

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.27.048

体外受精 - 胚胎移植中完全受精失败的原因分析 *

戴菁^{1,3} 黄增辉² 张硕屏^{1,2,3} 陆长富^{1,2,3} 林戈^{1,2,3Δ}

(1 中南大学基础医学院生殖与干细胞工程研究所 湖南 长沙 410078; 2 中信湘雅生殖与遗传专科医院 湖南 长沙 410078;

3 卫生部人类干细胞与生殖工程重点实验室 湖南 长沙 410078)

摘要:受精是生命起源至关重要的一个步骤。在辅助生殖的过程中,完全受精失败发生具有其复杂性和不可预见性。受精失败常伴随着一些胞间调控机制异常,其中,可能阻滞在与精子穿越卵冠丘复合体、精子-透明带结合/穿透、精子-卵膜结合、卵子激活、精子去浓缩或原核形成等任一阶段。通过卵胞浆内单精子注射可以避免大部分受精失败现象,但某些患者仍无法成功受精,即使采用辅助人工激活也无法完全避免其发生。对于在辅助生殖过程中完全受精失败患者,结合其卵子成熟情况、精子质量及相关检测结果,在后续周期调整临床方案可有效避免受精失败的再次发生。

关键词:完全受精失败;体外受精;透明带;卵胞浆内单精子注射

中图分类号:Q132;Q492;R321.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)27-5389-03

Analysis of the Causes of Total Fertilization Failure in Vitro Fertilization-Embryo Transfer*

DAI Jing^{1,3}, HUANG Zeng-hui², ZHANG Shuo-ping^{1,2,3}, LU Chang-fu^{1,2,3}, LIN Ge^{1,2,3Δ}

(1 Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China;

2 Reproductive and Genetic Hospital of CITIC-Xiangya, Changsha, Hunan, 410078, China;

3 Key Laboratory of Stem Cells and Reproductive Engineering, Ministry of Health, Changsha, Hunan, 410078, China)

ABSTRACT: Fertilization is a crucial step for origin of life. During Assisted Reproductive Technologies (ART), total fertilization failure is complex and unpredictable. Total fertilization failure may related to some abnormal cellular mechanistic events, such as: any stage of sperm and cumulus-oocyte-complexes penetration, sperm-zona pellucida binding / penetration, sperm-oocyte membrane binding, oocyte activation, sperm discondensation or pronuclear formation. Most of total fertilization failure could be solved by intracytoplasmic sperm injection. But oocytes of some patient still can't fertilize successfully, even though assisted oocyte activation be used. As for total fertilization failure patients in ART, combining the mature of oocyte, sperm quality and some trail to improve clinical protocol in later cycle may prevent failure to happen again.

Key words: Total fertilization failure; In vitro fertilization; Zona pellucida; Intracytoplasmic sperm injection

Chinese Library Classification(CLC): Q132; Q492; R321.2 **Document code:**A

Article ID: 1673-6273(2017)27-5389-03

前言

在哺乳动物中,成熟卵母细胞减数分裂阻滞在减数第二次分裂中期,等待与精子受精。受精过程主要分为以下步骤:精子-卵冠丘复合体结合,精子-透明带结合/融合,精子解聚,卵母细胞激活,原核形成。原核形成是受精过程中重要的一步,是判断受精成功的金标准,常规 IVF 受精率一般在 70-80%。如果受精后 14-18 h,所有卵母细胞均未见原核形成,继续培养仍未见卵裂胚胎,称为受精失败(total fertilization failure, TFF)。文献报道排除男方因素后,传统 IVF 受精失败的发生率在 2-3%^[1]。此外,一些大型研究报道 ICSI 受精失败的发生率为 1.3%和 3%^[2]。受精失败的原因从卵母细胞考虑,可能是透明带异常、卵母细胞提前激活、卵母细胞胞质不成熟等因素;从精子因素考虑,

可能是精子未能穿透透明带(ZP)、精子缺乏激活因子等因素造成的。

当患者遇到受精失败的情况,该周期将无可移植胚胎,这不仅给患者身体和心理都造成了极大的负担,对于胚胎学家而言也带来了困扰。本周传统 IVF 受精失败的病人中,10%左右病人在下一 ICSI 周期中仍出现受精失败的现象。因此,探索受精失败的阻滞阶段和预防措施将成为现在体外受精-胚胎移植所需解聚的一大难题。下面将就受精不同阶段可能出现的问题进行逐一综述。

1 精子穿越卵冠丘复合体障碍

在卵母细胞方面,大量动物试验表明卵子分泌的旁分泌因子可以调节卵丘细胞的特化和扩张。这类扩张是由于卵子内生

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(312715596)

作者简介:戴菁(1991-),女,硕士研究生,主要研究方向:受精与早期胚胎发育,E-mail:daijing.0508@qq.com

Δ 通讯作者:林戈,E-mail:linggf@hotmail.com

(收稿日期:2016-12-06 接受日期:2016-12-29)

长特化因子-9(GDF-9)和骨形成蛋白-15(BMP-15)^[1]或者另外一条信号通路 SMAD2/3 的激活子调控形成透明质酸酶^[4],透明质酸酶分泌的增加使卵冠丘复合体(COC)扩张,卵丘细胞凋亡的增加导致 IVF 临床的受精率低。研究发现卵丘细胞的 GDF-9 和 BMP-15 mRNA 水平与卵子成熟、受精、胚胎发育有关^[4]。此外,通过调节卵丘细胞的转录水平可以影响卵丘细胞的生长与功能。目前有研究认为卵丘细胞的转录组学能预测卵子受精潜能和发育潜能。

在精子方面,肝素和透明质酸酶对于精子获能、穿透卵丘细胞起了重要作用。精子穿过卵丘细胞主要依靠精子膜表面上大量的透明质酸酶,如果来源于男性生殖道透明质酸酶少或精子未获能达到超活力状态,则可能导致精子无法穿过卵丘细胞。在临床上,对于穿越卵丘细胞障碍的卵子,在脱去颗粒细胞后观察透明带上不粘精子。

2 精子-透明带结合与穿透障碍

精子在穿越卵丘细胞后会与 ZP 结合、穿透、进入卵周间隙与卵膜融合。卵子透明带通过识别、结合精子头部糖蛋白的受体分子。人类透明带蛋白包括 ZP1、ZP2、ZP3、ZP4^[6]。ZP3 与精子结合的初级受体,ZP2 为次级受体。普遍为大家接受的观点是:精子结合到 ZP3 上诱发顶体反应,裸露的精子顶体内膜结合 ZP2,进而穿透透明带^[7]。然而,有新的研究发现精子先与 ZP2 结合^[8],皮质颗粒释放蛋白酶水解 ZP2,破坏 ZP 受体,阻止多精受精^[9]。

在卵母细胞方面,初级受体 ZP3 与精子的结合类型有蛋白-蛋白结合、碳水化合物-蛋白结合以及一些未知的结合类型。在鼠的精子-ZP 识别中,ZP3 上 O- 连寡糖和 N- 连多糖起结合作用^[10]。ZP 上多糖的氧化作用会导致精子结合数量下降,但不会完全不结合。敲除 O- 连寡糖或 N- 连多糖的小鼠是可育的。通过扫描电镜对 ZP 结构进行观察^[11],发现在卵子成熟过程中 ZP 的结构会发生改变,表现在糖结合物的分布、密度、位置的改变。有研究表明 ZP3 结构或显微结构异常会影响精子诱导顶体反应;卵子成熟会影响 ZP 糖蛋白产生的信号通路,导致精子识别;外源促性腺激素影响 ZP 结构,可能影响精子结合^[12]。然而,现在有关于人 ZP 蛋白的研究较少,其具体机制仍有待进一步研究。

在精子方面,精子与 ZP3 相结合后释放顶体内酶,顶体内酶主要包含丝氨酸蛋白酶、顶体酶等。随着顶体内膜的裸露,与 ZP2 结合后穿透 ZP 蛋白。因此,由于圆头精子缺乏顶体结构,无法发生顶体反应,这类病人需要通过 ICSI 加辅助激活来受精,通过这种方式,使得这类病人的受精率达到正常水平。此外研究表明精子膜表面的完整性会影响受精。然而,顶体酶酶活与受精失败的相关性存在争议,顶体酶结合顶体反应发生率可能是受精潜能的评价指标。精子顶体 gACE(原始血管紧张素转化酶)的缺乏会导致 IVF 受精失败或受精率低^[13]。对于不育男性中有超过 25% 的患者存在 "ZP 诱发顶体反应障碍 "(DZPI-AR)^[14]。这类患者精液常规检查正常,但 ZP 上精子诱发顶体反应率低,导致受精失败或受精率低等现象。在临床上,为防止精子-透明带结合与穿透障碍,可以观察 ZP 诱发顶体反应率来预测受精结局或用人工合成 ZP3 来检测顶体反应诱发情况。

3 精子-卵膜结合障碍

穿透 ZP 后,精子进入卵子间隙,卵膜与精子赤道板部分质膜结合并发生膜融合,位于精子头部后端的细胞核进入卵子。

在卵母细胞方面,通过电镜观察到卵膜表面有大量微绒毛,微绒毛能包裹精子头部,有助于精卵融合。而精子很难与卵膜微绒毛缺乏的部分融合,人卵子微绒毛的分布受雌激素水平的调控,很多研究聚焦在研究卵子微绒毛与精子赤道部分的结合与融合分子上。SAS1B(卵子微绒毛膜限制性金属内切蛋白酶)能与精子 SLLP1 结合,SAS1B 与 SLLP1 为第一对确定的参与精子-卵膜识别过程的分子^[15]。已有研究证明位于微绒毛上的卵膜四次跨膜蛋白 CD9 参与精子的结合,使用 CD9 抗体封闭或 CD9 缺乏的小鼠模型导致精卵膜融合能力下降或缺乏,其卵子微绒毛的长度、密度、厚度改变。然而最近更多的研究表明 CD9 在精卵附着方面起重要作用,CD9 外泌体与精子结合^[16]。跨膜蛋白及一些周围蛋白会形成多分子复合物,在复合物中的一些蛋白也会影响精子的结合与融合,如 fertilin(整合素)、GPI(糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白)。研究表明 fertilin(即 ADAM)的敲除不会影响精卵结合与膜融合^[17]。GPI 的敲除会导致不孕及精子结合数量的急剧下降^[18]。最新研究发现 Juno 为参与精子-卵膜融合分子,与精子上 IZUMO 蛋白相互作用^[19],对受精成功起关键作用。

在精子方面,CRISP(富含半胱氨酸分泌蛋白)家族位于精子并参与膜融合。CRISP1/DE 蛋白参与膜融合,精子在卵膜缺乏微绒毛的部分无法发生膜融合^[20]。IZUMO-null 的精子能穿越 ZP,但无法与卵膜融合。在临床上,精子-卵膜结合或融合障碍无法进行预测,但可以通过对上周期未受精的卵子脱 ZP 进行诊断以确定阻滞阶段,方便在下一周期采取卵胞浆内单精子注射的受精方式。

4 卵子激活不完全

在精子与卵膜融合后进入卵胞浆内,卵子会发生一系列的形态及生理的变化,这个过程为卵子激活,大致分为两个主要事件:皮质反应阻滞多精受精及释放第二极体并完成第二次减数分裂。

在卵母细胞方面,防止多精受精的主要系统是皮质颗粒(CGs)的外泌物进入卵周间隙。在皮质反应中,CGs 分泌的蛋白酶水解 ZP2,β- 己糖苷酶消化 ZP3 上的寡糖受体使 ZP" 硬化",活动精子无法继续结合到 ZP 上,而已经结合到 ZP 上的精子无法继续穿透 ZP^[21]。

在精子方面,精子进入胞浆后会引发引起卵子 Ca²⁺ 的震荡。Ca²⁺ 储存于滑面内质网,释放后与内源的三磷酸受体(IP3)结合^[22]。关于受精后 Ca²⁺ 是如何在卵子中释放有几个假说,其中被普遍接受的是来源于精卵结合后精子所释放的因子。在十年前,这种因子得到验证为 PLCζ^[23]。已有文献报道 PLCζ 的缺失或缺少会导致不同程度的受精失败^[24]。升高的 Ca²⁺ 水平激活了钙/钙调依赖性激酶 II(CaMK II)^[25],此外,高的 Ca²⁺ 水平使 Emi2 迅速降解,恢复活性的 APC 可以降解 Cyclin B 和使 Cdc2 失活,从而破坏了 CSF 诱导的 MII 阻滞,排除第二极体,实现中期到后期的转化。在临床上,可以通过组蛋白和鱼精蛋

白的免疫荧光染色来确定本周期受精失败的是否由于卵子激活不完全造成,下周期可采用 Ca^{2+} 辅助人工激活的方式受精。

5 精子去浓缩及原核形成失败

卵子激活后,精子将在卵胞浆内进行修饰过程。精子发生解凝聚并形成原核(PN)主要包括以下三个步骤:① 无孔的精子核膜的去除;② 核纤层蛋白的重组;③ 染色质的解凝聚^[26]。精子解凝聚是指精子的染色质由鱼精蛋白紧密缠绕包裹,使精子头部保护防止 DNA 碎片的产生,在进入卵子后,鱼精蛋白被卵子内组蛋白替代,形成较松散的结构。卵子对精子解凝聚的能力是由卵子成熟程度决定的。卵子中谷胱甘肽的含量的成熟过程中逐渐增加,这也是精子解凝聚和雄原核形成所需物质。此外,精子染色体过早凝聚(PCC)在受精失败卵子的较普遍的病理现象,这可能是由于卵子激活不完全导致的^[27]。

精子解凝聚后周围会募集 γ -微管蛋白形成精子星体^[28]。精子星体染色质周围会包裹有核纤层蛋白的核膜,成为雄 PN。雄 PN 先于雌 PN 或与雌 PN 同时形成,雌 PN 最先在第二极体附近形成,逐渐变大,沿着微管在微管动力蛋白的作用下,向雄 PN 迁移,最后形成并列的两个原核。但若卵子存在原核形成的障碍,原因可能是细胞骨架的异常或核膜组装障碍导致,现无有效解决办法,若提高卵子成熟度仍无法解决则需要患者考虑供卵周期。

6 受精失败的预防措施

目前,在临床上如遇到 IVF 受精失败的现象,在第二周期将会改为 ICSI 的受精方式。然而,在 ICSI 受精中,仍有 10% 的受精失败的病人再次出现受精失败^[29],对于这部分病人,通常会在第三周期采取 ICSI 加辅助激活的受精方式^[30]。若再次出现受精失败,现在临床并无有效的解决办法。因此,深入地认识受精的过程及其机制能为受精失败的预防提供帮助。我院将本周期受精失败的废弃受精卵通过知情同意,收集后通过免疫荧光染色,根据卵胞浆内鱼精蛋白和组蛋白的信号来判断精子是否进入,精子进入卵母细胞的解聚情况,原核形成情况等等,从而指导下一周期治疗。若精子阻滞在结合 ZP 或与卵膜结合阶段,下一周期可采用 ICSI 的方案;若阻滞在卵子激活或形成原核的过程中,下一周期可采用 ICSI 加辅助人工激活的方案,这样可以防止受精失败再次出现,避免无可移植胚胎而取消周期给病人带来的身心负担。

参考文献(References)

- [1] Zhu J, Jiang H, He RB, et al. Association between etiologic factors in infertile couples and fertilization failure in conventional in vitro fertilization cycles[J]. *Andrology*, 2015, 3(4): 717-722
- [2] Goksan PE, Sinem CG, Dogus DO, et al. Uncommon but devastating event: total fertilisation failure following intracytoplasmic sperm injection[J]. *Andrologia*, 2016, 48(2): 164-170
- [3] Fernandez T, Palomino J, Parraguez VH, et al. Differential expression of GDF-9 and BMP-15 during follicular development in canine ovaries evaluated by flow cytometry [J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 167: 59-67
- [4] Xing N, Liang Y, Gao Z, et al. Expression and localization of Smad2 and Smad4 proteins in the porcine ovary [J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(8): 1301-1306
- [5] Castro FC, Cruz MH, Leal CL, The role of growth factors GDF9 and BMP15 in ovarian function and its importance in Mammalian Female Fertility[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2015. [Epub ahead of print]
- [6] Xu WX, Bhandari B, He YP, et al. Mapping of epitopes relevant for induction of acrosome reaction on human zona pellucida glycoprotein-4 using monoclonal antibodies[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 68(6): 465-475
- [7] Rodler D, Sasanami T, Sinowatz F. Assembly of the inner perivitelline layer, a homolog of the mammalian zona pellucida: an immunohistochemical and ultrastructural study[J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195 (4): 330-339
- [8] Gupta SK, Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans[J]. *J Reprod Immunol*, 2015, 108: 90-97
- [9] Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, et al. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein[J]. *Science*, 2010, 329(5988): 216-219
- [10] Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM. Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm [J]. *Dev Biol*, 1984, 106(1): 243-255
- [11] Novo S, Barrios L, Ibáñez E, et al. The zona pellucida porosity: three-dimensional reconstruction of four types of mouse oocyte zona pellucida using a dual beam microscope[J]. *Microsc Microanal*, 2012, 18(6): 1442-1449
- [12] Pökkylä RM, Lakkakorpi JT, Nuojua-Huttunen SH, et al. Sequence variations in human ZP genes as potential modifiers of zona pellucida architecture[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(8): 2669-2672
- [13] Li LJ, Zhang FB, Liu SY, et al. Human sperm devoid of germinal angiotensin-converting enzyme is responsible for total fertilization failure and lower fertilization rates by conventional in vitro fertilization [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(6): 125
- [14] Liu DY, Liu ML, Baker HW. Defective protein kinase A and C pathways are common causes of disordered zona pellucida (ZP)--induced acrosome reaction in normozoospermic infertile men with normal sperm-ZP binding[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1): 86-91
- [15] Sachdev M, Mandal A, Mulders S, et al. Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization[J]. *Dev Biol*, 2012, 363(1): 40-51
- [16] Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, et al. Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits[J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 125(1-4): 170-179
- [17] Bulstrode H, Jones LM, Siney EJ, et al. A-Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 10 and 17 promote self-renewal of brain tumor sphere forming cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 326(1): 79-87
- [18] Evans JP. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization [J]. *Bioessays*, 2001, 23 (7): 628-639
- [19] Bianchi E, Doe B, Goulding D, et al. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization [J]. *Nature*, 2014, 508 (7497): 483-487
- [20] Légraré C, Cloutier F, Makosso-Kallyth S, et al. Cysteine-rich secretory protein 1 in seminal plasma: potential biomarker for the distinction between obstructive and nonobstructive azoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(5): 1253-1260

- [27] Qu Z, Zhang Y, Liao M, et al. In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2012, 42: 922-933
- [28] Qu Z, Zhang Y, Liao M, et al. In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2012, 42: 922-933
- [29] Xiong Y, Lu QJ, Zhao J, et al. Metformin inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells by inducing apoptosis via mitochondrion-mediated pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 3275-3279
- [30] Bhalla K, Hwang BJ, Dewi RE, et al. Metformin prevents liver tumorigenesis by inhibiting pathways driving hepatic lipogenesis [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5: 544-552
- [31] Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies[J]. *Gut*, 2013, 62: 606-615
- [32] Hassan MM, Curley SA, Li D, et al. Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2010, 116: 1938-1946
- [33] Zhang H, Gao C, Fang L, et al. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients: a meta-analysis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48: 78-87
- [34] Zhang ZJ, Zheng ZJ, Shi R, et al. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 2347-2353
- [35] Singh S, Singh PP, Singh AG, et al. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108: 881-891
- [36] Lai SW, Chen PC, Liao KF, et al. Risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients and risk reduction associated with anti-diabetic therapy: a population-based cohort study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107: 46-52
- [37] Bhat M, Chaiteerakij R, Harmsen WS, et al. Metformin does not improve survival in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 15750-15755
- [38] Chen TM, Lin CC, Huang PT, et al. Metformin associated with lower mortality in diabetic patients with early stage hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26: 858-865
- [39] Zhang X, Harmsen WS, Mettler TA, et al. Continuation of metformin use after a diagnosis of cirrhosis significantly improves survival of patients with diabetes[J]. *Hepatology*, 2014, 60: 2008-2016
- [40] Chaiteerakij R, Petersen GM, Bamlet WR, et al. Metformin use and survival of patients with pancreatic cancer: a cautionary lesson [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 63: 3511
- [41] Du rui, Lu Jieli, Bi Yufang, et al. antidiabetic medication and malignancy [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and metabolism*, 2016, 32 (3): 253-256

(上接第 5391 页)

- [21] Tanphaichitr N, Kongmanas K, Kruevaisayawan H, et al. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm-egg recognition: roles of acrosomal proteins[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4): 574-582
- [22] Alzayady KJ, Wang L, Chandrasekhar R, et al. Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca^{2+} release[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(422): 35
- [23] Swann K, Lai FA. The sperm phospholipase C-zeta and Ca^{2+} signalling at fertilization in mammals [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44 (1): 267-272
- [24] Chithiwala ZH, Lee HC, Hill DL, et al. Phospholipase C-zeta deficiency as a cause for repetitive oocyte fertilization failure during ovarian stimulation for in vitro fertilization with ICSI: a case report [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(9): 1415-1419
- [25] Bruno C, Cavalluzzi MM, Rusciano MR, et al. The chemosensitizing agent lubeluzole binds calmodulin and inhibits Ca/calmodulin-dependent kinase II[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 116: 36-45
- [26] Ortega MA, Ko M, Marh J, et al. Presence of the Paternal Pronucleus Assists Embryo in Overcoming Cycloheximide Induced Abnormalities in Zygotic Mitosis [J]. *J Cell Biochem*, 2016. [Epub ahead of print]
- [27] Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, et al. Sperm contributions to oocyte activation: more that meets the eye [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(3): 313-316
- [28] Tanimoto H, Kimura A, Minc N. Shape-motion relationships of centering microtubule asters[J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(7): 777-787
- [29] Vanden MF, Nikiforaki D, Heindryckx B, et al. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(5): 560-571
- [30] Sfontouris IA, Nastri CO, Lima ML, et al. Artificial oocyte activation to improve reproductive outcomes in women with previous fertilization failure: a systematic review and meta-analysis of RCTs [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(8): 1831-1841