

精子自发顶体反应率与体外受精胚胎质量的相关性研究*

刘树沅, 韦剑洪, 陈伟辉, 霍骏业

(广东省中山市博爱医院生殖中心 528403)

摘要:目的 探讨精子自发顶体反应率以及两种精子处理方法与体外受精(IVF)胚胎质量的相关性。方法 将 200 例接受 IVF 治疗的男性随机分为观察组和对照组, 每组 100 例。对照组患者精液采用密度梯度离心法进行处理, 观察组患者采用密度梯度离心法联合上游法优化精子, 两组均进行常规 IVF 授精。比较两组间受精率和优胚率, 分析观察组精子自发顶体反应率与胚胎质量的关系。结果 观察组患者受精率明显高于对照组患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且精子自发顶体反应率与受精率呈负相关($r = -0.890, P < 0.05$)。观察组患者优胚率明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且精子自发顶体反应率与优胚率呈负相关($r = -0.647, P < 0.05$)。结论 密度梯度离心联合上游法有助于分离自发顶体反应率更低的精子, 从而提高 IVF 成功率, 而精子自发顶体反应率在预测胚胎质量方面具有一定的临床应用价值。

关键词: 体外受精; 胚胎质量; 自发顶体反应率; 密度梯度离心

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)01-0016-03

Correlation between sperm spontaneous acrosome reaction and in vitro fertilization embryo quality*

LIU Shuyuan, WEI Jianhong, CHEN Weihui, HUO Junye

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

Abstract: Objective To investigate the correlation between spontaneous acrosome reaction of spermatozoa as well as two different methods to separate sperm and the quality of in vitro fertilization(IVF) embryos. **Methods** 200 male treated by IVF were randomly divided into observation group and control group($n=100$). Semen sample of the patients in the control group were treated with density gradient centrifugation, and the patients in observation group were treated with density gradient centrifugation + swim-up methods. Two groups were receiving conventional IVF fertilization. The fertilization rate and the optimal embryo rate were compared between the two groups, the correlation between sperm spontaneous acrosome reaction of the observation group and IVF embryo quality. **Results** The fertilization rate of the observation group was significantly higher than that of the control group($P < 0.05$), and the AR rate was significantly negatively correlated with the fertilization rate($r = -0.890, P < 0.05$). The excellent embryo rate of the observation group was significantly higher than that of the control group($P < 0.05$), and the AR rate was significantly negatively correlated with the optimal embryo rate($r = -0.647, P < 0.05$). **Conclusion** Sperm spontaneous acrosome reaction rate which reduced by density gradient centrifugation + swim-up methods is helpful to improve the success rate of IVF and has clinical value in predicting the quality of IVF embryos.

Key words: in vitro fertilization; embryo quality; spontaneous acrosome reaction rate; density gradient centrifugation

依据世界卫生组织(WHO)调查显示,已婚育龄夫妇的不孕症发生率约为 10%,其中男性不育因素占总不孕患者的 40%^[1],而在国内由于二孩政策开放和环境污染等因素,这一比例还有一定的升高^[2]。为帮助不孕夫妇,辅助生殖技术(ART)得到了广泛应用,由于只有发生顶体反应的精子才能完成受精,检测精子是否已经发生顶体反应已成为评价精子质量和功

能的重要指标,高于 10%的自发顶体反应率则表现为病理性自发顶体反应升高,因此在男性不育的治疗中调整自发顶体反应率是治疗的重点目标^[3]。在常规体外受精(IVF)中,密度梯度离心法和上游法常用于优化精子,是筛选不同顶体反应率精子简单、易行的方式。本文研究了精子自发顶体反应率以及两种精子处理方法与 IVF 胚胎质量的关系,探讨更合适的精

* 基金项目:广东省中山市科技计划资助项目(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方面的研究。

液处理方法以及自发顶体反应率在临床指导授精方式方面的应用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 3 月至 2016 年 2 月在本院生殖中心接受 IVF 治疗的不孕夫妇 200 对, 男方年龄(33.9±5.1)岁, 女方年龄(29.6±5.3)岁, 每周获卵数(11.5±3.2)个。将所有患者分为观察组和对照组, 每组不孕夫妇 100 对, 两组间男女年龄和周期获卵数差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。排除标准: 女年龄≥37 岁, 获卵数<5 个者, 男方严重少、弱精或无精子症者。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理 按照《WHO 实验室手册》(第 5 版)采集和处理精液。不育男性患者需禁欲 2~7 d, IVF 当天通过手淫法取精, 精液收集在无毒、无菌容器内, 放置于温度为 37℃ 的恒温板上, 充分液化后混匀待用。

1.2.2 对照组精子优化 采用密度梯度离心法处理。取 40% 和 80% 精子梯度分离液(商品名: Sperm Grad)各 1 mL, 复温后在 15 mL 离心管内依次放入 80% 和 40% 精子梯度分离液各 1 mL, 注意保持液面分界清晰, 在 40% 精子梯度分离液上方加入液化后的精液, 300×g 离心 20 min, 除去上清液, 将沉淀移入 3 mL G-IVF 受精液中混匀, 200×g 离心 5 min, 去上清液, 留约 0.5 mL 底层液体及沉淀, 混匀后调整浓度备用。

1.2.3 观察组精子优化 采用密度梯度离心法联合上游法处理。密度梯度离心法处理步骤同上, 第 2 次离心处理后, 弃上清液, 将沉淀缓慢加入到含 1 mL G-IVF 受精液的小试管底部, 倾斜放置, 上游 25~45 min, 吸取云雾状的上层液体调整浓度后备用。

1.2.4 授精方法和胚胎观察 取卵当天, 患者注射绒毛膜促性腺激素(HCG)后 38.5~40.0 h 进行常规 IVF 授精, 授精后 17~19 h 观察受精情况, 计算受精率; 授精后第 3 天观察胚胎发育情况, 计算优胚率。

1.2.5 精子自发顶体反应率检测 采用络合异硫氰酸荧光素的豌豆凝集素(FITC-PSA)荧光标记法顶体染色, 使用安徽安科生物工程股份有限公司提供的试剂盒。取优化处理后的精子悬浮液 5 μL 涂片 2 张, 自然干燥后以 95% 乙醇固定 30 min。加入 60~100 μL FITC-PSA 工作液, 4℃ 下反应 2~17 h; 用纯水冲片, 1 000 倍油镜下观察, 计数 200 个精子, 计算自发顶体反应率。顶体完整精子判断标准为(1)顶体完整(AI): 精子头部有超过 1/2 荧光染色明亮且具有均匀性; (2)已发生顶体反应(AB): 精子仅在赤道带存在荧光带, 或顶体区无荧光染色; (3)顶体异常: 除上述两类精子之外的所有精子。

1.3 观察指标 记录观察组自发顶体反应率, 两组的受精率和优胚率。自发顶体反应率=顶体反应数/(顶体反应数+AI)×100%。顶体反应为已发生顶体反应精子, AI 为顶体完整的精子。受精率=受精卵子数/获卵数×100%, 优胚率=优质胚胎数/2PN 受精卵子数×100%, 其中优质胚胎是指 D3 评分为 7 I、7 II、8 I、8 II、9 I 或 9 II 的胚胎。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。计数资料以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 自发顶体反应率与受精率和优胚率的相关性用 Spearman 检验; 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间受精率比较及与自发顶体反应率相关性 对照组受精率为 53.6%, 观察组受精率为 70.9%, 两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组自发顶体反应率为 16.9%, 与受精率呈负相关($r=-0.890$, $P<0.05$), 见图 1。

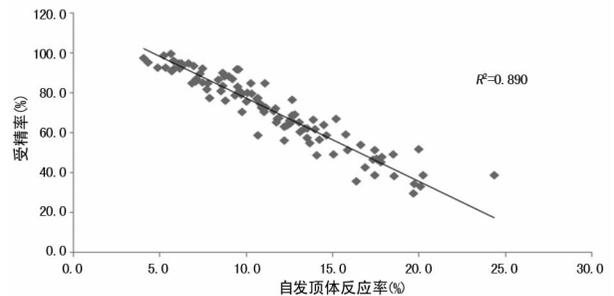


图 1 自发顶体反应率与受精率相关性

2.2 两组间优胚率比较及与自发顶体反应率相关性 对照组优胚率为 43.6%, 观察组优胚率为 55.9%, 两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组自发顶体反应率为 16.9%, 与优胚率呈负相关($r=-0.647$, $P<0.05$), 见图 2。

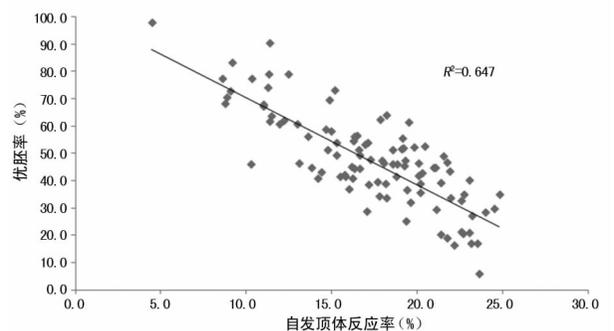


图 2 自发顶体反应率与优胚率相关性

3 讨论

IVF 是帮助不孕不育夫妇妊娠的重要手段, 在 IVF 治疗过程中, 最为重要的就是提高受精率和优胚率, 以达到改善不孕不育患者妊娠结局的目标^[4]。精液处理技术是男性不育治疗的重要手段, 其中上游法和密度梯度离心法是目前精子优化处理的常用技

术。上游法是利用精子自身的活动能力上游到培养液上层而进行优化,密度梯度离心法则根据精子密度利用离心力筛选精子,二者都能提高活动精子的百分率,上游法回收率较低。本文研究显示,观察组的受精率和优胚率均明显高于对照组($P < 0.05$),密度梯度离心法联合上游法能够选出质量更好的精子,有利于提高胚胎质量。

顶体反应是精子在受精过程中所经历的重要环节之一,在受精过程中精子必须完成顶体反应,释放顶体细胞溶解酶,使得精子在穿透透明带过程中产生一条轨道,协助精子穿过透明带与卵子结合^[5],如果精子在与透明带结合之前便发生自发顶体反应,则会失去受精能力,因此检测精子是否发生顶体反应已成为评价精子质量和功能的重要手段。目前,大多数顶体反应试验方法是使用各类的诱导剂或激动剂,如人卵泡液、孕酮或钙离子载体等^[6]。这些试验都具有费用高、不稳定等特点,临床应用受限。本研究采用 FITC-PSA 荧光标记法顶体染色对精子顶体功能进行检测,能够实现对精子顶体完整性进行科学评估,同时该种检测方法能够解决常规形态学方法不能有效判别精子自发顶体反应的问题,检测结果更具客观性和科学性^[7]。

通过人工诱导发生顶体反应在临床上大量研究。LIU 等^[8]在对钙离子载体 A23187 诱导的顶体反应精子形态及体外受精率进行的两次研究就出现过结果不一致现象;而 LIU 等^[9]采用人卵泡液对精子顶体反应进行诱导,观察到顶体反应率与体外受精率存在明显相关性,但是李建平等^[10]的研究结果却与之相悖。这提示在使用人工诱导顶体反应的尝试中仍存在稳定性差、成本高等难题。本文研究结果显示,自发顶体反应率与受精率呈负相关($r = -0.890, P < 0.05$),与优胚率呈负相关($r = -0.647, P < 0.05$),提示降低精子自发顶体反应率可以提高受精率和优胚率,有助于改善 IVF 的成功率和妊娠结局。另外,对于常规精液分析正常,而 IVF 不明原因反复受精失败的患者,可能存在顶体反应缺陷,可以通过检测精子自发顶体反应率考虑优先采用何种授精方式。对于自发顶体反应率明显升高的患者,可考虑选择卵子胞质内单精子注射的辅助生殖技术,而用于选择授精方式的自发顶体反应率参考阈值,则需要扩大样本量进一步研究和探讨。

综上所述,密度梯度离心联合上游法可以获得更

好的受精率和优胚率,自发顶体反应率与组间 IVF 受精率呈负相关,随自发顶体反应率的增加,受精率呈降低的趋势;自发顶体反应率与组间 IVF 优胚率呈负相关,随自发顶体反应率的增加,优胚率呈降低的趋势。自发顶体反应率可以为不孕不育患者临床治疗方式的选择提供指导。

参考文献

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sexual and reproductive health beyond 2014: equality, quality of care and accountability[M]. Geneva: WHO, 2014: 1-8.
- [2] 杨黎明, 张富青, 刘敏. 河南省育龄女性生育情况流行病学调查[J]. 中国当代医药, 2016, 23(4): 153-155.
- [3] ESTERHUIZEN A D, FRANKEN D R, LOURENS J G, et al. Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF[J]. Hum Reprod, 2001, 16(1): 138-144.
- [4] PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE; PRACTICE COMMITTEE OF THE SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY. Role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline[J]. Fertil Steril, 2014, 102(2): 348-351.
- [5] BEDFORD J M. Site of the mammalian sperm physiological acrosome reaction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(12): 4703-4707.
- [6] 陈莹, 李昆明. 精子顶体反应及其相关调控因子研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(9): 2011-2013.
- [7] 张冉, 丘映. 精子正常形态率、顶体完整率、顶体反应率与卵子体外受精率的相关性研究[J]. 中国民康医学, 2012, 24(19): 2305-2306.
- [8] LIU D Y, BAKER H W. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI[J]. Asian J Androl, 2002, 4(4): 281-286.
- [9] LIU D Y, LIU M L, GARRETT C, et al. Comparison of the frequency of defective sperm-zona pellucida(ZP) binding and the ZP-induced acrosome reaction between subfertile men with normal and abnormal semen[J]. Hum Reprod, 2007, 22(7): 1878-1884.
- [10] 李建平, 钟影, 吴东, 等. 人卵泡液诱导的顶体反应, 精子形态与体外受精率的关系[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(7): 605-607.

(收稿日期: 2017-07-03 修回日期: 2017-08-20)