

睡眠时间对精液常规参数、精子形态及精子 DNA 完整性的影响

陈庆, 李向红, 符生鱼, 赵金燕, 卢晓宁, 薛翔

西安交通大学第二附属医院妇产科, 陕西 西安 710004

摘要: **目的** 探讨睡眠时间对精液参数、精子形态以及精子 DNA 完整性的影响。**方法** 对 581 名男性的睡眠情况进行问卷调查, 将其分为三组, 即 I 组, 正常睡眠组; II 组, 轻度睡眠缺乏组; III 组, 严重睡眠缺乏组。采用计算机辅助精液分析系统 (CASA) 检测精液密度、活力、前向运动率等常规参数; 采用 Diff-Quick 染色法分析精子形态; 采用精子染色质扩散实验 (SCD 法) 分析精子 DNA 完整性。**结果** I、II、III 组精液密度 (70.5 ± 14.2 、 65.7 ± 11.2 、 53.8 ± 12.6) $\times 10^6$ /ml、活力 (74.3 ± 10.1 、 70.5 ± 14.5 、 65.8 ± 12.8)%、前向运动率 (57.2 ± 9.5 、 54.5 ± 11.3 、 48.3 ± 13.7)% 均呈下降趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并且 II、III 组精子畸形率 (91.0 ± 20.5 、 94.1 ± 21.7)% 和精子 DNA 碎片指数 (17.5 ± 10.1 、 24.6 ± 11.7)% 与 I 组 (86.4 ± 18.3 、 16.8 ± 9.5)% 相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 睡眠时间影响男性精液质量, 可能是导致男性精液质量下降的因素之一。

关键词: 精子; 精子形态; 精子 DNA 完整性; 睡眠时间

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2017)06-0650-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.06.003

Effect of sleep time on sperm routine parameters, sperm morphology and sperm DNA integrity

CHEN Qing, LI Xiang-hong, FU Sheng-yu, ZHAO Jin-yan, LU Xiao-ning, XUE Xiang

Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi 710004, China

Corresponding author: XUE Xiang, E-mail: xgxue@263.net

Abstract: **Objective** To explore the effect of sleep time on human sperm parameters, morphology and sperm DNA integrity.

Methods Five hundred and eighty-one men were divided into three groups according to their sleep status investigated by questionnaires: Group I (normal sleep group), Group II (mild sleep deprivation group) and Group III (severe sleep deprivation group). The sperm concentration, motility and progressive motility were detected by computer-assisted sperm analysis system (CASA). The sperm morphology was analyzed by Diff-Quick staining and the sperm DNA integrity was measured by sperm chromatin dispersion assay. **Results** From Group I to Group III, the sperm concentrations ($(70.5 \pm 14.2) \times 10^6$ /ml, $(65.7 \pm 11.2) \times 10^6$ /ml, $(53.8 \pm 12.6) \times 10^6$ /ml), motility ($(74.3 \pm 10.1)\%$, $(70.5 \pm 14.5)\%$, $(65.8 \pm 12.8)\%$) and progressive motility rates ($(57.2 \pm 9.5)\%$, $(54.5 \pm 11.3)\%$, $(48.3 \pm 13.7)\%$) showed a declining tendency, with statistically significant differences (all $P < 0.01$). Moreover, the sperm deformity rates ($(91.0 \pm 20.5)\%$, $(94.1 \pm 21.7)\%$) and sperm DNA fragmentation indexes ($(17.5 \pm 10.1)\%$, $(24.6 \pm 11.7)\%$) of the Group II and III showed statistically significant differences compared with those of Group I ($(86.4 \pm 18.3)\%$, $(16.8 \pm 9.5)\%$) (both $P < 0.05$). **Conclusions** Sleep time affects the semen quality of males, and it may be one of the factors leading to decline in semen quality.

Key words: sperm; sperm morphology; sperm DNA integrity; sleep time

目前我国不孕不育症的发病率有逐年上升的趋势, 据统计, 在育龄夫妇中存在生育障碍的约占 12.5%~15%, 其中由男方因素引起的约占不孕不育人群的 40%~50%^[1]。而引起男性不育的因素有很多, 如环境污染、精神压力、吸烟、酗酒、不良生活方式

等^[2-3]。近年来, 国内外研究表明不良的生活习惯可引起男性精液质量下降^[4], 并受到了人们越来越多的关注。

睡眠对人类健康具有重要意义, 可影响人的神经、内分泌、免疫及心血管等系统功能。由于现代社会生活节奏加快, 白天工作忙碌, 晚上熬夜已成为许多人的生活模式。睡眠不足问题正日益凸现。然而, 睡眠时间对男性精液质量的影响, 目前尚不清楚。本研究选取本院生殖门诊男性患者作为研究对象, 通过探讨不

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31201118)

作者简介: 陈庆 (1979-), 男, 博士, 研究方向: 生殖健康, E-mail: lychenqing@163.com。

通信作者: 薛翔, E-mail: xgxue@263.net。

同睡眠时间对精液常规参数、精子形态及 DNA 完整性的影响,分析了睡眠时间对精液质量的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 3 月-2016 年 3 月在西安交通大学第二附属医院生殖门诊就诊的 581 例男性作为研究对象,年龄 22~45 岁,婚后正常性生活 1 年以上不育,排除性功能障碍、无精子症、遗传病、生殖系统严重疾病、工作环境有污染(如高温、职业与有毒物质相关等)以及吸烟、酗酒等不良生活习惯的患者。

1.2 试剂与仪器 精子形态学快速染色液(Diff-Quik 法),精子 DNA 碎片检测试剂(SCD 法),均购自深圳博锐德生物科技有限公司。计算机辅助精液分析系统(Microptic 公司,西班牙)。

1.3 调查与分组 对研究对象采用问卷调查,内容包括年龄、文化程度、职业以及平均每天睡眠时间。根据睡眠时间不同将其分为三组,Ⅰ组,即正常组,平均每天睡眠 7 h 以上;Ⅱ组,即轻度睡眠缺乏组,平均每天睡眠 4~6 h;Ⅲ组,即严重睡眠缺乏组,平均每天睡眠少于 4 h;其中睡眠缺乏持续时间为 2 年以上。

1.4 样本收集 禁欲 2~7 d 后采取手淫法留取全部精液于一次性洁净广口采样杯中,立即送检。

1.5 精液常规分析 精液常规分析按照世界卫生组织(WHO)所规定的方法和标准检测,标本置 37 ℃水浴箱内,观察液化情况。采用计算机辅助分析系统(CASA)结合手工方法对精液理化性质、精子密度、精子活力等参数进行检测,所有标本经 2 名检验人员检测核准。

1.6 精子形态分析 采用 Diif-Quik 染色法,按照试剂盒说明进行染色,采用计算机辅助分析系统(SCA)结合人工修正方法进行精子形态分析。精子形态分为 5 大类,即正常形态精子、头部异常精子、颈部及中段异常精子、尾部异常精子及胞浆小滴。油镜下计数

200 条精子,分别计算正常形态精子百分率、精子畸形率以及精子畸形指数(SDI)。

1.7 精子 DNA 完整性分析 采用精子染色质扩散试验(SCD)分析精子 DNA 完整性,操作步骤简述如下:(1)精液标本用生理盐水稀释到 $10\times10^6/\text{ml}$,取 30 μl 精液与琼脂凝胶按 1:1 比例混匀,置于 EP 管内,待用。(2)吸取 30 μl 配置的精液置于冷却的载玻片上,盖上盖玻片于 4 ℃放 5 min。(3)去除盖玻片,加入 0.08 mol/L 盐酸 7 min。(4)加入精子裂解液避光孵育 25 min。(5)置于冲洗液 4 min 后,分别置于 75%、95%乙醇中各脱水 2 min。(6)玻片自然干燥后,加入瑞-吉氏染液,普通显微镜下观察结果。DNA 完整的精子产生扩散的光晕,DNA 不完整的精子产生很小的光晕或不产生光晕。结果判读:计数 200 个精子,计数存在 DNA 碎片的精子数,精子存在 DNA 碎片标准:精子头部产生小光晕或无光晕,单侧光晕厚度不超过精子头部最小直径 1/3。计算精子 DNA 碎片指数 DFI(%)=存在 DNA 碎片精子数/观察精子总数 $\times 100\%$ 。

1.8 统计学分析 数据用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS13.0 软件包进行分析,K-S 法检验数据的正态性,多组间比较采用单因素方差分析,发现总体比较有差异后,两组间比较采用 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睡眠时间对精液常规参数的影响 581 例男性患者精液常规分析情况见表 1。与Ⅰ组相比,Ⅱ、Ⅲ组的精液量、精子密度、精子活力、前向运动率以及直线运动速率均呈下降趋势,经统计学检验,其中精子密度、活力、前向运动率及直线速率与Ⅰ组相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。而各组中精液量、精液 pH 值相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 不同睡眠时间男性患者精液常规分析比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	精液量(ml)	pH	精子密度($\times 10^6/\text{ml}$)	精子活力(%)	前向运动率(%)	直线速率($\mu\text{m/s}$)
Ⅰ组	285	3.5 \pm 1.1	7.2 \pm 2.1	70.5 \pm 14.2	74.3 \pm 10.1	57.2 \pm 9.5	31.2 \pm 8.3
Ⅱ组	182	3.3 \pm 1.3	7.2 \pm 1.7	65.7 \pm 11.2	70.5 \pm 14.5	54.5 \pm 11.3	27.5 \pm 10.2
Ⅲ组	114	3.4 \pm 1.2	7.1 \pm 1.9	53.8 \pm 12.6	65.8 \pm 12.8	48.3 \pm 13.7	20.6 \pm 7.4
<i>F</i> 值		1.59	0.12	67.03	20.67	26.66	59.67
<i>P</i> 值		0.20	0.88	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ⅰ vs. Ⅱ <i>P</i> 值		-	-	<0.0001	<0.0001	0.006	<0.0001
Ⅱ vs. Ⅲ <i>P</i> 值		-	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ⅰ vs. Ⅲ <i>P</i> 值		-	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

2.2 睡眠时间对精子形态的影响 对各组样本精子形态分析发现,Ⅱ、Ⅲ组正常形态精子百分率与Ⅰ组相比明显降低,经统计学检验,差异有统计学意义($P<0.01$);并且与Ⅰ组相比,Ⅱ、Ⅲ组中精子总畸形率显著

升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。Ⅱ、Ⅲ组中精子畸形指数、精子头部、颈部及中段畸形率与Ⅰ组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 睡眠时间对男性患者精子形态的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	正常形态率(%)	总畸形率(%)	精子畸形指数(SDI)	头部畸形(%)	颈部及中段畸形(%)	尾部畸形(%)	胞浆小滴(%)
I 组	285	13.6±4.7	86.4±18.3	1.1±0.2	72.5±17.4	45.2±11.6	20.3±15.2	1.0±0.8
II 组	182	9.0±3.6	91.0±20.5	1.1±0.3	75.3±15.3	50.6±15.4	21.5±16.5	1.1±0.9
III 组	114	5.9±2.8	94.1±21.7	1.3±0.5	80.6±20.1	52.4±12.8	24.3±17.6	0.9±0.8
F 值		168.7	7.15	18.95	8.92	16.29	2.51	2.08
P 值		<0.0001	0.0009	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.082	0.126
I vs. II P 值		<0.0001	0.012	1	0.076	<0.0001	0.423	0.210
II vs. III P 值		<0.0001	0.23	<0.0001	0.011	0.298	0.167	0.053
I vs. III P 值		<0.0001	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.024	0.26

2.3 睡眠时间对精子 DNA 碎片的影响 三组患者精子 DNA 碎片检测发现,II、III 组的精子 DNA 碎片指数 (DFI) 明显高于 I 组,经统计学检验,其中 III 组与 I 组相比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 不同睡眠时间男性患者精子 DNA 碎片比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	精子 DFI(%)	F 值	P 值	I vs. II P 值	II vs. III P 值	I vs. III P 值
I 组	285	16.8±9.5					
II 组	182	17.5±10.1	25.3	<0.0001	0.449	<0.0001	<0.0001
III 组	114	24.6±11.7					

3 讨论

据报道,男性精液质量在过去几十年里一直呈下降趋势。环境污染可能是主要诱因,例如空气、水、食品的化学污染、农药污染、电磁辐射等^[5]。近年来,随着人们生活方式的改变,吸烟、酗酒、熬夜等不良生活习惯^[6]与精液质量的关系越来越受到人们的重视。目前,睡眠缺乏已成为许多年轻人的常见现象。而睡眠质量与人的健康息息相关,睡眠过少不仅会增加心血管疾病风险,而且会引起神经系统损害。动物试验研究表明,睡眠剥夺可引起小鼠睾丸质量降低,局部生精小管间质减少、生精上皮变薄,精子活率降低^[7]。汪倩等^[8]通过对 KM 小鼠进行间歇式睡眠干扰发现,睡眠干扰可引起附睾脏器系数明显下降、精子畸形率显著增高、精子质膜完整率下降。这些研究表明,睡眠干扰可引起雄性小鼠生殖系统损伤。然而,目前人们对睡眠是否影响男性精液质量尚不清楚。本研究通过对本院生殖门诊 581 例男性患者精液检测,分析其与睡眠时间的关系,探讨了睡眠时间对男性精液质量的影响。

本研究表明,睡眠时间缺乏可引起男性精子密度、活力、前向运动率以及精子运动直线速率出现显著降低。尤其是重度睡眠缺乏,与正常睡眠相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。这提示,睡眠不足对男性精液质量有明显影响。研究发现,精液质量异常在男性不育患者中发生率较高,其中少、弱精占有相当大的比例^[9]。因此,睡眠缺乏也可能是男性生育能力降低的原因之一。睡眠缺乏对精液影响的机制可能与长期睡眠不足,精神处于亢奋状态影响性激素的分泌,造成生

殖激素水平紊乱,最终导致精子质量下降有关。

精子畸形率的增加也是男性不育的一个重要诱因。通过对精子形态分析,睡眠缺乏组精子正常形态率明显低于对照组,而精子总畸形率以及精子畸形指数则高于对照组,其中严重睡眠缺乏组与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。这一结果说明睡眠缺乏能导致精子形态出现异常,引起精子畸形率增加。精子畸形包括头部畸形、颈部及中段畸形,尾部畸形以及胞浆小滴,精子畸形指数主要反映精子的多重缺陷。分析精子具体缺陷部位发现,严重睡眠缺乏组与对照组相比,头部畸形率、颈部及中段畸形率差异有统计学意义($P<0.05$),而尾部畸形率与胞浆小滴差异无统计学意义。这说明睡眠缺乏可能对精子头部、颈部及中段的影响较大。

完整的精子 DNA 是使遗传信息得以表达的重要因素,精子 DNA 受损时,精子穿透卵子的能力降低,可能影响胚胎发育和着床,降低妊娠率增加自然流产率^[10-11]。在辅助生殖技术(ART)中,精子 DNA 碎片增加可导致患者受精率、卵裂率、优胚率、生化妊娠率及临床妊娠率均出现显著降低^[12]。大量研究表明精子 DNA 完整性在妊娠结局中具有重要意义^[13]。然而,许多物理化学及生物因素等可通过影响精子染色质组装、氧化应激、精子凋亡等引起精子 DNA 损伤^[14]。有研究表明,吸烟可引起精子 DNA 损伤,下调 chk1 蛋白表达,导致精液质量下降^[15]。精子 DNA 损伤主要表现为 DNA 碎片增加,包括精子 DNA 双链或单链的断裂、异常染色质包装及鱼精蛋白缺乏等。本研究中,睡眠严重缺乏组与正常睡眠组相比,精子 DFI 显著增加($P<0.05$),表明睡眠缺乏导致精子 DNA 碎片升高。

总之,本研究表明睡眠缺乏能引起精子密度、活力、前向运动率以及精子直线运动速率降低,精子畸形率及碎片率增加,影响精液质量。睡眠缺乏是一种不良的生活习惯,可对男性的生殖健康产生不良影响,是导致男性不育的一个可能因素。因此,应倡导健康的生活方式,避免熬夜,保证充足的睡眠时间,以保护男性的生殖健康。

重点科室,针对重点人群开展 HIV 常规检测,以及继续加强检测咨询和发挥非政府组织作用,促进高危人群早检测,以最大限度地早发现 HIV 感染者,减少二代传播。

了解 HIV 新发感染状况对合理制定艾滋病防控策略具有重要意义。随着实验室检测技术的发展,BED 捕获酶联法(BED-CEIA)作为新发感染监测的实验室技术,其重复性和稳定性已得到有效证明^[14-15],并在我国推广应用。但这种方法在个体水平研究上存在一定的假阴性和假阳性,依据此方法区分 HIV-1 新发感染和长期感染时可能会出现偏差,因此更多地将此方法用于整体水平评估。本研究采用 BED 方法检测 HIV 新发感染,估算不同人群新发感染的大致比例,同时根据检测结果将新报告感染者分为新发感染者和长期感染者,有可能会因归类错误而导致偏差,这也是目前国内进行新发感染研究的共同问题。但是,由于本研究严格按照新发感染检测要求排除了不合格标本且样本量较大,可在一定程度上降低归类错误造成的偏差,使得研究结果仍具有一定参考价值。

参考文献

- [1] 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心. HIV-1 新发感染血清学方法检测方案[R]. 北京:中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心,2011.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Missed opportunities for earlier diagnosis of HIV infection—South Carolina, 1997–2005 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2006, 55: 1269–1272.
- [3] 陈强,李洋,苏雪丽,等. 北京市 2009–2011 年部分新报告 HIV 病例中新发感染的流行病学分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35

(1): 53–56.

- [4] 胡海洋,刘晓燕,张之,等. 江苏省 2011–2013 年新报告 HIV 感染者/艾滋病患者新发感染状况分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(10): 1115–1118.
- [5] 杨楠,王路. 沈阳市 2006–2012 年艾滋病疫情分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(2): 176–178.
- [6] 中华人民共和国卫生部,联合国艾滋病规划署,世界卫生组织. 2009 年中国艾滋病疫情估计工作报告[R]. 北京:中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心,2010.
- [7] 中华人民共和国卫生部,联合国艾滋病规划署,世界卫生组织. 2011 年中国艾滋病疫情估计[R]. 北京:中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心,2011.
- [8] 宁铁林,郭燕,柳忠泉,等. 应用 BED 捕获酶联免疫检测方法分析 2010 年天津市 HIV-1 新近感染病例特征[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(13): 1020–1022.
- [9] 彭庭海,彭国平,阳凯,等. 湖北省 2010–2013 年男男性行为者 HIV 新发感染分析[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(2): 58–62.
- [10] 黑发欣,王璐,秦倩倩,等. 中国 2006–2010 年男男性行为者艾滋病疫情分析[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(1): 67–70.
- [11] Duffus WA, Weis K, Kettinger L, et al. Risk-based HIV testing in south Carolina health care settings failed to identify the majority of infected individuals[J]. AIDS Patient Care STDS, 2009, 23(5): 339–345.
- [12] 汤后林,毛宇嵘,张铁军,等. HIV 感染者及艾滋病患者检测发现晚的原因调查分析[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(11): 1004–1008.
- [13] 王淑荣,闫皓,杨涛. 无偿献血大学生预防艾滋病的知识和态度[J]. 中国学校卫生, 2006, 27(3): 235–236.
- [14] 马文娟,汪宁. BED-CEIA 估计 HIV-1 新近感染率的有效性及其影响因素的评价[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(9): 1056–1061.
- [15] 王懋杰,蒋岩,韩梅,等. 检测 HIV-1 新近感染的 BED 捕获酶免疫实验的重复性和稳定性评价[J]. 中国艾滋病性病, 2007, 13(4): 305–307.

收稿日期:2016-11-11

(接 652 页)

参考文献

- [1] 秦玉峰. 关键基因遗传变异、代表性 EDCs 暴露及其交互作用在精子生成中的作用[D]. 南京:南京医科大学, 2014.
- [2] Zilberlicht A, Wiener-Megnazi Z, Sheinfeld Y, et al. Habits of cell phone usage and sperm quality—does it warrant attention? [J]. Reprod Biomed Online, 2015, 31(3): 421–426.
- [3] Vested A, Ramlaui-Hansen CH, Olsen SF, et al. Associations of in utero exposure to perfluorinated alkyl acids with human semen quality and reproductive hormones in adult men [J]. Environ Health Perspect, 2013, 121(1): 1–5.
- [4] 刘安娜,王厚照. 不良生活习惯对男性精液质量的影响分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 20(6): 121–122.
- [5] Chandra A, Copen CE, Stephen EH. Infertility service use in the United States; data from the National Survey of Family Growth, 1982–2010 [J]. National Health Statistics Reports, 2014, 200(1): 1–21.
- [6] 闫伟. 嘉兴市婚检男性精液质量调查及其与生活习惯的相关性研究[J]. 实用预防医学, 2015, 22(9): 1107–1109.
- [7] 蒋超,周冉,夏聪聪,等. 72 h 睡眠剥夺对雄性小鼠的生殖毒性效应及机制[J]. 现代预防医学, 2013, 39(7): 1325–1329.
- [8] 汪倩,郭爱伟,周杰珑,等. 睡眠干扰对雄性 KM 小鼠生殖健康的影响[J]. 畜禽业, 2008, 10(1): 10–11.

- [9] 黄健云,莫和国,蔡锦梅,等. 268 例男性不育患者精液质量分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(12): 1509–1511.
- [10] Yassine S, Escoffier J, Martinez G, et al. Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development [J]. Mol Hum Reprod, 2015, 21(2): 169–185.
- [11] Ni K, Steger K, Yang H, et al. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno/oligozoospermic clinical varicocele [J]. Andrology, 2016, 4(5): 816–824.
- [12] 李洁,杨菁,徐望明,等. 精浆 piRNA 对精子 DNA 完整性及辅助生殖技术结局的影响[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(11): 897–901.
- [13] 郑毅春,梁嘉颖,杜鹏,等. 精液保存和优化处理方法对精子 DNA 完整性的影响[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(5): 432–436.
- [14] 杨译,姜辉. 精子 DNA 损伤与男性不育的关系[J]. 中国男科学杂志, 2011, 25(1): 67–69.
- [15] Hamad MF. The potential adverse effects of khat chewing and cigarette smoking on human sperm parameters [J]. Int J Biosci, 2014, 4(9): 90–99.

收稿日期:2016-11-25