

·规范与标准·

卵胞质内单精子注射(ICSI)技术中国专家共识(2023年)

中国医师协会生殖医学专业委员会

通信作者:李蓉,北京大学第三医院妇产科生殖医学中心,北京 100191, Email: roseli001@sina.com; 李达,中国医科大学附属盛京医院生殖医学中心,沈阳 110022, Email: leeda@sina.cn; 章志国,安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖中心,合肥 230022, Email: zhangzhiguo@ahmu.edu.cn

【摘要】 人类卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术开展至今已有 30 余年。其最初主要应用于针对严重少、弱、畸形精子症导致的男性不育患者的治疗,但随着未成熟卵体外培养、卵子冷冻、胚胎植入前遗传学检测等辅助生殖技术的开展,ICSI 使用比例已大幅提升。虽然目前 ICSI 技术相对成熟,但仍有很多细节值得关注和完善。为规范与优化人类辅助生殖技术从业者的 ICSI 操作,由中国医师协会生殖医学专业委员会发起,并联合全国多家生殖医学中心共同编撰了本共识。

【关键词】 生殖技术,辅助; 精子注射,细胞质内; 共识

Chinese expert consensus on intracytoplasmic sperm injection (2023)

Chinese Association of Reproductive Medicine

Corresponding authors: Li Rong, Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China, Email: roseli001@sina.com; Li Da, Center for Reproductive Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China, Email: leeda@sina.cn; Zhang Zhiguo, Reproductive Medicine Center, Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China, Email: zhangzhiguo@ahmu.edu.cn

【Abstract】 Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has been developed for over 30 years. Initially, it was mainly used in the treatment of male infertility caused by severe oligozoospermia, asthenozoospermia and teratozoospermia. However, the use of ICSI has substantially increased due to the extensive development of assisted reproductive technology such as *in vitro* maturation of immature oocytes, oocyte cryopreservation and preimplantation genetic testing. Although ICSI technology is relatively mature, there are still many details that need to be improved. In order to standardize and optimize the technology of ICSI, this consensus is initiated by the Chinese Association of Reproductive Medicine, and coedited with other reproductive medicine centers.

【Key words】 Reproductive techniques, assisted; Sperm injection, intracytoplasmic; Consensus

20 世纪 90 年代首例卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)婴儿的诞生^[1],标志着对男性不育的治疗取得了突破性进

展。如今该技术已常规应用于全球各生殖中心,并且随着未成熟卵体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM)、卵子冷冻、胚胎植入前遗传学检测

DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20230228-00076

收稿日期 2023-03-01 本文编辑 王李艳

引用本文:中国医师协会生殖医学专业委员会. 卵胞质内单精子注射(ICSI)技术中国专家共识(2023年)

[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2023, 43(7): 659-669. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20230228-00076.



(preimplantation genetic testing, PGT)等辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的广泛开展,ICSI的使用比例也大幅增加^[2]。因此,能够熟练、高效、安全地进行ICSI操作是每一个胚胎学家应具备的基本技能。虽然ICSI技术比较成熟,基本流程也具有较高标准化,但仍有部分细节值得关注或有待完善。本共识将从ICSI的适应证、正常及常见异常形态卵子、卵子的显微注射、受精观察、ICSI特殊情况的应对及其他细节、ICSI技术的质控及培训等几个方面进行阐述并提出相应推荐意见,旨在为人类ART实验室从业者提供实用性参考,从而为广大不孕患者提供更高质量的服务。

一、ICSI的适应证

虽然ICSI技术成功解决了一些严重男性因素导致的不孕问题,但在部分非男性因素不孕的治疗方面,其有效性和安全性仍不明确^[3-4]。因此,ICSI技术的使用需更加谨慎。

1. 男性因素:①极重度少精子症及弱精子症,即精子浓度 $<1 \times 10^6/\text{mL}$ 及精子前向运动百分率 $<1\%$,处理后的前向运动精子总数不足100万^[5-6]。对于授精方式的选择,目前国内外尚无明确的精子参数阈值,应结合前向运动精子总数、精子形态及病史(不育年限、原发/继发不育等)进行综合考虑。②特殊类型畸形精子症,如圆头精子症、大头精子症、无头精子症及精子鞭毛多发形态异常。ICSI是治疗圆头精子症的主要方法,而其他特殊类型畸形精子症建议先行遗传学筛查,明确致病基因后再选择辅助生殖助孕方式^[7]。③手术取精,指通过附睾或睾丸手术取精且无论新鲜或冷冻保存^[8]。④精子功能异常,即精子中缺乏精子特异性卵子激活因子(sperm-borne oocyte activation factor, SOAF)导致卵子激活障碍,目前认为磷脂酶C ζ 蛋白(phospholipases C zeta, PLC ζ)是主要的SOAF^[9]。⑤射精功能障碍,如逆行射精且出现精子浓度或活力严重下降^[10]。⑥精子免疫性因素,即抗精子抗体阳性导致精子活力下降、发生特异性凝集、影响精子与卵子透明带的结合及顶体反应^[11]。

2. 非男性因素:①需行PGT周期^[12];②IVM周期^[12];③卵子冻融周期^[12];④不明原因前次常规IVF周期完全受精失败^[12];⑤前次周期卵子普遍存在透明带异常(如锯齿样/蜡样透明带)^[13-14]。

推荐意见:应将ICSI作为上述男性与非男性因素的唯一或首选授精方式。对于常规IVF授精有污染史且未能抗菌治愈的病例,仍然存在再次IVF授精污染风险,可尝试选择ICSI^[15-16]。而对于不明原因不孕、高龄及获卵数较低等因素,尚无证据表明ICSI可提高活产率^[12],因此推荐短时受精结合早补救技术。另外,虽然ICSI仍为PGT周期的推荐授

精方式^[17],但目前对于单纯为了避免父源DNA对检测结果产生干扰而行ICSI尚存争议^[18-19],因此也有共识建议PGT周期中,ICSI应仅限于精子污染可能对检测结果准确性造成影响的情况下应用^[12]。

二、ICSI周期中正常及常见异常形态卵子

通常情况下,仅对出现第一极体(first polar body, Pb1)的核成熟卵子进行ICSI授精。评估卵子质量的形态学结构包括:卵丘-卵母细胞复合物(cumulus-oocyte complexes, COCs)、Pb1、透明带、卵胞质以及卵周间隙(perivitelline space, PVS)。理想形态的卵子应该具有:近似椭圆且完整的Pb1;厚度适中、折光无异常且边缘规则的透明带;颗粒感均匀适中且不含任何内容物的胞质;大小正常且无颗粒/碎片弥散的卵周间隙。在卵丘细胞去除后,60%~70%的卵子表现出异常的形态学特征^[20],但卵子形态对胚胎发育潜能的预测仍存在不同的结论^[21-22]。本共识整理了正常及常见异常形态的卵子以作参考,详见图1。

推荐意见:COC中卵丘细胞的致密度与卵子成熟度呈负相关,成熟度越低则卵丘细胞越致密,越不容易观察到卵子;巨大卵子(卵子直径 $>200 \mu\text{m}$,胞质直径 $>150 \mu\text{m}$)应予以丢弃;GV卵子和巨大极体卵子(长径 $>40 \mu\text{m}$)应根据成熟或正常卵子的比例,酌情选择丢弃;MI卵子根据患者实际情况决定继续体外培养或丢弃(见五、ICSI特殊情况的应对及其他细节);滑面内质网簇(smooth endoplasmic reticulum cluster, SERc)、大空泡(直径 $>14 \mu\text{m}$)或多发小空泡、胞质细胞器聚集、锯齿或蜡样透明带以及多重异常形态卵子会对受精、胚胎发育及妊娠结局产生较大的负面影响,但部分卵子通过ICSI仍然可以获得健康活产婴儿,因此建议这部分卵子进行特殊标记并不作为移植首选。

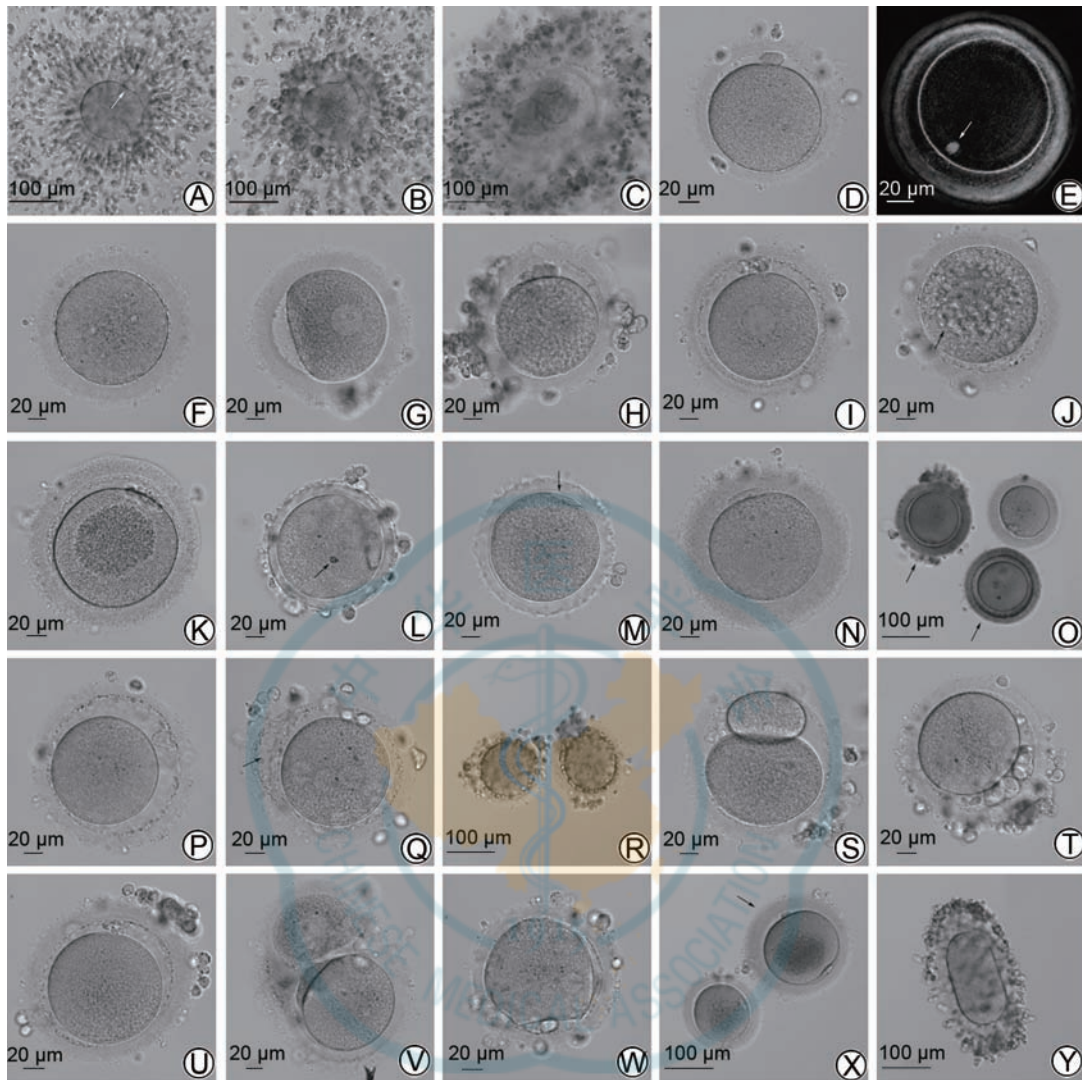
三、卵子的显微注射

1. 显微操作系统:显微操作系统是ICSI操作的基础设备,主要由倒置显微镜、X-Y-Z轴驱动系统、油压/气压显微注射仪、恒温加热板及防震系统组成,不同品牌操作系统之间有所差异,但基本结构及工作原理相似。

推荐意见:显微操作系统应安置在百级净化区域(ISO Class5),该区域应相对独立、安静且人员流动较小,远离门口和传递窗口,尽量避免高效滤器出风口直吹操作台面和操作人员,这样可以保障操作环境稳定,使操作人员免受外界因素干扰而更加专注^[23]。除此之外,与显微操作相关的培养箱应尽量靠近显微操作设备,增加操作流程的顺畅度,减少配子或胚胎在外界暴露的时间。

2. ICSI操作皿的制备:ICSI操作皿通常由用于卵子注射的HEPES/MOPS操作液微滴和加注精液





注: COC 示卵丘-卵母细胞复合物; Pb1 示第一极体; ZP 示透明带; PVS 示卵周间隙

图 1 人类正常及常见异常卵子

A 示 COC(成熟卵子, 卵丘细胞松散, 箭头所示为 Pb1); B 示 COC(未成熟卵子, 卵丘细胞致密, 未见 Pb1); C 示 COC(退化卵子且透明带破裂); D 示正常形态卵子; E 示偏振光显微镜下正常形态卵子, 纺锤体(箭头所示)位于极体正下方; F 示 MI 卵子; G 示 GV 卵子; H 示胞质粗糙, 颗粒感明显且均匀; I 示胞质可见滑面内质网簇, 光滑似圆盘; J 示胞质多发空泡(呈凹陷感, 最大空泡直径约 16 μm, 箭头所示); K 示胞质细胞器聚集, 中央区域颗粒感明显; L 示异常 ZP, 呈琼脂/蜡样、无 PVS, 胞质出现折光体(箭头所示, 约 5 μm); M 示异常 ZP, 边缘呈锯齿状, Pb1 呈月牙状(箭头所示), 无 PVS; N 示 ZP 增厚(>20 μm 为增厚); O 示 ZP 着色, 透明度下降(箭头所示卵子); P 示 PVS 增大(至少可以容纳 2 个正常大小的 Pb1); Q 示 ZP 夹层(箭头所示); R 示 PVS 内大量颗粒碎片; S 示巨大 Pb1(长径约 80 μm); T 示多 Pb1 且较大; U 示 Pb1 碎片化且 PVS 增大; V 示连体卵子; W 示胞膜不规则; X 示巨大卵子(箭头所示, 总体平均直径约 230 μm, 胞质平均直径约 150 μm), 双 Pb1, 胞质细胞器聚集; Y 示长椭圆形巨大卵子

样本的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)液微滴所组成。ICSI 操作皿应至少提前 2 h 置于 37 °C 不透气培养箱中进行温度平衡^[24]。建议使用通过鼠胚试验和内毒素检测的 ICSI 专用皿。

推荐意见: ICSI 操作皿各类微滴的具体布局没有统一标准, 可根据个人操作习惯制备, 但应遵循如下基本原则及参考技巧^[24]: ①操作液微滴应尽量集中于皿的中部, 以避免操作针下降时触碰皿的侧壁; ②如果是极重度少、弱精或睾丸/附睾精子, 也可不用制作 PVP 微滴, 直接将精子悬液制成微滴;

③建议双人制皿, 及时覆盖培养油, 避免因挥发而改变液滴渗透压。

3. 显微操作针的安装: 用于 ICSI 的显微操作针包括注射针和持卵针。通常厂商会根据不同内外径尺寸、针尖形状、前端角度等提供多种规格的显微操作针, 一般认为采用内径更小、尖端更长的注射针有助于降低卵子的退化率^[25], 有研究表明使用内径 3~5 μm 的注射针行 ICSI, 较使用内径 5~7 μm 的注射针可使卵子退化率下降 7% 左右^[26]。显微操作针的正确安装对于 ICSI 操作至关重要。

推荐意见:①安装时避免注射针内产生大量气泡;②操作针在插入持针器过程中如遇到较大阻力时切勿强行插入,应检查持针器管路内是否有破损的玻璃残留物;③若发现操作针吹吸不顺畅,尤其是无法稳定控制注射针内的精子时,应首先检查装针位置和水晶螺母松紧度;当确保装针到位并拧紧水晶螺母后上述问题仍未解决,应考虑是水晶螺母内的密封胶垫出现了老化或破损,需及时进行更换;④将安装好的操作针在低倍物镜(4×或10×)下进行调焦,并使注射针和持卵针成一条直线;⑤注射针前端角度并非与皿底完全平行,但角度不宜过大,以成功压停运动精子的最小角度为佳。

4. 卵子的脱颗粒:ICSI前需将COCs的大部分或全部颗粒细胞剥离,以便于卵子成熟度和形态的评估及后续的显微注射。脱颗粒过程采用透明质酸酶消化和机械吹吸相结合的方式。基本步骤:COCs在透明质酸酶中剥离大部分的卵丘细胞,随后在含HEPES或MOPS的配子缓冲液中用剥卵管进一步去除透明带外层的放射冠。

推荐意见:建议卵子在透明质酸酶中作用的时间 $<30\text{ s}$ ^[24]。脱颗粒的总时间控制在1~2 min内,因此不建议一次操作过多的卵子(5~8枚为宜)^[27]。建议使用口径(内径)递减的烧拉制成的玻璃吸管或商品化剥卵针逐步进行卵子脱颗粒:通常先用管口烧制光滑的巴斯德吸管在酶中进行吹吸消化、随后用内径200 μm 左右的吸管转移至干净配子缓冲液中、然后用内径160~180 μm 的吸管/拨卵针进行“粗拆”、最后用内径135~140 μm 的吸管/拨卵针将颗粒细胞剥离干净^[27];脱颗粒后的卵子应进行充分洗涤,最后移入卵裂培养液中孵育至少1 h^[24]。

5. 显微注射基本步骤:精子制动、调整穿刺位置并固定卵子、穿刺透明带及胞质、负压破膜、注入精子(图2),操作过程力求简练、轻柔、缓慢。

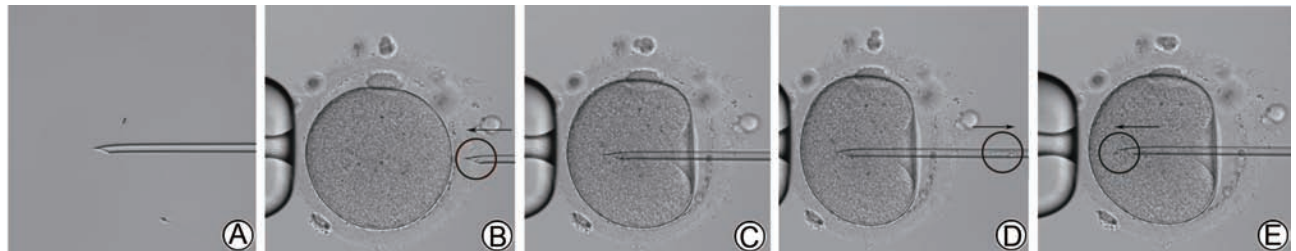
推荐意见:将精子注入胞质内是受精的关键。精子头颈部顺利滑出针尖,并且撤针后不随胞膜的回弹而持续后移,即标志着精子成功注入胞质。当观察到破膜成功,但精子在注入时明显受阻而依然

停留在针尖内侧,并且在撤针后精子会沿穿刺通道缓慢向外移动,表明回吐的胞膜“褶皱”阻碍了精子的进入^[23]。如遇此种情况,可以进行二次回吸胞质,然后再重新注入精子;或者平行于第一次穿刺通道位置进行二次穿刺,重新破膜后再注入精子。经过第一次穿刺拉伸后的胞膜,通常在二次穿刺时仅需轻微负压甚至无需负压即可破膜^[23]。推荐在200×~400×放大倍数下进行精子的制动和卵子的注射。

6. 精子的制动:精子制动的主要目的是“止动”。与此同时精子质膜被破坏,导致核周膜暴露并促进卵子激活因子的释放^[28]。部分操作者为了充分破膜,往往会反复多次地对精子尾部进行滑动或研磨。有研究显示,相较于多次的精子制动,一次性的制动并不会降低受精率,反而可以获得更高的优质胚胎率(一次性制动:37.5%,多次制动:31.8%, $P=0.02$)^[29]。

推荐意见:对于精子的制动,成功阻止前向运动及尾部摆动即可;精子制动后尽快进行注射,不建议提前制动足够数量的精子后再进行注射。对于极重度少精患者,为避免卵子外界暴露时间过长,可以提前抓取足够数量的精子,但不提前进行制动。

7. ICSI过程中极体摆放的位置:理论上,减数分裂纺锤体应靠近Pb1排出的皮质下方^[30-31]。因此为避免ICSI过程中穿刺及回吸胞质对纺锤体的损伤,通常将Pb1置于6点或12点位置,从3点位置进针。当Pb1置于12点位置时,针尖开口斜面背向纺锤体,能有效避免胞质回吸过程中对纺锤体的损伤;当Pb1置于6点位置时,精子注入后更靠近纺锤体,有利于受精和胚胎发育^[25]。但关于ICSI过程中Pb1摆放的位置目前并没有明确定论。实际上,利用偏振光显微镜观察可以发现,并非所有纺锤体均靠近Pb1,推测是拆卵过程导致Pb1发生了位移。但大部分(74%)的减数分裂纺锤体依然是靠近Pb1的(偏离角度 $\leq 45^\circ$)^[32];并且发育潜能更好的卵子,其纺锤体往往是越靠近Pb1的^[33]。由此可见,常规位置进行穿刺,对于大部分卵子,尤其是高质量卵子是相对安全的。



注:圆圈示精子的位置;箭头示精子移动方向;Pb1示第一极体;PVP示聚乙烯吡咯烷酮

图2 显微注射过程(200×)

A示轻压精子尾部中段或下段进行制动;B示调整Pb1位置并固定卵子,针尖抵住透明带后将精子移到针尖处;C示突破透明带并刺入胞质,但此时并未破膜;D示当胞质瞬时流入针内时(破膜),即刻终止负压;E示精子进入胞质,应避免注入PVP



推荐意见:建议将Pb1置于12点或6点位置,于3点或9点位置(左手进针者)进行穿刺。使用显微注射针轻压卵子透明带,使Pb1旋转至穿刺焦距平面最清晰位置。

8. 注射针穿刺深度:注射针首先穿透透明带并触及胞质膜,随后继续向卵胞质深部进入。注射针穿刺胞质的深度不宜过深或过浅,进针过深,会吸住对侧卵胞质膜;而进针过浅,则会导致注射后卵子退化率升高。

推荐意见:建议穿刺深度为胞质直径的1/2~2/3为宜^[34]。但对于发生突然破膜(无穿刺漏斗形成)的卵子则不建议继续进针,可直接将精子注入胞质。

四、受精观察

受精观察时间点为ICSI后(17±1)h。出现2个原核(two pronuclei, 2PN)及2个极体为正常受精;出现1个原核(monopronuclear, 1PN)或>2PN为异常受精;未见原核(nonpronuclear, 0PN)多数情况为未受精,也有少部分是原核出现的时间不在观察时间点内。

推荐意见:尽管有研究报道,通过PGT筛选正常双亲二倍体胚胎可以获得健康婴儿^[35-36],但考虑到较低的正常胚胎率和较高的检测成本,建议丢弃ICSI-1PN来源的胚胎。ICSI-OPN来源的胚胎可能是原核出现过早或过晚而错过了观察时间。鉴于高质量ICSI-OPN来源的胚胎具有与ICSI-2PN来源胚胎近似的正常染色体发生率、双亲二倍体比例以及妊娠结局^[37-38],建议对高质量ICSI-OPN来源胚胎行囊胚培养,形成可利用囊胚,经充分知情同意后行移植或冷冻保存^[39]。

五、ICSI特殊情况的应对及其他细节

虽然ICSI技术已十分成熟,流程也具备较高的标准化,但某些特殊情况的应对及细节仍不够明确或尚存争议。

1. 第一次减数分裂(M I)中期卵子的处理:ICSI周期中可以发现不成熟卵的比例约为15%,其中M I卵占4%左右^[40]。这些M I卵通过短时间的体外培养,一部分仍可以在体外发育成熟。但随着体外成熟时间的延长,非整倍体卵子的比例也会逐渐增加^[41],因此对这部分卵子的使用尚存争议^[25]。

推荐意见:对于卵子成熟率较低(<50%)或高龄(≥40岁)的患者,可对M I卵进行短时间的体外培养(取卵后8h内),从而增加卵子利用率及可用胚胎数量,但鉴于其较高的非整倍体率及不良妊娠结局,有条件的可酌情对形成的囊胚进行PGT-A检测^[42]。

2. 易退化卵子的应对:ICSI卵子退化是比较常见的现象,退化率通常在5%~19%^[25]。一类卵子退化是发生在ICSI过程中,表现为进针时突然破膜,胞质外溢;另一类则是在第1天观察受精时才被发现。

ICSI卵子退化,多数情况下与卵子自身质量有关,但操作者的技术因素同样会导致卵子退化率的增加。

导致ICSI卵子退化率增加的因素主要包括:
① 卵子胞质的成熟度。胞质成熟度越低,其含水量越高,黏滞性便越低。而过熟的卵子,由于膜下的微丝(尤其是F-肌动蛋白)含量下降,同样会导致胞质黏滞性降低。胞质黏滞性越低,细胞内压力则越大,破膜的瞬间便越容易发生胞质的外溢,从而造成卵子退化。此类卵子通常会表现为,穿刺所形成的“漏斗”小且持续时间短,甚至无漏斗形成(突然破膜)^[43]。
② 剥卵针过细或剥卵过度,造成细胞骨架或胞膜的机械性损伤,其中肌动蛋白丝对机械刺激尤为敏感^[44]。
③ 精子或胞质黏针,使得ICSI针在胞质内过度操作,从而引发胞质外溢。
④ 进针过深导致卵子贯穿。
⑤ ICSI针前端水平角度过大,造成穿刺截面增加。

推荐意见:脱颗粒过程中应避免高频率、大幅度吹吸,剥卵针内径不应<135 μm;避免过度剥离颗粒细胞,残余颗粒细胞不影响卵子的观察和注射即可;当出现精子或胞质黏针严重时,应及时更换ICSI针;ICSI针前端水平角度不宜过大;对于卵膜脆性较高的卵子,建议适当延长孵育时间,再行ICSI。

3. 无透明带卵子(zona-free oocytes, ZFOs)的处理:ZFOs多数是由取卵或脱颗粒过程中机械应力导致透明带破裂所致^[45],也可见于少数透明带发育异常的特殊病例^[46],如图3。由于缺少了透明带的保护,此类卵子非常脆弱。但ZFOs通过ICSI依然可以获得正常活产^[46],且与透明带完整卵子活产婴儿具有相似的孕周和出生体质量^[47]。因此ZFOs依然具有临床应用价值,不应直接丢弃,尤其是获卵数较少的患者。

推荐意见:ICSI过程中,Holding针负压不宜过大,ICSI针刺入不宜过浅;由于观察不到Pb1,有条件的可以利用偏振光显微镜确认纺锤体位置后再行ICSI;ZFOs来源的卵裂期胚胎在移植或冷冻过程中容易发生解体,因此建议进行囊胚培养;为避免养囊换液过程中卵裂球分解,可以直接将培养液滴中的卵裂期培养液移除并重新注入囊胚培养液,或者使用一步培养液;建议对ZFOs进行单滴培养或应用时差成像系统进行培养。

4. ICSI完全受精失败的应对:ICSI周期完全受精失败的发生率为1%~5%^[48]。导致ICSI受精失败的因素包括技术因素、精子缺陷以及卵子因素,其中最常见的原因是精子缺陷导致的卵子激活障碍(oocyte activation deficiency, OAD)^[9]。目前,对于OAD的治疗通常采用人工卵子激活(artificial oocyte activation, AOA),即利用机械、物理、化学等方式引起卵子外源Ca²⁺的内流或内源Ca²⁺的释放,



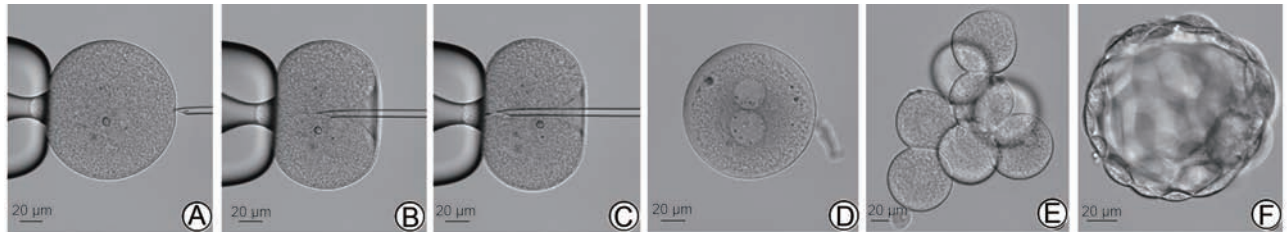


图3 人类无透明带卵子行卵胞质内单精子注射及胚胎发育情况

A 示固定卵子;B 示穿刺胞膜;C 示注入精子;D 示第 1 天正常受精;E 示第 3 天 8-细胞胚胎;F 示第 5 天囊胚

进而诱发一系列与受精相关的生化反应^[25]。对于明确由精子缺陷导致 OAD 的病例, AOA 可以显著改善再次治疗的结局^[49]。尽管有限的研究表明, 与常规 ICSI 相比, AOA 出生的后代患病率和出生缺陷并没有差异^[50], 但仍需要进行前瞻性的多中心长期研究, 以明确该技术的有效性和安全性。

推荐意见: AOA 应谨慎应用, 建议对前次 ICSI 受精完全失败或受精率低下患者进行患者精子与供者卵子的交叉试验、鼠卵激活试验 (mouse oocyte activation test, MOAT) 或精子的 PLC ζ 染色, 来判断精源性或是卵源性 OAD; 可对 I 型圆头精子症或精源性 OAD 的病例进行 AOA 治疗^[51]; 常用化学法激活剂包括离子霉素、A23187 以及氯化铯。三者之间的效果比较尚存争议, 但对于单独应用上述 3 种激活剂临床治疗效果不佳的患者, 可尝试联合应用^[52]。

5. 完全不活动精子的应对: ICSI 过程中, 将完全不活动精子中的活精子和死精子进行区分至关重要, 因为死精子无法激活卵子而发生正常受精^[53]。常用的存活精子鉴别方法包括人工精子激活 (artificial sperm activation, ASA)、低渗膨胀试验 (hypo-osmotic swelling test, HOST)、激光辅助不动精子选择 (laser-assisted immotile sperm selection, LAISS)、精子尾部柔韧性测试 (sperm tail flexibility test, STFT)。

(1) ASA: 利用己酮可可碱或茶碱等磷酸二酯酶抑制剂 (phosphodiesterase inhibitor, PDE), 通过 cAMP 途径诱导精子尾部的下游蛋白磷酸化, 从而刺激尾部运动^[25]。睾丸穿刺获取的精子经过冷冻复苏通常会表现为不活动或者活力较弱, 因此 ASA 常用于该类精子的激活, 并且效果非常显著^[54]。虽然卵子和胚胎并不直接接触 ASA 药物, 精子暴露浓度也极低, 但关于 ASA 对子代影响的研究非常有限^[55-56], 其安全性尚需更多的长期随访研究来证实。

(2) HOST: 具有正常膜功能的存活精子, 在低渗溶液中尾部会发生肿胀。研究表明, 将培养液与超纯水 1:1 混合配制成的低渗液更有利于对 ICSI 不动精子的选择^[57]。HOST 具有简单、相对安全、可重复性高等特点。尽管 ASA 对于睾丸中精子的选择效果显著优于 HOST^[58], 但其对轴突缺陷或功能性尾部缺陷的精子却是无效的, 因此 HOST 仍然是 IVF 实验室应采纳的一项技术^[56]。

(3) LAISS: 利用激光击打精子尾部末端, 不动的存活精子尾部会在被击打部位发生卷曲^[59]。该方法具有快速、简单、可重复性高等特点, 其识别存活精子的特异性与 HOST 相当^[25]。与常规通过活力和形态选择精子行 ICSI 周期比较, LAISS 周期在受精、胚胎发育及种植潜能等方面没有差异, 并且不会增加产科和新生儿不良结局的风险^[60]。但目前仍缺乏对子代进行长期随访的相关研究。

(4) STFT: 利用 ICSI 针将精子尾部向一侧弯曲, 若尾部弯曲后可以恢复原位或者独立于头部移动, 说明精子是存活的^[61]。显然, 该方法的生物安全性是最高的, 但同时对于实验室人员的技术和经验要求也更高, 因此可操作性和准确性相对较低。

推荐意见: 虽然上述四种方法存在各自的优缺点, 但 IVF 实验室应至少采用其中一种用于不动精子的 ICSI 处理; 鉴于 ASA 的安全性尚不明确, 因此应谨慎应用; HOST 和 LAISS 可以作为 ASA 无效病例的备选方法, 但尚无证据表明两者哪个更具优势, 可以根据实验室操作习惯及设备条件进行选择应用; STFT 方法通常可以结合 HOST 和 LAISS 方法使用。

当使用 HOST 时, 精子在低渗液中暴露时间应少于 30 s^[62]。具体操作方法: 先用 STFT 法选择疑似活的不动精子, 将精子按照先头后尾的方向吸入注射针内, 将注射针移入低渗液内, 轻轻地先吐出尾部尖端, 使头部保持在注射针内, 一旦发现尾部出现肿胀, 立即将精子转移到等渗培养液中, 这样就可以尽可能避免低渗环境对精子细胞核的影响。低渗液配制: 50% 培养液+50% 超纯水。

6. 精子的优选: 精子 DNA 碎片会对辅助生殖的治疗结果以及自然受孕产生不利影响^[63]。因此, 先进的精子优选技术越来越多地应用于 IVF 周期 (常用于 ICSI 周期), 旨在提高精液样本中具有完整 DNA 的精子数量^[64]。常用的先进精子优选技术包括磁性活化细胞分选法、电动电位法、电泳分离法、透明质酸结合法、偏振光显微镜精子选择、形态选择性卵胞质内单精子注射 (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection, IMSI)、微流体分离法以及精子水平迁移法等^[65]。但上述方法的安全性和有效性依然缺乏具有前瞻性和随机性的相关研究。另外, 高比例的精子 DNA 碎片化是

否会导致 ICSI 周期的不良结局,依然存在相互矛盾的研究结论^[66],这可能是因为常规 ICSI 过程中基于形态动力学的精子挑选本身就是一种优选方式^[67]。

推荐意见:目前还没有可靠的技术可以彻底筛除 DNA 碎片化的精子,并且这些技术的安全性和有效性有待商榷,因此不建议将上述方法进行常规应用;对于精子 DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI) $>20\% \sim 30\%$ 且具有不良预后因素(高龄、卵巢功能低下、反复种植失败/流产)的病例可以尝试上述方法进行精子的优选,但由于相关研究缺乏前瞻性和随机性,因此目前尚无法推荐最佳的精子优选技术^[68-69];若 DFI 持续较高且反复 ICSI 周期失败 2 次以上可考虑从睾丸中获取精子^[68-69]。

7. 其他细节

(1) 卵子孵育、脱颗粒及 ICSI 时机的选择:在促排卵周期中卵子会存在胞核-胞质发育不同步的情况,因此对卵子进行短时的体外孵育似乎有利于胞质的成熟,从而提高受精率和妊娠率^[25]。但目前对于卵子的孵育时间,以及取卵至脱颗粒和脱颗粒至 ICSI 的间隔时间仍未形成明确共识。

① 取卵至脱颗粒时间:虽然卵丘细胞有助于卵子的进一步成熟,但长时间孵育会加速卵子的老化,导致减数分裂纺锤体发生降解^[70-71]。

② 脱颗粒至 ICSI 时间:一般认为在透明质酸酶的消化以及剥卵管的机械应力作用下,卵子会产生应激,因而需要一个短暂的恢复过程。

③ 取卵至 ICSI 时间:目前普遍认为,取卵后对卵子进行孵育有利于改善 ICSI 的结局^[25],但过长的孵育时间反而会产生负面影响^[72-73]。然而,具体时间范围仍不明确,因为除了孵育时间,患者特征、用药方案以及实验室培养条件等多种因素都会对 ICSI 周期结局产生影响。

推荐意见:取卵后 2~6 h 或人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)扳机后 38~42 h 内进行脱颗粒及 ICSI;建议脱颗粒后孵育 1 h 再行 ICSI;预后不良的患者可以利用纺锤体观测仪评估卵子核-质同步性,对于未见纺锤体的 M II 卵可以适当延后 ICSI 时间^[74-75]。

(2) PVP 的浓度:商品化 PVP 的浓度通常为 7%~10%,可以直接使用。然而,即使低浓度的 PVP 也会对精子质膜、顶体及核造成损伤,延迟卵子钙离子震荡和精核去凝集的发生,进而影响受精及胚胎发育^[76]。因此有学者提出用低浓度或不含 PVP 的溶液进行 ICSI 操作^[76]。Ding 等^[77]分别使用三种浓度(10%、7% 和 5%)的 PVP 进行前瞻性研究。结果表明,随着 PVP 浓度的降低,受精率、卵裂率、优质卵裂期胚胎率及优质囊胚率均有所增加,其中 5% PVP 组的卵裂率(96.26%)、优质卵裂期胚

胎率(81.73%)和优质囊胚率(54.96%)均显著高于 10% PVP 组(92.00%, $P < 0.001$; 69.40%, $P < 0.001$; 42.67%, $P < 0.001$)。但由于低浓度或不含 PVP 的溶液黏性较低,无论是精子的抓取、制动,还是将精子注射入卵子的操作过程都需要实验人员具有很强的操控能力,因此需要进行充分的训练。

推荐意见:建议根据个人技术能力和习惯将 PVP 进行适当稀释,5%的 PVP 是很好的选择,一方面降低高浓度 PVP 对卵子发育潜力的负面影响,另一方面也几乎不增加精子制动操作的时长^[77]。

(3) 透明质酸酶的浓度:实验室所使用的透明质酸酶浓度通常为 80 U/mL。高浓度的透明质酸酶(约 760 U/mL)会增加 ICSI 后卵子退化率及 1PN 发生率^[78]。另外,商品化透明质酸酶多来源于牛睾丸,人们会担心纯度低、浓度批次差异、卵子消化过程中的机械创伤和长时间暴露,以及外源 DNA 整合等因素对卵子产生负面影响^[79]。van de Velde 等^[78]应用更低浓度的透明质酸酶进行脱颗粒,结果显示相较于高浓度组妊娠率有所提高(39 U/mL 与 78 U/mL 比较,妊娠率分别为 49% 和 32%;10 U/mL 与 39 U/mL 比较,妊娠率分别为 56% 和 44%),但差异均无统计学意义。尽管目前尚无充分证据表明低浓度透明质酸酶更有利于 ICSI 治疗结局,但从生物安全角度考虑,在不影响消化效能的前提下,应考虑使用更低浓度的消化酶。

推荐意见:商品化透明质酸酶(80 U/mL)可以直接应用。同时建议在不影响脱颗粒效果和时间的的前提下可以进行稀释应用。

六、ICSI 技术的质控及培训

1. 质控指标:根据 2017 年维也纳共识及 2018 年中国胚胎实验室关键指标质控专家共识^[80-81],将 ICSI 实验室质控指标的计算方式及标准归纳如下,详见表 1。

表 1 ICSI 实验室质控指标

质控指标计算	最低标准	理想标准
正常受精率=可见 2PN 及 2Pb 的卵子数/注射 M II 卵子数 $\times 100\%$	$\geq 65\%$	$\geq 80\%$
卵子退化率=退化卵子数/注射 M II 卵子数 $\times 100\%$	$\leq 10\%$	$\leq 5\%$
1PN 率=1PN 卵子数/注射 M II 卵子数 $\times 100\%$	$< 3\%$	

注:正常受精率和卵子退化率为关键质控指标;1PN 率为一般质控指标;退化卵子定义为 ICSI 过程中出现胞质崩解及受精观察时发现凋亡的卵子;ICSI 示卵胞质内单精子注射;PN 示原核;Pb 示极体

2. 技术培训:2005 年美国生殖医学会规定,新人要在资深胚胎学家的指导下,完成 20 枚未受精卵子的注射和 50 枚实际患者卵子的注射,并且受精率 $\geq 50\%$ 、卵子退化率 $< 15\%$ 方可独立操作^[82]。但随着临床促排卵方案的不断进步和实验室技术的

不断成熟,新人培训合格的标准也应该有所提高。有研究显示,ICSI 操作经验会直接影响受精率、可利用囊胚率及持续妊娠率等指标,并且新人需要完成至少 1 000 个 ICSI 周期,才能达到与资深胚胎学家相近的 ICSI 实验室和临床结果^[83]。当然,取得高水平技能所需的 ICSI 周期数也会因教学方法和个人水平而异^[84]。因此对新人进行系统、专业且长期的培训十分重要。

推荐意见:①新人要充分了解 ICSI 的理论基础及影响因素。只有熟练掌握捡卵、胚胎转移、卵子脱颗粒等基础技能的新人才可以开始训练 ICSI 操作;②训练期间可以使用未受精或废弃的 IVM 卵子进行练习。当新人的平均每卵操作时间(从制动精子开始,至注射结束)与带教胚胎学家相当、废弃 IVM 卵子受精率>60%、卵子退化率<10%时,方可进行患者卵子的操作;③新人在正式操作患者卵子的部分卵子。至少注射 50 枚卵子后,当受精率及卵子退化率与资深胚胎学家注射的同批卵子结果相当时,方可进行独立操作。

七、小结

ICSI 技术的出现为不孕夫妇带来了希望,甚至已经成为某些病因所致不孕的唯一治疗手段。但关于 ICSI 在先天畸形和子代健康方面的安全性依然存在争议^[85]。而在我国普遍开展的短时受精,同时结合早期补救 ICSI,目的就是最大限度地降低 ICSI 应用比例。一项随机对照试验研究表明,虽然非男性因素行 ICSI 较常规 IVF 可以获得更高的受精率及更低的周期取消率,但并不会增加活产率^[86]。而获得健康婴儿才是不孕夫妇的最终目标。因此,对于 ICSI 的应用需要严格把控适应证,在改善治疗结局的同时,更要重视子代的长期健康。

执笔专家:李蓉(北京大学第三医院)、李达(中国医科大学附属盛京医院)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)

参与编写共识的专家组成员(按姓氏汉语拼音排序):蔡令波(南京医科大学第一附属医院)、曹云霞(安徽医科大学第一附属医院)、陈曦(北京大学人民医院)、程东凯(沈阳菁华医院)、高英卓(中国医科大学附属盛京医院)、顾亦凡(中信湘雅生殖与遗传专科医院)、郝大勇(郑州大学第三附属医院)、黄博(华中科技大学同济医学院附属同济医院)、李博(空军军医大学唐都医院)、李达(中国医科大学附属盛京医院)、李磊(广州医科大学附属第三医院)、李梅(山东大学第二医院)、李蓉(北京大学第三医院)、李友筑(厦门大学附属第一医院)、刘丽英(沈阳市妇婴医院)、刘晓妍(烟台毓璜顶医院)、吕祁峰(上海交通大学医学院附属第九人民医院)、马燕琳(海南医学院第一附属医院)、孟祥黔(成都西囡妇科医院)、木良善(复旦大学附属中山医院)、秦朗(四川大学华西第二医院)、史艳彬(大连市妇女儿童医疗中心)、谭季春

(中国医科大学附属盛京医院)、汤小晗(哈尔滨医科大学附属第六医院)、王桂泉(厦门大学附属妇女儿童医院)、王天任(香港大学深圳医院)、王喜良(中国人民解放军北部战区总医院)、王秀霞(中国医科大学附属盛京医院)、吴琰婷(复旦大学附属妇产科医院)、武泽(云南省第一人民医院)、夏曦(北京大学深圳医院)、薛松果(同济大学附属东方医院)、杨大磊(中国医科大学附属盛京医院)、尹太郎(武汉大学人民医院)、张宁媛(南京大学医学院附属鼓楼医院)、张润驹(浙江大学医学院附属妇产科医院)、张艳(武汉大学人民医院)、张曜耀(四川大学华西第二医院妇产科)、章志国(安徽医科大学第一附属医院)、周桦(贵州医科大学附属医院)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李蓉、李达和章志国负责论文撰写、文献指导、论文修改;杨大磊负责论文撰写;其他共识专家组成员均参与了共识的讨论、修改及定稿

参 考 文 献

- [1] 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. DOI: 10.1016/0140-6736(92)92425-f.
- [2] Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, et al. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection[J]. JAMA, 2015, 313(3): 255-263. DOI: 10.1001/jama.2014.17985.
- [3] van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during *in vitro* fertilisation in patients with non-male subfertility[J/CD]. Cochrane Database Syst Rev, 2003(2): Cd001301. DOI: 10.1002/14651858.CD001301.
- [4] Berntsen S, Laivuori H, la Cour Freiesleben N, et al. A systematic review and meta-analysis on the association between ICSI and chromosome abnormalities[J]. Hum Reprod Update, 2021, 27(5): 801-847. DOI: 10.1093/humupd/dmab005.
- [5] 中国医师协会生殖医学专业委员会生殖男科学组少精子症诊疗中国专家共识编写组. 少精子症诊疗中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(7): 586-592. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210418-00177. Chinese Expert Consensus Compilation Group for Oligozoospermia Diagnosis and Treatment, Reproductive Andrology Group, Reproductive Medicine Professional Committee of Chinese Medical Doctor Association. Chinese experts' consensus on the diagnosis and treatment of oligozoospermia[J]. Chin J Reprod Contracep, 2021, 41(7): 586-592. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210418-00177.
- [6] 中国医师协会生殖医学专业委员会生殖男科学组弱精子症诊疗中国专家共识编写组. 弱精子症诊疗中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(7): 593-599. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210520-00224. Chinese Expert Consensus Compilation Group for Asthenozoospermia Diagnosis and Treatment, Reproductive Andrology Group, Reproductive Medicine Professional Committee of Chinese Medical Doctor Association. Chinese experts' consensus on the diagnosis and treatment of asthenozoospermia[J]. Chin J Reprod Contracep, 2021, 41(7): 593-599. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210520-00224.

- [7] 中国医师协会生殖医学专业委员会生殖男科学组畸形精子症诊疗中国专家共识编写组. 畸形精子症诊疗中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(7): 600-609. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210520-00229. Chinese Expert Consensus Compilation Group for Teratozoospermia Diagnosis and Treatment, Reproductive Andrology Group, Reproductive Medicine Professional Committee of Chinese Medical Doctor Association. Chinese experts' consensus on the diagnosis and treatment of teratozoospermia[J]. Chin J Reprod Contracep, 2021, 41(7): 600-609. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20210520-00229.
- [8] Schlegel PN, Sigman M, Collura B, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part II [J]. Fertil Steril, 2021, 115(1): 62-69. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.11.016.
- [9] Yeste M, Jones C, Amdani SN, et al. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? [J]. Hum Reprod Update, 2016, 22(1): 23-47. DOI: 10.1093/humupd/dmv040.
- [10] 中国医师协会生殖医学专业委员会生殖男科学组逆行射精症诊疗中国专家共识编写组. 逆行射精症诊疗中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2023, 43(3): 246-252. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20221121-00519. Chinese Expert Consensus Compilation Group for diagnosis and treatment of retrograde ejaculation, Reproductive Andrology Group, Reproductive Medicine Professional Committee of Chinese Medical Doctor Association. Chinese experts' consensus on the diagnosis and treatment of retrograde ejaculation[J]. Chin J Reprod Contracep, 2023, 43(3): 246-252. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20221121-00519.
- [11] Haddad M, Stewart J, Xie P, et al. Thoughts on the popularity of ICSI [J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(1): 101-123. DOI: 10.1007/s10815-020-01987-0.
- [12] Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2020, 114(2): 239-245. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.05.032.
- [13] Li M, Ma SY, Yang HJ, et al. Pregnancy with oocytes characterized by narrow perivitelline space and heterogeneous zona pellucida: is intracytoplasmic sperm injection necessary? [J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(3): 285-294.
- [14] Zhao J, Zhang NY, Xu ZP, et al. Effects of abnormal zona pellucida on fertilization and pregnancy in IVF/ICSI-ET [J]. Chin J Reprod Contracep, 2015, 26(2): 73-80. DOI: 10.7669/j.issn.1001-7844.2015.02.0073.
- [15] 聂睿, 靳镭, 胡娟, 等. 体外受精中胚胎污染 38 例临床分析 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014, 30(11): 902-904. DOI: 10.7504/fk2014100119. Nie R, Jin L, Hu J, et al. Clinical analysis of 38 cases of microbial contamination of embryo cultures during *in vitro* fertilization [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2014, 30(11): 902-904. DOI: 10.7504/fk2014100119.
- [16] Lin LL, Guu HF, Yi YC, et al. Contamination of ART culture media-the role of semen and strategies for prevention [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2021, 60(3): 523-525. DOI: 10.1016/j.tjog.2021.03.024.
- [17] Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT [J]. Hum Reprod Open, 2020, 2020(3): hoaa020. DOI: 10.1093/hropen/hoaa020.
- [18] De Munck N, El Khatib I, Abdala A, et al. Intracytoplasmic sperm injection is not superior to conventional IVF in couples with non-male factor infertility and preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) [J]. Hum Reprod, 2020, 35(2): 317-327. DOI: 10.1093/humrep/deaa002.
- [19] Dong Y, Liu D, Zou Y, et al. Preimplantation genetic testing for human blastocysts with potential parental contamination using a quantitative parental contamination test (qPCT): an evidence-based study [J]. Reprod Biomed Online, 2023, 46(1): 69-79. DOI: 10.1016/j.rbmo.2022.08.103.
- [20] Bartolacci A, Intra G, Coticchio G, et al. Does morphological assessment predict oocyte developmental competence? A systematic review and proposed score [J]. J Assist Reprod Genet, 2022, 39(1): 3-17. DOI: 10.1007/s10815-021-02370-3.
- [21] Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature [J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(1): 34-45. DOI: 10.1093/humupd/dmq029.
- [22] 孙正怡. 卵子质量评估的意义和手段 [J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(5): 399-402. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.05.002. Sun ZY. Significance and methodology of assessment of human oocytes [J]. J Reprod Med, 2017, 26(5): 399-402. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2017.05.002.
- [23] Elder K, van den Bergh M, Woodward B. Troubleshooting ICSI procedures. In Troubleshooting and Problem-Solving in the IVF Laboratory [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2015: 171-188. DOI: 10.1017/CBO9781107294295.012.
- [24] 黄国宁. 辅助生殖实验室技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014. Huang GN. Assisted Reproductive Techniques [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014.
- [25] Rubino P, Viganò P, Luddi A, et al. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects [J]. Hum Reprod Update, 2016, 22(2): 194-227. DOI: 10.1093/humupd/dmv050.
- [26] Yavas Y, Roberge S, Khamsi F, et al. Performing ICSI using an injection pipette with the smallest possible inner diameter and a long taper increases normal fertilization rate, decreases incidence of degeneration and trippronuclear zygotes, and enhances embryo development [J]. J Assist Reprod Genet, 2001, 18(8): 426-435. DOI: 10.1023/a:1016634704469.
- [27] 刘平. 生殖医学实验室技术 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2013. Liu P. Laboratory Techniques of Assisted Reproductive [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2013.
- [28] Takeuchi T, Colombero LT, Neri QV, et al. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study [J]. Hum Reprod, 2004, 19(1): 114-117. DOI: 10.1093/humrep/deg511.
- [29] Velaers A, Paternot G, Debrock S, et al. Triple touch sperm immobilization vs. single touch sperm immobilization in ICSI--a randomised trial [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 10: 65. DOI: 10.1186/1477-7827-10-65.
- [30] Maddox AS, Azoury J, Dumont J. Polar body cytokinesis [J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2012, 69(11): 855-868. DOI: 10.1002/cm.21064.
- [31] Yi K, Li R. Actin cytoskeleton in cell polarity and asymmetric division during mouse oocyte maturation [J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2012, 69(10): 727-737. DOI: 10.1002/cm.21048.
- [32] Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, et al. Relationship between



- meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI[J]. Hum Reprod, 2003, 18(6): 1289-1293. DOI: 10.1093/humrep/deg274.
- [33] Mahfoudh AM, Moon JH, Henderson S, et al. Relationship between pre-ICSI meiotic spindle angle, ovarian reserve, gonadotropin stimulation, and pregnancy outcomes[J]. J Assist Reprod Genet, 2017, 34(5): 609-615. DOI: 10.1007/s10815-017-0890-x.
- [34] Hickman C. ICSI for IVF: Training Protocol. In Principles of IVF Laboratory Practice: Optimizing Performance and Outcomes[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2017: 36-43. DOI: 10.1017/9781316569238.008.
- [35] Bradley CK, Traversa MV, Hobson N, et al. Clinical use of monopronucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 34(6): 567-574. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.03.013.
- [36] Xie PY, Tang Y, Hu L, et al. Identification of biparental and diploid blastocysts from monopronuclear zygotes with the use of a single-nucleotide polymorphism array[J]. Fertil Steril, 2018, 110(3): 545-554.e5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.034.
- [37] Li M, Lin S, Chen Y, et al. Value of transferring embryos that show no evidence of fertilization at the time of fertilization assessment[J]. Fertil Steril, 2015, 104(3): 607-611.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.016.
- [38] Li M, Huang J, Zhuang X, et al. Obstetric and neonatal outcomes after the transfer of vitrified-warmed blastocysts developing from nonpronuclear and monopronuclear zygotes: a retrospective cohort study[J]. Fertil Steril, 2021, 115(1): 110-117. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.07.019.
- [39] 中国医师协会生殖医学专业委员会. 人类卵裂期胚胎及囊胚形态学评价中国专家共识[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022, 42(12): 1218-1225. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20220619-00266.
Chinese Association of Reproductive Medicine. Expert consensus on human embryo morphological assessment: cleavage-stage embryos and blastocysts grading criteria[J]. Chin J Reprod Contracep, 2022, 42(12): 1218-1225. DOI: 10.3760/cma.j.cn101441-20220619-00266.
- [40] De Vos A, van de Velde H, Joris H, et al. *In-vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 1999, 14(7): 1859-1863. DOI: 10.1093/humrep/14.7.1859.
- [41] Strassburger D, Goldstein A, Friedler S, et al. The cytogenetic constitution of embryos derived from immature (metaphase I) oocytes obtained after ovarian hyperstimulation[J]. Fertil Steril, 2010, 94(3): 971-978. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.035.
- [42] 梁珊珊, 黄国宁, 孙海翔, 等. 卵胞浆内单精子注射(ICSI)技术规范[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(11): 1043-1047. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.11.001.
Liang SS, Huang GN, Sun HX, et al. Technical specification of intracytoplasmic sperm injection[J]. J Reprod Med, 2018, 27(11): 1043-1047. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.11.001.
- [43] Krause I, Pohler U, Grosse S, et al. Characterization of the injection funnel during intracytoplasmic sperm injection reflects cytoplasmic maturity of the oocyte[J]. Fertil Steril, 2016, 106(5): 1101-1106. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.015.
- [44] Veselská R, Janisch R. Reaction of the skin fibroblast cytoskeleton to micromanipulation interventions[J]. J Struct Biol, 2001, 136(2): 110-118. DOI: 10.1006/jsbi.2001.4432.
- [45] Ding J, Rana N, Dmowski WP. Intracytoplasmic sperm injection into zona-free human oocytes results in normal fertilization and blastocyst development[J]. Hum Reprod, 1999, 14(2): 476-478. DOI: 10.1093/humrep/14.2.476.
- [46] Hu Y, Trolice MP. Live birth of twins derived from zona-free oocytes[J]. Fertil Steril, 2016, 105(5): 1232-1235. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.023.
- [47] Ueno S, Bodri D, Uchiyama K, et al. Developmental potential of zona pellucida-free oocytes obtained following mild *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2014, 102(6): 1602-1607. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.025.
- [48] Kashir J, Heindryckx B, Jones C, et al. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility[J]. Hum Reprod Update, 2010, 16(6): 690-703. DOI: 10.1093/humupd/dmq018.
- [49] Bonte D, Ferrer-Buitrago M, Dhaenens L, et al. Assisted oocyte activation significantly increases fertilization and pregnancy outcome in patients with low and total failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection: a 17-year retrospective study[J]. Fertil Steril, 2019, 112(2): 266-274. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.006.
- [50] Long R, Wang M, Yang QY, et al. Risk of birth defects in children conceived by artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2020, 18(1): 123. DOI: 10.1186/s12958-020-00680-2.
- [51] Fesahat F, Henkel R, Agarwal A. Globozoospermia syndrome: an update[J]. Andrologia, 2020, 52(2): e13459. DOI: 10.1111/and.13459.
- [52] Gao Y, Yang D, Fang Y, et al. Live birth following an innovative artificial oocyte activation protocol using double calcium stimulators[J]. Chin Med J (Engl), 2023. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002407.
- [53] Yazawa H, Yanagida K, Hayashi S, et al. The oocyte activation and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of mouse and human dead (sonicated) spermatozoa[J]. Zygote, 2009, 17(2): 175-184. DOI: 10.1017/S0967199408005157.
- [54] Ebner T, Tews G, Mayer RB, et al. Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline[J]. Fertil Steril, 2011, 96(6): 1331-1336. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.041.
- [55] Navas P, Paffoni A, Intra G, et al. Obstetric and neo-natal outcomes of ICSI cycles using pentoxifylline to identify viable spermatozoa in patients with immotile spermatozoa[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 34(4): 414-421. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.01.009.
- [56] Sandi-Monroy NL, Musanovic S, Zhu D, et al. Use of dimethylxanthine theophylline (SpermMobil®) does not affect clinical, obstetric or perinatal outcomes[J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 300(5): 1435-1443. DOI: 10.1007/s00404-019-05312-8.
- [57] Verheyen G, Joris H, Crits K, et al. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod Update, 1997, 3(3): 195-203. DOI: 10.1093/humupd/3.3.195.
- [58] Mangoli V, Mangoli R, Dandekar S, et al. Selection of viable spermatozoa from testicular biopsies: a comparative



- study between pentoxifylline and hypoosmotic swelling test[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(2): 631-634. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.10.007.
- [59] Aktan TM, Montag M, Duman S, et al. Use of a laser to detect viable but immotile spermatozoa[J]. *Andrologia*, 2004, 36(6): 366-369. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2004.00636.x.
- [60] Chen H, Wang C, Zhou H, et al. Laser-assisted selection of immotile spermatozoa has no effect on obstetric and neonatal outcomes of TESA-ICSI pregnancies[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 159. DOI: 10.1186/s12958-021-00835-9.
- [61] de Oliveira NM, Vaca Sánchez R, Rodríguez Fiesta S, et al. Pregnancy with frozen-thawed and fresh testicular biopsy after motile and immotile sperm microinjection, using the mechanical touch technique to assess viability[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(2): 262-265. DOI: 10.1093/humrep/deh083.
- [62] Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, et al. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia[J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(5): 972-976. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)58271-5.
- [63] Schlegel PN, Sigman M, Collura B, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I [J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(1): 54-61. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.11.015.
- [64] Lepine S, McDowell S, Searle LM, et al. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction[J/CD]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 7(7): CD010461. DOI: 10.1002/14651858.CD010461.pub3.
- [65] Baldini D, Ferri D, Baldini GM, et al. Sperm selection for ICSI: do we have a winner? [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3566. DOI: 10.3390/cells10123566.
- [66] Khalafalla K, Majzoub A, Elbardisi H, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on intracytoplasmic sperm injection outcome[J]. *Andrologia*, 2021, 53(10): e14180. DOI: 10.1111/and.14180.
- [67] Ribas-Maynou J, Yeste M, Becerra-Tomás N, et al. Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2021, 96(4): 1284-1300. DOI: 10.1111/brv.12700.
- [68] Agarwal A, Majzoub A, Baskaran S, et al. Sperm DNA fragmentation: a new guideline for clinicians[J]. *World J Mens Health*, 2020, 38(4): 412-471. DOI: 10.5534/wjmh.200128.
- [69] Esteves SC, Zini A, Coward RM, et al. Sperm DNA fragmentation testing: summary evidence and clinical practice recommendations[J]. *Andrologia*, 2021, 53(2): e13874. DOI: 10.1111/and.13874.
- [70] Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, et al. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility[J]. *Hum Reprod Update*, 2009, 15(5): 573-585. DOI: 10.1093/humupd/dmp014.
- [71] Kilani S, Cooke S, Chapman M. Time course of meiotic spindle development in M II oocytes[J]. *Zygote*, 2011, 19(1): 55-62. DOI: 10.1017/S0967199410000110.
- [72] Pujol A, García D, Obradors A, et al. Is there a relation between the time to ICSI and the reproductive outcomes? [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(5): 797-806. DOI: 10.1093/humrep/dey067.
- [73] Carvalho M, Leal F, Mota S, et al. The effect of denudation and injection timing in the reproductive outcomes of ICSI cycles: new insights into the risk of *in vitro* oocyte ageing[J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(10): 2226-2236. DOI: 10.1093/humrep/deaa211.
- [74] Holubcová Z, Kyjovská D, Martonová M, et al. Human egg maturity assessment and its clinical application[J]. *J Vis Exp*, 2019(150). DOI: 10.3791/60058.
- [75] Holubcová Z, Kyjovská D, Martonová M, et al. Egg maturity assessment prior to ICSI prevents premature fertilization of late-maturing oocytes[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(3): 445-452. DOI: 10.1007/s10815-018-1393-0.
- [76] Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction[J]. *Reprod Med Biol*, 2012, 11(4): 165-176. DOI: 10.1007/s12522-012-0126-9.
- [77] Ding D, Wang Q, Li X, et al. Effects of different polyvinylpyrrolidone concentrations on intracytoplasmic sperm injection[J]. *Zygote*, 2020(14): 1-6. DOI: 10.1017/S0967199419000820.
- [78] van de Velde H, Nagy ZP, Joris H, et al. Effects of different hyaluronidase concentrations and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection[J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(10): 2246-2250. DOI: 10.1093/humrep/12.10.2246.
- [79] Tsampras N, Kollmann M, Craciunas L. Recombinant versus bovine hyaluronidase for oocyte denudation before intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2022, 42(2): 301-305. DOI: 10.1080/01443615.2021.1893670.
- [80] ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators[J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 35(5): 494-510. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.06.015.
- [81] 孙青, 黄国宁, 孙海翔, 等. 胚胎实验室关键指标质控专家共识 [J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(9): 836-851. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.09.003.
- Sun Q, Huang GN, Sun HX, et al. CSRM consensus on key indicators for quality control in IVF laboratory[J]. *J Reprod Med*, 2018, 27(9): 836-851. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3845.2018.09.003.
- [82] Keck C, Fischer R, Baukloh V, et al. Staff management in the *in vitro* fertilization laboratory[J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(6): 1786-1788. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.051.
- [83] Tiegs AW, Scott RT. Evaluation of fertilization, usable blastocyst development and sustained implantation rates according to intracytoplasmic sperm injection operator experience[J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 41(1): 19-27. DOI: 10.1016/j.rbmo.2020.03.008.
- [84] Durban M, García D, Obradors A, et al. Are we ready to inject? Individualized LC-CUSUM training in ICSI[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(8): 1009-1015. DOI: 10.1007/s10815-016-0686-4.
- [85] Norman RJ. Intracytoplasmic sperm injection 30 years on: too much of a good thing? [J]. *Fertil Steril*, 2022, 117(2): 268-269. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.11.033.
- [86] Dang VQ, Vuong LN, Luu TM, et al. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional *in-vitro* fertilisation in couples with infertility in whom the male partner has normal total sperm count and motility: an open-label, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1554-1563. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00535-3.