

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.020

胰激肽原酶对精子质量影响的初步研究^{*}

段 礼¹, 陈 勇¹, 卢奋坚², 肖新民¹, 王 胜², 田二坡², 钟 影¹, 温子娜^{1△}

1. 四川省成都西囡妇科医院男科中心, 四川成都 610011; 2. 四川省成都市锦江区

妇幼保健院生殖医学中心男科中心, 四川成都 610011

摘 要:目的 初步研究胰激肽原酶(PK)对精子质量的影响,为改进精子体外保存条件提供参考。方法 选择来成都西囡妇科医院行辅助生殖技术治疗的男性患者精液 20 例,将同一份精液均等地分成 3 份,并随机分编为 A、B、C 3 组,每组 20 例。A 组每份加入常规精子冷冻保护剂,B 组加入等量的冷冻保护剂及 40 U PK,C 组加入等量的冷冻保护剂及 80 U PK。检测冷冻前后 3 组的精子常规参数及精子 DNA 碎片指数(DFI)。结果 (1)冷冻前 3 组的前向运动精子百分比呈递增趋势,B、C 组与 A 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),复苏后 3 组差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)冷冻前 3 组的精子活动率呈递增趋势,B、C 组与 A 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),复苏后 3 组差异无统计学意义($P>0.05$)。(3)冷冻前及复苏后 3 组的精子 DFI 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 PK 有助于提高精子体外保存时的活力,当在常规冷冻保护剂中添加 PK 时,冷冻复苏后的精子质量有一定改善。

关键词:胰激肽原酶; 精子冷冻; 精子质量

中图法分类号:R446.19

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2218-03

近年,辅助生殖技术治疗不育不孕症有了长足的进步,其中精子质量是关键因素之一。关于如何保护和提高精子的活力和功能以及如何克服冷冻对精子的不良影响的研究引人关注。目前胰激肽原酶(PK)被广泛应用于男科疾病的治疗,有研究报道其对精液化及精子质量具有改善作用^[1-3]。本研究初步探讨 PK 对精子质量的影响,为改进精子体外保存条件提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 6—9 月来成都西囡妇科医院行辅助生殖治疗体检的男性患者 20 例,年龄 25~35 岁。入选标准:精液常规检查各项参数正常,无传染病及遗传病史,近期无吸毒、吸烟、酗酒等不良生活习惯,近期无生殖道感染病史。专科查体:排除精索静脉曲张,排除前列腺肿大。本研究通过成都西囡妇科医院伦理委员会及生殖样本库批准,所有提供精液标本的患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 精液检查 患者禁欲 2~7 d,手淫取精置清洁的一次性取精杯内,放入 37℃ 恒温箱内孵育。精液化后,将同一份精液均等地分成 3 份,编为 A、B、C 组,严格按照《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)^[4]的技术规范进行操作。采用重力分析法测量精液体积,采用 HAMILTON THORNE

IVOS II 全自动精液分析仪检测精子活力。精液参数正常值参考《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)标准。采用 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测精子染色质(DNA)的完整性,精子核完整性染色试剂盒采用浙江星博生物科技股份有限公司产品。

1.2.2 精子冷冻及复苏 将冷冻保护剂 SAGE Quinn's Advantage™ Sperm Freezing Medium 提前置于室温中复温并混匀。A、B、C 组均按 1 份体积冷冻保护剂加入 1 份体积精液的比例添加保护剂,B、C 组中分别再加入 40、80 U 注射用 PK(常州千红生化制药股份有限公司),逐滴加入并旋转冻存管,将混合液在 30~35℃ 孵育 5 min,检测 3 组标本冷冻前的精子常规参数及 DNA 碎片指数(DFI)。将上述混合液吸入冷冻保存管,再逐步移入液氮中。所有标本冷冻 30 d 后放入 37℃ 的 HH-S2 恒温水浴锅中复苏,然后利用精液分析仪及流式细胞仪分别检测复苏后的精子常规参数及 DFI。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

冷冻前 A、B、C 3 组的前向运动精子百分比呈递增趋势,B、C 组与 A 组比较,差异有统计学意义($P<$

^{*} 基金项目:四川省科学技术厅资助项目(2019YJ0675);四川省卫生和计划生育委员会资助项目(17PJ488);四川省成都市卫生和计划生育委员会资助项目(2017035)。

[△] 通信作者, E-mail:18679861@qq.com。

本文引用格式:段礼,陈勇,卢奋坚,等.胰激肽原酶对精子质量影响的初步研究[J].检验医学与临床,2021,18(15):2218-2220.

0.05),复苏后 3 组的前向运动精子百分比呈逐渐上升趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。冷冻前 A、B、C 3 组的精子活动率呈递增趋势,B、C 组与 A 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);复苏后 B、C 组的精子活动率高于 A 组,但差异无统计学意义($P>$

0.05)。冷冻前 A、B、C 3 组的精子 DFI 呈逐渐下降趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$),复苏后 A 组的 DFI 高于 B、C 组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 冷冻前后各组标本的精子参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	前向运动精子百分比(%)		精子活动率(%)		精子 DFI	
		冷冻前	复苏后	冷冻前	复苏后	冷冻前	复苏后
A 组	20	33.40±4.80	14.76±4.95	38.20±4.68	16.85±5.24	9.57±3.15	10.33±3.30
B 组	20	40.80±5.08*	15.00±3.48	45.20±4.40*	18.46±4.90	8.67±2.71	9.56±3.13
C 组	20	41.40±5.57*	16.02±3.69	46.00±5.11*	18.43±4.50	7.64±2.43	9.25±3.04

注:与 A 组相比,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

目前,随着辅助生殖技术的发展,人类配子、睾丸组织、卵巢组织等冷冻技术也不断提高。精子冷冻技术为供精助孕、男性不育症治疗提供了条件,但其本身也会对精子质量及功能造成不良影响^[5-6]。随着冷冻过程中温度的急剧变化,精子细胞内外的冰晶形成,水分子跨膜移动和渗透压变化,很容易引起精子细胞膜和线粒体的变化,导致细胞死亡或细胞核的损伤^[7],体现在复苏后的精子质膜破裂、DNA 损伤等方面,最终导致复苏后精子活力下降,存活率降低,受精能力变差。部分研究表明随着冷冻时间的延长,这种影响会不断加大^[8]。

影响人类精子冷冻后质量的主要因素有冷冻方法、冷冻保护剂的成分及冻存时间等。近年来,精子的体外冷冻保存技术层出不穷,各种新型冷冻保护剂的问世、冷冻技术的改进,使成功冷冻精子变得更加容易,而怎样减少冷冻对精子的损伤、尽可能保护精子的功能,是目前精子冷冻技术研究的新方向。郑九嘉等^[9]研究显示,在精子冷冻保护剂中添加适当浓度的维生素 E 可以缓解冻融过程对精子造成的伤害,在一定程度上提高冻融后精子的活动力、存活率及精子 DNA 完整性。本研究在精子冷冻保护剂中添加 PK,结果显示冷冻精子复苏后的前向运动精子百分比、精子活动率均有增高趋势,而 DFI 呈下降趋势,表明 PK 可能具有一定的保护精子作用。

生殖系统微循环障碍影响精子质量,而改善微循环已经被作为男性不育的基础性治疗方法写入中华医学会男科学分会制订的《中国男科疾病诊断与治疗指南(2016 版)》^[10-11]。PK 又称胰激肽释放酶、血管舒缓素,属蛋白水解酶类,有扩张血管、改善微循环、调整血压等作用^[1,11-12]。从 20 世纪 80 年代开始,PK 就被应用于男性不育的治疗,尽管临床观察结果存在一定的争议,但一些研究结果表明,PK 治疗可以改善精子质量^[1]。文献^[13]报道,体外实验中将 PK 加入到精液中,可以增强精子的活动力和穿透宫颈黏液的

能力,以及提高精子运动速度,而且对冷冻复苏后的精子存活率和运动能力都有积极的作用,这与本研究得出的结果一致。50%以上的患者在接受 3 个月的 PK 治疗后,其精子活力得到改善,同时其正常形态精子的百分率也相应提高,因此在人工授精前常可采用 PK 对精液进行预处理^[13],该结论在本研究中也得到证实,本研究向新鲜精液加入 PK 恒温孵育 5 min 后,前向运动精子百分比和精子活动率都有明显提高。

随着辅助生殖技术的发展,获得优良精子是提高成功率的关键,精子的冷冻保存更是治疗男性不育症中必备的技术,特别是微量精子的冷冻成功,为严重少精子、睾丸显微取精获得精子提供了生育亲生后代的可能。本研究证实了 PK 有助于提高精子体外保存时的活力,不足之处在于,由于要进行冷冻保存,恒温孵育时间仅为 5 min,接下来笔者团队将延长孵育时间来进一步验证这一结论。另外,在常规冷冻保护剂中添加 PK,冷冻复苏后的精子质量有一定改善,但差异不显著,这一结论有待扩大样本量来进一步验证。

参考文献

[1] 白刚,佟宪,李宏军.胰激肽原酶在男科疾病中的应用[J].生殖医学杂志,2014,23(2):165-168.
[2] 陈廷,朱惠斌,程怀瑾.弱精子症患者应用胰激肽原酶的临床观察[J].中国男科学杂志,2002,16(4):309-310.
[3] 周蓉.胰激肽原酶促精液液化效果的评价[D].武汉:华中科技大学,2009:1-44.
[4] 谷翊群,陈振文,卢文红,等,译.人类精液检查与处理实验室手册[M].5 版.北京:人民卫生出版社,2011:115-118.
[5] PAOLI D, LOMBARDO F, LENZI A, et al. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 791: 137-150.
[6] 蒋旭平,王尚乾,张伟,等.精子冷冻技术及其对精子蛋白的影响[J].现代泌尿外科杂志,2015,20(4):281-287.
[7] SAID T M, GAGLANI A, AGARWAL A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury[J]. Reprod Biomed Online,

2010, 21(4):456-462.

- [8] 彭向杰, 王斯洋, 范立青, 等. 精液长时间冷冻存储与冷冻复苏率的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(26):101-103.
- [9] 郑九嘉, 陈霞, 张李雅, 等. 维生素 E 和 B12 对冷冻精子活力和 DNA 的保护作用[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(3):264-268.
- [10] 中华医学会男科学分会. 中国男科疾病诊断治疗指南与专家共识(2016 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017:1-199.
- [11] 中国胰激肽原酶临床应用专家共识编写组, 中华医学会男科学分会. 胰激肽原酶在男性不育中的临床应用专家

共识(2018 版)[J]. 中国男科学杂志, 2018, 32(3):59-63.

- [12] 尤传静, 吴强, 杨晓玉. 胰激肽原酶联合金水宝对糖尿病勃起功能障碍患者性激素、ET-1 和 Ang II 的影响分析[J]. 中国性科学, 2018, 27(3):100-103.
- [13] STERZIK K, STREHLER E, ABT M, et al. In vitro kallikrein treatment of human spermatozoa: stimulation of sperm penetration into zona-free hamster eggs depends on the quality of initial semen parameters but not on constituents of the kallikrein-kinin system in seminal plasma[J]. J Urol, 1994, 151(6):1712-1714.

(收稿日期:2020-10-11 修回日期:2021-04-27)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.021

免疫荧光法在阴道分泌物病原体检测中的应用*

尹小毛¹, 赖少芬¹, 冯洁仪¹, 黄锡谊¹, 温双花², 吴秀春¹, 王丽斯¹, 王治伟^{1△}

1. 广州医科大学附属顺德医院检验科, 广东佛山 528315; 2. 广东省食品药品职业技术学院, 广东广州 530001

摘要:目的 通过与湿片法进行比较, 分析免疫荧光法检测阴道分泌物病原体的应用价值。方法 分别采用湿片法和免疫荧光法检测 39 例阴道分泌物标本中的线索细胞、念珠菌和阴道毛滴虫, 并比较分析两种方法的检测结果。结果 湿片法和免疫荧光法检出线索细胞的例数分别为 15 例和 9 例, 阳性率分别为 38.46% 和 23.08%, 两种方法检测结果差异无统计学意义($P>0.05$); 两种方法检出念珠菌的例数分别为 15 例和 14 例, 阳性率分别为 38.46% 和 35.90%, 两种方法检测结果差异无统计学意义($P>0.05$); 两种方法均未检出阴道毛滴虫。结论 免疫荧光染色检测阴道分泌物病原体具有较好的应用价值, 临床实验室可直接应用免疫荧光法染色来检测阴道加德纳菌。

关键词: 阴道分泌物; 免疫荧光法; 念珠菌; 阴道加德纳菌; 阴道毛滴虫

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)15-2220-03

阴道炎是临床妇科发生率较高的一种疾病, 其发病原因有多种, 较为常见的是阴道加德纳菌、念珠菌和阴道毛滴虫等生殖道病原体导致的感染^[1]。目前阴道分泌物细菌和真菌检测的金标准仍然是培养法, 但是该方法操作较为烦琐, 所需时间也较长, 因此临床实验室使用最广泛的检测方法是涂片镜检^[2]。阴道分泌物常规检测采用直接湿片法或革兰染色法, 能够较为便捷地检出阴道加德纳菌、念珠菌、阴道毛滴虫等病原体, 但是此类方法检查阴道分泌物存在一定程度的漏检^[3]。免疫荧光法染色通过荧光素标记抗体直接与病原体结合后显色, 具备免疫学和形态学的双重优点^[4], 本研究拟将其与湿片法进行分析比较, 现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 标本取自 2020 年 12 月广州医科大学附属顺德医院门诊或住院成年女性患者 39 例。用

无菌窥阴器扩张阴道, 将无菌棉拭子于阴道内约 4 cm 处内侧壁或阴道后穹窿处采集分泌物, 持续转动数秒后放入收集管中, 旋紧管盖后立即送检。

1.2 仪器与试剂 荧光显微镜购自尼康仪器(上海)有限公司, 免疫荧光染色试剂购自深圳市迈科龙生物技术有限公司。载玻片和盖玻片购自江苏飞舟玻塑有限公司, 无菌棉拭子购自康正卫生材料有限公司。

1.3 方法 参照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》进行阴道分泌物湿片法常规检测操作。免疫荧光法染色操作步骤: 将采集的阴道分泌物涂抹于载玻片中央并干燥固定, 加入免疫荧光试剂染色(针对不同的病原体使用对应的染色试剂), 以试剂刚好覆盖整个涂片部位为宜, 37℃ 孵育 20~30 min, 使用蒸馏水缓慢冲洗载玻片数次, 每次 5~10 s, 再将玻片自然晾干。干燥后使用荧光显微镜进行观察, 先用高倍镜(×40)搜索疑似视野, 然后用油镜(×100)观察具体

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2014A020212173); 广东省自然科学基金项目(2017A030310019)。

△ 通信作者, E-mail: wangzhiwei_001@sina.com。

本文引用格式: 尹小毛, 赖少芬, 冯洁仪, 等. 免疫荧光法在阴道分泌物病原体检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(15): 2220-