

DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2020.03.027

转化医学学会《男性不育症精子 DNA 碎片检测临床实践指南》解读

高庆和, 晏斌, 刘煜, 刘胜京, 付建华*

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)



【摘要】 转化医学学会(TSM) 2017 年发表了《男性不育症精子 DNA 碎片检测临床实践指南》(以下简称《指南》)。《指南》阐述了精子 DNA 碎片(SDF)的检测方法、检测适应症、精子 DNA 碎片指数(DFI)结果分析,及其与辅助生殖预后关系等方面。本文通过对《指南》的解读,旨在指导临床医师和检验人员规范 SDF 的检测和应用,尤其是对 DFI 的结果进行客观分析。

【关键词】 精子 DNA 碎片; 精子 DNA 碎片指数; 转化医学学会; 男性不育; 指南

【中图分类号】 R698+.2 **【文献标识码】** A

Interpretation of “Clinical Practice Guidelines for Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility” published by Society for Translational Medicine

GAO Qing-he, YAN Bin, LIU Yu, LIU Sheng-jing, FU Jian-hua*

Xiuyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091

【Abstract】 The Society for Translational Medicine (TSM) published the “Clinical Practice Guidelines for Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility” (hereinafter referred to as the “Guide”) in 2017. The “Guide” discussed the evaluation, diagnosis & detection of indications of sperm DNA fragments (SDF), result analysis of sperm DNA fragmentation index (DFI) and its relationship with assisted reproductive outcomes. This paper aims to guide clinicians and inspectors to standardize SDF detection and application, as well as objective analysis of DFI results, through the interpretation of the “Guide”.

【Key words】 Sperm DNA fragments (SDF); Sperm DNA fragmentation index (DFI); Society for translational medicine; Male infertility; Guideline

(J Reprod Med 2020,29(03):416-421)

精液分析是评估男性生育能力的基础检查,包括精液体积、精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率以及精子形态学分析等,检测结果可为临床医生提供初步的诊断依据^[1]。但精液分析不能准确预测由于精子质量变化而产生的影响,因此有必要寻找其他的检测指标,来提高男性生育的预测和管理^[2]。随着对男性不育症病因及机制的深入研究,精子 DNA 碎片(Sperm DNA fragmentation, SDF)检测可能成为评价男性生育能力的重要手段,精子 DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)开

始为患者的病因诊断提供新依据。虽然其在男性不育症的临床诊断中并未常规使用,但 SDF 检测的价值已被美国泌尿外科学会和欧洲泌尿外科学会的相关指南承认。转化医学学会(The Society for Translational Medicine, TSM)在 2017 年发表了《男

【收稿日期】 2019-07-29; **【修回日期】** 2019-11-07

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81473527);国家自然科学基金青年项目(81703929)

【作者简介】 高庆和,男,山东济宁人,硕士,主治医师,中西医结合男科生殖方向。(* 通讯作者)

性不育症精子 DNA 碎片检测临床实践指南》(以下简称《指南》),介绍了 SDF 的检测方法、SDF 检测适应症、DFI 结果分析等^[3]。本文通过对《指南》进行解读,旨在指导临床医师和检验人员规范 SDF 的检测和应用,尤其是对 DFI 结果的客观分析。

一、SDF 的检测

《指南》指出,精子 DNA 损伤的机制尚不清楚,存在多种 SDF 检测方法。在实验室中广泛使用并将其作为临床指标应用于男性生育评估之前,需要在方法学上对 SDF 检测进行规范,实现 SDF 检测的标准化。

1. SDF 的检测方法:SDF 检测一般分为直接和间接检测两类方法。直接测定法通过直接使用探针和染料来测量。间接测定法既测量现有的断裂,也可以测量 DNA 对变性的敏感性。目前 SDF 检测有 8 种方法^[4],其中末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)、精子染色质结构分析(SCSA)和精子染色质弥散试验(SCD)是 3 种最常用的检测方法。(1)TUNEL:利用荧光标记的核苷酸片段检测 DNA 的“Nicks”或游离端,该方法通过使用流式细胞术或荧光显微镜对 dUTP 通过酶反应进入单链或双链 DNA 断裂进行定量。(2)SCSA:基于流式细胞术的检测方法,用于评估吖啶橙色染色到 DNA 断裂的大量细胞,在精子 DNA 的温和酸变性之后,核酸选择性阳离子荧光染料与产生绿色荧光的 DNA 断裂的双链 DNA 或产生红色荧光的单链 DNA 结合, DNA 变性的程度是通过测量从绿色到红色荧光的异色移位来确定的。(3)SCD:也被称为光晕测试,即具有片断 DNA 的精子在酸变性和去除核蛋白后不会产生在具有非片断 DNA 精子中观察到的分散 DNA 环的特征光晕,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。不管使用哪种检测方法,研究表明 SDF 检测在评估精子 DNA 损伤和生育潜力方面具有重要价值^[5]。

2. SDF 的检测要求:文献报道新鲜精液最常用于 SDF 检测(表 1,C 级建议),加工处理后的精液会对检测结果有一定影响。体外受精(IVF)/卵胞浆内单精子注射(ICSI)的精子制备程序会造成精子 DNA 损伤。密度梯度离心法(DGC)是辅助生殖技术(ART)前一种常见的精子制备程序,虽然 DGC

使得精子活动率改善,但 DGC 后精子 DFI 从 15% 显著增加到 25%^[6],从而导致较低的妊娠率^[7]。但也有研究得出相反的观点,显示在 DGC 后 DNA 受损的精子比例减少了 22%~47%^[8]。此外,精子细胞上游(swim-up)后,精子 SDF 与受精率、着床率和妊娠率之间并没有明显的相关性^[9]。因此,精液处理对 SDF 的影响尚不确定,需要进一步的研究,目前的证据尚不支持在 SDF 检测中使用处理后的精液来预测 ART 结局。

3. 禁欲时间对 SDF 结果的影响:采集精液标本前的禁欲时间对 SDF 结果有一定影响(表 1,C 级建议)。与禁欲时间较长的患者相比,禁欲 1 d 的 SDF 显著降低,缩短禁欲时间已被建议作为治疗高 SDF 的一种方法^[10]。虽然最佳的禁欲时间尚未确定,《指南》建议在精液采集前 2~3 d 禁欲可能会减少 SDF 个体内和个体间差异对测试结果的影响。与正常对照组相比,具有高 SDF 的不育男性精液样本中活性氧(ROS)含量较高^[11]。《指南》推荐缩短精子培养时间、在室温下保存以及向培养基中添加抗氧化剂/低温保护剂等策略以减少对 SDF 的影响。

4. SDF 检测的标准化:具有严格质量控制的标准方案对于 SDF 检测结果的可靠性是必不可少的(表 1,B-C 级建议)。目前,SDF 检测的不足之处即 DNA 损伤的性质和类型是未知的。但通过反映样本的整体质量和精子 DNA 的性质,这些测试是相互关联的,并且可能指向共同的损伤来源。研究显示,当使用相同的仪器在标准化的分析条件下独立分析同一组精液样品时,两个实验室之间的 SDF 结果具有高度相关性^[12]。同样,经验丰富的技术人员使用标准化方案对精液样品 SDF 进行比较测量,也显示出实验室之间高度可靠的结果^[13]。同时,流式细胞术的应用允许在相对较短的时间内分析数千个细胞,大大增加了 SDF 检测的可靠性^[14]。与其他技术中使用光学或荧光显微镜相比,TUNEL 和 SCSA 中流式细胞术的加入减少了观察者内和观察者间的变异性。在 SDF 检测中,SCSA、TUNEL、SCD 和彗星实验(COMET Assay)具有文献报道的标准化方案^[15-18]。因此,SDF 检测的标准化,需要在专业实验室通过标准方案和质量控制才能确定检测的可靠性。

表 1 SDF 的检测要求

SDF 检测	推荐等级
精液要求:建议使用新鲜的精液样本进行 SDF 检测,加工处理后的精液对 SDF 的影响尚不确定	C 级
时间要求:在收集精液样本之前固定禁欲天数,推荐 2~3 d	C 级
操作标准:采用具有严格质量控制的标准方案,如 SCSA、TUNEL、SCD 和 COMET,以保证 SDF 检测结果的可靠性	B-C 级
SDF 检测作用:SDF 阈值可以反映生殖结果的概率	B-C 级

二、SDF 检测的临床适应证

尽管精子 DNA 完整性在人类生殖中的重要作用已被广泛研究,但 SDF 检测的临床适应证尚不明确,《指南》根据现有证据支持的试验,在临床实践中为 SDF 检测提出具体的适应证。

1. 精索静脉曲张患者:精索静脉曲张是男性不育的常见原因,精索静脉结扎术已被证明能显著改善精液参数,改善自然妊娠结局^[19]。使用传统的精液分析作为手术治疗获益与否的评价指标是不足的^[20],在发现 SDF 与精索静脉曲张显著正相关后,人们开始关注 SDF 检测,关注精索静脉曲张患者的 SDF 数值。在包括 16 个病例对照研究的文献综述中,Zini 等^[21]指出精索静脉曲张男性的 SDF 高于对照组,表明精索静脉曲张与 DNA 损伤有关。Esteves 等^[22]的一项多中心研究评估各种病因的 SDF,发现男性精索静脉曲张患者 SDF 发生率最高[(35.7 ± 18.3)%]。精索静脉曲张与 SDF 之间的相关性,在精索静脉结扎术后精子 DNA 损伤改善中得到进一步验证。Zini 等^[21]报道 12 项研究中共 511 例患者精索静脉结扎术后 SDF 降低。有 Meta 分析表明,精索静脉结扎术提高了精子的完整性,与未治疗相比平均差异 3.37%[95%CI(-4.09, -2.65), $P < 0.000\ 01$]^[23]。

SDF 与临床 2~3 级精索静脉曲张之间的关系得到了各种研究的证据支持,Sadek 等^[24]报道,只有 3 级精索静脉曲张患者术后 SDF 有统计学上的显著降低。Ni 等^[25]报道,手术修复后 2 级和 3 级精索静脉曲张患者的 SDF 均减少。因此,SDF 检测推荐用于常规精液参数正常的 2~3 级精索静脉曲张患者(表 2,C 级推荐)。然而,目前还没有足够的证据来证明 SDF 检测在低度精索静脉曲张中的临床应用,因此需要进一步的研究来阐明 SDF 在 1 级精索静脉曲张中的应用价值。一项研究评估了 482 例 1~3 级的精索静脉曲张不育症患者,术后精液参数均有统计学意义的改善,而且低度精索静脉曲张患

者在手术后获得了与 3 级精索静脉曲张患者相似的自然妊娠结局^[26]。因此,《指南》推荐 SDF 检测用于精液参数临界或异常的 1 级精索静脉曲张患者(表 2,C 级推荐)。

SDF 与精索静脉曲张之间具有相关性,以及精索静脉曲张患者术后 SDF 改善,支持 SDF 检测在精索静脉曲张患者中应用。SDF 检测在 2~3 级精索静脉曲张患者中的应用较为明确,在 1 级精索静脉曲张患者中的应用仍需进一步的研究。

2. 不明原因不育、宫腔内人工授精(IUI)失败或反复流产的患者:不明原因不育症约占不育夫妇的 10%~30%^[27]。男性因素可能存在精子 DNA 完整性受损,而精液参数正常^[28],这也证明传统精液分析的局限性。有 25%~40%精液参数正常的不育男性出现 DFI 大于 20%~30%。Oleczuk 等^[29]将 119 名不明原因不育症的男性与 95 名已证实生育能力的男性进行比较,发现不明原因不育症患者 DFI 在 30%以上的为 17.7%,而已证实生育能力的男性为 10.5%($P = 0.005$)。SDF 与 IUI 失败相关,Duran 等^[30]评估 154 个 IUI 周期的精液样本,在 IUI 失败的周期中 SDF 水平明显升高。Bungum 等^[28]研究称,DFI > 30%的患者生化妊娠(3% vs. 24%)、临床妊娠(3% vs. 23.7%)和分娩率(1% vs. 19%)较 DFI < 30%的患者显著降低。SDF 与反复流产相关,Carlini 等^[31]发现尽管精液参数正常,反复流产组 DFI[(18.8 ± 7.0)%]高于生育对照组[(12.8 ± 5.3)%],与不育夫妇相似[(20.8 ± 8.9)%],反复流产事件数与 DFI 升高呈显著正相关($r = 0.20, P < 0.05$)。因此,不明原因不育、IUI 失败和反复流产的夫妇应该进行 SDF 检测,同时实施可能的干预措施来减少 DFI(表 2,C 级建议)。

3. IVF 和/或 ICSI 失败的患者:SDF 与 IVF 妊娠率之间具有显著关系,Zini 等^[32]评估了 9 项 IVF 研究,发现高 SDF 患者的妊娠率较低,合并优势比为 1.57[95%CI(1.18-2.07), $P < 0.05$];未发现

SDF 和 ICSI 妊娠率之间的显著关联,合并优势比为 1.14[95%CI(0.86-1.54)]。Zhao 等^[33]在 2 756 对夫妇的荟萃分析中发现,高 SDF 患者 IVF 妊娠率较低,但 ICSI 妊娠率没有明显影响,这可能与 ICSI 过程是将精子直接注入卵母细胞,精子受到较少的氧化应激有关,同时质量较好的卵母细胞可能更有能力修复精子中的损伤。接受 IVF 和 ICSI 的患者,SDF 与活产率之间具有相关性,有荟萃分析显示,低 SDF 的男性活产率高于高 SDF 的男性[OR = 1.17,95%CI(1.07-1.28),P = 0.000 5]^[34]。另有研究显示低 SDF 的男性活产率明显较高,IVF 和 ICSI 风险比分别为 1.27[95%CI(1.05-1.52),P = 0.01]和 1.11[95%CI(1.00-1.23),P = 0.04]^[35]。

在 ART 之前 SDF 检测常规应用存在争议,这与治疗策略对 ART 结局的不确定影响有关,但支持对高 SDF 患者进行干预的有效性证据仍在不断发展。Bradley 等^[36]发现睾丸抽取精子的活产率(49.8%)、卵胞浆内形态选择后精子注射的活产率(28.7%)和生理性 ICSI 活产率(38.5%)高于未干预组(24.2%)。在 ICSI 中使用从睾丸获得的精子是一种合理的策略,这与精子 DNA 损伤发生在附睾运输过程中有关^[37]。研究证明,高 SDF、少精子症或反复 IVF 失败的男性中,采用睾丸取精是有益的(表 2,B-C 级建议)。

《指南》建议,SDF 检测适用于反复出现辅助生殖失败的患者,在 IVF 或 ICSI 中的检测应该更早(表 2,C 级建议)。自然妊娠和 ART 可以通过 SDF 检测来预测结局,反复流产和 ART 失败与 SDF 升高有关。SDF 检测的结果可为不育夫妇选择成功率高的 ART 方案提供依据。

4. 具有危险因素的男性患者:SDF 检测应提供给具有危险因素(主要指吸烟、肥胖等)的男性不育症患者,无论精液参数是否正常(表 2,C 级推荐)。氧化应激诱导的 SDF 与男性不育症患者的生活方式有潜在关系,通过改变这些危险因素,男性 SDF 检测值可以改善。(1)吸烟:吸烟对常规精液参数、精子受精能力和不育风险有不利影响^[38]。Elshal 等^[39]研究显示,不育吸烟者的 SDF 显著高于不吸烟者。SDF 程度与精液参数恶化之间存在显著的负相关。(2)肥胖:肥胖与生育能力低下有关,体重指数(BMI)增加和生育能力之间具有相应关系^[40]。Kort 等^[41]评估了 520 对不育夫妇,发现男性 BMI 与 SDF 呈正相关,平均 SDF 从 BMI 正常男性的 19.9%上升到肥胖男性的 27.0%。因此,SDF 检测应该对具有危险因素的不育男性提供。SDF 与生活方式之间的关联使 SDF 检测成为识别高危患者和监测干预反应的理想工具,SDF 检测也有助于督促患者生活方式的改变。

表 2 SDF 检测的适应证

适应证	说明	推荐等级
1. 精索静脉曲张	SDF 检测推荐用于常规精液参数正常的 2~3 级精索静脉曲张患者 SDF 检测推荐用于 1 级精索静脉曲张伴精液参数临界或异常的患者	C 级 C 级
2. 不明原因不育或 IUI 失败或反复流产	SDF 检测应提供给反复流产或 IUI 失败的不育夫妇	C 级
3. IVF 和/或 ICSI 失败	SDF 检测适用于反复出现辅助生殖失败的患者 少精子症、高 SDF 和反复 IVF 失败的男性,使用睾丸取精可能是有益的	C 级 B-C 级
4. 具有危险因素的男性不育患者	SDF 检测应提供给生活方式具有危险因素的患者	C 级

注:根据证据质量给出的建议等级:A 级,基于质量良好且与至少一个随机试验一致的临床研究;B 级,基于设计良好的研究(前瞻性,队列),但没有良好的随机临床试验;C 级,基于质量较差的研究(回顾性,病例系列,专家意见)。修改自牛津循证医学中心。

三、SDF 阈值的作用

SDF 阈值可反映生殖结局的概率(表 1,B-C 级建议),缺乏 SDF 检测的标准值是其不足之处。由于生殖涉及男女双方的多种因素,SDF 阈值不能完全评估生殖结局。目前 DFI 实验室参考值一般如

下:DFI ≤ 15% 表示精子 DNA 完整性好;15% < DFI < 30% 表示精子 DNA 完整性一般;DFI ≥ 30% 代表精子 DNA 完整性较差。DFI > 30% 与自然受孕和 IUI 中的阴性妊娠结局一致。ART 的成功率随着 DFI 升高而下降,当 DFI 达到 20%~25% 可能

会出现不育问题^[42]。然而,并不排除高 DFI 有成功受孕的可能性。因此《指南》指出 SDF 检测结果应作为反映妊娠概率的统计值,根据具体临床情况并考虑其他混杂因素调整该值是合理的,较高的 DFI 为不良生殖结局提供了一个可能的解释。

四、讨论

《指南》指出,随着 ART 的快速发展,男性不育症患者可以通过 ICSI 繁衍后代,却没有解释引起男性不育症的原因,忽视了对男性生育能力的评估。因此,过去几十年男性不育症的研究人员转向了精子内部的检测,发现精子 DNA 完整性对人类生殖具有重要作用^[43-44]。

SDF 能否被视为影响男性生育能力的一个独立致病因素,SDF 检测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,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联系,SDF 目前在临床中的可用性越来越高。《指南》对临床医师提出了具体的建议,SDF 检测适应于精索静脉曲张、不明原因不育或 IUI 失败或反复流产、IVF 和/或 ICSI 失败、生活方式具有危险因素的男性不育患者。同时,《指南》对 SDF 检测的规范性给出了具体要求,在精子采集和质量控制等方面确保 SDF 检测的准确性。

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,因此 SDF 产生的具体机制尚不明确。为减少异常 SDF 对生育的影响,口服抗氧化剂、精索静脉曲张修复、缩短禁欲时间、精子选择技术以及睾丸抽吸精子用于 ICSI 的尝试都取得了不同程度的进展。因此,SDF 检测应与传统精液分析一起用于男性不育症的评估中,进一步的研究有助于 SDF 检测在临床实践中发挥的更大作用。

【参 考 文 献】

- [1] 张敏建,郭军,陈磊,等. 男性不育症中西医结合诊疗指南(试刊版)[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35:1034-1038.
- [2] Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination[J]. Int Braz J Urol,2014,40:443-453.
- [3] Agarwal A, Cho CL, Majzoub A, et al. The Society for Translational Medicine: Clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility[J]. Transl Androl Urol,2017,6(Suppl 4):S720-S733.
- [4] Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, et al. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios[J]. Transl Androl Urol,2016,5:935-950.
- [5] Lewis SE, Aitken JR, Conner SJ, et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment[J/OL]. Reprod Biomed Online,2013,27:325-337.
- [6] Zini A, Nam RK, Mak V, et al. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing[J]. Fertil Steril,2000,74:824-827.
- [7] Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, et al. Variation of DNA fragmentation levels during density gradient sperm selection for assisted reproduction techniques: a possible new male predictive parameter of pregnancy? [J]. Medicine (Baltimore),2016,95:e3624.
- [8] Gosálvez J, de la Torre J, Lopez-Fernandez C, et al. DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed plus gradient-isolated human spermatozoa[J]. Syst Biol Reprod Med,2010,56:27-36.
- [9] Niu ZH, Shi HJ, Zhang HQ, et al. Sperm chromatin structure assay results after swim-up are related only to embryo quality but not to fertilization and pregnancy rates following IVF[J]. Asian J Androl,2011,13:862-866.
- [10] Agarwal A, Gupta S, Du Plessis S, et al. Abstinence time and its impact on basic and advanced semen parameters [J]. Urology,2016,94:102-110.
- [11] Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa[J]. Mol Hum Reprod,2010,16:3-13.
- [12] Ribeiro S, Sharma R, Gupta S, et al. Inter- and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation[J]. Andrology,2017,5:477-485.
- [13] Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility[J]. Anim Reprod Sci,2016,169:56-75.
- [14] Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, et al. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay[J]. Hum Reprod,2005,20:1921-1927.
- [15] Evenson D. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): detailed protocol. In: Zini A, Agarwal A ed. Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction [M]. Berlin: Springer Sciences,2011:487-497.
- [16] Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control [J]. J Assist Reprod Genet,2016,33:291-300.

- [17] Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL. Sperm chromatin dispersion test: technical aspects and clinical applications. In: Zini A, Agarwal A ed. Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction [M]. Berlin: Springer Sciences, 2011: 151-170.
- [18] Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 927: 137-146.
- [19] Diamond DA, Gargollo PC, Caldmone AA. Current management principles for adolescent varicocele [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96: 1294-1298.
- [20] Agarwal A, Sharma R, Harlev A, et al. Effect of varicocele on semen characteristics according to the new 2010 World Health Organization criteria; a systematic review and meta-analysis [J]. *Asian J Androl*, 2016, 18: 163-170.
- [21] Zini A, Dohle G. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96: 1283-1287.
- [22] Esteves SC, Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, et al. Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility [J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47: 1471-1477.
- [23] Wang YJ, Zhang RQ, Lin YJ, et al. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis [J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25: 307-314.
- [24] Sadek A, Almohamdy AS, Zaki A, et al. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95: 1705-1708.
- [25] Ni K, Steger K, Yang H, et al. Sperm protamine mRNA ratio and DNA fragmentation index represent reliable clinical biomarkers for men with varicocele after microsurgical varicocele ligation [J]. *J Urol*, 2014, 192: 170-176.
- [26] Krishna Reddy SV, Shaik AB, Sailaja S, et al. Outcome of varicolectomy with different degrees of clinical varicocele in infertile men [J]. *Advan Androl*, 2015: 1-9. doi: 10.1155/2015/432950.
- [27] Isaksson R, Tiitinen A. Present concept of unexplained infertility [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2004, 18: 278-290.
- [28] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22: 174-179.
- [29] Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, et al. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples [J]. *Andrology*, 2013, 1: 357-360.
- [30] Duran EH, Morshedi M, Taylor S, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17: 3122-3128.
- [31] Carlini T, Paoli D, Pelloni M, et al. Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss [J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34: 58-65.
- [32] Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons [J]. *J Androl*, 2009, 30: 219-229.
- [33] Zhao J, Zhang Q, Wang Y, et al. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102: 998-1005. e8.
- [34] Osman A, Alsomait H, Seshadri S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2015, 30: 120-127.
- [35] Bungum M, Humaidan P, Spano M, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19: 1401-1408.
- [36] Bradley CK, McArthur SJ, Gee AJ, et al. Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis [J]. *Andrology*, 2016, 4: 903-910.
- [37] Alvarez JG. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility [J]. *Minerva Ginecol*, 2003, 55: 233-239.
- [38] Yang F, Li L, Chen JP, et al. Couple's infertility in relation to male smoking in a Chinese rural area [J]. *Asian J Androl*, 2017, 19: 311-315.
- [39] Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, et al. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking [J]. *Clin Biochem*, 2009, 42: 589-594.
- [40] Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, et al. Subfecundity in overweight and obese couples [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22: 1634-1637.
- [41] Kort HI, Massey JB, Elsner CW, et al. Impact of body mass index values on sperm quality and quantity [J]. *J Androl*, 2006, 27: 450-452.
- [42] Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum B. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome [J]. *Andrology*, 2016, 4: 290-296.
- [43] 宋焱鑫, 郭燕京, 董波, 等. 精子 DNA 碎片指数阈值与体外受精-胚胎移植结局的相关性研究 [J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26: 546-551.
- [44] 季兴哲, 杨杰, 宋娟, 等. 334 例男性不育症患者精子 DNA 完整性与精液常规参数间的相关性分析 [J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26: 1233-1237.

[编辑: 辛玲]