

• 调查报告 •

1 710 例女性不孕患者血清抗体检测结果分析*

赵 军, 周运恒[△]

(武警上海总队医院检验科, 上海 201103)

摘要:目的 探讨各种血清抗体与女性免疫性不孕的关系。方法 用 ELISA 法对不孕的 1 710 例妇女血清进行抗精子抗体(ASAb)、抗子宫内膜抗体(EMAb)、抗卵巢抗体(AOAb)检测。结果 患者血清中 ASAb、EMAb、AOAb 阳性率分别为 29.77%、29.77%、30.53%, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 免疫性不孕患者血清中各种抗体可影响妊娠的不同环节, 导致不孕; 血清抗体的联合检测可以为临床诊断免疫性不孕提供科学依据。

关键词:不育; 精子; 子宫内膜; 卵巢; 抗体; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1060-02

Analysis on serum antibody in 1 710 female patients with infertility*

Zhao Jun, Zhou Yunheng[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai Crops Hospital of Chinese People's Armed Police, Shanghai 201103, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between serum antibody and immunologic infertility. **Methods** Serum anti-sperm antibody, anti-endometrial antibody and anti-ovarian antibody in 1 710 female patients with primary or secondary infertility were tested by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The positive rates of the above antibodies were 29.77%, 29.77% and 30.53% respectively, and were all significantly higher than those in control group($P < 0.05$). **Conclusion** Serum antibody might influence the various component element of pregnancy. Combined detection of serum antibodies could be valuable for the diagnosis of immunologic infertility.

Key words: infertility; spermatozoa; endometrium; ovary; antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay

现今多数学者认为夫妻婚后性生活正常、未采取任何避孕措施、1 年未怀孕者视为不育不孕症。国际妇产科联合会定时限为 2 年, 美国不孕学会定为 1 年。不孕不育的病因很多, 有生殖系统器质性病变、遗传物质改变、内分泌异常和免疫因素等。随着研究的不断深入, 免疫性不育作为不孕病因之一日益受到研究人员的关注。免疫性不孕是指机体对生殖过程中某一环节发生自发性免疫而导致生育力下降, 延迟受孕 3 年以上。育龄妇女中不孕不育患者约占 15%, 其中 20%~30% 可能为免疫因素导致^[1]。

近年来研究发现, 不明原因不孕妇女患者体内存在抗精子抗体(ASAb)、抗子宫内膜抗体(EMAb)、抗卵巢抗体(AOAb)等, 并证实了这些抗体对不孕产生的影响^[2-3]。

为探讨免疫学指标检测的临床价值, 作者对不孕门诊 1 710 例女性患者与 200 例健康体检、有正常生育史女性进行了血清中 ASAb、EMAb、AOAb 的检测, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2009 年 9 月至 2011 年 9 月本院不孕门诊就诊的不孕患者 1 710 例(不育组), 年龄 21~40 岁, 不育年限 2~5 年, 病因筛查排除解剖、遗传、内分泌等疾病; 另外选择 200 例来本院进行健康体检的女性、有正常生育史者作为对照组, 年龄 24~39 岁。

1.2 试剂与方法

1.2.1 样本要求 静脉穿刺采血, 室温下放置 30~40 min 后于 1 000×g 离心 10 min 分离血清, 即可使用。不能立即检测的血清样本在 -20℃ 至少可保存 1 个月, 避免反复冻融。

1.2.2 试剂 ELISA 试剂盒(由南京欣生物药业工程有限责任公司提供)、酶标仪(Multiskan MK3)等。

1.2.3 操作步骤

1.2.3.1 每批设空白及阴、阳性对照各 1 孔, 除阴、阳性对照孔外, 每孔加样本稀释液 100 μL 和待测血清 5 μL(空白对照孔不加)。阴、阳性对照孔分别加阴、阳性对照液 2 滴(100 μL), 混匀后用封板膜覆盖反应板, 置 37℃ 温育 40 min。

1.2.3.2 用 PBS-T 洗板 4 次, 每次 3 min, 拍干。

1.2.3.3 每孔加酶结合物 2 滴, 充分混匀后用封板膜覆盖反应板, 置 37℃ 温育 30 min。

1.2.3.4 甩净孔内液体加洗液, 洗涤方法同上。

1.2.3.5 每孔加显色液 A、B 各 1 滴, 混匀后避光反应 10 min。

1.2.3.6 每孔加终止液 1 滴, 终止反应。

1.2.3.7 以空白孔调零, 在波长 450 nm 处读取各孔吸光度值(A 值), 凡样品孔 A 值大于或等于阴性对照孔 2.1 倍, 即为阳性。

1.3 统计学处理 数据用 SPSS15.0 统计软件进行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

检测结果见表 1~4。

表 1 3 项免疫抗体检测结果[n(%)]

组别	n	ASAb 阳性	EMAb 阳性	AOAb 阳性
不育组	1 710	509(29.77)*	509(29.77) [△]	522(30.53) [#]
对照组	200	5(2.50)	1(0.50)	0(0.00)

*: $\chi^2 = 67.6$; Δ : $\chi^2 = 78.3$; #: $\chi^2 = 84.0$, $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 2 ASAb 与 EMAb 的关系 (n)

项目	ASAb	EMAb	合计
+	509	509	1 018
-	1 201	1 201	2 402
合计	1 710	1 710	3 420

$\chi^2=0, P>0.05$ 。

表 3 ASAb 与 AOAb 的关系 (n)

项目	ASAb	AOAb	合计
+	509	522	1 031
-	1 201	1 188	2 389
合计	1 710	1 710	3 420

$\chi^2 \approx 0, P>0.05$ 。

表 4 EMAb 与 AOAb 关系 (n)

项目	EMAb	AOAb	合计
+	509	522	1 031
-	1 201	1 188	2 390
合计	1 710	1 710	3 420

$\chi^2 \approx 0, P>0.05$ 。

3 讨论

目前与不孕不育关系密切的血清抗体主要有血清 ASAb、AOAb、EMAb、抗绒毛膜促性腺激素抗体 (hCGAb) 及抗心磷脂抗体 (ACAb) 等 5 种自身抗体^[4]。hCGAb 是与人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 表面抗原特异性结合的抗体, 可灭活 hCG, 使体内性激素水平紊乱而致不孕^[5]。ACAb 可引起不孕或早期流产^[6]。

检测不育不孕妇女体内的自身抗体可以进一步确定不孕不育的原因, 并利用免疫疗法使很多患者达到怀孕目的, 并最终生下健康的宝贝^[7]。ASAb 和 EMAb 阳性能够引起免疫性不孕, 在女性不育检测中具有十分重要的价值, 应作为不育患者常规检测项目, 为免疫性不孕患者的诊治提供重要依据^[8]。

3.1 ASAb 与不孕不育的关系 精子作为一种具有强抗原性的隐蔽性抗原, 与机体免疫系统接触后可产生同种或自身免疫反应, 导致产生 ASAb。正常情况下男性由于血睾屏障保护作用, 精子抗原不会引起自身免疫反应, 因此无 ASAb 存在。但由于感染、手术、外伤等使血睾屏障受到破坏时, 精子抗原暴露于机体免疫系统, 引发免疫反应而产生 ASAb。对于女性而言, 女性生殖道亦有屏障作用, 可防止精子抗原与免疫系统接触, 且精浆存在的一些免疫因子可以抑制女性对精子抗原的免疫应答。而当女性发生生殖道感染、损伤, 以及人工流产等因素导致免疫机制削弱时增加了精子与免疫活性细胞的接触或女方对丈夫精子过敏等均可使女性产生 ASAb^[9-10]。有研究表明 ASAb 可引起精子凝集、制动、降低精子的活动力及影响精卵融合过程等, 甚至导致胚胎死亡而引起女性生育能力降低^[7]。因此, ASAb 检测对诊断、治疗不孕不育有重要意义。

3.2 EMAb 与不孕不育的关系 EMAb 是一种以子宫内膜为靶细胞并引起一系列免疫病理反应的自身抗体。育龄妇女子宫内膜在卵巢激素的调节下, 产生周期性剥脱, 随着月经流

出体外, 一般不诱发机体产生自身免疫反应, 但在某些病理状态下如子宫内膜异位症患者受到异位内膜刺激或经血逆流等因素导致免疫应答紊乱, 即可产生 EMAb。EMAb 往往与子宫内膜异位症并存。在子宫内膜异位症患者血清中 EMAb 检出率高达 30%~70%, 而且患者体内往往因此产生多种自身抗体, 从而干扰神经-生殖内分泌-免疫调节网络, 引起体液免疫水平异常升高, 对子宫内膜产生免疫病理损害, 干扰孕卵着床及胚囊发育, 导致不孕^[11-12]。EMAb 不仅与异位子宫内膜发生抗原抗体反应, 同时也可与正常位置的子宫内膜细胞中的抗原位点结合, 激活补体系统, 局部产生免疫病理变化, 直接影响子宫内膜腺体功能^[13], 从而导致孕卵着床失败和(或)发育不良, 最终以不显性的早期流产而告终^[14]。因此, EMAb 检测对诊断、治疗不孕不育也有重要意义。

3.3 AOAb 与不孕不育的关系 AOAb 是一种位于卵巢颗粒细胞、卵母细胞、黄体细胞和间质细胞内的自身抗体。该抗体的产生原因尚不是很清楚, 常见于: (1) 避孕失败, 常采用人工流产术以终止妊娠, 此过程可能造成生殖道、子宫内膜等部位的损伤, 若术后未及时治疗, 可导致逆行性感染, 其炎症可经生殖道、子宫上行至输卵管、卵巢, 而引起卵巢炎症; (2) 不注重性生活卫生, 引发生殖系炎症, 而累及卵巢发生炎症; (3) 人工助孕, 反复刺激和穿刺卵泡取卵, 造成卵巢创伤; (4) 自身免疫性疾病如桥本甲状腺炎、Grave's 病、Addison's 病和系统性红斑狼疮 (SLE) 等自身免疫性疾病。AOAb 可能通过阻碍卵母细胞成熟, 使卵母细胞数量减少, 影响胚胎细胞分裂; 透明带的异常改变影响卵子排出、精子穿入和胚胎着床; 颗粒细胞变性坏死、卵泡膜内层细胞和黄体细胞内固醇类物质代谢障碍, 影响雌、孕激素的产生, 降低卵巢内分泌功能, 造成孕卵种植和着床失败^[15], 从而导致不孕不育, AOAb 是造成不明原因不孕和自然流产的原因之一, 且其对不孕的影响比自然流产的影响大^[16]。因此, AOAb 检测对诊断、治疗不孕不育患者也有重要意义。

本研究结果显示, 不育组抗体阳性率比对照组高 ($P < 0.05$)。ASAb、EMAb、AOAb 阳性可影响妊娠的不同环节, 导致不孕不育, 在女性不孕不育的检测中具有十分重要的价值, 提示对不明原因的不孕不育及反复流产患者应进行自身抗体的检测。本研究结果也显示, ASAb、EMAb、AOAb 之间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而且三者阳性率均在 30% 左右, 说明三者所表达的意义基本一样, 三者联合检测可减少漏检率。由于正常人体内也可能存在 ASAb、EMAb 或 AOAb, 也有相当一部分 ASAb、EMAb 或 AOAb 阳性者能够生育, 说明免疫性抗体的血清学检测不能作为最终的诊断依据。本研究还发现在自身抗体阳性的患者中阳性吸光度越高即患者体内抗体滴度高, 不孕概率增加, 今后可选择一些定量的检测方法, 为诊断免疫性不孕提供更好的科学依据。

在实际的工作中作者还发现不少 ASAb、EMAb 或 AOAb 阳性女性患者合并生殖道感染, 因此, 今后可以进一步研究生殖道感染类妇科常见病的病原体如溶脲脲原体 (UU)、人型支原体 (Mh)、沙眼衣原体、白色念珠菌、淋球菌、阴道毛滴虫和细菌性阴道病等与 ASAb、EMAb、AOAb 的相关性。

参考文献:

[1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 2 版. 北京: 人民卫(下转第 1063 页)

续表 2 144 例 MM 患者 M 蛋白各年龄段分布(n)

年龄(岁)	男	女	IgG-κ (男/女)	IgG-λ (男/女)	IgA-κ (男/女)	IgA-λ (男/女)	IgM-κ (男/女)	IgM-λ (男/女)	κ(男/女)	λ(男/女)
>60~70	29	23	7/7	8/5	0/3	8/4	0/0	1/1	3/0	2/3
>70~80	20	12	5/4	3/4	2/2	3/0	1/1	1/0	5/1	0/0
>80	3	2	1/1	0/0	0/0	0/1	1/0	1/0	0/0	0/0

3 讨 论

MM 是一种单克隆细胞异常增殖的恶性肿瘤,发病年龄多为 50~60 岁,40 岁以前少见,男性多于女性。本研究 144 例 MM 患者年龄为 35~82 岁,平均 61.2 岁,多为 50~70 岁,发病年龄与陈程和郭淑丽^[3]、董喜环^[4],以及朱宇芳^[5]报道的相当。男女发病比例为 1.36 : 1.00,低于陈程和郭淑丽^[3](2.17 : 1.00)、董喜环^[4](2.04 : 1.00)和朱宇芳^[5](3.60 : 1.00)所报道的结果,与刘玉梅等^[6](1.33 : 1.00)报道结果相当,表明兰州地区男性发病率明显低于朱宇芳报道的湖北和董喜环报道的河南。对 144 例 MM 患者 M 蛋白进行 IgG、IgA、IgM 分型鉴定结果显示男性患者中 IgG 型占 45.8%,κ>λ 型; IgA 型占 24.1%,λ>κ 型; IgM 型占 9.6%,λ 和 κ 型发病相当;轻链型中 λ>κ 型。女性患者中 IgG 型占 57.4%, IgA 型占 24.6%,均为 λ>κ; IgM 型占 6.6%,λ 和 κ 型发病相当;轻链型中 λ>κ;各型发病率均不同于陈程和郭淑丽^[3]报道的结果。男女平均发病 IgG、IgA、IgM 型分别为 51.6%、24.3% 和 8.1%,不同于董喜环^[4]和朱宇芳^[5]报道的结果,表明兰州地区各型发病率不同于其他地区。本研究就各年龄段 MM 患者各型的出现情况进行了统计,旨在观察各年龄段各型发病情况,并以此与其他地区统计结果进行比较,但未查到相关文献。在

本研究中多发年龄段男性 IgG-κ 和 λ 发病相当, IgA-λ 明显多于 κ;女性各型发病相当。

综上所述,兰州地区 MM 患者发病率在性别和免疫分型方面与其他地区有一定差异,造成此差异的原因是否由于地域还是经济条件尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 沈霞. 电泳技术的现状和发展[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(5): 263-265.
 [2] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M] 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 232-234.
 [3] 陈程, 郭淑丽. 乌鲁木齐地区维吾尔族、汉族多发性骨髓瘤型别特征[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 266-267.
 [4] 董喜环. 免疫固定电泳技术在多发性骨髓瘤诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(10): 902-9030.
 [5] 朱宇芳. 免疫固定电泳在多发性骨髓瘤诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(12): 1064-1065.
 [6] 刘玉梅, 赵有利, 石翀. 107 例多发性骨髓瘤 M 蛋白检测与免疫学分型分析[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 132-134.

(收稿日期: 2012-01-08)

(上接第 1061 页)

生出版社, 2004: 2602-2603.

[2] 王丽, 黄萍, 黄晓燕, 等. 1 020 例免疫性不孕患者的治疗结果分析[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(4): 234.
 [3] 赵艳, 贾丽洁. 抗心磷脂抗体与人工流产后继发不孕的相关性分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(7): 44.
 [4] 罗世永. 联合检测抗子宫内膜抗体和抗精子抗体对女性不孕的临床意义[J]. 右江民族医学院学报, 2010, 32(6): 923-924.
 [5] 黄新亮, 洪亮. 不孕症自身抗体 HCGA 与生殖激素水平关系的研究[J]. 皖南医学院学报, 2005, 24(3): 173-174.
 [6] 张孝艳, 牛保华. 中西医结合治疗免疫性不孕 206 例临床观察[J]. 河南大学学报(医学科学版), 2004, 23(2): 56-57.
 [7] 张秀贞. 不孕不育妇女血清中 ASAb、EMAb 的检测分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(1): 117.
 [8] 孙芳. 276 例 ASAb、EmAb 检测与不孕不育关系探讨[J]. 中国实用医药, 2010, 5(18): 105-106.
 [9] 欧建平. 抗精子抗体对辅助生育的影响[J]. 中华男科学, 2003, 9(3): 214-217.
 [10] 李广为. 抗精子抗体的研究现状[J]. 中华男科学, 2004, 10(5):

385-388.

[11] 王咏梅, 孙绪德, 项泉. 抗子宫内膜抗体阳性患者体内其他自身抗体出现频率的研究[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(24): 封 3.
 [12] 马安伦, 王树军, 聂红, 等. 子宫内膜异位症患者腹腔液对子宫内膜细胞 MHC-I 类分子表达以及 NK 细胞功能的调节[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(5): 436-438.
 [13] Meek SC, Hodge DD, Musich JR, et al. Autoimmunity in infertile patients with endometriosis[J]. Am J Obstet Gynecol, 1988, 158(6 Pt 1): 1365.
 [14] 张展, 贾莉婷, 杨丽珍, 等. 习惯性流产患者抗精子抗体、抗子宫内膜抗体和抗心磷脂抗体检测[J]. 郑州大学学报(医学版), 2002, 37(5): 640.
 [15] 林建华, 严隽鸿, 林其德, 等. 抗卵巢抗体对卵巢组织及其功能影响的实验研究[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(1): 20-22.
 [16] 黄鹂, 常笑雪. 抗卵巢抗体在不明原因不孕、流产中的作用[J]. 陕西医学杂志, 2005, 34(8): 950-951.

(收稿日期: 2012-01-08)