

88-94

第25卷 第1期
1997年2月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 1
Feb. 1997

哺乳动物显微受精研究进展*

刘 灵¹ 钱菊汾¹ 陈大元² ✓

(1 西北农业大学动物医学系, 陕西杨陵 712100)

(2 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘 要 全面系统地总结了哺乳动物显微受精的发展历史和现状, 从注射部位、精子状态、精子发生、卵子状态、卵子激活等方面阐述了影响显微受精的主要因素, 并指出了在我国开展显微受精的重要性和必要性。

关键词 显微受精, 受精技术, 哺乳动物

中图分类号 Q954.44

显微受精是 80 年代后期发展起来的一种新型的体外受精技术, 即借助显微操作仪, 将精子或精子细胞直接注入卵母细胞质内(卵胞质内受精, Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) 或卵周隙中(带下受精, Subzonal Insemination, SUZI)来实现受精的过程。这一技术不仅对于揭示哺乳动物雌雄配子间的相互作用和受精本质等具有重的理论意义, 而在提高优良种公畜的利用率和治疗男性不育方面具有重要的实践意义, 尤其在野生动物的遗传资源保存及保护和挽救珍稀动物方面具有重要的现实意义和应用前景。如与其他生物工程技术相结合, 必将在畜牧业育种、转基因动物(制药)生产和性别控制等方面发挥一定的作用。

1 研究进展

精子注射试验首次是在啮齿类哺乳动物中进行的。早在 1976 年, Uehara^[1]等将仓鼠和人精子注入仓鼠卵母细胞质中, 观察到精核能够去致密并可以发育形成雄原核, 证明雌雄配子膜融合并非精核去致密和原核发育所必需。此后, Iritani^[2]和 Mann^[3]分别报道了兔单精子胞质内受精和小鼠单精子带下受精成功, 并获得后代, 兔附睾尾精子胞质内受精卵的原核发育率可达 53%, 少数卵可分裂发育至 2~4 细胞; 小鼠成熟精子(活动精子)注入卵透明带下, 受精率可达 25%, 其中 54% 的受精卵发育为个体。迄今为止, 该项技术已先后在大鼠、小鼠、仓鼠、兔、羊、牛、猪、绵羊和马等动物及人取得成功, 并在兔、牛、小鼠、马等动物和人获得了试管后代。进入 90 年代, 相继在澳大利亚、美国、加拿大和法国等国家有大批精子显微受精的试管婴儿诞生, 使该项技术发展为男性不育症治疗的理想手段。人精子胞质内注射的受精率高达 60%~70%, 胚胎附着率也达到 20% 或更高^[4]。精子的功能使成熟卵母细胞受精, 为此, 精子从睾丸中产生, 并经历附睾中的成熟和雌性生殖道中的获能过程, 发生一系列形态、结构和生化变化, 目的是能够到达受精部位(输卵管壶腹部), 并获得受精能力。那么, 变态前的单倍体球形精子细胞能否象精子一样参与基因组

收稿日期: 1996-09-02

* 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室课题资助。

的融合和胚胎发育呢? 1993年, Ogura^[5,4]将仓鼠球形精子细胞核注入成熟的卵母细胞质中, 结果表明75%的受精卵能分裂成2细胞。同年, Ogura^[6]将仓鼠球形精子细胞注射到卵透明带下, 然后加一直流脉冲, 使之融合, 结果20%~40%的精子细胞可融入卵子, 70%的卵子能分裂发育至2细胞。小鼠球形精子细胞与卵母细胞的电融合率为30%, 95%的卵子可分裂为2细胞, 移植后, 获得了6只仔鼠^[6]。此后, 小鼠球形精子细胞核和次级精母细胞核的卵胞质内注射受精也获成功, 并获得试管小鼠^[7,4]。

我国的同类研究起步较晚。1992年, 卢圣忠^[9]进行了牛和猪精子显微受精的研究。牛冷冻精子注射的受精率为19.9%, 分裂率为9.4%; 猪新鲜和冷冻附睾精子注射的受精率达25.2%, 分裂率达21.6%。此后, 罗军^[10]报道了兔单精子胞质内注射受精的成功, 获得70%的桑椹胚和囊胚发育率, 2~4细胞胚胎移植后, 顺产4只健康仔兔。曾嵘^[11]用胞质内注射和带下注射法研究小鼠精子显微受精, 带下受精的受精率达29.2%, 卵裂率为42.8%, 移植后出生两只健康仔鼠, 而小鼠卵的胞质内注射没有取得良好结果。近期资料表明, 我国人冷冻—解冻后卵母细胞ICSI的受精率为42.6%, 未受精卵的再次受精率达36.7%^[12]。此外, 尚未见到更为深入的研究报道。

2 影响显微受精的因素

影响显微受精的因素很多, 其中主要有注射部位, 精子的状态, 精子发生, 卵子状态, 显微受精卵的激活和显微操作环境条件等。

2.1 注射部位

根据注射部位的不同, 显微受精可分为卵胞质内注射和带下注射两种方式。注射方式的选择是依据动物卵母细胞的耐操作能力而定。大量的实验表明, 鼠类, 尤其是小鼠卵母细胞的ICSI十分困难。1983年, Markert仅获得少数囊胚, 直至1995年, Kimura^[12]才获得了首批小鼠ICSI的试管后代。所以鼠类的显微受精多采用带下注射法, 受精率可达67.3%, 其中54%的受精卵可正常发育成个体。在人类, ICSI和SUZI技术都十分有效^[4], 截至1994年8月, 全世界由ICSI技术获得的胚胎, 已使500~600名妇女怀孕, 175个试管婴儿顺利诞生^[13]。Steirteghem^[14]系统研究人ICSI和SUZI的结果表明, ICSI(16.3%)对卵母细胞的机械损伤大于SUZI(8.5%), 同时, ICSI(49.1%)法的正常受精率显著高于SUZI(16.6%), 随后的双原核卵发育率分别为73.9%和80%没有显著差异, 但ICSI法往往比SUZI法产生更多的三倍体胚胎, 受精卵移植后, 分别有29.3%和14.7%的妇女妊娠。可见, ICSI和SUZI两种方法各有优缺点, 一般活的精子多选择SUZI法, 而死的或不完整的精子则选择ICSI法。在家畜, 也可得出类似的结论^[15]。

2.2 精子状态

精子的状态直接影响显微受精的效果。如精子获能与否, 顶体反应与否, 新鲜与否, 活动与否, 完整与否, 死活与否等。

2.2.1 精子获能和顶体反应与否与显微受精 早在1988年, Mann^[3]用体外获能的小鼠附睾尾精子单精子带下受精, 获得25%的受精率和54%的原核发育, 并获得世界首批带下受精的试管小鼠。分别用获能0.5、2和6小时小鼠精子进行SUZI, 其受精率分别为36%, 34%和29%, 不产生明显差异^[16]。Yang^[17]将1个新鲜精子, 2~5个新鲜精子和1个

获能精子分别进行 SUZI, 分别获得 42%, 40% 和 50% 的分裂率和 26%, 35% 和 21% 的囊胚发育率, 表明精子获能与否对 SUZI 不产生显著影响。然而, Minhas^[28]则认为用 IA23187 使小鼠精子获能后, 可明显提高其 SUZI 受精率, 同时, 获能精子比未获能精子有更有效的原核形成和发育能力。精子获能和顶体反应与否对 ICSI 不产生显著影响。

2.2.2 精子新鲜和活动与否与显微受精 Uehara 和 Yanagimachi^[11]提出, 仓鼠精核注射到仓鼠卵内, 可以发育形成雄原核。新鲜、冷冻-解冻、冻干的人精核注射进仓鼠卵也能发育形成雄原核。继这些首创性的试验之后, Hosoi^[18]等将不活动但是活的兔精子注射到兔卵胞质内获得的胚胎, 移植到输卵管内, 获得了仔兔。Goto^[20]采集牛附睾精子, 并进行冷冻保存, 35℃ 冰浴中解冻后, 作获能处理。将获能处理后的精子不加冷冻保护剂深冻(-20℃)-解冻两次, 以停止其运动, 然后单精子注入牛体外成熟的卵母细胞质中, 受精卵可发育到桑椹胚和囊胚期, 并获得 3 头试管犊牛。Heuwieser^[21]进行了常规体外受精和显微受精的比较试验表明, 精子经 IA23187 获能后, 4 头公牛的体外受精率分别为 80%, 54%, 1% 和 2%。精子在不加冷冻保护剂的条件下, 在 -25℃ 冷冻处理以停止其运动, 然后进行 ICSI, 其受精率分别为 39%, 22%, 21% 和 34%, 没有显著差异。表明冷冻精子和不活动精子同样可以获得理想的胞质内受精率。

2.2.3 精子完整与否与显微受精 1993 年, Goto^[15]应用超声波将牛精子头尾分开, 然后将精子头注入体外成熟的卵母细胞质中, 可使卵子受精, 受精卵发育到 2~4 细胞, 6~16 细胞、桑椹胚和囊胚期的比率分别为 30.3%, 6.3%, 2.1% 和 0.3%。澳大利亚皇家北滨医院的资料也表明, 用超声波去掉精子尾巴后, 精子头的 ICSI 受精率由全精子时的 19% 提高到 44%。这些结果表明, 精核是受精卵发育为个体不可少的部分, 而其尾巴, 只是精子的运动器官, 以保证精子能运动到达受精部位。

2.2.4 精子的死活与否与显微受精 关于精子的死活是一个含糊的概念, 为了分析死亡精子的受精发育潜力, Goto^[20]从牛附睾中采集精子, 装在 0.5 mL 塑料细管中冷冻, 25℃ 水浴中解冻后, 在含有 BSA 和咖啡因的 BO 液中预培养 2~3 h, 作获能处理。将获能处理后的精子不加冷冻保护剂深冻(-20℃)-解冻两次, 用 0.5% 伊红 B 液染色, 全部精子都着色, 表明精子已被杀死。将单个的死精子注入牛体外成熟卵母细胞质中, 注射卵用 IA23187 激活后进行体外培养, 发育到 2~4 细胞、6~12 细胞、桑椹胚和囊胚期的比率分别为 12%, 9.3%, 5.9% 和 7.8%。桑囊胚移植后, 3 头受体中有两头怀孕, 分别于移植后的 281 和 288 d 分娩。其中 1 头犊牛因难产而死亡, 经检查, 发育良好, 另一头犊牛发育正常。相反, Yanagida^[21]则以高温法杀死精子, 来分析精核的耐热性。分别采集仓鼠、小鼠、人、鸟和鱼的精子, 用超声波去除质膜和顶体及尾巴后, 精子核于 60~125℃ 水浴或蒸气中处理 20~120 min, 然后单精子核注入仓鼠卵母细胞质内, 结果表明, 精子核于 90℃ 下处理 30 min, 仍具有原核发育潜力。将仓鼠精子核完全灭活的温度高达 125℃, 鸟、鱼和不成熟的仓鼠和小鼠精子核在 90℃ 处理后, 虽可去致密, 但却不能形成雄原核。表明精子核对低温和高温都具有很强的耐受性。死精子同样具有受精和发育潜能。

2.3 精子发生

2.3.1 辜丸和附辜精子与显微受精 从取自不同附辜段精子的体内、体外受精资料中可以看出, 大多数哺乳动物附辜中段或尾段以前的精子不能完成受精。Lacham^[22]比较了小

鼠睾丸、附睾头、附睾体和附睾尾精子的受精潜力。将上述各段精子获能处理 2 h 后,单个注入小鼠成熟卵母细胞的透明带下,结果表明,睾丸和附睾头精子几乎不能使卵子受精,受精率为 0%~7%,远段和近段附睾体及附睾尾的前进运动精子具有相似的受精能力,受精率为 30%~45%,而振动和原地转圈精子的受精率(6%~10%)则明显降低。受精卵体外培养后,附睾体近段、远段和附睾尾精子受精卵发育到囊胚的比率分别为 65%,87%和 94%,附睾尾以前的各段精子带下受精高于常规体外受精。

与带下受精不同,睾丸和附睾精子在卵胞质内受精却十分有效。牛睾丸、附睾(头和尾)和射出精子的 ICSI 受精卵发育到 2~8 细胞期和桑椹胚的比率分别为 31.0%~37.8%和 11.1%~18.2%,没有显著性差异,但睾丸和附睾精子受精卵发育到囊胚的比率(11.4%和 8.9%)显著高于附睾体、附睾尾和射出精子(7.1%,4.4%和 6.7%)受精卵的发育率^[23]。

2.3.2 睾丸变态前生精细胞与显微受精 球形精子细胞是精母细胞减数分裂后形成的最早的单倍体雄性生殖细胞,那么球形精子细胞能否象精子一样参与基因组的融合和胚胎发育呢? Ogura^[5]将仓鼠球形精子细胞核注入成熟卵母细胞中,95%的卵子其精核能够发育形成雄原核,89%的雄原核表现 DNA 合成活性,其染色体可与卵子染色体配合,75%的受精卵能分裂为 2-细胞。同年,Ogura^[6]将仓鼠球形精子细胞注射到卵透明带下,然后加一直流脉冲,使之融合,结果表明 20%~40%的精子细胞可融入,其中 5%~10%的融合卵子其精核可以发育形成正常大小的雄原核,其他卵子其精核发育不全,体积较小,但能形成核仁和合成 DNA,75%的卵子能分裂发育至 2-细胞。同时证明,先用链酶蛋白酶和神经氨酸酶(neuraminidase)处理卵母细胞后,再进行电融合,可获得理想的融合率。这可能是这些酶可以去除卵膜上的某些分子,使配子间能够更加紧密的接触。小鼠卵母细胞则不具有这种特性,而当卵母细胞首先被激活后,可有利于球形精子细胞的融合,融合率可达 30%,80%的融合卵子可发育形成一个大的雌原核和一个很小的雄原核^[6]。

自 Kimura^[12]首次报道了小鼠精子卵胞质内注射技术成功之后,小鼠睾丸生精细胞的显微受精研究取得很大进展。小鼠球形精子细胞核注入电激活的卵母细胞质中,注射成功率高达 96%,可获得 77%的受精率,2-细胞发育率高达 96%~100%。131 枚 2-细胞胚移植后,获得 37 只试管小鼠,产仔率为 28.2%^[7]。此后,Kimura^[8]从成年小鼠睾丸中分离到次级精母细胞,将其核注入卵母细胞质中 2 h,电激活注射卵母细胞,75%的注射卵其精核和卵核各自形成雄原核和雌原核,2-细胞、4-细胞、桑椹胚和囊胚发育率分别为 98%,94.2%,76.9%和 65.3%,29 枚 2-4 细胞胚移植后,产仔鼠 7 只,产仔率为 24%。初级精母细胞核在卵母细胞质中可以完成一次减数分裂,形成雌雄两个原核,染色体检查表明,卵裂球为三倍体。可见,球形精子细胞已具备了潜在的受精能力,精子形成期的变态、精子的附睾成熟、获能和顶体反应等过程,只是为了保证将雄性单倍体核送入卵母细胞,并非受精本质所必需。

关于家畜睾丸变态前生精细胞显微受精研究极少。自 Sofikitis 报道了兔球形精子细胞核 ICSI 成功,并有妊娠和产仔结果之后,Goto^[31]首次报道牛睾丸精子细胞的 ICSI 试验,2-8 细胞、桑椹胚和囊胚发育率分别为 35.7%,11.9%和 7.1%,尚没有试管后代诞生。也没有其它家畜的同类研究报道。

2.4 卵子状态与显微受精

受精是精子和卵子相互作用最终形成合子的过程,已知显微受精往往给卵子造成不同程度的机械损伤,因此,卵子的状态必然对显微受精产生影响。卢圣忠^[9]的试验表明,有第一极体的猪卵母细胞的 ICSI 受精率和分裂率分别可达 32.9%和 32.6%,而无第一极体卵则仅为 16.3%和 10.9%,没有卵子能发育到囊胚期。美国对 141 对夫妇(妇女年龄为 25~44 岁,平均为 34.3 岁)的 ICSI 治疗资料表明,妇女的年龄对 ICSI 的效果有显著性影响,在 36 岁以上妇女的 60 个周期中,注射卵的存活率、适合于冷冻和胚胎移植的胚胎发育率、胚胎移植平均数量和妊娠率均显著低于 36 岁妇女的 103 个周期的结果^[24]。Greenblatt^[25]的研究表明,超数排卵方法直接影响卵母细胞的成熟度,34 名妇女被分为两组(各 17 名)分别进行长 GnRH 和短 GnRH 两种超排处理。注射 hCG 后 36 h 分别回收卵母细胞,短 GnRH 处理和长 GnRH 处理组回收的 M I 期和 M II 期卵母细胞分别为 60%,4%和 26%,81%;两种处理回收的卵母细胞 ICSI 后,其卵裂率分别为 9%和 36%;M I 期卵母细胞 ICSI 后的卵裂率分别为 7.0%和 23.7%;各自能产生的可移植周期分别为 29%和 70%。各组间均有显著差异。表明只有成熟的卵母细胞才能诱导精核正常发育。

2.5 显微受精卵的激活

受精激活包含两个概念,一是卵母细胞的激活,这一激活过程可以由精子激活,也可不依赖于精子的存在而人为激活;另一是精子的激活,精子只有进入卵母细胞后,在成熟卵母细胞质中某些物质的作用下,才能真正激活。卵母细胞的激活是以启动并完成第二次减数分裂,放出第二极体、皮质反应、雌原核的形成与发育和启动卵子代谢为标志。精子激活则以核去致密,雄原核形成和发育及其 DNA 合成等为标志。最终两性原核融合,发生第一次卵裂,进入早期胚胎发育。

Kimura^[7]证明,小鼠睾丸精子象成熟精子一样,具备了激活卵子的因子,将其注入卵胞质后,可形成雄原核,而精子细胞则缺乏这种因子,注射后需要激活处理。虽然精子已具有了激活卵子的能力,由于显微受精部分或全部越过了正常受精时精子必须经过的环节,所以往往不能使卵母细胞完全激活。牛^[15]和兔的显微注射卵于 IA23187 培养液中短时间培养,即可大大改善其受精率。人 ICSI 卵的自发受精率仅为 32%,用 IA23187 处理后,受精率可达 88%。表明 Ca^{2+} 有利于显微受精卵的激活与发育。近期资料表明,由显微操作传递的 Ca^{2+} 不足于激活人卵母细胞,卵母细胞的激活发生在显微注射后的一定时间里,推测激活卵子的因子可能是由注入精子释放的可溶性物质。

2.6 其他

带下受精往往要求精子应具有一定的运动能力或经过获能处理或发生顶体反应,所以,单精子带下受精的效果并不稳定,为克服这一不足,人们常将多个精子注入透明带下,以增加使卵子受精的机会。O'Neill 将 1~35 个精子注入人卵母细胞透明带下,正常受精率为 17.2%,多精子受精率为 9.5%,虽然其受精率较低,但发育至可移植或冷冻保存的胚胎比率高达 98.5%,胚胎移植后的 hCG 阳性率高达 21.4%,17 个怀孕妇女共产 21 个婴儿,其中 4 个妇女均产双胞胎。有趣的是婴儿的性别比例为 8:13(♂:♀)。

显微受精是一项精细操作技术,所以,操作工具的质量往往影响其成败。小鼠卵母细胞不象仓鼠和人卵母细胞,抗损伤力较差,细胞质往往从注射孔流出,卵子迅速崩解。1995

年, Kimura^[15]对显微操作仪做了改进, 安装了 Piezo-pulse 设备, 通过轻微的负压, 在透明带和卵质膜上打孔, 对卵母细胞的损伤大大降低, ICSI 的卵子存活率高达 97%, 世界首批精子胞质内注射受精的试管小鼠诞生。

显微注射针的直径对 ICSI 受精至关重要, 罗军^[10]证明, 使用 5 μm 口径的注射针优于 8 μm 口径的注射针, 注射兔卵的存活率分别为 85.6% 和 61.%; 激活率分别为 59.9% 和 47.2%; 卵裂率分别为 43.5% 和 19.4%。以 7 μm 和 12 μm 外径的注射针进行牛 ICSI 试验表明, 7 μm 针的显微受精率、2-3 细胞、4-细胞、8-细胞、16-32 细胞、桑椹胚和囊胚发育率 (54.5%, 68.0%, 61.1%, 44.0%, 36.1%, 22.2% 和 15.7%) 显著高于 12 μm 注射针的结果 (44.4%, 41.9%, 30.8%, 24.6%, 23.4%, 12.3% 和 4.9%)。因此显微注射针应使用尽可能细的外径。无论注射针的外径多小, ICSI 操作不可避免地对卵母细胞结构造成损伤。注射针进出卵胞质可能破坏卵子的微管系统, 而微管是纺锤体的重要组成部分, 所以可能引起染色体不正常分离, 产生复杂的单倍体或三倍体胚胎。损伤微丝系统, 也引起纺锤体异常, 卵子染色体全部分配给第二极体, 或全部滞留于卵子内, 产生单原核卵和雄性异型的三原核卵。如果将纺锤体移位到卵子中央, 可引起卵子迅速分裂, 形成两个等大的细胞, 而不是一个大的卵细胞, 一个小的第二极体。对附着于纺锤体的染色体和原核的损伤, 往往导致多个小原核卵的产生。

3 显微受精的前景与展望

显微受精作为一项新的体外受精技术, 在短短的 10 年里能得以迅猛发展, 关键在于该项技术同时具有重要的理论价值和实践价值。首先显微受精技术作为一种重要的实验手段, 被广泛应用于受精生物学研究。如精卵识别、精卵相互激活及某些成分对卵子激活的影响等。其次显微受精技术是男性不育治疗的理想手段。自带下受精和胞质内受精的试管婴儿首次诞生以来, 人们比较了男性不育治疗的各种方法, 结果表明, 尽管显微受精的方法还不完全成熟, 并且有先天性畸形发生的危险, 但该项技术仍不失为目前能及的最佳手段, 并制定出了不同程度不育患者的相应治疗方案。再者, 显微受精技术必将在动物育种和野生动物遗传资源保存方面发挥巨大的作用。我国的同类研究相对落后, 仅有试管小鼠和兔诞生, 还没有应用该技术解决男性不育问题的研究报道。我国拥有多种野生动物资源, 但其中大多数均濒临灭绝, 所以开展显微受精技术研究, 无论在人类生育, 还是动物育种和野生动物保护方面, 均具有重要意义。

参考文献

- 1 Tucker MJ, Yanagimachi R. Microsurgically injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male nuclei. *Biol Reprod*, 1976, 15: 467~470
- 2 Irtani A. Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction. *Fert Steril*, 1988, 50: 543~551
- 3 Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjection under the zona pellucida. *Biol Reprod*, 1988, 38: 1077~1083
- 4 Reproduction, fertilization and development. 1995, 7: 135~299
- 5 Ogura A, Yanagimachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod*, 1993, 48: 219~225

- 6 Ogura A, Yanagimachi R. Spermatids as male gametes. *Reprod Fert Devel*, 1995, 7: 155~159
- 7 Kimura Y and Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa and round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 1995, 121: 2397~2405
- 8 Kimura Y and Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod*, 1995, 53: 855~862
- 9 卢圣忠, 朱裕鼎. 牛和猪精子注射法受精研究. 农业科学集刊. 北京: 农业出版社, 1993
- 10 罗军, 范必勤. 单精子注射受精兔胚的体外和体内发育. 中国畜牧兽医学动物繁殖研究会编, 广州, 1993
- 11 曾嵘, 卢光铸, 卢惠霖. 精子显微授精技术的初步探讨. *生殖与避孕*, 1995, 15: 104~108
- 12 李善国, 邵敬敏. 人卵母细胞冷冻保存后显微注射授精的初步研究. *生殖与避孕*, 1996, 16: 88~92
- 13 Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*, 1995, 52: 709~720
- 14 Steirteghem AV, Liu JE, Joris H et al. Assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fert Devel*, 1994, 6: 85~91
- 15 Goto K. Bovine microfertilization and embryo transfer. *Mol Reprod Devel*, 1993, 36: 288~290
- 16 Lacham O, Trounson A, Holden C et al. Fertilization and development of mouse eggs injected under the zona pellucida with single spermatozoon treated to induce the acrosome reaction. *Gamete Research*, 1989, 23: 233~243
- 17 Yang X, Chen J, Chen YQ et al. Improved developmental potential of rabbit oocytes fertilized by sperm microinjection into the perivitelline space enlarged by hypertonic media. *J Exp Zool*, 1990, 155: 114~119
- 18 Minhas B S, Roubesh W E, Ricker D D et al. Treatment of sperm with high ionic strength medium increase microsurgical fertilization rate of rabbit oocytes fertilized by subzonal placement of sperm. *J IVF ET*, 1991, 8: 111~115
- 19 Hosoi Y, Iritani A. Rabbit microfertilization. *Mol Reprod Devel*, 1993, 36: 282~284
- 20 Goto K, Kinoshita A, Takuma Y et al. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Res*, 1990, 127: 517~520
- 21 Yanagida K, Yanagimachi R, Perreault S D et al. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod*, 1991, 44: 440~447
- 22 Lacham O, Trounson A. Embryo development capacity of oocytes fertilized by immature sperm and treated with motility stimulants. *Reprod Fert Devel*, 1994, 6: 113~116
- 23 Goto K, Kinoshita A, Nakanishi Y et al. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in vitro or in vivo derived spermatids into bovine oocytes. *Theriogenology*, 1996, 45: 301
- 24 Tucker M J, Morton P C, Wright G et al. Factors affecting success with intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fert Devel*, 1995, 7: 229~236
- 25 Greenblatt E M, Meriano J S, Casper R F. Type of stimulation protocol affects oocyte maturity, fertilization rate, and cleavage rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fert Steril*, 1995, 64: 557~563

Advances in Microfertilization in Mammals

Liu Ling¹ Qian Jufen¹ Chen Dayuan²

(1 Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 State Key Laboratory of Productive Biology, Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract This paper, at first, presents the developing history and the status quo of the microfertilization in mammals. Then, a systematic exposition is made on the main factors which affect microfertilization, such as spermatozoa injection position, spermatozoa state, spermatogenesis, oocyte state, oocyte activation and so on. The paper also points out it is important to do further research work on microfertilization in China.

Key words microfertilization, fertilization technique, mammal