

精子形态学分析在诊断男性不育症中的应用

黄美琼,李北坤,陈赞钢(广东省英德市妇幼保健院 513000)

【摘要】 目的 探讨精子形态学分析在诊断男性不育症中的应用。**方法** 选择 2008 年 7 月 1 日至 2010 年 6 月 29 日在英德市妇幼保健院就诊的不孕夫妇,男方至少行精液分析 2 次,在第一次精液分析时即进行精子形态学分析。精液分析采用 JZF-I 型精液分析系统,精子形态学分析采用改良巴氏法染色,应用 Microsort Excel 进行分析。**结果** 进行精液分析共 402 例次,进行精子形态学分析共 173 例次。精子密度 $0\sim180\times10^9/L$,平均 $(55.3\pm32.2)\times10^9/L$,75.1% 的病例精液密度为 $20\sim100\times10^9/L$,仅 13.3% 为少精症,无精症占 1.5%;a 级精子为 $(14.0\pm9.9)\%$,b 级精子为 $(10.6\pm7.8)\%$,a 级+b 级大于 50% 者仅占 0.6%,超过半数的为 30%~50% (51.1%),精子形态学分析,仅有 20.5% 病例是正常的 ($>14\%$)。**结论** 无精症显然与不育相关,精子活动力低下或精子畸形率过高更能预示不孕因素,精液分析和精子形态学分析可以作为男性不育的首要筛查手段,以防止过度治疗。

【关键词】 精液分析; 精子形态; 男性不育; 精子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.04.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)04-0422-02

Application of sperm morphology analysis in diagnosing male infertility HUANG Mei-qiong, LI Bei-kun, CHEN Zhan-gang (Yingde Municipal Maternal and Child Care Service Center, Yingde, Guangdong 513000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the application of sperm morphology analysis to the diagnosis of male infertility. **Methods** The infertile couples in out-patient department from July 1, 2008 to June 29, 2010 were selected. All males underwent semen analysis for at least 2 times and sperm morphology analysis for 1 time. **Results** Total 402 cases of semen analysis and 173 cases of sperm morphology were analyzed. Sperm concentration was $0-180\times10^9/L$, with an average of $(55.3\pm32.21)\times10^9/L$, 75.1% were with in $20-100\times10^9/L$, only 13.3% were oligozoospermia, and azoospermia accounted for 1.5%; 51.1% of the cases had 30%—50% rapid progressive sperms (a grade+b grade), and only 0.6% were normal according to the WHO standard (a grade+b grade $>50\%$). Only 20.5% of the cases had $>14\%$ normal sperm morphology. **Conclusion** Azoospermia is obviously related to infertility. Asthenospermia or high sperm deformity may predict the infertility factors. Analysis of semen and sperm morphology should be used as the first screening method for out-patient infertile couples to prevent excessive treatment.

【Key words】 sperm analysis; sperm morphology; male infertility; sperm

精子形态是受孕过程中起重要作用的参数之一,被认为是评价男性生育中最好的指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 7 月 1 日至 2010 年 5 月 29 日在本院就诊的不孕症夫妇中的男方。

1.2 女方检查方法 排除女方因素导致的不孕,进行白带常规、宫颈支原体 and 衣原体、性激素 6 项、血清抗体检测;B 超监测排卵至少两个周期。

1.3 男方检查方法 精液分析 2 次,并进行精子形态学分析。对怀疑无精子者进行离心沉淀找精子,不计入精子形态学分析统计。

1.4 精液分析 采用 JZF-I 型精液分析系统(由石家庄康普生科技有限公司提供)。患者禁欲 3~4 d,检查当日手淫取精,全部精液收集于干净取精杯内马上送检。精液放置于 37℃ 恒温箱,每 5 min 检查 1 次液化程度,一旦液化马上检查,在 5 min 内完成检测。 >60 min 即使仍然不液化也进行检查。精子活动参数按 WHO 对人类精子的分级标准分为 a 级(快速前向运动)、b 级(慢速或呆滞前向运动)、c 级(非前向运动)、d 级(极慢或不动)4 级。

1.5 精子形态学分析 进行精液分析的同时取精液 10 μ L 在载玻片直接涂片,烘干后染色。采用改良巴氏法,染液包括苏木素、橘黄 G 和 EA50(珠海贝索生物技术有限公司),染色方法按照试剂说明进行,在目镜 10 $\times$ 、物镜 100 $\times$ 条件下观察。精子形态类型标准依据为《世界卫生组织人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册》(第 4 版),进行精子形态学

分析。

2 结 果

应用 Microsoft Excel 进行分析。密度检测显示,75.1% 的病例精液密度为 $(20\sim100)\times10^9/\mu$ L,仅 13.3% 为少精症,无精症占 1.5%,这说明除了无精症显然与不孕相关外,精子密度可能不是评估不孕原因的一个很好的指标。但前向运动精子 a 级为 $14.0\%\pm9.9\%$,b 级为 $10.6\%\pm7.8\%$ 则远低于正常标准,a 级+b 级大于 50% 者仅占 0.6%,半数 30%~50% (51.1%),其余的小于 30%。这说明精子活动力低下更能预示不孕的发生。按照 Tygerberg 标准进行精子形态学分析,仅有 20.5% 是正常的,也证明精子形态学异常可能与不孕相关。

表 1 精子密度

项目	精子密度($\times10^9/L$)			
	0	0~20	20~100	>100
n	6	53	32	41
比例(%)	1.5	13.3	75.1	10.1

表 2 精子活动力分析

项目	a 级+b 级(%)		
	0~30	30~50	>50
n	194	205	3
比例(%)	48.3	51.1	0.6

表 3 正常形态精子百分率

正常形态精子	0	0~15	>15
n	28	306	68
比例(%)	6.6	72.9	20.5

3 讨 论

精液常规分析是用于诊断男性生育最基本的临床指标,精液常规分析只对精液理化性状进行评估,以此来预测男性生育状况很不准确。精子形态是受孕过程中起重要作用的参数之一,被认为是衡量男性生育中最好的指标^[1-2]。形态正常的精子的百分率与受孕有直接关系,比精子密度、精液量、活动率更能在受孕中起预测作用。研究显示精子形态与其功能密切相关。任何精子形态上的缺陷将导致其功能下降,影响男性生育力。

一般男科学认为,生育健康男性精液中正常精子大于 70%,畸形精子少于 20%~40%。畸形精子大于 40%即为畸形精子症,它可能影响生育能力^[3-4]。如畸形精子超子 70%,则属于严重的畸形精子症,会影响男性生殖能力,导致不育。如正常形态小于 15%体外受精极低。各种异常精子形态中,头部畸形比率最高占 50%,大多数畸形精子是顶体异常,这种精子很难穿透卵子透明带,精子缺失后顶体就不能与卵子结合,妨碍受精过程,或受精失败。睾丸疾病、睾丸功能低下是畸形精子发生的主要原因^[5]。附睾的分泌不足,使精子不能进一步成熟,造成精子顶头不足,畸形;尾部卷曲,胞质不能浓缩排出,而残存胞质小体,颈部膨大,折头;尾部成熟不足,引起运动过小、过大、转圈运动等。当解脲支原体感染时,精子表现为光

头、头尾折角、卷尾^[6]。有资料显示,精子正常形态率与不良孕史密切相关。精子畸形率高会导致习惯性流产、胎儿停止发育、胎儿畸形等。测定精子正常形态率可为不良孕产史夫妇查找病因,作为临床诊治的依据。

因此,精子形态染色在临床男性不育的诊断中占有重要地位。在进行常规精液分析时,增加形态学染色项目,对男性不育患者的诊治有很大帮助,有助于临床为不孕患者选择助孕方式,为有不良孕产史夫妇查找病因,作为临床诊治的依据。

参考文献

[1] 黄宇烽. 男性病实验诊断手册[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1993.

[2] 黄平怡,李永梅. 男性不育[M]. 北京:中国科学技术文献出版社,1990.

[3] 徐建平,徐元诚,黄宇烽. 精液参数分析的几种方法比较与评价[J]. 生殖与避孕,1997,17(5):2.

[4] Weber RF,Dohle GR,Momijn JC. Clinica laboratory evaluation olnalc subfertility[J]. Adv Clin Chem, 2005, 40: 317-364.

[5] Gomendio M,Malo AF,Garde J,et al. Male fertility sperm traits and male fertiltuty in natural populations[J]. Reproduction,2007,134:19-29.

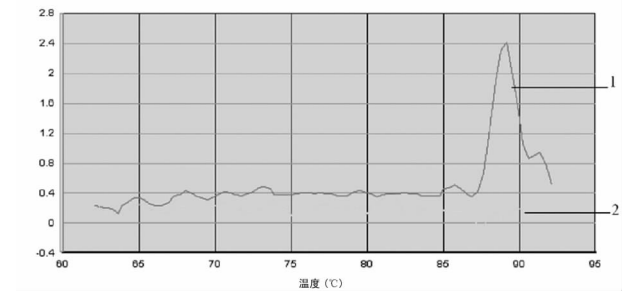
[6] 袁祖立,杨楷. 不育男性精子分析[J]. 临床和实验医学杂志,2006,5(9):1381.

(收稿日期:2010-10-29)

(上接第 421 页)

出现荧光最高吸收峰,而阴性标本在该温度无此峰。

2.3 重复性测定 18 次测定该标本 Ct 值分别为 23. 80、27. 97、25. 38、27. 60、27. 61、27. 16、23. 11、27. 78、28. 35、20. 52、23. 76、21. 18、25. 01、25. 23、25. 19、26. 93、25. 74、25. 73。经过正态检验得: $P=0. 2>0. 05$,为正态分布,算术均数为 25. 45,标准差值为 2. 28,变异系数值为 9. 0%。



注:1 为阳性标本的融解曲线;2 为阴性对照的融解曲线。

图 2 融解曲线

3 讨 论

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因^[1]。野生型 p53 参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程。DNA 损伤是 p53 较常见的一种功能改变。由于 DNA 损伤不同于点突变,难于采用传统的限制性酶切或 SSCP 等方法确认。本文中作者结合实时荧光定量 PCR 针对 p53 基因的第 8 进行定量扩增,当发生 DNA 损伤的时候,定量水平就发生相应的下降。通过建立这样的定量方法就可以有效的检测 p53 基因的损伤程度。通过对同一标本的重复测定,说明该方法有一定的可靠性,且该方法简便,只需进行一次 DNA 的扩增即可发现异常。为 p53 基因 DNA 损伤的

研究提供了一条新思路。

作者采用的是 SYBRGreenI 染料标记的实时荧光定量方法,由于该染料是非特异性的与双链 DNA 结合,因此在反应过程中产生的少量引物二聚体也可能对结果造成干扰。为了消除干扰,作者又在 65℃~93℃对产物进行了融解曲线的测定,发现在 89℃附近有一个由产物形成的荧光峰,因此又在循环过程中在 89℃时增加 5 s 的停留,因为 5700 扩增仪是在循环的最后一步记录荧光,这一措施有效地消除了引物二聚体对反应的干扰。这一措施在目前的 SYBRGreenI 染料标记的实时荧光定量方法中尚很少见报道,具有一定的创新性和可实施性。PCR 技术由于具有高敏感性,往往出现污染问题,作者在实验过程中充分考虑到了该问题,首先是根据卫生部对 PCR 实验室的要求对实验室进行合理分区,实验用器械均专室专用,实验室具备完整的防污染规章制度,并且获得了卫生部技术验收合格证书。检测过程中设立了阴性对照,证明实验过程中无污染。

SYBRGreenI 染料标记的实时荧光定量 PCR 技术,直接检测 PCR 过程中荧光信号的变化使 PCR 的扩增及其分析过程的均在同一封闭系统下完成,只需加样时打开一次 PCR 反应管,其后的过程完全是闭管操作,免除了标本和产物的污染,且无复杂的产物后续处理过程,高效、快速,并在电脑分析软件支持下实现对 PCR 扩增产物的动态监测和自动定量;荧光染料能监测任何 dsDNA 序列的扩增,不需要设计探针,使检测方法变得简便化,同时也降低了检测的成本。

参考文献

[1] 付春华,陈孝平,余龙江,等. 实时荧光定量 PCR 的应用和进展[J]. 激光生物学报,2005,14(6):466-471.

(收稿日期:2010-08-26)