

炎支原体检测中的比较分析[J]. 实用医技杂志, 2016, 23(4):395-396.

[14] 刘强, 韩晓红. 胶体金法检测肺炎支原体 IgM 抗体的临床应用[J]. 延边医学, 2015, 20(1):38-39.

[15] 张文超, 赵梦川, 冯志山, 等. 被动颗粒凝集法检测 MP 抗体效价和胶体金法联合检测 MP-IgM、MP-IgG 抗体在儿童支原体肺炎中的应用价值[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(9):1058-1061.

2018, 39(9):1058-1061.

[16] 徐瑾. 肺炎支原体抗体滴度测定在呼吸道感染患儿诊断中的临床意义[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(16):2001-2003.

(收稿日期:2019-03-18 修回日期:2019-07-25)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.23.043

精子 DNA 损伤程度与精液常规参数及活性氧的相关性及对 IVF-ET 结局的影响

王文帅, 苟江, 迟剑, 李慧[△]

陕西省西安市第四医院生殖医学科, 陕西西安 710004

摘要:目的 探讨男性的精子 DNA 损伤程度与精液常规分析各项指标及活性氧(ROS)的相关性及对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局的影响。方法 选取 2016 年 12 月至 2017 年 12 月该院收治的行 IVF-ET 的夫妇 169 对为研究对象, 根据男方精液 DNA 损伤程度分为正常组(84 例)、轻度损伤组(57 例)、重度损伤组(28 例), 检测各组男方精液常规参数、ROS 水平, 分析精液常规参数、ROS 水平与精子 DNA 损伤程度相关性, 观察各组 IVF-ET 结局。结果 各组精子活力、精子正常形态百分率及 ROS 水平比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 重度损伤组精子活力、精子正常形态百分率均低于正常组和轻度损伤组, ROS 水平高于正常组和轻度损伤组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 精子活力、精子正常形态百分率与 DNA 损伤程度均呈负相关($r = -0.371, -0.334, P < 0.05$), ROS 与 DNA 损伤程度呈正相关($r = 0.380, P < 0.05$); 重度损伤组受精率低于正常组和轻度损伤组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但各组在卵裂率、优胚率、妊娠率及分娩率方面比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 男性精子 DNA 损伤可能与高水平 ROS 有关, 精子 DNA 损伤可导致精子质量下降, 降低受精率, 对 IVF-ET 产生不利影响。

关键词:精子; DNA 损伤; 精液常规参数; 活性氧; 相关性; 体外受精-胚胎移植

中图分类号:R446.19

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)23-3520-03

精液常规参数是评价男性生育能力的常用指标, 能反映精子密度、活力等, 但精液常规参数检查存在一定局限性, 易受受试者生活状态影响, 且不同时间检查, 各参数也存在较大波动^[1]。所以需寻找一种稳定性高、并能准确反映精子质量的指标以评估男性生育能力。DNA 是精子细胞内与遗传密切相关的重要成分, 精子 DNA 损伤可能会造成复发性流产、男性不育、辅助生殖治疗失败, 而活性氧(ROS)是引起精子 DNA 损伤的重要因素之一^[2-3]。本研究旨在分析精子 DNA 损伤与精液常规参数及 ROS 之间的关系, 以及对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的影响, 在分子水平上为诊断男性不育提供一定参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 12 月至 2017 年 12 月本院收治的行 IVF-ET 的夫妇 169 对为研究对象, 女方年龄 24~42 岁, 平均(31.12±3.72)岁, 卵泡刺激素(FSH)水平 3.48~11.28 U/L, 平均(7.69±2.18) U/L; 男方年龄 26~44 岁, 平均(33.28±4.45)岁。

根据精子 DNA 损伤程度分为正常组(精子 DNA 损伤率 < 15%)84 例、轻度损伤组(精子 DNA 损伤率 15%~30%)57 例、重度损伤组(精子 DNA 损伤率 > 30%)28 例。本研究经本院伦理委员会批准同意。纳入标准:(1)女方年龄 ≤ 42 岁;(2)女方卵巢功能正常、月经规律;(3)获卵数 5 个以上;(4)均签署知情同意书。排除标准:(1)女方生殖道解剖异常;(2)女子宫内病变、输卵管积水、生殖道感染;(3)男方睾丸、附睾、输精管明显异常;(4)伴有心血管疾病、凝血功能障碍。

1.2 方法

1.2.1 精液常规参数分析 在女方取卵前 2 周, 男方禁欲 3~7 d, 通过手淫法获取新鲜精液, 在 37 °C 下液化, 进行精液常规参数分析, 包括精子密度、精子活力等指标, 采用巴氏法染色分析精子形态, 统计精子形态正常百分率。

1.2.2 精子 DNA 损伤检测 采用精子染色质扩散试验检测精子 DNA 损伤情况, 试剂盒购自上海晶都

[△] 通信作者, E-mail:182214637@qq.com.

生物技术有限公司。根据晕环(b)与精子头部横径(a)比例进行精子 DNA 等级判断,大晕环: $b/a \geq 2/3$,中晕环: $1/4 < b/a < 2/3$,小晕环: $b/a \leq 1/4$;无晕环:观察不到晕环;退化:未见晕环且精子核区染色较浅。除大晕环和中晕环外,其他均视作精子核 DNA 损伤。在光学显微镜下对 400 个精子进行观察,统计精子 DNA 损伤率。精子 DNA 损伤率=(DNA 损伤精子数/精子总数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 精液 ROS 水平检测 精液 ROS 水平采用化学发光法检测,检测试剂盒购自武汉纯度生物科技有限公司,精液完全液化后,取 400 μL 于透明离心管中,然后严格按照试剂盒说明书操作。仪器为 LB 9508 型管式化学发光检测仪(德国 Berthold 公司)。

1.2.4 IVF-ET 相关指标检测 采用常规方案控制性促排卵,注射人绒毛膜促性腺激素 36 h 后取卵,然后在 6 h 内进行体外受精,3 d 后选择 2~3 个优质胚胎进行移植,自取卵日行黄体支持,胚胎移植 12 h 后检测人绒毛膜促性腺激素水平,人绒毛膜促性腺激素阳性者在胚胎移植后 35 d 进行 B 超检查,判断是否妊娠。统计正常受精率、卵裂率、优胚率、妊娠率及分娩率。正常受精为双原核受精卵,正常受精率=双原核受精卵数/获卵数 $\times 100\%$ 。优质胚胎判断标准:细胞大小基本均匀,卵裂球在 6 个以上,碎片不超过 25%。优质胚胎率=优质胚胎数/第 3 天可利用胚胎 $\times 100\%$ 。临床妊娠:胚胎移植后经 B 超检查显示宫腔出现孕囊者。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计学软件进行统计分析,计量资料呈正态分布,且方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料以例数或百分率表示,多组间比较采用 χ^2 检验,多组之间两两比较采用 χ^2 分割比较。相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$,均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。 χ^2 分割比较检验水准为 $\alpha=0.05/3=0.017$,即 $P < 0.017$ 差异才有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组精液常规参数及 ROS 水平比较 各组精子活力、精子正常形态百分率及 ROS 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),重度损伤组精子活力、精子正常形态百分率均低于正常组和轻度损伤组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),ROS 水平高于正常组和轻度损伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 精液常规参数及 ROS 与精子 DNA 损伤程度关系分析 精子密度与 DNA 损伤程度无相关性($r=0.037, P=0.15$),精子活力、精子正常形态百分率与 DNA 损伤程度均呈负相关($r=-0.371, P=0.026$; $r=-0.334, P=0.032$),ROS 与 DNA 损伤程度呈正相关($r=0.380, P=0.023$)。

2.3 3 组体外受精及妊娠结局比较 各组间受精率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),重度损伤组受精率低于正常组和轻度损伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 3 组精液常规参数及 ROS 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精子密度($\times 10^6/\text{mL}$)	精子活力(a+b)%	精子正常形态百分率(%)	ROS(RLU/S)
正常组	84	48.98 \pm 22.31	57.32 \pm 23.29	14.12 \pm 6.67	9.54 \pm 2.18
轻度损伤组	57	53.29 \pm 24.18	53.57 \pm 22.71	11.85 \pm 6.79*	10.72 \pm 2.87*
重度损伤组	28	56.82 \pm 20.59	42.19 \pm 14.08*#	8.37 \pm 4.03*#	12.19 \pm 2.59*#
F		2.481	6.334	4.384	5.128
P		0.073	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与轻度损伤组比较,# $P < 0.05$

表 2 3 组体外受精及妊娠结局比较[n(%)]

组别	n	受精率	卵裂率	优胚率	妊娠率	分娩率
正常组	84	68(80.95)	81(96.43)	44(52.38)	39(46.43)	38(45.24)
轻度损伤组	57	47(82.46)	55(96.49)	28(49.12)	24(42.11)	22(38.60)
重度损伤组	28	16(57.14)*#	26(92.86)	13(46.43)	11(39.29)	10(35.71)
χ^2		8.041	0.762	0.340	0.532	1.073
P		0.018	0.683	0.842	0.766	0.586

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与轻度损伤组比较,# $P < 0.05$

3 讨论

精子生成涉及到有丝分裂、减数分裂,是一个独特且复杂的过程,在精子形成过程中,鱼精蛋白逐渐

将组蛋白代替,其具有中和 DNA 电荷、降低 DNA 分子间静电作用,在二硫键作用下与精子 DNA 形成致密胞核,使精子 DNA 在女性生殖道转运过程中不受

破坏,遗传物质保留完整性,父系遗传信息能完整传递给子代^[4]。然而,由于医源性损伤、病理性因素、环境因素的影响,可能会对精子 DNA 造成损伤^[5]。ROS 主要包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢,化学性质活跃等。李文杰等^[6]研究认为,精子 DNA 损伤程度与 ROS 介导的脂质过氧化反应水平呈正相关。本研究结果发现,各组间 ROS 水平具有明显差异,ROS 水平随着精子 DNA 损伤程度加重而升高,与 DNA 损伤程度呈正相关,提示 ROS 可能与精子 DNA 损伤机制有关。ROS 在人体内一般处于动态平衡状态,若 ROS 自身清除能力弱于其产生能力,则会在体内积累,造成氧化应激损伤。人类精子膜含有高浓度不饱和脂肪酸,在受精过程中扮演重要角色,但对 ROS 灵敏度高,极易受自由基攻击,发生脂类过氧化反应,使维持精子膜流动性的双键断裂,导致精子线粒体 DNA、精子核内 DNA 受损^[7]。

目前常用精液常规参数评价男性生育能力,但精液常规参数检查存在一定局限性,且 15% 左右男性精液常规指标显示正常者仍不育。本研究结果显示,各组精子活力、精子正常形态百分率有明显差异,且随着精液 DNA 损伤程度加重,精子活力、精子正常形态百分率显著降低,精子活力、精子正常形态百分率与精液 DNA 损伤程度呈负相关,与既往研究结果一致^[8],提示精液 DNA 损伤与精液常规参数密切相关,可作为评估男性生育能力的重要指标之一。精子损伤程度与精子核鱼精蛋白水平呈负相关,而精子核鱼精蛋白 P2 水平减少时,会引起精子活力降低、形态异常。此外,精液 DNA 损伤还会影响其线粒体呼吸代谢功能,从而导致精子活力下降^[9]。

既往许多研究证实,精子 DNA 损伤会影响 IVF-ET 结局,但具体内容存在一定差异。如张娜等^[10]研究发现,精子 DNA 损伤会造成优胚率明显下降。曾玖芝等^[11]研究显示,精子 DNA 损伤与受精率相关,精子 DNA 损伤率 $\geq 30\%$ 者受精率明显低于精子 DNA 损伤率 $< 30\%$ 者。本研究结果显示,各组间受精率差异有统计学意义 ($P < 0.05$),重度损伤组受精率明显低于正常组和轻度损伤组,提示精子 DNA 损伤可降低受精率。分析原因可能在于:(1)精子 DNA 损伤的负面影响无法通过优质卵子补偿;(2)与正常精子相比,DNA 受损的精子较难穿过透明带进入卵

子;(3)精子 DNA 受损后,相应蛋白转录与合成均受到影响,从而导致顶体酶活性降低,受精过程受阻。

综上所述,精子 DNA 受损的发生可能与高 ROS 水平有关,高 ROS 水平可通过氧化损伤精子膜,破坏精子 DNA 完整性,从而降低精子活力,减少精子正常形态百分率,并降低受精率,通过检测精子 DNA 是否受损,有助于更准确评估男性生育能力。

参考文献

- [1] 关小川,孙刚,姜力. 精子 DNA 完整性对男性不育症患者精液常规参数和精子形态的影响[J]. 中国性科学,2018,27(2):100-104.
- [2] 郭静秋,徐望明. ROS 与精子质量的关系综述[J]. 中国性科学,2017,26(12):88-90.
- [3] 蔡文伟,江楠. 男性不育患者精液活性氧与精子参数的关系研究[J]. 预防医学,2017,29(3):264-268.
- [4] 邵淑敏,李姣,邹敏,等. 精子 DNA 损伤对 IVF/ICSI-ET 结局影响的回顾性资料分析[J]. 中国计划生育学杂志,2016,24(3):179-182.
- [5] 范焱. 237 例意向生育二孩男性精液常规与精子 DNA 损伤的相关性分析[J]. 生殖医学杂志,2017,26(8):831-834.
- [6] 李文杰,潘伟光,刘建,等. 活性氧与不育者精子 DNA 损伤相关性研究[J]. 现代中西医结合杂志,2014,23(11):1160-1161.
- [7] 张俏忻,肖颖秀,程碧珍. 精液白细胞异常增加对精子 DNA 氧化损伤的影响[J]. 癌变·畸变·突变,2015,27(5):383-385.
- [8] 曾玖芝,龚衍,梁梅玉,等. 不育男性精子 DNA 损伤与年龄和精液常规参数的相关性研究[J]. 四川医学,2015,36(5):659-661.
- [9] 麦选诚,董云华,陈斌,等. 不育患者精子 DNA 损伤和精液常规参数关系分析[J]. 中国男科学杂志,2016,30(4):19-22.
- [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]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(8):122-124.
- [11] 曾玖芝,龚衍,梁梅玉,等. 精子 DNA 损伤对常规体外受精-胚胎移植结局的影响[J]. 中国计划生育和妇产科,2015,7(5):30-33.

(收稿日期:2019-03-15 修回日期:2019-07-28)