

世界卫生组织编



人类精液及精液 - 宫颈粘液相互作用 检验手册

-62

人民卫生出版社

人类精液及精液-宫颈粘液相互作用 检 验 手 册

世界卫生组织 编

凌援宁 沈 琳 颜玉娇 译

钱绍祯 黄 霁 审校

人 民 卫 生 出 版 社

世界卫生组织委托中华人民共和国卫生部

由人民卫生出版社出版本书中文版

人类精液及精液—宫颈粘液相互作用

检 验 手 册

世界卫生组织 编

凌援宁 沈 琳 颜玉娇 译

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京市崇文区天坛西里10号)

人 民 卫 生 出 版 社 胶 印 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

1000×1400毫米32开本 $2\frac{3}{8}$ 印张 2插图 76千字

1989年6月第1版 1989年6月第1版第1次印刷

印数：00,001—3,090

ISBN 7-117-01104-1/R·1105 定价：4.10元

〔科技新书目196—124〕

致 谢

世界卫生组织人类生殖研究、发展和研究培训特别规划司谨向以下积极参加编辑和校订本实验手册第二版全过程的人员表示感谢:

Dr R.J. Aitken
MRC Reproductive Biology Unit
Centre for Reproductive Biology
37 Chalmers Street
Edinburgh EH3 9EW, UK

Dr F.H. Comhaire
Department of Internal Medicine
Academisch Ziekenhuis
185 de Pintelaan
B-9000 Ghent, Belgium

Dr R. Eliasson
Department of Physiology
Faculty of Medicine
Karolinska Institute
S-104 01 Stockholm, Sweden

Dr S. Jager and
Dr J. Kremer
Department of Obstetrics and
Gynaecology
University Hospital
Oostersingel 59
9713 EZ Groningen
The Netherlands

Dr W.R. Jones
Department of Obstetrics and
Gynaecology
Flinders Medical Center
Bedford Park
South Australia 5042
Australia

Dr D.M. de Kretser
Department of Anatomy
Monash University
Clayton, Victoria
Australia 3168

Dr E. Nieschlag
Max Planck Clinical Research Unit
for Reproductive Medicine
at the University Women's Hospital
Steinfurter Strasse 107
D-4400 Münster
Federal Republic of Germany

Dr C.A. Paulsen
Department of Medicine
University of Washington
US Public Health Service Hospital
Seattle, Washington 98114
USA

Dr C. Wang
Department of Medicine
Queen Mary Hospital
Hong Kong

Dr G.M.H. Waites
Special Programme of Research,
Development and Research
Training in Human Reproduction
World Health Organization
1211 Geneva 27, Switzerland

下述各位对本手册的某些方面作出有益的贡献：

Dr K.S. Moghissi
Department of Obstetrics &
Gynaecology
Wayne State University
Detroit, Michigan 48201
USA

Dr T.M.M. Farley and
Dr P.J. Rowe
Special Programme of Research,
Development and Research
Training in Human Reproduction
World Health Organization
1211 Geneva 27, Switzerland

对Evelyn Matala小姐（世界卫生组织人类生殖研究、发展和研究培训特别规划司）细致精确的秘书工作亦表谢忱。

缩 写 词

AID	artificial insemination by donor semen 用供者精液人工授精
AIH	artificial insemination by husband semen 用丈夫精液人工授精
BSA	bovine serum albumin 牛血清白蛋白
EtOH	ethyl alcohol 乙醇
HPF	high-power field 高倍镜视野
Ig	immunoglobulin 免疫球蛋白
IVF	in-vitro fertilization 体外授精
MAR	mixed antiglobulin reaction 混合抗球蛋白反应
RLU	relative light units 相对光单位
SCMC	sperm-cervical mucus contact 精子-宫颈粘液接触

目 录

致谢

缩写词

1. 序	1
2. 人精液的采集和检验	3
2. A 标准方法	3
2.1 标本的收集和转送	3
2.2 标本管理	4
2.3 肉眼检查	4
2.3.1 外观	4
2.3.2 量	4
2.3.3 粘稠度	4
2.3.4 pH	5
2.4 显微镜初检	5
2.4.1 活力	5
2.4.2 标本的制备和分级	5
2.4.3 精子浓度估算	6
2.4.4 非精子细胞成分	6
2.4.5 凝集	7
2.5 显微镜复检	7
2.5.1 精子存活力	7
2.5.2 精子计数	7
2.5.3 精子形态学特征分析	9
2.5.4 染色方法	9
2.5.5 精子包被抗体的测定	9
2. B 供选用的试验	10
2.6 精液培养	10
2.7 生化分析	10
2.7.1 精浆	10
2.7.2 精子	11
2.8 无透明带仓鼠卵母细胞试验	11

2.9	精子游动试验: 从精液中收集活动精子	11
2.10	未成熟生殖细胞	12
3.	精子—宫颈粘液相互作用	13
3.1	导言	13
3.2	宫颈粘液的收集和保存	16
3.2.1	收集步骤	16
3.2.2	贮藏和保存	16
3.3	宫颈粘液的评价	16
3.3.1	宫颈粘液量	17
3.3.2	粘稠度	17
3.3.3	羊齿化	17
3.3.4	成丝性	17
3.3.5	细胞性(即含细胞数量)	18
3.3.6	pH	18
3.4	精子—宫颈粘液相互作用	18
3.4.1	体内试验(性交后试验)	18
3.4.2	体外试验	20
	附录	23
I. A	精液变量的正常值	23
I. B	一些精液变量的术语	24
II.	正甲苯胺蓝过氧化物酶染色	25
III.	体外活体染色技术	26
IV.	精子和其他细胞核的吉姆萨染色体	27
V. A	精子改良巴氏染色	28
V. B	精子的简化巴氏染色	32
VI.	精子形态涂片的勃-利二氏(Bryan-Leishman)染色	33
VII.	精液标本分析记录表	35
VIII.	混合抗球蛋白试验(MAR试验)	37
IX.	免疫珠试验	38
X.	精液中需氧菌的实验培养技术	40
XI.	精浆中锌的测定	41
XII.	精浆中柠檬酸的测定	43
XIII.	人精浆中果糖的测定	45
XIV.	精液中ATP测定法	47

XV. 无透明带仓鼠卵母细胞试验方案.....	50
XVI. 准备性交后试验的参考要点.....	53
XVII. 精子-宫颈粘液相互作用: 毛细管试验法	55
参考文献.....	58
英汉词汇表	62

序

世界卫生组织1980年《人类精液及精液-宫颈粘液相互作用检验手册》一书的出版,标志着对人精液检查步骤标准化日益增加的需要。此书受到世界各地临床医生和科研人员的热烈欢迎。

但是,一些发展促使我们即着手修订本手册。男性学领域取得了很大进展,人们对客观检测精子质量和功能特征的重要,以及与副腺分泌作用有关的精子变量的认识也不断提高。这对推测夫妻不孕的原因,对检测精子发生可能受到抗生育药物或毒物抑制的男子生育力都是必要的。此外,精液变量的客观测定,在体外授精,供精者或丈夫的人工授精,以及法医科学等新兴的研究中也具有重要意义。

基于这些理由,世界卫生组织人类生殖研究、发展与研究培训特别规划司邀请专家组或工作组就两方面修订本手册。

(a) 男性生育调节方法

(b) 不孕症诊断和治疗

本手册开始部分的人精子检查主要分为两个部分:第一,精液标准检测法及最基本的步骤(2A: 2.1~2.5);第二,为特殊研究或深入评价精液而考虑选用的一些方法(2B: 2.6~2.10)。

第二版所作的改动之一,是用一种简易的方法,替代以前的方法来筛别精子以外其他细胞的形态;而将以前推荐的技术列为备用,同时增加了检测精子抗体的技术。

据称,测定精浆中的某些生化成分可评价副腺的分泌功能。其中,枸橼酸、锌、 γ -谷氨酰转肽酶、酸性磷酸酶能反映前列腺的分泌功能;果糖是精囊分泌功能的标志;游离左旋肉毒碱则可能是附睾分泌功能的标志。虽然上述生化试验均未能表明与生育力密切相关,但特殊标志物的生化分析可提供男性副腺功能状态的信息,从而能较好判别异生因素和疾病的可能影响。基于这些理由,在选用部分中包括了一些生化实验(2.7)。

有人建议将三磷酸腺甙(ATP)浓度作为精子功能的重要变量。此外,

世界卫生组织最近召开了一次会议来评价无透明带仓鼠卵母细胞试验对于检测人精子与卵母细胞结合能力的价值（世界卫生组织，1986）。本手册收入这两个试验的推荐方案以供选用，所引用的参考资料更提供了与此有关的现代观点。

本手册精子-宫颈粘液试验章节(3.1~3.4)认为,评价夫妇生育力时,体外测定精子穿透宫颈粘液能力,是常规精液分析的一个有价值的附加试验。为此目的可采用几种方法,如显微镜法(玻片技术)以及毛细管试验。

最后必须再度强调,本手册旨在推广标准方法,从而提高各实验室间的质量控制,以利于综合分析来自不同实验室的数据。注意标准方法的细节,也可提高实验的精确性和可复性。分析精液质量某些特性的计算机技术的问世,预示了借助计算机传递数据以及实验室间质量控制的前景。

人精液的采集和检验

2. A 标准方法

2.1 标本的收集和传送

必须为受检者提供如何收集和传送精液的简要说明书。

(a) 最好在禁欲后 2 ~ 7 天收集标本。对于每份精液标本, 应将受检者姓名、禁欲时间、收集日期和时间记录在案(表格见附录 VII)。

(b) 首次分析精液时需两份标本。两次采精相隔时间视当地情况而定, 但不能少于 7 天或多于 3 个月。如两次测定差异显著, 则应再次采精测定, 因为即使在同一个人, 精子数量也会有显著波动(图 2.1)。

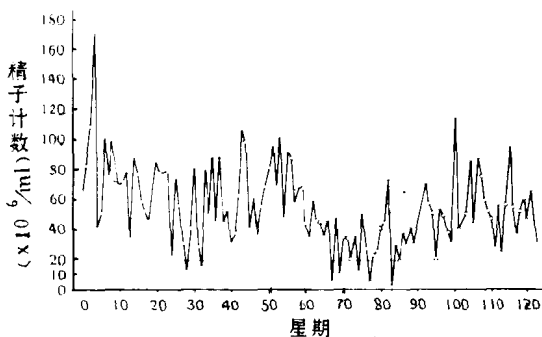


图 2.1 每 2 周一次测定某人精液中精子浓度, 连续 120 周。在此期间未服用药物, 也无发热症状。虚线表示 $20 \times 10^6/\text{ml}$, 通常被认为是正常范围的低限(见附录 I. A)。(未发表资料, C. A. Paulsen)

(c) 收集标本最好在实验室附近房间内单独进行。不然, 则应在收集后一小时内送至实验室。如精子活力异常低下(快速直线前向活动精子少于 25%, 见 2.4.1)时, 则必须再次采精并尽快检验。如需测定精子功能(如无透明带仓鼠卵母细胞试验), 必须在采精后一小时内将精子与精浆分离(见附录 XV)。

(d) 须手淫采精, 并使其射入清洁玻璃或塑料广口容器内。如用塑料容器, 必须经鉴定对精子无毒性作用。容器要温热, 以减少精子冷休克的危

险。如需进行细菌检查,受检者应先解小便,然后冲洗双手和阴茎,再采精并置于消毒容器内(见2.6)。采精时不可使用润滑剂。

(e) 普通阴茎套可能影响精子存活力,故不可用于采精。如无法手淫采精,可用特制塑料阴茎套(见Zavos, 1985)。

性交中断法也不宜用于采精,因精子含量最高的射精第一部分可能失败。此外,标本会有细胞和细菌污染,而且阴道液pH偏酸,对精子活力有不利影响。

(f) 不完全的标本,特别是失去第一部分的标本,不宜进行分析。

(g) 标本传送至实验室时,应防止温度过大变化(不低于20℃,不超过40℃)。

(h) 标本容器需有标签,写明受检者姓名、采精日期和时间及禁欲时间。

2.2 标本管理

应告知实验技术员,精子标本可能具有生物性危害。因其中可能含有害病毒,如肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、疱疹病毒等。应谨慎对待。

2.3 肉眼检查

2.3.1 外观

首先在室温下作简单的肉眼观察,正常精液标本呈灰白色,质均匀,室温下60分钟内液化。有些人60分钟内不能完全液化,应作记录。

精子浓度太低的标本显得清澈。存在红细胞时呈褐色。标本中出现粘液丝是不完全液化的征象,可能影响精子计数。

正常精液也可能含有不液化的胶冻状颗粒。

标本一经液化,或在射精后一小时内,须立即进行检测。有时标本可能不液化,需要另行处理(例如加菠萝蛋白酶)后才能检测。

标本在原容器内必须充分混匀。

2.3.2 量

测定精液量可用刻度量筒,也可将其全部抽吸到刻度注射器或吸管中。如要继续进行生物分析或精液培养,以上器皿需先行消毒。

2.3.3 粘稠度

测量液化后精液粘稠度(参阅第一版手册中的“粘性”)的方法为,将

精液轻轻地从注射针头（21G，内径约为0.03英寸或0.08mm；使用注射器针头时必须仔细参阅2.2有关注意事项）推出，观察精液丝长度。正常标本离开注射针头时，形成不连续的悬滴，异常粘稠标本的悬滴可粘成一条长于2cm的丝状物。另一方法是将一根玻璃棒接触标本，观察轻提棒时所形成的精液丝长度，正常也不应超过2cm。

2.3.4 pH

将一滴精液均匀涂布于pH试纸（pH范围6.4~8.0），30秒钟后试纸浸润区的颜色应均一，以之与标准条带相比较，便得pH值。无论使用何种pH试纸，均应根据已知标准先行核查其精确度。

pH应在射精后一小时内测定，正常值范围在7.2~7.8之间。如超过7.8，则可能有感染存在；反之，如小于7且标本中无精子，则可能为输精管、精囊或附睾发育不良。

2.4 显微镜初检

显微镜初检项目包括精子活力、精子浓度、非精子细胞及精子凝集性。

2.4.1 活力

近年来采用了一些客观评价人精子活力的新技术，如定时曝光和计算机化显微录相术（Overstreet等，1979；Katz和Overstreet，1981；Aitken等，1982），以及应用激光技术的方法（Lee等，1982）。本手册仅推荐一种不需要精密仪器就能很好评价精子活力的简易分级方法。有兴趣对精子活力作详细测定者，可参阅上述文献。

2.4.2 标本的制备和分级

将一定量精液（10~15 μ l）置于清洁玻片上。可用微量吸管吸取，亦可从21G针头滴下一滴。上覆20mm $\times$ 20mm或24mm $\times$ 24mm盖玻片。精液量和盖玻片的大小必须标准化，使分析时标本有固定的厚度（即在25~30 μ m之间）。在此厚度正常精子能充分进行旋转运动。

检查未染色标本可用普通光学显微镜，放大400~600倍观察。如将聚光镜调低，使光线弥散，效果较好。当然，使用相差显微镜则更佳。

盖玻片的重量使标本展开而利于观察，新制湿片要稳定一分钟左右后镜检，应在室温下进行，最好在18~24 $^{\circ}$ C。如超过这个范围，精子活力会发生变化，从而此项变量的正常值（见附录I）就不再适用。

有顺序地观察整个视野，对所见每个精子的活力都进行分类。活力分为(a)、(b)、(c)、(d) 4个等级。这些等级的定义为：

(a) 具有快速、直线的前向运动（过去称作“很好”或“良好”前向运动）；

(b) 慢速或迟钝的直线或非直线前向运动（过去称作“弱”或“中等”前向运动）；

(c) 具有不向前的运动；

(d) 不活动。

一般检查4~6个视野以连续累计100个精子，进行分级，得出各活动等级的百分率。最好再用同样方法取一滴精液重复检查一遍。每个等级的精子计数可利用一般实验室计数器。

2.4.3 精子浓度估算

测定精子浓度的方法将在2.5.2中讨论，但在初检时可约略估算一下，以便决定要采用的稀释步骤，以及是否需要离心以制备合适的形态分析涂片。估算方法如下：在40倍物镜下，将若干视野中精子的平均数乘以 10^6 即可。例如，每个视野有40个精子，则精子数大约为每毫升4000万。

如每个视野的精子数差异很大，说明标本不均匀。需将标本重新充分混合。粘稠度或液化异常、精子聚集到粘液丝上或精子凝集，都可能导致标本的均匀度降低。这些情况应在精液分析报告上注明。

2.4.4 非精子细胞成分

除精子外，精液通常还含有其他细胞，如尿道中的多角上皮细胞、生精细胞和白细胞等，这些在手册第一版统称为圆细胞。估算湿片每个视野中这些细胞的数目可在估算精子数量的同时进行。此外，可用适合的血细胞计数器（如白氏、诺氏或改良诺氏计数池）来精确测定所有这些细胞的浓度。

如这些细胞的浓度超过 $10^6/\text{ml}$ ，或在40倍物镜下每个视野见到一个，可用一种专门染色法来鉴别过氧化物酶阳性的白细胞与其他细胞。染色的标本要新鲜，染色方法是基于完整的中性多形核粒细胞含有过氧化物酶（见附录II；Naboum 和Cardozo, 1980）。过氧化物酶阴性的细胞包括：失粒多形核粒细胞、淋巴细胞和未成熟的生殖细胞，后者包括精子细胞、精母细胞和精原细胞（见图版2.2）。如过氧化物酶阳性细胞超过 $10^6/\text{ml}$ ，应进一步检查患者副腺是否有感染。无白细胞并不排除男性副腺感染的可

能性。

倘若认为有必要对每一类型细胞进行定量分类，则可采用下列方法：

因为精子计数（见 2.5.2）只包括精子（具有尾的形态上成熟的生殖细胞），其他类型生殖细胞和白细胞浓度可用已知精子数进行相对计算。

假定 N 是在计数 100 个精子的同样视野中某种细胞的数目，S 代表 10^6 / ml 精子数，则每毫升这种细胞的 10^6 数（C）可按下列公式计算，因细胞数和精子数的比率在涂片上和精液中理应相同。

$$C = \frac{N \times S}{100}$$

例如，每 100 个精子细胞可数得 10 个未成熟生殖细胞，而精子数是 120×10^6 / ml，则未成熟生殖细胞浓度是：

$$C = \frac{10 \times 120}{100} = 12 \times 10^6 \text{ / ml} \quad \text{或} \quad 12000 \text{ 万 / ml}$$

2.4.5 凝集

精子凝集指活动精子相互粘附，有头对头、中段对中段、尾对尾或混合粘附，如中段对尾等。不活动或活动精子附着于粘液丝、非精子细胞或碎片，均不能视作凝集，故不作凝集记录。

出现精子凝集，提示存在不育的免疫原因，但不能完全证明此点。凝集的程度可能是重要的，因此，即使只有由几个精子凝集在一起的少数团块，也应作记录。

2.5 显微镜复检

2.5.1 精子存活力

如不活动的精子超过 60%，可用体外活体染色技术测定活精子比例。该技术原理是胞浆膜受损的死精子可被染色。染色有两种方法：单用伊红染湿片或合用苯胺黑与伊红染干片。详细操作方法见附录Ⅲ。

在普通显微镜或相差显微镜下数 100 个精子，区别其死（着色）、活（未着色）。体外活体染色技术能区分不活动的死、活精子。

这些方法还能查核活力评价的准确性，因死精子百分比不应超过不活动精子百分比。此外，如不活动精子的比例过大，提示鞭毛可能有结构缺损。

2.5.2 精子计数

精子浓度可用血细胞计数器计数。计数时，将精液充分混匀，并按 1:20

稀释,即50 μ l液化精液加950 μ l稀释液。稀释液含NaHCO₃ 50g, 35%福尔马林10ml (也可含饱和龙胆紫液 5 ml),加蒸馏水至1000ml,若用相差显微镜则不必加染色剂。

如初检时发现精子浓度过高或过低,标本的稀释程度应作相应调整。据此,每毫升精子少于 20×10^6 时,稀释比例以1:10为宜;每毫升精子超过 100×10^6 时,稀释比例1:50较佳。稀释通常用白细胞计数吸管,但不够精确,故建议用微量吸管。标本应在清洁小玻管中稀释。

充分混和稀释的精液,取一滴置于标准血细胞计数器上,覆以盖玻片。然后留置1~5分钟。为减少标本干燥,血细胞计数器最好放在潮润的室中。待细胞在此期间沉淀后,在普通显微镜或相差显微镜下计数(100或400 $\times$)。只计数精子(即形态上成熟的有尾生殖细胞)。

在血细胞计数器中计数精子的方法为:用改良诺氏血细胞计数器,其计数池中央方块中有25个大方格,每个大方格中有16个小方格(见图2.2)。每个大方格中,精子数少于10时,需计数整个中央方块,即25个大方格的精子;每大方格精子数10~40时,需数10个大方格;精子数超过40时,应数5个大方格。如精子位于两格间分界线上,只计数位于上侧及左侧者。为了用 10^6 /ml算出原精液标本中的精子浓度,应将数得的数字乘以表2.1所示的相应换算因数。如标本10倍(按1+9)稀释,而25个大方格中数得2个精子,则原精液中精子浓度是 20×10^6 /ml。

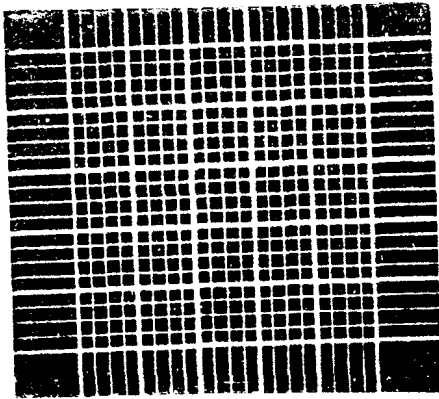


图2.2 改良诺氏血细胞计数器的中央方块有25个大方格,用这些方格计数精子(见正文及表2.1)。

表2.1 白细胞计数器法的转换因数

稀释 (精液+稀释液)	计 数 的 大 方 格		
	25	10	5
1 + 9	10	4	2
1 + 19	5	2	1
1 + 49	2	0.8	0.4