术后较多的并发症限制了其使用,常见的并发症包括瘢痕形成、瘢痕溃疡、淋巴瘘、皮肤炎症和湿疹都等。

我们对经典 Charles 手术进行了改良和系统化。采取分次手术和多种手术方式联用的方法,一期进行小腿皮片移植联合大腿皮瓣转移,半年至1年之后,对大腿部的病变组织采用小范围吸脂术[5],一般常可获得较为理想的效果。手术去除了几乎全部的肿胀增生的皮下组织,带来的好处包括:皮肤更易清洁,减少了反复发作的皮肤软组织炎症、淋巴结炎等,结合烘绑治疗等保守治疗作用更加直接、效果更好,肢体的活动性更好,患者自觉十分满意。采用原位厚中厚皮片移植覆盖创面,既能够保证较高的皮片存活率、减少术后并发症,术后也能获得较好的美容效果,大张的皮片移植则减少了术后瘢痕的形成。大腿部位进行楔形切除,减少了大腿小腿之间周径的差距,术后患肢形态更加接近健侧。而皮瓣转移及吸脂术的联用,则有效减少了移植皮片的面积,减少了术后并发症,同时保留了关节部位的功能,避免了瘢痕所致畸形引起的功能障碍。患者的外观及功能均得到不同程度的改善,值得临床推广。

参考文献:

[1] 张涤生. 整复外科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 815-835.
[2] Murdaca G, Cagnati P, Gulli R, *et al*. Current views on diagnostic approach and treatment of lymphedema [J]. Am J Med, 2012, 125(2): 134-140.
[3] Doscher M E, Herman S, Garfein E S. Surgical management of inoperable lymphedema: the re-emergence of abandoned techniques [J]. J Am Coll Surg, 2012, 215(2): 278-283.
[4] Becker C, Arrive L, Saaristo A, *et al*. Surgical treatment of congenital lymphedema [J]. Clin Plast Surg, 2012, 39(4): 377-384.
[5] Schaverien M V, Munro K J, Baker P A, *et al*. Liposuction for chronic lymphoedema of the upper limb: 5 years of experience [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2012, 65(7): 935-942.

(**收稿**:2013-03-31;**修回**:2013-05-21)
(编辑 王小宴)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2244-03

SperMagic 在68例人卵细胞质内单精子注射周期中的应用

曾兴光,刘永刚,李明舵,洪 伟,孟 丹,朱石令,屈清华,李 敏,何 畏 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[**摘要**] **目的** 探讨 SperMagic 在人卵细胞质内单精子注射中应用对精子活动数量、卵子受精、胚胎发育及临床结局的影响。**方法** 回顾性分析2011年1月至2013年1月在本科接受细胞质内单精子注射的严重少弱精或非梗阻性无精子症周期共132例,分为研究组68例和对照组64例。研究组在精液处理结束后的50μL精子授精液中加入5 μL的 SperMagic,对照组未添加 SperMagic。比较2组精子活动力、2PN 受精率、卵裂率、优质胚胎率、可用胚胎率及临床妊娠率。**结果** 2组年龄、2PN 受精率、临床妊娠率差异无统计学意义($P>0.05$),但研究组的精子活动力显著高于对照组($P<0.01$),而且优质胚胎率、可用胚胎率明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** SperMagic 在细胞质内单精子注射中应用有助于选择正常精子,有利于合子的形成及胚胎的发育,从而能有效提高胚胎利用率,有助于获得较好的临床结局。

[**关键词**] 激动剂;精子活力;细胞质内单精子注射;优胚率
[**中图法分类号**] R321.1;R321.2;R984 [**文献标志码**] A

卵细胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)是重度少精、弱精、畸精等男性不育症的有效治疗方法[1],而经皮附睾精子抽吸术(percutaneous epididymal spermaspiration,PESA)或者经皮睾丸精子抽吸术(testicular sperm aspiration,TESA)与 ICSI 结合是目前治疗无精子症患者的有效方法[2]。近年来,有许多关于优化 ICSI 精子方法的研究报道,包括通过结合透明质酸、卵丘复合物、透明带的实验选择具有受精能力的精子,或通过将精子放大6 600倍从超微形态上选择形态正常的精子(intracyto plasmic morphologically selected sperm injection,IMSI)等方法[3]。处理严重少弱精、非梗阻性无精子症等男性的精子,经常发现可选择的正常精子不多,其余为不动(immobility,IM)精子,为了选择形态佳的活精子卵子会因此在培养箱外的时间延长,因此急需一种简单迅速有效选择

[**通信作者**] 何 畏,E-mail:anyhewei@yahoo.com.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130625.1251.013.html(2013-06-25)

正常精子的方法。本研究使用的 SperMagic 是精子钙的激动剂,国外研究[4-6]发现可以刺激精子的能量激发,增强精子运动能力。严重少弱精、非梗阻性无精子症等精子添加 SperMagic 后,通过提高精子活力,增加可选择的正常形态精子数目,达到缩短 ICSI 时间和提高 ICSI 质量。我们回顾性比较添加 SperMagic 的研究组和对照组的受精率、优胚率和临床妊娠率等指标,分析添加 SperMagic 的方法是否有助于优化 ICSI 结局。

1 资料与方法

1.1 研究资料

选择2011年1月至2013年1月在西南医院妇产科生殖中心行 ICSI 的周期患者,均经患者知情同意。女方均为原发性不孕,排除子宫内膜异位症、子宫肌瘤、子宫腺肌症等因素,女方年龄(28.89±4.64)岁。男方排除重大疾病和遗传性疾病,根据 WHO 标准诊断为非梗阻性无精子症或严重少弱精子症,共132例细胞质内单精子注射周期,根据当时处理精液过程中是否添加 SperMagic,分为研究组68例,对照组64例。根据取精方式又可分为手淫、经皮附睾精子抽吸术和经皮睾丸精子抽吸术3个类型。

1.2 方法

按本中心常规[7],于上次月经黄体中期开始皮下注射 GnRHa醋酸曲普瑞林 0.1 mg, 在月经第3~5天达到降调标准后改GnRHa 0.05 mg/d,开始每天加用重组尿促卵激素(rFSH)150~300 IU;每隔2~4天行阴道超声检查和血清性激素检测,以检测卵泡发育情况并调整 rFSH 用量;当出现3个以上直径18 mm的卵泡时,当晚肌注人绒毛膜促性腺激素(HCG)10 000 IU,34~36 h后在阴道 B 超引导下行卵泡抽吸,将卵母细胞收集在卵子授精液中培养。

严重少弱精患者通过手淫获取精液,非梗阻性无精子症患者通过经皮附睾精子抽吸术或者经皮睾丸精子抽吸术获取精子,以上两种方式获取的精液处理方法如下:2 000×g 离心洗涤2次,最后留取微量(50 μL)上清。研究组,在上清中加入5 μL 的 SperMagic,对照组不加,放入培养箱孵育5~10 min 以上即可使用。HCG 后40 h 行 ICSI,将处理好的两组精子吸取10 μl 至 ICSI 操作皿内的50ul 的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)微滴中,增加操作液的黏性来降低精子运动速度,并在400倍视野下对活动精子计数,5个不同视野下的平均活动精子数即为该标本的每视野活动精子数量。

ICSI 后16~18 h 观察卵细胞内出现双原核(2PN)为正常受精,原核>2判断为多精受精。受精后48 h 观察胚胎发育情况,受精后66~68 h,对胚胎进行评分,如果胚胎符合以下条件:卵裂球≥6,碎片≤15%,卵裂球均匀或不均(直径相差<1/3),无空泡,粗糙度适中,卵裂球无多核,可评为3分以上的优质胚胎,可选择1~2个优质胚胎进行移植。同时每天给予黄体酮40~60 mg 肌肉注射,所有患者于移植后14 d 查血 HCG 确定是否妊娠,并在3周后行 B 超观察有孕囊或流出物病理检查见绒毛者为临床妊娠。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,2组资料间计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 2组构成比例

2组均有3种不同来源的精液组成,研究组有22例手淫获取的精液,42例经皮附睾精子抽吸术、4例经皮睾丸精子抽吸术,对照组有18例手淫获取的精液,40例经皮附睾精子抽吸术、6例经皮睾丸精子抽吸术,2组构成比例无差异($P=0.695$)。

2.2 活动精子数量的比较

2组在显微镜5个视野下平均可见的活动精子有显著的差别(3种不同来源的精液分为2组比较,$P=0.000$)。见表1。

表1 2组活动精子数量(条,$n=10$)

精液来源	研究组	对照组
手淫	40.2±13.18[a]	16.5±5.25
PESA	8.6±4.00[a]	2.5±1.08
TESA	2.7±1.34[a]	0.8±0.79

a: $P<0.01$,与对照组比较

2.3 临床结局比较

2组的平均年龄、受精率、卵裂率、临床妊娠率无差异($P>0.05$),但研究组临床妊娠率略高于对照组,研究组的优胚率和可用胚胎率高于对照组,并且有统计学差异($P<0.05$)。研究组、对照组在胚胎移植日分别有18例和24例取消移植,原因为取卵数超过15~20个,预防卵巢过度刺激综合征(ovarianhyperstimulationsyndrome,OHSS)发生,或因胚胎质量差的因素而取消移植。

表2 2组胚胎发育及临床结局比较

组别	周期数	平均年龄[岁,$\bar{x}\pm s$]	MII 率[例(%)]	2PN 受精率[例(%)]	2PN 卵裂率[例(%)]	2PN 优质胚胎
研究组	68	29.06±5.51	614(85.28)	370(60.26)	370(100)	190
对照组	64	28.71±3.53	680(87.40)	412(60.59)	402(97.57)	148

组别	优胚率[例(%)]	移植胚胎数	冷冻胚胎数	可用胚胎数	可用胚胎率[例(%)]	临床妊娠率[例(%)]
研究组	190(51.35)[a]	94	210	304	304(82.16)[a]	26(52)
对照组	148(36.82)	92	200	292	292(72.64)	20(45.45)

a: $P<0.05$, 与研究组比较

3 讨论

目前临床操作中发现精子的选择对ICSI临床结局尤为重要,挑选精子时可能将有遗传基因缺陷的精子注射到卵子内,影响受精、后期胚胎发育及临床结局[8],精子形态作为评价精子质量的一项重要指标,常优先选择正常形态的活动精子行ICSI。Matyas等[9]通过5年的无精子症ICSI积累分析发现,活动精子多的组,就更容易挑选到正常形态的精子行ICSI,临床妊娠率要高于活动精子少的组。遇到畸精症患者时,正常形态的精子少造成选择精子困难,若没有活动的精子,就更难选择合适的精子行ICSI,可能导致受精失败。Nagy等[12]分析了近千例ICSI治疗周期得出一个结论,精液中即使无活动精子,或无正常形态的精子,仍可能妊娠,关键在于是否找到一条活精子注射入卵子。有报道通过精子膜标记物选择成熟精子,或通过将精子放大6 600倍从超微形态上选择形态正常的精子(intracyto plasmic morphologically selected sperm injection,IMSI)[3],虽然可选择到形态正常的精子,但是需要特定的设备,操作繁琐,延长了卵子在培养箱外的时间,由于卵子对pH、温度的波动的敏感性,在培养箱外操作过久,会对卵子的纺锤体造成不可逆的损伤[10-11],严重影响后期胚胎发育和临床结局。因此在培养箱外操作卵子过程中,选择正常形态精子的时间需要严格控制,关键是如何有效缩短选择正常形态的精子时间,以期达到良好效果。

国外研究[13]发现精子尾部的摆动由精子胞浆内的Ca^{2+}浓度调节,精子胞膜上的Ca^{2+}离子信号通路控制精子活力及活化过程[14],因此,有许多研究通过相关信号通路激活精子活力。本研究使用的SperMagic就是含有钙的激动剂和营养元素[4],通过Ca^{2+}离子信号通路激活精子活力,激发能量,促使其尾部摆动,增强精子运动能力,使原来不动的活精子摆动起来。冯怀亮等[15]在手术获取的附睾和睾丸精液中随机分组添加SperMagic,发现研究组的活动精子数量显著增多,试验组的附睾精子和睾丸精子每视野分别为2~3条和1~1.5条活动精子,而相应的对照组每视野低于1条活动精子,ICSI操作时间显著降低了,这与我们的研究发现是一致的,他们还发现受精率和着床率均有显著提高,其中着床率接近30%,而对照组不到20%,这与我们研究发现的试验组临床妊娠率略高于对照组($P>0.05$)是吻合的,我们还发现试验组的优胚率和可用胚胎率显著高于对照组,由此可见SperMagic有助优化临床结局。

本研究发现SperMagic是一种实用性很强的精子激动剂,应用在ICSI操作中能有效改善精子活力,扩大选择正常形态精子的范围,另外使用SperMagic时需要注意,添加SperMagic后,精子的运动速度提高,需要在ICSI操作皿内添加PVP降低精子速度,方便观察精子形态。由于本研究周期病例较少,还需要进一步积累资料,进一步深入分析SperMagic提高ICSI临床妊娠率的作用,这样对临床治疗才具有更好的指导意义。

参考文献:

[1] Palermo G D, Neri Q V, Hariprashad J J, *et al*. ICSI and its outcome [J]. Semin Reprod Med, 2000, 18(2): 161-169.

[2] 冼志勇, 李飞, 邹亚光, 等. 不同生精功能和取精方式对无精子症ICSI妊娠结局的影响[J]. 中国男科学杂志, 2010, 24(2): 35-38.

[3] Nasr-Esfahani M H, Deemeh M R, Tavalaee M. New era in sperm selection for ICSI[J]. Int J Androl, 2012, 35(4): 475-484.

[4] Zheng L J, Han Y, Feng H L. Impact of spermagic medium on pregnancy in humans after intrauterine insemination [J]. Biol Reprod, 2008, 78: 182.

[5] Zheng H L, Feng L J. Induced motility of MESA/TESE spermatozoa is associated with increased fertilization and implantation rates in human [J]. Reproduction Fertility & Development, 2006, 18(2): 259.

[6] Feng H L. Effect of TESE medium on performing time of incytoplasmic sperm injection (ICSI) and the fertilization rate in human[J]. Theriogenology, 2008(Suppl): 36.

[7] 何畏, 俞炽阳, 李红梅, 等. 重复IVF/ICSI-ET治疗对卵巢反应性及妊娠结局的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(15): 1667-1669.

[8] Merchant R, Gandhi G, Allahbadia G N. *In vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection for male infertility[J]. Indian J Urol, 2011, 27(1): 121-132.

[9] Matyas Sz, Rajczy K, Papp Gy, *et al*. Five years experiences with microinjection of testicular spermatozoa into oocytes in Hungary[J]. Andrologia, 2002, 34: 248-254

[10] Rabea Khoudja, Tao Li, Chenhui Ding, *et al*. Effect of coincubation of oocytes with a decreasing number of spermatozoa on embryo quality [J]. Reproductive BioMedicine Online, 2012, Dec 28. [Epub ahead of print].

[11] K. Jayakrishnan. Insights into Infertility Management[M]. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers(P) Ltd, 2012: 190-191.

[12] Nagy Z, Janssenswillen C, *et al*. Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or *in vitro* fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa[J]. Hum-Reprod, 1998, 13 (6): 1606

[13] Olson S D, Fauci L J, Suarez S S. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation[J]. Mol Hum Reprod, 2011, 17(8): 500-510.

[14] Alasmari W, Barratt C L, Publicover S J, *et al*. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation[J]. Hum Reprod, 2013, 28(4): 866-876.

(**收稿**:2013-03-31;**修回**:2013-05-23)

(编辑 吴培红)