

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.24.027

不同程度精索静脉曲张对不育男性精浆生化标志物 及精子 DNA 完整性的影响*

杨勇 王英男 全超 丁苏宁 杨文霞 宋明旭[△]

(江南大学附属医院 生殖中心 江苏 无锡 214000)

摘要 目的:探讨不同程度精索静脉曲张(varicocele, VC)对不育男性精浆生化标志物及精子 DNA 完整性的影响。**方法:**选取 2017 年 8 月至 2020 年 9 月至我院生殖医学中心男性专科门诊就诊并进行精浆生化及精子 DNA 完整性检查的不育患者 138 例,按照有无 VC 分为 VC 不育组 62 例,非 VC 不育组 76 例,选取同期就诊无 VC 的正常生育者 60 例作为本研究的对照组,根据精索静脉曲张程度将 VC 不育组患者分为 VC I 度组、VC II 度组、VC III 度组。比较 VC 不育组、非 VC 不育组与正常生育组精浆生化标志物及精子 DNA 碎片率(DNA fragmentation index, DFI),分析比较 VC 不育各亚组间精浆生化标志物及精子 DFI 变化情况。**结果:**精浆生化标志物分析:VC 不育组精浆 α -葡萄糖苷酶较非 VC 不育组及正常生育组明显减低($P<0.05$),且 VC 不育各亚组间精浆 α -葡萄糖苷酶水平依次减低,三组间两两比较有显著性差异($P<0.05$);精浆锌、柠檬酸、果糖在 VC 不育组、非 VC 不育组与正常生育组比较无统计学差异($P>0.05$),在 VC 不育各亚组间比较均无显著性差异($P>0.05$);精子 DFI 分析:VC 不育组精子 DFI 较正常生育组升高($P<0.05$),非 VC 不育组精子 DFI 较正常生育组升高($P<0.05$),VC 不育组精子 DFI 较非 VC 不育组比较未见明显差异($P>0.05$);VC 不育各亚组间精子 DFI 逐渐升高,三组间两两比较有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**VC 的发生与进展程度与精子 DFI 及精浆 α -葡萄糖苷酶水平异常具有相关性,其二者可作为评价 VC 的有效指标,并为 VC 的分度提供一定的依据。

关键词:精索静脉曲张;男性不育症;精浆 α -葡萄糖苷酶;精子 DFI

中图分类号:R697.24;R698.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)24-4738-04

Effects of Varying Levels of Varicocele on Seminal Plasma Biochemical Markers and Sperm DNA Integrity in Infertile Men*

YANG Yong, WANG Ying-nan, QUAN Chao, DING Su-ning, YANG Wen-xia, SONG Ming-xu[△]

(Reproductive Center, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, 214000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of varying levels of Varicocele (VC) on seminal plasma biochemical markers and sperm DNA integrity in infertile men. **Methods:** A total of 138 infertile patients were enrolled from August 2017 to September 2020, who were treated in the male clinic of Reproductive Medicine Center of our hospital and had their seminal plasma biochemistry and sperm DNA integrity, all cases are divided into 62 VC infertility group and 76 non-VC infertility group, and at the same time 60 normal men without VC were selected as normal control. Patients with VC infertility were divided into VCI group, VCII group and VCIII group according to the levels of varicocele. The changes of seminal plasma biochemical markers and sperm DNA fragmentation index (DFI) were compared between VC sterility group, non-VC sterility group and normal fertility group. **Results:** The α -glucosidase in VC sterile group was significantly lower than that in non-VC sterile group and normal fertile group ($P<0.05$), and the level of α -glucosidase in seminal plasma decreased in different subgroups of VC sterility, and there was significant difference between two groups ($P<0.05$). There was no significant difference ($P>0.05$) in zinc, citric acid and fructose in seminal plasma between VC sterile group and non-VC sterile group and normal fertile group, DFI analysis showed that DFI of sperm in VC infertility group was significantly higher than that in normal fertility group ($P<0.05$), and DFI of sperm in non-VC infertility group was higher than that in normal fertility group ($P<0.05$), there was no significant difference in DFI of sperm between VC infertility group and non-VC infertility group ($P>0.05$), but DFI of sperm in VC infertility sub-group increased gradually, and there was significant difference between two groups ($P<0.05$). **Conclusion:** The occurrence and progression of VC is correlated with abnormal DFI in spermatozoa and α -glucosidase in seminal plasma levels, which can be used as effective indicators for VC evaluation and provide a certain basis for VC grading.

Key words: Varicocele; Male infertility; Seminal plasma α -glucosidase; DNA fragmentation index

Chinese Library Classification(CLC): R697.24; R698.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)24-4738-04

* 基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(92068109)

作者简介: 杨勇(1983-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 生殖男科, E-mail: yy830415@163.com

(收稿日期: 2022-05-27 接受日期: 2022-06-23)

前言

精索静脉曲张(Varicocele, VC)是指精索静脉回流受阻,血液反流导致精索蔓状静脉丛的扩张、迂曲及伸长,在不育男性群体中患病率可达40%^[1]。VC是可以手术根治的导致男性不育的首位原因,但其引起不育的生理、病理机制目前仍不十分明确^[2]。尽管精液常规等参数可预测男性生育能力,但以往相关研究证实并非所有的精索静脉曲张患者的精液常规都会出现异常表现,事实上附睾及其主要附属性腺对男性精子的功能、发育及运输起到了至关重要的作用^[3]。精液由精浆与精子构成,其中90%以上成分由精浆提供,精浆由前列腺液、精囊液、附睾液和尿道球腺分泌的少量液体一起组成,包含精子存活、运动的必须载体成分,精浆成分的改变会影响精子的生理功能^[4,5]。精子的DNA直接决定了精子的形态、活力及功能,精子DNA完整性的破坏会对生育产生负面影响,造成不育和反复流产。精子DNA碎片率(DNA fragmentation index, DFI)检测被认为是一个新的评价精子质量和预测生育能力的指标。因此,本研究通过检测精索静脉曲张患者的精浆生化相关指标,包括锌、柠檬酸、果糖、 α -葡萄糖苷酶水平及精子DFI,比较精索静脉曲张患者与正常人群之间的差异,并对精索静脉曲张程度患者的检测结果进行组间对比,探讨VC的发生与进展过程对男性不育的影响,为VC的临床诊疗工作提供更多依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

所有对象均来自2017年8月至2020年9月至本院生殖医学中心男性专科门诊就诊并进行精浆生化及精子DNA完整性检查的不育患者,共纳入符合者138例,其中VC致不育患者62例,非VC致不育患者76例,选取同期就诊无VC的正常生育者60例作为本研究的对照组;VC不育组以超声诊断VC分度标准分为三组,其中VC I度组29人,VC II度组21人,VC III度组12人。

1.2 标准

1.2.1 纳入标准 (1)年龄25~35岁的男性不育患者;(2)符合WHO男性不育症诊断标准;(3)符合精索静脉曲张诊断标准;(4)不违背医学伦理要求,患者知情同意并自愿加入。

1.2.2 排除标准 (1)无精子症及严重的少、弱精子症;(2)存在泌尿生殖系统感染与炎症,如睾丸炎、附睾炎、前列腺炎等;(3)睾丸外伤史、隐睾及生殖器官先天异常者;(4)近期内有激素、化疗等药物治疗史;(5)近半年有吸烟饮酒史;(6)其它可能影响精浆生化检查结果的疾病。

1.2.3 诊断标准 专家共识^[6]推荐以超声诊断VC分度标准:
① I度:临床触诊阳性,超声检查静息状态下精索静脉最大内径(maximum veous diameter in rest, DR)2.2~2.7 mm, Valsalva动作时精索静脉出现反流的持续时间(reflux time, TR)2~4 s;
② II度:临床触诊阳性,超声检查DR2.8~3.1 mm, Valsalva动作时可见返流信号,TR4~6 s;
③ III度:临床触诊阳性,超声检查DR \geq 3.1 mm, Valsalva动作时可见返流信号,TR $>$ 6 s。若患者存在双侧VC则按照曲张更严重的一侧进行分度。三组间年

龄及一般情况无显著性差异。

1.3 观察指标

1.3.1 标本采集 采集精液前禁欲4-7 d^[7],手淫法采集全部精液于干燥消毒的采样杯内,置37℃恒温水浴箱内自然充分液化,行各项检测。

1.3.2 精浆生化检测 检测仪器为Bio Systems A25全自动特定蛋白分析仪,取液化后精液经3000 r/min离心10 min后分离精浆。精浆柠檬酸(semenal plasma citratea assay kit, CIL)定量检测用酶法,所用的试剂盒购自重庆博士泰生物技术有限公司;精浆锌(semenal plasma zinc, Zinc)定量检测用比色法,所用的试剂盒购自重庆博士泰生物技术有限公司;精浆果糖(semenal plasma fructose, FRU)定量检测用己糖激酶法,所用的试剂盒购自重庆博士泰生物技术有限公司;精浆 α -葡萄糖苷酶(semenal plasma α -glucosidase, α -GLU)采用速率法进行定量检测,所用的试剂盒购自南京欣迪生物药业工程有限公司,严格按照说明操作。正常参考值:精浆柠檬酸参考值为 $>$ 15.6 mol/L;精浆锌参考值为0.764-7.64 mol/L;精浆果糖参考值为 $>$ 8.33 mol/L; α -葡萄糖苷酶参考值为109.63-570.76 U/L。

1.3.3 精子DNA碎片率检测 DFI检测采用精子染色质结构分析法(Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA)计算精子DFI。仪器及试剂采用塞雷纳(中国)医疗科技有限公司提供的Sparrow流式细胞仪及精子DNA染色试剂盒,严格按照仪器使用手册及试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学分析

所有数据录入后用R-4.1.2统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,三组间两两比较采用SNK法q检验。以 $P < 0.05$ 为差异显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 VC不育组、非VC不育组和正常生育组间精浆生化标志物、DFI比较

各组间精浆生化标志物比较结果:VC不育组精浆 α -葡萄糖苷酶较非VC不育组及正常生育组明显减低($P < 0.05$);VC不育组余指标精浆柠檬酸、锌、果糖与非VC不育组及正常生育组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);非VC不育组与正常生育组比较,各项指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

各组间精子DFI比较结果:VC不育组精子DFI较正常生育组升高($P < 0.05$);非VC不育组精子DFI较正常生育组升高($P < 0.05$);VC不育组精子DFI较非VC不育组比较未见明显差异($P > 0.05$)(表1)。

2.2 VC不育各亚组间精浆生化标志物、DFI比较

VC不育各亚组间精浆 α -葡萄糖苷酶随精索静脉曲张程度加重依次降低($P < 0.05$),三组间两两比较有显著性差异($P < 0.05$);精子DFI随精索静脉曲张程度加重各亚组依次升高($P < 0.05$),三组间两两比较有显著性差异($P < 0.05$);VC不育各亚组间精浆标志物柠檬酸、锌、果糖无显著性差异($P > 0.05$; $P > 0.05$; $P > 0.05$)(表2)。

表 1 VC 不育组、非 VC 不育组、正常生育组精浆生化、DFI 水平比较

	n	Zinc(mol/L)	CIL(mol/L)	FRU(mol/L)	a-GLU(U/L)	DFI(%)
VC infertility group	62	1.77±0.49	19.80±3.52	27.4±4.11	297.5±20.51* [#]	27.35±5.87*
non-VC infertility group	76	1.68±0.55	20.66±3.33	27.66±3.35	356.2±22.53	26.33±4.56*
normal fertile group	60	1.59±0.53	20.80±3.1	27.52±3.82	348.6±28.25	14.36±4.85

Note: Compared with normal fertility group, * $P<0.05$, Compared with non-VC infertility group, [#] $P<0.05$.

表 2 VC 各组间精浆生化、DFI 水平比较

Table 2 Comparison of seminal plasma biochemistry and DFI levels among VC groups

	n	Zinc(mol/L)	CIL(mol/L)	FRU(mol/L)	a-GLU(U/L)	DFI(%)
VCI group	29	1.72±0.53	21.60±2.24	25.12±7.32	287.3±22.54	23.66±4.53
VCI group	21	1.69±0.31	21.33±2.42	23.34±5.53	255.5±21.333*	29.28±4.88*
VCI group	12	1.55±0.54	22.26±2.63	25.63± 5.4	233.2±25.45* [#]	40.25±13.20* [#]

Note: Compared with the VCI group, * $P<0.05$, Compared with the VCI group, [#] $P<0.05$.

3 讨论

VC 作为一种常见的男性泌尿生殖系疾病,多见于成年男性,以往对于 VC 导致不育的研究方向主要集中于 VC 对睾丸生精功能的影响,应用常规精液参数指标来评估 VC 患者的生育能力,但精液常规参数会受到很多不可预测因素的影响。因此,我们尝试通过对精子 DNA 碎片率以及代表男性附属性腺功能的精浆生化标志物的检测,以探讨 VC 对精子 DNA 完整性、男性附属性腺功能的影响,从而评估 VC 对男性生育能力的损害。

精液包含精子和精浆,精浆的含量达到精液的 95%,是精子存活及运动的载体,其标志物的生理和生化特性的改变势必会影响精子质量,进而对男性生育力造成影响^[8]。精浆生化检测作为男科实验室常规的检测手段,在 VC 等相关疾病对男性生育能力影响等方面可提供重要依据^[9]。人体精液中包含 6 种葡萄糖苷酶,其中 α -葡萄糖苷酶几乎全部来源于附睾上皮细胞, α -葡萄糖苷酶可催化糖蛋白或多糖中碳水化合物向葡萄糖分解的糖基反应,供能于精子成熟、运动及受精过程,并可影响精子与透明带的结合,故其活性水平的降低将导致精液质量的异常^[10-13]。本研究结果表明,VC 不育组精浆 α -葡萄糖苷酶含量明显低于非 VC 不育组及正常生育组($P<0.05$),而非 VC 不育组和正常生育组比较无明显差异,提示 VC 可作为一种独立的影响因素导致附睾功能的损害,进而导致男性不育的发生;同时 VC 不育各亚组间精浆 α -葡萄糖苷酶随 VC 程度加重而明显减低,三组间两两比较均具有统计学差异($P<0.05$),提示随 VC 曲张程度的加重, α -葡萄糖苷酶活性显著减低,附睾功能的损伤进一步加重,这对于 VC 的诊断和分度有一定的参考价值。分析其可能原因为,当 VC 发生时睾丸及附睾静脉血液瘀滞,阴囊温度增高,导致逆流热交换,附睾因微循环障碍而缺氧,HIF-1 α 表达增加,进而造成附睾上皮细胞大量凋亡,导致 α -葡萄糖苷酶的消耗进而阻碍精子的成熟及前向运动,导致男性的生育功能受损^[10]。

精浆中的柠檬酸和锌主要源自前列腺,是反应前列腺功能的特征性标志物,可间接反映前列腺的功能。精浆中的柠檬酸

不仅参与精子的代谢,加强精子的运动,更起着维持精浆渗透压的作用^[14,15]。精浆 Zn 是多种酶的辅酶,作为人体重要微量元素之一具有维持精子活力的作用^[16]。精浆果糖作为精囊腺功能的标志物,其代谢产物三磷酸腺苷为精子纤丝收缩提供能量,直接参与了精子的获能和受精过程^[17]。本研究结果显示,VC 不育组、非 VC 不育组与正常生育组对比及 VC 不育各亚组两两对比中均未发现精浆锌、柠檬酸与果糖含量有统计学差异,表明 VC 在发生、进展过程中可能对前列腺及精囊腺的功能未造成直接影响。

本研究还发现 VC 可导致并加重精子 DNA 完整性破坏。目前对于精子 DNA 损伤机制研究,主要包括细胞凋亡、氧化应激及染色质异常 3 个方面,其中氧化应激学说被认为是 VC 导致不育的重要机制之一^[18]。正常机体的氧化与抗氧化维持一种动态平衡,当各种原因使机体的氧化与抗氧化失衡,将导致机体的氧化应激。过量的自由基尤其是活性氧自由基(reactive oxygen species,ROS)可以攻击包括 DNA 在内的几乎所有生物分子^[19]。精子质膜含有高浓度的不饱和脂肪酸,浆膜中含有低度 ROS 清除酶,在过量 ROS 的攻击下,质膜中的不包含脂肪酸发生脂类过氧化反应,破坏精子质膜通透性和流动性,改变内环境,致使精核 DNA 单/双链发生断裂或变异,精子 DNA 完整性受损^[20-22]。ROS 还可通过直接氧化精子 DNA 碱基的修饰导致鸟嘌呤 C8 位的氧化(形成 8-OHdG),由此引发 DNA 复制时碱基的错误配对及编码,导致基因突变、破坏精子 DNA 完整性。精子线粒体 DNA 较体细胞 DNA 缺少组蛋白和 DNA 结合蛋白的保护,对各种损伤因子尤其 ROS 极为敏感,且本身修复损伤的能力有限,如果精子 DNA 受损,又会更容易受到 ROS 的攻击,两者恶性循环,致使精子 DNA 损伤不断加重^[23-26]。

精子 DNA 碎片率(DNA fragmentation index,DFI)检测是一个关于精子质量的检测过程,被认为是一个新的评价精子质量和预测生育能力的指标。DFI 反映的是精子遗传物质的完整性。本研究结果显示,VC 不育组 DFI 明显高于正常生育组($P<0.05$),非 VC 不育组 DFI 也高于正常生育组($P<0.05$),而 VC 不育组与非 VC 不育组间未见明显差异($P>0.05$)。VC 不育组精子 DFI 明显升高,这与以往的研究结果相一致^[27-29],以往

结果显示 VC 患者精子 DFI 与对照组相比显著升高,对 VC 患者进行 3 个月抗氧化治疗或给予 VC 患者实施手术治疗后,精子 DNA 损伤有显著改善^[30],证实了 VC 的氧化应激是导致精子 DNA 损伤的主要原因,从而进一步引发男性不育。VC 不育组 DFI 与非 VC 不育组未见明显差异。分析其可能原因为精子 DNA 的损伤导致不育是多种因素共同作用的结果,主要包括生殖道的感染、肿瘤,生活环境及习惯等,而 VC 只是其众多因素中的一种,本研究仅将导致不育的因素按照是否伴发 VC 进行分组,但对于一部分可能影响生育力的未知因素仍然无法区分。本研究比较了 VC 不育各亚组间 DFI 的关系,三组间两两比较均有统计学差异($P < 0.05$),表明随 VC 曲张程度增加精子 DFI 不断上升,精子 DNA 损伤逐渐加重。

综上所述,VC 的发生与进展程度与精子 DFI 及精浆 α -葡萄糖苷酶水平异常具有良好的相关性,二者为 VC 导致不育机制的研究提供了重要佐证,可作为评价 VC 的有效指标,并为 VC 的分度提供一定的依据。检测这些指标对于 VC 的预防、早期发现、诊断有重要作用。本研究虽然将导致不育的因素按照是否伴发 VC 进行分组,但对于一部分可能影响生育力的未知因素仍然无法区分。因此,精浆 α -葡萄糖苷酶水平及精子 DFI 在不育症的鉴别诊断中的作用还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Jakobd, Joensenun, Carlsene, et al. Varicocele is associated with impaired semen quality and reproductive hormone levels: a study of 7035 healthy young men from six European countries [J]. *Eur Urol*, 2016, 70(6): 1019-1029
- [2] 邓春华, 商学军. 精索静脉曲张诊断与治疗中国专家共识[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(11): 1035-1042
- [3] 赵娜, 徐磊, 林宏云, 等. 陈文道, 王文婷, 刘德胜. 三种不同手术方式治疗精索静脉曲张患者的临床研究[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(6): 1155-1158
- [4] 阮衍泰, 郜亮, 徐贵江, 等. 精索静脉曲张对孕前男性精浆生化及精子 DNA 完整性的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2021, 27(2): 54-56+60
- [5] 郝天羽, 张宁宁. 人类精浆对夫精宫腔内人工授精妊娠结局影响的初步研究[J]. *中国性科学*, 2019, 28(8): 64-66
- [6] 黎晋宇, 金明显, 袁少英, 等. 彩色多普勒高频超声在精索静脉曲张不育症检查中的价值[J]. *蚌埠医学院学报*, 2018, 43(3): 371-373
- [7] 张红焯, 陆金森, 卢坤刚, 等. 精浆 α -葡萄糖苷酶全自动检测方法的建立及评价[J]. *中华男科学杂志*, 2014, 20(10): 886-889
- [8] 陈渝龙, 梁培禾. 精索静脉曲张与男性不育的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2020, 20(60): 41-43, 49
- [9] 刘健男, 刘亚东, 杨可来尔, 等. 精索静脉曲张外科治疗概述及有效性分析[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2018, 23(1): 73-76
- [10] 曾广启. 精浆 α -糖苷酶与男性不育症患者精液参数, 精浆生化的相关性[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(25): 126-127
- [11] Osman A, Alsomait H, Seshadri S, et al. Dose the extent of sperm fragmentation affect IVF or ICSI outcome: a systematic review and meta analysis[J]. *Human Reproduction*, 2013, 28(1): 9
- [12] Z Qiu, Q Chu, W Zhang, et al. Level of neutral alpha-1,4-glucosidase in seminal plasma of Chinese men [J]. *Andrologia*, 2018, 50 (3). doi: 10.1111/and.12948. Epub 2017 Dec 28
- [13] 谢军, 刘继红, 陈俊, 等. 精浆弹性硬蛋白酶、果糖和中性 α -葡萄糖苷酶测定在梗阻性无精子症诊断中的意义 [J]. *中国男科学杂志*, 2007, 21(3): 47-50
- [14] 沙琨, 齐莹莹. 精浆生化分析在精索静脉曲张诊断中的临床意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(9): 1389-1390
- [15] Anel-Lopez L, Ortega-Ferrusola C, Marti Nez-Rodriguez C, et al. Analysis of seminal plasma from brown bear (*Ursus arctos*) during the breeding season: Its relationship with testosterone levels [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0181776
- [16] Yamaguchi S, Miura C, Kikuchi K, et al. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(26): 10859-10864
- [17] Yazar H, Halis F, Nasit Y, et al. Effect of the Oxidant-Antioxidant system in seminal plasma on varicocele and idiopathic infertility in male humans [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(5): 935-940
- [18] Gomes M, Gonçalves A, Rocha E, et al. Effect of in vitro exposure to lead chloride on semen quality and sperm DNA fragmentation [J]. *Zygote*, 2015, 23(3): 384-393
- [19] Hamada A, Esteves C, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2 [J]. *Nat Rev Urol*, 2013, 10 (1): 26-37
- [20] 陈康, 吴妙峰, 吴品, 等. 精索静脉曲张对精子 DNA 碎片、活力、形态和体外受精结局的影响 [J]. *医学理论与实践*, 2020, 33(4): 536-538, 523
- [21] 阳方, 李俊君, 董良, 等. 精子 DNA 完整性损伤的发生机制及诊断治疗 [J]. *中国男科学杂志*, 2016, 30(9): 70-72
- [22] 刘丽敏, 谢庆东, 凌晓辉, 等. 精浆 ROS、PON-1、MDA 联合精子 DNA 碎片指数在男性不育症患者中的研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(12): 1435-1438
- [23] 康然, 秦松林, 王晓兰. 精索静脉曲张不育患者血清 8-OHdG、NO 及抑制素 B 水平变化及意义 [J]. *医学理论与实践*, 2019, 32(18): 2945-2947
- [24] Sivanarayana T, Ravi Krishna C, Jaya Prakash G, et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): Correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection [J]. *Reprod Med Biol*, 2013, 13(2): 87-94
- [25] Darbandi M, Darbandi S, Agarwal A, et al. Reactive oxygen species and male reproductive hormones [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 87
- [26] Ilacqua A, Izzo G, Emerenziani GP, et al. Lifestyle and fertility: The influence of stress and quality of life on male fertility [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 115
- [27] Moskovtsev SI, Lecker I, Mullen JB, et al. Cause-specific treatment in patients with high sperm DNA damage resulted in significant DNA improvement [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2009, 55(2): 109-115
- [28] Pallotti F, Paoli D, Carlini T, et al. Varicocele and semen quality: a retrospective case: control study of 4230 patients from a single centre [J]. *Endocrinol Invest*, 2018, 41(2): 185-192
- [29] Ammar O, Tekeya O, Hannachi I, et al. Increased sperm DNA fragmentation in infertile men with varicocele: relationship with apoptosis, seminal oxidative stress, and spermatid parameters [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(3): 909-919
- [30] 邓浩, 李焱, 赵军, 等. 精索静脉曲张术后联合不同抗氧化剂对精子 DNA 碎片率的影响 [J]. *中国男科学杂志*, 2020, 34(5): 42-46