

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.04.006

精索静脉曲张不育患者各项精液分析指标的特征及其临床价值^{*}

王希部,罗燕萍,刘丽亚,莫红梅[△]

广东省深圳市罗湖区人民医院医学检验科,广东深圳 518000

摘要:目的 通过比较精索静脉曲张不育患者与健康婚育检查人士各项精液分析指标水平,探讨精索静脉曲张不育患者各项精液分析指标的特征,并分析精子 DNA 碎片指数(DFI)与其他精液分析指标的相关性,以及各项指标联合检测在精索静脉曲张不育中的诊断效能。**方法** 将该院 2019 年经 B 超确诊为精索静脉曲张,并同时精子 DNA 完整性检查、精液常规参数分析和精子形态分析的 107 例不育患者纳入精索静脉曲张组,选择同期 60 例健康婚育检查人士纳入健康对照组。检测并比较两组研究对象精子 DFI、高 DNA 可染性(HDS)、精子浓度、前向运动精子(PR)、正常形态精子百分比(PNS)、畸形精子指数(TZI)、精子畸形指数(SDI),分析精子 DFI 与其他精液分析指标的相关性,绘制受试者工作特征(ROC)曲线,判断联合检测在精索静脉曲张不育患者中的诊断效能。**结果** 两组精子 DFI、HDS、精子浓度、PR、PNS、TZI、SDI 比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。精子 DFI 与 HDS、TZI、SDI 呈正相关($r=0.530, 0.454, 0.306, P<0.05$),与 PR、PNS 呈负相关($r=-0.559, -0.245, P<0.05$),与精子浓度无明显相关性($r=-0.112, P>0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,精子 DFI 与 HDS 是精索静脉曲张不育的独立危险因素[精子 DFI($OR=1.179, 95\%CI: 1.094\sim1.271, P<0.05$)、HDS($OR=1.150, 95\%CI: 1.029\sim1.286, P<0.05$)]。ROC 曲线分析显示,各项指标联合检测 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.871($95\%CI: 0.819\sim0.924, P<0.05$),灵敏度为 71.0%,特异度为 95.0%,阳性预测值为 95.0%,阴性预测值为 65.5%,约登指数为 0.660,诊断效能均优于单独检测。**结论** 精索静脉曲张不育患者精子 DNA 完整性、常规精液分析结果与健康人有差异,精子 DFI 与部分精液分析指标存在相关性,精子 DFI 与其他精液常规分析参数联合检测能为临床筛查和治疗精索静脉曲张不育提供更好的依据。

关键词:精索静脉曲张; 精子 DNA 完整性; 精液常规; 联合检测

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)04-0450-04

Features and clinical value of routine semen analysis indicators in study of varicocele infertility patients^{*}

WANG Xibu, LUO Yanping, LIU Liya, MO Hongmei[△]

Department of Clinical Laboratory, Luohu District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China

Abstract: **Objective** By comparing the semen analysis index levels of varicocele infertility patients and health examination person, to analyze characteristics of these indicators of varicocele infertility patients, and analyze the correlations between sperm DNA fragmentation index (DFI) and other indicators, as well as the value of joint detection of these indicators in patients with varicocele infertility. **Methods** In 2019, 107 cases of infertility patients with B-ultrasound diagnosed as varicocele in Luohu District People's Hospital were retrospectively collected into varicocele infertility group. Meanwhile, 107 cases of infertility patients were examined for sperm DNA integrity, semen routine analysis and sperm morphological analysis. A total of 60 healthy marriage and childbirth examinees in the same period were collected into healthy control group. The results of sperm DFI, high DNA staining cells (HDS), sperm concentration, sperm forward movement (PR), percentage of normal sperm (PNS), malformed sperm index (TZI), defective sperm index (SDI) between the two groups were compared, the correlation between the parameters of sperm DFI and routine semen analysis was analyzed, and the receiver operating characteristic curve (ROC) was established to determine the diagnostic efficacy of combined detection in patients with varicocele infertility. **Results** The sperm DFI, HDS, sperm concentration, PR, PNS, TZI, SDI in varicocele infertility group had statistically significant differences compared with those in healthy control group ($P<0.05$). Sperm DFI positively correlated with HDS, TZI and SDI ($r=0.530, 0.454, 0.306, P<0.05$), negatively correlated with PR and PNS ($r=-0.559, -0.245, P<0.05$), and

^{*} 基金项目:广东省深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201601062)。

作者简介:王希部,男,主管技师,主要从事临床检验研究。 [△] 通信作者, E-mail:437897734@qq.com。

本文引用格式:王希部,罗燕萍,刘丽亚,等.精索静脉曲张不育患者各项精液分析指标的特征及其临床价值[J]. 检验医学与临床, 2021, 18

not significantly correlated with sperm concentration ($r = -0.112, P > 0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that sperm DFI and HDS were independent risk factors for varicocele infertility, sperm DFI with $OR = 1.179, 95\% CI: 1.094 - 1.271, P < 0.05$ and HDS with $OR = 1.150, 95\% CI: 1.029 - 1.286, P < 0.05$. ROC curve analysis showed that the area under the curve of combined multi-parameter was 0.871 ($95\% CI: 0.819 - 0.924, P < 0.05$), the sensitivity was 71.0%, the specificity was 95.0%, the positive predictive value was 95.0%, the negative predictive value was 65.5%, and the Yoden index was 0.660, all of which were better than the single-parameter diagnosis. **Conclusion** Sperm DNA integrity and routine semen analysis results of patients with varicocele infertility are different from those of healthy patients. Sperm DFI correlates with some items of routine semen analysis, and joint detection could provide better basis and help for clinical diagnosis and treatment of varicocele infertility.

Key words: varicocele; sperm DNA integrity; semen routine; joint detection

精索静脉曲张临床定义为精索脐带状丛中静脉异常扩张和弯曲,是男性不育的常见原因之一。有研究表明,近 40% 的男性不育由精索静脉曲张导致^[1]。精索静脉曲张的发生机制由多因素导致,其中氧化应激为核心机制。精子的 DNA 和脂质膜直接受到活性氧族(ROS)的攻击,导致精子 DNA 损伤,引起精子 DNA 碎片增加。因此,精子 DNA 完整性检测是反映精子 DNA 损伤程度的一项重要指标,精子 DNA 损伤可以使男性不育。另外,氧化应激可影响精子核酸结构和功能,致使精子蛋白氧化,损伤睾丸,同时,通过氧化细胞膜诱发发生精细胞凋亡,从而导致精子形态、运动性和受精能力的改变。本研究拟通过分析精索静脉曲张不育患者和健康婚育检查人士精子 DNA 完整性和精液常规参数分析指标之间的关系,用多参数联合检测旨在为精索静脉曲张患者不育中的筛查和治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性选择本院 2019 年确诊的 107 例精索静脉曲张,并同时检查精子 DNA 完整性和精液常规参数、精子形态的不育患者纳入精索静脉曲张组。精索静脉曲张以 B 超诊断为金标准,其中 1 级精索静脉曲张 82 例,2 级精索静脉曲张 15 例,3 级精索静脉曲张 10 例;平均年龄为 (32.0 ± 6.1) 岁。再选择同期健康婚育检查人士 60 例作为健康对照组,平均年龄为 (33.5 ± 6.9) 岁。两组间年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 仪器:上海北昂 BEION S3 精液分析仪及配套计数池,迈瑞 BriCyte E6 流式细胞仪。试剂:贝索精子形态学快速染色液,包括固定剂(Diff-Quick Fix)、染液 I (Diff-Quick I)、染液 II (Diff-Quick II);浙江星博生物科技股份有限公司精子 DNA 完整性检测试剂盒,医疗器械注册证号为浙甬食药监械(准)字 2012 第 1400127 号,试剂规格为 10 人份/盒,试剂由 A、B、C1 和 C2 液 4 部分组成。

1.3 方法

1.3.1 精液标本的采集及处理 所有研究对象禁欲 3~7 d,手淫法取出精液放置于无菌杯中,并记录取精时间和禁欲天数,立即送检。收到标本置于 37℃ 水浴箱中孵育,待精液完全液化,利用计算机辅助精子

分析系统进行各项精液常规参数分析,使用“拉薄”技术进行精子形态学分析,留取 0.5 mL 精液用于精子 DNA 完整性分析。若精子 DNA 完整性不能及时检测,放置于 -20℃ 冰箱进行保存,1 周内进行检测。

1.3.2 精液常规参数分析 使用上海北昂 BEION S3 精液分析仪及配套计数池,按照仪器标准操作规程,待标本完全液化后混匀,吸取液化精液 5 μ L,冲池放入计数池,样品自行扩散充满仓室内部,再静置 1 min 进行检测,通过显微图像采集系统将精子图像放大,并将结果输入计算机,同时显示在屏幕上,在计算机软件控制下,全自动显微镜自动扫描显微镜下的精子图像,并记录精子的运动轨迹,通过软件分析,计算标本的精子浓度、存活率及活力级别、前向活动力精子(PR)等各项参数。

1.3.3 精子形态学分析 严格按照 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》,取液化后混匀的精液(5~10 μ L),使用“拉薄”技术,制成适当厚度涂片,待自然干燥后第 2 天,使用贝索精子形态学快速染色液(Diff-Quick 法),按照说明书对精子进行染色,油镜计数 200 个精子,记录正常精子数、头部缺陷精子数、中段缺陷精子数、尾部缺陷精子数,由此计算出正常精子百分比(PNS)、畸形精子指数(TZI)、精子畸形指数(SDI)。

1.3.4 精子 DNA 完整性检测 正常精子 DNA 紧密结合,且具有抗酸性,维持双链的稳定性,而受损的或不成熟的精子形成松散的染色质结构,其 DNA 在酸作用下变成单链,吡啶橙(AO)与双链 DNA 结合发出绿色荧光,与单链 DNA 结合发出红色荧光。采用精子染色质结构分析法,使用浙江星博生物科技股份有限公司精子 DNA 完整性检测试剂盒进行检测,严格按照说明书操作,每管按计算取样量加入精子标本,再加入 A 液至 100 μ L,冰上充分混匀,加入 B 液 200 μ L,准确计时 30 s,再加入染色液(C1+C2 液配制而成)600 μ L,冰上静置 1 min 后立即使用迈瑞流式细胞仪进行检测,流式检测速度大约为每秒 200~300 个,以收集 5 000 个粒子数为结束条件。将流式细胞仪检测完毕的文件导出,采用专用软件进行处理,计数得出精子 DNA 碎片指数(DFI)和高 DNA 可染性(HDS)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS24.0 统计软件进行数

据处理及统计学分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;相关分析采用 Pearson 相关分析;危险因素分析采用多因素 Logistic 回归分析;同时绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析多参数联合检测对精索静脉曲张不育患者的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组各项精液分析指标结果比较 精索静脉曲张

表 1 两组各项精液分析指标结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	精子 DFI(%)	HDS(%)	精子浓度($\times 10^6$ /mL)	PR(%)	PNS(%)	TZI	SDI
精索静脉曲张组	107	24.50 $\pm$ 15.80	14.29 $\pm$ 11.41	67.42 $\pm$ 55.45	33.02 $\pm$ 17.87	3.06 $\pm$ 1.89	1.39 $\pm$ 0.15	1.34 $\pm$ 0.15
健康对照组	60	11.23 $\pm$ 4.28	8.14 $\pm$ 2.93	97.72 $\pm$ 72.33	46.69 $\pm$ 14.19	3.83 $\pm$ 1.80	1.31 $\pm$ 0.12	1.26 $\pm$ 0.12
<i>t</i>		−6.367	−4.098	3.029	5.090	2.562	−3.601	−2.968
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.003	<0.001	0.011	<0.001	0.003

2.3 多因素 Logistic 回归分析 精子 DFI、HDS 是精索静脉曲张不育的独立危险因素($P < 0.05$),见表 2。

表 2 多因素 Logistic 回归分析

变量	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)
精子 DFI	0.038	18.601	<0.001	1.179(1.094~1.271)
HDS	0.057	6.049	0.014	1.150(1.029~1.286)
精子浓度	0.004	2.649	0.698	0.993(0.985~1.001)
PR	0.015	0.151	0.104	0.994(0.965~1.024)
PNS	0.244	0.465	0.495	0.874(0.525~1.365)
TZI	17.076	0.495	0.482	0.000(0.000~5.65E+19)
SDI	17.396	0.285	0.593	0.000(0.000~5.94E+19)

2.4 各项精液分析指标和联合检测对精索静脉曲张

表 3 各项精液分析指标及联合检测对精索静脉曲张不育的诊断价值

项目	AUC(95% <i>CI</i>)	cut-off	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	约登指数	<i>P</i>
联合检测	0.871(0.819~0.924)	—	71.0	95.0	95.0	65.5	0.660	<0.05
精子 DFI	0.815(0.753~0.878)	15.12%	68.2	83.3	87.8	60.0	0.515	<0.05
HDS	0.708(0.632~0.785)	12.72%	47.7	95.0	94.4	54.0	0.427	<0.05
PR	0.275(0.200~0.350)	30.45%	49.5	88.3	88.3	49.5	0.378	<0.05
精子浓度	0.335(0.251~0.419)	57.20 $\times 10^6$ /mL	58.9	76.7	81.8	51.1	0.356	<0.05
PNS	0.369(0.285~0.454)	2.46%	43.9	85.0	55.4	18.2	0.289	<0.05
TZI	0.651(0.565~0.737)	1.41	42.2	85.0	83.3	45.1	0.271	<0.05
SDI	0.656(0.572~0.740)	1.37	43.0	85.0	83.6	45.5	0.28	<0.05

注:联合检测为精子 DFI、HDS、PR、精子浓度、PNS、TZI、SDI 联合检测;—为无数据。

3 讨 论

精索静脉曲张是影响生育能力的重要因素之一,其导致男性不育的机制仍未完全阐明。精索静脉曲张导致男性不育的因素有氧化应激、精子 DNA 损伤、睾丸缺氧、局部高温、肾脏及肾上腺代谢物质的反流、一氧化氮、免疫因素等,其中氧化应激是临床公认的

张组和健康对照组各项精液分析指标比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 精子 DFI 与其他精液分析指标的相关性分析 精子 DFI 与 HDS、TZI、SDI 呈正相关($r = 0.530、0.454、0.306, P < 0.05$),与 PR、PNS 呈负相关($r = -0.559、-0.245, P < 0.05$),与精子浓度无明显相关性($r = -0.112, P > 0.05$)。

不育的诊断价值 联合检测的诊断效果明显优于单独检测。单独检测中,以精子 DFI 诊断效能最佳。见表 3、图 1。

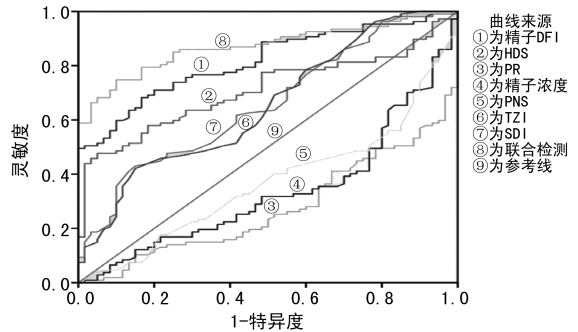


图 1 各项指标联合检测与单独检测诊断精索静脉曲张不育的 ROC 曲线

一个关键重要机制,此学说通过分子机制阐述了精索静脉曲张会引起精液质量的下降和精子 DNA 的损伤。而精子 DNA 的损伤又会负反馈地促进更多的 ROS 产生,引起恶性循环^[2]。本研究结果显示,与健康婚育检查人士相比,精索静脉曲张不育患者的精子浓度、PR、PNS 均降低,而精子 DFI、HDS、TZI、SDI

均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。本研究结果与钟慧芝等^[3]的研究一致,这说明精索静脉曲张不育患者生成的精液质量较差,生育能力下降,也印证了氧化应激的分子机制学说。

精子遗传信息的载体主要是头部的 DNA 和中部线粒体 DNA。精子 DNA 的损伤主要由细胞凋亡、ROS 的影响、染色质的异常所导致^[4]。刘利敏等^[5]研究发现,ROS 结果与精子 DFI 呈正相关,ROS 的增加会导致氧化应激的发生。有研究表明,氧化应激是导致精索静脉曲张发生的因素之一^[6]。本研究通过多因素 Logistic 回归分析显示,精子 DFI 和 HDS 是精索静脉曲张不育的独立危险因素。这说明精子 DNA 完整性与精索静脉曲张具有密切的关系,精索静脉曲张会损伤精子 DNA,引起精子染色质异常。通过筛查精子 DNA 完整性,可以对男性的生育能力进行评估,同时进一步印证了上面的分子机制学说。

精子 DNA 完整性的检测在生殖医学中极其重要,关于精子 DFI 与精液常规参数分析、精子形态学分析的各指标相关性已有较多报道,但关于联合相关参数在精索静脉曲张不育患者中的诊断效能的研究相对较少。本研究结果显示,精子 DFI 与 HDS、TZI、SDI 呈正相关($r=0.530, 0.454, 0.306, P<0.05$),与 PR、PNS 呈负相关($r=-0.559, -0.245, P<0.05$),与精子浓度无明显相关性($r=-0.112, P>0.05$)。除精子浓度外,与曾兰等^[7]研究结果一致,而精子浓度结果与李非凡等^[8]研究结果一致。精子 DFI、HDS、PR、精子浓度、PNS、TZI、SDI 多参数联合检测诊断精索静脉曲张不育的 AUC 为 0.871(95%CI: 0.819~0.924, $P<0.05$),灵敏度为 71.0%,特异度为 95.0%,阳性预测值为 95.0%,阴性预测值为 65.5%,约登指数为 0.660,诊断效能最高。联合检测的特异度高达 95.0%,与 B 超诊断的特异度基本一致^[9]。提示联合检测优于单独检测的诊断效能。单个项目中,精子 DFI 和 HDS 诊断精索静脉曲张不育患者效能较高,其次为 TZI 和 SDI,其他参数诊断效能较低,不能用于男性生育能力的评估和判断患者预后,这与 COCUZZA 等^[10]研究一致,说明精子 DNA

完整性与精索静脉曲张不育关系密切。

精子 DNA 完整性与精液常规参数分析项目具有关联性,可以作为精索静脉曲张不育的临床筛查指标,而精子 DNA 完整性联合精液常规参数分析能够为精索静脉曲张不育提供更为准确的诊断,可以更好地为临床提供帮助,建议将联合检测作为常规检测。

参考文献

- [1] YING Y J, RONG R Q, YAN Y J, et al. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a Meta-analysis[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(3): 307-314.
- [2] HAMADA A, ESTEVES S C, AGARWAL A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2[J]. Nat Rev Urol, 2013, 10(1): 26-37.
- [3] 钟慧芝, 吕福通, 谢丹妮, 等. 精索静脉曲张程度对精子 DNA 完整性和 α -1, 4-葡糖苷酶含量的影响[J]. 内科, 2014, 9(2): 131-135.
- [4] 阳方, 李俊君, 董良, 等. 精子 DNA 完整性损伤的发生机制及诊断治疗[J]. 中国男科学杂志, 2016, 30(9): 70-72.
- [5] 刘利敏, 谢庆东, 凌晓辉, 等. 精浆 ROS、PON-1、MDA 联合精子 DNA 碎片指数在男性不育症患者中的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(12): 1435-1438.
- [6] 贺情情, 刘小彭, 范年丰, 等. 大鼠精索静脉曲张睾丸组织的蛋白质组学研究[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版), 2014, 8(2): 51-54.
- [7] 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.
- [8] 李非凡, 杨昊, 肖佳云, 等. 精子 DNA 碎片指数与精液参数相关性的初步研究[J]. 中国男科学杂志, 2018, 32(1): 33-36.
- [9] 梁雁, 黄君. 精索静脉曲张超声诊断及分度标准研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2019, 35(4): 610-613.
- [10] COCUZZA M, SIKKA S C, ATHAYDE K S, et al. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis[J]. Int Braz J Urol, 2007, 33(5): 603-621.

(收稿日期: 2020-04-03 修回日期: 2020-09-16)

(上接第 449 页)

- [13] 刘成军, 王嵩明, 商微, 等. 精子 DNA 损伤与不明原因复发性流产的关系[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(7): 619-621.
- [14] 郭辉, 金美珠, 金东芳, 等. 精子 DNA 碎片率与复发性流产及精液参数的相关研究[J]. 全科医学临床与教育, 2018, 16(2): 134-136.
- [15] ZHANG Y, TRUSSELL J C, CHOCHAN K R. Detecting and minimizing sperm DNA damage[J]. Semin Reprod Med, 2013, 31(4): 267-273.
- [16] 辜秀丽, 李红钢, 熊承良. 不育男性精子 DNA 碎片指数与

年龄和精液参数相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(7): 608-612.

- [17] ASHOK A, KARTIKEYA M, RAKESH S. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update[J]. J Reprod Immunol, 2008, 59(1): 2-11.
- [18] AYDOS O S. Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men[J]. Turk J Urol, 2015, 41(4): 191-197.

(收稿日期: 2020-06-16 修回日期: 2020-09-30)