

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.04.005

男性不育患者精子 DFI 与其他精液参数的关系*

冯 玲, 乔 静, 冼英杰, 颜秋霞, 周秀琴, 陈润强, 张国志, 陈彩蓉[△]

广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院生殖中心, 广东清远 511518

摘 要:目的 通过研究精子 DNA 碎片指数(DFI)与其他精液参数的相关性,探讨精子 DFI 在诊断和治疗男性不育中的临床应用价值。**方法** 收集 2019 年 1 月至 2020 年 1 月在该院生殖中心就诊的 959 例男性不育患者的精液标本,通过计算机辅助分析系统进行精液常规检测,运用 Diff-quick 染色法对精液进行染色处理后再作形态学分析,采用精子染色质扩散试验检测精子 DFI,根据精子 DFI 值分组,Ⅰ组精子 DFI<30%,Ⅱ组精子 DFI≥30%,并对精子 DFI 与其他精液参数的相关性进行分析。**结果** Ⅰ组有 754 例;Ⅱ组有 205 例。Ⅰ组的精子存活率、前向运动精子百分率(PR)、非前向运动精子百分率(NP)和正常形态精子百分率明显高于Ⅱ组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Ⅰ组患者的年龄、不动精子百分率(IM)明显低于Ⅱ组,差异有统计学意义($P<0.05$)。精子 DFI 与精子存活率、PR、NP、正常形态精子百分率呈负相关($r=-0.409, -0.402, -0.198, -0.216, P<0.05$),而与患者年龄和 IM 呈正相关($r=0.181, 0.402, P<0.05$)。**结论** 精子 DFI 与多项精液参数相关,因此精子 DFI 检测应与精液常规检测及精子形态学分析相结合,为临床评估男性不育患者的生育力提供可靠且准确的评价指标。

关键词:男性不育; 生育力; 精液参数; 精子 DNA 碎片指数; 相关性

中图法分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)04-0447-04

Correlation between sperm DFI and other semen parameters of male infertility patients*

FENG Ling, QIAO Jing, XIAN Yingjie, YAN Qiuxia, ZHOU Xiuqin,

CHEN Runqiang, ZHANG Guozhi, CHEN Cairong[△]

Center for Reproductive Medicine, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou

Medical University/Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China

Abstract: Objective To investigate the clinical application value of sperm DNA fragmentation index (DFI) in the diagnosis and treatment of male infertility diseases by studying the correlation between sperm DFI and other semen parameters. **Methods** Collect semen specimens of 959 male infertile patients who were treated in Center for Reproductive Medicine of the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Qingyuan People's Hospital from January 2019 to January 2020, detect semen parameters by computer-aided analysis system, and use Diff-quick staining to stain the semen, morphological analysis was performed afterwards, and sperm DFI was detected by SCD method, and grouped as group I with DFI<30%, group II with DFI≥30% according to sperm DFI value, and the correlations between sperm DFI and other semen parameters were analyzed. **Results** Group I had 754 cases, group II had 205 cases. Sperm survival rate, forward movement of the sperm percentage (PR), non forward movement sperm percentage (NP) and normal morphology sperm percentage in group I were higher than those in group II, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Patients' age, motionless sperm percentage (IM) in group I were lower than those in group II, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Correlation analysis found that sperm DFI value significantly negatively correlated with sperm survival rate, PR, NP and normal morphology sperm percentage ($r=-0.409, -0.402, -0.198, -0.216, P<0.05$), and positively related to the patients' age, IM ($r=0.181, 0.402, P<0.05$). **Conclusion** Sperm DFI significantly relates to other semen parameters. Therefore, sperm DFI testing should be combined with routine semen analysis and morphological analysis to provide a reliable and accurate evaluation index for clinically evaluating the fertility of male infertile patients.

Key words: male infertility; fertility; semen parameters; sperm DNA fragmentation index; correlation

* 基金项目:广东省清远市科技计划项目(190912104569144)。

作者简介:冯玲,女,主管技师,主要从事生殖医学实验室研究。 [△] 通信作者, E-mail:cairong1222@163.com。

本文引用格式:冯玲,乔静,冼英杰,等.男性不育患者精子 DFI 与其他精液参数的关系[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(4):447-449.

近年来,不孕不育的夫妇逐年增多,大多数不孕不育夫妇需要通过辅助生殖技术(ART)来实现生殖愿望,患者双方经济与精神压力增加,并可能影响家庭和睦^[1]。有研究显示,在中国约有 1 250 万个不孕不育的家庭,其中约 40%是由男性因素造成的^[2]。目前,诊断男性不育的方法主要为精液量、精子浓度、精子存活率、精子活动力和精子形态等实验室指标检测,然而这些参数可能会受实验员的主观判断影响,且波动范围较大,仅靠这些参数评估男性生育力已不能满足临床需要^[3-4]。根据相关研究统计,大约有 15%不育男性的精液常规检测结果是正常的^[5]。因此,临床上需要寻找更客观、更准确、更稳定的检测指标对精液质量进行评估。精子 DNA 碎片指数(DFI)检测时受外界影响较少,而且可以从精子的染色质层面评估精子质量^[6]。精子 DFI 不仅有助于探索男性不育和女性自然流产的病因,还有助于更好地评估男性的生育力,对预测辅助生育的结局具有重要作用^[7]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2019 年 1 月至 2020 年 1 月于本院生殖中心进行了精液常规检测、精子形态学分析及精子 DFI 检测的 959 例男性不育患者的检测结果进行回顾性分析,患者年龄为 22~59 岁,平均(34.3±6.2)岁。纳入标准:(1)婚后不采用避孕措施,正常性生活,1 年以上不育;(2)无遗传性疾病或性功能障碍病史;(3)体格检查未发现阴茎、附睾、睾丸、输精管等有异常。排除标准:(1)生殖系统发育异常;(2)取精时精液射于杯外,有遗漏;(3)无精子症;(4)女方因素导致未怀孕。

1.2 方法

1.2.1 精液常规检测及形态学分析 嘱咐患者取精前禁欲 2~7 d,精液标本采集必须完整,使用本中心提供的清洁、无毒的专用取精杯,通过手淫的方式收集一次射精的全部精液于杯内,及时放入 37℃恒温水箱。待液化后,精液标本参照《WHO 人类精液检查与处理实验室手册(第五版)》的标准进行处理,用西班牙 SCA 精液分析仪做精液常规分析。精液标本制片干燥后,先用 Diff-quick 染色法快速染色、晾干,

在显微镜的油镜下镜检,借助实验室计数器,评估 200 个没有重叠的完整精子,对每个精子的各部位仔细观察,严格区分正常与缺陷的精子。正常形态精子百分率=正常精子数/200×100%,正常参考值为≥4%。

1.2.2 精子 DFI 检测 采用精子染色质扩散试验(SCD)进行检测,精子核 DNA 完整性的检测试剂盒(生产许可证编号:粤食药监械生产许 20030802 号)为深圳华康生物医学工程有限公司的产品。实验操作步骤严格按照试剂盒说明书实施,精液经过酸化变性处理,去除核蛋白,保留精子 DNA 部分。封片染色后,在高倍显微镜下对 400 个精子进行精确观察、判断后再计数。通常,DNA 比较完整的精子在其头部四周能看到因精子染色质环附着于残留的精子核而扩散形成特征性大晕环或中晕环;而精子核 DNA 损伤较大的精子,头部周围仅见少量的晕环,有些甚至看不到晕环。根据精子是否出现晕环,以及晕环大小判断该精子 DNA 是否完整,碎片率有多少。精子 DFI=(无晕环精子+小晕环精子+退化精子)/400×100%,正常参考值<30%。根据精子 DFI 的检测结果进行分组,I 组精子 DFI<30%,II 组精子 DFI≥30%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,相关分析采用 Pearson 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 分组情况、精液常规检测及精子形态学分析结果 根据精子 DFI 的检测结果进行分组,I 组精子 DFI<30%,有 754 例;II 组精子 DFI≥30%,有 205 例。I 组的精子存活率、前向运动精子百分率(PR)、非前向运动精子百分率(NP)和正常形态精子百分率明显高于 II 组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。I 组的年龄、不动精子百分率(IM)明显低于 II 组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

2.2 精子 DFI 与精液常规检测及精子形态学分析结果的相关分析 精子 DFI 与精子存活率、PR、NP 和正常形态精子百分率呈负相关(*P*<0.05),而与患者年龄和 IM 呈正相关(*P*<0.05)。见表 2。

表 1 I 组和 II 组的精液常规检测及精子形态学分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄(岁)	精液量 (mL)	精子浓度 (×10 ⁶ /mL)	精子存活率 (%)	PR(%)	NP(%)	IM(%)	正常形态精子 百分率(%)
I 组	33.8±5.8	3.4±1.5	55.3±49.2	77.7±13.0	40.6±15.7	21.3±7.2	38.0±18.6	4.1±1.4
II 组	36.0±7.6	3.5±1.4	51.8±54.4	65.3±15.3	26.4±15.1	17.7±7.6	55.9±20.5	3.4±1.3
<i>t</i>	20.898	0.277	0.787	135.162	133.493	39.250	141.944	32.920
<i>P</i>	<0.001	0.599	0.375	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 精子 DFI 与精液常规检测及精子形态学分析结果的相关分析

项目	年龄	精液量	精子浓度	精子存活率	PR	NP	IM	正常形态精子百分率
相关系数(<i>r</i>)	0.181	0.002	-0.016	-0.409	-0.402	-0.198	0.402	-0.216
<i>P</i>	<0.001	0.960	0.614	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨 论

众所周知,DNA 是实现遗传信息传递的重要载体,父系遗传物质要正确传递给子体必须通过完整的精子 DNA 序列来实现信息交换,精子异常的染色结构会影响精卵结合、受精卵分裂及胚胎正常发育^[8],且可能导致复发性流产。有研究发现,精子核 DNA 产生损伤主要是由该患者体内精子出现氧化应激,引起精子染色质无法进行正常组装,以及精子出现难以预测的异常凋亡等^[9]。精子 DNA 常见的损伤形式一般有以下几种:(1)DNA 出现碎片;(2)一些形态异常的染色质难以实现包装;(3)精子体内鱼精蛋白不足或严重缺乏。而精子 DNA 出现碎片是最常见、最主要的 DNA 损伤形式^[10]。MOSKOVTSSEV 等^[11]研究发现,当精子 DFI≥30%时,男性生育力下降。因此,本研究按照精子 DFI 值<30%与≥30%分组。

近年来,随着医学技术的快速发展,我国学者对精子 DNA 完整性与反复流产的关系做了大量的研究,发现复发性流产与精子 DFI 密切相关,精子 DNA 碎片可能会导致胚胎无法正常发育,使流产率增加^[12-14]。ZHANG 等^[15]的研究发现,在实施 ART 时,高精子 DFI 可能会对受精、胚胎发育等产生不良影响。辜秀丽等^[16]相关研究认为,不育男性的精子 DFI 会随着年龄的增加而明显升高,本研究结果也验证了这一观点。原因在于随着年龄增长,生殖器官老化,导致自由基增加、生精过程中的抗氧化作用及精子 DNA 修复能力下降,也意味着精子细胞膜无法受到保护,免受攻击,从而导致精子 DNA 受损。本研究结果还显示,精子 DFI 与 PR、NP 呈负相关,提示男性不育患者的精子可能存在着较多的 DNA 碎片,精子损伤较严重。ASHOK 等^[17]研究发现,精子 DNA 损伤可能影响精子内呼吸链,使精子运动供能异常,进而使精子活力减弱,与本研究结果一致。此外,在本研究中,还发现精子 DFI 与正常形态精子百分率呈负相关,这表明精子 DNA 损伤会破坏精子的正常形态结构,使畸形精子增多,这与 AYDOS 等^[18]的观点相符。因此,精子 DFI 在一定程度上可以预测患者精子存活率和形态等情况,临床查找患者不育原因时最好同时进行精液常规检测、形态学分析及精子 DFI 检测。

综上所述,精子 DNA 损伤可能会使精子活力下降、异常形态精子增多,也可能间接导致无法正常受精、胚胎停止发育、流产等。精子 DFI 能较全面、客观地评估精子质量,为生殖医学临床诊断与治疗男性不

育提供新的方法和方向。在今后的研究中,将深入研究复发性流产患者其配偶精子 DNA 损伤是否对行 ART 后的胚胎发育产生影响,进一步探讨精子 DFI 在男性不育中的临床应用价值,希望能改善接受 ART 治疗患者的妊娠结局。

参考文献

[1] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Geneva:WHO,2010:1-2.

[2] 彭靖,李铮,涂响安,等.中国男性不育显微外科 15 年发展历程及展望[J].中华男科学杂志,2014,20(7):586-594.

[3] 宋焱鑫,郭燕京,董波,等.精子 DNA 碎片指数阈值与体外受精-胚胎移植结局的相关性研究[J].生殖医学杂志,2017,26(6):546-551.

[4] ZHANG Z,ZHU L,JIANG H,et al. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI:a Meta-analysis[J]. J Assist Reprod Genet,2015,32:17-26.

[5] ZHANG H,WANG R,LI L,et al. Translocation breakpoints of chromosome 3 in male carriers: a report of twelve cases and a review of the literature[J]. Turk J Med Sci,2018,48(1):150-156.

[6] 石雯茜,段忠亮,梁昀.精子 DFI 与精液常规的相关性分析及在相关疾病中的表达[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(10):118-119.

[7] SAKKAS D,ALVAREZ J G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis[J]. Fertil Steril,2010,93(4):1027-1036.

[8] OSMAN A, ALSOMAIT H, SESHADRI S, et al. Does the extent of sperm DNA fragmentation affect IVF or ICSI outcome: a systematic review and Meta analysis[J]. Hum Reprod,2013,28(1):i9-i12

[9] CORTES-GUTIERREZ E, DAVILA-RODRIGUEZ M, FEMANDEZ J L, et al. DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele evaluated by sperm chromatin dispersion and DBD-FISH[J]. Arch Gynecol Obstet,2016,293(1):189-196.

[10] 陈亮,徐阳.精子 DNA 碎片化检测在男性生殖领域的临床应用[J].中国男科学杂志,2014,28(7):60-62.

[11] MOSKOVTSSEV S I, WILLIS J, WHITE J, et al. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities[J]. Urology,2009,74(4):789-793.

[12] 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. (下转第 453 页)

均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。本研究结果与钟慧芝等^[3]的研究一致,这说明精索静脉曲张不育患者生成的精液质量较差,生育能力下降,也印证了氧化应激的分子机制学说。

精子遗传信息的载体主要是头部的 DNA 和中部线粒体 DNA。精子 DNA 的损伤主要由细胞凋亡、ROS 的影响、染色质的异常所导致^[4]。刘利敏等^[5]研究发现,ROS 结果与精子 DFI 呈正相关,ROS 的增加会导致氧化应激的发生。有研究表明,氧化应激是导致精索静脉曲张发生的因素之一^[6]。本研究通过多因素 Logistic 回归分析显示,精子 DFI 和 HDS 是精索静脉曲张不育的独立危险因素。这说明精子 DNA 完整性与精索静脉曲张具有密切的关系,精索静脉曲张会损伤精子 DNA,引起精子染色质异常。通过筛查精子 DNA 完整性,可以对男性的生育能力进行评估,同时进一步印证了上面的分子机制学说。

精子 DNA 完整性的检测在生殖医学中极其重要,关于精子 DFI 与精液常规参数分析、精子形态学分析的各指标相关性已有较多报道,但关于联合相关参数在精索静脉曲张不育患者中的诊断效能的研究相对较少。本研究结果显示,精子 DFI 与 HDS、TZI、SDI 呈正相关($r=0.530, 0.454, 0.306, P<0.05$),与 PR、PNS 呈负相关($r=-0.559, -0.245, P<0.05$),与精子浓度无明显相关性($r=-0.112, P>0.05$)。除精子浓度外,与曾兰等^[7]研究结果一致,而精子浓度结果与李非凡等^[8]研究结果一致。精子 DFI、HDS、PR、精子浓度、PNS、TZI、SDI 多参数联合检测诊断精索静脉曲张不育的 AUC 为 0.871(95%CI: 0.819~0.924, $P<0.05$),灵敏度为 71.0%,特异度为 95.0%,阳性预测值为 95.0%,阴性预测值为 65.5%,约登指数为 0.660,诊断效能最高。联合检测的特异度高达 95.0%,与 B 超诊断的特异度基本一致^[9]。提示联合检测优于单独检测的诊断效能。单个项目中,精子 DFI 和 HDS 诊断精索静脉曲张不育患者效能较高,其次为 TZI 和 SDI,其他参数诊断效能较低,不能用于男性生育能力的评估和判断患者预后,这与 COCUZZA 等^[10]研究一致,说明精子 DNA

完整性与精索静脉曲张不育关系密切。

精子 DNA 完整性与精液常规参数分析项目具有关联性,可以作为精索静脉曲张不育的临床筛查指标,而精子 DNA 完整性联合精液常规参数分析能够为精索静脉曲张不育提供更为准确的诊断,可以更好地为临床提供帮助,建议将联合检测作为常规检测。

参考文献

- [1] YING Y J, RONG R Q, YAN Y J, et al. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a Meta-analysis[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(3): 307-314.
- [2] HAMADA A, ESTEVES S C, AGARWAL A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2[J]. Nat Rev Urol, 2013, 10(1): 26-37.
- [3] 钟慧芝, 吕福通, 谢丹妮, 等. 精索静脉曲张程度对精子 DNA 完整性和 α -1, 4-葡糖苷酶含量的影响[J]. 内科, 2014, 9(2): 131-135.
- [4] 阳方, 李俊君, 董良, 等. 精子 DNA 完整性损伤的发生机制及诊断治疗[J]. 中国男科学杂志, 2016, 30(9): 70-72.
- [5] 刘利敏, 谢庆东, 凌晓辉, 等. 精浆 ROS、PON-1、MDA 联合精子 DNA 碎片指数在男性不育症患者中的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(12): 1435-1438.
- [6] 贺情情, 刘小彭, 范年丰, 等. 大鼠精索静脉曲张睾丸组织的蛋白质组学研究[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版), 2014, 8(2): 51-54.
- [7] 曾兰, 叶飞, 李运星, 等. 精子 DNA 完整性与精液常规参数相关性分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2014, 6(4): 47-50.
- [8] 李非凡, 杨昊, 肖佳云, 等. 精子 DNA 碎片指数与精液参数相关性的初步研究[J]. 中国男科学杂志, 2018, 32(1): 33-36.
- [9] 梁雁, 黄君. 精索静脉曲张超声诊断及分度标准研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2019, 35(4): 610-613.
- [10] COCUZZA M, SIKKA S C, ATHAYDE K S, et al. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis[J]. Int Braz J Urol, 2007, 33(5): 603-621.

(收稿日期: 2020-04-03 修回日期: 2020-09-16)

(上接第 449 页)

- [13] 刘成军, 王嵩明, 商微, 等. 精子 DNA 损伤与不明原因复发性流产的关系[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(7): 619-621.
- [14] 郭辉, 金美珠, 金东芳, 等. 精子 DNA 碎片率与复发性流产及精液参数的相关研究[J]. 全科医学临床与教育, 2018, 16(2): 134-136.
- [15] ZHANG Y, TRUSSELL J C, CHOCHAN K R. Detecting and minimizing sperm DNA damage[J]. Semin Reprod Med, 2013, 31(4): 267-273.
- [16] 辜秀丽, 李红钢, 熊承良. 不育男性精子 DNA 碎片指数与

年龄和精液参数相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(7): 608-612.

- [17] ASHOK A, KARTIKEYA M, RAKESH S. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update[J]. J Reprod Immunol, 2008, 59(1): 2-11.
- [18] AYDOS O S. Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men[J]. Turk J Urol, 2015, 41(4): 191-197.

(收稿日期: 2020-06-16 修回日期: 2020-09-30)