

重度少、弱、畸精症及阻塞性无精症患者单精子卵胞浆内注射治疗结果分析

董先宏 刘雨生 骆丽华 朱明 周桂香 付应云 季静娟

摘要 目的 回顾性分析应用单精子卵胞浆内注射(ICSI)技术治疗重度少、弱、畸精症及阻塞性无精症性不育的临床效果。方法 收集2001年5月~2003年3月在我中心接受ICSI技术治疗的29例(31个周期)重度少、弱、畸精症及8例(9个周期)阻塞性无精症患者为研究对象,长方案进行超促排卵,ICSI常规操作,分析体外排精组和附睾取精组ICSI后的妊娠结局。结果 40个周期共获卵372枚,平均获卵 9.3 ± 5.36 枚,其中可注射的M II成熟卵326个(87.6%),注射后存活卵306枚(93%)。受精率78.6%(241/306),胚胎形成率89%(215/241),优质胚胎形成率39%(84/215),平均移植胚胎数 2.73 ± 0.85 ,周期生化妊娠率35%,临床妊娠率27.5%。1例3胎、3例双胞胎,多胎率36%,目前已全部出生,共诞生了16名健康婴儿。结论 ICSI技术是治疗重度少、弱、畸精症及阻塞性无精症性不育的有效手段。

主题词 单精子卵胞浆内注射;阻塞性无精症;重度少、弱、畸精症;附睾/睾丸精子抽吸术;不育;男(雄)性/治疗;受精;少精液症/治疗

中图分类号 R698.2

文献标识码 A 文章编号 1000-1492(2004)03-0220-03

1992年Palermo在世界上率先报道应用卵细胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术获得健康婴儿出生。该技术随后在许多国家得到应用和发展。我国应用ICSI技术获得首例健康婴儿是1996年出生于广州^[1]。本中心于2000年开展此项技术,本组收集2001年5月~2003年3月在我中心接受ICSI技术治疗的29例重度少弱畸精症及8例无精症不育患者的资料,现将治疗结果报道如下。

2003-09-22收稿,2004-03-25修回

作者单位:安徽医科大学附属省立医院生殖医学中心,合肥 230001

作者简介:董先宏,男,35岁,助理研究员;

刘雨生,男,48岁,主任医师,教授,硕士生导师,通讯作者

1 材料与方法

1.1 治疗前的有关检查

1.1.1 按WHO标准评估男方精液指标,应用伟力彩色精子分析系统检测精液。20例精液的平均正常活动精子数 5×10^5 ;11例由于精子数太少,未进行计数分析,10×20倍显微镜下观察为0-3——2-7个精子;8例阻塞性无精症患者经皮附睾穿刺证实有生精能力。

1.1.2 女方按常规IVF检查进行。

1.1.3 男、女双方均进行染色体G显带核型分析,双方均无异常。

1.2 研究对象 2001年5月~2003年3月在我中心接受ICSI技术治疗的37对(40个周期)不育患者。其中重度少弱畸精症31个周期及阻塞性无精症9个周期。女方年龄26~39(30.5 ± 3.6)岁、男方年龄29~40(32.5 ± 3.7)岁,平均不育年限2~14(6.1 ± 2.4)年。

1.3 方法

1.3.1 超促排卵 采用GnRH-α/HP-FSH或HP-FSH+HMG/HCG长方案,至主卵泡直径达18mm,肌注人绒毛膜促性腺激素10000IU,35~36h内经阴道B超引导下取卵。

1.3.2 卵子收集 将卵丘复合体收集到Gammet20(美国、Vitrolife公司)培养液中冲洗两次,转移到IVF-20(美国、Vitrolife公司)培养液中,37℃、5%CO₂条件下培养。

1.3.3 精子准备 卵子取出后男方排精,用密度梯度法分离精子。附睾取精子显微操作前1h进行,局部阻滞麻醉下经皮穿刺附睾,用7号针头抽吸,或行阴囊微切口暴露附睾,直视下穿刺附睾,抽吸液置显微镜下观察有无活动精子及数量、活率、畸形率,然后转移IVF-20培养液中37℃孵育箱待用。

eight cases had carotid arteriosclerotic plaques, the occurrence rate was 67.61%. Carotid atherosclerosis plaques were more common in the bifurcation, especially in the left side. **Conclusion** Color doppler flow imaging is an important accurate method in detection of carotid atherosclerosis plaques.

MeSH attherosclerosis/ultrasonography; ultrasonography doppler, color; carotid arteries

1.3.4 裸卵制备 根据卵母细胞成熟度于取卵后 3~6 h 用透明质酸酶消化卵丘复合体, 用内径 150 μm 左右的毛细管反复吹吸以去除颗粒细胞, 获得显微注射用裸卵。

1.3.5 显微操作 裸卵准备好后, 开始准备操作皿, 即在显微操作皿加入数滴 Gammet-20、一滴精子上游液及 PVP 液, 用矿物油覆盖, ICSI 方法同文献^[1,2]显微操作完毕观察卵有无破损, 经冲洗后转入培养液中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

1.3.6 受精判断及胚胎移植 注射后 16~20 h 在倒置镜下观察受精情况, 有两个原核者为正常受精。24 h 后观察分裂情况, 第 2 或第 3 天选择分裂均匀、无碎片或碎片少的良好胚胎进行移植。每次移植胚胎数不超过 3 个。

1.3.7 移植后 15 天测尿 HCG 及血 β -HCG 均为阳性者为生化妊娠; 妊娠 7 周行 B 超检查, 见孕囊及胎心搏动诊断为临床妊娠。

1.4 统计学方法 两样本均数用 t 检验, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组妊娠率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

40 个周期共获卵 372 枚, 平均获卵 (9.3 ± 5.36) 枚, 其中可注射的 M II 成熟卵 326 个 (87.6%), 注射后存活卵 306 枚 (93%)。受精率 78.6% (241/306), 胚胎形成率 89% (215/241), 优质胚胎形成率 39% (84/215), 平均移植胚胎数 2.73 ± 0.85 , 周期生化妊娠率 35% (14/40), 周期临床妊娠率 27.5% (11/40)。1 例 3 胎、3 例双胞胎, 多胎率 36%, 目前已全部出生, 共诞生了 16 名健康婴儿。附睾取精和体外排精组的取卵数、注射后存活卵数、优质胚胎数均无差异。虽然正常受精数、卵裂数、移

植胚胎数差异具有统计学意义, 但其生化妊娠率、临床妊娠率差异无显著性。两组结果比较见表 1。

40 个周期中, 14 个周期生化妊娠, 11 个周期临床妊娠。妊娠组与非妊娠组的女方年龄、不育年限、男方年龄、取卵数、正常受精数、优质胚胎数、移植胚胎数差异无显著性。结果的比较见表 2。

3 讨论

ICSI 技术自 1992 年首次在人类获得妊娠成功以来, 经过十几年的发展, 其适应症由早期的治疗少、弱、畸精引起的不孕, 扩大到原因不明不孕及前次体外受精—胚胎移植 (IVF-ET) 不受精或受精率低于 30% 的病人, 目前可从附睾或睾丸获取精子利用 ICSI 技术进行不孕症的治疗。

本组收集了经 ICSI 治疗后的重度少、弱、畸精症及阻塞性无精症 37 例 40 个周期的资料, 共有 11 例临床妊娠, 周期临床妊娠率 27.5%, 低于本中心同期的体外受精—胚胎移植 (IVF-ET) 36% 的临床妊娠率, 这可能与早期 ICSI 操作技术的不够熟练从而影响胚胎的质量有关。李满等^[2]报道附睾/睾丸精子 ICSI 后正常受精率低于其他原因的 ICSI 治疗组, 也低于 IVF 组, 但临床妊娠率并无差异, 这与本研究的结论相一致。就其可能的原因: 一方面在重度少、弱、畸精精液或附睾/睾丸抽吸液中活力、形态正常的精子很难找到从而影响 ICSI 操作进程。另一方面在精液或抽吸液中寻得的外观正常的精子, 其基因或显微结构可能存在异常。有资料表明^[3], 男性不育的遗传缺陷如染色体数量和结构异常的发生率远高于表型正常有生育力的男子。傅俊江等^[4]认为, Y 染色体微缺失, 特别是 AZFc/DAZ 的缺失是引起无精和严重少精、造成男性不育的重要

表 1 体外排精组和附睾取精组的 ICSI 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	周期数	取卵数	成熟卵母细胞	注射后存活卵子数	正常受精	卵裂	优质胚胎数	移植胚胎数	生化妊娠 Δ	临床妊娠 Δ
体外排精	31	10 \pm 5.8	8.1 \pm 4.1	7.4 \pm 3.4	6.1 \pm 2.8	6.0 \pm 2.8	2.6 \pm 1.3	2.9 \pm 0.7	35.5%	26%
附睾取精	9	6.9 \pm 2.3	6.2 \pm 2.4	5.8 \pm 2.5	3.3 \pm 2.4	3.3 \pm 2.4	2.3 \pm 1.3	2.3 \pm 0.7	33.3%	33.3%

两样本均数比较用 t 检验, $P < 0.01$; Δ 妊娠率经 χ^2 检验, 差异无显著性

表 2 妊娠组与非妊娠组的结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	周期数	女方年龄	不育年限	男方年龄	取卵数	正常受精	优质胚胎数	移植胚胎数
妊娠	14	29.9 \pm 2.9	5.6 \pm 1.7	31.2 \pm 3.3	9.6 \pm 4.4	5.6 \pm 3.0	2.9 \pm 1.2	2.7 \pm 0.7
非妊娠	26	30.6 \pm 4.2	6.0 \pm 3.2	33.2 \pm 4.2	9.2 \pm 5.6	5.4 \pm 3.0	2.3 \pm 1.2	2.9 \pm 0.7

两样本均数比较采用 t 检验, 各项差异均无显著性

原因之一, 建议在进行 ICSI 前, 除了对染色体进行检查外, 有必要对不明原因的不育男性患者进行 Y 染色体微缺失分子检测。从而避免遗传缺陷传给下一代。

阻塞性无精症患者精子的采集方法有多种, 本中心采用经皮附睾精子吸引(PESA)法。本组 8 例无精症患者均在进入周期前经皮附睾穿刺证实有生精能力, ICSI 当日均取出活动精子。精液取出后可用离心或上游洗涤方法处理或不加处理即直接进行 ICSI。本中心起初采用离心法处理精液, 但精子收集不甚理想, 因而后来采用上游洗涤法处理再进行 ICSI, 这样省时、方便、有效。

总之, ICSI 技术是解决男性因素不育的一个有效方法, 但 ICSI 的遗传风险要高于 IVF-ET, 因为在生物进化过程中, 雌雄配子的受精是进行自然选择的重要环节, 部分染色体及基因异常的配子可通过受精失败而淘汰。ICSI 的应用越过了自然受精过程, 失去了生物自然选择的机会, 有研究显示 ICSI 时男方部分的 DNA 碎片携带进入卵子内, 这也增加了 ICSI 的遗传风险^[5, 6]。

ICSI 技术应用于人类仅十几年, 目前尚未发现借助 ICSI 技术诞生婴儿的健康状况与正常妊娠出生的婴儿差异有显著性。但婴儿的成年后的生育能力等健康状况尚需要进一步的跟踪研究^[5]。所以对 ICSI 的适应征应严格控制。

参考文献

- 1 李 蓉, 庄广伦, 张敏芳 等. 卵母细胞单精子显微注射治疗男性因素及不明原因不育. 中华妇产科杂志, 1997; 4(32): 211~3
- 2 李 满, 庄广伦, 李 蓉 等. 附睾、睾丸精子卵浆内单精子注射治疗阻塞性无精症引起不育. 中华泌尿外科杂志, 1998; 19(10): 625~8
- 3 李 娟, 王克华, 张 琦 等. ICSI 技术治疗男性不育的遗传风险. 国外医学计划生育分册, 2002; 21(1): 8~10
- 4 傅俊江, 李麓云, 钟昌高 等. 特发性无精症和严重少精症患者 Y 染色体微缺失的分子检测. 生殖与避孕, 2001; 21(1): 29~32
- 5 Ramos L, Kleingeld P, Meuleman E *et al.* assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2002; 77(2): 233~7
- 6 Dohle GR, Halley DJJ, Van Hemel JO *et al.* Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 7(1): 13~6

Evaluation of treatment of intracytoplasmic sperm injection for infertility of severe oligo-astheno-teratospermia and obstructive azoospermia

Tong Xianhong, Liu Yusheng, Luo Lihua *et al*

(*Reproductive Medicine Center of Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001*)

Abstract Objective To evaluate the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the treatment for infertility of severe oligo-astheno-teratospermia and obstructive azoospermia. **Methods** One group of 29 couples (31 cycles) because of severe oligo-astheno-teratospermia and another group of 8 couples (9 cycles) because of obstructive azoospermia received ICSI. Ovarian stimulation was achieved by conventional long-protocol. Only matured oocytes were selected for ICSI. The pregnancy rate of the 2 groups was analyzed. **Results** The total number of oocytes collected was 372, average number of oocytes was 9.3 ± 5.36 each cycle. Injectable oocytes accounted for 326 (87.6%) and fertilized oocytes was 241 (78.6%). Embryos developed added up to 215 (89%), of which 84 (39%) had good morphology. The average number of embryo transfer was 2.73 ± 0.85 . The clinical pregnancy rate was 27.5%. 16 healthy babies of 11 couples were delivered. **Conclusion** ICSI is an effective treatment for infertility of severe oligo-astheno-teratospermia and obstructive azoospermia.

MeSH intracytoplasmic sperm injection; obstructive azoospermia; oligo-astheno-teratospermia; epididymas sperm aspiration/testicular sperm extraction; infertility, male/therapy; oligospermia/therapy; fertilization