

论著 · 临床研究

精浆 ROS、PON-1、MDA 联合精子 DNA 碎片指数在男性不育症患者中的研究*

刘利敏¹, 谢庆东², 凌晓辉¹, 余相¹, 陈志云¹

(1. 惠州市中心人民医院生殖医学中心, 广东惠州 516001; 2. 汕头大学医学院生殖医学中心, 广东汕头 515041)

摘要:目的 研究分析男性不育症患者的精浆氧自由基(ROS)、对氧磷酶-1(PON-1)、丙二醛(MDA)和精子DNA碎片指数(DFI)水平, 以期为男性不育症的诊断及治疗提供一些临床依据。方法 选择2017年6月至2018年6月在惠州市中心人民医院就诊的50例男性不育症患者作为试验组, 另选择该院二胎孕前检查者50例作为对照组, 采集患者精液并完成精液常规、精浆ROS、PON-1、MDA和精子DFI及ROS、PON-1、MDA检查, 同时分析精子DFI及ROS、PON-1、MDA与DFI的相关性。结果 与对照组比较, 试验组患者精子浓度、精子存活率及前向运动精子率均明显降低, 精浆ROS、MDA和精子DFI显著升高, 精浆PON-1水平明显降低, 精浆ROS、MDA水平与精子DFI之间呈正相关($r=0.538, 0.737$), 精浆PON-1与精子DFI之间呈负相关($r=-0.371$), 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 精浆ROS、PON-1、MDA水平和精子DFI的检测可为男性不育症的诊断和治疗提供依据, 具有一定的临床应用价值。

关键词:活性氧; 对氧磷酶-1; 丙二醛; 精子DNA碎片指数

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.12.007

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2019)12-1435-04

文献标识码:A

Study on seminal plasma ROS, PON-1 and MDA combined with sperm

DNA fragmentation index in male patients with infertility*

LIU Limin¹, XIE Qingdong², LING Xiaohui¹, YU Xiang¹, CHEN Zhiyun¹

(1. Center for Reproductive Medicine, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516001, China; 2. Center for Reproductive Medicine, Shantou University Medical School, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: Objective To study the seminal plasma reactive oxygen species (ROS), paraoxonase-1 (PON-1), malondialdehyde (MDA) and sperm DNA fragment index (DFI) levels in male infertility patients, so as to provide some clinical evidences for the diagnosis and treatment of male infertility. **Methods** 50 cases of male infertility in Huizhou Central People's Hospital from June 2017 to June 2018 were selected as experimental group, and another 50 cases who came for prenatal examination of second births in the hospital were selected. Semen analysis and seminal plasma ROS, PON-1, MDA and sperm DNA fragmentation index detection were carried out, and the correlation of ROS, PON-1, MDA and sperm DNA fragmentation index was analyzed. **Results** Compared with the control group, the sperm concentration, the sperm survival rate and the sperm forward movement rate of the experimental group were significantly decreased, the seminal plasma ROS, MDA and sperm DFI were significantly increased. The PON-1 level of spermatozoa decreased significantly, the level of ROS and MDA of seminal plasma was positively correlated with sperm DFI ($r=0.538, 0.737$), and there was a negative correlation between sperm PON-1 and sperm DFI ($r=-0.371$), and the differences were all statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of seminal plasma ROS, PON-1, MDA and sperm DFI can provide evidences for the diagnosis and treatment of male infertility, which can provide certain clinical application value.

Key words: reactive oxygen species; paraoxonase-1; malondialdehyde; sperm DNA fragmentation index

* 基金项目: 广东省省级科技计划项目(2014A020212035)。

作者简介: 刘利敏, 女, 主管技师, 主要从事生殖方面的研究。

本文引用格式: 刘利敏, 谢庆东, 凌晓辉, 等. 精浆 ROS、PON-1、MDA 联合精子 DNA 碎片指数在男性不育症患者中的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(12): 1435-1438.

男性不育症是指夫妻双方未采取任何避孕措施,规律性生活 1 年以上,因男方因素导致女方未自然受孕。男性不育症发病因素多样,约 70% 的患者难找到发病原因^[1]。

氧化应激条件下,机体常常会产生高活性分子,如活性氧(ROS),其可引起机体氧化-抗氧化系统的失衡,导致脂质过氧化物损伤,从而引起男性不育症^[2]。对氧磷酶-1(PON-1)为机体内非常重要的抗氧化酶,其活性降低亦可导致不育^[3]。丙二醛(MDA)是 ROS 的脂质过氧化醛式产物,可损伤精子的细胞膜,从而导致不育^[2]。精子 DNA 的完整性和 DNA 碎片指数(DFI)是判断精子 DNA 损伤的重要指标,精子 DNA 的损伤可导致男性不育^[4]。

本研究通过分析男性不育症患者的精浆 ROS、PON-1、MDA 和精子 DFI 水平,以期为男性不育症的诊断及治疗提供一些临床依据。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 6 月至 2018 年 6 月在惠州市中心人民医院就诊的 50 例男性不育症患者纳入试验组,年龄 22~40 岁,平均(26.32±4.13)岁。纳入标准:(1)婚后正常性生活,未避孕 1 年以上不育,明确诊断为男性不育症;(2)无睾丸外伤、性腺不全、性功能障碍及家族遗传性疾病等;(3)体检无明显睾丸、附睾和输精管异常。排除标准:(1)患有严重的心血管、呼吸系统、内分泌系统疾病等;(2)睾丸和睾丸后因素而导致的不育者;(3)患有外伤或者感染疾病。对照组的精液来自二胎孕前检查者 50 例,年龄 21~39 岁,平均(28.42±2.75)岁。

1.2 试验方法 (1)精液采集:按照《WH 人类精液检查和处理实验室手册》的标准进行精液采集:受试者在标本采集前禁欲 2~7 d,手淫法采集精液,置无菌采精杯中,立即送男性实验室进行精液常规、精浆 ROS、PON-1、MDA 和精子 DFI 检测。(2)精液常规检查:精液液化后,观察精液颜色,检测精液量,使用

西班牙 SCA 精液分析系统进行精子浓度、精子存活率及前向运动精子率等检查。(3)ROS、PON-1、MDA 检测:将患者精液离心,获取精浆,分别置不同的试管中进行检测。ROS 检测使用 ELISA 法,试剂盒购自上海欣乐生物有限公司;PON-1 检测使用分光光度法,试剂盒购自上海希美生物科技有限公司;MDA 检测使用硫代巴比妥酸法,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。(4)精子 DFI 检测:精子染色质扩散法,试剂盒购自深圳市博锐德生物科技有限公司。按照试剂盒的说明书进行操作,光学显微镜下观察比较至少 500 个精子的精子核和核周晕轮,计算 DFI。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较用独立样本 *t* 检验;计数资料用百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验;精浆 ROS、PON-1、MDA 和精子 DFI 间的相关性采用 Pearson 分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 论

2.1 两组精液常规检查结果比较 与对照组比较,试验组患者精子浓度、精子存活率及前向运动精子率均明显降低,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),精液量两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者精液常规检查结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	精液量 (mL)	精子浓度 (1×10^6 /mL)	精子存活率 (%)	前向运动 精子率(%)
对照组	50	3.6±1.2	95.3±33.6	88.3±9.5	48.6±7.4
试验组	50	3.5±1.3	67.1±29.5	60.9±8.9	27.3±4.5
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 两组患者精浆 ROS、PON-1、MDA 和精子 DFI 比较 与对照组比较,试验组精浆 ROS、MDA 和精子 DFI 显著升高,精浆 PON-1 水平明显降低,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

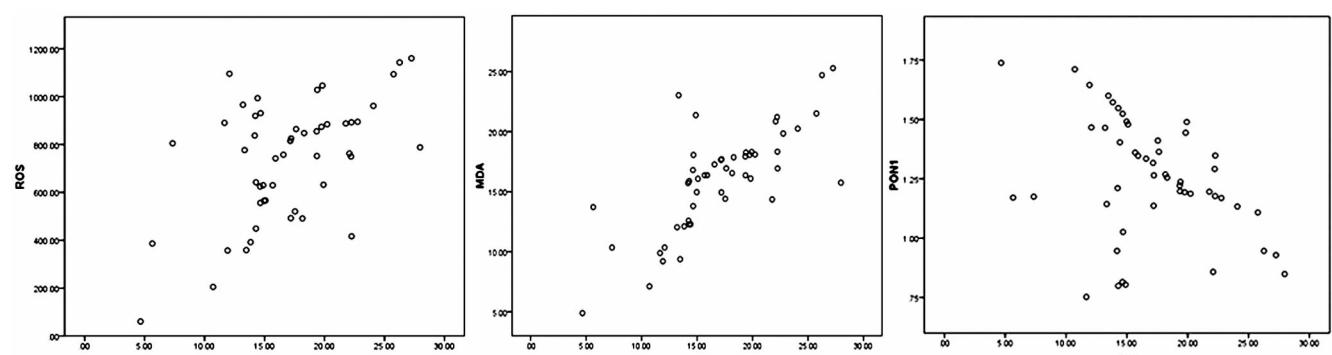


图 1 男性不育症患者精浆 ROS、PON-1、MDA 与精子 DFI 的相关性分析图

表 2 两组患者精浆 ROS、PON-1、MDA 和精子 DFI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精浆 ROS(U/L)	精浆 MDA(nmol/mL)	精浆 PON-1(U/mL)	精子 DFI(%)
对照组	50	463.91±167.58	5.75±1.18	4.02±0.69	13.05±5.54
试验组	50	736.33±247.58	16.00±4.24	1.25±0.25	37.76±6.43
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 男性不育症患者精浆 ROS、PON-1、MDA 与精子 DFI 的相关性分析 男性不育症患者精浆 ROS 水平与精子 DFI 之间呈正相关($r=0.538, P<0.05$), 精浆 MDA 水平与精子 DFI 之间呈正相关($r=0.737, P<0.05$), 精浆 PON-1 与精子 DFI 之间呈负相关($r=-0.371, P<0.05$)。见图 1。

3 讨 论

近年来,不孕不育率呈逐年上升的趋势,其中男性因素导致不育的概率约 50%。男性不育症对家庭和谐造成严重影响,而引起男性不育症的因素多种多样,其中较为常见的原因为精液异常。因此,有效评估精液的质量对于不育症的诊断及预后非常重要。目前绝大多数男性不育症患者仍然依靠精液常规检查,但是精液常规检查亦存在一定的缺陷,一部分精液常规检查各项参数及精子形态学正常的男性,仍出现不育情况。故寻求新的更准确、更全面的方法或者生物学指标,对于男性不育症的诊断和预后具有极其重要的意义^[5-6]。

在精子的形成过程中,氧化应激反应极易对精子造成损害。氧化应激过程中产生的 ROS 可以使精子细胞膜发生脂质过氧化反应,生成的脂质过氧化物可导致精子的形态学、功能和代谢发生异常。同时,ROS 还可以通过影响精子核酸及蛋白质的异常,从而破坏精子 DNA 的完整性,引起精子 DNA 碎片指数升高,继而导致不育^[7-8]。本研究结果显示,试验组患者精浆 ROS 水平较对照组明显升高,ROS 水平与精子 DFI 呈正相关($r=0.851, P<0.05$),这表明不育症男性的精子可发生脂质过氧化反应,导致精子 DNA 碎片增加,这可能与精子细胞膜蛋白质受体和转运蛋白的结构改变有关。

PON 是由肝脏产生的一种酶,常存在于高密度脂蛋白中,有 PON-1、PON-2 和 PON-3 3 种亚型。3 种亚型中的 PON-1 为机体内对抗氧化反应的重要磷酸酯酶,通过与高密度脂蛋白中的 ApoA1 结合,降低脂质过氧化产物的聚集而达到抗氧化作用。已有研究证实,PON-1 的活性降低可降低精子数量,改变精子形态和活动力,是男性不育症的重要危险因素^[9-10]。本研究发现,与对照组相比,试验组患者精浆 PON-1 水平明显下降,PON-1 水平与精子 DFI 呈负相关($r=-0.753, P<0.05$),这表明不育症男性的精子抗氧化

反应作用减弱,导致精子 DNA 碎片增加,这可能与精子细胞膜 ROS 产量增加,PON-1 的消耗增多,氧化/抗氧化系统的失衡有关。

MDA 是机体细胞膜多聚不饱和脂肪酸的脂质过氧化产物,具有细胞毒性作用,可破坏精子细胞膜的完整性和流动性,导致精子的运动能力下降或者丧失,从而影响受孕能力。研究表明,MDA 可影响精液常规参数,也可使精子活力丧失,在男性不育症中发挥着重要作用^[11]。本文研究揭示,试验组患者精浆 MDA 水平较对照组明显升高,MDA 水平与精子 DFI 呈正相关($r=0.623, P<0.05$),与 ROS 水平的升高趋势一致,这与甄锦壮等^[12]和季兴哲等^[13]的研究结果一致,提示精浆 MDA 能够间接反映精浆 ROS 的活性和精子 DNA 的损伤程度。

精子 DNA 是人体遗传信息的携带者,其基因突变、缺失、含量改变等均可导致 DNA 的完整性受到损伤,从而影响受精和胚胎发育。已有不少研究表明,精子 DNA 损伤与男性不育症有着密切的关系,可影响精子的存活率和浓度^[14]。因此,近年来,对于判断精子 DNA 损伤标准的 DFI 在男性不育症中的作用越来越得到重视,逐渐成为生殖医学的研究热点。本文研究结果显示,试验组患者精子 DFI 较对照组明显升高,这验证了男性不育症患者中 DNA 损伤的存在。

4 结 论

男性不育症患者精子浓度、精子存活率及前向运动精子率均明显降低,精浆 ROS、MDA 和精子 DFI 显著升高,精浆 PON-1 水平明显降低,精浆 ROS、MDA 水平与精子 DFI 之间呈正相关,精浆 PON-1 与精子 DFI 之间呈负相关。因此,精浆 ROS、PON-1、MDA 水平和精子 DFI 的检测可以为男性不育症的诊断和治疗提供依据,具有一定的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] AGARWAL A, MULGUND A, HAMADA A, et al. A unique view on male infertility around the globe[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 26(13):37.
- [2] SUBRAMANIAN V, RAVICHANDRAN A, THIAGARAJAN N, et al. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility[J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45(2):88-93.

- [3] AITKEN R J, FLANAGAN H M, CONNAUGHTON H, et al. Involvement of homocysteine, homocysteine thiolactone, and paraoxonase type 1 (PON-1) in the etiology of defective human sperm function[J]. *Andrology*, 2016, 4(2):345-360.
- [4] PANNER SELVAM M K, AGARWAL A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment[J]. *Arab J Urol*, 2018, 16(1):65-76.
- [5] 关小川, 孙刚, 姜力. 精子DNA完整性对男性不育症患者精液常规参数和精子形态的影响[J]. 中国性科学, 2018, 27(2):100-104.
- [6] 肖宗辉, 梁嘉颖, 李子涛, 等. 精液参数评估男性因素不孕者夫精宫腔内人工授精临床妊娠结局的可能性[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(23):3374-3377.
- [7] NI K, STEGER K, YANG H, et al. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno/oligozoospermic clinical varicocoele[J]. *Andrology*, 2016, 4(5):816-824.
- [8] XIE D, LU C, ZHU Y, et al. Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility[J]. *Exp Ther*
- [9] TAVILANI H, FATTAHY A, ESFAHANI M, et al. Genotype and phenotype frequencies of paraoxonase 1 in fertile and infertile men[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2014, 60(6):361-366.
- [10] VERIT F F, VERIT A, CIFTCI H, et al. Paraoxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters[J]. *J Androl*, 2009, 30(2):183-189.
- [11] STRAMOVA X, KANDAR R. Determination of seminal plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography in smokers and non-smokers[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2015, 116(1):20-24.
- [12] 鄢锦壮, 邓杨富, 黄秀丽. 白细胞精子症精浆ROS、PON-1水平与精子DFI的相关性研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(8):9-11.
- [13] 张宁锋, 刘彩霞, 郑灵燕, 等. 精子DNA碎片率及顶体酶活性对男性不育的诊断价值[J]. 中山大学学报(医学版), 2018, 39(1):93-100.
- [14] 何海洪, 郭伟权, 兰希, 等. 严重生殖障碍患者精子DNA碎片指数与血清Hcy水平的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4):83-86.

(收稿日期:2018-12-21 修回日期:2019-03-06)

(上接第1434页)

抑制剂而干扰SLE典型症状的出现,这对疾病活动度的判断可能产生较大影响。当然,这还需要大样本的研究以了解这些指标的相关性。

4 结 论

SLE患者Th22细胞表达降低,可能源于AhR直接或间接调控炎性细胞因子的产生和分泌,从而导致不同免疫细胞亚群的免疫失衡,这也提示改变或促进Th22细胞分化的上游或下游通路可能减轻SLE的免疫炎性反应,Th22细胞水平可以作为SLE诊疗的潜在靶点和辅助标志物。

参考文献

- [1] EYERICH S, EYERICH K, PENNINO D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling[J]. *Clin Invest*, 2009, 119(12):3573-3585.
- [2] WANG Q, QIAN S, LI J, et al. Combined transplantation of autologous hematopoietic stem cells and allogenic mesenchymal stem cells increases T regulatory cells in systemic lupus erythematosus with refractory lupus nephritis and leukopenia[J]. *Lupus*, 2015, 24(11):1221-1226.
- [3] YANG X Y, WANG H Y, ZHAO X Y, et al. Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(4):767-774.
- [4] SUGITA S, KAWAZOE Y, IMAI A, et al. Role of IL-22- and TNF- α -producing Th22 cells in uveitis patients with Behcet's disease[J]. *J Immunol*, 2013, 190(11):5799-5808.
- [5] AZIZI G, SIMHAG A, MMEI R N. Th22 cells contribution in immunopathogenesis of rheumatic diseases[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2015, 14(3):246-254.
- [6] DORGHAM K, AMOURA Z, PARIZOT C, et al. Ultraviolet light converts propranolol, a nonselective β -blocker and potential lupus-inducing drug, into a proinflammatory AhR ligand[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(11):3174-3187.
- [7] QUINTANA F J, BASSO A S, IGLESIAS A H, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Nature*, 2008, 453(7191):65-71.
- [8] 岳林环, 林进. 系统性红斑狼疮患者血浆IL-22水平下降[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(2):243-244.
- [9] HANIEH H. Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 23(11):520763.
- [10] 朱俊宇, 范霞, 梁华平. AhR调控炎性细胞因子的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(1):73-77.

(收稿日期:2018-12-25 修回日期:2019-03-06)