

优选后精子 DNA 碎片指数及与体外受精的关系*

程立子, 韦剑洪, 于文娟, 陈伟辉, 霍骏业 (广东省中山市博爱医院生殖医学中心 528403)

【摘要】 目的 探讨优选前和优选后精子 DNA 碎片指数 (DFI) 的变化及其对体外受精 (IVF) 的影响。**方法** 检测 105 例 IVF 助孕患者男方精液密度梯度离心优选前及优选后的精子 DFI, 分析优选前后精子 DFI 与 IVF 受精率、卵裂率、优质胚胎率、妊娠结局等的关系。**结果** 优选处理后精子 DFI 较处理前明显降低, 差异有统计学意义 $[(13.88 \pm 8.63), (29.68 \pm 9.94), P < 0.05]$; 优选后的精子 DFI 与 IVF 受精率呈负相关关系 ($P < 0.05$)。**结论** 优选后精子 DFI 与 IVF 受精率密切相关, 其对 IVF 的受精率具有预测价值。

【关键词】 密度梯度离心; 体外受精; 精子 DNA 碎片指数

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)04-0448-03

The changes of sperm DNA fragmentation index after selection technique and relationship with the outcomes of IVF*

CHENG Li-zi, WEI Jian-hong, YU Wen-juan, CHEN Wei-hui, HUO Jun-ye (Reproductive Medical Center, Boai hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of selection technique on sperm DNA fragmentation index (DFI) and its association with the outcomes of IVF. **Methods** The male partners from 105 infertility couples who received IVF treatment were examined sperm DFI on semen specimen of a freshly liquefied and after its selection by density gradient centrifugation techniques. The relationship between sperm DNA fragmentation index after selection technique and fertilization rate, cleavage rate, high quality embryos rate and pregnancy outcomes was analyzed. **Results** Sperm DFI was significantly decreased after selection technique $(13.88 \pm 8.63 \text{ vs. } 29.68 \pm 9.94, P < 0.05)$, and it showed a negative correlation with fertilization rate of the IVF ($P < 0.05$). **Conclusion** Sperm DFI after selection technique was associated with fertilization rate of the IVF, and it could be used to predict the fertilization rate of the IVF.

【Key words】 density gradient centrifugation; in vitro fertilization; sperm DNA fragmentation index

体外受精 (IVF) 是治疗不孕的有效方法。随着技术日趋成熟, 临床妊娠率越来越高。但在临床实际中仍有约 10%~25% 患者出现受精率低下 (受精率小于 30%) 或完全不受精情况^[1]。导致受精率低下或完全不受精的原因复杂多样, 可能与卵子质量、精子质量、授精方式、体外环境等有关, 但尚无定论。其中, 精子方面的影响越来越受到重视。能否在 IVF 治疗前评估精子受精能力, 指导授精方式选择, 是目前研究的热点。

精子 DNA 是遗传信息的载体, 精子 DNA 的完整性是保证父系遗传信息正确传递给子代的前提条件。过往研究表明, 精子 DNA 损伤是较精液常规参数更有效的评估男性生育能力的指标^[2]; 但精子 DNA 损伤能否用于预测 IVF 结局及指导授精方式的选择尚存较大争议。

本研究通过比较 IVF 助孕患者男方精液密度梯度离心优选前及优选后精子 DNA 碎片指数 (DFI) 的差异, 分析精子优选处理前后 DFI 是否对 IVF 受精率、卵裂率、优质胚胎率等有影响, 以评价优选处理前后精子 DFI 是否预测 IVF 结局并为临床选择适宜的授精方式提供帮助。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 9~12 月在该院生殖中心进行 IVF 助孕的病例共 105 例。女性平均年龄 (32.16 ± 4.69) 岁, 男性平均年龄 (33.70 ± 5.08) 岁。纳入标准: 初次接受 IVF 助孕; 女方单纯输卵管因素导致不孕, 无子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征等; 夫妻双方均染色体正常、性激素正常, 无明显解剖学异常和免疫性因素异常。排除条件: 男性严重少弱精及无精症患者。

1.2 标本采集及处理 男性禁欲 2~7 d, 取卵日当天以手淫法取精于无菌取精杯内, 待完全液化后充分混匀, 分为 2 份, 1 份直接用于检测精子 DFI; 另 1 份先用密度梯度离心处理后再分为 2 份, 1 份用于检测精子 DFI, 另 1 份采用常规 IVF 方法授精。

1.3 精子检测及处理

1.3.1 密度梯度离心精子优选法 试剂由瑞典 Vitrolife 公司提供。采用巴氏吸管吸取 1.5 mL 80% Sperm Grad 加入离心管底部, 将 1.5 mL 40% Sperm Grad 缓慢加于上层, 然后将精液加入最上层, 注意每一步界面清晰。放入离心机 1 800 r/min 离心 15 min 后弃上清液, 沉淀中加入 2 mL G-mops Plus 混匀, 1 500 r/min 离心 5 min, 留 0.3~0.5 mL 底层液体, 混匀备用。

1.3.2 精子 DFI 检测 采用精子核染色质散发法 (SCD), 试剂由深圳博锐德生物有限公司提供。严格按照试剂说明书进行操作, 计数 500 个精子, 以小光晕和无光晕精子为 DNA 有损伤。

1.4 控制性超促排卵和 IVF 按常规方案进行。当有 2 个卵泡直径大于或等于 18 mm 时, 予以 hCG 10 000 U 肌注, 34~36 h 后手术取卵。取卵当日采用常规 IVF 方法授精, 授精 17~19 h 后观察受精情况, 授精后第 3 天观察胚胎发育情况并进行胚胎移植。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较应用两独立样本 t 检验; 采用 Spearman 进行相关性分析; 绘制受试者工作特征 (ROC) 曲

* 基金项目: 中山市卫生和计划生育局资助项目 (2015A020020)。

作者简介: 程立子, 女, 硕士, 主管技师, 主要从事辅助生殖及生殖医学实验研究。

线,评价优选后 DFI 对 IVF 受精率的诊断效率;优选处理前及优选处理后精子 DFI 的关系采用线性回归方式; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.6 观察指标 观察指标计算及判断。见表 1。

表 1 观察指标计算及判断指征

观察指标	计算公式或判断指征
精子 DFI	精子 DFI=(小光晕精子+无光晕精子)/500×100%
受精率	受精率=受精卵数/获卵数×100%
卵裂率	卵裂率=2PN 卵裂数/受精数×100%
优质胚胎率	优质胚胎率=优质胚胎数/受精卵数×100%
生化妊娠	移植后 14 d 测定血清 β -HCG $\geq$ 25 mIU/mL 者
临床妊娠	移植后 28 d B 超检查宫腔内见孕囊者

2 结 果

2.1 密度梯度离心优选处理前后精子 DFI 结果比较 优选处理后精子 DFI[(13.88±8.63)%]较处理前[(29.68±9.94)%]明显降低,差异有统计学意义($t=12.30, P<0.05$)。

2.2 密度梯度离心优选处理前后精子 DFI 与 IVF 受精及妊娠结局的相关性分析 优选处理前精子 DFI 与 IVF 受精率、卵裂率等均无明显相关性($P>0.05$);处理后精子 DFI 与 IVF 受精率呈明显负相关关系($r=-0.468, P<0.05$),而与其他指标均无明显相关性($P>0.05$)。见表 2。

表 2 优选处理前后 DFI 与 IVF 受精和妊娠结局相关性分析

项目	处理前		处理后	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
IVF 受精率	-0.157	0.111	-0.468	0.000
卵裂率	0.099	0.314	0.062	0.530
优质胚胎率	0.056	0.569	0.175	0.074
生化妊娠	-0.010	0.917	0.014	0.889
临床妊娠	-0.053	0.590	0.078	0.426

2.3 优选处理后精子 DFI 与 IVF 受精率的 ROC 曲线分析 以 IVF 受精率小于 30% 为阳性,IVF 受精率大于或等于 30% 为阴性进行分组,作优选后 DFI 与 IVF 受精率的 ROC 曲线。当优选处理后精子 DFI>17.5% 时,预示 IVF 受精率小于 30% 的敏感度为 88.9%,特异度为 85.1%。见表 3 及图 1。

表 3 优选后精子 DFI 与 IVF 受精率 ROC 曲线分析

受精率(%)	曲线下面积	标准误	95%CI	<i>P</i>	cut off 值(%)	敏感度(%)	特异度(%)
受精率	0.892	0.041	0.812~0.972	0.000	17.5	88.9	85.1

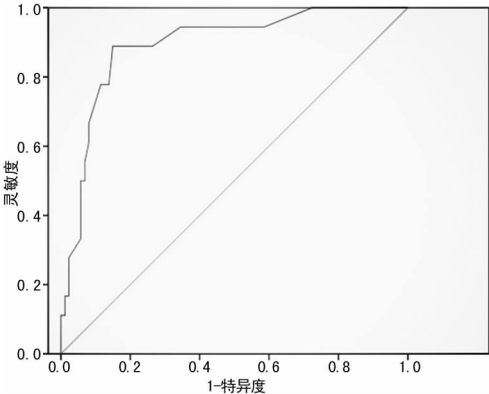


图 1 优选后 DFI 与 IVF 受精率 ROC 曲线

2.4 优选处理前 DFI 与优选处理后 DFI 的关系 对优选处理前、后精子 DFI 作相关性分析显示两者显著相关($r=0.514,$

$P<0.05$)。以优选前精子 DFI 为因变量 Y,优选后精子 DFI 为自变量 X,回归方程: $Y=0.619X+21.08$,回归方程差异有统计学意义($r=0.289, P=0.000$)。将预测受精率小于 30% 的优选处理后精子 DFI 的 cut off 值 17.5% 代入回归方程: $Y=0.619X+21.08$,可得相对应的优选处理前精子 DFI 为 31.9%,提示当优选处理前精子 DFI>31.9% 时,预示 IVF 受精率小于 30% 的敏感度为 88.9%,特异度为 85.1%。

3 讨 论

精子发生过程中精核内蛋白质逐渐由组蛋白转换为鱼精蛋白,精子 DNA 双链与鱼精蛋白紧密结合,浓缩形成特殊的双环结构,这种特殊的结构有助于保护精子 DNA 免受外界毒性物质损伤,从而保障父系遗传信息正确传递给子代[3]。造成精子 DNA 损伤的机制尚不确定,可能与以下几点有关:(1)凋亡异常。(2)氧化应激。(3)染色质组装缺陷。

以往研究表明,不育男性的 DFI 较正常生育男性显著增高,精子 DFI 与精子浓度、活力、畸形率等密切相关[4]。当 DFI $\geq$ 30% 时,自然妊娠概率几乎为零,精子 DFI 可用于评价男性生育力[5]。但精子 DFI 能否预测 IVF 结局,目前观点仍颇有争议。有学者认为,精子 DFI 对 IVF 受精率、卵裂率、优质胚胎率、妊娠率等均无影响[6]。但有学者的观点则恰恰相反,有研究报道,随着 DFI 升高,IVF 受精率和胚胎质量随之降低,精子 DFI 对 IVF 受精率和胚胎质量有负面影响[7]。Collins 等[8]则发现精子 DFI 与 IVF 妊娠结局呈弱相关,但尚不足以用于指导临床。因此,精子 DFI 能否预测 IVF 结局仍有待进一步研究。

本研究通过分析优选处理前后精子 DFI 与 IVF 受精率、优胚率等关系,评价精子 DFI 能否预测 IVF 结局。本组结果显示,密度梯度离心优选处理前精子 DFI 与 IVF 受精率、卵裂率、优质胚胎率、妊娠率均无相关性($P>0.05$),与有关报道相同[9-10]。与优选处理前 DFI 和 IVF 受精率相关性不明显所不同的是,本研究发现,优选后精子 DFI 与 IVF 受精率呈明显负相关($P<0.05$)。优选前后 DFI 对 IVF 受精率预测价值不同,原因可能为:精液原液由正常精子、异常精子及凋亡精子等组成,而常规 IVF 精液须先经过体外优化处理除去大部分异常精子和凋亡精子,检测精液原液中精子 DFI 并不能准确反映授精时实际精子 DNA 损伤情况,因此预测效果不佳。而检测优选处理后精子 DFI 则与授精时实际 DNA 损伤情况更为接近,更能反映其与受精率的关系。进一步对优选处理后精子 DFI 与 IVF 受精率作 ROC 曲线分析显示,优选处理后精子 DFI>17.5% 时,提示 IVF 受精率小于 30% 的敏感度为 88.9%,特异度为 85.1%。本研究结果表明,优选处理前精子 DFI 与优选处理后精子 DFI 显著相关($P<0.05$),回归方程 $Y=0.619X+21.08$,当优选后 DFI 为 17.5% 时,可推算出对应的优选前 DFI 为 31.9%,当优选处理前精子 DFI>31.9% 时,IVF 受精率小于 30% 的敏感度为 88.9%,特异度为 85.1%。Tomlinson 等[11]研究报道,DFI<27% 是 IVF 成功的基础;Tavares 等[12]的研究证明 DFI>34.25% 时,IVF 的成功率明显下降,本组结果与以上观点基本相符。提示精子 DFI 尤其是优选处理后的精子 DFI,可预测 IVF 受精率,并可为临床选择恰当的授精方式提供依据。对于准备接受辅助生殖技术的助孕者,当各项精液常规参数达到 IVF 标准时仍需检测精子 DFI,尤其是优选处理后的精子 DFI,DFI 正常时选择 IVF;如 DFI 较高,即便精液常规参数较好,也应优先选择卵胞浆内单精子注射(ICSI)或 half-ICSI,以获得较高的受精率。

如何获得 DNA 损伤较少的精子,除进行药物治疗和避免吸烟、饮酒等行为外,精子体外优化处理起着重要作用。操日

亮等^[13]研究数据表明,密度梯度离心法由于长时、高速离心等会造成精子物理性损伤并增加活性氧含量,从而导致精子 DNA 损伤增加。但本研究结果显示,密度梯度离心优选处理后精子 DFI 较处理前明显降低($P<0.01$),与之前的一些报道相一致^[14-15]。可能与不同实验室所用的试剂及操作方法不同所致。应用不同的精子优选方法如上游法、密度梯度离心法处理后精子 DFI 是否有差异,由于样本量所限,本研究暂未涉及,尚待进一步研究。

综上所述,精子 DNA 损伤对 IVF 受精率有不良影响。对准备接受辅助生殖技术的助孕者,检测精子 DFI 尤其是优选处理后的精子 DFI,有助于预测 IVF 受精率,并能为医师选择适宜的授精方式提供依据。如何通过治疗或优选处理以获得 DNA 无损伤或损伤较小的精子,值得继续探索。

参考文献

[1] Van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, et al. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 2005, 83(3): 612-617.

[2] 弓翠屏, 高云. 精子 DNA 完整性与男性不育[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(9): 1-4.

[3] 焦瑞宝, 冯恒孝, 唐吉斌, 等. 不育患者精液的氧化应激对精子 DNA 完整性等参数的影响[J]. 检验医学, 2013, 28(6): 487-491.

[4] 孙启玉, 李剑, 韩迎春, 等. 吸烟对男性精子核 DNA 完整性的影响[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(19): 2075-2076.

[5] Bungum M, Humaidan P, Spano M, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (Scsa) parameters for the outcome of intrauterine insemination, ivf and icsi[J]. Human Reproduction, 2004, 19(6): 1401-1408.

[6] 秦文松, 刘英, 秦辉灵, 等. 精子 DNA 完整性与 IVF/ICSI 助孕结局的关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 23(1): 25-28.

[7] Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, et al. Sperm DNA

fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments[J]. Andrologia, 2015, 47(3): 295-302.

[8] Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? [J]. Fertil Steril, 2008, 89(4): 823-831.

[9] Simon L. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes[J]. Reprod Biomed Online, 2011, 23(6): 724-734.

[10] 张娜, 刘敬泽, 赵世彬, 等. 精子 DNA 碎片与活性氧的关系研究及对 IVF 结局的影响[J]. 中国优生与遗传, 2012, 20(8): 122-124.

[11] Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation; implications for assisted conception[J]. Hum Reprod, 2001, 16(10): 2160-2165.

[12] Tavares RS, Silva AF, Loureno B, et al. Evaluation of human sperm chromatin status after selection using a modified Diff-Quik stain indicates embryo quality and pregnancy outcomes following in vitro fertilization[J]. Cell, 2013, 1(6): 830-837.

[13] 操日亮, 汪中扬, 马波, 等. 不育男性精浆中过氧化氢测定在评估精液质量中的意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(2): 224-226.

[14] 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.

[15] 黄茜, 丘映, 史秋雯, 等. 两种处理方法对精子顶体完整性和 DNA 损伤的影响[J]. 中国热带医学, 2013, 13(3): 340-342.

(收稿日期: 2015-06-25

修回日期: 2015-09-22)

(上接第 447 页)

参考文献

[1] Coleman EA, Boulton CE. Improving the quality of transitional care for persons with complex care needs[J]. J Am Geriatr Soc, 2003, 51(4): 556-557.

[2] Chen ZT, Lin YC, Dai YT. The problems of family care giving among discharged patients in first month[J]. Nursing Research (Taiwan Nurses Association), 1997, 7(5): 423-434.

[3] 中华人民共和国卫生部. 中国人体器官分配与共享基本原则和肝脏与肾脏移植核心政策[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2013, 1(2): 67-71.

[4] 相锋. 终末期糖尿病肾病患者延续性护理需求调查[J]. 护理研究, 2013, 27(8A): 2326-2327.

[5] 陈彩玲, 袁鹏英, 谷一薄, 等. 维持性血液透析高血压患者延续性护理应用效果评价[J]. 中国血液净化, 2013, 12(7): 404-406.

[6] 杨倩蓉, 杨明莹, 王剑松, 等. 腹膜透析患者延续护理服务需求调查[J]. 护理学杂志, 2014, 29(13): 77-78.

[7] 龚艳, 金春莲, 章小庆, 等. 延续护理小组管理的实践与成效[J]. 中华护理杂志, 2013, 48(1): 50-51.

[8] 王晓凤, 魏苏艳, 候铭. 造口患者的院外延续护理[J]. 护理学杂志, 2010, 14(22): 92-93.

[9] 王世英, 席淑华, 吕一刚, 等. 出院患者延续护理中出现的问题及干预对策[J]. 解放军护理杂志, 2009, 26(2A): 24-26.

[10] 王世英, 王进华, 陈春花. 延续护理在特需患者中的应用[J]. 解放军医院管理杂志, 2008, 15(2): 191-192.

[11] Shu CC, Hsu NC, Lin YF, et al. Integrated postdischarge transitional care in a hospitalist system to improve discharge outcome: an experimental study[J]. BMC Med, 2001, 9(2): 96-97.

(收稿日期: 2015-06-25

修回日期: 2015-09-20)