

精子功能检测的临床应用进展*

李圆龙¹综述,王树松^{2△}审校1. 河北医科大学研究生学院,河北石家庄 050017;2. 河北省计划生育科学技术研究院/
国家卫生和计划生育委员会计划生育与优生重点实验室,河北石家庄 050071**关键词:**精子功能检测; 男性不育; 辅助生殖技术**中图分类号:**R446.9**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)18-2738-04

不育症是指夫妻双方 12 个月或更长时间的无保护性交后未能达到临床妊娠,在发达国家,不育症发生率为 5.0%~8.0%,而在发展中国家则高达 5.8%~44.2%^[1]。由于男性因素导致的不育占 40%~50%,且多达 2% 的男性精液参数未达到标准^[2]。一直以来,对于男性不育的实验室诊断主要采用常规精液分析,且将其作为评价男性生育力的重要依据。精子从发生到最终形成受精卵需要经过精子获能、顶体反应、结合并穿越透明带、精卵融合等一系列复杂的过程^[3],但是常规精液分析仅仅是对精液一般性状、精子浓度和活力进行分析,并不能准确反映精子受精能力。因此,还需要对精子功能进行检测,以完善对于男性生育力的评估。近年来,随着辅助生殖技术(ART),尤其是卵细胞质内单精子注射(ICSI)的出现和推广,使精子功能检测在临床上的应用日趋减少,ICSI 的应用大大提高了不育男性的生育率,掩盖了精子功能缺陷的影响^[4]。事实上,进行精子功能检测可减少没有严重精子缺陷夫妇的侵入性操作,同时降低医疗费用。本文针对常用精子功能检测方法及其对于男性不育的诊治意义进行综述。

1 精子 DNA 损伤检测

DNA 损伤是细胞凋亡的标志,通过检测精子 DNA 可以获得精子参数,预测精子受精能力。当精子 DNA 损伤超过一定阈值时,会对妊娠和胚胎发育造成损害。有研究发现,精子 DNA 损伤在不育男性中比在生育男性中更为常见^[5]。DNA 损伤检测常用彗星试验,该试验可直接评估 DNA 损伤和氧化程度。而精子染色质扩散分析(SCDA)和精子染色质结构分析(SCSA)可通过检测 DNA 碎片率(SDF)来间接判断精子 DNA 的损伤,其结果用精子 DNA 碎片指数(DFI)来表示^[6]。然而,彗星试验无法和 SCSA 提供相同的结果,这也限制其临床常规应用。若用流式细胞仪检测精子 DNA,可区分异常二倍体和成熟单倍体精子、未成熟生殖细胞和细胞碎片^[7]。有研究表明,DNA 损伤、组蛋白残基、鱼精蛋白/鱼精蛋白 2 比

值均与妊娠率相关^[8]。TELLO-MORA 等^[9]研究 69 例接受体外受精(IVF)的患者发现,DFI 与囊胚发育率呈负相关,其对囊胚发育率的预测值为 70.0% (特异度为 80.6%,灵敏度为 72.3%)。ZHANG 等^[10]对 102 例高 DFI 男性分别用睾丸精子和射出精液中精子进行 ICSI,发现对于 DNA 损伤较为严重的男性行 ICSI 时,使用睾丸精子更为有利。有研究发现,拉曼光谱技术可检测活细胞 DNA 状态且不会影响其活力,检测结果与 SCSA 一致,特别适用于 ICSI^[11]。因此,精子 DNA 损伤检测对于男性不育的诊断具有重要价值^[12]。

2 精子膜完整性检测

精子膜作为精子细胞最外层的一种功能性膜,其完整性不仅对精子的代谢发挥重要作用,同时,精子膜动力的正确变化对于精子获能、顶体反应、精子与卵子表面结合等过程中具有重要意义。因此,精子膜的完整性和功能活性在受精过程中对于评价男性生育力有重要意义^[13]。精子膜主要分为头部膜和尾部膜。目前,头部膜完整性检测主要根据染料(如伊红)能否将核着色来进行判断,其原理是非透过性染料分子不能进入完整头膜;尾部膜完整性检测主要利用低渗肿胀试验,其原理为精子膜是半透膜,尾部膜受损导致无法调节渗透压,即使处于低渗液中,水也无法进入膜内使尾部肿胀^[14]。伊红染色在临床实验室较为常用,但在行 ICSI 睾丸取精需要鉴别精子膜完整性而无法进行染色时,则应选取低渗肿胀试验^[13]。

3 精子-宫颈黏液相互作用试验

子宫是精子在女性生殖道内运输时经历的第一道解剖学屏障,其中形态和运动性差的精子通过黏附在宫颈黏液上而被过滤掉^[15]。因此,精子-宫颈黏液相互作用试验可了解精子在子宫颈穿透密度、迁移密度、减少程度、迁移距离等情况,以评估精子存活和状态^[14]。精子-宫颈黏液相互作用试验主要包括体内试验(性交后试验,PCT)和体外试验。PCT 是指在接近排卵时夫妇性交,几小时后检查女性宫颈黏液中活

* 基金项目:政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(20170183);国家卫生健康委员会计划生育与优生重点实验室开放课题
研究项目(2016004)。

△ 通信作者,E-mail:wshsong@sina.com。

动精子数目,常被用来预测自然受孕的可能性,也可评估抗精子抗体试验阳性的意义。然而,PCT 易受性交技术、排卵问题、排卵时机和免疫因素的影响,使部分患者难以接受。同时随着宫腔内人工授精(IUI)、IVF 等技术的完善,近几年该试验已较少使用^[16]。当 PCT 阴性时可进行体外试验,如毛细管试验和玻片试验,前者操作简单,试验条件易控制且影响因素较少,还可鉴定 PCT 结果异常因素的来源,临床实用价值较大;后者更为简便,但主观性较大^[17],且该方法需使用人宫颈黏液,同时宫颈炎症和 pH 值会影响黏液质量,从而影响对精子穿透力的判断^[14]。

4 精子-透明带结合试验

精子与透明带结合并相互作用是顶体反应的前提,也是受精成功的关键步骤,目前主要有两种方法,一种是半透明带检测试验,另一种是精子-透明带结合试验。半透明带检测试验是将透明带显微切割成相等的两部分,分别与相同浓度的对照可育精子和待测患者精子孵育。精子-透明带结合试验使用不同荧光染料分别标记对照可育精子和待测患者精子,计算两种精子竞争结合同一个透明带的数量和比值。当 IVF 失败或受精率低、特发性不育、少精子症及精子畸形时,精子-透明带结合试验具有临床价值,尤其是对 IVF 结果具有高度预测价值,也可预测接受 IVF 的夫妇是否会因为精子结合异常而不能成功受精,从而选择 ICSI^[18]。精子-透明带结合试验必须采用人卵透明带,并且使用 IVF 中未受精的卵透明带,故透明带本身是否缺陷无法确定,这也制约了精子-透明带结合试验在临床上的应用。

5 顶体反应检测

顶体反应是指精子顶体接触卵丘细胞,诱发精子质膜与顶体外膜融合,顶体小泡释放顶体蛋白酶,水解卵母细胞周围透明带形成入卵通道,以便于精子与卵母细胞膜融合。顶体反应是包括人类在内的所有物种配子相互作用的关键步骤,因此,顶体反应被认为是生育潜力的决定性指标^[19]。利用荧光染料异硫氰酸荧光素标记的凝集素(如豌豆凝集素、花生凝集素)进行精子染色,相差显微镜下若观察到精子头部 50%以上荧光染色明亮且均匀为顶体完整;而已发生过顶体反应的精子仅赤道带出现荧光带或顶体区无荧光染色;其他类型的精子则为顶体异常^[20]。 Ca^{2+} 内流是正常顶体反应的起点,故可使用 Ca^{2+} 载体作为诱导剂,如 Ca^{2+} 载体 A23187 体外诱发顶体反应^[21]。顶体反应可预测体外受精率,这有利于指导由于男性不育的夫妇选择 ART。在顶体反应较差的情况下,建议进行 ICSI 治疗,因为在没有顶体反应的情况下,精子无法穿透透明带。顶体反应检测在预测受精效果方面的结论不一致。最近一项 IVF 受者参加的横断面研究发现,顶体反应与受精率高度相关,并且可以预测体外受精率(60.0%)^[9]。WISER 等^[22] 研究发现,顶体反应只预测了 35.0%的受精率。因此,在顶体反应检测进入临床常规检测前,仍需要更多的研

究支持。

6 质酸结合试验(HBA)

HBA 的原理为透明质酸选择性地与顶体完整且形态良好的成熟精子进行结合,该方法是一种新的、简便的精子功能检测方法,试验阳性则表明细胞成熟、活力高,精子顶体完整^[23]。因此,HBA 是鉴定精子的一种可靠、重复性好的方法,有助于临床医生为患者选择 IVF 或 ICSI 治疗。ESTERHUIZEN 等^[24] 对接受常规 ICSI 治疗的 91 例患者进行分析认为,HBA 与常规 ICSI 中的受精有明显相关性,HBA 评分也与受精率和生化妊娠明显相关。然而,YILDIRIM 等^[25] 和 BOYNUKALIN 等^[26] 分析了进行 IUI 的不育夫妇发现,妊娠状况与 HBA 之间无明显相关性,认为 HBA 不能预测不明原因不育或轻度男性因素不育夫妇的 IUI 结果,但它可与精液参数一起来验证精子质量。

7 精子穿透试验(SPA)

SPA 的原理是仓鼠卵细胞去除透明带后几乎无种属特异性,人类精子与仓鼠卵母细胞融合过程与人卵细胞膜融合过程相同。SPA 可测定精子获能、顶体反应、融合和穿透卵膜的能力,以及在仓鼠卵母细胞质内的解聚能力,评价精子受精潜力从而评估男性生育能力^[18]。有些精子可结合到卵细胞透明带上并发生顶体反应,但却无法穿透透明带而受精,因此,与精子-透明带结合试验相比,SPA 能更好地预测受精能力^[14]。但是,SPA 易受多种因素影响使其结果稳定性较差,易出现假阴性和假阳性结果,降低预测价值^[18]。VOGIATZI 等^[27] 指出,SPA 的诊断准确率差异较大,主要依赖于试验灵敏度(52.0%~100.0%)、特异度(0.0%~100.0%)、阳性预测值(PPV,18.0%~100.0%)和阴性预测值(NPV,0.0%~100.0%)及每组采用的方法和截止值。SPA 可重复性和实验室间方法标准化程度较低。BROWN 等^[28] 利用 SPA 预测 60 例行 ICSI 的夫妇的妊娠结局发现,SPA 作为独立试验时对 ICSI 的结局无明显预测作用。因此,尽管 SPA 对于评估精子受精能力、IVF 和 ICSI 的选择及妊娠结局的预测有积极作用,但在临床上应用较少^[14]。

8 活性氧(ROS)测定

ROS 是氧的代谢物,精液中的 ROS 由精子和白细胞产生^[22]。ROS 对于男性生殖功能影响是一把“双刃剑”,一方面,适量的 ROS 可维持男性生殖功能,如对精子活力、精子获能、顶体反应及激素产生有重要作用^[29-30];另一方面,过多的 ROS 会导致精子活力下降、精子细胞膜脂质过氧化、DNA 完整性受损、Y 染色体微缺失、端粒缩短等氧化应激反应,导致体外受精能力和自然孕率下降^[31-32]。近几年,精子功能损伤常与过量 ROS 导致的氧化应激有关,据报道,有 25%~40%的不育男性精液中可检出 ROS 水平升高^[33]。目前,对于 ROS 的测定,常采用化学发光法,且以鲁米诺或光泽精为氧化还原反应敏感探针,检测精子发出的信号,该信号强度与精子功能和体外受精

时精子受精能力均呈负相关^[34],说明 ROS 水平可能降低不育男性自然生育率和体外受精成功率^[5]。SUBRAMANIAN 等^[35]通过测定 110 例接受宫腔内人工授精夫妇中丈夫精液 ROS 和总抗氧化能力(TAC)发现,TAC 和 ROS 测定对预测精液质量及生育治疗效果有重要价值,同时,ROS 可准确区分可育男性和不育男性。

综上所述,进行精子功能检测可全面而客观地评价男性生育能力。对于需要进行 ART 的患者来说,精子功能检测可指导他们选择合适的方法,在一定程度上也可预测妊娠结局。目前由于 ART 技术的限制,这些检测方法并非都能应用于临床。在临床实验室中,主要应用 SCDA、膜完整性检测等一些较为简便的方法,而由于精子-透明带结合试验等方法较为复杂还需逐渐推广。随着检测技术的不断进步及对男性不育研究的不断深入,精子功能检测将在男性不育的诊治与 ART 的应用上发挥巨大作用,更好地帮助男性不育患者解决生育问题。

参考文献

- [1] BENBELLA A, ABOULMAKARIM S, HARDIZI H, et al. Infertility in the moroccan population: an etiological study in the reproductive health centre in Rabat[J]. Pan Afr Med J, 2018, 30(10): 204-209.
- [2] KUMAR N, SINGH A K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: a review of literature [J]. J Hum Reprod Sci, 2015, 8(4): 191-196.
- [3] SUN T C, WANG J H, WANG X X, et al. Effects of sperm proteins on fertilization in the female reproductive tract[J]. Front Biosci, 2019, 24(1): 735-749.
- [4] TALWAR P, HAYATNAGARKAR S. Sperm function test[J]. J Hum Reprod Sci, 2015, 8(2): 61-69.
- [5] 张富勋, 吴侃, 卢一平. 男性不育精液诊断技术的新进展 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(1): 119-125.
- [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(1): 6-9.
- [7] HAERTLE L, MAIERHOFER A, BÖCK 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.
- [8] BIENIEK 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.
- [9] TELLO-MORA P, HERNÁNDEZ-CADENA L, PEDRAZA J, et al. Acrosome reaction and chromatin integrity as additional parameters of semen analysis to predict fertilization and blastocyst rates[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 102-109.
- [10] ZHANG J, XUE H, QIU F, et al. Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage [J]. Andrologia, 2019, 51(2): e13175.
- [11] 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.
- [12] 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): 41-48.
- [13] RAMU S, JEYENDRAN R S. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity [J]. Methods Mol Biol, 2013, 927(1): 21-25.
- [14] 马国燕, 卢静, 景丽. 精子功能检测在男性不育诊治中的应用 [J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 23(1): 61-63.
- [15] KÖLLE S. Transport, Distribution and Elimination of Mammalian Sperm Following Natural Mating and Insemination [J]. Reprod Domest Anim, 2015, 50 (Suppl 3): 2-6.
- [16] MARTYN F, MCAULIFFE F M, WINGFIELD M. The role of the cervix in fertility: is it time for a reappraisal [J]. Hum Reprod, 2014, 29(10): 2092-2098.
- [17] 曹泽磊, 朱亮. 精子功能检测在辅助生殖中的应用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(1): 136-138.
- [18] OEHNINGER S, FRANKEN D R, OMBELET W. Sperm functional tests [J]. Fertil Steril, 2014, 102(6): 1528-1533.
- [19] ZHANG G, YANG W, ZOU P, et al. Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity [J]. Hum Reprod, 2019, 34(1): 3-11.
- [20] 刘树沅, 韦剑洪, 陈伟辉, 等. 精子自发顶体反应率与体外受精胚胎质量的相关性研究 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(1): 16-18.
- [21] BELTRÁN C, TREVIÑO C L, MATA-MARTÍNEZ E, et al. Role of ion channels in the sperm acrosome reaction [J]. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2016, 220(5): 35-69.
- [22] WISER A, SACHAR S, GHETLER Y, et al. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: preliminary results [J]. Andrologia, 2014, 46(2): 313-315.
- [23] NIZANSKI W, PARTYKA A, PROCHOWSKA S. Evaluation of spermatozoal function-useful tools or just science [J]. Reprod Domest Anim, 2016, 51 (Suppl 1): 37-45.
- [24] ESTERHUIZEN A D, FRANKEN D R, BOSMAN E, et al. Relationship between human spermatozoa-hyaluronan-binding assay, conventional semen parameters and fertilisation rates in intracytoplasmic spermatozoa injection [J]. Andrologia, 2015, 47(7): 759-764.
- [25] YILDIRIM M, DUVAN C I, PEKEL A, et al. Can hyaluronan binding assay predict the outcome of intrauterine insemination in couples with unexplained or mild male factor infertility [J]. J Reprod Infertil, 2015, 16(1): 18-23.
- [26] BOYNUKALIN F K, ESINLER I, GUVEN S, et al. Hyaluronan binding assay does not predict pregnancy rates in IUI cycles in couples with unexplained infertility [J]. Arch

Gynecol Obstet, 2012, 286(6): 1577-1580.

[27] VOGIATZI P, CHRELIAS C, CAHILL D J, et al. Hemizona assay and sperm penetration assay in the prediction of IVF outcome: a systematic review[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 945825.

[28] BROWN D B, MERRYMAN D C, RIVNAY B, et al. Evaluating a novel panel of sperm function tests for utility in predicting intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(4): 461-477.

[29] KUMAR N, SINGH A K. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018, 47(10): 565-572.

[30] AITKEN R J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage[J]. Mol Reprod Dev, 2017, 84(10): 1039-1052.

[31] KÜÇÜK N. Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm[J]. Turk J Urol, 2018, 44(1): 1-5.

[32] BUI A D, SHARMA R, HENKEL R, et al. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility[J]. Andrologia, 2018, 50(8): e13012.

[33] 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(1): 79-90.

[34] SMITH G D, TAKAYAMA S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction[J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(4): 257-268.

[35] SUBRAMANIAN V, RAVICHANDRAN A, THIAGARAJAN N, et al. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility[J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45(2): 88-93.

(收稿日期: 2019-02-26 修回日期: 2019-05-18)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.18.051

两种血糖监测系统性能比较分析

解 怡 综述, 李耀华[△] 审校

国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心, 北京 100081

关键词: 自我血糖监测系统; 专业血糖监测系统; 上市前申报; 性能要求
 中图分类号: R955 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2019)18-2741-03

近年来, 糖尿病发病率在世界范围内呈上升趋势, 糖尿病目前已经与肿瘤、心血管疾病同属于影响人类健康的 3 大慢性疾病^[1]。我国糖尿病的发病形势也较为严峻, 据报告, 我国 2010 年糖尿病的发病率约为 11.6%, 2013 年约为 10.7%, 由此推测糖尿病患者数超过 1 亿, 已成为世界上糖尿病患者人数最多的国家^[2-3]。我国糖尿病发病率在过去 30 年里从 1% 增长到 10%, 发病率增长迅速, 且存在着未诊断人群比例高, 糖尿病高危人群数量多等问题, 因此带来严重的健康问题, 加重了家庭和社会的经济负担^[4-7]。因此, 糖尿病的预防、诊断和治疗工作具有十分重要的意义。

目前, 临床上主要是通过检测静脉血浆中葡萄糖水平来辅助诊断和监测糖尿病。《中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)》^[2] 中建议糖尿病患者血糖诊断界值如下: 随机血糖(1 d 中任意时间)浓度 11.1 mmol/L, 空腹血糖浓度 7.0 mmol/L, 葡萄糖负荷后 2 h 血糖浓度 11.1 mmol/L。目前检测血液中葡萄糖的方法可分为有创检测和无创检测^[8], 血糖监测系统对血样的检测属于有创检测, 主要利用该系统对人体血液标本中的葡萄糖浓度进行定量检测, 是目前最传统且较准确的血糖检测方法^[9-10]。血糖监测系统按照预期用途不同, 可分为非专业人员使用的自我血糖监测系统(SMBG)和专业人员使用的专业血糖监测

系统(BGMS)。

国内已发布的血糖监测系统相关指导原则包括《自测用血糖监测系统注册申报资料指导原则》^[11]和《血糖仪注册技术审查指导原则》^[12]。目前国内制定的相关标准为《体外诊断检验系统自测用血糖监测系统通用技术条件: GB/T19634-2005》^[13], 主要依据为 ISO 15197: 2003^[14], 而国际标准已经更新为 ISO 15197: 2013^[15], 在性能方面提高了要求^[16]。美国食品与药品监督管理局(FDA)在 2016 年底发布了两个关于血糖监测系统的指导原则, 其中引用了比 ISO 15197: 2013 更为严格的标准^[17-18]。以往 FDA 发布的关于血糖监测系统的指南并未将两种血糖监测系统区分开, 本次新发布的指南将两者区分开, 且根据不同血糖监测系统的特性, 分别提出了不同的要求。

血糖监测是糖尿病辅助诊断和治疗的重要环节, 相关的产品品种多、数量大, 所以一直是注册申报的热点。不同用途的血糖监测系统由于预期使用人群和使用环境不同, 其具体性能要求上也存在差异。通过对 FDA 相关指南的要求解析, 有助于更深入的理解两种血糖监测系统的差异, 从而更好地设计产品, 根据不同需求完善产品性能。

1 两个血糖监测系统的概念

在 FDA 发布的两个指南中, SMBG 是预期提供

[△] 通信作者, E-mail: liyh@cmde.org.cn.