

• 论 著 •

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*

程立子, 方小武, 吴日然, 霍骏业

(中山市博爱医院生殖中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 探讨男方精液指标与体外受精助孕患者孕早期自发性流产的相关性。方法 回顾性分析该院接受体外受精助孕的夫妻 251 对, 根据女方是否发生早期自发性流产分为研究组(98 对)及对照组(153 对), 分析 2 组中男方的精子 DNA 碎片率、精子核蛋白不成熟率、正常形态精子百分率等指标。结果 研究组男方的精子 DNA 碎片率、正常形态精子百分率、精子浓度、精子活力、前向精子活力等与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 研究组男方的精子核蛋白不成熟率大于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 精子核蛋白不成熟率与早期自发性流产呈弱正相关($P<0.05$)。结论 精子成熟障碍与孕早期自发性流产相关, 精子核蛋白不成熟率可用于评估体外受精助孕者孕早期自发性流产风险。

关键词:精液指标; 体外受精; 自发性流产; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0324-03

Analysis of correlation between sperm indicators and early spontaneous abortion after in vitro fertilization*

Cheng Lizi, Fang Xiaowu, Wu Riran, Huo Junye

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

Abstract: Objective To explore the correlation between the sperm indicators and early spontaneous abortion after in vitro fertilization(IVF). **Methods** 251 couples receiving IVF, were retrospectively analyzed and divided into the research group (98 couples) and control group (153 couples) according to whether spontaneous abortion occurring. The male's indicators of sperm DNA fragmentation index (DFI), sperm nucleoprotein immaturity rate, percentage of normally morphologic sperms, etc. in the two groups were analyzed. **Results** DFI, percentage of normally morphologic sperms, sperm concentration, motility and forward motile sperm had no statistical differences between the research group and the control group($P>0.05$); while the sperm nucleoprotein immaturity rate of the research group was significantly higher than that of control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the sperm nucleoprotein immaturity rate had weak correlation with spontaneous abortion in early pregnancy ($P<0.05$). **Conclusion** The sperm nucleoprotein dysmaturity is correlated with the spontaneous abortion in early pregnancy. The sperm nucleoprotein immaturity rate could be used to evaluate the risk of spontaneous abortion in early pregnancy after IVF.

Key words: semen parameters; in vitro fertilization; spontaneous abortion; correlation

孕早期自发性流产是指妊娠 12 周内自行终止或自发流产。早期流产常见的原因可能与胚胎染色体异常、孕妇内分泌异常、生殖器官畸形、生殖道感染、生殖道局部或全身免疫异常等有关, 但具体机制尚未完全探明。过往研究多关注女性因素, 对男性因素, 尤其是男性非遗传性因素与自发性流产关系的研究甚少。精液指标多应用于男性生育力的评估, 对于男性精液因素是否可影响孕早期自发性流产尚存较大争议。本研究通过分析在本院生殖中心接受体外受精(IVF)男方的精液指标, 探讨各指标与女性孕早期自发性流产的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2014 年 1~12 月在本院生殖中心进行 IVF 助孕的患者病历资料, 根据女方受孕后是否发生孕早期自发性流产分为 2 组, 研究组为女方发生早期流产者, 共 98 对夫妻, 对照组为女方未发生早期流产者, 共 153 对夫妻。其中研究组中女方年龄(32.47 ± 5.00)岁; 对照组中女方年龄(32.11 ± 5.35)岁。2 组女方一般资料比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准: 接受 IVF 者, 男女双方染色体、性激素均正常, 无明显解剖异常和免疫因素异常, 孕早期无疾病和服药史。

1.2 方法 男方禁欲 2~7 d, 以手淫法采集精液于取精杯内,

待完全液化后混匀, 按表 1 中方法检测各精液指标, 操作严格按照试剂和仪器说明书进行。比较 2 组间男方精液指标的差异, 分析男方年龄、各项精子指标与孕早期自发性流产的相关性, 对相关的指标进一步作受试者工作特征(ROC)曲线分析, 分析其对早期自发性流产的诊断价值。

表 1 精液指标检测方法 & 试剂、仪器厂家

项目	方法	试剂与仪器厂家
精子 DNA 碎片率	染色质扩散法(SCD)	深圳博锐德生物
精子核蛋白不成熟率	改良苯胺蓝染色法	深圳博锐德生物
精子形态学检测	改良巴氏染色法	南京欣迪生物
精子浓度	计算机辅助分析	西班牙 SCA 精子分析系统
精子活力	计算机辅助分析	西班牙 SCA 精子分析系统
前向精子活力(a+b)	计算机辅助分析	西班牙 SCA 精子分析系统

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 相关分析采用 Pearson 相关。绘制 ROC 曲线, 评价精液指标对早期自

* 基金项目: 2013 年中山市科技局医学科研基金项目(20132A027)。 作者简介: 程立子, 女, 主管技师, 从事辅助生殖及生殖医学实验研究。

发性流产的诊断效率,计算 Youden 指数,以 Youden 指数最大的对应切点为临界值。

2 结 果

2.1 2 组间男方年龄及精液指标比较 除精子核蛋白不成熟率外,2 组间男方年龄及其他精液指标比较,差异均无统计学

意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 男方年龄及各精液指标与自发性流产的相关性 精子核蛋白不成熟率与早期自发性流产呈弱相关,差异有统计学意义($P<0.05$),其余各指标与自发性流产间无显著相关($P>0.05$)。见表 3。

表 2 2 组间男方年龄及精液指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	男方年龄 (岁)	精子 DNA 碎片 率(%)	精子核蛋白不 成熟率(%)	正常形态 精子率(%)	精子浓度 (10^6 /mL)	精子活力 (%)	前向精子(a+b) 活力(%)
研究组	98	33.72±5.68	18.61±9.39	33.06±10.31*	2.26±1.27	96.98±39.93	59.89±13.94	41.19±15.00
对照组	153	33.78±5.50	18.23±8.41	28.51±11.20	2.38±2.12	94.09±37.22	63.24±13.35	44.24±15.62

*: $P<0.05$,与对照组比较。

表 3 男方年龄及各精液指标与自发性流产的相关性

项目	r	P
男方年龄	-0.005	0.934
精子 DNA 碎片率	0.021	0.739
精子核蛋白不成熟率	0.201*	0.001
正常形态精子率	-0.034	0.592
精子浓度	0.037	0.561
精子活力	-0.120	0.058
前向精子活力(a+b)	-0.097	0.127

2.3 精子核蛋白不成熟率的 ROC 曲线分析 精子核蛋白不成熟率与早期自发性流产的 ROC 曲线分析结果显示,当精子核蛋白不成熟率大于 35.5%时,预测发生早期自发性流产的灵敏度为 40.8%,特异度为 81.0%,ROC 曲线下面积(AUC)为 0.648。

3 讨 论

导致孕早期自发性流产的原因有很多,包括胚胎染色体异常、孕妇内分泌紊乱、感染、免疫异常、环境因素等,但仍有 50%以上的病例原因不明^[1]。过往针对流产原因的分析多集中在女性方面,对男性因素与自发性流产关系的研究较少见,且多集中于探讨父系染色体异常与流产的关系。精子功能及形态检查,则多应用于对男性不育及胚胎质量评价上^[2-3],对于男性精液因素是否与孕早期自发性流产相关尚存较大争议。有学者发现流产组精子浓度、精子活力、正常形态精子百分率明显低于对照组^[4-5];有的研究者则认为精子 DNA 损伤是胚胎早期流产或复发性流产的重要危险因素^[6-7]。也有研究者持有不同的观点,如程锦娥等^[8]认为,精子核蛋白不成熟率与孕早期自发性流产有关,其他精液指标均无明显相关。男性精液因素是否对接受 IVF 助孕者孕早期自发性流产有影响,目前鲜有报道。

本研究显示,研究组的男方年龄、精子 DNA 碎片率、精子浓度、精子活力、前向精子活力等指标与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),但 2 组间精子核蛋白不成熟率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),精子核蛋白不成熟率与孕早期自发性流产呈弱正相关($P<0.05$),这与刘瑜等^[9]的研究基本一致。

精子 DNA 碎片率常被认为与早期自发性流产密切相关,但在本研究中,精子 DNA 碎片率与自发性流产不存在相关性,其可能原因为:(1)在一定范围内,卵母细胞和受精卵可对受损的精子 DNA 进行修复^[10];(2)精子 DNA 碎片率主要影

响受精能力、胚胎分裂功能,而对受精后胚胎生长、妊娠等影响较小^[11];(3)精子之间存在竞争与优胜劣汰过程^[12],最后成功受精者往往是质量较好的精子。

在精子成熟过程中,精子核内组蛋白被富含鱼精蛋白逐渐取代^[13],成熟精子精核内主要成分为鱼精蛋白,鱼精蛋白可中和 DNA 链上负电荷,使精子核染色质紧密结合而高度压缩,形成特殊双环结构而保护精子 DNA 免受破坏;精子成熟障碍时,蛋白转换过程受阻,精核内蛋白成分主要为组蛋白,其对精子 DNA 无保护作用,精子 DNA 易遭到破坏,导致胚胎异常发育而流产^[14]。本研究中显示,精子核蛋白成熟障碍为导致 IVF 受孕后自发性流产的重要危险因素,AUC 为 0.648,其临界值为 35.5%,明显高于方小武等^[15]以流产者男性配偶及健康男性为研究对象得出的 27%的结论,这可能是由于两项研究中研究对象不同所致,本文所选的研究对象为接受 IVF 助孕者,精子经过优选处理,精子优选过程有助于降低精子核蛋白不成熟率,从而减少流产的风险。

综上所述,精子成熟障碍与孕早期自发性流产密切相关,精子核蛋白不成熟率可用于 IVF 助孕者发生早期自发性流产风险评估。对于接受辅助生殖助孕者,应先通过治疗或适宜的精子优选处理来降低精子核蛋白不成熟率,以降低早期自发性流产风险。

参 考 文 献

- [1] 赵花,苗竹林,韦才才.复发性流产的病因分析及治疗新进展[J]. 临床医学,2013,33(2):104-108.
- [2] 蒋最明,顾敏,李仲余,等.精子形态和精子活力分析在男性不育诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(1):91-93.
- [3] 黄茜,丘映,史秋雯,等.精子 DNA 损伤与精子形态、顶体完整率的关系研究[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(6):649-650.
- [4] Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal AA, et al. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss[J]. Fertil Steril, 2010, 94(4):1465-1472.
- [5] 张洲,师娟子,邢俊平,等.复发性流产与精液常规参数、精子畸形率和 DNA 完整性的相关性[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(16):1788-1792.
- [6] Kumar K, Deka D, Singh A, et al. Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(9):861-867.
- [7] 甄亚丽.精子 DNA 完整性与不明原因复发性流产相关性分析[D]. 大连:大连医科大学,2014.
- [8] 程锦娥,何丹.精液实验室指标与孕早期自发性流产的临床诊断关系[J]. 吉林医学,2012,33(10):2033-2035. (下转第 328 页)

性宫颈癌的过程中, HPV 基因的整合与 TERC 基因的表达有紧密关系。在病变发展过程中, HPV 从游离状态整合到宿主细胞内是一个重要的危险因素, TERC 基因的异常表达和 HPV 的基因整合能够推动形成非整倍体细胞。但并不是所有 HPV 阳性的细胞都会出现 TERC 基因异常表达, 10 例存在 HPV 整合的二倍体病变中只有 8 例有 TERC 基因异常表达, 这就意味着 HPV 病毒整合到宿主细胞后存在两种不同的发展方向, 其中之一就是与染色体基因突变无关^[13], 而染色体基因的突变在宫颈癌的形成过程中起着关键作用, 这也许可以说明为什么在宫颈癌前病变中 HPV 的感染很普遍, 但只有极少的一部分最终发展为浸润性宫颈癌。

本研究中 20 例健康人正常的宫颈脱落上皮细胞中无 TERC 基因的异常表达, 而在 CIN 至宫颈癌中 TERC 基因的异常表达呈递增趋势, 且宫颈癌中阳性表达率是 100.0%, 明显高于不同分期 CIN ($P < 0.05$), 提示 TERC 基因的异常表达存在于宫颈癌的发生、发展过程中, 恶性程度越高, 异常表达率越高。12 例宫颈癌中 HPV 阳性率是 91.7%, TERC 基因表达阳性率是 100.0%, 提示 TERC 基因异常表达在宫颈癌的发生、发展过程中起着关键作用。

3 组 CIN 患者中均有 HPV 阳性而 TERC 基因表达阴性的病例, 提示不是所有 HPV 阳性的患者都会出现 TERC 基因的阳性表达, 这说明只有 HPV 整合到宿主细胞后才可能在宫颈癌的形成过程中, 具有致癌性。在宫颈癌的发展过程中伴随 TERC 基因异常表达出现的 HPV 阳性率随着病变恶性程度的增加而逐渐上升, 在宫颈癌中阳性率最高达到 91.7%, 二者的同时出现可能说明在宫颈癌的发展中 HPV 与 TERC 基因有着某种协同作用。

研究中, 通过 CSP3 对照探针的绿色信号客观地反映出 TERC 基因异常表达的细胞中存在非二倍体细胞。随着病变恶性程度的增加, 非二倍体细胞出现的频率也增加, 在 CIN1 和 CIN2 中二倍体多见, 几乎见不到非二倍体, 在 CIN3 中非二倍体比例升高, 宫颈癌中最高, 提示染色体数目的变异可能与宫颈癌的发生有一定的联系。

综上所述, TERC 基因异常表达和高危 HPV 感染与宫颈癌的发生、发展密切相关。在宫颈癌的发生、发展过程中, TERC 基因异常表达、高危 HPV 感染、3 号染色体数目的突变可能起着重要的协同作用。

参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 191-192.
- [2] Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, et al. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer[J]. Nat Rev Cancer,

2003, 3(9): 695-701.

- [3] 李晓红, 董卫红, 黄在菊, 等. 子宫颈癌前病变组织 DNA 倍体分析与人乳头状瘤病毒亚型检测[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 205-206.
- [4] 奚玲, 朱涛, 吴鹏, 等. 人端粒酶逆转录酶在子宫颈癌组织中的表达变化及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(6): 407-410.
- [5] Oikonomou P, Mademtzis I, Messinis I, et al. Quantitative determination of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in premalignant cervical lesions and correlation with human papillomavirus load[J]. Hum Pathol, 2006, 37(2): 135-142.
- [6] Jarboe EA, Thompson LC, Heinz D, et al. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma[J]. Hum Pathol, 2004, 35(4): 396-402.
- [7] Heselmeyer-Haddad K, Janz V, Castle PE, et al. Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1405-1416.
- [8] Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer[J]. Am J Pathol, 2005, 166(4): 1229-1238.
- [9] Evans MF, Cooper K. Human papillomavirus integration; detection by in situ hybridization and potential clinical application[J]. J Pathol, 2004, 202(1): 1-4.
- [10] Peitsaro P, Johansson B, Syrjinen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 886-891.
- [11] Graham DA, Southern SA, McDicken IW, et al. Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix[J]. Lab Invest, 1998, 78(3): 289-296.
- [12] Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, et al. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer[J]. J Pathol, 2006, 210(4): 412-419.
- [13] Graham DA, Southern SA, McDicken IW, et al. Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix[J]. Lab Invest, 1998, 78(3): 289-296.

(收稿日期: 2015-11-05)

(上接第 325 页)

- [9] 刘瑜, 陈晓兰, 叶丹捷, 等. 精子成熟障碍对孕早期自发性流产与胚胎停育的影响[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(8): 532-537.
- [10] Marchetti F, Essers J, Kanaar R, et al. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(45): 17725-17729.
- [11] 陈泯燕, 黄国宁, 王亚平, 等. 精子 DNA 碎片与体外受精结局的关系[J]. 生殖与避孕, 2010, 30(11): 732-737.
- [12] 方小武, 韦剑洪, 吴日然, 等. 精子 DNA 碎片率与早期自发性流产的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013(6): 112.
- [13] 刘居理, 罗明, 卢雪芳, 等. 男性不育患者精子核蛋白组型转换与

精子密度及活力分析[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(13): 1061-1062.

- [14] Li Y, Lalancette C, Miller D, et al. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus[J]. Asian J Androl, 2008, 10(4): 535-541.
- [15] 方小武, 陈捷, 韦剑洪, 等. 复发性流产男性配偶精子核蛋白不成熟度检测的临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(1): 108.

(收稿日期: 2015-09-25)