

· 临床研究 ·

养精颗粒对男性不育患者精子质量
及精浆 miR-424 表达的影响[※]王志强¹ 朱 晨¹ 王 海¹ 陕文生¹ 孙大林² 金保方^{2▲}

摘 要 **目的:**探讨中药养精颗粒对男性不育患者精液质量及精浆微小核糖核酸 424(miR-424)水平变化的影响。**方法:**将 90 例特发性少弱精子症患者随机分为对照组和治疗组各 45 例,对照组口服天然维生素 E 胶囊,治疗组口服养精颗粒,两组均治疗 3 个月。观察两组治疗前后精液量、精子浓度、精子前向活力、精子 DNA 碎片指数(DFI)及精浆 miR-424 水平变化情况。**结果:**与治疗前相比,治疗后对照组精子前向运动力及治疗组精液量、精子浓度、精子前向活力、精浆 miR-424 水平显著升高,治疗组 DFI 明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),且治疗组精液量、精子浓度、精子前向活力、精浆 miR-424 水平高于对照组,DFI 低于对照组($P<0.05$)。**结论:**养精颗粒能提高不育患者的精液量、精子浓度、活力,降低精子 DFI 值,其对精子质量的影响可能与调节精浆 miR-424 水平有关。

关键词 养精颗粒;不育症;精子质量;微小核糖核酸 424

不孕不育是一个重要的生殖健康问题,男性因素是导致不孕症发生的一半原因。既往对于男性生育力的评估主要依据精液常规、形态等分析,近年来有学者提出,精子 DNA 碎片化可能会对精子受精潜力产生不利影响,特别是当 DNA 损伤水平很高时是男性因素引起不孕不育的重要病因^[1]。精子 DNA 完整性对于健康后代的出生是必不可少的,越来越多的证据表明,精子 DNA 碎片化是染色质受损的标志物,在男性不育和生殖助孕中具有独立和显著的作用^[2]。目前精子 DNA 损伤多为经验性治疗,如抗氧化剂或抗感染的药物治疗,而补肾生精的中药在此方面可能有一定的疗效^[3]。相关研究^[4]发现,精浆 miR-424 参与了精子 DNA 损伤,这种 miRNA 的失调可以诱导精子发生 DNA 双链断裂。本研究的目的是观察养精颗粒对精子质量的影响及可能作用机制的探讨。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择 2022 年 1 月—2022 年 7 月在甘肃省妇幼保健院男科就诊的 90 例患者,采用随机数

字法分为对照组和治疗组各 45 例。对照组平均年龄(33.51 ± 3.82)岁,平均精子浓度(7.91 ± 2.53) $\times 10^6$ /mL,平均精子前向运动(19.51 ± 5.86)%。治疗组平均年龄(34.42 ± 4.11)岁,平均精子浓度(7.72 ± 2.41) $\times 10^6$ /mL,平均精子前向运动(20.05 ± 6.30)%。两组患者基础资料相比无统计学差异($P>0.05$)。本研究通过医院伦理委员会批准(批号:[2021]GSFY 伦理 04 号)。

1.2 诊断标准 参照 2010 年 WHO 的《人类精液检查与处理实验室手册》^[5],精子密度每毫升 <1500 万为少精子症,精子前向活力 $<32\%$ 为弱精子症。

1.3 纳入标准 (1)1 年以上未避孕、未育;(2)性生活规律;(3)精液分析至少进行两次,检查前需要禁欲 2~7 d,符合少、弱精子症诊断标准;(4)配偶生育力基本正常;(5)患者签署知情同意书。

1.4 排除标准 (1)有隐睾史或患有睾丸炎者;(2)吸烟、酗酒或药物滥用,或最近 3 个月接受生育激素治疗的患者;(3)合并其他可能影响精子质量因素的患者,如肥胖、白细胞精子症、放化疗、核型异常或暴露于促性腺毒素的患者。

1.5 脱落标准 (1)受试者依从性差,不能坚持治疗者;(2)未按规定服药,无法判定疗效,或资料不全等影响疗效判定者。

1.6 治疗方法

1.6.1 对照组 予天然维生素 E 胶囊(浙江新昌制

※基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81874472)

▲通讯作者 金保方,男,主任医师。主要从事中西医结合治疗男科疾病及生殖医学研究。E-mail:hexiking@126.com

• 作者单位 1.甘肃省妇幼保健院(甘肃 兰州 730050);2.东南大学附属中大医院(江苏 南京 210029)

药厂,国药准字 H33020187)口服,100 mg/次,3次/日。
1.6.2 治疗组 口服养精颗粒(组成:熟地黄 10 g,黄精 10 g,炙黄芪 20 g,当归 10 g,煅牡蛎 20 g,王不留行 10 g,荔枝核 10 g,淫羊藿 15 g,紫河车 10 g,沙苑子 10 g,炙水蛭 10 g),由甘肃省妇幼保健院中药房提供,水煎服,2次/日,200 mL/次,饭后 30 min 服用。

两组患者的治疗周期均为 3 个月。

1.7 观察指标 于治疗前、治疗后进行观察。

1.7.1 精子质量 (1)精液常规:患者禁欲 2~7 d,手淫取精,35℃恒温箱静置 30 min 或待液化后,以北京德加精子检测系统 CASAS-QH-Ⅲ 进行精液参数分析,采用 WHO 第 5 版推荐标准,测定精液常规参数。(2)精子 DNA 碎片指数(DFI):使用精子染色质结构分析法测量精子 DNA 损伤。该方法可以测量精子核 DNA 对原位酸诱导的 DNA 变性的敏感性。将先前冷冻于-80℃冰箱中的含有 1×10^6 精子的精液样品解冻,立即用含有 0.1% Triton X-100,0.15 mol/L 氯化钠和 0.08 mol/L 盐酸的洗涤剂溶液(pH 1.2)处理。30 s 后,精子用含 6 mg/mL 吖啶橙(AO)的染色溶液在磷酸盐(pH 6)缓冲液中进行染色。BD 流式细胞仪(Becton, Dickinson 生物公司)用于分析染色细胞。对于每次测量,不低于 5000 个精子的荧光信号,用 488 nm 的光源激发细胞,导致吖啶橙插入产生绿色荧光的双链

DNA,同时插入单链(变性)DNA。使用标准的贝克顿·迪金森软件,将每个精子的红色和绿色荧光坐标的强度值的原始数据绘制在一个散点图上。染色质结构异常的精子的百分比用 DFI(%)表示。

1.7.2 精浆 miR-424 水平 用离心机 3000 r/min 离心精液 8 min,再提取精浆上清液,在-20℃的冰箱中低温保存;采用 RT-qPCR 法检测精浆 miR-424,采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算 miR-424 的相对表达含量。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 *t* 检验,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;计数资料用 χ^2 检验,采用百分比表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脱落情况 研究过程中两组均未出现脱落情况。

2.2 两组患者精子质量比较 治疗后,对照组精子前向运动力与治疗前相比显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),精液量、精子浓度、DFI 与治疗前相比,无显著改善($P > 0.05$)。治疗组治疗后精液量、精子浓度、精子前向活力与治疗前相比显著升高,DFI 明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且精液量、精子浓度、精子前向活力高于对照组,DFI 低于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者治疗前后精子质量变化情况($\bar{x} \pm s$)

观察指标	对照组		治疗组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
精液量(mL)	2.15±0.57	2.21±0.61	2.35±0.64	3.22±0.85 [#]
精子浓度($\times 10^6$ /mL)	7.91±2.53	8.23±2.53	7.72±2.41	12.84±5.12 [#]
精子前向活力(%)	19.51±5.86	28.51±5.86 [*]	20.05±6.30	39.63±13.13 [#]
DFI(%)	36.62±2.68	30.17±2.03	37.35±3.01	14.46±4.57 [#]

注:与本组治疗前比较,^{*} $P < 0.05$;与对照组同期比较,[#] $P < 0.05$

2.3 两组患者精浆 miR-424 水平比较 治疗后,对照组精浆 miR-424 水平无明显变化($P > 0.05$),治疗组精浆 miR-424 水平显著升高($P < 0.05$)。治疗组治疗后的精浆 miR-424 水平高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者治疗前后精浆 miR-424 水平对比($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗后
对照组	1.09±0.19	1.19±0.24
治疗组	1.13±0.21	2.82±0.33 [#]

注:与本组治疗前比较,^{*} $P < 0.05$;与对照组同期比较,[#] $P < 0.05$

3 讨论

男性不育的原因主要是精子质量的异常,临床上常表现为精子数量减少(少精子症)、精子活力下降(弱精子症)、精子形态异常(畸形精子症)以及精子 DNA 碎片损伤。有学者提出精子 DNA 损伤与辅助生殖技术如宫内受精率、体外受精率、卵胞浆内单精子注射率和复发性妊娠丢失率呈负相关^[5],在评估体外受精-胚胎移植(IVF)成功率时,可将精子 DNA 损伤作为一个重要的参考指标,精子 DNA 损伤水平能预测辅助生殖助孕结局^[5]。因此,该技术可引进为实验

室常规检查,可以丰富精液功能相关特征的诊断。精子质量下降有几种原因,包括精索静脉曲张、生活方式、职业和环境毒物、衰老和感染,但仍有大约40%的男性不育患者的病因尚不明确^[6]。针对精子异常的药物治,目前临床主要包括抗感染、抗氧化、激素、营养治等^[7],但效果不满意,缺乏特效药物,因此广大学者积极探索一种合理有效的药物治疗方案,并研究其可能的作用机制。

中医学关于男性不育多从肾、脾论治,认为“肾藏精,主生殖”,肾精充盛促使“天癸”成熟,在男子则表现为“精气溢泻”,能和阴阳而有子,若肾精衰少,肾气不足则“无子”^[9]。因此,补肾填精药物治疗男性不育症历来为医家所重视,是改善精子质量的重要方法。近年来,随着与现代医学的交流日渐频繁,中医药在精子治方面也受到关注^[10-11]。张孝旭等^[12]研究发现,服用复方养精汤可以有效提高少弱精患者的精子质量,并改善患者的激素水平。

养精颗粒是由金保方教授的养精胶囊化裁而来,其理论来源于《黄帝内经》“肾藏精,主生殖”的思想,继承了“阳化气,阴成形”理论,由熟地黄、黄精、炙黄芪、当归、煅牡蛎、荔枝核、王不留行、淫羊藿、紫河车、沙苑子、炙水蛭等组成。方中淫羊藿可补肾助阳通脉,填精益髓;熟地黄具有补血、滋阴、益精之功,两药合用,既补肾阳,又补肾阴,共为君药。黄精具有补气养阴、填精益髓之效;沙苑子具有补肾固精、温阳补虚之功;黄芪、当归具有气血双补、强五脏、补肾气的作用;紫河车乃血肉有情之品,可加强补肾填精、益气养血之功,共为臣药。王不留行、炙水蛭具有活血通经脉之功;煅牡蛎可补肝肾之阴,固肾涩精;荔枝核入肝、肾经,具有温中理气之效,共为佐药。诸药共奏补肾益精养血,滋阴温阳之功效。

精子质量异常发病因素众多,其中遗传因素是重要的发病因素之一,且精子质量越差与遗传因素的相关性越大^[13],目前,miRNAs正被用作非侵入性诊断的生物标志物。miRNAs是单链非编码RNA分子,通过抑制或抑制翻译作为转录后基因沉默调节因子,在几种不同类型的男性不育症中,人们已经研究了miRNA调控的变化,因此已经确定了miRNA和靶点基因在精子发生过程中的生物学作用。精原细胞干细胞(SSCs)是精子发生和男性生育能力所必需的,Wang等^[14]研究认为miR-424调控SSCs的自我更新,功能分析显示,miR-424对SSCs的自我更新至关重要。Chen等^[15]研究发现,在不育男性中miR-424的下调可能通

过直接作用于靶基因位点Ddx3x,诱导生精细胞凋亡和精子DNA损伤,导致男性不育。这可能是养精颗粒改善精子质量异常的重要机制之一。

综上,本研究发现养精颗粒可以改善特发性少弱精子症患者的精液参数,降低精子DNA的损伤程度,调节精浆miR-424水平,说明该治疗方案是有效的。本研究也存在一定的局限性,如样本量较小、无安慰剂组等,以及缺乏养精颗粒通过调节精浆miR-424改善精子质量作用机制的基础实验研究,仍有待进一步深入探索。

参考文献

- [1] AGARWAL A, CHO C L, MAJZOUB A, et al. The society for translational medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility[J]. Transl Androl Urol, 2017, 6(Suppl 4): S720-S733.
- [2] BUI A D, SHARMA R, HENKEL R, et al. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility[J]. Andrologia, 2018, 50(8): e13012.
- [3] 申玉行, 陈广辉, 王广建, 等. 基于“肾藏精”理论运用补肾填精法治少弱精子症的研究进展[J]. 中国性科学, 2020, 29(4): 118-121.
- [4] ZHAO K, CHEN Y, YANG R, et al. MiR-424/322 is downregulated in the semen of patients with severe DNA damage and may regulate sperm DNA damage[J]. Reprod Fertil Dev, 2016, 28(10): 1598-1607.
- [5] HAO S L, NI F D, YANG W X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis[J]. Gene, 2019, 706: 201-210.
- [6] TOURNAYE H, KRAUSZ C, OATES R D. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017, 5(7): 544-553.
- [7] 刘双, 程东凯, 于洪君, 等. 氧化应激与男性不育相关性研究进展[J]. 中国性科学, 2021, 30(7): 37-40.
- [8] ZEQR AJ A, BEADINI S, BEADINI N, et al. Male infertility and sperm DNA fragmentation[J]. Open access Maced J Med Sci, 2018, 6(8): 1342-1345.
- [9] 王旭昀, 李曰庆. 补肾法治男性不育症探析[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(2): 289-290.
- [10] 徐元杰, 常德贵, 俞旭君, 等. 阳化气理论在弱精子症及精子DNA损伤中的临床研究[J]. 四川中医, 2021, 39(5): 130-134.
- [11] 李俊君, 董良, 谭琨, 等. 补肾活血法治改善精子DNA完整性损伤临床研究[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(8): 79-83.
- [12] 张孝旭, 陈小敏, 孙大林, 等. 复方养精汤治少弱精子症男性不育临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(5): 466-469.
- [13] KRAUSZ C, RIERA-ESCAMILLA A. Genetics of male infertility[J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(6): 369-384.
- [14] WANG Y, LI X, GONG X, et al. MicroRNA-322 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells through Rassf 8[J]. Int J Bio Sci, 2019, 15(4): 857-869.
- [15] CHE Q, WANG W, DUAN P, et al. Downregulation of miR-322 promotes apoptosis of GC-2 cell by targeting Ddx3x[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17(1): 1-9.

(收稿日期: 2022-09-26)

(本文编辑: 金冠羽)