

## 获卵数结合精子DNA碎片指数及精液参数 对R-ICSI的预判价值

谭艳, 贡雪凤, 龙文香

(株洲市妇幼保健院, 湖南 株洲 412000)

**摘要:** **目的** 探讨短时体外受精 (IVF) 受精时受精失败的影响因素, 为选择恰当的助孕方式提供依据。**方法** 回顾性分析株洲市妇幼保健院生殖中心 2021 年 1 月至 2023 年 9 月短时受精的 IVF 周期数据, 根据受精结果分为早期补救胞质内单精子注射 (R-ICSI) 组 ( $n=49$  例) 和短时 IVF 组 ( $n=402$  例), 比较不孕不育夫妇各项数据资料, 包括双方年龄、不孕类型、不孕年限、促性腺激素 (Gn) 天数、Gn 总量、获卵数、女方体重指数 (BMI)、促卵泡激素 (FSH)、抗米勒管激素 (AMH) 和精液体积、精子浓度、前向运动 (PR) 精子、正常精子形态和精子 DNA 碎片指数 (DFI)。**结果** R-ICSI 组获卵数、精子浓度、正常精子形态、DFI 与短时 IVF 组比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 而双方年龄、不孕类型、不孕年限、Gn 天数、Gn 总量、女方 BMI、FSH、AMH、精液体积、PR 级精子与短时 IVF 组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。R-ICSI 组获卵数  $<5$  枚和  $\geq 30$  枚的比例异于短时 IVF 组, 同时轻度少精子症和中度畸形精子症比例也高于短时 IVF 组 ( $P<0.05$ )。**结论** 当获卵数  $<5$  枚或者  $\geq 30$  枚时, 遇到精子浓度异常、精子正常形态率异常、DFI 异常的情况, 尤其是在这几项指标同时出现异常时, 提示患者存在受精障碍的概率较大, 可尽早实行 R-ICSI, 提高卵子利用率。

**关键词:** 早期补救胞质内单精子注射; 获卵数; 精子浓度; 正常精子形态; 精子 DNA 碎片指数  
**中图分类号:** R321-33

## Predictive value of egg count combined with sperm DNA fragment index and semen parameters for R-ICSI

TAN Yan, GONG Xuefeng, LONG Wenxiang

(Women and Children Healthcare Hospital of Zhuzhou, Zhuzhou, Hunan 412000, China)

**Abstract:** **[Objective]** To explore the influencing factors of fertilization failure during short-term *in vitro* fertilization (IVF), in order to provide a basis for selecting appropriate pregnancy assistance methods. **[Methods]** The IVF cycle data of short-term fertilization at the Reproductive Center of Women and Children Healthcare Hospital of Zhuzhou from January 2021 to September 2023 were retrospectively analyzed. According to the fertilization results, the patients were divided into the rescue intra cytoplasmic sperm injection (R-ICSI) group ( $n=49$ ) and the short-term IVF group ( $n=402$ ). The data of infertile couples were compared, including age, type of infertility, duration of infertility, number of Gn days, total Gn count, number of eggs obtained, female body mass index (BMI), follicle-stimulating hormone (FSH), anti-Müllerian hormone (AMH), semen volume, sperm concentration, forward movement (PR grade) sperm, normal sperm morphology and sperm DNA fragmentation index (DFI). **[Results]** There were significant differences in egg count, sperm concentration, normal sperm morphology, DFI between the R-ICSI group and the short-term IVF group ( $P<0.05$ ), while there were no significant differences in age, infertility type, infertility years, Gn days, Gn total, female BMI, FSH, AMH, semen volume, PR grade sperm between the two groups ( $P>0.05$ ). The proportion of eggs obtained in the R-ICSI group was significantly different from that in the short-term IVF group, with a count of  $<5$  and  $\geq 30$  eggs. At the same time, the proportion of mild oligospermia and moderate dysspermia was also significantly higher than that in the short-term IVF group ( $P<0.05$ ). **[Conclusion]** When the number of eggs obtained is  $<5$  or  $\geq 30$ , abnormal sperm concentration, normal sperm morphology, and abnormal DFI are encountered, especially when these indicators are abnormal at the same time, indicating a higher probability of fertilization disorders in patients. R-ICSI can be implemented as soon as possible to improve egg utilization rate.

**Keywords:** rescue intra cytoplasmic sperm injection; number of retrieved oocytes; sperm concentration; normal sperm morphology; sperm DNA fragmentation index

在体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 助孕过程中, 体外受精的失败不可避免, 发生率为 5%~20%, 其可能的原因是精卵功能异常或精卵结合障碍, 但很难在每个受精失败周期中进行研究以明确原因<sup>[1]</sup>。低受精的发生大大降低了卵子利用率, 尽管已经证实短时 IVF 结合早期补救卵胞质内单精子注射 (rescue intra cytoplasmic sperm injection, R-ICSI) 可有效降低周期取消率, 但临床上体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 失败的预测仍非常困难。为了进一步明确受精失败的原因, 本文回顾性分析了株洲市妇幼保健院生殖中心 2021 年 1 月至 2023 年 9 月实行早期 R-ICSI 的病例资料, 以确定短时 IVF 失败的影响因素, 为选择恰当的助孕方式提供依据, 现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

回顾分析 2021 年 1 月至 2023 年 9 月于株洲市妇幼保健院生殖中心首次 IVF-ET 助孕且行早期 R-ICSI 的病历资料 49 例作为 R-ICSI 组, 并将同时期短时 IVF 受精且受精率 $\geq 70\%$  的 402 例病历资料作为短时 IVF 组。两组患者均排除结核、子宫内膜异位症及宫腔病变, 近 3 个月未应用过激素类药物, 夫妇双方染色体正常, 并排除获卵数 $\leq 3$  枚的取卵周期。

### 1.2 控制性促排卵

根据患者情况采用本中心标准黄体期长方案、卵泡期长方案、拮抗剂、以及高孕激素状态下促排卵方案 (progestin primed ovarian stimulation, PPOS) 等进行促排卵治疗。根据患者卵巢反应、激素水平及卵泡大小调整促性腺激素 (gonadotropins, Gn) 剂量, 当卵泡直径和激素水平达到扳机标准时, 给予剂量为 5 000~10 000 IU 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 进行扳机, 36 h 后进行超声引导下取卵。所有患者均签署了知情同意书。

### 1.3 精液参数测定

取卵当天男方手淫法取精, 按照《人类精液检查与处理实验室手册》(第五版) 进行精液参数检测及判定。正常精液参数为: 精子总数 $\geq 39 \times 10^6$  (每次射精); 精子活力正常为: 前向运动 (progressive motility, PR) 精子 $\geq 32\%$ ; 精子形态正常为: 正常形态精子 $\geq 4\%$ 。精液参数异常按程度分为轻度、中度、重度。少精子症为精子数量异常: 轻度少精子症为  $10 \times 10^6/\text{mL} \leq$  精子浓度  $< 15 \times 10^6/\text{mL}$ ;

中度少精子症为  $5 \times 10^6/\text{mL} \leq$  精子浓度  $< 10 \times 10^6/\text{mL}$ ; 重度少精子症为  $1 \times 10^6/\text{mL} \leq$  精子浓度  $< 5 \times 10^6/\text{mL}$ ; 极度少精子症  $< 1 \times 10^6/\text{mL}$ 。精子活力异常被定义为弱精子症: 轻度弱精子症为  $20\% \leq \text{PR} < 32\%$ ; 中度弱精子症为  $10\% \leq \text{PR} < 20\%$ ; 重度弱精子症为  $1\% \leq \text{PR} < 10\%$ ; 极度弱精子症  $\text{PR} < 1\%$ 。正常精子形态异常被定义为畸形精子症: 轻度畸形精子症为  $3\% \leq$  正常形态精子  $< 4\%$ ; 中度畸形精子症为  $2\% \leq$  正常形态精子  $< 3\%$ ; 重度畸形精子症为  $1\% \leq$  正常形态精子  $< 2\%$ ; 极度畸形精子症为正常形态精子  $< 1\%$ 。由于极度少、极度弱、极度畸精子症是卵胞质内单精子注射 (intra cytoplasmic sperm injection, ICSI) 的绝对适应证, 不能进行 IVF 受精, 因此本研究不涉及极度少、极度弱、极度畸精子症。

### 1.4 精子 DNA 碎片指数测定

应用精子染色质扩散法 (sperm chromatin dispersion, SCD) 检测精子 DNA 碎片指数 (DNA fragmentation index, DFI), 试剂盒购自深圳市博瑞德生物科技有限公司, 具体操作参照说明书。DFI 结果判定标准: 根据晕环与精子头部直径比例, 分为大晕环、中晕环、小晕环、无晕环以及退化精子。计算公式:  $\text{DFI} = (\text{小晕环} + \text{无晕环} + \text{退化}) / \text{精子} / \text{计数精子总数} \times 100\%$ 。

### 1.5 体外受精

取卵当日在卵冠丘复合体 (oocyte corona cumulus complex, OCCC) 取出后 2~4 h 进行常规 IVF 加精, 授精后 4~6 h 拆除颗粒细胞, 倒置显微镜下观察第二极体是否出现。若出现第二极体的卵母细胞少于成熟卵母细胞的 30%, 则进行 R-ICSI。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSSAU 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 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  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基本情况比较

两组患者间双方年龄、不孕类型、不孕年限、女方体重指数 (body mass index, BMI)、促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、抗米勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)、Gn 天数、Gn 总量、精液体积、PR 级精子比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而两组间获卵数、精子浓度、正常精子形态、DFI 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组基本情况比较

资料	R-ICSI(n=49)	短时 IVF(n=402)	$t/\chi^2$	P
女方年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	32.69±4.84	33.17±4.87	0.134	0.894
男方年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	33.94±5.84	34.76±4.14	0.145	0.885
原发不孕[n(%)]	24(49.0)	167(41.5)	0.385	0.535
不孕年限( $\bar{x} \pm s$ , 年)	3.10±2.21	2.89±2.68	1.816	0.070
女方 BMI( $\bar{x} \pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	22.76±2.90	22.63±3.05	1.325	0.186
FSH( $\bar{x} \pm s$ , IU/L)	7.49±1.98	7.33±1.82	0.554	0.580
AMH( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL)	2.95±1.40	2.93±0.64	0.087	0.931
Gn 天数( $\bar{x} \pm s$ , d)	9.69±2.14	9.36±2.35	0.624	0.533
Gn 总量( $\bar{x} \pm s$ , IU)	2 430.87±579.01	2 256.64±510.77	0.174	0.862
获卵数( $\bar{x} \pm s$ , 枚)	11.96±6.43	9.80±6.43	2.097	0.037
精液体积( $\bar{x} \pm s$ , mL)	2.95±1.35	2.94±1.26	0.457	0.678
PR 级精子( $\bar{x} \pm s$ , %)	29.51±9.98	31.99±10.04	0.898	0.359
精子浓度/ ( $\bar{x} \pm s$ , ×10 <sup>6</sup> /mL)	53.61±29.00	65.68±27.59	2.153	0.032
精子正常形态/ ( $\bar{x} \pm s$ , %)	3.86±1.46	5.15±2.13	2.511	0.012
DFI( $\bar{x} \pm s$ , %)	16.57±12.22	13.17±10.25	2.127	0.034

表 2 两组获卵数比较 [n(%)]

组别	n	N<5	5≤N<10	10≤N<15	15≤N<20	20≤N<30	N≥30
R-ICSI	49	5(10.20)	15(30.6)	16(32.5)	7(14.3)	4(8.2)	2(4.2)
短时 IVF	402	104(25.9)	102(25.4)	104(25.9)	58(14.4)	32(8.0)	2(0.4)
$\chi^2$		3.970	0.355	0.573	0.001	0.002	6.101
P		0.046	0.551	0.449	0.975	0.964	0.014

注：N——获卵数（枚）。

表 3 两组精子浓度比较 [n(%)]

组别	n	精子浓度正常	轻度少精子症	中度少精子症	重度少精子症
R-ICSI	49	43(87.8)	2(4.1)	2(2.0)	2(2.0)
短时 IVF	402	396(98.5)	2(0.5)	2(0.5)	2(0.5)
$\chi^2$		0.275	6.101	6.101	6.101
P		0.600	0.104	0.014	0.014

表 4 两组精子形态比较 [n(%)]

组别	n	精子形态正常	轻度畸形精子症	中度畸形精子症	重度畸形精子症
R-ICSI	49	25(44.9)	14(28.6)	8(16.3)	2(4.1)
短时 IVF	402	310(77.1)	58(14.4)	28(7.0)	6(1.5)
$\chi^2$		2.609	4.314	4.161	1.590
P		0.106	0.037	0.041	0.207

表 5 两组 DFI 比较 [n(%)]

组别	n	DFI<15%	15%≤DFI<30%	DFI≥30%
R-ICSI	49	28(57.1)	15(30.6)	6(12.3)
短时 IVF	402	276(68.7)	95(23.6)	31(7.7)
$\chi^2$		0.543	0.672	0.979
P		0.461	0.412	0.322

## 2.2 两组获卵数比较

R-ICSI 组中获卵数量为<5 枚或≥30 枚时，与短时 IVF 组比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )，而当获卵数在≥5 枚及<30 枚之间时，两组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 2。

## 2.3 两组精子浓度比较

两组中度、重度少精子症比例比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 3。

## 2.4 两组精子形态比较

两组轻度及中度畸形精子症的比例比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 4。

## 2.5 两组 DFI 比较

虽然两组总体 DFI 比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (见表 1)，但在正常值 ( $DFI<15%$ )、临界值 ( $15%\leq DFI<30%$ )、异常值 ( $DFI\geq 30%$ ) 时两组比较，差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 5。

## 3 讨论

受精是一个复杂的生理过程，需要精子与成熟卵母细胞之间进行精细的相互作用，包括精子获能、顶体反应、精子穿透、第二极体排出完成减数分裂、父系和母系原核的形成等。受精障碍的原因主要是少弱精子症，极度少精症、极度弱精症以及极度畸形精子症必须进行 ICSI 助孕，其他程度的精液异常在精子优化处理后能获得足够的 PR 级精子，就可以采用 IVF 受精方式，但是 IVF 受精失败的情况时有发生。即便精子的各项指标都正常，或者患者有过自然妊娠史，或者前次 IVF 受精正常，都有可能出现 IVF 失败。由于 IVF 失败的影响因素和发生机制仍不明确，临床上也难以对有受精失败风险人群进行预测，因此近年来越来越多的生殖中心开始实施短时受精，在受精迹象较差时进行 R-ICSI。但是对每个 IVF 周期均行早期去除颗粒细胞，会极大的增加实验室人员的工作量。那么，如何在既防止不受精发生的同时，又能有选择性地早期去颗粒细胞呢？基于以上想法，笔者对 2021 年 1 月至 2023 年

9 月于株洲市妇幼保健院生殖中心实行短时 IVF 和 R-ICSI 的周期资料进行了回顾,对不孕不育患者双方的资料进行分析,希望从中找到一些规律,从而为有效的预测 R-ICSI 提供依据。

本研究资料显示, R-ICSI 组不孕不育夫妇双方年龄、不孕类型、不孕年限、Gn 天数、Gn 总量、女方 BMI、FSH、AMH、精液体积、PR 级精子与短时 IVF 组比较,差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。惠燕等<sup>[2]</sup>研究发现原发性不孕及不孕时间延长会导致短时 IVF 失败风险增加,但本研究的资料显示, R-ICSI 组和短时 IVF 组不孕类型没有明显差异,并且不孕年限的增加并不会增加受精障碍的发生。有研究指出,对于获卵数 $<5$  枚的高龄患者, IVF 组的正常受精率会显著低于 ICSI 组,而且获卵数少的患者不适宜通过短时受精联合早期 R-ICSI 来避免全部受精失败<sup>[3-4]</sup>。也有研究发现过多的获卵数会导致正常受精率降低,异常受精率增加,可移植胚胎率与优质胚胎率下降,临床妊娠率、胚胎种植率与活产率的下降<sup>[5-6]</sup>,这可能是因为在促排卵过程中超生理剂量的促性腺激素的使用以及超生理的高雌状态,可能破坏卵母细胞的发育调控和同步性,导致核质成熟的不同步,降低卵母细胞的成熟率,进而影响 IVF 受精率<sup>[7]</sup>。与之相似,本研究也发现当获卵数 $<5$  枚或者获卵数 $\geq 30$  枚时,短时 IVF 组与 R-ICSI 组比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

陈其桂等<sup>[8]</sup>认为,精子正常形态率与受精率存在显著相关性。本研究资料中发现, R-ICSI 组患者中,精子正常形态的比例明显降低,尤其是对于合并了精子浓度异常的患者来说,进行 R-ICSI 的概率也增加,可以认为该类患者更容易发生受精障碍。不同于张娜等<sup>[9]</sup>的研究,笔者发现 R-ICSI 组 PR 级精子比例与短时 IVF 组相比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),这可能与笔者对 IVF 精子优化处理的方式相关。笔者在用不连续梯度离心法处理完成后,会继续上游精子 30 min,进行 IVF 授精时 PR 级精子 $\geq 99\%$ ,因此两组资料显示 PR 级精子并没有明显差异。

有研究显示, DFI 与精子活力、前向运动率呈负相关, DNA 损伤严重的精子引起其线粒体呼吸代谢功能明显降低,精子 DNA 损伤可能是导致弱精子症的重要原因之一<sup>[10]</sup>。LIU 等<sup>[11]</sup>在 DFI 水平高的男性进行 IVF-ET/ICSI 周期中仍然观察到较高的自发性流产率,这表明两种受精方法并不能筛选出 DNA 损伤的精子并排除其对 IVF-ET/ICSI 的

不利影响。从数据中可以看出,虽然将 DFI 进行正常值、临界值、异常值分组之后进行比较, R-ICSI 组和短时 IVF 组间差异并无统计学意义 ( $P<0.05$ ),但 R-ICSI 组的总体 DFI 指标与短时 IVF 组比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),因此在选择助孕方式时,要重点关注 DFI 这个精子参数指标。

综上所述,当获卵数 $<5$  枚或者 $\geq 30$  枚时,遇到精子浓度、正常精子形态、DFI 异常的情况,尤其是在这几项指标同时出现异常时,提示患者存在受精障碍的概率较大,可尽早实行 R-ICSI,提高卵子利用率。但是,造成受精失败的原因很多,本研究的病例数据不足,仍需要总结更多的经验来得出更准确的结论,便于对早期 R-ICSI 进行预测,使其更具有临床及实验室参考意义。

#### 参 考 文 献

- [1] GLENN TL, KOTLYAR AM, SEIFER DB. The impact of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility—a critical review[J]. J Clin Med, 2021, 10(12): 2616.
- [2] 惠燕,周晗璟,罗金,等. 短时体外受精周期中受精失败的影响因素分析[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(3): 289-295.
- [3] LIPERIS G, SHARMA K, AMMAR OF, et al. #ESHREjc report: are sperm selection techniques a panacea? Indications for the use of physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI) in medically assisted reproduction[J]. Hum Reprod, 2022, 37(10): 2492-2496.
- [4] 蒋彦,袁景川,耿彩平,等. 改良 IVF 正常受精率计算公式在获卵少周期中的应用及资料分析[J]. 生殖医学杂志, 2023, 32(2): 208-213.
- [5] 高文怡,张东,李采霞,等. 胚胎实验室解读: 获卵数对体外受精妊娠结局的影响[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(24): 3871-3876.
- [6] 路红琴,何玉洁. 长方案 IVF/ICSI 周期中女性年龄和获卵数对妊娠结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(9): 1017-1026.
- [7] LATTES K, CHECA MA, VASSENA R, et al. There is no evidence that the time from egg retrieval to embryo transfer affects live birth rates in a freeze-all strategy[J]. Hum Reprod, 2017, 32(2): 368-374.
- [8] 陈其桂,李大文,谭卫红,等. 精子正常形态率、顶体完整率及顶体反应率与补救 ICSI 结局相关性研究[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(12): 1581-1586.
- [9] 张娜,张轶,乜照燕,等. 189 例早补救 ICSI 患者的精液参数分析[J]. 中国男科学杂志, 2016, 30(7): 46-49.
- [10] 曲仕浩,罗英,周益平,等. 精子 DNA 碎片指数对体外受精胚胎及囊胚发育的影响[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(12): 1650-1652.
- [11] LIU H, ZHAO HB, YU GL, et al. Conventional *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI): which is preferred for advanced age patients with five or fewer oocytes retrieved?[J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 297(5): 1301-1306.

(张咏 编辑)