

乙型肝炎病毒感染对精子 DNA 完整性影响的研究

兰贵斌, 谢德纯, 农正祥, 周晓旋, 潘敏, 韦尚兵

(广西百色市人民医院, 右江民族医学院附属西南医院检验科, 广西 百色 533000)

E-mail: lan040500@163.com)

摘要: **目的** 探讨乙型肝炎病毒感染对精子 DNA 完整性的影响。**方法** 选择血清乙型肝炎病毒表面抗原检测为阳性的 12 例男性患者作为观察组, 对照组选择健康体检男性 10 例, 对两组精液样本进行精子染色质扩散 (SCD) 实验和精液常规检测。**结果** 与对照组相比, 观察组精液密度、前向活动率、活动率和正常形态率明显更低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 在精液量的对比上, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组对比, 观察组精子碎片 SCD 检查结果中, 各项数据对比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 乙型肝炎病毒感染影响精子的活动能力和精子密度多方面指标, 严重影响精子 DNA 的质量, 导致精子的质量大幅度下降。

关键词: 乙型肝炎病毒; 精子 DNA 完整性; 染色质扩散试验

中图分类号: R512.6⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)04-0368-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.04.004

The impact of hepatitis B virus infection on sperm DNA integrity

Lan Guibin, Xie Dechun, Nong Zhengxiang, Zhou Xiaoxuan, Pan Min, Wei Shangbing

(Guangxi Baise People's Hospital, Department of Clinical Laboratory, Affiliated Southwest Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

E-mail: lan040500@163.com)

Abstract: **Objective** To study the effects of hepatitis B virus infection on sperm DNA integrity. **Methods** Twelve male patients with seropositive hepatitis B surface antigen (HBsAg) were selected into the observation group, ten male individuals undergone healthy check-up were chosen into the control group. A sperm chromatin dispersion (SCD) test and a semen routine detection were performed for examining semen samples of the two groups. **Results** compared control group with observation group, the observation group had obviously lower sperm density, lower ratio of forward motile sperm, lower motility rate and lower normal morphology rate, there were statistical significant differences ($P < 0.05$). Comparison of semen volume between the two groups showed that there was no significant difference ($P > 0.05$). Comparing the sperm fragment SCD test results between control group and observation group showed there were statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Hepatitis B virus infection affects various sperm indexes such as sperm motility and sperm density, which seriously impacts on the quality of sperm DNA and results in a great decline in sperm quality.

Key words: hepatitis B virus; sperm DNA integrity; chromatin dispersion test

乙型肝炎(简称为乙肝)病毒(HBV), 属于一种嗜肝 DNA 病毒, 是一种传染性疾病。HBV 具有比较高的感染率, 在我国 HBV 感染率超过半数, 乙肝抗原检测显示为阳性的患者大约达到 7.2%, 传染途径包括母婴传播途径、血液感染、医源性感染、性传播、日常生活中体液感染等等。男性性腺是 HBV 感染者肝外复

制的另一场所之一^[1], HBV 可在男性性腺呈慢性持续性的侵扰并繁殖, 影响精子的发生与成熟, 还能使存储在附睾中的精子下降、畸形率升高, 最终影响接下来的受精与胚胎的种植^[2]。目前, 感染 HBV 是否对精子 DNA 完整性的影响尚未完全阐明, 相关研究报道较少。本研究通过检测 HBV 感染者精液的常规质量等

并与健康男性对比分析,探讨 HBV 感染对精子 DNA 完整性的影响。本文主要探讨 HBV 感染对精子 DNA 完整性的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 观察组:选择百色市人民医院 2013 年 6 月~2014 年 6 月收治的经过血清 HBV 表面抗原检测为阳性的男性患者作为研究对象,一共有 12 例,年龄分布在 29~40 岁之间,平均年龄为(35±2.5)岁,排除精神病患者、其他病毒感染患者、性功能障碍患者等等。对照组:选择健康体检男性作为对照组,经过血清 HBV 表面抗原检测,检查结果为阴性,一共有 10 例,年龄分布在 28~41 岁之间,平均年龄为(31±2.0)岁,所有研究对象都同意参与研究。两组在前列腺液化验结果差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。在年龄、其他病症等方面基线资料比较差异也无统计学意义。

表 1 两组研究对象前列腺化验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)						
组别	<i>n</i>	白细胞/ (个·HP ⁻¹)	脓球/ (个·HP ⁻¹)	卵磷脂小体 (个·HP ⁻¹)	pH	
观察组	12	13.8±7.6 ^a	3.6±2.6 ^a	78.8±24.6 ^a	6.35±0.23 ^a	
对照组	10	12.9±7.3	3.1±2.7	80.3±27.5	6.28±0.18	

注:与对照组比较:a: $P>0.05$

1.2 研究方法

1.2.1 研究设备和仪器 荧光显微镜;免疫发光仪;精子彩色检测系统;精子 DNA 碎片检测试剂;分析纯。

1.2.2 精液常规分析 禁欲 2~3 d,采集精液放在无菌容器中,采集精液后马上放进恒温箱,温度为 37℃,在半小时后,根据世界卫生组织关于人体精液实验检验的标准和男性不育症的诊断标准,检查精子样本,并且对照各项检查参数。正常情况下,精液液化时间在

60 min 以内,精液量超过 2 ml,密度超过 20 万个单位,存活率超过 60%,前向运动精子数量超过 50%,精子形态正常的概率超过 30%。

1.2.3 血清 HBV 表面抗原检测方法 采用酶联免疫法,在操作过程中严格遵守无菌相关规定和试剂盒使用说明书进行操作^[3]。

1.2.4 精子染色质扩散(SCD)实验 首先对精子的密度进行调整,调整目标值为 10×10⁶/ml;然后溶解琼脂糖,将琼脂糖管放在水浴箱内,温度为 90~100℃,时间控制为 5 min;再往盛溶解的琼脂糖管加入精液标本,量为 60 μl,取出混合物,放在载玻片上,盖上盖玻片,冷藏 4 min,温度控制为 4℃;之后从冰箱中拿出冷藏的精液标本,去掉盖玻片,放入变性液中,进行温育,时间控制为 7 min;带上无菌手套,使用刀片取出玻片,水平移动放入另一个装有 10 ml 裂解液的托盘中进行孵育,孵育的时间控制为 25 min。把玻片取出来,放入蒸馏水,5 min 后,分别放入不同浓度的乙醇,等待玻片晾干,进行染色,曝光 15 min,冲洗干净后风干,最后使用显微镜对显色的效果进行观察。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析,数据采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较进行 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组常规精液检查结果 与对照组对比,观察组精液密度、前向活动率、活动率和正常形态率降低明显,差异具有统计学意义($P<0.05$);在精液量的对比上,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.2 两组 SCD 检验结果 与对照组相对比,观察组精子碎片 SCD 检查结果的精子 DNA 碎片指数(DFI)、大晕环、中晕环、小晕环、无晕环明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 两组精液样本的常规检查结果比较 ($\bar{x}\pm s$)						
组别	<i>n</i>	精液量(ml)	密度(×10 ⁶ /ml)	前向活动率(%)	活动率(%)	正常形态率(%)
对照组	10	2.6±1.0	72±18.0	52±18.1	68±13.0	39.2±6.3
观察组	12	2.3±1.0	33±18.5	35±18.2	53±13.1	27±8.5
<i>t</i>		0.701	4.984	2.187	2.685	3.754
<i>P</i>		0.492	<0.001	0.041	0.014	0.001

表 3 两组 SCD 检查结果比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)						
组别	<i>n</i>	DFI	大晕环	中晕环	小晕环	无晕环
对照组	10	12±6.2	72±8.2	16.5±8.3	7.5±3.8	4.5±3.2
观察组	12	23.5±10.0	49±16.2	28±10.5	16.3±6.5	8.5±4.2
<i>t</i>		3.159	4.065	2.806	3.769	2.470
<i>P</i>		0.005	0.001	0.011	0.001	0.023

3 讨论

乙肝属于一种发病率很高的肝炎疾病,目前,HBV 感染已经成为世界范围内高度重视的公共健康问题^[4]。HBV 可以通过人体体液、母婴传播等途径传播。目前已知 HBV 不仅具有嗜肝性,还可以侵袭人体其他器官造成感染,如男性生殖器 HBV 的侵袭。据报道,HBV 对男性精子会造成一定的负面作用,影响精子的质量^[5]。目前,关于 HBV 对精子的质量造成不良影响的争论比较多。根据本文研究发现,与正常健康的男性精子相对比,HBV 感染男性患者的精子的密度、前向活动率、活动率以及正常形态率明显更低,本文研究结果显示 HBV 感染会对男性精子产生严重的负面作用,破坏精子的质量,和男性不育的发生具有一定的因果关系。

对于男性而言,成熟的精子属于一种特化的细胞,其中精子核是精子头部的重要组成部分,主要成分包括 DNA、核蛋白。DNA 是承载着男性遗传信息的重要物质,DNA 必须具备完整的结构,才可以保证正常的受精,也是保证胚胎正常发育的前提条件^[6]。HBV 感染男性患者,其乙肝病毒不仅仅存在血液里面,还存在睾丸组织以及精液里面,HBV DNA 可以出现在精子头的核心位置。据相关报道,HBV 会导致男性患者的精子染色体结构发生变化,破坏原本的稳定性,最终导致精子基因发生变异,影响精子受精的过程和胚胎的正常发育^[7]。最新研究显示^[8]男性不育症中同时伴有 HBV 感染患者,检测其精子 DFI 显著高于无 HBV 感染的不育症患者,说明感染 HBV 可能加重男性不育患者的精子 DNA 损伤。研究还发现精子 DNA 损伤后可能会导致精子质量下降、习惯性自然流产、宫内胚胎停止发育或畸形等,甚至可能增加后代不育的可能^[8]。

综上,感染影响精子的活动能力和精子密度等多方面指标,严重地影响精子 DNA 质量,导致精子的质量大幅度下降。通过研究 HBV 感染男性患者的精子影响因素,可以进一步探讨男性不育的发病机制,为寻找有效的治疗方法提供临床参考依据。

参考文献:

- [1] 刘浩,耿春惠,王维,等. 乙肝病毒对人精液参数和精子 DNA 完整性的影响[J]. 中华男科学杂志,2013,19(10): 896—898.
 - [2] Oger P, Yazbeck C, Gervais A, et al. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF[J]. Reproductive biomedicine online,2011,23(2):207—212.
 - [3] 谷龙杰,陈振文,许剑锋. 不育男性精子染色质结构与精液常规参数的关系[J]. 中国男科学杂志,2009,23(3): 29—32.
 - [4] 梅顺利,兰孟东,刘平. 乙型肝炎病毒携带者精子中 HBV DNA 的检测及意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2009(3): 117—118.
 - [5] 陈建伟,崔云,张晓霞. 乙型肝炎病毒感染对精子 DNA 损伤的影响研究[G]. 2012 浙江省医学会男科学,泌尿外科学学术年会论文汇编,2012.
 - [6] 郁佳佳,施维,鞠少卿. 循环游离 DNA 完整性检测的临床应用研究进展[J]. 临床检验杂志,2013(2):121—123.
 - [7] 邓天勤,黄永汉,甄劲仪,等. 男性不育伴乙型肝炎病毒感染患者精子 DNA 完整性的初步研究[J]. 中华男科学杂志,2013,19(1):72—76.
 - [8] Kennedy C, Ahlering P, Rodriguez H, et al. Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction[J]. Reproductive biomedicine online,2011,22(3):272—276.
- 收稿日期:2016—04—27;修回日期:2016—05—13