

乙型肝炎病毒男性携带者行 IVF/ICSI 治疗的结局分析

陈 华 武新梅 习海涛 单 丹 管荷琴 葛红山 吕杰强

摘 要 **目的** 研究男性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染对 IVF/ICSI(in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection)过程和周期结局的影响。**方法** 115 对男方乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性、女方阴性的夫妇作为实验组,对照组为夫妇双方 HBsAg 均阴性,根据 HBV 组女性年龄、月经第 3 天 FSH 值、体重指数和治疗方法(IVF 或 ICSI)按 1:2 的比例进行配对,比较分析两组的 FSH 注射天数、Gn(gonadotropin)用量、HCG(human chorionic gonadotropin)日子宫内膜厚度和 E₂(estradiol)值、平均获卵数、成熟率、2PN(two pronucleus)受精率、卵裂率、优质胚胎率、临床妊娠率和种植率等参数。**结果** 两组间各项指标均无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 男性 HBV 感染不影响 IVF/ICSI 过程和周期结局。

关键词 乙型肝炎 IVF/ICSI 临床妊娠率

Effect of HBV Seropositive in Male on the Process and Outcomes of IVF/ICSI Treatment. Chen Hua, Wu Xinmei, Xi Haitao, Shan Dan, Guan Heqin, Ge Hongshan, Lü Jieqiang. The Second Affiliated Hospital of Chinese Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To evaluate the possible influence of IVF/ICSI cycles on outcomes in Hepatitis B surface antigen(HBsAg) seropositive men and seronegative female partners. **Methods** Totally 115 IVF/ICSI cycles in couples with men HBV infection were compared with 230 cycles in non-infected couples, matched for female age, D3 serum FSH level, body mass index, type of infertility(primary or secondary), reasons for infertility and ART approach used(IVF or ICSI). **Results** Duration of FSH injection, total dosage of gonadotropin, serum estradiol level and endometrial thickness on the day of hCG injection and mean number oocytes retrieved were similar when compared to matched control. Rates of two-pronuclear, cleaved embryos and proportion of viable embryos were comparable between the two groups. And there was no significant difference in ongoing pregnancy rate and implantation rate between seropositive women group and matched-control. **Conclusion** These datum indicate that men with HBV infection is unlikely to represent poor IVF/ICSI outcomes.

Key words Hepatitis B; In vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection; Clinical pregnancy rate

乙型肝炎是危害人类健康的全球性疾病。近年来的研究发现,HBV 并非专一的嗜肝病毒,还可以通过血睾屏障进入睾丸组织和精液中,有可能影响精液质量,降低男性生育能力^[1,2]。有报道证实,HBV DNA 以多位点随机的方式整合到人精子染色体中,造成染色体的不稳定性和染色体结构的改变,垂直传播给子代^[3]。这些可能会降低胚胎的发育潜能,影响 IVF/ICSI 周期结局。

材料与方法

1. 研究对象及分组:对 2008 年 1 月~2011 年 7 月在温州医学院附属第二医院生殖中心第 1 次行 IVF/ICSI 治疗的 1938 对不孕夫妇进行筛选。入选标准:女方为无明确原因或

单一的输卵管原因不孕,或为男方原因的不育;获卵数不少于 5 个,有进行胚胎移植的;所有入选的夫妻均 HCV、HIV 和梅毒螺旋体抗体阴性,血丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶正常。经筛选后,男方乙肝表面抗原阳性、女方阴性的 115 对夫妇作为 HBV 组,对照组为夫妇双方 HBsAg 均阴性,根据 HBV 组女性年龄、月经第 3 天 FSH 值、体重指数和治疗方法(IVF 或 ICSI)按 1:2 的比例进行配对。

2. 超促排卵方案:病例组和对照组均采用标准的短方案(不用降调节)或者长方案(用 GnRH 激动剂降调节)进行卵巢刺激。在长方案中,从月经的第 21 天开始,隔天皮下注射达菲林 0.1mg,直至注射 HCG 日。当达到降调标准(血清雌激素水平 $\leq 30\text{pg/ml}$,血清 LH $\leq 3\text{mIU/ml}$,超声检查未发现卵巢囊肿)后进行卵巢刺激。在短方案中,月经 D3 直接启动。根据患者卵泡的反应,我们给予个体化剂量的重组 FSH 进行卵巢刺激。当卵泡直径达到 14mm 时开始加用 HMG。促性腺激素的剂量根据超声检查和血清雌激素水平来调整。当最大卵泡平均直径达 17~18mm 时,注射 HCG,36h 后取卵。

基金项目:浙江省教育厅基金资助项目(Y200907948)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院

通讯作者:吕杰强,电子信箱:jieqianglv@126.com

3. 受精、胚胎发育和妊娠诊断:取卵后 4~6h,进行 IVF 受精和 ICSI。18~20h 后查看受精情况,D2、D3 每天观察胚胎发育情况。根据卵裂球的数量和形态以及胞质碎片的百分比来判断胚胎的质量。根据患者的年龄、IVF 的指征、获得的胚胎的数量和质量来决定移植 2 个或者 3 个胚胎。剩余的可利用胚胎进行玻璃化冷冻,将 HBsAg 阳性患者的胚胎置于单独的液氮罐中,以防交叉感染。移植后每天肌注 100mg 安宫黄体酮来进行黄体支持直到移植后 14 天查血 β -hCG 确定妊娠。如果未妊娠,停用安宫黄体酮。如果妊娠,则根据患者有无阴道出血酌情减量。胚胎移植后 6 周超声再次确定是否宫内妊娠。卵裂率定义为 2PN 正常卵裂的比率。可用的胚胎数是指适合移植和冷冻的胚胎。临床妊娠是指在超声下见到卵黄囊或者在流产标本中见到绒毛。流产率是指在孕 24 周前的流产。种植率指移植的胚胎中在超声下见到卵黄囊的比率。妊娠结局通过电话或者信件随访来确认。

4. 统计学方法:用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,均数比较采用 t 检验,组间率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

选择 2008 年 1 月 1 日~2011 年 7 月 31 日期间在温州医学院附属第二医院生殖中心第 1 次行 IVF/ICSI 周期治疗的患者夫妇,均由于输卵管原因或男方原因或无明确原因的不孕而行 IVF/ICSI 治疗。经严格筛选后,115 对男方 HBsAg 阳性、女性阴性的患者确立为 HBV 组,HBsAg 阴性对照组根据 HBV 组女性年龄、不孕原因、不孕类型(原发或继发)、月经第 3 天 FSH 血值、体重指数和 ART 方法(IVF/ICSI),按 1:2 的比例进行配对。

两组女性患者基础特征见表 1,各个参数间均无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1 患者基本资料($\bar{x} \pm s$)

项目	HBV 组 ($n = 115$)	对照组 ($n = 230$)
年龄(岁)	31.26 $\pm$ 4.25	31.37 $\pm$ 4.07
不孕年限(年)	4.07 $\pm$ 2.84	4.18 $\pm$ 3.03
体重指数(kg/m ²)	20.60 $\pm$ 1.87	20.62 $\pm$ 1.94
月经 D3 FSH 值(IU/L)	7.81 $\pm$ 1.89	8.01 $\pm$ 2.06
继发不孕比例(%)	77/115 (66.96)	154/230 (66.96)
输卵管不孕比例(%)	85/115 (73.91)	166/230 (72.17)

P 均 > 0.05

IVF/ICSI 周期方面,两组在 FSH 注射天数(13.99 vs 13.64)、Gn 用量(2166.45 vs 2073.26)、HCG 日子宫内膜厚度(10.37 vs 10.62)、HCG 日 E_2 值(2788.21pg/ml vs 2758.23pg/ml)、平均获卵数(13.14 vs 12.85)、成熟率(87.02% vs 86.75%)、

2PN 受精率(71.56% vs 70.56%)、卵裂率(97.64% vs 97.2%)和优质胚胎率(58.64% vs 62.77%)等指标均无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 IVF/ICSI 周期情况和胚胎学数据($\bar{x} \pm s$)

项目	HBV 组($n = 158$)	对照组($n = 230$)
Gn 注射时间(天)	13.99 $\pm$ 2.86	13.64 $\pm$ 3.14
总 Gn 注射量(IU)	2166.45 $\pm$ 411.00	2073.26 $\pm$ 503.25
hCG 注射日 E_2 值 (pg/ml)	2788.21 $\pm$ 124.94	2758.23 $\pm$ 100.78
hCG 注射日子宫内膜 厚度(mm)	10.37 $\pm$ 2.01	10.62 $\pm$ 1.90
ICSI 比例[n (%)]	22/115 (19.13)	44/230 (22.26)
平均获卵数	13.14 $\pm$ 5.66	12.85 $\pm$ 5.27
成熟率(%)	87.02 $\pm$ 14.87	86.75 $\pm$ 14.13
双原核受精率(%)	71.56 $\pm$ 18.78	70.56 $\pm$ 17.93
卵裂率(%)	97.64 $\pm$ 5.82	97.20 $\pm$ 7.56
优质胚胎率(%)	58.46 $\pm$ 28.34	62.77 $\pm$ 28.18

成熟率 = 成熟卵数/获卵数;双原核受精率 = 双原核受精数/成熟卵数;卵裂率 = 双原核卵裂数/双原核受精数;优质胚胎率 = 双原核优质胚胎数/双原核卵裂数; P 均 > 0.05

临床结果方面,HBV 组新鲜移植 115 个周期,平均移植胚胎数 2.03 个,临床妊娠率 46.09%,种植率 30.34%;对照组 230 个新鲜移植周期,平均移植胚胎数 2.06 个,临床妊娠率 41.74%,种植率 28.27%,两组间无统计学差异($P > 0.05$)。

表 3 IVF/ICSI 周期临床结局($\bar{x} \pm s$)

项目	HBV 组($n = 115$)	对照组($n = 230$)
平均移植胚胎数(个)	2.03 $\pm$ 0.51	2.06 $\pm$ 0.45
临床妊娠率[n (%)]	53/115 (46.09)	96/230 (41.74)
种植率[n (%)]	71/234 (30.34)	134/474 (28.27)

临床妊娠率 = 妊娠数/总的移植周期数;种植率 = 孕囊数/总的移植胚胎数; P 均 > 0.05

讨 论

HBV 在精液、精子中的存在和 HBV DNA 在精子中的整合状态提示其通过精子进行父婴垂直传播的可能性,虽然其确切机制和意义有待阐明,但这种存在和整合对精液质量、男性生育潜能和对 IVF/ICSI 治疗结局的可能影响应引起生殖医学领域的重视^[3]。本研究先对研究对象进行严格的筛选,选择第 1 次在本中心行 IVF/ICSI 的,不孕原因为输卵管和男方原因或无明确原因的患者夫妇,且获卵数不低于 5 个;115 对男方 HBsAg 阳性、女方阴性的夫妇作为实验组,对照组根据 HBV 组女性年龄、不孕原因、不孕类型(原发或继发)、月经第 3 天 FSH 血值、体重指数和 ART 方法(IVF/ICSI),按 1:2 的比例进行配

对,各项参数之间比较无统计学差异;统计平均获卵数、成熟率、原核受精率、卵裂率、优质胚胎率等胚胎学数据间比较无显著差异,种植率和临床妊娠率也无差异;说明男性 HBV 携带者行 IVF/ICSI 不影响胚胎发育和周期结局。

研究发现,HBV DNA 以多位点随机的方式整合到精子染色体中,造成染色体的不稳定性和结构改变,最终可能会降低生育能力,影响受精后的胚胎发育和 IVF/ICSI 周期结局^[1,4]。通过对 102 例男方 HBsAg 阳性(女方阴性)及以年龄配对的 204 例双方 HBsAg 均为阴性的夫妇作对照研究,赵二勇等^[5]发现,男方 HBsAg 阳性组的受精率、优质胚胎率、累计胚胎分数较低,卵裂率、种植率、临床妊娠率、流产率、分娩率较高,但差异均无统计学意义,证实男方携带 HBsAg 并不影响 IVF 周期的结局。费前进等^[6]对 1108 个第 1 次行 IVF/ICSI 的周期进行回顾性分析,所有女方 HBsAg 阴性,154 个周期男方阳性,得到相似的结论。本研究的结果与前两者相似,但与之不同之处在于:①前两者研究对象包括各种原因的不孕,多种因素的存在可能会使实验结果存在偏差,而本研究仅选择输卵管、男方或无明确原因的不孕患者;②本研究对照组根据 HBV 组女性年龄、不孕原因、不孕类型、月经第 3 天 FSH 血值、体重指数和使用 ART 方法进行了严格的配对。这使得本研究的对象相对一致,更能反映事情的本质。

HBV 携带者行 IVF/ICSI 治疗不影响周期结局,主要可能基于以下原因:首先,精液和卵泡液中 HBV 的含量远低于血清,HBV 并不能感染同一患者的所有精子或所有卵子,精子洗涤和 IVF 培养环境有助于降低病毒含量^[7-11]。其次,虽然 HBV DNA 可整合到配子和胚胎染色体上,造成染色体畸变和基因突变,但卵子和胚胎存在自我修复机制,可以对这些进行自我修复。另外,HBV DNA 只能整合于 HBV 携带者部分的配子和胚胎,即使这种整合会影响胚胎质量,但在进行新鲜周期移植时,我们通常选择最好的胚胎,这也减少了被感染或整合有 HBV DNA 的胚胎植入宫腔的可能^[7,8]。这些因素的存在大大降低了 HBV 感染对配子质量、胚胎发育和 IVF/ICSI 周期结局的影响。

动物实验表明,HBV DNA 可整合到精子染色体中,在子代中继续复制、受精,稳定的遗传给子代细胞,不再复制产生新的病毒^[12]。但这种整合会增加染色体的不稳定性和畸变,是否会增加胎儿流产率和畸形率?目前尚无有力的临床数据支持。再者,对肝

癌患者组织的研究发现,病毒基因的整合可能会启动原癌基因的复制与表达,诱发基因突变^[13]。被 HBV DNA 锚定的基因多数与生长发育和肿瘤的发生发展有关,即 HBV DNA 整合入人配子和胚胎并遗传下去,可能会使后代发生肿瘤的概率大于正常人群。综上所述,本研究表明男性 HBV 携带者行 IVF/ICSI 治疗不影响胚胎发育和周期结局,同时,HBV 患者的后代安全性值得进一步关注。

参考文献

- 1 Qian WP, Tan YQ, Chen Y, *et al.* Rapid quantification of semen hepatitis B virus DNA by real-time polymerase chain reaction[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(34): 5385-5389
- 2 Ogunkunle M, Oni A, Odaibo G, *et al.* Hepatitis B surface antigen (HbsAg) in blood and genital secretions of patients with sexually transmitted diseases in Ibadan Nigeria[J]. *West Afr J Med*, 2005, 24(3): 206-208
- 3 Mohamed MM, Ahmed, Tian-Hua H, *et al.* An improved experimental model for studying vertical transmission of hepatitis B virus via human spermatozoa[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 151(1): 116-120
- 4 Bahy AA, Tian HH, Halima HS, *et al.* Expression of hepatitis B virus genes in early embryonic cells originated from hamster ova and human spermatozoa transfected with the complete viral genome[J]. *Asian J Androl*, 2006, 8(3): 273-279
- 5 赵二勇,陈士岭,孙玲,等. 男方 HBV 慢性感染对体外受精-胚胎移植治疗结局的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(12): 1827-1829
- 6 费前进,黄学锋,杨海燕,等. 男性乙肝携带者行卵胞浆内单精子注射和常规体外受精治疗后的胚胎结局[J]. *中国男科学杂志*, 2008, 22(1): 36-38
- 7 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, *et al.* Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(4): 736-740
- 8 Ye F, Yue Y, Li S, *et al.* Presence of HBsAg, HBcAg, and HBV DNA in ovary and ovum of the patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 194(2): 387-392
- 9 张昌军,杨敬宁,王华,等. 乙型肝炎病毒 DNA 在胚胎卵裂球细胞中的整合[J]. *山西医科大学学报*, 2008, 39(12): 1068-1071
- 10 Hu XL, Zhou XP, Qian YL, *et al.* The presence and expression of the hepatitis B virus in human oocytes and embryos[J]. *Human Reproduction*, 2011, 26(7): 1860-1867
- 11 罗莉,刘平,廉颖,等. 乙肝病毒携带者实施体外授精处理的垂直传播风险[J]. *现代妇产科进展*, 2007, 1116(112): 901-904
- 12 Bagis H, Arat S, Mercan H, *et al.* Stable transmission and expression of the hepatitis B virus total genome in hybrid transgenic mice Until F10 Generation[J]. *J EXP Zool A Comp Exp Biol*, 2006, 305(5): 420-427
- 13 Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4): 594-604

(收稿日期:2012-05-07)

(修回日期:2012-07-04)