

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.01.011

精子 DNA 碎片对 IVF 和 ICSI 中囊胚形成的影响

梁晓东,段如冰,莫淦文,沈炳连,纪 鹏,廖勇彬[△]
广东省江门市中心医院生殖医学诊疗中心,广东江门 529030

摘要:目的 探讨精子 DNA 碎片对体外受精(IVF)和单精子卵浆内注射技术(ICSI)中囊胚形成的影响。方法 选取在该院生殖医学诊疗中心行 IVF/ICSI 治疗的患者夫妇,按精子 DNA 碎片指数(DFI)的结果分为 4 组,把第 3 天(D3)胚胎培养成囊胚,分析各组囊胚形成率、可用囊胚形成率和优质囊胚形成率,并且通过 Logistic 多因素回归模型分析囊胚形成的影响因素。结果 随着 DFI 的升高,囊胚形成率、可用囊胚形成率和优质囊胚形成率呈现下降趋势,Logistic 多因素分析结果提示精子活力、DFI 和授精方式与囊胚形成结局显著相关($P<0.05$)。结论 DFI 是囊胚形成过程当中的重要影响因子。

关键词:囊胚形成; 体外受精; 精子 DNA 碎片

中图分类号:R394.1

文章编号:1672-9455(2020)01-0043-04

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effects of sperm DNA fragments on blastocyst formation in IVF/ICSI

LIANG Xiaodong, DUAN Rubing, MO Ganwen, SHEN Binglian, JI Peng, LIAO Yongbin[△]
Center of Reproductive Medicine Clinic, Jiangmen Central Hospital,
Jiangmen, Guangdong 529030, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of sperm DNA fragments on blastocyst formation in IVF/ICSI. **Methods** Couples who received IVF/ICSI treatment were divided into four groups according to the results of sperm DNA fragmentation index (DFI). The third day (D3) embryos were cultured into blastocyst, and blastocyst formation rate, available blastocyst formation rate and high quality blastocyst formation rate were analyzed in each group. Logistic multivariate regression model was used to analysis the influence factors of blastocyst formation. **Results** With the increasing of DFI, blastocyst formation rate, available blastocyst formation rate and high quality blastocyst formation rate showed a downward trend, and Logistic multivariate analysis suggested that sperm motility, DFI and fertilization mode significantly correlated with blastocyst formation outcomes. **Conclusion** DFI index is an important effect factor on blastocyst formation.

Key words: blastulation; in vitro fertilization; sperm DNA fragmentation

精子 DNA 碎片指的是精子成熟过程中在各种因素的作用下,其 DNA 片段发生断裂、交联等损伤。当这种存在碎片的精子数量超过一定程度,可能导致男性不育。而这种精子 DNA 损伤导致的男性不育通常无法通过常规的精液分析检查出来,成为不明原因不育^[1]。近年来,辅助生殖技术(ART)的广泛应用为患者带来了孕育新生命的希望。在应用 ART 治疗过程中,这些患者的预后与结局受到高度的重视。有研究表明,精子 DNA 损伤与反复的胚胎质量差、种植失败及流产存在密切的关系^[2],但对于精子 DNA 损伤通过何种途径影响妊娠结局,以及影响胚胎发育的哪个阶段,目前仍然没有统一的结论。近年来,把第 3 天(D3)的胚胎培养成为囊胚,再移植到子宫内膜的技术受到生殖界的青睐,囊胚具有种植率高,与子宫内膜移植窗口期更为同步等优点,成为实验室开展囊胚培

养的着眼点。使用囊胚培养更是能准确地反映和评估胚胎发育潜能的重要手段^[3]。已经有学者对精子 DNA 碎片是否会影响对胚胎的发育潜能或者影响到卵裂期胚胎发育成囊胚进行了研究^[4-5]。这些研究主要使用单因素分析法,鉴于影响囊胚形成的影响因素众多,仅使用单因素进行分析有可能造成偏倚,因此,有必要进一步使用多因素分析法分析各因素对囊胚形成的影响,从而观察 DNA 完整性对囊胚形成结局的独立作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾分析 2016 年 1 月至 2018 年 12 月在本院生殖医学诊疗中心行囊胚培养周期的患者夫妇资料。纳入标准:女方年龄 ≤ 35 岁,受精方式包括常规体外受精(IVF)和单精子卵浆内注射技术(ICSI)。排除标准:(1)经皮附睾/睾丸穿刺取精(PESA/

TESA) 周期; (2) 女方卵巢储备功能低下, 参照 ZHANG 等^[6]介绍的标准, 基础窦卵泡数<5 个, 或者基础促卵泡生成素(FSH)>10 U/L, 或者曾经出现过前一个卵巢刺激周期获卵数<5 个的卵巢低反应史; (3) 卵母细胞冷冻周期。

1.2 方法

1.2.1 促排卵方案 在促排卵的前 1 个月经周期的黄体中期开始用促性腺释放激素激动剂(GnRH-a) 进行降调。用 GnRH-a 后 16~20 d, 达到降调标准后使用促性腺激素(Gn) 启动, 同时 B 超监测卵泡发育, 并测量血清性激素水平, 当至少 1 个卵泡直径达 18 mm 或至少 3 个卵泡直径达 17 mm 时, 注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)。注射 HCG 后 34~36 h 取卵。

1.2.2 精液采集及处理 男方禁欲 3~5 d, 取卵日用手淫法收集精液。使用上游法或密度梯度离心法处理精液。

1.2.3 IVF 和胚胎培养 取卵术后, 收集和观察卵母细胞形态, 根据处理后精子数量选择 IVF 方案或者 ICSI 方案进行受精。若受精率低, 则采取补救卵胞浆内单精子注射(R-ICSI) 方案。受精 72 h 后观察 D3 胚胎情况。

1.2.4 囊胚培养 采用 Quinn's Advantage 序贯培养液或 Vitrolife 序贯培养液对卵裂期胚胎作囊胚培养, 按试剂说明书操作。第 5 天(D5) 上午进行观察, 若当天形成可用囊胚则移植, 若未形成则在第 6 天(D6) 再观察, 若有可用囊胚形成再移植。囊胚的评价

标准采用 Gardner 人类囊胚分级系统, D5 评分≥3BB、D6 评分≥4BB 定义为优质囊胚, D5 评分>3CC、D6 评分>4CC 定义为可用囊胚。

1.2.5 精子染色质结构分析试验(SCSA) 检测精子 DNA 碎片指数(DFI) 精液液化后用 TNE(Tris, NaCl, EDTA) 缓冲液进行稀释, 使精子浓度为 (1~2)×10⁶/mL, 取 0.05 mL 稀释后的悬液置于流式细胞仪进样管中, 加入 0.1 mL 酸处理液处理 30 s, 再加入 0.3 mL 吖啶橙染色液, 调整精子流速。检测 5 000 个精子的荧光, 用软件分析各种荧光的精子比例, 并且计算出 DFI。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计学软件进行数据处理及统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若满足正态分布及方差齐性的条件, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间中的两两比较采用 SNK-*q* 检验; 若不符合正态分布, 则采用非参数检验进行比较。而单向有序分类资料的比较, 采用线性相关趋势分析法或者 χ^2 检验。囊胚培养结局与各变量之间的关系使用二分类 Logistic 回归分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者夫妇一般资料 符合条件的患者夫妇的基础情况见表 1。

2.2 各组囊胚培养结果 各组的囊胚形成状况见表 2。随着 DFI 的升高, 囊胚形成率、可用囊胚形成率和优质囊胚形成率呈现下降趋势。

表 1 患者的基础条件和获卵数($\bar{x} \pm s$)

DFI	<i>n</i>	女方年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	不孕年限 (年)	基础 FSH (U/L)	基础 E ₂ (pg/mL)	获卵数 (个)	Gn 用量 (U)	男方年龄 (岁)
<20%	342	30.21±3.22	21.48±3.07	3.95±2.48	5.58±1.82	56.72±35.06	15.27±6.13	2 339.20±1 032.97	32.77±4.59
20%~<30%	133	30.07±3.22	21.13±2.97	4.13±2.74	5.59±1.72	58.86±27.03	15.53±6.27	2 362.41±902.64	32.07±3.96
30%~<40%	94	30.33±3.06	21.39±3.54	4.34±3.04	6.12±2.03	52.15±21.56	15.16±6.96	2 482.98±900.47	33.19±4.26
≥40%	60	30.55±3.22	21.76±3.10	3.88±2.32	5.87±1.87	57.47±25.12	14.47±5.78	2 448.54±861.99	32.02±3.52
<i>P</i>		0.864	0.366	0.595	0.160	0.168	0.056	0.602	0.210

表 2 各组囊胚培养结果

DFI	囊胚培养周期数(个)	囊胚培养数(个)	囊胚形成率(%)	可用囊胚形成率(%)	优质囊胚形成率(%)
<20%	467	2 057	55.75	44.13	20.79
20%~<30%	194	818	52.67	43.21	19.75
30%~<40%	134	535	45.00	32.50	11.87
≥40%	73	299	18.92	10.81	2.07
<i>P</i>	—	—	0.001	0.002	0.010

注:—表示无数据。

2.3 多因素回归分析 把 DFI 和能够影响囊胚形成率的其他变量, 如女方基础条件、授精方法, 以及男方

精子浓度、活力及形态等作为协变量, 把是否形成囊胚作为因变量进行 Logistic 多因素回归模型分析, 在

模型中把有囊胚形成设定为 1,没有形成囊胚设定为 0;把不孕因素中的男方因素设定为 1,女方因素设定为 2,双方因素设定为 3,其他因素设定为 4;把授精方法中的 IVF 设定为 1,ICSI 设定为 2,R-ICSI 设定为 3。结果提示精子活力、DFI 和授精方式与囊胚形成结局显著相关($P<0.05$),见表 3。

表 3 囊胚形成多因素 Logistic 回归分析					
项目	β	Wald	P	OR	95%CI
女方年龄	0.027	0.891	0.345	1.028	0.971~1.088
BMI	-0.045	3.433	0.064	0.956	0.912~1.003
不孕年限	-0.008	0.076	0.783	0.992	0.936~1.051
基础 FSH	-0.018	0.195	0.659	0.982	0.908~1.051
获卵数	0.024	3.223	0.073	1.024	0.998~1.051
男方年龄	-0.007	0.132	0.717	0.993	0.957~1.031
精子浓度	-0.001	0.037	0.848	0.999	0.994~1.005
精子活力	0.011	6.561	0.010	1.011	1.003~1.019
精子形态	0.036	1.099	0.295	1.036	0.969~1.108
DFI	-0.016	5.128	0.024	0.984	0.970~0.998
不孕因素					
男方因素	—	6.395	0.094	1.000	1.000
女方因素	0.183	0.590	0.442	1.201	0.753~1.916
双方因素	0.022	0.008	0.930	1.022	0.632~1.653
其他因素	-0.344	1.901	0.168	0.709	0.435~1.156
授精方式					
IVF	—	20.73	0.000	1.000	1.000
ICSI	-1.134	17.99	0.000	0.322	0.191~0.543
R-ICSI	-0.601	7.142	0.008	0.548	0.353~0.852

注:—为无数据。

3 讨 论

精子 DNA 片段发生损伤是外界理化因素及内在精子缺陷共同作用的结果^[7]。较高的精子 DNA 损伤率可以引起男性不育^[8]。而随着生殖医学技术的发展和进步,不少不孕不育夫妇接受 ART 而成功妊娠,因此,精子 DNA 损伤程度对于采取了 ART 治疗后的临床结局及预后是否也存在着影响,是一个重要的研究课题。目前,已经有大量的研究表明,精子 DNA 损伤与不良的 IVF 妊娠结局有密切关系^[4,9]。

胚胎的体外培养是 IVF 过程中至关重要的一环,胚胎的质量直接影响妊娠结局。利用卵裂期胚胎培养至囊胚阶段,观察其是否形成囊胚或者囊胚是否可用,比起单纯的对卵裂期胚胎进行形态学评估,更能客观、准确地反映胚胎的质量与发育潜能^[3]。因此,本研究通过观察囊胚培养结局作为胚胎发育潜能指标来研究精子 DNA 损伤对其的影响。研究发现,随着精子 DNA 损伤程度的升高,囊胚形成率、可用囊胚形成率和优质囊胚形成率呈现下降趋势,表明精子

DNA 碎片能影响卵裂期胚胎发育到囊胚的过程,与 VIRRO 等^[10]和 NI 等^[5]的研究结果相同。SIMON 等^[11]把这种影响称为胚胎晚期发育的父源效应。

先前已经有研究报道了精子 DNA 碎片对囊胚发育的影响^[12],然而由于女方年龄、卵巢储备功能及使用的授精方法也可能影响到囊胚形成结局^[13-14],对研究结论造成干扰。为此本研究不但选取了年龄 35 岁以下、卵巢储备功能好的女性患者作为研究对象,还把这些因素及授精方法等变量纳入 Logistic 多因素回归模型进行分析,结果显示,囊胚形成与授精方式有关,与唐永梅等^[15]的研究相符合。除此以外,从模型分析结果还可以看出,男方精液参数中的精子活力也能影响囊胚形成,可能与精液处理过程中所选择的方法有关^[16]。综合分析以上因素及模型分析结果,笔者认为 DFI 是囊胚形成过程中的重要影响因素。

精子 DNA 损伤能够广泛地影响胚胎细胞各个发育过程,包括受精、细胞分裂、胚胎发育和着床过程。带有 DNA 损伤的精子与卵母细胞受精后,卵母细胞会以有限的修复能力启动 DNA 修复程序,但严重的 DNA 损伤卵母细胞无法修复,可能会激活凋亡通路,诱导胚胎凋亡,以上机制可能是影响胚胎发育潜能的重要机制之一^[17]。

综上所述,本研究探讨了精子 DNA 完整性对囊胚形成的影响,可为今后深入研究精子 DNA 完整性对囊胚形成的预测价值及作用机制奠定基础。

参考文献

[1] MAYORGA-TORRES B,CAMARGO M,CADAVID A P,et al. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? [J]. Andrologia,2017,49(5): 12659.

[2] BACH P V,SCHLEGEL P N. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI[J]. Basic Clin Androl,2016,26:15-20.

[3] HERBEMONT C,SARANDI S,BOUJENAH J,et al. Should we consider day-2 and day-3 embryo morphology before day-5 transfer when blastocysts reach a similar good quality? [J]. Reprod Biomed Online,2017,35(5): 521-528.

[4] SIMON L,ZINI A,DYACHENKO A,et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome[J]. Asian J Androl,2017,19(1): 80-90.

[5] NI W,XIAO S,QIU X,et al. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation[J]. PLoS One,2014, 9(4):e94956.

[6] ZHANG H H,XU P Y,WU J,et al. Dehydroepiandrosterone improves follicular fluid bone morphogenetic protein-15 and accumulated embryo score of(下转第 50 页)

- The pediatric asthma yardstick: practical recommendations for a sustained step-up in asthma therapy for children with inadequately controlled asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2018, 16(3):299-304.
- [2] 吴雪梅, 黄玉如, 余艳飞, 等. 随访管理对学龄期儿童哮喘延续护理的效果分析[J]. *医院管理论坛*, 2017, 34(2):64-66.
- [3] QI Y L, AVALOS M I, REZNIK M. Asthma management in New York City schools: a physical education teacher perspective[J]. *J Asthma*, 2018, 56(4):1-29.
- [4] BASSOLA B, SANSONE V A, LUSIGNANI M. Being yourself and thinking about the future in people with motor neuron disease: a grounded theory of self-care processes[J]. *J Neurosci Nurs*, 2018, 50(3):138-143.
- [5] KIM S J, KANG S R, LEE J M. Development of a sexual abuse prevention education program for elementary school students using a hybrid application[J]. *Child Health Nurs Res*, 2018, 24(1):109-118.
- [6] LARSSON K, STALLBERG B, LISSPERS K, et al. Prevalence and management of severe asthma in primary care: an observational cohort study in Sweden(PACEHR)[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1):12.
- [7] TAPONEN S, LEHTIMAKI L, KARVALA K, et al. Employment status and changes in working career in relation to asthma: a cross-sectional survey[J]. *J Occup Med Toxicol*, 2018, 13(1):8-14.
- [8] 侯超, 胡晓帆, 刘婷, 等. 哮喘长期管理方法的研究进展[J/CD]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2013, 6(5):452-456.
- [9] FERRER M, JONES P W. George's Respiratory Questionnaire[M]// ALEX C M. *Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research*. Amsterdam: Springer, 2014:75-79.
- [10] 徐晓燕, 邓小霞. 健康教育在小儿哮喘临床护理中的应用效果[J]. *中国现代医生*, 2015, 53(1):99-101.
- [11] 伍晓莹, 林志玉, 潘烨, 等. 基于微信公众平台的延续护理在 PICC 带管患者中的应用效果研究[J]. *中国护理管理*, 2016, 16(6):819-823.
- [12] 雷铨, 陈晨, 石镁虹, 等. 基于微信平台的延续护理在院外患者中的应用现状[J]. *护士进修杂志*, 2017, 32(2):117-120.
- [13] 翟丹丹, 王尹蓉. Orem 自理护理模式对帕金森患者的 Barthel 指数, 满意度及健康教育达标率的影响[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(2):47-49.
- [14] 张丽, 王晓春. Orem 自理护理模式对老年脑梗死患者认知功能及康复效果的影响[J]. *中华现代护理杂志*, 2014, 20(3):312-314.
- [15] 岳芸. Orem 自理护理模式对阿尔茨海默病患者并发症及生活质量的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(14):151-152.

(收稿日期:2019-06-02 修回日期:2019-10-10)

(上接第 45 页)

- infertility patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial[J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7:93-96.
- [7] 陆金春. 精子 DNA 损伤的相关因素研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(8):675-680.
- [8] EVENSON D P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility[J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 169:56-75.
- [9] OLESZCZUK K, GIWERCMAN A, BUNGUM M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome[J]. *Andrology*, 2016, 4(2):290-296.
- [10] VIRRO M R, LARSON-COOK K L, EVENSON D P. Sperm chromatin structure assay(SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles[J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(5):1289-1295.
- [11] SIMON L, MURPHY K, SHAMSI M B, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(11):2402-2412.
- [12] 陈莉, 王宇峰, 曹芳, 等. 精子 DNA 碎片指数对囊胚发育的影响[J]. *中国当代医药*, 2018, 25(33):110-112.
- [13] DE CONTO E, GENRO V K, DA S D, et al. AMH as a prognostic factor for blastocyst development[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2015, 19(3):131-134.
- [14] CHADID M L, CARPIO J, VALDIVIESO P, et al. Percentage of blastulation on the number and function of metaphase II oocytes[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2015, 19(3):111-113.
- [15] 唐永梅, 韦继红, 韦立红, 等. 不同受精方式的囊胚发育速度及其临床结局分析[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(8):813-815.
- [16] 唐永梅, 韦继红, 牟联俊, 等. 不同受精方式对囊胚培养和移植结局的影响[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(14):2260-2262.
- [17] PALINI S, STEFANI S, PRIMITERRA M, et al. Comparison of in vitro fertilization outcomes in ICSI cycles after human sperm preparation by density gradient centrifugation and direct micro swim-up without centrifugation[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2017, 21(2):89-93.

(收稿日期:2019-03-25 修回日期:2019-07-02)