

关于男性生育力的人精子顶体内顶体蛋白酶和透明质酸酶作用解析

李林 吴励梅 罗一平 田小燕 李彩英 徐妙容
(广东省佛山市顺德区第一人民医院生殖健康与不孕科 佛山 528300)

摘要:目的:解析精子透明质酸酶(HYD)和精子顶体蛋白酶(ACE)在男性生育力中所起的作用。方法:以不育者为实验组,以来我院检查身体的健康正常生育男性为对照组,用明胶底物膜法对精子样本检验,并进行组间对比。结果:实验组精子畸形率较高,ACE 阳性率、活性强度、HYD 阳性率、活性强度均低于对照组,且精子密度及活性与上述指标呈正相关($P<0.05$)。结论:HYD 及 ACE 在男性生育能力中起到至关重要的作用。

关键词:男性生育力;精子;ACE;HYD

中图分类号:R698.2

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.05.012

有研究认为精子透明质酸酶(HYD)和精子顶体蛋白酶(ACE)与男性生育能力相关,但其具体所起的作用却未经证实^[1-2]。本研究采用细胞染色技术对不育症患者精液样本进行观察,并通过与正常人的精液比较来探讨其作用。现报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料 本研究选取 2013 年 4 月~2015 年 9 月期间在我院生殖健康与不孕科就诊的不育症患者为实验组,同时以身体健康正常生育男性为对照组。诊断标准:前向运动(PR)级精子百分率 $>32\%$ 、精子密度 $>15\times 10^6/\text{ml}$ 为正常^[3]。纳入标准:已婚且有 1 年以上同居经历;夫妻性生活正常;处在正常可生育年龄范围内(本研究选取 24~35 岁患者)。排除标准:因女方原因导致不育。经纳入、排除后共选入对象 70 例。实验组 20 例,年龄 24~35 岁,平均年龄 (29.32 ± 2.16) 岁,按精子活动率和精子密度各分为三组。对照组 50 例,年龄 24~35 岁,平均年龄 (29.15 ± 2.09) 岁。两组一般资料对比,无明显差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法 用明胶底物膜法对精子样本进行检验,对比正常男性与不育者精子样本差异,分析人精子顶体蛋白酶与透明质酸酶的作用。研究对象需要禁欲 3~7 d,采用手淫法取精液,全部收集于干燥无菌取精杯中,放置 37℃恒温箱内孵育,待液化后精液样本处理。通过人工镜检法准确计数精子畸形率、活动率、密度。移取精液于 15 ml 锥形管内,相对离心力 900 g 离心 10 min,将精浆上层去除,用磷酸盐缓冲液(PBS)对沉淀物洗涤,用 2 倍体积的 PBS 将洗涤后的沉淀物悬浮,取 1~2 滴悬浮液,滴于明胶膜片上,保持温度在 37℃恒温内 3 h,干燥后涂片、孵育、对其进行观察。

HYD 检测法: 在 0.2 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液中放入药盒底膜片,缓冲液 PH 值为 4,保持 20

min,以矫正 PH 值。将以上的 PBS 精子悬浮液取 1~2 滴在药盒底膜片上涂抹,并放在温度为 37℃的恒湿恒温箱中孵育。孵育 3 h 后取出,并在室温下进行干燥,干燥后置于普通光镜下对孵育结果观察。**ACE 检测法:**把药盒底膜片放入巴比妥钠醋酸缓冲液当中,10 s 后取出,进行干燥处理。干燥后将精子 PBS 悬浮液均匀铺开在底膜片上 1~2 滴,放于温度为 37℃的恒温恒湿箱当中孵育,于 2 h 后取出,并在室温下做干燥镜检^[4]。

观察组患者根据精子密度不同进一步分组,其中 M1 组精子浓度 $>40\times 10^6/\text{ml}$,M2 组精子浓度 $15\sim 40\times 10^6/\text{ml}$,M3 组精子浓度 $<15\times 10^6/\text{ml}$ 。同时,根据精子活动率不同进一步分组,其中 H1 组 PR $>50\%$,H2 组 PR $32\%\sim 50\%$,H3 组 PR $<32\%$ 。

1.3 评定标准^[5-6] 本次实验检测用显微镜型号均为 Leica DME,一般检测所用视野六个左右即可,随即选取 200 个精子头部对其进行观察检测。检测结果显示其头部周围存在不同程度的晕环情况即可判定为 HYD 或 ACE 阳性。确定阳性后,医护人员需要选取专业合理的测微尺测量精子头部周围晕环的直径,整理分析不同测量数据,最终得出平均值,根据该数值能够对 HYD 或 ACE 的活性强度进行判定。

1.4 观察指标 主要对两组患者的精子密度及活性指标进行观察,同时观察分析实验组患者精子密度与 ACE 和 HYD 及精子活动率与 ACE 和 HYD 之间的关系。

1.5 统计学方法 将所有研究数据纳入 SPSS19.0 软件,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,用 t 检验;计数资料以率(%)表示,用 χ^2 检验。判定统计学差异的标准为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 健康人与不育患者的精子密度及活性相关指标比较 HYD 阳性率、活性强度及 ACE 阳性率和

活性程度比较,实验组低于对照组,而精子畸形率比较,则实验组较高, $P<0.05$ 。见表 1。

表 1 实验组与对照组精子密度及活性指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HYD 活性强度(μm)	HYD 阳性(%)	精子畸形率(%)	ACE 活性强度(μm)	ACE 阳性(%)
实验组	20	28.31 $\pm$ 17.32*	37.25 $\pm$ 15.32*	53.30 $\pm$ 10.22*	27.02 $\pm$ 12.31*	44.01 $\pm$ 7.32*
对照组	50	49.21 $\pm$ 17.25	76.35 $\pm$ 9.26	42.15 $\pm$ 6.31	46.21 $\pm$ 7.98	84.02 $\pm$ 8.51
t		11.359	20.315	12.580	19.214	20.145
P		0.015	0.001	0.021	0.002	0.001

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

2.2 不同精子密度下的相关指标比较 相比对照组而言,精子密度越低则 ACE 及 HYD 阳性和活性相关指标越低,组间对比均经统计学验证证实, $P<0.05$ 。见表 2。

表 2 精子密度为因变量下的相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE 阳性(%)	ACE活性强度(μm)	HYD 阳性(%)	HYD 活性强度(μm)
M1 组	9	55.25 $\pm$ 12.64*	38.52 $\pm$ 17.25*	52.31 $\pm$ 10.34*	39.80 $\pm$ 12.45*
M2 组	6	39.25 $\pm$ 6.20*	22.34 $\pm$ 5.01*	35.35 $\pm$ 7.89*	21.63 $\pm$ 8.65*
M3 组	5	29.49 $\pm$ 5.21*	11.94 $\pm$ 2.64*	12.42 $\pm$ 72.25*	15.65 $\pm$ 3.42*
对照组	50	84.02 $\pm$ 8.51	46.21 $\pm$ 7.98	76.35 $\pm$ 9.26	49.21 $\pm$ 17.25

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

2.3 不同精子活动率下的相关指标比较 相比对照组而言,精子活动率越低则 ACE 及 HYD 阳性和活性相关指标越低,组间对比均经统计学验证证实, $P<0.05$ 。见表 3。

表 3 精子活动率为因变量下的相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE 阳性(%)	ACE活性强度(μm)	HYD 阳性(%)	HYD 活性强度(μm)
H1 组	10	51.14 $\pm$ 12.32*	38.52 $\pm$ 17.25*	47.25 $\pm$ 15.02*	37.31 $\pm$ 15.32*
H2 组	5	40.25 $\pm$ 6.21*	22.34 $\pm$ 5.21*	29.35 $\pm$ 7.54*	22.98 $\pm$ 3.65*
H3 组	5	33.51 $\pm$ 5.23*	12.97 $\pm$ 2.65*	25.15 $\pm$ 76.25*	15.65 $\pm$ 3.42*
对照组	50	84.02 $\pm$ 8.51	46.21 $\pm$ 7.98	76.35 $\pm$ 9.26	49.21 $\pm$ 17.25

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

3 讨论

HYD 在精子顶体内酶组中发挥重要作用,其细胞颗粒在卵泡附近呈分散式分布,能促使精子通过。并利用相关酶系以及其他顶体蛋白酶,在配合作用下创造适宜于精子和卵子结合的环境条件^[7]。在当前医学界对人体微观认知中,酶共有 24 种,除了 HYD 之外,另一种重要的酶就是 ACE。ACE 在精子获能时形成透明带,并与 HYD 相配合促进精子通过。所以两者均成为对精子活性进行评价的有效指标。加之两者之间的配合关系,对 HYD 和 ACE 进行协同检测则能通过综合反馈的信息,对男性生育

能力做出准确的评估^[8]。另外,精子内含 HYD 及 ACE 数量可以通过其头部亮环进行观察而得出,一般来说亮环亮度越强、范围越大则 HYD 及 ACE 数量也就越多,并且酶活性越高。

本次研究证实,ACE 和 HYD 指标均能有效反应男性生育能力,通过两者综合测量能在常规检查的基础上提高诊断准确率。从研究结果中发现,男性不育症患者精子畸形率较高,并且 HYD 阳性率、活性强度及 ACE 阳性率和活性程度比较结果显示实验组低于对照组。相比对照组而言,精子密度越低则 ACE 及 HYD 阳性和活性相关指标越低。精子活动率越低则 ACE 及 HYD 阳性和活性相关指标越低。综上所述,HYD 及 ACE 在男性生育能力中起到至关重要的作用,在对因不育的男性患者进行临床检查时,应采取 ACE 及 HYD 协同检测方法,以加强诊断的及时性和准确性。

参考文献

[1]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

[2]郑立宏,杨丹,高晓勤.有机磷农药对精子顶体内透明质酸酶的影响[J].解剖学杂志,2014,37(5):636-638

[3]谷翊群.世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M].人民卫生出版社,2011

[4]梁鑫,成妹婷,王正荣,等.Clock 基因对精子顶体酶的影响[J].中国男科学杂志,2015,29(11):3-7,22

[5]钟志敏,王维,莫云丹,等.血清顶体蛋白酶抗体与精子蛋白 17 抗体对不孕不育症的临床价值探讨[J].检验医学,2013,28(4):276-279

[6]杨晶,李洪锐,易善勇,等.红花油体表表达人透明质酸酶基因的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,23(9):191-195

[7]杨建辉,陈利红,高晓勤.不育患者精子质量与顶体内透明质酸酶活性研究[J].黔南民族医学学报,2014,27(2):79-82

[8]马晓萍,高晓勤,丁贤胜,等.人精浆中性 α -1,4- 糖苷酶活性与精子透明质酸酶活性的关系[J].基础医学与临床,2011,31(2):166-169

(收稿日期: 2016-04-18)

《实用中西医结合临床》杂志在线投稿系统指南

我刊已启用在线投稿系统, 网址: <http://www.szyxyjhlc.com>, 欢迎大家通过本网站投稿、浏览文章。通过本网站,可实现不限时在线投稿、审核、编

辑、校对、组版等全流程功能,作者可在线查看稿件流程情况,专家可登录网站实行在线审核,并可全文查阅本刊以往刊出文章。