

- rphage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(7): 2281 – 2290
- 7 Bitarte N, Bandres E, Boni V, *et al.* MicroRNA – 451 is involved in the self – renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells [J]. Stem Cells, 2011, 29(11): 1661 – 1671
- 8 高玉元. miRNA – 451/MIF 通路介导脑微血管损伤在帕金森病认知障碍发生中的作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018
- 9 Gibrat C, Saint – Pierre M, Bousquet M, *et al.* Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and α – synuclein inclusions [J]. J Neurochem, 2009, 109(5): 1469 – 1482
- 10 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 – 408
- 11 Lees AJ, Smith E. Cognitive deficits in the early stages of Parkinson's disease [J]. Brain, 1983, 106(Pt 2): 257 – 270
- 12 Levin BE, Llabre MM, Weiner WJ. Cognitive impairments associated with early Parkinson's disease [J]. Neurology, 1989, 39(4): 557 – 561
- 13 Aarsland D, Creese B, Politis M, *et al.* Cognitive decline in Parkinson disease [J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(4): 217 – 231
- 14 Junn E, Lee KW, Jeong BS, *et al.* Repression of alpha – synuclein expression and toxicity by microRNA – 7 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(31): 13052 – 13057
- 15 Xiong R, Wang Z, Zhao Z, *et al.* MicroRNA – 494 reduces DJ – 1 expression and exacerbates neurodegeneration [J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(3): 705 – 714
- 16 Nan Y, Guo H, Guo L, *et al.* MiRNA – 451 inhibits glioma cell proliferation and invasion through the mTOR/HIF – 1 α /VEGF signaling pathway by targeting CAB39 [J]. Hum Gene Ther Clin Dev, 2018, 29(3): 156 – 166
- 17 Yang X, He XQ, Li GD, *et al.* AntagomiR – 451 inhibits oxygen glucose deprivation (OGD) – induced HUVEC necrosis via activating AMPK signaling [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175507
- 18 Weng N, Sun J, Kuang S, *et al.* MicroRNA – 451 aggravates kainic acid – induced seizure and neuronal apoptosis by targeting GDNF [J]. Curr Neurovasc Res, 2020, 17(1): 50 – 57
- 19 Culmsee C, Zhu X, Yu QS, *et al.* A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta – peptide [J]. J Neurochem, 2001, 77(1): 220 – 228
- 20 Shin EJ, Nam Y, Lee JW, *et al.* N – Methyl, N – propynyl – 2 – phenylethylamine (MPPE), a selegiline analog, attenuates mptp – induced dopaminergic toxicity with guaranteed behavioral safety: involvement of inhibitions of mitochondrial oxidative burdens and p53 gene – elicited pro – apoptotic change [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(9): 6251 – 6269
- 21 Thanos S, Mey J, Wild M. Treatment of the adult retina with microglia – suppressing factors retards axotomy – induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro [J]. J Neurosci, 1993, 13(2): 455 – 466
- 22 Rogove AD, Tsirka SE. Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus [J]. Curr Biol, 1998, 8(1): 19 – 25

(收稿日期: 2021 – 05 – 17)

(修回日期: 2021 – 05 – 23)

快速冻融睾丸精子在无精子症患者中应用的潜在影响

董 竞 赵激浪 欧阳杰 张 伟 马 猛 王田田 罗沛琦 陆诗佳 彭 惠 李 斌

摘 要 **目的** 通过比较快速冻融睾丸精子 and 新鲜睾丸精子行胞质内单精子注射(ICSI)后的多种临床指标,探讨睾丸精子快速冻融对无精子症患者治疗结局的影响。**方法** 用倾向性评分匹配方法对患者基本资料进行匹配后,共回顾性分析了 272 个 ICSI 周期。通过比较两组中患者的受精率、优胚率、卵子利用率、临床妊娠率和活产率等多种指标来探讨睾丸精子的快速冻融对患者临床结局的影响。**结果** 两组的优胚率、卵子利用率、临床妊娠率、活产率等比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而研究组患者的受精率、正常受精率显著低于对照组($P < 0.05$)。**结论** 睾丸精子快速冻融未对无精子症患者的临床结局带来不利影响,对其进行提前快速冻存有利于患者临床治疗安排。

关键词 冻融 睾丸精子 ICSI

中图分类号 R711.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.10.009

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81971448)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院辅助生殖科

通讯作者:李斌,电子信箱:libinlicc@163.com

Potential Impact of Rapid Freezing and Thawing of Testicular Sperm in Patients with Azoospermia. Dong Jing, Zhao Jilang, Ouyang Jie, et al. Department of Assisted Reproduction, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract Objective To explore the effect of rapid freezing and thawing testicular sperm on the treatment outcome of azoospermia patients by comparing various clinical indicators of rapid freezing and thawing testicular sperm and fresh testicular sperm after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Methods** After matching the basic data of patients with the propensity score matching method, a total of 272 ICSI cycles were retrospectively analyzed. The study compares the fertilization rate, high-quality embryo rate, oocytes utilization rate, clinical pregnancy rate and live birth rate of patients in the two groups to explore influence of rapid freezing and thawing of testicular sperm on the clinical outcome of patients. **Results** There was no statistical difference between the two groups in the rate of high-quality embryo rate, oocytes utilization rate, clinical pregnancy rate, implantation rate and live birth rate ($P > 0.05$), while the fertilization rate and normal fertilization rate of patients in the frozen-thawed sperm group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The rapid freezing and thawing of testicular sperm did not adversely affect the clinical outcome of patients with azoospermia, and rapid freezing in advance is beneficial to the clinical treatment of patients.

Key words Freeze-thaw; Testicular sperm; ICSI

无精子症的患病率在男性人群中约为 1%, 在不育男性人群中约为 10% ~ 15%^[1]。胞质内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 技术的引入开启了无精子症患者治疗的新纪元^[2]。睾丸精子提取 (testicular sperm extraction, TESE) 和 ICSI 的结合成为无精症男性的有效治疗手段^[3,4]。虽然无精子症患者可以在配偶取卵日进行睾丸穿刺手术后直接行新鲜睾丸精子 ICSI, 但是即使诊断性睾丸穿时有活动精子存在, 再次重复进行的 TESE 也不能确保取卵日可以得到可用活动精子^[5]。因此, 睾丸精子的提前冷冻保存是非常有必要的。睾丸精子的提前冻存可以避免因取精失败导致的 ICSI 周期取消和再次 ICSI 周期的重复睾丸活检^[6,7]。

无精子症患者通过手术获取的少量精子极其珍贵, 常规精液冷冻保存程序中离心和清洗不仅会导致精子的丢失而且容易造成精子损伤。研究显示, 常规精液冷冻睾丸精子的复苏回收率只有 1%^[8]。TESE 获得的精子头部 DNA 不够稳定, 细胞膜也未完全成熟, 常规方式冷冻精子复苏率低^[9]。本研究采用快速微量精子冷冻方法, 避免了常规冷冻程序中离心洗涤造成的精子丢失。已有研究表明对于稀少精子使用快速精子冷冻法冷冻保存非常有效^[10,11]。

当前, 关于冻融睾丸精子在临床上的应用效果尚未达成一致。一些研究发现, 冻融睾丸精子行 ICSI 后的受精率显著低于新鲜睾丸精子, 并且种植率和活产率也显著降低^[12,13]。Madureira 等^[14]研究也发现, 新鲜睾丸精子注射后的受精率和临床妊娠率比冻融睾丸精子更高。但是, 也有研究者报道睾丸精子冷冻保存不会损害活动精子的可用性, 冻融睾丸精子与新

鲜睾丸精子 ICSI 的结局比较, 差异无统计学意义^[15~17]。甚至还有研究报道了冻融睾丸精子行 ICSI 的妊娠率和着床率显著优于新鲜睾丸精子^[18]。除此之外, 女方因素也是影响无精子症治疗成功与否的重要因素, 而现有的研究却常常忽略了其潜在影响^[17]。

基于上述可能存在的问题, 本研究将通过倾向性评分匹配法消除两组女方因素差异的条件下, 对比分析快速冻融睾丸精子组和新鲜睾丸精子组的无精子症患者的临床治疗结局, 进一步确认快速冷冻保存的睾丸精子在辅助生殖治疗中的应用是否会给患者的临床妊娠带来不利影响。

对象与方法

1. 研究对象: 回顾性分析了用倾向性评分匹配法收集的 272 例睾丸精子抽吸术 (testicular sperm aspiration, TESA) 取精后行 ICSI 的无精子症患者: 新鲜睾丸精子组 (对照组) 为 136 例取卵日用新鲜睾丸精子行 ICSI 的患者; 快速冻融睾丸精子组 (研究组) 为 136 例取卵日使用冻融睾丸精子行 ICSI 的患者, 其在进行诊断性睾丸穿时, 使用快速微量精子冷冻法提前对睾丸精子进行了冷冻保存。患者纳入标准: ①首次体外受精 (in vitro fertilization, IVF) 周期患者; ②女方年龄 < 43 岁; ③基础卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) < 10; ④窦卵泡数 ≥ 5; ⑤男方在 TESA 前均进行多次的精液常规检查, 并经精液离心沉淀证实为无精子症, 且经诊断性睾丸穿证实睾丸内存在成熟精子。遗传分析显示, 所有患者的核型均正常。排除标准: ①夫妇双方先天性或遗传性疾病; ②女方有明显宫腔畸形; ③严重的内外科系统性疾病不宜接受促排卵治疗及不能耐受妊娠患者。对照组与研究组根

据年龄、不孕年限和体重指数等基本资料进行 1:1 倾向性评分匹配^[19]。倾向性评分匹配是一种工具,由 Rosenbaum 和 Rubin 于 1983 年首次提出,用于调整非随机研究中被测混杂因素的治疗效果,可以有效降低混杂偏倚,并且在整个研究设计阶段,得到类似随机对照研究的效果^[20,21]。本研究严格遵守《赫尔辛基宣言》并得到医院医学伦理学委员会的审核和批准,参与对象均签署知情同意书。

2. 超促排卵及取卵:本研究未对不孕症患者的促排卵方案做限定,所用方案包括:孕激素方案、拮抗剂方案、长方案、短方案、微刺激和黄体期促排^[22,23]。简言之,卵泡期促排的患者从月经周期的第 3~5 天开始促排;黄体期促排的患者则在排卵后的第 1~3 天,对卵泡 <8mm 的患者开始促排。当有 1 个以上卵泡的直径达到 20mm 或者 3 个以上的卵泡直径达到 18mm 以上时扳机,扳机 34~36h 后在阴道超声引导下取卵术。

3. TESA:取男性患者截石位,会阴部常规消毒、铺巾。用 2% 利多卡因注射液约 2ml 对术侧阴囊行精索封闭。麻醉起效后,以阴囊皮肤无血管分布区作为穿刺点,在睾丸实质内钳取适量睾丸组织,置于添加了 10% 血清的配子准备液(modified HTF medium, MHTF, 美国 Irvine Scientific 公司)中,在解剖显微镜下用无菌 BD 注射器针头将睾丸组织撕碎,倒置显微镜下观察有无活动精子。如有活动精子则行微量精子快速冷冻,在取卵日解冻行 ICSI;若采用新鲜睾丸精子行 ICSI,如上方法操作,倒置显微镜下观察到有活动精子后,用配子准备液 MHTF 洗涤离心,留取沉淀,置于室温下备用。

4. 睾丸精子快速冷冻与复苏:本研究中采用 Strawtop 快速微量精子冻融法进行睾丸精子的冷冻保存。简言之,即将等量的精子冷冻保护剂(丹麦 Origio 公司)逐滴加入含有精子的睾丸组织悬液中,每加 1 滴后都小心将溶液混匀,室温放置 10min。精子冷冻管(法国 CBS 公司)的一端剪出开放性的凹槽,将混合样品移入该凹槽中(约 50 微升/支)。将精子冷冻管在 1min 内由液氮表面约 50cm 处缓慢降低至刚刚离开液氮表面,然后保持直至观察到冷冻溶液凝固后装入冷冻支架,投入液氮罐进行保存。取卵日,从液氮罐中取出相应的精子冷冻管,将盛有精子的一端浸入 37℃ 预温的油中待液滴溶解后,将其移入精子操作滴内,备后续 ICSI 操作。

5. 授精、胚胎培养与观察:所有患者行常规 ICSI

授精后约 16~18h 观察受精情况,72h 观察胚胎卵裂情况。采用 Cummins' 标准对第 3 天胚胎进行评级^[24]。其中 I 级和 II 级胚胎作为优质胚胎进行冷冻保存;III 级和 IV 级胚胎继续培养至囊胚期。囊胚采用 Gardner 和 Schoolcraft 评分系统进行评级。胚胎冷冻根据既有方法采用 Cryotop 进行^[25]。

6. 胚胎移植与妊娠结果判断:笔者医院常规采用冻融胚胎移植(frozen-thawed embryo transfer, FET),胚胎移植的内膜准备主要有自然周期、微刺激和激素替代 3 种方式,均按常规进行^[22]。胚胎移植操作均在超声监测下进行,移植后 14 天行尿 hCG 检测,阳性为生化妊娠,再经 14 天行阴道超声检查,见孕囊者为临床妊娠。

7. 统计学方法:采用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以率(%)表示。计量资料符合正态分布者采用 *t* 检验,不符合正态分布者采用 *Kruskal-Wallis H* 检验,计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者基本资料:经过倾向性评分匹配后共入选 272 例患者,其中研究组和对照组各 136 例。匹配后两组患者的年龄、不孕年限、体重指数、基础 FSH、基础黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和成熟卵数等基本资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 患者的基本资料($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	研究组	<i>P</i>
周期数	136	136	
女性年龄(岁)	35.43 ± 3.76	35.40 ± 3.65	0.592
男性年龄(岁)	38.48 ± 5.32	37.95 ± 5.26	0.410
不孕年限(年)	3.56 ± 2.62	3.38 ± 3.06	0.935
女性体重指数(kg/m ²)	21.06 ± 2.62	21.11 ± 2.73	0.595
男性体重指数(kg/m ²)	23.77 ± 2.91	23.65 ± 2.88	1.000
孕次(次)	0.46 ± 0.87	0.42 ± 0.81	0.730
产次(次)	0.04 ± 0.21	0.04 ± 0.21	0.877
基础 FSH(IU/L)	4.81 ± 2.17	4.96 ± 2.13	0.568
基础 LH(IU/L)	3.76 ± 2.98	3.35 ± 2.04	0.190
成熟卵数(枚)	11.01 ± 6.72	10.27 ± 5.72	0.719

2. 睾丸精子快速冻融对胚胎早期发育的影响:两组中患者的异常受精率、优胚率、有效囊胚形成率和卵子利用率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但研究组中患者的受精率和正常受精率显著低于对照组($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 睾丸精子快速冻融对胚胎早期发育的影响 [% (n / N)]

指标	对照组	研究组	P
受精率	93.10(1282/1377)	90.71(1152/1270)	0.024
正常受精率	90.49(1246/1377)	87.87(1116/1270)	0.030
异常受精率	2.61(36/1377)	2.83(36/1270)	0.728
优胚率	53.98(651/1206)	50.68(559/1103)	0.113
有效囊胚形成率	17.70(114/644)	16.84(99/588)	0.688
卵子利用率	38.35(675/1760)	35.59(611/1717)	0.091

3. 睾丸精子快速冻融对患者妊娠结局的影响:研究组和对照组的患者在临床妊娠率、宫外孕率、流产率、种植率、活产率、早产率、累积活产率、孕周等方面比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。研究组中新生儿的出生体重和出生缺陷率与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),详见表 3。

表 3 睾丸精子快速冻融对患者妊娠结局的影响 [$\bar{x} \pm s$, % (n / N)]

指标	对照组	研究组	P
FET 周期数	188	175	
移植胚胎数	1.82 $\pm$ 0.38	1.82 $\pm$ 0.38	0.968
临床妊娠率	58.51(110/188)	60.57(106/175)	0.689
宫外孕率	0.91(1/110)	1.89(2/106)	0.616
流产率	14.55(16/110)	8.49(9/106)	0.164
种植率	42.57(146/343)	42.32(135/319)	0.949
活产率(每个 FET 周期)	49.47(93/188)	54.29(95/175)	0.359
早产率	15.05(14/93)	18.95(18/95)	0.478
累积活产率(每例患者)	63.24(86/136)	63.24(86/136)	1.000
新生儿数	117	122	
新生儿孕周(周)	37.91 $\pm$ 2.34	38.08 $\pm$ 2.10	0.602
新生儿出生体重(g)	2980.00 $\pm$ 605.19	2999.88 $\pm$ 611.00	0.808
出生缺陷率	0(0/177)	4.10(5/122)	0.060

讨 论

随着辅助生殖技术的发展,传统意义的无精子症患者可以通过经睾丸或附睾穿刺取精,再联合 ICSI 技术实现正常生育。然而 30% ~ 50% 的非梗阻性无精子症患者的睾丸组织中没有精子^[26]。目前也没有可靠的术前指标可以有效预测睾丸穿刺手术能否获得可用精子^[27]。由于生精小管中的精子分布不均,即使是先前的睾丸活检也没有统计学意义的预测价值^[28]。冷冻保存睾丸精子可以将取卵手术和睾丸活检手术分割开来,可有效避免因无可用精子导致周期取消。但是,无精子症患者通过手术获取的精子通常很少,常规精液冷冻保存程序中离心和清洗会导致精子的回收率和复苏率低^[8,9]。精子快速冷冻法由于快速越过冰晶形成的温度,且省去了离心的步骤,可最大限度保存精子。但是,目前关于使用冻融睾丸精

子行 ICSI 后的治疗结果尚存在一些问题,有研究发现,使用冻融或新鲜睾丸精子可以获得相似的受精率、种植率和临床妊娠率^[15]。另有研究发现,使用冻融精子会损害睾丸精子的受精能力,并引起种植率和活产率降低^[12]。

基于上述的这些争议,我们有必要进一步确认快速冷冻保存的睾丸精子在辅助生殖治疗中的应用是否会给患者的临床妊娠带来不利影响。在本研究中,通过对快速冻融睾丸精子组与新鲜睾丸精子组的治疗结果进行比较,笔者发现快速冻融睾丸精子组中患者的受精率和正常受精率显著性低于新鲜睾丸精子组(分别为 90.71% vs 93.10%, 87.87% vs 90.49%, $P<0.05$)。

De Croo 等^[12] 和 Madureira 等^[14] 采用麦管液氮蒸汽熏蒸法冷冻睾丸精子的研究也发现,冻融睾丸精子获得的受精率低于新鲜睾丸精子获得的受精率。笔者推测潜在的原因可能是:(1) 由于睾丸精子不成熟,冻融会导致部分精子活动力和受精能力下降^[13]。(2) 冷冻、解冻和冷冻保护剂暴露期间精子的结构和功能会发生显著变化,精子的冻结可引起精子顶内膜和质膜的膨胀和破裂。(3) 在冷却和解冻过程中,氧自由基的产生均增加,导致继发于质膜脂质过氧化的自由基损伤。除此之外,笔者的研究结果显示,快速冻融睾丸精子组的患者可以获得与新鲜睾丸精子组患者相似的优胚率(50.68% vs 53.98%)、卵子利用率(35.59% vs 38.35%)、临床妊娠率(60.57% vs 58.51%)及活产率(54.29% vs 49.47%)比较,差异无统计学意义($P>0.05$),这与既往研究结果相一致^[15]。本研究结果提示,虽然快速冻融睾丸精子可能导致了精子受精能力的下降,但并没有进一步影响受精后合子的早期发育。

为了进一步确认快速冻融睾丸精子的应用是否会给患者的子代带来潜在的影响,笔者详细分析比较了两组患者的多种临床妊娠指标。研究结果显示,患者行 FET 后的宫外孕率、流产率和早产率等指标比较,差异均无统计学意义(1.89% vs 0.91%, 8.49% vs 14.55%, 18.95% vs 15.05%, $P>0.05$),提示睾丸精子的快速冻融不会增加不良的产科结局。此外,进一步比较两组的新生儿情况,结果显示,两组中新生儿的出生孕周和出生体重均没有显著区别(38.08 $\pm$ 2.10 周 vs 37.91 $\pm$ 2.34 周, 2999.88 $\pm$ 611.00g vs 2980.00 $\pm$ 605.19g, $P>0.05$)。两组中新生儿的先天缺陷发生率比较,差异也无统计学意义($P>0.05$),

其中快速冻融睾丸精子组中出现了 5 例先天缺陷的新生儿,新鲜睾丸精子组中未发现先天缺陷的新生儿。已有报道显示,正常受孕情况下发现的先天畸形率,加拿大约为 4.2%、南澳大利亚州约为 5.8%。与此相比,研究组中新生儿的出生缺陷率(4.10%)处在正常水平,并没有增加。因此,本研究结果提示,快速冻融睾丸精子行 ICSI 是一种简便且安全的无精子症男性不育患者的临床治疗方案,通过手术取精获得的精子都应考虑提前冷冻保存,即使对于只取出很少精子的患者也是建议的。

临床治疗无精子症患者时,TESA-ICSI 的治疗结局可能会受到男女双方多种因素的影响,如男方因素(年龄、精子质量等)和女方因素(如年龄、卵巢储备等)。现有的研究常常忽略了女方因素的影响^[17]。针对此问题,本研究采用了倾向性评分匹配法控制了女性人群特征数据的影响,包括女方年龄、不孕年限、体重指数、基础激素水平、获卵数等。当然,本研究也存在不足:本研究是一个单中心的回顾性研究,虽然笔者用倾向性评分匹配来尽量消除组间可能存在的差异,但回顾性偏倚仍不能完全避免。活产和子代安全是评估不同治疗方法的金标准,但它涵盖两个周期(取卵和移植),包含了很多混淆因素。今后笔者将继续积累相关数据并在研究设计上优化,进一步在更单纯的背景和更多的样本量下进行分析研究,给临床诊疗提供更精准的信息。条件成熟时,也将考虑开展 RCT 的研究,以期得到更高质量的研究结果。

综上所述,虽然快速冻融睾丸精子与新鲜睾丸精子行 ICSI 的受精率有显著性差异,但是受精后合子的早期发育,移植后的临床妊娠率、活产率以及子代出生孕周、体重和先天缺陷率比较,差异均无统计学意义。快速冻融睾丸精子行 ICSI 可以获得和新鲜睾丸精子相似的临床结局,睾丸精子的微量快速冷冻是一种简便且安全的无精子症男性不育患者的临床治疗方案,可避免患者的反复睾丸活检,有利于患者临床治疗的安排。

参考文献

- Willott GM. Frequency of azoospermia[J]. *Forensic Sci Int*, 1982, 20(1): 9-10
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, *et al*. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection[J]. *Human Reprod*, 1993, 8(7): 1061-1066
- Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Concepts in diagnosis and therapy for male reproductive impairment[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(7): 554-564
- Pan MM, Hockenberry MS, Kirby EW, *et al*. Male infertility diagnosis and treatment in the era of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection[J]. *Med Clin North Ame*, 2018, 102(2): 337-347
- Haimov-Kochman R, Lossos F, Nefesh I, *et al*. The value of repeat testicular sperm retrieval in azoospermic men[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(Suppl 4): 1401-1403
- Yu G, Liu Y, Zhang H, *et al*. Application of testicular spermatozoa cryopreservation in assisted reproduction[J]. *Int J Gynaecol Obstetr*, 2018, 142(3): 354-358
- Schachter-Safrai N, Karavani G, Levitas E, *et al*. Does cryopreservation of sperm affect fertilization in nonobstructive azoospermia or cryptozoospermia? [J]. *Fertil Steril*, 2017, 107(5): 1148-1152
- Borini A, Sereni E, Bonu, *et al*. Freezing a few testicular spermatozoa retrieved by TESA[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169(1-2): 27-32
- 王乃辉, 柳立军, 薛石龙, 等. 不同冷冻方法对人睾丸精子冷冻保存效果的研究[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(1): 82-86
- Stein A, Shufaro Y, Hadar S, *et al*. Successful use of the Cryolock device for cryopreservation of scarce human ejaculate and testicular spermatozoa[J]. *Andrology*, 2015, 3(2): 220-224
- Peng QP, Cao SF, Lyu QF, *et al*. A novel method for cryopreservation of individual human spermatozoa[J]. *In Vitro Cell Deve Biol Animal*, 2011, 47(8): 565-572
- De Croo I, van der Elst J, Everaert K, *et al*. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa[J]. *Human Reprod*, 1998, 13(7): 1893-1897
- Wu B, Wong D, Lu S, *et al*. Optimal use of fresh and frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2005, 22(11-12): 389-394
- Madureira C, Cunha M, Sousa M, *et al*. Treatment by testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection of 65 azoospermic patients with non-mosaic Klinefelter syndrome with birth of 17 healthy children[J]. *Andrology*, 2014, 2(4): 623-631
- Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, *et al*. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia[J]. *Human Reprod*, 1999, 14(7): 1794-1801
- Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, *et al*. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa-a prospective randomized study[J]. *Human Reprod*, 2001, 16(10): 2109-2113
- Yu Z, Wei Z, Yang J, *et al*. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcome with fresh versus frozen-thawed testicular sperm in men with nonobstructive azoospermia: a systematic review and Meta-analysis[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(7): 1247-1257
- Park YS, Lee SH, Lim CK, *et al*. Effect of testicular spermatozoa on embryo quality and pregnancy in patients with non-obstructive

- azoospermia[J]. *Systems Biol Reprod Med*, 2015, 61(5): 300 – 306
- 19 Du T, Wang Y, Fan Y, *et al.* Fertility and neonatal outcomes of embryos achieving blastulation on Day 7: are they of clinical value? [J]. *Human Reprod*, 2018, 33(6): 1038 – 1051
 - 20 Rosenbaum PR, Rubin DB. The central role of the propensity score in observational studies for causal effects[J]. *Biometrika*, 1983, 70(1): 41 – 55
 - 21 F Thoemmes. Propensity score matching in SPSS [J]. *Statistics*, 2012, arXiv: 1201. 6385
 - 22 Dong J, Wang Y, Chai WR, *et al.* The pregnancy outcome of progesterone – primed ovarian stimulation using 4 versus 10mg of medroxyprogesterone acetate per day in infertile women undergoing invitro fertilisation: a randomised controlled trial [J]. *Bjog An Int J Obstetr Gynaecol*, 2017, 124(7): 1048 – 1055
 - 23 Wang N, Wang Y, Chen Q, *et al.* Luteal – phase ovarian stimulation vs conventional ovarian stimulation in patients with normal ovarian reserve treated for IVF: a large retrospective cohort study[J]. *Clin Endocrinol*, 2016, 84: 720 – 728
 - 24 Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, *et al.* A formula for scoring human embryo growth rates in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality[J]. *J Vitro Fertil Embryo Transfer*, 1986, 3(5): 284 – 295
 - 25 Cobo A, de los Santos MJ, Castello D, *et al.* Outcomes of vitrified early cleavage – stage and blastocyst – stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3, 150 warming cycles [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(5): 1138 – 1146
 - 26 Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, *et al.* Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure[J]. *Human Reprod*, 1997, 12(11): 2422 – 2428
 - 27 Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, *et al.* Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors[J]. *Urology*, 1997, 49(1): 91 – 95, discussion 5 – 6
 - 28 Devroey P. Clinical application of new micromanipulative technologies to treat the male[J]. *Human Reprod*, 1998, 13(Suppl 3): 112 – 122

(收稿日期: 2021 – 03 – 17)

(修回日期: 2021 – 04 – 12)

饮水砷暴露对 SD 大鼠肝脏损伤的形态学研究

丁关鑫 黄 佳 夏荣香 林 勤 马 艳 吴顺华 张 玲

摘 要 **目的** 研究不同浓度亚砷酸钠染毒对大鼠肝脏超微结构变化的影响。**方法** 将 56 只健康成年 SD 大鼠随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。记录尿砷含量以及观察肝脏病理形态学改变的情况。**结果** 低、中、高剂量组的尿砷含量均大于对照组,经检验差异有统计学意义($Z = 48.50, P < 0.01$),且随着亚砷酸钠剂量的增大,尿砷的含量也随着升高。与对照组比较,中、高剂量组的肝脏重量下降明显,经检验,差异有统计学意义($F = 3.246, P < 0.05$)。电镜下观察,低剂量组肝细胞细胞核异形,中、高剂量组出现细胞核畸形,肝细胞灶性坏死。**结论** 亚慢性饮水砷暴露会造成肝脏超微结构变化,且随着亚砷酸钠剂量的增加,肝脏的病理变化也随之加重。同时,SD 大鼠尿砷含量增高,肝脏重量下降。

关键词 饮水砷暴露 肝脏 病理形态学

中图分类号 R595.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.10.010

Morphological Study of Liver Injury in SD Rats Induced by Arsenic Exposure in Drinking Water. Ding Guanxin, Huang Jia, Xia Rongxiang, *et al.* School of Public Health, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, China

Abstract Objective To study the effects of different doses of sodium arsenite on the ultrastructure of rat liver. **Methods** Fifty – six healthy adult SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, low – dose group, medium – dose group, high – dose group. Urine arsenic content was recorded and liver pathomorphology was observed. **Results** The urinary arsenic content of the low – dose group, medium – dose group, high – dose group were higher than that of the control group, the difference was statistically significant ($Z = 48.50, P < 0.01$), and the urinary arsenic content increased with the increase of the exposure dose. Compared with control group, liver weight of the medium – dose group and high – dose group decreased significantly, and the difference was statistically significant ($F =$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560520)

作者单位:830011 乌鲁木齐,新疆医科大学公共卫生学院(丁关鑫、马艳、吴顺华);830002 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(黄佳、夏荣香、林勤、张玲)

通讯作者:张玲,主任医师,电子信箱:549307703@qq.com