的6例患者,ICSI受精后1例获得生化妊娠。目前微滴玻璃化冷冻精子悬液微滴的制作方法多样,有研究者将精液和冷冻保护剂悬液制成微滴,然后覆以石蜡油在冷冻管中冷冻储存^[17];还有在培养皿中将冷冻保护剂制成液滴(0.5 μl)覆盖石蜡油,然后导入精子,最后将皿封口于液氮中储存^[18];亦有人直接将精液(8~10 μl)滴入液氮凝固成微滴,然后放入冷冻管中投入液氮储存等,在冷冻效果特别是精子回收率上都取得一定的成效。

以往微量精子的微滴冷冻法常采用液氮熏蒸或慢速冷冻,较少采用玻璃化冷冻,主要是由于该方法所使用的高浓度保护剂会对细胞产生毒性。最近研究者尝试采用微滴进行附睾微量精子无保护剂玻璃化冷冻,发现与传统的慢速冷冻法(以1.8 ml的冷冻管为载体加冷冻保护剂)相比,两组的复苏率差异没有统计意义,但是微滴组精子回收率和复苏率高于对照组,认为微滴法冷冻微量精子较常规冷冻管法具有优势,而且无需保护剂,减少了细胞毒性的产生,简便安全、经济可行^[19]。

然而目前关于微滴法冷冻精液获得妊娠的报告很少,可能是由于不同的微滴冷冻方案都存在一些

困扰。采用培养皿储存微滴,不能保证培养皿在液氮中长久储存。冷冻管储存微滴,冷冻及复温操作上较难控制。将微滴直接投入液氮会存在与液氮直接接触带来的微生物污染等问题。

3 其他载体冷冻方法

稀少精子的冷冻方案除了采用冷冻环和微滴载体冷冻外,有研究者尝试以cryoleaf为载体进行玻璃化冷冻微量精子,结果显示经皮附睾穿刺获得精子采用冷冻-复温后92%恢复活力,60.6%经注射后受精,85%胚胎卵裂,认为采用cryoleaf作为冷冻载体方案可以有效简便的保存单个或微量精子,有助于临床治疗梗阻性无精子症患者^[20]。

针对某些微型载体的开放性特点,许多研究者转向利用封闭式载体以求避免开放式载体在冷冻过程中存在的污染问题。Isachenko等^[21]认为在精液的冷冻上,冷冻环、微滴、开放式拉长麦管和标准开放式麦管都适用于精子的低温储存,但是较冷冻环和微滴,后两者由于可以保证精液和液氮的隔离,可以避免微生物污染,是比较安全干净的玻璃化冷冻方法。Desai等^[22]采用一种新型的高安全麦管(HSV)进行睾丸和附睾精子慢速冷冻,并成功临床妊娠,该载体的密闭性使其成功的避开了与液氮的直接接触,安全可靠。Isachenko等^[23]利用封闭式塑料毛细麦管(50 μl)对少弱子精症患者的精子进行玻璃化冷冻,该过程中仅使用非渗透性保护剂蔗糖(0.25 mol/L)不含以往玻璃化冷冻中需要的渗透性保护剂,复温后1 h精子运动性、包膜完整性和顶替完整性都优于慢速冷冻,认为该方法在行ICSI/IVF受精时具有很大潜力。

4 睾丸组织冷冻

目前采用上述冷冻方法进行微量精子的冷冻虽然可以取得一定效果,但是尚未达到满意的临床要求,因此有许多研究者尝试进行睾丸组织的冷冻储存,该方法是将穿刺或是外科手术取得的睾丸组织(有推荐0.5~1.0 m³为适宜冷冻体积)保存在液氮中,有需求时将该组织进行复温,随后抽提组织精子进行体外培养或是抽提精原干细胞进行自体或异体移植,完成精子形成过程,保存男性生育力。该方法目前主要针对于癌症患者化疗前、无精子症和少精子症患者等,其冻融效果可以利用光镜、电镜、免疫组化和激素水平4个方面进行评价。研究显示睾丸组织冷冻具有很好的应用潜力,组织冻融后抽提的成熟精子,其ICSI受精结果优于睾丸精子悬液的冻

存^[24]。Friedler等^[25]将新鲜精子和冻融睾丸组织精子的 ICSI 受精结果比较发现,两者的原核受精率(66% vs. 58%)、胚胎卵裂率(98% vs. 90%)和胚胎移植率(33.3% vs. 21.4%)的差异没有统计学意义,提示了睾丸组织冻存精子具有较强的受精潜能。

目前睾丸组织的冷冻方法多选用程序化慢速冷冻,有研究认为影响组织冻融效果主要因素是冷冻速率^[26],过快的冷冻速率可能会损伤精原细胞,不利于体外精子成熟培养。Keros等^[27]认为慢速冷冻法有利于冻融睾丸组织中支持细胞、精原细胞和基质成分的保存(组织复苏后未成熟精子体外培养成熟的保障),高速率降温不利于睾丸组织的冷冻。在冷冻保护剂上多选用二甲亚砜(DMSO),Keros等^[28]采用几种常用的冷冻保护剂丙二醇、甘油和DMSO进行睾丸组织冷冻效果比较,复温后结果显示甘油冷冻效果最差,DMSO(0.7 mol/L)优于丙二醇和甘油更适合于维持睾丸组织结构,特别是精原细胞的保存。

目前睾丸组织冷冻还存在许多问题有待解决,主要技术难点是睾丸组织复苏后未成熟精子的体外成熟培养以及精原干细胞移植技术尚未成熟,未达到临床应用程度^[24]。

5 睾丸/附睾精子冷冻临床效果

精子在睾丸内产生后,随后进入到附睾内,附睾内含有的激素、酶和营养物质有助于精子的进一步成熟,附睾内精子活力优于睾丸精子^[29]。有研究认为通过TESA获得的精子其ICSI受精率、卵裂率、临床妊娠率等与射精获得精子没有差别^[30-31]。Levron等^[30]观察了TESE获取的精子冻融后体外受精结局,结果发现与新鲜精子相比,两者的IVF结局不具有统计学意义,取卵当日精子缺乏时可以使用冻融的睾丸精子代替。

Lin等^[32]认为TESE获取的精子在冻融后其受精率和临床妊娠率等与新鲜精子差异没有统计意义。Hameed等^[33]发现行ICSI后与睾丸精子相比,附睾精子具有较高的受精率及较好的胚胎发育和临床妊娠结局,而胎儿畸形和流产率低于睾丸精子,以上结局可能和精子的成熟度有关。朱伟杰等^[7]认为附睾精子冻融后的活力优于睾丸精子,可能与睾丸精子成熟度较差,对冻融过程中的冷冻损伤抵抗性弱。但是也有报告认为虽然附睾内精子活力优于睾丸,但是两者的体外受精/ICSI妊娠结局上不具有统计学差异,精子活力不影响受精结局,由于附睾内精子数量相对较少,研究更倾向于睾丸精子^[29]。

少精子症、无精子症患者主要通过微创手术获得精源(睾丸精子或附睾精子),选择合适的精子来源不仅是成功受孕的保障,而且减少患者反复取精痛苦和对身体的创伤。睾丸和附睾精子的ICSI妊娠结局没有差异,临床上对两者的选择各有偏好^[34],并且两者的冻融临床效果比较存在不稳定性,因此选择何种精源进行冷冻还需要进一步研究。

6 展望

精子冷冻是人类生殖细胞冷冻中较成熟的技术,目前已有很多精子库建立,向有需求的患者提供了健康合格的精子。稀少精子冷冻是该技术的补充与完善,与ICSI的结合很大程度上提高了稀少精子患者的受孕率,带来了生子希望。虽然现在采用空卵膜、微型载体等方案可以部分解决稀少精子的冷冻问题,但是这些方案冻融后的受精结局仍未达到理想结果,选择合适的冷冻程序(快速冷冻或是慢速冷冻)、冷冻载体及最佳的冷冻保护剂浓度等可能是未来稀少精子冷冻的研究重点。

参考文献

- [1] 王益鑫,郑菊芬. 男性不育研究新进展. 中华男科学杂志, 2006, 12(9): 771-774.
- [2] Schuster TG, Keller LM, Dunn RL, et al. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. Hum Reprod, 2003, 18(4): 788-795.
- [3] Walmsley R, Cohen J, Ferrara-Congedo T, et al. The first births and ongoing pregnancies associated with sperm cryopreservation within evacuated egg zonae. Hum Reprod, 1998, 13 (Suppl 4): 61-70.
- [4] AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, et al. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: A systematic review. Hum Reprod Update, 2009, 15(2): 153-164.
- [5] Hsieh Y, Tsai H, Chang C, et al. Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae. Fertil Steril, 2000, 73(4): 694-698.
- [6] Baibakov B, Boggs NA, Yauger B, et al. Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zona pellucidae in transgenic mice. J Cell Biol, 2012, 197(7): 897-905.
- [7] 朱伟杰,黄敏珍,邢福祺,等. 少量人类精子以空卵透明带为冻载体体的冷冻保存. 生殖与避孕, 2002, 22(6): 338-341.
- [8] Hassa H, Gurer F, Yildirim A, et al. A new protection solution for freezing small numbers of sperm inside empty zona pellucida: Osmangazi-Turk solution. Cell Preserv Technol, 2006, 4(3): 199-208.
- [9] Levi-Setti PE, Albani E, Negri L, et al. Cryopreservation of a small number of spermatozoa in yolk-filled human zona pelluci-

- dae. Arch Ital Urol Androl, 2003, 75(4): 195-198.
- [10] Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: Effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. Biol Reprod, 2004, 71(4): 1167-1173.
- [11] Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. Reprod Biomed Online, 2003, 6(2): 191-200.
- [12] Nawroth FI, Dessole S. Successful cryopreservation of human spermatozoa by direct plunging into liquid nitrogen (vitrification) without cryoprotectants. Fertil Steril, 2002, 78(Suppl 3): 129.
- [13] 蒋凌英, 靳 镭, 朱桂金, 等. 精子冷冻环无保护剂玻璃化冷冻方法的初步研究. 生殖医学杂志, 2006, 15(4): 234-236.
- [14] Woods EJ, Benson JD, Agca Y, et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology, 2004, 48(2): 146-156.
- [15] Desai NN, Blackmon H, Goldfarb J. Single sperm cryopreservation on cryoloops: An alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. Reprod Biomed Online, 2004, 9(1): 47-53.
- [16] Sereni E, Bonu MA, Fava L, et al. Freezing spermatozoa obtained by testicular fine needle aspiration: A new technique. Reprod Biomed Online, 2008, 16(1): 89-95.
- [17] Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. Hum Reprod, 1995, 10(7): 1623-1626.
- [18] Bouamama N, Briot P, Testart J. Comparison of two methods of cryoconservation of sperm when in very small numbers. Gynecol Obstet Fertil, 2003, 31(2): 132-135.
- [19] 靳 镭, 郑家凤, 刘 群, 等. 微滴无保护剂玻璃化法冷冻附睾微量精子的研究. 中华男科学杂志, 2010, 16(12): 1089-1094.
- [20] Peng QP, Cao SF, Lyu QF, et al. A novel method for cryopreservation of individual human spermatozoa. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2011, 47(8): 565-572.
- [21] Isachenko V, Isachenko E, Montag M, et al. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. Reprod Biomed Online, 2005, 10(3): 350-354.
- [22] Desai N, Goldberg J, Austin C, et al. Cryopreservation of individually selected sperm: Methodology and case report of a clinical pregnancy. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(5): 375-379.
- [23] Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, et al. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: New capillary technology. J Androl, 2012, 33(3): 462-468.
- [24] 刘睿智, 薛 凯. 人类睾丸组织冻融及其应用研究进展. 生殖与避孕, 2008, 28(2): 108-112.
- [25] Friedler S, Raziel 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.
- [26] 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): 269-274.
- [27] Keros V, Hultenby K, Borgstrom B, et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. Hum Reprod, 2007, 22(5): 1384-1395.
- [28] 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): 1676-1687.
- [29] Moghadam KK, Nett R, Robins JC, et al. The motility of epididymal or testicular spermatozoa does not directly affect IVF/ICSI pregnancy outcomes. J Androl, 2005, 26(5): 619-623.
- [30] Levron J, Madgar I, Shefi S, et al. IVF outcome with cryopreserved testicular sperm. Andrologia, 2011, 43(1): 48-51.
- [31] Amirjannati N, Heidari-Vala H, Akhondi MA, et al. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes between spermatozoa retrieved from testicular biopsy and from ejaculation in cryozoospermic men. Andrologia, 2012, 44(Suppl 1): 704-709.
- [32] Lin YH, Huang LW, Seow KM, et al. Intentional cryopreservation of epididymal spermatozoa from percutaneous aspiration for dissociated intracytoplasmic sperm injection cycles. Acta Obstet Gynecol Scand, 2004, 83(8): 745-750.
- [33] Hameed N, Ozturk O. Testicular versus epididymal spermatozoa in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2010, 22(4): 159-163.
- [34] 王 丽, 陈家仙, 胡雪梅, 等. 睾丸或附睾精子 ICSI 治疗无精子症. 遵义医学院学报, 2012, 35(1): 66-68.

(收稿日期: 2013-01-05; 接受日期: 2013-05-28)

(本文编辑: 徐建平)