DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.006
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
1998 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)22-1998-03

抗精子多肽抗体体外抗受精作用的初步研究

李玉艳,梁志清,何 畏,李玉清,史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 评价一种抗人工合成的精子多肽(35肽)抗体对人精子受精功能的影响情况。方法 将含抗35肽抗体的兔血清与人精子共同孵育,用计算机辅助精液分析系统(computer aimed sperm assay, CASA)检测精子活动力,以及检测顶体反应率和穿卵率。结果 抗35肽抗体兔血清可显著抑制精子的速度(包括直线速度、曲线速度和平均路径速度)、活动精子百分比、顶体反应率及穿卵率。结论 抗35肽抗体可抑制人精子受精功能,35肽作为一种避孕疫苗有一定开发前景。

关键词:抗精子抗体;CASA;顶体反应率;穿卵率
中图法分类号:R321.1;R321.2;R392.1 文献标识码:A

Effects of synthesized anti-sperm multiple peptide antibody on fertilization of human sperms *in vitro*

LI Yu-yan, LIANG Zhi-qing, HE Wei, LI Yu-qing, SHI Chang-xu (Department of Obstetric and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To assess the effects of the synthesized anti-sperm polypeptide (35 peptide) antibody on human sperm fertilization. Methods Rabbit serum containing anti-35 peptide antibody was incubated with human sperms. The sperm motility, the sperm acrosome reaction (AR), and the rate of sperm penetration rate (SPR) were detected by computer-aided sperm analysis (CASA). Results All parameters of the sperm quality were decreased significantly, including straight-line velocity, curvilinear velocity, average path velocity, percentage of sperm motility, AR, and SPA. Conclusion The anti-35 peptide antibody could inhibit the fertilization ability of human sperms. However, further studies should be conducted for the development of 35 peptide as a new contraceptive vaccine.

Key words: anti-sperm antibody; computer-aided sperm analysis; acrosome reaction; sperm penetration rate

人工合成的精子多肽(35肽)为取自含小鼠睾丸/精子特异性蛋白的关键性表位的氨基酸序列,动物实验已证实35肽与动物生育功能有关,并且抗35肽抗体可显著抑制其生育能力[1]。本实验通过检测抗35肽抗血清对人精子活动力、顶体反应率和穿卵率的影响,来初步评价其对人精子受精能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

含抗35肽抗体的新西兰大白兔(第三军医大学实验动物中心提供)灭活兔血清(35肽与弗氏佐剂等量混合,按4 mg/kg行背部多点皮下注射,每周1次,共4次获得)和从未交配过的新西兰大白兔的对照灭活兔血清。5~10周龄雌性金黄地鼠60只,购自成都生物制品研究所。FITC-PSA、Ca-ionophoreA23187(美国Sigma公司);CASA操作系统(广州威尔曼公司);Makler精液记数板(广州威尔曼公司)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000183)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000183)
作者简介:李玉艳(1972-),女,重庆市江津县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事生殖医学方面的研究。电话:(023)68754409
收稿日期:2003-08-22;修回日期:2004-05-10

1.2 精液准备

12位25~35岁健康已生育自愿供精男性,禁欲3~5 d,分批分次收集精液,充分液化后采用Makler记数板行常规精液分析,各指标均达到WHO规定标准,进行上游洗涤处理精液,调节精子密度为1×10^7/ml,做第1次CASA精液分析后备用(记为0组资料,即获能前组)。

1.3 精子活动力检测

将精子悬液置入CO_2培养箱中获能培养3.5 h后,均分为5组:1组为正常获能组,2组为1∶5抗35肽血清组,3组为1∶10抗35肽血清组,4组为1∶5正常兔血清组,5组为1∶10正常兔血清组,按比例分别加入0.3%HSA的EBSS液、抗35肽兔血清、正常对照兔血清,置培养箱孵育30~40 min,分别进行CASA检测,指标包括精子活率、曲线速度(curvilinear velocity, VCL)、直线速度(straight-line velocity, VSL)、平均路径速度(average path velocity, VAP)、快速前向运动精子百分比(a%)、快速前向+慢速前向精子百分比[(a+b)%],并单独计算VCL>100 μm/s的精子百分比,记为超激活运动精子百分比(hp%)。

1.4 穿卵试验

按文献[2]方法进行。12份上游处理好的精子,置CO_2培养箱获能培养4 h后分成3组,分别为正常组、1∶5抗35肽血清组和1∶5对照兔血清组,按比例分别加入0.3% HSA的EBSS液,抗35肽兔血清、正常对照兔血清,调整精子密度为3.5×

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10^6/ml, 准备受精液滴每个约 50 μl, 覆以石蜡油, 将每滴加入 20 个金黄地鼠卵, 放入培养箱孵育 3 h。将受精处理后的卵洗涤 2 次后用相差显微镜观察, 并进行压片后进一步观察记录穿卵情况, 计算穿卵率。

1.5　精子顶体反应检测

上述处理后精子每份取 1/3 分别加入终浓度为 10 μmol/ml 的钙离子载体 A_{23187}, CO_2 培养箱敷育 30 min, 离心洗涤后涂片, 在空气中自然干燥, 浸入无水甲醇中 30 s, 取出后迅速干燥。每张片加 FITC-PSA 液, 在室温孵育 30 min, 用蒸馏水洗涤 1 min, 浸入足量的蒸馏水中至少 15 min。干燥后当天在荧光显微镜下, 观察 100 个精子, 计算顶体反应率。

1.6　统计学方法

所有资料均采用 SPSS 10.0 软件, 进行单因素方差分析及 LSD 法的两两比较。

2　结果

2.1　精子各组的运动指标

各组指标结果组间差异显著($P<0.05$), 组内无统计学差异。正常获能孵育组 1 组与其它组间 a%、(a+b)%、hp%、VCL、VSL、VAP 均存在显著差异, 2 组与 4 组间除了 hp% 外, 均有显著差异, 3 组与 5 组间均有显著差异, 说明抗精子多肽抗体可显著改变精子的运动速度包括 VCL、VSL、VAP 等, 也明显降低了精子的活动率, 以及各项活动精子(a 级, a+b 级)及超激活运动精子的比例, 正常对照兔血清也有类似差异($P<0.05$), 但与抗血清组间有显著差异($P<0.05$), 见表 1。

表 1　精子的运动指标($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Parameters of sperm activity ($\bar{x}\pm s$)

Group	Motility percent(%)	a(%)	(a+b)(%)	hp(%)	VCL(μm/s)	VSL(μm/s)	VAP(μm/s)
0	77.50±8.12 *	38.50±8.12 *	50.75±8.49 *	8.33±5.38 *	45.48±9.46 *	30.22±9.02 *	37.97±7.78 *
1	86.26±4.77	65.32±9.19	73.48±8.49	31.19±9.60	76.90±12.15	52.88±10.01	62.57±9.24 *
2	24.33±16.37 *#	4.10±8.20 *#	6.63±9.76 *#	1.65±4.78 *#	17.31±17.30 *#	8.96±11.99 *#	13.79±13.40 *#
3	60.27±11.46 *	16.45±9.79 *	27.40±12.96 *	4.79±6.72 *	35.11±17.62 *	19.03±13.94 *	27.65±13.49 *
4	73.37±7.51 *	30.07±6.76 *	41.47±6.89 *	6.45±4.59 *	42.11±9.01 *	26.13±7.18 *	35.02±7.25 *
5	73.79±8.24 *★	36.06±10.59 *★	49.49±10.21 *★	12.87±7.84 *★	51.75±9.96 *★	32.55±7.92 *★	42.39±7.93 *★
F	57.089	66.974	66.825	29.911	27.147	24.766	30.360
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

*: $P<0.05$, *vs* 1; #: $P<0.05$, *vs* 4; ★: $P<0.05$, *vs* 3

2.2　精子穿卵率

穿卵指数= 受精卵数/卵子总数× 100%。3 组间两两比较均存在显著差异($P<0.05$), 提示抗 35 肽抗体可显著抑制精子穿卵, 见表 2。

表 2　精子顶体反应率及穿卵率比较[$n=12$, ($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 2　Comparison of acrosome reaction rate and sperm penetration rate[$n=12$, ($\bar{x}\pm s$)%]

Group	AR	SPA
Normal control	38.75±13.89	27.42±9.02
1∶5anti-35P antiserum	11.67±4.36	6.58±5.62
1∶5 control serum	22.25±14.25	15.75±4.71
F	21.392	38.570
P	0.000	0.000

2.3　精子顶体反应率

3 组两两间比较均存在显著差异($P<0.05$), 提示异种血清对精子发生顶体反应有一定影响, 但抗 35 肽抗体可显著抑制精子的顶体反应发生。

3　讨论

精子授精过程包括精子成熟、附着、结合、顶体反应、穿卵、融合、皮质反应、双方配子的带反应和核聚变等, 而抗精子抗体可通过降低精子速度、减少顶体反应率、抑制精卵结合等多种途径来影响精子授精功能, 导致免疫性不孕[3]。因此利用精子抗原来制作避孕疫苗, 已成为世界各研究结构的研究热点。在本研究中已获得一段含小鼠睾丸精子特异性蛋白的关键性表位的氨基酸序列, 并人工合成的 35 肽, 和以 35 肽为疫苗免疫大白兔后收获的兔血清, 35 肽取自定位于精子顶体部位的精子蛋白 SP17 和精子顶体跨膜蛋白 Cyritestin 的表位, 二者均在精子与卵子透明带结合及精-卵膜的结合和融合过程中发挥了重要作用, 前期实验研究证实两种原蛋白的同源性良好[1]。

常规检测精子运动的精液分析方法, 依靠人工记数, 仅仅是对活动精子百分比和精子活力分级的评价, 较盲目且变异大。采用 CASA 系统评价精子运动参数可以改善其客观性、精度和重复性, 并可以定量检测运动指标, 如精子的速度和轨道特征等, 对预测精子授精功能可提供可靠评价。用 CASA 系统测定定量活动力和精子浓度在评价精子功能, 和预测成功授精和妊娠等方面有显著的临床价值, Macleod 等[4] 研究报道可成功预测 86.9%的病例。

在本研究中, 因样本量较少, 在分析时部分组出现了变异过大现象, 可能是个体差异引起, 但在配对研究中表现了某种规律性, 具有一定的参考价值。增加样本量将能更客观地反映这一规律性。

因 CASA 系统不能评价单个精子的每一个指标, 故选用 VCL> 100 μm/s 的精子百分比来估计精子的获

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

能率,发现精子在正常获能孵育情况下,精子 VSL、VCL、VAP 等运动指标显著增加,各项活动精子百分比均增加,特别是 hp%从 8.33%上升到 31.19%。当精子与抗多肽抗血清孵育后则出现精子运动力改变,各项运动速度显著下降,活动精子百分比显著下降,精子的获能率也显著下降。考虑可能系血清中抗体与相应抗原结合导致精子损伤所致,有研究认为抗精子抗体结合精子能通过经典途径激活自体固有的补体,导致形态学改变而改变精子动力,最终导致精子溶解[5]。同时正常灭活兔血清对人精子活动力也有影响,与正常获能组及抗血清组间均有显著差异,考虑可能与异种蛋白对精子的影响有关,但与抗多肽抗血清组间差异显著,并且与含抗体的浓度之间具有一定依赖关系,提示该抗体可影响精子运动及获能。

本研究采用 FITC-PSA 荧光染色法检测顶体反应率,方法直观、明确,去透明带金黄地鼠穿卵法则为最常用的检测精子穿卵功能的方法。结果显示抗 35 肽抗血清对精子顶体反应率及穿卵率有显著抑制作用,提示该抗体对精子的授精功能有抑制作用,对照血清组虽然也影响顶体反应率和穿卵率,但尚存在生育力[6]。

综上,抗 35 肽抗体可显著影响精子的活动力,顶体反应率和穿卵率,预示其对人精子受精功能存在影响,具有潜在的抗生育力作用。但因异种血清对实验干扰较大,需要进一步改进实验方法来排除,其实用性有待继续研究。

参考文献:

[1] 何 畏,梁志清,史常旭,等. 一种多价精子抗原表位肽的设计与合成[J]. 生殖与避孕,2002,22(2):67-69.
[3] 黄天华,高小平,漆 著,等. 人精子染色体研究——一种稳定的人精子染色体制备技术[J]. 遗传与疾病,1987,4(3):174.
[3] Shibahara H, Shigeta M, Inoue M, *et al*. Diversity of the blocking effects of antisperm antibodies on fertilization in human and mouse[J]. Hum Reprod, 1996, 11(12): 2595-2599.
[4] Macleod I C, Irvine D S. The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme[J]. Hum Reprod, 1995, 10(3): 580-586.
[5] D' Cruz O J, Haas G G Jr, Wang B L, *et al*. Activation of human complement by IgG antisperm antibody and the demonstration of C3 and C5b-9-mediated immune injury to human sperm[J]. J Immunol, 1991, 146(2): 611-620.
[6] 杨 戎,魏莎莉,程绮馨. 去透明带地鼠卵穿透试验与人工授精受孕率关系的临床研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,1998,14(2):93-95.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2004)22-2000-01

重组(酵母)乙肝疫苗接种后人体免疫效果分析

Analysis of immune effect of yeast-recombinant hepatitis B vaccine

谭琳琳,张国华,刘 利 (解放军第 324 医院检验科,重庆 400020)

乙型肝炎疫苗接种于人体后,刺激机体产生乙肝表面抗体(抗-HBs),具有预防控制乙肝病毒感染,保护易感人群的作用。为维护医务工作者身体健康,对 272 名医务人员接种重组(酵母)乙型肝炎疫苗,并对乙肝疫苗接种后的免疫效果进行分析,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 调查对象

272 名医务工作者,年龄 21~59 岁,男性 95 人,女性 177 人。无肝炎病史,无免疫缺陷,免疫接种前 HBsAg、抗-HBs 均为阴性。以年龄分≤35 岁为 1 组,共 100 人,>35 岁为 1 组,共 172 人。

1.2 方法

采用 0、1、6 个月 3 针常规免疫程序接种,剂量均为 5 μg/支,上臂三角肌肌内注射。全程免疫 3 个月后,查抗-HBs 阳转情况,以 S/N≥2.1 判断为阳性。以抗-HBs 水平≥10 U/L 为达到有效免疫水平的免疫保护阈值[被世界卫生组织(WHO)及美国免疫实践指导委员会(ACIP)确定为接种疫苗后应答良好的标准]。

1.3 试剂材料

重组(酵母)乙型肝炎疫苗是由深圳康泰生物制品有限公司生产,乙型肝炎表面抗体检测试剂盒由兰州标佳生物制品有限公司制造,酶标仪为芬兰上海菲曼特公司制造。

1.4 统计学方法

采用 χ^2 检验。

2 结果

272 人全程接种 3 个月后 226 人抗-HBs 为阳性,抗-HBs 阳转率为 83.1%。

(下转 2003 页)

作者简介:谭琳琳(1966-),女,重庆市人,主管技师,主要从事临床检验方面的研究。电话:(023)67221693

收稿日期:2004-05-17;修回日期:2004-10-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net