文章编号:1000-5404(2010)16-1773-04

论著

精子形态与精液其他参数的关系及对体外受精结局的影响

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

【摘要】 目的 了解精子形态在体外受精(*in vitro* fertilization,IVF)中的作用。**方法** 回顾性调查在本生殖中心接受常规 IVF 治疗者共 397 个周期的精子正常形态率,397 个周期按精子正常形态率不同分为 A 组(≤5%)、B 组(5% < B 组≤14%)及 C 组(>14%),按 IVF 临床结局分为临床妊娠、未妊娠及未移植组,分析其与精液其他参数的关系以及对 IVF 结局的影响。**结果** 精子正常形态率与精液其他参数如精子密度、活率及前向运动精子百分率(PMS)呈显著的正相关(*r* 分别为 0.188、0.197、0.190,$P<0.01$),精子正常形态率、精子密度、活率及 PMS 与受精率均呈显著的正相关关系(*r* 分别为 0.237、0.171、0.155、0.187,$P<0.01$)。A、B 组及 C 组间受精率差异存在统计学意义($P<0.05$),未移植组的精子正常形态率为(15.53 ± 7.54)%,明显低于临床妊娠组的(20.05 ± 9.51)%($P<0.05$),但临床妊娠组与未妊娠组(19.06 ± 9.14)%之间差异无统计学意义($P>0.05$)。在继发不孕患者中,A 组年龄[(41.4 ± 14.1)岁]明显大于 B 组[(35.4 ± 6.4)岁]和 C 组[(34.7 ± 4.6)岁]($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 精子形态对 IVF 受精率和结局有影响,精子正常形态率可能是预测 IVF 结果更好的参数;随着年龄的增长,精子正常形态率下降。

【关键词】 体外受精;精液参数;精子形态;受精率
【中图法分类号】 R321-33;R321.1;R321.2 **【文献标志码】** A

Relationship of sperm and semen parameters and effect of normal morphology on IVF outcomes

Wang Fengying, He Wei, Yu Chiyang, Li Yuyan, Qu Zongyin, Long Ling, Li Mingduo (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of sperm morphology in *in vitro* fertilization (IVF). Methods Relationship between sperm morphology and other sperm parameters and effects of normal forms on IVF outcomes were retrospectively analyzed from 397 IVF cycles in our department from 2008 to 2009. Three group were divided based on sperm morphology, which defined ≤5% normal forms as group A, >5% and ≤14% as group B, and >14% as group C. The IVF outcomes included the clinical pregnancy, pregnancy failure and no embryo transfer. Results The percentage of sperm normal forms was significantly correlated with sperm density, motility, percentage of progressive motile sperm (PMS%) ($r=0.188$, 0.197 and 0.190, all $P<0.01$). The normal form rate, density, motility and PMS% were positively correlated with the fertilization rates ($r=0.237$, 0.171, 0.155 and 0.187, $P<0.01$). There were significant differences in the fertilization rates among groups A, B and C ($P<0.05$). The normal form rates of sperms in patients with no embryo transfer were markedly lower than that in patients with clinical pregnancy [(15.53 ± 7.54)% *vs* (20.05 ± 9.51)%, $P<0.05$], but no differences was found between the clinical pregnancy group and the pregnancy failure group. The age in group A was significantly older than that in groups B and C (41.4 ± 14.1 *vs* 35.4 ± 6.4 and 34.7 ± 4.6, $P<0.05$ and $P<0.01$) among patients with secondary sterility. Conclusion The sperm morphology affects fertilization rates and clinical outcomes in IVF, and may be a better predictive parameter for fertilization in IVF. The sperm normal forms will be decreased with patient age.

【Key words】 *in vitro* fertilization; semen parameter; sperm morphology; fertilization rate

Corresponding author: Wang Fengying, Tel: 86-23-68765903, E-mail: fyw018@163.com

有研究显示,精子形态与其功能密切相关,被认为是衡量男性生育中最好的指标。形态正常精子百分率与受孕有直接关系,比精子密度、精液量和运动性更能在受孕中起预测作用[1]。在我们的前期研究中,已表明精子密度、活率、前向运动精子百分率(PMS)及分离后的精子活率、前向运动精子百分率等均与体外受精(*in vitro* fertilization,IVF)有关[2,3]。为了进一步了解

【通信作者】 王凤英,电话:(023)68765903,E-mail:fyw018@163.com

精子形态在IVF中的作用,本研究回顾性调查2008-2009年在本生殖中心进行常规IVF治疗的397个周期的精子正常形态率,分析其与精液参数及男性相关因素的关系,以及对IVF结局的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性分析2008-2009年在本生殖中心进行常规IVF治疗并完成精液常规分析及形态学检查者共397个周期,年龄22~57(34.23±5.41)岁,不孕时间0.5~20(5.81±3.67)年。不孕诊断中,原发不孕135个周期,继发不孕262个周期。

1.2 精子形态学检查

1.2.1 染液配制 苏木精染液:溶液Ⅰ:5 g苏木精溶解于50 ml乙醇;溶液Ⅱ:硫酸铝钾35.2 g溶解于910 ml热水中,再加入0.4 g碘化钠。将上述溶液Ⅰ和溶液Ⅱ混合,加入40 ml冰醋酸,使用前过滤。伊红染液:配制成0.1%的工作液。

1.2.2 制片 取0.2~0.5 ml液化后精液,用生理盐水稀释至10 ml,以1 000~1 500 r/min,离心10 min,去掉大部分上清液,剩余20~50 μl,将精子重新悬浮于剩余生理盐水中,取5~10 μl悬浮液滴于载玻片的中央,将第2张载玻片表面朝下盖在其上,轻轻拉动使2片分开即可获得2张涂片。每位患者通常制备2~4张。

1.2.3 固定 95%的酒精中固定30 min,风干。

1.2.4 染色 苏木精染色5 min→流水冲洗→0.1%伊红染色5 s→流水冲洗,风干。

1.2.5 镜检 在油镜下重复检查200个精子的形态,根据WHO的评价标准,对精子形态各相关参数进行评估,计算正常形态精子的百分率。

1.3 受精及胚胎培养

根据精液情况分别采用上游法或密度梯度离心方法分离精子。授精时间为取卵后2~6 h,最终授精浓度每个卵约2万个精子。授精后16~20 h(D1)观察原核形成情况,授精后第2天(D2)、第3天(D3)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,每个患者移植1~3个胚胎。

胚胎评分:参照Puissant的标准并作修改如下:4分:卵裂球大小均匀,形态规整,无碎片;3分:卵裂球形态大小稍不均,碎片≤15%;2分:卵裂球形态大小不均,碎片<50%;1分:卵裂球可辨,碎片>50%。

优质胚胎判定:受精后第2天(D2)卵裂球在3个以上或受精后第3天(D3)卵裂球6~10个,评分3分和4分,无空泡、多核等异常,且碎片≤15%者。

1.4 实验分组

参照精子形态严格标准[4]及本中心卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)的形态学标准(即精子正常形态率≤5%时,考虑部分或全部ICSI)将精子正常形态率分为3组(精子形态学分组):A组为≤5%,5%<B组≤14%,C组为>14%。在进行相关分析时,将不孕诊断分为原发不孕和继发不孕,将IVF临床结局分为临床妊娠、未妊娠及未移植。受精率、卵裂率及优质胚胎率只统计D1观察到2PN(原核)的情况。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析及相关性分析。

2 结果

2.1 精子正常形态率与精液参数及其他男性因素的关系

397个IVF周期患者的精子正常形态率、精液量、精子密度、精子活率及前向运动精子百分率(PMS)分别为(19.27±9.25)%、(2.82±2.56)ml、(81.92±49.16)×10^6/ml、(48.28±14.30)%和(23.42±8.94)%。精子正常形态率与精子密度、活率、PMS等均呈显著的正相关(r分别为0.188、0.197、0.190,$P<0.01$),与不孕诊断也有显著相关关系($r=0.130$,$P<0.05$),即原发不孕患者的精子正常形态率低于继发不孕患者。而精子正常形态率与精液量、不孕时间无明显相关(r分别为-0.003、-0.021,$P>0.05$)。

2.2 精子正常形态率与IVF结局的关系

在397个IVF周期中,2PN受精率、卵裂率、优质胚胎率分别为(79.70±28.72)%、(97.39±15.42)%、(42.15±32.61)%,相关分析结果显示,精子正常形态率与2PN受精率具有显著的正相关关系($r=0.237$,$P<0.01$),与卵裂率、优质胚胎率无明显相关(r分别为-0.006、-0.005,$P>0.05$)。

进一步分析精液其他参数与受精率的关系,发现精子密度、活率及PMS与受精率也有显著的正相关关系(r分别为0.171、0.155、0.187,$P<0.01$),但这些参数与受精率的相关系数小于精子正常形态率与受精率的相关系数($r=0.237$)。精液量与受精率无明显相关($P>0.05$)。

397个IVF周期的结局包括临床妊娠157个,未妊娠202个,生化妊娠17个,未移植21个。相关分析未显示IVF结局与精子形态相关($r=0.086$,$P>0.05$),但将生化妊娠合并至未妊娠组,进一步比较临床妊娠组、未妊娠组及未移植组精子的形态差别,结果显示3组的正常形态率依次为(20.05±9.51)%、(19.06±9.14)%及(15.53±7.54)%,未移植组的正常形态率明显低于临床妊娠组($P<0.05$),其他组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

为减少卵子因素对受精率的影响,进一步把统计资料限制在卵子数≥4个,且MⅡ卵数量≥3个、MⅡ卵比率>40%范围(共349个周期),将受精率<25%作为受精率低下组(27个周期),受精率≥25%作为受精率正常组(322个周期),结果显示,受精率低下组的精子正常形态率为(12.86±9.22)%,明显低于受精率正常组(20.00±9.23)%($P<0.01$)。

2.3 不同精子形态学组的受精结果比较

A、B、C组女方获卵数分别为(13.60±6.54)、(10.88±6.28)、(11.05±6.30)个,MⅡ卵数量分别为(9.20±4.32)、(8.42±5.66)、(8.85±5.26)个,组间比较无明显差异($P>0.05$)。授精后D1观察2PN受精率在3组间存在明显差异,A组受精率明显低于B组和C组($P<0.05$,$P<0.01$),B组低于C组($P<0.05$)。但卵裂率、优质胚胎率各组间无明显差异($P>0.05$)。见表1。

由于相关分析显示精子正常形态率与不孕诊断有一定关系,故进一步将继发不孕和原发不孕分开后再比较不同形态学组间的各种参数的差异,发现无论原发不孕还是继发不孕,不同形态学组间精子密度、活率、PMS及受精率等均存在明显差

异($P<0.05$)。原发不孕患者年龄(32.86±4.59)岁,继发不孕患者年龄(35.09±5.61)岁,继发不孕患者年龄明显高于原发不孕患者($P<0.05$)。在继发不孕患者中,A 组的年龄[(41.4±14.1)岁]高于 B 组[(35.4±6.4)岁]和 C 组[(34.7±4.6)岁,$P<0.05$,$P<0.01$]。而原发不孕患者 3 组间年龄无明显差异($P>0.05$)。此外,继发不孕患者 C 组[(39.59±31.73)%]和 B 组[(38.79±31.78)%]的优质胚胎率略高于 A 组[(12.95±17.7)%],但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 不同精子形态学组的体外受精结果比较(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	周期数	受精率	卵裂率	优质胚胎率
A 组	14	55.76±36.33[ac]	97.53±7.41	30.36±36.94
B 组	121	73.68±29.75[b]	96.90±17.35	42.91±32.29
C 组	262	86.46±22.95	98.48±12.20	42.44±32.01

a:$P<0.05$,与 B 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 C 组比较

3 讨论

虽然精液各种参数如精子密度、精子活率、前向运动精子百分率及前向运动精子总数对 IVF 受精率有影响[2],但近年来学者们意识到精子形态可能是评估精液质量及衡量男性生育更好的指标[5]。本研究结果显示精子正常形态率与精液其他参数如精子密度、活率及前向运动精子百分率等均呈显著的正相关,同时与受精率也有非常显著的正相关关系。表明这些参数对 IVF 受精均有一定的影响,因此,体外受精前对这些参数进行检测和综合分析对于选择恰当的受精方式是必要的。尽管如此,本资料同时发现受精率与精子正常形态率之间的相关系数大于其他参数与受精率的相关系数,表明精子形态与受精率的相关性更强。此外,当将精子正常形态率按严格标准进行分组后,我们发现不同精子形态学组间的受精率也存在明显差异,正常形态率越低,受精率也越低。在排除了部分卵子因素影响的情况下,我们通过方差分析发现受精率低下组的正常形态率明显低于受精率正常组,进一步表明精子形态对 IVF 受精有显著影响。这些结果提示精子形态可能是预测 IVF 受精结果更敏感的参数,同时也是选择受精方式最重要的参考指标。

关于精子形态与卵裂率的关系,有少数作者发现正常精子形态率对卵裂率有显著影响[6]。本研究只观察 D1 见到 2PN 的卵裂情况,未发现精子形态对卵裂率产生影响。一般而言,移植时主要是从 D1 形成 2PN 的胚胎中选择,而 2PN 合子的卵裂率都比较高,本资料都在 96% 以上。本研究也未发现精子形态对优质胚胎率有明显影响,与文献[7]报道一致。我们的结果提示,对于体外受精而言,精子正常形态率和精液其他参数的作用主要体现在对受精环节的影响,而对受精后的卵裂及胚胎质量影响不大。最近有研究者比较卵胞浆内形态学选择精子注射(intracytoplasmic morphologically selected sperm injection,IMSI)(放大 8 400 倍以选择形态正常精子)与常规 ICSI 对胚胎质量的影响,结果显示 IMSI 和常规 ICSI 的卵裂率和优质胚胎率无明显差别[8]。该结果从另外的角度表明精子形态学正常与否对卵裂率和优质胚胎率无明显影响。

当然,我们也发现正常形态率≤5% 这组的优质胚胎率有降低趋势。由于大多数正常形态率≤5% 的周期已被本中心纳入 ICSI,使该组样本量偏少,且该组还有一部分属于 half-ICSI 周期(即一半卵子进行常规 IVF,一半卵子进行 ICSI)。而其他文献也往往排除了正常形态率 <5% 的周期。因此,这一结果是否能完全反应精子形态对于胚胎质量的影响还有待进一步证实。

已有研究发现不孕患者精子正常形态率明显下降[9]。对于有胚胎移植的 IVF 周期,我们发现正常形态率与是否妊娠无相关性,但将 IVF 结局分为临床妊娠、未妊娠及未移植 3 组后,发现未移植组的精子正常形态率明显低于临床妊娠组,而未移植组主要包括因未获得可移植胚胎及因严重卵巢过度刺激而取消移植者。表明当精子形态缺陷时,可能通过影响受精而导致无胚胎形成,从而造成 IVF 治疗失败。这一结果与 Obara 等[10]的报道有一定差异。该作者发现精子形态学正常组和异常组的妊娠率、无可移植胚胎的周期率及因过度刺激放弃周期的比率无明显差异。造成这种差异的原因可能系与不同研究资料的精子形态分组标准不同有关。

过去,大多数人认为精子正常形态与年龄无关,最近的一些研究提出了不同的观点,认为精子正常形态率随年龄增大而下降[11]。本研究发现在继发不孕患者中,精子正常形态率各组间存在明显年龄差异,正常形态率随年龄增大而降低,但在原发不孕患者中未发现年龄对精子正常形态的影响,可能与原发不孕患者的平均年龄较小有关。

此外,我们发现精子形态也与不孕诊断有一定相关关系,即原发不孕组精子正常形态率低于继发不孕组。另外的研究显示:在受精失败组中,原发不孕和畸形精子症的比例显著高于受精组[12]。这些结果提示,原发不孕患者精子形态异常情况增加,并由此可能导致受精失败的机会增多,临床应予以重视。

综上所述,本研究表明精子形态与精液其他参数有显著的正相关关系,并对 IVF 受精率和结局均有影响;随着年龄的增长,精子正常形态率下降。相对于精液其他参数,精子形态可能是预测 IVF 受精更好的指标。

参考文献:

[1] Sallam H N, Ezzeldin F, Sallam A, *et al*. Sperm velocity and morphology, female characteristics, and the hypo-osmotic swelling test as predictors of fertilization potential: experience from the IVF model[J]. Int J Fertil Womens Med, 2003, 48 (2): 88-95.

[2] 王凤英，俞炽阳，何畏，等. 常规IVF中受精失败相关因素及后续处理结果分析[J]. 生殖与避孕，2009，29(10)：648－653.
[3] 王凤英，屈宗银，李玉艳，等. 常规体外受精中正常受精率患者的精液参数分析[J]. 第三军医大学学报，2009，31(23)：2378－2380.
[4] Kruger T F, Acosta A A, Simmons K F, *et al*. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization [J]. Fertil Steril, 1988, 49(1): 112－117.
[5] Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen[J]. Asian J Androl, 2010, 12(1): 47－58.
[6] 林典梁，陈永艳，孙艳，等. 人正常精子形态率对辅助生殖治疗结局的影响[J]. 中国误诊学杂志，2007，7(24)：5705－5707.
[7] 吴颖，徐惠明，张松英，等. 精子形态变化对体外受精率的影响[J]. 中华男科学杂志，2008，14(7)：610－613.
[8] Mauri A L, Petersen C G, Oliveira J B, *et al*. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010, 150(1): 42－46.
[9] Ho L M, Lim A S, Lim T H, *et al*. Correlation between semen parameters and the Hamster Egg Penetration Test (HEPT) among fertile and subfertile men in Singapore[J]. J Androl, 2007, 28(1): 158－163.
[10] Obara H, Shibahara H, Tsunoda H, *et al*. Prediction of unexpectedly poor fertilization and pregnancy outcome using the strict criteria for sperm morphology before and after sperm separation in IVF-ET[J]. Int J Androl, 2001, 24(2): 102－108.
[11] Zavos P M, Kaskar K, Correa J R, *et al*. Seminal characteristics and sexual behavior in men of different age groups: is there an aging effect?[J]. Asian J Androl, 2006, 8(3): 337－341.
[12] 师娟子，薛侠，张洲，等. 畸形精子症与常规体外受精失败[J]. 中华男科学杂志，2009，15 (2)：106－109.

(收稿：2010-03-05 修回：2010-03-31)
(编辑 王小宾)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2010)16-1776-01

T管引流术预防肝吸虫病肝切除术后胆漏的临床观察

郑培秋，何艳英 (530300 广西 南宁，横县人民医院肝胆外科)

【关键词】 肝切除术；肝吸虫病；胆漏；T管引流
【中图法分类号】 R657.4 【文献标志码】 B

肝切除术的患者合并肝吸虫病，术后胆漏发生率颇高，成为肝切除术后胆漏的主要危险因素[1]。既往切肝时碰到扩张的胆管溢出大量胆汁或肝吸虫时，术者常意识到需要置管引流，但对切肝术附加T管引流术的适应证仍未有统一的认识。本研究报告2006年1月至2009年12月我科收治的87例肝切除术合并肝吸虫病患者治疗体会，旨在探讨T管引流术在预防肝吸虫病肝切除术后胆漏的作用。

1 临床资料

87例患者中，男性81例，女性6例，年龄24～76(51.9±10.4)岁。手术原因为肝肿瘤或肿瘤样病变。术后病理诊断：肝细胞癌43例，肝内胆管癌28例，混合癌8例，肝腺瘤1例，海绵状血管瘤5例，肝脓肿2例。手术方式：不规则切除52例，半肝切除22例，肝左外叶切除13例。肝吸虫病诊断以术中见到成虫，胆汁或粪便镜检虫卵阳性为准。全组病例按是否附加T管引流分成2组(经患者知情同意)：A组36例，年龄(51.91±9.14)岁，不规则切除23例，半肝切除11例，肝左外叶切除2例，作肝切除术同时行胆道探查、冲洗、T管引流；B组51例，年龄(51.92±11.72)岁，不规则切除29例，半肝切除11例，肝左外叶切除11例，仅作常规肝切除术。2组间年龄、术式等差异均无统计学意义($P>0.05$)。肝吸虫病变的轻重以肝内小胆管扩张作评价指标(排除了共他引起肝内胆管扩张的因素)，主要通过增强CT，结合B超和术中所见确定。以次级胆管直径为标准：轻微扩张≤3 mm，手术所见为肝内胆管可见到肝吸虫，但肝胆外观改变不明显；轻度扩张3～5 mm，术中所见为肝表面特别是肝下缘可见到扩张的末梢胆管；中度扩张5～7 mm，肝表面容易见到扩张的末梢胆管，肝切面上见到明显的扩张胆管，并有污浊稀薄胆汁和虫体溢出；重度扩张≥7 mm，肝表面大量扩张胆管，肝边缘可呈泡沫状，整个肝脏甚至呈蜂窝样改变。A组病例轻微、轻度、中度和重度胆管扩张分别为0、6、21和9例，B组为9、19、14和9例；即A组中、重度扩张占83.3%，B组占45.1%；A组肝内小胆管扩张较B组为重。

手术方法：一般都在入肝血流控制下进行，断肝实质用Ligsure，肝断面能拉拢的拉拢缝合，否则用带血管蒂大网膜包裹或者彻底止血后开放创面，部分喷涂医用凝胶。A组在切肝、彻底止血后，创面先不作处理，先行胆总管切开探查、胆道内冲洗、配合肝外按摩机械驱虫，安置T管后注水测试肝创面胆漏情况，并予以仔细缝扎，直至加压至50～60 cmH_2O (1 cmH_2O = 0.098 kPa)无泄漏。肝创面或肝下置胶管引流，术后按肝切除术常规处理。B组则不附加胆道手术。

术后胆漏评价：观察腹腔引流液，见到胆汁样液，即送标本作胆汁试验，术后3 d仍有胆汁性引流液者，即诊断为胆漏。根据其引流量、患者症状、腹部体征等情况将其分为：①无症状型：虽有胆汁漏出，但无症状，或症状轻微，不需特殊处理而自愈；②易处理型：有腹痛、腹胀等腹膜炎表现，但腹膜炎逐渐局限，4周内愈合；③难处理型：需再次手术或4周内未愈合者，包括死亡时胆漏未愈者。

(下转1780页)

【基金项目】 广西壮族自治区卫生厅科研项目(Z2008325)
【通信作者】 郑培秋，电话：(0772)7222239，E-mail：zhengpeiqiu@sina.com