

· 论 著 ·

## 体外受精-胚胎移植中新鲜睾丸精子与解冻后睾丸精子助孕结局比较

陈巧莉, 刘军霞, 裴莉, 韩伟, 曾品鸿, 叶虹, 黄国宁

(重庆市妇幼保健院 400013)

**摘要:**目的 比较单精子卵泡浆内显微注射受精助孕(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)中,使用新鲜睾丸精子与解冻后睾丸精子两组的助孕结局。方法 回顾性分析 2002 年 1 月至 2008 年 8 月在本所接受 ICSI 助孕的 272 个周期,其中 117 个周期使用新鲜睾丸精子,为 A 组;155 个周期使用解冻后睾丸精子,为 B 组。结果 (1)A、B 两组受精率为 77.1% vs 78.9%、优质胚胎率:20.7% vs 17.5%,两组比较差异无统计学意义。(2)妊娠及出生结局分析,A、B 组临床妊娠率、着床率、流产率分别为 48.7% vs 52.3%、26.9% vs 32.3%、8.8% vs 14.8%。足月活产率,低体重儿发生率分别为 63.2% vs 55.6%、20.3% vs 29.5%,两组比较差异均无统计学意义。结论 体外受精-胚胎移植中采用解冻睾丸精子其助孕结局与新鲜睾丸精子相同,解冻后睾丸精子的使用可以最大限度减少反复睾丸活检对睾丸组织的损伤,增加睾丸组织的利用率。

**关键词:**单精子卵泡浆内显微注射受精助孕;经皮睾丸活检术;睾丸精子;妊娠率

**中图分类号:**R698.2;R714.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2009)24-3063-02

## In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa

CHEN Qiao-li, LIU Jun-xia, PEI Li, et al.

(Chongqing Women and Children Health Care Hospital, Chongqing 400013, China)

**Abstract:** Objective To compare the outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in the patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. **Methods** A retrospective analysis was performed on 264 patients involving 272 ICSI cycles undergoing testicular sperm extraction during January 2002 to August 2008; the cycles were classified by ICSI with fresh or frozen-thawed spermatozoa. The fertilization rates, embryo quality, embryo implantation rates, clinical pregnancy rates per cycle, and delivery and spontaneous abortion rates were compared between the two groups. **Results** No statistically significant differences were found in each parameter examined between the groups. Fertilization rates were 77.1% with fresh vs 78.9% with frozen-thawed testicular sperm; the good quality embryo rate were 20.7% vs 17.5%, implantation rates 26.9% vs 32.3%, pregnancy rates per cycle: 48.7% vs 52.3%, and abortion rates was 8.8% in frozen-thawed testicular sperm, no statistically significant differences with the fresh group ( $P=0.288$ ). **Conclusion** No differences were found in ICSI outcomes between cryopreserved and fresh testicular sperm. In addition, cryopreservation provides several advantages for the patients and reproductive team.

**Key words:** intracytoplasmic sperm injection; testicular sperm extraction; fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa; pregnancy outcome

随着单精子卵泡浆内显微注射受精技术(ICSI)的诞生,经皮睾丸活检术(TESA)联合 ICSI 使无精症患者获得亲生子女成为可能。许多患者接受 ICSI 前都进行睾丸的诊断性活检以明确睾丸内是否有精子,部分不孕夫妇接受多个 ICSI 助孕周期,但反复睾丸手术可能造成血行阻断和永久性损害<sup>[1]</sup>,因此可以将前期睾丸活检获取的精子进行冷冻保存,用于后期 ICSI 助孕使用,但解冻后睾丸精子与新鲜睾丸精子对 ICSI 结局是否存在影响目前观点不一<sup>[2-3]</sup>,现回顾性分析 2002 年 1 月至 2008 年 8 月在本所接受 TESA+ICSI 助孕的 272 个周期,探讨 ICSI 中使用解冻后睾丸精子和新鲜睾丸精子助孕结局是否存在差异。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 2002 年 1 月至 2008 年 8 月期间在重庆市妇幼保健院因男方为无精症接受 ICSI 助孕的患者,年龄 22~40 岁,平均(29.6±4.3)岁,不育年限 0.5~17 年,平均(5.5±3.7)年。纳入标准:(1)因男方无精症接受 ICSI 助孕,染色体正常,女方无不育因素。(2)通过睾丸活检术获得睾丸精子。(3)新鲜胚胎移植周期。(4)所有妊娠周期均随访至出生,共纳入 264 例,累计 272 个周期。

**1.2 研究方法** 控制性超排卵(COH):采取本所常规超排卵方案<sup>[4]</sup>,使用促排卵药物(Gn)3d 后开始阴道 B 超(Aloka 1400)检测卵泡发育,测量宫内膜厚度。当有 2 个以上卵泡直径达到 18mm 以上时,停用 GnRH-a 和 Gn,当晚肌肉注射 HCG 10 000u,36h 后在阴道 B 超引导下穿刺取卵,取卵当日男方经睾丸活检取精或解冻睾丸精子,经单精子卵泡浆内显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)方法受精<sup>[5]</sup>,培养 3d 后移植 1~3 个胚胎,黄体支持采用黄体酮 60mg/d 肌肉注射。妊娠判断:胚胎移植后 14d 测定血清 β-HCG,28d 后 B 超检查,所有妊娠周期均由专人于孕早、中、晚期进行电话随访,生产情况及围产儿资料均通过电话询问患者本人或医院记录获得,真实可靠。

**1.3 经皮睾丸活检术(TESA)** 术前常规进行染色体,梅毒,艾滋病,甲型、乙型、丙型肝炎病毒,血常规,凝血功能检查,穿刺时使用 2%利多卡因,2%肾上腺素进行局部麻醉后,在阴囊皮肤做一个小切口,穿过睾丸鞘膜在白膜上做一个小切口,切取一块睾丸组织放入 SpermRinse 培养液(瑞典, Vitrolife 产品)中,室温下保持 15min,洗涤 2 次,在解剖显微镜下用两个无菌 BD 注射器针头将睾丸组织撕碎,在倒置显微镜下检查。

若为诊断性睾丸活检,发现活动精子后即采用我所常规睾丸组织冷冻方法进行冷冻,后期解冻行 ICSI<sup>[9]</sup>;若采用新鲜睾丸组织中精子行 ICSI,获得新鲜睾丸精子后用 SpermRinse 培养液洗涤,置于 5%CO<sub>2</sub>,37℃ 培养箱中备用。

**1.4 统计学方法** 本研究资料采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,计量资料比较采用 *t* 检验,计数资料的比较采用卡方检验。

## 2 结果

264 例患者累计接受 272 个 ICSI 助孕周期,根据患者意愿选择助孕前先行 TESA,获取睾丸精子冷冻备用或采卵当日获取新鲜睾丸精子,其中 117 个周期使用新鲜睾丸精子(A 组),155 个周期使用解冻后睾丸精子(B 组)。

**2.1 助孕情况分析** A、B 两组女方平均年龄、获成熟卵数比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。A 组受精率、优质胚胎形成率、着床率、临床妊娠率分别为 77.1%、20.7%、26.9%、48.7%;B 组分别为 78.9%、17.5%、32.3%、52.3%,两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。

表 1 两组助孕情况分析(周期)

项目	A 组	B 组	P
周期数	117	155	
平均年龄(岁)	29.8±5.1	29.0±4.5	0.841
获成熟卵数	10.4±5.2	10.3±5.6	0.455
受精率(%)	77.1(826/1072)	78.9(1016/1287)	0.269
可移植胚胎数(率, n(%))	5.87±3.62(77.0)	5.48±3.76(72.2)	0.827
优质胚胎数(率, n(%))	1.59±1.83(20.7)	1.34±1.68(17.5)	0.208
移植胚胎数	2.32±0.55	2.15±0.44	0.122
临床妊娠率(%)	48.7(57~/117)	52.3(81/155)	0.563
着床率(%)	26.9(79/294)	32.3(111/344)	0.137

**2.2 妊娠情况分析** A 组共 57 个妊娠周期,其中单胎 30 个、双胎 13 个、三胎 3 个,宫外孕 5 个、临床妊娠流产 5 个、宫内合并宫外孕 1 个;B 组共 81 个周期,单胎 36 个、双胎 28 个、三胎 1 个、宫外孕 3 个、宫内合并宫外孕 1 个、流产 12 个。A、B 两组流产率分别为 8.8%、14.8%,两组比较差异无统计学意义( $P=0.288$ )。多胎率比较(大于或等于 2 胎):A 组多胎发生率为 27.1%,B 组为 34.9%,两组比较差异无统计学意义( $P=0.324$ )。

表 2 两组妊娠及分娩情况分析[n(%)]

组别	周期数	流产周期	足月活产率	活产儿出生体重	
				<2 500g	≥2 500g
A 组	57	5(8.8)	36(63.2)	12(20.3)	47(80.7)
B 组	81	12(14.8)	45(57.8)	23(29.5)	55(70.5)
P		0.288	0.372	0.224	

**2.3 围产儿比较** 妊娠周期中 A 组获得婴儿 57 个,早产死亡 1 例(双胎,孕 34 周早产),1 例中孕期发现胎儿脑积水、胸腔外翻行引产术。B 组获得婴儿 74 个,早产死亡 5 例(均为双胎,分别为孕 29、30、34 周早产),未发现畸形胎儿。A、B 组足月活产率分别为 63.2%、55.6%,活产儿中低体重儿发生率为 20.3%、29.5%,两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),结果

见表 2。

## 3 讨论

ICSI 技术的广泛开展,使更多的无精子症患者拥有了自己的遗传学后代,大部分患者需行多个 ICSI 周期,如果每一次 ICSI 操作都需要睾丸取精,这不仅增加患者的痛苦,反复睾丸活检会破坏睾丸组织结构,造成睾丸损伤,尤其是睾丸发育不良的患者,而且采卵当日 TESA 失败,也导致女方超排卵失去意义,这不但在不育夫妇的生理和心理上造成影响,同时也带来经济上的损失。而将前期诊断性睾丸活检获得的精子进行冷冻保存,既可以防止因取卵日精子获取失败导致助孕取消,还可以实现一次睾丸取精多次 ICSI 治疗、降低睾丸活检手术并发症发生率。但冷冻睾丸精子解冻后行 ICSI 对助孕结局是否有影响,目前尚存争议。有报道认为,冷冻会破坏精子 DNA<sup>[7]</sup>,损害精子细胞膜、细胞器,降低受精率等影响助孕结局<sup>[8]</sup>。也有报道认为,冷冻起到了一种筛选的作用,只有那些活动力较好、膜功能稳定、代谢旺盛、染色体正常的精子才能耐受<sup>[9]</sup>。本资料结果显示,采用 10%甘油作为冷冻保护剂,以液氮悬吊法冷冻睾丸组织,复苏后行 ICSI 助孕,卵子受精率、获可移植胚胎率、优质胚胎形成率、生化妊娠率、着床率与新鲜睾丸精子组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),这与 Habermann 等<sup>[3]</sup>报道一致。作者认为,冷冻睾丸精子解冻后,精子的发育潜能并没有受到破坏,当然也没有发现冷冻过程可以帮助选择优质的睾丸精子使妊娠结局得到改善,采用解冻后睾丸精子行 ICSI,其助孕结局与新鲜睾丸精子相同。从妊娠及出生情况分析,A、B 两组流产率、妊娠周期足月活产率、低体重儿比率分别为 8.8% vs 14.8%、63.2% vs 55.6%、20.3% vs 29.5%,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

综上所述,使用解冻后睾丸精子助孕与新鲜睾丸精子助孕其妊娠丢失率,足月活产率,低出生体重儿发生率均无差异,进一步证实上述观点。围产儿情况分析显示,A 组围产儿死亡 1 例,B 组围产儿死亡 5 例,均为双胎早产夭折。A 组发生畸形胎儿 1 例,B 组未发现畸形胎儿,由于本研究样本较少,解冻后睾丸精子助孕对围产儿是否存在影响,目前还需扩大样本进一步证实。

总之,采用冷冻睾丸精子行 ICSI 与新鲜睾丸精子助孕结局未见差异,冷冻睾丸精子的应用可以最大限度的减少患者接受 TESA 的次数,避免睾丸组织的反复损伤,增加睾丸组织的利用率,可以在临床开展。

## 参考文献:

- [1] Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction [J]. Hum Reprod, 1997, 12(8): 1688.
- [2] Vincent W, Aoki BS, Aaron LW, et al. Improved in vitro fertilization embryo quality and pregnancy rates with intracytoplasmic sperm injection of sperm from fresh testicular biopsy samples vs. frozen biopsy samples[J]. Fertil. Steril. 2004, 82(6): 1532.
- [3] Habermann H, Seo R, Cieslak J, et al. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa[J]. Fertil. Steril. 2000, 74(5): 955.
- [4] 文宏贵,朱春娟,赵迎,等. 排尿方式对(下转第 3069 页)

醉质量管理的要求相应提高,除需维持麻醉与手术过程中各项生命体征正常平稳外,还应使全麻起效、恢复、清醒快,以便于接台。其主要原因之一系此类手术时间短,连台手术多<sup>[2]</sup>。本院从 2006 年开始,妇科腹腔镜手术采用气管内插管全凭静脉麻醉方法,靶控输注异丙酚及瑞芬太尼维持麻醉来达此目的,肌松药主要选择中时效非去极化肌松药国产顺式阿曲库铵、维库溴铵。为充分了解两种中时效非去极化肌松药的药效学特点,术中合理应用,不延长全麻后恢复时间,不影响连台手术,作者做了本试验。

本试验采用 TOF-Guard 肌松监测仪行经典的连续四个成串刺激方式监测顺式阿曲库铵、维库溴铵的肌松作用,所有患者无肝、肾功能异常及神经肌肉传导疾病,试验条件可靠;两组患者一般情况无差异,麻醉诱导期间血液动力学平稳,组间无差异,试验结果具可比性。顺式阿曲库铵为阿曲库铵的反-反-顺-顺式同分异构体,它的药物活性比外消旋阿曲库铵高 50%,肌松强度为阿曲库铵的 3 倍左右。顺式阿曲库铵既具有阿曲库铵的代谢特点(Hofman 消除方式代谢),又具有维库溴铵对心血管影响小的特点,且无明显的组胺释放反应,这与黄河等<sup>[3]</sup>观察到的阿曲库铵的组胺释放反应明显不同。顺式阿曲库铵与维库溴铵是目前临床评价较好的中时效非去极化肌松药。单次静脉注射两肌松药 0.1mg/kg(2 倍 ED95)量后,A、V 组均能提供良好气管插管条件,顺式阿曲库铵的起效时间较维库溴铵长;无反应期即临床肌松维持时间,顺式阿曲库铵明显较维库溴铵短; $T_1$  恢复至 25%、75%、95%的时间即临床肌松有效作用时间,顺式阿曲库铵较维库溴铵短;这与两药药代动力学特征一致,顺式阿曲库铵在人血浆中平均消除半衰期为(29.2±3.8)min,维库溴铵在人血浆中平均消除半衰期为(71.0±20.0)min。从需拮抗残余肌松的比例上,顺式阿曲库铵组较维库溴铵组低,进一步证实顺式阿曲库铵的临床肌松有效作用时间较维库溴铵短。恢复指数与 TOFR( $T_4/T_1$ )70% A、V 组无差异,这一特点使其恢复的预测性好,即不管初始剂量大小,重复给药次数多少,持续注滴多长时间,只要肌松恢复至 25%,13min 左右肌松作用基本消失,而无蓄积作用。反应在术毕若患者已有呼吸活动,TOF 监测在 2 个颤搐以上,常规给予新斯的明 0.02mg/kg、阿托品 0.01mg/kg 静脉注射拮

抗残余肌松,抗残余肌松消失快,有利于全麻术后恢复。闻大翔等<sup>[4]</sup>采用加速度肌肉松弛监测仪,观察单次静脉注射 2 种中时效非去极化肌肉松弛药顺式阿曲库铵和维库溴铵在老年患者中的药效学,并与非老年患者比较,为 2 种肌肉松弛药在老年患者麻醉中的应用提供参考,结果表明老年患者应用肌肉松弛药,尤其是维库溴铵时,应充分考虑到其作用时效的延长,注意使用剂量并加以严密监测。但顺式阿曲库铵和维库溴铵在非老年患者中的药效学比较,却无明显差异,与本试验存在差异,作者考虑是否与本试验采用靶控输注瑞芬太尼维持麻醉,瑞芬太尼对 2 种肌肉松弛药的协同性不一致有关,有待进一步研究。

综上所述,单次静脉注射 0.1mg/kg(2 倍 ED95)量顺式阿曲库铵与维库溴铵用于短小妇科腹腔镜手术,均能提供良好肌松,气管插管条件良好,无组胺释放等不良反应,血液动力学稳定。顺式阿曲库铵的起效时间较维库溴铵长,临床肌松维持时间及临床肌松有效作用时间都较维库溴铵短,术毕需拮抗残余肌松的比例较少。对于手术时间较短的妇科腹腔镜手术,单次静脉注射顺式阿曲库铵与维库溴铵,前者全麻术后恢复质量更高些。

#### 参考文献:

- [1] 莫利求,黄文起,谭洁芳.新的中效肌松药-顺式阿曲库铵[J].国外医学麻醉学与复苏分册,2000,21(3):170.
- [2] 徐世元,刘辉,许平,等.腹腔镜胆囊切除术中不同剂量维库溴铵对呼吸动力学与通气功能的影响[J].中华麻醉学杂志,2003,23(2):87.
- [3] 黄河,杨天德,陶军,等.罗库溴铵与维库溴铵、琥珀胆碱、阿曲库铵快速诱导气管插管的对比研究[J].重庆医学,2004,23(11):1632.
- [4] 闻大翔,蒋茹,杭燕南,等.顺式阿曲库铵、维库溴铵在老年患者中的药效学研究[J].中华老年医学杂志,2004,23(5):313.

(收稿日期:2009-05-15 修回日期:2009-06-20)

(上接第 3064 页)

- IVF-ET 结局无影响的临床观察[J].重庆医学,2008,37(1):80.
- [5] 黄国宁,叶红,刘红,等.卵细胞浆单精子显微注射(ICSI)治疗不育 67 个周期分析[J].实用妇产科杂志,2000,16:252.
  - [6] 刘东云,刘红,文宏贵,等.应用睾丸组织中精子行卵母细胞浆内单精子注射[J].中华妇产科杂志,2004,39(3):195.
  - [7] Blake D, Hamilton-Douglas T, Carrell Baumber J, et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa [J]. J Androl,

2003,24(4):621.

- [8] Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, et al. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods[J]. Hum Reprod,2000,15:335.
- [9] Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, et al. Light and electron microscopic of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies[J]. Hum Reprod,1999,14(8):2041.

(收稿日期:2009-06-05)