

石菖汤对肾虚夹湿型弱精子症患者精子线粒体酶及精浆锌的影响※

● 程宛钧* 张敏建▲ 史亚磊 危桢罡 潘旭东 林 勇 潘日润 邓日森 曾智承

摘 要 目的:探讨石菖汤对肾虚夹湿型弱精子症患者精子活力、精子线粒体酶活性及精浆锌含量的影响。方法:选取符合纳入标准的病例 76 例,随机分为石菖汤治疗组 38 例;天然维生素 E 软胶囊 + 葡萄糖酸锌片对照组 38 例,检测两组治疗前后精液常规参数;精子线粒体呼吸链相关酶活性:琥珀酸脱氢酶(SDH)和细胞色素 C 氧化酶(COX)的水平;全自动精浆生化仪测定精浆锌含量的变化;评估治疗前后中医证候评分。结果:两组治疗后各项精液参数比较,治疗组优于对照组($P < 0.05$);两组治疗后精子线粒体呼吸链相关酶活性值均有升高,治疗组优于对照组($P < 0.05$);两组治疗后精浆锌含量升高,治疗组升高幅度高于对照组($P < 0.05$);两组治疗后中医证候评分,治疗组改善程度明显优于对照组($P < 0.01$)。治疗 16 周后再随访 12 周,治疗组 9 例夫妇受孕成功,总有效率为 86.11%;对照组仅 4 例夫妇受孕成功,总有效率为 72.22%,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。结论:石菖汤对改善肾虚夹湿证弱精子症患者的精液常规中的活力参数有明显作用,应与其激发精子线粒体酶活性和提高精浆锌含量以及治疗肾虚夹湿证临床症状有关,进而提升不育患者夫妇受孕能力,值得进一步深入研究。

关键词 石菖汤 肾虚夹湿 弱精子症 线粒体酶活性 精浆锌

男性不育症是目前成年男性的常见病、多发病,占不孕不育因素的 50% 左右^[1],弱精子症常是导致男性不育症的主要原因,约占 19%^[2],弱精子症产生的原因多与感染、精浆异常、内分泌异常、男性附属性腺炎症或功能下降、精索静脉曲张等因素有关^[3],随着研究发现精子线粒体活性和精浆锌与弱精子症关系密切^[4]。我院协定处方石菖汤是治疗肾虚夹湿型弱精子症的经验方,临床应用近三十年,疗效良好^[5]。

为进一步探讨其作用机制,笔者运用石菖汤对肾虚夹湿型弱精子症患者进行治疗,并对其改善精液参数、精子线粒体酶活性及精浆锌含量的干预作用进行观察,取得了满意效果。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自 2015 年 8 月 ~ 2017 年 3 月在福建中医药大学附属人民医院男科门诊就诊的男性不育症中弱精子症患者 76 例,按照 1:1 比例随机分为治疗组(石菖汤)38 例;对照组(天然维生素 E 软胶囊 + 葡萄糖酸锌片)38 例。年龄:治疗组,23 ~ 46 (30.85 ± 9.67) 岁;对照组,23 ~ 48 (29.63 ± 8.97) 岁。病程:治疗组,最长 7 年,最短 15 个月,平均 (2.83 ± 1.27) 年;对照组,最长 9 年,最短 13 个月,平均 (3.19 ± 1.76) 年。经 SPSS19.0 统计学分析,两组间年龄、病程均无显著差异 ($P > 0.05$)。

1.2 西医弱精子症诊断标准 参考《实用男科学》^[6]

※基金项目 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (No. 81403246);福建省卫生厅中医药科研课题资助 (No. wzsyl201307);福建省卫生厅青年科研课题资助 (No. 2013 - 2 - 60)

* 作者简介 程宛钧,男,医学硕士。主要从事中西医结合男科临床与基础研究。

▲ 通讯作者 张敏建,男,主任医师,教授。E-mail:190078137@qq.com

• 作者单位 福建中医药大学附属人民医院 (350004)

标准,进行精液分析,精液量 $>2\text{mL}$,精子计数 $>20\times 10^9/\text{L}$,精子总数 $>40\times 10^9/\text{L}$,伴以下活力指标有1项或1项以上异常:60min内,前向快速运动精子(A级)、前向慢速运动精子数(B级)和非前向运动精子(C级),即 $A+B<50\%$,或A级 $<25\%$,或A级+B级+C级 $<60\%$ 者。

1.3 中医证候诊断标准 参照《中药新药临床研究指导原则》^[7]并加以修改。主症3项,分别是舌淡红苔厚腻,脉滑或沉细;腰膝酸软;形寒肢冷。次症4项,分别是精液黏稠;失眠健忘;口干口苦;嗜睡。符合主症1项,同时兼具主症其余各项中的任1项和次症中任2项即可诊断。

1.4 纳入标准 (1)23~50岁育龄男性;(2)夫妻双方同居性生活1年以上,未采取任何避孕措施女方均未曾怀孕者^[1];(3)符合中医证候诊断标准;(4)符合西医弱精子症诊断标准;(5)自愿参加本研究,并签署知情同意书。

1.5 排除标准 (1)具有明确遗传性免疫缺陷性疾病,及具有药物、食物过敏者;(2)精浆生化分析提示伴有其它附属性腺功能不良者;(3)全身检查有其它内分泌疾病、代谢性疾病者;(4)3个月内有服用影响睾丸生精功能或附属性腺功能药物者;(5)先天生殖系统发育不良或畸形;(6)生殖道感染;(7)女方是不孕症者;(8)拒绝参与本研究者。

1.6 实验药物

1.6.1 治疗组 石菖汤(福建中医药大学附属人民医院协定处方),功效:化湿祛浊、益肾填精;组成:石菖蒲20g,草薢20g,连翘15g,黄芪30g,枸杞子20g,菟丝子30g,黄精15g,五味子10g,覆盆子10g,墨旱莲15g,女贞子15g,怀牛膝10g。由我院全成分中药配方颗粒剂智能中药房全封闭配制,每剂分2包,早晚饭后各1包,开水溶解冲服,连续服用16周。

1.6.2 对照组 天然维生素E软胶囊(珠海市汤臣倍健股份有限公司出产,国食健字G20110005)每日1粒,饭后服;葡萄糖酸锌咀嚼片(浙江杭康药业有限公司生产,国药准字H20083979),每次4片,每天2次,饭后服。对照组方案药物,连续服用16周。

1.7 疗效指标

1.7.1 两组患者治疗前后精液参数的变化 按

WHO第4版实验室操作手册的标准方法^[8]用徐州北斗科贸公司生产的BD-8000G型彩色精液分析仪(CASA)进行精液密度和活力等参数的检测。

1.7.2 精子线粒体呼吸链相关酶活性测定 采用王美娇方法^[9]改进,制备精子悬液-80℃保存备用。采用Clark^[10]和王新^[11]等方法将前述制备好的精子悬液,分离提取精子线粒体悬液,置于冰槽备用。严格按照线粒体呼吸链复合物试剂盒说明书设定好分光光度计(上海尤尼柯UV-2000型),对精子线粒体琥珀酸脱氢酶(SDH)和细胞色素C氧化酶(COX)的活性进行检测。精子线粒体呼吸链相关酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.7.3 精浆锌测定 将患者精液离心沉淀分离精子后得到精浆,按照南京欣迪生物公司出品的精浆锌定量检测试剂盒(PAN法),用迈瑞公司全自动精浆生化仪(BS-400型)检测。

1.7.4 中医证候评分的变化 观察两组患者治疗前后的临床症状变化,并参考《中医临床病症诊断疗效标准》并修订后对患者的临床症状进行评分,根据无、轻、中、重程度,主症分别评0、2、4、6分,次症分别评0、1、2、4分^[12]。

1.7.5 疗效判定标准及总有效率的比较 参照《中药新药临床研究指导原则》^[7]男性不育症的疗效判定标准。痊愈:患者服药期间以及治疗后3个月内使配偶受孕;显效:治疗后精液质量转为正常但配偶没有受孕;有效:精液分析中精子密度、成活率、活动力,至少有1项提高幅度 $>30\%$;无效:治疗前后精液质量无变化。总有效率($\%$)=(治愈例数+显效例数+有效例数)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.8 统计学方法 由专人采用SPSS19.0统计软件进行临床研究资料的汇总数据分析,对于方差齐性检验中方差齐的计量资料采用 t 检验,方差不齐则采用秩和检验;等级资料采用秩和检验方法。计数资料组间比较采用卡方检验,用 $P<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 两组精液参数治疗前后比较 见表1。

表 1 两组精液参数治疗前后比较($\bar{x} \pm s$)

组别		量(ml)	精子密度(10^6 /ml)	精子活动率(%)	a 级(%)	a + b(%)
治疗组 (n=36)	治疗前	1.81 ± 0.67	25.83 ± 4.67	36.14 ± 13.18	13.18 ± 7.57	29.22 ± 10.23
	治疗后	3.78 ± 1.03 ^{1) 2)}	31.43 ± 7.56 ^{1) 2)}	66.84 ± 18.61 ^{1) 2)}	29.49 ± 5.38 ^{1) 2)}	56.24 ± 6.15 ^{1) 2)}
对照组 (n=35)	治疗前	1.86 ± 0.79	23.21 ± 3.15	38.20 ± 12.45	14.21 ± 5.13	30.11 ± 11.13
	治疗后	2.74 ± 1.57 ¹⁾	28.52 ± 5.31 ¹⁾	51.29 ± 10.64 ¹⁾	24.12 ± 4.26 ¹⁾	43.45 ± 6.32 ¹⁾

注:治疗前比较,¹⁾ $P < 0.05$;与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 两组治疗前后精子线粒体呼吸链相关酶活性和 精浆锌含量比较 见表 2。

表 2 两组精子线粒体呼吸链相关酶活性治疗前后比较($\bar{x} \pm s$)

组别		n(例)	SDH(U/mg)	COX(U/mg)	精浆锌(μ mol/次射精)
治疗组	治疗前	36	2.38 ± 0.45	1.68 ± 0.43	2.89 ± 1.93
	治疗后	36	3.98 ± 0.56 ^{1) 2)}	2.93 ± 0.31 ^{1) 2)}	4.93 ± 2.36 ^{1) 2)}
对照组	治疗前	35	2.59 ± 0.56	1.91 ± 0.61	2.61 ± 1.77
	治疗后	35	3.15 ± 0.59	2.36 ± 0.57	4.06 ± 1.61 ¹⁾

注:治疗前比较,¹⁾ $P < 0.05$;与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 两组治疗前后肾虚夹湿证中医证候评分比较
见表 3。

表 3 两组治疗前后肾虚夹湿证中医证候评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后
治疗组	36	18.8 ± 4.6	5.3 ± 3.9 ^{1) 2)}
对照组	35	17.3 ± 5.6	10.3 ± 4.6

注:治疗前比较,¹⁾ $P < 0.05$;与对照组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.4 两组总体疗效评价 服药 16 周后再随访 12 周,治疗组有 9 例夫妇受孕成功,总有效率为 86.11%。对照组仅 4 例夫妇受孕成功,其中 1 例在怀孕 11 周左右检查发现先兆流产,总有效率为 72.22%。两组对比,具有统计学差异($P < 0.05$),说明治疗组疗效明显优于对照组。见表 4。

表 4 两组治疗前后总体疗效的比较(例,%),

组别	例数	痊愈	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	36	9	14	8	5	86.11 ¹⁾
对照组	35	4	11	11	9	72.22

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.5 两组脱落情况 治疗组脱落 2 例,对照组脱落 3 例,两组共有 71 例完成研究。两组脱落病例均为前往外地工作,无法定期复诊观察而中断服药。

3 讨论

男性不育症是严重影响患者生活质量和家庭和谐的一个疾病,弱精子症是其常见的原因,而造成弱精子症常见因素有两类:一类为感染因素、微量元素缺乏(如锌)以及氧化应激的过氧化损伤(如活性氧)、内分泌激素异常等;另一类为精子中段线粒体病变和功能发生异常等。随着精子超微结构和分子研究的深入,发现精子运动所需能量主要来自线粒体呼吸链的氧化磷酸化,如果氧化磷酸化功能异常,酶活性或表达量改变及 mtDNA 的变异等均可能导致线粒体能量合成障碍,降低精子活力^[4]。线粒体是细胞对食物进行器,精子细胞中也存在着线粒体^[13]。所以,线粒体呼吸链酶活性是评价精子活力的重要参数之一。近年来线粒体结构和功能异常与精子活力低下的相关性已引起关注^[4]。

SDH 是线粒体呼吸酶系的关键酶,它位于线粒体的内膜上,在三羧酸循环中,SDH 催化琥珀酸转化为延胡索酸,脱去的 H^+ 最后生成三磷酸腺苷,为细胞提供能量^[14]。因此,SDH 活性能直接反映线粒体功能和细胞能量代谢状态。COX 也是呼吸酶系中的关键酶之一,其酶活性变化直接影响整个呼吸链的功能。COX 是线粒体能量代谢的关键调控部位,在能量产生中起主要作用^[15]。

另外,国内外很多研究证实,锌是机体必需的微量元素,参与精子产生、成熟、激活、获能及凋亡的全过程,足量的锌能够维持细胞结构的稳定性和生理通透性、延缓精子细胞膜脂质氧化过程,从而使精子活

力良好^[16]。睾丸组织对锌的依赖性较强,因此锌对生殖系统的发育与功能密切相关,锌缺乏则加重睾丸内氧化的损伤,降低蛋白、脂质及核酸的含量,进而易导致破坏正常精子线粒体结构。睾丸内存在适量锌,可对抗氧自由基等多种因素诱发的睾丸生精细胞凋亡^[17,18]。抗氧化作用是维生素 E 重要的药理作用,维生素 E 能够通过改善附属性腺的内环境和分泌功能,降低精子和精浆的氧化应激损伤,从而改善精子活力。国内有研究表明,氧自由基的增高和线粒体信号通路分子的异常在特发性少弱精子症患者精液中均能检测出。少精子症侧重于凋亡,弱精子症侧重于氧化损伤^[19]。氧化应激损伤常导致精子线粒体结构和功能的异常,造成精子活力下降,该研究还表明,活性氧(ROS)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)对精子的作用是双面的:既损害又保护,在运动参数方面尤为显著。ROS 作用于精子线粒体通路、影响其相关参数,GSH 则直接对抗 ROS,并呈现一定的量效关系^[19]。因此,补充维生素 E 和锌制剂是现代医学常用来抗氧化应激损伤来修复线粒体功能,改善精子活力的方法。

石菖汤是我院男科协定处方,临床用于治疗肾虚夹湿型弱精子症 30 余年取得了良好的疗效^[5,20]。针对其肾精亏虚、湿阻精窍的病机,发挥益肾祛湿强精的功用。方中石菖蒲、萆薢祛湿开窍利浊;黄芪、枸杞子、菟丝子益气健脾滋肾;黄精、五味子、覆盆子、墨旱莲、女贞子益肾填精;少佐连翘清热利尿解毒,取下病上治之意;怀牛膝补肝肾、引药下行直达病所。全方共奏益肾强精化浊之功。

本研究结果显示,石菖汤能有效地改善各项精液参数,尤其在提升精子活力方面作用显著;同时研究表明石菖汤能够较快地改善精子线粒体呼吸链相关酶活性,使 SDH 和 COX 的水平均有升高,有效地改善精子线粒体功能状态;治疗后发现精浆锌含量较治疗前明显升高,说明治疗方案能够有效地改善附属性腺的功能,提高精浆质量;更重要的是,通过石菖汤治疗能明显改善患者的中医肾虚夹湿证的临床症状,体现了中医治疗的优势和特色。

综上,通过研究期间观察和随访,发现石菖汤在总有效率和受孕率均优于对照组,说明该方案对肾虚夹湿证弱精子症患者的精液常规中的活力参数有明显的改善作用,应与其激发精子线粒体酶活性和提高精浆锌含量以及改善肾虚夹湿证临床症状有关,进而

提升患者夫妇受孕能力,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会男科专业委员会. 男性不育症中西医结合诊疗指南(试行版)[J]. 中国中医结合杂志, 2015, 35(9): 1034 - 1038.
- [2] Curi SM, Ariagno JJ, Chenlo PH, et al. Asthenozoospermia: Analysis of a large population[J]. Arch Androl 2003, 49(5): 343 - 349.
- [3] 张卫星, 王 瑞. 导致少、弱精子症的因素和治疗[J]. 医学新知, 2008, 18(1): 18 - 21.
- [4] 郑九嘉, 楼哲丰, 郑蔚虹, 等. 线粒体呼吸功能与精子活力、核 DNA 损伤的相关性分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(1): 34 - 40.
- [5] 张敏建, 张球勇, 程宛钧, 等. 石菖汤治疗肾虚夹湿型弱精子症 49 例临床观察[J]. 福建中医药大学学报, 2012, 22(4): 4 - 6.
- [6] 李宏军, 黄宇烽. 实用男科学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2015: 577 - 592.
- [7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 361 - 390.
- [8] 世界卫生组织. WHO 人类精液及精子 - 宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 5.
- [9] 王美娇. 精子线粒体膜蛋白 Prohibitin 和 UPS 通路相关蛋白的表达及与男性不育的相关性研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [10] Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria: Preparation and characterization[J]. J Biol Chem, 1970, 245: 4724 - 4731.
- [11] 王 新, 陈凤玲. 线粒体的功能及检测方法[J]. 医学综述, 2011, 17(1): 12 - 15.
- [12] 李晓彤, 孙红丽, 张艳杰. 滋肾活血汤治疗月经过少肾虚血瘀证临床观察[J]. 光明中医, 2016, 31(13): 1899 - 1900.
- [13] 黄国林, 秦耀琮, 王权胜, 等. 续断种子方对少弱精子症模型大鼠生精作用及其超微结构改变的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(6): 727 - 729.
- [14] 薛小平, 商学军, 傅 健, 等. 精子线粒体琥珀酸脱氢酶检测及其意义[J]. 中华男科学, 2003, 9(8): 601 - 603.
- [15] 李晓东, 史华新, 程 霞. 解毒化瘀方对内毒素血症大鼠肝线粒体 COX 的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(1): 35 - 37.
- [16] 周伟强, 林锦春, 邵丹丹, 等. 淫羊藿育宝汤对肾阳亏虚型不育症患者精子顶体酶及精浆锌水平的影响[J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(3): 5 - 8.
- [17] Duan H, Wang Y, Aviram M, et al. SAG, a novel zinc ring finger protein that protects cells from apoptosis induced by redox agent[J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 113: 187 - 196.
- [18] Summers BL, Henry CM, Rofe AM, et al. Dietary zinc supplementation during pregnancy prevents spatial and object recognition memory impairments caused by early prenatal ethanol exposure[J]. Behavioural Brain Research, 2008, 186: 230 - 238.
- [19] 张卫东. 氧自由基 - 线粒体信号通路在少、弱精子症发病中的机制研究[D]. 河南郑州: 郑州大学, 2015.
- [20] 程宛钧, 张敏建, 史亚磊. 石菖汤对肾虚夹湿型弱精子症精子线粒体结构的影响[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(增 1): 25 - 26.