

冻存睾丸精子用于男性生殖力储备的探讨

郅艳荣¹, 贺占举², 蔡学泳¹, 王 晟¹, 袁亦铭²,
彭 靖², 张 蕾¹, 薛 晴¹, 尚 鹄¹, 陈 菲¹,
鞠慧岩¹, 左文莉¹, 廖秦平¹, 徐 阳¹
(北京大学第一医院, 1. 妇产科, 2. 泌尿外科, 北京 100034)

【摘要】 目的: 通过研究对无精子症患者实施睾丸活检或其他手术时冷冻睾丸精子经复苏后行卵细胞胞质内单精子注射(ICSI) 助孕的临床效果, 探讨冻存睾丸精子作为男性生殖力储备的有效性。 方法: 回顾性分析了在本院实施睾丸活检或其他手术时冷冻睾丸精子的患者 96 例, 其中的 55 例已在本中心复苏冷冻精子行 ICSI 助孕共 60 个周期, 评估其冷冻精子复苏、卵子受精、卵裂、可移植胚胎、优质胚胎、临床妊娠及其分娩情况。 结果: 复苏冻存睾丸精子 60 个周期均获成功, 复苏后行 ICSI 技术助孕, 受精率 77.6% (513/661), 2PN 受精率 69.4% (459/661), 卵裂率 99.4% (510/513), 可利用胚胎率 84.5% (431/510), 优质胚胎率 40.8% (208/510); 所有周期均有可移植胚胎; 新鲜胚胎移植 52 个周期, 临床妊娠 30 例(临床妊娠率 57.7%), 双胎妊娠 11 例(其中 1 例双胎自然减为单胎), 单胎妊娠 19 例, 种植率为 38.7% (41/106), 流产率为 3.33% (1/30)。目前, 已经出生了 20 例健康婴儿(12 个男婴, 8 个女婴), 未发现先天缺陷儿; 另外 13 例(7 例单胎和 6 例双胎) 继续妊娠中。 结论: 睾丸精子冷冻复苏后行 ICSI 助孕可以得到较好的临床结局。冻存睾丸精子是无精子症男性生殖力储备的有效方式。

【关键词】 无精子症; 卵细胞胞质内单精子注射; 睾丸精子冷冻; 生殖力储备

中图分类号: R698⁺.2 文献标志码: A 文章编号: 1009-3591 (2012) 03-0231-04

Testicular sperm cryopreservation for male fertility preservation

KUAI Yan-rong¹, HE Zhan-ju¹, CAI Xue-yong¹, WAN Sheng¹, YUAN Yi-ming²,
PENG Jing², ZHANG Lei¹, XUE Qing¹, SHANG Jing¹, CHEN Fei¹,
JU Hui-yan¹, ZUO Wen-li¹, LIAO Qin-ping¹, XU Yang¹

1. Department of Gynecology and Obstetrics; 2. Department of Urology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effectiveness of testicular sperm cryopreservation in male fertility preservation by evaluating the clinical outcome of ICSI cycles with frozen-thawed testicular sperm for azoospermia patients. **Methods:** We retrospectively analyzed 96 samples of cryopreserved testicular sperm obtained by testicular biopsy, vasovasostomy (V-V), vasoeppididymostomy (V-E), of which 55 were subjected to 60 ICSI cycles with frozen-thawed testicular sperm. We evaluated the rates of sperm recovery, fertilization, cleavage, transferable and good-quality embryos, clinical pregnancy, pregnancy outcome, and health of the newborns. **Results:** All the frozen testicular sperm samples were recovered successfully. The rates of fertilization, 2PN fertilization, cleavage, available embryos and good-quality embryos were 77.6%, 69.4%, 99.4%, 84.5% and 40.8%, respectively. There were transferable embryos in all cycles. Fresh embryos were transferred in 52 of the 60 cycles, with the clinical pregnancy rate of 57.7% (30/52), including 19 singletons and 11 twins, and the rates of implantation and miscarriage were 38.7% (41/106) and 3.33% (1/30). Up to the present

① 作者简介: 郅艳荣(1979-)女, 湖北荆门市人, 助理研究员, 硕士, 从事辅助生殖技术专业。

通讯作者: 徐 阳, Email: xuyangm@126.com

time, there have been 20 healthy newborns, including 12 boys and 8 girls, and another 13 ongoing pregnancies. No birth defects have been found so far. **Conclusion:** Desirable clinical outcomes can be obtained from ICSI cycles with frozen-thawed testicular sperm, and testicular sperm cryopreservation is an effective method of fertility preservation for azoospermia males. *Natl J Androl, 2012, 18 (3): 231-234*

【Key words】 azoospermia; ICSI; testicular sperm cryopreservation; fertility preservation

Correspondence to: XU Yang, email: xuyangm@126.com

Received: November 30, 2011; accepted: February 28, 2012

不孕症在育龄夫妇中的发生率约为 9.3%,其中男性因素约占 30%~50%,而无精子症在男性不育人群中的发生率为 10%~20%。1992 年卵细胞胞质内单精子注射技术^[1] (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 的诞生给严重少、弱、畸精子症的患者带来了福音。次年, Cref 等^[2]首次利用睾丸精子行 ICSI 助孕获得成功,使得无精子症的患者拥有遗传学后代成为可能。该技术的诞生又将精子的冷冻技术向前推动了一大步,附睾及睾丸精子冷冻、睾丸组织冷冻相继获得成功。1996 年 Hovatta^[3]和 Gil-Salom^[4]所在不同研究组分别报道用冻融睾丸精子行 ICSI 术获得成功妊娠,又将无精子症的助孕治疗向前推进一大步。目前,国内外尝试用多种方法冷冻保存睾丸精子,提高其复苏率和复苏后行 ICSI 助孕的临床效果,探索无精子症男性助孕治疗和生殖力储备的有效方式。现将北京大学第一医院生殖与遗传医疗中心近几年冷冻保存睾丸精子的情况及其复苏后行 ICSI 助孕治疗的临床结局总结分析如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 2009 年 1 月至 2011 年 9 月在本中心冷冻保存睾丸精子的患者有 96 例。其中已有 55 例患者复苏冷冻睾丸精,行 ICSI 助孕 60 个周期。男方的平均年龄为(33.4±2.85)岁,女方的平均年龄为(29.34±3.71)岁,平均不孕年限(3.54±3.48)年,平均基础 FSH(7.62±4.34) IU/ml。所有患者夫妇均充分知情并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 控制性超促排卵及卵子的获取 超促排卵采用黄体中期启动的短效 GnRH-a 长方案或月经周期第 2 天启动的长效 GnRH-a 长方案,当有≥2 个优势卵泡的直径达到 20 mm 时,注射绒毛膜促性腺激素(艾泽) 250 μg,36 h 后行阴道 B 超引导下穿刺取卵术。取卵后 4~6 h 选取成熟卵子(M II 期)行 ICSI。

1.2.2 睾丸精子的冷冻与复苏

1.2.2.1 睾丸精子的获取 采用睾丸精子抽吸术

或行开放性切开睾丸组织取精方法取出生精小管,方法见参考文献[5];生精小管取出后一部份送病理检查,余下的放在培养液(Sperm rinse,美国 Quinn's 产品)中,用 1 ml 注射器分开生精小管,清洗 2~3 遍,尽量多地去除红细胞,然后用两只折弯了(角度为 90 度)的 1 ml 注射器针头将精子从生精小管中挤出至 0.6 ml 培养液中,在倒置显微镜下观察有无精子及活动情况。若无精子则征求患者意见考虑取对侧睾丸组织。去除培养液中反复挤压过的生精小管,收集余下的细胞悬液在试管中。冷冻时机的选择:若悬液中见到活动精子则即刻冷冻;若未见活动精子则将其放到培养箱(37℃、5% CO₂)中培养 6~24 h 后再观察,一般会见精子活力明显加强,一旦见到有活动精子就予以冷冻。

1.2.2.2 精子冷冻与复苏 本中心使用的精子冻存液为美国 Quinn's 公司生产的 Sperm Freezing Medium,其冷冻方法为液氮蒸汽悬吊法,具体步骤为:

①室温下,将等体积的精子冻存液在 30 s 内缓慢加入精子悬液中;②充分混匀后装载到冷冻管中,室温放置 3 min;③4℃水浴 60 min;④再在液氮液面上方 15~20 cm 的液氮蒸汽中悬吊 30 min;⑤置入液氮中长期保存。一般在取卵的前日下午或者当日上午复苏精子。精子复苏步骤为:首先将装有精子悬液的冷冻管放入 35℃的水浴中;直至冰晶完全融化后将精子悬液转移到 15 ml 离心管中;再向其中缓慢(30 s 内)加入 8 倍于精子悬液体积的精子培养液;充分混匀后,300×g 离心 10 min;去除上清液留取精子沉渣洗涤。

1.2.2.3 精子洗涤与评估 精子复苏后用培养液(Sperm rinse 美国 Quinn's 产品) 3 ml 悬浮沉渣,取出 50 μl 悬液至培养皿中,在倒置显微镜下评估精子质量;余下悬液 300×g 离心 5 min,离心后去除大部分上清液,留取 0.3~0.5 ml 液体重新悬浮沉渣。精子悬液放在室温或培养箱中待用(如果活动精子易找则放置室温,否则培养箱中培养)。以活动精子的数量满足 ICSI 的要求,即大于或等于患者获得成熟卵子的数目判定为精子复苏成功。

1.2.2.4 体外受精、培养、胚胎移植及妊娠情况

采用 ICSI 方法受精,所用培养体系为 Vitrolife 公司提供的 G-FERT、G1、G2 系列。ICSI 后 16~20 h,取卵后 48、72 h 分别观察受精及胚胎发育情况。取卵后第 3 天进行胚胎移植,胚胎移植后 14 d 验尿、查血 hCG,若为阳性,则于移植后 4 周来院行 B 超检查,确定临床妊娠。所有临床妊娠患者随访至胎儿出生。

2 结果

2.1 睾丸精子取材来源 2009 年 1 月至 2011 年 9 月在本中心冷冻保存睾丸精子 96 例。笔者出于最大限度地保护患者生殖力目的考虑,尝试性地探讨取材来源的多样性,包括以下几种情况:诊断性睾丸活检术中;行输精管探查术、输精管-输精管吻合术(V-V)、输精管-附睾吻合术(V-E)等手术中;ICSI 周期受精后剩余的睾丸精子;睾丸肿瘤放、化疗或手术前。本研究总结的 60 个 ICSI 周期均来自前两种情况。

2.2 睾丸精子的复苏结果 复苏冻存睾丸精子 60 个周期均获成功,所有周期均找到了足够数量的活动精子完成 ICSI。其中 51 个周期在行 ICSI 过程中较为容易地找到了足够数量的活动精子,找精时间为 30~60 min;另 9 例因活动精子形态差或精子活力差(尾巴偶尔微微摆动)或活动精子数量少(显微镜下多个高倍视野见 1~2 条尾巴活动精子)而导致在行 ICSI 过程中找精困难,找精时间超过了 1 h。

2.3 睾丸精子复苏后行 ICSI 助孕的结局 精子复苏后行 ICSI 助孕 60 周期,受精率为 77.6%(513/661),2PN 受精率 69.4%(459/661),卵裂率 99.4%(510/513),可利用胚胎率 84.5%(431/510),优质胚胎率 40.8%(208/510)。所有周期均有可移植胚胎。8 例未行新鲜周期移植,其中 5 例因预防卵巢过度刺激综合征的发生,2 例因 HCG 日孕酮升高,1 例因移植当天女方发烧。行新鲜胚胎移植 52 个周期,临床妊娠 30 例(临床妊娠率 57.7%),双胎妊娠 11 例(其中 1 例双胎自然减为单胎),单胎妊娠 19 例,种植率为 38.7%(41/106),流产率为 3.33%(1/30)。目前,已经出生了 20 个健康婴儿(12 个男婴,8 个女婴),均未发现先天缺陷儿;另外 13 例在(7 例单胎和 6 例双胎)继续妊娠中。

3 讨论

睾丸精子冷冻在辅助生殖领域的应用较为广泛,意义重大。睾丸活检是判断无精子症患者睾丸

有无精子的最直接、有效的方法。对于非梗阻性无精子症者,即使前次手术取精成功,下次手术取精也有 15%~20% 的失败风险^[6]。对于死精子症患者如果在睾丸组织中找到活动精子并利用其进行 ICSI 助孕,其临床结局更好。睾丸活检时冻存精子,以用于后期 ICSI 治疗,除了可以避免反复睾丸取精术本身给患者带来的精神、肉体、经济方面的负担,还可以避免取卵日取精失败,方便医患双方掌握治疗进度。

冻存睾丸精子也是男性尤其是无精子症男性生殖力储备的一种重要方式。男性生殖力储备主要有以下几种方式:冻存精子(包括精液精子、附睾精子、睾丸精子);冻存睾丸组织;冻存胚胎。睾丸组织冷冻后再复苏、移植,技术本身不成熟,效果欠佳,对于肿瘤患者的睾丸组织冷冻后再复苏、移植还有再次种植肿瘤的风险;胚胎冷冻仅适合于已婚男性;而冷冻精子技术本身相对成熟,复苏后助孕的临床效果也相对肯定。因此,冷冻精子应该是生殖力储备的最主要方式。冻存睾丸精子用于生殖力储备主要适应于以下几种情况:①无精子症癌症患者在进行对生育力有损伤的放、化疗、手术之前^[7]。由于医学的进步,许多癌症患者经过正规的治疗有很好的预后,完全能恢复正常人的工作、生活能力。而且冻存生殖细胞后会增加肿瘤患者继续生存的勇气,有利于改善治疗预后。有学者^[8]认为,肿瘤会导致精液中精子质量下降,助孕效果差,而主张冻存睾丸精子或组织;②无精子症患者同时合并有免疫缺陷性疾病、肾病综合征、糖尿病等系统性疾病时,由于对合并症的治疗往往也影响生殖功能,在治疗前进行生殖力储备也有必要^[9];③无精子症患者在接受输精管探查术、输精管-输精管吻合术(V-V)、输精管-附睾吻合术(V-E)等男科手术时,考虑到输精管缺如、手术复通失败发生率高、手术本身也有可能影响睾丸精子生成,手术中顺便取材冻存睾丸精子或组织也十分必要^[10];④无精子症或死精子症或极度少精子症患者在行诊断性睾丸活检时冻存精子^[11];⑤无精子症患者在接受新鲜睾丸精子行 ICSI 助孕时的剩余精子。笔者在以上几个方面均进行了尝试,尽可能地对无精子症男性的生殖力进行储备。

目前,绝大多数研究者认为睾丸精子经冷冻复苏后行 ICSI 治疗能取得与新鲜睾丸精子行 ICSI 治疗后一样的受精率及临床妊娠率^[11-13];还有研究者报道,同一患者不同 ICSI 周期分别使用新鲜和冷冻睾丸精子的受精率、临床妊娠率、流产率无差异^[11-12]。本中心数据也提示睾丸精子经冷冻复苏

后行 ICSI 治疗能取得较好的临床结局: 受精率为 77.6%、卵裂率为 99.4%、可利用胚胎率为 84.5%、临床妊娠率为 57.7%、流产率为 3.33%, 与文献^[11-13]报道的结果相似。

本研究结果显示, 睾丸精子冷冻后有很好的复苏效果, 结合 ICSI 技术对无精子症患者进行助孕治疗取得了令人满意的临床结局。笔者认为在对无精子症患者施行睾丸活检或其他有创手术时, 冻存精子, 以储备其生殖力值得推广。而对于某些特殊人群, 如对癌症或免疫缺陷性疾病患者进行放、化疗之前, 应该关注男性生殖力的保护, 在有需求的情况下, 尽可能对其生殖细胞进行储备。综上所述, 冻存睾丸精子是无精子症男性生殖力储备的有效方式。

参考文献

- [1] Palermo G, Joris H, Devroey P, *et al.* Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 340(8810): 17-18.
- [2] Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilizing ability of testicular spermatozoa. *Lancet*, 1993, 342(8875): 864.
- [3] Hovatta O, Foudila T, Sieberg R, *et al.* Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of spermatozoa from a frozen-thawed testicular biopsy specimen. *Hum Reprod*, 1996, 11(11): 2472-2473.
- [4] Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, *et al.* Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, 1996, 11(6): 1309-1313.
- [5] 武学清, 李晓红, 张晓, 等. 微创睾丸穿刺取精结合卵泡浆内单精子注射治疗男性梗阻性无精子不育症. *中国药物与临床*, 2005, 5(12): 892-893.
- [6] Glina S, Soares JB, Antunes N Jr, *et al.* Testicular histopathological diagnosis as a predictive factor for retrieving spermatozoa for ICSI in non-obstructive azoospermic patients. *Int Braz J Urol*, 2005, 31(4): 338-341.
- [7] Jahnukainen K, Ehmeke J, Hou M, *et al.* Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(2): 287-302.
- [8] Radford J, Shalet S, Lieberman B. Fertility after treatment for cancer. Questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. *BMJ*, 1999, 319(7125): 935-936.
- [9] Ranganathan P, Mahran AM, Hallak J, *et al.* Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: A descriptive study. *J Androl*, 2002, 23(1): 71-75.
- [10] Tash JA, Goldstein M. The use of intra-operative sperm cryopreservation in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril*, 2002, 78(Suppl 1): 208.
- [11] Verheyen G, Vermaeve V, Van Landuyt L, *et al.* Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod*, 2004, 19(12): 2822-2830.
- [12] Vermaeve V, Krikilion A, Verheyen G, *et al.* Outcome of testicular sperm recovery and ICSI in patients with non-obstructive azoospermia with a history of orchidopexy. *Hum Reprod*, 2004, 19(10): 2307-2312.
- [13] Levron J, Madgar I, Shefi S, *et al.* IVF outcome with cryopreserved testicular sperm. *Andrologia*, 2011, 43(1): 48-51.

(收稿日期: 2011-11-30; 接受日期: 2012-02-28)

(本文编辑: 黄婷婷)