

# 卵浆内单精子注射术治疗阻塞性无精症的不育症

李 满 庄广伦 邓春华 李 蓉 张敏芳 王长希 邓明芬

(中山医科大学附属第一医院生殖医学研究中心; 广州, 510080)

**摘 要** 目的: 评价附睾取精术结合卵浆内单精子注射技术治疗阻塞性无精症所致不育症的疗效。方法: 对 24 例精液常规检查无精症的男性不育患者之妻子, 进行超排卵治疗 30 个周期。获卵当日同时从患者阴囊行微切口附睾取精液, 或经皮附睾穿刺抽吸术获得活动精子, 进行卵浆内注射。精子准备方法可从常规的 Minipercoll 法简化为作者自创的“N”字游出法。结果: 30 个治疗周期共获卵 378 个, 其中 298 个(占 78.8%)为减数分裂中期 II 的卵子, 可行显微精子注射, 受精率和卵裂率分别为 55.7% 和 94.6%; 每周期平均移植的胚胎数 3.6 个。在所有治疗周期中共妊娠 9 例, 其中流产 1 例, 已分娩 3 例, 继续妊娠 5 例, 妊娠率为 30.0%/周期(9/30)。结论: 精路阻塞的无精症不育患者, 只要获得活动精子, 结合卵浆内单精子注射, 仍然有机会获得妊娠。

**主题词** 男(雄)性; 不育; 附睾; 穿刺术; 少精液症/治疗; 受精, 体外; 显微注射; 胚胎移植

**中图分类号** R 711.6

## EPIDIDYMAS SPERM ASPIRATION WITH INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION PROVIDE FERTILITY FOR MEN WITH OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA

Li Man Zhuang Guanglun Deng Chunhua Li Rong Zhang Minfang Wang Changxi Deng Minfen

(The ART Center, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

**Abstract Objective:** To observe whether epididymas sperm could be used to perform intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for men with obstructive azoospermia. **Methods:** 24 obstructive azoospermic males 30 cycles, with their wives underwent controlled ovarian hyperstimulation, on the day of her oocytes retrieval we did open or percutaneous epididymas sperm aspiration and ICSI. N-shape sperm swim-out founded by ourselves is one kind of sperm preparation method which can be an alternative to minipercoll. **Results:** We retrieved 378 oocytes from 30 cycles, among them 298 was M II oocytes suitable for ICSI. The fertilization rate was 55.7%, and cleavage rate was 94.6%. 3.6 embryos were transferred per cycle, and the pregnancy rate was 30% (9/30). Among 9 pregnant cases, 1 case was aborted, 3 cases were delivered, and 5 cases were still ongoing. **Conclusion:** Infertility caused by obstructive azoospermia may be treated with ICSI using aspirated epididymas sperm.

**Subject headings** male; infertility; epididymas; puncture; azoospermia/treatment; fertilization-in vitro-methods; microinjection; embryo transfer

使用卵浆内单精子注射术 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 是近年来治疗严重男性少、弱、畸形精子不育的最有效的方法, 它包括使用附睾或睾丸取精治疗阻塞性或非阻塞性无精症的不育症。我院生殖中心从 1996 年 8 月至今共治疗了 24 例 30 个周期, 因输精管先天缺如或炎症阻塞性无精症的不育夫妇, 现将初步结果报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 治疗前的有关检查

对 24 例经精液常规检查发现为无精症的男性不育患者, 均作如下检查: ① 抽血检查血清 FSH、LH、T, 了解有无睾丸功能衰竭; ② 行睾丸活检, 确

认有成熟精子, ③夫妇双方染色体 G 带检查正常。即列入治疗计划。

### 1.2 常规超排卵治疗法

女性患者行常规的超排卵治疗<sup>[1]</sup>, 即于上次月经的黄体中期开始使用促性腺激素激动剂(buserelin, hoechst)喷鼻, 月经第 5 天开始注射促卵泡素(metrodin, serono)或人绝经期促性腺激素(pergonal, serono)行超排卵治疗。当主导卵泡平均直径达 18~20 mm 时, 当晚注射 hCG 10 000 IU, 36~38 h 后经阴道 B 超介导下行卵泡抽吸术, 将卵母细胞收集在 Earle's 液(SIGMA, E7883)含 10% 灭活血清的培养液中培养。

### 1.3 附睾取精法

收集卵母细胞后, 随即进行局部阻滞麻醉下阴囊微切口, 暴露附睾或附睾管, 直视下或经皮穿刺附睾, 用 6 号针头抽吸精子, 若失败则改用切开, 吸取其中液体置上述培养液中, 立即在显微镜下观察有无活动精子, 将吸出的含有精子的液体计数精子的数量、活动率、畸形率后, 置于 37 °C 孵育待用。

### 1.4 精子的分离

如果活动精子计数较高, 大部分精子活动力在 II 级以上者, 可用微量 Percoll 梯度离心法收集活动精子。如活动精子含量很少, 可采用另一种作者自制的方法, 即在培养皿(Falcon 1006)上用 5%~10% 的聚烯吡酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)溶液 10 μL 划写“N”字, 然后将含精子的溶液离心(1 000 r/min, 10 min)后, 取沉淀 1 μL 加入“N”字的左下角, 在“N”字上方用 HEPES 缓冲的 Earle's 液(HEPES-EBSS)5 μL 做 6 个液滴, 为放入卵母细胞用, 然后上盖矿物油, 置培养箱中数分钟, 等待精子从沉渣中游出至液滴边缘后即可加入准备好的卵母细胞进行 ICSI 操作。

### 1.5 卵母细胞处理与 ICSI 针制备及操作步骤<sup>[2]</sup>

卵母细胞必须去除其周围的颗粒细胞, 先将其置于含 80~100 IU/mL 透明质酸酶的 HEPES-EBSS 中连续吹打数次, 然后将卵母细胞吸出置于 HEPES-EBSS 中, 换用内径为 150 μm 的毛细玻璃管继续吹打, 直到几乎完全去除颗粒细胞, 再用 HEPES-EBSS 液冲洗数次, 加入已准备好的培养皿中进行 ICSI。只有处于减数分裂中期 II(M II 期)的卵母细胞可用于注射精子。

### 1.6 受精, 卵裂的观察和诊断妊娠

ICSI 后 16~18 h 观察有无原核形成, 再过 24

h 后观察有无卵裂, 并将胚胎根据卵裂球的数目, 其大小是否均等及无核碎片的多少给予评分, 然后选择评分高的胚胎进行移植, 常规移植数不超过 4 个, 移植后 2 周, 检验尿 hCG 了解妊娠与否, 7 周后 B 超观察妊娠囊数目与胎心搏动。

## 2 结 果

### 2.1 30 个治疗周期小结

迄今附睾取精结合 ICSI 共治疗 24 例患者 30 个周期, 获卵 378 只, 其中 298 只(占 78.8%)为 M II 期卵子可用于精子注射, 受精率为 55.7%, 卵裂率为 94.6%, 每周平均移植的胚胎数 3.6 个。30 个治疗周期妊娠 9 例, 流产 1 例, 分娩 3 例(1997 年 6 月 7 日第 1 例孕足月剖腹产 1 男活婴), 继续妊娠 5 例, 妊娠率为 30.0%/周期。

### 2.2 附睾精子 ICSI 组与射出精子 ICSI 组及常规 IVF 组比较

附睾取精结合 ICSI 治疗周期与本中心同期少弱精患者的 56 个 ICSI 周期及 1996 年常规 IVF 组 255 个周期比较, 以及微量 Percoll 法与“N”字游出法处理精子比较。结果见表 1~3。

表 1 附睾取精与手淫集精 ICSI 结果比较(%)

Table 1 Fertilization rate(FR) and pregnancy rate(PR) after ICSI with epididymal and ejaculative sperm

	Cycles(n)	FR	PR
Ejaculative	56	59	28.6
Epididymal	30	55.7	30.0
t test analyse		$P > 0.05$	$P > 0.05$

表 2 ICSI 组与我院 1996 年常规 IVF 组结果比较(%)

Table 2 FR and PR of ICSI and normal IVF group

	Cycles(n)	FR	PR
Group ICSI	86	58.7	29.0
Group IVF	255	75.3	21.6
t test analyse		$P < 0.01$	$P > 0.05$

表 3 微量 percoll 法与“N”字游出法比较

Table 3 Comparison of the two kinds of sperm preparation method; minipercoll and “N” shape swim-up

	M II oocytes	FR(%)	Time cost
“N” swim-up	56	34(60.1)	40 min ±
Minipercoll	242	132(54.5)	10 min ±
Total	298	166(55.7)	
t test analyse		$P > 0.05$	

### 3 讨 论

#### 3.1 附睾取精结合 ICSI 技术治疗阻塞性无精症的不育是有效的

本文阻塞性无精症患者 24 例,包括先天性输精管缺如 10 例,炎症阻塞输精管 14 例。附睾取精 ICSI 组与本中心非输精管阻塞少弱精手淫集精 ICSI 组的妊娠率分别为 30.0%、28.6%,基本上无差异。大多数精液常规无精症引起的不育,女方通常具有正常的生育力,其排卵功能与内膜允许胚胎着床生长的能力是正常的,文献报道附睾取精的妊娠率可高达 58%<sup>[4]</sup>。随着本中心应用此技术的成熟,其妊娠率应比目前初步结果(30%)更高。

#### 3.2 精路阻塞者附睾精子的特点及 ICSI 治疗有效的的原因

精子能否穿越透明带取决于其在附睾中停留的机会,生理情况下,大多数精子在到达附睾远端时才获得受精的能力,伴形态成熟<sup>[9]</sup>,这是由于附睾及输精管分泌特定的物质促进精子的成熟。当输精管阻塞时,精子在附睾中成熟的部位提前,具有受精能力的活动精子可出现在附睾头部甚至于输出小管<sup>[7]</sup>,所以这时如果将附睾头部或输出小管直接与输精管吻合后,也能射出具有生育力的精子<sup>[8]</sup>;正常情况下,附睾尾部是精子贮存的主要部位,当输精管阻塞时,长时间停留在附睾尾部的精子活动力明显下降,老化死亡。基于上述两个特点,本研究从附睾头部取精,24 例患者都获得质量较好的活动精子供显微注射。显微注射的刺激及注射后精子膜和卵膜的互相接触释放出特定的因子,如  $Ca^{2+}$  等相互激活,从而使精子核去浓缩,雌、雄原核形成并进一步发生卵裂,是 ICSI 治疗有效的主要原因。事实上,附睾精子组与手淫集精组比较其受精率无显著差异,说明借助 ICSI 附睾精子也能使卵子受精。在本组中 1 例用精子细胞注射,也有受精及正常的卵裂,提示尽管附睾精子成熟度较低,但 ICSI 治疗仍然是有效的。

#### 3.3 精子准备方法的改进

从附睾获取的精子混杂有大量血细胞及组织碎片。采用 mini-percoll 梯度离心法处理可以获得活动精子,并去除杂质及部分死精以供显微注射。Silber<sup>[4]</sup>认为不同的处理精液方法对能否妊娠影响不大,但直接影响显微注射操作的难易。当不能将

活动精子与杂质及死精分离时,使注射针易堵塞,还可能将杂质及其它染色质或 DNA 成分随微注射带入卵母细胞,使流产率增高。mini-percoll 法处理精液时活动精子的获得率为 20%~30%,残留死精约 20%<sup>[10]</sup>,附睾取精最常见的是活动精子极少或活动力很低,即采用 mini-percoll 法处理精子常令人失望;当处理精子的 Percoll 成分没有完全去除便加入 PVP 中有可能使 PVP 变得粘稠无法吸取精子,使显微操作显得异常困难。作者自创的精子“N”字游出法让活动精子从杂质中游出,是一种简化、有效的方法,且获得活动精子数较 minipercoll 法多,本文用此方法,受精率与对照组无显著差异,而且其用精液量较少,省下的精液可以冻存。

#### 3.4 附睾取精方式的改进

随着治疗例数的增加,附睾取精的经验也增加,开始时我们曾用附睾切开吸取贮留在附睾管内的精液,这种术式范围大,破坏附睾严重,手术时间长,第 2 次再从手术侧附睾无法获取精子,是一种杀鸡取蛋的操作,现已不用。现常用的是直接经皮附睾穿刺或阴囊微切口暴露附睾直视下(也较少用)抽吸精子,这种方式简便、创伤小,时间短,对患者的影响小,可再次取精。当数次穿刺抽吸不到精子时,为避免更大的创伤。我们宁可改用提取睾丸曲细精管数条,从中分离精子进行显微操作<sup>[12]</sup>。

#### 参 考 文 献

- 1 庄广伦,顾正田,周灿权. Buserelin 在超排卵周期中的作用及对卵泡液的影响. 中华妇产科杂志, 1993, 28 (1): 10
- 2 李 蓉,庄广伦,张敏芳. 卵母细胞单精子显微注射技术治疗男性因素及不明原因不育. 中华妇产科杂志, 1997, 32(4): 211
- 3 Mills C L. Factors affecting embryological parameters and embryo selection for IVFET. In: Brinsdon P R, Rainsbury P A, eds. A textbook of *in vitro* fertilization and assisted reproduction. London: The Parthenon Publishing Group, 1992, 231~245
- 4 Silber S J, Nagy Z, Liu J, et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. Hum Reprod, 1995, (10)8: 2031
- 5 Yeung C H, Cooper T G, Oberpenning F, et al. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. Biol Reprod, 1993, 49: 274

6 Cooper T G. The human epididymis; Is it necessary? *Int J Androl*, 1993, 16: 245

7 Mathieu C, Guerin J, Cognat M, *et al*. Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. *Fertil Steril*, 1992, 57: 871

8 Schoysman R J, Bedford J M. The role of the human epididymis in sperm maturation and sperm storage as reflected in the consequence of epididymovasostomy. *Fertil Steril*, 1986, 46: 293

9 Silber S J, Van Steirteghem A C, Liu J, *et al*. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection obtained from testicle biopsy. *Hum Re-*

*prod*, 1995, (10)1: 148

10 Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6: 25

11 Liu J, Lissens W, Silber S J, *et al*. Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. *JAMA*, 1994 (272)23: 1858

12 李 满, 庄广伦, 王长希, 等. 睾丸精子抽提结合卵母细胞单精子显微注射治疗无精症的不育症. *生殖医学杂志*, 待发表

(1997-11-12 收稿 1998-03-12 修回)

(上接第 130 页)

4 hepatitis B virus DNA over a wide range from serum for studying viral replicative in response to treatment and in recurrent infection. *Hepatology*, 1995, 21: 1492

5 Ozaki H, McLaughlin L W. The estimation of distances between specific backbone labeled sites in DNA using fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 5205

6 Wang C N, Wu K Y, Wang H T. Quantitative PCR us-

ing the Amplisensor Assay. In: Dieffenbach C W, Dveksler G S eds. *PCR primer; a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995: 193

7 董惠卿, 张复春, 蔡晓莉, 等. 定量聚合酶链反应检测血清乙型肝炎病毒 DNA 及其意义. *广东卫生防疫*, 1996, 22: 1

8 张复春, 吴婉芬, 董惠卿, 等. 定量 PCR 检测血清 HBV DNA 及其临床应用. *中华传染病杂志*, 1997, 15: 25

(1997-07-15 收稿 1998-04-02 修回)

(上接封 3 页)

瘤中呈阳性反应,而在表皮及其他附属器和其他附属器肿瘤中则为阴性。CEA 在汗腺肿瘤的腺腔面、管腔面及其内的分泌物中染色最强,同时也可注意到以向导管方向分化的汗腺肿瘤或瘤体中的导管样结构,才常见明显的 CEA 着染,而其外围的实性细胞团则呈阴性。这也从一个侧面说明 CEA 可能主要是由汗腺管、腺腔内层细胞所分泌的。我们的染色结果及特点也与 Penneys 等人的结果相似<sup>[2]</sup>。同时,我们也发现,汗腺恶性肿瘤中 CEA 除可见腔膜型着染外,随着肿瘤恶性程度的增加,可出现胞浆型形态不规则的着染。我们认为由于 CEA 是一种糖蛋白,随着肿瘤恶性程度的增加,它们的癌变造成细胞器结构、功能异常,使 CEA 的合成、转运、分泌等功能障碍,从而出现胞浆内不规则着染。因此,其 CEA 着染类型、形态的异常也在一定程度上反映了肿瘤的生物性质与预后,与吴继锋等人在胃癌及皮脂腺癌中发现的结果有相似之处<sup>[1,3]</sup>。

CEA 在胚胎早期出现,并较稳定地存在于汗

腺及汗腺肿瘤中,是一种对诊断汗腺来源肿瘤有帮助的标记物;CEA 阳性有助于对汗腺肿瘤及其它皮肤来源肿瘤的鉴别<sup>[2]</sup>。因大小汗腺肿瘤中都存在 CEA,故它不能鉴别大小汗腺的肿瘤。本研究的部分汗腺肿瘤中 CEA 染色阴性,可能与标本的处理、保存及染色过程中 CEA 抗原的破坏、遮盖或抗原暴露不好等因素有一定关系。因此,在临床免疫病理诊断中,必要时可用不同处理方法多做几次染色,以降低假阴性率。

参 考 文 献

1 吴继锋, 杨光霖, 董聿明, 等. 胃癌癌胚抗原的分布型式与组织类型及组织发生分型的关系. *临床与实验病理学杂志*, 1994, 10(1): 28

2 Penneys N S, Nadjj M, Morales A R. Carcinoembryonic antigen in benign sweat gland tumors. *Arch Dermatol*, 1982, 118: 225

3 李建军, 佟菊贞. 皮脂腺肿瘤凝集素亲和组化研究. *临床皮肤科杂志*, 1994, 23(6): 305

(1997-10-10 收稿 1997-12-10 修回)