

男性不育患者精液活性氧和精浆丙二醛测定临床价值研究^{*}

游永强¹, 龚道元², 李子萍², 康梅², 庄锡伟³ (1. 广东省佛山市南海经济开发区人民医院官窑分院 528000; 2. 广东省佛山市科学技术学院医学院 528000; 3. 广东省佛山市禅城区中心医院 528000)

【摘要】 目的 探讨男性不育患者精液活性氧(ROS)和精浆丙二醛(MAD)测定的临床价值。**方法** 选择有生育力的男性健康对照组 50 例, 男性不育症组 270 例, 化学发光法测定精液 ROS, 生化比色法测定精浆中的 MAD。**结果** 参数正常男性不育组和参数异常男性不育组精液 ROS 分别为 (39.28 ± 3.57) RLU/S 和 (79.77 ± 4.32) RLU/S, 均明显高于健康对照组精液 ROS (17.16 ± 2.84) RLU/S, 参数异常男性不育组精浆 MAD 为 (27.81 ± 3.93) nmol/mL, 明显高于健康对照组精浆 MAD (5.40 ± 1.12) nmol/mL。白细胞精子症组、畸形精子症组及轻度、中度、重度弱精子症组精液 ROS 和精浆 MAD 的水平明显高于健康对照组, 随着精子活动力下降, 精液中 ROS 和精浆中的 MAD 的水平依次升高, 以上结果差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** ROS 是影响男性不育的一个重要病因和病理因素, 对男性不育患者精液 ROS 和精浆 MAD 检测具有重要的临床意义。

【关键词】 男性不育; 精液; 活性氧; 丙二醛

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.17.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)17-2113-02

The clinical value of determination of reactive oxygen species and seminal plasma malondialdehyde in male sterility patients semen* YOU Yong-qiang¹, GONG Dao-yuan², LI Zi-ping², KANG Mei³, ZHUANG Xi-wei³ (1. Foshan Nanhai Guanyao Economic Development Zone People's Hospital of Guanyao Branch, Guangdong 528000, China; 2. Medical College, Foshan University of Science and Technology, Guangdong 528000, China; 3. Central Hospital of Foshan Chancheng District, Guangdong 528000, China)

【Abstract】 Objective To explore the clinical value of semen ROS and seminal plasma MAD determination. **Methods** Fertility of male healthy control group of 50 cases, 270 cases of male infertility group were selected, semen ROS was detected by chemiluminescence method, MAD in the seminal plasma was detected by biochemical colorimetric. **Results** Semen ROS of normal parameters group and abnormal parameters group were (39.28 ± 3.57) and (79.77 ± 4.32) RLU/S, respectively, these were significantly higher than that in healthy control group (17.16 ± 2.84) RLU/s. Abnormal parameters group seminal plasma MAD was (27.81 ± 3.93) mmol/mL, it was significantly higher than healthy control group (5.40 ± 1.12) mmol/L. Semen ROS and seminal plasma MAD of Azoospermia group of white blood cells, abnormal sperm group and mild, moderate or severe asthenozoospermia groups were significantly higher than healthy controls. With the sperm motility declining, semen ROS and seminal plasma in the MAD level increased successively, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** ROS is an important cause and pathological factor for affecting male infertility, semen ROS and seminal plasma MAD detection have important clinical significance in male infertility.

【Key words】 male infertility; semen; reactive oxygen species; malondialdehyde

活性氧(reactive oxygen species, ROS)也称氧自由基, 是一些具有比氧更活跃的化学反应性的氧化代谢产物及其衍生的含氧物质^[1]。研究发现精液高水平 ROS 是导致男性不育的重要原因之一^[2]。丙二醛(malondialdehyde, MDA) 是 ROS 攻击精子细胞膜中的多聚不饱和脂肪酸产生的脂质过氧化物产物之一, 是脂质过氧化损伤严重程度的指标^[3]。本研究通过测定男性不育患者精液中的 ROS 和精浆中 MAD 水平, 探讨 ROS 和 MAD 水平在男性不育症中的作用及它们间相互关系, 从多角度为临床对男性不育的诊断提供分子水平的实验室证据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 男性不育患者均来自佛山市禅城区中心医院男性科不育门诊就诊男性不育症患者 270 例, 年龄 22~36 岁, 平均 (27.0 ± 4.5) 岁, 婚后性生活正常, 未避孕 2 年以上不育, 无创伤及遗传性疾病病史, 无性功能障碍病史, 体检未发现有

明显睾丸、附睾及输精管异常, 女方生育能力经检验排除异常。健康对照组来自有子女自愿献精者, 年龄 24~38 岁, 平均 (27.5 ± 4.7) 岁。

1.2 分组 (1)健康对照组 50 例: 精子密度大于或等于 $20 \times 10^9/L$, 精子存活率大于 60%, a 级精子大于 25% 或 (a+b) 级精子大于 50%, 正常形态的精子大于 30%, 有生育史; (2)参数正常不育组 21 例, 主要指精子密度、存活率、活力、正常形态及白细胞等几个指标中参数全部正常; (3)参数异常男性组 79 例, 主要指精子密度、存活率、活力、正常形态及白细胞等几个指标中一个或几个不正常; (4)白细胞精子症组 52 例, 精液中白细胞大于 $1.0 \times 10^9/L$; (5)畸形精子组 30 例, 正常形态的精子小于 30%; (6)轻度弱精子症组 27 例, (a+b) 级精子为大于或等于 30% 并小于 50%; (7)中度弱精子组 42 例, (a+b) 级精子为大于或等于 10% 并小于 30%; (8)重度弱精子症组 19 例,

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(9152902001000017)。

(a+b)级精子小于 10%。

1.3 主要仪器与试剂

1.3.1 仪器 WLJY-9000 型伟力彩色精子质量分析系统(南昌长征医疗科技发展有限公司)。

1.3.2 试剂 鲁米诺和Ⅵ型辣根过氧化物酶均购自美国 Sigma 公司;MDA 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 精液标本采集与处理

1.4.1 精液标本采集 所选受试者禁欲 2~7 d,于医院处置室内手淫取精,置干燥无菌量杯内,37 ℃ 水浴箱内液化,并记录液化时间。

1.4.2 精浆标本制备 精液以 3 000 r/min 离心 15 min,取上层精浆于一 40 ℃ 保存待测。

1.5 指标测定

1.5.1 精子密度、活力等指标测定 采用国产 WLJY-9000 型伟力彩色精子质量分析系统测定精子密度、活力等指标。

1.5.2 精子形态检查 按照世界卫生组织(WHO)标准采用改良巴氏染色法进行染色,用国产 WLJY-9000 型伟力彩色精子形态检测系统下人工修正方法进行精子形态分析。为提高准确率,同一份精液标本需 2 位专业检测人员进行形态分析。

1.5.3 精子存活率测定 采用伊红 Y 染色,被染色的精子为死精子,透明未被染色的精子为活精子,用 WLJY-9000 型伟力彩色精子质量分析系统计数 200 个精子,计算精子存活率。

1.5.4 精液 ROS 测定 参考赵洪鑫等^[4]介绍测定方法。用化学发光法检测精液 ROS 水平,将 400 μL 完全液化后的精液加入一次性照度计容器内,取 4 μL 鲁米诺储存液,同时加入 8 μL 辣根过氧化物酶(12.4 U 的Ⅵ型辣根过氧化物酶,310 U/mg)。使用 Berthold 照度计检测化学发光信号约 5 min,直至其达到稳定。为了平衡精子密度对各组 ROS 水平带来的混杂作用,按照下式计算调整各组 ROS 水平:平衡精子密度后的 ROS=相对化学发光强度(RLU/s)×(20×10⁶)/精子密度(精子数/mL)×0.4 mL,计算后的 ROS 单位为 RLU/s 每 20×10⁶ 精子。

1.5.5 精浆 MDA 测定 采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。按操作说明书操作,用分光光度计读取吸光度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均值比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 参数正常及异常不育组与健康对照组精液 ROS、精浆 MAD 结果比较 不育组精液 ROS 均明显高于健康对照组(*P*<0.01);参数异常不育组精液 ROS 高于参数正常不育组(*P*<0.01)。参数正常不育组精浆 MAD 高于健康对照组,两组之间的差异无统计学意义(*P*>0.05);参数异常不育组精浆 MAD 明显高于健康对照组(*P*<0.01),参数异常不育组精浆 MAD 高于参数正常不育组(*P*<0.01),见表 1。

表 1 参数正常及异常不育组与健康对照组精液 ROS、精浆 MAD 结果比较($\bar{x} \pm s$)

患者组别	<i>n</i>	精液 ROS(RLU/s)	精浆 MDA(nmol/mL)
健康对照组	50	17.16±2.84	5.40±1.12
参数正常不育组	21	39.28±3.57 ^a	9.07±1.90 ^b
参数异常不育组	79	79.77±4.32 ^{ac}	27.81±3.93 ^{ac}

注:与健康对照组比较,^a*P*<0.01,^b*P*>0.05;与参数正常男性不育组比较,^c*P*<0.01。

2.2 畸形精子症组、白细胞精子症组与健康对照组精液 ROS、精浆 MAD 结果比较 两组精液 ROS 和精浆 MAD 明显

高于健康对照组(*P*<0.01);白细胞精子症组精液 ROS 和精浆 MAD 均明显高于畸形精子症组(*P*<0.01),见表 2。

表 2 不同精子症不育组与健康对照组精液 ROS、精浆 MAD 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	精液 ROS(RLU/s)	精浆 MAD(nmol/mL)
健康对照组	50	17.16±2.84	5.40±1.12
畸形精子症组	30	434.71±7.34 ^a	22.15±1.94 ^a
白细胞精子症组	52	813.52±10.64 ^{ab}	55.76±3.96 ^{ab}

注:与健康对照组比较,^a*P*<0.01;与畸形精子症组比较,^b*P*<0.01。

2.3 不同精子活力不育组与健康对照组精液 ROS、精浆 MAD 结果比较 不同精子活力不育组精液 ROS 和精浆 MAD 均明显高于健康对照组(*P*<0.01);轻度弱精子症组、中度弱精子症组和重度弱精子症组随着精子活力降低,ROS 和 MAD 都升高,组间结果差异有统计学意义(*P*<0.01),见表 3。

表 3 不同精子活力不育组及健康对照组精液 ROS、精浆 MAD 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	精液 ROS(RLU/s)	精浆 MAD(nmol/mL)
健康对照组	50	17.16±2.84	5.40±1.12
轻度弱精子症组	27	35.21±3.93 ^a	15.25±2.87 ^a
中度弱精子症组	42	67.77±5.61 ^{ab}	25.76±3.96 ^{ab}
重度弱精子症组	19	98.43±6.63 ^{abc}	46.75±4.83 ^{abd}

注:与健康对照组比较,^a*P*<0.01;与轻度弱精子症组比较,^b*P*<0.01;与中度弱精子症组比较,^c*P*<0.01。

3 讨 论

有研究报道 25%~40% 的不育男性精液中可检测到高水平的 ROS,高水平的 ROS 是导致男性不育的重要原因。本研究结果显示,男性不育组精液 ROS 活性明显高于健康对照组,提示精液 ROS 活性测定对男性不育的诊断具有重要临床价值;另外,本研究还发现参数异常男性不育组精液 ROS 活性明显高于参数正常男性不育组,说明 ROS 除影响常规精液参数外,还可通过其他机制导致男性不育,ROS 有可能作为一个独立的指标指导男性不育的诊断。MDA 是 ROS 与细胞多不饱和脂肪酸发生过氧化反应的主要产物,是脂质过氧化损伤严重程度的指标,对细胞具有毒性作用,使精子活力丧失^[5]。本研究结果还显示,参数异常男性不育组精浆 MAD 明显高于健康对照组,与精液 ROS 活性测定结果平行,结果提示精浆 MAD 可间接反映精液 ROS 活性和生殖系统受损程度;参数正常男性不育组精浆 MAD 高于健康对照组,但差异无统计学意义,提示精液 ROS 活性测定比精浆 MAD 测定更有价值,更加准确反映精子氧化应激状态。

精液中 ROS 的来源主要包括形态异常精子、生精细胞和白细胞,其中白细胞和形态异常精子是人精液中 ROS 的主要来源,精液中的白细胞含量增加是导致 ROS 增高的重要原因之一。本研究中白细胞精子症组精液中 ROS 和精浆中 MAD 水平明显高于健康对照组,可能一方面是由于白细胞本身大量产生 ROS,另一方面则与白细胞抑制 ROS 清除酶(如谷胱甘肽)等有关。

本研究结果表明,畸形精子组精液 ROS 和精浆 MAD 显著高于健康对照组,与文献[6]报道一致,畸(下转第 2117 页)

方法或检测系统得到可靠测量结果的范围^[7]。它是反映仪器及分析方法分析性能的重要指标,也是保证临床检测结果准确、可靠的前提,更是建立临床可报告范围的基础。通过线性验证实验,实验室可证实检测系统的线性性能、决定其测量范围、核实校正的正确性、发现试剂的变质和检验结果的精确度等^[3]。

CAP 对临床开展的一些检测项目提供线性验证品,并对线性结果利用多项式回归方法判定线性,但我国还没有临床化学发光免疫检验的线性验证品。选择低浓度和高浓度患者标本按适当比例关系配制形成系列浓度血清,在检测系统上进行测定,将实测值与预期值作比较,确定 THCG 的 AMR,方法简便实用^[6-8]。实验表明,THCG 的 AMR 为 1.7~995.0 mIU/mL,与厂商声明的线性范围 2~1 000 mIU/mL 基本一致。

CRR 即定量检测项目向临床所能报告的结果范围,患者标本可经稀释、浓缩或其他处理,有别于 AMR。CAP 要求定量检测项目须进行 AMR 验证实验,即线性验证实验,并确定每个项目的 CRR。此后每半年至少进行一次线性验证实验,而 CRR 一经确定、不需更改^[3]。本研究进行 CRR 验证实验时先进行最大允许稀释度实验,因其是进行功能灵敏度、CRR 实验的前提。在 AMR 内选择 3 份不同浓度高值标本,按实验方法稀释后计算稀释回收率,结果 3 份标本的最大稀释度为 1:200,与检测系统的最大自动稀释倍数一致。结合功能灵敏度 2.6 mIU/mL,AMR 上限 995.0 mIU/mL,故本检测系统测定 THCG 的 CRR 为 2.6~199 000 mIU/mL。但值得注意的是各浓度水平在不同稀释条件下所得的稀释回收率,随着稀释倍数的逐渐增加,稀释回收率也有逐渐增加趋势甚至可达到约 20%的正偏差。在临床应用中,THCG 的高值更具诊断、监测和治疗意义,对于妊娠 3~4 周妇女 THCG 的浓度很可能大于 1 000 mIU/mL,必须经过稀释才能得到准确结果,但当原始浓

度大于 1 000 mIU/mL 时,即使进行 1:5 倍稀释,所得结果也将产生约 10%的偏差,若进行 1:200 的稀释,结果将产生约 20%的偏差,在临床应用时必须引起注意。由此可见,对于高值检测有重要意义的检测项目都应验证或建立其临床可报告范围,才能更好地保证检验质量,为临床提供准确有效的信息。

参考文献

[1] 魏昊,丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京:中国计量出版社,2004:59-75.
[2] Department of Health and Human Services, Centers for Medicare and Medicaid Services. Clinical laboratory improvement amendments of 1988: final rule[M]. Fed Register, 2003;3704.
[3] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.
[4] 张秀明,郑松柏,庄俊华,等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证方案与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1293-1297.
[5] 王秀萍,焦琳,郭红燕. 人绒毛膜促性腺激素的临床应用进展[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(3): 185-189.
[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP-6A User demonstration of performance for precision and accuracy [S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
[7] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 168-195.
[8] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2004: 96-108.

(收稿日期:2012-02-18)

(上接第 2114 页)

形精子可产生过量的 ROS,ROS 对成熟精子的氧化损伤可能是男性不育的重要原因。表 2 结果显示,白细胞精子症组精液 ROS 和精浆 MAD 水平明显高于畸形精子组,也证实了精液中白细胞计数增高是导致 ROS 升高的主要原因。

在男性生殖道中,适量低浓度的 ROS 对精子有着重要的生理作用^[7],如精子的高活跃性运动、获能及完成顶体反应等;但是过多 ROS 可引起氧化应激,导致精子运动能力下降甚至丧失,本研究结果也证实了这点。轻度弱精子症组、中度弱精子症组及重度弱精子症组精液中 ROS 和精浆中的 MAD 的水平明显高于健康对照组,随着精子活动力下降,精液中 ROS 和精浆中的 MAD 的水平也依次升高。ROS 导致精子运动力下降的机制主要有:(1)过多的 ROS 引起精子细胞膜脂质的过氧化及链式反应,产生过多 MAD,造成精子膜硬度增加,膜流动性减弱,使精子膜的超微结构损伤,精子运动能力下降甚至丧失^[8];(2)精子线粒体是提供精子运动的源泉,过多的 ROS 也会导致精子线粒体的超微结构损伤,影响到精子运动能力;(3)ROS 也会引起三磷酸腺苷耗竭,从而导致精子活动力丧失。

综上所述,ROS 是影响男性不育的一个重要病因和病理因素,对男性不育患者精液 ROS 和精浆 MAD 进行检测具有重要的临床意义。

参考文献

[1] 郝新霞,杨敬英,龚道元. 活性氧与男性不育相关研究进

展[J]. 医学综述杂志, 2011, 17(18): 2726-2729.
[2] Agarwal A, Sharma RK, Nalljella KP, et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility [J]. Fertil Steril, 2006, 86(4): 878-885.
[3] Andrew Gallardo JM. Evaluation of antioxidant system in normal semen[J]. Rev Invest Clin, 2007, 59(1): 42-47.
[4] 赵洪鑫,史庭燕,时伟丽,等. 应用化学发光法检测男性不育人群精液活性氧水平[J]. 中国男科学杂志, 2009, 23(4): 14-17.
[5] Andrew CW, Wiliam CLF. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function[J]. Fertil Steril, 2005, 83(4): 929-936.
[6] Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, et al. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress[J]. Asian J Androl, 2004, 6(4): 313-318.
[7] 焦瑞宝,唐吉斌. 氧化应激与男性不育[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 13-15.
[8] Venret P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 216(1/2): 31-39.

(收稿日期:2012-05-12)