

• 临床检验研究论著 •

男性不育症患者精子 DNA 完整性与精液分析参数相关性研究*

龚道元¹, 李子萍¹, 庄锡伟², 郝兴霞³, 康梅¹, 黄勇汉⁴

(1. 佛山科学技术学院医学院, 广东佛山 528000; 2. 佛山市禅城区中心医院, 广东佛山 528000;

3. 内蒙古医学院基础医学院, 内蒙古呼和浩特 010059; 4. 佛山市第一人民医院, 广东佛山 528000)

摘要:目的 探讨男性不育症患者精子 DNA 完整性与精液参数间的相关性。方法 已有生育男性健康者 50 例(对照组); 男性不育症患者 100 例(不育组), 根据精子常规参数检测结果分为参数正常不育组及参数异常不育组。采用计算机辅助精液分析系统分析精液常规和运动参数, 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 末端标记法检测精子 DNA 碎片化指数(DFI)。结果 参数正常不育组和参数异常男性不育组精子 DFI 均高于对照组($P < 0.05$), 参数异常不育组精子 DFI 高于参数正常不育组($P < 0.05$); 不育组精子 DFI 与精子密度、正常形态率、活动率、存活率、a 级和 b 级精子活力及精子运动参数(直线速度、曲线速度、平均路径速度和侧摆幅度)呈不同程度负相关($P < 0.05$), 与 c 级和 d 级精子活力呈正相关($P < 0.05$), 与精子直线性、前向性、摆动性和鞭打频率无相关性($P > 0.05$)。结论 精子 DFI 是可用于评估精液质量和男性生育能力的理想指标。

关键词:不育; 男性; 精子; DNA; 精液分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)19-2321-02

Correlation between sperm DNA integrity and semen parameters in male infertility*

Gong Daoyuan¹, Li Ziping¹, Zhuang Xiwei², Hao Xingxia³, Kang Mei¹, Huang Yonghan⁴

(1. Medical College, Foshan University of Science and Technology, Foshan, Guangdong 528000, China;

2. Central Hospital of Foshan Chancheng District, Foshan, Guangdong 528000, China;

3. Basic Medical College, Inner Mongolia College, Hohhot, Inner Mongolia 010059, China;

4. the First People's Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To study the correlation between sperm DNA integrity and semen parameters of male infertility. Methods 50 healthy fertile male were enrolled as control group. 100 male with infertility were enrolled as infertility group, and were divided into parameter-normal and parameter-abnormal infertility group. Computer aided semen analysis was performed for the detection of routine and movement parameters, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated-dUTP nick end labeling assay was used for the detection of DNA fragmentation index(DFI). Results There was significant difference of DFI between control group, parameter-normal group and parameter-abnormal group($P < 0.05$). DFI in infertility group was negatively correlated with sperm density, sperm morphology, activity rate, survival rate, a and b class of sperm motility and sperm motion parameters of linear velocity, curvilinear velocity, average path velocity and sway amplitude with different extent($P < 0.05$), positively correlated with c and d class of sperm motility($P < 0.05$), and was not correlated with sperm line, forward, swinging and beat frequency($P > 0.05$). Conclusion Sperm DFI could be a better evaluation parameter of semen quality and male fertility.

Key words: infertility; male; sperm; DNA; semen analysis

精液常规参数和运动参数是评价男性生育能力的常用指标,然而这些参数不能全面评估精子质量。精子 DNA 损伤可影响精子受精能力、胚胎发育和着床,进而降低临床妊娠率、增高流产率,甚至影响子代身体健康^[1]。因此,精子 DNA 损伤被认为是评价精子质量和预测生育能力的更有效指标^[2]。本研究采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 末端标记法(TUNEL)检测精子 DNA 碎片化指数(DFI),分析其与精子常规参数和运动参数的相关性,探讨其在评估男性生育力中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 100 例于佛山市禅城区中心医院确诊的男性不育症患者,年龄 22~36 岁,平均 27.0 岁,无外伤及遗传性疾病病史,无功能障碍病史,未发现明显睾丸、附睾及输精管异常,女方生育能力无异常。50 例已有生育健康男性作为对照

组,年龄 24~38 岁,平均 27.5 岁。

1.2 仪器与试剂 WLJY-9000 型伟力彩色精子质量分析系统(南昌新长征),精子 DFI 检测试剂盒(上海杰美基因)。

1.3 方法 (1)标本采集:受试者禁欲 2~7 d 后以手淫法取精,置干燥无菌量杯内,37℃水浴孵育,记录液化时间。(2)精子参数指标分析:精子密度、存活率、活力及运动参数等指标测定采用彩色精子质量分析系统。各指标参考范围为:液化时间小于 60 min,精液量大于 2 mL,精子密度大于 20×10^6 /mL,存活率大于 60%,精子正常形态率大于 15%。精子活力分级标准:(a+b)级精子不少于 50%或 a 级精子不少于 25%者纳入活力正常组;(a+b)级精子少于 50%,但不低于 30%者纳入轻度弱精子症组;(a+b)级精子少于 30%,但不低于 10%者纳入中度弱精子症组;(a+b)级精子少于 10%者纳入重度弱精子症组。男性不育症患者中精子数量、精子形态、精子存活率和

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(9152902001000017)。

活动力等指标均异常者纳入参数异常不育组(79 例),余下患者纳入参数正常不育组(21 例)。(3)精子形态分析:以改良巴氏染色法进行标本染色,在彩色精子质量分析系统上采用人工修正法进行精子形态分析。(4)精子存活率测定:以伊红 Y 染色法进行标本染色,采用彩色精子质量分析系统计数 200 个精子,计算精子存活率。(5)DFI 测定:采用 TUNEL 法测定精子 DFI,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包分析数据;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关系数法,并采用显著性检验,相关系数为 0.10~0.39 时判为低度相关,0.4~0.70 时判为中度相关,超过 0.7 时判为高度相关^[3];显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

对照组、参数正常不育组、参数异常不育组精子 DFI 检测结果比较见表 1。不育症患者随着精子活力降低,DFI 逐渐升高递增趋势,不育症患者各精子活力组间 DFI 比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。不育症患者精子 DFI 与精子密度、精子正常形态率、精子活动率呈低度负相关($P<0.05$),与精子存活率、a 级和 b 级精子活力呈中度负相关($P<0.05$),与 c 级和 d 级精子活力分别呈低度和中度正相关($P<0.05$),见表 3。不育症患者精子 DFI 与直线速度(VSL)、曲线速度(VCL)、平均路径速度(VAP)、平均移动角度(MAD)和侧摆幅度(ALH)分别呈不同程度负相关,与直线性(LIN)、前向性(STR)、摆动性(WOB)和鞭打频率(BCF)无相关性,见表 4。

表 1 各研究组精子 DFI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DFI(%)
对照组	50	3.45±1.40
参数正常不育组	21	18.55±6.72*
参数异常不育组	79	30.93±5.71*▲

*:与对照组比较, $P<0.05$;▲:与参数正常不育组比较, $P<0.05$ 。

表 2 不育症患者各精子活力组 DFI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DFI(%)
精子活力正常组	35	6.45±1.30
轻度弱精子症组	27	19.55±4.62
中度弱精子症组	25	25.93±3.91
重度弱精子症组	13	32.00±3.91

表 3 不育症患者精子 DFI 与精液常规参数相关性

精液常规参数	相关系数	<i>P</i>
密度	-0.17	<0.05
正常形态率	-0.19	<0.05
活动率	-0.38	<0.05
存活率	-0.51	<0.05
a 级精子百分率	-0.45	<0.05
b 级精子百分率	-0.41	<0.05
c 级精子百分率	0.21	<0.05
d 级精子百分率	0.46	<0.05

表 4 不育症患者精子 DFI 与精子运动参数相关性

精子运动参数	相关系数	<i>P</i>
VSL	-0.35	<0.05
VCL	-0.29	<0.05
VAP	-0.32	<0.05
MAD	0.37	<0.05
ALH	-0.19	<0.05
LIN	-0.07	>0.05
STR	-0.08	>0.05
WOB	-0.11	>0.05
BCF	0.09	>0.05

3 讨 论

精子 DNA 损伤主要机制包括生精过程中的细胞凋亡异常、精子运输过程中氧自由基的影响及精子染色质包装异常等^[4-5]。精子 DNA 完整性检测方法主要有精子染色体结构分析试验(SCSA)、彗星试验、精子染色体扩散试验、TUNEL 和聚合酶链反应等。TUNEL 检测原理是采用末端转移酶将一段标记的核糖核酸连接到断裂的 DNA 片段的 3-羟基末端,可通过光镜、荧光显微镜观察,也可用流式细胞仪检测^[6-7],主要检测凋亡所致精子 dsDNA 损伤,对 DNA 断裂具有较高特异度和灵敏度。

本研究采用 TUNEL 技术对精子 DNA 完整性进行检测,结果显示不育患者精子 DFI 高于健康者($P<0.05$),说明不育患者精子细胞 DNA 损伤程度较健康者更为严重,这与 Irvine 等^[8]的报道一致,而参数异常不育症患者精子 DFI 高于参数正常不育症患者。因此,对于精液常规参数正常的特发性不育症患者,精子 DFI 检测可能有助于发现潜在的致病因素,为临床诊断提供帮助。

本研究结果显示,不同精子活力不育症患者精子 DFI 比较差异均有统计学意义($P<0.05$),且随着精子 DFI 增高,精子活力呈下降趋势。精子 DFI 与精子活动率、存活率、a 级及 b 级精子百分率呈负相关关系,而与 c 级和 d 级精子百分率呈正相关关系,与文献报道基本一致^[9],提示 DNA 损伤可能是导致弱精子症的重要原因之一。结果表 3 显示不育症患者精子 DFI 与精子正常形态率和密度呈低度负相关,与 Varghese 等^[10]的研究结果相同。精子染色质组装缺陷、氧化应激、凋亡异常均可导致精子 DNA 损伤,而这些损伤因素也会对精子密度、形态造成不良影响。精子 DFI 和精子密度及正常形态率呈负相关,说明少精子症及畸形精子症患者均有必要进行精子 DFI 检测,以评估精子 DNA 损伤程度。

精子运动活力主要与精子头部运动速度有关,精子运动方式则主要受鞭毛摆动方式的影响,形成直线或曲线运动。本研究结果显示,精子 DFI 与反映运动活力的参数(VSL、VCL、VAP 和 ALH)呈不同程度低度负相关,但与反映运动方式的参数(LIN、STR、WOB 和 BCF)无相关性,与文献报道基本一致^[11],说明精子染色质损伤可直接影响精子运动活力,导致精子 VCL、VSL、VAP 降低,精子头沿曲线轨迹瞬间转折角度的时间增长,但不影响精子运动方式。

综上所述,精子 DFI 可反映精子密度、形态、活力、活动率及运动方式,部分不育症患者即使精液常规参数正常,DFI 也显著升高,说明精子 DNA 完整性是可用于评估精液质量和男性生育能力的理想指标。(下转第 2324 页)

植的促进都均通过 IGF 介导,增加细胞外基质粘连、刺激滋养层细胞浸润及迁移,促进胚胎早期种植,在此过程中 IGF- I 大量消耗,但局部浓度可能增高^[4],从而保证胚胎正常发育;(3) 样本量的影响;(4) 采样时间的影响;(5) 孕早期尿排出增加,血清中浓度降低。孕 6 周妇女血清 IGF- I 含量明显高于试验组 A、B($P<0.05$)。胚胎发育至 13~21 d 时,胎盘主要结构绒毛进入发育旺盛期,除肝脏外,胎盘也成为合成 IGF- I 的主要来源。孕妇血清 IGF- I 水平降低将导致滋养细胞浸润能力下降,胎盘缺血缺氧,从而导致胎盘代谢和营养转运功能降低。随着孕期增加,母血 IGF- I 持续增加,提示胚胎发育、胎儿生长正常^[5-6]。

外周血中 75% 的 IGF- I 和 IGFBP-3 及酸不稳定亚单位 (ALS) 形成复合物,该复合物由于体积较大只能留在血管内,作为 IGF- I 循环库^[7]。IGF- I 大部分细胞效应通过 IGF- I 受体 (IGF- I R) 实现,其与 IGF- I R 的相互作用受 IGFBP 的调节,其中 IGFBP-1、3 起主要作用,且与妊娠关系密切。有研究显示 IGFBP-3 不直接影响滋养细胞浸润,但通过调节 IGF- I 对滋养细胞增殖和迁移的促进功能,对其产生间接影响^[8]。也有研究显示 IGFBP-3 不仅通过影响 IGF 生物学活性而影响胎儿及胎盘生长发育,而且其自身也有促细胞分裂作用,可直接参与胎盘形成和胎儿生长^[9]。试验结果显示,与试验组 A 相比,试验组 B IGFBP-3 含量明显降低。IGFBP-3 降低,与游离 IGF- I 结合机会降低,导致游离 IGF- I 增多,使 IGF- I 迅速与 IGF- I R 结合,发挥其促进有丝分裂及细胞生长、抑制调亡的生物活性。孕 6 周妇女血清 IGFBP-3 含量明显升高,与试验组 A 无差异,但与试验组 B 差异显著,显示胎盘 IGFBP-3 表达明显增强,提示胎盘也可合成 IGFBP-3,说明孕妇血清 IGFBP-3 增高可提示胚胎发育正常^[10]。

血清 IGF- I 与 IGFBP-3 呈高度正相关。这种相关性保证了 IGFBP-3 调节游离 IGF- I 的作用。如 IGFBP-3 病理性增高,可导致游离 IGF- I 减少,可能引起胎儿发育迟缓。

由此可见,孕妇血清 IGF- I、IGFBP-3 含量变化和妊娠周期有关,与胚胎发育、胎儿生长密切相关。动态检测母血 IGF- I、IGFBP-3 水平可预测胚胎发育、胎儿生长状况。

参考文献

- [1] Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins; biological actions[J]. *Endocr Rev*, 1995, 16(1): 3-34.
- [2] Giudice LC, Irwin JC. Roles of the insulin-like growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual; trophoblast interface[J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1999, 17(1): 13-21.
- [3] Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Standen P, et al. Early pregnancy maternal endocrine insulin-like growth factor I programs the placenta for increased functional capacity throughout gestation[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(9): 4362-4370.
- [4] 黄燕明, 章汉旺. 胰岛素样生长因子 1 对早孕滋养细胞增殖的作用及机制研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(1): 100-101.
- [5] Hill FA, English J, Chard T. Circulating levels of IGF-1 and IGF-binding protein-1 throughout pregnancy: relation to birth weight and maternal weight[J]. *J Endocrinol*, 1996, 148(2): 303-309.
- [6] Wiznitzer A, Reece EA, Homko C, et al. Insulin-like growth factors, their binding proteins, and fetal macrosomia in offspring of non diabetic pregnant women[J]. *Am J Perinatol*, 1998, 15(1): 23-28.
- [7] Duan C, Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1): 44-52.
- [8] Peterson AJ, Ledgard AM, Hodgkinson SC. The proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins in ovine uterine luminal fluid[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10(4): 309-314.
- [9] Reynolds TS, Stevenson KR, Wathes DC. Pregnancy specific alterations in expression of the insulin-like growth factor system during early placental development in the ewe[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(3): 886-896.
- [10] 靳松, 李尚为, 李蕾. 胰岛素样生长因子结合蛋白 1-3 在人早孕期蜕膜和绒毛中的表达及其作用[J]. *生殖医学杂志*, 2006, 15(1): 26-29.

(收稿日期: 2012-05-28)

(上接第 2322 页)

参考文献

- [1] Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility[J]. *Theriogenol*, 2006, 65(5): 979-991.
- [2] Cooper TG. WHO laboratory manual for examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Switzerland: WHO Press, 2010: 157.
- [3] 贺士林, 陈修. 医学科研方法导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 292-293.
- [4] Mahfouz R, Sharma R, Thiagarajan A, et al. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(6): 2141-2146.
- [5] 曾兰, 李运星, 叶飞. 精子 DNA 损伤在生殖医学中的研究[J]. *中国计划生育杂志*, 2010, 19(1): 60-62.
- [6] 宋学茹, 江珊, 白晓红, 等. 精子 DNA 完整性检测的临床应用[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2011, 30(1): 61-64.

- [7] Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(4): 986-993.
- [8] Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality[J]. *Androl*, 2000, 21(1): 33-44.
- [9] Zhang Y, Wang H, Wang LR, et al. The clinical significance of sperm DNA damage detection combined with routine semen testing in assisted reproduction[J]. *Mol Med Report*, 2008, 1(5): 617-624.
- [10] Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics[J]. *Andrologia*, 2009, 41(4): 207-215.
- [11] 黄学锋, 金建远, 费前进, 等. 精子 DNA 损伤: 独立的精子质量评价指标[J]. *温州医学院学报*, 2010, 40(3): 239-241.

(收稿日期: 2012-06-18)