

人乳头瘤病毒感染女性配偶精液参数及抗精子抗体检测分析

刘学伟,赵学英,郝彤,赵海英

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(20150823)

作者单位:062552 河北省任丘,华北石油管理局总医院妇科(刘学伟、赵海英),泌尿外科(赵学英),病理科(郝彤)

通信作者:赵学英,E-mail:zhxy120@126.com

【摘要】目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)感染女性的配偶精液 HPV 感染状况以及其对精子参数和抗精子抗体(AsAb)的影响。**方法** 收集 2014 年 1 月—2015 年 12 月在华北石油管理局总医院进行精液检测的 125 例已婚男性为研究对象,其配偶均经宫颈组织检测确定为 HPV 感染。分别对男性的精液标本进行常规分析及 HPV、AsAb 检测。**结果** HPV 感染女性的配偶精液 HPV 感染阳性率为 42.4% (53/125),其中单一型感染 49 例(92.5%),二重感染 3 例(5.7%),多重感染 1 例(1.8%),夫妻 HPV 吻合率为 15.2% (19/125)。HPV 感染男性的精子活力低于非感染男性($t=2.928, P=0.004$),而精子密度、精子存活率、精子畸形率差异无统计学意义($P>0.05$)。HPV 感染男性精液 AsAb 阳性率高于非感染男性(34.0% vs. 18.1%, $\chi^2=4.142, P=0.042$)。**结论** HPV 感染女性的配偶也是病毒感染的高危人群,特别是对于有生育愿望的夫妇,应关注感染对男性生育的影响。

【关键词】 人乳头瘤病毒;精液参数;抗精子抗体

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2016.05.014

Analysis of semen parameters and anti-sperm antibodies in male whose spouses infected with human papilloma virus

LIU Xuewei*, ZHAO Xueying, HAO Tong, ZHAO Haiying. * General Hospital of Huabei Petroleum Administration, Hebei Province, Renqiu 062552, China

Corresponding author: ZHAO Xueying, E-mail: zhxy120@126.com

【Abstract】 Objective To explore the infection status in male whose wife infected with human papilloma virus and the impact on sperm parameters and anti-sperm antibodies (AsAb). **Methods** From December 2015 to January 2014, 125 cases of married men in the General Hospital of North China Petroleum Administration were collected as study subjects. Their spouses were identified as HPV infection by the detection of cervical tissue. Routine analysis of semen samples and HPV, AsAb detection were performed. **Results** The HPV infection of female spouses semen HPV infection positive rate was 42.4% (53/125), the single type infection in 49 cases (92.5%), dual infection in 3 patients (5.7%), multiple infection in 1 case (1.8%), the husband and wife HPV agreement rate was 15.2% (19/125). Sperm motility of male HPV infection was lower than that of non-infected males ($t=2.928, P=0.004$), and sperm density, sperm survival rate, sperm malformation rate difference was not statistically significant ($P>0.05$), HPV infection in semen AsAb positive rate higher than in non-infected males (34.0% vs. 18.1%, $\chi^2=4.142, P=0.042$). **Conclusion** Male whose wife infected with HPV is at high risk of infection. It is necessary to pay more attention to the influence of infection on male fertility for couples who have fertility willingness.

【Keywords】 Human papilloma virus; Seminal fluid parameter; Anti-sperm antibody

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一种无包膜的小 DNA 病毒,有极强的嗜上皮细胞属性,可引发皮肤及黏膜病变^[1]。HPV 感染是常见的性传播疾病之一,男性感染后多不表现生殖器明显病变,但病毒可通过性生活传染给女性性伴侣,感染女性也可

将病毒传播给男性,使之成为病毒感染者。我们检测了 125 例宫颈组织 HPV 感染女性的配偶精液常规、精液 HPV 和精液抗精子抗体(anti-sperm antibodies, AsAb),明确配偶精液 HPV 感染状况以及感染对精子参数和 AsAb 的影响,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2014 年 1 月—2015 年 12 月在华北石油管理局总医院泌尿外科进行 HPV 及精液检测的已婚男性 125 例作为观察对象,其配偶均经宫颈组织检测确定为 HPV 感染,夫妻性生活正常且双方均无感染临床表现(亚临床感染期)。排除标准:(1)考虑 HPV 来源的不确定性将夫妻一方或双方有婚外性生活史者排除;(2)考虑年龄因素对精子质量的影响,将大于 40 岁的男性排除;(3)女方已确诊有宫颈癌及癌前病变等体征阳性患者;(4)夫妻一方或双方有尿道非特异性感染性疾病者。男性年龄 24~40 岁,中位数 32.6 岁,女性年龄 22~43 岁,中位数 30.2 岁。本研究经华北石油管理局总医院医学伦理委员会审查通过,所有受试者均自愿参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 观测指标

1.2.1 精液标本采集:男性禁欲 5~7 d 后手淫或取精器取精液,精液置于 37℃ 水浴箱内液化后待行精液常规和 AsAb 检测。取精后用特制的无菌细湿棉签置于尿道口内 0.5~1 cm 处,充分蘸取残余精液,头端迅速置于洗脱管中并旋紧管盖,保持洗脱管直立放置,待检。

1.2.2 精液 HPV 检测:所有标本先用 Digene 公司的第二代杂交捕获试验系统对 13 种高危型 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68 进行检测。高危型 HPV 阳性标本再应用导流杂交法基因芯片技术进行分型检测。检测仪器及试剂包括 QIAgen DNA 提取试剂盒、广东凯普医用核酸分子快速杂交基因分型试剂盒、凯普 DNA hybriMax 导流快速杂交仪等。实验室检测及结果分析严格按照实验室流程进行,具体操作如下:(1)DNA 的提取,充分漂洗棉签头部,将洗脱液全部转移至离心管内,高速离心后,弃去上清液,保留离心管底部的细胞。随后加入裂解液,充分振荡混匀,加热至 100℃ 10 min,再次离心后,取中间层 DNA 溶液待用。(2)HPV 聚合酶链反应(PCR 扩增),将 PCR 反应管依次编号,分别加入已提取的 DNA 样品、空白对照、阳性对照,高速离心后上机扩增。(3)杂交、孵育和显色,取 15 ml 离心管,放入标有样本编号的膜条,加入 5~6 ml 配比液及所有 PCR 产物,拧紧管盖。将离心管放入沸水浴中变性 10 min 后取出,立即放入杂交箱内杂交 1.5h。取出膜条,转移至预热液中,轻摇洗涤后将膜条转移至孵育液中室温孵育 30 min,弃去孵育液,室温下洗涤后放入显色液中显色至少 30 min。(4)结果判定,根据蓝紫色圆点出现的有

无及位置判断是否 HPV 感染及基因型,对照膜条相应位点出现蓝紫色圆点提示检测结果有效。

1.2.3 精液参数检测:采用北京伟力 WLJY-9000 精子质量分析系统,按照《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》第 5 版^[2]进行常规检测。精液质量分析正常参考标准:(1)精液体积 ≥ 2 ml,(2)精液酸碱度 ≥ 7.2 ;(3)液化时间 ≤ 60 min;(4)精子密度 $\geq 20 \times 10^9$ /L;(5)精子活力 a 级 $\geq 25\%$ 或 a + b 级 $\geq 50\%$;(6)精子正常形态率 $\geq 15\%$ 。检测项目包括精子密度、精子存活率、精子活力和畸形精子率。精子活力统计 a 级 + b 级前向运动的精子百分率。

1.2.4 AsAb 检测:精液常规检测后,1 000 r/min 离心精液样本 15 min,取上清液,按照 1:51 的比例稀释后,混合均匀。根据试剂盒操作说明书的步骤要求进行酶联免疫吸附试验(ELISA)检测。抗精子抗体酶联免疫定量试剂盒由深圳科润达生物工程有限公司提供(RE52029)。在酶标仪上测定波长 450 nm 的 OD 值,根据标准曲线将 OD 值转换成样本测定的 AsAb 浓度值。正常值范围:稀释精液 AsAb 浓度 < 150 mU/100 μ l,稀释精液 AsAb 浓度 ≥ 150 mU/100 μ l 为检测结果阳性。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精液 HPV 检测 125 例男性中 HPV 感染 53 例(42.4%);其中单一型感染 49 例(92.5%),二重感染 3 例(5.7%),多重感染 1 例(1.8%)。HPV 亚型按其出现的频次依次为 16 型(35 例次)、18 型(10 例次)、58 型(6 例次)、52 型(5 例次)、33 型(1 例次)和 59 型(1 例次)。与配偶 HPV 检测亚型配对后发现 17 例 HPV 亚型完全吻合,双方均为同一亚型感染;另有 2 例亚型部分吻合,即一方为多重感染,其配偶为单一亚型感染且双方均有同一亚型。未发现感染女性与其丈夫同为多重感染者。夫妻 HPV 吻合率为 15.2%(19/125),其余为感染亚型不同或单方检测阳性。

2.2 精液参数检测 将精液 HPV 检测结果阳性的 53 例男性纳入感染组,72 例检测阴性者纳入对照组,感染组男性年龄、婚龄分别为(33.4 \pm 5.9)岁、(12.8 \pm 5.7)年,对照组男性年龄、婚龄分别为(32.5 \pm 6.8)岁、(13.7 \pm 4.6)年,2 组男性年龄、婚龄等一般状况比较差异无统计学意义($t = 0.789$, $P = 0.431$; $t = 0.945$, $P = 0.347$)。检测结果显示,2 组男性精子密

度、精子存活率、精子畸形率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 感染组男性的精子活力低于对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 2 组精液分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	精子密度 ($\times 10^9/L$)	精子存活率 (%)	精子活力 (%)	精子畸形率 (%)
对照组	72	41.4 \pm 17.0	56.0 \pm 16.2	42.7 \pm 15.8	26.2 \pm 11.3
感染组	53	43.1 \pm 15.9	54.3 \pm 18.4	34.9 \pm 13.1	24.5 \pm 12.6
<i>t</i> 值		0.568	0.547	2.928	0.792
<i>P</i> 值		0.571	0.585	0.004	0.430

2.3 抗精子抗体检测 对照组精液 AsAb 检测阳性 13 例 (18.1%), 阴性 59 例 (81.9%); 感染组 AsAb 阳性 18 例 (34.0%), 阴性 35 例 (66.0%)。HPV 感染组男性精液 AsAb 阳性率高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.142, P = 0.042$)。

3 讨论

HPV 属乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒 A 属, 是一种小的双链闭环 DNA 基因组, 是感染泌尿生殖道黏膜的常见病毒之一^[3]。根据病毒的致病性, 一般将 HPV 分为高危型和低危型。低危型 HPV 感染主要与良性尖锐湿疣的发病有关, 高危型 HPV 持续感染是宫颈癌的主要危险因素, 90% 以上的宫颈癌伴有高危型 HPV 感染^[4], HPV 感染的检测已成为预防、诊断和处理宫颈病变的重要依据^[5-6]。性生活传播是高危型 HPV 感染的最主要的传播途径。男性感染后大多为亚临床感染或潜伏感染, 多不表现皮肤、黏膜病损或疣状赘生物形成, 但由于男性生殖道缺乏女性特有的阴道酸性环境, 自身清除病毒的能力较差, 只能依靠自身免疫功能逐渐清除病毒, 甚至 HPV 有可能在体内长期存在, 因此男性在性生活传播中起着重要的“载体”和“桥梁”作用^[7]。男性感染 HPV 后, 病毒不仅存在于外生殖器及肛周部位, 也存在于生殖道中, 可以通过采集尿道分泌物、精液和前列腺液等进行检测。无症状的性生活活跃男性中约有 10% 的人精液中可检测到 HPV^[8]。托娅等^[9]检测接受体外受精—胚胎移植的 330 对夫妇, 女性阴道分泌物 HPV 阳性率为 13.6%, 男性精液 HPV 阳性率为 9.1%, 夫妻双方同时 HPV 阳性率为 1.8%。另一项荟萃分析显示不育男性精液 HPV 的感染率为 16%^[10]。由于男女双方在生殖道内环境、免疫功能和行为习惯等方面存在的差异, 导致自身防御和清除病毒的能力不同, HPV 的感染率和感染亚型不尽相同。但在感染的优势亚型上双方大体一致, 在一定程度上也说明男性在 HPV 防治中的不可或缺性。

目前, HPV 感染与男性不育的关系正逐步受到人们的关注, 也成为生殖领域研究的一大热点。国外有研究通过体外仓鼠卵—人类精子渗透试验证实^[11], HPV 表面可表达 L1 衣壳蛋白、syndecan-1 糖蛋白, L1 衣壳蛋白可通过 syndecan-1 糖蛋白渗透进入精子内部, 并紧密绑定于精子。感染 HPV-DNA 多局限于精子及精液中的脱落上皮细胞内, 主要定位于精子头部表面的赤道段^[12], 对精子的 DNA 完整性产生一定影响, 甚至会降低受精的成功率、影响胚胎质量、增加妊娠自然流产率^[13]。HPV 感染也可影响精子与次级卵母细胞相遇时的顶体反应进而影响两者的融合。HPV 感染精液初期, HPV-DNA 可与宿主细胞的 DNA 链进行重新整合, 且处于低浓度、稳定的自我复制中, 可逃避宿主免疫系统的监控, 不足以导致宿主出现强烈的免疫反应, 处于病毒携带阶段。当具备一定的时间和基因组拷贝数后, 机体即无法通过 HPV L1 壳蛋白激活免疫反应来清除病变细胞, 进一步影响精子功能。本研究发现, HPV 感染对精子的密度、存活率、畸形率以及精子畸形率等没有显著影响, 可能由于患者仍为无症状携带者且精子与 HPV 作用时间短, HPV 衣壳蛋白基因组拷贝数低有关。精子活力受 HPV 感染影响较大, 主要表现在精子速率减低和前向运动能力降低, 推测与受感染精子头侧摆幅度减低以及精子 DNA 链碎片化有一定关系^[14]。HPV 感染精液或 HPV-DNA 重新整合是否会导致 HPV 感染卵子或对胚胎的发育造成影响尚缺乏可靠依据, HPV 与精子相互作用的确切机制也需进一步的研究。

完整的血睾屏障是阻止具有独特分化抗原功能的精子与男性免疫系统接触产生 AsAb 的基础。男性生殖系统损伤或感染, 均可造成血睾屏障不同程度地受损。一旦精子或其可溶性抗原溢出即引起致敏淋巴细胞产生免疫反应, 机体产生的 AsAb 可影响精子获能、精卵结合和受精卵发育等各个环节^[15]。本研究结果显示, HPV 感染男性 AsAb 阳性率高于 HPV 阴性男性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 GAROLLA 等^[16]的研究结果类似, 推测 HPV 感染有影响男性生育能力或引发女性免疫性不孕不育的可能。HPV 外膜糖类与精子膜表面糖蛋白可能含有结构相同或相似的抗原决定簇^[17], HPV 感染时局部黏膜可产生针对 HPV 外膜糖类的抗体, 免疫系统动员淋巴细胞产生免疫反应, 从而导致交叉免疫反应产生大量 AsAb, 抑制精子活性。刘瑞菡等^[18]对比了男性血浆和精液内的 AsAb 阳性率, 认为男性血浆和精液的 AsAb 阳性率有明显差异, 血浆中出现 AsAb 并不表示精液中也会出

现 AsAb, 因此检测精液 AsAb 更具临床诊断价值, 且 AsAb 结果阳性持续时间长短、阳性率的高低与疗效和预后情况也密切相关。由于样本量所限, 本研究未能对男性感染 HPV 病毒载量、不同病毒亚型进行分层研究来探讨 HPV 与精子活力、抗精子抗体浓度之间的相关性, 还有待在后续的研究中进一步深入探讨。

综上所述, HPV 感染女性的配偶也是病毒感染的高危人群。HPV 感染可造成男性精子活力降低和 AsAb 水平升高, 影响精子功能。女性一旦检测出 HPV 感染阳性, 有必要对其配偶进行 HPV 筛查, 以促进夫妻共治。特别是对于有生育要求的夫妇, 更应关注 HPV 感染对男性生育能力的影响。

作者贡献声明

刘学伟、赵学英、赵海英: 课题设计, 数据获取, 论文撰写; 郝彤: 资料整理, 统计学分析, 修改论文

参考文献

[1] DERLUND-STRAND D S, KJELLBERG L, DILLNER J. Human papillomavirus type-specific persistence and recurrence after treatment for cervical dysplasia [J]. *J Med Virol*, 2014, 86 (4): 634-641. doi: 10.1002/jmv.23806.

[2] World Health Organisation. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen [M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.

[3] 叶琼, 蒋义, 王环, 等. HPV L1 壳蛋白的表达与宫颈病变的严重程度关系研究 [J]. *中国性科学*, 2015, 24 (12): 3-6.

[4] 杨慧伦, 张宗峰. 人乳头瘤病毒 16 型 E5 蛋白的生物活性研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2015, 14 (10): 1084-1087.

[5] 秦宇, 杨立娟, 刘欧. 导流杂交基因芯片技术检测人乳头瘤病毒结果分析 [J]. *疑难病杂志*, 2013, 12 (11): 865-867.

[6] 杨丽, 何艳, 马彩玲. 人乳头瘤病毒疫苗预防宫颈癌及其相关感染有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *中国全科医学*, 2015, 18 (12): 1415-1424.

[7] 夏思钧, 龚培尧, 耿建祥, 等. 男性尿道口细胞 HPV 感染基因型

分布的研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34 (17): 2231-2233.

[8] DAVIS M A, GRAY R H, GRABOWSKI M K, et al. Male circumcision decreases high-risk human papillomavirus viral load in female partners: A randomized trial in Rakai, Uganda [J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 133 (5): 1247-1252.

[9] 托娅, 陈秀娟, 郑华. HPV 在男性精液中的感染率及对辅助生殖技术助孕结局的影响 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2015, 37 (5): 453-456.

[10] LAPRISE C, TROTTIER H, MONNIER P, et al. Prevalence of human papilloma viruses in semen: a systematic review and meta-analysis [J]. *Human Reproduction*, 2014, 29 (4): 640-651.

[11] FORESTA C, PATASSINI C, BERTOLDO A, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e15036.

[12] SCHILLACI R, CAPRA G, BELLAVIA C, et al. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100 (5): 1236-1240.

[13] 明章书, 陈晓勇. 人乳头瘤病毒感染与男性不育症关系的研究进展 [J]. *中国男科学杂志*, 2014, 28 (11): 64-66.

[14] 郑华, 王丽岩, 陈秀娟. HPV 感染对男性精子活力及精子 DNA 完整性的影响 [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (1): 70-74.

[15] 蔡智慧, 冯丽, 刘梅云, 等. 不孕不育症患者抗精子抗体和抗子宫内膜抗体检测分析 [J]. *疑难病杂志*, 2012, 11 (3): 217-218.

[16] GAROLLA A, PIZZOL D, BERTOLDO A, et al. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99 (1): 125-131.

[17] BOZHEDOMOV V A, LIPATOVA N A, ALEXEEV R A, et al. The role of the antisperm antibodies in male infertility assessment after microsurgical varicocelectomy [J]. *Andrology*, 2014, 2 (6): 847-855.

[18] 刘瑞蕊. 男性不育患者血浆抗精子抗体和精液抗精子抗体检测结果分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34 (13): 1669-1670.

(收稿日期: 2016-01-13)

(上接第 489 页)

[4] JEUDY J, STEIGER V, BOYER P, et al. Treatment of complex fractures of the distal radius: a prospective randomised comparison of external fixation versus locked volar plating [J]. *Injury*, 2012, 43 (2): 174-179.

[5] 刘宁, 邹松玮, 余国荣, 等. 微创治疗桡骨远端难复性复杂性腕关节内骨折 21 例 [J]. *中华显微外科杂志*, 2014, 37 (4): 381-382.

[6] 董强, 马信龙, 马宝通, 等. LCP 钢板与外固定架治疗 C 型桡骨远端骨折的疗效比较 [J]. *中华骨科杂志*, 2012, 32 (3): 249-253.

[7] 张殿英, 傅中国, 王天兵, 等. 两种内固定方法治疗桡骨远端骨折的疗效比较研究 [J]. *中华手外科杂志*, 2010, 26 (6): 340-343.

[8] 曾林如, 汤祥华, 徐灿达, 等. 解剖锁定钢板治疗 C3 型桡骨远端骨折 [J]. *中华手外科杂志*, 2014, 30 (3): 226-228.

[9] KWAN K, LAU T W, LEUNG F. Operative treatment of distal radial fractures with locking plate system—a prospective study [J]. *Int Or-*

thop, 2011, 35 (3): 389-394.

[10] 杨亚东, 徐跃根. 三柱理论在 C2、C3 型桡骨远端骨折的应用价值 [J]. *浙江创伤外科*, 2012, 17 (1): 97.

[11] 黄新宇, 何伟东, 许国华, 等. 掌侧 2.4mm 锁定钢板治疗复杂桡骨远端关节内骨折 [J]. *中华关节外科杂志: 电子版*, 2014, 8 (3): 306-309.

[12] 白晓冬, 王宝军, 赵亮, 等. 远端万向锁定加压双柱接骨板治疗桡骨远端骨折 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2015, 17 (9): 815-818.

[13] 郭雅妮, 闵捷, 李峻, 等. 单一锁定加压钢板掌侧入路治疗桡骨远端骨折 [J]. *中华手外科杂志*, 2014, 30 (3): 235-236.

[14] 陈昌红, 周荣魁. 掌侧和背侧钢板内固定治疗背侧不稳定性桡骨远端骨折的病例对照研究 [J]. *中国骨伤*, 2013, 26 (2): 131-133.

[15] 陈农王, 会仁, 周凯华, 等. 背侧入路双钢板技术治疗桡骨远端不稳定骨折 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2014, 30 (4): 324-327.

(收稿日期: 2015-12-07)