

直接上游法与梯度离心结合上游法 优选精子的比较研究

李维娟 朱娜

作者单位: 830001 新疆乌鲁木齐, 新疆佳音医院(李维娟)
830000 新疆乌鲁木齐, 新疆第四人民医院(朱娜)
通讯作者: 李维娟, Email: 1297800451@qq.com
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.03.018

【摘要】 目的 应用直接上游法和梯度离心结合上游法处理不明原因不孕患者的精液, 探讨两种优选精子的方法。**方法** 回顾性分析 2015 年 1 月至 2016 年 12 月在我中心接受体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术助孕的夫妇 1 329 对, 分别采用直接上游法和密度梯度离心结合上游法进行精液标本的优选, 对照分析两组卵子的受精率。**结果** 直接上游法检测 501 个周期, 获得卵子 5 251 枚, 受精率为 75.29%; 密度梯度离心结合上游法检测 828 个周期, 获得卵子 8 753 枚, 受精率 79.32%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 通过两种方法的比较分析, 密度梯度离心结合上游法可以明显提高卵子的受精率。

【关键词】 直接上游法; 密度梯度离心法结合上游法; 受精率

A comparative study on the optimum spermatozoa of direct upstream and gradient centrifugation

Li Weijuan, Zhu Na. Xinjiang Jiayin Hospital, Urumqi 830001, Xinjiang, China (Li WJ); Xinjiang Fourth People's Hospital, Urumqi 830000, Xinjiang, China (Zhu N)

Corresponding author: Li Weijuan, Email: 1297800451@qq.com

【Abstract】 Objective To study the semen of two infertile patients with unexplained infertility by direct upstream method and gradient centrifugation combined with upstream method. **Methods** A retrospective analysis was performed on 1 329 pairs of patients who received *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in our center from January 2015 to December 2016. The patients were treated with direct upstream method and density gradient centrifugation combined with upstream method for semen samples. Fertilization rate of two groups of eggs were compared. **Results** Five hundred and one cycles were detected by direct upstream method, and 5 251 eggs were obtained. The fertilization rate was 75.29%. The density gradient centrifugation combined with upstream method was 828 cycles, and 8 753 eggs were obtained. The fertilization rate was 79.32%. The difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** By comparing the two groups, the density gradient centrifugation combined with the upstream method can significantly improve the fertilization rate of the egg.

【Key words】 Direct upstream method; Density gradient centrifugation combined with upstream method; Fertilization rate

近年来,随着生育年龄的增加,不孕症患者在逐年增多,有研究指出 10%~15% 的育龄夫妇存在不孕不育问题^[1],而男性不育占其中的 30%~40%^[2]。男性不育主要通过精液常规检查、精子形态学和 DNA 碎片化指数等指标来进行判断^[3]。随着辅助生殖实验室技术的不断完善和成熟,各种精液优化处理方式不断出现,最常见的为上游法和密度梯度离心法。密度梯度离心法可以更好地去除精液中的杂质及碎片,回收更多的精子,但相对于上游法其回

收后的精子畸形率过高,该方法更适用于少弱精子症患者^[4];上游法可分离获得活力更高的精子,但回收效率较低,该方法更适用于精液常规检查结果正常及较好的患者^[5]。本中心自 2015 年起尝试采用梯度离心结合上游的方法处理精液标本,并与直接上游法进行了对比分析。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 1 月至 2016 年 12 月在新疆佳音医院生殖医学中心接受体外受精-胚胎

移植(IVF-ET)技术助孕的 1 329 对夫妇,取卵当天的精液标本经检查各项指标均符合 IVF-ET 的标准。

1.2 研究方法

1.2.1 分组 将 1 329 份精液标本依据精液处理方法不同分为两组:A 组为直接上游法;B 组为密度梯度离心结合上游法。

1.2.2 精液处理方法^[6]

1.2.2.1 直接上游法 ① 充分混匀精液标本,并常规分析其各项指标(体积、浓度、活率等);② 将 1 mL 的 Hapes 液置于试管底部,小心地将 1 mL 精液加到 Hapes 液下方,注意保持液体的分界面;③ 将试管倾斜 45°,置 37℃ 孵育 60 min 后,将最上面 1 mL 培养液移置另一试管中,并加 2 mL Hapes 液 114×g 离心 5 min 洗涤 1 次,弃上清液;④ 将沉淀重新混匀后悬浮于 1 mL 的 Hapes 液中备用。记录精子活率和精子正常形态。

1.2.2.2 梯度离心结合上游法 ① 先后将 80% 和 40% 的梯度液各 1.5 mL 置于离心管中,注意保持液体分界面;② 充分混匀精液标本,并常规分析其各项指标(体积、浓度、活率等);③ 小心地将混匀后的精液 2~3 mL 加在配置好的梯度液面上,注意保持液体的分界面,114×g 离心 20 min,弃上清液;④ 用 2 mL Hapes 培养液重新混匀精子沉淀,114×g 离心 5 min,弃上清液;再用 2 mL Hapes 培养液混匀精子沉淀,114×g 离心 5 min,弃上清液后混匀精子沉淀;⑤ 将混匀后的精子沉淀液 1 mL 小心地加到 1 mL 的 Hapes 培养液下方,并注意保持液体的分界面,再次置于 37℃ 孵育 120 min 备用。记录精子活率和精子正常形态。

1.2.3 试剂 本文中的 Hapes 液和 80% 和 40% 梯度液为美国 SAGE 公司生产的成品。Hapes 培养液为 9 mL Hapes 液 + 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)混合而成。

1.3 检测受精率 受精率 = 总受精卵数 / 总获卵数 × 100%。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据,计数资料以例(%)表示,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用 χ^2 检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.5 IVF 的适应证 女方输卵管性不孕、排卵障碍、子宫内膜异位症、免疫性不孕,男方轻度少精症、弱精症或畸精症,原因不明性不孕且经其他助孕治疗多次失败者。

2 结果

2.1 不同精液优化处理方式前后精子活率和精子正常形态的比较 处理前,A 组和 B 组的精子活率和精子正常形态相当(均 $P > 0.05$),处理后,两组精子活率和精子正常形态有不同程度的升高,B 组略高于 A 组,但两组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 不同精液优化处理方式前后精子活率和精子正常形态($\geq 4\%$)的比较

组别	时间	周期数	精子活率(%)	正常形态精子百分率(%)
A 组	处理前	501	51.7 ± 5.2	57.2 ± 5.1
	处理后	501	88.7 ± 3.2	72.1 ± 4.9
B 组	处理前	828	45.5 ± 5.9	56.7 ± 6.0
	处理后	828	92.5 ± 4.1	79.2 ± 5.5

2.2 不同精液优化处理方式对受精率的影响 A 组受精率为 75.29%,B 组受精率为 79.32%,A 组与 B 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 1 329 例 IVF 周期数受精率在不同检测方法 A、B 两组间的数据对比

组别	周期数	获卵数	受精数	受精率(%)
A 组	501	5 251	3 954	75.29
B 组	828	8 753	6 943	79.32
P 值				< 0.05

3 讨论

众所周知,影响卵子受精的因素有很多,比如精子本身的质量、卵子的因素以及其他未知的一些因素。但不可否认,更多、更好的前向运动且获能良好的精子,是常规体外受精中卵子受精的基础,而精液的预处理则是达到这一目的的重要手段^[7-9]。在精液处理的方法中,直接上游法是利用精子自身的运动能力将活动精子从精液中分离出来,可以获得活动能力良好的精子,同时精子在上游的过程中获能。直接上游法操作简单易掌握,但不易标准化,操作周期长不易统一。而密度梯度离心法则是借助活动精子的运动和各类细胞的密度差异来分离精子,从而可以获得更多的、质量良好的精子,再将这些质量良好的精子上游,使其可以再次获能。相比直接上游法,密度梯度离心法结合上游法操作更容易标准化,操作周期也大大缩短。更主要的是,密度梯度离心结合上游法可以在统一的时间内完成精液的优选过程,这样就能有效地掌控加精时间。因为在目前的 IVF-ET 中,短时受精已经被大家普遍认可。这是由于短时受精不仅符合正常人体的受精过程,

而且短时受精也有利于在出现受精失败后的补救,从而可以有效地提高体外受精中卵子的受精率。对于短时受精,统一的加精时间不仅有利于操作和掌控,也有利于受精的判断。密度梯度离心结合上游法虽然操作过程较为繁琐但仅从本中心的临床效果来看,其对提高受精率具有明显效果。

综上所述,在辅助生育技术中,精液的不同优选方法在卵子受精过程的重要性不言而喻,本中心采用密度梯度离心结合上游法进行精子优选的方法,主要依据是:不仅可以利用密度梯度离心法优选出更多、更好的精子,同时利用上游法使其能充分获能,这样就使卵子的受精有了一个重要的保障。虽然梯度离心结合上游法的操作过程稍显繁琐,不易掌握,但只要通过一段时间的培训和训练就基本能够掌握。所以,密度梯度离心结合上游法是值得临床应用的一个精子优选方法。

参考文献

- 1 张剑波,尹国良,徐新蓉,等.不育门诊就诊男性精液质量与影响因素分析[J].生殖医学杂志,2015,24(12):1041-1044.
- 2 Varshini J, Srinag BS, Kalthur G, et al. Poor sperm quality and advancing age are associated with increased sperm DNA damage in infertile men [J]. Andrologia, 2012, 44 Suppl 1: 642-649.
- 3 李媛.人类辅助生育实验技术[M].北京:科学出版社,2008.
- 4 朱立华,肖新燕,许玉刚,等.密度梯度离心方式对人工授精结局的影响[J].中国男科学杂志,2016,30(2):17-20,25.
- 5 张红,马博.两种不同的上游法处理精液对常规体外受精结果的影响[J].中国医药导报,2010,7(33):46-47.
- 6 谷翊群,等. WHO 人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5 版.北京:人民卫生出版社,2011.
- 7 中华人民共和国卫生部.人类辅助生殖技术规范[M].北京:中华人民共和国卫生部.
- 8 黄国宁.体外受精-胚胎移植实验室技术[M].北京:人民卫生出版社,2012.
- 9 王一飞.21 世纪的精液分析技术:现状·争议·展望[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2010,29(3):131-132.

(收稿日期:2017-07-03)

(本文编辑:杨程伍 李银平)

消 息

第三届安徽省检验医师学术年会

由安徽省医师协会医学检验医师分会、安徽省免疫学会检验专业委员会主办的“第三届安徽省检验医师学术年会”,定于 2017 年 12 月中旬在合肥召开。本次会议以“开创检验专家平台,提高检验质量和临床服务水平”为主题,充分发挥检验医师分会的行业带头作用和社会影响力。会议将设定主题报告和五个论坛专题报告,届时将邀请国内外知名专家及本省中青年学术技术带头人共同探索检验医学的发展方向,突破行业发展瓶颈,分享检验专科人才培养经验,展示安徽检验医师风采。会议将进行优秀论文评选,同时授予继续医学教育 I 类学分 5 分。现将会议征文有关事项通知如下。

一、征文内容

与检验医学相关论文均可投稿。包括临床检验、临床生物化学、临床微生物学、临床免疫学、临床血液学、临床分子生物学、医学实验室认可等相关内容,欢迎检验界同仁及博士、硕士等青年骨干踊跃投稿,尤其是创新理念强、临床应用价值大的检验技术、方法、科研等方面的稿件。

二、征文要求

- 1 大会征文截止日期:2017 年 10 月 31 日 24:00。
- 2 稿件要求:论著、经验总结、综述和评论性文章均可,论文必须是未公开发表过的文章,以原始研究(论著)为主,稿件请附摘要和全文。
- 3 大会将组织权威专家对论文进行评选,论文以“科学性、创新性、实用性”为基本准则,优秀论文设一、二、三等奖,并对优秀参展论文进行壁报交流。

三、投稿邮箱

liming19831002@163.com

四、联系人及电话

李明:18919685630;孙安源:18955114079

五、会议具体时间、地点见第二轮通知