

精子 DNA 碎片及其在不育症诊治中的应用

张俊峰^{1,2} 彭炜^{1,2} 王涛^{1,2,△} 刘继红^{1,2,△}

[摘要] 精子 DNA 碎片(SDF)是近年来国内外生殖医学领域研究的热点,随着大量实验研究和临床研究的开展,SDF 对于男性生殖能力具有重大影响已成为学术界的共识。但是,SDF 产生机制不明确,治疗手段也较为有限,同时关于 SDF 的众多问题仍然存在较大争议,本文从 SDF 的产生机制、临床意义、检测方法和治疗手段 4 个方面对 SDF 的发展及应用现状予以综述,以利于对 SDF 进一步的深入研究。

[关键词] 精子 DNA 碎片;产生机制;临床意义;检测方法;治疗手段

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2018.08.019

[中图分类号] R698.2 **[文献标识码]** A

Sperm DNA fragmentation and its application in the diagnosis and treatment of infertility

ZHANG Junfeng^{1,2} PENG Wei^{1,2} WANG Tao^{1,2} LIU Jihong^{1,2}

(¹Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China; ²Hubei Institute of Urology)

Corresponding author: WANG Tao, E-mail: tjhwt@126.com

Abstract Sperm DNA fragmentation is a hot spot in the field of reproductive medicine at home and abroad recently. With the development of a large number of experimental studies and clinical researches, the significant impact of the SDF on male reproductive ability has become the consensus of academia. Nonetheless, there are many controversial issues on the SDF. Its exact mechanism is unclear, and its effective cure methods are comparatively limited. In this paper, we reviewed basic experiments and clinical trials to contribute to its in-depth studies from four aspects the generation mechanism of SDF, clinical significances, detection methods and treatment methods.

Key words sperm DNA fragmentation; mechanism theory; clinical significance; detection method; treatment method

精子 DNA 碎片(sperm DNA fragmentation, SDF)是指在各种内、外不利因素的作用下,精子核 DNA 或线粒体 DNA 发生单链或双链断裂,导致父源性基因完整性受损的情况,近年来逐渐成为评价精液质量和预测生育能力的新指标。文献显示有近 20% 的特发性不育与 SDF 有关,其影响的环节涉及受精、着床、胚胎发育等多个环节^[1]。SDF 在这种背景下愈加受到重视,当精子碎片化率(DFI)在 10%~20% 时,男性不育的风险明显大于 DFI<10% 的男性;DFI>20% 时,不育症发生率达到 33%^[2]。因此,SDF 作为一个对于男性生育能力有评估和预测价值的指标,越来越受到男科领域和生殖领域的重视。但是临床对 SDF 认识并不深刻,存在较多的争议甚至自相矛盾的结论,严重影响了 SDF 的发展和临床应用进程。本文主要从 SDF 产生机制、临床意义、检测方法和治疗方法 4 个方面对 SDF 进行综述,以深化对 SDF 的认识。

1 SDF 产生的机制

成熟的精子核蛋白主要为鱼精蛋白,富含精氨酸和半胱氨酸。精氨酸残基携带正电荷,其作用是中和精子核 DNA 所携带的负电荷;半胱氨酸残基之间以二硫键相连,稳定染色质结构,同时使染色质高度压缩排列,形成高密度的精子核染色质。然而,当精子受到内部或外部原因造成结构破坏时,过于致密的染色质结构使得精子的修复能力较低。精子的产生是一个多因素参与协调的漫长过程,任何过程受到干扰或者损伤都有可能使精子 DNA 染色体结构异常。SDF 产生的具体机制并不明确,目前主要有精子成熟障碍、精子凋亡异常和氧化应激 3 种机制学说。

1.1 精子成熟过程中核染色质组装异常

在精子的发育成熟过程中,精子核 DNA 会发生一系列复杂的变化,在精子发生的中期,组蛋白替换鱼精蛋白是精子核 DNA 完成染色质组装的重要步骤,此时精子核 DNA 双链高度致密排列并形成扭曲应力^[3]。正常情况下,为了减少 DNA 双链之间扭曲应力的影响,DNA 链在特定的位点进行“解链”,然后用修复酶恢复其正常结构。拓扑异

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科(武汉,430030)

²湖北省泌尿外科研究所

△审校者

通信作者:王涛,E-mail:tjhwt@126.com

构酶 II (topoisomerase II) 可能与精子 DNA 的解链相关, 具有解链活性, 能够从特定的位点解开 DNA 双链。同时拓扑异构酶 II 也具有修复活性, 是重要的精子 DNA 链延伸修复的活酶^[4]。这一过程容易被各种因素所干扰, 有研究显示 ploy 聚合酶能够抑制拓扑异构酶 II 的修复活性, 使断开的 DNA 链不能完全修复而导致染色质结构的破坏^[5]。另外, 5%~15% 的患者缺乏鱼精蛋白, 组蛋白相对过多使得染色质致密性降低, 易受外界因素影响。因此, 精子成熟过程中的核染色质组装异常降低了精子对自身 DNA 修复的能力和适应能力, 导致精子碎片的产生。

1.2 精子凋亡异常

Sakkas 等^[6]最先提出精子凋亡理论, 精原细胞和精母细胞的早期凋亡由 Fas/FasL 途径、Caspase 途径介导, 具有 DNA 缺陷的细胞通过某种方式逃过了正常的凋亡途径而产生了异常精子。死亡受体 (Fasreceptors/CD95) 是一种细胞凋亡特征性的超微结构, 在射出的精液中高表达, 并且存在凋亡的细胞结构 (如细胞质液泡) 中, 由此推测在射出的精液中 SDF 的产生与睾丸中的生精细胞凋亡不全有一定关系。在建立的小鼠动物模型中敲除端粒酶催化亚基后, 诱导细胞进入凋亡应激状态, 发现精子 DFI 增加了 7 倍, 小鼠 DFI 的显著增加可能与其精子凋亡应激状态有关^[7]。也有研究指出 M450 小体 (M450 bodies) 是一种无核、膜结合型、具有环状结构的凋亡小体, M450 小体在低生育能力的男性精液中广泛存在, 并且其数量的多少与 SDF 呈正相关性, 进一步证明了精子凋亡异常可能是 SDF 产生的机制之一^[8]。

1.3 氧化应激

精子成熟过程中的染色质组装障碍和精子凋亡异常并不足以完全解释 SDF 的产生机制, 氧化应激是目前最为重要的发病机制学说。Moskovtsev 等^[9]研究表明, 精子被射出体外后其 DFI 远远大于睾丸内的精子, 其可能与精子射出体外后活性氧 (ROS) 的大量增加有关。而热应激也能使睾丸内精原细胞的 ROS 生成增加^[10]。内源性 ROS 也与 SDF 的产生密切相关: 一方面不成熟精子保留了大量的胞质, 其产生过量的内源性 ROS 使机体抗氧化系统失衡, 导致细胞膜中多聚不饱和脂肪酸氧化甚至 DNA 链的断裂; 另外使用 ROS 清除剂和抗氧化剂治疗和预防 SDF 有效, 也间接证明了 ROS 是引起 SDF 的重要原因。同时, 泌尿生殖道的感染也是过量内源性 ROS 重要来源。8-羟基-2-脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG) 是 DNA 氧化应激最主要的标志物, SDF 与 8-OHdG 的水平高度正相关^[11]。因此在氧化应激的

作用下, 精子细胞膜结构受到破坏, 精子代谢与功能受到损害甚至丧失, 导致核 DNA 的完整性损坏; 另外精子细胞膜破坏以后, 精子核 DNA 直接与胞浆中的 ROS 接触, 引起单链或者双链的断裂, 导致精子遗传物质结构受损和功能缺陷。

2 SDF 的主要临床意义

2.1 SDF 与男性不育

常规精液参数检查是诊断男性不育症的重要参考指标, SDF 能否作为一项对男性生育能力有预测意义的检查并没有被广泛接受。Sergeie 等^[12]研究表明, SDF 可能导致男性不育, 正常精液中 SDF 比例为 $(13.1 \pm 7.3)\%$, 在不育男性精液中 SDF 比例达到了 $(40.9 \pm 14.3)\%$, 以 20% 作为 SDF 分界值, 预测男性能否生育的特异度为 89.4%, 敏感度为 96.9%。Aydos^[13]也发现常规的精液参数包括精子计数、精子向前运动率、精子形态 3 项指标与 SDF 呈负相关性, 认为 SDF 对于男性生育能力的预测有其科学性与合理性, 应作为常规精液检查之外的一项重要的预测男性生育能力的指标。黎智彪等^[14]对 100 例不育症患者进行的 SDF 和男性不育关系的研究也证实了 SDF 检测与男性生育能力存在相关性, 指出 SDF 与常规精液参数无相关性, 但依然建议将 SDF 作为一项评价男性生育能力的重要指标。部分学者并不认为 SDF 能够作为一项常规的精液检查, 其理由是 SDF 自然存在于精液中, 存在缺陷的精子通常也不能赢得自然选择而受精, 只有在特定的条件下才有必要进行 SDF 的检查。

2.2 SDF 与反复流产的关系

早期发生的不明原因反复流产发病机制尚不清楚, 越来越多的研究显示精子 DNA 的完整性破坏可能是其发病原因。Zidi-Jrah 等^[15]的研究揭示了反复流产患者丈夫的 SDF 显著高于正常对照组, 表明高 SDF 患者的配偶发生反复流产的可能性高于正常人群。我国学者近年来也对精子完整性与反复流产的关系做了大量的研究, 张洲等^[16]研究了 49 例反复流产患者丈夫 DFI, 与 60 例正常对照组男性比较, 前者 DFI 明显高于正常对照组, 常规精液参数与对照组比较差异有统计学意义, 研究发现反复流产与 SDF 存在密切相关性; 刘成军等^[17]也做了类似的研究, 试验组为 56 例有反复流产病史患者的丈夫, 对照组为 31 例正常生育力的男性, 试验组 DFI 为 $11.0\% \sim 56.9\%$, 其中 21 例 (37.5%) 高于 30%; 对照组 DFI 为 $10.0\% \sim 36.8\%$, 其中 8 例 (25.8%) 高于 30%, 以上数据表明试验组精子 DFI 均数高于对照组, 差异有统计学意义 ($29.4\% \text{ vs. } 25.5\%, P < 0.05$), 也证明复发性流产与 SDF 存在相关性。因此, SDF 可能成为

原因不明的早期反复流产发病机制研究的突破口。

2.3 SDF与辅助生殖技术的结局

DNA损伤程度与自然受孕率呈显著负相关,如果男性精子DNA损伤率 $>30\%$,则自然生育的可能性几乎为0,辅助生殖技术则成为生殖医学重要的治疗手段,主要包括宫腔内人工受精(IUI)、体外受精(IVF)以及卵胞浆内单精子注射(ICSI)。目前学术界对SDF与辅助生殖技术的关系存在争议:部分学者认为精子DNA碎片化程度与IVF和ICSI的受精成功率呈显著负相关,精子DNA完整性差会导致精子在IVF时的受精能力以及胚胎发育潜能降低,进而影响到临床妊娠成功率以及增加流产风险。Li等^[18]发表的Meta分析显示:SDF与IVF的临床妊娠率存在显著负相关而对ICSI受孕没有明显的影响。Zhao等^[19]进行的Meta分析也得出相似结论并强烈建议将SDF作为预测辅助生殖技术能否成功受孕的检测项目。Simon等^[20]搜集了41篇研究SDF与IVF、ICSI结局相关的文献,以此为基础的Meta分析表明:SDF对于IVF、ICSI临床妊娠率均存在负相关性。美国社会实践委员会和美国生殖医学会(The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine)认为现有的数据不足以证明SDF对辅助生殖技术的结局是有消极作用的^[21]。学术界对于SDF是否对辅助生殖技术结局存在影响的争议是多个原因造成的,其中最主要和最常见的是精子碎片检测手段多样但缺乏标准化的评价体系和操作步骤以及实验人员个人的经验、技术的影响。

2.4 SDF对早期胚胎发育及子代的影响

DFI与反复流产、胚胎发育不良的关系已有大量的文献报道:对于自然受精的胚胎而言,如果较高DFI的精子形成了受精卵而超过了卵母细胞的修复能力或者胚胎自身的修复能力,可能导致胚胎存在遗传不稳定,子代出现遗传性缺陷或者先天性疾病^[22];对于辅助生殖技术培育的胚胎而言,Zhang等^[23]研究指出在进行IVF与胚胎移植时,高DFI不仅影响受精卵的正常结合,而且影响后期胚胎发育,移植成功率明显低于DFI低的精子,也大大增加了早期流产的风险。ICSI直接跨过了精子的自然选择过程,同时也增加了用异常精子行ICSI的风险,可能会导致人类异常胚胎的形成。利用ICSI技术培育的胚胎新陈代谢能产生谷氨酰胺(glutamine)、丙酮酸酯(pyruvate)、丙氨酸(alanine)等物质,最新一项报道显示^[24]:运用核磁共振技术(nuclear magnetic resonance,NMR)检测上述物质的1D ^1H 核磁共振谱(1D ^1H NMR spectrum)强度,观察到高DFI实验组上述物质的光谱强度显著低于正常对照组,同时实验组受精率、临

床妊娠率、胚胎质量明显低于对照组,该研究不仅证实了高DFI对于受精率、妊娠率和胚胎质量的影响,而且可能提供了一种检测精子DFI的新方法。因此,高DFI对于早期胚胎和子代的生长发育存在明显消极影响,利用有效的精子筛选技术选用高质量的精子,是避免出现早期胚胎流产、子代发育畸形的重要措施。

3 检测SDF常用的主要检测方法

随着对SDF的深入研究,SDF检测手段越来越丰富,例如精子DNA完整性检测技术有精子染色质结构分析试验(SCSA)、单细胞凝胶电泳(single cell gelelectrophoresis,SCGE)、末端转移酶介导的脱氧核苷酸(dUTP)末端标记法(TUNEL)、精子染色体扩散实验(sperm chromatin dispersion test,SCD)、荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization,FISH)、以及8-羟基脱氧鸟苷测定法(8-hydroxy-2-deoxyguanosine,8-OHdG)、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)、基因芯片技术(Microarray technology)等,其中临床最常用的技术包括SCSA、SCGE、TUNEL、SCD 4项检测技术。

3.1 SCSA

SCSA是第1种较为广泛使用的标准化检测方法。正常精子DNA紧密结合的双链具有很强的稳定性和抗酸能力,当精子DNA受损时如果导致了精子染色质结构的松散,此时的酸性溶液作用使之形成单链,吖啶橙(acridine orange,AO)可与单链DNA结合形成聚合物并发出红色或黄色荧光,而与双链DNA结合发出绿光,检测荧光颜色的变化从而实现对精子损伤的检测。其优点是检测的样本量大,准确度高,已经成为各男科实验室评测精子质量重要手段,是检测SDF的金标准。但因其器械条件(如流式细胞仪)要求较高,费用昂贵,阻碍了该技术的大面积推广^[25]。

3.2 SCGE

另一项临床上常用的SDF检测技术是SCGE,又称彗星实验(comet assay),是一种非常简单的检测单细胞DNA损伤的技术。精子DNA损伤时,原本紧密结合的双链结构变松散,损伤形成的DNA小片段被电场力驱动从核内向阳极迁移,形成了如“彗星”样的拖尾,未损伤的DNA则形成彗星的头部,形成特征性的病理现象。在荧光显微镜下根据彗星的荧光强度和头尾长度评估精子细胞DNA的损伤程度,其中DNA链断裂程度越高,其精子尾部的荧光强度、尾长和尾矩将越明显。SCGE能够简单、快速、灵敏的评价精子质量和损伤,能同时检测精子DNA双链和单链的断裂情况,能真实的反映SDF的程度。但是由于其对于

精液的保存要求高,易受电压电流及电泳液 pH 值的影响,需要检测人员具有丰富的经验和技能积累,因此任何一项出现异常情况都有可能产生假阳性结果。虽然近年来诸多研究对该技术进行了一些改进,例如改变电泳液 pH 值^[26]、碱性-中性双重彗星实验^[27],但缺乏标准化的操作和评价标准,主要依赖计算机软件进行图像分析使得该技术难以大面积普及使用。

3.3 TUNEL

近年来,为了追求检测 SDF 的精确性和可靠性,一些新的检测技术不断涌现,TUNEL 是较多使用的新检测方法。其基本原理是:精子 DNA 核酸内切酶激活后,核 DNA 被切割成双链 DNA 片段、高分子量 DNA 单链缺口,从而暴露出大量的 3'-OH 末端。此时通过末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的作用,将带有标记物的 dUTP 转移到 3'-OH 末端,然后在光镜下或荧光显微镜下观察精子 DNA 断裂的情况。TUNEL 技术敏感性较高,但成本较高,易受主观因素影响,假阳性结果偏高。TUNEL 法近年来也有新的发展,例如 TUNEL 实验末端用二巯苏糖醇(dithiothreitol)解凝^[28],使精子核更加靠近末端脱氧核苷酰转移酶,因而能够更精确更稳定的检测精子染色质结构的损伤。

3.4 SCD

正常精子的 DNA 经过酸变性并去除核蛋白后,原来致密的染色质结构变松散,使 DNA 环附着于残留的核结构并扩散形成特征性的光晕,而精子 DNA 单链片段抑制 DNA 光晕扩散的特性,形成了光晕的差异性,利用显微镜去观察光晕的有无和大小从而判断精子 DNA 的完整性^[29]。SCD 法检测结果的组内差异、组间差异相对较低,操作简单,成本较低,但是速度较慢,只能检测是否存在 SDF,而不能评价精子损伤的程度,结果易受主观因素影响,缺少统一的参考标准,需建立自己的试验检测标准和正常参考值。因此其局限性限制了该技术的大面积使用,虽然有一些改进并生产了商品化的试剂盒,保证了精子尾部的完整,使得易于区分精子和非精子成分,但仍然没有突破其自身局限性,应用相对较少。

4 SDF 的治疗

SDF 是否能被视为影响男性生育能力的一个独立致病因素,检测 SDF 是否应作为一项常规检测用以评价精子质量和预测男性生育能力仍然具有争议性,但是针对 SDF 的大部分研究都清晰表明,SDF 与人类生殖存在密切的联系,在不断的认识和探索的过程中,一些有益于改善 SDF 的治疗方法得以总结,目前治疗 SDF 的手段主要有抗氧

化治疗、去除病因治疗和中医治疗。

4.1 抗氧化治疗

氧化应激是引起 SDF 产生的重要机制,过量的 ROS 造成了抗氧化系统清除 ROS 能力的减退甚至丧失,因此抗氧化剂的补充是一个行之有效的措施,既可以口服抗氧化剂也可在精液培养基中添加抗氧化剂,都能使精子抗氧化能力得到改善。常用的外源性抗氧化剂有天然抗氧化剂、人工合成的抗氧化剂;天然抗氧化剂主要来源于植物,有效成分有维生素、生物碱、多糖、多酚、黄酮等,能够高效低毒的清除 ROS^[30];合成维生素 C、维生素 E 及其他大分子抗氧化剂为常见的人工合成抗氧化剂,但是其缺点是不易吸收,长期使用还有毒性作用。微量元素锌对于人类精子具有积极的影响,Omura 等^[31]发现锌作为一种抗氧化剂对于减少精子氧化应激损伤和增强精子活力具有积极作用。近年来不断探索 SDF 新的治疗方法;最近一项研究显示精子盐藻糖转移酶-5(sperm fucosyltransferase-5, sFUT5)能够调节精子与输卵管上皮细胞的相互作用,保护精子免受氧化损伤^[32];一项关于 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)降低精子氧化损伤改善精子质量的研究报道也探讨了一种新的抗氧化剂治疗方法^[33],同时关于 NAC 对精子的抗氧化作用后续研究表明,NAC 还可以改善精子活力和精子密度。单用或联合使用 L-肉毒碱(L-carnitine, LC)和乙酰-L-肉毒碱(acetyl-L-carnitine)对于男性不育症精子的抗氧化作用已有大量文献报道^[34]。亲脂性的维生素 E 与亲水性的维生素 C、微量元素硒、锌等抗氧化剂合用,与单用抗氧化剂相比较,联合使用多种抗氧化剂有一定的协同作用,但是依然观察到对氧化损伤有明显的治疗效果,可以在不同程度上降低氧化应激对精子的损伤。

4.2 去除病因治疗

引起 SDF 异常增高的原因很多,诸多报道均证实引起精子 DNA 损伤的原因除了疾病因素以外,还与环境和生活习惯密切相关^[35]。泌尿生殖道感染能导致精液中白细胞增多,诱使精浆 ROS 水平升高,通过氧化应激损伤引起 SDF,积极治疗泌尿系原发感染,可避免 SDF 的异常产生和增高。睾丸温度异常升高、精索静脉曲张、放化疗、药物等是常见的可能引起 SDF 的疾病因素,镉、铁中毒可致睾丸细胞的 DNA 损伤,细胞毒性药物作用靶点是睾丸生精上皮,引起生精障碍。放化疗亦可损伤睾丸生精上皮,引起生精障碍和精子损伤,因此对于有生育要求的男性患者,放化疗前精子冷冻保存是保证其生育能力的重要措施。吸烟、饮酒、环境的毒性作用,长时间的激素类药物、不健康的生活

习惯和特殊的工作条件都有可能引起SDF,例如长时间大量的吸烟、饮酒可能引起精液中ROS的异常增多,导致精子损伤,丙烯腈(CAN)^[36]及其代谢产物作为一种多效应毒性物质,可诱导精子DNA断裂和染色体结构异常。因此,避免危险因素,积极治疗原发病是预防和治疗SDF异常增高的有效措施。

4.3 中医治疗

中医治疗男性不育有着悠久的历史,目前中医将传统医学与现代化的检验检测手段相结合,实现中药治疗的新发展。孙伟等^[37]运用生精散治疗不育症患者的研究表明,生精散(配方:菟丝子、枸杞子、五味子、覆盆子、车前子为基础,加入熟地、鹿茸、鱼鳔、沉香等)可降低不育患者精子DNA损伤程度,改善精子质量,提高IVF-ET的受孕率。聚精丸、益肾生精方、六味地黄软胶囊、养精赞育颗粒、十子二仙汤、淫羊藿总黄酮、红景天提取物、菟丝子水提物、巴戟天水提物、木黄酮和牛尿酚等^[38]都是近年来我国科技工作者将传统的中医药方联合现代化的研究方案、检验检测技术取得的研究成果,均显示了上述中医药方或中药提取物对SDF的积极治疗作用。

5 总结

SDF自然存在于人类精液中,其异常增加的机制并不明确。引起SDF的原因包括疾病(精囊局部高温、精索静脉曲张、炎症、生殖器肿瘤等)、药物(放化疗、激素、免疫抑制剂等)、不良生活习惯(吸烟酗酒、吸毒、久坐等)、环境污染等;对于非无精症男方因素造成的特发性不育、女方不明原因的反复流产、育前和辅助生殖前精子优选的患者应行SDF的检查。SDF检测技术的不断发展和更新,有助于进一步深化SDF的认识,然而是否将SDF作为常规精子检测项目和评价指标仍未确立;当前SDF的治疗手段并不多,西医以治疗原发病、抗氧化损伤为主要治疗手段,避免危险因素和改善工作环境是重要的辅助治疗手段,中医中药联合现代化的SDF检测技术是中医治疗的主要治疗方法。现阶段的研究多为临床研究,基础研究没有取得实质性的突破,SDF的研究仍然任重道远。

[参考文献]

- 1 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.
- 2 Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples[J]. *Asian J Androl*, 2008, 10(5): 786—790.
- 3 Simon L, Murphy K, Shamsi M B, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(11): 2402—2412.
- 4 Simard O, Grégoire M C, Arguin M, et al. Instability of trinucleotide repeats during chromatin remodeling in spermatids[J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(11): 1280—1284.
- 5 Meyer-Ficca M L, Lonchar J D, Ihara M, et al. Poly (ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(5): 900—909.
- 6 Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa[J]. *Rev Reprod*, 1999, 4(1): 31—37.
- 7 Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, et al. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation[J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(4): 843—845.
- 8 Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, et al. Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies[J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13(9): 621—631.
- 9 Moskovtsev S I, Jarvi K, Mullen J B, et al. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4): 1142—1146.
- 10 田洪成, 马志芳, 杨波, 等. 热应激对生精细胞影响机制的研究进展[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2017, 32(2): 148—151.
- 11 De Iuliis G N, Thomson L K, Mitchell L A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(3): 517—524.
- 12 Sergerie M. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(12): 3446—3451.
- 13 Aydos O S. Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men[J]. *Turk J Urol*, 2015, 41(4): 191—197.
- 14 黎智彪, 严共全, 黄莉, 等. 精子DNA碎片率与男性不育的关系研究[J]. *中国医药科学*, 2016, 6(9): 128—130.
- 15 Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss [J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(1): 58—64.
- 16 张洲, 师娟子, 邢俊平, 等. 复发性流产与精液常规参数、精子畸形率和DNA完整性的相关性[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(16): 1788—1792.
- 17 刘成军, 王蔼明, 商微, 等. 精子DNA损伤与不明原因复发性流产的关系[J]. *中华男科学杂志*, 2011, 17(7): 619—621.

- 18 Li L, Wang L, Cai J, et al. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2006, 23(9-10): 367-376.
- 19 Zhao J, Zhang Q, Wang Y, et al. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(4): 998-1005.
- 20 Simon L, Zini A, Dyachenko A, et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome [J]. *Asian J Androl*, 2016, 19(1): 80-90.
- 21 Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(3): 673-697.
- 22 Adiga S K, Upadhyay D, Kalthur G, et al. Transgenerational changes in somatic and germ line genetic integrity of first-generation offspring derived from the DNA damaged sperm [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2486-2490.
- 23 Zhang Y, Trussell J C, Chohan K R. Detecting and minimizing sperm DNA damage [J]. *Semin Reprod Med*, 2013, 31(4): 267-273.
- 24 Uppangala S, Pudakalakatti S, Dsouza F, et al. Influence of sperm DNA damage on human preimplantation embryo metabolism [J]. *Reprod Biol*, 2016, 16(3): 234-241.
- 25 Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility [J]. *Asian J Androl*, 2011, 13(1): 69-75.
- 26 Loyo M, Espinoza S, Giraud P, et al. Early and severe dyspnea after supracricoid partial laryngectomy [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2014, 123(1): 53-57.
- 27 Nie C, Shen C, Hu H, et al. Mid-term results of fronto-vertical partial laryngectomy for early glottic carcinoma with anterior commissure involvement [J]. *Acta Otolaryngol*, 2014, 134(4): 407-412.
- 28 Mitchell L A, Iulius G N, Aitken R J. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology [J]. *Int J Androl*, 2011, 34(1): 2-13.
- 29 Pollock K, Gosálvez J, Arroyo F, et al. Validation of the sperm chromatin dispersion (SCD) test in the amphibian *Xenopus laevis* using in situ nick translation and comet assay [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2015, 27(8): 1168-1174.
- 30 Gharagozloo P, Aitken R J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(7): 1628-1640.
- 31 Omu A E, Al-Azemi M K, Kehinde E O, et al. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy [J]. *Med Princ Pract*, 2008, 17(2): 108-116.
- 32 Huang V W, Lee C L, Lee Y L, et al. Sperm fucosyltransferase-5 mediates spermatozoa-oviductal epithelial cell interaction to protect human spermatozoa from oxidative damage [J]. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21(6): 516-526.
- 33 Ciftci H, Verit A, Savas M, et al. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status [J]. *Urology*, 2009, 74(1): 73-76.
- 34 Gharagozloo P, Aitken R J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(7): 1628-1640.
- 35 Sarıözkan S, Türk G, Çıkla-Süzgün P, et al. Effect of etodolac hydrazone, a new compound synthesised from etodolac, on spermatozoa quality, testicular lipid peroxidation, apoptosis and spermatozoa DNA integrity [J]. *Andrologia*, 2016, 48(2): 177-188.
- 36 Fariello R M, Pariz J R, Spaine D M, et al. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(11): 3140-3149.
- 37 孙伟, 杨丽霞, 于艳, 等. 中药生精散对精子 DNA 完整性的影响及其在 IVF-ET 治疗中的临床疗效 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2011, 31(9): 617-620.
- 38 王志强, 葛君, 陕文生. 中药对精子 DNA 损伤影响研究进展 [J]. *实用中医药杂志*, 2016, 32(4): 384-385.

(收稿日期: 2017-05-24)