DOI:10.16016/j.1000-5404.201603024

重庆市大学生精液常规参数与精子 DNA 损伤的关联性分析

刘太秀[1,2],崔志鸿[2],曹 佳[2] (750004 银川,宁夏医科大学公共卫生与管理学院[1];400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨重庆市在校大学生精液常规参数与精子 DNA 损伤水平之间的关联性。**方法** 2014 年6 月招募的重庆大学生男性生殖健康调查(male reproductive health in Chongqing college students,MARHCS)队列 639 名健康大学生,手淫法采集精液样本,用计算机辅助精子分析系统(Computer-aided sperm analysis, CASA)进行精液常规分析,采用 Diff-Quick 试剂盒检测精子形态,采用单细胞凝胶电泳(彗星实验)检测精子 DNA 损伤,采用 Spearman 相关分析探讨精子 DNA 损伤与精液常规参数间的关联性。**结果** 大学生人群精液常规各指标(中位数):精液量为 3.6 mL,精子密度为 52.0×10^6/mL,精子总活力为 89.4%,前向运动精子百分率为 57.0%,精子正常形态率为 21.3%。精子 DNA 损伤(彗星实验指标)水平:尾部 DNA 含量百分比(Tail DNA%)为 19.4%,尾长(tail length,TL)为 35.7 pixels,彗星长(comet length,CL)为 81.6 pixels,尾距(tail moment,TM)为 7.6,Olive 尾距(olive tail moment,OTM)为 6.3。经 Spearman 相关性分析,精子密度与 Tail DNA% 呈负向关联($P<0.05$),精子总活力(%)与 Tail DNA%、CL、TM、OTM 呈负向关联(P 值均 <0.01),前向运动精子百分率与精子 Tail DNA%、CL、TL、TM、OTM 呈负向关联(P 值均 <0.05)。**结论** 重庆市大学生精子密度、精子总活力、前向运动精子百分率均与精子 DNA 损伤呈负向关联。

[关键词] 精液分析;精子 DNA 损伤;大学生;关联分析

[中图法分类号] R181.3+7; R195.2; R321.1 [文献标志码] A

Association analysis between routine semen parameters and sperm DNA damage in Chongqing college students

Liu Taixiu[1,2], Cui Zhihong[2], Cao Jia[2] ([1] School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750004; [2] Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the association between routine semen parameters and sperm DNA damage in Chongqing college students. **Methods** A total of 639 college students which were recruited in MARHCS (Male reproductive health in Chongqing College students) cohort study in 2014 were enrolled in this study. Semen samples were collected by masturbation. Routine semen parameters were performed by computer-aided sperm analysis system (CASA), and Diff-Quick kit and Single cell gel electrophoresis (Comet assay) were used to evaluate sperm morphology and DNA damage, respectively. Association analysis between main semen parameters and sperm DNA damage was performed by Spearman correlation. **Results** The median semen parameters in college students were as following, semen volume 3.6 mL, sperm concentration 52.0×10^6/mL, sperm total motility 89.4%, sperm progressive motile 57.0%, and sperm normal morphology 21.3%. Sperm DNA damage (Comet assay parameters) study showed that DNA in the comet tail (Tail

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130051)

[通信作者] 曹 佳,电话:(023)68772534,E-mail: caojia1962@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160422.1533.006.html(2016-04-22)

DNA%) was 19.4%, tail length (TL) was 35.7 pixels, comet length (CL) was 81.6 pixels, tail moment (TM) was 7.6, and olive tail moment (OTM) was 6.3. Spearman correlation analysis showed that sperm concentration was negatively correlated with Tail DNA% ($P < 0.05$), sperm total motility (%) was negatively associated with Tail DNA%, CL, TM and OTM ($P < 0.01$), and sperm progressive motile (%) was negatively associated with Tail DNA%, CL, TL, TM and OTM ($P < 0.05$). **Conclusion** Sperm concentration, total sperm motility, and progressive motility are all negatively associated with sperm DNA damage parameters in Chongqing college students.

[**Key words**] semen analysis; sperm DNA damage; college students; association analysis

Supported by the Key Project of National Science Foundation of China (81130051). Corresponding author: Cao Jia, E-mail: caojia1962@126.com

精液常规分析是评价精液质量、评估男性生育能力的常规方法。目前临床常用的精液常规指标主要是精液量、pH 值、精子密度、精子数量、精子活力、精子形态等,其对临床指导意义的局限性越来越明显。近年来精子 DNA 损伤作为一项独立于精液常规参数之外的评价指标,逐渐成为男性不育症研究的热点,精子 DNA 损伤可影响精子的受精能力、受精卵的分裂、胚胎发育和着床,进而降低妊娠率、增大流产的风险[1]。因此,精子 DNA 损伤已经成为评价精子质量和生育能力的有效指标[2]。我们的前期研究也证明,环境化学物的暴露在不引起精液常规参数改变的水平下可引起精子 DNA 损伤[3]。目前精子 DNA 损伤已逐渐成为精液常规分析的必要补充[2-5],但也有一些研究认为精子 DNA 损伤对于人工辅助生殖(assisted reproductive techniques, ART)就诊者的受孕率没有明确的指示作用[6-7]。本研究采用单细胞凝胶电泳技术(彗星实验)检测重庆大学生健康人群精子 DNA 损伤水平,分析其与精液常规多种参数间的关联性,探讨精子 DNA 损伤检测在评价精液质量和男性生育能力中的应用价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究获得第三军医大学伦理委员会批准,于 2014 年 6 月开展大学生生殖健康现场调查,招募来自重庆大学、重庆医科大学、西南政法大学等 9 所重庆高校的健康男性大学生 639 名,全部受访者签署知情同意书。研究对象纳入标准:①禁欲 2 ~ 7 d;②年满 18 周岁;③重庆市在读大学生。排除标准:①泌尿生殖系统疾病史,包括确诊的睾丸损伤、附睾炎、睾丸下降不全、泌尿生殖系统炎症、精索静脉曲张治疗史;②由调查现场中男科医师检查确认以下情况:附睾结节或精索静脉曲张、隐睾、阴茎异常、阴毛发育异常、喉结发育异常、乳腺发育异常。

1.2 方法

1.2.1 精液标本采集 研究对象禁欲 2 ~ 7 d 后,手淫法采集精液样本于无菌的塑料采样皿中,立即置于 37 ℃孵箱中液化。记录受试者禁欲时间,待完全液化后立即进行精液常规分析。

1.2.2 精液常规分析 严格执行 WHO《人类精液和精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册》(第五版)操作要求,采用计算机辅助精子分析系统(SCA CASA system, Spain)进行精液常规分析;精子形态学分析,首先制备精液涂片,风干后用 Diff-Quik 试剂盒(Baxter 92 Healthcare Corporation, Inc.)进行染色分析。

1.2.3 精子 DNA 损伤检测 采用单细胞凝胶电泳(彗星实验)检测精子 DNA 损伤水平。将冻存的精液样本置于 37 ℃ 水浴锅中,至刚好融化后立即取出,吸取 20 μL 精液样本并调节精子密度至 3×10^6/mL,按照 Luke Simon 的方法[8](略有调整)进行操作。具体过程为:将调节好密度的精子悬液与 0.6% 的低熔点胶混合,平铺于预先用 1% 琼脂糖铺过的载玻片上,经裂解液(2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na_2 EDTA, 10 mmol/L Tris, NaOH 8 g, 10% DMSO, 1% Triton X-100;pH 10.0,4 ℃,70 min)处理以去除细胞器、核膜和部分核蛋白,再经蛋白酶 K(100 μg/mL; 37 ℃, 16 h;AMO)液进一步除去核蛋白尤其是鱼精蛋白,经碱性溶液(0.3 mol/L NaOH, 1 mmol/L Na_2 EDTA; 37 ℃,20 min)解旋后将玻片置于电泳槽中进行电泳,使断裂的 DNA 片段电泳出来形成彗星样形态;经溴化乙啶(EB)染色后置于荧光显微镜下观察、拍摄照片。最后将拍摄好的照片用专门的彗星分析软件 Casp (http://casplab.com/)进行图像分析和数据处理,选取 5 项常用的彗星指标:①尾部 DNA 含量百分比(Tail DNA%);②尾长(tail length, TL);③彗星长(comet length, CL);④尾距(tail moment, TM);⑤Olive

尾距(olive tail moment,OTM)来反应精子 DNA 损伤水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,因所得检测结果为非正态数据资料,用中位数(median)和四分位数间距范围(interquartile range)进行描述;用 Kruskal-Wallis 检验对分层资料进行数据的比较分析;用 Spearman 相关性分析对精液常规参数和彗星参数进行关联性分析;检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 人口学背景资料

639 例重庆大学生分别来自汉族、土家族、哈萨克族、彝族、苗族、柯尔克孜族、蒙古族、瑶族、穿青人、仡佬族、回族、壮族、水族、藏族、侗族 15 个民族,其中汉族占 84.0%;平均年龄 22.0(四分位数间距:21.0~23.0)岁,平均禁欲时间 4.0 d,平均体质量指数(BMI)21.2(四分位数间距:19.7~22.9)kg/m^2;吸烟人数占 21.6%,饮酒人数占 74.8%(表 1)。

表 1 研究人群的人口学特征($n=639$)

特征	例数(%)
民族	
汉族	537(84.0)
土家族	21(3.3)
哈萨克族	9(1.4)
彝族	7(1.1)
苗族	8(1.3)
其他民族	57(8.9)
吸烟	
从不	467(73.1)
已戒烟	34(5.3)
吸烟	138(21.6)
饮酒	
从不	125(19.6)
已戒酒	36(5.6)
饮酒	478(74.8)

2.2 精液常规各指标及其合格率

样本各参数合格率分别为:精液量 98.6%、精子密度 95.4%、精子总数 96.7%、精子正常形态率 91.9%、前向运动精子百分率 82.3%、精子总活力 99.4%(异常值:精液量 <1.5 mL,精子密度 $<15\times10^6$/mL,精子总数 $<39\times10^6$/次,前向运动精子百分率 <40%,精子总活力 <32%,精子正常形态率 <4%);所有指标都符合 WHO 标准的占 68.9%(439/637),见表 2。

表 2 MARHCS 队列男性精液各参数值及符合 WHO 正常参考值的百分率($n=637$)

参数	中位数(四分位数间距)	符合率(%)
精液量(mL)	3.6(2.8~4.6)	98.6
精子密度(10^6/mL)	52.0(33.5~81.7)	95.4
精子总数(10^6/mL)	193.6(115.0~310.8)	96.7
精子形态		
正常形态(%)	21.3(14.3~32.2)	91.9
头部异常(%)	53.2(45.9~59.5)	–
体部异常(%)	41.6(39.1~43.8)	–
尾部异常(%)	34.6(31.4~39.1)	–
精子运动参数		
前向运动精子(%)	57.0(45.2~67.8)	83.2
精子总活力(%)	89.4(80.8~94.9)	99.4
VCL(μm·s^{-1})	53.5(45.0~62.1)	–
VSL(μm·s^{-1})	20.6(16.7~24.8)	–
VAP(μm·s^{-1})	31.8(26.4~37.7)	–
BCF(Hz)	12.3(10.7~13.7)	–
ALH(μm)	1.8(1.5~2.1)	–
LIN(%)	38.1(34.5~41.9)	–
STR(%)	64.9(60.9~69.0)	–
WOB(%)	58.7(55.5~61.9)	–

2.3 精液参数影响因素分析

研究对象按照禁欲天数分为 3 组,2~3 d、4~5 d、6~7 d;BMI 按照中国人群标准分为 4 组,<18.5 kg/m^2(偏瘦),18.5~<24 kg/m^2(正常)、24~<28 kg/m^2(偏胖)、≥28 kg/m^2(肥胖);按吸烟状态分 3 组,从不吸烟、已经戒烟、吸烟;按饮酒状态分3 组,从不饮酒、已戒酒、饮酒。

禁欲天数对精液量($P\leqslant0.001$)、精子密度($P\leqslant0.001$)、精子总数($P\leqslant0.001$)、前向运动精子百分率($P=0.005$)都有影响,并且禁欲 2~3 d 组以上的指标均低于 4~5 d、6~7 d 组;BMI 对精子总数有影响,精子总数随 BMI 分级的升高而降低;吸烟会对精子正常形态率产生影响;饮酒对精子密度、精子总数、前向运动精子百分率、精子总活力都有影响(表 3)。

2.4 彗星实验检测精子 DNA 损伤

经彗星实验测得精子 DNA 损伤各参数中位数(四分位数间距范围):Tail DNA% 为 19.4%(15.6~23.4),TL 为 35.7(30.9~41.0)pixels,CL 为 81.6(76.6~85.9) pixels,TM 为 7.6(5.5~10.1),OTM 为 6.3(4.9~7.9)。

2.5 精液参数与精子 DNA 损伤参数关联性分析

精子 DNA 损伤彗星指标主要与精子运动能力相关联,前向运动精子百分率与 Tail DNA%、TL、CL、TM、OTM 都呈负向关联,精子总活力与 Tail DNA%、CL、TM、OTM 呈负向关联;Tail DNA% 与精子密度也存在负向关联(表 4)。

表 3 精液参数影响因素分析结果[中位数(四分位数间距)]

影响因素	n	精液量(mL)	精子密度(10^6/mL)	精子总数(10^6)	前向运动精子(%)	精子总活力(%)	正常形态率(%)
禁欲时间							
2~3 d	225	3.3(2.6~4.2)	47.6(30.2~67.8)	158.4(95.62~242.6)	59.6(41.7~69.3)	90.1(81.6~94.8)	10.4(7.1~15.2)
4~5 d	291	3.6(2.9~4.6)	52.5(34.4~80.9)	195.5(120.4~310.9)	56.9(45.4~66.3)	88.9(80.6~94.8)	10.5(7.1~15.8)
6~7 d	122	4.3(3.1~5.2)	67.3(40.7~108.9)	279.1(152.8~424.0)	50.9(41.5~63.7)	90.0(77.2~95.0)	10.5(6.6~15.9)
P		<0.001	<0.001	<0.001	0.005	0.763	0.915
BMI(kg/m^2)							
<18.5	55	3.8(2.8~5.1)	52.7(30.6~99.9)	205.4(129.0~400.0)	54.4(46.1~66.6)	90.1(79.6~95.6)	9.3(5.9~12.4)
18.5~<24	479	3.6(2.8~4.7)	54.0(34.8~82.8)	199.9(115.2~316.7)	57.1(44.7~67.5)	89.5(80.6~94.7)	10.6(7.2~16.0)
24~<28	72	3.2(2.6~4.2)	50.3(34.2~71.6)	174.8(111.5~246.0)	58.7(46.5~71.3)	89.0(82.2~96.3)	9.8(6.5~15.9)
≥28	28	3.3(2.6~4.5)	39.4(29.2~56.6)	135.7(101.3~192.2)	55.5(49.9~62.4)	87.3(81.1~92.9)	10.5(8.4~14.1)
P		0.072	0.109	0.004	0.823	0.692	0.153
吸烟							
从不	466	3.5(2.8~4.6)	51.4(33.8~80.6)	192.7(117.6~301.3)	56.4(44.7~67.2)	88.9(80.4~74.7)	10.4(7.0~15.5)
已戒烟	33	3.9(2.6~4.9)	55.1(38.0~68.7)	196.7(116.2~342.5)	59.1(43.6~71.7)	91.3(79.5~96.9)	8.8(5.7~16.1)
吸烟	138	3.6(2.8~4.5)	51.1(32.0~86.1)	196.4(105.3~331.3)	58.8(47.6~68.3)	91.0(81.5~95.0)	11.6(7.9~18.1)
P		0.701	0.975	0.894	0.456	0.332	0.049
饮酒							
从不	125	3.8(2.9~4.7)	44.6(29.5~68.8)	176.7(106.7~268.3)	52.4(41.3~65.8)	86.8(76.8~93.2)	9.8(6.9~13.6)
已戒酒	36	3.2(2.6~4.2)	47.5(32.4~58.5)	149.8(102.7~275.3)	49.9(37.0~68.7)	85.2(73.6~93.9)	9.8(4.7~13.9)
饮酒	477	3.6(2.8~4.6)	55.6(35.7~85.0)	206.2(117.9~324.3)	57.9(46.0~68.0)	90.2(82.7~95.0)	10.8(7.3~16.0)
P		0.278	0.011	0.035	0.015	0.006	0.064

表 4 精液参数与精子 DNA 损伤参数关联性分析结果

彗星实验参数	精液量(mL)	精子密度($\times10^6$/mL)	精子总数($\times10^6$)	精子总活力(%)	前向运动精子(%)	正常形态率(%)
Tail DNA%						
r	0.075	−0.090	−0.071	−0.164	−0.165	−0.042
P	0.058	0.023	0.074	<0.001	<0.001	0.296
TL						
r	0.019	−0.045	−0.043	−0.075	−0.087	−0.034
P	0.629	0.253	0.283	0.058	0.028	0.388
CL						
r	0.041	−0.063	−0.058	−0.122	−0.112	−0.022
P	0.307	0.112	0.142	0.002	0.005	0.582
TM						
r	0.051	−0.069	−0.056	−0.123	−0.135	−0.052
P	0.201	0.083	0.158	0.002	0.001	0.189
OTM						
r	0.056	−0.073	−0.060	−0.130	−0.139	−0.047
P	0.160	0.066	0.128	0.001	<0.001	0.242

3 讨论

全世界范围内不孕不育形势日渐严峻,目前已发现越来越多的危险因素,如环境污染[9]、不良生活方式[10-11]、心理因素[12]等均可导致精液质量的下降。与此同时,不明原因的原发性不育患者也日渐增多,对精液常规指标能否真实反映精液质量的质疑声也越来越强烈[13]。精子 DNA 损伤检测[14]、精液活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)检测[15]等指标已逐渐被认为是精液常规检测的必要补充。其中,精子 DNA 损伤被认为可以反映精子受环境暴露后的损伤[3],在精液质量检测中的应用已越来越广泛。

目前检测精子 DNA 损伤的方法主要有精子染色质结构分析(sperm chromatin structure assay,SCSA)、精子染色质扩散试验(sperm chromatin dispersion test,SCD)、精子彗星实验(comet assay)、末端转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记法(TUNEL),而不同的试验方法代表着的精子遗传损伤的不同终点。彗星电泳可以直接反映精子 DNA 的单、双链断裂水平,并且有成本低、重复性好等优点,所以是一种较好地反映

精子 DNA 损伤的检测方法。

目前关于精子 DNA 损伤的研究对象主要集中在不育人群[16-17],也有部分研究针对普通育龄人群[18]。MARHCS 队列是本课题组建立的重庆市大学生生殖健康调查队列,队列于 2013 年开始建立,基线调查时共纳入合格的健康男性大学生 796 人[19],本研究的对象是 2014 年随访的样本。我们共随访到了 696 人,随访率为 87.4%。所有的调查对象是大学三年级学生,年龄相似,生活习惯同质化较高,这些因素有利于排除对精液质量有影响的混杂因素,如年龄、职业暴露、受教育程度、收入水平等的干扰,研究环境暴露、生活习惯等因素对生殖健康的影响。

本研究结果表明,禁欲时间与饮酒会影响精液参数,且随着禁欲天数的增加,精液量、精子密度、精子总数都相应增高,但前向运动精子(%)相应降低;而禁欲时间、饮酒与精子 DNA 损伤指标间没有发现关联性,提示精子 DNA 损伤较精液常规参数更加稳定,这与前人研究结果相符[20]。

目前有关精子 DNA 损伤与精液常规参数间关联性的研究结果主要体现在与精子密度和精子活力的关联性上。本研究对精液常规和精子 DNA 损伤关联性分析结果表明,精子 DNA 损伤与精子密度、精子运动指标相关联。精子密度与精子 DNA 损伤呈负向关联,与 Zini 等[21]、曾兰等[22]的研究结果一致;精子活力、前向运动精子(%)与精子 DNA 损伤呈显著负向关联,与孙静波等[23]、杨雪梅等[24]的研究结果相符。本课题以重庆大学生这一身体素质、生殖机能相对较好的人群进行研究,更能说明精子 DNA 损伤可以反映精子密度、精子活力等精液常规指标水平。

一般认为,精子 DNA 损伤会造成精子头部畸形[25],但我们的研究结果未发现精子 DNA 损伤与精子畸形的关联性,其原因可能是本研究纳入的对象均为健康大学生,其精子畸形率显著低于普通人群,其精子 DNA 损伤程度也显著低于普通人群,所以,其精子 DNA 损伤可能还未造成精子头部的畸形,这也进一步证明精子 DNA 损伤较精液常规检测更为敏感。

精子 DNA 损伤主要机制包括:①精子发生过程中的细胞凋亡异常[26];②精子染色质重塑、包装异常[27];③精子运输过程中的氧化应激作用[28-29]。我们前期的研究表明,精子 DNA 损伤与个体多环芳烃的暴露成正相关关系[3],可以比精液常规更为灵敏地反映环境暴露对精子造成的损害。精子 DNA 损伤后可影响精子的受精能力、受精卵的分裂、胚胎发育和着床等功能,而在精子发生过程中,80% 的核 DNA 组蛋白被结合力更强的鱼精蛋白所取代,染色质逐渐凝缩,以增加 DNA 对各种有害因素的自我保护能力。在精子生成以后,精子 DNA 几乎没有自我修复能力,在精卵结合以后受损的 DNA 才得以修复[30],因此对精子 DNA 损伤水平的检测尤为重要。本研究结果表明在大学生人群中,精子 DNA 损伤与精子密度和活力呈显著负向关联,但相关系数较小,说明精液常规指标只能部分反映精子 DNA 损伤的状况,而不能完全取代。

随着我国二孩政策的全面放开,高龄夫妇的生育需求也越来越大,男性生育能力的检测显得尤为重要。目前精液分析仍然是衡量男性生育能力和精子质量的主要指标,但约有 15% 的男性不育者精液常规分析正常[22],因此,精液常规分析作为衡量精子质量的基本指标,有时不能对男性生育能力进行有效评价。精子 DNA 损伤可影响受精能力、胚胎发育甚至子代健康,不育男性有较高的 DNA 损伤水平[31],在特发性不育者中约 20% 有高水平的精子 DNA 损伤,所以精子 DNA 损伤的检测被看作是评价精子质量和男性生育能力的更有效指标。精子 DNA 损伤检测可以反映出精液常规分析不能反映的精子异常,因此,精子 DNA 损伤的检测应作为精液常规分析的必要补充,以对精液质量、男性生育能力进行更加全面、客观的评价。

参考文献:

[1] Evenson D P, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility[J]. Theriogenology, 2006, 65(5): 979-991. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.011

[2] 曾兰, 李运星, 叶飞. 精子 DNA 损伤在生殖医学中的研究现状[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(1): 60-62. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8189.2010.01.022

[3] Han X, Zhou N, Cui Z, *et al*. Association between urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and sperm DNA damage: a population study in Chongqing, China[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(5): 652-657. DOI: 10.1289/ehp.1002340

[4] Wilding C S, Cadwell K, Tawn E J, *et al*. Mitochondrial DNA mutations in individuals occupationally exposed to ionizing radiation[J]. Radiat Res, 2006, 165(2): 202-207.

[5] 龚道元, 李子萍, 庄锡伟, 等. 男性不育症患者精子 DNA 完整性与精液分析参数相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2321-2322, 2324. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.009

[6] Sharbatoghli M, Valojerdi M R, Amanlou M, *et al*. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(5): 1315-1322. DOI: 10.1007/s00404-012-2440-1

[7] Palermo G D, Neri Q V, Cozzubbo T, *et al*. Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity[J]. Fertil

Steril, 2014, 102(6): 1508 – 1517. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.008

[8] Simon L, Carrell D T. Sperm DNA damage measured by comet assay[J]. Methods Mol Biol, 2013, 927: 137 – 146. DOI: 10.1007/978-1-62703-038-0_13

[9] Nieuwenhuijsen M J, Basagana X, Dadvand P, *et al*. Air pollution and human fertility rates[J]. Environ Int, 2014, 70: 9 – 14. DOI: 10.1016/j.envint.2014.05.005

[10] Grundy E M, Tomassini C. Marital history, health and mortality among older men and women in England and Wales [J]. BMC Public Health, 2010, 10: 554. DOI: 10.1186/1471-2458-10-554

[11] Kovac J R, Khanna A, Lipshultz L I. The effects of cigarette smoking on male fertility[J]. Postgrad Med, 2015, 127(3): 338 – 341. DOI: 10.1080/00325481.2015.1015928

[12] Depa-Martynow M, Walczyk-Matyja K, Szyfter J, *et al*. Quality of life versus semen parameters[J]. Ginekol Pol, 2008, 79(2): 115 – 119.

[13] 马芳芳, 王厚照, 周友泉, 等. 不明原因复发性流产与精子DNA完整性的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(7): 64 – 65. DOI: 10.13404/j.cnki.cjbhh.2012.07.029

[14] Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, *et al*. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay[J]. Andrology, 2013, 1(5): 715 – 722. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x

[15] Homa S T, Vessey W, Perez-Miranda A, *et al*. Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(5): 757 – 764. DOI: 10.1007/s10815-015-0454-x

[16] Durmaz A, Dikmen N, Gunduz C, *et al*. Fluctuation of "sperm DNA integrity" in accordance with semen parameters, and it's relationship with infertility[J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(12): 1665 – 1671. DOI: 10.1007/s10815-014-0364-3

[17] Tandara M, Bajic A, Tandara L, *et al*. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF[J]. Andrology, 2014, 2(5): 678 – 686. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00234.x

[18] Bandel I, Bungum M, Richtoff J, *et al*. No association between body mass index and sperm DNA integrity[J]. Hum Reprod, 2015, 30(7): 1704 – 1713. DOI: 10.1093/humrep/dev111

[19] Yang H, Chen Q, Zhou N, *et al*. Lifestyles Associated With Human Semen Quality: Results From MARHCS Cohort Study in Chongqing, China[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(28): e1166. DOI: 10.1097/md.0000000000001166

[20] Zini A, Kamal K, Phang D, *et al*. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men[J]. Urology, 2001, 58(2): 258 – 261.

[21] Zini A, Bielecki R, Phang D, *et al*. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men[J]. Fertil Steril, 2001, 75(4): 674 – 677.

[22] 曾兰, 叶飞, 李运星, 等. 精子DNA完整性与精液常规参数相关性分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2014, 6(4): 47 – 50. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4020.2014.04.13

[23] 孙静波, 姜宏, 何瑞冰. 精子DNA完整性与精液参数的相关性研究[J]. 中国男科学杂志, 2010, 24(4): 26 – 29. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0848.2010.04.006

[24] 杨雪梅,宋亚曼,谭宇哲,等. 精液常规参数对精子核DNA完整性影响的初步探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(18): 3113 – 3116.

[25] Utsuno H, Oka K, Yamamoto A, *et al*. Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm DNA fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity[J]. Fertil Steril, 2013, 99(6): 1573 – 1580. DOI:10.1016/j.fertnstert.2013.01.100

[26] Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, *et al*. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress[J]. Mol Med, 2015, 21: 109 – 122.

[27] Marcon L. Transient DNA Strand Breaks During Mouse and Human Spermiogenesis:New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling[J]. Biol Reprod, 2003, 70(4):910 – 918. DOI:10.1095/biolreprod.103.022541

[28] Hosen M B, Islam M R, Begum F, *et al*. Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility[J]. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 2015, 13(9): 525 – 532.

[29] Gavriliouk D, Aitken R J. Damage to Sperm DNA Mediated by Reactive Oxygen Species: Its Impact on Human Reproduction and the Health Trajectory of Offspring[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 868:23 – 47. DOI:10.1007/978-3-319-18881-2_2

[30] Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(3): 309 – 319. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.06.010

[31] Ramzan M H, Ramzan M, Khan M M, *et al*. Human semen quality and sperm DNA damage assessed by comet assay in clinical groups[J]. Turk J Med Sci, 2015, 45(3): 729 – 737.

(**收稿**:2016-03-04;**修回**:2016-04-09)

(编辑 吴培红)