

• 临床检验研究论著 •

不孕相关抗体检测女性不孕症的实验研究

邓世英, 石 姜, 聂 红

(重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

摘 要:目的 探讨 6 种自身免疫抗体与女性不孕症间是否存在相关性。方法 采用蛋白微阵列技术联合检测 140 例不孕症患者血清中抗精子抗体(ASAb)、抗子宫内膜抗体(AEmAb)、抗卵巢抗体(AVoAb)、抗透明带抗体(AZpAb)、抗滋养层抗体(ATAb)和抗人绒毛膜促性腺激素抗体(AhCG Ab), 并评价这 6 种抗体与女性不孕症的相关性。结果 与对照组相比, 不孕组中除 AVoAb 外, 其他 5 种抗体检测的阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。不孕组中, 6 种抗体联合检测的阳性率与单独检测比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。原发不孕组和继发不孕组中 6 种自身抗体的阳性率与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 不同病因引起的继发不孕中 6 种自身抗体的检测阳性率间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。不孕组中 ANA 的阳性率与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但实验者 ANA 抗体滴度多大于或等于 1:100(6/7), 核型多为核颗粒型(5/7), 与对照组中阳性滴度较低不同。不孕相关性抗体阳性患者和抗体阴性患者中 ANA 阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ASAb、AZpAb、AEmAb、AhCGAb 和 ATAb 与女性不孕症存在相关性, 6 种自身免疫抗体的联合检测可明显提高实验的灵敏度。

关键词:不孕症; 自身免疫抗体; 蛋白微阵列技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)15-2037-03

Experimental study on infertility related antibody detection in female infertility

Deng Shiying, Shi Jiang, Nie Hong

(Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To study whether the correlation exists between 6 kinds of autoimmune antibodies and female infertility. **Methods** The protein microarray technique was adopted to detect serum antibodies of anti-sperm antibodies(ASAb), anti-endometrial(AEmAb), anti-zona pellucida(AZpAb), anti-ovarian(AVoAb), anti-hCG(AhCG Ab) and anti-trophoblastic(ATAb) in 140 cases of female infertility and the correlation between these 6 kinds of antibody with female infertility was evaluated. **Results** Compared with the control group, except AvoAb, the positive rates of other 5 kinds of antibody had statistically significant differences ($P < 0.05$). In the infertility group, the positive rate of the combined detection of these 6 kinds of autoimmune antibody had statistical difference compared with that of single item detection($P < 0.05$). The positive rate of these 6 kinds of autoimmune antibody in the primary infertility group and the secondary infertility group had statistical difference compared with the control group; the positive rate of these 6 kinds of autoimmune antibody in the secondary infertility caused by different etiologies had no statistical difference ($P > 0.05$). The positive rate of ANA had no statistical difference between the infertility group and the control group ($P > 0.05$), but the titers of ANA in the experimenter were $\geq 1:100(6/7)$ and most of karyotypes were nuclear coarse(5/7), which was differed from the low positive titer in the control group. The positive rate of ANA had statistical difference between the infertility related antibody positive and the infertility related antibody negative in the infertility patients. **Conclusion** ASAb, AZpAb AEmAb, AhCGAb and ATAb are related with female sterility. The combined detection of these 6 kinds of antibody can significantly increase the detection sensitivity.

Key words: infertility; autoimmune antibodies; protein microarray technology

不孕不育一直是困扰夫妻双方身心健康的世界性问题。世界卫生组织(WHO)调查资料显示,全世界约有 10%~15% 已婚夫妇患有不孕不育症,其中女性因素占 25%~37%。国内目前定义不孕症为婚后两年,同居、有正常性生活,未采取任何避孕措施而不能生育^[1]。导致女性不孕的原因很多,如卵巢、内分泌紊乱等引起的排卵障碍;子宫结构和功能异常;输卵管、腹腔等病理原因;免疫性因素;原因不明等。本研究采用蛋白微阵列检测技术,联合检测不孕症患者血清中的 6 种不孕不育相关自身免疫抗体,包括抗精子抗体(ASAb)、抗子宫内膜抗体(AEmAb)、抗卵巢抗体(AVoAb)、抗透明带抗体(AZpAb)、抗滋养层抗体(ATAb)和抗人绒毛膜促性腺激素抗体(AhCG Ab),并分析其与女性不孕症的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 确诊不孕症的女性 140 例(不孕组),20~35 岁,按病史分为原发不孕组 14 例和继发不孕组 126 例。继发不孕组中包括多囊卵巢综合征、高泌乳素血症、卵巢功能障碍、月经不调和习惯性流产患者。选择无自然流产史、正常体检孕妇 25 例作为对照组,年龄 20~35 岁。不孕相关抗体阳性组和阴性组的年龄及其他疾病患病率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 标本采集 肘静脉采集凝固血 2 mL,常温下分离血清(3 000 r/min,5 min),-20 ℃冰箱保存备用。

1.3 仪器与试剂 不孕不育微阵列芯片(微孔渗滤法)和 LE-01-B 型生物微矩阵(芯片)分析仪均为西安联尔科技有限公司

产品。抗核抗体 IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)购自欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司。荧光显微镜为 leica 公司产品。

1.4 操作步骤 蛋白微阵列芯片联合检测 6 种自身免疫抗体严格按试剂说明书操作,待充分反应后,在 15 min 内将芯片放入分析仪中扫描,判读方式见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。核抗体的检测操作严格按抗核抗体 IgG 检测试剂盒说明书进行,在荧光显微镜下观察结果,主要核型模式见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。阳性率比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 6 种自身抗体在不孕组与对照组中的阳性率比较 ASAb、AZpAb、AEmAb、AhCGAb 和 ATAb 阳性率与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。AVoAb 阳性率与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 单一自身抗体的阳性率与 6 种抗体联合检测的阳性率比较 在 140 例不孕患者中,ASAb 阳性为[18(12.9%)];AEmAb 阳性为[6(4.3%)];AVoAb 阳性为[0(0%)];ATAb 阳性为[18(12.9%)];AZpAb 阳性为[2(1.4%)];AhCGAb 阳性为[10(7.1%)];6 种自身抗体联合检测阳性为[38(27.1%)]. 单个抗体的阳性率与 6 种抗体联合检测的阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 各组中自身抗体阳性率比较 原发不孕组、继发不孕组自身抗体阳性率与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。原发不孕组抗体阳性率与继发不孕组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组中不孕相关性自身抗体的检出情况

组别	病例数(n)	自身抗体阳性数(n)	自身抗体阳性率(%)
原发不孕组	14	2	14.3*
继发不孕组	126*	36	28.6*
对照组	25	1	4.0

* : $P<0.05$,与对照组比较。

2.4 自身抗体阳性的继发不孕患者中病因构成比 在不同病因引起的继发不孕中,6 种自身抗体的阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.5 抗核抗体(ANA)不孕组与对照组阳性率比较 见表 2,与对照组相比,不孕组中 ANA 的阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),但抗体滴度多大于或等于 1 : 100(12/14),核型多为核粗颗粒(10/14)。ANA 阳性率在不孕相关性抗体阳性患者和抗体阴性患者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 ANA 在不孕组与对照组中的阳性率比较

组别	病例数(n)	自身抗体阳性数(n)	自身抗体阳性率(%)
不孕相关抗体阳性组	38	8	21.1*
不孕相关抗体阴性组	102	1	5.9
不孕组	140	14	10.0
对照组	25	1	4.0

* : $P<0.05$,与不孕相关抗体阴性组比较。

3 讨 论

ASAb、AEmAb、AVoAb、ATAb、AZpAb 和 AhCGAb 是目前国际上公认与不孕不育相关的自身免疫抗体,某些刺激因素能激活机体免疫应答,产生抗自身成分的抗体,通过免疫介导的方式破坏正常组织、器官的生理功能^[2]。Philip 等^[3]曾通过对 13 个国家免疫性不孕不育患者 14 年的追踪调查研究证实,不孕患者血清中存在高水平的 ASAb。而 Narayanan 等^[4]也曾报道,与 AVoAb 阴性患者相比,AVoAb 阳性患者存在明显的低受孕率。可见,自身免疫抗体与女性不孕存在密切关联。

ASAb 作为不孕不育患者体内常见的自身抗体,通过影响精子获能等一系列精子受精过程,影响正常生育^[5]。AEmAb 以子宫内膜为靶细胞,引起子宫内膜免疫病理损伤,导致子宫内膜发育不良、分泌功能障碍、内膜和基底膜细胞结构改变等,从而影响孕卵着床,出现不孕或流产。AEmAb 往往与子宫内膜异位症并存,是子宫内膜异位症的标志性抗体^[6]。AZpAb 通过与透明带结合,干扰精子和卵泡间的信号交流,增加了母体对胎儿-胎盘的免疫损伤作用,加速了对胚胎的免疫排斥反应。加之 AZpAb 对含透明带的孕卵产生直接损伤作用,使得孕卵即使着床也因前期损伤而不能正常发育,最终导致不孕^[7]。AhCGAb 与 hCG 结合后,使 hCG 活性和浓度均降低,不能有效支配合子着床和维持妊娠。由于 AhCGAb 长期存在体内,故易导致习惯性流产^[8]。卵巢组织成分复杂,每一种成分都可能因感染、手术等原因异常表达,产生 AVoAb,影响卵巢的正常功能,引起较强的抗生育作用。滋养层在整个孕期为胎儿提供特殊的植入保护。当体内 ATAb 水平增加后,存在于血液及生殖道内的抗体活化巨噬细胞,对配子及胚胎产生毒性作用,造成胎盘组织和功能的改变,导致流产^[9]。

本次研究发现,ASAb、AZpAb、AEmAb、AhCGAb 和 ATAb 的检测阳性率与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),可认为这 5 种抗体与不孕症间存在相关性。在不孕组中,单一抗体的阳性检出率与 6 种抗体联合检测的阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),显示多种抗体的联合检测可提高试验的灵敏度。本实验应用蛋白微阵列技术联合检测替代了传统的酶联免疫法(ELISA)蛋白检测手段。蛋白微阵列技术,又称蛋白芯片技术,它是一种在固相支持物表面按照预先设计的方法固定大量探针蛋白,形成高密度排列的蛋白阵点,可用于免疫检测、疾病诊断等多个方面。与传统的蛋白定量技术 ELISA 比较,蛋白微阵列具有高通量、使用样品少、重复性好、可定量检测等特点^[10-11]。故建议临床采用联合检测多个不孕相关性抗体的方法辅助诊断不孕症,以降低对该病的漏检率和误诊率。对于 AVoAb 与女性不孕是否存在相关性,国际上也存在争议^[12]。由于刺激产生 AVoAb 的抗原成分复杂,例如颗粒细胞、卵母细胞等成分,机体内可存在多种类型的 AVoAb。目前并未完全掌握该类抗体组成,故诊断中有可能漏检,同时因本次实验标本量有限,故无法明确判断 AVoAb 对不孕症是否具有特异性。

原发不孕组、继发不孕组自身抗体阳性率与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而原发不孕组自身抗体阳性率与继发不孕组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),与张建平等^[13]的研究结果一致,说明不论是原发不孕者还是继发不孕者体内都可能存在某种损伤或者自身成分异常表达,并引起较强的免疫应答,刺激机体产生相应的自身抗体。Akhter 等^[14]曾报道,双侧输卵管堵塞、盆腔炎症性疾病(PID)等易导致继

发性不孕,而原发性不孕患者体内自身抗体的产生机制目前还尚未完全明确。

如图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)所示,比较不同病因引起的继发性不孕患者自身抗体阳性率,差异无统计学意义($P>0.05$),表明不孕相关抗体的表达与患者的基础病因无直接相关性。

ANA 广义上是针对细胞内所有抗原成分的自身抗体的总称,与前述抗体比较,无器官特异性和种属特异性^[15]。本研究发现,虽然不孕组中 ANA 的阳性率与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),但抗体滴度多大于或等于 1:100,而且不孕相关性抗体阳性患者的 ANA 阳性率与抗体阴性患者比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明患者体内自身抗体的产生可能与器官特异性抗体的异常表达,激活体内免疫应答,诱导 ANA 基础水平升高有关。同时,Reimand 等^[16]的研究也证实多囊卵巢综合症等引起的继发性不孕患者,ANA 水平升高,有发展为自身免疫疾病的倾向,应该引起临床医生的重视。

总之,女性不孕症与自身免疫抗体存在密切关系。应用蛋白微阵列技术同步联合检测多种不孕不育自身抗体,可以提高诊断方法的特异性和灵敏度,更适用于临床的辅助诊断。研究者需加强认识自身免疫抗体对女性不孕的影响,不孕原因不明确时,应考虑到免疫性因素的影响。

参考文献

- [1] 曹泽毅.中华妇产科学:下册[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2004:2590-2591.
- [2] 王铮,仇东辉.不孕不育妇女自身免疫抗体的研究[J].中国优生与遗传杂志,2008,16(1):10-11.
- [3] Damario MA. General aspects of fertility and infertility[J]. Methods Mol Biol,2014,1154(1):3-23.
- [4] Narayanan M, Murthy PS, Munaf SA, et al. Potential health hazards of assisted human reproduction. Possible immunological com-

- plications[J]. Hum Reprod,1996,11(4):701-702.
- [5] Feng HL, Han YB, Sparks AE, et al. Characterization of human sperm antigens reacting with anti-sperm antibodies from an infertile female patient's serum[J]. J Androl,2008,29(4):440-448.
- [6] Mathur S, Garza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin(Ig)G, IgA, and IgM responses in endometriosis[J]. Fertil Steril,1990,54(1):56-63.
- [7] Koyama K, Hasegawa A, Mochida N, et al. Follicular dysfunction induced by autoimmunity to zona pellucid[J]. Reprod Biol,2005,5(3):269-278.
- [8] Amato F, Warnes GM, Kirby CA, et al. Infertility caused by HCG autoantibody[J]. J Clin Endocrinol Metab,2002,87(3):993-997.
- [9] 陈桂冰,黄绍坤.免疫不孕患者自身抗体检测结果分析[J].职业与健康 2008,24(1):1725-1726.
- [10] 钟春英,彭蓉.蛋白芯片技术[J].生物技术通报,2004,20(2):34-37.
- [11] 李泽松,张文,曹恒杰.蛋白微阵列研究进展[J].生物技术通报,2003,14(1):333-335.
- [12] Monnier-Barbarino P, Forges T, Faure GC, et al. Gonadal antibodies interfering with female reproduction[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab,2005,19(1):135-148.
- [13] 张建平,余裕炉.不孕不育妇女四项自身免疫抗体的研究[J].中国优生与遗传杂志,2003,11(5):135-153.
- [14] Akhter S, Alam H, Khanam NN, et al. Charaacteristics of infertile couples[J]. Mymensingh Med J,2011,20(1):121-127.
- [15] 毕胜利.临床检验免疫学[M].2 版.北京:高等教育出版社,2008:66-67.
- [16] Reimand K, Talja I, Metsküla K, et al. Autoantibody studies of female patients with reproductive failure[J]. J Reprod Immunol,2001,51(2):167-176.

(收稿日期:2014-02-10)

(上接第 2036 页)

HbsAg 诊断人体 HBV 感染的指标已成常规,但因测定技术不够灵敏度等原因导致呈现低水平或不能检出而至灵敏度不理想。呈现低水平可能原因包括以下方面^[4]:(1)HBV S 基因的变异导致 HBsAg 结构和抗原性发生变化,从而引起抗原抗体结合异常,反应信号下降,而出现假阴性或者弱阳性,而实际上体内 HBsAg 仍处于高水平表达。(2)因个体的免疫应答水平低下、抗病毒治疗等原因,使得 S 基因表达低下,而出现实际的低水平。由此可见 ELISA 定性 HBsAg 出现现低水平或不能检出是不可避免的。另外,当机体被 HBV 感染后产生的 HBcAb 不是保护性抗体,可伴随乙肝病毒存在且 HBcAb 可以不随乙肝病毒感染的康复而消失,HBcAb 的阳性率达 20%,Chevirier 等^[5]研究发现 HBcAb 滴度与 HBV 隐匿性感染有一定的相关性,不仅可以作为既往 HBV 感染的标志,也可以提示隐匿性 HBV 感染的可能。说明 HBcAb 阳性可以佐证 HBV 感染的指标。显然在理论上 ELISA 定性 HBsAg 结果联合 HBcAb 可以增加对 HBV 感染的诊断性能是可能的,这与本研究结果一致。

我国仍是 HBV 高流行区域,隐匿性 HBV 感染多见。为减少因 ELISA 灵敏度不高而导致的隐匿性 HBV 感染,根据研究成果,试制定如下程序:(1)严格规范 ELISA 定性 HBsAg 检测的每一环节,强化操作责任心;(2)结果处于“S/CO 值为

0.51~1.00”并伴 HBcAb 阳性的样本用 i2000 定量复检,如是阴性发出。(3)如果定量阳性的样本与临床沟通,并建议进行 HBV DNA 检测或定期复查。本程序于 2013 年 12 月试行以来收到的临床正面的反馈信息。

参考文献

- [1] 张振华,叶瑁,杨东亮.隐匿性乙型肝炎病毒感染的研究进展[J].实用肝脏病杂志,2008,11(1):200-203.
- [2] Scheiblaner H, Soboll H, Nick S. Evaluation of 17 CE-Marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection[J]. J Med Virol,2006,78 Suppl 1:S66-70.
- [3] 李金明.临床酶免疫测定技术[M].北京:人民军医出版社,2005:104.
- [4] 王蕾,刘华,王雯静,等.低水平乙型肝炎表面抗原的检测及其临床价值评估[J].微生物与感染,2009,4(1):9-12.
- [5] Chevirier MC, St-Louis M, Perreault J, et al. Detection and characterization of hepatitis B virus of anti-hepatitis B core antigen-reactive blood donors in Quebec with an in-house nucleic acid testing assay[J]. Transfusion,2007,47(10):1794-1802.

(收稿日期:2014-02-24)