

临床研究

DOI: 10.11699/cyxb20130927

精液常规参数对卵胞浆内单精子显微注射治疗结局的影响

高 洋¹, 黄国宁², 王亚平¹

(1. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究室、组织胚胎学教研室, 重庆 400016;

2. 重庆市妇幼保健院遗传与生殖研究所, 重庆 400013)

【摘要】目的:分析精液常规参数对卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)治疗结局的影响。**方法:**对 290 例 ICSI 治疗周期进行回顾性分析, 根据精子参数分为: A(精液常规正常和轻度异常)、B(严重少精)、C(严重弱精)、D(严重畸精)和 E(严重混合精子异常)5 组。比较各组的受精率、卵裂率、可移植胚胎率、优质胚胎率、着床率和妊娠率是否存在差异。**结果:**5 组的受精率、卵裂率、可移植胚胎率和优质胚胎率比较, 差异无统计学意义($\chi^2=1.27, P=0.87$; $\chi^2=1.34, P=0.86$; $\chi^2=0.56, P=0.97$; $\chi^2=1.39, P=0.85$)。D 组和 E 组的生化妊娠率、着床率和临床妊娠率均低于 A 组($\chi^2=12.1, P=0.00$; $\chi^2=10.15, P=0.00$; $\chi^2=10.78, P=0.00$; $\chi^2=9.90, P=0.00$; $\chi^2=8.13, P=0.00$; $\chi^2=11.78, P=0.00$)、B 组($\chi^2=6.04, P=0.01$; $\chi^2=7.79, P=0.01$; $\chi^2=7.21, P=0.01$; $\chi^2=4.29, P=0.04$; $\chi^2=5.63, P=0.02$; $\chi^2=7.21, P=0.01$)和 C 组($\chi^2=7.01, P=0.01$; $\chi^2=6.47, P=0.01$; $\chi^2=6.95, P=0.01$; $\chi^2=5.14, P=0.02$; $\chi^2=4.35, P=0.04$; $\chi^2=7.01, P=0.01$)。**结论:**不同参数的精子不影响 ICSI 治疗的受精结局和胚胎质量, 严重形态异常的精子行 ICSI 治疗后着床率和妊娠率降低。

【关键词】卵胞浆内单精子注射; 精子参数; 临床结局; 辅助生殖

【中国图书分类法分类号】R711.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-01

Effects of sperm parameters on outcomes of intracytoplasmic sperm injection

GAO Yang¹, HUANG Guoning², WANG Yaping¹

(1. Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Teaching and Research Section of Histology and Embryology, Chongqing Medical University; 2. Reproductive and Genetic Institute, Chongqing Health Center for Women and Children)

【Abstract】Objective: To evaluate the effects of sperm with different parameters on the outcomes of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Methods:** Totally 290 ICSI cycles were analyzed retrospectively. They were divided into 5 groups according to sperm parameters: group A (normal sperm forms or mild oligoastheno-teratozoospermia), group B (severe oligozoospermia), group C (severe astheno-teratozoospermia), group D (severe teratozoospermia), group E (severe oligoastheno-teratozoospermia). Fertilization rate, cleavage rate, transferable embryos rate, good quality embryos rate, implantation and pregnancy rates were compared between the groups. **Results:** Fertilization rate, cleavage rate, transferable embryos rate and good quality embryos rate were not significantly different among the 5 groups ($\chi^2=1.27, P=0.87$; $\chi^2=1.34, P=0.86$; $\chi^2=0.56, P=0.97$; $\chi^2=1.39, P=0.85$). The chemical pregnancy rate, embryo implantation rate and clinical pregnancy rate were lower in group D and E than in group A ($\chi^2=12.1, P=0.00$; $\chi^2=10.15, P=0.00$; $\chi^2=10.78, P=0.00$; $\chi^2=9.90, P=0.00$; $\chi^2=8.13, P=0.00$; $\chi^2=11.78, P=0.00$), B ($\chi^2=6.04, P=0.01$; $\chi^2=7.79, P=0.01$; $\chi^2=7.21, P=0.01$; $\chi^2=4.29, P=0.04$; $\chi^2=5.63, P=0.02$; $\chi^2=7.21, P=0.01$) and C ($\chi^2=7.01, P=0.01$; $\chi^2=6.47, P=0.01$; $\chi^2=6.95, P=0.01$; $\chi^2=5.14, P=0.02$; $\chi^2=4.35, P=0.04$; $\chi^2=7.01, P=0.01$). **Conclusions:** Sperms of different parameters used in ICSI treatment can not affect the fertilization rate. Severe teratozoospermia can reduce the implantation and pregnancy rates after ICSI treatment.

【Key words】intracytoplasmic sperm injection; sperm parameters; clinical outcomes; assisted reproduction

在不育症夫妇中, 男性因素约占 50%^[1]。卵胞浆内单精子显微注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 技术直接将精子注射到卵胞浆内, 是目前治疗男性不育的有效方法。但是, 不同参数的精子因浓度、活力和形态的差异可能具有不同的精子核成熟度、染色质或 DNA 完整性^[2-3], 因此精子质量是否影响 ICSI 治疗后的胚胎发育和妊娠结局已成为

tion, ICSI) 技术直接将精子注射到卵胞浆内, 是目前治疗男性不育的有效方法。但是, 不同参数的精子因浓度、活力和形态的差异可能具有不同的精子核成熟度、染色质或 DNA 完整性^[2-3], 因此精子质量是否影响 ICSI 治疗后的胚胎发育和妊娠结局已成为

作者介绍: 高 洋, Email: gao_yang_email@163.com,

研究方向: 人类辅助生育。

通信作者: 王亚平, Email: ypwangcq@yahoo.com.cn。

备受关注的问题。目前,已有许多研究报道了不同来源的精子不影响 ICSI 治疗结局^[4-6],有关新鲜精液质量与 ICSI 治疗结局的关系报道较少,且其结果仍具有争议^[7-8]。另外,精液常规参数作为判断男性生育能力的基本指标已在各临床检验实验室广泛开展应用,因此本研究通过比较几种临床常见的异常类型的精子行 ICSI 治疗后的受精结局、胚胎质量和妊娠结局是否存在差异,以评价精液常规参数对 ICSI 治疗结局的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组

收集 2012 年 1 月至 2012 年 12 月在本院接受 ICSI 治疗的不育夫妇 290 例作为研究对象。纳入标准:女方为单纯输卵管因素不育,获得成熟卵数 4 枚;男方取新鲜精液标本;排除无精症患者。参照 WHO 第 4 版男性不育诊疗手册根据精液常规参数分为 5 组^[9]。A 组:精液常规正常和轻度异常组 93 例,精子浓度 $\geq 5 \times 10^6$ 个/ml,前向运动精子 $\geq 10\%$,正常形态精子 $\geq 2\%$;B 组:严重少精组 38 例,精子浓度 $< 5 \times 10^6$ 个/ml,前向运动精子 $\geq 10\%$,正常形态精子 $\geq 2\%$;C 组:严重弱精组 45 例,前向运动精子 $< 10\%$,精子浓度 $\geq 5 \times 10^6$ 个/ml,正常形态精子 $\geq 2\%$;D 组:严重畸精组 44 例,正常形态精子 $< 2\%$,精子浓度 $\geq 5 \times 10^6$ 个/ml,前向运动精子 $\geq 10\%$;E 组:严重混合异常组 70 例,符合以下任意 2 个条件:精子浓度 $< 5 \times 10^6$ 个/ml,前向运动精子 $< 10\%$,正常形态精子 $< 2\%$ 。

1.2 方法

1.2.1 精液分析及处理 男方禁欲 2~7 d,于女方取卵当天收集精液至干净的取精杯内,室温放置 30 min 待其完全液化。混匀精液标本,采用双层密度梯度离心,按照 WHO 第 5 版人类精液检查与处理手册规定的方法进行精液分析^[10]。经优化后的精液放置 37 ℃,5%CO₂ 培养箱内孵育备用用于 ICSI。

1.2.2 控制性促排卵和卵子处理 采用常规促性腺激素释放激素类似物 α 长方案促排卵,发现女方有 3 个主导卵泡直径 ≥ 18 mm 时,当晚肌注人绒毛膜促性腺激素(human chori-

onic gonadotrophin,hCG)10 000 IU,36 h 后在阴道 B 超引导下穿刺取卵。将采集的卵子转入培养液中,置 37 ℃,5%CO₂ 培养箱内培养 2 h,拆去颗粒细胞,选取成熟卵用于 ICSI。

1.2.3 ICSI 授精与移植 采卵后 4~10 h 即女方注射 hCG 40~46 h,于 37 ℃,200 倍倒置显微镜下选择活动、形态正常的精子行 ICSI。经 ICSI 注射授精后的卵子放入 G1(Vitrolife, Sweden)培养液中培养。授精后 16~18 h 观察受精情况,出现 2 个原核(two pronucleus,2 PN)和第 2 极体(the 2nd polar body,2nd PB)为正常受精。授精 42 h 和 72 h 观察卵裂和胚胎发育情况。根据改良的 Dale 方法对胚胎进行评级^[11],D3 胚胎中卵裂球大小均匀,无碎片为 I 级胚胎;卵裂球大小略不均匀,碎片 $< 10\%$ 为 II 级胚胎;卵裂球大小不均匀,碎片 20%~30%为 III 级胚胎, I ~III 级胚胎定义为可移植胚胎,卵裂球数目 7~8 个的 I 级或 II 级胚胎为优质胚胎。取卵后 72 h 移植 1~3 个可移植胚胎,剩余的可移植胚胎行冷冻保存。

1.2.4 妊娠结局判断 胚胎移植后第 14 天检测尿 hCG 和血清 β -hCG。尿 hCG 阳性,血清 β -hCG > 25 mIU/ml 确定为生化妊娠;移植后第 28 天 B 超检查显示宫腔内孕囊及胎心管搏动者确诊为临床妊娠。

1.2.5 观察指标的计算 正常受精率=2 PN 受精胚胎数/成熟卵数 $\times 100\%$;卵裂率=2 PN 卵裂数/2 PN 受精胚胎数 $\times 100\%$;可移植胚胎率=可移植胚胎数/2 PN 卵裂数 $\times 100\%$;优质胚胎率=优质胚胎数/可移植胚胎数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

采用 STATA 10.0 统计软件进行数据分析。结果以均数标准差($\bar{x} \pm s$)或率(%)表示,组间均数比较采用方差分析,率的比较采用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况

总共入选的 290 例 ICSI 治疗周期的患者平均年龄为(30.07 $\pm$ 4.31)岁,平均不育时间为(6.08 $\pm$ 3.86)年。各组间平均年龄、平均不育时间、平均获卵数和获成熟卵率差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组患者的一般情况
Tab.1 General condition of patients in each group

组别	例数(n)	女方平均年龄 (岁)	平均不育时间 (年)	平均获卵数 (个)	获成熟卵率 (%)
A组	93	29.99 $\pm$ 4.51	6.12 $\pm$ 3.95	12.08 $\pm$ 4.44	89.84
B组	38	29.71 $\pm$ 3.81	6.24 $\pm$ 3.36	13.45 $\pm$ 4.91	91.38
C组	45	30.38 $\pm$ 3.98	6.27 $\pm$ 4.22	12.36 $\pm$ 5.92	91.36
D组	44	29.73 $\pm$ 4.88	6.16 $\pm$ 3.54	12.68 $\pm$ 5.59	88.88
E组	70	30.71 $\pm$ 4.19	5.77 $\pm$ 4.04	12.26 $\pm$ 4.83	89.62
F 值 χ^2 值		0.28	0.16	0.56	3.17
P 值		0.89	0.96	0.69	0.53

2.2 ICSI 治疗的实验室结局

各组正常受精率、卵裂率、可移植胚胎率和优质胚胎率差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表 2。

表 2 各组 ICSI 治疗的实验室结局比较
Tab.2 Laboratory outcomes of ICSI in each group

组别	正常受精率 (%)	卵裂率 (%)	可移植胚胎 率 (%)	优质胚胎率 (%)
A组	77.87	89.19	53.28	24.66
B组	79.65	87.90	52.90	21.39
C组	79.33	90.32	54.12	22.33
D组	77.77	88.57	51.90	24.85
E组	77.52	88.64	52.00	25.36
χ^2 值	1.27	1.34	0.56	1.39
P 值	0.87	0.86	0.97	0.85

2.3 ICSI 治疗的临床结局

研究对象中,244 例 ICSI 治疗周期进行了胚胎移植,总共移植胚胎 500 枚,生化妊娠率 70.91%,着床率 48.20%,临床妊娠率为 67.22%。未行移植病例中 42 例因防止发生卵巢过度刺激取消移植;4 例因无可移植胚胎取消胚胎移植,各组未移植胚胎所占比率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

D组严重畸精组和 E 组严重混合异常组的生化妊娠率、着床率和临床妊娠率均低于 A、B、C 组($P<0.05$);A、B、C 3 组间及 D、E 2 组间生化妊娠率、着床率和临床妊娠率差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 各组 ICSI 治疗的临床结局比较
Tab.3 Clinical outcomes of ICSI in all groups

组别	未移植胚胎 比率 (%)	生化妊娠率 (%)	着床率 (%)	临床妊娠率 (%)
A组	11.83	81.71	53.49	78.05
B组	13.16	78.79	57.36	78.79
C组	13.34	79.49	54.55	76.93
D组	22.73	50.00 ^a	33.34 ^a	47.06 ^a
E组	20.00	57.15 ^{ab}	39.32 ^{ab}	50.00 ^{ab}
χ^2 值	4.01	19.37	14.99	21.84
P 值	0.41	0.00	0.01	0.00

注:a, $P<0.05$,与 A、B、C 组比较;b, $P>0.05$,与 D 组比较

3 讨 论

随着 ICSI 技术的广泛运用,越来越多既往无法生育的严重精子异常的男性不育症患者通过这项辅助生殖技术获得了自己的后代。有文献报道男性精子质量的降低会影响体外受精的治疗结局^[12],但精子参数对 ICSI 治疗的受精率、胚胎发育和妊娠结局的影响尚无定论。Lu 等^[13]认为严重精子异常会降低受精率和胚胎质量;Tsai 等^[14]认为精子质量不会影

响 ICSI 治疗结局和子代健康,这些结论的不一致可能与研究对象的纳入标准、分组标准以及实验方法等差异有关。本研究在排除女方卵巢反应不良、多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症等影响因素,保证卵子质量基本一致的条件下,首次按照临床检查中常见的几种精液异常情况分为正常和轻度精子异常、严重少精、严重弱精、严重畸精和严重混合异常 5 组,探讨各组精子行 ICSI 的实验室和临床结局是否存在差异,以期为临床治疗提供咨询和预后信息。

本研究结果表明随着精子异常程度增加,受精率和卵裂率并没有明显下降。这可能是因为 ICSI 越过了常规受精过程中精子获能、顶体反应、与卵透明带识别黏附、卵胞膜融合等步骤,直接将精子注射入卵胞浆内完成受精,远远降低了对精子数量和活动率的要求。另一方面,由于 ICSI 仅需要几条活精子参与,面对不同参数异常类型的精液标本,操作者总是尽可能挑选形态相对正常的活动精子行 ICSI。有研究发现,中心体功能异常、DNA 碎片、染色体非整倍性精子在严重参数异常的精液中存在的比例更高^[3,14]。卵子可以对一定程度的精子损伤进行修复,当超过这个范围,则可能对胚胎发育潜能造成影响,但是本研究通过对不同精子质量行 ICSI 治疗后的实验室结局进行比较,发现各组的胚胎质量均无显著性差异。推测原因可能是受精卵和早期发育胚胎中的线粒体 DNA 几乎全部遗传自卵子的线粒体,因此人类胚胎发育的早期主要受母源性 m-RNA 的调控,父方因素在胚胎基因激活前即胚胎发育到约 8 细胞前对胚胎质量的影响都表现不明显,已有文献报道支持这一机制^[15-16]。

精子形态与 ICSI 结局的关系仍存在争议^[7,17],本研究结果显示严重畸精组和严重混合异常组的生化妊娠率、着床率和临床妊娠率均降低。在 200 倍光学显微镜的分辨率下挑选的精子可能存在头部空泡、中段异常等细微的形态异常,这些普通放大倍数显微镜下看似“正常”的异常精子在严重畸形的精子样本中所占的比例更大,ICSI 时选择到它们的几率更高,故 D 组和 E 组临床结局降低的原因可能与此相关。这些细微形态异常的精子可能还存在超微结构的异常,如头部存在空泡特别是顶体后区存在空泡的精子 DNA 碎片发生率更较高。有文献报道精子 DNA 碎片增加 10%,妊娠率降低,当 DNA 碎片增加 25% 以上,则很难有妊娠发生^[18]。因此,这些超微结构的异常可能最终影响胚胎着床^[19]。2003 年

Bartoov 等^[20]利用高倍光学显微镜和数码放大的原理,在 6 000 倍以上的放大倍数下对精子进行不染色、实时、高分辨的形态评估,同时筛选出精子头部空泡较少且顶体、颈部和尾部均正常的精子来进行 ICSI,并将该技术命名为形态选择性卵细胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection, IMSI)。近年来,已有研究报道了 IMSI 可以提高男性不育包括畸形精子症患者的临床妊娠结局^[20-22]。

综上所述,采用不同参数的精子行 ICSI 均能获得满意的受精结局,严重畸形的精子会降低 ICSI 治疗的着床率和妊娠率,对少数重度畸精症即精液样本中几乎缺乏正常形态精子的患者可以尝试通过 IMSI 技术提高其辅助生育的临床结局。

参 考 文 献

- [1] Jequier A M. Clinical andrology—still a major problem in the treatment of infertility[J]. Hum Reprod, 2004, 19(6): 1245–1249.
- [2] Kobayashi H, Sato A, Otsu E, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(21): 2542–2551.
- [3] Zheng J J, Yang X, Zhang L Y, et al. Sperm DNA damage and sperm–nucleoprotein transition correlate to acrosin activity and seminal parameters [J]. National Journal of Andrology, 2012, 18(10): 925–929.
- [4] 倪运萍, 陈士岭, 王庆玲, 等. 不同参数不同来源精子行 ICSI 治疗后临床结局及出生缺陷的初步分析[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 957–959.
- Ni Y P, Chen S L, Wang Q L, et al. Clinical outcomes and birth defects resulting from intracytoplasmic sperm injection using sperms of different origins and parameters[J]. Journal of South Medical University, 2010, 30(5): 957–959.
- [5] 谭巧, 刘能辉, 李艳萍, 等. 不同精子来源及参数对卵胞浆内单精子注射术结局的影响[J]. 中南大学学报, 2011, 36(2): 149–153.
- Tan Q, Liu N H, Li Y P, et al. Impact of sperm source and parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection[J]. Journal of Central South University, 2011, 36(2): 149–153.
- [6] Tsai C C, Huang F J, Wang L J, et al. Clinical outcomes and development of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using extracted testicular sperm or ejaculated extreme severe oligo–astheno–teratozoospermia sperm: a comparative study[J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 567–571.
- [7] French D B, Sabanegh E S Jr, Goldfarb J, et al. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? [J]. Fertil Steril, 2010, 93(4): 1097–1103.
- [8] Hashimoto H, Ishikawa T, Goto S, et al. The effects of severity of oligozoospermia on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycle outcome[J]. Syst Biol Reprod Med, 2010, 56(1): 91–95.
- [9] World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 4.
- [10] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [M]. 5th ed. WHO Press, 2010: 223–226.
- [11] Dale B, Elder K. In Vitro Fertilization [M]. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997: 115–116.
- [12] Chocat A, Creveuil C, Galeraud–Denis I, et al. Predictive value of non–automated spermiatic parameters and automated kinetic parameters on cleavage rate in fertilization in vitro [J]. Gynecol Obstet Fertil, 2001, 29(4): 301–307.
- [13] Lu Y H, Gao H J, Li B J, et al. Different sperm sources and parameters can influence intracytoplasmic sperm injection outcomes before embryo implantation [J]. J Zhejiang Uni Sci B, 2012, 13(1): 1–10.
- [14] Derjick A A, van der Heijden G W, Ramos L, et al. Motile human normozoospermic and oligozoospermic semen samples show a difference in double–strand DNA break incidence [J]. Hum Reprod, 2007, 22(9): 2368–2376.
- [15] Tesarik J, Greco E, Mendoza C, et al. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation [J]. Hum Reprod, 2004, 19(3): 611–615.
- [16] Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo [J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(3): 370–375.
- [17] Berger D S, Abdelhazef F, Russell H, et al. Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology, embryonic cleavage and compaction [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9(1): 37.
- [18] Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology [J]. Reprod Biomed Online, 2003, 7(4): 477–484.
- [19] Falagario D, Bruculeri A M, Depalo R, et al. Sperm head vacuolization affects clinical outcome in ICSI cycle: a proposal of a cut–off value [J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(11): 1281–1287.
- [20] Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection [J]. Fertil Steril, 2003, 80(6): 1413–1419.
- [21] Souza S A, Ferreira R C, Paes de Almeida F B D, et al. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta–analysis [J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(4): 450–455.
- [22] Katja K, Tomaz T, Branko Z, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients [J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(2): 168–179.

(责任编辑: 冉明会)