

# 严重生精障碍患者精子 DNA 碎片指数 与血清 Hcy 水平的相关性研究\*

何海洪, 郭伟权, 兰 希, 柯娟玉, 陈 雷, 周义文

(深圳市南方医科大学深圳医院临床检验医学中心, 广东深圳 518110)

**摘要:**目的 探讨严重生精障碍患者精子 DNA 碎片指数与血清 Hcy 水平的相关性研究。方法 2015 年 12 月~2017 年 2 月期间就诊的严重生精障碍男性患者 56 例, 按 WHO 标准分为严重无、少精子症组 25 例和弱精子症组 31 例, 对照组为无生育障碍的男性 27 例。对所有纳入研究者运用全自动精液分析仪进行精子参数分析, 精子 DNA 碎片指数和血清 Hcy 水平的检测分别运用精子染色质扩散法和酶比色法。结果 对照组人群中精子 DNA 碎片指数和 Hcy 水平的中位数分别为 33% [95%CI(29.0%~34.4%)] 和 13.2  $\mu\text{mol/L}$  [95%CI(12.4  $\mu\text{mol/L}$ ~14.2  $\mu\text{mol/L}$ )], 而在严重生精障碍组中这两个指标分别为 21% [95%CI(19.0%~24.0%)] 和 8.9  $\mu\text{mol/L}$  [95%CI(8.4  $\mu\text{mol/L}$ ~9.4  $\mu\text{mol/L}$ )], 这两个项目的检测结果对照组均高于严重生精障碍组, 差异有统计学意义 ( $t=6.793\sim7.543$ ,  $P=0.000$ )。精子存活率正常对照组和严重生精障碍组分别为 71% [95%CI(67.8%~75.1%)] 和 57% [95%CI(52.3%~58.0%)], 差异有统计学意义 ( $t=-8.475$ ,  $P=0.000$ )。精子 DNA 碎片指数与血清 Hcy 水平、精子浓度呈正相关, Passing-Bablok 回归方程分别为:  $Y=10.705+0.053X$ ,  $Y=21.071+0.286X$ , 而 Hcy 水平和精子浓度呈负相关趋势。结论 Hcy 水平和精子 DNA 碎片指数的升高, 可能是严重生精障碍男性的重要病因, 但其具体机制有待进一步研究。

**关键词:**严重生精障碍患者; 精子 DNA 碎片指数; 同型半胱氨酸

中图分类号: R698; R446.112 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-083-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.023

## Study on the Relationship between Sperm DNA Fragmentation Index and Hcy Level in Patients with Severe Spermatogenesis

HE Hai-hong, GUO Wei-quan, LAN Xi, KE Juan-yu, CHEN Lei, ZHOU Yi-wen

(Department of Clinical Laboratory Medicine,

Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Guangdong Shenzhen 510120, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the relationship between the homocysteine, sperm DNA fragmentation index and sperm counts of male with severe impaired spermatogenesis. **Methods** From December 2015 to February 2017, 56 male patients with severe impaired spermatogenesis were enrolled in the study. The patients were divided into two groups according to the WHO criteria: severe oligozoospermia and azoospermia group ( $n=25$ ) and oligoasthenoteratozoospermia group ( $n=31$ ), and the control group was a male with no reproductive impairment ( $n=27$ ). The sperm parameters were analyzed by using the computer automatic semen analyzer, sperm DNA fragmentation index and serum Hcy level were detected by sperm chromatin diffusion method and enzyme colorimetric method. **Results** The median of Sperm DNA fragmentation index and homocysteine level in control groups were 33% [95%CI(29.0%~34.4%)] and 13.2  $\mu\text{mol/L}$  [95%CI(12.4  $\mu\text{mol/L}$ ~14.2  $\mu\text{mol/L}$ )], and in severe spermatogenesis groups in these two indicators were 21% [95%CI(19.0%~24.0%)] and 8.9  $\mu\text{mol/L}$  [95%CI(8.4  $\mu\text{mol/L}$ ~9.4  $\mu\text{mol/L}$ )], respectively. The results of these two items were higher than the control group, the difference was statistically significant ( $t=6.793\sim7.543$ ,  $P=0.000$ ). Sperm survival rate in normal control group and severe spermatogenesis group was 71% [95%CI(67.8%~75.1%)] and 57% [95%CI(52.3%~58.0%)], respectively, and the difference was statistically significant ( $t=-8.475$ ,  $P=0.000$ ). Sperm DNA fragmentation index was positively correlated with serum Hcy level and sperm concentration, Passing-Bablok regression analysis was:  $Y=10.705+0.053X$ ,  $Y=21.071+0.286X$ , and Hcy level was negatively correlated with sperm concentration. **Conclusion** The increase of Hcy level and sperm DNA fragmentation index may be an important cause of male with severe impaired spermatogenesis, but the specific mechanism remains to be further studied.

**Keywords:** patients with severe spermatogenic dysfunction; sperm DNA fragmentation index; homocysteine

在发达国家大约有 8%~10% 的夫妇患有不育症, 而发展中国家的数据更高, 有研究报道国内

\* 基金项目: 深圳市宝安区医疗卫生科研项目(2016CX300)。

作者简介: 何海洪(1983—), 男, 在职硕士, 主管技师, 主要从事临床血液学和遗传学, E-mail: hehaihong@163.com。

通讯作者: 周义文, 男, 教授, 博士, 主任技师, 硕士生导师, E-mail: yiwenzhou21@aliyun.com。

不育率达到 18%<sup>[1]</sup>,在这些不育夫妇中大约有 30%~55%是由于男方因素造成的<sup>[2]</sup>。在男性生殖领域,精子发生是一个复杂的过程,受感染、性激素失衡、吸烟、饮酒、染色体异常、Y 染色体微缺失、易位、囊性纤维化跨膜传导调节因子的基因突变和其他的遗传因素等多种因素的影响<sup>[3]</sup>。近年来,国外一些研究发现,严重生精障碍男性的同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)浓度明显高于正常男性,同时也证实精液中的 Hcy 水平升高可以损害精子的质量并引起出生缺陷<sup>[4,5]</sup>。而国内却鲜见 Hcy 和严重生精障碍男性的相关性研究。

有研究数据显示,精子 DNA 损伤和不明原因的不育男性密切相关<sup>[6]</sup>,精子 DNA 碎片指数能准确地反映精子 DNA 损伤,然而有学者的研究数据表明<sup>[7]</sup>,精子 DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)和精子常规各参数之间没有相关性,但是有部分学者的研究表明精子 DFI 和精液相关参数存在密切相关性<sup>[8]</sup>,因此精子 DFI 与精液密度、精子活力、存活率、畸形率等精液参数的相关性尚存在争议,尤其是精子 DFI 和血清 Hcy 的相关性研究,国内外均鲜见。因此,本次研究旨在研究严重生精障碍男性的精子 DFI 和血清 Hcy 水平,以及精子 DFI、Hcy 水平与精液浓度之间的关联性研究。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 2015 年 12 月~2017 年 2 月期间,按 WHO 男性不育推荐标准,收集南方医科大学深圳医院遗传生殖、泌尿外科门诊的精液标本,纳入研究者共 56 例,被分为两组:严重无、少精子症组(SOM 组)( $<5 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $n=25$ ,年龄  $30 \pm 7.1$  岁)和弱精子症组(OAT 组)[ $(5 \sim 20) \times 10^6/\text{ml}$ ,  $n=31$ ,年龄  $31 \pm 7.7$  岁]。正常对照组(NM 组)为无生育障碍的男性共 27 例,年龄  $29 \pm 6.1$  岁,已知的遗传因素包括严重生精障碍原因的个体(染色体异常、Y 染色体 AZF 微缺失等),不良的生活方式因素(酗酒、吸烟、职业等)以及临床因素(精索静脉曲张、隐睾等)均排除在本次研究外。纳入研究的对象均知情同意。

1.2 试剂和仪器 美国哈密尔顿-索尼 HAMILTON THORNE IVOS II 型电子计算机全自动精液分析仪(CSA)及原装进口的耗材,罗氏 Cobas 8000 全自动生化流水线, Hcy 检测用罗氏原装试剂盒,采用珠海 BASO Diff-Quik 法精子形态学快速染色试剂盒、深圳博锐德生物科技有限公司生产的精子 DNA 碎片指数检测试剂盒。

1.3 方法 BD 真空促凝采血管采集血液,待其自然凝固,  $3\,500\text{ r/min}$  离心  $10\text{ min}$ , 分离血清,罗

氏 Cobas 8000 自动生化流水线检测血清 Hcy 水平。按照试剂盒说明书, Hcy 参考区间为  $4.5 \sim 13.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ , 批内和批间不精密度变异系数不超过 4%。采集精液前,要求患者禁欲 2~7 天,运用美国哈密尔顿 HAMILTON THORNE IVOS II 型电子计算机全自动精液分析仪(CSA)检测精子浓度、精子总活力、精子存活率等项目,按 WHO 推荐的 Kruger 标准并采用 Diff-Quik 染色法检测精子畸形率,运用精子染色质扩散法(sperm chromatin dispersion, SCD)检测精子 DFI, 正常参考范围  $<25\%$ 。

1.4 统计学分析 各组间精子参数, Hcy 水平和精子 DFI 数据分析采用 Mann-Whitney 或 Kruskal Wallis 的非参数检验。数据的相关性分析采用 Passing-Bablok 线性回归分析,对不符合 Passing-Bablok 线性回归分析的采用散点线性趋势分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,所有数据分析均采用 Medcalc 统计分析(12.0 版本)。

## 2 结果

### 2.1 各组之间的精子参数、精子 DFI 和 Hcy 水平

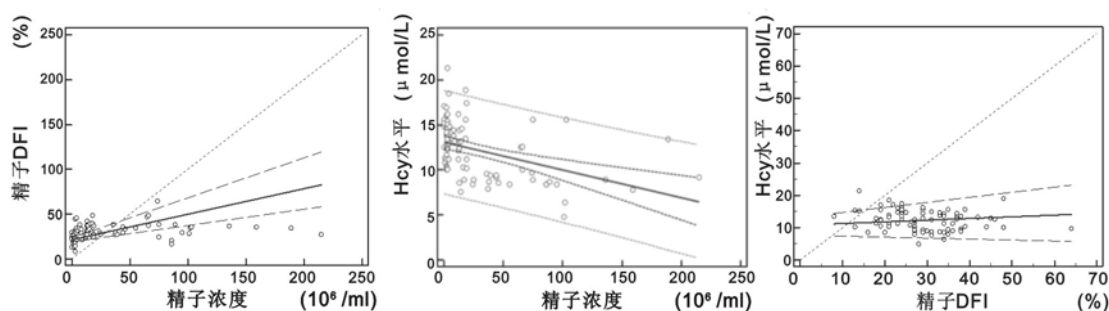
比较严重无、少精子症组(SOM 组)和弱精子症组(OAT 组)之间的精子存活率( $54.1\% \pm 10.3\%$  vs  $55.4\% \pm 8.0\%$ ,  $t=0.532$ ,  $P=0.597\,1$ ),精子 DFI( $33.4\% \pm 9.4\%$  vs  $32.1\% \pm 7.1\%$ ,  $t=-0.590$ ,  $P=0.557\,9$ )和 Hcy 水平( $13.7 \pm 2.8\text{ }\mu\text{mol/L}$  vs  $13.0 \pm 2.0\text{ }\mu\text{mol/L}$ ,  $t=-0.968$ ,  $P=0.335\,7$ ),差异均无统计学意义。由于精子存活率、DFI 和 Hcy 水平在 SOM 组和 OAT 之间没有差异,两组数据合并为严重生精障碍组患者(SOM&OTA 组),并与正常对照组进行中位数比较分析,对照组人群中精子 DFI 和 Hcy 水平的中位数分别为  $33\%$  [ $95\%\text{CI}(29.0\% \sim 34.4\%)$ ] 和  $13.2\text{ }\mu\text{mol/L}$  [ $95\%\text{CI}(12.4\text{ }\mu\text{mol/L} \sim 14.2\text{ }\mu\text{mol/L})$ ],而在严重生精障碍组中这两个指标分别为  $21\%$  [ $95\%\text{CI}(19.0\% \sim 24.0\%)$ ] 和  $8.9\text{ }\mu\text{mol/L}$  [ $95\%\text{CI}(8.4\text{ }\mu\text{mol/L} \sim 9.4\text{ }\mu\text{mol/L})$ ],这两个项目的检测结果对照组( $20.7\% \pm 5.4\%$ ,  $9.54 \pm 2.4\text{ }\mu\text{mol/L}$ )均高于严重生精障碍组,差异有统计学意义( $t=6.793 \sim 7.543$ ,  $P=0.000$ )。精子存活率严重生精障碍组和正常对照组分别为  $57\%$  [ $95\%\text{CI}(52.3\% \sim 58.0\%)$ ] 和  $71\%$  [ $95\%\text{CI}(67.8\% \sim 75.1\%)$ ],差异有统计学意义( $t=-8.475$ ,  $P=0.000$ )。

### 2.2 精子 DFI, Hcy 水平和精子浓度相关性分析

采用 Passing-Bablok 回归分析精子 DFI 与精子浓度之间,血清 Hcy 与精子 DFI 之间的相关性,回归方程分别为:  $Y=21.071+0.286X$ ,  $Y=10.705$

$+0.053X$ 。回归分析图显示,精子 DFI 与精子浓度、血清 Hcy 水平均呈正相关,而 Hcy 水平与精子浓度的数据分析不符合 Passing-Bablok 回归分析,

故采用散点线性趋势分析,发现 Hcy 水平越高,精子浓度则越低趋势性变化,见图 1。



A: 精子 DFI 与精子浓度之间回归分析图; B: Hcy 水平和精子浓度之间的散点趋势图; C: Hcy 水平和精子 DFI 之间的回归分析图。

图 1 精子 DNA 碎片指数、Hcy 水平和精子浓度比较分析

3 讨论 同型半胱氨酸是体内含硫氨基酸之一,是甲硫氨酸循环和半胱氨酸代谢的重要中间产物,其本身不参加蛋白质的合成,但是在叶酸代谢过程环节发生问题时,会引起 Hcy 堆积,从而导致高同型半胱氨酸血症,进而对机体产生一系列有害影响,尤其增加心血管疾病和神经管缺陷的风险<sup>[9]</sup>。有研究报道<sup>[10]</sup>,经过连续服用叶酸(5 mg/天)26 周,精子浓度平均升高了 74%,这表明,叶酸/同型半胱氨酸代谢在男性精子的发生中可能发挥重要作用。

叶酸参与精子 DNA 的合成与修复,而精子 DFI 是反映精子 DNA 受损的直接指标,研究表明,精子 DNA 损伤会对自然生育,辅助生殖技术治疗结局产生负影响,并与复发性流产有关,甚至有可能导致胎儿畸形率升高<sup>[11,12]</sup>。但是,在不明原因的严重生精障碍患者中,血清 Hcy 水平是否影响了精子 DFI,以及它们之间是否存在相关性,缺乏相关研究数据。本次研究表明,精子存活率、精子 DFI 和 Hcy 水平在严重无、少精子症组(SOM 组)和弱精子症组(OAT 组)之间比较,差异无统计学意义。严重生精障碍患者(SOM 组和 OAT 组)与正常对照组进行中位数比较分析,精子存活率和精子 DFI 两个项目的结果在对照人群中明显高于严重生精障碍人群,而 Hcy 水平则相反,说明精子 DFI、血清 Hcy 水平和精子浓度这三者之间存在一定关系。进而针对精子 DFI 和精子浓度之间进行 Passing-Bablok 回归分析(图 1A),发现精子 DFI 和精子浓度呈正相关,说明精子的 DNA 损伤越大,精子的浓度则越低,与孙超等<sup>[8]</sup>人的研究结果一致。血清 Hcy 水平和精子浓度之间的数据不适合进行 Passing-Bablok 回归分析,故采用散点线性趋势分析(图 1B),结果显示精子浓度越低, Hcy 水平越高,与戈一峰等<sup>[13]</sup>人的研究一致。为了进一步明确 Hcy 和精子 DFI 是否存在相

关性,继续对 Hcy 和精子 DFI 进行相关性研究(图 1C),数据显示随着 Hcy 的缓慢升高,精子 DFI 出现了较为明显的改变,说明精子 DFI 的改变对血清 Hcy 水平较为敏感。分析其中的原因,可能由于高 Hcy 使抗氧化酶的活性受到抑制,同时生成过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。正常男性精浆中有低浓度的 ROS,可引导精子的运动,获能,顶体反应及精卵结合<sup>[14]</sup>。而高浓度的 ROS 可能会影响到精子细胞,以及细胞内蛋白质甲基化反应,造成精子发生的减少<sup>[15]</sup>。氧化应激也是精子 DNA 损伤发生的机制之一,ROS 的产生超过了抗氧化物的清除能力,使精子 DNA 受到 ROS 的攻击,由于精子的 DNA 自我修复能力有限,导致精子 DNA 的严重损伤<sup>[16]</sup>。但是要明确精子 DNA 损伤和精子发生的减少,是否和 Hcy 升高导致的 ROS 升高的机制密切相关,还需要更加多的研究数据以及更加确凿的证据。

本次研究显示,严重生精障碍男性的精子 DFI 和 Hcy 水平均和正常对照组存在差异,以及精子 DFI 和 Hcy 水平存在正相关,因此,精子 DFI 和 Hcy 水平升高可能是不明原因严重生精障碍男性患者的重要病因,这两个项目可作为严重生精障碍男性患者的重点监测指标,但是 Hcy 水平升高导致精子 DFI 改变的机理还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Meng Q, Ren A, Zhang L, et al. Incidence of infertility and risk factors of impaired fecundity among newly married couples in a Chinese population[J]. Reprod Biomed Online, 2015, 30(1): 92-100.
- [2] Wu H, Sun L, Wen Y, et al. Major spliceosome defects cause male infertility and are associated with nonobstructive azoospermia in humans[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(15): 4134-4139.
- [3] Diao R, Fok KL, Chen H, et al. Deficient human beta-defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(249): 249.

- [4] Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, et al. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple[J]. *Human Reproduction*, 2006, 21(7): 1725-1733.
- [5] Molloy AM, Brody LC, Mills JL, et al. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects[J]. *Birth Defects Research Part A Clinical & Molecular Teratology*, 2009, 85(4): 285-294.
- [6] 邱毅, 王苏梅, 张丽红, 等. 精子染色质扩散实验检测精索静脉曲张及不明原因不育患者精子DNA碎片[J]. *生殖医学杂志*, 2008, 17(6): 465-468.  
Qiu Y, Wang SM, Zhang LH, et al. Determination of sperm DNA fragmentation in unexplained infertile males and in infertile males with varicocele by sperm chromatin dispersion test[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2008, 17(6): 465-468.
- [7] 杨译, 姜辉, 张海娇, 等. 男性不育患者年龄与精子DNA碎片和精液常规参数的相关性分析[J]. *中国性科学*, 2012, 21(2): 17-19.  
Yang Y, Jiang H, Zhang HQ, et al. Correlation of age, sperm DNA fragmentation with semen parameters in infertile males[J]. *Chinese Journal of Human Sexuality*, 2012, 21(2): 17-19.
- [8] 孙超, 徐志鹏, 石亮, 等. 不育症患者精子DNA碎片化指数与精子常规参数关系的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(4): 565-567, 570.  
Sun C, Xu ZP, Shi L, et al. Research on the relationship between sperm DNA fragmentation and semen parameters of infertile men[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Sciences)*, 2011, 31(4): 565-567, 570.
- [9] 赵铭佳, 周善杰, 袁冬, 等. 正常成年男性精浆同型半胱氨酸浓度及其与精液参数关联性研究[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(2): 116-120.  
Zhao MJ, Zhou SJ, Yuan D, et al. Seminal plasma homocysteine levels and the correlation with semen parameters in normal young men[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2014, 23(2): 116-120.
- [10] Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, et al. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial[J]. *Fertility & Sterility*, 2002, 77(3): 491-498.
- [11] 邱毅, 张丽红, 王磊光, 等. 精子染色质扩散实验检测男性不育患者精子DNA碎片[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2008, 27(6): 387-389, 后插1.  
Qiu Y, Zhang LH, Wang LG, et al. Determination of sperm DNA fragmentation in infertile males by sperm chromatin dispersion test[J]. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*, 2008, 27(6): 387-389, 后插1.
- [12] Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SeeH, et al. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates[J]. *Fertility & Sterility*, 2008, 90(2): 352-359.
- [13] 戈一峰, 汪春晖, 欧阳罗璇, 等. 少和/或弱精子症患者血浆同型半胱氨酸的测定及意义[J]. *中华男科学杂志*, 2008, 14(12): 1112-1114.  
Ge YF, Wang CH, Ouyang LX, et al. Determination of plasma homocysteine in oligospermia and/or asthenospermia patients[J]. *National Journal of Andrology*, 2008, 14(12): 1112-1114.
- [14] 张德庆, 张萌, 李忠培, 等. 解脲支原体感染对男性不育者精浆活性氧与细胞因子的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(1): 44-46.  
Zhang DQ, Zhang M, Li ZP, et al. Influence of seminal plasma reactive oxygen species and cell factors in infertile men with ureaplasma urealyticum infection[J]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(1): 44-46.
- [15] Amiri I, Rabiee S, Goodarzi MT, et al. Assessment of correlation between homocysteine concentration in follicular fluid and oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome patients under-going assisted reproductive technology[J]. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*, 2013, 19(4): 11-19.
- [16] 杨译, 姜辉. 精子DNA损伤与男性不育的关系[J]. *中国男科学杂志*, 2011, 25(12): 67-69.  
Yang Y, Jiang H. The relationship between sperm DNA damage and male infertility[J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2011, 25(12): 67-69.

收稿日期: 2017-03-30 修回日期: 2017-05-17

(上接 82 页)

- Cheng JJ, Li J, Liang XQ, et al. Correlation between non high density lipoprotein cholesterol and cardiac function in patients with coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(3): 43-47.
- [7] 赵佳, 左林, 姚创利, 等. 冠心病患者血清同型半胱氨酸水平与氧化应激的关系研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(5): 27-29.  
Zhao J, Zuo L, Yao CL, et al. Study on the relationship between serum homocysteine levels and oxidative stress in patients with coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(5): 27-29.
- [8] Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(23): 2844-2853.
- [9] Khera AV, Cuchel M, de la Lere-Moya M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(2): 127-135.

收稿日期: 2017-05-05 修回日期: 2017-06-04