维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0189－03

精子洗涤对精液中 HBV DNA 含量的影响

周　勤，姚珍薇

(重庆医科大学临床学院妇产科，重庆　400016)

【摘　要】目的：检查 HBV 感染者精液是否存在乙型肝炎病毒(HBV)，探讨精子洗涤是否能去除其中的 HBV DNA。方法：用实时荧光定量 PCR(FQ－PCR)法检测 57 名血清 HBsAg 阳性患者精液中 HBV DNA，采用 Percoll 非连续梯度离心及上游法分离其中 21 份精液，并对洗涤后标本进行 HBV DNA 检测。结果：62 份精液标本中有 15 份 HBV DNA 阳性，阳性率为 24.19%；21 份用于洗涤的精液标本中，有 7 份 HBV DNA 阳性，洗涤后仍有 6 份标本阳性。结论：部分 HBV 感染者精液具有传染性，精子洗涤不能完全去除精液中的乙肝病毒。将 HBV 感染者的精液用于人工授精或体外受精应慎重。

【关键词】乙型肝炎病毒；精液；精子洗涤

【中国图书分类法分类号】R373.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－03－13

The effect of sperm washing on hepatitis B virus concentration in semen

ZHOU Qin, YAO Zhenwei

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect hepatitis B virus (HBV) in semen and to find if sperm washing removes HBV DNA. *Methods*: Amplification by real－time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ－PCR) was used to detect viral DNA in semen samples of 57 HBsAg－seropositive patients. Twenty－one semen samples were washed, and spermatozoa were separated by discontinuous Percoll gradient centrifugation and the 'swim－up' method. The HBV DNA in post－washing samples was measured by FQ－PCR. *Results*: HBV DNA was detected in 15 of 62 semen samples, the positive rate was 24.19%. There were 7 positive cases in 21 samples before washing, the 6 cases except one were positive after washing. *Conclusion*: Part of semen of HBV infected patients is infective, and sperm washing does not remove HBV. It is cautious to use semen of the HBV infected patients in IVI or IVF.

【Key words】Hepatitis B virus; Semen; Sperm washing

乙型肝炎病毒(HBV)是严重威胁人类身体健康的传染性致病因子，我国现有慢性 HBV 感染者在 1 亿以上。HBV 可以通过母婴、血液、性行为及日常生活接触传播。自上世纪 70 年代有学者在乙肝患者精液中检出 HBsAg 以来，HBV 经精液水平传播或垂直传播逐渐受到重视。HBV 感染者的精液用 Percoll 非连续梯度离心及上游法处理后能否安全地用于人工授精或体外受精，国内外尚未见相关报道。本研究用 Percoll 梯度离心及上游法洗涤 HBV 感染者的精液，并用灵敏的 FQ－PCR 检测方法定量检测洗涤前后精液中的 HBV DNA，以了解常规精子洗涤对 HBV 感染者精液中 HBV DNA 载量的影响，洗涤后的精子是否能够安全地用于人工授精。

1　资料与方法

1.1　标本采集

2001 年 6 月～10 月，在我院传染科门诊采集 57 例男性 HBV 感染者精液及血液标本，其中"大三阳"41 例，"小三阳" 16 例。年龄 20～40 岁，平均 29.3 岁。禁欲 2～7 天，排尽尿后洗净双手，用手淫法射精于一干燥、清洁无菌的一次性敞口容器内，置 37℃ 孵箱内孵化 30min。共采得精液标本 62 份(其中 5 人采精 2 次，间隔 1～2 月)，洗涤精液标本 21 份，同时采集血清标本 55 份备检。

1.2　仪器及试剂

仪器　采用 Bio－Rad iCycler 荧光定量 PCR 检测仪(美国 BIO－RAD 公司)。

试剂　乙肝病毒核酸扩增荧光检测试剂盒由深圳匹基

作者介绍：周　勤(1975－　)，女，硕士研究生，主要研究方向：生殖生理。

基金项目：国家自然科学基金(编号：30170984)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

生物技术开发公司提供(生产批号:20010502)。精子洗涤试剂:10×Earle's 液、1×Earle's 液、Percoll 液均由 Sigma 公司生产,批号为 E7510、E7883、P7828。90%与 45%Percoll 液具体配制见文献[1]。

1.3 方法

1.3.1 精液常规分析,按 WHO 标准进行[2]。

1.3.2 Percoll 非连续梯度离心及上游法 将 1ml 90% Percoll 1 液加入锥形玻管底部,沿管壁在 90% Percoll 层上小心加上 1ml 45% Percoll 液,再在 45% Percoll 层上加 1ml 液化精液,注意不破坏三者间界面。离心 300g×20min。小心吸取 90% Percoll 液层及以下的精子沉淀 0.8ml,加入 1.5ml1×Earle 液中,用手指轻弹管底数下,使沉淀混匀。离心 300g×10min,取沉淀 0.5ml 小心加入 0.8ml1×Earle 液(圆底试管)底部,勿搅乱沉淀,试管倾斜 30 度置于孵箱中 37℃孵育 60min,轻柔吸取 0.4ml 上层清液,混匀后作精液常规分析。本研究共对 21 份新鲜精液进行精液处理,全部洗涤步骤均在 2h 内完成。

1.3.3 荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测洗涤前后精液中 HBV DNA 设置阴性、强阳性、临界阳性对照及各阳性参控品。严格按试剂盒操作方法提取精液中 HBV DNA,将对照品及所提取的精液标本 DNA 加入反应液中,置于定量 PCR 检测仪中扩增、检测。循环条件为 94℃ 1min 预变性,然后按 95℃ 5s、60℃ 30s,共做 45 个循环。结果判定:标准参控品 1~4 管,含量依次为 $10^4 \sim 10^7$copies/ml,测定阈值循环数(Threshold cycle,Ct),以 Ct 值为横坐标,HBV DNA 含量为纵坐标,电脑自动绘制标准曲线,并根据此自动计算出各标本的病毒含量。最低检出限:2×10^2copies/ml,批间误差:CV 值<15%。

1.4 统计学处理

t 检验、Spearman 等级相关。

2 结 果

2.1 FQ-PCR 检测精液与血清 HBV DNA

62 份精液标本中有 15 份 HBV DNA 阳性,阳性率 24.19%,拷贝数为 1.48×10^3/ml ~ 2.40×10^5/ml,平均拷贝数为 3.86×10^4/ml;55 份血清标本有 45 份阳性,阳性率为 81.82%,拷贝数为 4.31×10^4/ml ~ 2.88×10^8/ml,平均拷贝数为 2.33×10^7/ml。15 份精液阳性患者的血清 HBV DNA 均为阳性,拷贝数在 5.48×10^6/ml ~ 2.88×10^8/ml 之间。Spearman 等级相关分析:将血清与精液 HBV DNA 拷贝数的对数值进行直线相关分析,认为血清与精液病毒拷贝数等级间存在正相关关系。

表 1 血清与精液 HBV DNA 拷贝数关系

血清 HBV DNA 定量	PCR(例)	精液 HBV DNA 定量 PCR		
		阳性(例)	百分率(%)	拷贝数/ml
拷贝数>1×10^8/ml	2	2	100	5.55×10^4 和 2.89×10^4
拷贝数(1×10^7 ~ 1×10^8)/ml	21	6	28.57	1.70×10^4 ~ 2.40×10^5
拷贝数(1×10^6 ~ 1×10^7)/ml	17	3	17.65	1.55×10^4 ~ 6.85×10^4
拷贝数<10^6/ml 及阴性	15	0		
总 计	55	11	20	

$\gamma s_{校正}>3.09$, $P<0.01$

2.2 精子洗涤对精液 HBV DNA 拷贝数的影响

21 份用于精子洗涤的标本中有 7 份 HBV DNA 阳性,阳性率为33.33%,拷贝数在1.48×10^3/ml ~ 6.85×10^4/ml 之间,平均拷贝数为 1.95×10^4/ml;洗涤后仍有 6 份标本阳性,拷贝数在 2.31×10^2/ml ~ 4.92×10^4/ml 之间,平均拷贝数为 1.68×10^4/ml。

2.3 洗涤前后精液质量的改变

比较 Percoll 非连续密度梯度离心及上游法处理精液前后精子参数的变化,发现洗涤后精子活力、活动率及畸形率均明显改善;精子浓度较洗涤前下降约 2/3,检验差异有显著性。

表 2 洗涤前后精液中 HBV DNA 检测结果

病例号	精液 HBV DNA 拷贝数/ml	
	洗涤前	洗涤后
3	1.75×10^4	-
3*	2.63×10^3	1.03×10^3
5	1.70×10^4	1.03×10^4
7	6.85×10^4	4.92×10^4
11	6.85×10^4	4.92×10^4
36*	1.96×10^3	4.41×10^2
48*	1.48×10^3	2.31×10^2
N=7		

*表示第二次采精的标本,第二次采精时未同时采血,除 3 号外,其余 4 例第一次采精时未行精子洗涤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 洗涤前后精液质量的改变

	精子参数 $\bar{x} \pm s$			
	密度($\times 10^9$/L)	a+b 级(%)	活动率(%)	畸形(%)
洗涤前	48.81±19.15	40.76±6.07	71.00±4.95	25.33±4.79
洗涤后	15.19±7.43	64.10±10.80	82.14±5.78	5.10±2.93
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨 论

有报道用 Percoll 非连续梯度离心及上游法可去除或减少精液中人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)等病毒载量[3~6],将处理后的精子用于人工授精或体外受精,并未发现女方和新生儿受病毒感染[7,8]。目前认为 HIV 在 HIV 感染者精液中含量较低,主要并非分布于精子内,精子洗涤可使病毒载量减少到最低检出限之下,分离出的活动精子可以相对安全地用于人工授精和体外授精。这种精液处理方法使男方为病毒感染者的夫妇生育健康的婴儿成为可能。

本研究对 21 份 HBV 感染者精液采用 Percoll 非连续梯度离心及上游法分离出活动率高、畸形率低的优质精子,并对其用于人工授精或体外受精的安全性进行检测。发现在 HBV DNA 阳性的 7 份精液中仅 1 份(14.3%)洗涤后 FQ-PCR 未检测到病毒 DNA,其余 6 份洗涤后的精子标本仍呈阳性。该结果可能与乙肝病毒在精液中的特征性分布有密切关系。Hadchouel[9]最早在两名急性肝炎患者精液中发现 HBV DNA 可整合到精子 DNA 中。此后国内外均有报道在乙肝患者精子中发现游离或整合的 HBV DNA。HBV 可进入精子内,活精子还可以主动俘获外源性 HBV DNA[10,11]。提示 HBV 在精液中的分布可能与 HIV 等病毒不同,存在于精子内的乙肝病毒并非极少数,它们可以逃避离心、洗涤和精子上游一系列祛除非精子成分的洗涤步骤后仍存在于洗涤后的活动精子中。

本研究采用 FQ-PCR 定量检测 HBV 感染者血清及精液中的 HBV DNA。该系统具有独特的内标监控技术,不仅可防止扩增产物的污染,避免假阳性;同时也可避免样本抑制物、DNA 提取过程的丢失及误操作造成的假阴性,检测结果较为可靠。发现血清与精液病毒拷贝数等级间存在正相关关系,即血清拷贝数越高,精液 HBV DNA 检出率越高。提示精液与血液两体液系统在 HBV 入侵、感染、复制过程中存在一定联系;然而血清 HBV DNA 拷贝数为 5.48×10^6/ml ~ 2.88×10^8/ml,精液 HBV DNA 拷贝数为 1.48×10^3/ml ~ 2.40×10^5/ml,远较其血清低,提示 HBV 感染者精液的传染性较低。

在重复采精的 5 人中,4 人第一次精液 HBV DNA 检测呈阳性,其中 3 人在接受 Lamivudine 抗病毒治疗后 2 人精液病毒 DNA 转为阴性;而 1 例原本精液 HBV DNA 阴性的"小三阳"患者在其血清病毒 DNA 转阳后再次检测精液则呈阳性。说明 HBV 感染者精液带病毒状态和病毒载量可能随体内病毒复制状态改变而变化,抗病毒治疗不仅可降低患者血清中病毒载量,也可能会减少精液包括精子中的 HBV 载量。

综上,精子洗涤不能完全消除 HBV 经精液传播的危险性,HBV 感染者在接受人工授精或体外受精时不仅存在 HBV 水平传播的危险,也可能通过精子将乙肝病毒带入卵细胞,发生 HBV 垂直传播。因此精液 HBV DNA 阳性的 HBV 感染者在接受人工授精或体外受精前应进行正规的抗病毒治疗,待精液 HBV DNA 转阴后再授精。有条件者可检测洗涤后的精子是否带有 HBV,以使 HBV 水平传播或垂直传播可能性降低到最低限度。

参 考 文 献

[1] 尤洪兰,商学军,黄宇烽,等. Percoll 梯度离心结合上游法在人工授精中的应用[J]. 男科学报,1999;5(2):113-115.

[2] WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm - cervical mucus interaction. 3rd New York: Cambrige University press,1992.

[3] Louise U. Kim, Mark R. Johnson, Simon Barton, et al. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV - discordant couples wishing to have children[J]. AIDS,1999;13:645-651.

[4] Hideji Hanabusa, Naoaki kuji, Shingo Kato, et al. An evaluation of semen proccessing methods for eliminating HIV-1 [J]. AIDS,2000;14:1611-1616. (下转第 197 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

疫抑制剂有关,尤其是术后早期应用了大剂量免疫抑制剂,活动性 HCMV 发生率达 60%[4],文献[4]同时强调,尽管器官移植术后活动性 HCMV 感染大多无症状,但这类接受者发生急性排斥性反应的机会明显增多。而本文的器官移植接受者 HCMV 活动性感染率远远低于文献[4]所报道,这可能与本文病例较少;或器官移植者存在个体的免疫差异有关。总之 HCMV 活动性感染是器官移植术后急性排斥的原因之一,预防和治疗 HCMV 活动性感染对降低器官移植术后急性排斥反应具有重要意义。

无明原因黄疸患者应考虑 HCMV 活动性感染的可能,表中可见,不明原因黄疸患者 HCMV 活动性感染率也达 3.92%,仅次于乙、甲、丙型病毒性肝炎,因此对不明原因的黄疸、不明原因转氨酶升高、发热、乏力、肝脾肿大,以及慢性肾盂炎[5]、原发性高血压、动脉粥样硬化症[6,7]、肿瘤患者放化疗期等患者,都不应忽视 HCMV 的活动性感染的可能性,应常规作 HCMV - IgM 的检查,以便为 HCMV 活动性感染提供依据,达到早期诊断及治疗的目的。

参 考 文 献

[1] 孙 贞.巨细胞病毒早期抗原与巨细胞病毒 IgM,IgG 滴度一致率的对比研究[J].河南医学研究,2001;10(3):252 - 254.

[2] Britt WJ, Vugler LG. Antiviral antibody responses in mothers and their newborn infants with clinical and subclinical congenital cytomegalovirus infections[J]. J Intect. Dis, 1990; 161(2):214 - 219.

[3] 罗佳滨.巨细胞病毒感染对染色体畸变率的影响[J].中国优生与遗传杂志,1995;3(6):38.

[4] Akposso K, Rondeau E, Haymam JP, et al. Long - term prognosis of renal transplantation after pre - emptive treatment of cytomegalovirus infection[J]. Transplantaion, 1997;63(7): 974 - 976.

[5] 李 娜,勾敏慧,白淑清.慢性肾盂肾炎与巨细胞病毒感染关系初探[J].中华医学检验杂志,1997;20(1):26 - 27.

[6] Sorlie PD, Adam E, Melnick SL, et al. Cytomegalovirus/herpesvirus and carotid atherosclerosis: the Aric study[J]. J Med. Virol, 1994;42(1):33 - 37.

[7] Hendrix MGR, Salimans MMM, Van Boven CPA, et al. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients, suffering from grade Ⅲ atherosclerosis[J]. Am J Pathol, 1990;136:23 - 29.

(上接第 161 页)technique [J]. Eur J Radiol, 2000;33(1):41 - 49.

[4] Krinsky GA, Rofsky NM, DeCorato DR, et al. Thoracic aorta : comparison of gadolinium - enhanced three - dimensional MR angiography with conventional MR imaging [J]. Radiology, 1997;202(2):183 - 193.

[5] 李坤成,常 沙,杨小平,等.胸主动脉假性动脉瘤的 MRI 诊断[J].中国医学影像技术,2001;17(2):150 - 152.

(上接第 191 页)

[5] Pasquier C, Daudin M, Righi L, et al. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children [J]. AIDS, 2000;14(14):2093 - 2099.

[6] 徐建平,李保全,胡毓安,等.精液中丙型肝炎病毒的研究[J].中华男科学,2000;6(4):214 - 243.

[7] Marina S, Marina F, Alcolea R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 - serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination[J]. Fertil Steril, 1998;70(1):35 - 39.

[8] Semprini AE, Fiore S, Pardi G. Reproductive counselling for HIV - discordant couples (letter; comment) [J]. Lancet, 1997;349:1401 - 1402.

[9] Hadchouel M, J. Scotto, J. L. Huret, et al. Presence of HBV DNA in spermatozoa: A possible vertical transmission of HBV via the germ line[J]. J Med Virol, 1985;16(1):61 - 66.

[10] Davison F, G. J. Alexander, R. Trowbridge, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication[J]. J Hepatol, 1987;4:37 - 44.

[11] 赵连三,刘晓松,张智翔,等.乙型肝炎病毒感染经精子传播的可能性研究[J].中华传染病杂志,1999;16(3):154 - 157.