

- 10 潘铁军,张加桥,李功成,等.“腰肋悬空”仰卧位经皮肾镜术在高危及肥胖患者中的应用[J]. 现代泌尿外科杂志,2011,16(3):219-221.
- 11 胡晓晖,陈洪波,江克华,等. 三种不同体位行微创经皮肾镜钬激光碎石术疗效分析[J]. 中华腔镜外科杂志(电子版),2014,7(3):228-232.
- 12 De Sio M, Autorimo R, Quarto G, et al. Modified supine versus prone position in percutaneous nephrolithotomy for renal stones treatable with a single percutaneous access: a prospective and randomized trial [J]. Eur Urol, 2008, 54(1):196-202.
- 13 杨江,吴明贵,沈思. 仰斜卧位微创经皮肾镜碎石术观察体会[J]. 吉林医学,2011,32(6):1184-1185.
- 14 张方毅,黄锡玺,翁志梁. 半截石斜侧卧位在经皮肾镜碎石术中的应用[J]. 中国内镜杂志,2012,18(3):266-268.
- [收稿日期 2015-09-16][本文编辑 吕文娟]

新进展综述

精子 DNA 损伤在辅助生殖中的研究进展

黄悦悦, 薛林涛(综述), 何冰(审校)

基金项目: 广西卫计委科研课题(编号:Z2014225)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 黄悦悦(1983-),男,医学硕士,助理研究员,研究方向:男科实验室技术。E-mail:henry95272@163.com

[摘要] 男性生育力受到许多因素的影响,其中精子 DNA 损伤一直是生殖医学领域研究的热点之一。该损伤可由多种因素诱发精子 DNA 双链断裂或使其双链变性而形成。该文通过分析精子生成错误、氧化应激、精子染色质包装异常、疾病等因素对精子 DNA 损伤的影响,阐述精子 DNA 损伤检测在辅助生殖医学中的研究现状,为进一步阐明精子 DNA 损伤的发生机制以及如何为辅助生殖技术选用高质量精子提供基础材料。

[关键词] 精子 DNA 完整性; 精子 DNA 损伤; 精子染色质扩散试验

[中图分类号] R 698⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)03-0261-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.03.26

Research progress on sperm DNA damage of assisted reproductive technology HUANG Yue-yue, XUE Lin-tao, HE Bing. Reproductive Medicine and Genetics Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] The male fertility is affected by many factors, and sperm DNA damage is one of the research hotspots in assisted reproductive technology (ART). A number of factors can lead to the DNA strand breaks or make double-stranded DNA into single-stranded DNA. In this paper we review the damage factors of sperm DNA, including sperm production error, oxidative stress, abnormal assembling of chromatin, and the related diseases, which provides some basic information for elucidating the mechanism of DNA damage, and optimal spermatozoa selection in ART.

[Key words] Sperm DNA integrity; Sperm DNA damage; Sperm chromatin dispersion test

诊断男性不育症的重要手段主要依靠精子质量检测,长久以来,世界卫生组织所编纂的《人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册》中,规定了精子浓度、精子活动力以及精子形态正常率等作为评价精子质量的主要指标。但是近几年来,想要全面评估男性的生育能力已经不能单纯依靠常规的精液质量分析方法。据报道,约有 15% 的男性不育患者精液检查是正常的^[1]。因此,需要探索新的

精子质量检测分析手段。近几年来,生殖医学及相关技术发展迅速,宫腔内人工授精(intrauterine insemination, IUI)、体外受精-胚胎移植技术(in-vitro fertilization, IVF)和胞浆内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)已被广泛应用于临床之中。众多在自然条件下几乎没有生育希望的严重少弱精子症患者以及畸形精子症患者,借助于 ICSI 技术重新获得生育的可能,这是男性不育治疗技术

中的一次革命性的进步。在辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)发展的同时,越来越多的研究者开始关注精子 DNA 的损伤问题。目前的研究结果表明,精子的受精能力除了跟浓度、活动力等常规参数密切相关之外,也与精子 DNA 的完整程度有关, DNA 发生损伤的精子受精能力将会下降。同时也会造成受精卵在分裂过程中发生错误,阻碍胚胎的正常发育^[2-4]。目前更多的生殖专家倾向于评估男性不育症患者的精子 DNA 损伤情况,因此精子 DNA 的完整情况被认为是一个新的评估男性不育症患者精液质量、进而预测其生育能力的有效指标^[5]。

1 精子 DNA 损伤因素

造成精子 DNA 损伤的因素并不是单方面的,这是多种因素共同作用的结果,以下将列举引起精子 DNA 损伤的主要因素。

1.1 精子形成错误 精子母细胞有一个自我监控细胞分裂的能力。在精子形成过程中,如果精子母细胞自我监控发生异常或者该功能存在缺陷,异常的精子母细胞便会一直分裂,最后产生大量 DNA 损伤的精子。此外,精子染色质在成熟过程中需要发生浓缩,变成致密状态。致密状态下的核染色质才能完全装入精子的头部中,并且能使精子染色质对外界环境具有一定的抗压性和适应性。如果染色质在浓缩的过程中产生错误,将会导致染色质的结构变得不那么致密,这一状态的染色质容易受到环境因素的影响,比如活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)会将精子 DNA 碱基或脂质氧化,产生的过氧化产物与 DNA 发生共价结合,造成精子 DNA 损伤^[6]。

1.2 活性氧类物质因素 ROS 是氧自由基和过氧化物等物质的总称。ROS 参与人体内多种生理生化反应过程,比如调节基因表达和控制蛋白质活性等。精液中的 ROS 主要来自于白细胞和精子细胞,精子通过精子质膜上的氧化还原酶系统和线粒体代谢为组织功能的正常发挥提供一定量的 ROS。正常的生理环境中,精液内少量的 ROS 为精子顶体反应提供能量,并能增加顶体与透明带的结合能力;低浓度的 ROS 对生精细胞的增殖、分化和调节精子功能方面发挥重要作用。但是如果 ROS 水平过高,可导致 DNA 双链断裂,形成单链,引发精子染色质的损伤^[7]。正常男性人体中,精浆含有抗氧化剂,可以保护精子 DNA,避免遭到 ROS 的破坏。但是当积累的 ROS 浓度过高,精浆抗氧化能力超过极限时依然容易对 DNA 链造成一定的伤害^[8]。精液中过

量的 ROS 的主要来源是白细胞和非正常形态的精子,大量的 ROS 会产生氧化应激,从而破坏精子 DNA 的结构完整性。而染色质发生损伤的精子又有可能演变成畸形精子,进一步激发更多的 ROS。在特发性不育症患者中发现了氧化应激增强,并且检测到精子 DNA 损伤,考虑氧化应激与 DNA 损伤有关^[9,10]。

1.3 精子核蛋白组成异常 精子核蛋白主要由鱼精蛋白跟组蛋白构成。鱼精蛋白是一种富含正电荷氨基酸基团的蛋白质,由于其带正电,能与精子 DNA 的负电荷基团之间形成氢键以维持染色质结构的稳定性。作为精子染色质重要的组成部分,在精子的形成过程中,精子核蛋白组成构象会发生一系列的变化:首先结合在 DNA 链上的组蛋白将被鱼精蛋白逐渐替换。精卵结合后,精子头部核膜发生破裂,与此同时精子核内的 DNA 开始解螺旋状态,组蛋白再次替换鱼精蛋白。鱼精蛋白附着在 DNA 链上,与 DNA 链相互缠绕,形成高密度紧密有序的结构。DNA 超螺旋折叠压缩的过程中,为了释放 DNA 链的扭曲应力,加强鱼精蛋白与 DNA 链的黏着程度, DNA 链需要在酶的作用下实现局部解链再重新连接的复杂过程。这一过程易受到外界因素的影响,如果中途发生异常,将会造成精子 DNA 链的紧密状态异常, DNA 解链后不能被修复,形成碎片,染色体结构发生改变,进而引起男性不育。如果这种缺陷精子受精成功,甚至会影响胚胎早期的发育^[11]。Nili 等^[12]的研究结果表明,鱼精蛋白的组成成分缺失、含量过低都会引起精子 DNA 断裂。而过高的温度会引起这两种蛋白的组成比例异常,出现组蛋白短暂增加的现象,最终导致精子 DNA 损伤加剧。

1.4 精子细胞凋亡异常 正常生理过程下,细胞凋亡途径会将精子发生过程中 75% 以上的精子细胞破坏。为了维持精子的数量和质量,需要生精细胞的选择性凋亡机制参与。细胞凋亡不仅可以避免产生过多的精子,而且也能够中止生成并破坏掉异常的精子。凋亡会启动由内源性凋亡激酶及核酸酶组成的级联反应,如果细胞凋亡的调控信号发生问题,将会导致精子启动凋亡的过程出现异常,进而导致 DNA 损伤。细胞凋亡出现异常可能是引起精子生成或运输过程中 DNA 损伤的原因之一^[13]。细胞表面蛋白之一的凋亡蛋白 Fas,可能是引起精子凋亡的一个重要因素。Fas 在生精细胞的表面进行表达,支持细胞合成表达 Fas 的配体 FasL, Fas/FasL 途径可能是控制精子凋亡的主要途径。有研究指出,

不育症男性患者精子细胞表面 Fas 的表达量有所增加,提示精子正常凋亡途径受阻,DNA 受损的精子未能正常清除^[14]。

1.5 疾病因素 精子的 DNA 损伤也可以由生殖泌尿系统感染以及周边组织的非特异性炎症所导致。主要原因可能是因为生殖道感染和组织炎症引起的白细胞数量增加。精液中白细胞浓度升高,从而增加了精浆中的 ROS。另有研究表明,温度也是引起精子 DNA 损伤的因素之一,尤其睾丸部位的温度过高会引起精子 DNA 损伤。研究者表示可能由于温度敏感的组蛋白和鱼精蛋白的比率增加,造成精子 DNA 链的结构不稳定,同时也可能是温度升高影响了生殖细胞的正常凋亡^[15]。经检测,精索静脉曲张的患者,其精子 DNA 受到损伤的程度要比对照组的正常人群高,并且发现这类患者的精子 DNA 受损情况与精浆中 ROS 的浓度呈正相关关系。对此类患者施行精索静脉曲张手术后,患者精子的 DNA 损伤得到一定的改善。此外,环境污染、吸烟、药物等易引起生殖系统病变的因素以及年龄等原因都可能造成精子 DNA 的损伤^[16]。

2 精子 DNA 损伤实验室检测方法

精子 DNA 损伤与男性不育密切相关,但是如何客观地评价精子 DNA 的损伤程度,制定一个能给临床医生提供参考的正常值范围是相关研究的主要目的。现阶段在临床检验和科研的过程中,尚未制定出统一的规范和标准。目前检测精子 DNA 损伤的常用方法分为直接法和间接法。直接法中比较常用的包括彗星试验(Cometassay)、末端转移酶介导的 dUTP 末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)、精子染色质扩散试验(sperm chromatin dispersion test, SCD)。间接法包括精子染色质结构分析试验(sperm chromatin structure assay, SCSA)和吖啶橙试验(AO test, AOT)。

2.1 彗星试验 彗星试验又称单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE),是世界上第一个能够评估单细胞损伤的技术手段。彗星试验操作简便、灵敏度高,不需要很多的细胞,使用荧光显微镜就可以直接进行观察,这是一种检测精子细胞 DNA 损伤的有效手段。SCGE 的基本原理:当精子的 DNA 发生断裂时,DNA 的致密结构会变得松散,DNA 链上的负电荷暴露在外,受损的 DNA 片段在外加电磁场的作用下从核内迁出,向电磁场的阳极缓慢移动从而形成像“彗星”尾巴一样的脱尾,通过

荧光显微镜可以测量该细胞的一些长度数值,如“彗星”尾部长度和“彗星”细胞总长度;“彗星”尾长与细胞头部直径的比值等,以此可以评估 DNA 的受损程度。

2.2 末端转移酶介导的 dUTP 末端标记法(TUNEL) TUNEL 是一种原位检测凋亡细胞 DNA 片段的方法,该方法将分子生物学与免疫组织化学相结合,在断裂的 DNA 片段 3'OH 端通过末端转移酶的介导连接上一段含有荧光标记的小 RNA 片段,这样可以通过荧光显微镜就可以评估精子 DNA 断裂的情况:出现荧光标记信号的就是发生断裂的 DNA 链。TUNEL 法对 DNA 损伤检测具有特异度和敏感度高的特点,能够检测出由于细胞凋亡而引起的精子 DNA 断裂。

2.3 精子染色质结构分析(SCSA)和吖啶橙试验(AOT) 两者都属于间接检测精子 DNA 损伤的方法。SCSA 在 1980 年首次由研究者提出,其基本原理:正常状态下附睾内成熟的精子细胞中,鱼精蛋白含有大量被氧化的巯基,巯基氧化形成的二硫键紧密地结合在 DNA 链上,因此 DNA 的抗酸能力得以极大的增强,这种结合有助于稳定 DNA 的双链结构。而精子的 DNA 损伤后,染色质中鱼精蛋白的大多数巯基未能被氧化,整个染色质结构不紧密,抗酸性低,因此在酸的作用下容易发生变性,成为单链 DNA。荧光染色剂吖啶橙(AO)的特性是,当 AO 结合到双链 DNA 上以后,结合部位能发出绿色荧光,而结合到单链 DNA 上时结合部位发出红或黄色的荧光。使用荧光显微镜能够方便地检测这些荧光信号。或者通过流式细胞仪分析,便能统计精子 DNA 的损伤情况。该方法能够进行客观的定量检测,便于标准化。SCSA 的参数有别于精液常规参数,是一项特殊的数值,反映了不同精子 DNA 结构上的不一致性。该方法简单快捷有效,在医学检验中已成为检测精子染色质完整性的金标准。

2.4 精子染色质扩散试验(SCD) 2003 年有研究者提出一种新的检测精子 DNA 损伤的方法——SCD 法。其基本原理是利用精子染色质对酸的反应,将正常精子用酸进行处理,去除鱼精蛋白和组蛋白,染色质因没有核蛋白的结合保护,结构就会变得松散,松散的 DNA 环附于残留的核结构周围,形成光晕。而精子染色质发生损伤的地方,DNA 以单链形式存在,单链 DNA 不能形成正常大小的 DNA 光晕。因此可根据光晕的大小来判断精子的 DNA 碎片化程度。与彗星试验和 TUNEL 法相比,SCD 试验

结果不依赖于荧光强度和颜色,无需借助荧光设备,染色质光晕扩散的大小可以通过普通光学显微镜直接观察,方便精确地统计。该法更为简易实用。Chohan 等^[17]的研究结果表明,TUNEL、SCSA、SCD 等三种方法在检测精子 DNA 断裂情况的结果相近,因此简单快捷的 SCD 检测法在今后可能会被大量应用,成为检测精子 DNA 损伤的主要手段。2011 年,Dugum 等^[18]在一篇综述中指出,SCD 法是一种新的精子 DNA 断裂指数检测方法,它具有特异度高、操作简单、耗时短等优点。

3 精子 DNA 损伤检测的临床实用性

3.1 精液常规参数与精子 DNA 损伤之间的相关性 一直以来,预测生殖结局主要依靠精子浓度、活动力、形态值等传统的精液参数。现在,这些精液常规参数与精子 DNA 损伤之间是否具有相关性也逐渐受到关注。有研究证实,男性不育患者行常规精液检查,无论结果是否正常都可能存在精子 DNA 异常。Giwerzman 等^[19]发现,精子 DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)与精子活力呈负相关;而 Cohen-Bacrie 等^[20]和 Zini 等^[21]通过 TUNEL 试验和 SCSA 试验证实,DFI 与精子浓度、活动力、精子形态,尤其是精子颈部和尾部形态均密切相关;Moskovtsev 等^[22]的研究结果表明,DFI 与精子浓度、总活率、精子形态正常率是负相关的关系,差异显著。目前临床医生仍然以精液常规分析中的精子浓度、活动力、形态学等数据来作为选择常规 IVF 还是 ICSI 治疗不孕不育的根据。由于精液常规检测的结果波动范围较大,无论是浓度还是活动力值均容易受各种因素影响,因此这些常规指标只能反映最基本的精液质量,对可能影响精子功能的潜在异常,一般的精液分析不足以作出完整评估。而且,即使精液常规结果相近的人群中也会存在有明显不同的受精率和妊娠结局。所以,常规精液分析并不能很好地预测精子的受精潜能,也不能完全反映精子是否具有正常的受精能力。据相关报道,利用精子 DNA 完整率来区分生育力正常与非正常之间所存在差异的特异度为 89.4%,敏感度为 96.9%,这提示精子 DNA 完整性可以作为另一种评估精子质量的独立指标,在临床上作为精子质量评价标准具有一定的可行性和可靠性^[23]。

3.2 精子 DNA 损伤与自然受精率 现有研究表明,精子 DNA 损伤情况将会影响受精能力。细胞内氧化状态对精子获能的酪氨酸磷酸化环节起重要作用。虽然体内过高的活性氧水平对细胞存活和发挥

功能不利,但是生精细胞的发生、精子的形成和受精等一系列正常的生理过程仍需要低水平的氧化应激作用。比如在低水平氧化应激环境下,精子 DNA 损伤减少,DNA 完整率高,精子受精潜能提高;但是在高水平氧化应激情况中,活性氧浓度过高,结果就如前文所述,精子 DNA 将受到严重损伤,而且过氧化会破坏精子细胞膜,均可严重影响精子受精能力。据报道,精子 DNA 的完整性与自然受孕率间具有显著相关性。有研究者发现,当精子 DNA 不完整率高于 30% 时,无论是自然受孕率还是人工受精的受孕率均下降到极低的水平^[24]。

3.3 精子 DNA 损伤与 ART 结局 长期以来,如何预测妊娠结局一直困扰着生殖专家们。一项可预测患者妊娠结局的检查参数可以指导医生制定更合适的治疗方案,同时也可提前告知施行 ART 的患者们他们将会获得妊娠的概率,以减少患者治疗、等待的痛苦,减轻他们的经济负担。Muriel 等^[25]采用 SCD 法对 85 例需 IVF 和 ICSI 助孕的不孕症患者进行精子 DNA 完整性的检查,探讨精子 DNA 损伤与 ART 结局的相关性,结果发现 ART 受精率与 DNA 受损水平呈负相关;Velez de la Calle 等^[26]采用 SCD 法检测 622 例第一次借助 ART 治疗的不育不孕夫妇精液样本中精子 DNA 断裂水平,结果也发现精子 DNA 断裂率与受精率呈负相关,并指出显著影响受精情况的精子 DNA 断裂率阈值为 18%。王丽等^[27]的研究结果提示 DNA 断裂率与 IVF 受精率和优质胚胎率均存在显著负相关;然而 Borini 等^[28]利用 TUNEL 法对 IVF 及 ICSI 患者的精子 DNA 进行损伤检测,发现 IVF 组患者的临床妊娠率与精子 DNA 损伤无显著相关性,但是在 ICSI 组中的结果却正好相反,ICSI 患者的临床妊娠率与精子 DNA 损伤呈显著负相关;Zini 等^[29]统计分析了 7 篇文献报道中共计 1 549 个辅助生殖治疗周期,最后认为辅助生殖治疗中出现的流产率与精子 DNA 损伤率正相关。

4 结语

随着 ART 的广泛应用,传统的精液分析方法已经不足以准确判断男性生殖能力,需要建立更加全面、准确的精子评估和选择方法。综上所述,精子 DNA 完整性与 ART 结局密切相关,精子的 DNA 完整率为临床医生评估精子质量提供一个新的参考指标,在评价男性不育、预测 ART 结局和为临床选择合适的治疗方案等方面具有重要的指导作用。但是评估精子的 DNA 损伤会受多种因素共同影响,其中包括精子 DNA 损伤的类型、卵母细胞对损伤的修复

能力等。再者目前对于精子 DNA 损伤机制的研究仍在不断探索之中,其对 ART 结局的确切影响还不是非常确定。因此,通过检测精子 DNA 的完整性,建立完善的精子质量评价体系,对评估男性生育能力和预测 ART 结局具有十分重要的临床意义。

参考文献

- 1 张 寅,伍琼芳. 人类辅助生殖技术的临床研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2012, 31(2): 108-114.
- 2 蒋欢欢,曹云霞,贺小进. 精子染色质完整性检测与辅助生殖技术[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2011, 30(1): 58-64.
- 3 Venkatesh S, Singh A, Shamsi MB, et al. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility[J]. Reprod Sci, 2011, 18(10): 1005-1013.
- 4 Kennedy C, Ahlering P, Rodriguez H, et al. Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction[J]. Reprod Biomed Online, 2011, 22(3): 272-276.
- 5 黄学锋,金建远,费前进,等. 精子 DNA 损伤: 独立的精子质量评价指标[J]. 温州医学院学报, 2010, 40(3): 239-242.
- 6 Aitken RJ, de Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa[J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16(1): 3-13.
- 7 Winkle T, Rosenbusch B, Gagssteiger F, et al. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center[J]. J Assist Reprod Genet, 2009, 26(1): 41-46.
- 8 Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility[J]. Indian J Med Res, 2009, 129(4): 357-367.
- 9 焦瑞宝,唐吉斌. 氧化应激与精子 DNA 损伤[J]. 安徽医学, 2011, 32(4): 540-542.
- 10 李 红,杨学农,赵 萌,等. 不育男性的精子 DNA 完整性与活性氧及尿酸的关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(3): 149-151.
- 11 谷龙杰,陈振文,卢文红,等. 精子染色质结构异常对体外受精-胚胎移植结局的影响[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(2): 156-159.
- 12 Nili HA, Mozdarani H, Pellestor F. Impact of DNA damage on the frequency of sperm chromosomal aneuploidy in normal and subfertile men[J]. Iran Biomed J, 2011, 15(4): 122-129.
- 13 Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis[J]. Fertil Steril, 2010, 93(4): 1027-1036.
- 14 赵 凯,熊承良. 人精子染色质损伤及其检测的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(5): 460-463.
- 15 Nijs M, De Jonge C, Cox A, et al. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology[J]. Andrologia, 2011, 43(3): 174-179.
- 16 孙海龙,陈秀娟. 精子 DNA 损伤及其检测[J]. 中国男科学杂志, 2014, 28(9): 68-72.
- 17 Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, et al. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm[J]. J Androl, 2006, 27(1): 53-59.
- 18 Dugum M, Sandlow JI, Brannigan RE. Sperm DNA damage evaluation techniques[J]. J Androl, 2011, 32(3): 207-209.
- 19 Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study[J]. Int J Androl, 2010, 33(1): e221-e227.
- 20 Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménéz YJ, et al. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients[J]. Fertil Steril, 2009, 91(5): 1801-1805.
- 21 Zini A, Philips S, Courchesne A, et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay[J]. Fertil Steril, 2009, 91(6): 2495-2500.
- 22 Moskovtsev SI, Willis J, White J, et al. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities[J]. Urology, 2009, 74(4): 789-793.
- 23 Simon L, Lutton D, McManus J, et al. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success[J]. Fertil Steril, 2011, 95(2): 652-657.
- 24 Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team[J]. Fertil Steril, 2000, 73(1): 43-50.
- 25 Muriel L, Garrido N, Fernández JL, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertil Steril, 2006, 85(2): 371-383.
- 26 Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study[J]. Fertil Steril, 2008, 90(5): 1792-1799.
- 27 王 丽,张学红,刘金荣. 人精子穿去透明带金黄地鼠卵实验和精子 DNA 完整性检测在体外受精-胚胎移植中的应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(1): 43-47.
- 28 Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART[J]. Hum Reprod, 2006, 21(11): 2876-2881.
- 29 Zini A, Boman JM, Belzile E, et al. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod, 2008, 23(12): 2663-2668.

[收稿日期 2015-07-01][本文编辑 谭 毅 黄晓红]