

• 论 著 •

白细胞异常增加对精液质量及氧化应激的影响*

张俏忻¹, 肖颖秀², 程碧珍¹

(汕头大学医学院第一附属医院:1. 检验科;2. 神经内科, 广东汕头 515041)

摘要:目的 研究白细胞(WBC)异常增加对精液质量及氧化应激的影响。方法 共收集 52 份 WBC 异常增高精液标本和 50 份 WBC 正常精液标本, 彩色精子自动分析系统分析精液常规, 以鲁米诺为探针, 运用化学发光法检测精子活性氧(ROS)水平。分别采用硫代巴比妥酸法和黄嘌呤氧化酶法检测精液中丙二醛(MDA)和总超氧化物歧化酶(T-SOD)的水平。结果 WBC 异常组和 WBC 正常组的精液常规参数中总活力、前向运动力和正常精子比率与 WBC 正常组之间差异具有统计学意义($P=0.008$; $P=0.005$; $P=0.003$); 精子运动参数中曲线速度(VCL) ($P=0.023$)、直线速度(VSL) ($P=0.010$)、平均路径速度(VAP) ($P=0.011$)、摆动性(WOB)差异具有统计学意义($P<0.05$); 精子形态异常率差异具有统计学意义($P=0.008$)。WBC 异常组较 WBC 正常组精液标本中 ROS、MDA 显著增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 而 T-SOD 在两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 WBC 异常增高可引起精子质量下降, 其机制可能与 WBC 增加释放过多的活性氧有关。

关键词:白细胞; 精子; 活性氧
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.003 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2016)06-0726-03

The impacts of leukocytes elevation on the sperm quality and oxidative stress*

Zhang Qiaoxin¹, Xiao Yingxiu², Cheng Bizhen¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: Objective To study the impacts of leukocytes elevation on the sperm quality and oxidative stress. **Methods** A total of 52 elevated leukocytes specimen and 50 normal leukocytes specimen were collected. Standard semen analysis was performed. Reactive oxygen species (ROS) production was measured using luminol as the probe by the Chemiluminescence method. Malonaldehyde(MDA) content in semen was measured by the sulfo-barbitone acid method. Total superoxide dismutase(T-SOD) in semen was measured by the xanthine oxidase method. **Results** The semen parameters including total motility($P=0.008$), progressive motility ($P=0.005$) and normal forms ($P=0.003$), the sperm motion parameters including mean curvilinear velocity(VCL) ($P=0.023$), mean straight-line velocity(VSL) ($P=0.010$), mean average path (VAP) ($P=0.011$), swing(WOB) ($P<0.001$) in the elevated leukocytes group all decreased significantly compared with the normal leukocytes group. The ratio of sperm abnormality in the abnormal leukocytes group increased significantly($P=0.008$). ROS levels (using the log-transformation) and Malondialdehyde (MDA) were significantly higher in the elevated leukocytes group, but no significant difference was observed for T-SOD between the two groups($P>0.05$). **Conclusion** The leukocytes elevation could result in the decrease of spermatozoa quality, which might be related with ROS increase.

Key words: leukocytes; sperm; reactive oxygen species

白细胞(WBC)在精液中的作用一直存在争议, 有文献报道 WBC 的存在有利于精子质量的提高, 可以清除死亡或损伤的精子, 留下健康的精子, 从而提高男性的生殖能力, 增加受孕机会^[1-2]。但是某些文献观察到 WBC 对精子参数呈负面影响, 尤其是精子的活力和穿透力, 生殖系统感染所引起的 WBC 精子症被认为是受精能力下降的早期原因^[3-4]。WBC 是精液中活性氧(ROS)的重要来源, 而后的异常增加可造成精子细胞损伤, 本试验旨在研究 WBC 对精液质量及氧化应激的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 52 例受试个体均来自 2013 年 7~12 月汕头大学医学院第一附属医院的生殖中心, 共收集 52 份 WBC 异常增高($WBC>1\times10^6$ /mL)的精液标本(白细胞异常组), 标本来自平均年龄(31.3 ± 4.4)岁的男性, 50 份 WBC 正常($WBC<1\times10^6$ /mL)精液标本(WBC 正常组), 来自平均年龄(35.4 ± 5.5)岁的男性。两组年龄差异无统计学意义($t=0.988$, $P=0.219$)。

1.2 标本采集 标本收集及采集时间为禁欲 2~7 d 后, 用手淫法取精液, 精液标本使用 45% 和 90% 的梯度离心法分离精子, 吸取 45% 和 90% 中间部分的精子为本标本。

1.3 精液常规分析 使用北京伟力 9100 精子质量分析系统, 将液化后精液混匀, 吸出 5 μ L 标本, 加到精液计数板中, 按世界卫生组织(WHO)规定的标准分析精子各项参数。精液参数包括精液体积、pH 值、精子水平、总活力、前向运动力、正常形态精子比率; 运动参数包括直线速度(VSL)、曲线速度(VCL)、平均路径速度(VAP)、前向性(STR)、精子侧摆幅度(ALH)、运动直线性(LIN)、摆动性(WOB)、平均移动角度(MAD)、鞭打频率(BCF); 精子形态包括异常形态精子、头部异常、颈部/中断异常及尾部异常。精液 WBC 检测采用联苯胺染色方法, $WBC>1\times10^6$ /mL 被定义为 WBC 精子症。

1.4 精子活性氧 ROS 检测 ROS 产物使用鲁米诺(luminol; Sigma Aldrich)作为探针进行检测。精子细胞经 PBS 清洗后, 调整终浓度为 20×10^6 /mL 收集, 少精患者(少于 20×10^6 /mL) luminol 信号按照精子比例放大到 20×10^6 /mL。将溶解

* 基金项目: 广东省医学科研基金资助项目(A2014441)。 作者简介: 张俏忻, 男, 副主任检验技师, 主要从事分子诊断研究。

在 DMSO 中的 luminol (10 μ L, 5 mmol/L) 加入到 400 μ L 的精子悬液中, 立刻记录数据。将 5 μ L luminol 加入到 400 μ L 的 PBS 溶液中作为空白对照。25 μ L H₂O₂ 和 10 μ L luminol 混合悬液作为阳性对照。荧光信号使用荧光分光光度仪测量 15 min。结果用相对荧光单位 Relative luciferase activity(RLU)/20 $\times$ 10⁶ sperm/15 min 表示。

1.5 精液微量丙二醛(MDA)测定 精子膜脂类过氧化反应的程度以反应产物 MDA 的产量表示, MDA 测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法。取待测精液 0.1 mL 为测定管, 并设测定空白管、标准管及标准空白管, 按照说明书操作, 分别加入相应试剂。

1.6 总超氧化物歧化酶(T-SOD)检测 使用黄嘌呤氧化酶法, 按照说明书操作, 每毫升反应液中超氧化物歧化酶(SOD)抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U)。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 WBC 增加对精子参数的影响 WBC 异常组总活力、前向运动力和正常精子比率与 WBC 正常组比较, 差异具有统计学意义(*P*<0.05), 见表 1。

表 1 精液 WBC 与精子参数的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	WBC 正常组 (<i>n</i> =50)	WBC 异常组 (<i>n</i> =52)	<i>t</i>	<i>P</i>
体积(mL)	3.09 $\pm$ 1.09	3.04 $\pm$ 0.90	0.26	0.79
pH 值	7.47 $\pm$ 0.19	7.49 $\pm$ 0.16	0.93	0.35
精子水平($\times 10^6$ /mL)	79.59 $\pm$ 49.78	65.54 $\pm$ 38.09	1.60	0.11
总活力(PR+NP, %)	65.67 $\pm$ 16.64	55.76 $\pm$ 19.99	2.72	0.01
前向运动力(PR, %)	48.38 $\pm$ 12.94	40.24 $\pm$ 15.35	2.89	0.01
正常形态精子比率(%)	13.08 $\pm$ 5.18	9.91 $\pm$ 5.15	3.10	0.00

2.2 WBC 增加对精子运动参数的影响 WBC 异常组与 WBC 正常组相比精子运动参数 VCL、VSL、VAP、WOB 具有统计学差异(*P*<0.05), 见表 2。

表 2 精液 WBC 与精子运动参数的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	WBC 正常组 (<i>n</i> =50)	WBC 异常组 (<i>n</i> =52)	<i>t</i>	<i>P</i>
VCL(μ m/s)	47.28 $\pm$ 10.04	42.60 $\pm$ 10.44	2.308	0.023
VSL(μ m/s)	28.74 $\pm$ 7.31	25.11 $\pm$ 6.58	2.633	0.010
VAP(μ m/s)	31.79 $\pm$ 7.57	28.05 $\pm$ 7.02	2.589	0.011
MAD($^\circ$)	59.41 $\pm$ 7.12	56.57 $\pm$ 7.72	1.930	0.060
ALH(μ m)	3.96 $\pm$ 1.07	4.02 $\pm$ 1.19	0.260	0.800
BCF(Hz)	5.98 $\pm$ 1.03	6.20 $\pm$ 1.15	1.040	0.300
LIN(%)	60.32 $\pm$ 7.45	57.66 $\pm$ 7.60	1.780	0.080
WOB(%)	67.69 $\pm$ 6.22	62.64 $\pm$ 6.42	4.040	0.000
STR(%)	87.13 $\pm$ 3.87	85.69 $\pm$ 4.29	1.770	0.080

2.3 精液 WBC 与精子形态异常的关系 WBC 异常组与 WBC 正常组的精子形态异常率差异具有统计学意义(*P*<0.05), 其中头部异常增高明显, 见表 3。

2.4 精液 WBC 对精液中活性氧水平及氧化损伤的影响 WBC 异常组较 WBC 正常组精液标本中 ROS、MDA 显著增加, 差异具有统计学意义(*P*<0.05), 而两组 T-SOD 差异无发

现统计学意义(*P*>0.05), 见表 4。

表 3 精液 WBC 与精子形态的关系($\bar{x}\pm s, \%$)

项目	WBC 正常组 (<i>n</i> =50)	WBC 异常组 (<i>n</i> =52)	<i>t</i>	<i>P</i>
异常形态精子	87.21 $\pm$ 5.50	90.07 $\pm$ 5.17	2.71	0.01
头部异常	86.85 $\pm$ 5.51	89.90 $\pm$ 5.20	2.88	0.01
颈部/中断异常	11.69 $\pm$ 3.27	11.07 $\pm$ 3.22	0.97	0.34
尾部异常	5.36 $\pm$ 1.51	5.58 $\pm$ 2.07	0.63	0.53

表 4 精液 WBC 对精液中活性氧水平及氧化损伤的影响

项目	WBC 正常组 (<i>n</i> =50)	WBC 异常组 (<i>n</i> =52)	<i>t</i>	<i>P</i>
Log(ROS+1)	1.99 $\pm$ 0.76	2.76 $\pm$ 0.85	7.89	0.00
MDA(nmol/L)	0.92 $\pm$ 0.58	1.35 $\pm$ 0.61	3.88	0.01
T-SOD(U/mL)	64.33 $\pm$ 7.19	60.71 $\pm$ 7.10	0.90	0.36

Log(ROS+1): ROS 相对荧光强度的 Log 转换形式。

3 讨 论

有文献报道 WBC 在精子参数、精子功能和男性不育中具有不良作用, 与正常生育组相比, 不育男性 WBC 数量明显增加。研究表明, 精液 WBC 增多可导致精液量减少, 精子密度、活力、受精能力降低, 还可导致精子细胞染色质改变、精子 DNA 损伤、未成熟生精细胞和畸形精子数目增加等^[5-6]。但是, 也有学者认为精液 WBC 增高与男性不育并无关联。Tomlinson 等^[7]研究显示精液 WBC 增多或 WBC 亚群分布变化并不影响精子质量。Kiessling 等^[8]发现 WBC 精子症者的正常形态精子增加。本次试验结果显示, WBC 异常组总活力、前向运动力和正常精子比率较 WBC 正常组都有所降低, 两组差异具有统计学意义(*P*<0.05)。同时发现精液中增高的 WBC 对精子运动参数有影响, WBC 异常组与 WBC 正常组相比, 精子运动参数 VCL、VSL、VAP、WOB 差异具有统计学意义(*P*<0.05)。有研究表明精子运动能力下降与 WBC 增高有关, 后者可使精子膜上多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 造成精子膜硬度增加, 膜流动性减弱, 精子运动能力下降甚至丧失。此外, 有研究认为随着 WBC 水平增加, 精子畸形率也增加。笔者比较了 WBC 异常组和 WBC 正常组的精子形态, 结果显示 WBC 异常组与 WBC 正常组的精子形态异常率差异具有统计学意义(*P*<0.05), 其中头部异常增高明显, 本次研究结果与相关文献报道一致^[9]。

尽管 WBC 对精液影响的机制尚未完全明确, 但已有大量学者致力于此方面的研究, 精液 WBC 中大约有 95% 是嗜中性粒细胞和巨噬细胞, 可通过精子与 WBC 直接接触或粒细胞产生可溶性物质, 释放大量的 ROS, 引发氧化应激, 诱导精子细胞损伤和功能丧失。本研究对 WBC 异常增加的精液标本 ROS 及 MDA、T-SOD 进行了比较研究, 结果显示 WBC 异常组较 WBC 正常组精液标本中 ROS、MDA 显著增加, 具有统计学差异, 而 T-SOD 在两组之间未发现统计学差异。ROS 增加的可能机制是: 位于精子中段的线粒体鞘是精子运动的供能中心, 富含腺嘌呤核苷三磷酸(ATP), 当精液中的 WBC 增多时, 大量释放的 ROS 可使精子线粒体内外膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, ATP 合成减少, 最终影响精液质量, 导致精子顶体反应和卵细胞融合能力下降, DNA 片段增加。活性氧产生和降解的不平衡被认为是精液中氧化应激(下转第 730 页)

几方面需注意:(1)进行实验操作时,采取相应的防护措施(如需穿戴好口罩、帽子、隔离服、手套等);(2)实验操作需在生物安全柜中进行;(3)应用倒置显微镜观察结果时,24 孔细胞培养板需密封后才能进行观察,观察时需小心谨慎,避免打翻;(4)实验结束后,24 孔细胞培养板及废弃物必须经高温高压灭菌后,方可按一般垃圾处理。

参考文献

[1] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(1):3-7.

[2] Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru[J]. J Clin Microbiol,2000,38(2):1203-1208.

[3] Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug susceptibility assay for the diagnosis of TB[J]. N Engl J Med,2006,35(5):1539-1550.

[4] 金文国,胡忠义. 显微镜观察药物敏感性检测技术及其在结核病诊断和耐药性检测中的应用[J]. 中华预防医学杂志,2008,42(3):134-136.

[5] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006:13-37.

[6] Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination; report of a 2-year experience in a clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol,

1993,31(1):2882-2889.

[7] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev,2004,17(3):840-862.

[8] Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, et al. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Clin Microbiol,2007,45(2):1093-1097.

[9] Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings[J]. J Clin Microbiol,2004,42(10):4432-4437.

[10] Caws M, Ha DT, Torok E, et al. Evaluation of the MODS culture technique for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. PLoS ONE,2007,11(1):1173.

[11] 付佑辉,郑瑞娟,王洁,等. 显微镜观察药物敏感性技术快速检测结核分枝杆菌研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,23(2):3178-3181.

[12] 付佑辉,郑瑞娟,王洁,等. 显微镜观察药物敏感度检测技术在二线抗结核药耐药性检测应用[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(2):25-29.

[13] 陆俊梅,王洁,黄晓辰,等. 显微镜观察药物敏感性检测技术在痰标本直接药敏试验中的应用[J]. 中华预防医学杂志,2011,45(1):21-25.

(收稿日期:2015-12-11)

(上接第 727 页)

的一个重要原因,后者可造成精子膜的氧化损伤,导致相关功能的损害,例如精子活动力。有报道显示哺乳动物精子膜的脂质过氧化可导致膜结构的损伤和融合,引起精子活动力的丧失。活性氧通过攻击多不饱和脂肪酸(PUFA)来诱导脂质过氧化(LPO),进而引起膜流动性下降,造成精子结构和功能的损害。除了膜功能外,LPO 派生的醛类例如 MDA 可以通过氧化 DNA 碱基或与其共价结合导致 DNA 链的断裂或交联而引起 DNA 和蛋白质的损伤。Hsieh 等^[10]报道 MDA 水平与少弱精子患者的精子水平和活动力呈负相关,认为增加的 MDA 水平代表了 LPO 对精子膜的致病效能,对精子的活动力和生存力有抑制作用。SOD 在精浆和精子内都存在,培养过程中加入 SOD 可以保护精子免受活性氧的攻击。精子计数和总、前向运动力与精液 SOD 水平有显著相关性,研究发现 SOD 水平越高精子的数量越多,提示了 SOD 水平的下降与精液质量的异常有关^[11]。但本研究并未发现 T-SOD 在 WBC 异常增高组中有显著降低。

综上所述,精液中 WBC 异常增高可引起精子的质量下降,其机制可能与 WBC 增加释放过多的活性氧有关。

参考文献

[1] Agarwal A, Mulgund A, Alshahrani S, et al. Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia[J]. Rep Biol Endoc,2014,19(2):126-133.

[2] Tomlinson MJ, Barratt CL, Bolton AE, et al. Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization[J]. Fertil Steril,1992,58(2):1257-1259.

[3] Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, et al. Is leukocytospermia clinically relevant[J]. Fertil Steril,1996,66(3):822-825.

[4] Fraczek M, Wiland E, Piasecka M, et al. Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection[J]. Fertil Steril,2014,10(2):711-719.

[5] Arata BG, Tortolero I, Villarroel V, et al. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters[J]. Arch Androl,2000,45(7):131-136.

[6] Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress; modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility[J]. Reprod Biomed Online,2014,28(3):684-703.

[7] Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility[J]. Fertil Steril,1993,60(5):1069-1075.

[8] Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, et al. Semen leukocytes: friends or foes[J]. Fertil Steril,1995,64(4):196-198.

[9] Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W, et al. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C(11)-BODIPY(581/591)[J]. Theriogenology,2011,75(1):1623-1629.

[10] Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, et al. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility[J]. J Clin Lab Anal,2002,16(3):127-131.

[11] Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczler J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility[J]. Cent European J Urol,2013,66(5):60-67.

(收稿日期:2015-12-04)