

精子DNA碎片率及顶体酶活性对男性不育的诊断价值

张宁锋¹, 刘彩霞², 郑灵燕¹, 区颂邦¹, 梁海霞¹, 钟慧玲¹, 陈静华¹

(1.中山大学孙逸仙纪念医院生殖医学中心, 广东 广州 510120; 2.汕头大学医学院公共卫生与预防医学教研室, 广东 汕头 515021)

摘要:【目的】探讨精子DNA碎片率与顶体酶活性检测对男性不育的诊断价值。【方法】回顾性分析近三年前来本院就诊的902例男性患者的精液常规参数及精子DNA碎片率和顶体酶活性水平。【结果】按DNA碎片率水平将所有患者分为4组($\leq 10\%$, 11~20%, 21~30%, $\geq 31\%$), 各组患者的年龄、精子浓度、精子总活力、前向运动率以及顶体酶活性存在统计学差异;按精子顶体酶活性正常与否将患者分为两组后, 两组间精子浓度、精子总数、精子总活力、前向运动率、正常形态率、畸形精子指数、DNA碎片率均有统计学差异。相关性分析显示, DNA碎片率与精子浓度、精子活力、前向运动率、精子总数及顶体酶活性呈负相关关系, 与畸形精子指数呈正相关关系;顶体酶与精子浓度、精子活力、前向运动率、精子总数、正常形态率呈正相关关系, 与头部异常率、畸形精子指数、DNA碎片率负相关。【结论】精子DNA碎片率及顶体酶活性水平均可以在一定程度上反映精子参数水平, 其中DFI更能反映精子活力水平, 顶体酶活性则与精子形态更为相关。两者都是精子质量评估更为客观而全面的指标。

关键词: 男性不育; 精子; DNA碎片率; 顶体酶活性

中图分类号: R321-33

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)01-0093-08

Diagnostic Value of DNA Fragmentation Index and Acrosin Activity in Male Infertility

ZHANG Ning-feng¹, LIU Cai-xia², ZHENG Ling-yan¹, OU Song-bang¹, LIANG Hai-xia¹,
ZHONG Hui-ling¹, CHEN Jing-hua¹

(1.IVF Center of Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2.Shantou University Medical College, Department of Public Health and Preventive Medicine, Shantou 515021, China)

Corresponding to: CHEN Jing-hua; E-mail: chen-huaa@163.com

Abstract:【Objective】We aimed to explore the diagnostic value of DNA fragmentation index (DFI) and acrosin activity in male infertility. 【Methods】Nine hundred and two semen samples were collected from patients and assessed for the DNA fragmentation index by sperm chromatin dispersion test, acrosin activity, as well as standard sperm parameters according to the WHO criteria. Statistical analysis was performed with SPSS. 【Results】Statistically significant differences were observed in age, sperm concentration, total motility, progressive rate and acrosin activity among different group of sperm DNA damage ($\leq 10\%$, 11~20%, 21~30%, $\geq 31\%$). Sperm acrosin activity also showed difference in sperm concentration, total number, total motility, progressive rate, normal morphology rate, teratozoospermia index (TZI) and sperm DFI. The DNA fragmentation rate and sperm concentration, sperm motility, forward motility rate, total sperm count and acrosin activity was negatively correlated, while it is negative correlated with TZI. Acrosin activity and sperm concentration, sperm motility, forward motility rate, sperm count and normal morphology rate was positively correlated, while it is negative correlated with the abnormal rate of head, sperm deformity index, DNA fragmentation rate. 【Conclusion】Sperm DNA damage and acrosin activity could partly reflect the quality of sperm. Moreover, sperm DFI may predict the sperm motility part while the acrosin activity more likely related to sperm morphology.

Key words: male infertility; spermatozoa; DNA fragmentation index; acrosine activity

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1): 93-100]

收稿日期: 2017-09-01

基金项目: 广东省自然科学基金(2016A030313071)

作者简介: 张宁锋, 医学学士, 主管技师, 研究方向: 生殖医学与男性生育力评估, E-mail: 29469576@qq.com; 陈静华, 通信作者, E-mail: chen-huaa@163.com

据世界卫生组织报道,近年来不孕不育症的发病率呈逐年上升趋势,其中约一半是由男性不育引起的,而在这些人群中约有14%~15%伴有精子质量或数量的异常^[1]。一直以来,男性生育力的评估主要依赖于精子浓度、精子活力及精子正常形态等传统指标^[2];自2009年世界卫生组织(WHO)《人类精液检查与处理实验室手册》第五版发布以来,男科临床工作者开始逐渐重视精子总数、多重精子缺陷指数等综合指标的检测。但这些检验项目的结果判断和分析主观性较强,各参数波动范围大,仍不能形成统一的标准^[3]。近年来随着生命科学领域的进展和自动化仪器的逐步普及,男科学也从简单和主观的计数及形态学观察,逐步进入到更为客观的生化分析阶段。其中,DNA碎片指数(DNA Fragmentation Index,DFI)和顶体酶活性测定开始在男科临床检验领域得到发展。研究发现,精子DNA损伤会降低精子受精能力和胚胎发育潜能,从而降低妊娠率^[4];同时亦有研究肯定了精子DNA碎片指数对男性不育结局的预测价值^[5-6],但针对其具体精液参数诊断价值的研究较为缺乏。顶体是由精子细胞核附近的高尔基复合体形成,为精卵结合提供条件,内含多种水解酶,其中顶体酶则是顶体反应中最为重要的一种酶,它主要分布于精子顶体内膜及赤道部膜上,与精子顶体膜相连,是受精过程中不可缺少的一种中性蛋白水解酶,其活性的高低很大程度上决定了受精过程是否能顺利进行。DNA碎片指数和顶体酶活性的测定,在分子水平上反映了男性生殖能力的遗传结构基础和功能完整性^[7-8]。关于顶体酶活性诊断价值的研究在国内外报道则较少,且多局限在精子形态与顶体酶活性的关系研究^[9-10],尚不足以全面评估顶体酶的价值。本研究主要通过对精子DNA损伤、顶体酶活性与精液常规参数之间的相关分析,探讨新兴的生化分子标志物对男性不育诊断价值,以期对男性不育的临床诊断,及后续的辅助生殖技术治疗提供一定的理论支持。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

本研究使用的902例精液标本采自2014年4月至2017年5月来本中心就诊的男性不育患者,

平均年龄为(32.15±5.07)岁。所有患者禁欲2~7天,手淫方法收集精液标本,在37℃20~30 min完全液化后进行相关指标测定。样本的采集过程及信息使用都经过中山大学孙逸仙纪念医院伦理委员会的批准。

1.2 方 法

1.2.1 精液常规参数检测 本研究中精液常规检测均严格按照WHO《人类精液检查与处理实验室手册》第5版要求的检测方法进行检测^[1]。精液体积采用称重法,精子浓度及活力检测采用改良牛鲍氏计数板,用手工法计数;精子形态学检测用Diff-Quik快速染色法,以正常形态率4%作为参考值下限。所有技术人员均经过国家卫生计生委科学技术研究所2011年WHO第五版手册规范化培训并通过考核;并在国家计生委组织的全国男科实验室室间质评中各项检测结果均在控。

1.2.2 精子顶体酶活性检测 精子顶体酶活性检测按照深圳华康生物医学工程有限公司顶体酶试剂盒的检查方法,用改良Kennedy法进行:精液标本充分混匀并计数后调节至每个反应管精子个数为 7.5×10^6 个,每份标本设置反应管和对照管,分别加入抑制剂和反应液,对照管加入反应终止液;置于24℃环境反应1 h后终止反应并比色。正常精子顶体酶活性为:48.2~218.7 $\mu\text{U}/10^6$ 精子。

1.2.3 精子DNA碎片率检测 实验检测精子DNA损伤采用安徽安科生物工程(集团)股份有限公司的精子DNA碎片染色试剂盒(瑞-吉染色法)行SCD法检测,步骤简述如下:新鲜精液完全液化后用PBS稀释至精子浓度 $1 \sim 10 \times 10^6/\text{mL}$,取出30 μL 加入溶解并平衡至37℃的低熔点琼脂糖凝胶中,混匀后取20 μL 精子凝胶混合液滴加在预处理载玻片上,盖上22 mm×22 mm盖玻片,4℃冰箱水平放置5 min。移除盖玻片,放入DNA变性液中室温避光孵育7 min;取出玻片浸泡于裂解液中避光孵育25 min;在蒸馏水中静置5 min洗去残余裂解液。然后将玻片依次放入70%、90%和100%乙醇中各2 min脱水。晾干后玻片用染色液(Wright's染色剂和磷酸盐缓冲液等比例混合)覆盖于样本表面,染色10~15 min。用自来水冲洗掉多余染液,晾干。200倍光学显微镜下观察,比较精子核和核周围晕轮大小,至少计数500条精子,计算精子DNA碎片指数(DFI)。

1.3 统计学分析

数据采用SPSS 21.0 软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差或者中位数及四分位间距描述。数据经正态性及方差齐性检验后,符合正态分布和方差齐性的,采用两独立样本 *t* 检验或者单因素方差分析,组间两两比较执行S-N-K 检验和LSD 检验;不符合正态分布或方差齐性的数据经数据转换后采用参数检验方法,转换后仍不满足条件的采用秩和检验。相关性分析采用 Pearson (满足正态性)或者 Spearman 分析,相关系数用 *r* 或 *r_s* 表示。检验水准设为 0.05。

2 结果

2.1 数据基本情况描述

我们回顾性分析了近三年(2014年4月至2017年5月)来本中心就诊病患的精液样本902例,并检测精液常规参数,精子DNA碎片指数和顶体酶活性(表1)。

2.2 精子DNA碎片、顶体酶活性与精液常规参数间的关系

根据文献报道^[11],我们将DNA碎片率分为四个水平(≤10%, 11~20%, 21~30%, ≥31%)。其中,年龄、精子浓度,精子总活力,前向运动率,顶体酶

表1 精子样本的常规参数及功能指标

Table 1 Standard parameters and function index of sperm samples (n=902)

Parameters	$\bar{x} \pm s^{1)}$	Median	P_{25} and $P_{75}^{2)}$
Age/year	32.15±5.07	31.00	29.0, 35.0
Abstinence time/d	4.57±1.33	4.00	4.0, 5.0
Volume/mL	3.57±1.44	3.39	2.59, 4.30
Concentration/(10 ⁶ /mL)	54.79±32.40	50.00	32.0, 72.0
Total sperm number/10 ⁶	186.58±119.27	165.20	99.0, 249.6
Total motility/%	53.27±15.09	55.00	43.0, 65.0
Progressive motility/%	42.82±14.84	43.50	33.0, 54.0
Normal morphology/%	3.40±1.62	3.00	2.0, 4.0
Head anomalies/%	80.56±7.26	81.00	76.0, 86.0
Teratozoospermia index (TZI)	1.33±0.10	1.33	1.2, 1.4
DFI/%	15.88±10.49	13.50	9.0, 20.0
Acrosin activity/(μU/10 ⁶)	70.73±40.82	62.49	41.4, 93.1

1) Mean and standard deviation; 2) 25th percentile and 75th percentile

活性在不同水平的DNA碎片率分组间存在统计学差异。见表2。

依据WHO第五版手册及试剂说明书标准,以48.2 μU/10⁶为临界值,我们将顶体酶活性不同的

表2 DNA碎片指数对精子基本参数及功能指标的影响

Table 2 Influence of DFI on basic parameters and function index

(n=902)

Parameters	DFI				<i>F</i>	<i>P</i>
	Group A (≤10%) (n=274)	Group B (11~20%) (n=385)	Group C (21~30%) (n=157)	Group D (≥31%) (n=86)		
Age/year	31.41±4.76	32.12±5.00	32.98±5.14 ¹⁾	33.17±5.90 ¹⁾	13.921	0.003
Volume/mL	3.53±1.38	3.54±1.49	3.73±1.39	3.55±1.53	3.456	0.327
Concentration/(10 ⁶ /mL)	58.41±33.70	54.37±30.94	48.84±31.05 ¹⁾	46.00±35.72	9.660	0.022
Total sperm number/10 ⁶	201.32±128.25	181.76±111.012	171.00±117.35	189.69±125.53	6.357	0.095
Total motility/%	59.76±12.78	54.29±13.74 ¹⁾	47.31±14.16 ¹⁾²⁾	38.94±15.97 ¹⁾²⁾³⁾	140.283	<0.001
Progressive motility/%	49.41±12.96	43.28±13.90 ¹⁾	36.82±13.75 ¹⁾²⁾	30.71±14.81 ¹⁾²⁾	130.673	<0.001
Normal morphology/%	3.54±1.69	3.39±1.61	3.26±1.59	3.26±1.45	4.266	0.234
Head anomalies /%	80.04±6.88	80.66±7.35	81.07±7.34	80.87±7.89	2.567	0.463
TZI	1.31±0.09	1.33±0.11 ¹⁾	1.35±0.102 ¹⁾	1.37±0.12 ¹⁾	26.434	<0.001
DFI/%	6.62±1.94	13.94±2.76 ¹⁾	23.50±2.87 ¹⁾²⁾	40.19±10.28 ¹⁾²⁾³⁾	801.588	<0.001
Acrosin activity/(μU/10 ⁶)	78.19±40.65	71.91±40.50	65.67±41.83 ¹⁾	50.94±33.26 ¹⁾²⁾³⁾	39.789	<0.001

1) significant difference compared to group A; 2) significant difference compared to group B; 3) significant difference compared to group C

表3 顶体酶水平不同的精液检查者精子基本参数及功能指标比较
Table 3 Influence of acrosin activity on basic sperm parameters and function index (n=902)

Parameters	Acrosin activity ($\mu\text{U}/10^6$)				Mann-Whitney U	P
	$\bar{x} \pm s$		Median (IQR)			
	<48.2 (n=290)	\geq 48.2 (n=612)	<48.2 (n=290)	\geq 48.2 (n=612)		
Age/year	32.36 \pm 5.06	32.06 \pm 5.08	31 (6)	31 (5)	85859.5	0.429
Volume/mL	3.49 \pm 1.59	3.61 \pm 1.37	3.12 (1.77)	3.44 (1.71)	83245.0	0.109
Concentration/($10^6/\text{mL}$)	47.21 \pm 32.49	58.38 \pm 31.76	38.0 (43.0)	54.5 (38.0)	109997.5	<0.001
Total sperm number/ 10^6	155.62 \pm 114.24	201.26 \pm 118.89	125.16 (141.69)	180.95 (152.99)	111084.5	<0.001
Total motility/%	49.89 \pm 16.59	54.88 \pm 14.06	52.0 (22.5)	56.0 (21.0)	103831.0	<0.001
Progressive motility/%	39.44 \pm 15.86	44.42 \pm 14.07	40 (22)	45 (20)	104701.0	<0.001
Normal morphology /%	3.15 \pm 1.55	3.52 \pm 1.63	3 (2)	3 (2)	100600.5	0.001
Head anomalies/%	81.53 \pm 7.17	80.10 \pm 7.26	83 (12)	81 (10)	78085.5	0.004
TZI	1.40 \pm 0.10	1.37 \pm 0.09	1.40 (0.13)	1.37 (0.13)	75247.0	<0.001
DFI /%	19.43 \pm 12.77	14.20 \pm 8.73	16 (14)	12 (10)	66163.0	<0.001
Acrosin activity/($\mu\text{U}/10^6$)	30.46 \pm 12.96	89.81 \pm 35.26	32.32 (18.45)	79.73 (48.75)	177480.0	<0.001

¹⁾Mean and standard deviation; ²⁾Interquartile range

样本分成低活性组 (<48.2 $\mu\text{U}/10^6$) 和正常活性组 (\geq 48.2 $\mu\text{U}/10^6$)。统计学分析表明,精子浓度、精子总数、精子总活力、前向运动率、正常形态率、畸形精子指数、DNA 碎片率在顶体酶活性不同的组中有差异(表3)。

2.3 精子顶体酶活性与DNA碎片率对精液参数评估的价值分析

相关性分析表明,校准了年龄、禁欲天数的影响后,DNA碎片率与精子浓度、精子活力、前向运动率、精子总数、及顶体酶活性呈负相关关系,与畸形精子指数呈正相关关系,其中与精子活力及前向运动率相关性较高;顶体酶与精子浓度、精子活力、前向运动率、精子总数、正常形态率呈正相关关系,与头部异常率、畸形精子指数、DNA碎片率负相关。结果具有统计学意义(表4),说明精

子顶体酶和DNA碎片率与精液常规的多项参数具有密切联系,同时从微观的角度反映了精液质量的优劣。

我们选取了精子浓度、精子活力以及畸形精子指数作为代表精子的产生、活力、形态方面的指标,与DFI、顶体酶的结果进行比较。结果显示顶体酶活性与三者间均存在一定联系,可以导致精子浓度、活力的降低及精子形态的异常;随着精子DFI的增加,引起精子浓度、活力降低及精子畸形的危险性增加(表5)。

3 讨论

男性因素引起的不育接近50%。导致男性不育的因素较多,其中因精液异常引起不孕较为

表4 DNA碎片率及顶体酶活性与精液常规参数之间的相关性分析
Table 4 Correlation analysis among basic sperm parameters and DFI, acrosin activity (n=902)

Parameters	Volume	Concentration	Total motility	Progressive motility	Total sperm number	Normal morphology	Head anomalies	TZI	DFI	Acrosin activity
DFI /%	0.016	-0.078 ¹⁾	-0.419 ²⁾	-0.390 ²⁾	-0.073 ¹⁾	-0.073 ¹⁾	0.049	0.166 ²⁾	-	-0.200 ²⁾
Acrosin activity/($\mu\text{U}/10^6$)	0.010	0.147 ²⁾	0.154 ²⁾	0.163 ²⁾	0.141 ²⁾	0.123 ²⁾	-0.135 ²⁾	-0.165 ²⁾	-0.200 ²⁾	-

1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

表5 DFI、顶体酶活性与精液常规参数的危险性分析
Table 5 Risk analysis among sperm standard parameters and DFI, acrosin activity (n=902)

Parameters	OR(95%CI) ¹⁾		
	Concentration	Total motility	TZI
Acrosin activity (< 48.2)	3.35(2.07-5.44) ⁴⁾	2.05(1.45-2.91) ⁴⁾	4.31(1.29-14.44) ²⁾
DFI			
>10%	1.67(0.95-2.96)	4.67(2.72- 8.00) ⁴⁾	1.45(1.38-1.51) ²⁾
>20%	1.92(1.18-3.13) ²⁾	5.02(3.50- 7.21) ⁴⁾	8.41(2.26-31.33) ³⁾
>30%	2.41(1.28-4.52) ³⁾	8.19(5.12- 13.12) ⁴⁾	10.13(3.19-32.13) ⁴⁾

1) OR: odds ratio; CI: confidence interval; 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$, 4) $P < 0.001$

常见。因而无论过去还是现在,精液常规分析都是男性不育初步评估的基础实验室检查项目^[12]。但在临床诊断和实验室检查方面,许多缺陷仍然存在。由于当前主要是采用光学显微镜检测精子存活率、活动力和形态、浓度等指标,精液常规检查结果存在较大误差,重复性、可靠性差。同时,这些指标对精子功能和受精能力等方面提供的信息有限,不能对男性生育力提供精确诊断及预后评估,因此评估精液质量及男性生育能力需要更为准确、全面的指标或方法^[13]。

笔者所在生殖中心从2014年起开始引入精子DNA碎片率及精子顶体酶活性的检测方法。基于这一条件基础,本研究选用这两项客观性指标,与上述男科学中的经典指标进行对比分析,以期对精子DNA碎片率及精子顶体酶活性在男性精液参数的诊断价值进行全面分析。

3.1 精子DNA碎片指数(DFI)与精子常规参数的关系

人精子染色质可分为3个主要的结构,分别是环状结构、螺线管结构和核基质结合域。这些结构与功能密切相关。研究显示,这些结构分别具有不同的生理功能,其完整性在受精与胚胎发育过程中占据了非常重要的地位^[14];目前已有大量临床资料证实精子DNA完整性受损会影响IVF及ICSI治疗的妊娠结局^[5-6],并可能增加其流产率^[15]。但精子DNA发生碎片化的机制尚不完全清楚。一般认为与精子发生过程中的异常染色质包装、氧压胁迫或凋亡异常有关,也有可能是几种机制共同作用的结果^[16-18]。

有文献报道^[19-20],随年龄增长,精子DFI会显

著增加,本研究也证实这一结论。从表1可知,DFI指数与患者年龄呈正相关趋势,且有统计学差异。这可能与年龄大的患者附睾抗氧自由基以及睾丸生精过程的DNA修复能力的降低有关^[21]。这一现象,也为高龄男性生育力下降及配偶流产率提高提供了有力佐证。

同时,我们可以看到,精子总活力及前向运动率在不同水平DFI间也存在显著性差异。结合相关性分析结果来看,精子DNA碎片率与精子活力、前向运动率呈负相关,与Giwercman等^[22]的研究结果相符。其机制可能是由于精子核DNA与线粒体功能之间的密切关系——DNA损伤严重的精子引起其线粒体呼吸代谢功能明显降低^[23],提示DNA损伤可能是导致弱精子症的重要原因之一。

与多数研究结果一样,我们也发现不同精子DFI水平之间精子正常形态率并无显著性差异^[24],但随着精子DNA碎片率的升高,正常精子百分率有下降的趋势。我们引入了WHO第五版推荐的畸形精子指数这一反映精子头部中段及尾部畸形的综合性指标进行比较,则发现其与精子DFI水平呈显著性正相关,说明精子DFI水平更能反映出精子形态的综合水平,是判断精子畸形程度的可靠指标。

本研究的结果也显示精子DFI水平与精子顶体酶活性呈明显负相关。这些结果与Mortimer等^[25]的研究结果相似,其原因可能是由于精子遗传物质受到破坏,影响相应蛋白的转录或合成,从而影响顶体酶原的生成,或者由于无法合成某种酶原激活物质,使顶体酶无法被激活,最终表现为

顶体酶活性降低^[26]。

同时精子浓度在不同DFI水平间也表现出显著性差异,并呈负向相关关系。因此,精子DNA碎片率可以在一定程度上反映出精子常规参数的水平,并直接影响精子产生量、运动能力、形态及其受精能力。可以作为男性生育力评估的有力补充。

当然,目前精子DNA检测方式多种多样,其阐明的DNA损伤也不尽不同:精子染色质扩散实验(SCD法)测量松懈的完整DNA和外围组蛋白;精子染色质结构分析实验(SCSA)主要检测螺线管连接子位点;末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸标记实验(TUNEL法)通过加入荧光染色核苷酸,可特定分析磷酸二酯键的断裂,能够检测精子单链和双链DNA断裂的碎片;γ-吡啶橙实验(AOT)则通过结合双链DNA或单链DNA呈现不同颜色荧光来检测不成熟精子或DNA受损的精子。然而这些方法大都需要流式细胞仪或荧光显微镜分析观察,或检测试剂昂贵或步骤繁琐,限制了这些方法的临床应用。本研究采用的SCD法检测与其他方法的诊断价值亦各有侧重,有很多相关文献论述^[15,27-28],故本文不再赘述。

3.2 精子顶体酶活性的与精子常规参数的关系

本研究结果显示,顶体酶活性正常组与异常组之间精子浓度、精子总数、精子总活力、前向运动率、正常形态率、头部畸形率、畸形精子指数、DNA碎片率均存在显著性差异。相关性分析也显示精子顶体酶活性与上述各项指标均有一定关联性。进一步证实顶体酶活性对精子常规参数的预测价值。

一般认为,精子畸形往往伴有顶体不完整,进而导致顶体酶缺失或活性降低,精子不能穿越放射冠和透明带,受精率降低^[29]。2010年之前,有些报道认为精子顶体酶活性与精子形态具有一定的相关性^[9-10];但当时精子形态学分析普遍采用WHO第四版标准,以15%作为精子正常形态的参考值下限;虽然也得出精子形态与顶体酶活性相关的结论,但已与WHO第五版诊断标准大相径庭,不足以指导现在的临床实践。本研究中代表精子形态的指标——正常形态率、头部畸形率和畸形精子指数三项均与精子顶体酶活性相关,可以看出精子顶体酶活性不仅能反映精子形态的畸形率,还能反映出精子的多重畸形程度。这一结

果也正好弥补了上文述及的DFI在精子形态预测方面的不足,使得精子顶体酶活性与DFI两者结合可以客观而全面地反应出精子的形态学参数水平。

精子浓度和精子总数等指标代表精子的生成状态,精子活力及前向运动率代表精子的运动能力,这些常规参数意义非凡,但均存在波动性大,稳定性差,主观性强等缺点^[1,3]。而基于化学比色法的精子顶体酶分析更为客观而稳定。本研究结果显示顶体酶活性与精子浓度、精子总数、精子活力和前向运动率呈正相关关系,因此顶体酶活性水平不仅可以对精子常规分析起到监测与质量控制作用,并可以全面反映其常规参数的水平。

顶体酶活性与精子DFI的显著负相关,可能与精子DNA损伤影响酶类蛋白的转录及合成有关^[30],但具体机制仍需要进一步研究。目前无论是临床实践还是机制研究,关于顶体酶活性的研究尚较为缺乏,我们的研究是对这一领域的一次丰富与补充。关于顶体酶活性与精子生成及活力的机制研究仍需要进一步深入开展。但其临床实用价值是毋庸置疑的,有相当广泛的实用范围及临床推广价值。

3.3 DFI与精子顶体酶活性对男性不育的诊断价值分析

精液常规分析了精子浓度、精子活力及精子形态等,是男性不育主要检测方法,但常规的精液分析不能客观反映精子的功能状态。我们的研究中可以看出精子DFI可以反映精子的生成、活动力及受精功能的水平,尤其可以反映精子的活力状态,同时又可以代表精子遗传物质的完整性;精子顶体酶活性亦可以反映精子的生成、活力、形态等常规参数的水平,而尤其反映精子形态水平,同时可以代表精子的受精能力。

为了更充分的验证精子DNA碎片率的诊断价值,此我们选取了精子浓度、精子总活力、畸形精子指数分别代表精子常规的三个主要方面,分别用精子DFI和顶体酶活性对其做危险性分析,可以看到当患者精子顶体酶活性异常时,三项常规指标异常的可能性亦会出现不同程度的增加;而且随着DFI指数的升高,三项常规指标出现异常的危险度也显著增高。另外我们将DFI及精子顶体酶活性与常规精子参数的对比中,发现超过20%的精液样本在三个常规参数中显示为正常

值,DFI和顶体酶活性中却提示为异常,且顶体酶活性的敏感性更为突出。可见在男性不育诊断中,DFI和顶体酶活性同样具有不可替代的诊断价值。

本研究应用的SCD法检测精子DFI,简便易行、敏感度高,不仅能反映精子DNA的完整性,还能间接反映精子的前向运动能力、正常形态和顶体功能,是一个准确有效地评估精液质量的实验

方法;而作为评估男性不育的灵敏的生化指标,顶体酶活性检测不仅代表出精子功能,又能反映出精子常规参数的正常与否。两者为男性生育力的判定提供了更为客观、可靠且更为敏感的依据。可作为精液常规检查和形态学检查的补充及验证,为诊断男性不育症及进行相关治疗提供更全面的实验室依据,其诊断价值应得到充分重视。

参考文献:

- [1] GCT. WHO laboratory manual for the xamination and processing of human semen [M]. 5 ed. WHO, 2010.
- [2] Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: An effort towards standardization of in-vivo thresholds [J]. Hum Reprod, 2001, 16(6): 1165-1171.
- [3] Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men [J]. N Engl J Med, 2001, 345(19): 1388-1393.
- [4] Simon L, Zini A, Dyachenko A, et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome [J]. Asian J Androl, 2017, 19(1): 80-90.
- [5] Wiweko B, Utami P. Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility [J]. Basic Clin Androl, 2017, 27: 1.
- [6] Osadchuk LV, Tataru DA, Kuznetsova NN, et al. Sperm DNA fragmentation: Association with semen parameters in young men [J]. Urologiia, 2016, 11(6): 118-123.
- [7] 倪佳,高晓勤. 蛋白激酶A对精子顶体酶活性的影响 [J]. 中国民康医学(上半月), 2009, 21(1): 55-56.
NI J, GAO XQ. The effect of protein kinase A on the sperm acrosin activity [J]. Med J Chin People's Health, 2009, 21(1): 55-56.
- [8] Mao HT, Yang WX. Modes of acrosin functioning during fertilization [J]. Gene, 2013, 526(2): 75-79.
- [9] 陈可,包华琼,蔡敏. 精子形态与顶体酶活性关系的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17(6): 99-100.
- [10] 张海滨,黄永汉,邓天勤,等. 精子形态与顶体酶活性关系分析 [J]. 检验医学与临床, 2009, 6(9): 677-678.
Zhang HB, Huang YH, Deng TQ. The relationship between sperm morphology and sperm acrosin activity [J]. Lab Med Clin, 2009, 6(9): 677-678.
- [11] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome [J]. Hum Reprod, 2007, 22(1): 174-179.
- [12] Barratt CL. Semen analysis is the cornerstone of investigation for male infertility [J]. Practitioner, 2007, 251(1690): 8-10, 12, 15-17.
- [13] Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, et al. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: An evidence based analysis [J]. Int Braz J Urol, 2007, 33(5): 603-621.
- [14] Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development [J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16(1): 30-36.
- [15] 谭艳,范立青. Meta分析精子DNA完整性对辅助生殖结局的预测价值 [J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(1): 39-47.
Tan Y, Fan LQ. Meta-analysis of predictive value of sperm DNA integrity on assisted reproductive outcome [J]. J Reprod Med 2017, 26(1): 39-47.
- [16] Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress [J]. Hum Reprod, 2006, 21(4): 986-993.
- [17] Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, et al. The

- sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(6): 1576-1582.
- [18] 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.
- [19] 杨爱军, 孙宝刚, 王丽霞, 等. 男性年龄对精子质量与精子染色体影响的研究 [J]. *中国男科学杂志*, 2016, 29(7): 38-40, 45.
- Tang AJ, Sun BG, Wang LX, et al. Effects of males' age on sperm quality and aneuploidy of human sperms [J]. *Chin J Androl*, 2016, 29(7): 38-40, 45.
- [20] 钟晓君, 刘俊袁, 卓珺秦, 等. 精子DNA损伤与精液常规参数的相关性分析 [J]. *黑龙江医药*, 2017, 30(1): 45-48.
- Zhong XJ, Liu JY, Zhuo JQ, et al. Sperm DNA damage correlate to seminal parameters [J]. *Heilongjiang Med J*, 2017, 30(1): 45-48.
- [21] Bungum M, Spano M, Humaidan P, et al. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(1): 4-10.
- [22] Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters [J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(6): 1404-1412.
- [23] 郑九嘉, 楼哲丰, 郑蔚虹, 等. 线粒体呼吸功能与精子活力、核DNA损伤的相关性分析 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 24(1): 39-45.
- Zheng JJ, Lou ZF, Zheng WH, et al. Correlation analysis between mitochondria respiratory function and sperm motility and sperm DNA damage [J]. *Chin J Cell Biol*, 2012, 24(1): 39-45.
- [24] 秦文松, 刘英, 段金良. 精子DNA碎片指数与精液参数的相关性研究 [J]. *中国性科学*, 2014, 23(4): 55-57.
- Qin WS, Liu Y, Duan JL. Correlation of sperm DNA fragmentation index and semen parameters [J]. *Chin J Human Sex*, 2014, 23(4): 55-57.
- [25] Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions [J]. *J Androl*, 2001, 22(2): 192-205.
- [26] 郑九嘉, 杨旭, 张李雅, 等. 精子DNA损伤、核蛋白组型转换与顶体酶活性及精液参数的相关性分析 [J]. *中华男科学杂志*, 2012, 18(10): 925-929.
- Zheng JJ, Yang X, Zhang LY, et al. Sperm DNA damage and sperm-nucleoprotein transition correlate to acrosin activity and seminal parameters [J]. *Nat J Androl*, 2012, 18(10): 925-929.
- [27] 张丽红, 邱毅, 王磊光, 等. 精子染色质扩散试验及吖啶橙染色试验检测精子DNA完整性研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(12): 1335-1339.
- Zhang LH, Qiu Y, Wang LG, et al. Comparative study on determination of sperm DNA integrity by sperm chromatin dispersion test and by acridine orange staining test [J]. *Chin J Lab Med*, 2008, 31(12): 1335-1339.
- [28] 吴永明, 夏欣一, 黄宇烽. 精子DNA完整性检测技术研究进展 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(8): 737-741.
- Wu YM, Xia XY, Huang YF. Progress on the detection techniques for DNA Integrity of sperm [J]. *Nat J Androl*, 2006, 12(8): 737-741.
- [29] Langlois MR, Oorlynck L, Vandekerckhove F, et al. Discrepancy between sperm acrosin activity and sperm morphology: significance for fertilization in vitro [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 351(1/2): 121-129.
- [30] Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, et al. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 12(1): 19-25.

(编辑 王晓鹰)