

流式细胞术在精液检测中的应用

靳韶华 综述, 李建远 审校(山东省烟台市毓璜顶医院中心实验室 264000)

【关键词】 流式细胞术; 精子; 检测

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 15. 046 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)15-1876-02

流式细胞术(FCM)是 20 世纪 70 年代发展起来的一种单细胞快速分析技术,已广泛应用于细胞生物学和医学的各个领域。精子质量检测是诊断男性不育的重要手段,由于检测精子数低及主观因素影响,常规的精液检查只能反映精子的形态特征和有限的功能,不能为生育力提供准确评估的依据。将 FCM 用于精液检查,可把定性的描述过渡到定量的研究,并可进行数据统计,大大提高了实验结果的科学性,而且可对精液进行高通量、多参数分析。因而 FCM 为客观地评价男性生育能力提供了有利的条件,有着广泛的应用前景。本文对流式细胞术在精液检测中的应用进行综述。

1 精子质膜完整性的检测

精子的质膜组分对精子质量具有非常重要的作用。精子的质膜完整性是精子存活的基本条件之一,也是检测精液质量的重要指标之一。精子质膜维持和调节胞内成分,质膜破损会导致精子内环境失衡,最终导致精子死亡^[1]。碘化丙啶(PI)、溴化乙锭(EB)、赫斯特荧光染料 33258(Hoechst33258)是用于死精子质膜特异性检测的荧光染料,其中 PI 最常用。它们是膜不透性的 DNA 探针,只有质膜破损的精子才能允许染料进入细胞与 DNA 结合。检测活精子特异性的荧光染料有 SYBR-14\羧基荧光素双醋酸盐(CFDA)、羧基二甲基荧光素双醋酸盐(CDMFDA)等,它们是膜通透性的染料,能进入质膜完整的精子^[2]。Hoechst33258、CFDA 等染料对某些细胞的膜功能和 DNA 完整性具有一定损害^[3]。Christensen 等^[4]用 SYBR-14/PI 检测哺乳动物精子,用 FCM 进行定量分析,发现活精子被 SYBR-14 染成绿色,死精子被 PI 染成红色;同时染上两种荧光的双阳性精子表示正处于由活到死的过度状态。PI 和 SYBR-14 联合使用,可以很好地检测精子活力。其原理可能是 PI 进入死精子头部后端,取代了 SYBR-14 或使 SYBR-14 的荧光淬灭。

2 染色质状态的检测

精子的染色质状态是目前研究较多的一个指标。精子染色质结构的稳定性对于精卵的正常结合及受精卵的发育均是十分重要的。精子发生和成熟过程中,染色体呈减数分裂,核内染色质高度缩合,其缩合程度与精子成熟度有关^[5]。用 FCM 结合 DNA 荧光染料(如 PI),可以间接反映出精子染色质缩合度,从而反映精子的成熟度,判断其生育能力。流式细胞仪可对精子染色质结构的缩合水平进行快速、精确的分析,但受样品的保存和放置时间等影响染色质结构完整性的变化因素较为敏感。精子染色质结构分析测量反映了不同精子染色质构象结构的异质性。人精子细胞在染色质缩合水平、内源性 DNA 缺口和组蛋白相关区域的长度方面显示出很大的变异性,大多数正常精子具有浓密的固缩核,也有许多精子具有不同含量的染色质缺陷。精子染色质结构分析能提供一个客观的精子染色质完整性分析,快速识别和评价精子细胞显示出对 DNA 变性的敏感性^[6]。精子染色质结构的完整性与精子畸形率、存活率有关,但与顶体完整率无关。

3 顶体状态检测

在受精过程中,精子发生顶体反应,释放顶体酶,穿入卵细胞进行受精。顶体结构及功能与妊娠率显著相关,正常的精子顶体及顶体反应是精卵结合的必要条件。传统的顶体检测方法技术要求较高,操作复杂,难以推广应用。FCM 为研究精子顶体结构的完整性及顶体反应能力提供了新的方向。实验证实,一些荧光染料染色后视野反差很大,能够很好的区分顶体完整和顶体破裂的精子。例如络合了异硫氰酸荧光素的花生凝集素(FITC-PNA),或者络合了异硫氰酸荧光素的豌豆凝集素(FITC-PSA)。精子顶体膜糖蛋白上存在花生凝集素受体半乳糖, FITC- PNA 能特异性地标记在顶体膜上,其荧光强度可反映顶体大小,因此通过测定荧光强度可间接反映顶体结构的完整性^[7-8]。

4 线粒体功能

线粒体是精子的能量供应中心,其功能状态直接影响精子的活动力,因此线粒体功能异常也是导致精子功能缺陷的重要病因之一。常用检测线粒体功能的荧光探针有:罗丹明(Rh123)、MITO 和 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑基碳化青碘(5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide,JC-1)。Rh123 可检测精子线粒体有无功能,但不能区别线粒体膜电位的高低。通常用 Rh123 和 PI 双染结合 FCM 检测精子线粒体功能。Rh123 是一种花青苷样荧光染料,呈绿色荧光,对线粒体有特异亲和性,通过 FCM 检测精子可分 3 群:PI(+)Rh123(-)为死精子;PI(-)Rh123(+)为线粒体功能良好的精子;PI(-)Rh123(-)为线粒体功能丧失的活精子。在 FCM 检测过程中,绿色荧光的强弱反应线粒体的功能,荧光越强,说明线粒体功能越好,精子活动力越强;反之精子活动力甚至缺乏^[9]。JC-1 在检测精子线粒体膜电位方面具有重要作用。JC-1 能较特异地与线粒体内膜结合,只在线粒体膜崩解时才释放出来,因此检测结果可靠,敏感性高,是目前检测精子线粒体功能最适合的探针。应用流式细胞术可以进行快速、高通量、多参数的定量分析,更加有利于精子线粒体膜电位的检测^[10]。

5 抗精子抗体的检测

1954 年在男性不育患者血清中发现了抗精子抗体(AsAb),目前其已被列入男性不育患者常规检查的项目之一。AsAb 主要有免疫球蛋白(Ig)A、IgG、IgM 3 种类型,血清中主要以 IgG、IgM 为主,而精液中主要为 IgA。有研究认为,只有精子表面 AsAb 附着才是直接导致男性免疫性不育的免疫因素,故精液中 AsAb 比血清中 AsAb 对生殖的影响更大^[11]。检测 AsAb 的方法较多,免疫株法是当前标准试验法,但费时且带有主观性,仅计数 100 个可活动精子。用 FCM 检测 AsAb 既提供了快速、高效的检测方法,又具有高度敏感性和特异性等优点,每秒数千个细胞的速度分析一万个精子,但 FCM 是否会提高 AsAb 的检出水平,需进一步证实^[12]。

6 生精细胞凋亡的检测

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育、维护内环境稳定、由基因控制的细胞主动死亡过程。研究表明细胞凋亡的失

控与许多疾病的发生有关,包括不育症。生精细胞凋亡的检测方法可采用电泳法或末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧核苷酸原位末端转移酶标记法(TUNEL)等,但这些方法操作较繁琐、主观性大,不宜常规使用。现在通常用 Annexin-V FITC/PI 双标记后上流式细胞仪检测生精细胞凋亡情况。Annexin-V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂蛋白,凋亡早期 Ca^{2+} 升高,磷脂酰丝氨酸(Ps)由质膜内层转移至外层,Annexin-V 与 Ps 有高特异性结合。因此标记了的 Annexin-V 作为荧光探针,与凋亡外侧暴露的 Ps 特异性结合,用流式细胞仪检测其凋亡,Annexin-V FITC/PI 是一种灵敏、准确、快速的方法。FCM 检测精子凋亡是一种迅速、准确、客观、可靠的评估精子功能和男性生育力的新方法^[13-14]。

7 讨 论

通过 FCM 的检测可以得到精液不同时期的细胞数据及精子形态指标,对临床诊断精子发生障碍的性质、原因和程度提供了客观的依据。对少、弱精子和无精子症的判断、治疗及疗效的观察可作正确的评价。

流式细胞仪在临床上的广泛应用为精子内部结构和功能的检测提供了一个新的思路。FCM 可以对精液常规检测进行补充,对男性不育的诊断和治疗及优生优育具有重要的意义。

参考文献

[1] 周鑫,夏欣一,曹奇,等. SYBR-14/PI 双染法流式细胞术检测精子质膜完整性的研究[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(7):589-593.

[2] Bollwein H, Fuchs I, Koess C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa [J]. Reprod Domest Anim, 2008, 43(2):189-195.

[3] Perticarari S, Ricci G, Granzotto M, et al. A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis [J]. Hum Reprod, 2007, 22(2):485-494.

[4] Christensen P, Boelling D, Pedersen KM, et al. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls [J]. J Androl,

2005, 26(1):98-106.

[5] Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment; a test whose time has come[J]. Fertil Steril, 2005, 84(8):850-853.

[6] Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin[J]. Arch Androl, 2000, 45(3):215-225.

[7] Riley-Vargas RC, Lanzendorf S, Atkinson JP. Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5):1241-1249.

[8] Petrunkina AM, Gropper B, Gunzel-Apel AR, et al. Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen[J]. Reproduction, 2004, 128(6):829-842.

[9] Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, et al. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility[J]. Hum Reprod, 2004, 19(10):2267-2276.

[10] 夏欣一, 吴永明, 侯保山, 等. JC-1 单标法流式细胞术检测精子线粒体膜电位的研究[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(2):135-138.

[11] 邢荣威, 赵大伟, 马圣君, 等. IgA 抗精子抗体对精子顶体反应的影响[J]. 中国男科学杂志, 2005, 19(6):37-39.

[12] Rasanen M, Agrawal YP, Sarikoski S. Seminal antisperm antibodies measured by direct flow cytometry do not correlate with those measured by indirect flow cytometry, the indirect immunobead test, and the indirect mixed anti-globulin reaction[J]. Fertil Steril, 1996, 65(1):170-175.

[13] Oosterhuis GJ, Vermes I. Apoptosis in human ejaculated spermatozoa [J]. Biol Regul Homeost Agents, 2004, 18(2):115-119.

[14] 王芳, 罗婧, 王丽婷, 等. 流式细胞仪检测正常男性精子细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(2):184-185.

(收稿日期:2011-03-25)

ABO 血型变异的研究进展

马海芳(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028)

【关键词】 ABO 基因; 血型变异; ABH 抗原变异; 研究进展
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.15.047 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)15-1877-04

ABH 血型抗原是在红细胞、内皮细胞、上皮细胞表面的糖蛋白或糖脂类蛋白上发现的碳水化合物结构。血型物质的前体 H 物质受糖基转移酶的修饰和控制。糖基转移酶是由 ABO 基因的 1 对等位基因决定,而红细胞上的 H 抗原则由 FUT1 基因控制的岩藻糖基转移酶所决定。A 抗原由 N-乙酰半乳糖胺修饰 H 抗原表达;B 抗原由半乳糖胺修饰 H 抗原表达;O 抗原则是 H 抗原本身,没有任何结构的修饰。ABH 抗原变异已经被认为是髓系白血病常见的症状,也出现在许多癌症患者的肿瘤细胞上。健康人的抗原也存在抗原变异的现象,但是这与细胞表面血型物质受到掩盖以及人体存在一些稀有 ABO 等位基因有关,如 A3 和 B3。

1 ABO 血型与人类发展

ABO 血型起源一直是人类学家的研究兴趣所在,一般公

认的是 O 血型抗原最先出现。在研究人类进化过程中基因变化的规律时,常用到 Hardy-Weinberg 平衡公式,即:人类在进化过程中,基因频率不会因随机的突变和杂交而改变,低频率将始终保持低频率;因此,ABO 血型的遗传规律和分布能够很好地反映出种族的延续和早期人类的迁移情况。

美国生物化学家博依德在血型与种族鉴定关系的研究上成就显著,他得出的结论是:不同的种族之间,血型明显不同。美洲印第安人几乎全是 O 型或是 O 型中混有一定比例的 A 型,没有 B 型或 AB 型;澳大利亚土著人则是 A 型中混有大量的 O 型,也没有 B 型血;西班牙北部的巴斯克人是欧洲最古老的人种,他们在巴斯克高地上过着与世隔绝的生活,调查发现巴斯克人含有高频率的 O 基因。遗传学家认为 ABO 血型是在人类进化迁徙过程中,在食物、气候等外部多种因素作用下形成