

获得性梗阻性无精症患者预处理 改善经皮附睾穿刺-卵泡浆单精子注射治疗结局的 临床研究

黄吴健 张燕 黄群花 陈国勇 林春丽 刘芸[△]

南京军区福州总医院生殖中心, 福建福州 350025

[摘要] 目的 分析获得性梗阻性无精症患者预处理对经皮附睾穿刺-卵泡浆单精子注射(PESA-ICSI)治疗结局的影响。方法 选择2009年1月~2011年6月南京军区福州总医院生殖中心诊断为获得性梗阻性无精症(OA)的患者109例,随机分为两组。预处理组55例,临床检查有附属腺炎症或微生物感染患者先给予抗生素和抗炎治疗,接着给予抗氧化和促进附睾精子成熟治疗2个月(十一酸睾酮40 mg, po, qd, 维生素C 200 mg, po, bid, 维生素E 100 mg, po, bid, 左卡尼汀1.0 g, po, bid),无附属腺炎症或微生物感染患者,直接抗氧化和促进附睾精子成熟治疗;对照组54例,有附属腺炎症指征患者给予抗炎、抗感染治疗,余未作任何处理。比较两组诊断日与ICSI日精子活动力和ICSI后胚胎发育和临床结局。结果 ①两组诊断日经附睾穿刺液精子的总活动率和前向运动精子率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。ICSI日预处理组精子总活动率和前向运动精子率均有提高($P < 0.01$),而对照组无明显变化($P > 0.05$);两组ICSI日精子总活动率和前向运动精子率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②两组受精率、卵裂率差异无统计学意义($P > 0.05$);预处理组优质胚胎率为67.26%,高于对照组的60.49%,差异有统计学意义($P < 0.05$);预处理组临床妊娠率和植入率分别为47.16%和29.72%,高于对照组的37.25%和23.36%,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 对获得性OA患者进行抗氧化、促进精子成熟的预处理治疗,可以提高精子活动力,能够改善胚胎质量,但是对于ICSI治疗后临床妊娠率和植入率的影响还需要更大样本的观察。

[关键词] 梗阻性无精症;精子活动力;预处理;经皮附睾穿刺-卵泡浆单精子注射

[中图分类号] R697.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2013)11(a)-0060-04

Clinical research of pretreatment for the patients with acquired obstructive azoospermia in the improvement of percutaneous epididymal sperm aspiration-intracytoplasmic sperm injection

HUANG Wujian ZHANG Yan HUANG Qunhua CHEN Guoyong LIN Chunli LIU Yun[△]

Department of Assisted Reproduction Center, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fujian Province, Fuzhou 350025, China

[Abstract] Objective To analyze the pretreatment for the patients with acquired obstructive azoospermia in the improvement of percutaneous epididymal sperm aspiration-intracytoplasmic sperm injection (PESA-ICSI). **Methods** 109 patients diagnose as acquired obstructive azoospermia (OA) in Department of Assisted Reproduction Center, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command from January 2009 to June 2011 were selected and divided into pretreatment group ($n = 55$) and control group ($n = 54$) randomly. Patients in pretreatment group with identified infection/inflammation of the accessory glands were treated with sensitive antibiotics or anti-inflammatory drugs; then pretreatment group was give antioxidant and sperm maturation promotion treatment (testosterone undecanoate 40 mg, po, qd, Vitamin C 200 mg, po, bid, Vitamin E 100 mg, po, bid, levocarnitine 1.0 g, po, bid) for 2 months. Patients in pretreatment group without identified infection/inflammation were treated with antioxidant and sperm maturation promotion treatment directly. Patients in control group with identified infection/inflammation were treated with nothing except antibiotics and anti-infection treatment. Sperm motility on diagnosis day and ICSI day in the two groups were compared; embryonic development and clinical outcome after ICSI were compared. **Results** ①The differences of total epididymal sperm motility and forward epididymal sperm motility in the two groups on diagnosis day were not statistically significant ($P > 0.05$). The total epididymal sperm motility and forward epididymal sperm motility in pretreatment group on ICSI day were enhanced ($P < 0.01$), no change was found in control group ($P > 0.05$). The differences of total epididymal sperm motility and forward epididymal sperm motility in the two groups on ICSI day were statistically significant ($P < 0.05$). ②The differences of fertilization rate, cleavage

[△]通讯作者

rate in the two groups were not statistically significant ($P > 0.05$); high quality embryo rate of pretreatment group was 67.26%, it was higher than that of control group (60.49%), the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Clinical pregnancy rate and implantation rate of pretreatment group were 47.16% and 29.72% respectively, they were all higher than those of control group (37.25%, 23.36%), but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Pretreatment of antioxidants and sperm maturation promotion therapy can increase the epididymal sperm motility and improve the quality of embryo in patients with obstructive azoospermia, but the advantageous effect of pretreatment on the PESA-ICSI outcomes remains need some large sample study.

[Key words] Obstructive azoospermia; Sperm motility; Pretreatment; Percutaneous epididymal sperm aspiration-intracytoplasmic sperm injection

梗阻性无精症 (obstructive azoospermia, OA) 是一类因各种原因引起的精子输送管道阻塞, 导致射出精液中无精子的疾病, 约占男性不育人群的 5%~10%^[1]。就其发生原因可分为先天性因素, 如: 先天性双侧输精管发育不全 (congenital absence of the vas deferens, CBAVD)、先天性附睾发育不全、先天性精囊发育不全或缺如等; 获得性因素, 多为感染、手术创伤和肿瘤侵蚀、压迫所致^[2]。对于 OA 患者的治疗过去常用手术复通的方法, 但是由于梗阻部位和梗阻病因的复杂性, 以及部分患者合并睾丸生精功能的损伤和手术切口再堵等原因, 传统方法往往效果不佳。随着人工辅助生育技术的发展, 微创取精结合卵胞浆单精子注射 (ICSI) 已经成为大多数 OA 患者的选择^[3]。一般而言 OA 患者睾丸的生精功能基本正常或仅有轻微损伤, 但是临床工作中常常发现从 OA 患者附睾中获取的精子往往活动力不佳, 极少数患者活动率甚至低于 1%。近年来许多关于 OA 的基础研究发现, 输精管道发生梗阻以后, 附睾上皮的结构和功能会发生适应性改变^[4], 附睾中的精子由于长时间的驻留往往导致活性氧损伤^[5], 线粒体、DNA 损伤的精子比例增加^[6-7]; 许多临床学者统计了 OA 患者 ICSI 结局的资料亦发现, OA 的发生原因会影响 ICSI 的成功率, 尤其既往慢性附睾感染的患者成功率最低^[8-9]。基于以上原因, 本研究采用经皮附睾穿刺-卵胞浆单精子注射 (PESA-ICSI) 治疗的 OA 患者, 分析预处理方案对临床结局的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2009 年 1 月~2011 年 6 月南京军区福州总医院生殖中心诊断性经皮附睾穿刺抽吸术 (PESA) 证实为获得性 OA 的患者 109 例, 确定可以进行体外受精并征得患者同意, 同时排除合并有心血管、肝、肾和造血系统原发性疾病, 配偶没有明确的可检出不孕因素。所有患者均 2 次以上经精液常规检查证实为无精子症, 睾丸大小、质地, 以及血清促卵泡素 (FSH) 均在正常范围。染色体核型 46XY, Y 染色体微缺失未检

出。患者随机分为两组。预处理组 55 例, 患者平均年龄 (29.81±3.56) 岁, 配偶平均年龄 (28.98±4.18) 岁, 平均不孕年限 (3.25±1.62) 年; 对照组 54 例, 患者平均年龄 (30.21±3.90) 岁, 配偶平均年龄 (29.54±3.48) 岁, 平均不孕年限 (3.72±3.02) 年。两组一般资料比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 两组患者治疗方案 ①预处理组根据精浆弹性硬蛋白酶、前列腺常规、前列腺液微生物学 (支原体、衣原体、常见附属腺致病菌和条件致病菌) 检查, 判断附属腺炎症和感染情况, 诊断附属腺炎症或感染患者先给予抗生素和抗炎治疗, 复查治愈或好转患者接着经验性给予抗氧化和促进附睾精子成熟治疗 2 个月 (十一酸睾丸酮 40 mg, po, qd, 维生素 C 200 mg, po, bid, 维生素 E 100 mg, po, bid, 左卡尼汀 1.0 g, po, bid), 无感染和炎症征象患者直接进行抗氧化和促进附睾精子成熟治疗; ②对照组有附属腺炎症指征患者给予抗炎、抗感染治疗, 余未作任何处理。

1.2.2 超促排卵 两组患者的配偶均采用长方案降调节, 月经周期的黄体中期给予促性腺激素激动剂, 月经周期第 3~5 天开始应用促卵泡素 75~225 U, 经阴道 B 超监测卵泡发育, 当主导卵泡有 3 个直径 ≥ 17 mm 时, 给予人绒毛膜促性腺激素 10 000 U, 34~36 h 后, 经阴道 B 超引导下双侧卵巢穿刺取卵。获得的卵母细胞置于人输卵管液 (HTF 培养液)、5%CO₂、37℃ 培养箱内备用。

1.2.3 经皮附睾穿刺抽吸术 患者取平卧位, 常规消毒阴囊局部, 1%利多卡因局麻, 经皮肤提起附睾并固定, 1 mL 注射器吸取缓冲人输卵管液 (mHTF) 0.2 mL, 从附睾尾部开始穿刺抽吸, 抽出液在 200 倍倒置显微镜下观察, 见足量活动精子即为穿刺成功, 记录精子情况。获取的附睾液经离心洗涤备用。

1.2.4 卵胞浆单精子注射 在 200 倍倒置显微镜下, 使用显微操作系统进行。用细玻璃管小心去除卵母细胞表面的颗粒细胞, 显微穿刺针吸取形态正常、活力较好的精子, 制动, 持卵针固定卵母细胞, 将第一极体置

于 12 点或 6 点处,于 3 点或 9 点处穿破卵细胞膜,将已制动的精子释放于卵母细胞浆内,小心取出穿刺针。穿刺后的卵母细胞继续置于 5%CO₂、37℃ 培养箱内培养,18 h 后观察,卵细胞内见原核即为受精成功。对照组同法处理。

1.2.5 胚胎培养和移植 受精卵继续培养 24~48 h,分裂为 4~8 细胞时,选择细胞均匀、折光性好、碎片少的优质胚胎,装入胚胎移植管内,送入子宫腔中底部,等待胚胎着床。移植后应用黄体酮进行黄体支持,2 周后妊娠试验阳性,4 周后 B 超见妊娠囊为临床妊娠成功。

1.3 观察指标

1.3.1 诊断日与 ICSI 日精子活动力比较 将抽吸出来的附睾液置于显微镜下观察,计算 10 个高倍视野下活动精子及前向运动精子所占比例。

1.3.2 预处理组与对照组 ICSI 后胚胎发育和临床结局 ICSI 后 18 h 观察,卵细胞内见原核即为受精成功;受精卵继续培养 24~48 h,分裂为 4~8 细胞时,卵裂球较均匀、折光性好、碎片少 20% 的为优质胚胎;移植 2 周后妊娠试验阳性,4 周后 B 超见妊娠囊为临床妊娠成功。

1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 13.0 对数据进行分析,正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本的计量资料采用 *t* 检验。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精子活动情况

预处理患者中 26 例精子有较好提高,16 例轻度提高,13 例改善不明显。整体分析两组诊断日经附睾穿刺液精子的总活动率和前向运动精子率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。ICSI 日预处理组精子总活动率和前向运动精子率均有提高($P < 0.01$),而对照组无明显变化($P > 0.05$);两组 ICSI 日精子总活动率和前向运动精子率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两组 ICSI 临床结局比较

两组受精率、卵裂率差异无统计学意义($P > 0.05$);预处理组优质胚胎率 67.26%,高于对照组的

表 1 诊断日与 ICSI 日穿刺精子活动力比较(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	精子总活动率			前向运动精子率		
	诊断日	ICSI 日	<i>P</i> 值	诊断日	ICSI 日	<i>P</i> 值
预处理组(<i>n</i> = 55)	8.3±5.0	13.7±10.2	0.001	2.3±1.7	4.6±3.4	0.000
对照组(<i>n</i> = 54)	7.9±4.9	7.5±6.4	0.650	2.2±1.7	1.8±1.9	0.580
<i>P</i> 值	0.730	0.000		0.860	0.000	

注:ICSI:卵胞浆单精子注射

60.49%,差异有统计学意义($P < 0.05$);预处理组新鲜周期移植 53 例,临床妊娠 25 例,移植 111 个胚胎形成 33 个孕囊,临床妊娠率和植入率分别为 47.16%和 29.72%,高于对照组的 37.25%和 23.36%,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

梗阻性无精症 OA 就其发生原因可以分为先天性和获得性因素,虽然二者从发生机制上皆为输精管道的梗阻,但是前者涉及基因水平的因素,对于 ICSI 结局的影响可能与获得性因素有所不同^[9],因此本次实验入选的 109 例病例,皆排除了先天性的 OA。获得性因素中最常见的是感染,本次入选的 109 例病例中有 92 例有明确的生殖道感染病史,其中有 62 例是因为淋球菌感染引起;有 17 例原因不明,没有明确感染史,经直肠彩超和精浆果糖试验皆正常,排除先天性 OA。所有 OA 患者皆进行附属腺炎症和感染情况评估,包括精浆弹性硬蛋白酶、前列腺常规、前列腺液微生物学(支原体、衣原体、常见附属腺致病菌和条件致病菌)检查,有明确附属腺炎症/感染指征患者 45 例,敏感抗生素和抗炎治疗。

OA 患者因输精管道的梗阻存在精子郁积现象,大量精子阻塞在附睾和输精管中,压力增加使附睾发生一定程度结构和功能的改变,长期郁积管道周围吞噬细胞被激活清除精子,由于白细胞和精子的运动能够产生大量的活性氧 ROS,导致精子胞膜发生脂质过氧化、线粒体 DNA 和染色体 DNA 断裂和缺口增加。许多学者建议在进行 ICSI 治疗之前,给予 OA 患者一段时间的抗氧化治疗,虽然效益还没经过大范围统计^[5,10]。维生素 C 和维生素 E 是传统的治疗男性不育的药物,能够保护精子发生过程中的损伤^[11,12];卡尼汀是细胞线粒体膜上转运长链脂肪酸的载体成分,对细胞能量的产生和转运起重要作用,仅 L-异构体存在

表 2 33 例梗阻性无精症患者卵胞浆单精子注射结果

组别	女方年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	男方年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	获卵数 (枚, $\bar{x} \pm s$)	M II 卵子数 (枚, $\bar{x} \pm s$)	受精情况 [<i>n</i> (%)]	卵裂情况 [<i>n</i> (%)]	优质胚胎 [<i>n</i> (%)]	移植胚胎 数(个, $\bar{x} \pm s$)	植入胚胎 [<i>n</i> / <i>n</i> ₂ (%)]	临床妊娠 [<i>n</i> / <i>n</i> ₂ (%)]
预处理组(<i>n</i> = 55)	28.98±4.18	29.81±3.56	10.07±4.71	9.11±4.95	391(77.58)	377(96.42)	263(67.26)	2.02±0.7	33/111(29.72)	25/53(47.16)
对照组(<i>n</i> = 54)	29.54±3.48	30.21±3.90	9.65±5.15	8.65±4.79	367(78.59)	348(94.82)	222(60.49)	2.13±0.6	25/107(23.36)	19/51(37.25)
<i>P</i> 值	0.45	0.49	0.65	0.62	0.71	0.28	0.05	0.91	0.28	0.31

生物活性,即左卡尼汀。左卡尼汀在附睾内部分被乙酰辅酶 A 转换成乙酰左卡尼汀,左卡尼汀和乙酰左卡尼汀在精浆中有很高的浓度,不仅参与精子的能量代谢,而且和精子的活力、密度密切相关。有研究表明口服左卡尼汀能够提高精浆的左卡尼汀水平,并能增加精子的活动率,近年来国内外广泛用于治疗特发性少弱畸精症和感染后弱精症^[13-16];十一酸睾酮是雄性激素,许多研究表明低剂量的补充能够增加附属腺的分泌功能,改善精子的生存环境,对各种原因造成的生殖损害有一定效果。本实验经验性的采用维生素 C、维生素 E、左卡尼汀和低剂量十一酸睾酮组方,以期实现抗氧化和促进精子成熟的作用,在日常诊治过程中发现对于精子活动力的改善,多数情况半个月即可出现疗效,而且采用 ICSI 方式受精对精子数量要求不高,因此本研究将治疗时间定为 2 个月。

实验中预处理组 55 例,其中有 26 例精子活动力获得明显改善,其中有 1 例在外院穿刺时活动率不足 1%,治疗后 ICSI 穿刺日活动率达到 9%;16 例轻度改善,另外有 13 例精子质量较差的改善不明显。预处理组 55 例治疗后活动率(13.2±10.5)%,前向运动精子(4.6±3.4)%与治疗前[(8.8±6.3)%、(2.3±1.7)%]比较有明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$);而对照组治疗前后没有显示出明显差别。本研究也统计了 ICSI 临床资料,预处理组和对照组在受精率、卵裂率没有表现出差异;但在优质胚胎率上预处理组高于对照组;预处理组 53 例,移植 111 个胚胎,33 个发生植入,获得 25 例临床妊娠,临床妊娠率和植入率分别为 47.16%和 29.72%,高于对照组 37.25%和 23.36%,但差异无统计学意义($P > 0.05$),可能与样本量太小有关。对于预处理对 ICSI 临床效益的观察仍需要更大样本的研究。

[参考文献]

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on management of obstructive azoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(5): 259-263.
- [2] 李立,钟红兴.梗阻性无精子症的临床诊断和外科治疗[J]. *临床医学*, 2012, 32(2): 112-114.
- [3] Bernie AM, Ramasamy R, Stember DS, et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration: indications, techniques and outcomes [J]. *Asian J Androl*, 2013, 15(1): 40-43.
- [4] Pelliccione F, Cordeschi G, Bocchio M, et al. Immunophenotypic characterization of contractile cells in caput epididymidis of men affected by congenital or post-inflammatory obstructive azoospermia [J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(4): 289-294.
- [5] Basar MM, Kisa U, Tuglu D, et al. Testicular nitric oxide and thiobarbituric acid reactive substances levels in obstructive azoospermia: a possible role in pathophysiology of infertility [J]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006(3): 274258.
- [6] O'Connell M, McClure N, Lewis SE. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(6): 1571-1577.
- [7] Ramos L, de Boer P, Meuleman EJ, et al. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia [J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 8(4): 392-397.
- [8] Nicopoloulos JD, Gilling-Smith C, Ramsay JW. Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis [J]. *BJU Int*, 2004, 93(9): 1282-1286.
- [9] Kamal A, Fahmy I, Mansour R, et al. Does the outcome of ICSI in cases of obstructive azoospermia depend on the origin of the retrieved spermatozoa or the cause of obstruction? A comparative analysis [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(6): 2135-2140.
- [10] 王浩飞,沈健.左卡尼汀对梗阻性无精子症病人附睾精子质量的影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2006, 25(9): 721-723.
- [11] Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment [J]. *J Androl*, 2005, 26(3): 349-353.
- [12] Ross C, Morriss A, Khairy M, et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(6): 711-723.
- [13] Sigman M, Glass S, Campagnone J, et al. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(5): 1409-1414.
- [14] 王磊,卢玉忠,袁少英.中西医结合治疗慢性附睾炎不育症及其彩超图像的对比分析[J]. *中国医药导报*, 2012, 9(4): 120-121.
- [15] 卢少明,李晓,张浩波,等.左旋肉碱在经皮附睾穿刺取精-卵细胞胞质内单精子注射治疗中的应用[J]. *中华男科学杂志*, 2010, 16(10): 919-961.
- [16] Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, et al. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2(2): 73-81.

(收稿日期:2013-08-05 本文编辑:李继翔)