

女性不孕与解脲脲原体生物群及抗精子抗体的相关性

梅艳娟¹, 曾文军¹, 邓珍良¹, 陈群², 皮红泉¹, 王柳均¹, 曹玉平¹

摘要 :目的 探讨女性不孕患者解脲脲原体(UU)不同生物群与抗精子抗体(ASA)的相关性。方法 对 80 例女性不孕者(观察组)及 80 例健康孕妇(对照组)行 UU 及其生物群检测,采用 ELISA 法检测 ASA 阳性率,分析 UU 与 ASA 的相关性。结果 观察组 UU 及其 T960 生物群与 ASA 阳性率均明显高于对照组($P<0.01$),观察组 UU 以 T960 生物群为主;对照组 UU 主要以 Parvo 生物群为主。两组 Parvo 生物群比较无统计学意义。观察组 ASA 阳性者 UU 及 T960 生物群感染率明显高于 ASA 阴性者($P<0.01$),两者 Parvo 生物群差异无统计学意义。结论 女性不孕的发生与 UU 及 ASA 有关,T960 生物群更容易引起不孕。

关键词 解脲脲原体;生物群;抗精子抗体;聚合酶链反应;不孕

中图分类号 R-331 **文献标识码** B **文章编号** :1009-9727(2011)11-1390-03

The association between biovars of ureaplasma urealyticum and antisperm antibodies in infertile women. MEI Yan-juan ZENG Wen-jun DENG Zhen-liang et al.(1.Changping People's Hospital ,Dongguan 523753 ,Guangdong P. R. China)

Abstract Objective To analyze the correlation of biovars of ureaplasma urealyticum (UU) with antisperm antibodies (ASA) in infertile women. **Methods** UU and its biovars in 80 infertile women (observation group) and 82 pregnant women(control group) were examined. ASA was detected by enzyme-linked immunoassay(ELISA). The association between biovars of UU and ASA were analyzed. **Results** There were significant differences in positive rate of UU ,T960 and ASA between observation group and control group ($P<0.01$). Biovar Parvo was the main biovar in control group and observation group were mainly infected with biovar T960. No significant difference was found in biovar Parvo between two groups ($P>0.05$). The positive rate of ASA in positive UU and biovar T960 were significantly higher than that of negative rate of ASA ($P<0.01$). **Conclusion** It is suggested that occurrence of infertility in infertile women is closely correlated with UU and ASA ,Biovar T960 can easily cause infertility.

Key words: Ureaplasma urealyticum ;Biovars ;Antisperm antibody ;Polymerase chain reaction ;Infertility

近年来,随着检测技术不断提高,解脲脲原体(UU)临床分离率呈上升趋势。UU 为条件致病微生物,并且不同的生物群和血清型可能与不孕症、自然流产、早产、死胎、生殖道炎症等威胁女性健康的疾病有着密切关系^[1]。抗精子抗体(ASA)是一种自身抗体,是导致女性不孕的主要免疫性因素之一。ASA 产生的原因有多种学说,其中生殖道感染是重要原因之一。本研究对我院不孕门诊的 80 例女性不孕患者进行了相关检测分析,探讨 UU 不同生物群与 ASA 及女性不孕的关系,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 80 例女性不孕患者(观察组),年龄 21~36 岁,平均 27.9 岁。婚后正常性生活 2 年以上不孕,无避孕及性功能障碍。排除标准 ①淋球菌、沙眼衣原体、滴虫、细菌性阴道病及梅毒感染;②会阴部外伤及手术、家族性遗传性疾病、先天不育不孕因素及排卵障碍、内分泌失调;③严重器质性疾病、肿瘤病史、肝肾功能异常者;④排除配偶不育可能。另选择 80 例健康孕妇为对照组,年龄 22~38 岁,平均 28.4 岁。

1.2 方法

1.2.1 ASA 检测 采用双抗体夹心 ELISA 法(试剂盒购自华美生物工程有限公司)。抽取静脉血分离血清。准备所需板条,依

次加入 100 μ l 标准系列、质控物、血清(1:100 稀释),封板 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,洗涤液洗 3 次,拍干板条加入 100 μ l 酶应用液,封板 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,洗涤液洗 3 次,拍干板条,每孔加入底物显色剂 100 μ l,18~25 $^{\circ}$ C 闭光显色 10~15min;每孔加入 50 μ l 终止剂,30 min 内用酶标仪比色(450nm/600nm),根据标准曲线计算 ASA 阳性(≥ 150 mU/100 μ l)率。

1.2.2 UU 及其生物群检测及鉴定

1.2.2.1 UU 检测 受检女性常规暴露宫颈,用无菌棉球拭净宫颈阴道分泌物,用无菌棉拭子插入宫颈管内 2cm,停留约 10s,旋转 1 周后取出,接种于 UU 液体培养基中。将液体培养基置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 72h,培养基由黄色变成红色判定为 UU 阳性。取含 UU 的液体培养基稀释后均匀涂布于 A7 培养基表面,使之扩散并渗干,置上述温箱中培养 24~72h。用低倍镜观察琼脂表面菌落的生长情况,有典型棕黑色海胆状细小菌落为 UU 生长。挑取单个典型菌落重复接种于液体培养基增菌后,菌液置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2.2.2 UU 生物群鉴定 ①DNA 提取:以 UU-3 血清型标准株(Parvo 生物群)和 UU-8 血清型标准株(T960 生物群)为标准菌株(深圳晶美公司),以不含 UU 的液体培养基作为阴性对照。将保存的标准和临床菌株液体培养基自低温冰箱中取出,自然

基金项目:东莞市医疗卫生单位科技计划项目(No.2010105150131)

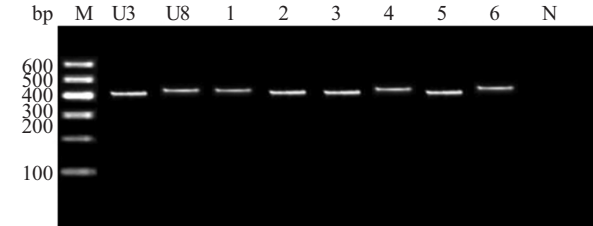
作者单位:1.东莞市常平人民医院,广东 东莞 523573; 2.广东医学院微生物教研室,广东 湛江 524000

解冻,吸取 400μl 菌液,13 200r/min 离心 15min,吸弃上清液;加入 50μl 的蛋白酶 K 溶液(含 0.5%的 NP40) 55℃冰浴 1h;95℃保温灭活蛋白酶 K 10min;10 000r/min 离心 0.5min,取上清液作 PCR 模板试验。② PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳^[2] PCR 反应体系均为 20μl M 引物各 1μl 2.5U/μl Taq 酶 0.5μl,10× PCR Buffer (含 Mg²⁺)5μl 2.5mM dNTP 混合物 4μl DNA 模板 2μl ddH₂O 36.5μl,总反应体积 50μl。UU 分群引物:上游 5'-GTATTGCAATCTTTATATGTTTCG-3';下游:5'-CAGCTGA TGTAAGTGCAGCATTAAATTC-3'。PCR 反应条件:95℃预变性 4min、95℃变性 45S、54℃退火 45S、72℃延伸 1min,共 40 个循环,最后 72℃延伸 7min。其中 Parvo 生物群扩增产物为 403bp,T960 生物群为 448bp。将 PCR 扩增产物 10μl 加入 1.5%琼脂糖凝胶样品孔中(含 1μg/ml 溴化乙锭)电泳,于紫外线灯上观察结果。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件,组间比较采用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 UU 及其生物群与 ASA 检测结果 本研究未发现两生物群混合感染的标本,见图 1。观察组患者 T960 生物群占 UU 检测率 69.70%(23/33),对照组 Parvo 生物群占 UU 检测率 78.57%(11/14)。观察组 UU 及 T960 生物群明显高于对照组($P < 0.01$),Parvo 生物群两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组 ASA 检测率明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 1。



注:M DNA 标准分子量,N:空白对照,U3 and U8 标准菌株基因扩增物;1 to 6 临床标本基因扩增物。

图 1 UU PCR 生物群电泳结果

表 1 两组 UU 及其生物群与 ASA 阳性率(n=80,%)

检测项目	观察组	对照组	P 值
UU	33 (41.25)	14 (17.50)	< 0.01
Parvo	10 (12.50)	11 (13.75)	> 0.05
T960	23 (28.75)	3 (3.75)	< 0.01
ASA	25 (31.25)	1 (1.25)	< 0.01

2.2 观察组 ASA 与 UU 及其生物群的关系 观察组 ASA 阳性者的 UU 及 T960 生物群感染率明显高于 ASA 阴性者($P < 0.01$)。但 ASA 在 Parvo 生物群差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 观察组 ASA 与 UU 及其生物群的关系 [例(%)]

观察组	n	UU 阳性	Parvo 阳性	T960 阳性
ASA 阳性	25	15 (60.00) *	3 (12.00)	14 (56.00) *
ASA 阴性	55	18 (32.73)	7 (12.72)	9 (16.36)

注:与 ASA 阴性者比较,* $P < 0.01$

3 讨论

解脲脲原体(UU)是一种寄居于男女泌尿生殖道的常见的无细胞壁原核微生物,当人体免疫力下降或泌尿生殖道粘膜受损时,在一定条件下可引起生殖道疾病。本研究女性不孕患者

UU 阳性率明显高于对照组,与既往研究相似^[3,4],说明不孕与 UU 有关。女性感染 UU 后,UU 黏附于宿主细胞膜,吸取脂质与胆固醇,并通过免疫介导损伤引起宫颈炎、盆腔炎及输卵管堵塞;此外,女性宫腔内 UU 吸附于精子表面,通过与精子表面的受体特异性结合,将结合部位连接成卷曲状态,从而降低精子的活动力和速度,影响精子对卵子的穿透能力,从而引起不孕^[3]。ASA 是机体产生的与精子表面抗原特异性结合的抗体,是影响女性不孕的重要原因之一。本研究结果显示,观察组 ASA 水平明显高于对照组,说明免疫性因素在不孕不孕中起重要作用。正常女性生殖道具有屏障作用,精子抗原与女性体内的免疫系统不直接接触,加之男性精浆中存在的免疫抑制物可以抑制女方对精子抗原的免疫应答而使女方形成免疫耐受,使大部分已婚妇女不会形成免疫性不孕,因此女性体内不会产生 ASA,但当女性生殖道内的环境发生改变、生理屏障受到破坏,增加了精子抗原进入血液以及精子与女性宫颈上皮或子宫内膜免疫细胞接触的机会,刺激女方免疫系统产生循环或生殖道局部的 ASA^[4]。ASA 致免疫不孕的主要机制:①对精子运行的影响。②对获能及顶体反应的影响。③对穿过透明带及精卵融合的影响。④干扰受精及受精卵着床。本研究中,女性不孕患者 ASA 阳性者的 UU 感染率明显高于 ASA 阴性者,提示女性不孕患者 ASA 的产生与 UU 的产生有关,与以往研究相似^[3-5]。UU 与精子膜蛋白间存有共同的抗原,UU 感染导致机体 ASA 升高的原因可能为局部生殖道产生针对病原体膜上糖类的抗体,此抗体与精子膜表面的糖蛋白起交叉反应^[4]。

UU 在性成熟无症状的女性宫颈或阴道中的分离率达 20%~50%,作为人群即便经过抗生素介入,降低其携带率,经过一段时间的正常性行为,携带率也会恢复原来水平^[6]。如何判断 UU 是感染状态或是携带状态,是临床中亟待解决的问题。临床根据 UU 的表型和基因型特征将其分为 Parvo 生物群(包括 1、3、6、14 四种血清型)和 T960 生物群(包括另外 2、4、5、7~13 十种血清型)。研究发现,UU 的血清型、UU 浓度及感染时间及宿主状态是 UU 感染的主要影响因素^[6]。尽管人们为探讨不同血清型 UU 的致病性进行了大量研究,但都无足以令人信服的证据说明某种血清型肯定和某种疾病有关。所以 UU 的分型对疾病的发病机制有重要作用。对于 UU 两大生物群对人类的致病性方面仍存在较多争议,甚至有些研究得出截然相反的结论,说明 UU 致病性研究方面的多因素性和复杂性。多项研究倾向于 T960 生物群是可能的致病菌群,而 Parvo 可能是定植菌群^[7,8],本研究结果亦支持此观点。Abele-Horn 等^[9]进行的前瞻性研究结果发现,T960 生物群在盆腔炎患者和流产患者中检出比率显著升高,分别为 57%和 42%,是主要的菌群,而且相对于 parvo 生物群似乎造成更多不良妊娠结局,两者在出生体重、怀孕时间、早产发生率方面差异均有统计学意义。本研究观察组 UU 及 T960 生物群、ASA 阳性率均明显高于对照组,两组 Parvo 阳性率无统计学意义;观察组 ASA 阳性者的 UU 及 T960 阳性率明显高于 ASA 阴性者($P < 0.01$),但 Parvo 阳性率无统计学差异。说明 UU 及 T960 生物群与 ASA 在女性不孕的发生中起重要作用,Parvo 生物群可能是定植菌群,而 T960 生物群更容易引起不孕。可能因为 T960 生物群产生脲酶多(下转第 1407 页)

4.08± 1.02 ,明显高于 MAP 患者的 2.45± 0.76($P<0.05$)。

2.3 IL-18 与 Ransons' 评分的相关性 所有 AP 患者入院后第 1d 的血清 IL-18 与 Ransons' 评分呈正相关($r=0.289$ $P<0.05$)。

表 1 各组血清 IL-18 水平的变化

组别	例数	IL-18(ng/ml)			
		1d	3d	7d	14d
对照组	32	9.52± 2.37	9.68± 3.08	9.34± 3.01	9.60± 3.22
MAP	35	29.47± 7.31*	27.33± 7.45*	17.39± 5.66#	10.38± 3.69
SAP	23	51.30± 12.16*△	48.09± 11.82*△	19.72± 6.70#	11.47± 4.84

注:与正常对照组对比,* $P<0.01$ # $P<0.05$ △与 MAP 组对比 $P<0.05$ 。

3 讨论

AP 是一种临床常见消化系统急危症,早期诊断及对病情的严重性进行判断,对治疗和预后有重要意义。目前研究证实,AP 是由于不同致病因子导致胰腺细胞损伤,活性胰酶被释放,刺激大量白细胞激活,大量炎症介质释放,从而引起的全身严重的炎症反应,导致多脏器损害的过程^[2]。因此,细胞因子等炎症介质在 AP 的发病中起重要作用,可以从参与胰腺炎症的介质中寻找诊断的可靠指征。

IL-18 是 1989 年 Nakamura 等首次发现的一种未糖基化的多肽物质,能诱导产生干扰素- γ 。近年来的研究发现,它是一种具有多向性效应的促炎症因子,在炎症反应链中起着关键性的作用^[3]。IL-18 可以诱导细胞产生许多细胞因子,在 IL-12 协同作用下,IL-18 也可诱导巨噬细胞、单核细胞、NK 细胞等生成 IFN- γ ,促进 T 细胞的增殖以及增强 FasL 介导的 Th 1 细胞、NK 细胞的细胞毒作用。此外,它可以上调细胞间黏附因子的表达^[4]。IL-18 在急性水肿性胰腺炎和急性坏死性胰腺炎中都高表达,而且在胰腺炎病理发展的不同阶段中的表达有显著性差异,与急性胰腺炎发生局部胰腺坏死及远处器官功能衰竭存在

相关性^[5]。IL-18 可能作为一种新的应激指标,反映机体的炎症情况,对急性胰腺炎的严重程度和预后评估有一定的临床应用价值^[6]。

在我们的试验中,AP 患者入院后第 1、3、7d,AP 患者的血清 IL-18 均明显高于正常对照组,并且以第 1d 升高最为明显,后逐渐下降,至第 14d 时则无明显差别,而 SAP 患者第 1、3d 的血清 IL-18 水平显著高于 MAP 患者,第 7、14d 时则无明显差别。入院后第 1d SAP 患者的 Ransons' 评分明显高于 MAP 患者,而所有 AP 患者入院后第 1d 的血清 IL-18 与 Ransons' 评分有良好的正相关。以上结果进一步证明了炎症反应是 AP 发生和发展的重要原因,IL-18 通过调控炎症因子和生物活性物质而参与 AP 的发病,并与 AP 的严重程度相关,可以作为 AP 早期诊断和病情严重性评判的临床实验室指标。

参考文献:

[1] 中华医学会消化分会胰腺病学组.中国急性胰腺炎诊治指南(草案)[J].中华消化杂志,2004,24(3):190-192.
[2] 袁耀宗,姚玮艳.急性胰腺炎的发病机制[J].中国实用内科杂志,2004,24(12):706-708.
[3] Gracie JA,Robertson SE,McInnes IB.Interleukin-18[J].J Leukoc Biol,2003,73:213-224.
[4] Nakamura A,Shikata K,Hiramatsu M et al.Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes[J].Diabetes Care,2005,28:2890-2985.
[5] 康迎新,王先坤,李培武,等.血清 IL-18 在急性胰腺炎严重性预测中的研究[J].甘肃科技,2007,23:186-188.
[6] 房林,褚庆华,贺健,等.急性胰腺炎血浆白介素-18 水平与急性时相蛋白的关系[J].临床消化病杂志,2006,3:171-172.

收稿日期 2011-08-15 编辑 吴中华

(上接第 1391 页)

于 Parvo 生物群,对宿主的细胞毒性更大,致病性更强^[10]。临床开展 UU 生物群的检测,区别对待 UU 不同生物群感染的治疗,不仅有利于合理处理病人,减少临床不合理使用抗菌药物,避免耐药性产生与播散、节省医疗资源,而且对减少不良妊娠结局,预防新生儿感染,开展优生优育具有重要意义。

总之,UU 的 T960 生物群与 ASA 及女性不孕的关系更密切,其机制有待更进一步探讨。

参考文献:

[1] 纪榕荣,张洪文.泌尿生殖道解脲支原体感染的分型研究进展[J].实用医学杂志,2009,25(6):997-999.
[2] 陆春,叶庭路,马寒,等.女性下生殖道解脲支原体生物群与临床症状相关性初步探讨[J].中国皮肤性病学杂志,2009,23(10):645-651.
[3] 马丽娜,李凤云,冯锡才.不孕不育与支原体、衣原体感染和抗精子抗体的关系[J].实用全科医学,2008,6(5):463-464.
[4] 林珠,闵玲.245 例不孕不育患者抗精子抗体与解脲支原体结果

分析[J].国际医药卫生导报,2010,16(6):712-714.
[5] 邓超干,沈彦珍,林小丹,等.女性不孕与支原体、衣原体感染和抗精子抗体的相关性[J].中国优生与遗传杂志,2005,13(10):122-130.
[6] 陆春,朱国兴,卢荣标.解脲支原体对女性生殖道致病性的研究进展[J].新医学,2008,39(2):132-133.
[7] Povlsen K,Bjomelius E,Lidbrink P et al.Relationship of Ureaplasma urealyticum (biovar 2)to nongonococcal urethritis [J].Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2002,21(2):97-101.
[8] Deguchi T,Yoshida T,Miyazawa T et al.Association of Ureaplasma urealyticum (biovar 2)to nongonococcal urethritis [J].Sex Transm Dis,2004,31(3):192-195.
[9] Abele-Horn M,Wolff C,Dressel P et al.Association of Ureaplasma urealyticum biovars with clinical outcome for neonates,obstetric patients and gynecological patients with pelvic inflammatory disease [J].J Clin Microbiol,1997,35(5):1199-1202.
[10] 张帝开,李秀云,覃春容,等.健康妇女下生殖道解脲支原体及其分群分型研究[J].中国微生态学杂志,2007,19(3):288-292.

收稿日期 2011-06-07 编辑 杜中华