

己酮可可碱在哺乳动物辅助生殖技术方面的应用进展

王海瑞, 刘玉良, 蔡志刚, 侯蓉*

(成都大熊猫繁育研究基地, 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 610081)

摘要:综述了己酮可可碱在哺乳动物辅助生殖技术方面的应用情况。概括了己酮可可碱在精子细胞浆内注射、人工授精、体外处理精液和口服使用对生殖细胞的改善作用等方面的应用情况,最后概述了己酮可可碱对生殖细胞可能产生的毒性作用。

关键词:己酮可可碱; 人工授精; 体外处理; 精子细胞浆内注射

中图分类号: R256.56; S814 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2010)06-1008-04

Advance in Application of Pentoxifylline in Assisted Reproductive Technology of Mammals

WANG Hai-ruì, LIU Yu-liang, CAI Zhi-gang, HOU Rong*

(The Sichuan Key Laboratory for Conservation Biology on Endangered Wildlife-Developing Toward a State

Key Laboratory for China, Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081, China)

Abstract:The application of pentoxifylline in assisted reproductive technology of mammals was reviewed. The roles of pentoxifylline in intracytoplasmic sperm injection (ICSI), artificial insemination (AI), dealing sperm *in vitro* and improving the germ cell by oral administration were outlined. The possible toxic action of pentoxifylline on germ cell was summarized.

Key words:pentoxifylline; AI; dealing sperm *in vitro*; ICSI

己酮可可碱(pentoxifylline, PF)为黄嘌呤衍生物,是一种非选择性磷酸二酯酶抑制剂,能阻断cAMP(环腺苷酸)转变为AMP(腺苷酸),使胞内cAMP升高,cAMP在顶体反应调控方面有一定的作用。己酮可可碱与甲基黄嘌呤族内其他药物相比,其作用时间长、有较高的水溶性,可明显改善少、弱精子症的活力,甚至于在冲洗和离心去除该试剂后较长时间内仍能持续其药理作用(Hinting *et al.*, 2001)。近年来,随着环境的改变,雄性动物(包括人)的精液质量,尤其是精子活力明显下降,己酮可可碱作为一种外源性物质用来提高精液质量得到了重视。

1 己酮可可碱在精子细胞浆内注射(ICSI)方面的应用

卵胞浆内单精子注射技术(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)就是第二代“试管婴儿”,该技术是借助显微操作系统将单一精子注射入卵子内使其受精。此项技术的关键在于获得有活力的精子。许多严重男性不育患者或其他动物的冷冻精液在解冻后观察不到活动的精子,因此找到一个能够获得有活力精子的方法意义重大。

通常的做法是通过将精液暴露在聚乙烯吡咯酮(PVP)溶液及其他缓冲液中,从而使有活力的精子变形而筛选出来,然后用有活力的精子进行ICSI操作(黄学锋等,2001)。这种做法筛选出的精子活力假阳性高并且受孕率低。有些患有严重少、弱甚至无精子症的男性或其他动物冷冻精液观

察不到有活力的精子,利用己酮可可碱可以促进精子的获能、顶体反应和调节精子的运动能力等,帮助筛选出有活力的精子。Borut等(2006)试验中使用组织液孵化2h仍观察不到活动精子,而在无活动精子的组织液中加入己酮可可碱处理2h后可以观察到有精子活动。由于己酮可可碱能够帮助鉴别有活力的精子,大大缩短了ICSI的操作时间。试验组中进行ICSI操作的平均时间为30min(最小为10min,最大为90min),而空白对照组的平均时间为120min(最小为60min,最大为240min)。并且试验组的受精率(66%)和获得的胚胎数量(4.7±3.3)也高于空白对照组的受精率(50.9%, $P<0.05$)和获得的胚胎数量(2.7±2.1, $P<0.01$)。Alberto等(1997)用1mg/mL的己酮可可碱处理液化的精液加大了在活动能力较差甚至没有活动能力的精液中找到有活动精子的几率。Theofanis等(1999)在没有活力的精液培养液中添加3mM的己酮可可碱和2-脱氧腺苷,放入5%的CO₂培养30min后,无活力的精子在48h之内都能达到活力高峰。Victoria等(2000)对少、弱精病人进行ICSI操作时使用5mM的己酮可可碱溶液在几秒钟之内就能筛选出有活力的精子,在稍后的操作中,卵母细胞的受精率为64.7%,受孕率为96.2%,最终有40%的女性成功受孕。Terriou等(2000)用7.2mM的己酮可可碱处理零活率的精液,以此来评估己酮可可碱是否能够增加睾丸和附睾中的鲜精和冷冻精液的活力,结果在所有试验组中精子均受到刺激,在睾丸精液中观察到的精子活率为29.2%,在附睾精液中这一活率

收稿日期:2009-10-13 接受日期:2010-03-14

基金项目:国家973计划前期研究专项项目(2007CB116213);成都大熊猫繁育研究基金会项目(CPF2002-06)

作者简介:王海瑞(1983~),男,硕士,E-mail:wang200108143@yahoo.com.cn

*通讯作者 Corresponding author,研究方向:濒危野生动物繁殖生物学,E-mail:Hourong2000@yahoo.com

为 33.6%,并且在以上两组中都有 50% 左右的精子表现出活力。然后用己酮可可碱处理过的这些无活率的精液与自然状态下有活率的精液进行 ICSI,结果在这两组中受精率和卵裂程度基本一致,最后的受胎率也几乎相当。

ICSI 是治疗严重男性不育的有效途径,该技术仅需数条精子即可受精、妊娠。在 ICSI 之前用己酮可可碱筛选精子,可以有效控制己酮可可碱作用于精子上的时间,还可将被药物处理过的精子进行清洗,使精子在最佳状态与卵子结合,因此在该技术上使用己酮可可碱安全可靠,得到了广泛应用。

2 己酮可可碱在人工授精方面的应用

己酮可可碱在体外能够增强精子活力、促进顶体反应、精子的穿卵运动和保护精子的原生质膜。对于精子活力低下的雄性,可以通过体外己酮可可碱处理技术获得精子活力的改善,使得常规人工授精得以改进,获得更高的成功率(李宏军,2002)。Negri 等(1996)为了证实己酮可可碱在人宫腔内授精中的效果,采用 150 个排卵周期进行试验,参加试验的夫妇分为两组,第一组为男性不育组,第二组为其他原因不孕不育组,每一组中又分为标准试验组(精液处理方法按照 WHO 规定进行)和添加己酮可可碱试验组。在己酮可可碱试验组中用 Ham's F-10 培养液将己酮可可碱稀释为 1 mg/mL,然后将精液用上述培养液进行 1:1 稀释,在 37℃ 下培养 10 min 后用 Percoll 进行梯度离心,取精液进行宫腔内授精。结果在男性不育组当中,经过己酮可可碱处理的精液的受胎率为 27.5%,显著高于标准对照组的 11.5% ($P < 0.05$);在其他原因的不孕不育组中,经过己酮可可碱处理的精液组和标准对照组的受胎率分别为 23.1% 和 20.0%,差异不显著。Jan Tesarik 和 Carmen Mendoza(1993)研究己酮可可碱对精子顶体反应缺乏的病人的影响,结果显示己酮可可碱可以在体外提高精子的顶体反应率和穿卵率,但是作者建议在临床使用该药物时,不同的病人的精液需要分别用该药物进行检测,待检测的顶体完整率合格后再使用,不可盲目使用。

己酮可可碱在人工授精方面的应用不如体外授精(IVF)广泛,主要是因为己酮可可碱促进精子活力的作用报道不一。有些报道称己酮可可碱对于密度低、虚弱的精子有作用,但对于正常质量精液的作用不明显;另有一些报道称己酮可可碱的作用仅局限于促进虚弱精子的运动速度,并且只能明显促进精子的曲线运动而非直线运动。相反,也有一些报道称己酮可可碱能够促进精子的直线运动(Yovich *et al.*, 1990; Tournaye *et al.*, 1993)。己酮可可碱在人工授精之前的孵育时间以及最佳刺激时间的报道不一也限制了该药物在临床的推广,孵育时间的报道有从 10 min 到 3 h 的,一般采用 30 min(Tesariki *et al.*, 1992; Pang *et al.*, 1993)。大多的报道都认为己酮可可碱可以提高精子的活力,但同时也能促使精子过早地发生顶体反应,如果精子在发生顶体反应后的一段时间内未能与卵子进行受精,精子的活力等指标将衰退(Gavella *et al.*, 1991),精子将失去与卵子结合的能力,并且这个过程不可逆(David *et al.*, 2007)。因此,在使用己酮可可碱进行人工授精时必须把握好排卵的准确时间。综合以

上分析,对于少、弱精液的个体(动物上的珍稀物种)用己酮可可碱处理的精液进行人工授精是有效的,并且人工授精相对于体外授精和 ICSI 来说,程序简单、费用低廉(Charles, 2000)。

3 己酮可可碱在体外处理精液方面的应用

由于己酮可可碱对精子的活力有促进作用,并且在体外可以避免己酮可可碱和精子长时间接触,因此己酮可可碱在体外改善精子活力及功能方面有广泛的应用。

Numabe 等(2001)报道用 5 mM 的己酮可可碱和肝素联合处理后的牛精液进行体外授精的受精率显著高于 7.5 mM 的试验组和空白对照组,尤其在单精授精的受精率方面。都基刚等(2003)用咖啡因、茶碱和己酮可可碱 3 种活性物质处理牛体外授精,结果显示 10 mol/L 的己酮可可碱的效果优于其他两组,但受精率没有显著差异。李彤等(2005)探讨己酮可可碱在体外处理男性弱精子时的最佳作用浓度和时间的试验中显示,不同浓度及不同时间对弱精子均有改善作用,而用己酮可可碱的 0.6 mmol/L 浓度孵育 30 min,对体外弱精子有显著增强作用。吴立君等(1997)则对正常男性射出的精液用己酮可可碱处理与用精子营养液 Ham's F10 和精子获能液 BWB 处理的精液进行对照,结果表明己酮可可碱主要增加了精子的前向运动,并且己酮可可碱作用后不但能刺激精子的运动,而且能在一定时间后还能较好保持这种被刺激的直线运动,这些在人工授精和精子体外处理工作中己酮可可碱优于 BWB。己酮可可碱也可以在作用于亚洲象精液后一段时间内保持其活力,Nikorn 等(2008)用 0.5、1.0 和 2.0 mg/mL 的己酮可可碱在 37℃ 下处理亚洲象精液,组间差异不大,但是己酮可可碱在处理精液 30 min 后仍能保持精子的活力和各项运动特征。Ahmed 等(1999)用 3.6 mM 的己酮可可碱对人的精液在体外进行试验发现在处理后的 1 h 和 4 h,试验组的精子活力和精子穿卵率均显著提高,并且试验还检测了精子内磷酸酪氨酸含量,发现己酮可可碱可促进精子活力与精子内的酪氨酸磷酸化有关。

用己酮可可碱体外处理冷冻保存的精液也有一定的研究。1 mg/mL 的己酮可可碱处理剂量对提高大熊猫冷冻精子体外授精能力效果较好,优于 2 mg/mL 处理浓度,但是随着孵育时间的延长,较高浓度的己酮可可碱对大熊猫精子有一定的损伤,并显著降低精子的受精能力(鲜红,2005)。1 mg/mL 处理组的总存活时间可达(15.33 ± 4.73) h,培养 4 h 时体外异种穿卵率达 51.44%,培养 6 h 时体外异种穿卵率为 7.49%,与对照组差异极显著($P < 0.01$),并优于血小板激活因子(PAF)(张明等,2007)。黄炎等(2004)使用己酮可可碱处理冷冻后的大熊猫精子时也出现了相同的效果:在 4 个终浓度分别为 0 mM、1 mM、5 mM 和 10 mM 的己酮可可碱试验组中,精子活力、运动状态、活率和顶体正常率在 90 min 内都很相似($P > 0.05$),在 1 mM 试验组中孵育 24 h 的精子活力没有变化,但是在 5 mM 与 10 mM 试验组中精子活力比空白对照组显著降低($P < 0.05$),并且在 10 mM 试验组中,精子在孵育 4 h 时的顶体正常率也比对照组显著降低($P < 0.05$)。以上试验均说明,己酮可可碱对大熊猫精子是敏感

的,但激活时间短暂,随着孵育时间的增加,精子活力会下降,高浓度的己酮可可碱还会损坏精子顶体,降低异种穿卵率。Gradil 等(2000)用 3.5 mM 或 7 mM 的己酮可可碱处理冷冻保存的马精液,试验表明,在冷冻保存之前添加己酮可可碱精液解冻后活力显著降低,相反,在冷冻保存之后添加己酮可可碱可以显著提高马精子的活力。这与己酮可可碱在处理人的冷冻保存精液时效果一致。Stanic 等(2002)将人的鲜精在冷冻保存之前添加 3 mmol/L 的己酮可可碱,解冻后精液的直线运动精子的活力和总体活力均低于空白对照;然而,在冷冻保存之后添加 3 mmol/L 的己酮可可碱则会显著提高直线运动精子的活力和总体活力。并且在冷冻之前将己酮可可碱作为冷冻保护剂与精液混合,解冻后精液的质量也没有提高(Stanic *et al.*, 2002),说明己酮可可碱不适合作为精液的冷冻保护剂。

4 口服己酮可可碱对生殖细胞的改善作用

Ashok 等(2004)报道在治疗男性不育的患者时,患者每天口服 300 mg 的己酮可可碱,4 次以后对精子的活力和精子运动的各项指标没有效果,但当每天的剂量在 1200 mg 时精子的活力和摆动频率增加。Mohammad 等(2005)采用 400 mg/d 己酮可可碱的剂量治疗不育男性,连续治疗 3 个月,试验检测了精子的浓度、数量、活力和形态,结果显示己酮可可碱能显著提高精子的活力($P < 0.01$),并且对各个年龄阶段的不育男性均有效。

Merino 等(1997)报道用己酮可可碱和安慰剂(空白对照)对男性不育患者进行试验,给患者每天口服 1200 mg 己酮可可碱,连续 6 个月。结果两组中血清激素含量、精液量、精子数、精子活率和精子形态没有明显的变化,但是精子活力有显著提高($P < 0.01$)。将己酮可可碱(400 mg/d)和克罗米芬(50 mg/d)联合治疗特发性少、弱精子症在临床也有较好的效果,在连续服用 3 个月后,少精子症组精子密度、精子活率、活动精子总数明显提高;而弱精子症组仅精子活率明显提高,精子密度和活动精子总数没有明显变化,提示两者联合服用能显著提高特发性少精子症患者的精液质量等(卢少明,2008)。

Okada 等(1997)通过试验也证实患少、弱精子症的患者其体内的精子会产生大量的活性氧族,精子的活力与这些活性氧族有关,活性氧族会导致精子活力下降。试验结果也证实己酮可可碱能够减少精子活性氧族的产生,并且在体外试验中己酮可可碱能够使精子在 6 h 之内保持曲线运动的速率和振动频率不下降。在对患少、弱精子症的患者进行口服己酮可可碱治疗后发现:小剂量的己酮可可碱(300 mg/d,连续服用 4 个月)不能够降低精子产生活性氧族,并且对精子活力没有效果;大剂量的己酮可可碱(1200 mg/d,连续服用 4 个月)能够提高精子的活力和振动频率,但对精子的受精率没有明显效果。

口服己酮可可碱可以提高精液中精子的活力、数量等参数,特别是对严重的少、弱精子症的个体,还能提高活动精子总数,这对下一步进行辅助生殖技术如单精子卵包浆内注射、人工授精、体外授精等提供了更多可供选择的对象,并且

口服药物相对安全、经济、方便,是一条治疗少、弱精子症的有效途径。

5 己酮可可碱可能存在的毒性作用

以上综述说明己酮可可碱在临床已经有了广泛的应用,尤其科研工作者在己酮可可碱促进精子活力和顶体反应的作用上有共识。己酮可可碱促进精子活力和顶体反应可能是由 cAMP 和 Ca^{2+} 协同作用产生的,也有一些报道认为己酮可可碱可以作为一种抗氧化剂,能够去除精子内的过氧化物,从而保护精子顶体膜和促进顶体反应(Gautam, 2005)。然而,己酮可可碱的临床应用还面临着很多问题。比如己酮可可碱作用于精液的时间和浓度,以及操作程序没有形成统一的标准。一些研究报道显示磷酸二酯酶阻断剂(包括己酮可可碱)对受精率的提高没有作用(Tournaye, 1995),并且对动物的卵子和胚胎有负面影响。己酮可可碱可以导致哺乳动物卵母细胞发育时有丝分裂停止和老鼠胚胎发育不良。在老鼠的体外受精和胚胎移植试验中,如果仅将精子与己酮可可碱接触而不接触卵子则不会影响受精率和受胎率,但如果卵母细胞接触了己酮可可碱结果就相反(Yovich, 1993)。也有一些报道称己酮可可碱虽然能促进精子的活力,但也能很快耗尽精子新陈代谢的能量,因此使用己酮可可碱处理精液的时间必须控制在短时间内,例如适合 ICSI 操作。另外一些报道称,将哺乳动物的细胞短时间内接触己酮可可碱,精子可以产生较强的抵抗力来抵抗己酮可可碱的毒性(Slamenova, 1994),但在老鼠受精卵和早期胚胎的研究中,发现将受精卵和早期胚胎长时间暴露在己酮可可碱溶液中时会产生毒性作用(Tournaye, 1995),不同浓度的己酮可可碱对胚胎的影响也不同。Herman 等(1993)发现将受精卵置于 5、10、50 μM 的己酮可可碱中,早期胚胎能发育至囊胚期,但置于 3.6 mM、7.2 mM 的己酮可可碱浓度中,早期胚胎的发育则严重受阻,因此作者建议受精卵与胚胎尽量少接触己酮可可碱。如在己酮可可碱处理完精子后,使用不含己酮可可碱的缓冲液冲洗精子,则不会对胚胎的分裂和质量产生毒性(Victoria *et al.*, 2000)。

6 结语

一些文献报道了己酮可可碱处理精液时可能存在的弊端,主要是由于我们对它产生毒性的机理还不了解,甚至于对它是如何阻断 cAMP(环腺苷酸)转变为 AMP(腺苷酸)的机理还不是很明确(Gautam, 2005)。未来还有很多关于己酮可可碱作用于精子、受精卵和胚胎的分子机理和作用机制需要研究。如果我们掌握了机理,就能扬长避短,充分利用己酮可可碱来帮助进行人类的辅助生殖操作,对保护珍稀野生动物物种资源也有重要的作用。

7 参考文献

- 都基刚,张明新,杨树光,等. 2003. 不同活性物质对精子运动性及受精率的影响[J]. 吉林畜牧兽医, (9): 1~3.
 黄学锋,郑菊芬,李澄棣,等. 2001. 单精子卵胞浆内注射术中不同来源精子的处理方法[J]. 温州医学院学报, 31(4): 205~207.
 黄炎,王鹏彦,Rebecca ES,等. 2004. 大熊猫冷冻精液解冻速度和

- 解冻液中添加 Pentoxifylline 对其解冻后活力的影响[J]. 兽类学报, 24(4): 286~292.
- 李宏军. 2002. 宫腔内人工授精治疗男性不育症[J]. 中国男科学杂志, 16(5): 395~398.
- 李彤, 李汉忠, 李宏军, 等. 2005. 己酮可可碱对精子活力的体外改善作用[J]. 中国男科学杂志, 19(3): 34~35.
- 卢少明, 李晓张, 浩波. 2008. 克罗米芬联合己酮可可碱治疗特发性少、弱精子症的临床研究[J]. 中国男科学杂志, 22(5): 39~41.
- 吴立君, 张君慧, 吴竞梅, 等. 1997. 己酮可可碱对人射出精子运动和顶体反应的影响[J]. 生殖医学杂志, 6(4): 239~241.
- 鲜红. 2005. 大熊猫精浆成分与精液质量关系及提高大熊猫冷冻精子体外受精能力的研究[D]. 四川农业大学.
- 张明, 鲜红, 侯蓉, 等. 2007. 己酮可可碱和血小板激活因子对冷冻保存的大熊猫精子受精能力的影响[J]. 畜牧兽医学报, 38(3): 294~300.
- Ahmed N, Mary M, Mahmood M, *et al.* 1999. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility [J]. *Fertility and sterility*, 71(5): 919~923.
- Alberto B, Mario S, Theofanis A, *et al.* 1997. Efficient modification of intracytoplasmic sperm injection technique for cases with total lack of sperm movement[J]. *Human Reproduction*, 12(6): 1227~1229.
- Ashok A, Kiran PN, Shyan SR A, *et al.* 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature[J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 8(6): 616~627.
- Borut K, Veljko V, Milan R. 2006. Clinical Use of Pentoxifylline for Activation of Immotile Testicular Sperm Before ICSI in Patients With Azoospermia[J]. *Journal of Andrology*, 27(1): 45~52.
- CM Gradil, BA Ballh. 2000. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa[J]. *Theriogenology*, 54: 1041~1047.
- Charles HM. 2000. Rationale, Interpretation, Validation, and Uses of Sperm Function Tests [J]. *Journal of Andrology*, 21(1): 10~30.
- David RJG, MRCOG, Carmel MM, *et al.* 2007. Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction *in vitro* [J]. *Fertility and Sterility*, 87(5): 1064~1070.
- G Merino, JC Martínez C, E Barahona, *et al.* 1997. Effects of Pentoxifylline on Sperm Motility in Normogonadotropic Asthenozoospermic Men [J]. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 39(1): 65~69.
- Gautam A. 2005. Intrauterine Insemination [M]. London: Informa Healthcare, 181~188.
- Gavella M, Lipovac V, Marotti T. 1991. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm [J]. *International Journal of Andrology*, 14(5): 320~327.
- Herman T, Marleen VL, Etienne VA, *et al.* 1993. Fertilization and early embryology: Effects of pentoxifylline on *in-vitro* development of preimplantation mouse embryos[J]. *Human Reproduction*, 8(9): 1475~1480.
- Hinting A, Lunardi H. 2001. Better sperm selection for intracytoplasmic sperm injection with the side migration technique[J]. *Andrologia*, 33(6): 343.
- Jan Tesarik MD, Carmen Mendoza. 1993. Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency[J]. *Fertility and sterility*, 60(1): 141~148.
- M Victoria H, Antonio LG, Natalio C, *et al.* 2000. In situ use of pentoxifylline to assess sperm vitality in intracytoplasmic sperm injection for treatment of patients with total lack of sperm movement [J]. *Fertility and Sterility*, 74(1): 176~177.
- Mohammad RM, Mohammad AK, Arash D. 2005. The effect of oral administration of Pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicoceles [J]. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 3(1): 25~29.
- Nikom T, Jumnan S, Sittidet M, *et al.* 2008. Effect of Pentoxifylline on the Motility Characteristics and Viability of Spermatozoa in Asian Elephants (*Elephas maximus*) with Low Semen Quality [J]. *Thai J Vet Med*, 38(3): 37~45.
- Okada H, Tatsumi N, Kanzaki M, *et al.* 1997. Formation of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa From Asthenozoospermic Patients; Response to Treatment With Pentoxifylline [J]. *Journal of Urology*, 157(6): 2140~2146.
- P Negri, E Grechi, A Tomasi, *et al.* 1996. Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination [J]. *Human Reproduction*, 11(6): 1236~1239.
- P Stanic, Z Sonicki, E Suchanek. 2002. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa [J]. *International journal of andrology*, 25: 186~190.
- P Terriou, E Hans, C Giogretti, *et al.* 2000. Pentoxifylline Initiates Motility in Spontaneously Immotile Epididymal and Testicular Spermatozoa and Allows Normal Fertilization, Pregnancy, and Birth After Intracytoplasmic Sperm Injection [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(4): 194~199.
- Pang SC, Chan PJ, Allen LU. 1993. Effect of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen [J]. *Fertility and sterility*, 60(2): 336~343.
- Slamenova D, Dusinska M, Gabelova A, *et al.* 1994. Assessment of toxicity, clastogenicity, mutagenicity and transforming activity of pentoxifylline in mammalian cells cultured *in vitro* [J]. *Mutat Res*, 322: 275~285.
- T Numabe, T Oikawa, T Kikuchi, *et al.* 2001. Pentoxifylline improves *in vitro* fertilization and subsequent development of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 56: 225~233.
- Tesariki J, Thebault A, Testart J. 1992. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens [J]. *Human Reproduction*, 7(9): 1257~1263.
- Theofanis A, Alexis A, Lewis K, *et al.* 1999. Enhancement or initiation of testicular sperm motility by *in vitro* culture of testicular tissue [J]. *Fertility and Sterility*, 71(2): 240~243.
- Tournaye H, Devroey P, Camus M, *et al.* 1995. Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology [J]. *Hum Reprod*. 10(suppl 1): 72~79.
- Tournaye H, Janssens R, Camus M, *et al.* 1993. Pentoxifylline is not useful in enhancing sperm function in cases with previous *in vitro* fertilization failure [J]. *Fertil Steril*, 59(1): 210~215.
- Yovich JL. 1993. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction [J]. *Hum Reprod*, 8: 1786~1791.
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, *et al.* 1990. Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility [J]. *Fertil Steril*, 53(4): 715~722.