

- [3] 江虹,曾婷婷.全自动血细胞分析和白细胞分类复检规则的制定及评价[J].中华检验医学杂志,2007,30(9):996-998.
- [4] 王靖.白细胞分类显微镜法与 CD1600 血细胞分析仪法的对比分析[J].中国中医药咨询,2010,7(2):119.
- [5] 尹杰,权志博,贾平选,等.血细胞分析镜检标本筛选条件的制定及应用[J].现代检验医学杂志,2006,21(3):85.
- [6] 田露,汤萌,程爱香.血细胞形态学检查在临床工作中的应用体会[J].实验与检验医学,2010,28(5):527.
- [7] 薛春玲,黄东平. SF-3000 血细胞分析仪显微镜复检规则的制定和应用[J].临床医学工程,2010,17(1):41-42.
- [8] 吴玲玲,秦芳,黄爱军,等. SYSMEX XS800i 血液分析仪提示白细胞异常的可信度分析[J].临床输血与检验,2008,10(4):300-302.
- [9] 陈小剑,王晓欧,李绵绵,等. XE-2100 血细胞分析仪血涂片复检标准制定及评价[J].中华医学检验杂志,2007,30(4):384-386.
- [10] 朱晓辉,马洪玉,朱忠勇.应用血液学分析仪后显微镜复检标准刍议[J].中国实验诊断学,2006,3(10):296-298.
- [11] XE-2100 血细胞分析复检标准制定协作组. Sysmex XE-2100 自动血细胞分析和白细胞分类的复检规则探讨[J].中华检验医学杂志,2008,31(7):752-757.
- [12] 许顺姬. Sysmex SE-9000 血液分析仪白细胞异常信息的相关分析[J].现代预防医学,2007,34(21):4155.

(收稿日期:2011-10-01)

提高计算机辅助精液分析结果的准确性

李 丽,曾金良 综述,卢卫国 审校(广州中医药大学第一附属医院,广州 510405)

【关键词】 精液分析; 男科疾病; 计算机; 辅助系统; 图像处理

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.08.038 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)08-0963-03

精液分析是评价男性生殖能力的一项重要临床检验项目,也是为男科疾病诊断治疗及疗效观察提供的实验室依据。20 世纪 80 年代发展起来的计算机辅助精液分析(computer-aided semen analysis,CASA)系统将现代化的计算机技术和先进的图像处理技术应用于精子质量的临床检验,通过对精子动态图像中精子特性的全面分析,为临床提供有关精子质量各项指标的准确数据^[1]。随着计算机辅助精液分析的不断发展,精液的常规分析(routine semen analysis,RSA)有逐渐被计算机辅助系统取代的趋势^[2]。但是由于实验室环境、样本制备、检验人员工作态度、理论和操作水平、实验室所用显微镜光学系统、系统分析软件、系统参数设置等的不同,造成精液分析报告的可比性和通用性较差,因此,探讨 CASA 结果的影响因素及改进方法,对提高其临床应用价值及建立实验室标准操作程序、质量控制和评估体系均有重要意义。

1 CASA 检测原理及与 RSA 的比较

CASA 是利用录像机或摄像机和计算机视屏技术产生的新技术,其原理是通过摄像机或录像机与显微镜连接,确定和跟踪单个精子细胞的活动,根据设定的有关参数对采集到的图像进行动态处理分析,并打印结果,其具有高效、客观、高精度的特点,同时多种精子运动参数、动态图像及运动速度和活力分级的直方图可为临床医生提供更多的信息。RSA 虽有规范化的操作规程,但操作繁琐费时、带有很大的主观性、重复性差,尤其对精子运动能力的判断缺少严格量化指标,不能完全适应临床工作的需要。而 CASA 系统大大克服了传统精液测定方法的缺陷,但同时它也有一定的局限性,如识别精子的准确性受精液中细胞成分和非细胞颗粒的影响,计算精子存活率时只有精子发生了一定的移位,CASA 系统才认为是活动精子,而对原地摆动的精子则判定为不活动精子,测出的值常低于实际结果。CASA 测定的是单个精子运动参数,缺乏对精子群体的了解。精子密度高时通常会增加碰撞的频率,并可能由此得出错误结果。安茂伟等^[3]对 145 例精液标本在进行 CASA 的同时进行 RSA 分析,发现 RSA 检测同一份精液标本,不同的检验者得出的结果往往相差很大,即使同一位检查者进行多次检查时其结果也不相同。这主要是因为检测者受主观因

素的影响较大,特别是对精子活率和活力分级的统计很大程度上依赖于检测者的经验和主观判断。CASA 技术能够克服 RSA 中主观因素的影响,在快速测定精子密度、活率、活力等参数的同时,还能显示精子的运动轨迹,分析与精子运动相关的各类参数,并且可以进行报告的打印、存储、查询,便于临床科研的比较和分析。张华等^[4]通过对 27 例生育男性及 317 例不育男性患者采用 CASA 与 RSA 各参数的比较,认为 CASA 对精子形态、活力辨别能力较 RSA 低,但其增设的量化指标及动态图像能客观、真实地反映精子的质量,是 RSA 所不能的。蔡志华等^[5]认为 CASA 改变了传统繁琐的手工操作方法,提高了检验质量,是精子动态学分析技术领域里程碑式的突破,然而影响其准确性的因素还很多,如系统阈值、灰度的调整、圆细胞的记数、检验人员对仪器性能的熟悉程度、仪器日常的质量控制等。综上所述,CASA 虽有 RSA 无法比拟的优势,但也不是完美无缺,有时需与手工常规分析结合验证才能保证结果的准确。

2 对影响 CASA 系统检测结果准确性主要相关因素分析

造成 CASA 报告结果的差异有多方面的原因,主要有待检标本、检验人员、仪器试剂三方面的因素,加强对上述因素及环节的监控是提高精液分析结果准确性的唯一途径。

2.1 标本因素 泛指分析前影响标本质量的所有因素,包括患者准备、精液采集与送检、标本确认等,而这些往往是检验人员最难以控制的环节,故需加强对医护人员相关知识的宣传和培训,建立送检标本的验收制度和验收程序,对质量不符合要求的标本应有退回或拒收的标准操作程序^[6]。标本采集前应禁欲至少 48 h 但不超过 7 d,否则会影响标本精子密度、活动力及形态等。由于男性精液分析结果可有相当大的波动性和变异性,初检者应检查 2 次或 2 次以上,2 次之间间隔应大于 7 d 但不超过 3 周,禁欲的天数应尽可能恒定。标本采集以手淫法为宜,收集精液要用对精子无毒性作用的广口玻璃或塑料容器。采集地点最好在实验室附近的取精室内单独进行,室温应保持在 20~40 ℃,将完整标本 1 h 内送检。如果未收集到射出的全部精液,特别是丢失了射精过程中的第一部分精液的标本,以及标本运送时间过长(超过 2 h)的标本,均不能进行精

液分析。此外,还应注意吸烟、喝酒等不良嗜好及药物因素对检验结果的影响。精液标本从患者到实验室的环节众多,影响因素繁杂,必须慎重对待每一个环节,努力将可能对实验结果造成影响的因素降到最低,以获取最接近真值的实验结果,为临床诊疗提供可靠的实验室依据^[7]。

2.2 检验人员因素 检验人员是精液分析工作的承担者和实施者,在精液分析工作过程中起着关键性作用,提高检验工作人员的理论水平和实践经验,规范操作行为,培养责任意识和质量意识尤为重要。检验人员接到标本后应立即放入 37℃ 恒温水浴箱内孵育,并记录接检的具体日期时间,在输入患者的一般资料时应核实所有信息准确无误。在对标本进行一般物理性质检查时,特别注意精液不液化和黏度高的区别。前者为黏度增高的黏液状匀质流体,无明显聚集物,镜下精子运动较缓慢但分布均匀。后者呈上稀下浓的不均匀胶体,伴较明显的聚集物,轻轻振摇,上述现象无明显消失,镜下精子运动缓慢,分布不均匀,活动精子的运动可牵动周围的不动精子^[8]。超过 60 min 精液不液化视为异常,应予以记录,建议取精后 20、30、60 min 观察液化情况并记录液化所需时间及是否完全液化^[9]。精液不液化可用机械混匀、菠萝蛋白酶消化或加入等量的培养液并重复用加样器吹打。应注意的是,所有这些处理方法都可能影响精浆的生化、精子活力和精子形态学的测定结果。精液黏稠度检查常用 Pasteur 滴管让吸入的精液靠重力滴落,如拉丝长度大于 2 cm 为黏度增高,常伴有精液不液化,可干扰精子计数和活力。精子密度,尤其高密度对 CASA 结果准确性的影响较明显。CASA 直接测定高密度精液结果除受到精子碰撞和非精子成分的影响外,还与精子的密度、CASA 灰度和阈值设置密切相关。魏小斌等^[10]采用 CASA 与 RSA 对 3 种不同密度的精液标本进行检测后发现精子密度在 $(20\sim 100)\times 10^6/\text{mL}$ 时,计算机辅助精液分析对精子密度的检测比较准确,超过 $200\times 10^6/\text{mL}$ 时,稀释后再检测,也能获得理想的结果。吴志平和吴祥林^[11]对门诊 19 例高密度精子精液标本采用 CASA 直接分析、精浆稀释精液后进行 CASA 以及手工计数法分析精液密度,并与伊红染色法进行比较发现,对高精子密度标本 $(>50\times 10^6/\text{mL})$ 用精浆稀释后进行 CASA 测定,其结果更能反映精子的质量。精液的酸碱度常用 pH 试纸法进行近似的判断,如用 pH 试纸法结果会更准确可靠。用移液器或加样枪吸取标本前应充分混匀精液,使精子分布均匀。一般取样量为 5.0 微升/次,滴于干燥、清洁的计数板上,既要保证用量的准确,又要防止因吸入空气而产生气泡。检测可在 20~24℃ 室温下进行,由于温度会影响精子的活力分级,因此,实验室的温度必须标准化。精子活力和运动速度与温度高度相关,建议进行活力评估时,最好使用保温镜台,台面温度恒定在 37℃,镜检操作应熟练,尽量缩短检查时间,因为精子在计数板中的活力随时间延长而下降^[12]。因精子密度影响 CASA 结果的准确性,所以在静态图上如精子计数小于 20 个应多取几个视野计数,如精子数大于 50 个则稀释观察样本以降低精子密度,一般检测的精子总数至少为 200 个,最好追踪检测 400 个左右。自身精浆是目前认为最好的稀释液,但如果没有同源精浆,世界卫生组织曾提出可使用 Dulbecco 磷酸盐缓冲液-葡萄糖-牛血清清蛋白溶液稀释标本,生理盐水也是相对较好的稀释液^[13]。此外,从计算机记录的静态图上还可以对精子的形态做出分析,如畸形等,前提是要排除精子重叠凝集或非精子颗粒黏附造成的假象。在选择视野时,应选择计数池中央部分,因为靠近计数池边缘部分精子密度常会偏高。最好选择精子分布较均匀且圆细胞较少的视野。计数时需将阈

值调整到可将精子全部采集而不采集卵磷脂小体、白细胞等非精子微小颗粒的状态。当前阈值可根据每份精液的实际情况进行 100~145 范围内调整;在 70~100 范围内适当增加中心阈值可在分割中剔除比精子小的杂质;在 400~900 范围内适当减小最大阈值可在分割中剔除比精子大的杂质,如果采用的不是灰度阈值而是核酸荧光染色的方法则可提高对精子识别的准确度。CASA 系统参数设置的准确与否,直接决定检测数据的准确程度,所以应按照系统说明书的指导进行设定,且一经设定好就不要轻易修改。一般精液分析仪的参数设置:(1)速度阈值是被检测精子的最低运动速度,一般设置为 $3\sim 10\ \mu\text{m/s}$,经验设置 $7\ \mu\text{m/s}$;(2)线性阈值是设定精子运动的线性标准,即精子运动的路径相当于直线的距离,一般设为 60%;(3)速度分级即精子活力级别的分类,一般设置为 7、15、27 $\mu\text{m/s}$,即直线运动速度在 27 $\mu\text{m/s}$ 以上的精子为 a 级,15~27 $\mu\text{m/s}$ 为 b 级,7~14 $\mu\text{m/s}$ 为 C 级,小于 7 $\mu\text{m/s}$ 为 d 级;(4)精子直径范围是 CASA 对精子大小的认定,一般设置为 $2\sim 9\ \mu\text{m}$ 。对“无精症”的报告要慎重,遇此情况时必须待精液完全液化充分混匀后再进行分析。世界卫生组织提出所有显微镜检查未见精子的标本都应离心确定在沉渣中有无精子,建议使用 RCF $>3\ 000\times g$ 离心 15 min,只有当所有沉渣重新悬浮,经彻底和系统检查后发现无精子后才能作出无精子的判断^[12]。

2.3 仪器试剂因素 仪器的性能状态是重要的影响因素,对仪器的工作状态和维护检修应有必要的记录。确保加样枪的加样量准确、计数板清洁、没有杂质或对精子有影响的物质存在;水浴箱的水温也要准确可信;显微镜、恒温装置、计算机分析系统等经调试都可正常使用。可使用同一仪器对同一患者的标本进行重复测定以观察仪器的精密度,用仪器测定已知浓度的质控品浓度,以观察测定结果的准确度等。如有多台同一型号的仪器还应进行检测结果的比对应。对某些特殊标本(如不液化和高黏度高浓度标本)需添加试剂进行处理时,应注意试剂对精液分析结果准确性的影响并予以说明。对由于仪器和试剂原因使检测结果超出控制限时,应仔细分析调查,不可轻易发送检验报告。

此外,男科实验室还进行精液其他方面的检查,如生化免疫微生物检查(如果糖、酸性磷酸酶、抗精子抗体、淋球菌、解脲支原体等),精子功能检查,细胞遗传学检查等,这些检查结果的异常亦可验证 CASA 结果的异常,从而为临床医生制定正确的诊疗计划提供支持。

3 结 语

CASA 系统在精液分析中具有无可比拟的优势,尤其体现在对精子运动特征的参数描述,为临床提供了更客观快捷的实验室指标。但各种因素对结果准确性的影响仍不容忽视,需要检验者避免或控制这些因素的影响,使检验结果在可接受范围内尽可能的准确。

参考文献

- [1] 黄宇烽,许瑞吉.男科诊断学[M].上海:第二军医大学出版社,1999:122-125.
- [2] 龚平,周治兰,王昌富.计算机辅助精液分析的临床应用[J].中国误诊学杂志,2004,4(5):759-760.
- [3] 安茂伟,韩秀娟,王世礼,等.计算机辅助精子质量分析与常规精液分析的对比性研究[J].现代诊断与治疗,2008,19(1):7.
- [4] 张华,蔡松良,俞建军.计算机辅助精液分析与常规精液分析的比较研究[J].浙江大学学报:医学版,2002,31

(3):215-218.

[5] 蔡志华,李建华,丁涛,等.有关计算机辅助精液分析的几个问题[J].中国男科学杂志,2003,17(3):206.

[6] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:46.

[7] 戈一峰,汪春晖,陆金春,等.精液分析前质量控制的初步研究[J].中华男科学杂志,2008,14(11):1015-1016.

[8] 朱卫中.高黏度精液与不液化精液的鉴别方法[J].临床检验杂志,1992,10(增刊):75.

[9] 陈振文.精液分析标准化和精液质量评估[J].中国生育健康杂志,200,14(3):139.

[10] 魏小斌,白志明,李春芸.计算机辅助与常规精液分析的

精子密度检测结果比较[J].中国热带医学,2006,6(3):555.

[11] 吴志平,吴祥林.高精子密度精液标本质量分析方法探讨[J].临床输血与检验,2006,8(4):288-290.

[12] 世界卫生组织.人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M].4版.北京:人民卫生出版社,2001:3-7.

[13] 叶明桃,曹云霞,赵济华,等.两种稀释液在精液常规分析中的应用比较[J].中国优生与遗传杂志,2008,16(2):106.

(收稿日期:2011-11-22)

前列腺素在肿瘤的发生与发展中的作用

李小平¹,殷俊²综述,朱卫平¹审校(1.湖南省湘潭市中心医院检验科 411100;
2.中南大学湘雅医学院病理生理学教研室和休克研究室,长沙 410000)

【关键词】 前列腺素 E2; 环氧合酶-2; 肿瘤
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.08.039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)08-0965-02

前列腺素 E2(PGE2)是一种重要的细胞生长和调节因子,它参与几乎所有的细胞代谢活动,并介导多种不同的生理、病理功能。一系列动物实验和临床研究表明,肿瘤的发生、发展与患者肿瘤组织分泌的 PGE2 有着密切关系。PGE2 在肿瘤组织中的高表达与肿瘤的大小、分期、有无转移、预后以及复发等方面都存在相关性。因此,开展 PGE2 的抑制剂及其含量的检测,将对肿瘤的预防、治疗等方面起着重要的作用。

1 PGE2 的简介

前列腺素(prostaglandin,PG)具有广泛而重要的生物活性,它不仅参与炎症反应,而且在肿瘤的发生、发展等过程中也起着重要的作用。其中 PGE2 是与其关系最为密切的一种。

2 PGE2 的产生

当细胞膜受到各种刺激时(如炎症反应),膜磷脂在磷脂酶 A2(PLA2)或磷脂酶 C(PLC)的作用下分解成游离 AA,游离 AA 在环氧合酶(cyclooxygenase,COX)、前列腺素 H2(PGH2)合酶以及前列腺素 G2(PGG2)合酶的作用下生成 PGE2。

3 PGE2 的生理功能与代谢

PGE2 是产科常用药。生理状态下的 PGE2 含量很低,却具有很强的生理活性:PGE2 能促进局部血管扩张,毛细血管通透性增加,诱发炎症反应,引起红、肿、痛、热等症状;能使动脉平滑肌舒张,有降低血压的作用;还能抑制胃酸分泌,促进胃肠平滑肌蠕动等作用。

肺是 PGE2 的重要代谢场所,可主动摄取并降解循环中的 PGE2,15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)的降解酶能促进 PGE2 的 15-羟基氧化成 15-酮基,转变成没有活性的 PGE2。

4 PGE2 与肿瘤的临床关系

4.1 PGE2 在肿瘤组织中高表达 PGE2 在细胞增殖中的作用一直受到人们的关注。研究表明,COX-2 的过度表达可能是促进肿瘤发生、发展的原因之一,而 COX-2 高表达促进 PGE2 合成增加^[1],从而参与肿瘤的形成过程,所以在不同肿瘤组织中都发现了 PGE2 高表达的现象。大肠癌分泌 PGE2 的能力是目前所知分泌能力最高的恶性肿瘤,是其他肿瘤的 1.7~5.2 倍^[2];另外,原发性胃癌组织中 PGE2 的含量高于正常胃黏膜组织;而在乳腺癌患者中发现恶性乳腺癌组织中的

PGE2 含量远高于其正常组织和良性肿瘤组织。

4.2 PGE2 促进肿瘤进展 PGE2 不仅在肿瘤组织中高表达,而且与其肿瘤的大小、分期、有无转移等方面都有相关性。Yang 等^[3]发现家族性腺瘤性息肉患者腺瘤中 PGE2 的含量随着肿瘤的增大而明显增加。艾志龙等^[4]发现大肠癌患者外周血中的 PGE2 含量与肿瘤的大小呈正相关,并且 DukesD 期的患者显著高于 B、C 期的患者。Narisawa 等^[5]通过测定 44 例结肠直肠癌患者血中 PGE2 的含量发现,有肝、肺转移患者的 PGE2 水平高于未转移者。俞慧宏等^[6]在胃癌患者中也发现了外周血中 PGE2 的含量与肿瘤的大小及分化程度呈正相关,低分化和高、中分化胃癌组织中 PGE2 的含量两者差异有统计学意义。以上研究提示,PGE2 不仅参与了肿瘤的发生过程,而且在肿瘤的发展以及扩散的病理过程中起着重要的作用。

5 PGE2 促进肿瘤发生、发展的分子机制

5.1 PGE2 促进肿瘤血管生成 肿瘤血管的生成是肿瘤生长的前提,PGE2 促进肿瘤血管生长的具体机制目前尚不清楚,可能与下列因素有关:(1)诱导血管内皮生长因子(VEGF)。Pai 等^[7]在结肠癌细胞中的研究发现 PGE2 先激活表皮生长因子受体(EGFR),再由 EGFR 激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),最后实现 PGE2 诱导 VEGF 的表达。Ding 等^[8]在胃癌 MKN28 细胞株的研究中证实 PGE2 通过 EGFR/MAPK 信号通路上调 VEGF 的表达。(2)促进血管生成的相关基因的表达。Uefuji 等^[9]研究发现 PGE2 的含量和胃癌血管密度存在高度的相关性,提示在胃癌细胞中 PGE2 可对多种血管生成相关基因的表达有促进作用。Chang 等^[10]在乳腺癌细胞中发现 PGE2 通过与其受体结合,上调血管生成调节基因,促进肿瘤血管的生成。(3)低氧诱导。肿瘤组织内存在低氧区,低氧诱导的 VEGF 表达上调是导致肿瘤新生血管化的关键事件。PGE2 通过激活缺氧诱导因子 21,增强人结肠癌细胞株 HCT116 的 VEGF 表达,促进血管新生。

5.2 PGE2 诱导细胞增生 PGE2 可通过自分泌或旁分泌途径作用于同种细胞或邻近周围组织其他类型的细胞,与细胞的内源性致热源受体结合,通过 G2 蛋白耦联途径及核内过氧化物酶增殖体激活受体(PPAR)促进细胞生长。Sheng 等^[11]在