

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.018

精液处理前、后精子 3 项对 IVT-ET 结局的相关性分析*

陈绍威¹, 王明勇¹, 付莉¹, 黄桂英¹, 王芳¹, 刘霜¹, 毛熙光²

(1. 西南医科大学附属医院生殖医学技术部, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学第一附属医院妇产科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨精液处理前、后精子 3 项对体外受精-胚胎移植(IVT-ET)结局的相关性。**方法** 回顾性统计分析西南医科大学附属医院 298 例行 IVT-ET 治疗的男方精液, 按照 WHO 标准对处理前精液进行常规分析, Vitrolife 密度梯度离心结合上游法处理精子后分析记录精液各项参数, 受精并进行序贯培养至第 3 天观察统计。**结果** 精液处理前后精子总活力、正常形态精子百分率、精子密度等差异有统计学意义($P < 0.05$); 处理后精子正常形态率与受精率、卵裂率呈正相关($r = 0.487, 0.250, P < 0.05$); 处理后精子总活力与受精率、卵裂率呈正相关($r = 0.249, 0.272, P < 0.05$); 处理后精子密度与 2 原核(PN)、多 PN 受精率呈正相关($r = 0.609, 0.243, P < 0.05$)。**结论** 根据取卵当日处理后的精子参数对选择合适的受精方式更有预测价值。

[关键词] 辅助生殖技术; 精子参数; IVF 结局; 相关系数**[中图分类号]** R394-33**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)32-4526-03**Correlative analysis of three sperm indexes and IVT-ET outcome after semen treatment***Chen Shaowei¹, Wang Mingyong¹, Fu Li¹, Huang Gui Ying¹, Wang Fang¹, Liu Shuang¹, Mao Xiguang²

(1. Department of Reproductive Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between three sperm indexes and the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer(IVT-ET) before and after semen treatment. **Methods** The semen derived from 298 male patients treated with IVT-ET from the Affiliated Hospital of Southwest Medical University was retrospectively analyzed. Routine analysis of semen before treatment was performed according to the WHO standard. Vitrolife density gradient centrifugation combined with upstream method was used to analyze sperm parameters after sperm analysis, and the observation and statistics were performed after fertilization and sequential culture to day 3. **Results** The total viability of spermatozoa before and after semen treatment, the percentage of normal spermatozoa, sperm density, and other differences were statistically significant($P < 0.05$); The normal sperm morphology rate was positively correlated with fertilization rate($r = 0.487, P < 0.01$) and cleavage rate($r = 0.250, P < 0.05$); The sperm vitality of post-processed semen was positively related to the fertilization rate($r = 0.249, P < 0.05$); and significantly cleavage rate($r = 0.272, P < 0.05$); After treatment, sperm density was positively correlated with 2 PN($r = 0.609, P < 0.01$) and multiple PN fertilization rates($r = 0.243, P < 0.05$). **Conclusion** Our experimental results indicate that the parameters of post-processed sperm treated at the day when the oocytes were collected may be more helpful in predicting the fertilization rate and cleavage rate of IVF-ET. Therefore, the IVF-ET treatment protocols should be chose based on the normal sperm morphology rate and sperm vitality after semen treatment.

[Key words] assisted reproductive technology; sperm parameter; IVF outcome; correlation coefficient

精液常规分析一直以来都是辅助生殖技术(ART)领域评估男性生育能力的重要方法之一,也是男性不育症疾病诊断、结局预测的主要依据^[1]。在体外受精-胚胎移植(IVT-ET)前对精子的各类参数进行恰当的评估并选择合适的受精方式,对受精具有重要影响。而在临床中根据处理前常规精液分析结果对患者进行 IVF 或者 ICSI 治疗方案^[2-3];许多研究中所采用数据也是采用处理前精液常规分析结果进行研究^[4]。但在实施 ART 的过程中,真正用来进行体外受精的精子是经过优化处理后的精子,而非优化处理前的精子,经过优化处理前、后精液的各项参数不尽相同^[5-7]。因此,本研究回顾性分析了西南医科大学附属医院 298 例病例,对精液处理前、后精子总活力、正常形态百分率和精子密度 3 项指标与 IVF 结局进行相关性

分析,旨在深入探讨优化处理前、后精子各项参数结果对 IVF 结局的影响,从而选择最佳检测结果作为判断标准,对单纯输卵管因素不孕夫妇实施辅助生殖治疗时采用何种辅助助孕方法提供临床指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014—2015 年在该院生殖中心拟行 IVT-ET 治疗的夫妇,共 298 对。所有对象均满足以下条件:女方各基础指标正常,因单纯双侧输卵管堵塞性因素不孕;年龄 23~43 岁,平均为(30.07±4.48)岁;不孕年限大于或等于 1 年;获取卵数大于或等于 4 枚;无卵巢手术史;无遗传家族病史;均为标准长方案刺激周期取卵。男方年龄 24~46 岁,平均为(32.43±3.95)岁;无外伤;无遗传性疾病家族史及无功能障碍

* 基金项目:西南医科大学科研基金(20130459);西南医科大学附属医院科研基金(11190)。 作者简介:陈绍威(1981—),助理研究员,硕士,主要从事辅助生殖方面的研究。

碍病史;体检未发现有明显睾丸、附睾及输精管异常;禁欲 3~7 d,于配偶取卵当日进行手淫法采集新鲜精液,精液常规检测基本正常。双方染色体检查均未见异常,患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 精液采集 标本均在禁欲 3~7 d 后于女方取卵手术当天,手淫法取全部精液于无菌容器中,注明标本编号及患者姓名,记录禁欲天数和取精时刻,置于 37 °C 恒温箱内液化,并记录液化时间。

1.2.2 精液常规分析 待精液完全液化后,混匀精液,记录液化时间、精液量、颜色等。每份标本随机采样至少 200 个精子以上,采用计算机辅助精液图像分析系统进行分析。取 5 μL 精液滴加于精子标准计数板,进行精液常规和运动参数分析,常规方法制备精子形态涂片,采用 Diff-Quik 方法进行染色,参照第 5 版《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》精子形态分析标准进行形态学评判,记录统计:精子正常形态率、精子总活力、密度、前向运动、非前向运动及 IgG 等参数。

1.2.3 精子优选处理 采用密度梯度离心法分离精子,将充分液化混匀的精子加入已预热的 90% Sperm grad(Vitrolife,瑞典)进行梯度离心,吸取沉淀,转移到含有 1.5 mL 的 G-IVF 中,离心,弃掉上清液;然后再加入 1.5 mL 的 G-IVF,进行离心,弃掉上清液,将精子沉淀转移到含有 0.5 mL 的 G-IVF 的离心管底部,置于 6% CO₂、5% O₂、95% 湿度、温度为 37 °C 的培养箱培养 30 min,吸取上清液进行体外受精。取受精后剩下的上清液再次进行精液常规分析,记录统计:精子正常形态率、精子总活力、密度、前向运动、非前向运动及 IgG 等参数。

1.2.4 超促排卵 均采用该中心的常规标准方案进行超促排卵,前次月经周期第 21 天,开始使用促性腺激素释放激素(GnRH-a),月经第 3 天肌内注射果纳芬(Gonal-F,Gn),当有 3 个以上卵泡直径大于或等于 18 mm,血黄体生成素(LH)<5 U/L,黄体酮(P)<16 nmol/L 时停止使用促性腺激素 Gn,给予人绒毛膜促性腺激素(hCG,Serono,瑞士),36 h 后阴道 B 超引导取卵。

1.2.5 体外受精与胚胎培养 精子获能 30 min,取卵后将卵子放在 G-IVF™ PLUS 培养液中成熟 2 h 后进行体外授精,置于水套式三气培养箱(37 °C、6% CO₂、5% O₂、95% 湿度)中培养,体外受精后 5 h 拆蛋观察第二极体出现情况并判定受精状态。根据 Garden 评分系统对 d0、d1、d2、d3 时间段分别记录 2

极体(Pb)、2 原核(PN)或多 PN 受精率、卵裂率、优质胚胎率等。本研究 2PN 受精率=2PN 受精数/获卵总数×100%;多 PN 受精率=多 PN 受精率/获卵总数×100%;卵裂率=受精卵裂胚胎数/受精数×100%;优质胚胎率=3~4 级/受精数×100%。

1.3 统计学处理 采用 Excel2007 和 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,处理前后精子各参数的比较采用配对 *t* 检验,对精子处理前后情况与受精结局采用 Spearman 秩相关系数进行分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 处理前、后精子总活力、正常形态、总密度等相关性 处理后精子总活力高于处理前,且处理前后呈正相关(*r*=0.29, *P*<0.01);处理后精子正常形态率高于处理前,且处理前后呈正相关(*r*=0.25, *P*<0.05);处理后精子密度低于处理前,且处理前后呈正相关(*r*=0.26, *P*<0.05),见表 1。

表 1 298 例患者精液处理的临床资料($\bar{x} \pm s$)

组别	总活力(%)	正常形态率(%)	总密度(10 ⁶ /mL)
处理前	43.03±16.21	2.83±2.03	137.02±88.67
处理后	87.61±9.61	5.42±1.94	57.26±40.43
<i>r</i>	0.29	0.25	0.26
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 IVF 结局 共获卵 4 518 枚,进行体外受精后平均 2PN 受精率、多 PN 受精率、卵裂率、优质胚胎率分别为(68.08±16.23)、(14.62±10.25)、(85.75±14.89)、(60.43±22.87)%。

2.3 处理前、后精子总活力、正常形态、总密度与 IVF 结局相关分析 处理前精子正常形态率与 IVF 结局 4 项(平均 2PN 受精率、多 PN 受精率、卵裂率、优质胚胎率)无相关性(*P*>0.05),处理后精子正常形态率与受精率呈正相关(*r*=0.487, *P*<0.01),与卵裂率正相关(*r*=0.250, *P*<0.05);处理后精子总活力与受精率呈正相关(*r*=0.249, *P*<0.05),与卵裂率呈正相关(*r*=0.272, *P*<0.05);处理前精子密度与 IVF 结局 4 项相关不显著,处理后精子密度与 2PN 受精率呈正相关(*r*=0.609, *P*<0.01),与多 PN 受精率呈正相关(*r*=0.243, *P*<0.05),见表 2。

表 2 精液处理前后对 IVF 结局相关性分析(*r*,*P*)

项目	处理前精液			处理后精液		
	正常形态	总活力	密度	正常形态	总活力	密度
受精率	0.032,0.971	0.053,0.535	0.021,0.869	0.487,0.006	0.249,0.032	0.133,0.114
2PN 受精率	-0.180,0.130	-0.037,0.761	-0.135,0.113	0.009,0.942	0.036,0.652	0.609,0.000
多 PN 受精率	0.120,0.108	0.142,0.089	-0.029,0.975	0.053,0.479	0.167,0.255	0.243,0.034
卵裂率	-0.169,0.147	0.119,0.248	0.038,0.740	0.250,0.038	0.272,0.016	-0.069,0.739
优质胚胎率	-0.052,0.845	0.677,0.072	0.472,0.116	0.214,0.131	0.121,0.098	0.098,0.483

3 讨论

临床选择受精方式依据诊断当日所获精液常规分析结果决定受精方式,而非依据取卵当日处理后的精液。有研究证实精液经过处理后,各项精液参数百分比都优于处理前的参数,能显著提高精子的质量^[5-7]。另外,常规精液检测只包括:精液量、精子密度、精子活率、酸碱度、颜色等,其对精子功能的检测

有限。众多研究表明,精子形态、DNA 完整性、顶体酶活性等精子功能对 IVF 受精率、卵裂率、临床妊娠率、流产率等有关^[8-10]。但以上研究用的是处理前的精液,存在较多的死精子及杂质,且检测方法不统一,得出的结果有差异,无法正确地反映精子的功能。在实施 ART 的过程中,真正用来进行体外受精的是经过优化处理后的精子,而非处理前的精子。因此处理

前的精液参数不能准确反映体外受精结局。为了更好地控制试验条件,本研究选择了因单纯性输卵管堵塞造成的不孕,并取卵 4 枚以上,尽可能减少女方不孕因素影响。鉴于此,本研究对精液处理前、后精子参数与 IVF 结局的相关性进行比较,探讨可靠的临床指导标准。

本研究结果显示,处理前精子正常形态率与 IVF 各项结局相关性不显著,但处理后精子正常形态率与受精率和卵裂率呈正相关。有研究显示正常形态率与受精率有相关性^[11-12],而也有相关研究显示精子正常形态百分率与其受精率无直接相关性,对预测 IVF 结局的价值有限^[13-14],因此精子正常形态率在预测受精率方面一直存在很多争议。也许造成争议可能是由于形态标准、染色方法、研究对象等不同导致。但是经查证,以上研究中所用数据均是处理前的数据,而在优化处理过程改变了精子的各项参数,导致处理前、后精液基本参数差异显著。因此使用处理前数据对 IVF 结局分析将存在极大波动性,从而出现了精子正常形态率能否预测受精率的争议。精子的受精能力首先取决于与透明带上糖基结合的能力,当精子的形态发生改变时,将影响到精子表面的结构,从而影响精子固着透明带的能力,因此降低了受精率^[15]。另外,精子正常形态与功能密切相关,头部畸形的精子运动速度减慢,头部顶体异常可能缺乏细胞表达蛋白,不具备与透明带结合的能力,使精子失去受精功能。本研究发现处理前精子正常形态率与受精率相关性不显著,而处理后正常形态率与受精率呈正相关,提示处理后的精子正常形态率更能预测 IVF 的受精率。同时精子正常形态率与卵裂率显著正相关,而精子的形态不能反映其染色体是否异常,虽然能正常受精卵裂,但是不能影响卵裂后期胚胎发育。有研究得出同样结论精子形态正常率对卵裂率有显著影响,对胚胎发育及胚胎形态无明显相关^[16]。说明处理后精子正常形态率对受精率和卵裂率具有一定的预测作用。

本研究还发现,处理前精子活力与各项 IVF 结局相关性不显著,处理后精子活力对受精率及卵裂率呈正相关。而影响精子活力的因素很多,如顶体形态、精子形态、精液中微量元素的水平、抗精子抗体等,在处理过程中,将畸形、异常、死亡的精子除去后,剩下活力较强的精子进行体外受精^[17]。本研究结果显示处理前后精子活力差异显著,有报道称精子的活力与精子核成熟、核形态都有相关性,因为形态正常有活力的精子通常都具有较为成熟的精子核,能正常完成卵裂^[18]。另外 Sivanarayana 等^[19]研究也发现精子活力与 DNA 完整性有关,细胞核正常意味着在一定程度上保证受精后具有良好后期发育。Luco 等^[4]研究发现精液处理前精子活力与 IUI 不相关,而精液处理后精子活力与 IUI 相关性显著。对纳入本研究的夫妇进行调查结果显示未见畸形胎儿出生,根据本研究处理后精子活力对受精率及卵裂率具有显著相关性的结果,意味着处理后精子活力对受精率及卵裂率具有预测作用。

本研究结果显示精液处理前精液密度对 IVF 结局相关性不显著,而处理后精液密度对 2PN 率具有相关性,对多 PN 也具有相关性。处理前后的密度差异显著,正常的精子密度能够保证精卵结合、顶体发生等受精过程。而处理前的精液含有一部分死亡或者畸形的精子,因此处理前的精子密度对 IVF 结局相关性不大。有研究表明无论是体内还是体外,随着精子密度的升高,多 PN 受精率也会随之提高^[19]。Palomo 等^[20]报道了,山羊的多 PN 受精率与体外受精时不同精子密度相关。本研究结果显示处理后精子密度对多精受精率有相关性,说明精子密度在一定程度上会影响精卵异常结合。精子数量的增多

会延迟卵母细胞皮质颗粒的释放,导致高频的多精受精。处理后的精液密度与 2PN 率和多 PN 率显著相关,进一步提示研究者依据处理后的精液密度加入合适的精液量。

综上所述,精液处理前各项参数对 IVF 结局无相关性,而处理后精子的各项参数与 IVF 结局有相关性,即精液处理后的正常形态率和精子活力对 IVF 受精率和卵裂率更具有评估价值,对选择合适的受精方式具有更重要指导意义,并依据处理后的精液密度加入合适的精液量,提高正常受精率。因此本课题组将会继续研究优化处理后精液各项参数与 IVF 结局的关系,深入探究优化处理后精液参数对 IVF 结局的影响,为临床提供更真实可靠的指导意义。

参考文献

- [1] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010: 2.
- [2] Bounartzis T, Dafopoulos K, Anifandis G, et al. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients[J]. Hum Fertil, 2016, 19(1): 56-62.
- [3] Cheng WX, Agbo C, Dahan MH. Comparison of pregnancy rates in pre-treatment male infertility and low total motile sperm count at insemination[J]. Arch Gynecol, 2016, 293(1): 211-217.
- [4] Luco SM, Agbo C, Behr B, et al. The evaluation of pre and post processing semen analysis parameters at the time of intrauterine insemination in couples diagnosed with male factor infertility and pregnancy rates based on stimulation agent. A retrospective cohort study[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014, 179(2): 159-162.
- [5] Tachawiwat K, Getpook C, Geater A. Comparison of hyaluronan binding assay scores of spermatozoa using swim-up techniques and density gradient centrifugation[J]. J Med Assoc Thai, 2015, 98 Suppl 2: S84-91.
- [6] Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, et al. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? [J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(1): 31-38.
- [7] Xue X, Wang WS, Shi JZ, et al. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients[J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(9): 1161-1166.
- [8] Ayşen Durmaz, Nurten Dikmen, Cumhuri Gündüz, et al. Fluctuation of "sperm DNA integrity" in accordance with semen parameters, and it's relationship with infertility [J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(12): 1665-1671.
- [9] Shi YC, Shen LY, Cheng HB, et al. Relationship of sperm morphology with the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer[J]. National Journal of Andrology, 2014, 20(8): 690-696.
- [10] Yang J, Gao X. Relationship between sperm acrosin hyaluronidase activity and conventional semen parameters[J]. J Med Res, 2010, 119(5): 705-708. (下转第 4532 页)

高,提示房颤心房肌成纤维细胞增殖活跃,胶原蛋白合成与分泌增加。心房组织纤维化过程既是心房损伤修复过程,也是心房组织适应新的生理病理状态的调节过程,这一过程涉及心房成纤维细胞和肌成纤维细胞肥大增生,合成分泌纤维网状胶原增加。国外大量研究也表明,心房组织纤维化是心房结构重构的重要机制^[6-8],本研究结果与国外报道一致。

既往国内外研究发现,TGF- β_1 细胞内信号转导与心房组织纤维化重构密切相关^[9-11]。TGF- β_1 能诱导人心房成纤维细胞 I 型胶原表达增加,动物实验发现,TGF- β_1 高表达导致小鼠心房间质纤维化加重。细胞实验发现,TGF- β_1 诱导心房成纤维细胞 I 型胶原表达增加,同时使 P-Smad2、Smad4 mRNA 和蛋白水平表达增加。本研究发现,TGF- β_1 无论在蛋白质翻译和基因转录水平的表达在 RHD-pAF 组明显增加,在 RHD-cAF 组更为显著。

本研究提示,风心病房颤发生机制与心房组织纤维化重构密切相关,I 型/III 型胶原网络重构在这一过程中发挥重要作用。综合国内外研究发现,TGF- β_1 过度表达可能是心房组织纤维化网络重构的分子机制之一,但 TGF- β_1 通过何种信号转导途径或如何介导心房间质纤维化的具体分子机制有待进一步基础与临床研究。

参考文献

- [1] Adeniran I, Maciver DH, Garratt CJ, et al. Effects of persistent atrial Fibrillation-Induced electrical remodeling on atrial Electro-Mechanics-insights from a 3D model of the human atria[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142397.
- [2] Jiao L, Yajuan Y, Chee YN, et al. Association of plasma transforming growth factor- β_1 levels and the risk of atrial fibrillation: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155275.
- [3] Lévy S, Sbragia P. Remodelling in atrial fibrillation[J]. Arch Mal Coeur Vaiss, 2005, 98(4): 308-312.
- [4] Allesie M, Ausma J, Electrical SU. Contractile and struc-

tural remodeling during atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 230-246.

- [5] Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling[J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 184-195.
- [6] Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, et al. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease[J]. Heart, 2004, 90(4): 400-405.
- [7] Paulus K, Gregory YL, Isabelle C, et al. Comprehensive risk reduction in patients with atrial fibrillation: emerging diagnostic and therapeutic options-a report from the 3rd Atrial Fibrillation Competence NETwork/European Heart Rhythm Association consensus conference[J]. Europace, 2012, 14(1): 8-27.
- [8] Trayanova NA. Mathematical approaches to understanding and imaging atrial fibrillation significance for mechanisms and management[J]. Circ Res, 2014, 114(9): 1516-1531.
- [9] Rahmutula D, Marcus GM, Wilson EE, et al. Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor-1[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(4): 769-779.
- [10] Cao HL, Zhou Q, Lan RF, et al. A functional polymorphism C-509T in TGF beta-1 promoter contributes to susceptibility and prognosis of lone atrial fibrillation in Chinese population[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112912.
- [11] Laura D, Jiawei J, Weijin S, et al. Mkk4 is a negative regulator of the transforming growth factor beta 1 signaling associated with atrial remodeling and arrhythmogenesis with age[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(2): e000340.

(收稿日期:2017-04-28 修回日期:2017-07-16)

(上接第 4528 页)

- [11] 王贺,周亮,石敏,等. 不育男性精子形态与体外受精妊娠结局的相关性研究[J]. 中国男科学杂志, 2012, 26(1): 23-26.
- [12] Li B, Ma YF, Huang JL, et al. Probing the effect of human normal sperm morphology rate on cycle outcomes and assisted reproductive methods selection [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113392.
- [13] 徐艳霞. 男性精液参数与体外受精-胚胎移植妊娠结局的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(11): 1505-1507.
- [14] 李晓晔,白晓红,宋学茹,等. 精子形态对体外受精胚胎移植妊娠结局的影响[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(1): 72-75.
- [15] Kashanian JA, Brannigan RE. Sperm morphology and reproductive outcomes: a perplexing relationship[J]. Fertil Steril, 2014, 102(6): 1561-1562.
- [16] 方丛,庄广伦,张敏芳,等. 精子形态对体外受精的影响作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(6): 367-369.
- [17] Cheng WX, Agbo C, Dahan MH. Comparison of pregnan-

cy rates in pre-treatment male infertility and low total motile sperm count at insemination[J]. Arch Gynecol Obstet, 2015, 293(1): 211-217.

- [18] Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion [J]. J Assist Reprod Genet, 2009, 26(11/12): 591-596.
- [19] Sivanarayana T, Krishna CR, Prakash GJ, et al. CASA derived human sperm abnormalities: correlation with chromatin packing and DNA fragmentation[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(12): 1327-1334.
- [20] Palomo MJ, Mogas T, Izquierdo D, et al. The influence of sperm concentration, length of the gamete co-culture and the evolution of different sperm parameters on the in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes[J]. Zygote, 2010, 18(4): 345-355.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-06-13)