

• 论 著 •

精子 DNA 完整性、诱发顶体反应与夫精宫腔内人工授精妊娠率的关系

梁嘉颖, 李子涛, 张 杰, 杨旭辉, 黄志承, 汪李虎, 刘风华[△]

(广东省妇幼保健院生殖健康与不孕症科, 广东广州 510010)

摘 要:目的 探讨精子 DNA 完整性和诱发顶体反应与夫精宫腔内人工授精(AIH-IUI)临床妊娠率的关系。方法 对相同促排方案的 151 个 IUI 周期的患者进行精子 DNA 碎片化指数(DFI)和钙离子载体激发顶体反应(ARIC)检测,分析精子 DNA 完整性和诱发顶体反应与 AIH-IUI 临床妊娠率的关系。结果 妊娠组 DFI% 为 $(20.6 \pm 9.5)\%$, 非妊娠组为 $(31.5 \pm 13.6)\%$, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 将患者分为 DFI% $\leq 30\%$ 和 DFI% $> 30\%$ 两组, 其临床妊娠率分别为 14.0% 和 6.7%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 妊娠组 ARIC% 为 $(14.1 \pm 4.6)\%$, 非妊娠组为 $(8.2 \pm 2.7)\%$, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 将患者分为 ARIC% $\geq 10\%$ 和 ARIC% $< 10\%$ 两组, 其临床妊娠率分别为 18.6% 和 7.4%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 精子 DFI% 和 ARIC% 与 AIH-IUI 临床妊娠率有关。

关键词:精子; DNA; 顶体反应; 临床妊娠率; 宫腔内人工授精

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1250-03

Relation between sperm DNA integrity and induced sperm acrosome reaction with intrauterine insemination pregnancy rate

Liang Jiaying, Li Zitao, Zhang Jie, Yang Xuhui, Huang Zhicheng, Wang Lihu, Liu Fenghua[△]

(Department of Reproductive Health and Infertility, Guangdong Provincial Women and Children's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relation between sperm DNA integrity and induced sperm acrosome reaction with artificial trauberine insemination with husband intrauterine insemination (AIH-IUI) pregnancy rate. **Methods** The sperm DNA fragmentation index (DFI) and Ca^{2+} ionophore (A23187)-induced acrosome reaction(ARIC) rate were detected in the patients with 151 IUI cycles who accepted AIH-IUI were analyzed treatment, the relation between sperm DNA integrity and sperm ARIC with clinical pregnancy rate of AIH-IUI. **Results** DFI% of the pregnant group was $(20.6 \pm 9.5)\%$ while which of non-pregnant group was $(31.5 \pm 13.6)\%$, the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). All the patients were divided into the DFI% $\leq 30\%$ group and the DFI% $> 30\%$ group, their clinical pregnancy rates were 14.0% and 6.7% respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). ARIC% of the pregnant group was $(14.1 \pm 4.6)\%$ while which of the non-pregnant group was $(8.2 \pm 2.7)\%$, there was statistically significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The patients were divided into the ARIC% $\geq 10\%$ group and the ARIC% $< 10\%$ group, their clinical pregnancy rates were 18.6% and 7.4% respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The sperm DFI% and ARIC % are associated with the clinical pregnancy rate of AIH-IUI.

Key words: spermatozoa; DNA; acrosome reaction; clinical pregnancy rate; intrauterine insemination

目前, 不孕不育已成为全球关注的健康问题。宫腔内人工授精(intrauterine insemination, IUI)是对不孕不育患者进行辅助生殖治疗的第一步。文献报道 IUI 的临床妊娠率大约在 10%~15% 之间, 供精人工授精(AID-IUI)的临床妊娠率略高于夫精人工授精(AIH-IUI)。影响 AIH-IUI 临床妊娠率的因素很多, 大部分研究集中在患者年龄、不孕不育年限、女方盆腔结构、子宫内膜厚度、输卵管壶腹部直径及伞端距宫角距离、促排方案、授精时机、授精次数以及男方精液因素等^[1-3]。精液因素与 AIH-IUI 临床妊娠率的研究只停留在精液常规分析水平上, 并不能全面评估精子质量, 其在预测临床妊娠结局方面的作用非常局限。临床上迫切需要更全面准确的精液参数指标, 帮助患者选择经济、有效的 ART 方案。本研究拟通过对精子进行 DNA 碎片化指数(DFI)和钙离子载体激发顶体反应(ARIC)的检测, 分析这两项实验结果与 AIH-IUI 临床妊娠率之间的关系, 探讨其作为 AIH-IUI 妊娠结局预测指标的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 1~8 月在本中心采用 HMG 促排方案进行 AIH-IUI 治疗的 151 个周期, 女方年龄小于 35 岁。夫妇双方查血常规、尿常规、肝肾功能、HIV、RPR、乙肝、丙肝、血型(ABO、Rh)、地中海贫血、G-6PD、染色体、胸透、心电图; 女方查致畸四项、白带常规、阴道或宫颈分泌物病原体、经子宫输卵管碘油造影至少一侧输卵管通畅、且输卵管通畅侧有优势卵泡、卵巢储备功能正常、盆腔无粘连、无子宫内膜异位症、子宫内膜厚度不低于 8 mm、排除生殖道畸形; 男方查精液常规、形态学、病原体检查, 符合标准者入选。所有患者均签署知情同意书, 本研究经医院伦理委员会同意。

1.2 仪器与试剂 日本 Olympus 公司 BX53 普通光学显微镜; 日本 Nikon 公司 Eclipse E600 荧光显微镜; 德国 Eppendorf 公司移液器; 上海齐欣科学仪器有限公司 CU-600 和 HWS-12 电热恒温水浴箱等。深圳博锐德生物科技有限公司精子 DNA 碎片检测试剂盒(染色质扩散 SCD 法); 瑞典 Vitrolife 公司

SpermRinse 液;Sigma 公司钙离子载体 A23187,异硫氰酸荧光素标记的豌豆凝集素 (FITC-PSA);DMSO, PBS 液,戊二醛,95%乙醇,生理盐水等。

1.3 方法

1.3.1 精液采集 受检者禁欲 2~7 d,行 IUI 当天手淫采集精液,立即放置 37℃ 恒温水浴箱,完全液化后进行检测。

1.3.2 精子 DNA 碎片化指数 (DFI) 检测 新鲜精液常规检查后调精子浓度至 $5\sim 10\times 10^6/\text{mL}$ 。易熔凝胶管 80℃ 温浴 20 min,37℃ 复温 5 min。取待测标本 60 μL 加入易熔胶管中充分混匀,加 30 μL 精子混合液在预处理的载玻片上,盖上盖玻片,4℃ 5 min 平行移去盖玻片。将载玻片垂直浸入反应液 A 中,室温 7 min,吸干多余液体,再垂直浸入反应液 B 中,室温 25 min 后浸入纯水中 1~2 min,换水 1~2 次。吸干多余水分,将载玻片依次放入 70%、90% 和 100% 乙醇中各 2 min,空气干燥。瑞氏染液室温 15 min,流水冲洗,空气干燥。光学显微镜下观察 500 条精子,计算 DFI%。

1.3.3 钙离子载体激发顶体反应 (ARIC) 检测 3~4 mL 生理盐水加入 1 mL 待测精液,混匀,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,将沉淀物加到 1 mL SpermRinse 底部,上游 1 h。取上游后精子加入另一管 SpermRinse 液中,活动精子调至 $1\times 10^6/\text{mL}$ 。孵育 3 h 诱导精子获能。获能后精子分为测定管和对照管。测定管中加入足量钙离子载体 A23187,终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$;对照管中加入等体积 DMSO,37℃ 孵育 15 min,3% 戊二醛终止反应。2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。取沉淀 20~30 μL 移至载玻片上,观察精子密度与活动率等情况后,吸取多余液体,空气干燥。将载玻片浸泡于 95% 乙醇 30 min,空气干燥。迅速加入 0.1 mg/mL FITC-PSA 40 μL ,水平放置 4℃ 湿盒内 10~12 h。蒸馏水浸泡 3 次,每次 2 min。荧光显微镜下观察 200 条荧光标记染色精子,计算 AR%。

1.3.4 AIH-IUI 采用 HMG 促排方案,当卵泡直径达 18~20 mm 时,肌注人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 5 000~10 000 IU。于 LH 峰后 12~24 h 行 AIH-IUI;若无自发 LH 峰,则于注射 HCG 后 24~48 h 进行。术前排空膀胱,取膀胱截石位,了解子宫位置,生理盐水抹洗外阴阴道后,将 IUI 一次性导管连接到 1 mL 注射器上,吸取处理后精液达到 0.4 mL,将导管

插入宫腔,缓慢将精液注入宫腔,术后垫高臀部,卧床 0.5 h。人工授精后次日开始肌注黄体酮 20 mg/d 或 HCG 2 000 IU,每 3 d 1 次;或使用地屈孕酮片 10 mg,1 d 2 次,或阴道使用黄体酮胶囊 200 mg,1 d 2 次。第 13~15 天若月经未来潮,抽血测 $\beta\text{-HCG}$ 、E2、P4,对 $\beta\text{-HCG}$ 阳性者,根据结果调整用药,1 周后复查。术后 5 周做 B 超确认临床妊娠。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 软件进行统计分析,均值比较采用 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料比较 将 151 个周期分为妊娠组和非妊娠组。妊娠组与非妊娠组夫妻双方年龄、不孕不育年限、IUI 日最大卵泡直径和子宫内膜厚度之间的差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 1。

2.2 处理前后精液参数比较 妊娠组和非妊娠组的处理前后精液量、精子浓度、前向运动率、正常形态率等参数之间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)^[4],见表 2。

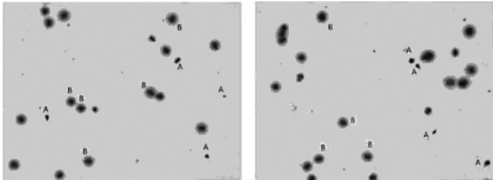
2.3 DFI 检测结果 普通光学显微镜下 10×40 倍观察 500 条精子,根据晕轮与精子头横直径的比例,分为大、中、小和无光晕 4 个等级。大光晕晕轮不低于精子头横直径;中光晕介于大小光晕之间;小光晕晕轮不高于精子头横直径 1/3;无光晕见图 1。大和中光晕表示精子 DNA 无碎片,小和无光晕表示精子 DNA 有碎片。计算 DFI%(存在 DNA 碎片精子数/观察精子总数 $\times 100\%$),非妊娠组患者 DFI% 为 (31.5 \pm 13.6)%,妊娠组 DFI% 为 (20.6 \pm 9.5)%,两组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。

表 1 妊娠组和非妊娠组参数比较 ($\bar{x}\pm s$)

参数	妊娠组 ($n=19$)	非妊娠组 ($n=132$)	<i>P</i>
女方年龄 (岁)	30.1 \pm 3.7	31.4 \pm 3.1	>0.05
男方年龄 (岁)	34.5 \pm 4.1	33.8 \pm 3.9	>0.05
不孕不育年限 (年)	3.6 \pm 1.7	3.9 \pm 2.1	>0.05
最大卵泡直径 (mm)	19.1 \pm 2.2	18.9 \pm 2.7	>0.05
子宫内膜厚度 (mm)	10.2 \pm 1.6	9.8 \pm 1.7	>0.05

表 2 处理前后精液参数比较 ($\bar{x}\pm s$)

项目	处理前			处理后		
	妊娠组	非妊娠组	<i>P</i>	妊娠组	非妊娠组	<i>P</i>
精液量 (mL)	2.7 \pm 1.3	2.9 \pm 1.7	>0.05	0.55 \pm 0.12	0.53 \pm 0.24	>0.05
精子浓度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	78.5 \pm 34.1	73.8 \pm 42.9	>0.05	38.2 \pm 10.1	31.2 \pm 12.7	>0.05
精子前向运动率 (%)	52.6 \pm 13.7	53.9 \pm 12.1	>0.05	86.7 \pm 14.3	85.9 \pm 18.1	>0.05
精子正常形态率 (%)	2.9 \pm 1.7	2.9 \pm 1.5	>0.05	7.3 \pm 2.1	6.5 \pm 2.4	>0.05

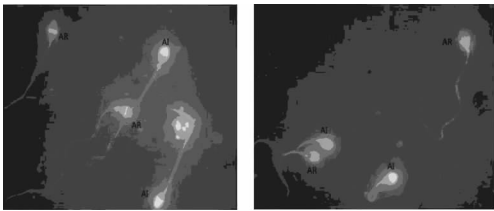


A:DNA 损伤精子 (有碎片);B:DNA 完整精子 (无碎片)。

图 1 SCD 法检测精子 DFI 瑞氏染色图 ($\times 400$)

2.4 ARIC 检测结果 荧光显微镜下 10×100 倍油镜观察 200 条精子。根据染色情况分为三类:顶体完整 (AI),精子头部一半以上荧光染色明亮且均匀;已发生顶体反应 (AR),精子仅在赤道带出现荧光带或者顶体区根本没有荧光染色;顶体异常,除上述两类精子外的所有其他精子 (图 2)^[4]。计算发生 AR 的精子数:AR%=发生 AR 的精子数量/被观察的精子总数 $\times 100\%$;A23187 诱发的 AR%(ARIC%)=测定管 AR%—对照管 AR%。非妊娠组诱发 AR% 明显低于妊娠组 ($P<$

0.05),见表 3。



AI:顶体完整,精子顶体区染色;AR:已发生 AR,精子赤道带或顶体后区染色。

图 2 A23187 诱发精子发生 AR 荧光染色图(×1 000)

表 3 妊娠组和非妊娠组的 DFI 值和 ARIC(%, $\bar{x}\pm s$)		
组别	DFI 值	ARIC
妊娠组($n=19$)	20.6±9.5	14.1±4.6
非妊娠组($n=132$)	31.5±13.6	8.2±2.7
P	<0.05	<0.05

2.5 精子 DFI 与 IUI 临床妊娠率的关系 根据 DFI 结果(小于等于 30%和大于 30%)将 151 个 IUI 周期分为两组^[5],两组的临床妊娠率分别为 14.0%和 6.7%,两组之间差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.6 精子诱发 AR 率与 IUI 临床妊娠率的关系 根据诱发 AR%(大于等于 10%和小于 10%)将 151 个 IUI 周期分为两组^[6],两组的临床妊娠率分别为 18.6%和 7.4%,两组之间差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 精子 DFI 值、ARIC%与临床妊娠率的关系

组别	IUI 例数(n)	临床妊娠例数(n)	临床妊娠率(%)
DFI≤30%	121	17	14.0
DFI>30%	30	2	6.7
P			<0.05
ARIC≥10%	70	13	18.6
ARIC<10%	81	6	7.4
P			<0.05

3 讨 论

研究认为,获得 IUI 治疗成功的首要关键是精液处理^[7]。常规的精液优化处理包括上游法、密度梯度离心法和直接洗涤法等。优化处理后的精子浓度、前向运动率、正常形态率等是目前行 AIH-IUI 治疗的重要判定标准。但其并不能全面评估精子染色体质量及其发生顶体反应、成功受精的能力。本研究对精子 DFI 和 ARIC 进行了检测,探讨其与 AIH-IUI 的临床妊娠率之间的关系,为临床提供更全面准确的精液参数指标。

笔者选择了相同促排方案的 151 个 AIH-IUI 周期,妊娠组和非妊娠组在患者年龄、不孕不育年限、女方子宫内厚度、卵泡情况以及男方精液处理前后的常规参数等方面的差异无统计学意义($P>0.05$)。排除上述因素后,对比妊娠组和非妊娠组的 DFI%和 ARIC%,结果显示妊娠组的 DFI%明显低于非妊娠组,差异有统计学意义($P<0.05$),与 Khalili 等^[8]的报道基本一致。妊娠组的 ARIC%明显高于非妊娠组,差异有统

计学意义($P<0.05$),该结果与 Makkar 等^[6]的报道基本相同。结果表明,在精子正常形态率相似的情况下,非妊娠组的患者精子 DNA 损伤明显高于妊娠组,说明精子正常形态率并不能充分反应精子内部结构和受精能力。Giwerzman 等^[9]研究表明,染色体结构异常与不动精子水平和染色质包装缺陷密切相关,对于预测妊娠结局来说,DFI 是一个独立的影响因子。因此,检测精子 DNA 完整性能更好地预测 AIH-IUI 的妊娠结局,尤其是以男方因素为主的不孕不育患者。

有学者将诱发顶体反应与精卵结合试验做对比,发现诱发顶体反应对预测 IVF 妊娠结局的能力与精卵结合试验的差异无统计学意义,但其方法简单易行,可操作性强^[10]。本研究利用钙离子载体 A23187 激发精子发生顶体反应,结果显示妊娠组和非妊娠组之间的 ARIC%有显著差异,而不同的 ARIC%其妊娠结局也有显著差异,表明 ARIC%可预测精子的受精能力,有助于选择辅助生殖技术治疗方案。有条件的生殖中心或生殖医学实验室,可在决定助孕方案前进行精子诱发顶体反应率检测,并根据实验结果制定本中心各种 ART 的 ARIC%参考值,同时结合精子 DFI%检测、正常形态率和精液常规等项目,为患者提供更合适有效的助孕治疗方案。

参考文献

[1] 卢伟英,刘西茹,黄元华,等. 718 周期夫精宫腔人工授精临床因素分析[J]. 海南医学院学报,2006,12(4):310-313.

[2] 茅琳,洪燕,金晶,等. 夫精宫腔内人工授精临床妊娠率影响因素的分析[J]. 中国男科学杂志,2008,22(8):20-24.

[3] Esmail LS, Faramarzi M. Endometrial thickenss and pregnancy out come after intrauterine in seminateon[J]. Fertil Steril,2007, 88(2):432-437.

[4] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2011.

[5] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome[J]. Hum Reprod,2007,22(1):174-179.

[6] Makkar G, Ng EH, Yeung WS, et al. The significance of the ionophore-challenged acrosome reaction in the prediction of successful outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination[J]. Hum Reprod,2003,18(3):534-539.

[7] Custers IM, Steures P, Hompes P, et al. Intrauterine insemination: how many cycles should we perform[J]. Hum Reprod,2008, 23(4):885-888.

[8] Khalili MA, Nazari S, Dehghani-Firouzabadi R, et al. Comparing the roles of sperm chromatin integrity and apoptosis in intrauterine insemination outcomes of couples with mild male and female factor infertility[J]. J Reprod Infertil,2014,15(1):35-40.

[9] Giwerzman A, Richthoff J, Hjollund H, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters [J]. Fertil Steril,2003,80(6):1404-1412.

[10] Oehninger S, Franken DR, Sayed E, et al. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2000, 6(2): 160-168.