

· 论 著 ·

少弱精子症患者精浆中精子及睾丸组织端粒酶活性实验研究*

杜晓钟, 陕文生, 郑 雷
(甘肃省妇幼保健院检验科, 兰州 730050)

摘 要:目的 通过对少弱精子症患者精浆及睾丸端粒酶活性(TA)的检测,探讨少弱精子症患者精浆中精子与 TA 的相关性。**方法** 以端粒重复序列扩增法(TRAP)检测受试者精浆中精子和睾丸组织 TA。**结果** 少弱精子症患者精子 TA 表达与健康者比较差异无统计学意义($P>0.05$);少弱精子症患者睾丸组织中 TA 呈阳性。**结论** 睾丸组织的 TA 是反映精子形成的高敏感和高特异标记物;健康者和少弱精子症患者精浆 TA 降低,TA 的缺乏可能是生殖细胞发育停滞的原因之一。
关键词:弱精子症; 端粒酶活性; 端粒重复序列扩增; 实验研究
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.002 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)12-1277-02

Experimental study for telomerase activity in patients with oligoasthenozoospermia*

Du Xiaozhong, Shan Wensheng, Zheng Lei
(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health-Care Hospital of Gansu Province, Lanzhou Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between telomerase activity(TA)and the sperms in seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia by the detection of the TA of seminal plasma and testis samples. **Methods** Telomeric repeat amplification protocol(TRAP)was performed for the detection of the TA of seminal plasma and testis samples of all subjects. **Results** There was no statistical difference of the expression of TA in sperm samples between patients with oligoasthenozoospermia and healthy controls. Testis samples from patients with oligoasthenozoospermia were positive with TA. **Conclusion** TA in testicular tissues could be highly sensitive and specific marker for the formation of sperms. It was confirmed of the decrease of the level of TA in seminal plasma of healthy individuals and patients with oligoasthenozoospermia, which might be one of the reasons, causing the arrest of development of germ cells.
Key words: asthenozoospermia; telomerase activity; telomeric repeat amplification; experimental study

端粒酶是维持端粒长度的逆转录酶,也是 1 种核糖核酸蛋白酶^[1]。多数生物细胞 DNA 的端粒随着细胞分裂而缩短,当缩短到一定长度,即达到某个危机点时,细胞不再分裂而衰老、死亡^[2]。少数细胞可逃逸危机点,激活端粒酶,从而永生或恶变。大部分健康人体细胞中无端粒酶活性(telomerase activity, TA),而在干细胞、生殖细胞和 90% 的恶性肿瘤细胞中端粒酶却特异性表达^[3-6]。生理状态下,端粒酶在生殖细胞中具有一定的活性。笔者对少弱精子症患者精浆和睾丸组织进行了 TA 检测和分析,以期对少弱精子症诊治提供新的研究方向和理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2002 年 1 月至 2004 年 1 月于本院男科就诊,符合相关诊断标准的 23 例患者:少弱精子症组 7 例,阻塞性无精子症组 7 例,生精功能障碍组 7 例、唯支持细胞综合征组 2 例。以体检健康者作为对照组,对照组含正常精液标本 7 例及睾丸组织 2 例。

1.2 方法

1.2.1 端粒酶的提取 (1)睾丸组织:活检手术取 50~100 mg 睾丸组织,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后研碎;加入 1 mL 预冷洗涤缓冲液(含 1 mmol/L 二硫苏糖醇)后再加入预冷溶解缓冲液,涡旋振荡 10 s,置冰上 30 min,重复 3~5 次;15 000 g 离心 30 min 后吸取上清至新试管,以溶解缓冲液调整浓度至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。(2)精液:根据世界卫生组织的标准在禁欲 5 d 后采集精液标本,每位受试者至少进行 2 次精液分析。5 000 g 离心精

液标本 10 min 后收集约 10×10^6 个细胞,PBS 洗涤,后续操作同上。

1.2.2 PCR 扩增 采用端粒重复序列扩增法(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)进行 TA 检测。50 μL 反应体系包括 10 \times TRAP 缓冲液 5 μL 、dNTPs 1 μL 、Taq DNA 聚合酶 1 μL 、TS 引物 1 μL 、上述提取物 2 μL 、含二乙基焦磷酸胺去离子水 39 μL ,于 PCR 管内混匀离心;置聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪上 23 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min;再加入 1 μL CX 引物混匀,94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 取 1 μL PCR 产物加入等 9 倍体积的 10 \times 上样缓冲液,以 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(10 mL)电泳 40~50 min。

1.2.4 银染 凝胶于 10% 乙酸溶液固定 30 min,蒸馏水漂洗 3 次,每次 5 min;置 0.2 g/L 硫代硫酸钠浸泡 1 min,蒸馏水漂洗 3 次,每次 30 s;于硝酸银染液浸泡 30 min,蒸馏水漂洗 15 s;置显色液中显色 10 min,直至全部条带显色;置 10% 乙酸溶液浸泡 5 min 以终止反应。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行数据统计学分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结 果

PCR 扩增产物为片段相差 6 bp 的数个 TTAGGG 的 DNA 梯度(DNA ladder)片段即为 TA 阳性,其中包括 36 bp 的内参照片段;阴性结果仅显示内参照片段。结果见表 1。

* 基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(ZS031-A25-065-E)。

表 1 不同组别 TA 检测结果				
组别	精浆		睾丸组织	
	n	阳性[%(n/n)]	n	阳性[%(n/n)]
阻塞性无精子症组	7	14. 29(1/7)	7	71. 43(5/7)
生精功能障碍组	7	0. 00(0/7)	7	85. 71(6/7)
唯支持细胞综合征组	2	0. 00(0/2)	2	0. 00(0/2)* #
少弱精子症组	7	14. 29(1/7)	7	71. 43(5/7)
对照组	7	28. 57(2/7)	2	100. 00(2/2)

* : $P<0.05$,与对照组相同类型标本 TA 检测阳性率比较;# : $P<0.05$,与少弱精子症组相同类型标本 TA 检测阳性率比较。

3 讨 论

端粒酶长度及活性在生精细胞分化与增殖的各个阶段各不相同,从精原细胞到精子的成熟过程中,TA 不断下降,端粒酶长度不断增加,二者间呈负相关;在成熟精子细胞和精子中,TA 完全丧失。随着端粒酶检测技术的发展,深入研究端粒酶在男性生殖生理及病理学意义已成为可能,有助于探讨激素及其他药物治疗的端粒酶机制,也使端粒酶技术成为诊断及治疗男性生殖疾病的重要手段之一。本研究探讨了 TA 与少弱精子症的关系,以期在基因水平探寻少弱精子症的发病机制,为少弱精子症的临床诊治提供新的研究方向和理论依据。

本研究显示,阻塞性无精子症组和生精功能障碍组睾丸组织 TA 阳性率分别为 71. 43% 和 85. 71%,与国外研究报道结果基本一致^[7];唯支持细胞综合征组未检出 TA,国内外研究结果一致^[8-10]。无生精细胞的唯支持细胞综合征患者睾丸组织中未检出 TA,提示生精细胞可能是 TA 的主要来源,说明 TA 是反映精子发生的高敏感和高特异标志。少弱精子症组与其他各组精浆 TA 检出阳性率比较差异无统计学意义,且少弱精子症组阳性率仅为 14. 29%,证实精子中 TA 表达受抑,与 Yamamoto 等^[11]的研究结论一致。笔者认为,在精子发生过程中,TA 的表达水平呈下降趋势,在精子形成后,成熟精子中无 TA 表达;而少弱精子症患者的发病可能与 TA 的异常无关。少弱精子症组睾丸组织 TA 阳性率为 71. 43%,与无生精细胞的唯支持细胞综合征组比较差异有统计学意义。少弱精子症患者睾丸组织 TA 的高低受生殖细胞发育所停滞的阶段及各级生殖细胞的数量影响。在精子形成前阶段,少弱精子症的发病与端粒酶有关,TA 的缺乏可能是生殖细胞发育停滞的原因之一,但是不是其发病的决定性因素有待进一步探索。睾丸组织的 TA 是反映精子形成的高敏感和高特异标记物。随着精子细胞的分化,TA 减弱,但对于在精子形成的哪一期 TA 停止表达仍不清楚。在精子细胞分化过程中 TA 的调节作用仍不确定。

关于 TA 与少弱精症子症的关系仍有不明确之处,例如 TA 是否为少弱精子症发病的决定性因素? 精子的发生和成熟过程非常复杂,其影响因素和作用机制尚未完全明确,少弱精子症的发生可能是多因素综合影响的结果。从少弱精子症患者睾丸组织中纯化各级精原细胞以定量分析 TA,对了解 TA 对疾病的影响及作用机制具有重大价值。通过调节 TA 以干预精子的发生和成熟还有待更为深入的研究。

本研究表明,睾丸组织的 TA 是反映精子形成的高敏感和高特异标记物;健康者和少弱精子症患者精子的 TA 表达程度较低。

参考文献

[1] Kim N, Piatyszek M, Prowse K, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.

[2] Blackburn EH. Structure and function of telomeres[J]. Nature, 1991, 350(6319): 569-573.

[3] Wiener HG, Mian C, Haitel A, et al. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer[J]. J Urol, 1997, 159(6): 1876-1880.

[4] Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, et al. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele [J]. Fertil Steril, 1988, 50(5): 795-800.

[5] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787-791.

[6] Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(2): 116-122.

[7] Martín-Rivera L, Herrera E, Albar J, et al. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(18): 10471-10476.

[8] Schrader M, Müller M, Heicapel R, et al. Telomerase activity and expression of telomerase subunits in the testicular tissue of infertile patients[J]. Fertil Steril, 2000, 73(4): 706-711.

[9] Fujisawa M, Tanaka H, Tatsumi N, et al. Telomerase activity in the testis of infertile patients with selected causes[J]. Hum Reprod, 1998, 13(6): 1476-1479.

[10] 叶哲伟, 陈晓春, 范民, 等. 男性不育症患者睾丸组织中端粒酶 RNA 表达状况的研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2003, 32(1): 58-61.

[11] Yamamoto Y, Sofikitis N, Ono K, et al. Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity[J]. Urol Res, 1999, 27(5): 336-345.

(收稿日期: 2011-05-05)

(上接第 1276 页)

[5] 李鹏, 马艳娇, 夏伟, 等. 环介导等温扩增在病原诊断中应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 343-344.

[6] 卫生部结核病控制中心. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 7-14.

[7] 丛玉隆, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程(下册)[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 992-995.

[8] 刘小立, 冯铁建, 杨应周. 慢性病防治工作规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 243-245.

[9] 王莉莉, 张莹蓉, 胡忠义. 分枝杆菌快速变色培养基应用初探[J].

中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8): 460-461.

[10] 黄阿莉, 李卉. 快速检测结核分枝杆菌对异烟肼的耐药性的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 294-295.

[11] 管记涌, 王嫩寒, 易俊莉, 等. MTBDR plus 方法快速检测北京地区临床结核分枝杆菌分离株利福平和异烟肼耐药性效果评价[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(10): 611-614.

[12] 孙勤, 沙巍. 非结核分枝杆菌肺病与肺结核患者的临床特征对比分析[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(2): 120-122.

(收稿日期: 2011-05-04)