

• 论 著 •

Pureception™ 密度梯度离心法优选精子在夫精人工授精中的应用评价*

黄娟华, 梁晓丽, 万小妍, 蒙思颖, 黄永汉, 黄雪坤, 刘 霓

(广东省佛山市第一人民医院妇产科生殖医学中心, 广东佛山 528000)

摘 要:目的 探讨 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子在夫精人工授精(AIH)中的应用价值。方法 采用 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子,应用于 672 对不孕夫妇的 1 360 个 AIH 周期治疗。结果 经 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子后,精子浓度由 $(54.86 \pm 26.03) \times 10^6/\text{mL}$ 提高到 $(63.89 \pm 34.40) \times 10^6/\text{mL}$ 、前向运动(PR)精子百分比由 $(32.47 \pm 9.31)\%$ 提高到 $(69.78 \pm 5.10)\%$,其差异均具统计学意义($P < 0.05$)。PR 精子回收率为 $(34.08 \pm 3.95)\%$ 。672 对不孕夫妇共进行 1 360 个 AIH 周期,周期临床妊娠率 16.62% (226/1 360)。优选精子前根据精子浓度分为 3 组: $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ 组(I 组)、 $(\geq 10, < 15) \times 10^6/\text{mL}$ 组(II 组)、 $< 10 \times 10^6/\text{mL}$ 组(III 组),临床妊娠率分别为 17.13%、16.05%、4.26%,III 组明显低于其他 2 组($P < 0.05$);根据 PR 精子百分比分为 3 组: $\geq 32\%$ 组(A 组)、 $(\geq 10, < 32)\%$ 组(B 组)、 $< 10\%$ 组(C 组),临床妊娠率分别为 17.53%、16.55%、4.65%,C 组明显低于其他 2 组($P < 0.05$)。优选精子后根据 PR 精子总数分为两组: $\geq 10 \times 10^6$ 组、 $< 10 \times 10^6$ 组,临床妊娠率分别为 17.33%、10.22%,两组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Pureception™ 密度梯度离心法是一种较好的精子优选方法,应用于 AIH 可获得较为满意的临床妊娠率。优选精子前精子浓度 $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ 、PR 精子 $\geq 10\%$ 、及优选精子后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$,可获得较理想的临床妊娠率。

关键词: Pureception™; 精子优选; 夫精人工授精

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)14-1979-03

The application of Pureception™ gradient centrifugation technique for sperm separation in artificial insemination by husband*

Huang Juanhua, Liang Xiaoli, Wan Xiaoyan, Meng Siying, Huang Yonghan, Huang Xuekun, Liu Ni

(Center of Reproductive Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics, the First People's

Hospital of Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: **Objective** To probe into the application of Pureception™ gradient centrifugation technique for sperm separation in artificial insemination by husband (AIH). **Methods** Prepare the semen by Pureception™ gradient centrifugation technique, and used for 1360 AIH cycles in 672 infertile couples. **Results** After preparing the semen by Pureception™ gradient centrifugation technique, the sperm concentration was increased from $(54.86 \pm 26.03) \times 10^6/\text{mL}$ to $(63.89 \pm 34.40) \times 10^6/\text{mL}$, the rate of PR sperm was increased from $(32.47 \pm 9.31)\%$ to $(69.78 \pm 5.10)\%$, the differences were both statistically significant ($P < 0.05$). the recovery rate of PR sperm was $(34.08 \pm 3.95)\%$. 672 infertile couples received 1360 AIH cycles, and the clinical pregnancy rate was 16.62% (226/1360). According to the sperm concentration before preparing the semen, the cycles were divided into 3 groups: $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ (Group I), $(\geq 10, < 15) \times 10^6/\text{mL}$ (Group II) and $< 10 \times 10^6/\text{mL}$ (Group III), the clinical pregnancy rates were 17.13%, 16.05% and 4.26%, respectively, Group III was significantly lower than the other two groups ($P < 0.05$); According to the rate of PR sperm, the cycles were divided into 3 groups: $\geq 32\%$ (Group A), $(\geq 10, < 32)\%$ (Group B) and $< 10\%$ (Group C), the clinical pregnancy rates were 17.53%, 16.55% and 4.65%, respectively, Group C was significantly lower than the other two groups ($P < 0.05$). According to the number of PR sperm after preparing the semen, the cycles were divided into 2 groups: $\geq 10 \times 10^6$ and $< 10 \times 10^6$, the clinical pregnancy rates were 17.33% and 10.22%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Pureception™ gradient centrifugation technique is a better way for sperm separation, and the clinical pregnancy rate is satisfactory when it is used in AIH. When the sperm concentration is $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ and the rate of PR sperm is $\geq 10\%$ before preparing the semen, and the number of PR sperm is $\geq 10 \times 10^6$ after preparing the semen, patients will get a more ideal pregnancy rate.

Key words: pureception™; sperm separation; artificial insemination by husband (AIH)

夫精人工授精(AIH)作为人类辅助生殖技术的重要组成部分,由于具有操作简单、费用低、并发症少、可重复性强等优点,一直以来被广泛应用于不孕症的治疗,而优选精子是 AIH 的重要环节,优选后的精子质量直接影响着 AIH 的成功率^[1]。目前临床上用于优选精子的方法很多,为了探讨 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子在 AIH 中的应用价值,作者回顾了 2011 年 7 月至 2014 年 6 月间采用 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子,并应用于 672 对不孕夫妇 1 360 个

AIH 周期治疗的情况,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 672 对不孕夫妇均为本院生殖医学中心门诊求诊者,在 2011 年 7 月至 2014 年 6 月间共进行 1 360 个 AIH 周期。其中原发不孕 872 周期,继发不孕 488 周期,男方年龄 23~48 岁,女方年龄 22~45 岁,不孕年限 1~15 年。进入 AIH 周期的患者具有 AIH 适应症并排除禁忌症,男女双方均进行 AIH 术前常规检查,且结果正常,男方检查项目为精液常

* 基金项目:2012 年广东省佛山市医学类科技攻关项目(201208004)。 作者简介:黄娟华,女,副主任技师,主要从事辅助生殖实验室工作。

规分析两次、精液白细胞检测、精子膜抗体混合抗球蛋白试验、UU、CT、抗 HIV、淋菌、梅毒抗体等；女方检查项目为性激素六项、STD+BV、UU、CT、抗 HIV、梅毒抗体、淋菌、抗精子抗体、抗子宫内膜抗体、LCT、盆腔超声、输卵管通畅检查等。

1.2 方法

1.2.1 AIH 周期治疗 所有患者根据月经周期第 3~5 天的性激素水平与既往病情选择自然周期或促排卵周期的宫腔内人工授精方案^[2]。采用阴道 B 超监测卵泡发育与子宫内膜情况,在卵泡直径 14 mm 左右开始监测 LH 峰的出现(检测尿/血 LH 水平),出现血或尿 LH 峰后 24~48 h 行 AIH;如果优势卵泡直径达 18 mm 时,未出现 LH 峰,可注射 HCG 5 000~10 000 IU,并于注射后 24~48 h 行 AIH。AIH 术当天男方取精,精液经精子优选后行宫腔内人工授精术。AIH 术后进行黄体支持,术后 14~16 d 确认生化妊娠,5 周 B 超确认临床妊娠,如发现多胎妊娠必须到具有选择性减胎术条件的机构行选择性减胎术。

1.2.2 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子 制备梯度离心管:在 15 mL 锥形离心管中先后加入 Pureception™ 密度梯度液,上层为 1 mL 的 40% Upper Phase,下层为 1 mL 的 80% Lower Phase,注意形成界面。每份精液按每支梯度离心管放约 1 mL 精液的原则准备 1~4 支梯度离心管,置培养箱预温备用。准备精子冲洗管:用 2 支 15 mL 锥形离心管按约 5 mL/支的量准备,置培养箱预温备用。男方采用手淫法取精,待精液完全液化后混匀,先取少许作精液常规分析,再按约 1 mL/支的量缓缓加入梯度离心管的 40% Upper Phase 梯度液上方,注意形成界面,以 300 g 离心 20 min 后弃上清液,余少量液体及沉淀团混匀,移入精子冲洗管内并混匀,以 200 g 离心 5 min 后弃上清液,余少量液体及沉淀团混匀,再移入另一支精子冲洗管内并混匀,以 200 g 离心 5 min 后弃上清液,余约 0.5 mL 液体及沉淀团,混匀后移至小试管备用宫腔内人工授精术,并取少许作精液常规分析,计算前向运动(PR)精子回收率,其计算公式为:[(处理后精液体积×精子浓度×PR 精子百分比)/(处理前精液体积×精子浓度×精子百分比)]×100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行比较,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 1 360 份精液经 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子后,圆细胞及细胞碎片等非精子成分镜下观察明显减少,精子浓度、PR 精子百分比均明显提高,具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。PR 精子回收率为(34.08±3.95)%,周期临床妊娠率 16.62%。

表 1 优选精子前后精子浓度与 PR 精子百分比(%)比较			
项目	优选前	优选后	<i>P</i>
精子浓度(×10 ⁶ /mL)	54.86±26.03	63.89±34.40	<0.05
PR 精子百分比(%)	32.47±9.31	69.78±5.10	<0.05

2.2 1 360 份精液优选精子前根据精子浓度分为以下 3 组 $\geq 15 \times 10^6$ /mL 组(Ⅰ组)、($\geq 10, < 15$) $\times 10^6$ /mL 组(Ⅱ组)、 $< 10 \times 10^6$ /mL 组(Ⅲ组),临床妊娠率分别为 17.13%、16.05%、4.26%,Ⅰ组与Ⅱ组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),Ⅲ组均明显低于Ⅰ组、Ⅱ组($P < 0.05$),见表 2;根据 PR 精子百分比分为以下 3 组: $\geq 32\%$ 组(A组)、($\geq 10, < 32$)%组(B组)、 $< 10\%$ 组(C组),临床妊娠率分别为 17.53%、16.55%、4.65%,A 组与 B 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),C 组均

明显低于 A 组、B 组($P < 0.05$),见表 3。以上分组均参考《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第 5 版)》。

表 2 优选精子前精子浓度的分组与各组间临床妊娠率的比较

组别	精子浓度 (×10 ⁶ /mL)	周期 数	构成比(%) (周期数/总周期数)	临床妊 娠数	临床妊娠率(%) (临床妊娠数/周期数)
Ⅰ组	≥ 15	1232	90.59	211	17.13*
Ⅱ组	$\geq 10, < 15$	81	5.96	13	16.05△
Ⅲ组	< 10	47	3.45	2	4.26#
合计		1 360	100.00	226	16.62

*: $P > 0.05$,与Ⅱ组比较;△: $P < 0.05$,与Ⅲ组比较;#: $P < 0.05$,与Ⅰ组比较。

表 3 优选精子前 PR 精子百分比的分组与各组间临床妊娠率的比较

组别	分组 (PR,%)	周期 数	构成比(%) (周期数/总周期数)	临床妊 娠数	临床妊娠率(%) (临床妊娠数/周期数)
A 组	≥ 32	616	45.29	108	17.53
B 组	$\geq 10, < 32$	701	51.55	116	16.55
C 组	< 10	43	3.16	2	4.65*
合计		1 360	100.00	226	16.62

*: $P < 0.05$,与 A、B 组比较。

2.3 1 360 份精液优选精子后根据 PR 精子总数分为以下两组: $\geq 10 \times 10^6$ 组、 $< 10 \times 10^6$ 组,临床妊娠率分别为:17.33%、10.22%,两组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 4 优选精子后 PR 精子总数的分组与各组间临床妊娠率的比较

组别(PR 精 子总数,×10 ⁶)	周期 数	构成比(%) (周期数/总周期数)	临床 妊娠数	临床妊娠率(%) (临床妊娠数/周期数)
≥ 10	1223	89.93	212	17.33*
< 10	137	10.07	14	10.22
合计	1 360	100.00	226	16.62

*: $P < 0.05$,与 $< 10 \times 10^6$ 组组比较。

3 讨 论

目前常用的精子优选方法有简单的洗涤法、上游法、密度梯度离心法等,有研究表明,密度梯度离心法的 PR 精子回收率($> 20\%$)一般高于上游法($< 20\%$),而且可以更快速、有效地去除精浆中影响精子质量的有害成分^[3-4]。而用于密度梯度离心法的介质培养基是精子在体外孵育、筛选的主要环境,直接影响到精子的质量与 AIH 的成功率,有研究显示,Pureception™ 密度梯度离心法优选精子后精子密度、活率、畸形精子率得到明显改善,应用于 AIH 可获得较满意的妊娠率^[5]。本研究采用 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子,应用于 672 对不孕夫妇 1 360 个 AIH 周期治疗,结果显示,优选精子后,精子浓度、PR 精子百分比均明显提高,具有统计学意义($P < 0.05$),PR 精子回收率为(34.08±3.95)%,周期临床妊娠率 16.62%,说明 Pureception™ 密度梯度离心法优选精子具有较好的精子分离效果及 PR 精子回收率,应用于 AIH 可获得满意的临床妊娠率。

精子浓度、PR 精子百分比与正常形态率作为是目前评估男性生育力最基本、最常用的指标,也是 ART 方案选择的重要依据,且与临床妊娠率密切相关^[6]。《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第 5 版)》发布了各项参数的最新正常参考值,如何摸索出新的阈值来指导选择适当的 ART 方案,

以获得更好的临床妊娠率,是目前亟待解决的问题。本研究结果显示,优选精子前根据精子浓度分为 3 组: $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ 组(I 组)、 $(\geq 10, < 15) \times 10^6/\text{mL}$ 组(II 组)、 $< 10 \times 10^6/\text{mL}$ 组(III 组),临床妊娠率分别为 17.13%、16.05%、4.26%,III 组均明显低于 I 组、II 组($P < 0.05$);根据 PR 精子百分比分为 3 组: $\geq 32\%$ 组(A 组)、 $(\geq 10, < 32)\%$ 组(B 组)、 $< 10\%$ 组(C 组),临床妊娠率分别为 17.53%、16.55%、4.65%,C 组均明显低于 A 组、B 组($P < 0.05$)。因此,笔者认为,AIH 周期优选精子前精子浓度 $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ 、PR 精子 $\geq 10\%$,可获得较理想的临床妊娠率,遵循首先考虑相对简单、风险较小的技术的 ART 治疗方案选择原则,从男方因素方面考虑,以上情况可优先考虑 AIH 方案。本研究在精子正常形态率方面缺乏完整数据,有待进一步探讨分析。

多项研究表明,AIH 周期精子优选后 PR 精子总数可作为重要参数应用于预测 AIH 临床妊娠率,处理后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$ 可获得较高的临床妊娠率^[7-8]。本研究优选精子后根据 PR 精子总数分为 2 组: $\geq 10 \times 10^6$ 组、 $< 10 \times 10^6$ 组,临床妊娠率分别为 17.33%、10.22%,两组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$),结果与以上研究相符^[9-10]。因此,笔者认为,AIH 周期优选精子后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$,可获得较理想的临床妊娠率。

综上所述,Pureception™ 密度梯度离心法是一种较好的精子优选方法,应用于 AIH 可获得较满意的临床妊娠率。优选精子前精子浓度 $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ 、PR 精子 $\geq 10\%$,及优选精子后 PR 精子总数 $\geq 10 \times 10^6$,可获得较理想的临床妊娠率。

参考文献

[1] 中华医学会编著. 辅助生殖技术与精子库分册:临床诊疗指南

(上接第 1978 页)

McIntyre 等^[5]研究发现,基因 PIK3CA 外显子 9 和 20 的多个突变与宫颈癌的总生存率紧密相关。PI3K 在 SCC 组的表达与患者预后关系的研究,国内少见报道。本研究结果显示,PI3K 阳性表达患者的生存率低于阴性表达患者,但未达统计学差异。PI3K 表达与宫颈鳞癌患者预后的关系,有待于更广泛深入的研究探讨。

参考文献

- [1] Shukla S, MacLennan GT, Hartman DJ, et al. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion[J]. Int J Cancer, 2007, 121(14): 1424-1432.
- [2] Zhang L, Yang N, Katsaros D, et al. The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(40): 4225-4231.
- [3] Ma YY, Wei SJ, Lin YC, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(23): 2739-2744.
- [4] Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 99-102.
- [5] 乐杰. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 261-268.
- [6] 杨大志, 姬长友. PI3K、p-Akt 蛋白在喉鳞癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 935-937.
- [7] 江忠清, 连成瑛, 林岷, 等. 宫颈鳞癌组织埃兹蛋白表达与局部浸润转移及预后的关系[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2007, 6(3): 308-312.

[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 60-63.

- [2] 庄广伦主编. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 132-147.
- [3] 世界卫生组织著; 谷翊群, 陈振文, 卢文红等译. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第 5 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 135-141.
- [4] Allamaneni SS, Agarwal A, Rama S, et al. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa[J]. Asian Androl, 2005, 7(1): 86-92.
- [5] 柴铭铭, 凌国灿, 周建萍. 促排卵联合 Pureception™ 密度梯度法优选精子在 AIH 中的应用[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2013, 10(2): 38-41.
- [6] 黄娟华, 刘炜培, 张四友, 等. Pureception™ 密度梯度离心法优选精子在 IVF、ICSI 中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(20): 3183-3185.
- [7] 滕晓明, 韩毅冰, 黄文强, 等. 男性不育的辅助生殖技术治疗[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2012, 31(5): 378-380.
- [8] Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination[J]. Fertil Steril, 2009, 91(3): 777-781.
- [9] 苏宁, 王维, 何燕, 等. 精液参数对宫腔内人工授精妊娠率的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23): 3154-3157.
- [10] 张科, 范立青, 刘薇, 等. 活动精子总数、精子形态与宫腔内人工授精妊娠率的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(19): 2254-2257.

(收稿日期: 2015-02-28)

- [8] 林岷, 江忠清, 朱凤川, 等. 宫颈癌 CD44v6 表达与局部肿瘤血管生成、癌细胞增殖及浸润转移的关系[J]. 福建医科大学学报, 2005, 39(1): 41-44.
- [9] Vivanco L, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 7(2): 489-501.
- [10] Park YH, Jung HH, Ahn JS, et al. Statin induces inhibition of triple negative breast cancer (TNBC) cells via PI3K pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(2): 275-279.
- [11] Yarbrough WG, Whigham A, Brown B, et al. Phosphoinositide kinase-3 status associated with presence or absence of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 69(2): 98-101.
- [12] Harris CP, Lu XY, Narayan G, et al. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2003, 36(3): 233-241.
- [13] Knuefermann C, Lu Y, Liu B, et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells[J]. Oncogene, 2003, 22(21): 3205-3212.
- [14] Rincon-Arango H, Rosales R, Mora N, et al. R-Ras promotes tumor growth of cervical epithelial cells[J]. Cancer, 2003, 97(3): 575-585.
- [15] McIntyre JB, Wu JS, Craighead PS, et al. PIK3CA mutational status and overall survival in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy[J]. Gynecol Oncol, 2013, 128(3): 409-414.

(收稿日期: 2015-03-15)