

- 果[J]. 广东医学, 2013, 34(15): 2358-2360.
- [2] Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, et al. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery[J]. N Engl J Med, 1991, 325(10): 669-674.
- [3] 赵晓敏, 杨立, 黄叙. 胎儿纤维连接蛋白对普贝生引产效果的预测[J]. 中国计划生育和妇产科杂志, 2011, 3(5): 64-67.
- [4] 王志新. 宫颈分泌物检测胎儿纤维连接蛋白预测早产的临床价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2003, 19(2): 97-98.
- [5] 杨芳, 覃磊, 马向东, 等. 胎儿纤维连接蛋白与自发性早产预测的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(24): 4782.
- [6] 战芳. 胎儿纤维连接蛋白联合宫颈长度在早产预测中的临床价值[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(20): 36-37.
- [7] 胡晓婷, 苏园园, 陈宏霞, 等. 妊娠期高血压疾病胎儿纤维连接蛋白及人绒毛膜促性腺激素的定量变化[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(1): 47-49.
- [8] 黄晓平, 许倩. 胎儿纤维连接蛋白在产科中的相关应用[J]. 中国美容医学杂志, 2012, 21(s1): 29.
- [9] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠晚期促宫颈成熟与引产指南(草案)[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(1): 75-76.
- [10] 荆永萍, 陶莹, 骆婕. COOK 宫颈扩张球囊联合催产素引产的效果及安全性分析[J]. 中外医疗, 2014, 32: 11-15.
- [11] 周云, 陈宇清. 宫颈扩张球囊促宫颈成熟及引产效果观察[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(10): 1613-1615.

收稿日期: 2016-07-08 编辑: 王娜娜

· 临床研究 ·

不同精液优化处理方式前后精子质量参数的变化及对 IVF-ET 结局的影响

邱峰龙¹, 左阳花¹, 冯播¹, 仲纪祥¹, 魏勉¹, 倪蓉², 薛惠英¹

1. 淮安市妇幼保健院不孕不育科, 江苏 淮安 223002;

2. 淮安市第一人民医院生殖健康与不孕症科, 江苏 淮安 223300

摘要: **目的** 比较不同精液优化处理方式前后精子质量参数的变化及处理后精子形态率、精子 DNA 碎片化指数 (DFI) 对体外受精胚胎移植技术 (IVF-ET) 结局的影响。**方法** 选择 2014 年 1 月至 2015 年 12 月接受 IVF-ET 技术助孕的患者夫妇 130 对, 精液优化处理采用 Isolate 密度梯度离心法 (A 组, $n=45$)、直接上游法 (B 组, $n=30$)、先 Isolate 密度梯度离心后上游法 (C 组, $n=55$); 根据处理后精子正常形态率分为形态率 $\geq 4\%$ 组 ($n=95$)、形态率 $< 4\%$ 组 ($n=35$); 根据处理后精子 DFI 分为 DFI $< 15\%$ 组 ($n=33$)、 $30\% \geq \text{DFI} \geq 15\%$ 组 ($n=77$)、DFI $> 30\%$ 组 ($n=20$)。对不同精液优化处理方式前后精子质量参数变化, 处理后不同精子形态率和不同精子 DFI 对 IVF-ET 受精率、卵裂率、优质胚胎率、妊娠率的影响进行分析。**结果** 处理前, 精子活力、正常形态率、精子 DFI 三组间相当 ($P>0.05$)。处理后, 各组精子活力、正常形态率不同程度升高, 精子 DFI 不同程度下降; 且 C 组精子正常形态率稍高于 A 组, 但无统计学差异 ($P>0.05$); 精子 DFI 在 C 组明显低于 A 组 ($P<0.05$); 在 B 组与 C 组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与形态率 $< 4\%$ 组比较, 形态率 $\geq 4\%$ 组的优质胚胎率、生化妊娠率和临床妊娠率均增高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。不同精子 DFI 组间在优质胚胎率、生化和临床妊娠率方面均有统计学差异 ($P<0.01$, $P<0.05$), 以 DFI $> 30\%$ 组为最低。**结论** Isolate 密度梯度离心结合上游法可显著降低精子 DFI, 一定程度提高精子正常形态率和精子活力。此外, 精子 DFI 及形态率可影响 IVF-ET 结局。

关键词: 精液优化处理; 体外受精胚胎移植技术; 精子正常形态率; DNA 碎片化指数; Isolate 密度梯度离心法; 上游法

中图分类号: R 714.8 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)01-0109-04

近年来, 有研究指出 10% ~ 15% 的育龄夫妇存在不孕不育问题^[1], 而男性不育占其中的 30% ~ 40%^[2]。男性不育主要通过精液常规检查、精子形态学和 DNA 碎片化指数 (DNA fragmentation index, DFI) 等指标来进行判断。随着辅助生殖实验室技术

的不断完善和成熟, 各种精液优化处理方式不断出现, 最常见的为密度梯度离心法和上游法。密度梯度离心法可以更好的去除精液当中的杂质及碎片, 回收更多的精子, 但相对于上游法其回收后的精子畸形率过高, 该方法更适用于少弱精子症患者^[3]; 上游法可分离获得活力更高的精子, 但回收效率较低, 该方法更适用于精液常规检查结果正常及较好的患者^[4]。此外, 有报道指出不孕男性精子正常形态率、DFI 影

响体外受精胚胎移植技术(IVF-ET)结局^[5-6]。本研究结合各处理方式的优缺点,分为 Isolate 密度梯度离心组、直接上游法组、先 Isolate 密度梯度离心后上游法组,比较不同精液优化处理方式前后精子质量参数的变化;并根据处理后精子正常形态率、DFI 分为形态率 $\geq 4\%$ 组、形态率 $< 4\%$ 组、DFI $< 15\%$ 组、 $30\% \geq \text{DFI} \geq 15\%$ 组、DFI $> 30\%$ 组,以探究影响 IVF-ET 结局的关键性因素,为后期 IVF-ET 中精液优化处理的准确应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在淮安市妇幼保健院不孕不育科生殖中心接受 IVF-ET 技术助孕的患者夫妇 130 对,根据精液优化处理方法分为 Isolate 密度梯度离心法(A组, $n = 45$)、直接上游法(B组, $n = 30$)、先 Isolate 密度梯度离心后上游法(C组, $n = 55$);根据处理后精子正常形态率分为形态率 $\geq 4\%$ 组($n = 95$)、形态率 $< 4\%$ 组($n = 35$);根据处理后精子 DFI 分为 DFI $< 15\%$ 组($n = 33$)、 $30\% \geq \text{DFI} \geq 15\%$ 组($n = 77$)、DFI $> 30\%$ 组($n = 20$)。纳入标准:女方单纯输卵管性不孕,不合并其他不孕因素,年龄 23~40(26.8 \pm 3.8)岁;男方正常或轻度精液异常原因不育,年龄 24~44(29.5 \pm 3.2)岁;双方染色体 G 显带技术检查为正常核型,无遗传性疾病家族史,无生殖道解剖结构异常,无近期生殖道感染及用药史,无甲状腺疾病、心血管疾病、糖尿病等影响生育的疾病及用药史,无有毒物质及放射线接触史,无卵巢手术史,月经第 2~5 天测定基础内分泌值正常。排除标准:女方年龄 40 岁以上;获卵数少于 4 个;基础血清卵泡刺激素(FSH) > 10 mIU/ml;内膜厚度 < 7 mm;取卵次数 > 2 次;体质指数(BMI) ≥ 25.0 。所有患者均签署知情同意后行常规长效降调节方案 IVF-ET。

1.2 仪器及试剂 精子分析系统(CASA)采用 Beion V4.20 精子质量分析系统,为上海北昂医疗技术有限公司产品,用于精液常规及形态参数的检测分析;荧光显微镜为日本 OLYMPUS 公司产品,用于精子 DFI 检测;精子核 DNA 吡啶橙荧光染色试剂盒、精子形态染色 diff-quick 试剂盒均为深圳华康生物医学工程有限公司产品;Isolate 梯度分离液为美国 Irvine-Scientific 公司产品,由 40%、80% 二氧化硅胶体液组成上、下层;IVF 洗涤液为 Vitrolife 公司产品。

1.3 精液优化处理 (1)直接上游法:待精液完全液化后,充分混匀,取 1.5~2.0 ml 加入装有 1.5 ml IVF 液的 15 ml 离心管中 310 g 离心 10 min,留底层

沉淀,重新加入 1.5 ml IVF 液,将离心管倾斜 45°,放入 37°C 培养箱中孵育 0.5~1.0 h。将离心管竖直,吸取上层云雾状液 1.0 ml,记录精子浓度、活率、活力,测定精子正常形态率、DFI 等指标。(2) Isolate 密度梯度离心法:待精液完全液化后,在离心管底部加入 0.5 ml Isolate 下层液,取 0.5 ml Isolate 上层液缓慢加入下层液中,使两液层交界处见明显分层,将精液全部加入到 Isolate 最上层,310 g 离心 20 min,吸取沉淀加入至 2 ml IVF 液中 310 g 离心 5 min,去上清,加入 1 ml IVF 液调整精子浓度。记录精子浓度、活率、活力,测定精子正常形态率、DFI 等指标。(3)先 Isolate 密度梯度离心后上游法:上述两种方法先后利用。

1.4 精子质量参数测定 所有 IVF-ET 男性患者按照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版要求^[7],禁欲 2~7 d 后于实验室取精室采用手淫的方法取精(也可就近在家中取精,取完于 25~30°C 环境下 60 min 内送至实验室),精液保存于无菌的精杯中置于 37°C 恒温水浴箱中液化 30~60 min,不同精液优化方式处理前后完成精液常规、精子形态及精子 DNA 碎片检测。其中,精液常规操作过程为液化并混匀后用 pH 试纸测定其 pH 值,取 5~10 μl 精液置于 CASA 分析系统上行精液常规分析,保存记录对应结果;精子形态检查取 10~20 μl 精液均匀涂于载玻片上,晾干后参照精子形态染色 diff-quick 试剂盒说明染色,在 CASA 分析系统上分析 200 个以上精子形态,人工比对单个精子形态异常情况保存记录对应结果;精子 DFI 指数检测为取液化后精液 1 ml 置于离心管中,经过 3 次去精浆和洗涤后参照精子核 DNA 吡啶橙荧光染色试剂盒说明处理,460~490 nm 激发波长荧光显微镜下观察,其中 DNA 双链精子为绿色、DNA 单链精子为红色、DNA 双链不稳定精子为橙黄色,DFI 为计算出的红色、橙黄色精子的百分率。

1.5 IVF-ET 临床观察指标 受精率:受精率 = 受精卵数/获卵数 $\times 100\%$;卵裂率:卵裂率 = 2PN 卵裂数/受精数 $\times 100\%$;优质胚胎率:优质胚胎率 = 优质胚胎数/受精卵数 $\times 100\%$;生化妊娠为移植后 14 d 测定血清 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG) ≥ 25 mIU/ml 者;临床妊娠为移植后 28 d 时 B 超检查宫腔内见孕囊者。

1.6 统计学分析 所有数据均利用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD- t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 不同精液优化处理方式前后精子质量参数变化比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	处理前			处理后		
		精子活力	精子正常形态率	精子 DFI	精子活力	精子正常形态率	精子 DFI
A 组	45	42.2 ± 7.9	6.4 ± 3.3	17.8 ± 9.3	91.9 ± 1.2 ^{**}	9.2 ± 2.5 ^{**}	16.4 ± 8.3 [#]
B 组	30	43.1 ± 5.9	6.8 ± 3.2	16.3 ± 10.2	97.6 ± 1.5 ^{**}	10.2 ± 2.7 ^{**}	14.3 ± 9.8 ^{**}
C 组	55	42.8 ± 6.3	7.0 ± 2.7	17.4 ± 9.9	97.9 ± 1.2 ^{**}	10.4 ± 3.5 ^{**}	13.6 ± 9.2 ^{**}

注:与本组处理前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 C 组处理后比较,[#] $P < 0.05$ 。

表 2 精子正常形态率对 IVF-ET 结局的影响

组别	例数	受精率(% , $\bar{x} \pm s$)	卵裂率(% , $\bar{x} \pm s$)	优质胚胎率(% , $\bar{x} \pm s$)	生化妊娠率(%)	临床妊娠率(%)
形态率 $\geq 4\%$ 组	95	85.5 ± 3.3	85.9 ± 3.2	60.7 ± 5.5 [*]	47.4 [*]	46.3 ^{**}
形态率 $< 4\%$ 组	35	83.5 ± 4.1	86.2 ± 4.3	58.3 ± 6.2	42.9	37.1

注:与形态率 $< 4\%$ 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 3 精子 DFI 对 IVF-ET 结局的影响

组别	例数	受精率(% , $\bar{x} \pm s$)	卵裂率(% , $\bar{x} \pm s$)	优质胚胎率(% , $\bar{x} \pm s$)	生化妊娠率(%)	临床妊娠率(%)
DFI $< 15\%$ 组	33	86.7 ± 2.1	97.1 ± 1.4	67.7 ± 5.1	48.5	45.5
30% \geq DFI $\geq 15\%$ 组	77	86.2 ± 2.5	97.5 ± 1.1	62.8 ± 7.0	44.2	42.9
DFI $> 30\%$ 组	20	85.1 ± 1.6	95.7 ± 1.8	52.8 ± 6.5	40.0	35.0
P 值		> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.01

2 结果

2.1 不同精液优化处理方式前后精子质量参数变化比较 处理前,精子活力、正常形态率、精子 DFI 三组间相当($P > 0.05$)。处理后,各组精子活力、正常形态率不同程度升高,精子 DFI 不同程度下降;且 C 组精子正常形态率稍高于 A 组,但无统计学差异($P > 0.05$),精子 DFI 在 C 组低于 A 组($P < 0.05$);B 组与 C 组差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 精子正常形态率对 IVF-ET 结局的影响 与形态率 $< 4\%$ 组比较,形态率 $\geq 4\%$ 组的优质胚胎率、生化妊娠率和临床妊娠率均增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 精子 DFI 对 IVF-ET 结局的影响 不同精子 DFI 组间在优质胚胎率、生化妊娠率和临床妊娠率方面均有统计学差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),以 DFI $> 30\%$ 组为最低。见表 3。

3 讨论

目前,精液优化处理的方法主要有密度梯度离心法、上游法以及密度梯度离心法结合上游法。密度梯度离心法主要根据前向运动精子、非前向运动精子和不动精子在浮力密度、精子活动性和活动轨迹方面的差异,利用密度梯度浮力密度的不同,各组分精子停留在不同的等浮力密度点上,收集底层沉淀可得到活率、活力较好的精子。该方法精子回收率高,可达到 40% 左右^[8],对精液黏稠度过高、液化不良、抗精子抗体阳性、轻度或中度弱精子症患者均可适用。上游

法主要通过 37℃ 的培养箱中利用精子的自由游动,收集上层洗涤液以获取活力较好的精子,该方法精子回收率较低,仅对活率、浓度正常或较好的精液适用。该方法筛选出的精子活率、活力均高于密度梯度离心法。IVF-ET 技术需要较高活率、活力的精液标本,因此本研究结合上述两种精液优化处理方法,比较三种处理方法精子质量参数的变化,结果表明,利用三种不同的精液优化处理方法均可不同程度提高处理后精子的活力、正常形态率、DFI;Isolate 密度梯度离心组在 DFI 指数方面与先 Isolate 密度梯度离心后上游组有统计学差异,表明先 Isolate 密度梯度离心法处理精液、再结合上游法筛选精子能显著降低 DFI。该研究结果与奚荻等^[9]和 Hayden 等^[10]的研究结论类似,表明先 Isolate 密度梯度离心法处理精液、再结合上游法筛选精子可彻底去除精浆及精液中的如抗精子抗体、异性蛋白、前列腺素等不利于受精的成分,有降低精子畸形率的趋势并降低 DFI。

不管用上述何种方法对精液进行优化处理,处理过后的精子都将用于 IVF-ET 技术。一项荟萃分析指出,精子 DNA 的碎片化与受精率、胚胎质量、妊娠率的减少和流产率的增加相关^[12]。江伟杰等^[12]认为精子 DFI 升高不仅导致精子活力下降,对 IVF-ET 受精率、卵裂率、优质胚胎率也有不良影响,但对妊娠率无影响。瞿虎等^[13]认为男性不育患者的精子 DFI 可作为精液检测、生育力及辅助生殖结局的重要评估指标之一。蔡靖等^[14]研究结果表明精子形态在受孕过程中起重要作用,是衡量男性生育最佳指标。本研究结果显示与形态率 $< 4\%$ 组比较,形态率 $\geq 4\%$ 组的优

质胚胎率、生化和临床妊娠率均增高,表明正常形态率在 4% 之上对 IVF-ET 的结局有显著性影响,提示精子形态在辅助生殖结局中的重要性。此外,不同精子 DFI 组间在优质胚胎率、生化和临床妊娠率方面均有统计学差异,以 DFI > 30% 组为最低,表明精子 DFI 指数越低,受精、胚胎发育及妊娠结局状况越好,这可能是因为 DNA 的碎片化较低时,精子 DNA 损伤的区域为非蛋白编码区,不会引起精子功能的降低,如果不能及时修复,精子的蛋白编码区会受到精浆中不利因素的破坏,部分精子的功能会显著性下降^[15];精子染色质中 DNA 的碎片化会导致其结构稳定性显著降低,引起 IVF 受精过程中雄性原核形成受阻而导致 IVF 受精率降低,影响胚胎发育及着床^[16]。

综上所述,Isolate 密度梯度离心法结合上游法能显著降低精子 DFI,一定程度提高精子正常形态率和精子活力。此外,精子形态率、DFI 会影响到 IVF-ET 的结局,是评价精子质量和预测生育能力的重要指标。因 IVF-ET 研究数据有限,本研究结果在数据上可能存在误差。

参考文献

[1] 张剑波,尹国良,徐新蓉,等. 不育门诊就诊男性精液质量与影响因素分析[J]. 生殖医学杂志,2015,24(12):1041-1044.

[2] Varshini J, Srinag BS, Kalthur G, et al. Poor sperm quality and advancing age are associated with increased sperm DNA damage in infertile men[J]. Andrologia,2012,44(S1):642-649.

[3] 朱立华,肖新燕,许玉刚,等. 密度梯度离心方式对人工授精结局的影响[J]. 中国男科学杂志,2016,30(2):17-20.

[4] 张红,马博. 两种不同的上游法处理精液对常规体外受精结果的影响[J]. 中国医药导报,2010,7(33):46-47.

[5] 黄智勇,王立雅,谢春雨,等. 精液优化处理前后精子 DNA 碎片率和畸形率的变化及对 IVF 妊娠结局的影响[J]. 齐齐哈尔医

学院学报,2016,37(3):321-322.

- [6] 张帆,韦继红,唐永梅. 精子形态与体外受精-胚胎移植治疗结局的相关性探讨[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(6):113-114.
- [7] 谷翊群. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2011.
- [8] Chi HJ, Chung DY, Choi SY, et al. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program[J]. Clin Exp Reprod Med,2011,38(1):10-17.
- [9] 奚获,陈赟,戴玉田. 精子 DNA 碎片指数与 IVF/ICSI 成功率的关系[J]. 中华男科学杂志,2016,22(1):77-81.
- [10] Hayden RP, Wright DL, Toth TL, et al. Selective use of percutaneous testis biopsy to optimize IVF-ICSI outcomes;a case series[J]. Fertil Res Pract,2016,2(1):1-7.
- [11] Cissen M, Wely MV, Scholten I, et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction:A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. PLoS One, 2016,11(11):e0165125.
- [12] 江俊杰,金帆,周黎明,等. 优选后精子 DNA 完整性对 IVF 胚胎发育及临床结局的影响[J]. 中华男科学杂志,2016,22(5):425-431.
- [13] 瞿虎,江春强,汪中扬,等. 精子 DNA 碎片率与形态学及辅助生殖结局的相关性分析研究[J]. 中国医药指南,2015,13(13):1-3.
- [14] 蔡靖,尹彪,刘红杰,等. 正常形态前向运动精子总数与体外受精结局关系的探讨[J]. 生殖医学杂志,2013,22(5):329-333.
- [15] Zhang Z, Zhu LL, Jiang HS, et al. Predictors of pregnancy outcome for infertile couples attending IVF and ICSI programmes[J]. Andrologia,2016,48(9):874-881.
- [16] Osman A, Alsomait H, Seshadri S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI;a systematic review and meta-analysis[J]. Reprod Biomed Online,2015,30(2):120-127.

收稿日期:2016-09-20 修回日期:2016-10-10 编辑:王国品