

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^{*}

张德庆¹, 张 萌¹, 李忠培¹, 于爱莲²

(1. 泰安市中心医院检验科, 山东泰安 271000; 2. 泰山医学院, 山东泰安 271000)

摘要:目的 研究解脲支原体(Uu)感染对男性不育者精浆活性氧(ROS)、细胞因子及精子质量的影响,探讨其在男性不育中的作用机制。方法 选择83例Uu感染男性不育者为实验组(Uu⁺不育组),30例无Uu感染男性不育者(Uu⁻不育组)和30例正常男性已育者为对照组(正常生育组),分别测定精浆丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、IL-6、IL-10、IL-18和TNF- α 水平并分析其相关性。结果 Uu⁺不育组MDA含量为19.56 \pm 5.22 nmol/ml,IL-6含量为58.31 \pm 8.94 pg/ml,IL-18含量为38.16 \pm 17.02 pg/ml和TNF- α 含量为42.68 \pm 11.18 pg/ml,均明显高于Uu⁻不育组和正常生育组($t=4.35\sim 20.43$, P 值均 <0.001),而IL-10含量为8.62 \pm 2.98 pg/ml和SOD活性为95.36 \pm 20.03 μ mol/L,均明显低于Uu⁻不育组和正常生育组($t=3.67\sim 23.74$, P 值均 <0.001)。相关分析发现,Uu⁺不育组MDA与TNF- α 、IL-18呈正相关($r=0.61,0.55$, $P<0.001$),而与SOD活力和IL-10呈负相关($r=-0.55,-0.53$, $P<0.001$)。结论 Uu感染导致精浆活性氧增加、细胞因子异常表达并影响精子质量,检测男性不育者精浆活性氧和细胞因子对男性不育的治疗具有重要意义。

关键词:解脲支原体;男性不育;精浆;活性氧;细胞因子

中图分类号:R375;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)01-044-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.012

Influence of Seminal Plasma Reactive Oxygen Species and Cell Factors in Infertile Men with Ureaplasma Urealyticum Infection

ZHANG De-qing¹, ZHANG Meng¹, LI Zhong-pei¹, YU Ai-lian²

(1. Department of Clinical Laboratory, Taian City Central Hospital,

Shandong Taian 271000, China; 2. Taishan Medical School, Shandong Taian 271000, China)

Abstract: Objective To study the influence of seminal plasma reactive oxygen species(ROS), cell factors and sperm quality in infertile male with Uu infection and explore its action mechanism in male infertility. **Methods** Chose 83 cases of male infertility with Uu infection as the experimental group (Uu⁺ infertility group), 30 cases of male infertility without Uu infection (Uu⁻ infertility group) and 30 normal men with children as a control (Normal fertility group). Respectively, determine the levels of seminal plasma malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), IL-6, IL-10, IL-18 and TNF- α , and analyzed its correlation. **Results** In Uu⁺ infertility group, the levels of MDA (19.56 \pm 5.22 nmol/ml), IL-6 (58.31 \pm 8.94 pg/ml), IL-18 (38.16 \pm 17.02 pg/ml) and TNF- α (42.68 \pm 11.18 pg/ml) were obviously higher than those in the other two groups ($t=4.35\sim 20.43$, P value <0.001), and the level of IL-10 (8.62 \pm 2.98 pg/ml) and SOD (95.36 \pm 20.03 μ mol/L) was lower than those in the other two groups ($t=3.67\sim 23.74$, P value <0.001). Correlation analysis found that MDA of Uu⁺ infertility group was positively correlated with TNF- α , IL-18 ($r=0.61,0.55$, P value <0.001), and negatively correlated with SOD and IL-10 ($r=-0.55,-0.53$, P value <0.001). **Conclusion** The results suggested that Uu infection caused the level of reactive oxidative increasing, cytokines counterbalance disorder and affected sperm quality. So it is of great significance for the treatment to test the levels of ROS and cytokines in patients with male sterility.

Keywords: ureaplasma urealyticum; male infertility; seminal plasma; reactive oxygen species; cell factors

男性不育症是危害人类生殖健康的疾病之一。生殖系病原微生物的感染已成为男性不育的重要原因,近年来,解脲支原体(ureaplasma urealyticum, Uu)引起的男性生殖道感染有上升的趋势。Uu引起的各种慢性炎症可造成弱精症、死精症等。精浆细胞因子在精子的发生、发育、成熟、获能

和受精能力等方面均有很重要的作用^[1]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是机体氧代谢过程中所产生的一类高活性化学基团。正常男性精浆中有低浓度的ROS,可引导精子的运动、获能、顶体反应及精卵融合^[2],高浓度ROS对精子质量和功能产生潜在的损害^[3]。本研究通过检测Uu感

* 基金项目:山东省计生委资助项目(No. ER08)。

作者简介:张德庆(1973-),男,博士,副主任技师,从事临床检验, Tel:13375388261 E-mail:tszhdq@163.com。

通讯作者:于爱莲,女,硕士生导师,教授, E-mail:alyu@tsmc.edu.cn。

染男性不育者(Uu⁺不育者)、无 Uu 感染男性不育者(Uu⁻不育者)及正常男性已育者(正常生育者)精浆丙二醛(MDA), SOD 和细胞因子水平, 分析与精液检测指标的关系, 以期为临床有效诊疗及研究男性不育症提供理论和实验支持。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集本院男科门诊 2013 年 3 月~2014 年 6 月收治病例, 不育时间为 2~8 年, 年龄 24~38 岁, 共选择 Uu⁺不育者 83 例, Uu⁻不育者和正常生育者各 30 例。

1.2 试剂与仪器 支原体鉴定药敏试剂盒购于珠海市银科医学工程有限公司; MDA 和 SOD 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; IL-6, IL-10, IL-18 和 TNF- α ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司产品)。酶标仪为 TECANSPECTRA 型, 洗板机为 MODEL1575 型(BIO-RAD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 男性不育的诊断标准: ①结婚两年以上, 性生活正常, 未采取任何避孕措施, 无躯体性疾病或性功能异常; 女方经检查无明显不育因素。②精液异常: 根据 WHO 推荐的精液项目与标准, 常规检验有下列情况之一者作为本研究对象。a. 无精; b. 少精症, 精子密度 $<20 \times 10^6$ ml; c. 精子活率 $<60\%$; d. 精子活力: a 级 $<25\%$, a 级+b 级 $<50\%$; e. 畸形率 $>20\%$; f. 精液量 <2 ml; g. 精液 30 min

液化不完全; h. pH 值 <7.2 或 >7.9 ; i. 白细胞数 >5 个/HP。

1.3.2 实验分组: 实验分为三组: Uu⁺不育组(A 组)为性生活正常, 无其他明显疾病, 精液培养 Uu⁺的男性不育者 83 例; Uu⁻不育组(B 组)病例为精液培养 Uu⁻男性不育者 30 例; 正常生育组(C 组)为正常男性已生育者 30 例, 结婚两年以上, 性生活正常, 妻子妊娠三个月以上或有正常生育史, 年龄 24~36 岁。

1.3.3 精液采集: 采集前禁欲 3~7 天。清洗外生殖器并用 75 ml/dl 乙醇洗浴, 手淫法采集全部精液于干燥、清洁的无菌瓶内, 30 min 内接种 Uu 培养基, 进行精液常规检验, 剩余精液(2 500 r/min, 10 min)离心后, 上清液-80℃冻存备用。

1.3.4 精液分析: 精液常规指标按全国临床检验操作规程第三版进行检测, 精浆 MDA, SOD 和细胞因子水平按试剂说明书进行操作。

1.4 统计学分析 计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行相关分析、t 检验、单因素方差分析及两两比较应用 SPSS18.0, PEMS 3.1 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA 含量和 SOD 活力结果 Uu⁺不育组、Uu⁻不育组与正常生育组的 MDA 含量和 SOD 活力结果见表 1。

表 1 MDA 含量和 SOD 活力检测结果

项 目	A	B	C	F	t			P
					A vs B	A vs C	B vs C	
MDA(nmol/ml)	19.56 \pm 5.22	10.50 \pm 2.33	7.62 \pm 1.52	85.449	9.16	12.42	5.57	<0.001
SOD(μ mol/L)	95.36 \pm 20.03	126.71 \pm 25.63	195.66 \pm 19.26	204.611	6.80	23.74	11.77	<0.001

表 1 可见, 经方差分析, MDA 含量和 SOD 活力在 A, B, C 三组之间有统计学意义($P < 0.001$); 经过两两比较, Uu⁺不育组、Uu⁻不育组与正常生育组之间差异具有统计学显著性意义($P <$

0.001)。2.2 精浆 IL-6, IL-10, IL-18 和 TNF- α 细胞因子检测结果 Uu⁺不育组、Uu⁻不育组及正常生育组的 IL-6, IL-10, IL-18 和 TNF- α 结果见表 2。

表 2 精浆中各项细胞因子的检测结果

项 目	A	B	C	F	t			P
					A vs B	A vs C	B vs C	
IL-6(pg/ml)	58.31 \pm 8.94	37.38 \pm 7.02	22.94 \pm 5.17	160.283	11.59	20.43	9.07	<0.001
IL-10(pg/ml)	8.62 \pm 2.98	13.22 \pm 3.28	16.76 \pm 4.14	59.875	7.05	11.50	3.67	<0.001
IL-18(pg/ml)	38.16 \pm 17.02	24.11 \pm 7.77	12.47 \pm 5.35	28.262	4.35	8.1	6.76	<0.001
TNF- α (pg/ml)	42.68 \pm 11.18	27.16 \pm 6.09	14.09 \pm 5.8	83.516	7.21	13.35	8.51	<0.001

表 2 可见, 经方差分析, IL-6, IL-10, IL-18 和 TNF- α 水平在 A, B, C 三组之间差异有统计学意

义($P < 0.001$); 经过两两比较, Uu⁺不育组、Uu⁻不育组与正常生育组之间差异具有统计学显著性

意义($P < 0.001$)。

2.3 Uu^+ 不育组 MDA 与 SOD, 细胞因子相关性分析

2.3.1 Uu^+ 不育组 MDA 含量与 SOD 活力经相关分析, Uu^+ 不育组 MDA 含量与 SOD 活力呈负相关($r = -0.55, P < 0.001$)。

2.3.2 Uu^+ 不育组 MDA 与 TNF- α , IL-18, IL-10

经相关分析, Uu^+ 不育组 MAD 含量与 TNF- α 水平($r = 0.61, P < 0.001$)和 IL-18 水平($r = 0.55, P < 0.001$)呈正相关, 而与 IL-10 水平呈负相关($r = -0.53, P < 0.001$)。

2.4 Uu^+ 不育组、 Uu^- 不育组与正常生育组精液质量结果 见表3。

表3 精液质量检测结果

项目	A	B	C	<i>t</i>	<i>P</i>
精液量(ml)	2.67±1.15	2.71±1.15	2.59±1.19	-	>0.05
活动力(级)	42.01±14.00	41.67±12.60	45.47±13.36	-	>0.05
活动率(%)	52.40±15.47	56.02±15.47	64.75±18.24	A vs C=3.57	<0.001
密度(10^6 /ml)	53.5±56.88	62.3±57.23	100.25±61.02	A vs C=3.78	<0.001
畸形率(%)	31.01±6.98	25.04±6.68	12.25±4.12	A vs B=4.06, A vs C=13.9	<0.001

表3可见, 经 *t* 检验, Uu^+ 不育组与 Uu^- 不育组比较畸形率差异有统计学意义($P < 0.001$); Uu^+ 不育组与正常生育组比较, 精子活动率、精子密度、畸形率差异均有统计学意义($P < 0.001$); Uu^+ 不育组、 Uu^- 不育组与正常生育组精液量、活动力比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论 近年来, 伴有 Uu 感染的男性不育者越来越多, Uu 感染与不育的研究也越来越受到重视。许多研究表明, Uu 感染所致的泌尿生殖道炎症可影响精子的发生、发育、获能等过程, 进而导致不孕不育^[4]。

Aitken 等^[5]人研究发现活性氧与男性不育具有一定相关性, 生理状态下的 ROS 是必须存在的, 它在细胞生长调节、信号传递以及抗微生物防御和免疫监视等方面具有重要作用。ROS 产生过多会损害细胞的功能或破坏细胞的内环境。过多 ROS 能导致不饱和脂肪酸氧化, 破坏精子细胞脂质双分子结构, 使精子活力下降、畸形率增加, 影响精子的顶体反应及受精功能。本研究检测三组精浆 MDA 含量和 SOD 活力发现, Uu^+ 不育组 SOD 活力较对照组显著降低($P < 0.001$), 而 MDA 含量较对照组显著升高($P < 0.001$)。高亚萍等^[6]的检测结果显示男性不育组的 MDA 含量与 SOD 活力与精液常规正常组比较差异有统计学显著性意义, 结果与本研究相一致。另外相关分析发现, Uu^+ 不育组 MDA 含量与 SOD 活力呈负相关, 提示精液清除 ROS 的抗氧化能力明显下降, 而 ROS 增加造成脂质过氧化损伤增强, 对精子活力有显著影响, 这种氧自由基和抗氧化剂平衡的打破可能是造成支原体感染后精子质量下降, 活力减低的重要原因。

正常条件下, 生殖系统内免疫细胞、间质细胞、支持细胞及精原细胞等分泌 IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 和 TNF- α 等细胞因子作为细胞内信号, 在细胞因子网络中处于正性调节; 但在生殖道炎性反应时, 由于高水平 Th1 类因子的抑制而表达水平降低, 导致免疫反应的发生^[7]。本研究中精浆 IL-6, IL-10, IL-18 和 TNF- α 的检测结果显示, 在 Uu^+ 不育组 IL-6, IL-18 和 TNF- α 的含量明显高于对照组, 而 IL-10 明显降低。相关分析表明, MDA 含量与 TNF- α 和 IL-18 水平呈正相关, 而与 IL-10 水平呈负相关, 这提示 Uu 感染影响了细胞因子表达水平。

另外, Uu 感染与精子密度、活力下降以及精子形态异常密切相关^[8]。生殖系统和精液中影响精子活力的 ROS, 主要是由精子、生精细胞及白细胞产生。其中, 精子及白细胞是 ROS 的主要来源。形态异常精子和未成熟精子是非白细胞精子症中 ROS 的主要来源。未成熟精子产生的过量 ROS 可能是导致男性不育的重要原因^[9]。 Uu 感染后, 精子活力下降以及精子形态异常的机制可能是精液中中性粒细胞增多, 释放大量的 ROS 使精子尾部细胞膜过氧化损伤并改变膜流动性。当线粒体鞘和线粒体酶受损时, 精子运动能力减弱, 甚至导致尾部畸形。畸形的精子又能产生高水平 ROS, 加重对精子质量的影响。本研究结果显示 Uu^+ 不育组的精子畸形率比 Uu^- 不育组高而精子密度减低, 与相关报道一致^[10]。

总之, Uu 感染导致精浆中 ROS 和细胞因子水平升高, 引起精子膜脂质过氧化损伤和形态异常; 而畸形的精子产生了更多 ROS, 又加重了对精子质量的影响, 从而引起不育。 (下转 51 页)

- Song XX, Ji LN. Global consensus on the definition of the International Diabetes Federation metabolic syndrome[J]. *China Journal Diabetes*, 2005, 13(3): 178-180.
- [10] 朱宏, 陈斌, 王鸿祥, 等. 体重指数与不育男性生育力指标的相关性分析[J]. *中国男科学杂志*, 2014, 28(2): 36-39.
- Zhu H, Chen B, Wang HX, et al. Association of body mass index with semen parameters and hormonal profile among infertile males fertility index correlation analysis [J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2014, 28(2): 36-39.
- [11] Hajshafiha M, Ghareaghaji R, Salemi S, et al. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples[J]. *International Journal of General Medicine*, 2013(6): 447-451.
- [12] Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, et al. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study[J]. *Human Reproduction*, 2014, 29(2): 193-200.
- [13] Martini AC, Tissera A, Estofan D, et al. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients[J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 94(5): 1739-1743.
- [14] 邵永, 曾嵘, 姚琦, 等. 腹型肥胖男性腰臀比与生殖内分泌激素的相关性分析[J]. *中华男科学杂志*, 2013, 19(7): 634-636.
- Shao Y, Zeng R, Yao Q, et al. Waist-hip ratio correlation with the levels of reproductive endocrine hormones in abdominal obese males[J]. *National Journal of Andrology*, 2013, 19(7): 634-636.
- [15] 焦瑞宝, 唐吉斌. 氧化应激与男性不育[J]. *现代检验医学杂志*, 2011, 26(4): 13-15.
- Jiao RB, Tang JB. Oxidative stress and male infertility [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2011, 26(4): 13-15.
- [16] Dupont C, Faure C, Sermondade N, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2013, 15(5): 622-625.
- [17] 蒋彦, 于湄, 李清雪, 等. 精液液化时间与精液主要参数关系的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(4): 655-656.
- Jiang Y, Yu M, Li QX, et al. Study on the relationship between semen liquefaction time and the main parameters of semen [J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2013, 28(4): 655-656.

收稿日期: 2015-04-03

修回日期: 2015-11-04

(上接 46 页)因此,对男性不育者进行精浆 ROS 和细胞因子检测,对 ROS 引起的少精子症、弱精子症等男性不育的诊断治疗具有重要意义。

参考文献:

- [1] Pilatz A, Hudemann C, Wagenlehner F, et al. Seminal cytokines: is quantification useful in urogenital disorders [J]. *Urologe A*, 2013, 52(3): 359-366.
- [2] Gabriella D, Cristina F, Alessandra A, et al. Evaluation of correct endogenous reactive oxygen species content for human sperm capacitation and involvement of the NADPH oxidase system [J]. *Human Reproduction*, 2011, 26(12): 3264-3273.
- [3] Chen SJ, Allam JP, Duan YG, et al. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches [J]. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2013, 288(1): 191-199.
- [4] Lee JS, Kim KT, Lee HS, et al. Concordance of ureaplasma urealyticum and mycoplasma hominis in infertile couples; impact on semen parameters [J]. *Urology*, 2013, 81(6): 1219-1224.
- [5] Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA, et al. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health [J]. *J Androl*, 2012, 33(6): 1096-1106.
- [6] 高亚萍, 李荣秀, 高羽, 等. 男性不育患者精浆和血清中锌铅镉丙二醛含量及超氧化物歧化酶活力的研究 [J]. *生殖医学杂志*, 2012, 21(1): 43-46.
- Gao YP, Li RX, Gao Y, et al. Zinc, lead, cadmium, malondialdehyde contents and superoxide dismutase activity in serum and seminal plasma in male infertile patients [J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2012, 21(1): 43-46.
- [7] Seshadri S, Bates M, Vince G, et al. Cytokine expression in the seminal plasma and its effects on fertilisation rates in an IVF cycle [J]. *Andrologia*, 2011, 43(6): 378-386.
- [8] 张炜, 蒋昱枫, 浦金贤, 等. 解脲支原体感染与精子动态、形态学分析 [J]. *中国血液流变学杂志*, 2012, 22(2): 321-322, 332.
- Zhang W, Jiang YF, Pu JX, et al. The relationship between the infection of UU and the semen analysis and sperm morphological analysis [J]. *Chin J Hemorrh*, 2012, 22(2): 321-322, 332.
- [9] 石明华, 李慕军. 活性氧与男性不育相关性的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2013, 6(5): 487-491.
- Shi MH, Li MJ. Research progress on reactive oxygen species and male infertility [J]. *Chinese Journal of New Clinical Medicine*, 2013, 6(5): 487-491.
- [10] 李骥, 周运恒, 刘凤华, 等. 男性不育患者解脲支原体感染对精液质量影响的研究 [J]. *人民军医*, 2013, 56(7): 791-792.
- Li J, Zhou YH, Liu FH, et al. Research on the effects of sperm quality of male infertility patients with urea mycoplasma infection [J]. *People's Military Surgeon*, 2013, 56(7): 791-792.

收稿日期: 2015-01-09

修回日期: 2015-07-26