

Sperm Chromatin Diffusion Test and Detection of Sperm DNA Integrity by Acridine Orange Staining

Zhenya Fang, Meihua Zhang, Anna Li, Yi Qiu*

Key Laboratory of Birth Regulation and Control Technology of National Health and Family Planning Commission of China, The Maternal and Child Health Hospital of Shandong Province, Jinan Shandong

Email: *qiuyi987@sina.com

Received: Aug. 6th, 2017; accepted: Aug. 20th, 2017; published: Aug. 28th, 2017

Abstract

Objective: To analyze and compare the accuracy and utility of determining sperm DNA integrity by sperm chromatin dispersion (SCD) test and acridine orange staining test (AOT). **Methods:** The level of DNA fragmentation was determined by SCD test and AOT in 32 adult healthy fertile men (control group) and 27 idiopathic oligozoospermia (IO) patients. Sperm nuclei with large DNA dispersion halos or with medium-sized halos were normal and nuclei with small-sized halos or no halo were abnormal. Sperm DNA strand breaks were tested by AOT of green for native DNA and red for denatured DNA. **Results:** The mean percentage of sperm nuclei with large halos, medium-sized halos, small-sized halos and no halo in patients with IO was (51.8 ± 17.1)%, (9.4 ± 8.6)%, (11.9 ± 5.8)% and (26.7 ± 10.6)%, but in control group it was (73.2 ± 6.2)%, (14.8 ± 5.7)%, (6.8 ± 2.9)% and (5.3 ± 2.2)%, respectively, there was a significantly difference in the IO and control group ($t = 4.256, P < 0.01$; $t = 5.1849, P < 0.05$; $t = 3.6967, P < 0.01$; $t = 5.7971, P < 0.01$). IO patients showed significantly higher DNA fragmentation (38.1% ± 9.5%) in their spermatozoa compared to healthy males (12.1% ± 5.2%, $P < 0.01$) determined by SCD test. No significant differences in the AOT outcome were seen between healthy males and IO patients ($P > 0.05$). **Conclusion:** The SCD is an effective test in sperm DNA fragmentation as a screening procedure to determine semen quality during basic infertility investigation for clinical use. The presence of sperm DNA fragmentation may lead to male infertility.

Keywords

Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test, Acridine Orange Staining Test, Sperm DNA Integrity, Idiopathic Oligozoospermia, Male Infertility

*通讯作者。

精子染色质扩散实验及吖啶橙染色检测精子DNA完整性研究

房振亚, 张美华, 李安娜, 邱毅*

国家卫生计生委生育调控技术重点实验室, 山东省妇幼保健院, 山东 济南
Email: qiuji987@sina.com

收稿日期: 2017年8月6日; 录用日期: 2017年8月20日; 发布日期: 2017年8月28日

摘要

目的: 采用精子染色质扩散(sperm chromatin dispersion, SCD)实验检测精子DNA碎片, 分析比较SCD实验及吖啶橙染色实验(AOT)检测精子DNA完整性的应用价值。**方法:** 对32例正常成年已生育的男性和27例特发性少精子症(idiopathic oligozoospermia, IO)患者同时进行SCD实验和AOT, 对检测结果进行分析。在SCD实验中, DNA完整性正常无损伤精子的DNA扩散产生大晕环或中晕环, 而DNA损伤产生DNA碎片的精子不产生或产生很小的晕环。AOT染色实验中, 正常精子DNA为双链, 染成绿色, 不成熟或损伤精子DNA为单链, 染成红色、橙色或黄色。**结果:** SCD实验检测结果为: IO患者精子大晕环、中晕环、小晕环和无晕环精子百分率分别平均为(51.8 ± 17.1)%、(9.4 ± 8.6)%、(11.9 ± 5.8)%和(26.7 ± 10.6)%, 健康对照组平均为(73.2 ± 6.2)%、(14.8 ± 5.7)%、(6.8 ± 2.9)%及(5.3 ± 2.2)%, 二组比较, 差异有统计学意义($t = 4.256, P < 0.01$; $t = 5.1849, P < 0.05$; $t = 3.6967, P < 0.01$; $t = 5.7971, P < 0.01$), DNA损伤精子百分率, IO患者为38.1% ± 9.5%, 正常生育男性为12.1% ± 5.2%, 二者比较有显著性差异($P < 0.01$)。AOT的检测结果为: IO患者的单链DNA精子比率和正常生育男性的比较, 无显著差异($P > 0.05$)。**结论:** 精子DNA完整性异常可导致男性不育。SCD实验是一种有效的精子DNA完整性检测方法。

关键词

精子染色质扩散(SCD)实验, 精子吖啶橙染色实验, 精子DNA完整性, 特发性少精子症, 男性不育

Copyright © 2017 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

精子DNA是精子遗传物质的载体,近年来的研究表明精子DNA的完整性能够影响精子的受精能力、受精卵的分裂以及胚胎的发育。精子DNA完整性对自然受孕、人工授精、胚胎、胎儿、婴儿甚至成人的发育至关重要。研究表明精子DNA完整性是优于常规精液分析的独立参数[1],与辅助生殖技术结局有相关性[2]。因此,对男性不育患者进行精子DNA完整性分析,有助于探讨或发现其不育的原因,为患者的预防和治疗提供咨询及诊断依据。

本研究对少精子症(idiopathic oligozoospermia, IO)患者同时应用精子染色质扩散(SCD)实验和吖啶橙染色实验(AOT)两种方法检测精子DNA完整性,探讨男性不育机理,并通过比较两种方法的检测结果,

分析这两种方法的应用价值。报告如下。

2. 对象与方法

2.1. 对象

选取山东省妇幼保健院 2014 年 1 月至 2016 年 2 月就诊的 IO 患者 27 例为不育组, 年龄(28~37)岁, 平均(28.5 ± 3.2)岁, 平均不育年限(5.3 ± 2.8)年。夫妇染色体检查均为正常核型。排除生殖器异常、内分泌异常及感染因素引起的不育。男性检查包括男性第二性征、阴茎、阴囊、精索、输精管、睾丸、附睾等。健康对照组选取 32 名近期生育过的正常成年男性, 年龄(28~38)岁, 平均(29.1 ± 2.7)岁, 男性检查均无发现异常。

2.2. 精液常规分析

按照 WHO《人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册》[3]和《世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册》[4]精液变量参考值的标准: 液化时间少于 60 min, 精液量大于 2 ml, 密度大于 $20 \times 10^6/\text{ml}$, 存活率 $\geq 60\%$, 前向运动精子 $\geq 50\%$, 精子正常形态率 $> 30\%$, 为正常精液指标参数。连续 3 次精液常规检查 $5 \times 10^6/\text{ml} \leq$ 精子密度 $< 20 \times 10^6/\text{ml}$ 为少精子症, 精子密度 $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ 为严重少精子症。

2.3. 精子 DNA 完整性检测

2.3.1. 仪器和试剂

1) 仪器: E-1000 荧光显微镜(日本 NIKON)。OLYMPUS CX31 普通光学显微镜(日本)。2) 主要试剂: 低熔点琼脂、标准琼脂、二硫苏糖醇(DTT)、联咪二苯吡啶(DAPI)、三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸二钠盐(Tris-Borate-EDTA, TBE)缓冲液、瑞氏-姬姆萨染液、吖啶橙等均购自美国 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯试剂。

2.3.2. SCD 实验,根据文献[5] [6]略加修改

1) 方法: 精液标本用磷酸盐缓冲液(pH6.8)调至 $10 \times 10^6/\text{ml}$, 取 0.3 ml 处理好的精液与 0.7ml 1%低熔点琼脂凝胶混匀, 37℃孵育; 吸取 50 μl 上述精子混合液滴在经过 0.65%正常熔点琼脂预处理过的载玻片上, 盖上 22 × 22 mm 盖玻片 4℃放置 5 min; 小心去除盖玻片, 室温(22℃左右)将标本载玻片浸入 0.08 mol/L 的盐酸(HCl)内变性 7 min; 然后浸入含 0.4 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)的精子裂解液内(pH 7.3) 20 min; 再移入 TBE 缓冲液中 3 min; 然后将标本载玻片依次放入 70%、90%和 100%的乙醇中脱水。所有操作过程均要求标本载玻片处于水平状态。风干后放入密封盒, 可存放数月。观察前染色。

2) 染色: 在标本上滴 50 μl 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DAPI 染色, 立即在荧光显微镜下观察。如用普通光学显微镜观察, 需进行瑞氏-姬姆萨染色。先用瑞氏染液将标本面充分覆盖; 稍等片刻再加姬姆萨染液 1~2 滴; 稍等 1~2 分钟后, 再缓慢加磷酸盐缓冲液, 直至染色液形成表面张力; 染色 10 分钟; 用蒸馏水缓缓冲洗至少 2 分钟, 风干, 立即观察结果(也可存放于密封盒内数周后观察)。

3) 结果判断: 计数 500 个精子, 观察精子晕环大小。根据环晕与精子头部横径的比例, 粗分为大、中、小和无晕环 4 个等级, 大和中晕环表示精子 DNA 完整无碎片, 小和无晕环表示精子 DNA 断裂为碎片。小晕环以 \leq 精子头直径四分之一为判断标准, 中晕环 $>$ 精子头直径四分之一而 \leq 精子头直径三分之二, 大晕环 $>$ 精子头直径三分之二。

2.3.3. AOT, 按参考文献[5]方法

1) 方法: 精液标本根据文献[2]配制的泰洛氏(Tyrode's)液洗涤 3 次, 精子沉淀稀释至 $50 \times 10^6/\text{ml}$;

涂片, 风干; 卡诺氏(Carnoy's)液(1份冰醋酸: 3份甲醇)固定 2 h, 风干; 用新配制的 0.19 mg/ml 的吖啶橙(pH 2.5)避光染片 5 min; 双蒸水冲洗染片, 盖上盖玻片立即观察。

2) 结果判断: 采用荧光显微镜计数 500 个精子(波长 450~490 nm), 观察精子着色情况, 绿色精子为未受损伤的双链 DNA 精子, 红色及黄色、橙色为受损伤的单链 DNA 精子。

2.4. 统计学分析

采用 SPSS(11.5 版)软件系统进行统计处理, 精液常规分析数据、SCD 实验及 AOT 检测数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)方式表达; 健康对照组和不育组比较经 t 检验。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 精液常规检查结果

精液常规分析如表 1 所示。IO 患者精子密度、活力、畸形率与健康对照组有显著性差异($P < 0.001$)。

3.2. 精子 DNA 完整性检测结果

3.2.1. SCD 实验结果

SCD 实验通过显示大、中、小晕环和没有晕环 4 个等级来分析含碎片 DNA 精子的百分率, 见图 1。IO 患者精子大晕环、中晕环、小晕环和无晕环精子百分率分别平均为(51.8 \pm 17.1)%、(9.4 \pm 8.6)%、(11.9 \pm 5.8)%和(26.7 \pm 10.6)%, 健康对照组平均为(73.2 \pm 6.2)%、(14.8 \pm 5.7)%、(6.8 \pm 2.9)%及(5.3 \pm 2.2)%, 二组比较, 差异有统计学意义($t = 4.256, P < 0.01$; $t = 5.1849, P < 0.05$; $t = 3.6967, P < 0.01$; $t = 5.7971, P < 0.01$)。IO 患者含 DNA 碎片精子(小晕环和无晕环精子)百分率为 26%~82%, 平均(38.1 \pm 9.5)%, 健康对照组 8%~18%, 平均(12.1 \pm 5.2)%, 二组比较, 差异有统计学意义($t = 9.2438, P < 0.01$), 见表 2、表 3。

3.2.2. AOT 结果

AOT 根据双链 DNA 精子染成绿色, 单链 DNA 精子染成红色或黄色的原理来分析含 DNA 碎片精子的百分率, 见图 2。健康对照组绿色荧光的精子平均为(60.1 \pm 16.6)%, 具有橙色、黄色或红色荧光的精子平均为(39.8 \pm 19.2)%, 不育组绿色荧光的精子平均为(54.7 \pm 12.2)%, 具有橙色、黄色或红色荧光的精子平均为(45.5 \pm 13.8)%, 两组比较, 差异均无统计学意义($t = 0.5617$ 和 $t = 0.6720, P > 0.05$), 见表 3。

3.2.3. SCD 实验与 AO 实验结果比较

SCD 实验中无晕环和小晕环的精子为 DNA 损伤精子, AO 实验中黄色、橙色及红色精子为单链 DNA 精子。健康对照组 SCD 实验的小晕环、无晕环精子占总精子数的百分率为(12.1 \pm 5.2)%, AO 实验的红、橙、黄色精子占总精子数的百分率为(39.8 \pm 19.2)%, 差异有统计学意义($t = 5.0443, P < 0.01$)。IO 患者 SCD 实验的小晕环、无晕环精子百分率为(38.1 \pm 9.5)%, AO 实验的红、橙、黄色精子的百分率为(45.5 \pm 13.8)%, 差异无统计学意义($t = 0.4312, P > 0.05$)。

Table 1. Comparison of semen routine analysis in infertility patients and healthy control group (s)

表 1. 不育患者及健康对照组精液常规分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	精子密度($\times 10^6$ /ml)	活率(%)	畸形率(%)	精液量(ml)
健康对照组	32	63.1 \pm 10.5	67.8 \pm 12.3	21.3 \pm 6.2	2.8 \pm 0.6
不育组	27	10.8 \pm 6.9 ^a	48.2 \pm 15.9	^a	41.2 \pm 15.3

注: a 与健康对照组比较, $P < 0.001$ 。

Table 2. Comparison of sperm of SCD, middle, small halo and no ring in infertility group and control group (s)**表 2.** 不育组与对照组 SCD 大、中、小晕环和无晕环精子比较 ($\bar{x} \pm s$)

	例数	大晕环(%)	中晕环(%)	小晕环(%)	无晕环(%)
健康对照组	32	73.2 ± 6.2	14.8 ± 5.7	6.8 ± 2.9	5.3 ± 2.2
不育组	27	51.8 ± 17.1 ^a	9.4 ± 8.6 ^b	11.9 ± 5.8 ^a	26.7 ± 10.6 ^a

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ 。

Table 3. Comparison (s) of SCD experiment and ao experimental results**表 3.** SCD 实验与 AO 实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

	SCD		AOT	
	例数	小、无光晕精子(%)	红、橙、黄色精子(%)	绿色精子
健康对照组	32	12.1 ± 5.2	39.8 ± 19.2 ^a	60.1 ± 16.6
不育组	27	38.1 ± 9.5	45.5 ± 13.8	54.7 ± 12.2

注: 与 SCD 比较, ^a $P < 0.01$ 。

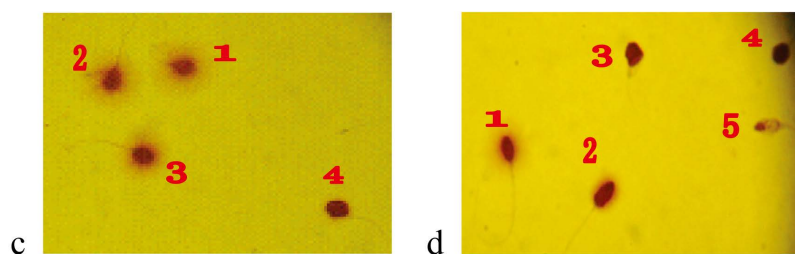


Figure 1. Light microscope sperm picture of SCD test. C for the healthy control group, 1, 2, 3 were large halo sperm, 4 was small halo sperm; d is a sterile group, 1 is a large halo sperm, 2 is a halo ring sperm, 3 and 4 are halo sperm, 5 is a halo-free ring sperm. (general optical microscope, ×1000)

图 1. SCD 试验普通光镜精子图片。c 为健康对照组, 1、2、3 号为大晕环精子, 4 号为小晕环精子; d 为不育组, 1 号为大晕环精子, 2 号为中晕环精子, 3、4 号无晕环精子, 5 号为无晕环退化精子。(普通光学显微镜, ×1000)

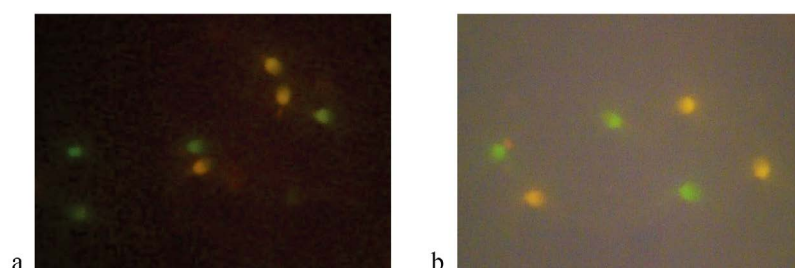


Figure 2. a is for the healthy control group, b is for the infertility group, the green arrow refers to normal double stranded DNA sperm (green), the red arrow refers to single strand DNA sperm (red, orange, yellow) (fluorescence microscope, ×1000)

图 2. AOT。a 为健康对照组, b 为不育组, 绿色箭头所指为正常双链 DNA 精子(绿色), 红色箭头所指为单链 DNA 精子(红色、橙色、黄色)(荧光显微镜, ×1000)

4. 讨论

人类精子成熟过程中, 其 DNA 极易受内外环境因素影响而形成 DNA 碎片, 从而引起精子形态和功能异常, 导致男性不育, 并带来遗传风险。尽管精子 DNA 完整性一直是生殖医学领域研究热点, 但过去

对精子 DNA 完整性的研究并不多,主要是存在方法学的不足。随着技术的发展和研究的深入,精子 DNA 完整性检测方法逐渐增多。然而这些方法大都需要流式细胞仪或荧光显微镜分析观察,或检测试剂昂贵或步骤繁琐,限制了这些方法的临床应用。SCD 实验是由 Fernández 等[5] 2003 年创立的一种精子 DNA 完整性检测方法,基本方法和原理是:将精子悬液与琼脂糖混合铺于载玻片上,酸处理后用裂解液裂解细胞去除核蛋白,用 DAPI 染色后在荧光显微镜观察精子。损伤断裂的 DNA 在酸处理后不能再产生特征性晕环。根据晕环的大小,可以判定精子 DNA 是否有碎片也就是确定其 DNA 的完整性,从而对男性生育力进行评估。然而由于荧光容易发生淬灭,晕环的大小在荧光显微镜下不容易区分,也不容易区分精子和其他精液细胞。2005 年 Fernández 等[6]改进了 SCD 检测方法,用瑞氏染液染色,可在光学显微镜下观察。精子头部晕环清晰易辨,并保留了精子尾部,得以区分精子和其他细胞。还能清晰地观察到荧光染色无法观察的退化的精子。使观察结果更加准确可靠。正常精子没有 DNA 碎片,具有大的晕环或中等晕环;而存在 DNA 碎片的精子没有晕环形成或有很小的晕环,或没有晕环且着色很淡,呈退化迹象。

本研究在改良的 SCD 实验[6]基础上,适当缩短了操作时间,使之更适于临床应用。并改瑞氏染液为瑞氏-姬姆萨染液进行染色,在普通光学显微镜下清晰观察到精子晕环,方法稳定、简单,重复性好,可直观定量显示精子 DNA 完整性水平,适于临床检测。

在实验方法建立过程中,我们发现影响精子 SCD 实验结果的因素为混合精子用的低熔点琼脂的浓度会影响精子粘附在载玻片上的牢固程度,从而影响实验效果。预处理载玻片时,正常熔点琼脂涂布不均匀可能使精子脱落,载玻片上出现无精子空白区域而检测不到精子。其次,合适、稳定的室内温度(20℃~32℃)也是 SCD 实验成功的关键。预实验结果表明,如果室温低于 18℃,则影响变性及裂解的效果,但 16℃左右对染色效果仍无影响。因此,严格遵守实验程序,保持室温相对稳定,对于 SCD 实验成功至关重要。

本研究采用 SCD 实验,观察了 IO 患者的精子 DNA 损伤情况,结果发现小晕环、无晕环精子百分率高于健康对照组[分别为(38.1 ± 9.5)%和(12.1 ± 5.2)%],说明 IO 患者的精子 DNA 损伤程度高于健康对照组。最近, Gallegos 等[7]对泌尿生殖系统感染的男性不育患者精子进行 SCD 检测,精子 DNA 碎片是正常生育男性的 3 倍(35.2%:10.8%),经过抗菌治疗后,精子 DNA 碎片下降到 13.6%和 11.2%。本研究结果与以上研究结果相符。提示 IO 患者精子 DNA 完整性异常,可能是精子质量下降的原因。

AOT 是一种常用的检测精子 DNA 单链或双链结构的方法[8] [9] [10]。其染色机理是:精子在附睾内成熟期间,精子头部 DNA 的硫醇类逐渐转为二硫化物,使 DNA 具有对抗酸所致变性的性能,从而保持了双链结构。而不成熟精子或受损伤的 DNA 在酸的作用下变性,成为单链。AO 荧光物质结合双链 DNA 呈单体形式,发绿色荧光,而与单链 DNA 结合时呈聚合物形式,发红色或黄色荧光。

本研究在进行 SCD 实验的同时还对同一份标本的精子涂片进行 AOT。结果发现,AOT 中,IO 患者和健康对照组的绿色精子百分率和红、橙、黄色精子百分率无统计学差异,健康对照组和 IO 患者均显示较高水平的 DNA 碎片。提示 AOT 用于精子 DNA 完整性检测的可靠性不高。Eggert-Kruse 等[11]也曾对 AOT 用于评价精子质量提出了质疑,在其研究中,AOT 与精液参数(如精子计数、动力、形态、活率、以及精子-宫颈粘液作用实验等)没有相关性。有人认为这可能与对颜色辨别的灵敏度、稳定性有关[12]。在本研究中,健康对照组的 AOT 与 SCD 实验结果不一致。AOT 结果明显高于 SCD 实验结果,差异有统计学意义。提示 AOT 如何用于评价精子 DNA 完整性以及是否适用还需进一步探讨。

相对于 AOT,本研究使用的 SCD 检测方法具有简单、快速、准确、廉价、分辨率高的特点,适用于临床应用。但仍需要进一步扩大样本,建立 SCD 实验检测标准和正常参考值,以便进一步扩大 SCD 实验的临床应用范围。

基金项目

山东省科技发展计划资助(基金号: 2015GSF118072)。

参考文献 (References)

- [1] Virro, M.R., Larson-Cook, K.L. and Evenson, D.P. (2004) Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) Parameters Are Related to Fertilization, Blastocyst Development, and Ongoing Pregnancy *In Vitro* Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles. *Fertility and Sterility*, **81**, 1289-1295. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.063>
- [2] Calogero, A.E., Condorelli, R.A., Russo, G.I. and Vignera, S. (2017) Conservative No Hormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *Biomed Research International*, **8**, Article ID: 4650182.
- [3] 世界卫生组织. 人类精液及精子宫颈粘液相互作用实验室检验手册[M]. 第4版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [4] 世界卫生组织. 男性不育标准化检查与诊疗手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [5] Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., et al. (2003) The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *International Journal of Andrology*, **24**, 59-66.
- [6] Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., et al. (2005) Simple Determination of Human Sperm DNA Fragmentation with an Improved Sperm Chromatin Dispersion Test. *Fertility and Sterility*, **84**, 833-842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>
- [7] Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., et al. (2007) Sperm DNA Fragmentation in Infertile Men with Genitourinary Infection by Chlamydia Trachomatis and Mycoplasma. *Fertility and Sterility*, **90**, 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.035>
- [8] Tejada, R.I., Mitchell, J.C., Norman, A., et al. (1984) A Test for the Practical Evaluation of Male Fertility by Acridine Orange (AO) Fluorescence. *Fertility and Sterility*, **42**, 87-91. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47963-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47963-X)
- [9] 李福平, 岳焕勋, 徐克惠, 等. 精子核成熟度与精液参数之间的关系[J]. 中华男科学杂志, 2007(13): 179-180.
- [10] 吴周亚, 王冲, 王信心. 生育与不育男性精子核 DNA 成熟度的比较研究[J]. 生殖医学杂志, 1999(3): 40-42.
- [11] Eggert-Kruse, W., Rohr, G., Kerbel, H., et al. (1996) The Acridine Orange Test: A Clinically Relevant Screening Method for Sperm Quality during Infertility Investigation? *Human Reproduction*, **11**, 784-789. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019255>
- [12] Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., et al. (2006) Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *International Journal of Andrology*, **27**, 53-59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>



期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: md@hanspub.org