

荧光原位杂交技术在膀胱疾病致男性不育的临床应用

史国瑞

(定西市中医院检验科 甘肃定西 743000)

[摘要] **目的** 利用荧光原位杂交技术对膀胱疾病患者的精准诊断,为临床治疗因膀胱疾病致男性不育症提供有力证据,同时以便早期筛查膀胱癌和治疗膀胱癌的预后监测。**方法** 收集本院门诊和住院就诊的有关男性不育的患者 142 例,将其患者的精液标本进行物理学参数常规分析和精子形态学参数分析,并利用荧光原位杂交技术检测其染色体特征的异常变化,将一系列的制片进行保存,以便复检。**结果** 患有膀胱疾病的患者精液物理学参数和精子活动力明显低于正常人参数数值,其精子形态畸形率明显增高,其差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),用荧光原位杂交技术检测结果发现患有膀胱疾病的患者,其精液精子染色体均有不同程度的异常变化,其中患有膀胱癌的患者其精子染色体异常数目明显增多或染色体发生了结构的变化,引起精子畸形率升高,导致男性不育率也随之加大。**结论** 荧光原位杂交技术的检测能准确分析膀胱疾病患者染色体的异常变化,在临床上既可以鉴别男性不育症的病因,也可以帮助诊断膀胱癌,用于早期对膀胱疾

病的筛查和监测治疗膀胱癌的复发和预后。因此荧光原位杂交技术在临床不育症的诊治有着广阔的应用前景。

[关键词] 荧光原位杂交；膀胱癌；膀胱疾病；男性不育

Clinical application of fluorescence in situ hybridization in male infertility caused by bladder diseases

Shi Guorui Laboratory of Dingxi Hospital of traditional Chinese Medicine Dingxi, Gansu seven hundred and forty-three thousand

[Abstract] purpose The accurate diagnosis of patients with bladder diseases by fluorescence in situ hybridization (FISH) can provide strong evidence for clinical treatment of male infertility caused by bladder diseases, as well as early screening of bladder cancer and prognosis monitoring of bladder cancer treatment.

method Methods: 142 cases of male infertility in our hospital were collected. The semen samples were analyzed by routine physical parameters and sperm morphological parameters. The abnormal changes of chromosome characteristics were detected by fluorescence in situ hybridization. A series of slides were preserved for re examination. result The sperm physical parameters and

sperm motility of patients with bladder disease were significantly lower than those of normal people, and the sperm morphological deformity rate was significantly higher ($P < 0.05$). The results of fluorescence in situ hybridization showed that the sperm chromosome of patients with bladder disease had different degrees of abnormal changes, In patients with bladder cancer, the number of sperm chromosomal abnormalities increased significantly or the chromosome structure changed, which led to the increase of sperm deformity rate and male infertility rate.

Conclusion The detection of fluorescence in situ hybridization can accurately analyze the abnormal changes of chromosome in patients with bladder diseases. It can not only distinguish the cause of male infertility, but also help to diagnose bladder cancer. It can be used for early screening and monitoring of bladder cancer recurrence and pre treatment. Therefore, fluorescence in situ hybridization has a broad application prospect in the diagnosis and treatment of infertility.

[Key words] Fluorescence in situ hybridization (FISH); Bladder cancer; Bladder disease; Male infertility

近年来不育症是一种比较复杂的疾病，影响了全球将近 70%

的男性人口，不孕不育症的发病率也在逐年上升，其中男性不育症的发生率约为 10%^[1]，其发生男性不育的原因也比较复杂，病因类别也比较多，人们对男性生殖，特别是对精子的认识也远远不够清楚^[2]，以及对男性不育症并非是一种独立的病种，并且受着多种因素的影响，这就必然在临床诊断中要求有更可靠的诊断方法和客观标准，才能明确男性不育症的病因，这些不育患者才能得到有效的治疗手段，获得生育的机会。近年来，随着男性科学的研究发展，人们对人类生殖问题的认识也有了大大的提高，男性不育的发现率也逐步上升，使人们对男性科学工作者也引起了高度的重视^[3]。但是对于遗传学诊断的证据了解也很不全面。随着医疗技术的不断发展，分子技术也在不断的更新，为了控制和治疗男性不育的发生率，研究发现荧光原位杂交技术可以分析男性不育患者染色体的异常变化，在临床上有很大的帮助，它能鉴别诊断产生男性不育的病因种类，能够运用荧光原位杂交技术进行早期筛查各种癌症^[4] 其敏感度和特异性均高，在临床上治疗疾病和预后复发的监测方面也有一定的意义，也使得在男性不育症的治疗方面取得了新的突破性进展。在我国膀胱癌是最为常见的泌尿系统肿瘤，发病率和死亡率均占首位^[5]，且呈逐年上升趋势，并且复发率极高。膀胱疾病是影响男性不育的一个重要因素，因此早期诊断膀胱疾病成为治疗男性不育症和改善膀胱癌预后的关键因素。

1. 资料与方法

1.1 研究对象的收集

1.1.1 患者的收集 收集 2016 年 12 月份以来就诊的男性不育患者 142 例，其年龄均在 27 岁至 40 岁之间,其中选取膀胱疾病病例 37 例。

1.1.2 正常对照对象的收集 收集符合标准的有正常生育能力的参照对象 37 例。

1.2 标本的采集与保存

精液标本的收集与保存 所有受检者同意后收集精液标本，按照精液标本收集要求注意事项收集全部精液，以获得一份满意的精液标本。标本采集后保持温度在 20℃-37℃ 之间。

1.3 所用试剂与仪器

1.3.1 仪器 北昂全自动精液工作站、北昂荧光原位杂交系统、上海那艾精密杂交仪等。

1.3.2 试剂 康录生物技术有限责任公司试剂盒

2. 实验方法与实验步骤

2.1 常规分析方法与步骤 将收集到的精液进行常规分析系统分析以及观察精子的畸形率和精子形态学的异常变化情况。

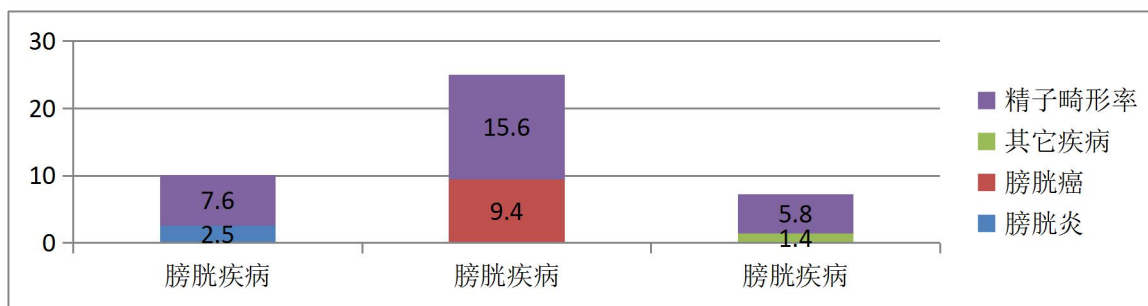
2.2 荧光原位杂交检测方法与步骤 本研究实验试剂盒由康录生物技术有限责任公司提供，操作步骤按照试剂盒说明的操作步骤进行操作，其具体操作包括标本处理；玻片预处理（破坏细胞膜有利于探针杂交；蛋白酶消化、HCl 处理）；变性、杂交、洗涤和复染；荧光显微镜观察图像的采集情况和保存图像；Fish

结果的分析判定。

2.3 数据的建立

2.3.1 37 例膀胱疾病患者精液常规分析结果：液化时间(min) 67.0 ± 3.2 ，酸碱度 7.30 ± 0.12 ，精液量 (ml) 1.037 ± 21.4 ，精子浓度 (106/ml) 48.28 ± 17.01 ，A 级精子 (%) 20.90 ± 8.90 ，B 级精子 (%) 13.22 ± 7.99 ，C 级精子 (%) 13.91 ± 3.48 ，D 级精子 (%) 36.77 ± 19.11 ，A+B 级精子 (%) 27.5 ± 5.4 ，A+B+C 级精子 (%) 47.55 ± 25.34 ；正常组参数为：液化时间(min) 34.38 ± 12.29 ，酸碱度 7.43 ± 0.10 ，精液量 (ml) 3.38 ± 1.47 ，精子浓度 (106/ml) 96.25 ± 11.54 ，A 级精子 (%) 24.32 ± 16.13 ，B 级精子 (%) 21.15 ± 9.65 ，C 级精子 (%) 18.47 ± 6.94 ，D 级精子 (%) 43.63 ± 22.58 ，A+B 级精子 (%) 44.76 ± 17.28 ，A+B+C 级精子 (%) 63.23 ± 19.11 。同时分析 37 例膀胱疾病患者生殖细胞的形态变化：生精细胞数 (/100 条精子) 5.78 ± 45.63 ，精原细胞 4.05 ± 24.42 ，初级精母细胞 8.56 ± 5.60 ，次级精母细胞 13.00 ± 1.07 ，精子细胞 72.00 ± 0.72 ；正常参考组结果为：生精细胞数 (/100 条精子) 2.70 ± 2.05 ，精原细胞 2.49 ± 19.14 ，初级精母细胞 6.06 ± 13.37 ，次级精母细胞 8.02 ± 13.61 ，精子细胞 84.70 ± 2.11 。

2.3.2 用 FISH 技术检测分析膀胱疾病脱落细胞染色体变化，统计其脱落细胞 DNA 的异常变化与精子畸形率的变化



3. 统计学方法

应用 SPSS24.0 统计软件,进行统计学分析,数据用 ($\bar{x}\pm s$) 来表示均值±标准差,用方差分析计量资料,用卡方检验计数资料,用 P 值表示数据间差别, $P<0.05$ 说明具有显著性差异, $P<0.01$ 说明具有极显著性差异。

4. 结果分析

根据两组精液常规分析数据和生殖细胞形态变化来看,酸碱度比较无差异 $P>0.05$, 其余各项数值差异比较均 $P<0.05$, 各类生殖细胞数值比较均有明显差异,具有统计学意义 ($P<0.05$)。利用 FISH 技术进行精子核 DNA 染色时,其荧光染料与患者精子核中 DNA 结合以后,在荧光显微镜下可以观察到显示红色或黄色的荧光。在 37 例膀胱疾病病例中,进行染色体分析,都发生了不同程度的异常变化,精子畸形率也随着发生了变化。同时进行了脱落细胞学 DNA 分析,分析其脱落细胞 DNA 的异常特征,定位准确的鉴别膀胱疾病中膀胱癌发生与发展变化,精子畸形率的变化与染色体异常变化和男性不育率呈正相关关系。

5. 讨论

对于男性不育而其染色体核型正常的患者来说,产生非整倍体核型精子的几率明显上升,尤其产生性染色体非整倍体的几率

更加明显^[6]。因此，利用荧光原位杂交技术对不育男性精子染色体的检测不仅在临床广泛应用，并且作为男性不育患者的常规遗传学筛查^[7]。随着男性科学以及分子遗传学的研究，荧光原位杂交技术也在不断地飞速发展，由起初的单色和双色荧光原位杂交技术逐渐发展为现在临床正使用的多色荧光原位杂交技术，其技术能够同时对不育男性患者精子的多条染色体进行检测研究，能够更全面的分析其精子染色体的异常变化与男性不育患者之间的关系。

综上所述数据，精液常规分析由于所获信息不多和其本身方法学的缺陷，临床上只能运用分析的精子质量情况来判断男性生育能力，但是不能鉴别精子染色体异常变化和产生精子质量不良的病因，也没有没有考虑到细胞遗传学异常在临床上导致男性不育的因素。随着生殖医学和男科学专业的发展，荧光原位杂交技术为临床疾病病因诊断方面提供了强有力的手段^[8]，解决了男性不育症在男科领域中常见的临床问题和严重的挑战。

荧光原位杂交（FISH）技术是在已有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传学技术^[9]。它即可以检测精子染色体的异常特征，对男性不育的病因诊查和临床治疗有一定的指导意义，还通过了解基因或染色体发生的扩增、缺失、融合或断裂，来分析间期细胞的变化，更全面地判断患者某种染色体的异常比例，根据其荧光信号来判断分析染色体的异常变化。FISH作为一种新兴的检测技术，其检测技术比较安全，

检测速度比较快，较其他检测方法灵敏度高、检测信号强、杂交特异性高^[10]，进行杂交时其特异性也明显高，并且能够同时显示多种颜色，此检测结果中不仅能够显示该细胞中期的分裂相，还能够显示细胞间期核。其检测结果更准确，更适用于临床诊断治疗。其中膀胱癌患者就是采用荧光标记的核酸探针检测3、7、17、9p21号染色体上的着丝粒，以确定染色体有无与膀胱癌相关的非整倍体，其技术特异性比较高，也能够更早地发现膀胱癌的复发，常用于膀胱癌的诊断和术后随访检查，同时具有重要的临床实际运用价值。

6. 参考文献

- [1] 世界卫生组织 WHO 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验检验手册[n1]，4 版，北京人民卫生出版社，2001:54.
- [2] 丁金龙，屠凤娟，绍兴地区 361 例不育症等患者精液常规检验结果的分析[J]，浙江检验医学，2020, 6, 4（2）：3P.
- [3] 郭应禄，胡礼泉，男科学，北京；北京卫生出版社，2005；133-134.
- [4] ILPO hvhtahtanieml, Encyclopedia of Endocrine Diseases, ind ed, Amerina; Academic pvess, 2019; 506-507.
- [5] 白文俊，白文俊教授团队男科疾病病例精解，北京，科学技术文献出版社，2018；13. 26.
- [6] 王聪，吴庆华，史惠苓，45. X/46. XY 嵌合体性发育异常诊治进展；国际生殖健康计划生育杂志，2016, 35（2）；132-133.

- [7] BARONJ, Classical and incomplete androgen insensitivity syndromes, *Gine kol pol*, 2004, 65 (7) 375-376.
- [8] 白文俊, 王晓降, 现代男科学临床聚集, 北京; 科学出版社, 2016. 43-46.
- [9] 泰国政, 中医男科学, 北京; 中国中医药出版社, 2012, 173-174.
- [10] HOSHIS, SVIDKIT, ISHIDIYS, etal, significance of simultaneous determination of strum human chorionic gonudotropin and testicular tumor patients iutJVrol, 200, 7 (6) ; 218-219.