实用妇产科杂志,2013,29(5):330-333.
[2] BIANCHI D W, RAVA R P, SEHNERT A J. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening [J]. N Engl J Med, 2014, 371(6): 887-888.
[3] BIANCHI D W. Cherchez la femme: maternal incidental findings can explain discordant prenatal cell-free DNA sequencing results[J]. Genet Med, 2017, 20(9): 910-917.
[4] BRISON N, VAN D B K, et al. Accuracy and clinical value of maternal incidental findings during noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies[J]. Genet Med, 2017, 72(8): 469-470.
[5] CURNOW K J, WILKINS-HAUG L, RYAN A, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(1): 1-9.
[6] 刘俊涛. 无创产前检测国际指南与中国规范[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017(6): 16-19.
[7] LO Y M, TEIN S C, LAU T K, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768-775.
[8] CHUI D H K, CUNNINGHAM M J, LUO H, et al. Screening and counseling for thalassemia [J]. Blood, 2006, 107(4): 1735-1737.
[9] NICOLAIDES K H, SYNGELAKI A, ASHOOR G, et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population[J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 207(5): 1-6.
[10] BIANCHI D W, WILKINS-HAUG L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road[J]. Clin Chem, 2014, 60(1): 78-87.
[11] WANG J C, SAHOO T, SCHONBERG S, et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases[J]. Genet Med, 2015, 17(3): 234-236.
[12] LESTOU V S, KALOUSEK D K. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1998, 79(3): 223-226.
[13] ACO G. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. Committee opinion No. 640[J]. Obstet Gynecol, 2015, 126(3): 691-692.
[14] GRATI F R, BARLOCCO A, GRIMI B, et al. Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal unbalances associated with relevant clinical phenotypes[J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A(6): 1434-1442.
[15] 朱蔚云, 谢天炽, 李佩琼, 等. 人类 X 染色体失活与基因的剂量补偿效应[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017(11): 61-63.

(收稿日期:2019-03-10　修回日期:2019-05-22)

·短篇论著·

1 203 例不育患者的精子 DFI 与精液质量参数的相关性分析*

李清琴, 董荔红△, 吴丹梅, 钟福春, 张　朵
(联勤保障部队第九〇〇医院临床遗传与实验医学科, 福建福州 350025)

摘　要:目的　分析不育患者精液质量、年龄与精子 DNA 断裂指数(DFI)的关系, 探讨精子 DNA 损伤的机制。**方法**　回顾性分析 1 203 例不育患者的精子 DFI、精子浓度、活力和年龄等指标。按少、弱精子症进行分组, 并进行精子 DFI 与精子浓度、活力的相关性分析。**结果**　精子 DFI 与精子浓度无相关性, 而与精子活力呈负相关($r=-0.457$, $P<0.05$)。少、弱精子症组的 DFI 较正常组高, 各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。年龄与精子 DFI 呈正相关($r=0.172$, $P<0.05$), 在弱精子症组中, 不同年龄组 DFI 值比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　精子 DFI 在弱精子症患者中明显升高, 其升高水平与精子活力下降的程度有明显的相关性。年龄与精子 DFI 呈正相关。

关键词:精子 DNA 断裂指数;　不育;　精子活力;　年龄
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.028　　**中图法分类号:**R698+.2
文章编号:1673-4130(2019)21-2673-04　　**文献标识码:**B

据统计中国育龄夫妇中受不育不孕困扰的大约有 10%～15%, 其中男性因素约占 50%[1]。精子核 DNA 完整性, 是父源性遗传信息能否准确传递给后代的关键。约 20%的特发性不育症存在精子 DNA

* **基金项目:**第九〇〇医院临床应用研究专项基金(2017L01)。
△ **通信作者**, E-mail: 77841892@qq.com。
本文引用格式:李清琴, 董荔红, 吴丹梅, 等. 1 203 例不育患者的精子 DFI 与精液质量参数的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21): 2673-2676.

断裂指数(DFI)高[2]。精子 DFI 高会降低卵母细胞的受精率、胚胎质量及受孕率[3]。精子功能评价除了精液质量分析外,增加精子 DNA 损伤检测作为一项新指标,可预测自然受孕和体外受精的结局,监测环境污染物和医疗干预诱发的精子 DNA 损伤,评估男性生殖系统疾病及其相关治疗[4-5]。为探究精子 DNA 损伤的发病机理,本文综合分析男性不育患者年龄、浓度、活力与精子 DFI 之间的关系。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2015－2017 年,在联勤保障部队第九〇〇医院生殖中心治疗不育症患者的精液质量参数和精子 DFI 作为研究对象,年龄分布在 20～62 岁,平均(32.9±5.3)岁。有正常夫妻生活的育龄夫妇,未采取任何避孕措施,女方 1 年以上未怀孕,即可诊断为不育症。排除具有以下情况的不育症患者:重度吸烟、男性生殖器官发育缺陷、精索静脉曲张、生殖器官炎性反应、全身性疾病、3 个月内服用可能影响精液常规的药物、无精子症等。

1.2　方法

1.2.1　精液分析　禁欲 2～7 d 后采集精液标本,37 ℃恒温箱液化 15～30 min。充分混匀后,采用手工法进行精液质量分析。所有精液分析均由 2 名规范化培训合格的技术人员操作完成,两两比对,进行严格的室内质控管理。根据《人类精液检查与处理实验室手册第 5 版》标准,将精子运动分类为前向运动(PR)、非前向运动(NP)和不活动(IM)的精子。精液特性的部分参考值下限(95%*CI*):精子浓度≥15×10^6/mL;精子总活力(PR＋NP)≥40%,PR 精子≥32%。根据精子活力(PR 级精子比率)的强弱将弱精子症分 4 类:轻度弱精子症(20%≤PR＜32%)、中度弱精子症(10%≤PR＜20%)、重度弱精子症(1%≤PR＜10%)、极度弱精子症(PR＜1%)。

1.2.2　精子 DFI 检测　流式细胞仪－精子染色质结构分析法进行精子 DFI 检测。具体如下:精液经过低 pH 值的缓冲液处理后,精子核 DNA 链在断裂处变性,吖啶橙荧光染色,通过 BD FACS Cnato™ Ⅱ流式细胞仪收集荧光性号,Diva 软件进行数据分析。精子 DFI 值＝有碎片化的精子数/被观察的总精子数×100%,其中 DFI 值≤15%表示精子 DNA 完整性好;15%＜DFI 值＜30%表示精子 DNA 完整性一般;DFI 值≥30%表示精子 DNA 完整性差。

1.2.3　分组设计　观察年龄对精子 DFI 的影响,将弱精子症组(664 例)和正常组(455 例)根据年龄分为 3 组,年龄＜30 岁、年龄 30～34 岁、年龄＞34 岁。

1.3　统计学处理　用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,选用非参数检验进行组间差异分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。采用多元线性回归分析 DFI 与精液参数的相关性。

2　结　　果

2.1　精子 DFI 与其他参数之间的相关性　相关性分析结果显示,精子 DFI 与年龄呈正相关($r=0.172$,$P<0.001$),与精子活力呈负相关($r=-0.457$,$P<0.001$),而与精子浓度无相关性。见表 1。

表 1　精子 DFI 与其他参数之间的相关性分析

变量	n	精子 DFI	
		r	P
年龄	1 203	0.172	＜0.001
精子浓度	1 203	－0.078	0.007
前向运动精子	1 203	－0.489	＜0.001
精子活力	1 203	－0.457	＜0.001

2.2　少、弱精子症组和正常组的精子 DFI 比较　少、弱精子症组的精子 DFI 分别为(27.2±15.0)%、(27.9±14.4)%,均明显高于正常组的(16.8±8.5)%,差异有统计学意义($P<0.001$)。见表 2。

表 2　少、弱精子症组与正常组的精液质量参数及精子 DFI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	浓度(×10^6/mL)	PR(%)	DFI(%)
弱精子症组	664	86.2±64.5	15.4±9.6	27.2±15.0
少精子症组	84	8.8±3.9	19.2±19.1	27.9±14.4
正常组	455	94.5±63.6	45.6±10.2	16.8±8.5
P		＜0.001	＜0.001	＜0.001

2.3　不同程度的弱精子症之间的精子 DFI 比较　将 664 例弱精子症患者根据精子活力的强弱分为轻度、中度、重度及极度弱精子症 4 组,各组的精子 DFI 均值分别为(20.1±9.6)%、(27.6±13.4)%、(32.8±17.3)%,(40.1±20.2)%,异常率(异常率＝DFI 值小于 30%的检测例数/总检测例数×100%)分别为 17.2%、33.0%、51.1%、63.9%,均明显高于正常组的异常率 8.1%,尤其是重度和极度弱精子症组。不同精子活力组间的 DFI 值比较差异有统计学意义($P<0.001$)。见表 3。

表 3　不同程度的弱精子症之间的精子 DFI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	浓度(×10^6/mL)	PR(%)	DFI(%)
极度弱精子症组	36	75.1±74.6	0.2±0.3	40.1±20.2
重度弱精子症组	184	85.1±65.6	5.0±2.5	32.8±17.3
中度弱精子症组	194	79.0±62.6	14.7±2.9	27.6±13.4
轻度弱精子症组	250	94.1±62.0	25.9±3.5	20.1±9.6
P		＜0.001	＜0.001	＜0.001

2.4　年龄对精子 DFI 的影响　弱精子症组中,各年龄组间的精子 DFI 比较差异有统计学意义($P<0.05$),随着年龄增大,精子 DFI 明显升高。而正常组中,各组间精子 DFI 比较差异无统计学意义($P>$

0.05)。见表 4。

表 4　不同年龄组精子 DFI 比较($\bar{x}\pm s$,%)

分组	＜30 岁		30～34 岁		＞34 岁		P
	n	DFI	n	DFI	n	DFI	
弱精子症组	171	23.2±12.8	252	27.7±15.7	241	29.6±15.0	＜0.001
正常组	149	15.8±8.1	194	17.1±8.6	112	17.7±9.1	0.084

3　讨　论

男性生育能力的评估指标主要包括精液质量分析、精浆生化、精子 DFI 等。虽然精液质量分析被认为是男性生育力的金标准,但是其不能检测精子分子水平的异常。精子 DNA 损伤影响 DNA 碱基对的复制与转录,直接导致了遗传信息的缺失并影响生物转化功能,从而阻碍胚胎形成[6]。前期研究显示,当精子 DFI 超过 30%时,自然生育率会大幅降低。

精子 DNA 损伤的病理生理机制尚未完全清楚,已报道的影响精子 DFI 的因素主要包括:(1)精子发生和成熟功能障碍如组蛋白－鱼精蛋白转换故障导致染色质包装异常;(2)男性生殖系统疾病或全身性疾病如炎性反应、糖尿病、精索静脉曲张、恶性肿瘤等;(3)生活方式包括吸烟、喝酒、饮食等;(4)环境因素如接触紫外线、电离辐射、有毒化学物质等;(5)其他因素,如年龄、禁欲时间、季节等[7-9]。

相关研究表明年龄增长,男性生育力下降、精液参数变差包括精子活动力降低、精子 DNA 损伤升高和精子形态异常率升高[10-11]。这可能因为年龄增加,活性氧(ROS)积累,高水平的 ROS 促进氧化应激,诱导脂质过氧化和进一步产生 ROS,导致细胞凋亡或对 DNA 的氧化损伤[12]。与国内外报道一致,本研究也发现年龄与精子 DFI 呈正相关。本研究还发现弱精子症组中,年龄＞34 岁的精子 DFI 显著高于年轻≤34 岁男性,＞34 岁组的异常率为 40.9%,30～34 岁组的异常率为 32.5%、＜30 岁组的异常率为 23.4%。而正常组中,年龄差异无统计学意义。

另一方面,男性不育中弱精子症大约占 19%,其特征是精子活力降低或无活力。精子运动的影响因素包括遗传性疾病(内脏逆位-鼻窦炎-支气管扩张综合征、囊性纤维化),代谢和结构综合征(线粒体和鞭毛缺乏),细胞凋亡等[13]。本研究发现与正常组相比,精子 DFI 在弱精子症患者中明显升高,异常率高于正常组,尤其是重度和极度弱精子症组,其升高水平与精子活力下降的程度有明显的相关性。这可能是由于精子膜内含有较高浓度的不饱和脂肪酸,过量 ROS 会诱导其发生脂质过氧化,使精子膜的流动性和完整性受到损伤,导致精子线粒体、精子核内 DNA 受损。高水平的 ROS 释放到细胞质中,减少了精子活力的能量供应,使精子活力降低,细胞凋亡,进而导致男性不育。MAHFOUZ 等[14]发现精液中 ROS 水平增加 25%,精子 DFI 大约会增加 10%,精子活力大幅度下降。SHI[15]等研究也发现 ROS 水平增加,可能诱导精子氧化损伤,精子功能受损,精子活力可能是这种损伤最早和最敏感的指标之一。因此,笔者认为某些因素如过量 ROS 水平等会同时影响精子 DNA 损伤与精子活力。

综上所述,精子 DFI 与精子活力呈负相关,且升高水平与精子活力的下降程度有关,提示精子 DNA 损伤可能存在与精子活力下降相同的影响机制。本研究还发现在弱精子症患者中,精子 DFI 与年龄呈正相关,＞34 岁组中精子 DFI 显著高于≤34 岁组,提示年龄也是阻碍弱精子症患者获取孩子的不利因素之一。因此,男性不育患者应正视并及早就医。

参考文献

[1] 彭靖,李铮,涂响安,等. 中国男性不育显微外科 15 年发展历程及展望[J]. 中华男科学杂志,2014,20(7):586-594.

[2] AGARWAL A, SAMANTA L, BERTOLLA R P, et al. Proteomics in human reproduction[M]. Biomarkers for Millennials, 2016.

[3] 庞湘力,杨菁,龙文,等. 不育男性年龄与精子核 DNA 碎片率及精液参数的相关性研究[J]. 中国性科学,2017,26(7):88-91.

[4] LU J C, JING J, CHEN L, et al. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 23.

[5] NGUYEN T T, TRIEU T S, TRAN T O, et al. Evaluation of sperm DNA fragmentation index, Zinc concentration and seminal parameters from infertile men with varicocele [J]. Andrologia, 2019, 51(2): e13184.

[6] 熊承良,商学军,刘继红. 人类精子学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013.

[7] 陆金春. 精子 DNA 损伤的相关因素研究进展[J]. 中华男科学杂志,2015,21(8):675-680.

[8] JUREWICZ J, RADWAN M, WIELGOMAS B, et al. The effect of environmental exposure to pyrethroids and DNA damage in human sperm[J]. Syst Biol Reprod Med, 2015, 61(1): 37-43.

[9] MANESH K, PANNER S, ASHOK A. A systematic review on sperm DNA fragmentationin male factor infertil-

ity: laboratory assessment [J]. Arab J Urol, 2018, 16(1): 65-76.

[10] 韩小克,苑辉,关立军,等. 精子 DNA 碎片与精液各参数的相关性分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(10): 59-62.

[11] PETERSEN C G, MAURI A L, VAGNINI L D, et al. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2 178 semen samples [J]. JBRA Assist Reprod, 2018, 22(4): 323-330.

[12] CHAK L C, ASHOK A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: a systematic review [J]. Arab J Urol, 2017, 16(1): 21-34.

[13] AITKEN R J, MARK A B. Causes and Consequences of apoptosis in spermatozoa: contributions to infertility and impacts on development[J]. Int J Dev Biol. 2013, 57(4): 265-272.

[14] MAHFOUZ R, SHARMA R, THIYAGARAJAN 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.

[15] SHI T Y, CHEN G, HUANG X, et al. Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility, viability and morphology[J]. Andrologia, 2012, 44(1): 696-703.

(收稿日期:2019-03-08 修回日期:2019-05-20)

·短篇论著·

1 例产前诊断罕见 β-地中海贫血的分析

梁 毅,宁思思,陈 晓

(广西壮族自治区玉林市妇幼保健院检验科,广西玉林 537000)

摘 要:目的 通过回顾性分析 1 对产前地中海贫血筛查阳性的夫妇及其胎儿的诊断、基因检测过程,探讨罕见地中海贫血的产前诊断策略。**方法** 抽取可疑孕妇及其丈夫的静脉血标本进行血常规和血红蛋白电泳检查。用抽取的可疑孕妇及其丈夫的静脉血标本及胎儿的羊水标本,采用多重跨越断裂点聚合酶链式反应(Gap-PCR)方法和聚合酶链式反应/反向点杂交法(RDB-PCR)检测三者的地中海贫血基因类型。对不符合遗传规律的结果进一步利用 β-珠蛋白基因序列测序进行分析。**结果** 孕妇及其丈夫的红细胞平均体积(MCV)和红细胞平均血红蛋白含量(MCH)均减低。孕妇及其丈夫的血红蛋白电泳结果显示血红蛋白 A2(HbA2)和血红蛋白 F(HbF)均升高。在常见地中海贫血基因检测中,受检孕妇地中海贫血基因型为 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$、41－42M/$\beta^{N}$,其丈夫地中海贫血基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$、－28M/$\beta^{N}$。胎儿地中海贫血基因型为 αα/αα、41－42M/41－42M,不符合遗传学规律。测序结果显示,孕妇的 β-珠蛋白基因存在 CD41－42(－TTCT)突变杂合子,其丈夫的 β-珠蛋白基因测序结果为－28A－>G 突变与罕见的 CD43(GAG→AAG)突变双重杂合突变。胎儿(羊水)的测序结果为 CD41－42(－TTCT)突变和罕见的 CD43(GAG→AAG)突变的双重杂合突变,测序结果符合遗传学规律。**结论** 应严格按照地中海贫血筛查到诊断的步骤对可疑的夫妇进行检查,对地中海贫血初筛阳性的夫妇进行产前诊断时,如一方存在检测结果与临床表型不吻合的情况或胎儿结果不符合遗传学规律时,应采用基因测序等方法进一步检测,联合应用多种方法进行确诊,从而避免重型地中海贫血患儿的出生。

关键词:地中海贫血; 罕见; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.029 **中图法分类号:**R556.9

文章编号:1673-4130(2019)21-2676-04 **文献标识码:**B

地中海贫血是一组由于珠蛋白基因的缺陷导致珠蛋白合成障碍所引起的常染色体隐性遗传性溶血性疾病,其临床表型可从无症状到致命的溶血性贫血[1]。中国南方为地中海贫血高发地区,特别是广西当地人群地中海贫血基因携带率高达 24.5%[2]。按照存在缺陷的珠蛋白基因的种类,地中海贫血一般可以分为 α-、β-、δβ-和 εγδβ-地中海贫血等类型,其中 α-和 β-地中海贫血最为常见[3]。目前该病尚无有效的治疗方法,只能通过对婚检、孕检夫妇以及胎儿进行准确的地中海贫血基因诊断或产前诊断,来杜绝中、重型患儿的出生,从而降低出生缺陷的概率[2]。地中海贫血基因突变一般分为点突变及缺失突变。目前国内地中海贫血基因诊断的常规检测范围为常见的 3 种缺失型 α-地中海贫血、3 种点突变型 α-地中海贫血和 17 种点突变型 β-地中海贫血,涵盖了中国人群中 95%以上的 α-和 β-地中海贫血致病基因缺陷,但仍有 5%罕见或未知突变未能进行检测[4]。在研究及临床工作中会发现一些基因型与表型不符或者与遗传规律不符的结果,提示该基因型可能是罕见或未知的,如不做进一步检测,则有可能出现误检、漏检等情况,严重时可能会导致重型地中海贫血患儿的出生。本文通过回顾性分析 1 例罕见重型 β-地中海贫血的诊

本文引用格式:梁毅,宁思思,陈晓. 1 例产前诊断罕见 β-地中海贫血的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21): 2676-2679.