

- nanoparticles conjugated with anti- P-glycoprotein antibody to overcome multidrug resistance[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21): 9249-9258.
- 36 Gutierrez-Iglesias G, Hurtado Y, Palma-Lara I, et al. Resistance to the antiproliferative effect induced by a short-chain ceramide is associated with an increase of glucosylceramide synthase, P-glycoprotein, and multidrug-resistance gene-1 in cervical cancer cells[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(4): 809-817.
- 37 吕锡芳,王英红. 多药耐药基因产物在宫颈癌中的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(9): 1794-1797.
- 38 吕纳男,孔为民. 宫颈癌耐药基因的表达及其与同步放化疗疗效的关系[J]. *肿瘤学杂志*, 2006, 12(5): 385-388.
- 39 张媛,李胜泽. Ki-67、P-糖蛋白预测宫颈癌新辅助化疗敏感性的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(12): 977-981.
- 40 刘思思,田佳,张美艳,等. 细胞周期突变体相关蛋白激酶2、P-糖蛋白和谷胱甘肽巯基转移酶- $\pi$ 在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(13): 58-62.
- 41 王漪,陈必良. p53蛋白O-乙酰氨基葡萄糖修饰介导宫颈癌细胞的顺铂耐药[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(19): 3004-3008.
- [收稿日期 2020-01-13][本文编辑 韦颖 韦所芬]

#### 本文引用格式

陈莹莹,曾笑梅. 糖基化与宫颈癌及其临床应用的研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2020, 13(11): 1175-1178.

## 新进展综述

# 人睾丸单倍体圆形精子细胞鉴别技术研究进展

毛献宝(综述), 薛林涛(审校)

基金项目: 广西卫健委科研课题(编号:Z20180742)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 毛献宝(1985-),男,硕士,助理研究员,研究方向:辅助生殖实验室技术。E-mail: gxm\_mxb@163.com

**[摘要]** 圆形精子细胞注射(ROSI)技术是通过显微注射技术将单倍体圆形精子细胞注射入成熟卵母细胞中,使卵母细胞受精进而分裂形成胚胎的技术,是目前部分非梗阻性无精子症患者获得自己遗传学后代的最后希望。圆形精子细胞为单倍体雄性生殖细胞,是精原细胞经过减数分裂后变形成为精子前的最后一个阶段,主要通过睾丸穿刺取精术(TESA)或显微外科睾丸取精术(Micro-TESE)获得。虽然已经有ROSI试管婴儿出生,但总体来说ROSI技术效率(妊娠率、活产率)较低,因此到目前为止国内外还没有广泛推行该技术,其中不能准确鉴别活体单倍体圆形精子细胞是导致ROSI技术效率低下的主要原因之一。该文对目前几种鉴别人睾丸单倍体圆形精子细胞的方法进行综述。

**[关键词]** 无精子症; 圆形精子细胞; 男性不育; 圆形精子细胞注射技术

**[中图分类号]** R 698.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2020)11-1178-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.11.26

**Research progress in identification techniques of human testis haploid round spermatid** MAO Xian-bao, XUE Lin-tao. *Center for Reproductive Medicine and Genetics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China*

**[Abstract]** Round spermatid injection(ROSI), a technique by which haploid round spermatids are injected into mature oocytes through microinjection to fertilize the oocytes and then divide them into embryos, is the last hope that non-obstructive azoospermia patients may obtain their own genetic offsprings. Round spermatids, haploid male germ cells, the last stage before spermatogonia undergo meiosis to form sperm, and are collected mainly through testicular sperm aspiration(TESA) or microscopic testicular sperm extraction(Micro-TESE). Although ROSI test-tube babies have been born, the ROSI technology efficiency(pregnancy rate, live birth rate) is generally low, and so far this technology has not been widely implemented at home and abroad. The inaccurate identification of living haploid round spermatids is one of the main reasons for the inefficiency of ROSI. This paper introduces several methods to identify human testis haploid round spermatid.

**[Key words]** Azoospermia; Round spermatid; Male infertility; Round spermatid injection(ROSI) technology

世界范围内大约有 15% 的已婚夫妇遇到生育困难<sup>[1]</sup>,且发病率有逐年增加趋势,已经成为全球性社会问题,其中因男性生育能力下降所致近 50%<sup>[2]</sup>。男性不育中约 15% 是由无精子症导致<sup>[3]</sup>。无精子症分为梗阻性无精子症 (obstructive azoospermia, OA) 和非梗阻性无精子症 (non-obstructive azoospermia, NOA)。对于 OA 患者,由于睾丸生精功能正常,经睾丸穿刺取精术 (testicular sperm aspiration, TESA) 获得精子后,行卵母细胞胞浆内单精子显微注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI),其妊娠率与射精精子 ICSI 相当<sup>[4]</sup>。对于 NOA 患者,由于睾丸生精功能异常,大约 40% 患者经显微外科睾丸取精术 (microscopic testicular sperm extraction, Micro-TESE) 后未发现精子,目前这类患者大多被建议选择供精,这给患者家庭带来极大的负面心理影响,而 30% 上述患者的睾丸组织中存在圆形精子细胞<sup>[5]</sup>。1993 年 Ogura 和 Yanagimachi<sup>[6]</sup>将仓鼠的圆形精子细胞核注入卵周隙,通过电融合,使圆形精子细胞融入卵母细胞,之后形成原核,提示圆形精子细胞可以使卵子受精。1994 年 Ogura 等<sup>[7]</sup>报道了首例通过圆形精子细胞注射 (round spermatid injection, ROSI) 技术出生的正常小鼠,证明圆形精子细胞具有与精子同样的使卵母细胞受精及发育的潜能。随后,Edwards 等<sup>[8]</sup>建议可采用圆形精子细胞治疗人类男性不育。随着 1996 年第一例人类 ROSI 试管婴儿的诞生<sup>[9,10]</sup>,这为部分 NOA 患者获得具有自己遗传学信息的后代带来了希望。然而,目前 ROSI 技术效率 (妊娠率、活产率) 低也是不争的事实<sup>[11]</sup>,这也是国内外还没有广泛推行该技术的原因。而导致 ROSI 技术效率低下的一个主要原因可能是错将其他圆形细胞当成圆形精子细胞进行注射<sup>[5]</sup>,因此,如何从多种睾丸圆形细胞中准确地挑选出活体单倍体圆形精子细胞是该技术成功的关键之一。

## 1 ROSI 技术提出的理论基础

人类精子发生 (spermatogenesis) 起始于精原细胞 (spermatogonia) 的分化,终止于成熟精子的形成,历时共计约 65 d,分为以下 4 个阶段:精原细胞增殖分化形成初级精母细胞 (primary spermatocyte);初级精母细胞经过减数分裂 I 形成次级精母细胞 (secondary spermatocyte);次级精母细胞经过减数分裂 II 形成单倍体圆形精子细胞 (round spermatid);圆形精子细胞经过变形形成精子 (spermatozoa)。因此圆形精子细胞是完成减数分裂 II 后,在变形成具有运动能力的功能性精子之前的单倍体细胞,含有一整套可

复制的遗传物质,并且含有中心体,DNA 甲基化印记已经完成<sup>[12]</sup>,组蛋白-鱼精蛋白的转变几乎还没有开始。从理论上讲,跨过自然受精所必需的组蛋白-鱼精蛋白转换等复杂的精子核 DNA 修饰,直接把圆形精子细胞注射入卵母细胞中使其正常受精并发育成胚胎,这可能是将单倍体父方 DNA 传递到卵母细胞中的一种有效手段<sup>[8]</sup>。

## 2 人睾丸圆形精子细胞的鉴别方法

虽然 ROSI 技术已经实施多年,但导致其效率低下和阻碍其广泛应用的许多问题尚待解决,其中如何快速准确地鉴别出活的单倍体圆形精子细胞便是一个技术挑战。要提高人类 ROSI 技术的成功率,必须具备准确的形态学鉴别和分离正常的活体圆形精子细胞的方法。按鉴别后圆形精子细胞能否应用于后续 ROSI,目前人睾丸单倍体圆形精子细胞的鉴别方法大致可分为非活体鉴别法和活体鉴别法两大类。

### 2.1 非活体鉴别法

此类方法研究较多,目前主要有化学染色法、免疫荧光法和荧光原位杂交法 (fluorescence in situ hybridization, FISH)。这几种方法对于鉴别单倍体精子细胞较为直观,但是鉴别后的单倍体圆形精子细胞不再具备生物学活性,因此不能进行后续的 ROSI,但是它们可以作为一种指导方法,为前期正确地认识人睾丸单倍体圆形精子起到指导作用。化学染色法:基于正负离子彼此结合的化学反应,碱性染料与酸性细胞核发生中和反应使细胞核着色,酸性染料使细胞质中的碱性蛋白质染色,通过细胞各组分嗜性不同而导致染色效果不同来分析细胞形态。目前常用的染色方法有 Diff-Quik 法、瑞士-姬姆萨法、改良品红法和苏木精法等,染色效果也有一定的差别。Diff-Quik 法染色后,细胞质呈蓝色,细胞核呈紫红色,核质分明。人睾丸细胞中粗线期初级精母细胞核最大,其次为精原细胞、各级精母细胞、支持细胞 (Sertoli 细胞)、圆形精子细胞。Sertoli 细胞的细胞核为均匀着色的整块染色质,有突出的核仁,细胞质有时部分丢失。精原细胞胞体完整,多为卵圆形,染色质较粗。前细线/细线期初级精母细胞胞核大于精原细胞和次级精母细胞,染色质疏松。粗线期初级精母细胞胞体大,胞核大,染色质颗粒状或粗糙条索状。在减数分裂 I 后期见到两个已经分离的核。次级精母细胞染色质较疏松,颗粒状,次级精母细胞极少见。在减数分裂 II 后期见到两个已经分离的核,染色质清晰。圆形精子细胞核小,染色质块状,着色深<sup>[13]</sup>。有研究<sup>[14]</sup>认为瑞士-姬姆萨染色法对小鼠圆形精子细胞染色效果较

好。该类方法操作简单,使用耗材少,对于初步认识不同阶段的生精细胞是一种简单易行的方法。免疫荧光染色法:精子发生过程中不同阶段生精细胞有表达不同的特异性蛋白(抗原),如 VASA 蛋白在精原细胞中特异性表达,其表达量最高,在精母细胞中表达减少,在精子细胞中表达很少,在精子中不表达<sup>[15]</sup>。MCA(meichroacidin)从粗线精母细胞到圆形精子细胞阶段的细胞质中都有表达,精子尾部轴丝上也有表达<sup>[16]</sup>。Smp-1(spermatid-specific manchette-related protein 1)蛋白表达于长形精子细胞的尾侧细胞质,但在成熟精子中消失<sup>[17]</sup>。h-Tektin-T 蛋白特异性表达于尾部轴丝上,形成丝状聚合物<sup>[18]</sup>。通过使用对应的 4 种阶段特异性生精细胞蛋白抗体进行免疫荧光染色,然后通过 400 倍放大的荧光显微镜下观察来鉴定不同发育阶段的生精细胞:精原细胞仅 VASA 染色,具有非常明显的核膜,细胞核和细胞质的直径分别为 7.22  $\mu\text{m}$  和 9.03  $\mu\text{m}$ 。前细线期至偶线期(P-Z)精母细胞仅 VASA 染色,细胞核和细胞质直径分别为 8.66  $\mu\text{m}$  和 12.50  $\mu\text{m}$ ,比精原细胞大而不规则;粗线期精母细胞 VASA 和 MCA 均染色,细胞核和细胞质直径分别增加到 12.3  $\mu\text{m}$  和 16.72  $\mu\text{m}$ ,是精子发生过程中最大的生精细胞。圆形精子细胞主要 MCA 染色,很少 VASA 染色,较精母细胞小,细胞核和细胞质直径分别为 5.78  $\mu\text{m}$  和 8.44  $\mu\text{m}$ ,由于轴丝尚未发育,圆形精子细胞均未被 h-Tektin-t 染色。长形精子细胞和精子由于形态学较为特殊,因此易于区分<sup>[19]</sup>。由于每种荧光抗体定位较为准确,可根据染色的状态和细胞的形态绘制不同阶段的生精细胞图谱,因此可以用于鉴别不同阶段的生精细胞。FISH:FISH 技术是一种重要的非放射性原位杂交技术,其基本原理是被检测的染色体或 DNA 纤维切片上的靶 DNA 与所用的核酸探针是同源互补,二者经变性-退火-复性,可形成靶 DNA 与核酸探针的杂交体,在荧光显微镜下根据杂交荧光信号来对待测 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。FISH 技术操作简单,敏感度高、特异性强,能同时显示多种颜色,既能用于显示中期染色体数量或结构,也能用于显示间期染色体。圆形精子细胞已经完成减数分裂 II,是单倍体生精细胞,采用多色 FISH,然后在荧光显微镜下根据杂交荧光信号来区分单倍体精子细胞<sup>[20]</sup>,也可以用于对根据细胞大小、细胞核和细胞质等形态特征挑选出的活体圆形精子细胞进行准确性验证<sup>[5]</sup>。但是该技术也存在一定的局限性:探针具有特异性,一种探针只能检测一种

染色体,而目前探针种类有限,因此无法应用于所有染色体检查;并且荧光信号易受多方面因素影响,可能会出现有假阴性及假阳性结果。

**2.2 活体鉴别法** 目前主要有线粒体染色法和活体细胞显微镜直接观察法。采用这两种方法鉴别后的单倍体圆形精子细胞仍然具备生物学活性,可以进行后续的 ROSI,是目前 ROSI 技术主要采用的单倍体圆形精子细胞活体鉴别法。线粒体染色法:Mito Tracker 是一种活细胞线粒体特异性荧光探针,对细胞核内的 DNA 染色作用较小,对线粒体的染色不依赖于线粒体膜电位。在圆形精子细胞阶段,随着细胞核和细胞质的浓缩,线粒体开始极化并且浓缩到细胞质的基极。该方法基于线粒体的极化模式,在荧光显微镜下能够准确直观地鉴别活体的圆形精子细胞。Sutovsky 等<sup>[21]</sup>首先报道采用该种无创的方法获得恒河猴和牛的圆形精子细胞用于 ROSI,通过 Nomarski 差分干涉差显微镜观察到的顶体颗粒或顶体帽的存在,证实了该方法获得活体圆形精子细胞的准确性。Hikichi 等<sup>[22]</sup>研究发现,其他的细胞被染色后不能出现线粒体偏极效应,故此效应可能为圆形精子细胞所特有。由于 Mito Tracker 会通过质膜被动地扩散并在活跃的线粒体中积累,因此也可能在细胞核中积累,这取决于孵化的时间和浓度。他们用不同浓度 Mito Tracker 染色后的小鼠圆形精子细胞与未染色的圆形精子细胞分别行 ROSI,发现当浓度 < 200 nmol/L 时,胚胎的发育能力与未染色组相似,并且有正常的子代出生;但当浓度 > 500 nmol/L 时,对胚胎发育有不利影响。可见圆形精子细胞经线粒体被染色后再用于 ROSI 治疗男性不育会存在潜在风险。因此,在 Mito Tracker 法选择圆形精子细胞用于临床之前,还需要对人类生殖细胞线粒体染色如何影响受精、妊娠和新生儿等方面进行更深入和广泛的研究。活体细胞显微镜直接观察法:无需对精子细胞进行特殊处理,对精子细胞无损伤,相对安全,但需要配置专业的显微镜观察系统,目前主要有倒置相差显微镜观察法、Hoffman 调制相衬显微镜观察法和微分干涉差(differential interference contrast, DIC)显微镜观察法。前一种观察法成像效果不如后两种,因此目前报道主要应用的是 Hoffman 调制相衬显微镜观察法和 DIC 显微镜观察法。Hoffman 调制相衬系统通过检测光学梯度(或斜率)并将其转换为光强度变化,使观测物体呈现出由相位梯度决定的明显的三维外观,提高未染色和活体生物材料的可见度和相衬度,目前主要应用于辅助生殖技术中

配子和胚胎质量的观察。刘书华<sup>[23]</sup>应用该技术分析 NOA 患者圆形精子细胞,发现圆形精子细胞直径在 5~7  $\mu\text{m}$ ,细胞核直径在 4~6  $\mu\text{m}$ ,细胞核质比例较固定,细胞圆形,细胞表面光滑,细胞质较亮,细胞核较均匀,在圆形精子细胞较早阶段细胞核多位于细胞的中心位置,较后阶段,细胞核较多位于细胞的边缘。通过 FISH 技术对挑选出的圆形精子细胞进行验证,发现其准确性仅 68.5%。DIC 显微镜又称 Nomarski 相差显微镜,是 Nomarski 在相差显微镜原理的基础上改进的新一代活体细胞观测显微镜,利用光线穿过溶液中带有不同折射率的物质时产生的相差来增强反差,生成立体感更强的浮雕状的三维立体影像,细胞内外各种边界清晰、细节明显、对比度适当,可以准确、生动地显示细胞、细胞核的边界、细胞质内的细胞器颗粒、核仁、染色质颗粒等细微结构,适合显微操作。Tanaka 等<sup>[5]</sup>应用该技术挑选 NOA 患者活体圆形精子细胞用于 ROSI,发现圆形精子是最小的生精细胞,直径约 6~8  $\mu\text{m}$ ,精原细胞 8~10  $\mu\text{m}$ ,精母细胞 10~12  $\mu\text{m}$ ,与其他生精细胞不同,它们没有明显的核仁,细胞核周围的细胞质边缘比精原细胞更薄。在精原细胞中常可见突出的伪足,但圆形精子细胞中不可见。顶体小泡或顶体帽是精子细胞的确切证据,但他们发现仅有约 10% 的精子细胞存在这个结构。他们还发现圆形精子细胞的另一个重要特征,用 ICSI 注射针轻微抽吸圆形精子细胞时,其细胞质很容易与细胞核分离。虽然有些精原细胞与圆形精原细胞相似,但并不能像精原细胞那样轻易地将其细胞质与细胞核分离。淋巴细胞与圆形精子细胞大小相似,但有一层坚硬的细胞质膜,即使通过有力的抽吸也无法破坏使核质分离。他们用 FISH 和染色体核型分析技术对挑选出的圆形精子细胞进行验证,准确率接近 100%。Tanaka 等<sup>[24]</sup>最近报道 90 个通过该技术出生的婴儿,其 2 岁前的生理和智力发育与自然生育婴儿没有差异,至少从目前数据资料来说,该技术是安全可行的。但该技术也存在一定的局限性: DIC 显微镜具有光学特性须与玻璃载体相匹配,常规使用的塑料细胞培养皿由于折射率的不同,会影响图像的立体感和清晰度;由于观测样本厚度也会影响成像效果,因此观察皿的制作要求较高;鉴别不同阶段的生精细胞具有一定的主观性,制定精确统一的鉴别标准存在一定的难度,因此该技术需要经验丰富的操作人员。

### 3 结语

ROSI 技术是当前部分 NOA 患者获得自己遗传

学后代的最后希望,而不能准确鉴别活体单倍体圆形精子细胞是目前 ROSI 技术效率较低而无法广泛应用于临床的主要原因之一。非活体鉴别法对于鉴别单倍体精子细胞较为简单直观,但不能用于活体鉴别,鉴别后不能用于后续 ROSI,主要用于对通过其他方法获得的圆形精子细胞进行准确性验证。活体鉴别法鉴别后的活体单倍体圆形精子细胞可用于后续 ROSI,但由于线粒体染色法使用了荧光染料,因此在应用于临床之前,还需要更深入的研究其是否对人类生殖细胞受精、胚胎发育、妊娠结局和新生儿发育等方面造成影响。DIC 显微镜观察法是目前临床上主要应用于 ROSI 的活体单倍体圆形精子细胞鉴别方法,但该方法具有一定的主观性,需要经验丰富的操作人员进行操作。精子中心体作为微管组装的中心,在正常受精过程中起着至关重要的作用,而微管组装对于雌雄原核的相互靠拢和融合至关重要。虽然目前活体单倍体圆形精子细胞的鉴别已有较高准确性,但是部分用于 ROSI 的圆形精子中心体可能是不成熟的,因为并没有对其中心体功能进行检测,这或许也是导致 ROSI 效率低的一个影响因素。因此活体单倍体圆形精子细胞的鉴别与挑选技术还需要进一步完善,以期挑选出功能完整、具有受精潜能的圆形精子细胞行 ROSI。随着国内越来越多动物试验的陆续开展<sup>[25~31]</sup>,相信经过不断的研究和改进,不久的将来一定会突破 ROSI 技术效率低下的瓶颈。

### 参考文献

- 1 黄荷凤,王波,朱依敏. 不孕症发生现状及趋势分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(9): 688-690.
- 2 李铮,张忠平,黄翼然,等,译. 世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 1-2.
- 3 Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of azoospermia[J]. Spermatogenesis, 2014, 4: e28218.
- 4 Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia[J]. Urology, 1997, 49(3): 435-440.
- 5 Tanaka A, Nagayoshi M, Takemoto Y, et al. Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(47): 14629-14634.
- 6 Ogura A, Yanagimachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy[J]. Biol Reprod, 1993, 48(2): 219-225.
- 7 Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(16): 7460-7462.
- 8 Edwards RG, Tarin JJ, Dean N, et al. Are spermatid injections into

- human oocytes now mandatory? [J]. *Hum Reprod*, 1994, 9(12): 2217 - 2219.
- 9 Tesarik J, Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development[J]. *Hum Reprod*, 1996, 11(4):772 - 779.
  - 10 Tesarik J, Rolet F, Brami C, et al. Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia[J]. *Hum Reprod*, 1996, 11(4):780 - 783.
  - 11 Vloeberghs V, Verheyen G, Tournaye H. Intracytoplasmic spermatid injection and in vitro maturation: fact or fiction? [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68(Suppl 1):151 - 156.
  - 12 Shamanski FL, Kimura Y, Lavoie MC, et al. Status of genomic imprinting in mouse spermatids [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(4):1050 - 1056.
  - 13 石敏, 李贤新, 宋博, 等. 人睾丸中各级生精细胞的鉴定[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2006, 38(4):441 - 443.
  - 14 刘建伟, 孟小倩, 陈玉洁, 等. 五种染色方法对小鼠圆形精子染色效果的比较[J]. *生物医学工程研究*, 2010, 29(2):113 - 116.
  - 15 Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, et al. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(17):9585 - 9590.
  - 16 Tokuhiro K, Hirose M, Miyagawa Y, et al. Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(27):19039 - 19048.
  - 17 Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tokuhiro K, et al. Isolation and characterization of the spermatid-specific *Smrp1* gene encoding a novel manchette protein[J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(6):967 - 975.
  - 18 Iguchi N, Tanaka H, Nakamura Y, et al. Cloning and characterization of the human *tektin-t* gene[J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(6):525 - 530.
  - 19 Okuda H, Tsujimura A, Yamamoto K, et al. Morphologic and mitochondrial characterization of human spermatogenic cells dispersed in wet preparation for testicular sperm extraction: establishment of a microscopic diagram of developing human spermatogenic cells[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(8):2665 - 2668.
  - 20 Tanaka I, Tanaka A, Nagayoshi M, et al. Fish analysis on human spermatogenic cells in patients diagnosed as not having testicular sperm with MD-TESE[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(4):S131.
  - 21 Sutovsky P, Ramalhosantos J, Moreno RD, et al. On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker™ and high resolution differential interference contrast microscopy[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(9):2301 - 2312.
  - 22 Hikichi T, Kishigami S, Thuan NV, et al. Round spermatids stained with mitotracker can be used to produce offspring more simply[J]. *Zygote*, 2005, 13(1):55 - 61.
  - 23 刘书华. 人单倍体圆形精子细胞识别方法的研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2014.
  - 24 Tanaka A, Suzuki K, Nagayoshi M, et al. Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes; survey of their development from fertilization to 2 years of age[J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(3):443 - 451.
  - 25 夏小雨, 郭陈智, 徐晨. 利用流式分选技术富集小鼠单倍体精子细胞[J]. *中华男科学杂志*, 2014, 20(2):106 - 110.
  - 26 黄静, 姜宏, 汪存利, 等. 化学激活在小鼠圆形精子细胞体外受精中的应用[J]. *中华男科学杂志*, 2014, 20(2):111 - 116.
  - 27 杨丽娟. 小鼠圆形精子细胞蛋白组学鉴定及 mINCA1 基因真核表达载体的构建[D]. 太原:山西医科大学, 2014.
  - 28 姜宏, 王丽, 汪存利. 小鼠微量圆形精子细胞冷冻保存方法研究[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(8):698 - 701.
  - 29 姜宏, 王丽, 汪存利, 等. 冻融小鼠圆形精子细胞在体外受精中的应用研究[J]. *中华男科学杂志*, 2017, 23(12):1059 - 1062.
  - 30 杨爱军, 于春娜, 牛焕付, 等. 不同融合参数对小鼠圆形精子细胞与卵母细胞融合胚胎发育的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(1):53 - 58.
  - 31 赵晴, 韩睿钦, 王琳芳, 等. 一种利用吖啶橙染色快速鉴定重力密度梯度沉降法中生精细胞类型的方法[J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(5):591 - 595.
- [收稿日期 2018 - 10 - 05][本文编辑 韦颖 韦所苏]

#### 本文引用格式

毛献宝, 薛林涛. 人睾丸单倍体圆形精子细胞鉴别技术研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2020, 13(11):1178 - 1182.