

· 临床研究 ·

石菖汤对弱精子症患者精子线粒体膜蛋白 PHB 及超微结构的影响※

● 程宛钧^{1*} 张敏建^{1▲} 史亚磊¹ 危桢罡¹ 江 澍² 程建标¹ 詹华深¹ 邓日森¹ 曾智承¹

摘 要 目的:探讨石菖汤对肾虚夹湿型弱精子症患者精子线粒体膜蛋白 PHB 及超微结构的影响。方法:选取福建中医药大学附属人民医院男科门诊就诊的肾虚夹湿型弱精子症患者(60 例)和生殖体检者(60 例)为研究对象。将生殖体检正常者纳入正常精液组(N 组, n=30), 检测为弱精子者纳入弱精子组(A 组, n=30); 确诊为肾虚夹湿型弱精子症的 60 例患者纳为石菖汤治疗组(T 组, n=60)。A 组暂未接受相关治疗措施, T 组连续口服石菖汤 16 周。三组受试者均禁欲 7d 后经手淫方式采集精液, 用计算机辅助精液质量分析仪(CASA)分析精液质量; 采用荧光探针 MitoTracker, 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察精子细胞的荧光强度, 分析精子细胞线粒体膜蛋白 PHB 阳性细胞的比例; 用透射电镜观察精子细胞线粒体超微结构的变化。结果:三组受试者除精液量比较无统计学意义($P>0.05$)外, N 组受试者部分精子质量指标[精子(a+b)级活动力及精子成活率]、精子线粒体膜蛋白 PHB 水平均明显高于 A、T 两组, 且 T 组上述指标检测结果明显高于 A 组, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。MitoTracker 荧光探针检测, LSCM 观察显示 N 组可见精子中段结构, 类似棒状; T 组可见精子中段结构, 但较短或弯曲状; A 组的精子结构变形; 荧光强度 A、T 组精子弱于 N 组, 但 T 组优于 A 组($P<0.05$)。透射电镜观察显示 N 组精子线粒体鞘完整; A 组精子出现水肿、呈现空腔, 线粒体肿胀; A 组精子线粒体鞘较完整、线粒体肿胀明显减轻、结构较完整、整齐。结论:石菖汤能够改善肾虚夹湿型弱精子症患者精子质量, 可通过上调精子线粒体膜蛋白 PHB 表达阻滞精细胞凋亡, 保护精子线粒体超微结构的完整性, 来达到治疗弱精子症的目的。

关键词 石菖汤; 肾虚夹湿; 弱精子症; 线粒体膜蛋白 PHB; 超微结构; 激光扫描共聚焦显微镜

弱精子症是当前引起男性不育症的主要因素之一, 其发生多与泌尿生殖道感染、内分泌失调、精索静脉曲张^[1]、遗传等因素相关^[2], 药物治疗改善精液质量是提高患者配偶妊娠成功率的有效途径。临床研

究发现, 精子线粒体结构和功能均与男性不育症患者精子活力呈正相关性^[3,4], 在临床评估精子质量方面有一定应用价值, 部分学者还指出中医药在改善精液微观成分方面有良好的优势^[5]。因此, 本研究选取肾虚夹湿型弱精子症患者和生殖体检者为研究对象, 研究石菖汤对精子线粒体膜蛋白 PHB 和超微结构的影响, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 8 月 - 2018 年 6 月于福建中医药大学附属人民医院男科门诊就诊的肾虚夹湿型弱精子症患者(60 例)、生殖体检正常者(30 例)、生殖体检弱精子者(30 例)为研究对象。将生殖体检其中正常者纳入正常精液组(N 组, n=30), 其年

※基金项目 1. 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81403246); 2. 福建省卫生厅中医药科研课题资助(No. wzsyl201307); 3. 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, 副主任医师, 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。E-mail: 190078137@qq.com

• 作者单位 1. 福建中医药大学附属人民医院(福建 福州 350004); 2. 福建中医药大学(福建 福州 350004)

龄为 (37.36 ± 4.21) 岁, 体质量 (BWI) 为 $(24.78 \pm 1.57) \text{ kg/m}^2$ 检测为弱精子但暂未要求给予治疗者纳为弱精子组 (A 组, $n = 30$), 其年龄为 (37.18 ± 4.40) 岁, BWI 为 $(24.07 \pm 1.49) \text{ kg/m}^2$, 病史为 (2.11 ± 0.36) 年; 确诊为肾虚夹湿型弱精子症的 60 例患者作为石菖汤治疗组 (T 组, $n = 60$), 其年龄为 (37.89 ± 4.36) 岁, BWI 为 $(24.15 \pm 1.60) \text{ kg/m}^2$, 病史为 (2.09 ± 0.38) 年。三组患者在年龄、体质量 (BWI) 等一般资料对比上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), A 组、T 组在男性不育病史对比上差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 纳入标准 ①已婚或有固定性伴侣且共同生活 12 个月以上, 性生活中未采取任何避孕措施而女方未受孕者; ②西医诊断标准参考《实用量科学》及文献^[6,7]中弱精子症相关诊断标准, 中医诊断标准参考《中药新药临床研究指导原则》^[8]中肾虚夹湿型弱精子症相关诊断标准者; ③20 岁 ~ 50 岁的男性; ④临床资料完整者; ⑤参与研究经我院医学伦理委员会批准者; ⑥自愿签署知情同意书者。

1.3 排除标准 ①合并先天性生殖系统发育不良或畸形、严重器质性疾病、自身免疫性疾病、生殖道感染疾病、内分泌疾病、代谢性疾病、重要脏器功能不全者; ②合并恶性肿瘤者; ③合并精神疾病、意识障碍者; ④拒绝参与本次研究者; ⑤研究入组前 90d 使用影响性腺功能、睾丸生精功能的药物者; ⑥配偶或固定性伴侣确诊为妇科不孕症者; ⑦过敏体质或相关治疗禁忌证者; ⑧治疗依从性不足者。

1.4 方法

1.4.1 治疗方法 A 组主要予以健康宣教, 暂未接受相关药物治疗措施; T 组给予石菖汤: 菖蒲、石菖蒲、菟丝子、枸杞子各 20g, 黄芪 30g, 黄精、女贞子、连翘、墨旱莲各 15g, 五味子、怀牛膝、覆盆子各 10g, 由我院全成分智能中药房配制为中药配方颗粒剂, 每日 1 剂, 分早晚两次冲服, 持续 16 周。

1.4.2 精液采集方法 三组受试者均自行采集精液, 禁欲 7d 后在取精室内经手淫方式获取全部精液并置入统一配发的一次性带盖取精杯内; 三组中 A 组及 N 组受试者入组时完成精液的采集工作, T 组患者口服石菖汤 16 周后, 按上述方法采集精液。

1.4.3 检测方法

1.4.3.1 精液质量检测 将采集的精子静置于 37℃ 恒温水浴箱中使之液化, 记录精液量; 精子密度、精子

(a + b) 级活动力、精子成活率等精子质量指标由男科实验室采用徐州北斗科贸公司生产的 BD - 8000G 型计算机彩色精液分析仪 (CASA) 进行分析。

1.4.3.2 精子线粒体膜蛋白 PHB 表达的荧光检测 将一部分调整后细胞密度约为 $10 \times 10^6/\text{L}$ 的精子悬液, 重悬于精子细胞 BWW 培养液中, 在培养箱中处理 45min 之后彻底洗净精子细胞用于线粒体荧光检测试验。加入配置好的 37℃ 预温的 Mito - Tracker 染色液共孵育 15min。洗涤去除 MitoTracker 染色液, 加入 37℃ 预温的精子细胞 BWW 培养液。取干净载玻片上加 5 μl 经 MitoTracker 染色后的精子悬液, 取四角垫着适量凡士林的清洁盖玻片压片, 使精子细胞尽量集中在盖玻片中心区域且无挤靠, 用羊毛脂密封住盖玻片和载玻片接触边缘, 室温下晾干, 置于暗处待测, 在波长 561nm 激光 LSCM 下观察红色荧光并拍照。照片用 Leica 图像分析软件处理, 比较荧光强度情况, 分析精子线粒体膜蛋白 PHB 表达的强弱。

1.4.3.3 精子线粒体超微结构检测 参照文献^[3]将三组精液标本移入细胞培养管, 3000 r/min 离心 10min。弃上清液, 将沉淀物用 2.5% 戊二醛固定, Epon812 环氧树脂包埋, 半薄切片, 甲苯胺蓝染色, 光镜定位后超薄切片, 用透射电子显微镜 (Hu - 12A, 日本日立公司) 重点观察精子中段线粒体的改变情况并拍片。正常线粒体大小标准: 精子线粒体直径大小为 0.5 ~ 1.0 μm , 呈椭圆形细胞器。排列规则, 线粒体嵴可见, 头尾连接紧密正常^[9]。

1.5 主要观察指标 观察比较三组受试者精子质量指标 [精液量、精子密度、精子 (a + b) 级活动力、精子成活率]、精子细胞线粒体膜蛋白 PHB 荧光强度、阳性细胞比例以及精子细胞线粒体超微结构的变化。

1.6 统计学方法 应用统计学软件 SPSS19.0 分析数据, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 t 检验, 计数资料以百分率表示, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精子质量指标比较分析 三组受试者除精液量比较无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, N 组受试者精子密度、精子 (a + b) 级活动力及精子成活率均明显高于 A、T 两组, 且 T 组上述指标检测结果明显高于 A 组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三组精子质量指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例	精液量(ml)	精子密度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子活力 (a+b) 分级(%)	精子活率 (%)
N 组	30	2.60 \pm 0.54	44.37 \pm 6.07 [▲]	55.86 \pm 3.55 [▲]	78.42 \pm 3.72 [▲]
A 组	30	2.56 \pm 0.55	15.23 \pm 2.82 ^{△△}	33.18 \pm 2.62 ^{△△}	53.18 \pm 2.51 ^{△△}
T 组	60	2.58 \pm 0.53	22.73 \pm 2.95 ^{△▲}	49.26 \pm 3.31 [▲]	73.35 \pm 3.37 [▲]

注:与 N 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与 A 组比较, [▲] $P < 0.05$

2.2 三组精子线粒体功能评估分析 经 MitoTracker 荧光探针(图中为红色荧光)检测显示,N 组精子染色可见棒状精子中段结构(见图 1 - N 组),T 组可见较

短或屈曲的精子中段结构(见图 1 - T 组),A 组可见变形的精子中段结构(见图 1 - A 组);A、T 组精子荧光强度明显弱于 N 组。见图 1。

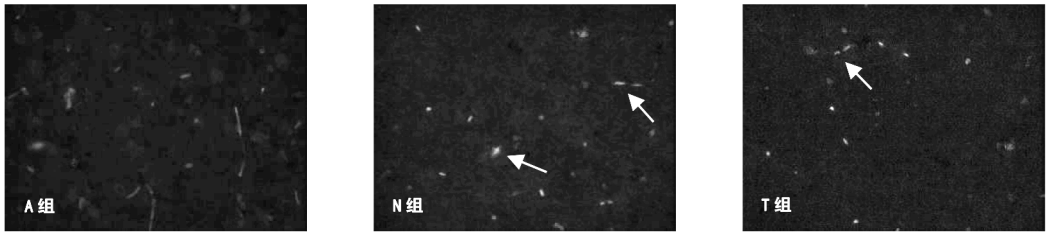


图 1 三组患者精子线粒体膜蛋白 PHB 表达情况(激光波长 561nm 观察红色荧光)

通过图像标记计数,计算精子线粒体膜蛋白 PHB 阳性细胞比例。N 组受试者精子线粒体膜蛋白 PHB 阳性细胞比例明显高于 A、T 两组,且 T 组高于 A 组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 三组精子线粒体膜蛋白 PHB 阳性细胞比例比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例	PHB 阳性细胞在线粒体膜蛋白中的比例(%)	红色荧光强度
N 组	30	58.16 \pm 3.36	4827.00 \pm 537.32
A 组	30	16.18 \pm 2.98 ^{△△}	2164.47 \pm 415.71 ^{△△}
T 组	60	41.66 \pm 3.23 ^{△▲}	3387.62 \pm 671.68 ^{△▲}

注:与 N 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与 A 组比较, [▲] $P < 0.05$

2.3 精子细胞线粒体超微结构的变化 经透射电镜对三组精子线粒体超微结构的观察发现 N 组精子线粒体鞘完整,轴丝及微管结构清晰。A 组精子呈现空泡状,线粒体肿胀、大小不一,轴丝出现明显断裂,微管缺失。T 组精子精子线粒体肿胀明显减轻、线粒体鞘基本完整、轴丝微管结构较完整。见图 2。

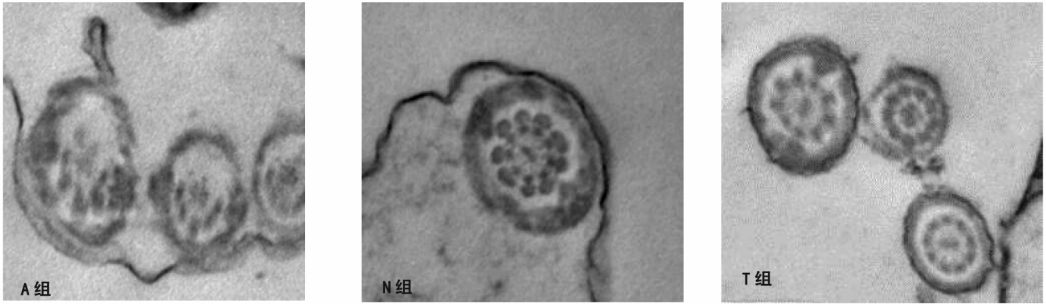


图 2 三组患者精子线粒体超微结构变化情况

3 讨论

据不完全统计,男性不育症已成为影响社会新生人口增长的主要因素之一^[10],弱精子症作为目前男性不育的常见致病因素,其临床诊疗受到学者们

的广泛关注^[11]。

祖国医学将弱精子症纳入“无子”“无嗣”范畴,认为该疾病以肾精亏虚为本、湿阻精窍为标^[11],需以益气补肾、强精除湿为治法^[12],方可获得理想的治疗效果。石菖汤是福建省名中医张敏建教授应用多年的治疗男性不育症的经验方,具有益肾强精、通窍除

湿的功效,以利湿化浊的萆薢及化湿开窍、醒神益智的石菖蒲为君药,辅以补肾生精的黄精、墨旱莲、五味子、覆盆子、女贞子等臣药可共奏强精益肾、利湿化浊的功效。本研究也发现,予以石菖汤口服 16 周治疗的 T 组患者精子质量评估指标检测结果均明显优于未接受相关治疗的 A 组患者,同安琪等^[13]报道的系统评价结论基本一致,证实石菖汤对改善男性不育肾虚夹湿型弱精子症患者精子活力及质量、促进其病情转归等方面有积极作用。

精子线粒体是精细胞的重要细胞器,而精子线粒体膜蛋白 PHB 反映着精子线粒体的功能状态,是其敏感指标之一。因为精子线粒体同时介导精细胞的凋亡,主要表现为精子线粒体的膜蛋白 PHB 下降,逐步引起精子线粒体结构的变化,而出现功能异常,精子的运动能力下降。本研究显示,T 组经过石菖汤 16 周的治疗,运用 LSCM 以及透射电镜的检测观察发现,有明显增强精子线粒体膜蛋白 PHB 的作用(荧光强度增加);改善精子线粒体结构,趋于恢复至正常的精子结构和形态。

综上所述,石菖汤能够对精液质量尤其活率和活力方面有明显的治疗作用,其分子生物机制在于通过提高精子线粒体膜蛋白 PHB 表达来减弱精子细胞凋亡的发生,进而改变精子线粒体的超微结构,恢复和提高精子的运动能力,达到临床上运用石菖汤治疗肾虚夹湿型弱精子症的目的。

参考文献

- [1]陈俊汇,章咏裳.精索静脉曲张所致男性不育原因的研究进展[J].中国男科学杂志,2001,15(3):209-211.
- [2]高 轲.少、弱、畸精子症相关遗传基因研究进展[J].中华男科学杂志,2017,23(4):367-371.
- [3]王旭初,王国华.四子种玉胶囊对精子超微结构影响的观察[J].光明中医,2010,25(11):1998-2000.
- [4]杨 颖,凡 永,匡延平,等.精子线粒体膜电位与男性精液参数和体质量指数的相关性研究[J].中华生殖与避孕杂志,2017,37(4):268-271.
- [5]吴秀全.郭军教授治疗男方因素致胎停育经验[J].中医药学报,2017,45(2):111-112.
- [6]程宛钧,张敏建,史亚磊,等.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[J].中医药通报,2017,16(5):54-57.
- [7]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.
- [8]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.
- [9]孙中明,丁彩飞,颜志中,等.特发性弱精子症线粒体功能和超微结构研究[J].中华医学杂志,2007,87(18):1263-1265.
- [10]苗群英.汉中市不孕症患者病因调查分析[J].陕西医学杂志,2016,45(8):1094-1096.
- [11]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].中国中西医结合杂志,2015,35(9):1034-1038.
- [12]海艺贝,梁沛华.少弱精子症的中医药治疗思路[J].中国性科学,2017,26(1):80-83.
- [13]安 琪,邹 练.生精类中成药治疗男性少、弱精子症的 Network Meta 分析和系统评价[J].生殖与避孕,2016,36(1):42-48+74.

(收稿日期:2018-12-10)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第 28 页)

3 总结与讨论

医学人才的教育培养模式是一个国家中医药发展的重要因素。中泰医学在人才教育培养制度上既存在相似之处,又有各自的特色。中泰医学的教育体系处于不断完善阶段,紧跟着世界中医药文化改革创新步伐。在学制上,中国教育分大专、本科、硕士、博士、博士后各个层次的培养,每个层次的培养时间不一,而泰国的医学最低学历为本科,其中有些院校需要在专业课学习基础上,先进行汉语的学习。在技能与理论的

学习运用中,中泰两国的培养均重视技能实践的培养,两者均根据本国的实际情况制定相应的理论学习与技能培训的时间安排。在教学模式上,两国均重视与国际的交流,注重双语教学等。随着中医药文化的全球化,我们应该积极推动医学人才培养制度的对外交流,使传统中泰医学与世界传统医学更好地结合在一起,共同发展,积极培养出一批又一批卓越的医学人才。

参考文献

- [1]郭宇航,方显明,蒋基昌,等.泰国中医药发展

- 历史现状调查及思考[J].东南亚纵横,2009,30(3):56-58.
- [2]白 杨,王 红.中泰中医推拿教育学比较[J].环球中医药,2009,2(6):464-466.
- [3]武君颖.关于创新中医教学方法的研究及思考[J].科技创新导报,2015,12(25):212-213.
- [4]刘江亭,李慧芬,李振阳,等.简析中医药人才培养中教学模式发展现状及趋势[J].中国高等医学教育,2013,26(11):47-48.
- [5]缪 薇,殷 梅,韩剑虹,等.泰国医学学生培养制度对我国医学学生教育的启发[J].科技创新导报,2015,12(3):156-157.

(收稿日期:2018-07-04)

(本文编辑:蒋艺芬)