论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2378-03

常规体外授精中正常受精率患者的精液参数分析

王凤英,屈宗银,李玉艳,何 畏,俞炽阳,龙 玲 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

摘 要:目的 了解常规体外授精(in-vitro fertilization,IVF)中正常受精率患者处理前后精液的参数范围及其对受精结果的影响。**方法** 回顾性分析在本生殖医学中心接受常规IVF治疗且获得正常受精及移植胚胎的408个周期的精液参数及其与受精结果的关系。**结果** 精子密度正常者399人次(97.79%),而活力正常者仅21人次(5.15%)。处理前精液量0.2~8 ml,精子密度(3~400)×10^6个/ml,活率10%~85%,前向运动精子比率(progressive motile sperm,PMS%)2%~40%,前向运动精子总数(total progressive motile sperm count,TPMSC)2~597×10^6。处理后的精子活率、PMS%及精子总数与处理前精子密度、活率、PMS%以及A+B级精子总数均呈显著的正相关($P<0.05$)。处理后的精子活率与受精率明显相关($r=0.132$,$P=0.008$)。**结论** 常规IVF正常受精者精液参数波动范围大,轻、中度的弱精或少精可能不影响正常受精,但处理后的精子活率可影响受精率。

关键词: 常规体外受精;精液参数;精子分离

中图法分类号: R394-33; R349.29; R698.2 **文献标识码:** A

Analysis of semen parameters of patients with normal fertilization rate in conventional IVF-ET cycles

WANG Feng-ying, QU Zong-yin, LI Yu-yan, HE Wei, YU Chi-yang, LONG Ling (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the semen relative parameters and their effects on fertilization outcomes. Methods Totally 408 semen samples with normal fertilization rates in conventional in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) cycles in our department from January 2006 to July 2008 were collected. The relationship of the semen parameters and fertilized outcomes were retrospectively analyzed. Results Among 408 samples, there were 399 samples (about 97.79%) had normal sperm density, but only 21 samples (5.15%) had normal motility. The sperm density was 3 to 400 10^6/ml, its motility 10% to 85%, percentage of progressive motile sperm (PMS%) 2% to 40%, and total progressive motile sperm count (TPMSC) was 2 to 597×10^6. The motility, PMS% and total sperm count after sperm separation were positively correlated with the density, motility, PMS% and TPMSC before separation ($P<0.05$). There was a positive correlation between the fertilization rate and separated sperm motility ($r=0.132$, $P<0.01$), other parameters have no effect on fertilization rate. Conclusion Semen parameters have a wild range for the patients with normal fertilization rate in conventional IVF. Mild and moderate oligoasthenospermia maybe have no effect on fertility. However, the motility after sperm separation can affect fertilization rate.

Key word: conventional *in vitro* fertilization; semen/sperm parameter; sperm separation

体外授精主要有2种方式:一种是常规体外授精(in-vitro fertilization,IVF),而另一种授精方式为卵细胞细胞质内单精子注射术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)[1-3]。常规IVF是体外受精的主要方式,该方式是将卵子和一定数量精子放置在同一培养皿中,让其自然受精。在常规IVF中,影响受精的主要因素是精子的数量和功能,当精子数量不足或功能缺陷时,可导致卵子受精率低下或完全不受精并进一步导致胚胎形成失败。而ICSI技术则可克服精子数量不足或功能障碍从而使卵子获得受精。但该技术费用高,技术难度大,尤其是对后代的远期影响还难以评估,故必须严格控制该技术的应用指征。因此,在授精前对精子的各种参数进行恰当的评估并选择合适的授精方式,对临床具有重要意义。但目前对常规IVF正常受精所需的精子参数范围尚不十分清楚,因而给临床判

作者简介:王凤英,女,四川省高县人,博士,教授,主要从事辅助生殖技术方面的研究。电话:(023)68765903,E-mail:fyw018@163.com

收稿日期:2009-05-14;修回日期:2009-06-23

断带来一定困难。本研究对本中心常规 IVF 周期中受精率正常者的精液参数进行回顾性分析,以了解正常受精所需的精液参数范围,为临床更好地评估精液状况及选择合适的受精方式提供一定的参考。

1　资料与方法

1.1　临床资料

资料来自 2006 年 1 月至 2008 年 7 月本生殖中心进行常规 IVF 且受精率正常及进行胚胎移植的 408 个周期。女性年龄 23 ~ 45(31.7 ± 4.4)岁,男性年龄 25 ~ 58(33.9 ± 5.1)岁。控制性超促排卵方案和取卵过程参照文献[4]。

1.2　精液分析及受精处理

嘱男方在其妻子取卵日前 3 ~ 5 d 排精 1 次,取卵当日将精液留取至无菌取精杯内,精液液化后进行检查,采用 Mark 记数板进行记数,并按 WHO 人类精液实验室检验手册要求和标准对精液进行处理和评估,根据精液情况采用上游法或密度梯度离心方法分离精子。上游法的上游时间为 30 ~ 40 min,上游结束后取最上方 0.5 ml 培养液内精子。分离后精子在 4 h 内授精,最终授精浓度为每个卵约 2 ~ 3 万条精子,采用过夜受精。授精后 16 ~ 20 h 观察受精情况,受精率 > 25% 者定为受精率正常。授精后第 2、3 天观察卵裂和胚胎情况,选择胚胎质量较好者行宫腔内胚胎移植。详细过程参见文献[4]。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件分别对数据进行相关分析和单因素分析。

2　结果

2.1　处理前精液的参数情况

408 个正常受精率 IVF 周期中,精子密度正常者 399 人次,约占 97.79 %,而密度低于 20×10^6 个/ml 仅 9 人次(其中 2 例为严重少精),占 2.21% %。精子活力正常者(A 级精子 ≥ 25%,或前向运动精子 ≥ 50%)仅 21 人次,约占 5.15%,而弱精者 387 人次,占 94.85%,包括严重弱精者 4 人次,临界严重弱精者(A 级 = 5%,或 A + B 级 = 10%)19 人次。408 个周期处理前精液各参数的最小值、中位数、95% 的参考范围(P2.5 ~ P97.5)见表 1。

表 1　408 个常规 IVF 周期受精率正常者的精液参数

	精液量(ml)	密度(10^6个/ml)	活率(%)	A 级(%)	PMS %	TPMSC($\times 10^6$)	精子总数
最小值	0.2	3	10	2	5	2	7.5
中位数	2.5	90	55	15	30	64.8	225.0
95% 参考范围	1.0 ~ 5.0	20.0 ~ 250.0	29.0 ~ 75.0	5.0 ~ 27.6	12.2 ~ 50.0	4.89 ~ 300.0	32.6 ~ 750.0

对处理前精液各参数进行相关分析发现:一次排精的 A、B 级精子总数(即 TPMSC)与精液量、精子密度、活率、A 级% 及 PMS % 等均呈明显的正相关关系(r 分别为 0.278、0.725、0.297、0.420、0.453,$P = 0.000$)。此外,精液量与精子密度呈负相关($r = -0.135$,$P = 0.006$),精子活率、A 级%、PMS % 之间均具有正相关关系($P = 0.000$)。

2.2　处理后的精子情况及其与处理前精液各参数的关系

精液经上游法或密度梯度离心方法处理后最终获得的精子参数见表 2。从表 1、表 2 中可以看出,处理后的精子活率和 PMS % 比处理前的精液有所提高,其波动范围缩小,但精子总数的范围仍较大。

表 2　408 个常规 IVF 周期受精率正常者精液处理后获得的精子情况

	活率(%)	PMS %	精子总数(10^6个/ml)
最小值	50	40	0.2
中位数	98	90	7.5
95% 参考范围	85.00 ~ 100.0	70.0 ~ 96.8	1.5 ~ 29.8

处理后获得的精子活率、PMS% 及精子总数与处理前精液各参数的相关系数见表 3。处理后精子活率、PMS% 及精子总数与处理前精子密度、活率、A 级%、PMS% 以及 TPMSC 均呈显著的正相关。此外,处理后精子总数还与处理前的精液量有显著的正相关关系。

2.3　精液各参数与 IVF 结果的关系

本资料显示,处理前的精液量及处理后的精液活率与受精率(仅限两个原核者)明显相关,r 分别为 0.149 和 0.132,P 值分别为 0.003 和 0.008,但与卵裂率及优质胚胎率无明显相关。其他精液参数与受精率、卵裂率及优质胚胎率等均无相关关系($P > 0.05$)。

此外,精液处理前、后的各项参数与胚胎移植后的妊娠结局无明显相关关系($P > 0.05$)。按不同妊娠结局分组进行比较,未妊娠组、临床妊娠组及生化妊娠组处理前后精液各参数之间均无明显差别($P > 0.05$)。

表 3　处理后精子与处理前精液各参数的相关性分析[$r(P)$]

处理后精子	处理前精液					
	精液量	密度	活率	A 级	PMS %	TPMSC
活率	0.060 (0.227)	0.166(0.001)	0.236(0.000)	0.165(0.001)	0.227(0.000)	0.181(0.000)
PMS %	0.052(0.292)	0.120(0.016)	0.236(0.000)	0.181(0.000)	0.218(0.000)	0.138(0.006)
精子总数	0.117(0.018)	0.226(0.000)	0.199(0.000)	0.124(0.012)	0.260(0.000)	0.229(0.000)

3　讨论

本研究结果显示在常规 IVF 受精率正常的患者中,精子密度正常者占 97.79%,精子密度范围与其他人群略有差别[5-7]。这可能与不同研究对象的年龄及职业等因素不同有一定关系,因为有研究发现不同年龄段的精子密度是不同的[6,8]。与精子密度大多正常不同,本研究中精子活率正常者很少,而弱精症所占比率很高,达到 94.85%。说明在 IVF 正常受精患者中,虽然大多数男性精子活力异常,但由于精子密度大多正常,故往往能够最终获得足够数量的活动精子进行 IVF。此外,精液量与精子密度呈负相关,提示对于少精症患者,如果精液量大,也可能获得足够的精子数量。至于少精症比率相对较少可能系一部分少精症患者已被纳入 ICSI 的缘故。

本研究结果显示,对于满足体外受精而言,精液参数的波动范围可以很大,不论是精液量、精子密度还是精子活力,不同患者可以相差数倍、数10倍甚至数百倍,但都可能达到正常体外受精需要。我们的结果还显示,P2.5以下的精子密度(3~20)×10^6个/ml间于严重少精和轻度少精之间,而P2.5以下的精子活率则为严重弱精或严重弱精临界水平。表明排除精子功能异常,轻、中度少精或弱精可能并不影响常规IVF受精。

精液中的活动精子总数被认为对于辅助生殖技术类型的选择具有重要作用[9,10]。在本中心408个常规IVF正常受精者中,TPMSC在(2~3)×10^6的精液样本有6个,经精子分离后从这些样本收获的TPMSC约为(0.2~2)×10^6(结果中未列出),这与"WHO关于男性不育的检查和诊疗手册相关标准"给出的IVF的最低数量标准接近[11]。过去认为常规IVF每个卵子约需5~10万条精子[12],而我们的结果表明,如果形态学检查无严重畸形精子症,处理后的前向运动精子总数只要能够满足每个卵子约2万条的精子数量,就可进行常规IVF。

根据WHO相关手册,大多数生殖中心及研究者把严重男性因素不孕(严重少、弱、畸精症)及前次常规IVF受精失败者作为ICSI的指征[12]。但为了避免或减少受精失败风险,一些生殖中心或研究者的ICSI指征有所放宽。本研究发现处理后的精子活率、PMS%及精子总数与处理前精子密度、活率、A级%、PMS%以及TPMSC等均显著相关,而处理后获得的精子总数还与处理前的精液量有显著正相关关系,表明处理前精液各参数均关系到处理后的精子情况。因此,对于各种程度的少、弱精患者,应结合精液其他参数综合分析,尤其应计算精液中的TPMSC,不能单凭少精或弱精等单项指标来决定受精方式。文献[13]报道一些严重少、弱精者精液处理后,获得的精子数量可达到5×10^6。这样的精子应该是不需要ICSI的。在本研究中,虽然严重少、弱精患者很少,但仍有2例严重少精、4例严重弱精及19例临界严重弱精者常规IVF也获得了正常受精。故我们认为没有理由扩大ICSI的指征。对于严重少、弱精症患者,如果形态学检查结果大于5%,建议对精液进行预处理得到更确切的数据,以决定是否需要ICSI。

此外,我们发现处理后的精子活率与受精率存在显著的正相关关系,即精子活率越高,受精率也越高,提示处理后精液中死精子可能对受精存在一定影响。因此,即使处理前精液各参数综合情况提示可能正常受精,但精子处理过程和处理方法可能关系到受精率的多少。为此,虽然有资料认为梯度离心处理比上游法密度梯度离心法能获得更多形态正常的精子并具有更高的受精能力,并减少有氧离子的损伤,但我们仍偏向上游法分离精子。因为我们的经验和已有的报道[14]均表明上游法处理往往比梯度离心分离法能够获得更高的精子活率。此外,小心操作也是保证获得更高活率精子的重要保证。

(致谢:本研究数据统计分析得到重庆市卫生信息中心孙安龙副主任的帮助,在此表示衷心的感谢!)

参考文献:

[1] 祁 强,朱健生,姚桂东,等. 卵胞浆内单精子显微注射技术的临床应用[J]. 皖南医学院学报,2008,27(3):194-195,203.

[2] 许张晔,叶碧绿,黄学峰,等. 不同来源精子对ICSI治疗后妊娠结局的影响[J]. 中国男科学杂志,2007,21(1):41-44.

[3] Bhattacharya S, Hamilton M P, Shaaban M, *et al*. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2001, 357(9274): 2075-2079.

[4] 王凤英, 李玉艳, 俞炽阳, 等. 对IVF超促排卵周期结局的分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12):1272-1275.

[5] 王奇玲, 唐立新, 马春杰,等. 供精自愿人群生物学特征与精液指标的相关性分析[J]. 中华男科学杂志,2007,13(1):13-16.

[6] 闫素文, 汤 洁, 张 宁, 等. 18~35岁男性军人精液质量调查[J]. 中华男科学杂志,2007,13(2):134-137.

[7] Lukanov T H, Lichev D I, Konova E I, *et al*. Flow cytometric measurement of sperm nuclear DNA fragmentation in infertile men with normal standard sperm parameters[J]. J Mens Health, 2009, 6(1): 50-55.

[8] Cocuzza M, Athayde K S, Agarwal A, *et al*. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men[J]. Urology, 2008, 71(3): 490-494.

[9] van-Weert J M, Repping S, Van-Voorhis B J, *et al*. Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis[J]. Fertil Steril, 2004, 82(3): 612-620.

[10] Repping S, van-Weert J M, Mol B W, *et al*. Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 2002, 78(1): 22-28.

[11] Rowe P J, Comhaire F H, Hargreave T B, *et al*. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male[M]. Geneva: World Health Organization, 2000.

[12] Coughlan C, Ledger W L. In-vitro fertilisation[J]. Obstet Gynaecol Reprod Med, 2008, 18(18): 300-306.

[13] 徐建亚, 霍 山, 吴曰然,等. 卵胞浆内单精子显微注射治疗男性不育的临床应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(4): 95-96.

[14] Mehmood A, Anwar M, Naqvi S M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen[J]. Anim Reprod Sci, 2009, 111(2-4):141-148.

(编辑 王 红)