经验交流

文章编号:1000-5404(2009)02-0184-02

流式细胞仪检测正常男性精子细胞凋亡

王 芳,罗 婧,王丽婷,孙 玮,张正治,潘 峰 (第三军医大学基础医学部中心实验室,重庆 400038)

随着工业化进程加快,人们生活更加方便快捷,生活水平也不断提高,不过人们在享受现代科技成果的同时,也在经受环境污染对健康的危害。特别是大量使用除草剂、杀虫剂、去污剂、洗涤剂等,这些物质被统称为内分泌干扰物(endocrine disrupting, EDs)。它们对男性生殖功能的影响,已引起社会各界的广泛关注[1]。

细胞凋亡存在于细胞的增殖、分化中,是一种正常的现象。检测精子细胞凋亡,是从分子水平评价精子功能的重要指标。精子细胞凋亡率与男性生育能力密切相关[2]。本实验用流式细胞术检测重庆市近郊男性精子细胞的凋亡,以了解目前生态环境下男性生育能力的变化。

1 材料与方法

1.1 精液样本

受试者来自于重庆市近郊,以社区为单位,以25~45岁的在近2年内有生育史的青壮年汉族男性为目标人群进行收集,共60例。禁欲3~5 d手淫法采集精液,按1992年WHO精液常规检测标准(包括精液颜色,精液量,pH值,精子浓度、活率、活动力和形态等指标)选择实验阴性对照,然后37 ℃水浴箱保存,3 h内送达实验室。

1.2 主要试剂及仪器

Annexin-V FITC/PI试剂盒购自碧云天公司,采用美国Becton Dickinson公司的FACS Calibur型流式细胞仪。

1.3 方法

用Annexin-V FITC/PI试剂盒小心吸取精液样本上层云雾状细胞50 μl,加入145 μl结合缓冲液,加入5 μl FITC,避光室温孵育10 min,1 500 r/min离心10 min,沉淀用200 μl结合缓冲液重悬,加入10 μl PI,1 h内上机检测。

1.4 流式细胞仪检测条件及参数

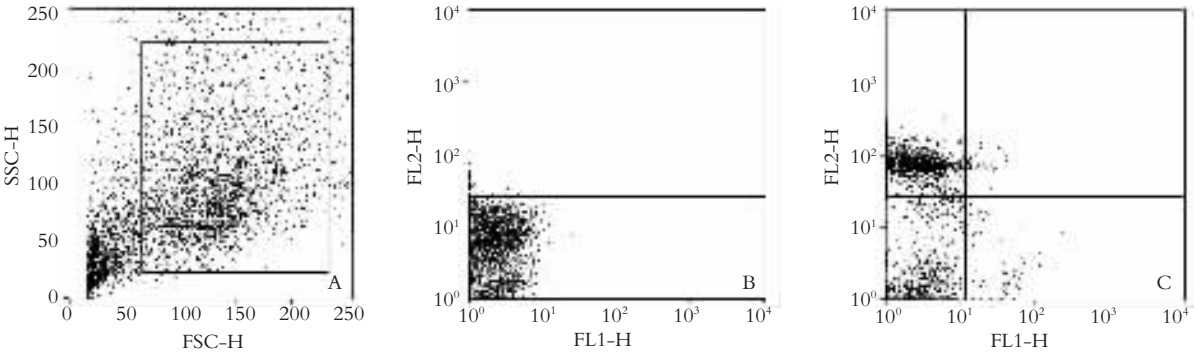
采用美国Becton Dickinson公司的FACS Calibur型流式细胞仪,激发光源,5 mW氩离子激光器,激光波长为488 nm。应用CellQuest软件收集及分析,用FL1通道收集FITC的信号,FL2收集PI信号。将光电二极管的电压设为E01,前向散射(FSC)参数设阈值为60,将进样速度控制在400~500个/s。精子细胞的FSC为横坐标,侧向散射(SSC)为纵坐标,以正常男性精子细胞为正常对照,获取精子细胞的散点图。调节FSC、SSC,把目标细胞群调在收集框中央位置,设门选取目标细胞群;然后调节FL1、FL2补偿值,获取荧光信号的双参数点图,FITC PI^-为双阴性细胞,$FITC^+ PI^-$为凋亡细胞,并将对照凋亡率调至4.9%以下,每个样品收集2万个细胞,逐一收集样品。

1.5 统计学处理

采用SPSS 10.1统计软件进行t检验。

2 结果

流式细胞仪检测结果见图1。对60例样本统计得出结论,重庆市近郊男性精子细胞凋亡率为(5.22±1.95)%。将Ricci等[3]报道的正常男性的精子凋亡率(4.9±3.3)%与本次实验结果进行单侧t检验,结果差异无统计学意义($P>0.05$)。将周增娣等[4]报道的具有正常生育能力的男性精子细胞凋亡率(5.3±2.7)%与本次实验结果经单侧t检验比较,结果差异也无统计学意义($P>0.05$)。



A:散点图; B: 阴性对照; C:收集样本

图1 本组男性精子细胞流式细胞仪检测结果

作者简介:王 芳,女,重庆市北碚区人,助理实验员,主要从事流式细胞仪及高效液相色谱仪分析方面的研究。电话:(023)68752353,E-mail: wangfangcxdoris@163.com

通信作者:潘 峰,电话:(023)68752349

收稿日期:2008-04-16;修回日期:2008-07-15

3　讨论

3.1　荧光染色方法对检测的影响

按 Annexin-V FITC/PI 试剂盒说明书操作步骤,在精子细胞悬液中,加入 5 μl Annexin-V/FITC 和 10 μl PI 混匀,于室温避光孵育 15 min 后,加 400 μl PBS,作流式细胞分析。FITC 的信号太弱,对照及实验样品的凋亡率 <1%,与实验结果不符。其原因是加入 PI 后,使液体局部碱性浓度过高而造成 Ca^{2+} 析出,导致 FSC 及 SSC 散点图的改变和细胞凋亡率的下降[5]。本研究结果表明:重庆市近郊男性精子细胞凋亡率为(5.22 ± 1.95)%。

3.2　Annexin-V 在检测细胞凋亡的作用

Annexin-V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂蛋白,含 319 个氨基酸,相对分子质量 35.8×10^3。凋亡早期,Ca^{2+} 浓度升高,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, Ps)由质膜内层转移至外层,Annexin-V 与 Ps 有高特异性结合。因此,用标记了的 Annexin-V 作为荧光探针,与凋亡细胞外侧暴露的 Ps 特异性结合,用流式细胞仪检测其凋亡,Annexin-V FITC/PI 是一种灵敏、准确、快速的方法[6]。

本研究将文献[3,4]报道的正常男性的精子凋亡率与本实验结果进行比较,结果差异均无统计学意义($P > 0.05$)。说明在目前的生态环境下,重庆市近郊男性生育能力未受到明显影响。

近年来,环境因素对男性生育能力的影响越来越明显。特别是 EDs 对动物雌激素、睾酮、甲状腺素、儿茶酚胺等呈显著干扰效应,其与人类生殖健康的关系非常密切。EDs 主要来源有以下 4 类:天然雌激素、人工合成雌激素、植物性雌激素和真菌性雌激素、环境化学污染物(如多氯联苯化合物、邻苯二甲酸酯类、有机氯杀虫剂、烷基酚类和双酚类等)。如果这些污染物排放入水体中,而水体自身的自净能力不足,则造成水体污染,从而对周边生活人群的健康造成影响[7]。流式细胞术是 20 世纪 70 年代发展起来的可快速进行单细胞定量分析的高技术。本实验用 Annexin-V FITC/PI 荧光染色,流式细胞检测精子凋亡率的方法既可定性又可定量,具有检测速度快、采集数据量大、分析全面客观等特点,而环境普查具有影响因素多,数据量大,范围广等特点,所以将流式细胞仪作为环境普查的一种筛查手段将会有广阔的运用前景。

关键词:精子细胞;凋亡;流式细胞仪
中图法分类号:R321.1　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] 张信连, 杨维东, 刘洁生. 环境内分泌干扰物对生物和人体健康的影响[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(6): 349 - 351.
[2] Oosterhuis G J, Mulder A B, Kalsbeek-Batenburg E, *et al*. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? [J]. Fertil Steril, 2000, 74(2): 245 - 250.
[3] Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, *et al*. Apoptosis in human sperm: Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes [J]. Hum Reprod, 2002, 17(10): 2665 - 2672.
[4] 周增娣, 马　丽, 葛争鸣, 等. 流式细胞术结合 FITC-Annexin V/PI 荧光染色检测人精子凋亡[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(10): 626 - 627.
[5] 尹　琰, 寿伟璋. 流式细胞术 Annexin V 细胞凋亡检测方法探讨[J]. 东南大学学报: 医学版, 2003, 22(3): 169 - 170.
[6] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, *et al*. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(1): 39 - 51.
[7] 金春峰, 蔡玉文. 环境内分泌干扰物对人类生殖健康的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(6): 45 - 46.

(编辑　王小寒)

《中华烧伤杂志》2009 年征订启事

《中华烧伤杂志》由中国科学技术协会主管、中华医学会主办,是全国烧伤学术界权威刊物。读者对象为从事烧伤和整形的临床医师,以及与烧伤医学研究有关的科研人员。烧伤病情复杂、并发症多,涉及许多相关医学科学,与病理生理学、病理学、免疫学、微生物学、细胞生物学、分子生物学、生物工程学等有密切关系。烧伤病程中出现的休克、感染、营养代谢、内脏并发症、水与电解质紊乱及创面修复等既是烧伤也是整个外科的基本问题。本刊将择优刊登上述内容的临床和实验研究论文,为读者提供烧伤及相关学科的新理论、新观点、新经验、新技术、新方法。《中华烧伤杂志》由国内著名烧伤外科及相关学科专家组成编委会,杂志具有科学性、实用性,内容新颖,可读性强。

目前《中华烧伤杂志》已被《CNKI 期刊全文数据库》、《中国科技论文统计源期刊》、《中国科学引文数据库统计源期刊》、《中文核心期刊要目总览》、《中文核心期刊(遴选)数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、《中文科技资料目录-医药卫生》、《中国期刊全文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》以及美国国立医学图书馆《医学索引》(IM)又称《Medline 数据库》、美国化学文摘社《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)、荷兰《医学文摘》(EMBASE)、《日本科学技术社科学技术数据库》(JST)、美国《乌利希国际期刊指南》等国内外重要检索机构收录,在国内医学期刊中具有较大影响。

本刊为双月刊,大 16 开,80 页哑光铜版纸印刷并配彩图,每期 14 元。邮发代号:78 - 131。欢迎广大作者和读者通过邮局订阅或直接向编辑部邮购。

汇款地址:重庆市沙坪坝区西南医院《中华烧伤杂志》编辑部　　**邮编**:400038
电话:(023)68754670-602,65460278　　**传真**:(023)65460398
E-mail:cmashz@ mail. tmmu. com. cn