

## · 临床研究 ·

## 精子DNA碎片率与复发性流产及精液参数的相关研究

郭辉 金美珠 金东芳 周燕霞

**[摘要]** 目的 探讨精子DNA碎片率对复发性流产的影响及其与精液参数的关系。方法 选择配偶有复发性流产史的男性患者200例作为实验组,1年内正常生育的男性200例作为对照组,对两组男性的精子DNA碎片率和年龄、精子浓度、向前活动精子、精子畸形率进行分析。并按照试剂盒推荐的参考范围10%,将400例患者分为精子DNA碎片率<10%组(215例)和DNA碎片率≥10%组(185例),比较其复发性流产率,并对实验组男性的精子DNA碎片率与各项精液参数进行相关性分析。结果 实验组的精子DNA碎片率明显高于对照组,前向运动精子率低于对照组( $t$ 分别=7.84、-15.73, $P$ 均<0.05),两组在精子浓度及精子畸形率方面比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别=0.92、0.03, $P$ 均>0.05)。精子DNA碎片率<10%组的流产率明显低于精子DNA碎片率≥10%组的流产率( $\chi^2=79.66$ , $P<0.05$ )。在实验组中,患者的精子DNA碎片率与其精子浓度、前向运动精子率呈负相关( $r$ 分别=-0.46、-0.60, $P$ 均<0.05),与精子畸形率呈弱相关( $r=0.19$ , $P<0.05$ )。结论 精子DNA碎片率增高与复发性流产有关,可作为评估精液的一项重要指标。

**[关键词]** 精子DNA碎片率; 复发性流产; 精液参数

### Relationship between sperm DNA fragmentation and recurrent spontaneous abortion and sperm parameters GUO

Hui, JIN Meizhu, JIN Dongfang, et al. Clinical Laboratory, Jinhua People's Hospital, Jinhua 321000, China

**[Abstract] Objective** To explore the relationship between sperm DNA fragmentation and recurrent spontaneous abortion and sperm parameter. **Methods** Totally 200 males whose spouses with recurrent spontaneous abortion were enrolled as the experimental group. A total of 200 adult healthy fertile males in one year were enrolled as the control group. Sperm DNA fragmentation, age, sperm concentration, percentage of progressive motility and sperm abnormality rate were compared between two groups. According to the reference range 10% recommended by the kit, the 400 cases were divided into groups of sperm DNA fragmentation higher than 10% and lower than 10%, and the rates of recurrent abortion in those two groups were compared. In the experimental group, the correlation between sperm DNA fragmentation and sperm parameters was analyzed. **Results** The sperm DNA fragmentation of the experimental group was significantly higher than that of the control group, while the percentage of progressive motility was lower than that of the control group ( $t=7.84, -15.73, P<0.05$ ). There were no differences in sperm concentration and sperm abnormality rate between the two groups ( $t=0.92, 0.03, P>0.05$ ). The abortion rate of group that sperm DNA fragmentation lower than 10% was significantly lower than that in group that sperm DNA fragmentation higher than 10% ( $\chi^2=79.66, P<0.05$ ). In the experimental group, the sperm DNA fragmentation was negatively correlated with sperm concentration and percentage of progressive motility ( $r=-0.46, -0.60, P<0.05$ ), and it was slightly related to sperm abnormality rate ( $r=0.19, P<0.05$ ). **Conclusion** Increased sperm DNA fragmentation is associated with recurrent spontaneous abortion, which can be used as an important indicator for the evaluation of semen.

**[Key words]** sperm DNA fragmentation; recurrent spontaneous abortion; sperm parameter

复发性流产是指妊娠28周以前连续2次及2次以上的自然流产。其原因十分复杂,还有部分原因

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.02.004

基金项目:金华市科技局项目(2016-4-008)

作者单位:321000 浙江金华,金华市人民医院检验科

不明<sup>[1]</sup>。目前大部分复发性流产的研究针对女性,而对男性因素则研究较少<sup>[2]</sup>。精子DNA是重要的遗传物质,其完整性是准确传递遗传信息的基础,能够影响精子的受精能力、受精卵的分裂,并且在胚胎发育方面有着决定性作用<sup>[3]</sup>。近年有研究表明,

不育夫妇中80%有正常精子,这些人群或许存在着DNA完整性的损伤<sup>[4,5]</sup>。精液常规分析是目前判断男性不育的常用参数,但其分析结果有一定的局限性,无法反映精子染色质的改变。因此,为了提高临床诊断水平,准确评估男性的生育潜能,需结合多个参数分析。本次研究通过对精子DNA碎片率及精液常规参数的分析,探讨复发性流产与精子DNA碎片率的关系,并将精子DNA碎片率与复发性流产进行相关性分析,为治疗中降低DNA损伤、提高精子质量、改变妊娠结局提供依据。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2015年2月至2017年2月就诊于金华市人民医院生殖中心及妇科、产科门诊的确诊配偶为复发性流产的男性200例纳入实验组,平均年龄(29.02±3.21)岁。同期近一年内生育过的男性200例(自愿取精)作为对照组,平均年龄(28.58±3.09)岁。两组的纳入标准:①夫妇染色体检查均为正常核型;②男性检查(包括第二性征、阴茎、阴囊、精索、输精管、睾丸等)均无异常,内分泌激素测定在正常范围;③女方内分泌、妇科、影像学等检查无异常;④对照组的男性在一年内有生育史;⑤所有研究对象在采集精液标本之前均禁欲2~7 d。两组年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 1.2 方法

1.2.1 精子DNA碎片检测采用精子染色质扩散试验进行检测,试剂盒由安徽安科生物工程公司生产,具体检测步骤如下:取精液待检样本用精子稀释液(含0.8%氯化钠的磷酸盐缓冲液)调整浓度至500~1000万/ml;取低熔点琼脂糖管一只(1 ml)置于90℃~100℃温度下5 min溶解后,然后置于

37℃温度下5 min,加入30 μl精液标本,混匀;取预处理玻片(包被1%琼脂糖的载玻片)一张置4℃面板上,待玻片冷却后,把琼脂糖精液20 μl加到玻片上并标记位置,盖上盖玻片,放入4℃冰箱5 min;把浓缩变性液(含33%浓盐酸)加入9 ml蒸馏水中,在平皿中混匀;小心揭开盖玻片,将玻片水平置入含有浓缩变性液的平皿中室温放置7 min,然后取出玻片,再水平置入含10 ml裂解液(含0.1M二硫苏糖醇)的平皿中室温放置25 min后,置入装有蒸馏水的平皿中5 min,然后分别置入70%、90%、100%乙醇中2 min,取出自然晾干;瑞氏染色:加10~12滴染液A(含0.17%瑞氏染料)染色1~3 min,加10~12滴染液B(pH 6.9磷酸缓冲液)用洗耳球轻轻吹匀,染色10~15 min;用纯净水洗涤玻片,封片剂封片;用日本OLYMPUS光学显微镜于400或1000倍镜下观察500个精子涂片形态。

1.2.2 精液分析 检测前禁欲2~7 d,在专用取精室以手淫法收集全部精液于干燥无菌杯。每份标本严格按照《WHO人类精液检验与处理实验室手册》<sup>[6]</sup>采用SCA-H-01精子分析仪(西班牙)进行分析,记录前向运动精子率。

1.2.3 精子形态分析 由固定一名技术员采用Diff-Quik方法分析精子形态,精子染色液由深圳华康生物医学工程公司生产,每张玻片分析200条精子,记录畸形精子所占比率。

1.3 统计学方法 采用SPSS 22.0统计学软件进行分析。计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )描述,采用 $t$ 检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组精子DNA碎片率及精液参数的比较见表1

表1 两组精子DNA碎片率及精液常规检测结果

组别	<i>n</i>	精子DNA碎片率/%	前向运动精子率/%	精子浓度/ $\times 10^6$ 个/ml	精子畸形率/%
实验组	200	15.17 ± 7.42*	39.88 ± 10.92*	70.48 ± 66.75	95.38 ± 0.61
对照组	200	10.18 ± 5.10	53.11 ± 12.93	64.49 ± 63.14	94.12 ± 0.53

注:\*,与对照组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,实验组的精子DNA碎片率明显高于对照组( $t=7.84, P<0.05$ ),前向运动精子率低于对照组( $t=-15.73, P<0.05$ )。两组在精子浓度及精子畸形率方面比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别为0.92、0.03,  $P$ 均 $>0.05$ )。

2.2 不同精子DNA碎片率的复发性流产率的比较 按照试剂盒推荐的参考范围10%,将400例分

为精子DNA碎片率 $<10\%$ 组215例和DNA碎片率 $\geq 10\%$ 组185例。精子DNA碎片率 $<10\%$ 组的流产率为29.30%,明显低于精子DNA碎片率 $\geq 10\%$ 组的流产率74.05%,差异有统计学意义( $\chi^2=79.66, P<0.05$ )。

2.3 实验组的精子DNA碎片率与其精子浓度、前向运动精子率、精子畸形率的相关性分析 200例

患者的精子DNA碎片率与其精子浓度、前向运动精子率呈负相关( $r$ 分别=-0.46、-0.60,  $P$ 均 $<0.05$ ),与精子畸形率呈弱相关( $r=0.19$ ,  $P<0.05$ )。

### 3 讨论

复发性流产是妇产科常见病,发生率约占临床妊娠的10%~20%,其病因复杂,且相关研究又侧重于女性方面,对男性因素研究较少。近年来精子DNA的完整性成为生殖医学领域的热点之一,有研究表明精子DNA的完整程度与复发性流产有关<sup>[7,8]</sup>。精子DNA碎片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。目前认为,精子发生过程中染色质的异常组装、精子DNA的氧化应激、精子异常凋亡等多种机制协同参与,导致了精子DNA完整性损伤<sup>[9]</sup>。

精液常规分析是目前判断男性不育的最常用指标,因其只能反映最基本的精液质量、各参数波动的范围又较大<sup>[10]</sup>,故不能准确反映精子是否有正常的受精能力,也不能预测精子的受精潜能。本次研究发现实验组的前向活动的精子少于对照组( $P<0.05$ ),两组在精液浓度、精子畸形率方面无明显差异( $P$ 均 $>0.05$ )。实验组中精子DNA碎片率与精液浓度、前向活动的精子百分率呈负相关,与精子畸形率呈微弱相关。这可能是由于精子DNA的完整性是准确传递遗传物质的基础,当精子DNA明显损伤时,生育能力将会降低。

精子DNA碎片率相对于传统的精液常规分析、精子形态检测而言,可以评价精子的功能状态,可明确精子当前状态是否适合受精。本次研究采用精子染色质扩散法对配偶有复发性流产史的200例男性和近一年配偶正常分娩的200例男性的精子DNA碎片率进行检测对比,发现配偶有复发性流产史的男性精子DNA碎片率明显高于对照组( $P<0.05$ ),且精子DNA碎片率 $\geq 10\%$ 组男性的配偶的复发性流产率高于精子DNA碎片率 $<10\%$ 组( $P<0.05$ )。表明精子DNA的完整性对自然受孕、胚胎

的发育至关重要,是复发性流产的男性因素之一。

完善对复发性流产患者男性配偶的精子DNA碎片率的测定,可部分明确病因,为患者节省费用,临床医务人员也可对症治疗以减低精子DNA的碎片率,改善妊娠结局。

### 参考文献

- 1 向卉芬,刘云云,宗晨,等.复发性流产的病因学研究进展[J].中华临床医师杂志,2016,10(4):554-559.
- 2 潘春琴,刘池波,梁勇.男性不育患者精浆中差异表达蛋白的筛选与鉴定[J].实用医学杂志,2009,25(1):35-37.
- 3 白文俊,耿冲.男性因素与复发性流产[J].实用妇产科杂志,2016,32(2):94-96.
- 4 Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, et al. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility[J]. FertilSteril, 2014, 101(6):1588-1593.
- 5 Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, et al. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples[J]. Andrology, 2013, 1(3): 357-360.
- 6 谷翊群,陈振文,卢文红,等.WHO人类精液检查与处理实验室手册[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2010:13.
- 7 史海跃,郑娟,周黎明,等.精子DNA碎片率对男性不育及早期复发性流产的影响[J].中国现代医生,2015,53(26): 72-75.
- 8 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):60-63.
- 9 Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, et al. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress [J]. Mol Med, 2015, 21(1):109-122.
- 10 费前进,金建远,倪昊花,等.不育夫妇中男性精子DNA碎片指数变异的研究[J].中华医学遗传学杂志,2013,30(3):357-361.

(收稿日期 2017-08-16)

(本文编辑 蔡华波)