

·临床研究·

单精子冷冻和常规冷冻对显微取精患者的胚胎培养及妊娠影响的比较

李婷婷, 刘贵华, 张靖, 孙桂花
(中山大学附属第六医院生殖医学中心, 广东广州 510655)

摘要:【目的】比较单精子冷冻和常规冷冻对显微取精患者的胚胎培养及妊娠影响。【方法】回顾性分析自2018年1月至2021年12月于中山大学附属第六医院生殖医学研究中心行显微镜取精术患者的临床资料,行单精子冷冻共39例307枚成熟卵子为单精子冷冻组,通过SPSS统计软件倾向性评分匹配女方基本助孕信息1:1匹配选择对照组,为常规冷冻组,共410枚成熟卵子,分析单精子冷冻与常规冷冻两组的受精、胚胎培养及移植后妊娠情况。【结果】单精子冷冻组和常规冷冻组的年龄、体质量指数(BMI)、不孕年限、基础卵泡刺激素(FSH)、基础黄体生成素(LH)、基础雌二醇(E2)、抗苗勒管激素(AMH)、窦卵泡计数(AFC)、获卵数、移植胚胎数等一般资料的比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);两组的受精率、可利用胚胎率、优质胚胎率比较分别为65.8% vs. 60.49%、67.82% vs. 58.87%、70.80% vs. 75.34%,差异均无统计学意义;两组的临床妊娠率为45.45% vs. 70.0%,有统计学差异($P=0.049$)。【结论】显微取精患者若获取精子极少,为增加每颗精子利用机会以及保证后续助孕精子解冻后获取精子,单精子冷冻可为有效选择,但临床妊娠率下降,因例数限制,对后续妊娠的影响还需增加例数再观察分析。

关键词:显微取精术;单精子冷冻;受精率;可利用胚胎率;优质胚胎率;临床妊娠率

中图分类号:R714.8

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)01-0145-05

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0120

Comparison of the Effects of Single Sperm Cryopreservation and Conventional Cryopreservation on Embryo Culture and Pregnancy in Patients Undergoing Micro-TESE

LI Ting-ting, LIU Gui-hua, ZHANG Jing, SUN Gui-hua

(Reproductive Medicine Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Correspondence to: SUN Gui-hua; E-mail: sungh3@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To compare the effects of single sperm cryopreservation and conventional cryopreservation on embryo culture and pregnancy in patients undergoing microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE).【Methods】A retrospective analysis was done on the patients who underwent micro-TESE at the Reproductive Medicine Center in the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University between January 2018 and December 2021. The single sperm cryopreservation group included 39 patients undergoing single sperm cryopreservation and 307 MII oocytes. The conventional cryopreservation group included 39 patients undergoing conventional cryopreservation and 410 MII oocytes. Propensity score matching (PSM) was performed to balance the selection bias. The fertility rate, embryo culture and pregnancy of these two groups were compared.【Results】There was no statistical difference in age, body mass index (BMI), years of infertility, basal FSH, basal LH, basal E2, AMH, AFC, number of oocytes retrieved and number of transferred embryos between the two groups ($P>0.05$). No significant difference was found in fertilization rate (65.8% vs. 60.49%), available embryo rate (67.82% vs. 58.87%) and high-quality embryo rate (70.80% vs. 75.34%). The single sperm cryopreservation

收稿日期:2022-07-01

基金项目:广东省科技计划项目(2020A1414010112)

作者简介:李婷婷,主治医师,研究方向:生殖医学,E-mail:litt33@mail.sysu.edu.cn;孙桂花,通信作者,研究方向:生殖医学,E-mail:sungh3@mail.sysu.edu.cn

group had significantly lower clinical pregnancy rate than conventional cryopreservation group (45.45% vs. 70.0%, $P=0.049$).【Conclusion】 If the patients undergoing micro-TESE have very few sperms, single sperm cryopreservation could be an effective choice to increase the utilization of each sperm and ensure the subsequent sperm retrieval after thawing, but the clinical pregnancy rate is decreased. Due to the limited number of cases, we need a large additional number of cases to observe and analyze.

Key words: micro-TESE; single sperm cryopreservation; fertilization rate; available embryo rate; high-quality embryo rate; clinical pregnancy rate

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(1): 145-149]

我国育龄夫妇的不孕不育率约12%~18%,其中男方因素约占1/3。男性不育的病因复杂,其中无精子症是导致男性不育的重要原因之一^[1]。临床上严重少精子症和无精子症患者主要是通过显微睾丸精子提取术(micro-TESE)获取少量精子再结合卵胞浆内精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术以获得良好的妊娠结局,妊娠率可达72.4%^[1-2],其中精子冷冻是显微取精术后的一个关键步骤,在显微镜下取出来的精子做精子冷冻保存,可以避免取卵日时无精子可用而取消授精和减少反复穿刺带来的疼痛与负担,这技术很大程度上保存了男性生殖能力,然而常规冷冻方法会损失掉部分冻融精子,这对本来精子数量有限的患者来说增加了助孕难度,而单精子冷冻技术的提出减少了常规冷冻方法的不足^[3]。国内外不少研究表明,单精子冷冻方法是对极度少精子症患者保存生育能力有效方法^[4-5],有研究已探讨了单精子冷冻对胚胎培养及临床应用的结局的影响^[6-7]。目前,相比于常规精子冷冻,单精子冷冻方法是否能提高胚胎培养和妊娠结局尚无研究观察和评估。因此,我们进行回顾性分析单精子冷冻和常规精子冷冻,冻融后进行ICSI的受精率、可利用胚胎率等实验指标和临床妊娠结局,评估单精子冷冻对这显微取精患者的效用价值,以便更好地指导临床工作。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

选择2018年1月至2021年12月于中山大学附属第六医院生殖医学研究中心行显微镜取精术患者的临床资料,行单精子冷冻得39例307枚成熟卵子为单精子冷冻组,通过SPSS统计软件倾向性评分匹配女方基本助孕信息1:1匹配选择对照组,为常规冷冻组,共410枚成熟卵子。所有患者在体外受精治疗前均给予书面知情同意提取其医疗记录。此研究获得中山大学附属第六医院机构伦理批件(2017ZSLYEC-016S)。

1.2 方 法

1.2.1 促排卵方案 根据女方卵巢储备状态采用适当的控制性卵巢刺激(control ovarian stimulation, COS)方案,当卵

泡监测到2枚卵泡达到 ≥ 18 mm或3枚卵泡达到 ≥ 17 mm时,注射250 μg 重组HCG(注射用重组人绒毛促性素,艾泽,默克雪兰诺,每支250 μg),在注射34~38 h后在B超引导下取卵。

1.2.2 精子获取方法及精子冷冻方法 在取卵日前经过显微取精子术获取含有精子的生精小管,在显微镜下寻找足够的精子,根据精子的情况采用单精子冷冻方法或常规冷冻方法保存精子。本中心单精子冷冻采用的是微滴冷冻法,通过显微操作仪和ICSI针将精子加入用冷冻保护剂制成超薄冷冻载体的液滴中,再通过一系列降温程序处理进行冷冻处理,本中心采用此法进行冷冻的患者精子回收率是100%。常规冷冻方法是将处理后的精子加冷冻保护剂后放入商品化的冷冻管里进行直接冷冻的方法,此方法简单方法,操作难度小,不需要用到显微操作仪。

1.2.3 冻融、胚胎培养、移植 在取卵日时根据精子冷冻的方法复苏冷冻的精子后,在显微镜观察下选择有活动的精子行ICSI,体外培养观察卵子受精/胚胎培养情况,取卵后第3天(D3)在B超引导下可用胚胎移植1~2枚,若新鲜周期因各种原因取消移植,D3冷冻保存2枚胚胎,剩余胚胎囊胚培养后若形成囊胚行冷冻保存,后续再行冻胚移植。

1.3 妊娠结局判断及随访

移植后7周时行B超检查,宫腔内见孕囊及原始心管搏动,即诊断为临床妊娠。所有患者资料随访至2022年3月。

1.4 统计分析

数据分析采用SPSS统计软件(25.0版本)。计量资料为连续变量用均值 \pm 标准差表示,并用独立样本 t 检验进行比较;不符合正态分布用中位数(四分位数范围)表示,用Mann-Whitney U 检验进行比较;分类变量用比例表示,并用卡方检验进行比较。 P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料

本研究两组患者的年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、不孕年限、基础促黄体生成素(luteinizing hormone,

LH)、基础雌二醇(estradiol, E2)等基本特征差异无统计学意义($P>0.05$;表1);两组的获卵数、成熟卵子数和移植胚胎数分别为(13.20±6.75) vs. (13.50±10.45)、(8.08±4.42) vs. (10.51±8.59)、(1.76±0.44) vs. (1.99±0.27),差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 胚胎培养和移植后妊娠情况

两组的受精率、可利用胚胎率、优质胚胎率分别为65.80% vs. 60.49%、67.82% vs. 58.87%、70.80% vs. 75.34%,差异均无统计学意义(表2)。常规精子冷冻组累积临床妊娠率为70.0%,单精子冷冻组的累积临床妊娠率为45.45%,两组比较有统计学差异($P=0.049$;表2)。

3 讨论

目前我国育龄夫妇的不孕不育率在逐年增加,男方因

素是导致不孕不育的重要因素,而极度少精子症和无精子症是男性不育的重要原因。显微镜取精术适用于无精子症的情况下取得有限的精子,精子冷冻是显微取精术后冷冻保存的不可或缺的环节,最佳的冷冻方法对他们的生育能力保存至关重要,因此单精子冷冻方法是针对这类患者保存少量精子的重要方法,其优点在于能完整保存该类患者精子且减少了精子冻融后的损失^[4-5],并且在单精子冷冻前能有效确认每条精子的情况,减少其他死亡精子细胞产生有害物质来影响正常精子的保存^[8],这极大程度地保存男方的生育能力。单精子冷冻方法自1997年Cohen等最先提出并证实该法可行后^[9],国内外的研究重点大多数在于探索对单精子冷冻方法的冷冻载体^[4, 10],目前临床上单精子冷冻方法的应用相对较少,其后续胚胎培养和临床结局缺乏统计分析,虽然有部分研究报道了单精子冷冻冻融后精子的复活率和临床妊娠结局的情况,但文章的报道仅限于少量的案例的研究^[11-14]。

表1 两组基本情况的比较

Table 1 Comparison of general data between 2 groups

$[(\bar{x} \pm s), M(P_{25}, P_{75})]$

Items	Single sperm cryopreservation group	Conventional cryopreservation group	<i>t/U</i>	<i>P</i>
No. of patients	39	39		
No. of oocytes	462	513		
No. of MII oocytes	307	410		
Female age/years	28.49±3.20	28.51±3.08	0.036	0.971
Male age/years	31.31±6.05	30.56±3.98	-0.641	0.523
BMI	21.32±3.04	21.92±2.72	-0.617	0.359
Duration of sterility/years	3.74±2.94	3.38±2.00	-0.922	0.539
Basal FSH/(U/L)	7.20(7.17~7.22)	6.83(6.80~6.86)	-0.589	0.119
Basal LH/(U/L)	6.59±4.59	5.33±2.69	-1.410	0.163
Basal E2/(pg/mL)	51.53±28.77	39.30±21.68	-0.201	0.049
AMH/(ng/mL)	3.78±3.03	3.53±2.06	-0.417	0.678
AFC	14.38±7.39	14.36±6.52	-0.016	0.987
No. of retrieved oocytes	13.20±6.75	13.50±10.45	0.144	0.886
No. of M II	8.08±4.42	10.51±8.59	1.557	0.124
No. of embryos transferred	1.76±0.44	1.99±0.27	1.224	0.231

BMI: body mass index; Basal FSH: Basal follicle stimulating hormone; Basal LH: Basal luteinizing hormone; Basal E2: Basal estradiol; AMH: anti mullerian hormone; AFC: antral follicle count.

因此,我们对我院生殖中心新鲜移植周期中307枚卵子和410枚卵子分别与单精子冷冻方法和常规冷冻方法的冻融精子行ICSI后的受精情况和胚胎培养的结果进行统计分析,探讨单精子冷冻和常规冷冻两种方法对胚胎培养和妊娠结局的影响。本研究结果显示两组受精率相似,差异

无统计学意义,而单精子冷冻的临床妊娠率相对较低。有研究表明单精子冷冻能有效提高精子活动的恢复率和受精率^[11, 15-16],这与我们研究结果一致,其中Sun等^[15]的研究中纳入了4名严重少精子症或非梗阻性无精子症患者的精子进行单精子冷冻,在取部分精子进行解冻复苏行常规ICSI

表2 两组的胚胎培养和移植后妊娠情况比较

Table 2 Comparison of embryo culture and pregnancy situation between 2 groups [% (n/N)]

Items	Single sperm cryopreservation group	Conventional cryopreservation group	χ^2	P
Fertility rate/%	65.80(202/307)	60.49(248/410)	2.118	0.146
Available embryos rate/%	67.82(137/202)	58.87(146/248)	3.822	0.051
High quality embryo rate/%	70.80(97/137)	75.34(110/146)	0.741	0.389
Cumulative clinical pregnancy rate/%	45.45(15/33)	70.00(21/30)	3.866	0.049

后成功受精胚胎有22个(受精率73%),最终有3例成功分娩了4个健康婴儿。在马超^[16]的研究中,他们纳入了总共15例患者探讨了单精子冷冻技术下解冻复苏的精子与新鲜精子行ICSI后的受精情况进行了对比,他们研究结果表明了冷冻复苏的精子与新鲜精子具有相似的受精率,均具有较高的受精能力。总结这两项研究,我们能相信无论是单精子冷冻还是常规冷冻均与新鲜精子一样具有较高的受精能力,可以解释有:①随精子冷冻技术的发展与完善精子的冷冻和复苏成活率大大提升;②我们研究的对象都是严重少精子症或无精子症患者,有研究报道精子的活动度不代表精子的受精能力,精子活动度低的仍然有受精能力^[17]。

在Sun^[15]的文章中也表明了单精子冷冻能提高成功怀孕的结果,而本研究中单精子冷冻组临床妊娠率较低,这可以解释为:①Sun的研究仅报道了单精子冷冻方法的胚胎培养及临床结局,但没有对常规冷冻方法做对比;②患者都有个体差异,个体的差异很大程度能影响研究的结果,Sun的研究中仅采用4例,本研究纳入了单精子冷冻的有39例,Sun的研究例数相对太少;③Sun研究中采用的单精子冷冻方法中冷冻保护介质和冷冻速率不同对精子影响可能不一样,Sun研究中采用的单精子冷冻方法与本院采用的冷冻方法不同,这得出的结果会存在一定的差异。还有研究纳入了共12例患者经过多种取精方法提取出精子进行单精子冷冻,总体的受精率达65.9%,临床妊娠率为58.3%^[18],与我们的研究结果相一致。最近一篇关于单精子冷冻的荟萃分

析,得出单精子冷冻解冻后受精率为63%(95%CI,58%~67%),妊娠率为57%(95%CI,39%~74%)^[6],这跟我们研究结果相符。

但是我们的统计结果中单精子冷冻的妊娠率比常规冷冻的低($P=0.049$),这可能的原因是:①虽然我们将女方的基本助孕信息进行了1:1匹配,但是因为本研究案例数量有限,这可能是数据的离散值影响所造成的;②有研究评估了精子冷冻保存对裂解阶段胚胎质量和囊胚形成机会的影响,他们结果表明在冷冻保存的精子形成的卵裂期胚胎质量无明显影响,但确实影响了囊胚形成的机会^[19]。本研究对象为极重度少精子症和无精子症患者,进行单精子冷冻的患者生精功能可能更差,获取的精子量更稀少,每个精子都用来授精,不排除一些异常精子仍然选择了被使用,在受精成胚胎的第2或第3天并不能完全显现出来,但会影响囊胚的形成从而影响了后续的怀孕;③本研究案例数量有限,这些患者取出的精子量少,而新鲜周期中卵母细胞数量足够,造成胚胎培养虽然结果较好,而没有提高临床妊娠率,若要探讨单精子冷冻对临床结局的效果仍需要大量的研究例数。

综上所述,单精子冷冻可为显微取精获取精子量极少的患者的优先选择,以确保利用好每颗精子,提高ICSI受精率,因例数限制,对后续妊娠的影响还需增加例数再次分析。

参考文献

- [1] Göktolga Ü, Izetbegovic S, Rama A, et al. The first report from bosnia and herzegovina on micro-tese results in azoospermic patients[J]. Med Arch, 2015, 69(3): 196-199.
- [2] 张靖, 刘贵华, 赵鲁刚, 等. 显微取精术治疗非梗阻性无精子症的疗效分析(附196例报告)[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(9): 804-807.
- [3] 王辉田, 李涛, 李晓明, 等. 微量精子冷冻复苏行卵胞浆内单精子注射的临床结局[J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(8): 613-617.
- [4] Zhang J, Liu GH, Zhao LG, et al. Micro-dissection testicular sperm extraction for patients with non-obstructive azoospermia: a report of 196 cases[J]. Natl J Androl, 2017, 23(9): 804-807.

- Wang HT, Li T, Li XM, et al. The clinical outcomes of ICSI with micro amount of frozen-thaw sperm [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2018, 34(8): 613-617.
- [4] Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 41.
- [5] Araki Y, Yao T, Asayama Y, et al. Single human sperm cryopreservation method using hollow-core agarose capsules [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(4): 1004-1009.
- [6] Huang C, Gan RX, Hu JL, et al. Clinical benefit for cryopreservation of single human spermatozoa for ICSI: a systematic review and meta-analysis [J]. *Andrology*, 2022, 10(1): 82-91.
- [7] Desai N, Goldberg J, Austin C, et al. Cryopreservation of individually selected sperm: methodology and case report of a clinical pregnancy [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(5): 375-379.
- [8] Oraipoulou C, Vorniotaki A, Taki E, et al. The impact of fresh and frozen testicular tissue quality on embryological and clinical outcomes [J]. *Andrologia*, 2021, 53(5): e14040.
- [9] Cohen J, Garrisi G J, Congedo-Ferrara TA, et al. Cryopreservation of single human spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(5): 994-1001.
- [10] 侯建文, 孟祥黔, 钟影. 单精子冷冻研究进展 [J]. *中华男科学杂志*, 2018, 24(5): 447-451.
Hou JW, Meng XQ, Zhong Y. Current progress in single sperm cryopreservation [J]. *Natl J Androl*, 2018, 24(5): 447-451.
- [11] Maleki B, Khalili MA, Gholizadeh L, et al. Single sperm vitrification with permeable cryoprotectant-free medium is more effective in patients with severe oligozoospermia and azoospermia [J]. *Cryobiology*, 2022, 104: 15-22.
- [12] 曹晓敏, 刘丽, 方祺, 等. 非梗阻性无精子症患者显微取精术联合单精子冷冻技术助孕1例报告 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(10): 1408-1410.
Cao XM, Liu L, Fang Q, et al. A case report of assisted pregnancy by microsection and single sperm cryotherapy in patients with non obstructive azoospermia [J]. *Chin J Fam Plann*, 2019, 27(10): 1408-1410.
- [13] 张静雯, 伍捷阳, 池霖生, 等. 睾丸不动精子行卵细胞浆内单精子注射的临床效果分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(7): 107-109.
Zhang JW, Wu JY, Chi LS, et al. The analysis on the clinical effect of intracytoplasmic sperm injection with testicular immobile sperm [J]. *Chin J Birth Health Heredity*, 2013, 21(7): 107-109.
- [14] 朱序理, 周亮, 王跃, 等. 不同精子来源质量冷冻方式与妊娠结局的关联性分析 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2021, 59(6): 86-93.
Zhu XL, Zhou L, Wang Y, et al. Correlation analysis of freezing methods with different sperm sources and pregnancy outcomes [J]. *J Shandong Univ Sci*, 2021, 59(6): 86-93.
- [15] Sun J, Chen W, Zhou L, et al. Successful delivery derived from cryopreserved rare human spermatozoa with novel cryopiece [J]. *Andrology*, 2017, 5(4): 832-837.
- [16] 马超, 胡明广, 金波. 封闭式薄片法在睾丸单精子冷冻保存中的应用探索 [J]. *中国当代医药*, 2017, 24(24): 19-21; +24.
Ma C, Hu MG, Jin B. Application of closed-sheet method for individual numbers of testicular spermatozoa cryopreservation [J]. *China Mod Med*, 2017, 24(24): 19-21; +24.
- [17] Jellad Ammar S, Arfaoui R, Hammami F, et al. Does cryopreservation of testicular sperm affect ICSI outcomes in azoospermia? [J]. *Tunis Med*, 2020, 98(7): 581-587.
- [18] Coetzee K, Ozgur K, Berkkanoglu M, et al. Reliable single sperm cryopreservation in Cell Sleepers for azoospermia management [J]. *Andrologia*, 2016, 48(2): 203-210.
- [19] Belenky M, Itzhakov D, Freger V, et al. Optimizing the protocol for vitrification of individual spermatozoa by adjusting equilibration time [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2020, 66(3): 223-228.

(编辑 余菁)