

• 论著-研究报告 •

# 抗精子抗体对人精子 HOS 试验及膜间 $Ca^{2+}$ 内流的影响\*

刘喜军<sup>1</sup> 李荣军<sup>1</sup> 王向东<sup>1</sup> 王璟琦<sup>2</sup> 徐计秀<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探讨在正常精液中加入 IgG 类抗精子抗体阳性精浆对人精子膜功能完整性及压力敏感性  $Ca^{2+}$  内流的影响。方法:在门诊的不育患者中收集精浆 IgG 抗精子抗体阳性患者,通过离心的方法从其精液中分离出精浆,并同正常人精子孵育,与正常精浆及正常人精子、精子培养液及正常人精子孵育的对照组比较研究,分别对它们进行低渗肿胀(HOS)试验及测定精子细胞内钙离子浓度的变化。结果:与 IgG 抗精子抗体阳性精浆孵育的精子,其 g 形精子百分率和精子尾部总肿胀率均明显低于两个对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );试验组的精子细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度差值明显低于两个对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:IgG 类抗精子抗体对人精子膜功能完整性及压力敏感性  $Ca^{2+}$  内流均可造成影响。

**[关键词]** 抗精子抗体;精子;钙离子;低渗肿胀试验

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.04.009

**[中图分类号]** R698 **[文献标志码]** A

## Effects of antisperm antibody on human sperm HOS test and $Ca^{2+}$ influx between membranes

LIU Xijun<sup>1</sup> LI Rongjun<sup>1</sup> WANG Xiangdong<sup>1</sup> WANG Jinqi<sup>2</sup> XU Jixiu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urology, Third Hospital of Datong, Datong, Shanxi, 037008, China; <sup>2</sup>Department of Urology, First Hospital, Shanxi Medical University)

Corresponding author: LIU Xijun, E-mail: 13403648838@163.com

**Abstract Objective:** To investigate the effect of adding IgG antisperm antibody-positive seminal plasma to normal semen on the functional integrity of human sperm membranes and pressure-sensitive  $Ca^{2+}$  influx. **Method:** The seminal plasma IgG antisperm antibody positive semen in infertile patients was collected from the infertile patients in the clinic, and the seminal plasma was separated from the semen by centrifugation and incubated with normal human sperm. And then, the samples were compared with two control groups including both normal semen incubated with normal human sperm and sperm culture fluid incubated with normal human sperm. After that, a hypotonic swelling(HOS) test was performed and the change of calcium ion concentration in sperm cells was measured respectively. **Result:** Among the sperm incubated with IgG antisperm antibody-positive seminal plasma, the percentage of g-shaped sperm and the total swelling rate of the sperm tail were significantly lower than those of the two control groups, and the difference was significant( $P < 0.01$ ). The  $Ca^{2+}$  fluorescence intensity within sperm cells in the test group was also significantly lower than that in the two control groups, and the difference was significant( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** IgG antisperm antibodies can affect the functional integrity of human sperm membrane and pressure sensitive  $Ca^{2+}$  influx.

**Key words** antisperm antibody; sperm; calcium ion; hypotonic swelling test

细胞内  $Ca^{2+}$  是重要的第二信使物质,精子细胞也不例外, $Ca^{2+}$  在精子获能和顶体反应中起着重要作用<sup>[1]</sup>。Rossato 等研究证明,随着精子细胞肿胀可以同时出现大量  $Ca^{2+}$  内向通道打开,细胞内钙离子会瞬间增加,称为压力敏感性  $Ca^{2+}$  内流。而且,这种压力敏感性  $Ca^{2+}$  内流是引起精子顶体反应的有效刺激,并足以使卵母细胞受精<sup>[2-4]</sup>。在女性宫腔内,渗透压广泛的不同,精子暴露在这种

细胞外液中,造成这种由弱的低渗刺激导致的内向通路的激活和接踵而来的  $Ca^{2+}$  内流在卵子受精过程中起着决定性调节作用。

我们先前已经对抗精子抗体(AsAb)阳性的不育患者和正常生育人进行过对比实验,发现前者的精子尾部总肿胀率明显的低于后者的<sup>[5]</sup>,并由此推测 AsAb 对人精子膜功能具有损害作用,从而影响精子的受精能力。这个试验结果已经发表在当年的中国男科学杂志上。本研究是在先前试验的基础上进一步探讨在正常精液中加入 IgG 类抗精子抗体阳性精浆对人精子膜功能完整性及压力敏感

\*基金项目:山西省卫生健康委科研项目(No:2018117)

<sup>1</sup>山西医科大学附属大同市第三人民医院泌尿外科(山西大同,037008)

<sup>2</sup>山西医科大学第一医院泌尿外科

性  $Ca^{2+}$  内流的影响,从而丰富 AsAb 引起不育的基础理论,希望能为指导治疗免疫性不育以及开发新型避孕药提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

正常生育组为 15 例健康已婚已生育男性自愿者,年龄在 22~36 岁。禁欲 3~7 d,手淫法取精,均行精液常规分析和精浆、血清 AsAb 检测,要求常规符合 WHO 规定的正常标准且 AsAb 同时为阴性。

在门诊的不育患者中收集精浆 IgG AsAb 阳性患者 30 例,他们的年龄在 22~36 岁,禁欲 3~7 d,手淫法取精,均行精液常规分析。

### 1.2 试剂和溶液

精子膜表面抗体 IgG 检测试剂盒(MAR)购自深圳华康生物医学工程有限公司,Earle's 液(Earle's Balanced Salt Solution;500 mL)购自 Sigma 公司, $Ca^{2+}$  荧光探针 fura-2/AM(Fura-2, AM ester;100  $\mu$ g)购自 Biotium 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 MAR 法筛选 IgG AsAb 阳性精液** 按 MAR 试剂盒(深圳华康生物医学工程有限公司)说明操作,检测出 IgG 抗体后,将 IgG 抗体阳性精浆置 -20℃ 冰箱冻存备用。

**1.3.2 精液标本处理及分组** 标本的处理:正常精液标本在 37℃ 水浴箱中 30 min 内完全液化的,通过上游法优选出活力良好的精子,最终用 Earle's 培养液调整精子密度至  $20 \times 10^6$  /mL 备用。将前面备用的 IgG 类阳性精浆由冷冻复温至 37℃。试验分组:将上面的正常精子悬液分装于 50 支试管内,平均每管 2 mL。首先随机选取 10 管作为正常精浆对照组,每管中加入不含 AsAb 的正常精浆 2 mL。然后再随机选取 10 管作为 Earle's 培养液对照组,每管中加入 Earle's 培养液 2 mL。最后剩下

的 30 管作为试验组,每管中加入 IgG 类 AsAb 阳性精浆 2 mL。

**1.3.3 低渗肿胀(HOS)试验** 各组分别编号后,从每管中各取一滴精子悬液滴于显微镜下,计数 200 个精子中 g 型精子百分率、精子尾部总肿胀率。然后再用加样器取 10  $\mu$ L 精液和 40  $\mu$ L  $0.0015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  伊红 Y 水溶液混匀于载玻片上,盖上盖玻片;2 min 后在 400 倍的显微镜下计数 200 个精子,记录并算出 g 型精子百分率和总肿胀精子百分率。用加水后的百分率减去相应加水前的百分率,即为 HOS 试验中出现反应的实际百分率。

**1.3.4 精子细胞内钙离子的测定** 参照 Rossato<sup>[6]</sup>方法,将荧光探针 fura-2/AM 分别加入到编了号的每管中,使其终浓度达 2  $\mu$ mol/L,经过 37℃ 孵育 30 min,使荧光探针负载了  $Ca^{2+}$ ,然后在  $500 \times g$  下离心 10 min,弃去上清液,沉淀用 Earle's 液调整精子密度至  $5 \times 10^6$  /mL,制成精子悬液。取 0.5 mL 精子悬液放入,用磁性搅拌子搅匀,用 RF-540 荧光分光光度计检测荧光强度。计算使其渗透压减小 30% 的蒸馏水量,加入比色杯中,再次检测荧光强度。对前后相应两次的各荧光强度值分别进行对比计算。

### 1.4 统计学方法

用 SPSS 20.0 统计软件对所得的实验数据进行统计学分析。对各组计数的 g 型精子百分率和总肿胀精子百分率以及计算出的胞内钙离子荧光差值分别进行方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AsAb 对精子 HOS 试验的影响

试验数据表明无论是 g 形精子百分率还是精子尾部总肿胀率,试验组的都明显低于两个对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。两个对照组比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 AsAb 对精子 HOS 试验的影响

组别	例数	g 型精子/%	总肿胀精子/%
正常精浆对照组	10	36.642 1±14.758 82 <sup>1)</sup>	79.485 3±6.234 28 <sup>1)</sup>
Earle's 培养液对照组	10	34.316 9±6.805 31 <sup>1)</sup>	82.561 7±11.544 12 <sup>1)</sup>
试验组	30	11.469 7±6.504 10	49.518 7±10.095 91

与试验组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$

### 2.2 AsAb 对人精子压力敏感性 $Ca^{2+}$ 内流的影响

因为细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的改变与细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度差值呈正比,所以可以通过比较  $Ca^{2+}$  荧光强度差值来反应  $Ca^{2+}$  浓度的改变。试验数据表明比较精子细胞内  $Ca^{2+}$  荧光强度差值:试验组的明显低于两个对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );两个对照组之间差异无统计学意义。见表 2。

表 2 AsAb 对精子压力敏感性  $Ca^{2+}$  内流的影响

组别	例数	$Ca^{2+}$ 荧光差值
正常精浆对照组	10	11.543 0±3.587 35 <sup>1)</sup>
Earle's 培养液对照组	10	10.914 5±4.156 43 <sup>1)</sup>
试验组	30	6.326 1±2.102 54

与试验组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

AsAb 是目前导致不育的明确原因之一,其对生育力影响的具体环节包括:精子凝集、运动能力、穿越宫颈黏液的能力、顶体反应、结合与穿越透明带的能力、精卵结合等<sup>[7-8]</sup>。为此,我们的团队也在这方面进行了多年研究,以期进一步完善这个领域的理论并给予指导临床。

近年来男科学领域研究工作飞速发展,其中对精子功能方面的研究也越来越受重视。正常精子表面有一层完整的质膜,精子活率染色仅仅能检测由于精子死亡而导致的精子质膜发生的物理改变。然而精子膜物理结构完整的精子其功能可能已经丧失,膜功能完整的精子其物理结构一定完整。HOS 试验与精子活率染色不同,它不仅反应精子膜物理的完整,还可以通过评价精子质膜在低渗溶液中对水的通透能力和随后导致的细胞肿胀和质膜牵伸能力来反应其功能的完整性。如果质膜在低渗溶液中对水通透很好,可以自然牵伸,精子细胞肿胀良好,则认为精子质膜功能和物理结构完整,否则认为精子质膜功能不完整,受精能力差。膜的物理结构和功能完整是精卵融合的必要条件<sup>[9]</sup>,所以 HOS 在一定程度上可以反应精子的受精能力,WHO 已于 1992 年推荐了该试验的方法与判别标准<sup>[10]</sup>。

肿胀程度最好的精子其形状呈“g”型,表明它的结构完整,功能良好,具备良好受精能力的潜能。当精子膜不完整或结构受损时,精子膜内外就不会再有渗透压差,蒸馏水就不再在膜内外流动,精子尾部就肿胀不完全或者不发生肿胀,这样的精子功能不完整,受精能力一定很差。WHO 推荐的 HOS 试验正常参考值:“g”型精子百分率  $> 33.2\% \sim 43.8\%$ ,总肿胀精子百分率  $> 70.2\% \sim 84.9\%$ <sup>[11]</sup>。

HOS 试验是反应精子尾部低渗肿胀的试验,而精子细胞肿胀瞬间可以产生压力敏感性钙离子内流。近 30 年多来,出现了很多细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的测定方法,如离子选择性微电极、钙激活的光蛋白等,这些方法普遍反应速度慢、灵敏度低。1985 年美国加州大学 Grynkiencz 合成的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针 fura-2,因其具有灵敏度高、波长漂移、反应速度快等优点,已经得到了广泛应用。fura-2 之所以可以测定  $\text{Ca}^{2+}$ ,是因为 fura-2 及其与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的复合物最大激发光波长分别为 380 nm 和 340 nm,这些发射光的强度与  $\text{Ca}^{2+}$  呈比例关系<sup>[12-13]</sup>。

本试验通过在正常精液中加入 IgG 类抗精子抗体阳性精浆与加入正常精浆及 Earle's 培养液进行对照,研究了 AsAb 对人精子膜功能完整性及压力敏感性  $\text{Ca}^{2+}$  内流的影响。结果发现,试验组的精子尾部总肿胀率和细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度差值均

明显低于两个对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。我们的研究结论和 Omu 等<sup>[14]</sup>的一项研究相吻合,他对单纯因 AsAb 导致的不育患者进行了一项临床试验,长期给予这些不育患者口服皮质类固醇,结果发现他们的妊娠率、精子动力和 HOS 试验分数都得到了改善。这个试验也从临床的角度印证了抗精子抗体可以损害精子质膜的功能<sup>[15]</sup>。

综上所述,本文从体外试验再次证实了 AsAb 可以改变精子膜功能的完整性,抑制压力敏感性  $\text{Ca}^{2+}$  内流,而膜的完整是精卵融合的必要条件,压力敏感性  $\text{Ca}^{2+}$  内流可以调节受精过程,这些可能是其导致不育的原因之一。这也可能会成为一项基础研究成果来解释免疫性不育,或者可能会为临床上在做辅助生殖时 AsAb 阳性患者受精和妊娠率低的原因。

### [参考文献]

- 1 Wei C, Zhang Y, Li R, et al. Terahertz irradiation-induced motility enhancement and intracellular calcium elevation in human sperm in vitro[J]. *Biomed Opt Express*, 2018, 9(9):3998-4008.
- 2 Rossato M, Di Virgilio F, Foresta C. Involvement osmosensitive calcium influx in human sperm activation[J]. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(12):903-909.
- 3 Ahmad E, Naseer Z, Uçan U, et al. Seasonal variations in sperm acrosome reaction, osmotic tolerance and serum testosterone concentrations in rams[J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 198:112-120.
- 4 Xu YR, Yang WX. Calcium influx and sperm-evoked calcium responses during oocyte maturation and egg activation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51):89375-89390.
- 5 刘晓峰, 刘喜军, 俞海涛. 抗精子抗体对人精子膜功能完整性的影响[J]. *中国男科学*, 2009, 23(4):61-62.
- 6 Rossato M, Galeazzi C, Ferigo M, et al. Antisperm antibodies modify plasma membrane functional integrity and inhibit osmosensitive calcium influx in human sperm[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(8):1816-1820.
- 7 朱伟杰. 抗精子抗体介导不育的再认识[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(1):5-9.
- 8 Cui D, Han G, Shang Y, et al. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444:29-36.
- 9 Olli KE, Li K, Galileo DS, et al. Plasma membrane calcium ATPase 4 (PMCA4) co-ordinates calcium and nitric oxide signaling in regulating murine sperm functional activity[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1):11-22.
- 10 Check JH, Aly J. Sperm with an abnormal hypo-osmotic swelling test—normal fertilization, normal embryo development, but implantation failure[J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2016, 43(3):319-327.

(下转第 303 页)

且多通道要求穿刺技术较高,难以达到精确的建立多通道,该术式可有效减少通道建立,利于有效开展复杂性肾结石的治疗。⑦对于无积水肾结石,可软镜先部分碎石后使肾脏内形成腔隙,且通过软镜鞘进行人工肾积水效果较输尿管导管更明显,便于经皮肾穿刺及通道的建立。⑧软镜可监视经皮肾穿刺及扩张过程,明确是否是穹隆穿刺,以及扩张深度,有效降低出血风险,保证视野清晰<sup>[9]</sup>。⑨经皮肾镜高流量的冲洗,能使软镜视野更加清晰。⑩合并同侧或对侧输尿管结石可同期处理而无需多次变换体位。

综上所述,斜仰卧位经皮肾镜联合逆行输尿管软镜治疗复杂性肾结石使二者优势相互结合,取长补短,较单纯经皮肾碎石术提高了结石清除率,缩短手术时间,有效地减少了通道的建立,减少出血及其他并发症的风险,值得大力推广应用。

#### [参考文献]

- Matlaga BR, Jansen JP, Meckley LM, et al. onomic outcomes of treatment for ureteral and renal stones: a systematic literature review[J]. J Urol, 2012, 188(2): 449-454.
- 那彦群, 叶章群, 孙颖浩, 等. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 2014版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 166-167.
- AKamn T, Binbay M, Sarie F, et al. factors affecting bleeding during percutaneous. Nephrolithotomy single surgen experience[J]. J Endourol, 2011, 25(2): 327-333.
- 周可义, 赵春利, 杨文增, 等. 可视标准通道联合可视超细通道经皮肾镜取石术精准穿刺治疗复杂性肾结石的临床应用[J]. 中国内镜杂志, 2017, 23(7): 109-112.
- Hamamoto S, Yasui T, Okada A, et al. Endoscopic combined intrarenal surgery for large calculi: simultaneous use of flexible ureteroscopy and mini-percutaneous nephrolithotomy overcomes the disadvantageous of percutaneous nephrolithotomy monotherapy[J]. J Endourol, 2014, 28(1): 28-33.
- Zheng C, Yang H, LOU J, et al. Extracorporeal shock wave lithotripsy versus retrograde intrarenal surgery for treatment for renal stoned 1-2cm: a meta-analysis[J]. Urolithiasis, 2015, 43(6): 549-556.
- Xu C, Song RJ, Jiang MJ, et al. Flexible ureteroscopy with holmium laser lithotripsy: a new choice for intrarenal stone patients[J]. Urol Int, 2015, 94(1): 93-98.
- 程跃, 谢国海, 严泽军, 等. 逆行输尿管软镜联合可视微通道经皮肾镜一期治疗鹿角形肾结石的临床分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2016, 37(2): 127-130.
- 戴枫, 糜远源, 王建, 等. 斜侧卧位经皮肾微通道双镜指引下气压弹道联合钬激光治疗复杂性肾结石的疗效观察[J]. 现代泌尿外科杂志, 2015, 20(10): 705-707.  
(收稿日期: 2019-08-02)
- (上接第 299 页)
- Zubair M, Ahmad M, Jamil H. Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test[J]. Andrologia, 2015, 47(7): 744-750.
- Kopp RF, Leech CA, Roe MW. Resveratrol Interferes with Fura-2 Intracellular Calcium Measurements[J]. J Fluoresc, 2014, 24(2): 279-84.
- Johnson M. Calcium Imaging of Store-Operated Calcium(Ca<sup>2+</sup>)Entry(SOCE)in HEK293 Cells Using Fura-2[J]. MethodsMol Biol, 2019, 1925: 163-172.
- Omu AE, al-Qattan F, Abdul-Hamada B. Effect of low dose continuous corticosteroid therapy in men with antisperm antibodies on spermatozoa quality and conception rate[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1996, 69(2): 129-134.
- Tadros NN, Sabanegh ES. Empiric medical therapy with hormonal agents for idiopathic male infertility[J]. Indian J Urol, 2017, 33(3): 194-198.  
(收稿日期: 2019-07-25)