

IVF 精卵结合障碍精子因素遗传学诊疗专家共识

中华医学会男科学分会

IVF 精卵结合障碍精子因素遗传学诊疗专家共识编写组

【关键词】IVF; 精卵结合障碍; 精子; 遗传学

中图分类号: R321.1 文献标志码: A doi: 10.13263/j.cnki.nja.2023.04.015 ①

体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)是卵子和精子在体外结合的过程。研究表明,男性精子因素是导致受精失败的主要原因之一^[1]。精子数量少、浓度低、活力差以及异常形态率高等均可能造成受精失败,但是在临床实践中,即使是上述精液参数指标正常的男性患者,应用IVF技术仍可能出现完全受精失败或受精率低下的情况,推测极有可能与精卵结合障碍有关。本共识从精子与卵丘细胞、透明带((zona pellucida, ZP)以及卵质膜之间的识别过程为主线,从遗传学角度归纳总结了由于精子因素导致IVF精卵结合障碍的原因(其中圆头精子症所致的受精失败不在本文共识中探讨),并提出相应的诊疗方案,以期提高IVF受精率和减少卵子完全受精失败的发生。

1 精子参与精卵结合的生物学过程

在哺乳动物受精过程中,精子在穿过宫颈管进入子宫腔及输卵管腔的过程中,精浆内大量的去能因子被阻挡,顶体表面的糖蛋白被女性生殖道分泌物中的 α 、 β 淀粉酶降解,同时顶体膜中胆固醇与卵磷脂比例和膜蛋白结构发生变化,降低了顶体膜稳定性,使精子获得穿过卵子并与卵子结合的能力,这就是精子获能,这一过程可以在体外实现^[2]。获能的精子首先要穿过卵丘细胞,然后再识别并穿过透明带,最后与卵子发生质膜融合,其中任何一个环节出现问题,均可导致精卵结合障碍。

IVF技术的发展使得人们能够在体外借助显微技术连续观测精子和卵子的相互作用和结合,卵丘

细胞是精子进入卵子的第一道屏障。为了穿透坚固的卵丘细胞,需要精子表面的一种糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)锚定的表面透明质酸酶(PH-20)来消化卵丘细胞中的透明质酸,使精子穿过卵丘细胞到达透明带^[2]。此后,为了穿透这层保护层,精子顶体外膜与精子质膜融合,顶体细胞内囊泡各种酶类释放,消化卵子周围的糖蛋白,发生顶体反应(acrosome reaction, AR)^[3]。只有发生AR后的精子才能够与ZP结合,进入膜间相互作用发生的卵周间隙区域,精子与ZP的结合是精卵相互作用的必要条件^[4]。最后,精子必须识别并粘附在卵母细胞质膜上,通过质膜融合,形成一个新的二倍体完成最终的受精^[5]。受精过程见图1。

2 病因与遗传学研究

2.1 精子穿过卵丘细胞过程

2.1.1 LYZ14 人c型溶菌酶(human c-type lysozyme, LYZ)属于人c型溶菌酶/乳清蛋白超家族成员之一^[6]。LYZ14基因编码1条146个氨基酸残基的肽链,分子中存在8个保守的半胱氨酸残基。LYZ14由睾丸和附睾分泌后定位于成熟精子头部的顶体膜上,不但可在精卵结合过程中发挥作用,还能够结合透明质酸并清除自由基。因此,LYZ14可能作为一种多功能分子在精子保护及精卵结合过程中发挥作用^[7]。

2.1.2 SPAM1和HYAL5在啮齿类动物中,附睾精子含有至少两种透明质酸酶SPAM1和HYAL5,它们能被GPI锚定在顶体膜上^[8]。由于精子到达

① 通讯作者: 商学军, Email: shangxj98@sina.com; 高媛, Email: gaoyuan@sduivf.com; 严杰, Email: yanjiebjmu@bjmu.edu.cn

卵母细胞-卵丘复合体后能通过顶体反应释放透明质酸酶, SPAM1 和 HYAL5 被认为能在精子穿透卵丘基质中起一定作用^[9]。在一项猪模型上进行的

IVF 试验显示, 抗猪精子透明质酸酶的多克隆抗体抑制精子与卵子的相互作用, 重组 SPAM1 可以在 IVF 试验中分散卵母细胞-卵丘复合体^[10]。

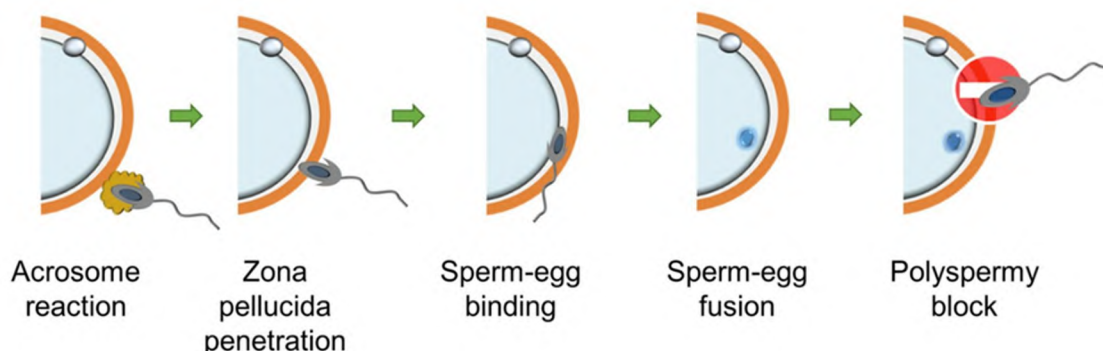


图1 哺乳动物受精过程示意图

(本图引自 Bianchi, et al, 2020)

2.2 精子顶体反应和与透明带识别过程

2.2.1 PC4/PCSK4 前蛋白转化酶 4 (proprotein convertase 4, PC4) 也称为前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 4 (proprotein convertase subtilisin/Kexin 4, PCSK4), 属于哺乳动物枯草杆菌酶 9 个超家族成员之一^[11]。PC4 可存在男性生殖系统的睾丸、精子和附睾中, 在大多数情况下, 它存在于精子表面、头部和顶体中, 并通过激活精子表面蛋白在哺乳动物受精过程中起着至关重要的作用^[12]。研究显示, PC4 基因敲除小鼠由于精子顶体反应过早而表现出严重的男性生育能力受损^[13]。

2.2.2 ZP 和 ACR 精子-透明带反应的缺陷是受精失败的主要原因之一。近期一项研究发现, ACR 基因也能通过影响精子与透明带结合导致精卵结合失败。ACR 基因可编码 ACROSIN, ACROSIN 是一种主要的顶体酶, 仅在精子头部顶体中表达。既往研究显示敲除 Acr 基因雄性仓鼠会受精障碍, 导致雄性不育。该研究采用全外显子组测序 (full-exome sequencing, WES) 对 8 对完全受精失败的男性致病基因进行鉴定, 发现 ACR 突变会导致精子的顶体蛋白缺乏和顶体超微结构缺陷。缺乏 ACROSIN 的精子不能穿透 ZP, 从而导致受精失败^[14]。

2.2.3 CATSPER 和 KCNU1 精子在发生、成熟, 特别是受精过程中与外界环境的离子交换对精子功能至关重要。精子中能够通过电生理手段检测到电流的钙通道是 CatSper 通道。它是一个由 4 个主亚基 (CATSPER1-4) 和多个辅助亚基 (CATSPER β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 τ 和 EFCAB9 等) 组成的碱激活的精子特异性通道, 在介导精子受精中起至关重要的作用^[15]。

CATSPER 主亚基和辅助亚基的编码基因敲除小鼠的精子不能穿透透明带而导致雄性不育。利用全外显子测序, 最近的一些研究发现 CATSPER2^[16]、CATSPER3^[17] 和 CATSPER ϵ ^[18] 是特发性男性不育症的发病基因。CATSPER2 和 CATSPER ϵ 基因突变的男性不育患者精子丧失孕酮诱导的顶体反应能力^[16-17], 而 CATSPER3 基因突变的男性不育患者精子则丧失了自发顶体反应能力^[18]。这些患者的精子均不能体外受精, 而借助卵细胞胞质内单精注射均成功受孕^[16-18]。

KSper 通道是目前能够通过电生理手段检测到电流的钾通道。它主要负责精子细胞膜的超极化^[19]。小鼠基因敲除模型揭示 KSper 通道由主亚基 SLO3 (由 Kcnu1 编码) 和辅助亚基 LRRC52 组成。Kcnu1 基因敲除小鼠雄性不育, 其精子获能时不能正常超极化从而影响精子超活化运动以及自发顶体反应^[19]。KCNU1 基因突变导致男性不育并且精子不能发生顶体反应^[20-21]。

2.3 精卵融合过程

2.3.1 IZUMO1 IZUMO1 为雄性睾丸特异性表达的一种蛋白, 属于免疫球蛋白超家族的一员, 位于发生顶体反应的精子表面, 对细胞之间的黏附有重要作用, 是首先明确的能够介导精卵结合的蛋白^[22]。研究显示, 敲除 Izumo1 基因的雄鼠表现为不育, 使用去除透明带的卵与敲除 Izumo1 基因的小鼠精子进行体外孵育, 发现出现了多精入卵现象, 因此, IZUMO1 对精卵结合受精至关重要^[23]。此外 CRISPR 技术的发展还发现 SPACA6、FIMPI1 的雄性小鼠都表现出 IZUMO1 缺陷, 它们产生的精子虽然

形态和活力正常,但无法与卵子结合^[14, 24-25]。

2.3.2 ACTL7A, ACTL9 和 PLCZ1 卵子受精的过程大致可分为精子入卵前和精子入卵后(图2),IVF受精失败涉及的过程主要在精子进入卵质膜前的环节,包括精子与透明带识别与结合、顶体反应、精子与卵质膜识别与锚定,即图2所示步骤1~6,此后过程虽然也会影响精卵的结合,但卵子激活障碍等过程主要影响ICSI受精,近年来发现的与卵子激活障碍相关的基因有 *PLCZ1*, *ACTL7A* 和 *ACTL9*。*ACTL7A* 和 *ACTL9* 睾丸特异表达蛋白的相关蛋白,可参与顶体与核膜的锚定,其致病性突变体可能会导致卵母细胞激活因子特异性磷脂酶 C (phospholipase C zeta, PLC ζ) 的缺失或异常定位,导致精卵融合失败,无法受精^[26-30](详细内容见“ICSI受精障碍精子因素遗传学诊疗的专家共识”)。

2.4 卵母细胞因素 精卵结合不但要求男方的精子要有一定的质量,同时也要求女方的卵子具有正常的生理功能。

ZP 在卵子周围形成一层保护层,是精子进入卵细胞膜的主要屏障。在人类中,这种细胞外基质由4种蛋白质组成,分别为 ZP1、ZP2、ZP3 和 ZP4^[31]。经典的受精理论认为,ZP3 是精子的初级受体和顶体反应的诱导物,主要介导了精子与透明带的结合,而 ZP2 是精子的次要受体,发生 AR 后的精子才能与 ZP2 结合。研究显示,ZP2 的 N 端蛋白水解裂解降低了精子结合卵子的能力^[32]。在人类受精过程中,具有生物活性的重组人 ZP3 可与人精子上的神经元甘氨酸受体结合或者烟碱乙酰胆碱型受体结合而诱发顶体反应^[33]。

近年来研究者还发现了与卵母细胞发育有关的 *TUBB8* 基因,*TUBB8* 在卵母细胞和早期胚胎中特异表达,该基因编码几乎所有表达的微管蛋白。*TUBB8* 突变将破坏微管功能,影响卵母细胞减数分裂纺锤体组装过程,造成小鼠和人类卵母细胞的减数分裂停滞^[34]。与卵母细胞发育相关的还有 *WEE2* 基因,*WEE2* 是一种关键的卵母细胞特异性激酶,参与控制小鼠卵母细胞减数分裂,有研究发现,*WEE2* 纯合突变可导致人类卵母细胞受精失败,向注射精子后的卵母细胞注射 *WEE2* cRNA 可挽救受精失败表型,并在体外诱导囊胚形成,提示 *WEE2* 可能是人类卵子因素受精障碍的致病基因^[35]。

3 诊断

3.1 临床表现 IVF 精卵结合障碍的患者通常表现为不育,与正常人群相比无其他特征性临床表现,

需依靠辅助学检查协助诊断。

3.2 辅助检查

3.2.1 精液参数特征 此类患者大多精子总数、精子浓度、精子活力、前向运动精子比例等指标均在正常范围内或经过处理后能达到 IVF 标准的轻度少、弱、畸形精子症,标准为精子浓度 $\geq 5 \times 10^6/\text{ml}$,精子正常形态率 $\geq 1\%$,经洗涤后前向运动精子 $< 2 \times 10^6/\text{ml}$,但 $\geq 0.5 \times 10^6/\text{ml}$ ^[36]。

3.2.2 精子大体和超微电镜形态学特征 目前关于精子形态学研究大多集中在 *ACTL7A* 和 *ACTL9* 上。在精子大体形态学研究发现 *ACTL7A* 和 *ACTL9* 突变精子头部畸形比例很高,包括锥形精子的比例增加和低比例的圆头精子^[37]。而通过透射电子显微镜观察也发现 *ACTL7A* 和 *ACTL9* 突变体的精子顶体和精子核周层(perinuclear theca, PT)超微结构异常,*ACTL9* 突变精子的 PT 松弛,顶体皱褶,内顶体膜与核膜分离。*ACTL7A* 突变患者的精子显示出较小的顶体,甚至没有顶体^[29-30]。

3.2.3 精子功能检测 精子功能异常,如顶体缺陷、无顶体透明质酸酶分解卵丘细胞、精子不能穿过放射冠以及顶体酶活性降低或消失等均可导致受精能力丧失。这些缺陷有赖于精子功能的检测,如顶体酶反应检测、顶体反应检测等。

3.2.4 透明带诱导的顶体反应实验 可采用荧光标记技术(DNA 荧光、凝集素荧光等)结合电镜观察来评定精卵结合及穿透 ZP 的成败。ZP 诱发的顶体反应则可以通过 FITC 标记着色来进行检测,其结果可作为 IVF 治疗中预测受精成败的一项敏感指标^[38]。透明带诱导的顶体反应实验(ZP-induced acrosome reaction, ZPIAR)可作为受精失败的预征象,此实验阳性者,需警惕受精失败可能。

3.2.5 小鼠卵母细胞激活试验 小鼠卵母细胞激活试验(mouse oocyte activation test, MOAT)是将患者精子注射入 MII 期小鼠卵母细胞中,通过评估二细胞胚胎形成率,来协助判断受精失败与精子因素的相关性^[39-42]。将激活结果分为三组:(1)MOAT1组:激活率为 0~20%,认为精子激活能力缺陷,受精失败极有可能与精子因素相关,圆头精子症患者属于此类;(2)MOAT2组:激活率为 21%~84%,认为精子激活能力减弱,受精失败可能与精子因素相关;(3)MOAT3组:激活率为 85%~100%,认为精子具有正常的激活能力,受精失败与精子因素相关性较小^[41-44]。但仍需人卵母细胞钙分析、粒子成像测速法进一步检测加以验证^[45]。

3.2.6 遗传基因诊断 不明原因的反复受精失败

患者,可常规进行外周血染色体核型筛查和/或基因组拷贝数变异测序(copy number variation sequencing, CNV-Seq)。若患者精子存在明确精子形态学异常,特别是顶体和 PT 超微结构异常,可首选对 *ACTL9* 和 *ACTL7A* 基因进行 panel 检测,对于 panel 未筛查到明确致病基因患者,可选择全外显子组测序。临床上也可通过定量实时聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qPCR)检测 *PLCZ1* 基因 mR-

NA 表达水平,免疫荧光和免疫印迹分析可定位和量化 PLC ζ 蛋白,在精卵结合障碍的患者中 PLC ζ 阳性精子的百分比低于 30%。同时,MOAT1 组患者中 PLC ζ 数量和定位模式发生改变,无法激活卵母细胞的精子,其头部的赤道区显示为 PLC ζ 定位异常或缺失的模式,以上遗传学筛查为遗传咨询提供关键信息。

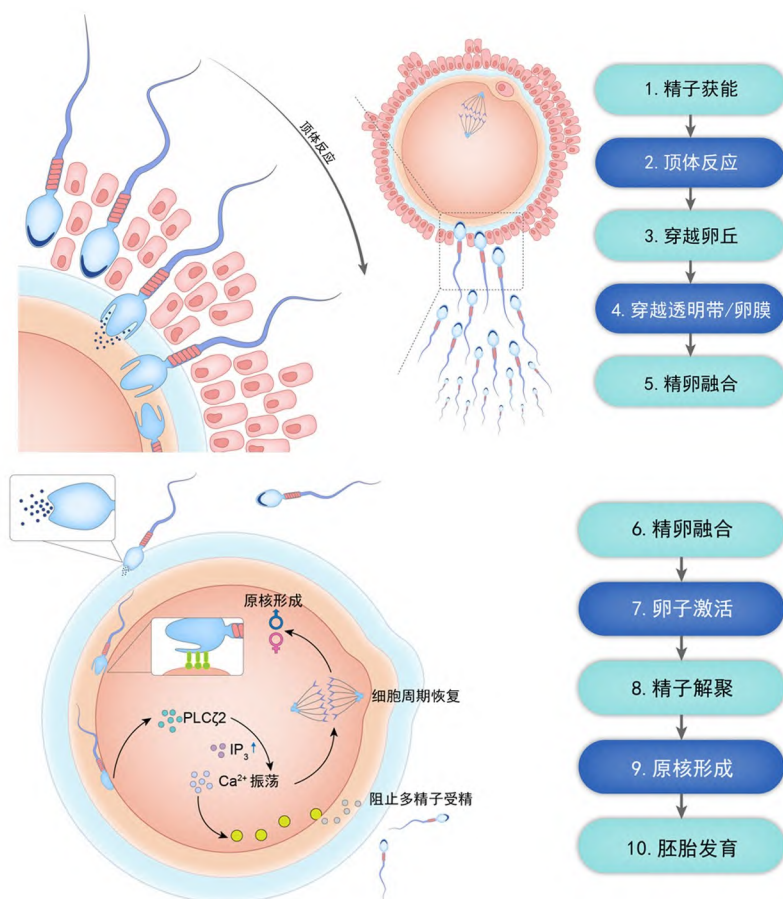


图 2 人卵母细胞受精过程图

4 治疗

4.1 Half-ICSI 和补救-ICSI 临床上为了预防 TFF, 对于精液质量较低或原因不明的男性不育患者,可一部分进行常规 IVF,另一部分行 ICSI(即 Half-ICSI)。有研究发现,对于 IVF 受精率低的患者,下周期通过 Half-ICSI 助孕,其妊娠结局与 IVF 受精正常周期的差异无统计学意义,由此认为 Half-ICSI 不仅能有效防止完全受精失败,还能获得较理想的妊娠结局,避免周期取消,是有效预防完全受精失败的方法^[46-47]。近些年随着短时受精和早期补救 ICSI 在国内的普及,Half-ICSI 已经逐渐被取代。

在发生低受精和不受精的情况时,对于没有受精的卵子还可以实施补救 ICSI。补救 ICSI 按照补救时间可分为早期补救 ICSI 和晚期补救 ICSI,晚期补救 ICSI 补救时间是在授精后 16 ~ 20 h 才进行的,由于机械损伤、卵母细胞老化和胚胎与子宫内膜发育不同步等原因,导致其受精率低,受精异常率高,妊娠率低,流产率高^[48-49]。晚补救的临床结局并不理想,其应用存在较大争议,

早期补救 ICSI 的理念被提出,即在授精后 4 ~ 6 h 去除卵子外周的颗粒细胞,通过第二极体预判受精情况,对低受精和不受精的卵子即刻实施早期补救 ICSI。早期补救 ICSI,不仅避免了晚期补救 ICSI

固有的卵母细胞老化以及胚胎与子宫内膜发育不同步的问题,而且减轻了因长时间孵育,精子和颗粒细胞代谢产物对卵母细胞潜在的不利影响,从而有效降低了周期取消和无胚胎移植的风险,显著改善临床结局^[50-51],也不增加胎儿流产及新生儿出生缺陷的风险,是一种安全有效的补救方法^[52-53]。但是,早补救 ICSI 操作与早去除颗粒细胞操作相连锁,对原核形成和基因印记的影响尚不明确,仍有待多中心、大规模、前瞻性临床试验来证实其安全性。临床应用的过程中需要严格把握适应症。

4.2 ICSI 在 IVF 临床治疗中,前次低受精(<30%)或完全受精失败(total fertilization failure, TFF)下一个周期可以采用 ICSI。IVF 低受精或 TFF 的原因主要与精子-ZP 反应的缺陷有关^[54],这类特异性精子功能障碍导致的 IVF 受精失败和男性不育统称为 DZPIAR^[55],由于 DZPIAR 的患者的顶体反应发生率较低,精子穿过透明带能力低下或完全丧失,导致大多数甚至全部卵子不受精,而且在多次 IVF 治疗周期中也会反复出现类似结果^[56]。虽然,有研究发现孕酮和钙离子载体可诱发顶体反应,但由于孕酮诱发顶体反应的百分率很低,而钙离子载体诱发顶体反应可能导致大量精子死亡,故孕酮和钙离子诱发顶体反应主要还是用于科研^[57-58]。因此,DZPIAR 的患者首选 ICSI,ICSI 是体外受精后绕过精卵细胞融合缺陷的最有效治疗方法,能够显著提高受精率和妊娠率,避免受精失败^[57],特别是明确为 *CATSPER*,*ACR* 等基因突变的患者。

4.3 ICSI 和 AOA 精卵融合是受精过程中的关键步骤,需要精子和卵母细胞中的一系列蛋白质分子介导质膜粘附和融合。而 *PLCZ1*, *ACTL7A* 和 *ACTL9* 致病性突变由于影响顶体和 PT 的超微结构,常规 IVF 治疗受精率低,也可通过 ICSI 结合人工卵母细胞激活(artificial oocyte activation, AOA)来挽救, AOA 具体方法和安全性详见“ICSI 受精障碍精子因素遗传学诊疗的专家共识”,在此不再赘述。

5 遗传咨询

精卵受精过程涉及诸多步骤,只有具有完整功能的精子才能避免 IVF 受精失败,因此对于精卵结合障碍的患者进行全面的精子功能检测是必要的。对于原发不孕且不孕原因不明,但精液分析正常或接近正常的男性不育患者,应该首先进行 ZPIAR 实验,若患有 DZPIAR 则避免行 IVF,避免受精失败。

同时,针对性的相关基因检测也十分重要。精子顶体和 PT 超微结构异常的患者可进行 *ACTL9* 和

ACTL7A 基因检测,必要时可行胚胎植入前遗传学检测(PGT)避免再次出现类似后代。也可根据精卵结合的生物学过程,针对性进行相关精子功能检测,确定可能障碍的生物学过程,以此检测编辑相关蛋白的基因,如 *IZUMO1*、*PC4* 基因等,针对性进行遗传备孕指导,以期取得更好的治疗效果,减轻患者的精神和经济的负担。

IVF 精卵结合障碍精子因素遗传学诊疗 专家共识编写组成员

顾问:

商学军(南京大学医学院附属金陵医院/东部战区总医院)
高媛(山东大学附属生殖医院)
严杰(北京大学第三医院)

组长:

林典梁(福建医科大学附属福建省妇幼保健院/福建省人类精子库)
杨晓玉(南京医科大学第一附属医院/江苏省人民医院)
沙艳伟(厦门大学附属妇女儿童医院/厦门市妇幼保健院)
刘丽荣(厦门医学院附属第二医院)
李博(空军军医大学唐都医院)

专家组成员(按姓氏拼音排序):

戴菁(中信湘雅生殖与遗传专科医院)
高媛(山东大学附属生殖医院)
贺小进(上海交通大学医学院附属第一人民医院)
李琳(首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院)
李朋(上海交通大学医学院附属第一人民医院)
李友筑(厦门大学附属第一医院)
刘文生(广东省生殖医院)
谭跃球(中信湘雅生殖与遗传专科医院)
魏晓利(云南大学医学院)
吴金香(福建医科大学附属第二医院)
尹太郎(武汉大学人民医院)
杨宏毅(厦门大学附属妇女儿童医院/厦门市妇幼保健院)

参考文献

- [1] Humm KC, Sakkas D. Role of increased male age in IVF and egg donation: Is sperm DNA fragmentation responsible? *Fertil Steril*, 2013, 99(1):30-36.
- [2] 杨沫, 杨兴雯, 李默. 精卵识别分子机制研究进展. *中华生殖与避孕杂志*, 2019, 39(2): 161-164.
- [3] Hirohashi N, Yanagimachi R. Sperm acrosome reaction: Its site and role in fertilization. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 127-133.
- [4] 宋力雯, 汪玉宝. 人类精卵结合与不育症的研究进展. *中华男科学杂志*, 2005, 11(8): 611-614.

- [5] Bianchi E, Wright GJ. Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. *Annu Rev Genet*, 2016, 23(50):93-111.
- [6] Zhang K, Gao R, Zhang H, *et al.* Molecular cloning and characterization of three novel lysozyme-like genes, predominantly expressed in the male reproductive system of humans, belonging to the c-type lysozyme/alpha-lactalbumin family. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 1064-1071.
- [7] 黄鹏, 钱能, 杜望春, 等. 人源类溶菌酶蛋白4在受精过程中的作用及酶学性质研究. *中华男科学杂志*, 2018, 24(2): 109-115.
- [8] Kimura M, Kim E, Kang W, *et al.* Functional Roles of Mouse Sperm Hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in Fertilization. *Biol Reprod*, 2009, 81(5): 939-947.
- [9] Avella MA, Xiong B, Dean J. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *The Annals of Occupational Hygiene*, 2013, 19(5): 279-289.
- [10] Yoon S, Chang KT, Cho H, *et al.* Characterization of pig sperm hyaluronidase and improvement of the digestibility of cumulus cell mass by recombinant pSPAM1 hyaluronidase in an in vitro fertilization assay. *Anim Reprod Sci*, 2014, 150(3-4): 45-62.
- [11] Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: A family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*, 1999, 848(1-2): 45-62.
- [12] Gyamera-Acheampong C, Mbikay M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: A review. *Hum Reprod Update*, 2009, 15(2): 237-247.
- [13] Mishra P, Qiu Q, Gruslin A, *et al.* In Vitro Regulatory Effect of Epididymal Serpin CRES on Protease Activity of Proprotein Convertase PC4/PCSK4. *Curr Mol Med*, 2012, 12(8): 1050-1067.
- [14] Hua R, Xue R, Liu Y, *et al.* ACROSIN deficiency causes total fertilization failure in humans by preventing the sperm from penetrating the zona pellucid. *Hum Reprod*, 2023, 38(6): 1213-1223.
- [15] Hwang JY, Chung JJ. CatSper Calcium Channels: 20 Years On Physiology (Bethesda). 2023, 38(3): 0.
- [16] Luo T, Chen HY, Zou QX, *et al.* A novel copy number variation in CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod*, 2019, 34(3): 414-423.
- [17] Wang J, Tang H, Zou Q, *et al.* Patient with CATSPER3 mutations-related failure of sperm acrosome reaction with successful pregnancy outcome from intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Mol Genet Genom Med*, 2021, 9(2): e1579.
- [18] Brown SG, Miller MR, Lishko PV, *et al.* Homozygous in-frame deletion in CATSPERE in a man producing spermatozoa with loss of CatSper function and compromised fertilizing capacity. *Hum Reprod*, 2018, 33(10): 1812-1816.
- [19] Wang H, McGoldrick LL, Chung JJ. Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nat Rev Urol*, 2021, 18(1): 46-66.
- [20] Liu R, Yan Z, Fan Y, *et al.* Bi-allelic variants in KCNU1 cause impaired acrosome reactions and male infertility. *Hum Reprod*, 2022, 37(7): 1394-1405.
- [21] Lv M, Liu C, Ma C, *et al.* Homozygous mutation in SLO3 leads to severe asthenoteratozoospermia due to acrosome hypoplasia and mitochondrial sheath malformations. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 5.
- [22] Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, *et al.* Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature*, 2016, 534(7608): 562-565.
- [23] Inoue N, Ikawa M, Isotani A, *et al.* The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 2005, 434(7030): 234-238.
- [24] Noda T, Lu Y, Fujihara Y, *et al.* Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(21): 11493-11502.
- [25] Barboux S, Ialy-Radio C, Chalbi M, *et al.* Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5335.
- [26] Nomikos M, Swann K, Lai FA. Starting a new life: Sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development; an essential phospholipase C with implications for male infertility. *Bioessays*, 2012, 34(2): 126-134.
- [27] Saleh A, Kashir J, Thanassoulas A, *et al.* Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 28.
- [28] Escalier D. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol*, 1990, 34(2): 287-297.
- [29] Xin A, Qu R, Chen G, *et al.* Disruption in ACTL7A causes acrosomal ultrastructural defects in human and mouse sperm as a novel male factor inducing early embryonic arrest. *Sci Adv*, 2020, 6(35): eaaz4796.
- [30] Wang J, Zhang J, Sun X, *et al.* Novel bi-allelic variants in ACTL7A are associated with male infertility and total fertilization failure. *Hum Reprod*, 2021, 36(12): 3161-3169.
- [31] Bianchi E, Wright GJ. Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm-egg recognition. *PLoS Biol*, 2020, 18(11): e3000953.
- [32] Baibakov B, Boggs NA, Yauger B, *et al.* Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J Cell Biol*, 2012, 197(7): 897-905.
- [33] Bray C, Son JH, Meizel S. A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the acrosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. *Biol Reprod*, 2002, 67(3): 782-788.
- [34] Feng R, Sang Q, Kuang Y, *et al.* Mutations in TUBB8 and Human Oocyte Meiotic Arrest. *N Engl J Med*, 2016, 374(3): 223-232.
- [35] Sang Q, Li B, Kuang Y, Wang X, Zhang Z *et al.* Homozygous Mutations in WEE2 Cause Fertilization Failure and Female Infertility. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(4): 649-657.
- [36] 陈振文. 辅助生殖男性技术. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [37] Dai J, Zhang T, Guo J, *et al.* Homozygous pathogenic variants in ACTL9 cause fertilization failure and male infertility in humans and mice. *Am J Hum Genet*, 2021, 108(3): 469-481.
- [38] Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, *et al.* Clinical importance of zona pellucida induced acrosome reaction and its pre-

- dictive value for IVF. Hum Reprod, 2001, 16(1): 138-144.
- [39] Rybouchkin A, Dozortsev D, de Sutter P, et al. Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. Hum Reprod, 1995, 10(5): 1130-1135.
- [40] Terada Y, Nakamura SI, Morita J, et al. Use of mammalian eggs for assessment of human sperm function; molecular and cellular analyses of fertilization by intracytoplasmic sperm injection. Am J Reprod Immunol, 2004, 51(4): 290-293.
- [41] Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, et al. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. Hum Reprod, 2005, 20(8): 2237-2241.
- [42] Heindryckx B, De Gheselle S, Gerris J, et al. Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. Reprod Biomed Online, 2008, 17(5): 662-668.
- [43] Heytens E, Parrington J, Coward K, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. Hum Reprod, 2009, 24(10): 2417-2428.
- [44] Heytens E, Schmitt-John T, Moser JM, et al. Reduced fertilization after ICSI and abnormal phospholipase C zeta presence in spermatozoa from the wobbler mouse. Reprod Biomed Online, 2010, 21(6): 742-749.
- [45] Vanden Meerschaut F, Leybaert L, Nikiforaki D, et al. Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure. Hum Reprod, 2013, 28(1): 87-98.
- [46] Liu DY, Gordon Baker HW. Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of *in vitro* fertilization in patients with unexplained infertility. Fertil Steril, 2003, 79(1): 74-80.
- [47] Hershlag A, Paine T, Kvapil G, et al. *In vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection split: An insemination method to prevent fertilization failure. Fertil Steril, 2002, 77(2): 229-232.
- [48] 朱 琴, 付伟平, 王丽萍, 等. 部分 ICSI 在体外受精胚胎移植中预防受精失败临床效果. 生殖医学杂志, 2014, 23(11): 872-875.
- [49] Nagy Z, Staessen C, Liu J, et al. Prospective, auto-controlled study on reinsemination of failed-fertilized oocytes by intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril, 1995, 64(6): 1130-1135.
- [50] Yuzpe AA, Liu Z, Fluker M. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging *in vitro* fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. Fertil Steril, 2000, 73(6): 1115-1119.
- [51] Díaz-Fontdevila M, Pommer R, Smith R. Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility. Fertil Steril, 2009, 91(5 Suppl): 2061-2068.
- [52] 刘 琨, 胡俊平, 马晓玲, 等. 体外授精中卵母细胞受精失败因素分析及早期补救 ICSI 的应用探讨. 生殖医学杂志, 2016, 25(7): 619-622.
- [53] Huang B, Qian K, Li Z, et al. Neonatal outcomes after early rescue intracytoplasmic sperm injection: An analysis of a 5-year period. Fertil Steril, 2015, 103(6): 1432-1437.
- [54] Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: A major cause of failure of fertilization in clinical *in-vitro* fertilization. Hum Reprod, 2000, 15(3): 702-708.
- [55] Liu DY, Baker HW. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: A newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization *in vitro*. Hum Reprod, 1994, 9(9): 1694-1700.
- [56] 刘德一, Gordon Baker HW. 精子功能检测与男性不育诊治的新进展. 中华男科学杂志, 2007, 13(2): 99-109.
- [57] Liu DY, Baker HW. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates *in vitro* in patients with teratozoospermic semen. Hum Reprod, 1998, 13(4): 905-910.
- [58] Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, et al. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in *in-vitro* fertilization. Hum Reprod, 1996, 11(8): 1661-1667.

(收稿日期: 2023-01-10; 接受日期: 2023-03-20)

(本文编辑: 夏佳东)