

流式细胞术检测精子 HSPA2 方法初步建立及对体外受精低受精率的预测价值研究

梁晓东, 冯敏怡, 莫淦文, 纪鹏, 骆强翔, 郭江华 (江门市中心医院生殖医学中心, 广东江门 529030)

摘要: **目的** 建立精子热休克蛋白 A2(HSPA2)流式细胞检测法,并探索精子HSPA2的表达水平在预测体外受精(IVF)低受精率的作用。**方法** 采用间接免疫荧光法(IIF)原理对精子HSPA2进行荧光染色,精子样本经透膜和封闭后,依次加入兔抗人HSPA2抗体(一抗)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔IgG抗体(二抗)作为检测管,同时设立不加一抗的样本作为对照管,并用流式细胞仪(FCM)分别测定两管的阳性率,计算检测管的阳性率与对照管的比值(阳性率比值)。使用棋盘法对最适合检测的精子数、一抗及二抗最适工作稀释度进行探索。在最优条件下,分别评估方法的重复性、线性范围和参考值范围,从而初步建立流式细胞术检测精子HSPA2表达水平的方法。方法建立后,进一步对2023年在江门市中心医院生殖医学中心的IVF患者夫妇的精子样本共85例进行初步检测,比较IVF受精成功组($n=63$)与低受精率组($n=22$)患者的HSPA2阳性率比值,用受试者工作特征(ROC)曲线分析阈值。**结果** 对照管中的HSPA2阳性率较低,显示出较低的背景信号,而检测管荧光信号明显增强,提示此法能有效检测HSPA2。棋盘法确定的最适合检测的精子数为 2×10^6 ,一抗及二抗最适工作稀释度分别为1:300和1:400。重复性及线性范围评估显示方法学性能较好。对IVF受精成功组和低受精率组的对比分析显示,低受精率组的精子HSPA2阳性率比值(6.19 ± 4.07)低于受精成功组(10.69 ± 8.26),差异具有统计学意义($t=2.446, P<0.05$)。ROC曲线和Youden指数显示,阳性率比值的界值为5.5067时达到最佳预测效能,此时的敏感度和特异度分别为71.4%,55.5%。**结论** 成功建立了精子HSPA2的流式细胞术检测法,通过此法检测的精子HSPA2表达水平提示其对IVF低受精率有预测价值,为今后临床科学选择受精方式提供了依据。

关键词: 热休克蛋白A2;流式细胞术;体外受精;低受精率;精子

中图分类号: R446.19; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2025)05-149-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.05.028

Preliminary Establishment of a Flow Cytometry Method for Detecting Sperm HSPA2 and Its Predictive Value for Low Fertilization Rate in IVF

LIANG Xiaodong, FENG Minyi, MO Ganwen, JI Peng, LUO Qiangxiang, GUO Jianghua (Department of Reproductive Medicine Center, Jiangmen Central Hospital, Guangdong Jiangmen 529030, China)

Abstract: Objective To establish a flow cytometric assay for detecting heat shock protein A2 (HSPA2) in sperm and explore the role of HSPA2 expression levels in predicting low fertilization rates in in vitro fertilization (IVF). **Methods** The principle of indirect immunofluorescence(IIF) was used to fluorescently stain sperm HSPA2. After the sperm sample was permeabilized and sealed, rabbit anti-human HSPA2 antibody (primary antibody) and fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled goat anti-rabbit IgG antibody (secondary antibody) were sequentially added as detection tubes. At the same time, a sample without primary antibody was set up as a control tube, and the positive rates of the two tubes were measured by flow cytometer. The ratio of the positive rate of the detection tube to the control tube (positive rate ratio) was calculated. The optimal number of sperm for detection and the optimal working dilutions of primary and secondary antibodies were explored using the chessboard method. Under the optimal conditions, the repeatability, linear range and reference range of the method were evaluated separately, in order to establish a preliminary method for detecting sperm HSPA2 expression levels using flow cytometry. After the establishment of the method, preliminary testing was conducted on a total of 85 sperm samples from couples who underwent IVF at the Reproductive Medicine Center of Jiangmen Central Hospital in 2023. The ratio of HSPA2 positivity rates between the group with IVF successful ($n=63$) and the group with low fertilization rate ($n=22$) was compared, and the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the threshold. **Results** The positive rate of HSPA2 in the control tube was relatively low, showing a low background signal, while the fluorescence signal of the detection tube was significantly enhanced, indicating that this method can effectively detect HSPA2. The optimal number of sperm samples for detection determined by the chessboard method was 2×10^6 , and the optimal working dilutions for primary and secondary antibodies were 1:300 and 1:400, respectively. Evaluation

基金项目: 江门市科学技术局医疗卫生领域科技计划项目(编号:2022YL01025)。

作者简介: 梁晓东(1983-),男,硕士研究生,副主任技师,研究方向:体外受精失败相关的精子因素, E-mail: 229290147@qq.com。

of repeatability and linear range showed good methodological performance. Comparative analysis between the group with IVF successful and the group with low fertilization rate showed that the ratio of sperm HSPA2 positivity rate in the group with low fertilization rate (6.19 ± 4.07) was lower than successful fertilization group (10.69 ± 8.26), the difference was statistically significant ($t=2.446, P<0.05$). The ROC curve and Youden index showed that the best predictive power was achieved when the cutoff value for the ratio of positivity rate was 5.5067, with a sensitivity and a specificity of 71.4%, 55.5%, respectively. **Conclusion** A flow cytometric method for detecting HSPA2 in sperm is successfully established. The expression level of sperm HSPA2 detected by this method suggests its predictive value for low fertilization rate in IVF, providing a basis for future clinical scientific selection of fertilization methods.

Keywords: heat shock protein A2; flow cytometry; in vitro fertilization; low fertilization rate; sperm

热休克蛋白A2(heat shock protein A2, HSPA2)是一种分子量为70KD的分子伴侣,其主要功能是正确折叠新生蛋白质分子,维持蛋白质空间结构的稳定性,从而使蛋白质的功能得以发挥^[1]。在精子中,它能介导精子与卵子透明带结合,完成识别过程^[2-3]。HSPA2的表达不足或功能缺失可能导致精子无法正常完成获能过程,从而影响其穿透卵母细胞透明带的能力。临床研究表明,HSPA2可能是体外受精(in vitro fertilization, IVF)失败的预测因子之一^[4],因此开展精子HSPA2的检测有重要意义。目前,对于精子HSPA2的表达水平的检测,通常使用免疫印迹法(western blotting)、酶联免疫吸附试验(ELISA)及免疫荧光技术进行^[5-6]。这些方法虽然能够检测HSPA2的表达水平,但存在一些不足之处,如操作复杂、耗时长和无法进行高通量检测等。相比之下,流式细胞术具有高效、快速和准确的特点,因而在精子HSPA2的检测中具有显著的优势。结合流式细胞术的优点,本研究将建立一种基于流式细胞术的HSPA2检测方法,

并借助这一技术,探讨HSPA2表达水平与IVF受精结局之间的关联性,提供一种对IVF低受精率预测的新工具。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2023年在江门市中心医院生殖医学中心进行IVF治疗的患者夫妇共85例为研究对象,在IVF周期内,受精的卵子比例高于20%视为常规IVF受精成功,归入受精成功组($n=63$);受精卵子比例低于20%需要补救性卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)完成受精的患者或者因过往IVF受精率低而本周期直接采用ICSI技术完成受精的患者归入IVF低受精率组($n=22$)。纳入标准:①女方年龄 ≤ 36 岁;②使用黄体期促性腺激素释放激素降调方案促排卵,取卵后卵母细胞经形态观察为成熟状态。排除标准:①卵母细胞冻融周期;②经皮睾丸穿刺取精周期。本研究按照医学伦理要求进行,并经医院伦理委员会批准(江心医伦理审查[2022]144号),患者均知情同意。患者的基本情况见表1。

表1 IVF受精成功组与低受精率组患者的基线特征

类别	受精成功组 ($n=63$)	低受精率组 ($n=22$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
女方年龄(岁)	33.85 ± 4.37	34.05 ± 3.61	-0.193	0.848
基础FSH水平(U/L)	4.84 ± 3.59	5.17 ± 2.21	-0.404	0.687
获卵数(枚)	12.98 ± 7.51	12.41 ± 6.98	0.312	0.756
成熟卵母细胞数(枚)	11.97 ± 7.06	10.13 ± 5.79	1.099	0.275
男方年龄(岁)	35.06 ± 4.96	38.31 ± 5.15	-2.620	0.010

1.2 仪器与试剂 兔抗人HSPA2多克隆抗体(HPA000798)(美国Merck公司),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)偶联的山羊抗兔IgG抗体(SF134)、吐温-20及牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(组分V)(北京索莱宝科技有限公司),流式细胞仪(北京安捷伦公司),精子质量分析仪(西班牙Microptic公司)。

1.3 方法

1.3.1 精子HSPA2流式细胞术检测方法的建立: 采用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)对精子HSPA2进行荧光染色。具体操作过程:精液样本液化后,根据世界卫生组织精液分析操作规程进行精子浓度测定。在离心管内加入适当量的精液,使加入精子总数为 2×10^6 。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)离心洗涤3次,去除精浆。在精子沉淀中加入含0.1%(v/v)吐温-20的PBS,使精子悬浮,室温下

透膜20min。离心洗涤后,在精子沉淀中加入含3g/dl BSA的封闭液于37℃封闭30min。把封闭后的精子悬液加入兔抗人HSPA2多克隆抗体(一抗),置4℃过夜,同时设立不加一抗的对照管,进行与检测管相同的平行操作。次日取出,使用含0.1%(v/v)吐温-20的PBS离心洗涤3次。精子沉淀使用含3g/dl BSA的PBS重悬,加入FITC偶联的山羊抗兔IgG抗体(二抗),置37℃恒温摇床中摇动孵育1h。孵育完成后,使用含0.1%(v/v)吐温-20的PBS离心洗涤3次,精子沉淀用PBS重悬样品,置流式细胞仪(FCM)上样器检测。FCM上设置每管检测10 000个细胞,利用侧向散射光(side scatter, SSC)和前向散射光(forward scatter, FSC)选取精子群(R1)^[7],在R1细胞群上检测不同FITC荧光强度下的精子数量。最后使用FlowJo软件设定对照管和检测管的HSPA2阴性细胞和阳性细胞的界值,计算两管的阳性细胞的

占比(阳性率),并且计算检测管的阳性率与对照管的比值(阳性率比值)。

1.3.2 最佳检测条件的建立:使用棋盘格法对精子数(1×10^6 , 2×10^6 和 4×10^6),一抗的稀释度(1:150, 1:300和1:600)和二抗的稀释度(1:200, 1:400和1:600)进行最佳条件的确定,取阳性率比值达最大时的精子数、一抗和二抗的稀释度作为最佳检测条件。

1.3.3 重复性和线性范围的检测:重复性检测:分别取阳性率比值的高值、中值和低值各1份样本,以最佳测量条件重复检测20次,计算变异系数(CV)。线性范围的确定:依据《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则(征求意见稿)》中关于线性范围确定的方法,选取一份低值标本(阳性率比值=2.14)和一份高值标本(阳性率比值=31.72),将这两份标本分别以精子总数按照3:1,1:1和1:3的比例进行混合。然后,利用这五个混合标本的理论值与实际检测值的偏离度确定检测的线性范围。

1.3.4 正常生育男性精子HSPA2阳性率比值参考值范围的确定:选取临床187例正常生育男性,使用上述检测方法检测阳性率比值,以确定参考值范围。

1.3.5 患者样本的初步检测:男方禁欲3~5天,于取卵日当天使用手淫法采集精液,使用世界卫生组织第五版的操作规程对精液样本进行测定,检测精液量、精子浓度和精子活动力,并采用最佳检测条件对精子HSPA2的表达水平进行分析,检测过程中同时设立不加一抗的对照管,计算检测管阳性细胞百分率与对照管的比值(阳性率比值)。

1.4 统计学分析 使用SPSS26.0进行统计分析,定

量资料使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,两组数据若服从正态分布,使用成组设计资料的 t 检验进行比较;若不服从正态分布,则采用Mann-Whitney U 检验进行比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。分析HSPA2阳性率比值的界值分析使用SPSS软件的受试者工作特征(ROC)曲线工具作图,常规IVF低受精率组定义为阳性,受精成功组定义为阴性,并且计算各个界值的Youden指数,取Youden指数达到最大时的界值作为最佳预测效能的界值。正常参考值范围的确定采用第5百分位数法作为参考值下限。

2 结果

2.1 最适检测条件、重复性和线性范围的确定 经棋盘格法进行分析,最适检测的加样精子数为 2×10^6 ,一抗最适工作稀释度为1:300,二抗最适工作稀释度为1:400。反复测量三份不同阳性率比值水平的精液样本,其CV分别为9.27%, 7.68%和8.38%。线性范围分析结果显示,阳性率比值在2.14~16.93范围内线性较好。

2.2 正常参考值的确定 采用单侧的百分位数法确定参考值下限为4.65。

2.3 精子HSPA2表达水平在受精成功组与低受精率组的比较 低受精率组的精子HSPA2阳性率比值为 6.19 ± 4.07 ,低于受精成功组的 10.69 ± 8.26 ,两组间的差异具有统计学意义($t=2.446, P < 0.05$)。

2.4 HSPA2阳性率比值预测IVF低受精率价值 见图1。HSPA2阳性率比值对发生IVF低受精率的预测曲线下面积(AUC)为0.662,在界值为5.5067时Youden指数为0.260且达到最大,此界值下的敏感度和特异度分别为71.4%, 54.5%。

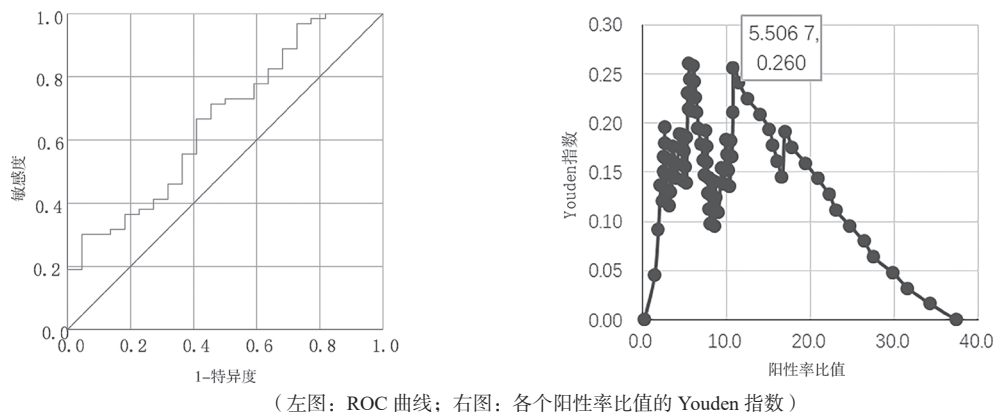


图1 HSPA2阳性率比值预测IVF低受精率的ROC曲线图和各阳性率比值的Youden指数图

3 讨论

HSPA2是精子功能的生物标志物,在精子的细胞内,它与多种复合物结合,以维持这些功能蛋白质的空间构象,在精子生成、获能及顶体反应等过程中起重要作用^[2-3]。其表达不足可能导致精子无法完成获能过程^[8],引起IVF的受精失败^[4]。除此以外,精子HSPA2水平还与生育潜力^[9-10]、精索静脉曲张^[11-12]

和妊娠丢失^[13-14]等有关,因此开展HSPA2的检测具有重要临床意义。

目前,精子HSPA2的检测技术中存在步骤繁琐,检测通量低等缺点,使其一直停留在研究状态,无法向临床推广。本文基于流式细胞术的优点,探讨流式细胞术在精子HSPA2检测的可行性。在建立HSPA2的检测方法时,我们使用了间接法的原理,但这个方

法存在背景信号高和假阳性的问题^[15]。对此采用了BSA封闭,洗涤液中加入吐温-20等方法,背景信号得到有效控制,且没有影响抗原与一抗的结合,提示精子HSPA2的流式细胞术检测的可行性。其次,研究过程中设立对照管并使用阳性率比值作为检测指标,修正了背景信号对检测结果的干扰,保证结果的可靠性。另外,我们确定了最佳实验条件,通过控制各成分的使用量来提高信噪比,为检测提供了依据。与此同时,本研究提示检测方法重复性良好、有一定程度的线性范围,但与理想的方法学指标有一定差距,仍需要通过改良操作技术来提升检测性能。

在初步建立HSPA2的流式细胞术检测法的基础上,本文分别分析了IVF受精成功及低受精率组中的HSPA2表达水平,发现HSPA2在低受精率组显著偏低,提示HSPA2表达水平不足会影响IVF受精过程。近年来的研究也证实,精子HSPA2对IVF受精结局有负面影响^[4]。虽然关于HSPA2的研究取得了一些进展,但是具体机制仍然不清楚,且HSPA2在精子的分布仍然存在争议^[8]。另一方面,本文探讨了HSPA2在低受精率的预测阈值及数据的预测性能,提示HSPA2表达水平对IVF受精失败有预测价值,在临床应用中有重大意义。由于常规IVF不能完成受精,临床上还可以使用ICSI技术完成受精^[16-17],如果能提前预测IVF失败,早期采用ICSI技术,则有助于改善患者的临床结局^[18]。因此,本研究提供了一种IVF受精失败及选择受精方式的预测工具,借此可预测IVF受精失败及需要借助ICSI技术的概率,为IVF助孕策略提供一种决策方法。

综上所述,本研究建立了一种流式细胞术检测HSPA2的方法,并且探讨了其在预测IVF受精失败的临床价值。通过提升检测方法的性能和进一步的临床研究,有望将这个标志物的检测转化成为常规开展的临床检验项目,更好地服务于临床医生和广大患者。

参考文献:

- [1] CIESIELSKI S J, YOUNG C, CIESIELSKA E J, et al. The Hsp70 and JDP proteins: structure-function perspective on molecular chaperone activity[J]. *The Enzymes*, 2023,54: 221-245.
- [2] GRASSI S, BISCONTI M, MARTINET B, et al. Targeted analysis of HSP70 isoforms in human spermatozoa in the context of capacitation and motility[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022,23(12): 6497.
- [3] GOMEZ-TORRES M J, HUERTA-RETAMAL N, ROBLES-GÓMEZ L, et al. Arylsulfatase a remodeling during human sperm in vitro capacitation using field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)[J]. *Cells*, 2021,10(2):222.
- [4] LEUNG E T Y, LEE B K M, LEE C L, et al. The role of spermatozoa-zona pellucida interaction in selecting fertilization-competent spermatozoa in humans[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023,14: 1135973.
- [5] NOWICKA-BAUER K, MALCHER A, WLOCZKOWSKA O, et al. Evaluation of seminal plasma HSPA2 protein as a biomarker of human spermatogenesis status[J]. *Reproductive Biology*, 2022,22(1): 100597.
- [6] LIU Y N, ZHANG Y S, WANG Z L, et al. Melatonin improves the ability of spermatozoa to bind with oocytes in the mouse[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2023,35(7): 445-457.
- [7] 王家雄, 刘彩钊, 韩慕天, 等. 流式细胞术检测精液细胞异质性与精子质量的相关性研究[J]. *生殖医学杂志*, 2020,29(11): 1493-1498.
- [8] WANG J X, LIU C Z, HAN M T, et al. Correlation between seminal cell heterogeneity detected by flowcytometry and sperm quality[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2020,29(11): 1493-1498.
- [9] HUERTA-RETAMAL N, SÁEZ-ESPINOSA P, ROBLES-GÓMEZ L, et al. Human sperm chaperone HSPA2 distribution during in vitro capacitation[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2021,143: 103246.
- [10] FIETZ D, SGAIER R, O'DONNELL L, et al. Proteomic biomarkers in seminal plasma as predictors of reproductive potential in azoospermic men[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2024,15: 1327800.
- [11] JANNATIFAR R, CHERAGHI E, NASR-ESFAHANI M H, et al. Association of heat shock protein A2 expression and sperm quality after N-acetyl-cysteine supplementation in astheno-terato-zoospermic infertile men[J]. *Andrologia*, 2021,53(5): e14024.
- [12] ARYA D, BALASINOR N, SINGH D. Varicocele-associated male infertility: cellular and molecular perspectives of pathophysiology[J]. *Andrology*, 2022,10(8): 1463-1483.
- [13] 华斌, 王书斌, 陈妍妍. 精索静脉曲张患者精浆TGF- β , IL-2及IL-6水平与精液质量的关系研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2020,35(4): 50-52,60.
- [14] HUA B, WANG S B, CHEN Y Y. Relationship between TGF- β , IL-2 and IL-6 levels in spermatic plasma and semen quality in patients with varicocele[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(4): 50-52,60.
- [15] MOHANTY G, JENA S R, KAR S, et al. Paternal factors in recurrent pregnancy loss: an insight through analysis of non-synonymous single-nucleotide polymorphism in human testis-specific chaperone HSPA2 gene[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022,29(41): 62219-62234.
- [16] MOHANTY G, JENA S R, NAYAK J, et al. Proteomic signatures in spermatozoa reveal the role of paternal factors in recurrent pregnancy loss[J]. *The World Journal of Men's Health*, 2020,38(1): 103-114.
- [17] 庞舒尹, 陈奕豪, 刘海英, 等. 儿童抗核抗体不同稀释度检测结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016,37(13):1772-1774.
- [18] PANG S Y, CHEN Y H, LIU H Y, et al. Analysis on detection results of different dilution titers of antinuclear antibodies in children[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2016,37(13): 1772-1774.
- [16] GÓMEZ-TORRES M J, HUERTA-RETAMAL N, SÁEZ-ESPINOSA P, et al. Molecular chaperone HSPA2 distribution during hyaluronic acid selection in human sperm[J]. *Reproductive Sciences*, 2023,30(4): 1176-1185.
- [17] HEIDARI M, DARBANI S, DARBANDI M, et al. Assessing the potential of HSPA2 and ADAM2 as two biomarkers for human sperm selection[J]. *Human Fertility*, 2020,23(2): 123-133.
- [18] 聂玉林, 赵魁, 周静, 等. 短时授精联合早期补救ICSI对受精失败高危人群的应用结局[J]. *当代医学*, 2020, 26(36):115-118.
- NIE Y L, ZHAO K, ZHOU J, et al. The outcome of short-term insemination combined with early rescue ICSI in the couples with high risk of fertilization failure[J]. *Contemporary Medicine*, 2020,26(36):115-118.

收稿日期: 2024-06-17

修回日期: 2024-10-21