

寒冷地区部队指战员精液质量的调查

丁晓萍 闫素文 张宁 董卫 鲁海鸥 汤洁 王喜良

【摘要】 目的 探讨在寒冷地区作业是否对精液质量产生影响。方法 通过现况调查,采用分子水平实验技术即单细胞凝胶电泳和染色质结构分析与精液常规检查相结合的方法,评估寒冷地区部队指战员精液质量和精子亚临床损伤。结果 寒冷地区作业人员精液常规化验均在正常范围,但单细胞凝胶电泳 I 级彗星率高达 4.4%,与对照组(1.9%)比较差异有显著性,精子染色质结构分析中 comet 增高,平均值为 22.26%,两种实验结果均反映了精子 DNA 单双链不同程度的损伤。结论 长期工作在寒冷地区的人员可见精子 DNA 单双链损伤增加,但不足以影响精液质量。提示加强寒冷地区男性作业人员的生殖健康保健十分必要。

【关键词】 精液质量;寒冷地区;单细胞凝胶电泳;染色质

Study on sperm quality of males living in cold area DING Xiao-ping*, YAN Su-wen, ZHANG Ning, DONG Wei, LU Hai-ou, TANG Jie, WANG Xi-liang. *Reproduction Center, 202nd Hospital of Shenyang Command, People's Liberation Army, Shenyang 110003, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects on male reproductive function working under cold area.

Methods After on site investigation, advanced molecular lab analysis-single-cell gel electrophoresis (SCGE) and sperm chromatin structure assay (SCSA) which are combined with semen routine analysis were used to evaluate semen quality and sperm sub-clinical injury. **Results** Semen routine analysis showed that the semen parameters of the males working in cold area were within normal range, but level I comet cell percentage in SCGE increased significantly, which was 4.4%, compared to the contrast group(1.9%) with significant difference. During sperm chromatin structure assay parameters, comet increased, with an average value of 22.26%. The two kinds of results both showed single and double strand breakages in sperm. **Conclusion** Long-term exposure to cold could induce sperm DNA injury, but not affect sperm quality. The results suggested that it was important to reinforce the reproductive care in males working in cold areas.

【Key words】 Semen quality; Cold area; Single-cell gel electrophoresis; Chromatin assay

物理因素对男性生殖健康影响的流行病学调查

国内外很少报道,一些研究机构也仅限于精液常规分析和内分泌激素的检测。采用分子水平的实验技术进行流行病学调查,无疑将为开展男性生殖健康保健、早期发现亚临床损伤探索一条新的途径。季节与生殖健康的关系越来越受到人们的关注,近年来国内已有专家开始研究高热、高原低气压等对生殖功能的影响^[1-3]。为研究寒冷低温对精液质量的影响,我们对驻守在黑龙江边防线上某部 194 名指战员的精液质量进行调查分析,从 DNA 水平探讨寒冷气候对男性的生殖危害。

对象与方法

1. 研究对象:本研究按照整群抽样的方法进行。调查组入选标准:在寒冷地区工作 2 年以上,冬季户外温度低于 -30℃ 长达 3 个月,每人每日户外作业 > 2 h,年龄 20 ~ 40 岁之间。剔除标准:在寒冷地区工作不到 2 年,年龄 < 20 岁或 > 40 岁,近 3 个月内曾患急性病或合并男性生殖泌尿系统疾病者。根据上述标准共有 218 人参加,194 人应答,应答率为 88.9%。对照组选择冬季户外温度 -10℃ 左右、在非寒冷地区工作的部队指战员 212 人,172 人应答,应答率为 81.3%。工作年限和年龄要求同上。两组平均年龄 23 ~ 25 岁,平均工作年限 2.9 ~ 3.1 年。

2. 方法:首先对全体人员进行男性生殖健康专题讲座和咨询答疑,然后分别组织他们填表、查体及留取精液标本。

(1) 填表:组织专职人员协助受检者填写《男性

基金项目:全军“十五”医药卫生科研基金重点课题资助项目(01Z002)

作者单位:110003 沈阳,解放军第二〇二医院全军优生优育中心(丁晓萍、闫素文、张宁、鲁海鸥、汤洁、王喜良);中国医科大学临床流行病学教研室(董卫)

生殖健康调查表》,调查表内容依照全国妇女卫生学组制定的生殖职业流行病学调查中常用的分析指标及其统计方法。

(2) 查体及留取精液标本:体检内容包括测量身高、血压;重点查外生殖器;B超检查膀胱、前列腺和精囊腺等。以自慰法留取精液标本,3天后重复1次。以第2次精液标本为主。所有受检人员3天前被告知禁止大运动量训练、禁止洗热水浴和禁止大量饮酒。

(3) 实验室检测:①精液常规化验:主要检测精子密度、活力、畸形率、pH值和液化时间等项目。②精子DNA检测-精子染色质结构分析(sperm chromatin structure assay, SCSA):通过流式细胞仪检测精子中异常精子所占的比例。专业软件对输入数据处理得出SCSA参数 at 、 $compat$ 和 $sdat$ 。其中 $compat$ 是DNA变性精子的百分数。根据SCSA的创始人Evenson, Jost^[4]的研究得出评估人群生育潜能的阈值(又称亚不孕的预测值): $compat < 15\%$ 具有高生育潜能;16%~29%具有中生育潜能; $\geq 30\%$ 具有低生育潜能;80%~90%无生育能力。单细胞凝胶电泳(简称彗星试验, single-cell gel electrophoresis, SCGE)是根据Singh等^[5]1988年设计的方法,在荧光显微镜下观察单细胞的头部、尾部大小及比率。根据彗星尾部DNA含量将精子细胞核DNA损伤程度分为5级。0级:无损伤,精子核完整;1级:轻度损伤;2级:中度损伤,可见明显彗尾;3级:重度损伤;4级:完全损伤,精子核消失。

(4) 现场环境测试:调查组户外温度-30℃~-40℃,湿度70%,风力(东北风)2~3级,室内温度16℃,留精室温度20℃。

(5) 统计学方法:全部数据输入计算机,Excel软件分析,用 t 检验和 u 检验。

结 果

1. 精液常规检测:

(1) 精液密度分布情况:两组人员精子数量正常者略有差异,对照组达73.25%。各组精子数量异常者中分布比例不同,调查组中多精症者55人,占异常精子人数的68.75%,少精症仅22人;对照组中少精症者34人,占异常精子数的73.9%,多精症仅12人(表1)。即调查组以多精症为主,对照组以少精症为主。

表1 两组精子数量分布情况

分 类	调查组 (n=197)	对照组 (n=172)
精子数量正常(%)	117(59.39)	126(73.25)
少精症($\times 10^6/ml$)		
轻度 ≤ 20	15(7.6)	24(13.95)
中度10	5(2.5)	9(5.23)
重度 < 5	2(1.0)	1(0.58)
多精症($\times 10^6/ml$)		
I级120~200	33(16.7)	9(5.23)
II级200~250	6(3.0)	2(1.16)
III级 > 250	16(8.1)	1(0.58)
无精症	3(1.5)	0

注:括号内数据为构成比(%)

(2) 精液主要参数:表2显示调查组的精子形态和精子活力均高于对照组($P < 0.05$)。

表2 两组人员精液主要参数比较($\bar{x} \pm s$)

分组	人数	精子畸形率(%)	精子活力 $a+b$ 级(%)
调查组	194	14.7 \pm 7.9	44.3 \pm 19.1
对照组	172	19.1 \pm 11.2	36.4 \pm 20.6

注: P 值均 < 0.05

2. 精子DNA检测:

(1) 彗星试验:正常人群I级彗星率 $< 2\%$,对照组1.9%,而调查组高达4.4%,同时II级彗星率也略有增高(表3)。

(2) 精子染色质结构分析:调查组中 $compat$ 参数均明显高于对照组($P < 0.01$),差异有非常显著性(表3)。

表3 两组人员精子DNA损伤检测结果($\bar{x} \pm s$)

分组	人数	SCGE		SCSA
		I级细胞数*	II级细胞数#	$compat$ (%)
调查组	194	8.90 \pm 18.7(4.4)	1.20 \pm 5.3(0.6)	22.86 \pm 15.10
对照组	172	3.89 \pm 6.4(1.9)	0.47 \pm 1.8(0.2)	18.28 \pm 16.68
u 值		3.28 $\chi > 2.58$	1.20 $\chi < 1.96$	3.44 $\chi > 2.58$
P 值		< 0.01	> 0.05	< 0.01

*为I级彗星率;#为II级彗星率

讨 论

1. 精液质量与精子DNA检测:物理因素对精液质量的影响近年来受到国内外学者的重视,并进行了大量的动物实验及流行病学调查。物理因素中人们在日常生活和生产劳动环境中存在的气象条件(气温、气湿、气流和气压)同样对精液质量产生一定的危害。这种对劳动者健康的急性危害相对较少,而长期慢性影响则较多,有的还不太明显与严重。当某种因素造成精子损伤达到一定程度时才有可能出现精液参数的变化。因此需要一种十分敏感、特异、精确的实验方法来评估精子的亚临床损伤。

SCGE 和 SCSA 就是目前国内外学者研究较多的从分子水平检测精子 DNA 单、双链损伤的两种最新实验技术。

SCGE 是一种直接在荧光显微镜下肉眼观察单个细胞 DNA 链断裂的实验方法^[6]。本项研究调查组精液 I 级彗星率高达 4.4%(血标本正常参考值 0.5% 精液参考值 < 2%), 而对照组仅 1.9%, 调查组明显高于对照组(温带组)。反映不同地区不同温度对精子细胞结构有不同的影响。是否由于长期超低温作业使睾丸血管发生强烈收缩, 局部血液循环受阻, 精浆营养成分改变直接导致精子 DNA 链断裂发生损伤的因素不容忽视。当然有报道因潮湿、长期吸烟饮酒及禁欲时间长等综合因素的作用均可影响精液质量。当彗星试验中 III 级甚至 IV 级彗星率增高时精液常规分析将出现精子数量、精子运动速度和形态的变化。

流式细胞精子 SCSA 利用吖啶橙的异染性与计算机专用软件界面的流式细胞仪相结合, 能快速识别带有不正常染色质结构的精子。人精子 DNA 完整性对父方基因遗传给正常子代是非常重要的。进入受精卵的精子 DNA 受到损伤将给胎儿发育和子代健康造成一系列影响。环境、不良气候、药物、疾病、精神和身体应激状态都能影响精子染色质质量^[7,8]。按照 Evenson 评估人群生育潜能阈值判断, 本次调查两组 compat 指标的平均值均在正常生育潜能范围内, 但调查组与对照组相比差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 是否说明寒冷地区作业人员的精子异常染色质结构增多影响生育潜能, 尚不能得出肯定的结论。因为我们发现染色质结构分析 compat 高值的这部分人员当中 90% 是未婚人员, 其中不足结婚年龄的人员占 38%; 10% 的已婚者中无原因不孕不育者仅占 2%, 6% 已有子女。因此难以判断其生育潜能。但是通过 SCSA 检测可以反映出 DNA 变性的精子增多, 即精子损伤率增高。这种精子的亚临床损伤尽管没有证据证明能引起不育, 但是寒冷低温无疑使不孕预测值 compat 参数升高, 生育潜能由高到低。因此我们将定期跟踪随访, 同时扩大样本量, 增加有生育史人员的流行病学调查。

2. 高寒低温对男性生殖系统功能的影响及其防护 寒带地区的共同特点为冬季严寒期长, 寒潮较频, 气温低, 昼短夜长, 有时风急雨骤, 加以冻土厚、冰期长、积雪深等, 一年中严寒期可达 4~6 个月, 极端最低气温可达 -50℃。对特种作业人员的健康存

在着潜在的威胁。人体在 -1~6℃ 温度中依靠体温调节系统, 可使人体深部体温保持稳定。由于长时间低温, 使人体热损失过多, 深部体温下降到生理可耐限度以下, 从而产生了低温的不适症状。据有关资料统计, 长期在寒冷地带工作生活其冻伤、腰腿痛和风湿的发病率明显增多。对生殖功能的影响目前仅限于动物实验。周锡顺等^[9]采用低温对兔睾丸生精功能进行实验研究, 结果表明: 低温作用后, 既可对兔睾丸精子的发生产生快速影响, 又可破坏附睾中的成熟精子。在 -10℃ 作用下, 对精原细胞和支持细胞均无影响, 推测低温抑制精子形成是可逆的。本次调查发现寒冷地区官兵男性生殖系统疾患及性功能障碍的发生率较一般人群并没有增加, 中度以上的少精症、无精症仅占 5.1%, 平均各项精液参数均在正常范围, 精子密度较一般人群为高, 精子活力 (a+b 级) 基本正常, 精子畸形率 < 20% (表 2), 精液主要参数均优于对照组。提示高寒地区生育年龄作业人员即使长年工作在寒冷地带, 只要防护措施得当, 保持正常体温, 一般不会影响精液质量, 这点与国外相关报道一致^[10]。

本次人群研究存在着一些局限性和混杂因素, 因此对单独一次的调查结果应持审慎态度。今后最好采用精子全自动分析和亚临床损伤指标相结合的方法对特殊暴露人群作调查, 从器官到组织、从细胞到分子水平通过不同界面研究和探讨其相互关系, 使男性生殖的临床和基础工作全面开展起来。

参 考 文 献

- 1 Giwercman A, Bonde JP. Declining male fertility and environmental factors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:807-830.
- 2 Petrelli G, Mantovani A, Menditto A. Human reproduction and environmental risk factors. *Ann Ist Super Sanita* 1999; 35:137-143.
- 3 Thomeau P, Bujan L, Multigner L, et al. Occupational heat exposure and male fertility. *Hum Reprod* 1998; 13:2122-2125.
- 4 Evenson DP, Jost LK. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000; 22:169-189.
- 5 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitative of low level of DNA damage in individual cells. *Exptl Cell Res* 1998; 175:184-191.
- 6 徐德祥, 沈汉民, 王俊南. 单细胞凝胶电泳用于检测人精子 DNA 链断裂. *中华医学遗传学杂志* 2000; 17:281-283.
- 7 Evenson DP, Jost LK, Zinaman MJ, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility. *Clinic Humc Reprod* 1999; 14:1039-1049.
- 8 Perreault SD, Rubes J, Robbuis WA, et al. Evaluation of aneuploidy and DNA damage in human spermatozoa: applications in field studies.

Andrologia 2000, 32:247-257.

9 周锡顺,李桂兰,陈鹏,等.低温对兔睾丸生精作用的影响.男性学杂志,1997,11:155-158.

10 Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, et al. Regional differences in semen quality in Europe. APMIS 2001(suppl):62-69.

(收稿日期 2002-04-20)

(本文编辑:尹廉)

文后短评

本期刊出的《寒冷地区部队指战员精液质量的调查》在部队一线指战员中进行了精液质量的调查,观察的样本量较大,资料非常难得。从流行病学角度评价这一研究对于今后改进研究设计、提高研究质量将有一定的帮助。从研究设计角度评价,论文中设计了寒冷地区人群(调查组)和温带地区人群(对照组),两组的人数相似,有一定的可比性。检查项目包括常规公认的精液质量检查和较新的 SCSA、SCGE 检查。从论文分析、总结和撰写角度评价,方法基本正确,论文撰写格式规范。在肯定上述优点的基础上,该文尚存在一些问题需要注意。

1. 研究对象的来源和可比性问题:已知新兵入伍多在 18 岁左右,来自全国不同的地区,该研究的对象是两个地区部队的一线指战员,他们在接受调查前多数时间生活在不同的地区,入伍前的生活环境不详。在研究中观察到两组间存在某种差异,可以解释为与寒冷地区生活有关,也可以解释为与入伍前不同生活地区的环境有关。研究者没有考虑到研究对象来源的这一特点,在研究结果和评价中留下一个遗憾。

2. 暴露的测量与评价:暴露是流行病学研究非常重要的组成部分。该研究中最重要暴露因素是低温寒冷的暴露,但论文中没有两个地区部队一线指战员日常的环境温度资料,如平均每天在室外训练战备多长时间,白天和夜间的比例,有无防护等。另外,边防指战员接触有毒、有害环境因素少,装甲兵接触多,两个人群中精液质量的差异有可能与这方面的环境暴露有关,但这方面的资料不详。目前国内许多流行病学研究工作在暴露方面存在许多问题,由于存在理论和技术方面的困难,测量手段落后,操作困难,工作量大等原因而忽视暴露资料的收集、分析评价。论文中对暴露问题的介绍往往一带而过,对暴露与结局关系的分析往往不深入。这些

问题有待在今后工作中改进。

3. 哪些指标是关键的结果变量:结果变量是研究工作落实的基础,在该文中什么结果变量最重要?精液的常规检查最重要!但论文对精液常规检查方法的介绍较简单,没有质量控制措施方面的说明,没有精液质量异常的诊断标准。相反,作者对 SCSA 和 SCGE 的介绍比较详细,与常规检查方法的篇幅相比很不协调。

从全文总体看,新指标在回答寒冷地区作业是否影响精液质量问题中的贡献较小,虽然这些指标很“先进”,有较高的科技含量。试问,为了回答作者的工作假说,该研究能否仅做精液的常规检查而不做 SCSA 和 SCGE?不做 SCSA 和 SCGE 是否影响论文的质量?事实上,流行病学研究不一定要追求所谓“先进”的有高科技含量指标,而是应该根据研究目标和工作假说选择最有价值、最重要的指标。流行病学研究中这一简单的原则往往被忽视,造成很大浪费。

4. 同等对待调查组与对照组:同等对待调查组与对照组是进行比较的基础,而在该文的某些地方没有遵循这一原则。如调查组的介绍比较详细,而对照组的介绍很简单,甚至缺少相应的数据,使两组间的均衡性难以用数字进行比较。调查组有现场采样环境的详细介绍,而对照组没有任何说明。

5. 伦理学问题:近年来,伦理已经成为医学研究需要注意的问题,尤其在以人为研究对象的流行病学调查中,伦理问题比较突出。按照目前国内外惯例,在观察人群精液质量的工作中,项目的实施应申报本单位伦理委员会审查批准,在项目实施过程中应该做到被调查对象的知情同意。该论文没有涉及这一问题,在今后流行病学调查中应对伦理学问题予以足够的重视。

6. 讨论写什么:该文的讨论没有围绕作者的工作假说和主要观察结果展开。讨论的一个重点是精液质量与亚临床损伤,但作者没有提供任何直接的观察证据,所有的讨论只是从文献到文献。论文的结果显示,寒冷地区指战员精液的质量并不差,但作者为何还要讨论寒冷地区对男性生殖系统的危害及防护(作者的研究没有涉及防护问题)?从总体看,该文的讨论是不完整的。

(本刊专栏评析组)