

睾丸与附睾精子 DNA 完整率及行 ICSI 结局的对比研究*

何泳志¹,李大文^{2△},黄悦悦²,肖鑫¹,毛献宝²,龚国通²

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心, 南宁 530021)

[摘要] **目的** 对比分析睾丸与附睾精子行卵胞浆内单精子注射术(ICSI)的结局及精子 DNA 完整率(用精子 DNA 断裂指数 DFI 表示)的差异。**方法** 对来该院生殖中心就诊的 183 例梗阻性无精子症患者行 ICSI, 将患者根据取精途径的不同分为两组, 其中经皮附睾穿刺抽吸术(PESA)取精 80 个周期, 经睾丸穿刺抽吸术(TESA)取精 103 个周期, 对比两组精子 DNA 完整率及行 ICSI 的结局。**结果** 两种方法精子 DNA 完整率和行 ICSI 时受精率、卵裂率、优胚率、妊娠率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 睾丸及附睾精子的 DNA 完整率及行 ICSI 结局无显著差异, 临床医生可根据个人经验或患者意愿选取精子行 ICSI 助孕。

[关键词] 睾丸精子抽吸术; 经皮附睾精子抽吸术; 梗阻性无精子症; 卵胞浆内单精子注射术; 精子 DNA 完整率

[中图分类号] R698+.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)25-3531-03

Testicular and epididymal sperm comparison of DNA integrity rate and ICSI outcome*

He Yongzhi¹, Li Dawen^{2△}, Huang Yueyue², Xiao Xin¹, Mao Xianbao², Gong Guotong²

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Center for Reproductive Medicine and Genetics, Guangxi Zhuang Autonomous Region People's Hospital, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To comparative analysis the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) result and rate of sperm DNA integrity (DNA fragmentation index, DFI) about testicular and epididymis sperm. **Methods** Totally 183 obstructed azoospermia patients were choosed to use ICSI. 80 cycles by PESA and 103 cycles by TESA, compared two groups of sperm DNA integrity rate and ICSI outcome. **Results** Sperm DNA integrity rate, fertilization rate, cleavage rate, good-quality embryo rate and pregnancy rate compared with no difference by ICSI ($P > 0.05$). **Conclusion** DNA integrity rate and ICSI outcomes of the testis and epididymis sperm have no significant differences. clinicians can be based on personal experiences or patients, wills to select sperm for ICSI.

[Key words] testicular sperm aspiration; percutaneous epididymal sperm aspiration; obstructive azoospermia; intracytoplasmic sperm injection; rate of sperm DNA integrity

据统计,有 10%~15% 的夫妇不孕不育,其中梗阻性无精子症是男性不育症的一个难题。近年来发展起来的经皮附睾穿刺抽吸术(percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA)及睾丸穿刺抽吸术(testicular sperm aspiration, TESA)获取精子行卵胞浆内单精子注射术(ICSI)助孕为梗阻性无精子症患者带来了福音。本文对比分析睾丸与附睾精子行 ICSI 的结局及精子 DNA 完整率(用精子 DNA 断裂指数 DFI 表示)的差异,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究回顾性分析 2012 年 6 月至 2013 年 12 月 183 例梗阻性无精子症患者,其中行 TESA 取精 80 例,行 PESA 取精 103 例。梗阻性无精子症的诊断标准:(1)经 3 次或 3 次以上精液常规检查并经过离心后确认,精子数为 0;(2)血浆促卵泡激素(FSH)正常;(3)睾丸活检中存在精子;(4)睾丸体积大于 30 mL 或单侧体积大于 15 mL;(5)排除其他诊断。B 超和性激素示女方卵巢功能正常。两组患者男方年龄、女方年龄、男方睾丸体积、睾酮及 FSH 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

1.2 方法

1.2.1 PESA 患者取仰卧位,常规消毒、铺巾,固定附睾头,4.5 mL 注射器吸入少量 COOK 精子洗涤液后直视下经皮穿刺附睾,负压抽吸同时缓慢后退,至有淡黄浑浊附睾液体抽出。若未见液体抽出,可改变穿刺方向重复抽吸。将抽吸出的附睾液注入小培养皿,在倒置显微镜下寻找活动的成熟精子。若提取液中无精子或无活动精子,则行对侧附睾穿刺。如仍无精子,考虑行 TESA。

1.2.2 TESA 术前准备同 PESA,术者用左手紧握固定一侧睾丸,在穿刺点用 1%利多卡因局部麻醉,右手握 12 号针经皮穿刺睾丸,由助手用 60.0 mL 注射器吸取 2 mL COOK 精子洗涤液,接上针头,抽吸,保持负压,直至吸取睾丸组织液和少量曲细精管,注入含 COOK 精子洗涤液的培养皿中。如找不到精子,可改变头皮针方向多点穿刺术。磨碎取出组织,于倒置显微镜下观察精子。

1.2.3 精子 DNA 完整性检测 精子 DNA 的检测采用精子染色质扩散试验。主要染色试剂为瑞氏-姬姆萨(珠海贝索生物技术有限公司)。1×400 倍显微镜下观察,每个高倍镜视野

表 1 两组患者一般情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	周期数(<i>n</i>)	男方年龄(岁)	女方年龄(岁)	睾丸体积(mL)	睾酮(ng/dL)	FSH(IU/L)
TESA 组	80	28.70±2.25	25.56±1.41	29.81±2.06	522.42±94.15	7.15±2.54
PESA 组	103	28.30±2.23	25.48±1.40	29.75±2.02	516.76±89.12	7.17±2.10
<i>t</i>		1.195	0.414	0.214	0.416	-0.760
<i>P</i>		0.234	0.679	0.831	0.678	0.940

大于或等于 1 条精子可以观察精子光晕大小(每个视野精子数小于 1 条则不检测)。根据光晕与精子头部横径的比例,粗分为大、中、小和无光晕 4 个等级,大和中光晕表示精子 DNA 完整无碎片,小和无光晕表示精子 DNA 断裂为碎片。小光晕以精子头直径小于或等于 1/4 为判断标准;中光晕精子头直径: $>1/4 \sim 2/3$;大光晕精子直径大于 2/3。

1.2.4 促排卵方案 采用促性腺激素激动剂(Diphereline, 益普生公司)/促卵泡生成素(Gonal-F, 瑞士雪兰诺)和(或)人绝经期促性腺激素(HMG, 丽珠制药)/绒毛膜促性腺激素(Profasi, 瑞士雪兰诺)长方案超促排卵。自用促性腺激素 4 d 后开始 B 超监测卵泡发育;当有 2 个卵泡直径大于 18 mm 时,当晚 21:00 左右予绒毛膜促性腺激素 10 000 IU 肌内注射,36 h 后取卵。

1.2.5 ICSI 操作 取卵后 4~6 h 进行去卵丘结构处理,选择见到极体的 M II 卵进行显微注射。16~18 h 后观察受精情况,48 h 后观察卵裂情况,48~72 h 后选取优质胚胎进行移植。

1.2.6 受精、卵裂、胚胎移植及妊娠情况 常规行 ICSI, ICSI 后第 1 天观察卵子受精情况,以双原核(2PN)卵子作为正常受精卵。第 3 天按照 Peter 分级标准选择优质胚胎进行移植,移植胚胎数小于或等于 3 个,剩余 III 级以上胚胎冷冻保存,并同时给予黄体支持。移植术后第 14、18 天若测血 β -绒毛膜促性腺激素阳性,则第 35 天 B 超观察宫腔内孕囊数目和心管搏动以确立临床妊娠。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组患者一般情况(包括男女双方年龄、睾丸体积、睾酮值、FSH 值)及受精率、D3 卵裂率、优胚率采用 *t* 检验比较,临床妊娠率采用 χ^2 检验比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者精子 DNA 完整率比较 TESA 组 DNA 完整率(34.52±20.36)%与 PESA 组完整率(33.95±24.97)%比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 两组患者行 ICSI 结局比较 两组患者行 ICSI 助孕受精率、卵裂率和优胚率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者行 ICSI 结局比较($\bar{x} \pm s$)

组别	周期数(<i>n</i>)	受精率(%)	卵裂率(%)	优胚率(%)
TESA 组	80	78.91±20.53	95.12±10.98	44.92±26.03
PESA 组	103	76.50±24.16	96.51±12.53	38.16±29.84
<i>t</i>		0.714	-0.781	1.617
<i>P</i>		0.476	0.436	0.108

2.3 两组患者行 ICSI 临床妊娠率比较 TESA 组 80 个周期,其中 39 个周期临床妊娠,临床妊娠率为 48.75%;PESA 组 103 个周期,其中 57 个周期临床妊娠,临床妊娠率为 55.34%,两组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.784, P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 睾丸精子和附睾精子 DNA 完整率的对比分析 精子 DNA 完整性对男性不育是一个有价值的评价指标。8%精液常规检查正常的患者中,精子 DNA 是有损伤的;精子 DNA 和染色质的损伤与男性不育和女性自然受孕率降低有明显的关联。大量研究表明,精子 DNA 和染色质的损伤与男性不育和女性自然受孕率降低有明显的关联^[1-2]。DFI 水平对行 ICSI 助孕时继续妊娠率呈负相关,且高水平 DFI 与 ICSI 植入率显著相关,精子 DNA 的损伤是多种因素造成的^[3]。其主要原因是睾丸自身的因素,如鱼精蛋白不足,过多的活性氧(ROS)含量等;外界环境因素包括阴囊温度过高、吸烟、生殖道的感染等^[4]。精索静脉曲张能够造成精子 DNA 完整性的损伤,其损伤程度与精索静脉曲张严重程度有密切关系^[5]。本研究对比分析睾丸及附睾精子 DNA 完整率,即睾丸及附睾精子 DNA 完整率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 睾丸精子和附睾精子行 ICSI 结局的对比分析 ICSI 技术的应用开启了男科领域的新篇章,为严重少精、死精甚至无精患者带来了福音,是男性不育症患者治疗的最后保障。PE-SA/ICSI 和 TESA/ICSI 治疗部分无精子症患者可获得与重度少和(或)弱精子症患者甚至非男方因素不育患者同等的临床妊娠率和种植率,是治疗梗阻性和非梗阻性无精子不育症的有效手段^[6]。可以在实验室去除污染物、细胞碎片、有害微生物和红细胞,处理后的精子可以行 ICSI 或冻存^[7]。有关不同来源精子行 ICSI 后的妊娠结局的报道却不尽相同。有研究显示睾丸精子与附睾精子相比 DNA 损伤程度更低,应用附睾精子治疗失败的患者改用睾丸精子治疗可获得更高的临床妊娠率^[8-9]。刘雅峰等^[10]研究发现附睾精子和睾丸精子,临床妊娠率分别为 52.43%、40.21%,附睾是精子获能、成熟的重要部位,为此附睾精子优于睾丸精子,对无精子症患者行 ICSI 之前尽可能首先选取附睾精子;也有学者认为经附睾精子受精率高于睾丸精子,但优胚率、胚胎植入率及妊娠率无差异^[11]。有文献报道精液、附睾、睾丸精子 ICSI 的助孕结局相近,精子的成熟度可能并不影响 ICSI 的结局^[12-13]。尽管睾丸精子行 ICSI 可能影响受精及早期胚胎发育,但与严重少弱精患者射出的精子及附睾来源的精子行 ICSI 的妊娠结局没有显著差异^[14]。本研究发现睾丸精子与附睾精子行 ICSI 受精率、卵裂率、优胚率差异无统计学意义($P > 0.05$),睾丸精子和附睾精子组的临床妊娠率分别为 48.75% 和 55.34%,睾丸与附睾精子行 ICSI 临床妊娠率差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组患者精子 DNA 完整率和行 ICSI 结局差异无统计学意义($P > 0.05$),经

TESA 取精对术者经验要求不高,经 PESA 取精则无需麻醉,建议术者对于梗阻性无精子症患者慎重选择取精方式行 ICSI 助孕。

随着 ICSI 后代的增多,ICSI 后代潜在的危险越来越受到人们的关注。ICSI 所用的精子正常情况下无法自然受精,可能存在某些遗传异常,并可能传给子代从而造成子代后代也患有同样的疾病;ICSI 技术本身可能对卵子产生机械性损害等。有学者对比经睾丸、附睾取精和射出精子行 ICSI 助孕出生后的孩子进行评估,认为睾丸、附睾精子行 ICSI 后孩子不会导致过多的病死率或先天畸形,且两者早产率、病死率、孕龄、畸形率无差别^[15]。但是目前尚没有确切结论,还有待于进一步深入研究,需对 ICSI 后代作长期随访^[16]。

参考文献

- [1] Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et al. Sperm chromatin structure assay as an Independent predictor of fertility in vivo: a case-control study[J]. *Int J Androl*, 2010, 33(1): e221-e227.
- [2] 张洲, 师娟子, 邢俊平, 等. 复发性流产与精液常规参数、精子畸形率和 DNA 完整性的相关性[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(16): 1788-1792.
- [3] Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, et al. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(7): 1609-1618.
- [4] Zini A, Phillips S, Courchesne A, et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(6): 2495-2500.
- [5] 李大文, 王英俊, 孟繁华. 精索静脉曲张对精子 DNA 完整率的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2010, 24(9): 36-39.
- [6] 黄亚, 王荣祥, 郭丽, 等. 不同来源精子对 ICSI 助孕结局的比较[J]. *临床军医杂志*, 2013, 41(10): 1060-1063.
- [7] Esteves SC, Varghese AC. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome[J]. *J Hum Reprod Sci*,

2012, 5(3): 233-243.

- [8] Moskovtsev SI, Jarvi K, Mullen JB, et al. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa inpatient with successful loralan tioxidant treatment[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4): 114-116.
- [9] 徐志鹏, 孙海翔, 张宁媛, 等. 睾丸精子行 ICSI 改善严重畸形精子症患者治疗结局 5 例报告[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(3): 218-222.
- [10] 刘雅峰, 欧建平, 王琼, 等. 附睾精子和睾丸精子妊娠结局比较[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(11): 100.
- [11] Xie D, Qiu Z, Luo C, et al. Effect of spermatozoa from different sources on normal fertilization of oocytes and embryo quality and development in intracytoplasmic sperm injection cycles[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014, 34(6): 857-861.
- [12] 罗开玲, 邓志华, 丘映, 等. 精液精子、附睾精子和睾丸精子卵泡浆内单精子注射助孕结局的比较[J]. *广西医科大学学报*, 2008, 25(2): 275-277.
- [13] Weng SP, Surrey MW, Danzer HC, et al. Chromosome abnormalities in embryos derived from microsurgical epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2014, 53(2): 202-205.
- [14] 张志宏, 朱海波, 张馨月, 等. 不同来源精子对卵泡浆内单精子注射治疗结局的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(3): 252-255.
- [15] Guo YH, Dong RN, Su YC, et al. Follow-up of children born after intracytoplasmic sperm injection with epididymal and testicular spermatozoa[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(11): 2129-2133.
- [16] Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Twaless M. failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects[J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(4): 892-898.

(收稿日期: 2015-03-18 修回日期: 2015-05-10)

(上接第 3530 页)

- 进展[J]. *山西师大体育学院学报*, 2007, 22(2): 138-141.
- [3] 季丽萍, 冯照军, 曹志发, 等. 冬泳对老年人血脂及心血管机能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2002, 22(6): 479-480.
- [4] 刘杰, 符谦, 杜晓平. 冬泳者机体应激反应与冷适应能力的实验研究[J]. *辽宁体育科技*, 2006, 28(6): 19-21.
- [5] 李德, 滢甫, 李莉. 冬泳健身作用及其安全阈值[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(24): 51-53.
- [6] Siems W, Brenke R. Changes in the glutathione system of erythrocytes due to enhanced formation of Oxygen free radicals during short-term whole body cold stimulus[J]. *Arctic Med Res*, 1992, 51(1): 3-9.
- [7] 庄磊, 王伟娟, 刘涛, 等. 血流剪切力对动脉粥样硬化影响的临床研究[J]. *中国医学影像技术*, 2006, 22(6): 889-

891.

- [8] 潘志军. 冬泳健身机制研究进展[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(2): 290-291.
- [9] 郭继平. 冬泳锻炼对治疗中老年常见慢性病的作用研究[J]. *辽宁师范大学学报*, 2002, 22(2): 178-180.
- [10] 王杰, 佟春玲, 孙宝利. 冬泳运动对高血压防治作用的探讨[J]. *黑龙江医药*, 2008, 7(8): 30-32.
- [11] 王禾, 赵泽霖. 冬泳锻炼对老年人血脂、心功能的影响[J]. *沈阳体育学院学报*, 2011, 15(2): 18-20.
- [12] 邹裕桂, 简辉, 邹小秋, 等. 冬泳对中老年入血糖部分参数的影响[J]. *中国民康医学*, 2006, 18(6): 416-417.

(收稿日期: 2015-03-22 修回日期: 2015-05-16)