

精浆天门冬氨酸氨基转移酶及其线粒体同工酶检测与精子膜功能完整性的关系^{*}

彭 明,顾向明,梁有娣(广州中医药大学附属中山市中医院检验科,广东中山 528401)

【摘要】 目的 对精浆天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及其线粒体同工酶(m-AST)的活性进行检测,并分析AST和m-AST活性与精子膜功能完整性的相关性。**方法** 122例精液标本,分别检测精浆AST和m-AST活性,用低渗肿胀-伊红Y结合试验(HOS-EY)检测精子头-尾膜完整性,用琥珀酸脱氢酶(SDH)染色法检测精子线粒体SDH,同时分析AST和m-AST活性与精子膜功能完整性的相关性。**结果** 精浆AST与m-AST的活性分别为 (238 ± 125) U/L和 (147 ± 79) U/L,两者呈明显正相关性($r=0.740,P=0.000$)。AST和m-AST活性均与(I+II+III)型精子呈明显正相关性($r=0.443,P=0.013;r=0.691,P=0.000$)。AST和m-AST活性均与IV型精子呈明显负相关性($r=-0.439,P=0.013;r=-0.689,P=0.000$)。AST活性与精子SDH阳性率无明显相关性($r=-0.187,P=0.313$),而m-AST活性与精子SDH阳性率呈明显负相关性($r=-0.471,P=0.007$)。**结论** 精浆AST和m-AST活性与精子膜功能完整性具有相关性,而m-AST活性检测更适合评价精子膜受损程度以及精子线粒体受损状况。

【关键词】 天门冬氨酸氨基转移酶; 同工酶; 精子膜功能; 完整性; 精浆
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)05-0515-03

Determination of seminal AST and m-AST activities and their relationship with functional integrity of human sperm membrane^{*} PENG Ming, GU Xiang-ming, LIANG You-di (Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital of TCM, Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan, Guangdong 528401, China)

【Abstract】 Objective To determine the seminal aspartate aminotransferase (AST) and mitochondrial AST (m-AST) activity, and to analyze their relationship with the functional integrity of human sperm membrane. **Methods** AST and m-AST activities in 122 samples of seminal plasma were measured. The sperm head membrane and tail membrane integrity were detected by the combined hypoosmotic swelling and eosin Y exclusion test (HOS-EY). The mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) of sperm was detected by the SDH dyeing method and the correlation between seminal AST or m-AST activity with the functional integrity of human sperm membrane. **Results** The AST and m-AST activities were (238 ± 125) U/L and (147 ± 79) U/L respectively, there was significant positive correlation between them ($r=0.740, P=0.000$). Both seminal AST and m-AST activities had obvious positive correlation with type I and II and III sperms ($r=0.443, P=0.013; r=0.691, P=0.000$). Both seminal AST and m-AST activities had obvious negative correlation with type IV sperm ($r=-0.439, P=0.013; r=-0.689, P=0.000$). There was no obvious correlation between AST activity and sperm SDH positive rate ($r=-0.187, P=0.313$), but seminal m-AST activities had significant negative correlation with sperm SDH positive rate ($r=-0.471, P=0.007$). **Conclusion** The seminal AST and m-AST activities have significant correlation with the functional integrity of human sperm membrane. The determination of m-AST activity is more suitable for evaluating the damage degree of sperm membrane and sperm mitochondria.

【Key words】 aspartate aminotransferase; isozyme; sperm membrane function; integrity; seminal plasma

男性不育是生育异常中较为常见的问题,而且病因复杂。多年来,传统的精液常规分析一直是用于判断男性生育力的最基本临床指标,但在临床上往往忽略了精子相关功能的检查,特别是精子膜功能的完整性。已有研究表明,其完整性与精子新陈代谢、顶体反应、精子获能、精卵融合、受精卵着床及胚胎植入密切相关^[1-3]。现时评价精子膜功能完整性的传统方法有伊红Y染色法(EY)、水试验法和低渗肿胀法(HOS)等,但上

述方法只是通过精子膜的受损来揭示精子膜功能的完整性,未能同时揭示精子线粒体的受损状况。目前,采用传统方法评价精子膜功能的完整性已成为部分男科学实验室的常规检测项目,但采用精浆天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及其线粒体同工酶(m-AST)评价精子膜功能完整性的研究报道较少。因此,作者将试剂盒法所测的精浆AST与m-AST活性,以及两者与精子膜功能完整性的相关性进行了比较,现报道如下。

^{*} 基金项目:广东省中山市科技计划项目资助课题(NO. 20102A061)。

1 资料与方法

1.1 研究对象 122 例精液样本来自本院 2012 年 6 月男科门诊患者,年龄 20~43 岁,平均 31 岁。

1.2 仪器 HITACHI 7600-120 全自动生化分析仪;Olympus CX41 显微镜。

1.3 试剂 柠檬酸钠购于广州化学试剂厂;果糖购于 Chem-base 公司;伊红 Y、琥珀酸钠购于汕头西陇化工股份有限公司;硝基四氮唑蓝(NBT)、二甲亚砜购于 Sigma 公司;AST 速率法试剂盒购于日本和光公司;AST 标准品和质控液购于英国朗道公司;m-AST 免疫抑制法试剂盒、标准品、质控品购于上海北加生化试剂有限公司。

1.4 精液标本采集与处理 所有研究对象均禁欲 2~3 d,手淫法留取精液标本于洁净的玻璃容器中,置 37 ℃ 水浴箱内液化。待精液液化后,一部分精液用低渗肿胀-伊红 Y 结合试验(HOS-EY)检测精子头-尾膜完整性,用琥珀酸脱氢酶(SDH)染色法检测精子线粒体 SDH;另一部分精液标本置 3 500 r/min 离心 15 min 分离精浆,检测精浆 AST 和 m-AST 活性。

1.5 HOS-EY 结合试验 实验方法及试剂配制见文献[4]。取 0.1 mL 精液加入 1 mL 低渗液中,混匀。37 ℃ 水浴 30 min 后,加入 0.1 mL 伊红低渗液,混匀。2 min 后吸取 10 μL 的精液滴在洁净的载玻片上,再盖上一张 22 mm×22 mm 的盖玻片,置光镜(×400)观察每条精子头部着色和尾部肿胀情况,随机计数 200 条精子,计算 4 种类型精子的百分率。4 种精子分型如下,Ⅰ型:头红染(EY+)-尾不肿胀(HOS-),为头膜-尾膜均损伤的精子。Ⅱ型:头未染色(EY-)-尾不肿胀(HOS-),为头膜完整-尾膜损伤的精子。Ⅲ型:头红染(EY+)-尾肿胀(HOS+),为头膜损伤-尾膜完整的精子。Ⅳ型:头未染色(EY-)-尾肿胀(HOS+),为头膜-尾膜均完整的精子。见图 1。

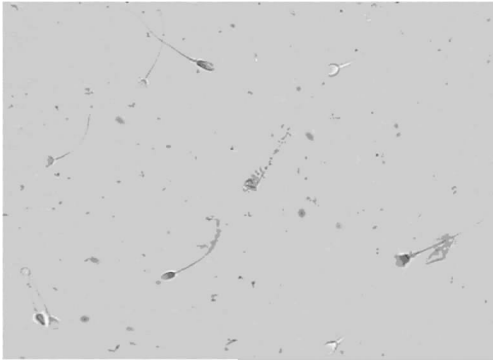


图 1 精子头部着色和尾部肿胀情况观察

1.6 精子线粒体 SDH 检测 SDH 作用液配制见文献[5];新鲜精液标本液化后用生理盐水洗涤 3 次,用适量生理盐水配成精子悬液;取已在 37 ℃ 预温 30 min 的 SDH 作用液 450 μL,加入到 5 mL 小试管中,然后加入 50 μL 精子悬液,37 ℃ 水浴 3 h,再将含有精子悬液的作用液混匀,取 5 μL 涂于洁净的载玻片上,自然晾干后树脂封片,油镜下观察 200 个精子中颈部(线粒体所在部位)有蓝紫色颗粒沉着的精子所占百分率,即为精子 SDH 阳性率,见图 2。

精子中段有蓝紫色颗粒沉着为精子 SDH 阳性,精子中段未着色为 SDH 阴性。

1.7 精浆 AST 活性的检测 精浆 AST 活性检测采用速率法

试剂盒,精浆标本在生化分析仪上直接测定 AST 活性,重复测定两次,结果取平均值,同时测定质控品。

1.8 精浆 m-AST 活性的检测 精浆 m-AST 活性检测采用免疫抑制法试剂盒,精浆标本在生化分析仪上直接测定 m-AST 活性,重复测定两次,结果取平均值,同时测定质控品。



图 2 精子线粒体琥珀酸脱氢酶的观察

1.9 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。精浆 AST 和 m-AST 与精液参数的相关性均采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精浆 AST 与 m-AST 活性的相关性比较 122 例精浆 AST 与 m-AST 的活性分别为 (238 ± 125) U/L 和 (147 ± 79) U/L,两者呈明显正相关性($r = 0.740, P = 0.000$)。

2.2 精浆 AST 和 m-AST 活性与精子膜功能完整性的相关性分析 122 例精液中(Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ)型精子比率为 $(62.58 \pm 15.21)\%$,Ⅳ型精子比率为 $(37.45 \pm 15.22)\%$,精子 SDH 阳性率为 $(58.86 \pm 19.34)\%$ 。精浆 AST 和 m-AST 活性与精子膜功能完整性的相关性见表 1。

表 1 精浆 AST、m-AST 活性与精子膜功能完整性的相关性($n = 122$)

参数	AST 活性		Am-AST 活性	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
(Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ)型精子	0.443	0.013	0.691	0.000
Ⅳ型精子	-0.439	0.013	-0.689	0.000
精子 SDH 阳性率	-0.187	0.313	-0.471	0.007

3 讨论

精子膜是精子最外面的一层细胞结构,对精子内外环境起着生理屏障作用,但它易受到外界各种物质的刺激,影响精子活力和新陈代谢,所以其完整性关系到受精的全过程,其功能的优劣直接反映精子的功能状况^[3]。自 Jeyendran 等建立精子尾部低渗肿胀试验以来,此方法在评价精子功能方面得到广泛应用,尤其对评价精子膜功能的完整性具有重要意义。而低渗肿胀试验、伊红 Y 染色法等试验只是通过精子膜的受损来评价精子膜的完整性,未能反映精子膜的受损程度以及揭示精子线粒体受损状况。

精子尾部中段的线粒体鞘是细胞呼吸链酶系集中的地方,当精子线粒体受到损害时,其酶逸入精浆中,使精子呼吸链的酶系统失调,其能量代谢的氧化磷酸化过程中断,能量来源断

绝,导致精子运动能力减弱甚至死亡。已有研究表明,精子质膜的破坏必然伴随着精子内容物的丢失,其中包括酶的渗漏^[6-8]。在人类和哺乳动物的精子中存在着 AST 及其同工酶^[8]。它具有两种同工酶,一种主要分布于胞质中称胞质 AST(cytosolic AST,c-AST),一种紧密附着于线粒体上称线粒体型 AST(mitochondrial AST,m-AST)。在精子轻度损伤时,主要是细胞质内的 c-AST 透过精子膜释放入精浆,而线粒体内的 m-AST 有两层线粒体膜的保护,不易释放入精浆。当精子坏死,线粒体崩解时,附着在线粒体上的 m-AST 大量释放入精浆,导致精浆中 m-AST 急剧升高。所以精浆中 m-AST 不仅能反映精子膜的受损,更能反映精子坏死的严重程度。

作者在前期采用速率法试剂盒对精浆 AST 活性进行了方法学评价^[9-10],而本实验对精浆 AST 和 m-AST 活性进行测定,发现精浆中存在 AST 和 m-AST 活性,平均活性分别为(238±125)U/L 和(147±79)U/L,两者呈明显正相关性($r=0.740,P=0.000$),反映了精子膜的受损伴随着 AST 和 m-AST 的渗漏。与 HOS-EY 实验结果比较表明:精浆 AST 和 m-AST 活性均与(I+II+III)型精子呈明显正相关性,由于精子头部或(和)尾部受损,精子内 AST 和 m-AST 渗漏到精浆中,说明了精子膜功能不完整性与 AST 和 m-活性具有相关性,AST 和 m-AST 活性越高,(I+II+III)型精子数量就越多;而精浆 AST 和 m-AST 活性均与 IV 型精子呈明显负相关性,进一步说明了精子膜功能完整性与 AST 和 m-AST 的相关性。有研究表明精浆中 AST 活性的增加是线粒体受损害所致^[11],本实验结果显示精浆 AST 活性与精子 SDH 阳性率呈无明显相关性,而精浆 m-AST 活性与精子 SDH 阳性率呈明显负相关性,说明了精浆 m-AST 活性越高,精子 SDH 阳性率就越低,精子膜不仅受损,而且它受损严重并累及线粒体受到损害,反映了精液质量的严重程度。

总之,本实验的结果显示,通过对精浆 AST 和 m-AST 活性的检测能反映精子膜功能的完整性,而 m-AST 活性检测更适合评价精子膜受损程度以及精子线粒体受损状况。

参考文献

[1] Katsoff D, Check ML, Check JH. Evidence that sperm

with low hypoosmotic swelling scores cause embryo implantation defects[J]. Arch Androl, 2000, 44(3): 227-230.

[2] Patankar SS, Deshkar AM, Sawane MV, et al. The role of hypo-osmotic swelling test in recurrent abortions[J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2001, 45(3): 373-377.

[3] 岳林. 精子膜完整性与精子功能评估的相关性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2005, 13(6): 363-364.

[4] 丰一兴, 朱伟杰. 应用人精子头-尾膜完整性试验对生育力组及不育组精液的评价[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(2): 101-102.

[5] 熊承良, 吴明章, 刘继红, 等. 人类精子学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 416.

[6] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation[J]. J Androl, 1992, 13(3): 232-241.

[7] Mortimer D, Bramley TA. Glutamic-oxalacetic transaminase leakage from human spermatozoa as an indicator of cryodamage [J]. Arch Androl, 1981, 6(4): 337-341.

[8] Mortimer D, Johnson AV, Long-Simpson LK. Glutamic-oxaloacetic transaminase isozymes in human seminal plasma and sperm extracts[J]. Int J Fertil, 1988, 33(4): 291-295.

[9] 彭明, 顾向明. 精浆天门冬氨酸氨基转移酶活性检测及方法学评价[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(5): 516-517.

[10] 彭明, 顾向明. 不同保存温度对精浆天门冬氨酸氨基转移酶活性和稳定性的影响[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(8): 901-904.

[11] Roychoudhury PN, Gowda HC, Pareek PK. Effect of different glycerol levels on the release of glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) from deep frozen ram spermatozoa [J]. Andrologia, 1975, 7(3): 211-215.

(收稿日期: 2012-08-19 修回日期: 2012-12-04)

(上接第 514 页)

anti-double-stranded DNA antibody[J]. Clin Exp Rheumatol, 2002, 20(1): 13-18.

[5] 苏茵, 韩蕾, 栗占国, 等. 抗核小体抗体测定在系统性红斑狼疮诊断中的意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(8): 474-477.

[6] 郝进, 郝飞, 钟白玉, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血单一核细胞核小体释放水平及其临床意义[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(7): 372-374.

[7] Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsD-

NA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis[J]. Autoimmun Rev, 2012, 12(2): 97-106.

[8] Monestier M. Autoantibodies to nucleosomes and histone-DNA complexes [J]. Methods, 1997, 11(1): 36-43.

[9] Hung WT, Chen YM, Lan JL, et al. Antinucleosome antibodies as a potential biomarker for the evaluation of renal pathological activity in patients with proliferative lupus nephritis [J]. Lupus, 2011, 20(13): 1404-1410.

(收稿日期: 2012-08-31 修回日期: 2012-12-07)