

精浆超氧化物歧化酶活性与精子活力的关联分析

余波澜 陈康 周华 袁静茹 刘敏 高兴成

【摘要】 目的 探讨精浆 SOD 活性与精子活力的相关性以及 SOD 活性用于临床诊断的可行性。**方法** 194例精子活力正常和228例精子活力低下的男性进行精液常规分析,通过 Dojindo 四氮唑盐(WST-1)底物比色法和二喹啉甲酸法(BCA)对其精浆 SOD 活性及精浆总蛋白含量进行测定。**结果** 每毫升精浆中 SOD 活性在两组中没有明显差异,但是每毫克精浆蛋白中 SOD 活性在低精子活力组中显著下降($P < 0.0001$)。SOD 活性在正常对照组和低精子活力组中均有较大的个体差异。ROC 曲线分析表明两组之间没有显著的阈值区分($A_z = 0.644$)。**结论** 精浆 SOD 活性与精子活力具有显著相关性,但是临床利用 SOD 活性进行弱精症诊断的准确性较低。

【关键词】 不育,男(雄)性; 超氧化物歧化酶; 精液; 精子活力

An association analysis of seminal SOD activity and sperm motility YU Bo-lan, CHEN Kang, ZHOU Hua, YUAN Jing-ru, LIU Min, GAO Xing-cheng. Maternity Institute, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China

Corresponding author: GAO Xing-cheng, Email: gaoxingcheng@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the association of seminal SOD activity with sperm motility and the possibility of clinical diagnosis using SOD activity assay. **Methods** Semen parameters of 194 subjects with normal sperm motility and 228 subjects with low sperm motility were analyzed in the reproduction medicine center of our hospital. Individual seminal SOD activity and seminal protein concentration were determined by colorimetric assay using Dojindo WST-1 substrate and by BCA method. **Results** There was a significant decrease in mean SOD activity measured in units per mg of seminal protein in subjects with low sperm motility compared to controls ($P < 0.0001$), but no significant difference of SOD activity in units per ml of seminal plasma was found between controls and cases. Large variations in individual SOD activity existed in both controls and cases, and ROC curve analysis showed no threshold value could be identified to separate semen samples with normal and low sperm motility. **Conclusions** The seminal SOD activity is significantly associated with sperm motility. However, it is difficult to apply SOD activity for asthenozoospermia diagnosis in clinic due to its low predictability.

【Key words】 Infertility, male; Superoxide dismutase; Semen; Sperm motility

近几十年来不育症已经成为一个世界性的健康问题,全球范围内大约每7~10对夫妇中就有1对受到不育症的困扰。精液质量缺陷是造成不育的重要原因之一。已知许多病理因素可能影响精液质量,包括基因缺陷、生殖道感染、外科手术和药物干预等,然而,原发性的精液异常和精子活力低下的原因和分子机制尚不清楚^[1]。过度氧化应激(excessive oxygen stress)是男

性不育的重要诱发因素之一。生精过程中旺盛的氧化代谢,生殖道中的免疫反应,以及其他有害环境因子均可产生大量活性氧物质(ROS)^[2]。尽管低浓度的ROS可能对精子的获能和顶体反应有着有利的影响,但是过量ROS会非特异性地氧化生物大分子包括核酸、蛋白和膜脂等,从而引起细胞损伤和凋亡^[3-4]。人类精子由于其浆膜上富含多聚不饱和脂肪酸而特别容易形成氧化损伤,因此,研究氧化损伤的相关病理机制对于进一步阐明精液原发性质量低下的发病机制具有重要的科学和临床意义^[5]。超氧化物歧化酶(SOD)是精浆中的主要抗氧化物酶类,其分布和含量可能直接与精子活力相关。本研究通过 Dojindo 四氮唑盐(WST-1)底物比色法和二喹啉甲酸法(BCA)测定了422例精子活力正常和低下男性中精浆 SOD 活性和精浆总蛋白浓

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.09.025

基金项目:广州市科信局科技攻关项目(2010J-E541);广东省科技厅科技计划项目(2008年146号)

作者单位:510150 广州医学院第三附属医院妇产科(余波澜、周华、袁静茹、刘敏),泌尿外科(陈康、高兴成)

通讯作者:高兴成,Email:gaoxingcheng@163.com

度,旨在探讨SOD酶对精子活力的影响及其应用于临床的可行性。

资料与方法

一、研究对象

2011年2月至2011年8月在广州医学院第三附属医院进行精液常规检测的广东男性422例。纳入标准为:(1)年龄介于20~50岁;(2)进行过两次及以下的精液常规检查,其检查结果一致;(3)精浆果糖和中性 α -葡萄糖苷酶表达正常;(4)无其他疾病。根据世界卫生组织标准(1999),在422例男性中,194例为精子正常者,228例为低精子活力者^[6]。

二、实验方法

1. 试剂和仪器:SOD活性检测试剂盒购自上海Sigma公司。BCA蛋白浓度检测试剂盒购自Thermo-ScientificPierce公司。SOD和BCA结果用Thermo公司的MULTISKAN MK3分析仪进行测定。精子密度、活力和形态等通过Himlton CASA分析仪和Nikon显微镜进行分析。

2. 精液采集和分析:精液样品从禁欲2~7 d的患者通过手淫法收集得到。样品在37℃液化30 min后,其精液量、pH值、精子密度、存活率、活动力、形态和CASA的分析严格按照世界卫生组织标准执行^[6]。快速前向运动精子(A级)比率小于25%或总前向运动精子(A+B级)少于50%的精液标本诊断为精子活力低下。

3. SOD活性和总蛋白浓度测定:SOD的活性利用Dojindo四氮唑盐作为底物进行化学比色法测得。精浆总蛋白浓度利用BCA测定获得。每份精浆标本稀释20倍后按照试剂盒说明书分别进行SOD活性检测和蛋白浓度测定,最终每个样品的SOD活性换算成U/ml和U/mg。

三、统计学分析

实验结果用GraphPad Prism 4.0软件进行独立样品 t 检验,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。对SOD活性和精子活力进行箱线图和ROC曲线分析利用PASW Statistics 18软件获得。

结 果

1. 研究对象的临床数据:本研究中194例正常对照和228例低精子活力患者的年龄和精液分析参数见表1。两组个体的平均年龄和精液量无统计学差异($P = 0.571$ 和 $P = 0.775$),但是低精子活力组中,精子密度、A级精子、B级精子、前向运动精子(A+B级)、精子存活率均显著低于正常组;而该组的不动精子(D

级)、SDI指数、TZI指数和精子畸形率均显著高于正常组(所有 $P < 0.0001$),表明低精子活力组的精液质量包括密度、活力和形态等均较正常组低。

2. 精浆SOD活性与精子活力有关:正常组和低精子活力组的精浆总蛋白含量(mg),SOD单位活性(U/ml)和SOD单位活性(U/mg)见表2。数据表明,低精子活力组的总蛋白含量显著高于正常对照组($P < 0.001$)。两组之间,以U/ml标定的SOD单位活性无统计学差异($P = 0.978$),但是以U/mg标定的SOD单位活性有统计学差异($P < 0.0001$)。

3. SOD活性用于临床诊断的可行性分析:图1中的箱线图统计了正常对照组和低精子活力组个体数据的上下四分位数及除异常值外的最大值和最小值,中间横线是中位数,可以用来比较两组样本的分布情况。图1表明,两组中SOD活力的个体数据分布有明显差异,其中位数分别为2.957和2.434,上下四分位数分别为2.332、3.691和1.945、3.057。但是两组中SOD活力的样本分布有明显交叉,因此很难找到合适的阈值用以区分正常组和病例组。以SOD活性(U/mg)为检验变量,精子活力分组为状态变量进行ROC曲线分析的结果见图2。分析表明其曲线下面积为0.644,标准误为0.027,渐近95%置信区间为(0.592~0.697)。ROC曲线可以对医学诊断试验性能进行评价,通过估计ROC曲线下的面积大小可作为某一诊断方法准确性评价的指标。本研究中ROC曲线下面积为0.5~0.7,表明临床利用SOD活性进行低精子活力病理诊断的准确性较低。

讨 论

在人类精液中,SOD酶大量表达,其浓度约为血液中含量的20倍;同时,在哺乳动物中SOD酶的表达高度保守,表明该酶在正常生理过程中具有至关重要的作用^[7]。利用动物模型已经发现精液质量与SOD的活性密切相关^[8-9]。

我们的研究证实,在精子活力低下的男性中精浆SOD活性明显下降,表明精浆中该酶活性与精子活力有关。同时,在所有样本中,表征前列腺功能的精浆果糖和表征精囊和附睾功能的中性 α -葡萄糖苷酶表达均为正常水平,提示精浆SOD表达水平的降低与副性腺的功能无直接关联。国内外相关研究曾报道,不育症患者精浆中的SOD活力显著低于正常男性,抗精子抗体阳性及支原体感染亦可引起精浆中的SOD活性下降^[10-12]。但是,也有文献表明,精浆SOD活力与男性育性无明显关联^[13-15]。通过比较这些文献中的实验方法,我们认为,除了遗传背景差异和样本群差异,SOD

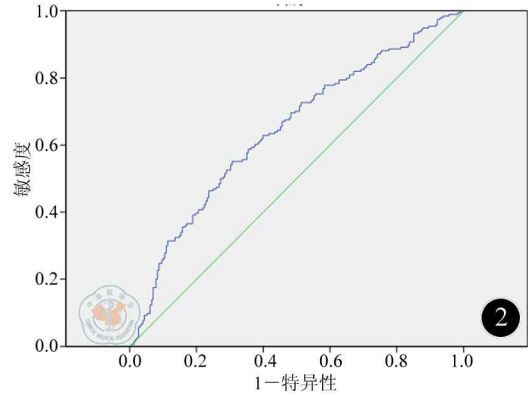
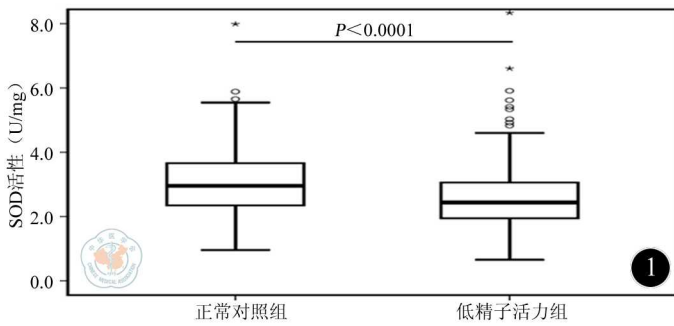


图1 SOD活性在正常对照组和低精子活力组中的样本分布 图2 利用SOD活性诊断低精子活力的ROC曲线分析

表1 正常对照组和低精子活力组的年龄和精液参数($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄 (岁)	精子密度 ($10^6/ml$)	精液量 (ml)	A级精子 (%)	B级精子 (%)	A+B级精子 (%)	D级精子 (%)	存活率 (%)	SDI 指数	TZI 指数	畸形率 (%)
正常对照组	194	34.8 ± 5.2	114 ± 65	3.4 ± 1.4	46 ± 9	21 ± 7	67 ± 8	24 ± 8	90 ± 5	1.21 ± 0.11	1.32 ± 0.11	92 ± 5
低精子活力组	228	35.1 ± 6.2	43 ± 40	3.4 ± 1.5	8 ± 6	11 ± 6	18 ± 9	77 ± 13	68 ± 19	1.42 ± 0.16	1.45 ± 0.16	97 ± 3
P 值		0.571	<0.0001	0.775	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

表2 正常对照组和低精子活力组的 SOD 活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	总蛋白含量 (mg)	单位 SOD 活性 (U/ml)	单位 SOD 活性 (U/mg)
正常对照组	194	124 ± 59	106 ± 30	3.1 ± 1.1
低精子活力组	228	147 ± 72	106 ± 28	2.6 ± 1.0
P 值		<0.001	0.978	<0.0001

活性的检测方法及测量方式可能影响实验结果。Dojindo 四氮唑盐法是最近发展的高度水溶性显色底物,能够利用比色法简单快捷准确地测定样本中总 SOD 的活性。因此,我们利用这一方法在大样本群中测得的 SOD 总活性具有较好的代表性。

我们的数据表明,当 SOD 活性用单位每毫升来标定时,低精子活力组和正常组中无统计学差异;但是当 SOD 活性用单位每毫克蛋白来标定时,则有统计学差异,即每单位体积中的 SOD 活性在弱精症患者中无明显变化,但在单位质量蛋白中的 SOD 活性下降。通过进一步比较发现在弱精症患者中的精浆蛋白浓度要高于正常对照组,这个结果目前还没有相关研究报道。最新研究表明,弱精症患者的精浆中有着大量的特异性蛋白表达,但是相关机制不是非常清楚^[16]。我们认为弱精症患者可能通过未知的机制改变了精浆蛋白表达的组成比例,降低了包括 SOD 在内的部分蛋白含量,但是其详细分子机制尚待深入研究。

值得注意的是,虽然 SOD 活性与精液质量的关系已有多年研究,然而,迄今这一重要生化指标尚未用于

临床检测。部分原因可能是文献报道中 SOD 活力的个体差异较大,尚无统一的可以用于临床检验的阈值^[7,10-15,17]。我们利用 Dojindo 四氮唑盐法测得的 SOD 总活力个值在 100 ~ 200 U/ml 和 2 ~ 4 U/mg(表 2),同时数据表明人群中 SOD 的个值差异较大(图 1)。在正常组中,极值为 8.0 和 1.0,其上下四分位数为 2.3 和 3.7。在低精子活力组中,极值为 8.3 和 0.7,其上下四分位数为 1.9 和 3.1。因此,正常对照组和低精子活力组中的 SOD 个值分布交叉明显,很难找到合适的阈值界定正常组和异常组(图 1)。同时,ROC 曲线分析也证明了这一点,利用 SOD 活性(U/mg)为检验变量,精子活力分组为状态变量的 ROC 曲线下面积为 0.644,表明其诊断准确性较低(图 2)。综上所述,我们认为较大的 SOD 个值差异是 SOD 活性研究尚未应用于临床的重要原因之一。

精浆 SOD 酶活力的表达差异可能具有病理性和遗传性等多种原因。研究报道生殖道感染及精索静脉曲张等疾病均有可能引起精浆中 SOD 的活性下降,而环境中有害物质产生的亲电性小分子能够修饰细胞内 SOD 酶,造成该酶的损伤和降解^[2]。同时,遗传多态性也能造成部分人群中 SOD 活力先天性的低下。报道表明具有 SOD 酶基因缺陷的人群中,该酶的活性明显下降;而基因多态导致的 SOD 酶活力下降与人类多种疾病的发生相关^[18-19]。此外,SOD 酶的表达受细胞内 Nrf2-ARE、 β -catenin、FOXO 等多条信号通路的调控,因此相关信号通路的缺陷也可能直接影响其表达活

性^[20]。这些导致精浆 SOD 酶活力下降的病理生理学原因和遗传学原因值得我们进一步地深入研究。此外,已知精子中也含有大量的 SOD,其含量可能与男性不育的发生有关。但是部分弱精症患者精子密度较低,很难获得足够的精子进行活性分析,因此目前大部分文献均采用测定精浆 SOD,而没有同时检测精子 SOD 活性。因此,将来可能需要更为灵敏的检测方法来深入的研究精子 SOD 和精浆 SOD 两者之间可能的协同关系及与不育的关联性。

参 考 文 献

- [1] de Kretser DM. Male infertility. *Lancet*, 1997, 349:787-790.
- [2] Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 1999, 5:399-420.
- [3] Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978, 201:875-880.
- [4] Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3:203-213.
- [5] Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, et al. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4:111-118.
- [6] World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edition. New York: Cambridge University Press, 1999.
- [7] Peeker R, Abramsson L, Marklund SL. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3:1061-1066.
- [8] Kawakami E, Takemura A, Sakuma M. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci*, 2007, 69:133-136.
- [9] 刘超,任有蛇,张春香,等.山羊精液中抗氧化酶活性与精子活力的相关性分析. *中国草食动物*, 2010, 30:30-32.
- [10] 张金萍,张雷家.精浆超氧化物歧化酶与男性不育的关系分析. *济南医学院学报*, 1999, 22:18-19.
- [11] 万长春,汪泓,郝宝金.不育男性精浆锌、铜和超氧化物歧化酶与衣原体感染的关系. *中国男科学杂志*, 2007, 21:37-39.
- [12] 张海峰,李建忠,张春影.精浆抗精子抗体阳性不育患者顶体酶及 SOD 活性的变化. *中华男科学杂志*, 2006, 12:349-351.
- [13] 陈国千,陆永绥.生育和不育男性精液 SOD 活性的研究. *中华泌尿外科杂志*, 1994, 8:290-291.
- [14] Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, et al. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J Clin Lab Anal*, 2002, 16:127-131.
- [15] Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*, 1993, 16:183-188.
- [16] 白洁,傅淑宏,蔡力力,等.人精浆中弱精子症相关蛋白质的“shot-gun”鉴定. *中华男科学杂志*, 2010, 16:201-211.
- [17] Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, et al. Impaired Seminal Antioxidant Capacity in Human Semen with Hyperviscosity or Oligoasthenozoospermia. *J Androl*, 2001, 22:798-803.
- [18] Woodson K, Tangrea JA, Lehman TA, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, a-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study (Finland). *Cancer Causes Control*, 2003, 14:513-518.
- [19] Olson SH, Carlson MD, Ostrer H, et al. Genetic variants in SOD2, MPO, and NQO1, and risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2004, 93:615-620.
- [20] Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts; beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol*, 2007, 21:2605-2614.

(收稿日期:2011-12-26)

(本文编辑:郝锐)