

- EBP α -p30 protein induces expression of the oncogenic long non-coding RNA UCA 1 in acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(21):18534-18544.
- [20] ZENG C, XU Y, XU L, et al. Inhibition of long non-coding RNA NEAT 1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1):693.
- [21] PARK B R, LEE S A, MOON S M, et al. Anthriscin induced caspase dependent apoptosis through IGF1R/PI3K/AKT pathway inhibition in A549 human non small lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(9):2769-2776.
- [22] SUN J, LI W, SUN Y, et al. A novel antisense long non-coding RNA within the IGF1R gene locus is imprinted in hematopoietic malignancies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(15):9588-9601.
- [23] KARMALI R, LARSON M L, SHAMMO J M, et al. Impact of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding proteins on outcomes in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(11):3135-3142.

(收稿日期:2018-06-29 修回日期:2018-09-28)

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.041

男性不育精液诊断技术的新进展

张富勋¹, 吴侃¹综述, 卢一平^{2△}审核

(四川大学华西医院泌尿外科, 成都 610041)

关键词: 男性不育; 精液分析; 生殖; 诊断; 专用检测**中图法分类号:** R698.2**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2019)01-0119-07

不孕不育影响约 15% 的夫妇。在不孕不育患者中, 因男性因素所致者约占 50%。男性不育症的检查, 包括完整的病史、详细的体格检查、精液分析、特异性精液检测, 以及基因和相关激素水平的检测。传统是将精液分析作为男性不育症的首选检查, 其地位十分重要。然而, 随检验技术的进步, 精液分析这一传统检查项目也进一步发展、细分, 形成对多方面指标的特异性检测项目。现对近年来出现的男性不育精液诊断技术进行综述, 探讨诊断男性不育症的新检测手段及发展趋势。

1 精子相关检测进展

对部分患者而言, 标准的精液分析并不能发现与生育能力有关的精子功能缺陷。据估计, 约 40% 男性存在生育能力低下。因此, 目前已经开发出多种用于评估精子功能的专用检测技术。随着对男性不育症认识的不断提高, 这些检测技术在男性不育症的诊断和治疗中的作用也日益显现出来。

1.1 活性氧自由基测定 近年来, 精子功能受损常与过量的活性氧自由基 (ROS) 产生的氧化应激相关^[1]。人类精子对 ROS 损伤高度敏感, 尽管低水平的 ROS 对精子获能是必需的, 但 ROS 水平过高, 往往导致精子细胞膜脂质过氧化、精子活动力下降、脱氧核糖核酸 (DNA) 完整性受损、体外受精能力受损的自然孕率下降^[2]。ROS 诱导的 DNA 损伤还可能加速生殖细胞凋亡进程, 导致精子数量减少。在 25%~40% 不育男性精液中, 可以检测到 ROS 水平升高^[1]。目前, 为了评估氧化应激对精子形态和功能的影响,

已经开发了化学发光测定法, 使用对氧化还原反应敏感探针 (如光泽精和鲁米诺) 可以检测到受累精子发出的信号, 该信号强度不仅与精子功能呈负相关, 还与体外受精时精子的受精能力呈负相关^[3]。表明 ROS 的水平与不育症男性自然生育的概率及体外受精成功率呈负相关。检测出高水平 ROS 的男性, 应给予抗氧化药物治疗, 如维生素 A、C、E 等, 可以改善精液质量, 提高妊娠率和卵胞浆内单精子显微注射技术 (ICSI) 后的着床率^[4]。

1.2 精子 DNA 损伤检测 DNA 损伤预示细胞发生凋亡, 因此, 可以通过检测精子 DNA 获取精子参数并对其受精潜力进行预测。当精子 DNA 损伤超过某一阈值, 即可导致妊娠和胚胎发育受损。研究已经发现, 不育症男性精子 DNA 损伤较健康者更多见。

1.2.1 流式细胞术与彗星试验 使用流式细胞术检测精子 DNA, 可以区分成熟单倍体和异常二倍体精子、细胞碎片和未成熟的生殖细胞^[5]。彗星试验, 即末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸 (dUTP) 缺口末端标记 (TUNEL) 试验, 可直接评估 DNA 损伤或 DNA 氧化。使用精子染色质结构分析 (SCSA) 或精子染色质扩散分析 (SCDA) 均可间接测定精子的 DNA 损伤^[6]。使用 SCDA 检测精子 DNA 损伤的试剂盒称为 SCDA Halosperm VR G2 试剂盒 (Halotech DNA SL)。由于所使用的测量系统不同, 不同检测方法得到的结果之间可能存在一定的矛盾和差异。目前, 彗星试验 (TUNEL 试验) 和 SCSA 不能提供一致的结果, 从而限制了其常规应用。

近期研究表明,组蛋白残留、DNA 损伤、鱼精蛋白与鱼精蛋白 2 比值和妊娠率均存在关联^[7]。因此,精子 DNA 损伤分析有可能成为诊断男性不育较有价值的检测手段,尤其是在人工辅助生殖技术方面^[8]。由于上述检测方法目前尚不能用于指导临床治疗,因此,其临床适用性尚存着在一定的限制。

1.2.2 拉曼微光谱技术 拉曼微光谱技术是拉曼光谱和共聚焦显微镜 2 种技术的结合,能提供存活细胞的分子指纹以描述其 DNA 状态(完整或受损)^[9]。该技术可以检测存活细胞,且不会破坏细胞的活力,可以在 ICSI 中应用。拉曼微光谱技术对精子早期 DNA 损伤的描述与目前已确立的技术(精子染色质结构分析)相一致^[10]。这种方法得到发展后也许能超越诊断的范畴,因为它具有用于治疗的潜力。

1.3 精子 DNA 甲基化检测 近期研究表明,精子甲基化异常与男性不育密切相关^[11]。目前已证明,母体印记基因中胚层特异性转录(MEST)与原发不育的少精症、睾丸体积减小、血清 FSH 增加有明确的关系^[12]。通过对健康志愿者的研究,已经确定精子 MEST DNA 甲基化的正常参考值范围为 0~15%。基于该正常参考值,不育症患者有 23% 出现 DNA 甲基化异常,因此,该正常参考值的确立有助于改进对不育病因的分类及确定原发性不育^[13]。

2 精浆相关检测进展

精液由少量的精子和来自于附属性腺(包括附睾、精囊、前列腺、尿道球腺)的分泌物组成。精子的比例大约只占每次射精量的 10%,其余的 90% 称为精浆,由不同的分子组成。其中,精浆中高浓度组织的特异性蛋白能为男性生育能力的评估提供大量的生物学标志物^[14]。

近年来,蛋白组学和生物标记物研究取得了长足发展,从基础电泳技术到液相色谱和质谱平台,能鉴定数以千计的高、中、低丰度蛋白质。20 世纪 40 年代,对精浆蛋白生物标志物的研究仅能确定 4 种蛋白质,而近年来,使用现代质谱技术已经确定了超过 2 300 个精浆蛋白^[15]。同时,新技术的不断涌现,包括基因组学、转录组学、代谢组学研究和数据积累还促进了对男性不育相关生物标志物的探索。希望通过研究,能开发出用于诊断和治疗男性不育的更可靠、更安全、更具性价比的生物标志物。

2.1 精浆蛋白组学 通过对比弱精症患者与健康者发现,患者精浆蛋白中有 45 种蛋白表达增加,有 56 种蛋白表达下调^[16]。进一步研究表明,弱精症男性中 DJ-1-a(一种参与氧化应激调节的蛋白)的表达显著降低,提示精子活力低下的男性丧失了对氧化应激反应的调节能力。MUNDI 等^[17] 分析 202 份精液标本后发现,精液中前列腺素 D 合酶(PTGDS)的浓度与精子密度、活力、正常形态呈正相关。此外,从健康男性

到少精症、无精症、输精管切除术后的男性,PTGDS 呈逐渐下降的趋势,表明 PTGDS 与精子运行通路梗阻有关^[18]。通过对蛋白组学确定的睾丸特异性蛋白进行比较分析,健康男性精液中很容易检测到的转酮醇酶样蛋白 1(TKTL1)^[19]、L-乳酸脱氢酶 C 链(LDHC)、磷酸甘油酸激酶 2(PGK2)在无精症和输精管切除患者中几乎检测不到^[20]。一项队列研究证实,无精症男性精浆中有 8 种蛋白(纤连蛋白、前列腺酸性磷酸酶、催乳素诱导蛋白、 β 2-微球蛋白、蛋白酶体亚单位 α 3 型、半乳糖凝集素-3 结合蛋白、胞质非特异性二肽酶)的表达上调。虽然上述研究增加了对男性不育症相关蛋白组学的理解,但是,到目前为止尚未能在现有精液分析之上提高对不育病因的诊断能力。

近年来,通过对无精症患者精液标本的蛋白组学研究,发现了数以千计的精浆蛋白质,部分已在上文中提到。而另外一些蛋白生物标记物,如 PTGDS、精子顶体小泡蛋白-1(ACRV1)、人乳糖凝集素-3 结合蛋白(LGALS3BP)、人细胞外基质蛋白-1(ECM1)、人睾丸表达蛋白-101(TEX101)已经得到了进一步确认^[21-24]。TEX101 是睾丸生殖细胞所特有的细胞膜蛋白,由睾丸的生殖细胞表达并进入精浆;TEX101 作为无精症诊断的生物标记物已经得到证实^[25];ECM1 来源于附睾,与 TEX101 一同可以作为鉴别梗阻与非梗阻性无精症的生物标记物^[26]。在不久的将来,ECM1 和 TEX101 的检测有望取代大多数诊断性睾丸活检,并有助于预测穿刺取精的结果,从而提高辅助生殖技术的成功率^[27]。目前,ACRV1 蛋白的免疫色谱检测试剂盒已经上市,在家中就能完成检测。而基于 TEX101 和 ECM1 的免疫检测试剂盒也正在研发中。

2.2 精浆基因组学 氧化应激等有害因素可导致精子 DNA 损伤及精子凋亡发生。精浆中的 DNA 是由已经进入凋亡过程的精子所释放,凋亡可发生于射精前或射精后。一种测定方法是使用常规的实时定量聚合酶链式反应(PCR)绿色检测法(qRT-PCR-Sybr),检测精浆中的游离 DNA,另一种方法是测量精子 DNA 片段指数。尽管 2 种方法都可用于评估精子凋亡情况,但第 1 种方法实际上是测量精浆中死亡精子(不存在于精液中)所释放的 DNA;而第 2 种方法则是直接计量射精时已发生凋亡的精子。通过 qRT-PCR-Sybr 检测精浆中的游离 DNA,可进行定量描述^[28]。但通过对比发现,精子 DNA 片段指数与精子密度、活力相关,精子 DNA 片段指数与精浆游离 DNA 相比具有更好的预测价值。目前有研究认为,精子 DNA 片段增加与流产率升高有关^[29]。究其原因,虽然精子 DNA 损伤本身对受精或着床的影响较小,但受精后卵母细胞无法修复 DNA 损伤,影响了胚胎的形成。虽然精浆游离 DNA 对受精和着床的影响较小,但游离 DNA 浓度与精子 DNA 片段的作用似

乎是叠加的,两者共同作用对妊娠结果有显著的不良影响。由此推测,可同时对精浆中游离 DNA 与精子 DNA 片段进行检测,如果 2 个参数累计超过某个阈值,将会对妊娠结果产生负面影响^[30]。

精浆中还存在着多种源于男性生殖管道细胞所产生的微泡。研究表明,包括外泌体在内的微泡中含有多种核糖核酸,如微小 RNA(miRNA)。miRNA 是短的非编码 RNA,它可以抑制靶基因的翻译过程,从而在转录后水平调节基因表达。所以,miRNA 也是精子发生不同阶段的重要调节因子,与精子发生过程中出现的病理变化密切相关^[31]。有研究发现,细胞 miRNA 水平与生精功能相关,生精功能障碍的男性生殖细胞中存在 miRNA 表达谱改变。此外,即使轻度生精功能障碍的男性,其生殖细胞中也发现了失调的 miRNA 模式,该模式可能导致多种男性生殖功能的异常^[32]。

近期有研究通过对比小鼠卵母细胞和受精卵,确定了多个雄性来源的 miRNA,包括人 miRNA-34c (hsa-mir-34c)、hsa-mir-375、hsa-mir-252、hsa-mir-25。其中 hsa-mir-34c 因其位于一组高度保守的 miRNA 而被认为在精子生发过程中具有关键作用^[33]。另外,能够形成正常妊娠的精子中有 44 个转录物的水平升高,产生了一组可能具有临床意义的生物标志物,包括几种组织蛋白酶和乙硫苏糖[人 α -内收蛋白编码基因(ADD1)、活化素受体样激酶-1(ACVRL1)、雄激素受体(AR)、芳香烃受体核易位蛋白(ARNT)]^[34-35]。但由于并非所有的 RNA 都被翻译,因此,前述的蛋白组学检查也是十分重要的。

2.3 精浆代谢组学 精浆中的细胞代谢产物也可以作为潜在的男性生育功能相关的生物标志物,但尚处于起步阶段,与精浆蛋白组学、基因组学相比较为滞后。精浆代谢组学主要研究精子在新陈代谢过程中产生或释放到精浆中的低相对分子质量的代谢物^[36]。精浆中这些低相对分子质量代谢物的生理功能多种多样,包括生长、发育、生殖。它们既可以是由细胞正常生理活动产生,也可以是经外界干预后产生。精浆代谢组学反映了基因表达的下游产物,较蛋白质组学或基因组学更接近基因的实际表型^[37]。

精浆代谢组学相关研究早期主要集中于生殖细胞在氧化应激中的异常改变。既往研究表明,精浆中存在的氧化应激标志物(-CH、-NH、-OH、-SH)可能影响精子和卵母细胞的质量及胚胎的活力。实际上在不育症患者中,有很大一部分精液的 ROS 水平显著升高,其在不育症中的重要性已经得到确认^[38]。近期有研究发现,精子有超氧化物自发产生,并观察到超氧化物的存在与精子活动力呈负相关^[26]。与健康者比较,无精症患者精浆中柠檬酸盐、乳酸盐、甘油磷酸胆碱的水平均有所改变,表明 ROS 与不育相关。

另外,近期对卵泡液标本与 ROS 关系的研究表明,氧化应激的代谢标志物(-CH、-NH、-OH、ROH)与妊娠结局之间存在联系^[39]。最后,有研究通过对体外受精的胚胎及其培养基的检测发现,成功着床的胚胎与着床失败者的羟基修饰存在差异^[40]。尽管尚需更加深入的研究来阐明,但是精浆代谢组学作为男性生育异常的生物标志物的潜力巨大。

3 基因检测

基因缺陷在严重不育症患者中较为常见。研究显示,少精子症患者中基因缺陷的比例为 4.3%,而无精症患者中该比例陡增至 20.6%。在不育症患者中,染色体异常者比例是健康者的 10~15 倍^[41]。

目前,对不育症患者基因缺陷方面的检查包括遗传染色体分析、Y 染色体特定缺陷筛查[如无精子症因子(AZF)缺失]、囊性纤维化跨膜电导调节因子(CFTR)突变检测、先天性低促性腺激素所致性腺功能减退症相关的基因检测。此外,关于卵泡刺激素(FSH)受体及其启动子的新观点可能有助于更好地理解 FSH 对生精功能的作用及其局限性。将来,精子表观遗传学标记有可能成为新的检测靶点,以便更好地鉴别原发性不育患者。

3.1 染色体畸变检测 对于习惯性流产或已知遗传性基因缺陷者,当精子浓度小于 10 000 000/mL 就有指征进行染色体畸变检测。15% 的无精症患者存在染色体畸变。克兰费尔特综合征(KS)是最常见的数目异常的染色体疾病,每 600 例男性中就有 1 例受到影响。额外的 X 染色体可能源于父亲或母亲的染色体减数分裂未分离(双方各占 50%)。在无精症患者中,14% 患有 KS,其临床特征为高促性腺激素和小睾丸。而 98% 的 KS 患者存在无精症。不过,这些患者通过显微外科睾丸取精技术成功获得精子者可达 50%,年龄越小,成功率越高。其他如染色体易位或 46,XX 核型男性等染色体异常均很少见,可发生于 1% 的无精症患者。另外,卡尔曼综合征也与不育症相关,因卡尔曼综合征基因-1(KAL1)变异,促性腺激素分泌障碍所致。患者可出现青春前期睾丸质地坚硬,头颅和面部不对称,腭裂、隐睾、小阴茎、先天性耳聋、嗅觉丧失、小脑功能障碍、肾功能异常。而由染色体短臂突变或缺失引起的 Prader-Willi 综合征,与继发性性腺功能低下有关,其特征是隐睾、肥胖、智力低下、婴幼儿肌张力减退等。

3.2 囊性纤维化 由囊性纤维化跨膜传导调节(CFTR)基因诊断 梗阻性无精症也可由沃尔夫管(Wolff ducts)发育障碍引起的输精管缺如所致,伴或不伴有附睾与精囊异常。这种先天性输精管缺如(CBAVD)是囊性纤维化的常见表现形式。有囊性纤维化表现的不育症患者中,95% 由 CBAVD 导致。CFTR 基因突变引起常染色体隐性遗传,CFTR 突变

检测必须从父母双方开始,因为普通人群中杂合子的频率高达4%~5%。由于睾丸功能未受影响,因此,行睾丸及附睾精子抽取联合ICSI治疗,成功受精的概率很高,但治疗前必须进行遗传咨询。临床无精症伴精液量少,精液pH值和葡萄糖苷酶水平低,而激素水平和睾丸体积正常是CBAVD的典型表现。总之,超过3%的无精症患者存在CFTR突变。

3.3 Y-染色体缺失(AZF缺失) 无精子因子(AZF)缺失是无精症和严重少精症的已知原因之一。约2%的无精症患者和10%~12%的具有不同种族背景的少精症患者可能具有Y染色体缺失,这将导致其男性后代的Y染色体缺陷。AZF缺失最常见的类型是AFZc,约占80%,其他如AZFa缺失占0.5%~4.0%,AZFb为1%~5%,AZFc为1%~3%。AZFabc同时缺失者通常伴随其他染色体疾病,如46,XX核型男性或等臂双着丝粒染色体(Y)。gr/gr缺失是部分AZFc缺失,临床表型极其异质,从无精症到精液正常者均可存在。

目前,是否应该对不育症男性常规进行AZF缺失筛查尚存争议。欧洲男科学会的最新指南表明,对精子计数小于5 000 000/mL的重度少精症或无精症患者,推荐进行AZFa、AZFb、AZFc缺失筛查。对于AZFa缺失者,尚无睾丸抽精成功的报道,且AZFa缺失被认为与睾丸生精细胞萎缩或唯支持细胞综合征相关,但对AZFb和AZFc缺失的患者,虽有睾丸取精成功的报道,但概率显著减少。AZFc缺失有多种临床表型,从无精症到少精症,睾丸取精子成功的概率约为50%。现有对ICSI的精子受精率、胚胎质量、整体成功率的报道存在矛盾。

总之,对精子计数小于5 000 000/mL的男性,强烈推荐进行AZF检测,该检测对无精症患者睾丸取精结果具有预测价值。治疗前建议夫妻双方进行遗传学咨询。

3.4 先天性低促性腺激素性腺机能减退的基因检测 先天性低促性腺激素性腺机能减退通常很早就被发现,由于垂体缺少下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)的刺激,导致青春期发育不能启动。患者处于青春前期,黄体生成素(LH)和FSH水平低下,睾丸体积小于6 mL,同时存在无精症。这种情况下,如果合并嗅觉丧失,则可诊断为卡尔曼综合征。其基因遗传可以是常染色体隐性遗传、常染色体显性遗传或X染色体遗传,应在咨询遗传学家之后进行基因检测。迄今为止,除了最重要的基因KAL1和KAL2之外,还确定了其他几个基因。由于这类患者经过治疗后具有不错的自然妊娠率,所以应该对这些患者提供遗传咨询,并阐明该疾病的遗传风险。

3.5 实验性基因分析 有关促卵泡激素 β 多肽((FSHB)基因(-211G> T, rs10835638)分析的研究

表明,FSHB基因的单核苷酸多态性与低血清FSH水平、小睾丸体积、低精子输出量有关,其有可能成为诊治男性不育的新基因靶点。G-T替代可导致转录活性降低50%的结论得到了体外实验数据的支持。有学者对男性队列研究的Meta分析表明,精子计数减少(每次射精小于39 000 000)的队列TT等位基因出现频率是精子计数正常男性的2倍。FSH治疗有可能增加T等位基因携带者的精子输出量,提高生育能力。最近,首个小样本、非对照针对携带FSHB基因的男性使用FSH治疗改善其生精功能的研究结果已经发表。该研究表明,与GG纯合子相比,T等位基因携带者的精子计数和质量均有所提高。研究结果符合假设,但仍需要通过随机对照试验确认之后方能推广应用。此外,该假设还得到了近期发表的关于FSH治疗特发性男性不育的Cochrane系统评价证据的支持。

4 微阵列技术

基于精子计数和活动力的传统精液分析已经沿用数十年之久,然而仍有相当一部分传统精液分析结果正常的男性发生不育,所以需开发新的诊断技术对这些个体精液标本进行深入分析。同时,传统的精子发生图对人工辅助生殖技术的预测能力有限。近年来,新出现的微阵列技术可在同一时间对成千上万的基因表达情况进行检测。精子转录组学作为开发男性不育标记物的来源日益受到关注,基于微阵列技术的精子相关检测的应用将指日可待。

4.1 精子RNA谱 探索男性不育因素的一种新方法是精子RNA谱。该方法采用无创技术收集精液标本,根据精子转录谱分析构建精子RNA谱,从而得到精子生发的历史记录。这一非侵入性技术可以提供更多关于男性生育功能的信息。

以精子mRNA功能谱为工具,可以简化男性不育症的诊断。男性不育与2大因素有关,第一是精子无法使卵母细胞受精。这些异常精子有诸多特点,包括原发性和/或继发性异常。第二是雄性配子不能启动合子、胚胎、胎儿发育。精子穿透卵子后,就会产生信号激活卵细胞,促进合子发育。由于精子在转录上处于休眠状态,所有这些结构和信号必须在排精之前就妥善储存在精子内部。因此,精子生发过程中的任何错误都可能影响生育功能。现已证明,精子的RNA谱与睾丸组织的RNA谱一致。实际上,它们反映了生精基因的表达。基于这些RNA谱的一致性,可以研发出用于评估人类精子功能的无创检测技术。

在使用精子RNA谱诊断男性不育症成为现实之前,必须破译生育功能正常男性的精子RNA谱。有实验证实,精子与睾丸组织的转录谱是一致的,这是将微阵列分析用于检测男性不育的依据。另有研究比较了健康男性和不育男性的基因表达谱,不育男性

精子改变的基因表达模式也已被发现。也许这就是建立男性不育诊断新模式所必需的基础。在不久的将来,这项技术还可被用来研究精子细胞对环境变化的反应,以及对 mRNA 表达条件改变后的反应。该技术也可以在人为设定的不同条件下对基因表达进行研究,以更加深入理解不同致病因素影响生精和生育的作用机制。现有研究显示,不育症患者精子的基因组表达模式发生改变。因此,该技术还可用于研究暴露于已知环境或职业危险因素男性,对他们进行相关检测,并提供生殖咨询。同样,该项技术也能为反复发生自然流产的夫妇提供一些信息,其中包括可能存在的精子功能障碍。

4.2 转录分析 转录分析可以分为开放或封闭技术。开放技术,如差异显示,目的是确定在某些条件下表达发生显著改变的 mRNA。确定差异调节的 mRNA 集之后,其序列即可得到确定。该技术具有很多优点,但耗时较多且费用昂贵。开放技术可用于研究不同条件下已知基因的表达,以了解发病机制。该方法最常见的例子是 DNA 微阵列,也称为基因芯片。阵列可以使用克隆的、PCR 扩增的或合成的分子进行组装。然后使用与 RNA 样品一致的放射性或荧光标记探针通过混合与阵列上合适的补体结合。当探针与目标结合后就会检测到正信号,通过对信号的编辑就可以构建相应的转录谱或 RNA 指纹。经过分析即可判断其功能状态。

4.3 植入前基因筛查 体外受精(IVF)是不育症治疗的巨大进步。在过去的几十年,尽管出现了很多 IVF 相关的干预措施,但以植入前基因筛查(PGS)受到的关注最多。目前最常用的 PGS 是非整倍性检测。自发流产与染色体非整倍性高度相关,非整倍性是自然生殖失败最常见的原因。因此,PGS 可以减少不育症患者接受 IVF 后产生非整倍体妊娠的可能。PGS 是对培养的早期胚胎进行细胞活检,在植入子宫之前检测其染色体,可鉴别出整倍体胚胎,从而增加植入的成功率和降低与 IVF 相关的流产率。目前,应用于 PGS 的微阵列主要有 2 种,即单核苷酸多态性(SNP)阵列和比较基因组杂交(CGH)阵列。这 2 种微阵列平台,滋养外胚层细胞都必须通过那些提供全基因组覆盖的 DNA 扩增方案进行裂解和扩增。与任何基因检测一样,诊断结果的质量基于扩增 DNA 标本的质量。

4.3.1 SNP 微阵列 SNP 是规定种类、变异度高的 DNA 基因组中的单个核苷酸对(A、T、C、G)。PGS 评估的 SNP 通常位于基因组的非外显子编码区段。用于 PGS 的 SNP 微阵列通常可评估整个基因组约 300 000 个 SNP。通过 SNP 阵列可以获得样品的基因型(AA、AB、BB),并将结果与国际人类基因组单倍型图谱参考基因组进行比较。这些阵列可以识别整

个染色体的非整倍体性,也可以在整个基因组中识别约 250 种常见的结构染色体畸变。然而,还有数百个新生结构染色体异常由于分辨率原因,不能被用于 PGS 的 SNP 阵列识别,这些染色体异常可能导致植入失败、流产、新生儿严重遗传缺陷。虽然 SNP 阵列识别三倍体的能力有限,但由于获得了基因型信息,可以识别单亲二倍体。如果能分析足够的滋养外胚层细胞,则 SNP 阵列也可以鉴别嵌合体。

用于 PGS 的 SNP 阵列的一个局限性是,如果夫妻间存在血缘关系,则不能识别拷贝数。因此,如果夫妻双方存在任何血缘关系,使用 SNP 阵列则不会得到非整倍性的结果。

4.3.2 CGH 微阵列 CGH 微阵列密度低于 SNP 微阵列,用于 PGS 的 CGH 阵列芯片可识别整个基因组约 4 000 个标记(重复运行)。CGH 阵列是一种比率标记方案,可将待检标本与正常 46,XY、46,XX DNA 标本进行比较。与 SNP 阵列比较,CGH 阵列能在更短的时间内完成。CGH 阵列平台能扩增 DNA,并在 12~15 h 内完成整个分析。与需要 30~40 h 完成分析的 SNP 阵列比较,时间优势明显。不同于 SNP 阵列,CGH 阵列不产生基因型,因而不能区分 46,XX、69,XXX 或 46,XY 与 69,XXY。此外,CGH 阵列不能识别单亲二倍体。用于 PGS 的 CGH 微阵列只能鉴别整个染色体的非整倍性,不能用于鉴定结构染色体畸变。如果将 CGH 芯片用于嵌合细胞样品的识别,则其确定滋养外胚层样品中的嵌合细胞的能力有限。

有学者提出,CGH 阵列的错误率约为 15%~30%^[42]。但有研究进行了验证,通过子代测序将 DNA 与 CGH 阵列进行比较,验证了超过 400 个滋养外胚层样品,两者的一致率超过 99%。

5 总 结

在判断男性生育功能时,传统的精液分析是首选检查,具有临床的重要性。但随着医学科学的蓬勃发展,检查技术日新月异,精液常规所能提供的有限信息已不能满足临床工作的需要。部分男性不育症患者可能需一些新型的、专用的检测手段,以明确不育症的具体病因,并为诊疗提供线索。在不久的将来,这些新型的检测方法可能会得到进一步的推广应用,将与传统的精液检查方法,为男性不育症患者,特别是那些病因不明的不育症患者,提供更多的帮助。

参考文献

- [1] MALAMA E, ZERON Y, JANETT F, et al. Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality[J]. Theriogenology, 2017, 87(10): 79-90.
- [2] KUECUEK N. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm[J]. Turk J Urol, 2018, 44(1): 1-5.

- [3] SMITH G D, TAKAYAMA S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction[J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(4):257-268.
- [4] CASTILLO J, JODAR M, OLIVA R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo[J]. *Hum Reprod*, 2018, 89(12):4512-4514.
- [5] HAERTLE L, MAIERHOFER A, BOECK J, et al. Hypermethylation of the non-imprinted maternal MEG3 and paternal MEST alleles is highly variable among normal individuals[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8):e0184030.
- [6] CAMARGO M, INTASQUI P, BERTOLLA R P. Understanding the seminal plasma proteome and its role in male fertility[J]. *Basic Clin Androl*, 2018, 28(3):6-14.
- [7] BIENIDK J M, DRABOVICH A P, LO K C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility[J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(3):426-433.
- [8] SAMANTA L, PARIDA R, DIAS T R, et al. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1):41-52.
- [9] TSAUR I, THURN K, JUENGEL E, et al. Evaluation of TKTL1 as a biomarker in serum of prostate cancer patients[J]. *Cent European J Urol*, 2016, 69(3):247-251.
- [10] LI D, LIU J, DU W, et al. Carnitine/organic cation transporter 2 (OCTN2) contributes to rat epididymal epithelial cell growth and proliferation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93(9):444-450.
- [11] BIENIEK J M, LO K C. Recent advances in understanding & managing male infertility[J]. *F1000 Res*, 2016, 5(1):27-56.
- [12] YANG C, GUO W B, ZHANG W S et al. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma[J]. *Andrology*, 2017, 5(5):1007-1015.
- [13] KORBAKIS D, SCHIZA C, BRINC D, et al. Preclinical evaluation of a TEX101 protein ELISA test for the differential diagnosis of male infertility[J]. *BMC Med*, 2017, 15(4):60-66.
- [14] DIMOPOULOU M, ANIFANDIS G, MESSINI C I, et al. Follicular fluid oocyte/ cumulus-free DNA concentrations as a potential biomolecular marker of embryo quality and IVF outcome[J]. *BioMed Res Int*, 2014, 20(2):89-96.
- [15] PALAZZESE L, GOSALVEZ J, ANZALONE D A, et al. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development[J]. *Reprod Dev*, 2018, 76(11):7623-7629.
- [16] BARCELO M, MATA A, BASSAS L, et al. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(6):1087-1098.
- [17] MUNOZ X, MATA A, BASSAS L, et al. Altered miRNA signature of developing germ-cells in infertile patients relates to the severity of spermatogenic failure and persists in spermatozoa[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):179-183.
- [18] PANTANO L, JODAR M, BAK M, et al. The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes[J]. *RNA*, 2015, 21(6):1085-1095.
- [19] PALERMO G D, ONEILL C L, CHOW S, et al. Intracytoplasmic sperm injection: state of the art in humans[J]. *Reproduction*, 2017, 154(6):F93-F110.
- [20] SHABANI N M, NEKONNAM S, NAJI M, et al. Cryoprotective effect of resveratrol on DNA damage and crucial human sperm messenger RNAs, possibly through 5' AMP-activated protein kinase activation[J]. *Cell Tissue Bank*, 2018, 19(1):87-95.
- [21] RIEKEBERG E, POWERS R. New frontiers in metabolomics: from measurement to insight[J]. *F1000 Res*, 2017, 6(4):11-18.
- [22] MALIVINDI R, RAGO V, DE R D, et al. Influence of all-trans retinoic acid on sperm metabolism and oxidative stress: Its involvement in the physiopathology of varicocele-associated male infertility[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 87(15):936-939.
- [23] WOJSIAT J, KORCZYNSKI J, BOROWIECKA M, et al. The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017, 71(10):359-366.
- [24] MINAI-TEHRANI A, JAFARZADEH N, GILANY K. Metabolomics: a state-of-the-art technology for better understanding of male infertility[J]. *Andrologia*, 2016, 48(6):609-612.
- [25] BAHMANIMEHR A, ZEIGHAMI S, NAMAVAR J B, et al. Detection of Y chromosome microdeletions and hormonal profile analysis of infertile men undergoing assisted reproductive technologies[J]. *Int J Fertil Steril*, 2018, 12(2):173-177.
- [26] DE SOUZA D A S, FAUCZ F R, PEREIRA-FERRARI L, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling [J]. *Andrology*, 2018, 6(1):127-135.
- [27] GNESSI L, SCARSELLI F, MINASI M G, et al. Testicular histopathology, semen analysis and FSH, predictive value of sperm retrieval: supportive counseling in case of reoperation after testicular sperm extraction (TESE)[J]. *BMC Urol*, 2018, 18(1):63-68.
- [28] GIAGULLI V A, CAPONE B, CASTELLANA M, et al. Neuropsychiatric aspects in men with klinefelter syndrome[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2018, 45(11):1326-1329.
- [29] WEN J, PAN L, XU X, et al. Clinical data and genetic mutation in Kallmann syndrome with CHARGE syndrome: Case report and pedigree analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(27):e11284.

- [30] GAJBHIYE R, KADAM K, KHOLE A, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene abnormalities in Indian males with congenital bilateral absence of vas deferens & renal anomalies[J]. Indian J Med Res, 2016, 143(5): 616-623.
- [31] KRZUSZ C, RIERA-ESCAMILLA A. Genetics of male infertility[J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(6): 369-384.
- [32] CASTILLO J, JODAR M I, OLIVAL R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo[J]. Hum Reprod Update, 2018, 96(17): 734-738.
- [33] AITKEN R J. Not every sperm is sacred; a perspective on male infertility[J]. Mol Hum Reprod, 2018, 24(6): 287-298.
- [34] DENOMME M M, MC CALLIE B R, PARKS J C, et al. Alterations in the sperm histone-retained epigenome are associated with unexplained male factor infertility and poor blastocyst development in donor oocyte IVF cycles[J]. Hum Reprod, 2017, 32(12): 2443-2455.
- [35] YE C J, REGAN S, LIU G, et al. Understanding aneuploidy in cancer through the lens of system inheritance, fuzzy inheritance and emergence of new genome systems[J]. Mol Cytogenet, 2018, 11(6): 31-35.
- [36] BREZINA P R, KUTTEH W H. Clinical applications of preimplantation genetic testing[J]. BMJ (Clin Res Ed), 2015, 350(11): 7611-7615.
- [37] LEE A, KIESSLING A A. Early human embryos are naturally aneuploid-can that be corrected? [J]. J Assist Reprod Genet, 2017, 34(1): 15-21.
- [38] SIMON A L, KIEHL M, FISCHER E, et al. Pregnancy outcomes from more than 1,800 in vitro fertilization cycles with the use of 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic testing for aneuploidy[J]. Fertil Steril, 2018, 110(1): 113-121.
- [39] OTTOLINI C S, KITCHEN J, XANTHOPOULOU L, et al. Tripolar mitosis and partitioning of the genome arrests human preimplantation development in vitro[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9744-9748.
- [40] GRIFFIN D K, OGUR C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? [J]. Reproduction, 2018, 156(1): F29-F50.
- [41] CAPALBO A, TREFF NR, CIMADOMO D, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies[J]. Eur J Hum Genet: EJHG, 2015, 23(21): 901-906.
- [42] BREZINA P R, ANCHAN R, KEARNS W G. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? [J]. Cell, 2016, 33(7): 823-832.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-08-28)

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.042

中性粒细胞与淋巴细胞比值对肿瘤预后评估的研究进展

李保林 综述, 王 猛, 于丹军[△] 审校
(河北省秦皇岛市第一医院检验科 066000)

关键词: 中性粒细胞与淋巴细胞比值; 肿瘤; 预后; 研究进展

中图分类号: R733

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)01-0125-04

肿瘤以起病隐匿、病情进展迅速、预后差等特点, 给临床诊疗带来了极大的困难, 对人类健康造成严重危害。病理学和影像学检查是临床评估肿瘤患者病情进展情况的主要手段, 而相同的病理分期和临床分级的患者预后不尽一致。除肿瘤本身的异质性外, 炎症反应和免疫功能发挥重要的作用。机体的炎症环境有助于肿瘤细胞的增殖、分化、转移, 同时导致机体的免疫监视及抗肿瘤能力降低^[1]。中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)作为衡量外周血中性粒细胞与淋巴细胞之间动态平衡的细胞学指标, 反映机体的炎症反应和免疫功能。高水平 NLR 提示炎症状态的增强和抗肿瘤免疫功能的减弱, 通过创建肿瘤细胞的炎症微环境, 促进癌细胞的增殖和转移^[2]。近年来, 多项流行病学研究证实, NLR 与肿瘤的浸润、转移、预后

情况具有相关性。现就近年来国内外 NLR 对常见肿瘤预后评估的研究进展作一综述。

1 NLR 与肿瘤研究

1.1 肺癌 ZHAO 等^[3] 研究证实, 高值 NLR 组(≥ 3.31)与低值 NLR 组(< 3.31)小细胞肺癌患者的分期和 ECOG 评分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 低值 NLR 组患者 1 年生存率明显大于高值 NLR 组(83.3% vs. 21.7%, $P < 0.05$), Cox 回归分析显示, 治疗前 NLR 是影响小细胞肺癌患者预后的独立危险因素, 与贾静等^[4] 研究结论一致。尹洪岩等^[5] 不仅证实术前 NLR 对非小细胞肺癌患者 1、3、5 年无病生存率(DFS)和总生存率(OS)的预测价值($P < 0.05$), 且复发时高值 NLR 组和复发时低值 NLR 组 1、2 年生存率, 差异有统计学意义(35.4%, 17.2%

[△] 通信作者, E-mail: qhdmmy@sina.com.