

## 吸烟对不育症男性精液质量的影响

姚颖杰<sup>1)</sup>, 蔡金凤<sup>1)</sup>, 侯江厚<sup>2)</sup>, 陈云雁<sup>1)</sup>, 夏明<sup>1)</sup>, 杨海云<sup>3)</sup>, 肖彭莹<sup>1)</sup>, 王丽君<sup>4)</sup>  
(1)昆明市妇幼保健院生殖健康与不孕不育科; 2)临床转化中心; 3)基层指导科;  
4)妇科, 云南昆明, 650032)

**[摘要]** **目的** 探究吸烟对不育症男性精液质量的影响。**方法** 选取 360 例男性不育症患者, 根据患者是否吸烟进行分组: 吸烟组( $n=190$ )和未吸烟组( $n=170$ , N 组), 其中吸烟组按照吸烟量分为 A 组( $\leq 10$  支/d 组,  $n=63$ )、B 组(11~20 支/d 组,  $n=80$ )、C 组( $>20$  支/d 组,  $n=47$ )。观察并进行组间、组内比较各组患者精液量、液化时间、精子浓度、活动力、DNA 碎片率以及正常形态率。**结果** 吸烟组和未吸烟组精液量、液化时间、精子活动力、正常形态率以及 DNA 碎片率比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ), 吸烟组患者精液量、精子活动力以及正常形态率低于未吸烟组, DNA 碎片率、精液液化时间高于未吸烟组。且随着吸烟量增加, 精子活动力以及正常形态率下降, 精液液化时间、DNA 碎片率增加; 吸烟组和未吸烟组精子浓度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。吸烟量不同的 3 个组精液量比较差异无统计学差异( $P>0.05$ )。**结论** 吸烟对精液量、精子活性、正常形态率、精子活动力、液化时间及 DNA 碎片化等精子质量参数造成负面影响, 大量吸烟影响尤为明显。应该加强全面健康教育、提倡健康的生活方式、减少吸烟。

**[关键词]** 吸烟; 男性不育; 精子质量

**[中图分类号]** R698.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)01-0163-05

## The Effect of Smoking on the Semen Quality in Male Infertile

YAO Yingjie<sup>1)</sup>, CAI Jinfeng<sup>1)</sup>, HOU Jianghou<sup>2)</sup>, CHEN Yunyan<sup>1)</sup>, XIA Ming<sup>1)</sup>,  
YANG Haiyun<sup>3)</sup>, XIAO Pengying<sup>1)</sup>, WANG Lijun<sup>4)</sup>

(1) Dept. of Reproductive Health and Infertility; 2) Clinical Translational Center; 3) Grassroots Guidance Section; 4) Dept. of Gynecology, Kunming Maternal and Child Health Hospital, Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of smoking on the semen quality in infertile men. **Methods** A total of 360 male infertility patients were enrolled and divided into the smoking group( $n=190$ ) and non-smoking group( $n=170$ ) based on whether they smoked or not. Furthermore, the smoking group was subdivided into group A( $\leq 10$  sticks/d,  $n=63$ ), group B(11~20 sticks/d,  $n=80$ ), and group C( $>20$  sticks/d group,  $n=47$ ) according to the amount of smoking. Semen volume, liquefaction time, sperm concentration, motility, DNA fragmentation rate and normal morphological rate were observed and compared between and within the groups. **Results** There were significant differences in semen volume, liquefaction time, sperm motility, normal morphological rate and DNA fragmentation rate between the smoking group and the non-smoking group( $P<0.05$ ). The semen volume, sperm motility and normal morphological rate of the smoking group were lower than those in the non-smoking group, and the DNA fragmentation rate and semen liquefaction time were higher than those in the non-smoking group. And with the increase of smoking volume, sperm motility and normal morphological rate decreased, semen liquefaction time and DNA fragmentation rate increased, and there was no significant difference in the sperm concentration between

**[收稿日期]** 2023-09-30

**[基金项目]** 昆明市卫生科技人才培养基金资助项目(2021-百工程-28)

**[作者简介]** 姚颖杰(1983~), 女, 云南昆明人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事辅助生殖临床及研究工作。

**[通信作者]** 王丽君, E-mail: 2205978015@qq.com

the smoking group and non-smoking group ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in the semen volume between the three groups with different smoking amounts ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Smoking has a negative impact on the sperm quality parameters such as semen volume, sperm motility, normal morphological rate, sperm motility, liquefaction time and DNA fragmentation, and the effect of heavy smoking is particularly obvious. We should strengthen the comprehensive health education, promote the healthy lifestyles and reduce smoking.

[**Key words**] Smoking; Male infertility; Semen quality

全世界约有七分之一的夫妇患有生殖障碍, 其中有 30%~40% 的病例是由于男性导致不育症。全球约 36.9% 的男性吸烟。香烟中含有大约 600 种成分, 燃烧后就会产生 7000 多种化学物质。砷、苯、一氧化碳、尼古丁和重金属只是在香烟中发现的少数有毒成分<sup>[1-2]</sup>。

精液分析是男性不育症检查的基石, 对结果的解释对不孕症夫妇的整体治疗起着至关重要的作用。精液质量的常规分析主要从精子活力、数量、正常形态率等方面进行评估。有研究认为, 过高的 DNA 碎片指数 (DNA fragmentation index, DFI) 会降低精子、胚胎发育潜能, 导致男性生育能力下降<sup>[3]</sup>, 故 DFI 可作为评价男性生育力的 1 项指标<sup>[4]</sup>。尽管如此, 关于吸烟是否会影响精液质量的证据存在争议, 一些研究表明吸烟对精液质量有负面影响, 香烟的使用高度威胁生殖健康<sup>[5-7]</sup>, 男性吸烟与精子数量/活力减少之间存在关联, 而其他研究没有发现之间的任何关系<sup>[7-8]</sup>。因此, 本研究的目的是评估吸烟对不育症男性精液质量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集对象一般情况及采样方法

本采集选取对象主要为 2021 年 5 月至 2023 年 5 月到昆明市妇幼保健院就诊的男性不育病例 360 例。研究对象纳入标准: 年龄 26~35 岁, 不育年限 1~3 a, 吸烟史 6~10 a, 均无酗酒嗜好, 未服用化疗药等影响精液质量的药物。排除标准: 女性不孕、无精子症、肥胖、糖尿病、高血压、甲状腺功能异常、生殖系统发育异常、精索静脉曲张、性功能障碍、逆行射精等影响生育的疾病及门诊统计资料不全的患者<sup>[9]</sup>。嘱患者禁欲 2~7 d, 于生殖科取精室采用手淫取精法排入无菌取精杯中。本研究通过昆明市妇幼保健院伦理委员会审批 (20210420), 患者均签署知情同意书。

### 1.2 样本检测方法及指标

精液检查方法及参数按照 WHO 推荐的 2010

年第五版精液质量参考标准进行精液量、液化时间、浓度、正常精子形态率、前向运动精子活动率等指标检测<sup>[3-9]</sup>。将采集标本放到 37℃ 的保温箱内液化后取部分精液在固定条件下离心, 然后取上层精液进行检测。用西班牙 SCA 精子分析仪检测精子浓度 ( $\times 10^6$  个/mL)、前向运动精子百分率 (%) 等精液质量参数<sup>[8]</sup>。

精子 DFI 测定采用吡啶橙染色法进行。使用 A 试剂稀释精子浓度至  $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  个/mL, 之后在流式细胞仪小管中加入样本, 加入 A 试剂 50  $\mu$ L, 轻轻混匀后加入 B 试剂 100  $\mu$ L, 混匀 30 s, 随即加入 C 试剂 300  $\mu$ L, 轻轻混匀后上流式细胞仪进行检测。

### 1.3 统计学处理

统计分析软件为 SPSS 22.0, 计数资料用  $\chi^2$  检验, 计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用  $F$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料比较

吸烟组和不吸烟组原发性不育和继发性不育比例、年龄差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

### 2.2 各组精液质量参数比较

是否吸烟及不同吸烟程度对不育症男性精液质量各参数的影响, 通过对 360 份精液标本中, 进行  $F$  检验, 得出结论, 吸烟导致精液量、正常形态率、精子活动力下降, 液化时间及 DNA 碎片率增加, 对精子质量存在不了影响, 且虽吸烟量增加, 精子质量明显下降。详见表 2。

**2.2.1 精液量、精子浓度方面** 未吸烟组 (N 组) 精液量高于 3 个吸烟组 (A、B、C 组), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但每日吸烟量不同的 3 个组 (A、B、C 组) 精液量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 3。同时, N 组精子浓度与 A、B、C 3 个组两两比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 4。

**2.2.2 正常形态率、前向运动精子百分率方面** 未吸烟组 (N 组) 精子正常形态率、活动率均高于上

表 1 不同吸烟分组中的男性不育症、年龄分布情况 [n(%)]

Tab. 1 Distribution of male infertility, age in different smoking groups [n(%)]

男性不育症	N组	吸烟组		
		≤10支/d A组	11~20支/d B组	>20支/d C组
原发性(n=174)	79(21.94)	33(9.17)	37(10.28)	25(6.94)
继发性(n=186)	91(25.28)	30(8.34)	43(11.94)	22(6.11)
年龄(岁)				
26~30(n=169)	73(20.28)	36(10.00)	38(10.56)	22(6.11)
31~35(n=191)	97(26.94)	34(9.44)	36(10.00)	24(6.67)

表 2 不同抽烟程度患者精液质量参数及 DFI 对比( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 2 Comparison of semen quality parameters and DFI in patients with different smoking degrees( $\bar{x} \pm s$ )

检测项目	N组	A组	B组	C组	F
精液量(mL)	3.71±1.56	3.57±1.45	3.69±1.44	3.49±1.53	0.848
精液液化时间(min)	32.31±7.22	35.50±6.23	41.71±6.81	49.32±7.50	9.499
精子浓度(×10 <sup>6</sup> 个/mL)	50.76±39.57	47.60±36.37	49.76±37.53	48.60±36.98	0.814
正常形态精子率(%)	3.97±1.90	3.81±2.01	3.66±1.70	3.51±1.57	0.833
前向运动精子百分率(%)	41.14±14.35	37.75±15.89	33.37±14.20	28.61±16.03	35.458
DFI(%)	17.02±8.13	22.28±10.35	26.34±14.34	29.28±1.09	77.2885

表 3 不同抽烟程度患者精液量对比

Tab. 3 Comparison of semen volume in patients with different smoking degrees

分组	未吸烟组 (n=170)	≤10支/d组 (n=63)	11~20支/d组 (n=80)	>20支/d组 (n=47)
A组	0.037	—	0.061	0.054
B组	0.046	—	—	0.072
C组	0.029	—	—	—

表 4 不同抽烟程度患者精子浓度对比

Tab. 4 Comparison of semen density in patients with different smoking degrees

分组	未吸烟组 (n=170)	≤10支/d组 (n=63)	11~20支/d组 (n=80)	>20支/d组 (n=47)
A组	0.061	—	0.065	0.059
B组	0.071	—	—	0.064
C组	0.053	—	—	—

述 3 个吸烟组, 且随吸烟量增加呈下降趋势(N>A>B>C), 上述各项比较差异均有统计学意义(P<0.05), 见表 5, 表 6。

**2.2.3 DNA 碎片率、液化时间方面** 未吸烟组(N组)DNA 碎片指数、精液液化时间均低于上述 3 个吸烟组, 且随吸烟量增加呈下降趋势(N<A<B<C), 上述各项比较差异均有统计学意义(P<0.05), 见表 7, 表 8。

以上结果表明, 吸烟导致患者精子活力、正常形态率下降, DNA 碎片指数增加, 液化时间延

表 5 不同抽烟程度患者精子正常形态率对比

Tab. 5 Comparison of semen normal morphological rate in patients with different smoking degrees

分组	未吸烟组 (n=170)	≤10支/d组 (n=63)	11~20支/d组 (n=80)	>20支/d组 (n=47)
A组	0.023	—	0.037	0.016
B组	0.039	—	—	0.045
C组	0.029	—	—	—

表 6 不同抽烟程度患者前向运动精子百分率对比

Tab. 6 Comparison of sperm motility in patients with different smoking degrees

分组	未吸烟组 (n=170)	≤10支/d组 (n=63)	11~20支/d组 (n=80)	>20支/d组 (n=47)
A组	0.034	—	0.022	0.040

长, 且每日吸烟量越高的组, 精子活动力、正常形态率越低, DNA 碎片率越高、液化时间则越长。提示吸烟与精子密度、精子活动力、精液液化时间、精子 DNA 碎片率有一定的相关性。

### 3 讨论

笔者的研究表明, 吸烟对不育症男性的精液量、液化时间、精子活力及正常形态率、DNA 碎片指数存在负面影响, 而浓度参数似乎未受到影响, 未来的前瞻性研究有必要验证这些发现, 并研究与吸烟者精液质量差的相关机制。在

表 7 不同抽烟程度患者 DNA 碎片指数对比

Tab. 7 Comparison of DNA fragmentation index in patients with different groups

分组	未吸烟组 (n=170)	≤10支/d组 (n=63)	11~20支/d组 (n=80)	>20支/d组 (n=47)
A组	0.017	—	0.011	0.034
B组	0.026	—	—	0.043
C组	0.036	—	—	—

表 8 不同抽烟程度患者精液液化时间对比

Tab. 8 Comparison of semen liquefaction time in patients with different smoking degrees

分组	未吸烟组 (n=170)	≤10支/d组 (n=63)	11~20支/d组 (n=80)	>20支/d组 (n=47)
A组	0.028	—	0.033	0.016
B组	0.034	—	—	0.047
C组	0.025	—	—	—

研究者需增加样本量,排除男性不育症患者中吸烟者和不吸烟者的混杂因素,比如年龄、文化程度、职业、地区、民族、体重指数、经济状况、禁欲时间、喝茶、用药、放射性物质、农药等毒害物接触等,在数据比较不同时应要进行统计学处理。

本结果部分与 Sharma 等<sup>[10]</sup>的 Meta 分析一致,该组的研究提示吸烟对精液参数有总体上的负面影响。尽管在某些病例中没有发现精液质量参数低于正常水平<sup>[11]</sup>,但也有其他文章也报道了吸烟不育男性的精液质量的负面趋势<sup>[12]</sup>。朗格纳坦等在 1 项前瞻性队列研究中发现,吸烟对不育男性的所有精液参数,特别是对精子活力会产生负面影响及精子 DNA 碎片率的显著变化等。有研究提示 DFI 升高可使精子畸形指数(teratozoospermia index, TDI)升高,即畸形精子数量增多,从而降低受精能力及男性生育力。分析原因可能为 DFI 升高使精子完整性降低<sup>[13]</sup>,影响正常受精。且部分 DFI 升高者同时存在液化时间延长,可能是 DFI 增加促使精囊分泌凝固因子、纤维蛋白溶解酶等理化因子,延长精液液化时间,最终导致男性不育。

烟草烟雾可能影响精子的机制目前尚不清楚。香烟中发现的有毒物质可能对男性生殖细胞产生有害影响,有报道称吸烟对人类精子的 8 个 nAChR 亚基有负面影响,从而导致精液损伤<sup>[14]</sup>。尼古丁本身也可能发挥作用,暴露于口服尼古丁的大鼠精液参数显著下降,而这些参数在戒烟后消失<sup>[15]</sup>。尼古丁等多种有害物质可减少男性附睾血流量减少,生精细胞体积缩小、畸形和凋亡,

同时改变睾丸支持细胞、间质细胞的结构与功能,破坏精子发育环境,导致精子膜及顶体损伤,精子质量和受精功能下降<sup>[16]</sup>。此外,在精子中表达的不同蛋白(Aldoa、ATP5a1、GPx4、Cs)在吸烟者<sup>[17]</sup>中发生了显著改变。Kumosane 等<sup>[18]</sup>发现,吸烟会影响精子的  $Ca^{2+}$ -atP 酶活性和运动性。这些影响可能与吸烟者精液中镉含量的增加和锌含量的降低有关。

同时研究发现,烟草烟雾中含有的尼古丁、生物碱、多环芳香烃、苯并芘、镉等上千种有害物质,可抑制与生殖相关酶的功能,降低睾丸的睾酮合成能力以及精原细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP),MMP 则是精子活力的主要能量来源,从而促进生精细胞凋亡、精子生成减少、活动力下降<sup>[19]</sup>。吸烟或接触二手烟还可导致女性卵巢内卵泡数量减少、质量下降、发育不良<sup>[20]</sup>。

总之,男性吸烟对精液参数存在影响,二手烟同时影响女性生育功能。若女性同时存在卵巢储备功能减退、盆腔炎等影响生育的因素,男性吸烟对夫妇生育力的负面影响更加显著。生育力的评估是对夫妇双方生活习惯、病史、各项检查指标等多方面因素综合分析的结果,其保护则需要夫妇双方及医疗、教育等多部门共同努力。因此为了降低吸烟对全身及生殖健康的损害,保护人类的生育力,应该加强健康教育。2030 年 15 岁以上人群吸烟率降低到 20%,是《健康中国行动(2019—2030 年)》的目标之一<sup>[21]</sup>,降低成人吸烟率的关键、有效措施在于预防青少年吸烟,故应加强将控烟工作关口前移到青少年期,小学阶段即开始培养青少年远离烟草的健康生活方式,开展全民健康知识的大力宣传,让青少年拒绝吸烟及二手烟,成年男性少吸烟或者是戒烟。

### [参考文献]

- [1] Baker R R, Silva D P R J, Smith G. The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(S): 3-37.
- [2] Beth H, D N V, Carlos B, et al. Trends in prevalence of cigarette smoking among US adults with major depression or substance use disorders, 2006-2019[J]. JAMA, 2022, 327(16): 1566-1576.

- [3] 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等译. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 8-8.
- [4] Tom H, Randy D V, A N A, et al. Active tobacco smoking impairs cardiac systolic function[J]. *Scientific reports*, 2020, 10(1): 6608.
- [5] Walser Tonya, Cui Xiaoyan, Yanagawa Jane, et al. Smoking and lung cancer: The role of inflammation[J]. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5(8): 811-815.
- [6] Zhi Hong Zhang, Hai Bo Zhu, Lei Lei Li, et al. Decline of semen quality and increase of leukocytes with cigarette smoking in infertile men[J]. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2013, 11(7): 589-596.
- [7] R. A Condorelli, S La Vignera, F Giacone, et al. In vitro effects of nicotine on sperm motility and bio-functional flow cytometry sperm parameters[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2013, 26(3): 739-746.
- [8] Zegers-Hochschild Fernando, Adamson G David, Dyer Silke, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017[J]. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 2017, 32(9): 1786-1801.
- [9] 许鹏宇, 程立立, 陈超, 等. 影响河北地区男性精液质量因素的初步分析[J]. *中国性科学*, 2022, 31(07): 24-27.
- [10] Reecha Sharma, Avi Harlev, Ashok Agarwal, et al. Cigarette smoking and semen quality: A new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen[J]. *European Urology*, 2016, 70(4): 635-645.
- [11] Robert K ü nzle, Michael D Mueller, Willy Hänggi, et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples[J]. *Fertility and Sterility*, 2003, 79(2): 287-291.
- [12] Ranganathan Parameswari, Rao Kamini Aravind, Thalaivarasai Balasundaram Sridharan. Deterioration of semen quality and sperm-DNA integrity as influenced by cigarette smoking in fertile and infertile human male smokers-A prospective study[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(7): 11784-11793.
- [13] 朱元, 李欢欢, 艾丹, 等. 复发性流产与精子畸形率及DFI的相关性分析[J]. *江西医药*, 2021, 56(10): 1592-1594.
- [14] Rosita A. Condorelli, Sandro La Vignera, Ylenia Duca, et al. Nicotine receptors as a possible marker for smoking-related sperm damage[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2018, 25(5): 451-454.
- [15] Oyeyipo Ibukun Peter, Raji Yinusa, Emikpe Benjamin Obukowho, et al. Effects of nicotine on sperm characteristics and fertility profile in adult male rats: A possible role of cessation[J]. *Journal of Reproduction & Infertility*, 2011, 12(3): 201-207.
- [16] 刘安娜, 王厚照. 不良生活习惯对男性精液质量的影响分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2014, 22(6): 121-122.
- [17] Chen Xiaohui, Xu Wangjie, Miao Maohua, et al. Alteration of sperm protein profile induced by cigarette smoking[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2015, 47(7): 504-515.
- [18] T. A. Kumosani, M. F. Elshal, A. A. Al-Jonaid, et al. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and  $Ca^{2+}$ -ATPase activity among infertile and fertile men[J]. *Clinical Biochemistry*, 2008, 41(14-15): 1199-1203.
- [19] Li Y, Kalo D, Zeron Y, et al. Progressive motility—a potential-predictive parameter for semen fertilization capacity in ovines[J]. *Zygote*, 2016, 24(1): 70-82.
- [20] 丛艳飞, 丁晶晶, 王莉莉. 烟草烟雾暴露对女性卵巢功能的影响[J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(7): 777-780.
- [21] 健康中国行动推进委员会. 健康中国行动(2019—2030年)[EB/OL]. (2019-07-09)[2022-10-10]. [http://www.gov.cn/xinwen/2019-07/15/content\\_5409694.htm](http://www.gov.cn/xinwen/2019-07/15/content_5409694.htm).

- [18] Díaz-Sánchez M, Soto-Peñaloza D, Peñarrocha-Oltra D, et al. Influence of supracrestal tissue attachment thickness on radiographic bone level around dental implants: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Periodontol Res*, 2019, 54(6): 573–588.
- [19] Rodríguez X, Vela X, Segalà M, et al. Examen histológico humano de la respuesta de los tejidos al tallado vertical y provisionalización inmediata (BOPT) [J]. *Fundamento Biológico. Periodoncia Clínica*, 2019, 12(1): 47–58.
- [20] Testori T, Weinstein T, Scutellà F, et al. Implant placement in the esthetic area: Criteria for positioning single and multiple implants[J]. *Periodontology*, 2018, 77(1): 176–196.
- [21] Agustín-Panadero R, Solá-Ruiz M F, Chust C, et al. Fixed dental prostheses with vertical tooth preparations without finish lines: A report of two patients[J]. *J Prosthet Dent*, 2016, 115(5): 520–526.
- [22] Cocchetto R, Canullo L. The hybrid abutment: A new design for implant cemented restorations in the esthetic zones[J]. *Eur J Esthet Dent*, 2015, 10(2): 187–208.
- [23] Agustín-Panadero R, Bustamante-Hernández N, Lobaig-Rueda C, et al. Influence of biologically oriented preparation technique on peri-implant tissues; prospective randomized clinical trial with three-year follow-up. part II: Soft tissues[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12): 2223.
- [24] Cabanes-Gumbau G, Pascual-Moscardó A, Peñarrocha-Oltra D, et al. Volumetric variation of peri-implant soft tissues in convergent collar implants and crowns using the biologically oriented preparation technique (BOPT) [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2019, 24(5): e643–e651.
- [25] Canullo L, Hjerpe J, Menini M, et al. Zirconia crowns and FDPs with feather-edge margins on conical implant abutments-up-to-5-year clinical retrospective study[J]. *Int J Prosthodont*, 2022, 35(4): 380–386.
- [26] Agustín-Panadero R, Bustamante-Hernández N, Solá-Ruiz MF, et al. Influence of biologically oriented preparation technique on peri-implant tissues; prospective randomized clinical trial with three-year follow-up. part I: Hard tissues[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12): 2183.
- [27] Serra-Pastor B, Loi I, Fons-Font A, et al. Periodontal and prosthetic outcomes on teeth prepared with biologically oriented preparation technique: A 4-year follow-up prospective clinical study[J]. *J Prosthodont Res*, 2019, 63(4): 415–420.
- [28] Rinaldi T, Santamaría-Laorden A, Orejas Pérez J, et al. Periodontal healing with fixed restorations using the biologically oriented preparation technique combined with a full digital workflow: A clinical case report[J]. *Healthcare (Basel)*, 2023, 11(8): 1144.
- [29] Casula L, Gillone A, Musu D. Peri-implant tissue adaptation after implant rehabilitation with shoulderless abutments with 24 months of follow-up[J]. *Case Rep Dent*, 2021, 1(7): 6689446.