

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.011

γ H2AX 与男性不育患者精子 DNA 损伤的关系及意义*

钟慧芝¹, 吕福通², 谢丹尼², 莫毅², 林发全^{1△}

(1. 广西医科大学第一附属医院检验科, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区人口和计划生育研究中心, 南宁 530021)

[摘要] 目的 研究 γ H2AX 在男性不育患者精液中的表达水平, 探讨 γ H2AX 用于评价男性不育患者精子 DNA 双链断裂 (DSBs) 损伤程度的可行性。方法 选取就诊于广西医科大学第一附属医院生殖医学研究中心、男性科门诊并确诊为男性不育患者 27 例 (男性不育组), 另外选取 23 例确认有生育能力的健康男性的精液样本作为对照组。通过 PureSperm 密度梯度离心法 (DGC) 优选精子, 运用单向凝胶电泳技术 (SCGE) 和流式细胞术方法对健康男性、男性不育组患者的精液进行精子双链 DNA 损伤和 γ H2AX 含量的测定和比较。结果 男性不育组患者精子 DSBs 损伤程度和 γ H2AX 表达含量均高于对照组 ($P < 0.01$), 而经密度梯度离心法优选精子后, 两组男性精子的 DSBs 损伤程度和 γ H2AX 表达含量均显著下降 ($P < 0.01$)。结论 γ H2AX 在男性不育患者精子中的含量明显高于健康男性, 可作为检测精子 DNA 双链断裂损伤程度的一个新的标志物。

[关键词] 男性不育; H2AX 磷酸化; DNA 双链损伤程度

[中图分类号] R44

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)08-1044-04

The relationship of γ H2AX and sperm DNA damage in male infertility patients*

Zhong Hui zhi¹, Lv Futong², Xie Danni², Mo Yi², Lin Faquan^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Research Center of Population and Family Planning of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether γ H2AX could be a useful biomarker for evaluating the DNA double-stranded. **Methods** Semen samples in case group were from 27 infertile males who were diagnosed in Andriatrics department or reproductive centre in the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University. The other semen samples were from 23 healthy donors with fertility as comparison. The levels of γ H2AX were detected by flow cytometry. Single cell gel electrophoresis (SCGE) was applied to assess the level of DSBs of sperm. Density gradient centrifugation (DGC) was applied to optimized spermatozoa. **Results** The γ H2AX levels and the DSBs of the sperm of the infertile subjects were significantly higher than those of healthy males ($P < 0.01$), and the levels of γ H2AX and the DSBs of sperm significantly decreased in two groups by DGC ($P < 0.01$). **Conclusion** The level of spermatozoa γ H2AX is higher in male infertility patients than in healthy donors with fertility, which might be a useful biomarker for evaluating DSBs of sperm.

[Key words] male infertility; H2AX phosphorylation; the levels of DNA damage

男性精子遗传物质的完整性对于自然受孕及其胚胎的正常发育起着重要作用。精子 DNA 损伤过高与不明原因的反复流产有关, 而且还会增加子代患不育症的风险^[1]。男性不育患者精子 DNA 损伤程度比健康男性的更为显著^[2]。为此, 人类精子 DNA 损伤机制及其不良影响成为生殖医学领域关注的热点问题之一; 并且在辅助生殖治疗过程中, 男性不育患者精子 DNA 损伤程度已被作为一项重要参考指标纳入治疗前精子质量评价及对患者生育能力进行预测^[3]。目前, 国内外的临床研究主要应用以下几种方法检测精子 DNA 损伤, 如单向凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE) 实验、末端标记检测 (TUNEL assay)、精子染色质结构分析 (SCSA) 和染色质扩散试验 (SCD) 等。然而, 在临床和科研过程中, 对此尚缺乏规范和统一的检测方法和标准, 并且相关研究结论亦存在分歧。因此, 有必要寻找一种新的标志物对精子 DNA 损伤进行检测, 建立一套准确评价精子 DNA 损伤程度的标准。

γ H2AX 是由组蛋白 H2A 家族中 H2AX 磷酸化所形成。有研究发现, 当细胞的 DNA 受到损伤时, 尤其是 DNA 双链断裂 (DSBs) 损伤后, 在 DSBs 位点会出现 γ H2AX 形成的“焦点”结构, 执行 DNA 损伤的感受或修复功能。另外, 人们发现 γ H2AX 焦点的形成没有细胞特异性, 无论何种因素诱导产生的 DSBs 都会伴随有 H2AX 的磷酸化, 并且 γ H2AX 形成焦点的数量及损伤引起的 DSBs 数量基本上是 1:1 的关系。这表明 γ H2AX 可作为 DNA 损伤的标志, 是目前检测体细胞 DNA 损伤, 特别是 DSBs 的一个新的特异性指标^[4-5]。然而, γ H2AX 在男性不育患者精子的检测及与 DSBs 的相关研究较少。因此, 本研究运用 SCGE、流式细胞术等方法对健康男性、男性不育患者的精子 DSBs 损伤程度和 γ H2AX 含量进行测定和比较, 并通过 PureSperm 密度梯度离心法 (DGC) 对精子进行优选, 再次检测 2 个指标的前后变化, 旨在探讨 γ H2AX 用于评价男性不育患者精子 DNA DSBs 损伤程度的可行性, 为辅助

* 基金项目: 广西科学研究基金资助项目 (10124001A-45); 广西人口计生研究基金资助项目 (1105)。 作者简介: 钟慧芝 (1985-), 硕士, 从事男性不育与生殖研究。 △ 通讯作者, Tel: (0771) 5356039; E-mail: fqin1998@163.com。

生殖技术进一步获得良好结局提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究选取 2012 年 11 月至 2013 年 1 月就诊于广西医科大学第一附属医院生殖医学研究中心、男性科门诊确诊为男性不育患者 27 例精液样本作为病例组研究对象设为男性不育组,另外选取 23 例确认有生育能力的健康志愿者的精液样本作为对照组。本研究的男性不育的纳入标准:(1) 男性不育患者均在未避孕、排除女方原因的条件下婚后 2 年未怀孕;(2) 患者性激素检测正常;(3) 患者在过去的 3 个月内未进行药物或手术治疗;(4) 精液量大于 2 mL,精子密度大于 20×10^6 ,精子活率大于 20%,且抗精子抗体检查阴性。所有研究对象在采集精液标本之前均禁欲 3~7 d;以手淫法收集精液并用洁净无菌试管收集,立即放入 37 ℃ 水浴箱内使其自然液化。

1.2 主要试剂(盒)与仪器 40% puresperm 液、80% puresperm 液、Puresperm wash 液(Nidacon Internal AB 公司),鼠抗人 FITC anti-H2AX-Phosphorylated(Ser139)、兔抗鼠 FITC anti-H2AX-Phosphorylated 同型对照(美国 BioLegend 公司),蛋白酶 K、多聚甲醛(美国 Sigma-Aldrich 公司),正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖(西班牙 Biosharp 公司),盐酸(廉江市爱廉化工试剂有限公司)、二甲基亚砜(DMSO)、氯化钠、硼酸、NaOH(天津市博迪化工有限公司),二(羟甲基)氨基甲烷(Tris-Base)、Triton-X 100(广州威佳科技有限公司),精液分析仪,AX70 Olympus 荧光显微镜,BD 流式细胞仪器(美国 BD FACSC canto™ II),水平电泳槽。

1.3 精子 γ H2AX 的检测 先将已经液化的精液混匀,以 PBS 缓冲液将精子浓度调整至 $(5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7)/\text{mL}$ 后,用 4% 的多聚甲醛固定 15 min。再用 PBS 缓冲液,300×g 离心精子 5 min,去除上清液留下底部沉淀物。随后加入 0.5% 的 Triton-X 100,吹散并混匀沉淀物,破膜 15 min。再次加入适量的 PBS 缓冲液,以 300×g 的离心力离心破膜后的精子 5 min,去除上清液留下底部沉淀物。再加入 PBS 缓冲液,300×g 离心精子 5 min,去除上清液。再向标本中加入 20 μL 鼠抗人 γ H2AX 单克隆抗体,用加样枪轻轻吹打混匀,室温避光孵育 30 min。用 PBS 缓冲液洗涤 2 次并且要在避光条件下处理,最后上流式细胞仪进行检测。同型对照的处理除所加抗体不同(加入的抗体为兔抗鼠 γ H2AX 单克隆抗体)外,其余处理步骤同上。

1.4 SCGE 实验

1.4.1 制做凝胶玻片 先将代用样本混匀,将精子浓度调整至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。吸取 100 μL 0.65% 正常熔点琼脂糖平铺于预先处理好的载玻片上,并快速地盖上盖玻片,置于 4 ℃ 环境中 10 min,使琼脂糖充分凝固。再将预先配好的 0.65% 低熔点琼脂糖进行熔解,待其完全熔解后,放在室温下使其温度稍稍下降后吸取 75 μL 琼脂糖液与 15 μL 预先调配好浓度的精子混匀。在第 1 层琼脂糖凝胶均匀地铺上调配好的精子琼脂糖混合液,置于 4 ℃ 环境中 10 min,使琼脂糖充分凝固。最后待第 2 层琼脂糖凝胶完全凝固后,再铺上 75 μL 0.65% 低熔点琼脂糖,置于 4 ℃ 环境中 10 min,使琼脂糖充分凝固。

1.4.2 凝胶玻片的裂解与电泳 将制好的琼脂糖凝胶玻片放入预先配好的中性裂解液中,在 4 ℃ 环境中裂解 2 h,将琼脂糖凝胶玻片从中性裂解液中取出,先浸泡在 PBS 液 30 s,此步骤

重复 3 次,再将琼脂糖凝胶玻片放入裂解液 2 中,将其放入 37 ℃ 水浴箱内继续裂解 15 h,将裂解好的琼脂糖凝胶玻片再用 PBS 液浸泡 30 s,再放入盛有 TBE 电泳液的电泳槽中平衡 20 min,然后在 15 V、100 mA 的电场下电泳 60 min,并在 4 ℃ 和避光环境中进行。将电泳好的琼脂糖凝胶玻片放入中和液中进行中和。将中和好的琼脂糖凝胶玻片进行溴化乙锭(EB)染色,EB 稀释比例为 1:2 000,吸取调配好的 EB 液 20 μL ,均匀地铺在琼脂糖凝胶玻片上等待 20 s,吸去多余的 EB,将染好 EB 的琼脂糖凝胶玻片置于荧光显微镜下观察。

1.5 puresperm 密度梯度离心优选精子 吸取 80% puresperm 液 1.5 mL 移至无菌锥形离心管底部,再吸取 40% puresperm 液 1.5 mL,轻轻加至 80% puresperm 液上,使 2 种不同浓度的 puresperm 液出现清晰的分界面。再将 1.0 mL 精液标本轻轻加至 40% puresperm 液上,使精液与 40% puresperm 液也出现清晰的分界面。用 350×g 离心 20 min,保留沉淀物及 4~6 mm 高的 80% puresperm 液。再用 puresperm wash 液对标本进行洗涤,以 350×g 离心 10 min。吸去上清液,留取沉淀,再向沉淀物中加入少许 puresperm wash 液,混匀放置 37 ℃ 水浴箱保温。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较,符合方差齐时用 t 检验分析,不符合时用秩和检验,计数资料比较用 χ^2 检验,等级资料用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 优选前两组精液常规参数的比较 本实验运用 CASA 对两组精液进行精液常规分析,结果见表 1。两组精液在年龄、精液液化时间、精液量等方面比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),但在精子浓度、精子活率、前向运动精子百分率以及正常形态百分率上,对照组均高于男性不育组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 优选前两组精液常规参数的比较($\bar{x} \pm s$)

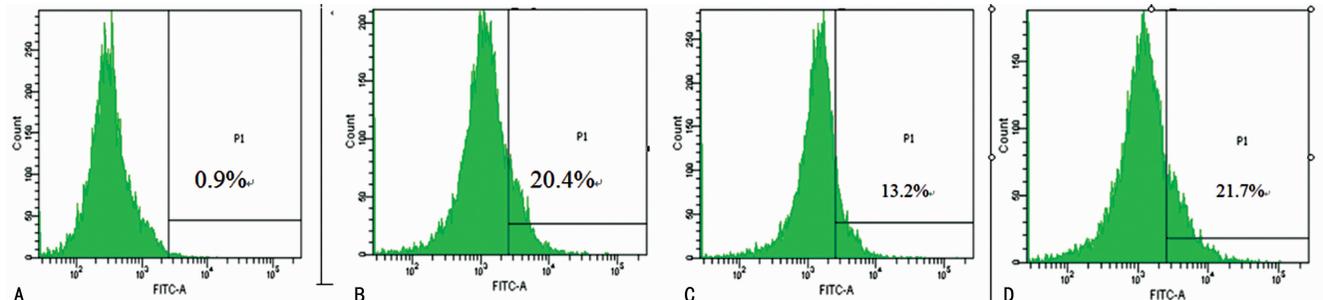
变量	对照组 ($n=23$)	男性不育组 ($n=27$)	P
年龄(岁)	30.83±4.02	32.74±4.39	0.094
精液量(mL)	3.93±0.98	4.16±1.07	0.644
浓度($\times 10^6/\text{mL}$)	77.49±16.73	56.73±35.82	0.012
精子活率(%)	56.73±9.71	45.30±11.89	0.002
前向运动精子(%)	49.99±8.96	35.59±11.01	0.000
精子正常形态率(%)	27.82±2.97	15.26±1.87	0.000

2.2 两组精液 γ H2AX 百分含量的测定结果比较 通过流式细胞仪对两组优选前精液进行 γ H2AX 含量的测定,结果显示男性不育组精子中表达的 γ H2AX 为 $(23.87 \pm 4.34)\%$,明显高于对照组的 $(13.8 \pm 2.88)\%$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。如图 1 所示,“门”左侧为阴性表达精子 γ H2AX,“门”右侧为阳性表达精子 γ H2AX。

2.3 两组精液单向凝胶电泳实验的结果比较 SCGE 也称彗星实验,临床上常用碱性彗星实验检测 DSBs。彗星实验指标有多种,其中尾部 DNA 百分含量是公认的能够反映 DNA 损伤程度的可靠指标,通过 Casp 软件可直接计算出彗尾中 DNA 百分含量。根据彗星尾部 DNA 百分含量可将精子细胞核

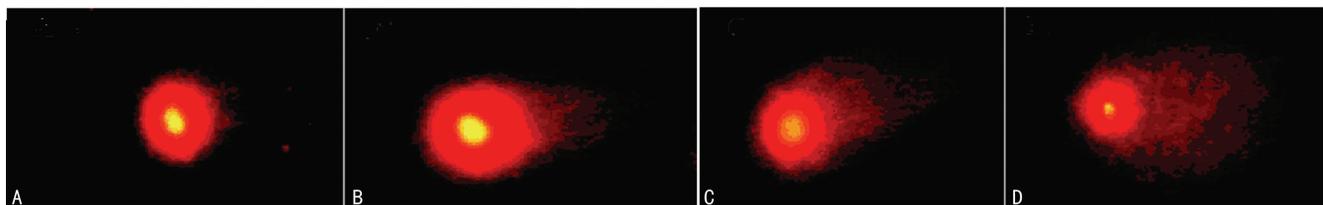
DNA 损伤程度分为 5 个等级,见图 2(本研究无 4 级精子损伤,故无 4 级精子损伤图片)。0 级: <5%,为无损伤精子,精子核完整;1 级: 5%~20%,为轻度损伤精子,可见彗尾,精子核缩小;2 级: 21%~40%,中度损伤精子,可见明显彗尾,精子核缩小;3 级: 41%~95%,重度损伤精子,彗尾荧光信号强而密,并见明显缩小的精子核;4 级: >95%,完全损伤的精子,仅见强而密的荧光彗尾,精子核基本消失。通过 Casp 软件对两组优选前精液精子彗星图像进行分析,结果显示,对照组中

无 DNA 损伤的精子为 1 835 个,轻度损伤的精子为 390 个,中度损伤为 75 个,未发现 DNA 重度损伤及完全损伤精子;男性不育组无 DNA 损伤的精子为 1 825 个,轻度损伤的精子为 719 个,中度损伤为 132 个,重度损伤为 24 个,未发现 DNA 完全损伤精子。两组精子 DNA 双链损伤程度进行统计分析,结果显示对照组精子 DNA 双链损伤程度显著低于男性不育组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。



A: 对照组 γ H2AX 阴性表达图; B: γ H2AX 阳性表达图; C: 对照组某一标本 γ H2AX 阳性表达图; D: 男性不育组某一标本 γ H2AX 阳性表达图。

图 1 γ H2AX 的流式细胞示意图



A: 0 级; B: 1 级; C: 2 级; D: 3 级。

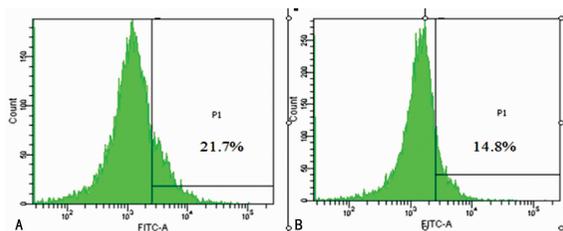
图 2 精子细胞核 DNA 损伤程度等级图($\times 400$)

表 2 两组精子 DNA 双链损伤程度比较(个)

组别	精子数	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级
对照组	2 300	1 835	390	75	0	0
男性不育组	2 700	1 825	719	132	24	0

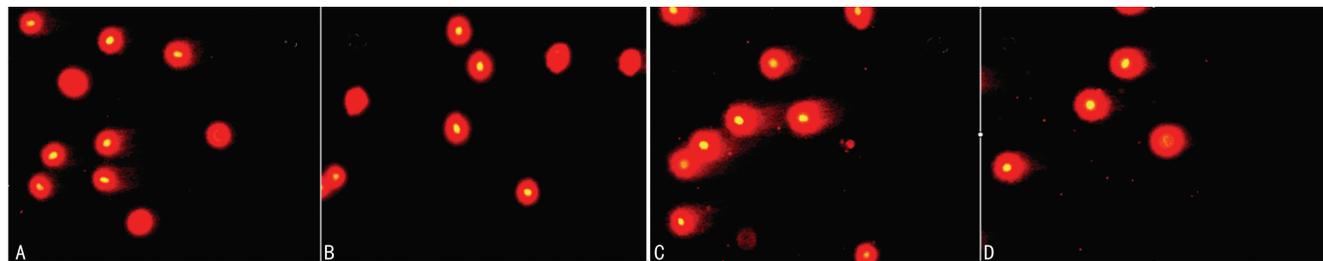
2.4 经密度梯度离心法优选后两组精液 γ H2AX 百分含量和单向凝胶电泳结果比较 对两组优选后的精液进行精子 γ H2AX 含量的测定,并与优选前各组精液的精子 γ H2AX 含量进行比较。结果显示,优选后两组精液的 γ H2AX 含量与优选前各组精液的精子 γ H2AX 含量比较均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 3、图 3。通过观察单向凝胶电泳结果,经过 puresperm DGC 优选后的两组精液,其彗尾中 DNA

的百分含量与优选前各组精液比较均显著减少,见图 3;优选后的两组精液的精子 DNA 双链损伤百分率均减少,与各组优选前的单向凝胶电泳结果比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 4、图 4。



A: 优选前; B: 优选后。

图 3 精液优选前、后 γ H2AX 百分含量的比较



A: 优选前对照组; B: 优选后对照组; C: 优选前男性不育组; D: 优选后男性不育组。

图 4 精液优选前、后精子细胞核 DNA 损伤程度比较图($\times 400$)

表 3 两组精液优选前、后精子 γ H2AX 百分含量的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	优选前	优选后	P
对照组	23	13.80 ± 2.88	8.77 ± 2.28	0.000
男性不育组	27	23.87 ± 4.34	14.98 ± 2.02	0.000

表 4 两组精液优选前、后 DNA 损伤百分率比较 (个)

组别	时间	精子数	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	P
对照组	优选前	2 300	1 835	390	75	0	0	<0.01
	优选后	2 300	2 034	266	0	0	0	
男性不育组	优选前	2 700	1 825	719	132	24	0	<0.01
	优选后	2 700	2 260	424	16	0	0	

3 讨 论

众所周知,高质量的精子与卵子是受孕成功的重要因素。但在通常情况下,男性不育患者的精子质量比健康男性的精子质量低下,使得夫妇双方不能通过正常的性行为使女方自然怀孕。国内外大量的临床试验研究证实,男性不育患者的精子密度、精子活率、前向运动精子百分率、精子正常形态百分率以及线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)都显著低于健康男性^[6]。本研究也得出类似结果。

造成男性不育的因素很多,而精子 DNA 损伤是其中一个重要因素。已有大量研究表明精子 DNA 损伤程度与受孕率及其胚胎质量呈负相关^[7-11]。此外,有研究表明使用有 DNA 损伤精子进行辅助生殖技术将会增加子代患不育症的可能性以及某些遗传方面的疾病,并且男性不育患者精液中精子 DNA 损伤比例显著高于健康男性^[12-13]。因此,本实验选择男性不育患者精子进行 DSBs 的检测。 γ H2AX 焦点检测方法已开始用于检测各种化学、物理等因素所诱导的体细胞 DSBs^[14]。研究发现在人类精子细胞 DNA 损伤过程中同样伴随 γ H2AX 的出现,并且 γ H2AX 水平与生殖毒性物质 H_2O_2 或者阿霉素之间呈现明显的剂量-时间效应,认为 γ H2AX 焦点可以作为生殖毒性物质引发精子 DNA 损伤的特异、敏感指标。本研究运用流式细胞仪对健康男性和男性不育患者的精子进行 γ H2AX 含量测定,观察两组的 γ H2AX 含量是否有差异,同时运用密度梯度离心法和单向凝胶电泳对两组精液的精子进行优选和 DNA 双链损伤程度的检测,用于验证 γ H2AX 的出现与精子 DNA 双链损伤有关。研究结果显示,健康男性中精子 γ H2AX 的表达含量显著低于男性不育患者,差异有统计学意义($P < 0.01$)。运用碱性 SCGE 检测精子 DNA 双链损伤程度,结果也显示健康男性精液中 DNA 损伤精子程度显著低于男性不育患者。通过密度梯度离心法对两组精子进行优选,两组精子的 DNA 双链损伤的精子显著减低,与优选前比较差异有统计学意义。这一结果与国内外有关精子优选研究结果相似。国内外研究显示,经过密度梯度离心法优选后的精子能有效去除 DNA 损伤的精子^[15]。与单向凝胶电泳实验相类似,两组精子在经过密度梯度离心法优选后, γ H2AX 表达的精子也显著减低,且与优选前比较差异有统计学意义。这一结果说明密度梯度离心法能有效去除 γ H2AX 表达的精子。

密度梯度离心法优选精子的原理是利用在离心时,活力好的精子能更好地沿沉淀梯度的方向运动,迅速穿越不同密度的

液体界面,从而自行与死精子、凝集精子、白细胞以及杂质分离,达到优选精子的目的。有研究表明精子 DNA 损伤程度与精子前向运动呈负相关。当有 DNA 双链损伤时, DNA 断裂处便会有 γ H2AX 焦点的表达。因此,运用密度梯度心离法可以有效地去除 DNA 损伤的精子以及 γ H2AX 表达的精子;但是,该优选方法仍然存在不足之处,它未能有效地去除早期 γ H2AX 表达的精子,因为当精子出现早期 DNA 损伤时,精子的活力及前向性运动很可能在正常范围,这样就有可能不能有效地去除早期 γ H2AX 表达的精子。因此,寻找出一种新的优选方法筛选出早期 DNA 损伤的精子,仍是生殖医学领域关注的热点问题之一。

在临床上,SCGE 已经广泛用于检测各种细胞的 DNA 损伤,但是,存在耗时较长、操作繁琐、温度控制较为严格等缺点,在操作过程中还很容易造成 DNA 的再次损伤,因此,操作要格外小心。相比于运用流式细胞仪测定 γ H2AX 用于检测 DNA 损伤,其耗时短、操作简便、结果客观、易于观察,同时运用抗原抗体结合原理,增加了检测 DNA 损伤的灵敏度和准确度,并且在细胞双链 DNA 断裂早期即可出现 γ H2AX,使得有双链 DNA 断裂的细胞能在早期被检测出来。

参考文献

- [1] Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful Pros and cons[J]. J Androl, 2009, 30(3): 219-229.
- [2] Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics[J]. Andrologia, 2009, 41(4): 207-215.
- [3] Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction[J]. Indian J Med Res, 2008, 127(2): 115-123.
- [4] Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation; a marker for DNA damage[J]. Methods Mol Biol, 2012, 920: 613-626.
- [5] Tanaka T, Halicka D, Traganos F, et al. Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks(DSBs)[J]. Methods Mol Biol, 2009, 523: 161-168.
- [6] Barroso G, Taylor S, Morshedi M, et al. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations [J]. Fertil Steril, 2006, 85(1): 149-154.
- [7] Nunez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, et al. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI[J]. Reprod Sci, 2012, 19(11): 1163-1168.
- [8] Lewis SE, Simon L. Clinical implications of sperm DNA damage[J]. Hum Fertil(Camb), 2010, 13(4): 201-207.
- [9] Simon L, Brunborg G, Stevenson M, et al. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome[J]. Hum Reprod, 2010, 25(7): 1594-1608.
- [10] Avendano C, Franchi A, Duran H, et al. (下转第 1051 页)

NS、低值血清均符合要求,但由于干生化检测的检测下限较低,所以,最多只能做 1:8 稀释。Vitros 淀粉酶干片说明书中对高值淀粉酶血清标本推荐用低值血清稀释,仅仅能满足卫计委最新规定的 TEa,以卫计委最新规定的 1/2TEa 为标准的话,应该选用 NS 为宜。与喻颀等^[13]在干生化检测系统中对高值尿素氮、总胆红素、丙氨酸氨基转移酶和肌酐标本稀释液评价的结果不一致,可能与涉及测量过程的反应不同有关。

对于高值尿液淀粉酶标本,本研究选用了临床检验工作中被广大检验工作者广泛使用的纯水、Vitros 淀粉酶干片说明书推荐的等渗盐水,以及从理论上引入基质效应最小的低值尿液,共 3 种稀释液进行研究。以中国卫计委最新行业标准规定的淀粉酶检测的总 TEa \leq 15% 为偏差判断的依据,结合线性评价的要求进行判断,结果显示,在湿生化检测系统中,3 种稀释液基本满足要求,但只有低值尿液做稀释液时其偏差满足较严格的质量要求($<1/2TEa$);在干生化检测系统中, H_2O 、NS 均不符合要求,只有低值尿液符合要求,其 5 个稀释度的偏差均小于卫计委最新规定的 1/2TEa。值得注意的是,Vitros 淀粉酶干片说明书推荐的等渗盐水,在偏差和线性分析 2 个方面,均不符合要求。作者再次重复了该实验,得到相同的结果。提示在常规检验工作中,应及时验证和纠正厂家提供的一些参数。

不管是高值淀粉酶的血清标本还是尿液标本,本研究均发现同一稀释液在 2 个系统中稀释后对结果造成的影响是不同的,这与 Hashim 等^[14]分别使用湿生化检测和干生化检测分析肾结石的结果吻合。本实验中, H_2O 、生理盐水、7%BSA 均存在显著差异,究其原因,主要是检测原理不同造成的。应引起广大检验工作者的高度重视,建议必须在评价后才能用于临床工作。本研究还发现,即使是同一检测系统,使用不同的稀释液稀释高值淀粉酶血清和尿液标本,所造成的偏差也是完全不同的,这与王森等^[15]在肌酸激酶中的研究结论一致。

参考文献

- [1] 刘成忠,肖传宇,侯文华,等.不同稀释液对高值肌酸激酶稀释测定的影响[J].实用医学杂志,2009,25(14):2361-2362.
- [2] 贺勇,陈嵌,唐治贵,等.干、湿化学检测系统测定肾功能高值标本稀释液的选择与评价[J].重庆医学,2012,41(6):542-544.
- [3] WS/T403-2012.临床生物化学检验常规项目分析质量指标

[S].中华人民共和国卫生部,2012.

- [4] Prakash C, Shaffer CL, Nedderman A. Analytical strategies for identifying drug metabolites[J]. Mass Spectrum Rev, 2007,26(3):340-369.
- [5] Yang X, Liu L, Wu M, et al. Wet-chemistry-assisted nano-tube-substitution reaction for high-efficiency and bulk-quantity synthesis of boron- and nitrogen-codoped single-walled carbon nanotubes[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(34):13216-13219.
- [6] 林有东,蔡鹏威. VITROS 250 全自动干化学分析仪的评价[J]. 福建医药杂志,2006,28(6):116-117.
- [7] 丛玉隆. 实用检验医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:469-471.
- [8] Lin MH, Wu MC, Lin J. Variable classifications of glycemic index determined by glucose meters[J]. J Clin Biochem Nutr, 2010,47(1):45-52.
- [9] Feng JF, Chen TM, Wen YA, et al. Study of serum arginino-succinate lyase determination for diagnosis of liver diseases[J]. J Clin Lab Anal, 2008,22(3):220-227.
- [10] 胡伟,毕永春,宋景秋,等.不同稀释液对血清 HBsAg 定量测定的影响[J]. 东南大学学报:医学版,2010,29(4):464-466.
- [11] 陈燕,赵明,王金行.不同稀释液对 CK、CK-MB、LDH 和 AST 检查结果的影响[J]. 中国血液流变学杂志,2003,13(2):172-173.
- [12] 胡士玉,王海清,程正江,等.自制稀释液在化学发光定量检测 HCG 浓度的应用[J]. 标记免疫分析与临床,2013,20(3):192-193.
- [13] 喻颀,张煜,左桂兰,等. Vitros350 不同稀释液在线性评估中的比较[J]. 检验医学与临床,2008,5(24):1489-1490,1493.
- [14] Hashim IA, Zawawi TH. Wet vs dry chemical analysis of renal stones[J]. Ir J Med Sci, 1999,168(2):114-118.
- [15] 王森,宋世平,闫宏斌,等.三种稀释液对干化学测定肌酸激酶(CK)结果的影响[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(12):3013.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-12-15)

(上接第 1047 页)

- DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome[J]. Fertil Steril, 2010,94(2):549-557.
- [11] Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedo C, et al. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI[J]. Reprod Biomed Online, 2010,20(3):320-323.
 - [12] Nili HA, Mozdarani H, Aleyasin A. Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men[J]. Reprod Biomed Online, 2009, 18(4):479-485.

- [13] Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples[J]. Asian J Androl, 2008, 10(5):786-790.
- [14] Smart DJ, Ahmedi KP, Harvey JS, et al. Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay[J]. Mutat Res, 2011,715(1-2):25-31.
- [15] Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, et al. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection[J]. J Assist Reprod Genet, 2012,29(1):31-38.

(收稿日期:2014-10-22 修回日期:2014-12-18)