DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.043
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
100 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0100-03

子宫内膜异位症患者腹腔液在不孕中的作用

王 琳,史常旭 (第三军医大学附属西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨子宫内膜异位症(EM)患者腹腔液对精子功能的影响及腹腔液中白细胞介素-1β(IL-1β)在不孕机制中的作用。方法 经腹腔镜检查确诊的子宫内膜异位症不孕患者共20例,对照组10例均为已生育妇女。在腹腔镜直视下或剖腹术时抽取腹腔液与精子孵育。同时采用放射免疫法检测腹腔液中IL-1β含量。结果 EM组腹腔液与精子孵育16 h后,EM组精子顶体反应发生率显著低于对照组。EM组腹腔液中IL-1β检出率为100%,范围为0.11~0.27 ng/ml,均值为(0.16±0.05)ng/ml;对照组检出率为50%,范围为0~0.16 ng/ml,均值为(0.06±0.28)ng/ml,EM组显著高于对照组。结论 EM患者腹腔液抑制正常精子顶体反应,腹腔液中IL-1β含量显著升高,可能与不孕有一定关系。

关键词:子宫内膜异症;不孕症;腹腔液;精子;顶体反应 白细胞介素-1β
中图法分类号:R711.710.12 文献标识码:A

Role of peritoneal fluid from endometriotic patients in their infertility

WANG Lin, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To determine whether peritoneal fluid from women with endometriosis (EM) contributes to their infertility due to sperm function impairment and explore the role of IL-1β in the fluid in the event. **Methods** Infertile women with laparoscopy-proved EM (n=20) were subjected and fertile women without EM (n=10) served as controls. Peritoneal fluid was aspirated from them. Sperm acrosome reaction was assessed following incubation with peritoneal fluid. The levels of IL-1β in peritoneal fluid from 15 infertile women with EM were determined with radioimmunoassay. **Results** Sperm acrosome reaction in EM group was reduced significantly in comparison with the control 16 h after incubation with peritoneal fluid. Peritoneal fluid IL-1β levels were (0.16±0.05) ng/ml (0.11-0.27 ng/ml) in women with EM and (0.06±0.28) ng/ml (0.0-0.16 ng/ml) in women without. **Conclusion** Peritoneal fluid from women with EM inhibits normal sperm acrosome reaction and increases the level of IL-1β in peritoneal fluid, which may be related to endometriosis-associated infertility.

Key words: endometriosis; infertility; peritoneal fluid; sperm; acrosome reaction; interleukin-1β

子宫内膜异位症(EM)是生育期妇女最常见的疾病之一,39%~50%的EM患者合并不孕[1],其机制仍在研究中。腹腔液(PF)构成特殊的生殖微环境,输卵管、卵巢均"沐浴"其中,PF对精子功能的影响及细胞因子与子宫内膜异位症(EM)的关系,近年来受到重视,认为EM的发生发展受到细胞因子的调控。有研究发现EM患者腹腔液中的白细胞介素(IL)检出率或含量高于正常人,其中包括IL-1、IL-6、IL-8、IL-10等[2]。EM患者PF中升高的细胞因子浓度(IL-1,IL-2,TNF-α,IF-γ)和活化的巨噬细胞可能抑制精子动度和精卵结合,影响EM患者生育力。精子受精能力取决于许多因素,如精子游动能力,游动特征和顶体反应。顶体反应是受精的先决条件,但EM患者PF对精子顶体反应是否有影响尚无一致结论。本研究拟通过检测EM患者的PF对精子顶体反应的影响,并采用放射免疫法检测EM不孕患者腹腔液中IL-1β含量,探讨PF中IL-1β与异位症不孕的关系及PF对精子在受精过程中的作用。

作者简介:王 琳(1964-),女,四川省巴中市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事子宫内膜异位症导致不孕机制方面的研究,发表论文18篇。电话:(023)68754409

收稿日期:2001-09-10;修回日期:2001-12-06

1 资料与方法

1.1 试验组

1998年10月至1999年5月在我院就诊的不孕患者20例,均经腹腔镜检查或剖腹探查确诊为EM,诊断按美国RAFS分期法,轻度(Ⅰ、Ⅱ期)15例,重度(Ⅲ、Ⅳ期)5例。年龄24~37岁(平均29.5岁),排除了生殖系统发育不良,生殖道结核,急、慢性炎症,输卵管阻塞,内分泌失调及男性不育等因素。

1.2 对照组

已生育妇女10例,年龄26~40岁(平均31.4岁)其中3例为绝育术后要求再通妇女,6例为子宫肌瘤,1例为单纯卵巢囊肿,均在剖腹术时排除盆腔异位症。

1.3 腹腔液的提取

两组对象均在腹腔镜直视下或剖腹术时抽取PF置于无菌玻璃试管内,立即500× g 离心10 min,除去细胞成分,取离心后的上清液置-20 ℃冰箱内备用。检测前PF在室温下自然融化后待检。

1.4 精液标本的制备

为了减少由多位供精者供精而引起的精液质量的变化,精液标本均取自同一健康已生育男性。其精液常规检查符合WHO标准,禁欲2~3 d,用手淫法采集精液于10 ml消毒烧杯中,37 ℃孵育箱中孵育30 min使其充分液化,用含0.3%人血清白蛋白的BWW培养液洗涤精子2次,将洗涤后的精子用BWW液制成精子悬液,再用Percoll法处理。混匀制成精子悬

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

液, 密度调整到 10^7 /ml。

1.5　PF 对精子顶体反应的影响观察

将 PF 标本统一编号, PF 各取 400 μl, 加入前述制备的精子悬液 100 μl 混匀, 在 37 ℃, 5% CO_2 中分别孵育 4 h 和 16 h 后, 加入终浓度为 10 μmol/L 的钙离子载体 A_{23187}(顶体反应诱导剂), 在 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中孵育 30 min, 离心, 弃上清液, 加入 BWW 洗涤液混匀, 至少离心 3 次, 用 BWW 洗涤液调节精子密度约为 10^7 /ml, 涂片, 在空气中自然干燥后, 当天即在荧光显微镜下, 观察 100 个活精子中发生顶体反应(顶体区染色)的精子数, 该值即为顶体反应率。

采用放射免疫法检测轻度 EM 不孕患者腹腔液中 IL-1β 含量, 操作按试剂盒说明书进行, 试剂盒购自解放军 301 医院。在放免 γ 计数器上测各管沉淀部份的放射性计数, 仪器已编制程序, 直接绘制出标准曲线, 并给出样品浓度。

1.6　统计学处理

采用 Microsoft Excel 统计软件进行分析。

2　结果

2.1　EM 患者与对照组 PF 对精子顶体反应的影响

两组 PF 与精子悬液孵育 4 h 后, 两组顶体反应发生率无显著差异, 但孵育 16 h 后, EM 组顶体反应发生率显著低于对照组, 结果见表 1。发生顶体反应的精子染色情况见图 1。

表 1　精子顶体反应发生率(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Sperm acrosome reaction after incubation in peritoneal fluid (%, $\bar{x}\pm s$)

Incubation Time(h)	EM(n=20)	Controls(n=10)
4	19.8±2.8	21.8±2.6
16	34.6±9.8	67.5±3.4

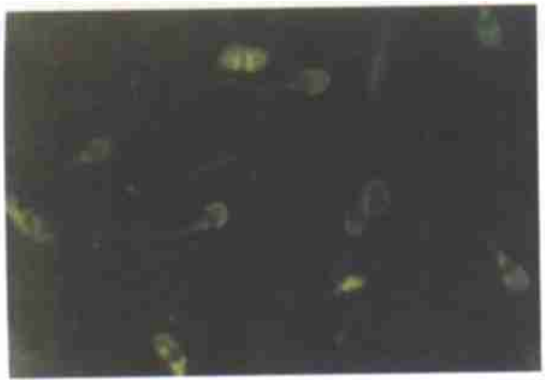


图 1　精子顶体区域内绿色荧光者为发生了顶体反应　(×1 000)

Fig 1　Sperm acrosome reaction showing green fluorescence　(×1 000)

子宫内膜异位症的分期不同, 其 PF 对精子顶体反应率的影响无显著性差异, 见表 2。

表 2　不同程度 EM 患者 PF 对精子顶体反应的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Sperm acrosome reaction after incubation in peritoneal fluid from women with mild or severe endometriosis (%, $\bar{x}\pm s$)

Group	Incubation Time(h)	
	4	16
Mild EM(n=15)	20.1±2.5	34.9±4.6
Severe EM(n=5)	18.4±6.9	33.2±2.1

2.2　EM 组腹腔液中 IL-1β 水平

15 例轻度 EM 患者腹腔液中均检出 IL-1β, 检出率为 100%, 范围为: 0.11~0.27 ng/ml, 均值为(0.16±0.05) ng/ml。对照组中 10 例中有 5 例检出 IL-1β, 检出率为 50%, 范围为 0~0.16 ng/ml, 均值为(0.06±0.28) ng/ml。两组 IL-1β 检出率和均值比较, EM 组腹腔液 IL-1β 水平显著高于对照组(P<0.01)。

3　讨论

3.1　EM 患者腹腔液对精子功能的影响

EM 致不孕的病理生理机制尚不清楚。近年的研究发现, EM 患者的腹腔液中有一种或多种生育抑制因子, 能影响排卵功能, 配子传输或存活, 早期胚胎发育及胚胎着床。EM 患者 PF 是否对精子功能产生有害影响尚在研究中。腹腔液充满输卵管和子宫内环境, 异位内膜病灶浸于其中, 其产生的炎性细胞因子如 IL-1, IL-2, TNF-α 等可直接释放于腹腔液中。初步的研究表明, EM 患者 PF 不仅可抑制鼠精子穿卵, 也能抑制人精子功能, 如降低精子游动能力, 抑制精子获能和顶体反应, 影响精子穿卵及干扰精卵结合, 导致 EM 患者不孕[3]。本实验为避免精液成分在腹腔对精子功能产生影响的过程中起中介作用, 而采用了 Percoll 法提取并洗涤精子, 更接近于精子在女性生殖道上部的环境, 并采用同一健康已育男性供精者, 保证了精子质量的稳定性。其结果显示: EM 组 PF 与精子孵育 16 h 后能明显抑制精子顶体反应, 且与 EM 分期无明显关系, 即轻重 EM 均能抑制精了顶体反应。

Oral 等[4] 的研究发现, 轻度异位症并不抑制精子游动能力, 但中、重度 EM 患者 PF 与精子孵育 4, 7 和 24 h 后, 其精子游动能力分别下降 40%, 50%和 80%。我们的研究发现 EM 患者 PF 抑制精子顶体的作用与时间成正相关, 孵育时间越长, 抑制作用愈明显, 且与 EM 分期无明显关系, 精子顶体反应受抑制, 可能是导致 EM 患者不孕的重要原因之一。

Aeby 等[5] 将 EM 患者 PF 与正常精子孵育 16~18 h 后, 检测了精子穿透明带仓鼠卵的百分率, 发现 EM 组精子穿卵率(22.9±5.31)显著低于对照组(44.4±4.96, P<0.01)且精子平均游动速度显著下降, 作者认为 EM 患者 PF 损害了精子功能和精子游动能力, 影响精卵结合, 导致 EM 患者不孕。我们的研究表明, EM 患者的腹腔液对精子功能有抑制作用。这种抑制作用可能是异位在腹腔内的子宫内膜蛋白诱发了机体产生体液和细胞免疫应答, 巨噬细胞增多, 活性增强, IL-1, IL-2, TNF-α 产生增多, 这些物质都可进入输卵管及子宫腔, 从而对配子运动和受精过程产生不良影响。EM 患者 PF 中的巨噬细胞对精子的抑制不能解除, 精子穿透卵子外周结构而与卵子融合所需要的顶体酶释放减少, 顶体反应减弱, 阻止了精卵结合, 从而干扰了受精过程。

3.2　IL-1 在 EM 患者腹腔液中的来源及在 EM 致不孕中的作用

有作者测定腹腔液中 IL-1 的浓度, 并将腹腔液中

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

巨噬细胞培养 24 h, 测定培养液中 IL-1 的浓度, 结果正常妇女腹腔液及培养液中未测出 IL-1, 而轻度 EM 不孕患者腹腔液及培养液中 IL-1 浓度, 均明显高于正常妇女及对照组[2]。

在 EM 患者的炎症过程中、巨噬细胞在腹腔液及异位内膜病灶中数量增多, 它分泌的 IL-1 是 EM 患者腹腔液中的主要来源。虽然各期 EM 均可出现 IL-1 升高, 但Ⅰ、Ⅱ期 EM 升高更明显, 因早期 EM 腹腔液中巨噬细胞数增加更显著。此外, IL-1 还可以刺激内膜纤维分化样细胞分泌大量单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1), 使腹腔内单核细胞增多, 并分泌大量的细胞因子, 包括 IL-1, 从而通过其它因子, 导致不孕[6]。本研究结果也显示轻度 EM 腹腔液中 IL-1β 升高, 这一结果可以解释为什么轻度 EM 患者、盆腔无明显的解剖学改变即可发生不孕。

近年来, 有作者发现 EM 患者腹腔液中存在一种或几种胚胎毒性因子, 抑制 2 细胞鼠胚胎的发育[7], 有人证实 EM 患者腹腔液中的胚胎毒性因子与 IL-1 及 TNF 有关。体外实验发现类似 EM 患者腹腔浓度的 IL-1 对小鼠的胚胎细胞有毒性作用。另有学者用人类重组 IL-1 对小鼠进行试验。发现 IL-1 可影响精子顶体反应及精子穿卵。但精子的活动力和速度无改变。Van 等[8] 发现 IL-1β 可抑制子宫内膜间质细胞的增殖, 阻滞人类子宫内膜间质细胞蜕膜化而影响受孕。IL-1 是单核巨噬细胞所产生的重要细胞因子, 它可能通过抑制卵子发育及精卵结合, 干扰受精卵种植后的生长环境及影响胚胎的发育, 导致不孕。

参考文献:

[1] Ryan I P, Taylor R N. Endometriosis and infertility: new concepts[J]. Obstet Gynecol Survey, 1997, 52(6): 365—371.
[2] keenan J A, Chen T T, Chadwell N L, *et al*. IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis[J]. Am J Reprod Immunol, 1995, 34(6): 381—385.
[3] Passos E P, Brugnara L, Facin A C, *et al*. Peritoneal fluid modulates the sperm acrosomal exocytosis induced by N—acetylglucosaminyl neoglycoprotein[J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(1): 59—65.
[4] Oral E, Arici A, Olive D L, *et al*. Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: the role of seminal fluid components[J]. Fertil steril, 1996, 66(): 787—792.
[5] Aeby T C, Huang T, Nakayama R T, *et al*. The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on human sperm function in vitro[J]. Am J Obstet Gynecol, 1996, 174(): 1 779—1 785.
[6] Arici A, Oral E, Attar E, *et al*. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometnosis and its modulation of expression in mesothelial cells[J]. Fertil steril, 1997, 67(6): 1 065—1 072.
[7] Simon C, Gomez E, Mir A, *et al*. Glucocorticoid treatment decrease sera embryotoxicity in endometriosis patients[J]. Fertil Steril, 1992, 58(): 284.
[8] Van L E L, Oh S T, Anners J A, *et al*. Interleukin-1 inhibits growth of normal human endometrial stromal cells[J]. Obstet Gynecol, 1992, 80(2): 405—409.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)01-0102-02

静脉注射人血丙种球蛋白治疗病毒性脑炎疗效分析

Efficiency of intravenous human globulin gamma injection in treatment of viral encephalitis

周月琴, 张 敏 (重庆市急救医疗中心神经内科, 重庆 400014)

病毒性脑炎是一类常见的中枢神经系统感染性疾病。目前治疗主要为抗病毒, 免疫治疗, 对症, 支持[1]。IVIG 具有广泛细菌及病毒抗体谱, 能有效防治各种细菌及病毒引起的感染, 同时对病毒感染引起的免疫缺陷状态有很好的调节作用。近年来国内外文献报道临床上使用 IVIG 治疗各种病毒感染及免疫性疾病取得较好疗效, 国外也有文献报道 IVIG 对治疗脑炎后癫痫有益[2]。我科使用 IVIG 治疗病毒性脑炎 15 例, 现将结果报告如下。

1 研究对象与方法

研究对象: 30 例病例均为本科 1996 年 2 月~1998 年 10 月住院患者, 均符合临床神经病学病毒性脑炎诊断标准[3]。年龄在 25~37 岁之间, 男 14 例, 女 16 例。其中单纯疱疹病毒性脑炎 8 例, 带状疱疹病毒性脑炎 2 例, 另 20 例未行病毒学分类。入院时均存在脑实质受损症状体征: 6 例存在精神行为异常, 3 例有继发性癫痫, 18 例前两种症状皆存, 6 例有头痛发热表现, 各病例均有双侧掌颏反射阳性, 21 例存在单侧或双侧病理征。脑电图有 21 例存在弥漫性慢波, 7 例有慢波活动增加, 2 例慢波呈阵发趋势发放。脑脊液 30 例均存在白细胞增多, 淋巴细胞分类高, 蛋白增高, 糖与氯化物基本正常。

方法: ①以上 30 例病例随机分为两组。15 例为实验组, 用 IVIG(成都生物制品研究所出品)5 g/d 静脉输注 7~10 d, 同时使用其它抗病毒药物, 激素, 对症, 支持治疗, 另外 15 例为对照组, 未使用 IVIG, 余治疗相同。②疗效观察。病程中观察患者症状体征恢复情况(于治疗后 20 d 时作评价), 治疗前及治疗后 15 d 时做脑电图及脑脊液常规生化检查作评价。

2 结果

症状体征恢复比较, 见表 1。基本正常: 神经系统症状体征

(下转 105 页)

作者简介: 周月琴(1972—), 女, 四川省宜宾市人, 主治医师, 主要从事临床神经内科方面的研究。电话: (023)63874000—2130

收稿日期: 2000-01-15; 修回日期: 2000-11-15

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