文章编号:1000-5404(2012)02-0183-03

技术方法

精子 DNA 完整率对 IVF/ICSI 妊娠结局的影响

王英俊[1],李大文[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科[1];530022 南宁,广西壮族自治区人民医院遗传与生殖中心[2])

[摘要] **目的** 探讨精子 DNA 完整率(DNA fragmentation index,DFI)对体外受精(*in vitro* fertilization,IVF)和卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)结局的影响。**方法** 回顾性分析 2008 年 4 月至 2011 年 1 月我院生殖中心收治进行辅助生殖的 162 对夫妇的临床资料,其中 IVF 108 周期,ICSI 54 周期,通过精子染色质扩散试验检测其丈夫精子 DNA 完整率并观察精子 DNA 完整率对辅助生殖结局的影响。**结果** 通过相关系数比较,IVF 组中 DFI 与受精率($r=-0.123$,$P<0.05$)、优质胚胎数($r=-0.139$,$P<0.05$)、临床怀孕率($r=-0.174$,$P<0.05$)有着密切的关系;ICSI 组中无明显的关联。**结论** DFI 对预测 IVF 妊娠结果起作用,而对 ICSI 结局影响不明显。

[关键词] 精子 DNA 完整率;体外受精;卵胞浆内单精子注射;临床怀孕率
[中图法分类号] R321-33 [文献标志码] B

西方国家 10% ~15% 的已婚夫妻存在生育问题[1],男性生殖健康面临的形势十分严峻。生育力低下或不育的患者需要临床治疗来建立妊娠,但常规的手术、药物或激素治疗对相当一部分不育患者的治疗效果不明显。目前临床多趋向于借助辅助生育技术治疗不育症,其中体外受精(*in vitro* fertilization,IVF)和卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)的治疗效率较高。国外有报道称精子 DNA 的损伤会对辅助生殖产生影响[2],但尚未形成一致意见。本研究回顾性分析 2008 年 4 月至 2011 年 1 月来我院生殖中心进行辅助生殖的 162 对夫妇的临床资料,其中 IVF 108 周期,ICSI 54 周期,通过精子染色质扩散试验检测其丈夫精子 DNA 完整率(DNA fragmentation index,DFI)并观察精子 DNA 完整率对辅助生殖结局的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组 162 对夫妇,IVF 组 108 对,ICSI 组 54 对,基本情况见表 1。纳入条件:①女方年龄≤45 岁;②具有正常的月经周期和排卵功能;③不孕原因经子宫输卵管造影、腹腔镜、B 超、内分泌检查、男方精液检查及睾丸活检证实为输卵管阻塞、子宫内膜异位症、男性因素和不明原因不孕。

1.2 研究方法

1.2.1 精子 DNA 完整性检测 禁欲 2 ~7 d,于早晨 8:00 ~10:00 时通过手淫取出精液,用干燥消毒量杯接盛,立即送检,置 37 ℃水浴箱内液化。精子 DNA 的检测采用精子染色质扩散试验。精液标本用磷酸盐缓冲液(pH 6.8)调至 10×10^6/ ml 1 000 r/min 10 min,弃精浆,精子沉渣用磷酸盐缓冲液(pH 6.8)调至(1 ~10)$\times10^6$/ml,取 0.3 ml 处理好的精液与 0.7 ml 1% 低熔点琼脂凝胶混匀,37 ℃孵育;吸取 50 μl 上述精子混合液滴在经过 0.65% 正常熔点琼脂预处理过的载玻片上,盖上 22 mm×22 mm 盖玻片 4 ℃放置 5 min。精子变性及裂解:小心去除盖玻片,室温(22 ℃左右)将标本载玻片浸入 0.08 mol/L 的盐酸内变性 7 min;然后浸入精子裂解液内(pH 7.3)20 min;再移入缓冲液中 3 min,脱水。将标本载玻片依次放入 70%、90% 和 100% 的乙醇中脱水。操作过程均要求载玻片(标本)处于水平状态。空气自然干燥后加入 4',6-二脒基吲哚(DAPI)染色,荧光显微镜下观察结果。除去核蛋白后,精子染色质松散,DNA 环附着在残留的核结构上,形成光晕。

表 1 行 IVF/ICSI 的夫妇基本情况分析

组别	周期(*n*)	女方年龄(岁)	男方年龄(岁)	不育年限(年)	输卵管因素(%)	获卵数(*n*)	受精率(%)	移植胚胎数(*n*)	精液密度(×10⁶/ml)	液化时间(min)	精子形态(%)	精子活力(%)	射精量(ml)
IVF													
怀孕组	32	34.5 ±4.9	36.3 ±5.8	5.4 ±3.2	64.7	10.4 ±6.3	72.8 ±19.7	1.9 ±0.2	62.6 ±37.7	20.4 ±7.5	29.5 ±14.7	57.1 ±21.8	3.2 ±1.5
未怀孕组	76	35.2 ±5.2	36.5 ±4.9	5.5 ±3.7	65.9	8.1 ±5.0	61.4 ±30.8	1.5 ±0.6	67.8 ±41.1	21.9 ±8.2	21.6 ±9.7	54.7 ±19.1	3.4 ±2.6
P 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	—	0.022	0.049	0.014	>0.05	>0.05	0.048	>0.05	>0.05
ICSI													
怀孕组	17	34.9 ±6.3	37.6 ±5.4	6.1 ±3.9	69.7	10.2 ±4.9	78.5 ±20.7	1.9 ±0.3	41.3 ±48.7	20.2 ±10.1	20.1 ±9.9	42.8 ±22.1	—
未怀孕组	37	35.1 ±3.8	36.7 ±6.1	6.4 ±4.2	68.6	9.2 ±5.1	78.1 ±19.9	1.8 ±0.5	36.6 ±38.0	21.55 ±9.8	17.9 ±11.4	43.1 ±25.6	—
P 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	—

[基金项目] 广西医疗卫生重点科研课题(200806)
[通信作者] 李大文,电话:(0771)2130933,E-mail:lidawendavid@yahoo.com.cn

1.2.2 精子核DNA碎片的判断标准 计数500个精子,观察精子光晕大小。根据光晕与精子头部横径的比例,粗分为大、中、小和无光晕4个等级,大和中光晕表示精子DNA完整无碎片,小和无光晕表示精子DNA断裂为碎片。小光晕以精子头直径≤1/4为判断标准;中光晕精子头直径>1/4,≤2/3;大光晕精子头直径>2/3。

1.2.3 IVF/ICSI程序 采用促性腺激素激动剂(Diphereline,益普生公司)/促卵泡生成素(Gonal-F,瑞士雪兰诺)或(和)人绝经期促性腺激素(HMG,丽珠制药)/绒毛膜促性腺激素(Profasi,瑞士雪兰诺)长方案超促排卵。自用促性腺激素4 d后开始B超监测卵泡发育;当有2个卵泡直径大于18 mm时,当晚9:00左右予hCG 10 000 IU肌注,36 h后取卵。精子处理:男方在禁欲3~5 d后用手淫法取精,采用上游或梯度离心的方法收集活动精子,无精患者行经皮附睾精子抽吸术(PESA)或睾丸穿刺(TESE)。将取出的卵子置于培养箱中进一步培养,卵子成熟后加入精液继续培养。ICSI操作:取卵后4~6 h进行去卵丘结构处理,选择见到极体的MⅡ卵进行显微注射。16~18 h后观察受精情况,48 h后观察卵裂情况,48~72 h后选取优质胚胎进行移植。自取卵日开始予黄体酮肌注支持黄体,胚胎移植后14 d验尿hCG,阳性者20 d后B超检查,宫腔内见孕囊或/和胎心搏动者(包括宫外妊娠)诊断为临床妊娠。

1.2.4 妊娠及随访结局 移植后12~14 d,若尿和血hCG阳性,诊断为生化妊娠;移植后28 d,B超下见孕囊诊断为临床妊娠,3胎及3胎以上者行减胎术。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,DFI与胚胎卵裂数、受精率、优质胚胎数、临床怀孕率、男性年龄、女性年龄采用Spearman等级相关测试。百分比数进行平方根反正弦变换和转化。

2 结果

2.1 DFI与IVF组各相关因素的相关系数比较

IFV组DFI与受精率($r=-0.123$)、优质胚胎数($r=-0.139$)、临床怀孕率($r=-0.174$)有着密切的关系($P<0.05$),而与胚胎卵裂数、卵母细胞数,无明显的关联($P>0.05$)。

2.2 DFI与ICSI组各相关因素的相关系数比较

ICSI组DFI与胚胎卵裂数、受精率、优质胚胎数、临床怀孕率均无明显的关联($P>0.05$)。

2.3 精子DNA损伤程度与受精率的关系

回顾行IVF的108周期的男性DFI指数与受精率的情况,其中,DFI 0~5%组,24周期受精率为(70.9±4.8)%,DFI 6%~10%组30周期受精率为(65.2±3.7)%,与DFI>15%组比较[18周期受精率为(52.9±5.0)%]差异有统计学意义($P<0.05$)。DFI 11%~15%组36周期受精率为(62.1±4.5)%。

2.4 IVF和ICSI术后临床怀孕组与未怀孕组DFI的比较

在108周期IVF患者中,怀孕32周期,怀孕率为29.6%。怀孕的32周期IVF患者其丈夫精子DFI值为(5.9±3.6)%,未怀孕76周期IVF患者其丈夫精子DFI值为(9.8±4.9)%,两组DFI比较差异有统计学意义($P<0.05$)。在54周期ICSI患者中,怀孕17周期,怀孕率为31.5%,其对应DFI值为(10.9±5.7)%,未怀孕37周期,其对应DFI值为(11.2±5.6)%,两组DFI比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

精子异常是导致男性不育的主要原因之一。目前精液常规检查主要为精液量、pH值、精子密度、精子活力和形态[3]。但大约15%的男性不育患者,精液常规检查是正常的[4]。因此,仅仅进行精液常规检查还是不够的。在过去的10年中,人们越来越重视精子DNA完整性在男性不育中的作用。国内外研究表明,精子DNA和染色质的损伤与男性不育和女性自然受孕率降低有明显的关联[5-6]。正常情况下,在核中的精子DNA非常稳定,因为它有特殊结构[7]。精子DNA损伤最重要的机制是不正常的染色质包装、活性氧(ROS)和凋亡[8],也可能是外界环境因素造成的,如阴囊温度过高、吸烟、生殖道的感染等[9]。目前精子DNA检测方法很多。SCD法由Fernandez等[10]首先提出,是一种简便、快速、准确地评价精子DNA完整率的方法。

DFI对辅助生殖的影响现在仍然是一个争议的话题。对108周期IVF的回顾性分析发现,DFI与受精率、优质胚胎数、临床怀孕率有着密切的关系,而与胚胎卵裂数无明显的关联;DNA损伤程度与受精率存在关联;怀孕组与未怀孕组DFI比较差异有统计学意义($P<0.05$)。说明DFI对IVF的结果会产生影响。国外研究DFI对IVF影响的文献也很多,但结果并不一致。有些学者认为,DFI会对IVF临床妊娠结果产生重要影响[11-12],但也有很多学者持相反的观点,认为两者并无必然的联系[13-14]。本研究还发现,在ICSI组中,DFI与胚胎卵裂数、受精率、优质胚胎数、临床怀孕率均无明显的关联。ICSI组中怀孕17周期,怀孕率为31.5%,DFI值为(10.9±5.7)%,未怀孕37周期,DFI值为(11.2±5.6)%,2组DFI比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这与国外很多学者的研究结果[9,15]相一致,但也有学者认为DFI会对ICSI临床妊娠结果产生影响[16-17]。

辅助生殖的成功受多种因素的制约。本组临床观察发现,DFI对辅助生殖特别是IVF的结局具有重要的意义。我们认为一个精液常规检查正常,但DFI值相对较高的患者,在作辅助生殖的时候,必须高度重视其可能导致的低受精率和临床怀孕率。

总之,在对108周期IVF和54周期ICSI的回顾性观察发现,DFI与IVF受精率、优质胚胎数、临床怀孕率相关,而对ICSI结局影响不明显。由于观察样本量等条件的限制,该研究结果还需要大样本深入观察,

以更好地指导男科临床。

参考文献：

[1] Evers J L. Female subfertility[J]. Lancet, 2002, 360(9327): 151 – 159.
[2] Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART[J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(4): 337 – 349.
[3] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction[M]. Cambridge: Cambridge University Press: 1999.
[4] Agarwal A, Allamaneni S S. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come[J]. Fertil Steril, 2005, 84(4): 850 – 853.
[5] Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, *et al*. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility *in vivo*: a case-control study[J]. Int J Androl, 2010, 33(1): e221 – e227.
[6] 张洲, 师娟子, 邢俊平, 等. 复发性流产与精液常规参数、精子畸形率和 DNA 完整性的相关性[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(16): 1788 – 1792.
[7] Agarwal A, Said T M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(4): 331 – 345.
[8] Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(4): 529 – 536.
[9] Zini A, Phillips S, Courchesne A, *et al*. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay[J]. Fertil Steril, 2009, 91(6): 2495 – 2500.
[10] Fernandez J L, Muriel L, Rivero M L, *et al*. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation[J]. J Androl, 2003, 24(1): 59 – 66.
[11] Saleh R A, Agarwal A, Nada E A, *et al*. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility[J]. Fertil Steril, 2003, 79(Suppl 3): 1597 – 1605.
[12] Virro M R, Larson-Cook K L, Evenson D P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles[J]. Fertil Steril, 2004, 81(5): 1289 – 1295.
[13] Frydman N, Prisant N, Hesters L, *et al*. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation[J]. Fertil Steril, 2008, 89(1): 92 – 97.
[14] Bakos H W, Thompson J G, Feil D, *et al*. Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy[J]. Int J Androl, 2008, 31(5): 518 – 526.
[15] Lin M H, Kuo-Kuang-Lee R, Li S H, *et al*. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates[J]. Fertil Steril, 2008, 90(2): 352 – 359.
[16] Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, *et al*. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART[J]. Hum Reprod, 2006, 21(11): 2876 – 2881.
[17] Bungum M, Spano M, Humaidan P, *et al*. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART[J]. Hum Reprod, 2008, 23(1): 4 – 10.

（收稿：2011-08-02；修回：2011-11-14）
（编辑 龙 亮）

（上接 182 页）

3 讨论

剖宫产切口通常选择在子宫下段，即子宫解剖学的峡部，该部分在非妊娠状态下长约 1 cm，峡部组织学特征为缺乏丰富的肌层组织，因此收缩力差，出血后不易止血，因此早期诊断显得尤为重。国外报道病例大部分依据 1997 年 Godin 等[4-5]提出子宫下段切口处妊娠的超声诊断标准：①子宫腔内未见妊娠囊；②子宫颈管内未见妊娠囊；③子宫峡部前壁见妊娠囊；④妊娠囊与膀胱间肌壁菲薄。本组病例声像图具有典型特点，于子宫前壁峡部见孕囊或混合回声区，子宫腔及子宫颈管内未见孕囊，前壁浆膜层变薄。本组 31 例彩色多普勒超声显示瘢痕处见血流信号，呈低阻力型，因此结合临床表现，彩色多普勒超声可以明确诊断。

剖宫产术后子宫瘢痕处妊娠虽然具有较特异的声像图特征，但是容易与难免流产、宫颈妊娠、子宫切口血肿、局灶性子宫内膜异位症混淆，应注意鉴别。本组不同类型剖宫产术后子宫瘢痕处妊娠声像图表现不同，临床治疗方法不同，在 B 超监护下高危诊刮 8 例，病灶较小，前缘距子宫前壁浆膜层≥5 mm，滋养层血流稀少，术后 B 超随访宫内未见明显残留。天花粉治疗 7 例，病灶 2 ~ 5 cm，前缘距子宫前壁浆膜层 3 ~ 5 mm，滋养层血流散在或较丰富，血 β-HCG≤10 000 IU/L，治疗期间随访血 β-HCG 明显下降，跟踪 B 超检查，包块明显缩小。子宫动脉栓塞术后 24 h 超声下刮宫 16 例，病灶子宫峡部前壁肌层明显变薄，前缘距前壁浆膜层≤3 mm，甚至达前壁浆膜层，滋养层血流丰富，血 β-HCG > 10 000 IU/L，术后随访血 β-HCG 进行性下降，B 超随访包块逐渐缩小。

综上所述，超声检查能够实时、准确地提供诊断与治疗信息，重复性好，早期超声诊断有助于临床选择合理有效的治疗方案。

参考文献：

[1] 周平, 叶智霞. 剖宫产术切口妊娠的超声诊断[J]. 中国当代医药, 2010, 17(20): 90 – 91.
[2] 张爱青, 刘朝晖, 赵文秋, 等. 剖宫产切口瘢痕妊娠的声像图特征及临床分析[J]. 临床超声医学杂志, 2008, 10(9): 622 – 624.
[3] 邓梅先, 柯水香. 剖宫产术后子宫切口妊娠的诊治方法探讨[J]. 中华现代妇产科学杂志, 2009, 6(4): 26 – 28.
[4] Godin P A, Bassil S, Donnez J. An ectopic pregnancy developing in a previous caesarian section scar[J]. Fertil Steril, 1997, 67(2): 398 – 400.
[5] Bignardi T, Condous G. Transrectal ultrasound-guided surgical evacuation of Cesarean scar ectopic pregnancy[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2010, 35(4): 481 – 485.

（收稿：2011-09-27；修回：2011-11-07）
（编辑 龙 亮）