

畸型精子症患者精子DNA完整性与年龄及常规精液参数的关系

郭丽媛, 周 华, 王晓蔓, 刘 敏

(广州医科大学附属第三医院妇产科研究所//广东省普通高校生殖与遗传重点实验室, 广东 广州 510150)

摘要:【目的】探讨畸型精子症患者的精子DNA完整性与年龄及常规精液参数的相关关系。【方法】收集2013年1月至2016年12月在我院生殖中心就诊的255例畸型精子症患者的精液标本,将患者按年龄分为 ≤ 30 岁、30~35岁和 ≥ 35 岁3组,按WHO第5版手册进行精液常规分析,采用精子染色质扩散法(SCD)检测精子DNA完整性。【结果】畸型精子症患者精子DNA碎片指数(DFI)与前向运动精子百分率(PR%)、精子总活力呈负相关($P < 0.001$; $P < 0.001$),与年龄、正常形态精子百分率(NF%)可能存在弱相关关系($P = 0.003$; $P = 0.027$)。精子浓度、总精子数与精子DFI之间的相关关系无统计学意义($P = 0.260$; $P = 0.541$)。不同年龄组患者的精子DFI水平差异具有统计学意义($P = 0.021$);年龄 ≥ 35 岁组的精子DFI水平显著高于 ≤ 30 岁组和30~35岁组($P = 0.030$, $P = 0.035$);而 ≤ 30 岁组和30~35岁组间的精子DFI水平差异无统计学意义($P = 1.000$)。年龄 ≥ 35 岁组的精子DFI异常率明显高于 ≤ 30 岁组和30~35岁组($P = 0.002$)。在年龄 ≥ 35 岁组中,年龄、PR%及精子总活力在DFI正常患者与DFI异常患者之间的差异具有统计学意义($P = 0.006$; $P < 0.001$; $P < 0.001$)。【结论】畸型精子症患者的PR%是与其精子DFI最密切相关的精子参数;年龄越大的畸型精子症患者的精子DNA完整性越差。

关键词:畸型精子症;精子DNA完整性;年龄;精液参数

中图分类号:R321-33

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2018)05-0731-05

Correlation of Sperm DNA Integrity with Age and Routine Semen Parameters in Teratozoospermic Men

GUO Li-yuan, ZHOU Hua, WANG Xiao-man, LIU Min

(Institute of Obstetrics and Gynecology//Key Lab of Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institute, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China)

Corresponding to: GUO LI-yuan; E-mail: liyuan-guo@hotmail.com

Abstract:【Objective】To study the correlation of sperm DNA integrity with age and routine semen parameters in teratozoospermic men.【Methods】Semen samples were collected from 255 teratozoospermic men between January 1, 2009 and December 31, 2016. Then we divided them into three groups according to the male age (≤ 30 , 30~35, ≥ 35 years). The results of routine semen parameters were evaluated base on the WHO Laboratory Manual (5th ed). Sperm DNA integrity was detected by sperm chromatin dispersion (SCD) test.【Results】Sperm DNA fragmentation index (DFI) was inversely correlated with 2 parameters (progressive motility% and total motility%; $P < 0.001$; $P < 0.001$) and correlated with male age and NF% weakly ($P = 0.003$; $P = 0.027$) in teratozoospermic men. The correlation of sperm DFI with sperm concentration and total sperm number was not statistically significant ($P = 0.260$; $P = 0.541$). The patients in different groups showed significant difference on the level of sperm DFI ($P = 0.021$); the level of sperm DFI in ≥ 35 years group was higher than ≤ 30 years group and 30-35 years group ($P = 0.030$, $P = 0.035$); but there was no statistically significant difference of the sperm DFI level between ≤ 30 years group and 30-35 year group ($P = 1.000$). The abnormality rate of sperm DFI in ≥ 35 years group was higher than ≤ 30 years group and 30-35 years group ($P = 0.002$). The dif-

收稿日期:2018-03-27

基金项目:广东省医学科研基金(B2018227)

作者简介:郭丽媛,通信作者,医学硕士,主管技师,研究方向:生殖与遗传, E-mail: liyuan-guo@hotmail.com

ferences of age, PR% and total motility% are statistically significant between normal DFI patients and abnormal DFI patients from ≥ 35 years group ($P = 0.006$; $P < 0.001$; $P < 0.001$). 【Conclusion】 The percentage of the progressive motility is the sperm parameter which is most closely related to sperm DFI; The older teratozoospermic men have worse sperm DNA integrity than younger patients.

Key words: teratozoospermia; sperm DNA integrity; age; semen parameters

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5): 731-735]

不孕不育是当今社会的重大疾病之一。随着国家二孩政策的开放,高龄夫妇的生育需求是临床迫切需要解决的难题,其中男性因素引起的不育约占50%。近年来,人们越来越关注男性年龄对生育力的影响^[1]。有研究发现,精液体积、精子活动力以及精子形态学参数随着男性年龄的增长而显著下降^[2]。也有学者报道,不育男性年龄的增长提高了其精子DNA损伤的风险^[3]。畸形精子症作为男性不育的常见表现之一,目前发病机制尚不明确,药物治疗效果一般,一部分患者需要实施辅助生殖技术才能达到生育目的^[4]。国外研究显示,畸形精子症患者的DNA碎片率明显高于具有正常生育力的男性^[5]及正常精液参数的男性^[6]。而目前关于我国畸形精子症患者精子DNA完整性的研究报道甚少,本文旨在研究畸形精子症患者的精子DNA完整性与年龄及常规精液参数之间的相关关系,为畸形精子症患者的进一步诊治提供依据及参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013年1月至2016年12月在广州医科大学附属第三医院生殖中心就诊的不育男性255例,年龄21~57岁,精液常规分析结果:NF% < 4%,并且精子总数 $> 39 \times 10^6$ /一次射精(或精子浓度 $> 15 \times 10^6$ /mL),PR% > 32%。研究样本的采集及信息使用都经广州医科大学附属第三医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 试验分组

按患者年龄分为3组: ≤ 30 岁、30~35岁、 ≥ 35 岁。

1.3 精液常规检查

患者禁欲2~7d,手淫法完整收集精液于无

菌专用取精杯中,置于37℃恒温台上,待其完全液化后,按照WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第5版),采用计算机辅助精子分析(CASA)系统(Hamilton, USA)检测其精子浓度、总精子数及活动力,改良巴氏染色法分析精子形态。

1.4 精子DNA完整性检测(SCD法)

采用精子核DNA完整性检测试剂盒(深圳华康生物医学工程有限公司),实验步骤简述如下:用精子稀释液将精子浓度调至 $5 \sim 10 \times 10^6$ /mL,吸取60 μ L已稀释的标本加到低熔点琼脂糖管中并充分混匀。取出混匀好的30 μ L混悬液滴加至水平位置的预处理载玻片上,轻轻盖上盖玻片。将该载玻片置于4℃冰箱5min。从冰箱取出后轻轻滑动移走盖玻片。迅速将该载玻片浸入变性液中7min,取出载玻片,在蒸馏水中浸泡5s;然后取出载玻片使其竖立并用滤纸吸干玻片表面水珠;再将载玻片浸入裂解液中反应20min。反应毕,将该载玻片浸入洗涤液3min,然后将其取出依次浸入70%、90%以及无水乙醇溶液中脱水各2min。自然晾干后,用瑞士染色剂进行染色。染色完成后,待载玻片完全干燥后在常规显微镜下观察,计数400条精子,统计小晕环、无晕环和退化的异常精子的百分率,以DFI表示,DFI = 小晕环、无晕环和退化的异常精子数/计数精子总数。正常参考值:DFI < 30%。

1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相关性分析采用Spearman相关分析;由于数据方差不齐,采用Welch近似方差分析进行不同年龄组间DFI的比较,多重比较采用Dunnnett's T3方法。不同年龄组间精子DFI异常率的比较采用 χ^2 检验。在年龄 ≥ 35 岁组中DFI正常者与异常者的年龄及各参数的比较采用两个独立样本 t 检验方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的年龄、精子DNA完整性及常规精液参数结果

精子DNA完整性结果以DFI表示,常规精液参数包括精子浓度、总精子数、精子总活力、PR%、NF%(表1)。

表1 畸形精子症患者的年龄、精子DFI及常规精液参数
Table 1 The age and the results of sperm DFI and semen parameters in teratozoospermic men

(n = 255)	
Items	$\bar{x} \pm s$
Age/years	33 ± 6
DFI/%	15 ± 10
concentration (× 10 ⁶)/mL	73 ± 59
total sperm number (× 10 ⁶)	2.3 ± 1.8
total motility/%	60 ± 15
PR%/%	53 ± 14
NF%/%	1.5 ± 1

2.2 精子DFI与患者年龄及常规精液参数的相关性分析

畸形精子症患者精子DFI与PR%、精子总活力呈负相关关系($r = -0.325, P < 0.001; r = -0.317, P < 0.001$),与年龄、NF%可能存在弱相关关系($r = 0.188, P = 0.003; r = -0.138, P = 0.027$)。精子浓度、总精子数与精子DFI的相关关系无统计学意义($r = -0.071, P = 0.260; r = -0.038, P = 0.541$)。

2.3 3组患者的精子DFI水平比较

不同年龄组患者的精子DFI水平的差异具有统计学意义($P = 0.021$);年龄≥35岁组的精子DFI水平显著高于≤30岁组和30~35岁组($P = 0.030, P = 0.035$);而≤30岁组和30~35岁组间的精子DFI水平差异无统计学意义($P = 1.000$),年龄≥35岁组的精子DFI异常率明显高于≤30岁组和30~35岁组($\chi^2 = 12.158, P = 0.002$;表2)。

2.4 年龄≥35岁组中DFI正常者与异常者之间年龄及各精液参数的比较

年龄、PR%及精子总活力在DFI正常(DFI < 30%)患者与DFI异常(DFI ≥ 30%)患者之间的差异具有统计学意义($P = 0.006; P < 0.001; P < 0.001$;表3);精子浓度、总精子数及NF%在DFI正常者与异常者之间的差异没有统计学意义($P = 0.929; P = 0.142; P = 0.566$;表3)。

表2 不同年龄组的精子DFI水平比较

Table 2 Comparison of sperm DFI in different age groups

Group	≤ 30 years	30-35 years	≥ 35 years	F or χ^2	P
n	90	73	92		
DFI /%	14 ± 8	14 ± 8	18 ± 12 ¹⁾²⁾	3.957	0.021
Abnormality rate /%	3.33	5.48	17.39	12.158	0.002

Dunnett's T3 after Welch, 1) compared with the ≤ 30 years group, $P = 0.030$; 2) compared with the 30-35 years group, $P = 0.035$

表3 年龄≥35岁组中DFI正常者与异常者年龄及各精液参数的比较

Table 3 Comparison of age and semen parameters between normal DFI patients and abnormal DFI patients in ≥ 35 years group

Parameter	DFI < 30% (n = 76)	DFI ≥ 30% (n = 16)	t	P
Age	38 ± 3	44 ± 7	-3.166	0.006
PR%/%	54 ± 15	41 ± 7	4.906	< 0.001
Total motility/%	60 ± 17	47 ± 8	4.840	< 0.001
Concentration(× 10 ⁶)/mL	79 ± 70	80 ± 57	-0.089	0.929
Total sperm number(× 10 ⁸)	2.3 ± 1.8	1.6 ± 0.8	1.481	0.142
NF%/%	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.6	0.577	0.566

3 讨论

精子DNA完整性检测是近二十年来发展起来并日益成熟的新技术。精子DNA损伤是指在精子生成及成熟过程中,各种原因导致DNA完整性被破坏而产生断裂的碎片^[7]。精子DNA完整性是遗传物质正确传给子代的前提,在受精和胚胎发育中起着非常重要的作用,而精子DNA损伤无论对自然生育还是辅助生殖技术的妊娠结局均产生不良的影响^[8-14]。目前,检测精子DNA完整性的方法有精子染色质结构分析(sperm chromatin structure assay, SCSA)、彗星实验(Comet assay)、末端转移酶介导的dUTP末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)、精子染色质扩散实验(sperm chromatin dispersion, SCD)^[15]。SCD法具有简单、准确及价格低廉等特点,自2003年Fernandez等^[16]发明以来已被广泛应用于精子DNA完整性的研究。本研究采用SCD法检测畸形精子症患者的精子DNA完整性以保证结果的可靠性。

3.1 畸形精子症患者精子DNA完整性与年龄的关系

本研究发现精子的DFI与男性年龄可能存在弱相关关系,与已有的采用SCD法的研究结论相似^[17]。这提示精子DNA损伤可能是男性生育力随着年龄的增长而不断下降的原因之一。而Nijs等^[18]采用SCSA法以及Brahem等^[19]采用TUNEL法的研究则显示,DFI与男性年龄并不显著相关。这可能是方法学之间的差异导致了不同研究之间结论的异同。

此外,本研究发现年龄 ≥ 35 岁组的精子DFI水平及异常率显著高于 ≤ 30 岁组和30~35岁组,Moskovtsev等^[20]在对不育男性的研究中指出,年龄 > 45 岁的男性精子DFI明显高于年轻男性。但是Moskovtsev等并未对其研究对象的不育类型进行细分,而本研究则锁定了畸形精子症患者,所以在畸形精子症患者中,年龄对精子DFI的影响似乎更加明显。通过对年龄 ≥ 35 岁组中DFI正常患者与异常患者进行比较,本研究发现DFI异常患者的年龄高于DFI正常患者,进一步证实年龄越大的畸形精子症患者的精子DNA完整性越差。目前,关于精子DNA损伤的分子机制大致分

为三个理论:①染色质包装异常;②活性氧;③凋亡。这三种机制可能独立或共同导致精子的DNA损伤。在畸形精子症患者中,随着男性年龄的增长,体内氧自由基增多,而精子凋亡效率下降,这可能更容易导致精子DFI升高。

3.2 畸形精子症患者精子DNA完整性与精液参数的关系

在精子DNA完整性与精液参数的关系方面,本研究显示精子DNA完整性与PR%、精子总活力呈负相关。由于一个成熟、紧密的精子核的形成与精子鞭毛的发育都是来源于精子的发生过程^[21],所以精子的DNA完整性会影响精子的活动力。Belloc等^[21]证明精子活动力减弱是与精子DNA损伤最密切相关的精液参数异常。本研究则证实,在畸形精子症患者中,PR%是与精子DNA完整性最密切相关的精子参数。这与前者结论基本一致。同时,本研究发现年龄 ≥ 35 岁组中DFI异常患者的精子活动力低于DFI正常患者。因此在畸形精子症患者中,如果PR%接近正常参考值范围的下限(32%),有必要建议患者进行精子DNA完整性的检测,这将有利于临床的进一步诊治。

精子DNA损伤可能起源于睾丸,也有可能在输精管中或排精的过程中造成,精子DNA损伤可能会造成精子的形态异常而导致畸形精子症的发生。这也解释了精子DFI与NF%之间可能存在的相关性。但是,在年龄 ≥ 35 岁组中DFI正常患者与异常患者之间的NF%没有明显差异,这说明了在年龄 ≥ 35 岁的畸形精子症患者中精子DNA完整性检测能够弥补形态学检测的不足。由于WHO目前推荐的精子形态学检测方法仍然是人工评估方法,因此存在一定的主观性。为尽量避免方法学存在的缺点,本研究数据来源于男性学实验室资深技术人员,同时本实验室严格执行室内质控与室间质控,以保证数据的真实性与可比性。

综上所述,畸形精子症患者的年龄、精子活动力及正常形态精子百分率与精子DNA完整性密切相关。年龄越大的畸形精子症患者的精子DNA完整性越差。因此,在对这类患者的诊治过程中,不仅需要考虑到精子形态异常导致的不育,还要结合精子活力考虑男性年龄因素可能引起的精子DNA损伤。

参考文献:

- [1] Wu C, Lipshultz LI, Kovac JR. The role of advanced paternal age in modern reproductive medicine [J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(3): 425-435.
- [2] Hellstrom WJ, Overstreet JW, Sikka SC, et al. Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older [J]. *J Androl*, 2006, 27(3): 421-428.
- [3] Alshahrani S, Agarwal A, Assidi M, et al. Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12(1): 103-113.
- [4] 沙鹏鹏, 唐文豪, 周善杰. 畸形精子症相关影响因素和治疗策略的研究进展 [J]. *生殖医学杂志*, 2015, 24(11): 952-959.
- Sha PJ, Tang WH, Zhou SJ. Advance research on pathogenesis and treatment strategy of teratozoospermia [J]. *J Reprod Med*, 2015, 24(11): 952-959.
- [5] Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, et al. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(1): 41-48.
- [6] Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, et al. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: Correlation with semen parameters [J]. *Andrologia*, 2009, 41(6): 383-386.
- [7] 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): 60-66.
- Chen L, Xu Y. The clinical application of sperm DNA fragmentation in male infertility [J]. *Chin J Androl*, 2014, 28(7): 60-66.
- [8] Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2003, 9(4): 331-345.
- [9] Lopez G, Lafuente R, Checa MA, et al. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment [J]. *Asian J Androl*, 2013, 15(6): 790-794.
- [10] Absalan F, Ghannadi A, Kazerooni M, et al. Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(1): 11-14.
- [11] Ni W, Xiao S, Qiu X, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94956.
- [12] Matorini M, Tarozzi N, Cambi M, et al. Variation of DNA fragmentation levels during density gradient sperm selection for assisted reproduction techniques: A possible new male predictive parameter of pregnancy? [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(20): e3624.
- [13] Simon L, Zini A, Dyachenko A, et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome [J]. *Asian J Androl*, 2017, 19(1): 80-90.
- [14] Zheng WW, Song G, Wang QL, et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization [J]. *Asian J Androl*, 2018, 20(1): 75-79.
- [15] Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay [J]. *Andrology*, 2013, 1(5): 715-722.
- [16] Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation [J]. *J Androl*, 2003, 24(1): 59-66.
- [17] 张宁锋, 刘彩霞, 郑灵燕, 等. 精子DNA碎片率及顶体酶活性对男性不育的诊断价值 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2018, 39(1): 93-100.
- Zhang NF, Liu CX, Zheng LY, et al. Diagnostic value of DNA fragmentation index and acrosin activity in male infertility [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2018, 39(1): 93-100.
- [18] Nijs M, De Jonge C, Cox A, et al. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology [J]. *Andrologia*, 2011, 43(3): 174-179.
- [19] Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, et al. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(5): 425-432.
- [20] Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(2): 496-499.
- [21] Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(5): 527-532.

(编辑 余菁)