

影响精子 DNA 完整性高危因素及检测技术进展

兰云竹¹ 综述,付莉^{1*} 毛熙光² 审校

基金项目: 泸医附院(编号: 2014-71 号-17)

作者单位: 646000 四川 泸州 西南医科大学附属医院 1. 生殖中心; 2. 妇产科

作者简介: 兰云竹 毕业于西南医科大学, 硕士 医师, 研究方向为生殖内分泌

* 通讯作者, E-mail: 1987flpays@163.com

【摘要】人类精子保存并承载着父辈遗传信息, 精液生成过程缜密有序, 但易受机体内在因素及环境外在因素影响。普通精液常规结果波动较大, 通过对精子 DNA 完整性的监测, 为男性患者精液质量进行评估参考。现就影响精子 DNA 完整性高危因素及精子 DNA 检测技术进行综述。

【关键词】精子 DNA 完整性; 染色体结构; 高危因素; 检测技术

【中图分类号】R 588.1 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-4020(2017)01-0029-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2017.01.08

High risk factors affect sperm DNA integrity and progress on the detection techniques for sperm DNA integrity

LAN Yun-zhu¹, FU Li^{1*}, MAO Xi-guang²

1. Department of Reproductive Center 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 646000 P. R. China

* Corresponding author, E-mail: 1987flpays@163.com

【Abstract】Objective Human sperm preserve and carry the fathers' genetic information. The generative process of semen is careful and orderly, but affected by internal factors and environment external factors. Routine results of semen are instable, the sperm DNA integrity monitoring can provide evaluation reference of semen quality. We summarized high risk factors affecting sperm DNA integrity and progress on the detection techniques for sperm DNA integrity.

【Key words】sperm DNA integrity; chromosome structure; high risk factors; detection techniques

有研究表明, 精子 DNA 的损伤可能与氧化应激、细胞凋亡及染色质结构改变有关^[1]。虽然精子核 DNA 损伤的确切机制尚未完全明了, 但精子 DNA 完整性破坏易导致受精成功率降低、胚胎发育延迟、习惯性流产增加, 甚至影响子代健康^[2]。目前, 精子 DNA 完整性检测已成为评价精子质量的重

要指标之一, 精子 DNA 碎片率(DNA fragmentation index, DFI) 较常规精液检测结果更具有稳定性^[3]。本文主要对精子 DNA 完整性的高危因素从内部及外部因素进行探讨, 并就精子 DNA 完整性检测的方法进行综述。

1 容易影响精子 DNA 完整性的高危因素

1.1 精子内部生成环境

作为精子内部生成环境,需少量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)在精子获能等生理过程中起作用,但是当生殖道炎症、精索静脉曲张、畸形精子产生等因素刺激活性氧增加过多时,不仅可能促使精子基因改变,诱导 DNA 完整性破坏,同时可能启动细胞凋亡程序,诱使细胞凋亡。

1.1.1 氧化应激 炎症因素促进机体产生大量中性粒细胞参与局部抗炎作用,同时诱导细胞合成大量 ROS,此外,存在于精子膜上的还原型辅酶氧化酶反应及精子线粒体本身的呼吸链作用,使大量的 ROS 累积储存在附睾中。由于附睾中有抗氧化作用的多种抗氧化酶,可以暂时阻止损伤发生,但当超过其负荷时,大量的 ROS 攻击精子 DNA,可能导致其完整性损伤、破坏。魏任雄等^[4]在精浆弹性蛋白酶(seminal plasma elastase, SPE)与精子 DNA 完整性的相关性研究中利用生殖道炎症标志物 SPE 对精液质量及精子 DNA 完整性探讨,得出与正常对照组相比,不育组的正常形态精子百分率下降, DNA 碎片指数和 SPE 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明生殖道炎症可能是导致精子 DNA 损伤的重要原因之一。

1.1.2 细胞膜过氧化 精子膜上本身含有不饱和脂肪酸,有多个双键固定,维持表面膜流动性。当 ROS 增多后,高浓度的不饱和脂肪酸同时也受到攻击,使其发生脂类的过氧化反应,失去双键结构,使精子膜失去流动性,最终导致精子功能障碍。焦瑞宝等^[5]对精子膜脂类过氧化反应的程度以反应产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的研究显示,随着精子活力下降,精子 MDA 呈增加趋势,说明精子膜的脂类过氧化增加,改变了精子膜流动性结构,降低精子运动能力,同时与增加的 ROS 共同作用,影响精子 DNA 完整性,减少精子正常形态数,降低受精成功率。

1.1.3 细胞凋亡 ROS 的增加及精子膜运动的改变使得精子细胞生长环境受到改变,诱导精子基因突变,诱使细胞中凋亡基因与抑凋亡基因表达不平衡,当促凋亡基因过度表达时可能引起精子细胞的凋亡,彻底破坏精子 DNA^[6]。Hikim AP 等^[7]认为也有可能氧化应激过程中 ROS 诱导了细胞凋亡受体自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)和配体(Fas Ligand, Fas-L)表达,从而调控精子细胞

凋亡。

1.2 机体自身条件因素

1.2.1 年龄 乜照燕等^[8]在研究不同年龄阶段男性精子 DNA 完整性变化时发现,相对于 <35 岁的男性组,35~39 岁组和 >40 岁组精子 DNA 完整性明显偏低,而且 >40 岁组的精子凋亡率分别高于 <35 岁组和 35~39 岁组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着年龄的增加,不仅是精子细胞凋亡数目增加,精子 DNA 完整性也在不断下降。可能与生殖器官质性衰退、半胱天冬酶及 Fas/Fas-L 途径异常等因素有关。

1.2.2 乙肝感染 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)可以在男性性腺慢性持续性复制、繁殖,干扰精液生成环境,影响精子形成,同时也作用于附睾中储存的精子细胞,促使精子染色体畸变,改变其结构及诱导基因突变^[9]。HBV 感染还可导致全基因组低甲基化,出现高频率杂合性缺失^[10]。刘浩等^[11]根据精液乙肝病毒拷贝数,对精液中乙肝病毒作用于精子 DNA 完整性影响进行探究,证明病毒载量(对数换算后)与精子 DNA 碎片指数呈正相关,说明乙肝病毒不仅能在男性精液中生存,还可导致精子 DNA 完整性破坏,使 HBV 感染者不育率提高。

1.2.3 睡眠减少 精液生存环境具有抗氧化系统保护机制,包括超氧化物酶、维生素 E、辅酶 Q 等。睡眠减少通过体内条件可以导致氧化还原酶活性降低,产生精子生存环境不同程度的过氧化损伤,破坏精子 DNA 完整性。由于睡眠减少也可干扰下丘脑-垂体-性腺轴相关激素分泌的平衡,长期处于应激状态下催乳素(prolactin, PRL)会相应升高,大量的 PRL 会抑制睾丸生精功能,而部分受下丘脑调节的甲状腺激素、促甲状腺激素处于高水平状态,诱发机体高血糖、低胆固醇状态,不仅使精子生成过程中 DNA 组建及线粒体活动的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)功能受阻,也使睾酮合成原料减少^[12]。Methippara MM 等^[13]认为在快速动眼期中促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)增多,这两种激素具有促进睾酮产生功能,但长期睡眠减少则很难进入快速动眼期,从而 LH、FSH 减少,影响睾丸组织产生睾酮,而睾酮可促进精液产生。

1.3 外界环境

1.3.1 久坐 何泳志等^[14]对150例不育患者以开车时间多少分为3组,其中A组(50例)每天开车1~5h,B组(60例)每天开车>5h,C组(40例)每天开车0h,进行精子DNA完整性比对检测,结果显示B组患者DNA DFI高于A、C组($P < 0.01$),说明DFI升高与开车时间长有关。究其原因可能与长期久坐后导致局部温度升高,尤其是睾丸组织,影响睾丸生殖细胞的生长环境及降低精液质量。Bujan等^[15]发现司机在驾驶过程中阴囊温度较步行时温度平均升高2.2℃,腹股沟区温度升高后影响阴囊温度的调控,从而影响睾丸生殖细胞产生及营养因子的生成,最终可能损害精子DNA。

1.3.2 吸烟或被动吸烟 李强等^[16]对841例吸烟患者进行研究,吸烟组DNA完整精子比例(34%)显著低于不吸烟组(77%)($P < 0.05$)。细胞周期检测点激酶1(checkpoint kinase I,Chk1)基因mRNA相对表达量检测吸烟组表达低($P < 0.05$)。DNA损伤后DNA损伤检测点及时延迟或停止细胞生长周期,启动DNA损伤相应修复机制^[17]。Chk1通过细胞分裂周期蛋白25同源蛋白C(cell division cycle 25 homolog c,Cdc25c)磷酸化作用,对DNA受损部位进行修复,是G2-DNA损伤校正的核心^[18]。

1.3.3 环境污染 在含有苯、甲醛、铅等可挥发有机物环境中工作,不仅对血液系统、呼吸系统等产生影响,同样也可能对生殖系统产生损害。黄国泉^[19]对冶炼厂工人(铅作业人员)及社会普通工作者(非铅作业人员)进行比对发现,铅工作人员血铅含量较高,精子活力减弱,精子畸形率增高。但目前并无直接外界环境导致人精子DNA完整性破坏的实验报道。

2 常见精子DNA检测技术

精子DNA DFI检测手段可以分为两大类:直接法与间接法。

2.1 直接法

2.1.1 荧光免疫杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH) 利用荧光染料通过免疫化学过程,与介导分子原位杂交,在已损失的DNA序列上显示出杂交信号表明完整性破坏。目前,最新的多彩FISH可同时用7种颜色进行检测。并且同时兼具测多个靶序列。而绿色荧光蛋白分子技术则是利用不同的基因插入质粒或染色体DNA而表达的绿色荧光蛋白,对细胞进行可视化检测及观察基因表达^[20]。

2.1.2 原位末端标记法(in situ end labeling, ISEL)

原理是凋亡精子细胞会存有3'-OH末端片段。利用细胞内源性核酸内切酶激活后,切断细胞体内DNA片段成可能含有3'-OH末端片段,将标记物的脱氧核苷酸转移到3'-OH末端,通过荧光显微镜、流式细胞仪等技术检测。检测到精子凋亡细胞DNA片段,从而得知该精子DNA是否完整。

2.2 间接法

2.2.1 精子染色质结构分析试验法(sperm chromatin structure assay, SCSA) 是1980年由Evenson等提出检测精子受损DNA方法,利用吡啶橙(AO)与在酸作用下成为受损DNA的单链反应生成黄色或红色荧光,而与双链DNA结合发出绿色荧光原理,在流式细胞仪及荧光显微镜下对精子DNA完整性进行评估。利用SCSA法染色后流式细胞仪观察的精子DNA更加准确,有较高临床指导及参考价值,是检测精子DNA完整性的“金标准”^[21]。

2.2.2 精子染色质扩散试验(sperm chromatin dispersion test, SCD) 是2003年Fernández等在研究精子DNA完整性上提出的另一种方法。利用酸处理精液后,裂解液裂解精子细胞并去除核蛋白,再用染料染色。无损伤的精子DNA可形成DNA环状延伸的核晕,而已有损伤的异常精子DNA则不能形成核晕,或者核晕很小。最后通过光学显微镜下进行计数统计。目前已有改良SCD法试用于检测精子DNA完整性,如将染色剂改变为荧光染色剂可以辅助提高辨别核晕大小。邱毅等^[22]将中草药皂角提取液替代三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸二钠盐,在保护环境的同时,也可以减少破坏精子尾部,使其实验结果更为准确。

2.2.3 单细胞凝胶电泳 又称为彗星实验,是1984年由Ostling等^[23]提出,利用精子细胞DNA受损出现断裂时,超螺旋结构不稳定,暴露超螺旋上的负电荷,在电场力作用下,损伤的DNA片段向阳极运动,当DNA损伤越严重,产生的碱性变性断链或片段就越多,形成类似“彗星”样改变。不仅可以了解精子DNA完整性变化,同时也可以了解DNA损伤类型。陈建伟等^[24]对彗星实验进行了进一步改良,利用中性凝胶电泳,当DNA双链均断裂时进入凝胶中向阳极迁移,更加明确提示精子DNA是单链还是双链损伤,对临床男性生育能力预评估提供参考依据。

2.2.4 其他 8-羟基脱氧鸟苷法(8-OHdG),主

要检测精子 DNA 氧化损伤程度。聚合酶连反应 PCR 则是针对性地对精子染色体基因损伤位点检测,受人群选择、种族差异等影响。

3 总结

精子 DNA 碎片化机制至今尚未清楚,通过汇总及分析可能影响精子 DNA 完整性的高危因素,期望在临床工作中对男性不育患者生活习惯及机体状态进行相应调整,适当提高精子 DNA 完整性。临床工作中对男性评估依据主要通过常规精液分析,但精液常规参数波动较大,受仪器、外界环境及检验者技巧影响。通过检测精子 DNA DFI,对男性精液质量更为稳定和准确的评估,有助于辅助生殖技术方式的选择。值得考虑的是,检测后的精液标本不能继续使用于辅助生殖过程,所以还需要探索对精子 DNA 完整性更为安全、有效的检测技术。

【参考文献】

- [1] 曾兰,叶飞,李运星,等. 精子 DNA 完整性与精液常规参数相关性分析 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2014, 6(4): 47-50.
- [2] DE Bantel - a, FLEURY - FEITH J, POIROT C, et al. Simultaneous vitality and DNA - fragmentation measurement in spermatozoa of smokers and non - smokers [J]. Cytometry. Part B, Clinical Cytometry, 2015, 88(2): 120-124.
- [3] 杨雪梅,宋亚曼. 精液常规参数对精子核 DNA 完整性影响的初步探讨 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(18): 3113-3116.
- [4] 魏任雄,王辉. 精浆弹性蛋白酶与精液常规参数及精子 DNA 完整性的相关性研究 [J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(10): 902-906.
- [5] 焦瑞宝,冯恒孝,唐吉斌,等. 不育患者精液的氧化应激对精子 DNA 完整性等参数的影响 [J]. 检验医学, 2013, 28(6): 487-491.
- [6] 赵永平,林典梁,张晓威,等. 精子细胞凋亡率与胚胎停育相关分析 [J]. 中国计划生育学杂志, 2012, 20(9): 619-622.
- [7] Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, et al. Key apoptotic pathways for heat - induced programmed germ cell death in the testis [J]. Endocrinology, 2003, 144(7): 3167-3175.
- [8] 乜照燕,吴海峰,张娜,等. 不同年龄对精子凋亡率及 DNA 完整性影响的研究 [J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(11): 1004-1008.
- [9] P Oger, C Yazbecle, Gervais, et al. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF [J]. Reprod biomed online, 2011, 23(2): 207-212.
- [10] Tong A, Gou L, Lau QC, et al. Proteomic profiling identifies aberrant epigenetic modifications induced by hepatitis B virus X protein [J]. Journal of proteome research, 2009, 8(2): 1037-1046.
- [11] 刘浩,耿春惠,王维,等. 乙肝病毒对人精液参数和精子 DNA 完整性的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(10): 896-898.
- [12] 赵一帆,任飞强,胡开妮,等. 睡眠剥夺导致精子质量异常的可能机制探讨 [J]. 黑龙江医学, 2015, 39(10): 1165-1166.
- [13] Methippara MM, Alam MN, Szymusiak R, et al. Preoptic Area Warming Inhibits Wake - active Neurons in the Perifornical Lateral Hypothalamus [J]. Brain Res, 2003, 960(960): 165-173.
- [14] 何泳志,李大文,何冰,等. 不育男性司机精液质量及精子 DNA 完整率与工作时间的关联性研究 [J]. 中国临床新医学, 2015, 8(6): 516-519.
- [15] Bujan L, Daudin M, Charlet JP, et al. Increase in Scrotal Temperature in Car Drivers. Hum Reprod [J] 2000, 15(6): 1355-1357.
- [16] 李强,崔向荣,井宣,等. 吸烟对男性精液质量,精子 DNA 完整性及 Chk1 基因表达的影响 [J]. 生殖医学杂志, 2015, 24(12): 1019-1024.
- [17] Yue M, Zeng L, Singh A, et al. Rad4 mainly functions in Chk1 - mediated DNA damage checkpoint pathway as a scaffold protein in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe [J]. PLoS One, 2014, 9(3): 434-438.
- [18] AL - KAABI M M, ALSHAREEDA A T, JERJEES D A, et al. Checkpoint kinase1 (CHK1) is an important biomarker in breast cancer having a role in chemotherapy response [J]. British Journal of Cancer, 2015, 112(5): 901-911.
- [19] 黄国泉. 血铅浓度对精子质量的影响探讨 [J]. 医学信息(上旬刊), 2011, 24(3): 1585-1586.
- [20] 邢德峰,任南琪,王爱杰. FISH 技术在微生物生态学中的研究及进展 [J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 114-119.
- [21] 邱毅,张丽红,王磊光,等. 精子染色质扩散实验检测男性不育患者精子 DNA 碎片 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(6): 387-389, 后插一.
- [22] OSTLING O, JOHANSON K J. Microelectrophoretic study of radiation - induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984, 123(1): 291-298.
- [23] 陈建伟,张晓霞,崔云. 双尾彗星实验检测精子 DNA 完整性的方法学建立 [J]. 检验医学, 2012, 27(1): 21-25.

(收稿日期: 2016-01-15 编辑: 杨叶)