

男性年龄与精液常规参数及精子 CFTR 表达的关系研究

单江静 郑伟平 张松英

摘要 **目的** 探讨男性年龄与精子质量及精子中 CFTR 表达的关系。**方法** 选取 2011 年 3 月~8 月于笔者医院生殖中心门诊就诊的精液常规参数正常的健康可育男性 293 例,按照年龄分为 3 组,A 组 20~29 岁,105 例;B 组 30~39 岁,156 例;C 组 ≥ 40 岁,32 例。进行精液常规分析及精液形态学分析,精子 CFTR 免疫荧光染色。分析男性年龄与精子质量及 CFTR 表达间的关系。**结果** 3 组精液:体积分别为 A 组 2.56 ± 0.95 ml, B 组 2.45 ± 0.98 ml, C 组 2.28 ± 0.85 ml, 前向活动力分别为 A 组 $77.91\% \pm 17.42\%$, B 组 $77.71\% \pm 14.94\%$, C 组 $77.68\% \pm 15.71\%$, 正常形态率分别为 A 组 $7.04\% \pm 4.52\%$, B 组 $6.36\% \pm 4.31\%$, C 组 $5.40\% \pm 4.22\%$, 精子浓度分别为 A 组 $(106.78 \pm 65.33) \times 10^6$ /ml, B 组 $(111.85 \pm 65.70) \times 10^6$ /ml, C 组 $(134.59 \pm 75.30) \times 10^6$ /ml, 精子总数分别为 A 组 $(291.3 \pm 187.9) \times 10^6$, B 组 $(256.9 \pm 143.4) \times 10^6$, C 组 $(264.4 \pm 170.4) \times 10^6$, CFTR 表达率分别为 A 组 34.58%, B 组 28.32%, C 组 23.15%, 所有常规参数 3 者间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 组间两两比较差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$); 相关分析显示精子体积、向前活动力、正常形态率、浓度、总数及 CFTR 表达率均与年龄无关 ($P > 0.05$)。**结论** 随着年龄的增大,精液体积、前向活动力、正常形态率呈下降趋势,精子浓度呈升高趋势,精子总数无明显变化,但均与年龄无相关性。

关键词 男性年龄 精子 形态 活动力 CFTR

中图分类号 R69

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.10.028

Research on the Relationship between Male Age, Sperm Quality and CFTR Expression. Shan Jiangjing, Zheng Weiping, Zhang Songying. Department of Gynecology and Obstetric, Shaoxing People's Hospital & Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To explore the correlation between male age, sperm quality and expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Methods** Sperm samples from 293 "healthy" and fertile men (22–58 years) were collected and were divided into three groups according to the males' age: Group A 20–29 years ($n = 105$), Group B 30–39 years ($n = 156$), Group C ≥ 40 years ($n = 32$). All the routine sperm parameters were normal. Sperm concentration, total number, progressive motility were analyzed by computer assisted sperm assay system. Sperm morphology was analyzed by critical standard. The expression CFTR was conducted by indirect immunofluorescence staining. **Results** The sperm volume, motility, normal morphology and CFTR expression decreased with age, but there was no significant difference among group A, B and C in sperm volume 2.56 ± 0.95 ml, 2.45 ± 0.98 ml, 2.28 ± 0.85 ml, motility $77.91\% \pm 17.42\%$, $77.71\% \pm 14.94\%$, $77.68\% \pm 15.71\%$, normal morphology $7.04\% \pm 4.52\%$, $6.36\% \pm 4.31\%$, $5.40\% \pm 4.22\%$, CFTR expression 34.58%, 28.32%, 23.15% ($P > 0.05$). Also there was no significant difference among 3 groups in sperm concentration $(106.78 \pm 65.33) \times 10^6$ /ml, $(111.85 \pm 65.70) \times 10^6$ /ml, $(134.59 \pm 75.30) \times 10^6$ /ml and count $(264.4 \pm 170.4) \times 10^6$, $(256.9 \pm 143.4) \times 10^6$, $(291.3 \pm 187.9) \times 10^6$ ($P > 0.05$). **Conclusion** There was a tendency that the sperm quality decrease with advance in males' age, but there was no significant difference between sperm quality and males' age.

Key words Male's age; Sperm; Morphology; Motility; CFTR

随着社会的发展,越来越多的育龄夫妇推迟了生育后代的计划,也因此带来了因年龄引发的生育问

题^[1]。多种因素如性功能、激素水平、精子的受精能力等共同作用,最终影响着男性的生育能力,男性的生育能力在很大程度上取决于精子的受精能力^[2]。

囊性纤维化跨膜转导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是在多种上皮均有表达的一种氯离子通道蛋白,对于跨上皮的盐类运输、液体流动和离子浓度调节等都具有重要的

作者单位:312000 绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院妇产科(单江静、郑伟平);310000 杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院生殖中心(张松英)

通讯作者:张松英,电子信箱:zenlier@hotmail.com

决定作用^[3]。近年来研究发现,CFTR 表达在成熟精子的头部,且与精子的获能和顶体反应密切相关^[4,5]。Xu 等^[6]认为 CFTR 表达率与男性生育能力的改变密切相关。笔者前期的研究也显示,CFTR 表达率与男性的精液质量密切相关,CFTR 的表达缺陷可能导致人类精子受精能力的下降^[7]。因此,CFTR 是一种理想的精子受精能力的预测指标。故在本研究中,将 CFTR 与其他精液常规指标一起作为预测精子受精能力的指标来观察年龄对男性生育能力的影响。

对象与方法

1. 研究对象:选取 2011 年 3 月~8 月于笔者医院生殖中心门诊就诊的精液常规参数(指精液体积、精子浓度、总数、活动率等参数)正常(具体标准参照第 5 版^[8])的健康可育男性 293 例,患者年龄 22~58 岁,按照年龄分成 3 组,A 组 20~29 岁,105 例;B 组年龄 30~39 岁,156 例;C 组年龄≥40 岁,32 例。入选标准:无吸烟酗酒史,无有害射线及有毒物质接触史,无癌症放化疗史,无腮腺炎病史,无生殖系统手术史,无糖尿病及慢性心血管病史,无家族性遗传病史,无精索静脉曲张、泌尿系统炎症史、性功能障碍及性传播疾病史等。该研究经医院伦理委员会批准,所有对象均签署知情同意书,实验结束后将所有精液标本毁弃。

2. 主要实验试剂:鼠抗人单克隆 CFTR 抗体购自美国 Abcam 公司;Alexa fluor 488 交联的羊抗鼠 IgG 购自美国 Abcam 公司;TritonX-100 购自美国 Sigma 公司;Hochest 33258 购自美国 Sigma 公司。

3. 研究方法:(1)精液常规分析:按照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版^[8]的操作要求进行。检测精液 pH 值、精液量,同时运用 CASA 技术分析精子浓度及前向活动力。(2)精子形态学分析:染色方法为《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版推荐的改良巴氏染色法,镜下计数 200 个精子,按照严格形态学标准判定正常

形态精子,计算正常形态率。正常形态百分率=正常形态精子数/200×100%。(3)CFTR 表达率的测定:按照 Xu 等^[5,6]报道的方法进行。采用间接免疫荧光法。精子标本用 PBS 洗 2~3 次,离心 500g×5min,弃去上清。沉淀后加入 4% 多聚甲醛固定,4℃ 冰箱过夜。PBS 洗 3 次,离心 500g×5min,显微镜下观察精子形态,调整浓度,然后涂于硅烷化的玻璃片上,并于室温下晾干。待完全干燥后加 0.1% TritonX-100/PBS 透膜 10min,PBS 洗 3 次,每次 5min。用 PBS 稀释的 10% 羊血清涂于玻片上封闭精子上非特异结合位点,室温 1h。弃去封闭液,将一抗(鼠抗人 CFTR,1:500)溶于 10% 羊血清中,加在玻片上,4℃ 湿盒中反应过夜。弃去多余未反应的一抗,用 PBS 洗 3 次,每次 10min。避光环境下将二抗(Alexa fluor 488 交联羊抗鼠,1:500)稀释于 10% 羊血清,加在玻片上,避光室温孵育 1h。弃去二抗,PBS 洗 3 次,每次 10min。用终浓度 1μg/ml Hochest 复染细胞核,室温 5~10min。用 PBS 洗 3 次,每次 5min。在 1000 倍荧光显微镜下观察。每个标本至少计数 200 个精子定量 CFTR 蛋白的表达率。

4. 统计学方法:所有数据采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,计量资料结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用率表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或 χ^2 检验,相关分析采用 Spearman 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组间精液常规、形态学分析及 CFTR 表达率比较:3 组间精液体积、前向活动率、正常形态率、浓度、总数差异均无统计学差异($P > 0.05$),组间两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。3 组均有不同程度的 CFTR 阳性表达,随着年龄的增加,CFTR 阳性表达率逐渐下降,但 3 组间表达差异无统计学意义($P > 0.05$),两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1,图 1,图 2)

表 1 3 组间精液常规、形态学分析及 CFTR 表达率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体积(ml)	前向活动率(%)	正常形态率(%)	精子浓度(×10 ⁶ /ml)	总数(×10 ⁶ /ml)	CFTR 表达率(%)
A 组	105	2.56±0.95	77.91±17.42	7.04±4.52	106.78±65.33	291.3±187.9	34.58
B 组	156	2.45±0.98	77.71±14.94	6.36±4.31	111.85±65.70	256.9±143.4	28.32
C 组	32	2.28±0.85	77.68±15.71	5.40±4.22	134.59±75.30	264.4±170.4	23.15

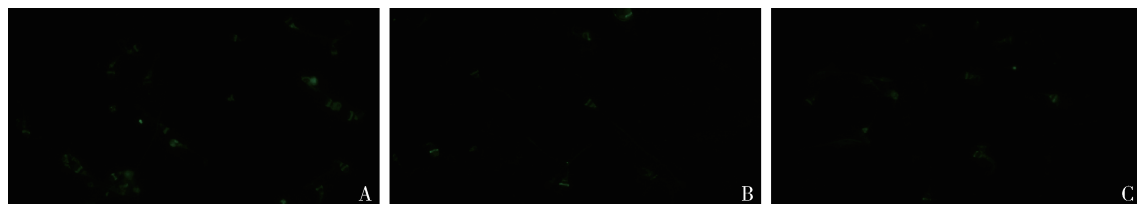


图1 CFTR 间接荧光染色

A. A 组; B. B 组; C. C 组

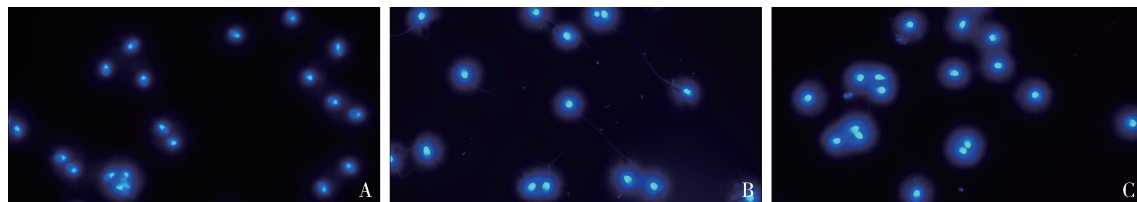


图2 Hoechst 复染荧光染色

A. A 组; B. B 组; C. C 组

2. 年龄与精液常规、形态学分析及 CFTR 表达率 Spearman 相关性分析: 男性精液体积、前向活动率、正常形态率随着年龄的增加呈下降趋势, 但相关分析这 3 个参数均与年龄无显著相关性 ($P > 0.05$)。随着年龄的增加, 精子 CFTR 阳性表达率呈升高趋势, 但结果显示两者无显著相关性 ($P > 0.05$)。此外, 结果还显示精子浓度、总数及 CFTR 表达率与男性年龄之间均无显著相关性 ($P > 0.05$)。

讨 论

目前关于年龄与男性生育力关系的研究结论存在争论, 但多数研究者倾向于男性生育能力随着男性年龄的增长而下降, 尤其是精子活动力和正常形态率, 其随年龄增长而下降的趋势较精子浓度和数量更加明显^[8-10]。Eskenazi 等^[10]对 97 例 22~80 岁的健康男性的精液体积、精子数量和活动力做了研究, 发现精液量以每年 0.03ml 的速度减少, 前向活动力以每年 3.1% 的速度减少, 而精子浓度和总数只在 70 岁以上组出现了显著的下降, 其他年龄组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Eskenazi 等^[10]和也照燕等^[11]还发现, 随着年龄的增长, 精液出现异常情况的概率也逐渐增高, 因此认为, 随着年龄的增长, 男性生育能力呈逐渐下降的趋势, 主要体现在精液体积和精子的活动力。本研究结果显示, 精液体积、前向活动力随着年龄增加而下降, 与上述报道一致。本研究发现前向活动力呈现出了随年龄增长而逐渐下降的趋势, 3 组间精子正常形态率差异无统计学意义, 但也有随年龄增长而逐渐下降的趋势, 与多数文献报道相吻

合^[12,13]。而精子浓度和总数方面, 3 组间差异无统计学意义。值得一提的是, 这两项指标并没有呈现出如活动力及形态指标那样随年龄增长而逐渐下降的趋势, 反而有上升的趋势, 尽管与多数文献报道的轻度下降或者无明显下降趋势的结论不符, 但与 Gallardo 等^[12]和 Rolf 等^[14]的结论一致。

近年来随着对 CFTR 深入研究, CFTR 对男性精子受精能力的预测价值越来越引起研究者的重视。一系列研究均证实, CFTR 在预测精子受精能力方面具有重要的意义, 是具有显著预测价值且不依赖卵子的应用前景良好的一个指标^[6,7,10]。本研究发现, CFTR 随年龄增长呈逐渐下降的趋势, 这与活动力及正常形态率的趋势一致, 但 3 个年龄组之间 CFTR 表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Spearman 相关分析也没有发现 CFTR 表达率与男性年龄之间的相关性。

综上所述, 随着年龄的增长, 精液体积、前向活动力、正常形态率呈下降趋势, 精子浓度呈升高趋势, 精子总数无明显变化, 但均与年龄无相关性。

参考文献

- 1 于俊荣, 张香改, 黄海燕, 等. 生育年龄与社会影响因素分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2008, 16(7): 413-415
- 2 Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction[J]. Human Reprod Update, 2010, 16(1): 65-79
- 3 Rauh R, Diakov A, Tzschoppe A, et al. A mutation of the epithelial sodium channel associated with atypical cystic fibrosis increases channel open probability and reduces Na^+ self inhibition[J]. Physiol, 2010, 588(8): 1211-1225