

• 论 著 •

精子 DNA 碎片率与精子核蛋白不成熟度检测在体外受精治疗中的应用研究^{*}

刘树沅, 韦剑洪, 霍骏业, 赖瑜琪

(广东省中山市博爱医院生殖中心 528403)

摘要:目的 探讨精子 DNA 碎片率及精子核蛋白不成熟度检测在体外受精(IVF)治疗中的应用价值。方法 选择 2015 年 3 月至 2016 年 2 月于本院接受 IVF 治疗的不育症患者 102 例,进行精液常规分析、精子核蛋白不成熟度及精子 DNA 碎片率检测,分析精子核蛋白不成熟度和精子 DNA 碎片率与精子质量分析参数、IVF 受精率及优胚率等的相关性。结果 精子 DNA 碎片率与 IVF 优胚率、精子活力呈负相关($P < 0.05$),与 IVF 受精率无相关性($P > 0.05$);精子核蛋白不成熟度与 IVF 优胚率、IVF 受精率无相关性($P > 0.05$),与精子浓度呈负相关($P < 0.05$)。结论 精子 DNA 碎片率与 IVF 优胚率密切相关,对不育症患者 IVF 治疗结局具有重要的预测价值。

关键词:体外受精; 优胚率; 精子 DNA 损伤; 精子核蛋白不成熟度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1452-03

Application of nucleoprotein immature sperm percentage and sperm DNA damage rate detection in in vitro fertilization^{*}

LIU Shuyuan, WEI Jianhong, HUO Junye, LAI Yuqi

(Reproductive Medical Center, Boai Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application value of sperm nucleoprotein immaturity and sperm DNA damage detection in in vitro fertilization(IVF). **Methods** From Mar. 2015 to Feb. 2016, routine sperm analysis, sperm nucleoprotein immaturity and sperm DNA damage detection were performed in 102 patients with infertility, and the correlation between these parameters were analyzed. **Results** Sperm DNA fragmentation rate was negatively correlated with IVF optimal embryos rate and sperm viability($P < 0.05$), while was not correlated with IVF fertility rate($P > 0.05$). Sperm nucleoprotein immaturity rate was not correlated with IVF optimal embryos rate and fertility rate($P > 0.05$), while was negatively correlated with sperm concentration($P < 0.05$). **Conclusion** Sperm DNA fragmentation rate could be closely correlated with IVF optimal embryos rate, which might be with prediction value in IVF treatment.

Key words: in vitro fertilization; optimal embryo rate; sperm DNA damage; sperm nucleoprotein immaturity rate

精液常规检查是体外受精(IVF)治疗前评估男性生育能力的基本方法,可获得精子浓度、精浆性状、正常精子百分率及前向运动精子百分率等相关指标的基本数据,但无法以此数据准确预测 IVF 优胚率^[1]。因此,有必要研究对 IVF 优胚率具有一定预测意义的检查项目,以准确评估 IVF 治疗效果。本研究分析了精子 DNA 碎片率及核蛋白不成熟度与 IVF 优胚率的相关性,探讨二者对 IVF 治疗效果的预测价值。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择 2015 年 3 月至 2016 年 2 月于本院接受 IVF 治疗的不育症男性患者 102 例。纳入标准:配偶年龄小于或等于 38 岁;配偶卵泡刺激素(FSH)水平小于或等于 10 IU/L;配偶获得卵子个数为 7~16 个;配偶不成熟卵子个数小于或等于 3 个。排除标准:严重弱精子症患者;配偶合并免疫性不孕症、子宫内膜异位症、子宫内膜病变或输卵管积水。患者年龄 30~49 岁,平均(32.63±1.54)岁。根据精子 DNA 碎片指数(DFI)水平将患者分为 A 组、B 组。精子 DFI≥15% 纳入 A 组,精子 DFI<15% 纳入 B 组。102 例男性患者配偶同时纳入本研究,以分析 IVF 受精率。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与处理 配偶取卵当日,患者通过手淫法采集精液标本,置无毒、无菌容器中,待精液完全液化后充分混匀,分成 2 份,1 份用于精液常规检查及精子 DNA 碎片和精子核蛋白不成熟度检测,另 1 份用于 IVF 治疗授精。精液常规检查采用计算机辅助精液分析系统(CASA 分析系统),采用 Diff-quick 染色法分析精子形态。检查指标包括精子浓度、精子活力及正常形态精子百分率。其中,精子活力=(前向运动精子数+非前向运动精子数)/计数精子总数×100%。正常形态精子百分率=正常形态精子数/计数精子总数×100%。

1.2.2 优选精子和授精 采用密度梯度离心法进行精子优选。向 15 mL 锥形离心管底部依次加入浓度为 80% 和 40% 的 SpermGrad 精子梯度分离液各 1 mL,注意界面清晰,最上层加入液化精液,2 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,将沉淀移入 3 mL G-IVF 洗精受精液中,混匀,1 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,将底部沉淀转入含 1 mL G-IVF 洗精受精液的小试管底部,倾斜放置,采用常规 IVF 方法进行授精。

1.2.3 精子 DNA 碎片检测 采用精子核染色质发散法(SCD)进行精子 DNA 碎片检测。采用磷酸盐缓冲液或培养液

^{*} 基金项目:2015 年广东省中山市科技计划项目(2015B1170)。

作者简介:刘树沅,男,主管技师,主要从事辅助生殖及生殖医学实验研究。

将精液标本稀释至精子浓度 $(5\sim10)\times10^6/\text{mL}$;将浓度为 1% 的低熔点琼脂凝胶置 90~100 ℃ 水浴箱中,溶解 5 min,置 37 ℃ 恒温箱中放置 5 min。吸取 20 μL 精液,与 1% 低熔点琼脂凝胶混匀,37 ℃ 孵育;吸取混合液 18 μL ,滴于经 0.65% 正常熔点琼脂凝胶处理过的载玻片上,盖上盖玻片,4 ℃ 放置 5 min,经精子变性裂解、脱水和染色处理后,显微镜观察计数 500 个精子。中晕环、大晕环精子均判为正常精子;无晕环、小晕环或退化精子均判为有碎片异常精子。精子 DNA 碎片率=存在 DNA 碎片精子数/计数精子总数 $\times100\%$ 。

1.2.4 精子核蛋白不成熟度检测 采用深圳博锐德生物科技有限公司试剂进行精子核蛋白不成熟度检测。操作步骤严格参照试剂说明书。选择 100 倍光学显微镜观察至少 200 个精子。染色为紫蓝色或紫色的精子均判为核蛋白不成熟精子;染为红色的精子判为核蛋白成熟精子。精子核蛋白不成熟度=核蛋白不成熟精子数/计数精子总数 $\times100\%$ 。

1.2.5 观察指标 采用常规 IVF 方法进行授精后,计算受精率、可利用胚胎率和优质胚胎率(简称优胚率)。受精率=受精卵子数/获卵数 $\times100\%$;可利用胚胎率=D3 卵裂期 4 细胞 I 级及以上胚胎数/2PN 受精卵数 $\times100\%$;优胚率=优质胚胎数/2PN 受精卵数 $\times100\%$,优质胚胎指 D3 评分为 7 I、7 II、8 I、8 II、9 I 或 9 II 的胚胎。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用卡方检验;相关性分析采用 Spearman 相关分析。显著性检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为比较差异或统计参数有统计学意义。

2 结 果

2.1 精液常规检查结果 B 组患者精液质量优于 A 组,精子浓度、精子活力及正常形态精子百分率组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 精液常规检查结果组间比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	精子浓度 ($\times10^6/\text{mL}$)	精子活力(%)	正常形态精子 百分率(%)
A 组	33.5 $\pm$ 30.5	37.9 $\pm$ 17.5	3.6 $\pm$ 3.4
B 组	59.6 $\pm$ 36.5*	57.8 $\pm$ 14.8*	4.5 $\pm$ 3.8*

注:与 A 组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 卵子受精及胚胎发育结果 B 组受精率、可利用胚胎率高于 A 组,但组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),B 组优胚率高于 A 组,且比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 卵子受精及胚胎发育结果组间比较(%, $\bar{x}\pm s$)			
组别	受精率	可利用胚胎率	优质胚胎率
A 组	69.8 $\pm$ 8.9	69.8 $\pm$ 18.5	45.2 $\pm$ 10.5
B 组	71.6 $\pm$ 7.9	72.6 $\pm$ 16.6	53.6 $\pm$ 10.8*

注:与 A 组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 相关性分析结果 102 例不育症患者分析结果显示,精子 DNA 碎片率与 IVF 受精率无相关性($P>0.05$),与精子活力、优胚率呈负相关($P<0.05$),见表 3;精子核蛋白不成熟度与精子浓度呈负相关($P<0.05$),与优胚率、IVF 受精率无相关性($P>0.05$),见表 4。

表 3 精子 DNA 碎片率与 IVF 受精率、精子活力、 优胚率的相关性		
参数	相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i>
IVF 受精率	-0.016	0.875
精子活力	-0.220	0.009
优胚率	-0.220	0.009

表 4 精子核蛋白不成熟度与精子浓度、IVF 受精率、 优胚率的相关性		
参数	相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i>
精子浓度	-0.318	0.000
IVF 受精率	-0.003	0.960
优胚率	0.136	0.110

3 讨 论

不育症患者精液检查方法以精液常规分析为主,分析参数包括精液体积、精液 pH 值、精子浓度、正常形态精子百分率、精子活力等,可在一定程度上判断患者精子质量。但有研究显示,检查人员主观性、精液质量波动性等因素均影响精液常规分析结果,进而影响分析结果的可靠性^[2]。由于精液常规分析在精子质量评价方面还存在一定局限性,因此研究其他能够反映不育症患者精子质量的相关参数具有重要的临床意义。本研究主要分析了 DNA 碎片率、精子核蛋白不成熟度与受精率、优胚率等 IVF 效果评价指标的相关性,旨在为不育症患者诊断及 IVF 治疗结果评价提供更多的参考依据。

有研究显示,精子 DNA 碎片率是反映精子 DNA 损伤情况的重要指标,可反映不育症患者精子质量,可用于男性生育力的客观评估,以及 IVF 治疗结局预测^[3]。与传统的精液常规分析相比,精子 DNA 碎片率是更为理想的男性生育能力评价指标,这是因为:(1)同一份精液标本精子 DNA 碎片率检查结果变异系数小于 5%;(2)同一对象精子 DNA 碎片率检查结果变异系数较小,可减少检查次数;(3)精子 DNA 碎片率可更好地评价男性生殖能力,碎片率高者受精能力低。因此,精子 DNA 碎片率检测在预测 IVF 治疗结局方面具有重要意义。

精子 DNA 碎片率可直接反映精子 DNA 完整性,是评估精子 DNA 损伤程度的重要指标^[4-5]。目前常用的精子 DNA 碎片率检测方法包括精子染色质结构检测法、精子染色质分散试验法等^[6]。本研究结果显示,不孕症患者精子 DNA 碎片率与 IVF 优胚率呈负相关($P<0.05$),与受精率则无相关性($P>0.05$)。有研究显示,正常男性年龄与精子 DNA 碎片率无相关性,说明年龄对精子 DNA 碎片率检测结果没有影响^[7-8]。另有研究证实,精子 DNA 碎片率不会影响 IVF 受精率,但对优胚率产生显著影响,与本研究结果基本一致^[9-10]。

精子 DNA 损伤的发生与遗传物质组装异常、精子凋亡异常及氧化压力等因素有关^[11]。与成熟精子相比,不成熟精子更易出现 DNA 碎片化现象。本研究对不育症患者进行了精子核蛋白不成熟度检测及分析,结果显示,精子核蛋白不成熟度与 IVF 受精率、优胚率无相关性($P>0.05$),但与精子浓度呈负相关($P<0.05$),但相关机制有待进一步研究证实。综上所述,精子 DNA 碎片率检测对不育症患者(下转第 1456 页)

本研究显示,心肌炎患儿外周血 hs-cTnT 与 CK-MB 水平均高于非心肌炎其他疾病患儿($P<0.05$)。Simpson 等^[12]研究表明,单独以 hs-cTnT 或 CK-MB 作为小儿心肌炎诊断指标,均不能取得较好结果,两者联用则可提高小儿心肌炎诊断准确率,与本研究结果一致。hs-cTnT 水平可较为灵敏、特异地反映心肌缺血,但与心肌损伤程度相关性相对较弱;CK-MB 水平可较好地反映心肌损伤程度,但影响因素多、特异性相对较差。因此,hs-cTnT 与 CK-MB 联合检测,综合发挥二者的优势,可同时提高灵敏度、特异度,更好地反映患者病情。本研究结果显示,<1 个月心肌炎患儿外周血 hs-cTnT 及 CK-MB 水平显著高于 1 个月至 1 岁及>1~3 岁患儿,与类似研究结果一致^[13]。有研究表明,与 1~12 个月及>1~3 岁心肌炎患儿相比,新生儿罹患心肌炎时,外周血 hs-cTnT 水平升高更为明显,可能与新生儿心肌尚未发育完全,患儿心肌细胞受损程度更为严重有关^[13]。

综上所述,hs-cTnT 与 CK-MB 联合检测对小儿心肌炎的诊断灵敏度高、特异性强,可准确反映患儿心肌损伤程度,提高治疗及预后效果,值得推广应用。但本研究纳入患儿例数较少,未能完全排除其他影响因素,因此所得结论有待更为全面的研究结果的证实。

参考文献

[1] 申浩,李昕雪,杨靖,等. 参麦注射液联合常规用药治疗小儿病毒性心肌炎的系统评价[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(11):1534-1539.

[2] 马沛然,王小康. 小儿病毒性心肌炎病毒病原学检测方法及其临床价值评估[J]. 中国实用儿科杂志,2013,28(7):499-501.

[3] 裴文利,陈国卿,郑永昌. 小儿肺炎衣原体感染与心肌炎的临床关系探讨[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(13):3344-3345.

[4] Banka P, Robinson JD, Uppu SC, et al. Cardiovascular magnetic resonance techniques and findings in children with myocarditis: a multicenter retrospective study[J]. J Cardiovasc Magnet Reson, 2015, 17(1): 1-8.

[5] Liu G, Yang X, Su Y, et al. Cardiovascular magnetic resonance imaging findings in children with myocarditis[J]. Chine Med J, 2014, 127(21): 3700-3705.

[6] 郑百红, 许忠, 徐晓恒, 等. 磷酸肌酸钠治疗小儿急性病毒性心肌炎疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(29): 4294-4295.

[7] Garbern JC, Gauvreau K, Blume ED, et al. Myocarditis is not an independent risk factor for outcomes in children listed for heart transplantation[J]. Circulation, 2014, 130(Suppl2): S135-141.

[8] 吴铁吉. 病毒性心肌炎诊断标准(修订草案)[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(2): 75-75.

[9] 王晓华, 刘维婵. 小儿手足口病并暴发性心肌炎 4 例报告[J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(1): 9-11.

[10] 谭忠友. 小儿病毒性心肌炎机制研究和临床治疗进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(7): 866-868.

[11] 王颖, 袁越, 王勤, 等. 小儿暴发性心肌炎 64 例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(12): 935-937.

[12] Simpson KE, Cunningham MW, Lee CK, et al. Children with myocarditis and new onset dilated cardiomyopathy have evidence of autoimmunity and viremia at presentation[J]. Prog Pediatr Cardiol, 2014, 37(1): 39-40.

[13] Lin KY, Kerur B, Witmer CM, et al. Thrombotic events in critically ill children with myocarditis[J]. Cardiol Young, 2014, 24(5): 840-847.

(收稿日期:2016-11-14 修回日期:2017-01-20)

(上接第 1453 页)
IVF 治疗结局具有重要的预测价值。

参考文献

[1] 曾玖芝,袁华,龚衍,等. 精子 DNA 损伤与常规体外受精-胚胎移植结局关系研究[J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(4): 564-565.

[2] 查钱江,高勇,王雅丽,等. 精液处理前后精子 DNA 碎片的变化及对 IVF-ET 结局的影响[J]. 医药论坛杂志, 2015, 36(6): 1-2.

[3] 黄智勇,王立雅,谢春雨,等. 精子 DNA 碎片指数对体外受精-胚胎移植妊娠结局预测价值的研究[J]. 中国当代医药, 2016, 23(4): 97-98.

[4] 何泳志,李大文,成俊萍,等. 精子 DNA 完整率、精子顶体完整率及反应率对补救卵泡浆内单精子注射术的影响[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(1): 140-144.

[5] 张雪. 精子 DNA 损伤对试管婴儿助孕结局的影响[J]. 医学理论与实践, 2015, 28(15): 1991-1992.

[6] 程立子,方小武,吴日然,等. 精液指标与体外受精助孕后

孕早期自发性流产的相关分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(3): 324-325.

[7] 刘芳,王莹,金锐,等. 常规 IVF 短时授精第 2 极体排出及原核形成与胚胎发育潜能的相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2013, 35(9): 799-802.

[8] 黄绘,洪焱,冯玉蓉,等. 未成熟卵体外成熟技术在卵巢高反应患者 IVF-ET 中的应用[J]. 中国计划生育学杂志, 2012, 20(6): 401-402.

[9] 江莉,李慕军,翟丹梅,等. 观察胚胎早期卵裂预测体外受精-胚胎移植妊娠结局的价值[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(1): 40-42.

[10] 辛才林,朱元,黄志辉,等. 取卵后卵冠丘复合物体外孵育时间对 IVF-ET 受精和胚胎质量的影响[J]. 江西医药, 2013, 48(2): 107-108.

[11] 刘晓妍,张守信,郝翠芳,等. 卵母细胞授精前剥除部分卵丘细胞对体外受精-胚胎移植结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2013, 22(3): 167-170.

(收稿日期:2017-01-21 修回日期:2017-03-22)