

壮族低受精率男性精子的顶体酶活性及其临床意义[▲]

李征 钟慧芝 李增营 彭鸿浩 莫定敢 檀大美

(广西壮族自治区卫生计生委生殖中心生殖医学科,南宁市 530021,电子邮箱:35139225@qq.com)

【摘要】 目的 分析壮族低受精率男性的精子顶体酶活性及其临床意义。方法 选择行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的低受精率壮族男性作为研究组,另选择300例正常受精率的壮族男性作为对照组,比较两组精液相关参数,即前向运动精子(a级)百分率、快速前向运动精子(a+b级)百分率、精子活动率、正常精子形态、精子浓度以及精子顶体酶活性,分析所有研究对象的顶体酶活性与精液相关参数、受精率的相关性。**结果** 研究组a+b级百分率、a级百分率、精子活性率、正常精子形态和精子浓度、顶体酶活性均低于对照组(均 $P<0.05$);顶体酶活性与a+b级百分率、a级百分率、精子活性率、正常精子形态、精子浓度、受精率均呈正相关(均 $P<0.05$)。**结论** 低受精率的壮族男性精子顶体酶活性较低;顶体酶活性异常可能会影响精子的活力与形态,从而导致受精率下降。

【关键词】 低受精率;精子;顶体酶活性;壮族

【中图分类号】 R 321-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2018)13-1487-03

DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2018.13.26

体外受精是将精子与卵子在体外人工控制环境中完成受精的过程,其成功与否与卵子和精子质量密切相关^[1]。顶体酶是存在于精子顶体内膜及赤道部膜上并以无活性形式存在的一种酶,当精子头部进入卵透明带时,顶体酶原会被激活为顶体酶,该酶对精子运动及受精过程不可或缺,其活力不足可导致男性不育^[2-3]。本研究旨在分析壮族低受精率男性的精子顶体酶活性及其临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择在本中心行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)的300例壮族低受精率男性作为研究组,另选择300例壮族正常受精率男性作为对照组。研究组纳入标准:(1)壮族(患者三代均为壮族);(2)受精率均 $\leq 30\%$;(3)患者对本研究知情同意。对照组纳入标准:(1)壮族(患者三代均为壮族);(2)受精率 $> 30\%$;(3)患者对本研究知情同意。两组排除标准:(1)受试者女性配偶各项检测指标异常,合并多囊卵巢综合征;(2)合并生殖道感染;(3)存在性功能障碍;(4)不愿参与本研究。研究组年龄23~48(34.75 \pm 4.82)岁,不育年限2~12(6.64 \pm 2.35)年,配偶年龄22~43(31.68 \pm 4.39)岁;对照组年龄24~47(35.12 \pm 5.03)岁,不育年限2~11(6.51 \pm 2.29)年,配偶年龄21~44(32.14 \pm 4.48)岁。两组受试者年龄、配偶年龄、不育年限比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

具有可比性。

1.2 主要试剂及仪器 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,RT-6100型),水浴箱(常州普天仪器制造有限公司,HH-W420型),离心机(湘仪集团,HI650-W型),精液分析系统(湘仪集团),分光光度计(上海美谱达仪器有限公司,V1200型)。精子顶体酶活性定量检测试剂盒(华康生物,批号:170245817)。

1.3 标本采集 两组男性采集精液前2周内无急性病变,采集精液前3~7d禁欲。采集精液前清洁双手和外生殖器,在安静无干扰环境中手淫,将获取的精液置入干净的一次性取精杯中,并即刻置于37℃恒温水浴中,待精液完全液化后进行检测。若有标本不液化,采用机械振荡法使其液化。

1.4 精液常规检查 取1滴液化精液滴于Makler精子计数板中,盖上盖片,采用计算机辅助精子动态图像检测系统(西班牙SCA公司)于37℃恒温环境中对相关参数进行检测。每份标本采集精子数为200个,获取精子活力和运动轨迹,均于5min内完成。

1.5 精子形态分析 采用快速染色法对精子形态进行检测分析,于固定液(1L甲醇含1.8mg二芳基甲烷)中固定玻片15s,使用吸水纸吸取玻片多余液体,将玻片于溶液1(1L叠氮钠防腐液中含1g氧杂蒽)中染色10s,吸取玻片多余液体,然后于溶液2(1L缓冲液中含1.25g硫氮杂合染料)中染色5s,于流水中浸洗10~15次,除去多余染色剂。将玻片垂直干燥,固定玻片。把制备好的玻片于显微镜下观察,计算200个精子中正常

[▲]基金项目:广西医药卫生科研课题(Z20170975)

作者简介:李征(1981~),男,硕士,主治医师,研究方向:生殖男科。

通信作者:檀大美(1969~),男,硕士,主任医师,研究方向:生殖男科,电子邮箱:tdx912@163.com。

(头、颈、中段和尾巴均正常)和异常比例,正常精子百分率 > 30% 为受精率正常。

1.6 顶体酶活性检测 将液化好的精液充分颠倒混匀后计算浓度,每份标本均同时设定测定管和对照管,均为 1.5 ml 的 Eppendorf 管。每管参加反应精子数为 7.5×10^6 个,根据标本精子浓度计算每管需要的精液量 ($V = 7.5 / \text{精子浓度}$)。25℃ 下 2 000 r/min 离心 20 min,将测定管和对照管倒扣于吸水纸上,除去精浆,在测定管和对照管内各加入 100 μl 抑制剂以去除精浆蛋白酶抑制因子,加盖后轻弹管底,使沉淀精子困在管内均匀悬浮。向测定管和对照管内各加入 1 000 μl 反应液,再向对照管内加入 100 μl 终止液。将测定管和对照管于 24℃ 水中孵育 1 h,再加入 100 μl 终止液于测定管中,25℃ 下 2 000 r/min 离心 15 min,把上清液移入 0.5 cm 比色皿中,采用 410 nm 波长比色,双蒸水调零后采用分光光度计分别测算测定管和对照管的 A 值。顶体酶活性 ($\mu\text{IU}/10^6$ 精子) = (测定管 A 值 - 对照管 A 值) $\times 10^6 / 247.5 \times 7.5$ 。正常参考值:顶体酶活性 $\geq 48.2 \mu\text{IU}/10^6$ 精子。

1.7 观察指标 (1) 比较两组精液相关参数,包括前

表 1 两组患者精液相关参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	a 级百分率 (%)	a + b 级百分率 (%)	精子活动率 (%)	正常精子形态率 (%)	精子浓度 ($\times 10^6/\text{ml}$)
研究组	300	27.64 \pm 10.59	43.23 \pm 18.28	50.74 \pm 20.51	7.81 \pm 4.93	48.76 \pm 30.22
对照组	300	36.75 \pm 13.44	51.63 \pm 16.57	61.03 \pm 19.26	17.35 \pm 10.14	69.03 \pm 47.26
t 值		9.222	5.897	6.335	14.655	6.259
P 值		<0.001	0.012	0.008	<0.001	0.009

2.2 两组顶体酶活性比较 研究组顶体酶活性为 (47.23 \pm 8.95) $\mu\text{IU}/10^6$ 精子,低于对照组的 (56.69 \pm 10.42) $\mu\text{IU}/10^6$ ($t = 11.929, P < 0.001$)。

2.3 顶体酶活性与精子相关参数及受精率相关性分析 顶体酶活性与 a 级、a + b 级、精子活率、正常精子形态、精子浓度、受精率均呈正相关 (均 $P < 0.05$),见表 2。

表 2 顶体酶活性与精子相关参数及受精率相关性分析

指标	r 值	P 值
a 级	0.775	0.010
a + b 级	0.706	0.038
精子活率	0.728	0.024
正常精子形态	0.793	0.006
精子浓度	0.714	0.035
受精率	0.817	<0.001

3 讨论

精子质量好坏是评估男性生育功能的重要指标,一般的精液分析对预测精子受精能力存在局限性,因此还需要进行部分精子功能试验,以完整地评估男性生育功能,而顶体酶活性检测是目前广泛受关注的重点检查项

向运动精子 (a 级) 百分率 (前向运动精子数/精子总数 $\times 100\%$)、快速前向运动精子 (a + b 级) 百分率 (快速前向运动精子/精子总数 $\times 100\%$)、精子活动率 (活动精子/精子总数 $\times 100\%$)、正常精子形态率 (精子形态正常例数/精子总数) 和精子浓度; (2) 比较两组顶体酶活性; (3) 分析所有研究对象的顶体酶活性与 a 级、a + b 级、精子活率、正常精子形态、精子浓度、受精率相关性。

1.8 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 t 检验;计数资料以例数 (百分比) 表示,比较采用 χ^2 检验;采用 Spearman 系数进行相关分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组精液相关参数比较 研究组 a 级百分率、a + b 级百分率、精子活动率、正常精子形态率和精子浓度均低于对照组 (均 $P < 0.05$),见表 1。

目^[4-5]。顶体酶是受精过程中不可缺少的一种蛋白水解酶,可以水解卵透明带糖蛋白,使精子穿过卵丘和透明带,与卵子结合;同时顶体酶还可以促进生殖道激肽释放,增强精子活力和运动能力^[6-7]。当顶体酶活性不足时,精子运动受到影响,难以与卵子结合形成受精卵,致使男性不育^[8]。孙琴等^[9]研究表明,顶体酶活性较低男性受精率低于顶体酶活性较高的男性。因此,对于不明原因的男性不育患者,精子顶体酶活性是判断精子功能的重要指标,对 IVF-ET 结局也有重要影响^[10-11]。

本研究以壮族男性为研究对象,受试者民族相同,均处于相同地区与地理环境,生活习俗相近,或可为分析本地区男性的顶体酶活性情况提供参考。本研究结果显示,研究组的顶体酶活性低于对照组 ($P < 0.05$),提示受精率低的壮族男性顶体酶活性降低;进一步的相关性分析结果也显示,壮族男性的顶体酶活性与受精率呈正相关 ($P < 0.05$),即受精率会随着顶体酶活性升高而升高,提示顶体酶活性异常可影响受精率,与孙琴等^[9]的研究结果相似。

本研究结果显示,研究组 a 级、a + b 级、精子活率、正常精子形态和精子浓度均低于对照组 (均 $P < 0.05$),

提示受精率低的壮族男性精子活力与精子形态均存在异常。a级、a+b级、精子活率、正常精子形态和精子浓度均是精子与卵子正常结合的重要条件,顶体酶活性较低时,生殖道激肽释放减少,精子活力和运动能力降低,形态异常,且不易透过卵透明带,无法与卵子正常结合,IVF-ET成功率下降。而丁锦丽等^[12]对男性精子顶体酶活性与精液常规参数进行相关性分析后发现,精子顶体酶活性与精子正常形态、精子活力和精子浓度均存在相关性。本研究中,顶体酶活性与a级、a+b级、精子活率、正常精子形态、精子浓度均呈正相关(均 $P < 0.05$)。因此,顶体酶活性异常可能会影响精子的活力与形态,从而导致受精率下降。

综上所述,低受精率的壮族男性精子顶体酶活性较低;顶体酶活性异常可能会影响精子的活力与形态,从而导致受精率下降。此外,影响顶体酶活性的因素可能包括禁欲时间、药物、精液体位停留时间等^[13-14],本次研究尚未纳入上述因素进行分析,因此还需扩大样本量进行更加深入的研究。

参 考 文 献

[1] 周保锋,梁江红,邓建平. 子宫内膜异位症患者体外受精或卵胞浆内单精子注射临床结局与体质量指数的相关性分析[J]. 中国性科学,2016,25(4):132-135.

[2] Ahammad MU, Nishino C, Tatemoto H, et al. Acrosome reaction of fowl sperm; evidence for shedding of the acrosomal cap in intact form to release acrosomal enzyme [J]. Poult Sci, 2013,92(3):798-803.

[3] 蒲江波,高建,唐雪莲. 畸形精子症患者体外精子的PR、PR+NP以及顶体酶活性在不同时间段的下降速率比较[J]. 中华男科学杂志,2015,21(8):733-736.

[4] Jamalan M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, et al. Human Sperm Quality and Metal Toxicants; Protective Effects of some Flavonoids on Male Reproductive Function [J]. Int J Fertil Steril, 2016,10(2):215-223.

[5] 覃湛,袁逸之,袁少英,等. 精索静脉曲张不育症患者精浆生化标志物与精子顶体酶的测定与分析[J]. 中国医药导报,2014,11(3):12-16.

[6] 马晓萍,高晓勤,杨燕平,等. 人精子顶体内顶体蛋白酶和透明质酸酶对男性生育力的影响[J]. 检验医学,2014,29(3):258-261.

[7] Tanphaichitr N, Kongmanas K, Kruevaisayawan H, et al. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm-egg recognition; roles of acrosomal proteins [J]. Asian J Androl, 2015,17(4):574-582.

[8] Ma L, Yu H, Ni Z, et al. Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility [J]. J Biol Chem, 2013,288(14):10154-10165.

[9] 孙琴,李鸿儒,梁元姣,等. 精子顶体酶检测对不明原因不孕夫妇助孕治疗方案选择的临床意义[J]. 中华男科学杂志,2017,23(2):152-156.

[10] 丁锦丽,杨菁,张怡,等. 男性精子顶体酶活性与精液常规参数的相关性分析[J]. 中国性科学,2015,24(8):95-97.

[11] 蒲江波,唐雪莲,李雪梅. 复方玄驹胶囊联合维生素E、C治疗男性不育症的临床疗效[J]. 实用医学杂志,2016,32(15):2560-2562.

[12] 王箭,吴方贵,邹红艳,等. 精子DNA碎片率、精子形态率与精子顶体酶之间的关系及其对妊娠结局影响的研究[J]. 中国妇幼保健,2015,30(22):3845-3847.

[13] 何连利,刁英,杨名慧,等. 少弱精症患者不同禁欲时间采集精液对体外受精-胚胎移植治疗结局及受精方式的影响[J]. 中国妇幼保健,2014,29(30):4958-4960.

[14] 李贞莹,刘文礼,王海华,等. 银翘消支饮治疗精液解脲支原体感染及其对精子顶体酶活性的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(12):4526-4527.

(收稿日期:2018-03-08 修回日期:2018-06-08)

● 参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型 专著 论文集 报纸文章 期刊文章 学位论文 报告 标准 专利

文献类型标识 M C N J D R S P

对于专著、论文集集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母“A”;对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型 数据库 计算机程序 电子公告

电子文献类型标识 DB CP EB