

补肾中药有效成分金丝桃苷、淫羊藿苷对少精症患者精液冷冻保存效果的影响

崔媚婷, 黄菁宇, 陈娟, 刘凯鲁, 刘承勇, 聂晓伟*

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的:了解常用补肾中药菟丝子和淫羊藿的有效成分金丝桃苷、淫羊藿苷两种中药单体在人冷冻保存精液过程中的应用效果及对氧化应激的影响,并筛选淫羊藿苷和金丝桃苷的最理想添加浓度。方法:选择在南京中医药大学附属医院生殖医学科就诊患者的正常精液 3 份,少精症精液 10 份。以人精液冷冻保护剂 TGG 基础液为对照组(Control)。在每毫升 TGG 基础液中,分别加入金丝桃苷 0.25、0.5、1.0 mg 及淫羊藿苷 0.5、1.0、2.0 mg 配置成含中药单体的精液冷冻保护剂,分别设为 H-1、H-2、H-3 组及 I-1、I-2、I-3 组。按照 1:1、1:2 和精液样本混合,进行冷冻保存然后快速解冻,检测冷冻前后的精子活力及氧化还原电位。结果:正常精液冷冻前总活率($70.67 \pm 5.13\%$),前向活动精子率($51.00 \pm 5.20\%$),解冻后对照组总活率($51.00 \pm 2.65\%$),前向活动精子率($39.00 \pm 1.73\%$);加入 0.5 mg/mL 金丝桃苷组,按照 1:1 比例混合效果最好,解冻后对照组总活率($65.67 \pm 5.86\%$),前向活动精子率($45.33 \pm 3.51\%$);加入 0.5 mg/mL 淫羊藿苷组,按照 1:1 比例混合效果次之,解冻后对照组总活率($63.67 \pm 5.8\%$),前向活动精子率($44.67 \pm 2.89\%$)。少精症患者冷冻前总活率($61.90 \pm 6.12\%$),前向活动精子率($43.20 \pm 5.98\%$),解冻后对照组总活率($51.00 \pm 2.65\%$),前向活动精子率($39.00 \pm 1.73\%$);加入 0.5 mg/mL 金丝桃苷组,按照 1:1 比例混合效果最好,解冻后对照组总活率($38.40 \pm 6.22\%$),前向活动精子率($25.40 \pm 5.03\%$);加入 0.5 mg/mL 淫羊藿苷组,按照 1:2 比例混合效果次之,解冻后对照组总活率($38.00 \pm 1.0\%$),前向活动精子率($27.00 \pm 3.6\%$)。与正常精液相比,少弱精氧化还原电位显著升高;少弱精加入金丝桃苷、淫羊藿苷冷冻保护液后,氧化还原电位显著降低。结论:淫羊藿苷、金丝桃苷可以在少精症患者精液冷冻保存过程中起到较好的保护作用,并可以有效保护氧化应激损伤。

关键词:金丝桃苷;淫羊藿苷;少精症;冷冻保存;氧化还原电位

中图分类号:R285.6;277.5 文献标识码:A DOI:10.19656/j.cnki.1002-2406.XXXXXX01

引用格式

崔媚婷,黄菁宇,陈娟,等.补肾中药有效成分对少精症患者精液冷冻保存效果的影响[J].中医药信息,XXXX,XX(X):1-6.

CUI M T, HUANG J Y, CHEN J, et al. Effect of active ingredients from chinese medicinal of tonifying kidney on semen cryopreservation in patients with oligospermia[J]. Information on TCM, XXXX, XX(X):1-6.

Effect of Active Ingredients from Chinese Medicinal of Tonifying Kidney on Semen Cryopreservation in Patients with Oligospermia

CUI Meiting, HUANG Jingyu, CHEN Juan, LIU Kailu, LIU Chengyong, NIE Xiaowei*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

基金项目:国家自然科学基金项目(81774357,82074479);江苏省青年医学人才资助项目(QNRC2016639);2019 年高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才科研项目(LGY2019070);江苏省中医院创新发展基金(Y2018CX40)

作者简介:崔媚婷(1994-),女,硕士研究生,主要研究方向:中西医结合妇科。

通讯作者:聂晓伟(1981-),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要研究方向:生殖医学临床和基础研究。

Abstract: Objective: To explore the effect of the active ingredients of hyperoside and icariin on semen cryopreservation and on oxidative stress, thus to screen the optimal supplemental concentration of hyperoside and icariin. Methods: 3 semen samples of normal people and 10 semen samples of oligospermatozoospermia were selected from the Department of Reproductive Medicine of Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine. The basal medium of cryoprotectant TGG for human semen cryopreservation was used as the control, to which were added hyperoside at the dose of 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1.0 mg/mL (H-1, H-2 and H-3) or icariin at the dose of 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL and 2.0 mg/mL (I-1, I-2 and I-3). The prepared cryoprotectants were added to the semen samples in the mix ratio of 1:1 or 1:2 for cryopreservation. The total motility (TM), progressive motility (PR), non-progressive motility (NP) and oxidation-reduction potential (ORP) of the sperms before freezing and after thawing were compared among different groups. Results: In the normal semen samples, TM and PR of sperm before freezing were $(70.67 \pm 5.13)\%$ and $(51.00 \pm 5.20)\%$, which were $(51.00 \pm 2.65)\%$ and $(39.00 \pm 1.73)\%$ after thawing in the control group; in the H-2 group, the best ratio was 1:1, under which condition TM was $(65.67 \pm 5.86)\%$ and PR was $(45.33 \pm 3.51)\%$ after thawing in the control group; which was followed by $(63.67 \pm 5.80)\%$ and $(44.67 \pm 2.89)\%$ in the I-1 group with the ratio of 1:1. In the semen samples from the oligozoospermia patients, TM and PR of sperm before freezing were $(61.90 \pm 6.12)\%$ and $(43.20 \pm 5.98)\%$, which were $(51.00 \pm 2.65)\%$ and $(39.00 \pm 1.73)\%$ after thawing in the control group; in the H-2 group, the best ratio was 1:1, under which condition TM was $(38.40 \pm 6.22)\%$ and PR was $(25.40 \pm 5.03)\%$ after thawing in the control group; which was followed by $(38.00 \pm 1.00)\%$ and $(27.00 \pm 3.60)\%$ in the I-1 at the ratio of 1:2 group. Compared to that in the normal semen, the ORP of oligosperm was significantly increased, which was decreased significantly after the intervention of cryopreservation solution of hyperin and icariin. Conclusion: Hyperoside and icariin can protect sperm in semen cryopreservation for infertile males with oligozoospermia, and it can effectively protect against oxidative stress injury.

Key words: Hyperoside; Icariin; Oligozoospermia; Cryopreservation; Oxidation-reduction potential

精液冷冻保存在我国主要应用于人类精子库以及生育能力的保存。自1949年Polge首先发现甘油能保护精子免受冷冻损伤以来,国内外研究者已经建立了相对成熟的精液冷冻保存体系。全国各生殖中心对人工精液冷冻保护剂的需求量很大,但国内市场上还没有自行开发的人类精液冷冻保护剂应用于临床。

近年来国内外对精子保护剂的研究主要集中于在原有成分的基础上,添加更多种类的“特殊”成分,如咖啡因、褪黑素、ATP、GSH、酶类、维生素、自由基清除剂Tempol、微量元素及泛素样小蛋白SUMO1等^[1-4]。笔者前期的研究结果已经证实对少弱精患者进行精液冷冻保存,可以获得尽可能多的处理后活动精子总数,并应用于宫腔内人工授精(IUI),可以减少患者的治疗费用,让不孕不育患者以最小的代价获得妊娠^[5]。而随着临床经验的积累,笔者发现某些商品化的人类精液冷冻保存系统只适合于人的正常精液,对少弱精的保存效果较差。目前国内外的研究热点主要集中于微量精子冷冻,对轻中度少弱精的冷冻保存研究甚少^[6]。近年来国内外对少弱精的新型冷冻保护剂研究包括水

溶性维生素E、左旋肉碱、神经生长因子等的添加^[7-9],而针对添加中药成分的效用研究还未见相关报道。

菟丝子和淫羊藿是中医男科领域补肾益精的常用中药,而金丝桃苷、淫羊藿苷分别是菟丝子和淫羊藿的主要有效成分。笔者前期研究结果证实在大鼠常用的精液冷冻保护液配方中添加菟丝子、淫羊藿水提液,可以提高解冻后精子活率指数^[10]。将菟丝子和淫羊藿的有效成分金丝桃苷、淫羊藿苷添加到大鼠精液冷冻保存体系中,可以有效改善大鼠精液冷冻保存效果^[11]。

氧化应激(oxidative stress, OS)是由过多的自由基在体内产生的一种负面作用,被认为是导致衰老和疾病的重要因素。氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)是用来反映水溶液中所有物质表现出来的宏观氧化-还原性。氧化还原电位越高,氧化性越强,电位越低,氧化性越弱。氧化还原电位是多种氧化物质与还原物质发生氧化还原反应的综合结果。这一指标虽然不能作为某种氧化物质与还原物质浓度的指标,但有助于了解水体的电化学特征,分析水体的性质,是一项综合性指标。ORP值是反映

生物体内氧化与抗氧化作用平衡状态的重要指标数值,也是反映机体内的氧化还原水平较为直接的指标。

本研究主要针对金丝桃苷、淫羊藿苷在人少弱精冷冻保存技术中的应用效果及对氧化应激的影响进行了初步探究。

1 材料与方法

1.1 一般资料与材料

1.1.1 精液标本

所有精液标本均来自南京中医药大学附属医院生殖医学科门诊精液常规检查。包括正常精液 3 份,少弱精 10 份。检测方法参考 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)要求,每份标本检测 3 次,数据取平均值作为最终结果。该研究通过南京中医药大学附属医院伦理委员会审批,并获得志愿者知情同意。

1.1.2 试剂与仪器

金丝桃苷(批号:110737-200415)、淫羊藿苷(批号:111521-201205)来自中国食品药品检定研究院,其余试剂均采购于 SIGMA 公司。计算机辅助精子质量自动分析系统(清华同方),精子计数板(Markler,以色列),RedoxSYS System 自由基快速检测分析仪(美国 Aytu BioScience)。

1.2 方法

1.2.1 冷冻保护液的配置

1000 mL 净化水中添加 CaCl_2 0.2 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 0.05 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 8.0 g, NaHCO_3 1.0 g, 右旋葡萄糖 1.0 g, 用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液调整 pH 值至 7.4, 配置成无菌台式溶液。在 40 mL 上述无菌台式溶液中加入 5 mL 浓度为 100 mg/mL 的人白蛋白, 0.9 g 葡萄糖和 5 mL 甘油, 配置成 TGG 基础液(WHO5 推荐少弱精专用冷冻保护剂), 然后使用 0.45 μm 的滤器过滤。在配置好的每毫升 TGG 基础液中, 分别加入金丝桃苷 0.25、0.5、1.0 mg, 淫羊藿苷 0.5、1.0、2.0 mg 配置成含中药单体的精液冷冻保护剂。

1.2.2 试验分组

本研究选择基础液(TGG)为对照组(Control), 添加金丝桃苷 0.25、0.5、1.0 mg 分别设置为 H-1、H-2、H-3 组, 添加淫羊藿苷 0.5、1.0、2.0 mg 分别设置为 I-1、I-2、I-3 组。各组精液冷冻保护液在配置完成后, 均用 0.22 μm 的滤器过滤后备用。待样本液化完全后, 分别将正常精液和少精症患者精液样本按照体积 1:1 和 1:2 加入到已添加冷冻保护剂的冷冻管中, 并混合均匀。正常组精液冷冻前浓度皆为 $(45.00 \pm 5.00) \times 10^6/\text{mL}$; 少精症 1:1 混合组冷冻前精液浓度为

$(12.30 \pm 2.06) \times 10^6/\text{mL}$; 1:2 混合组冷冻前精液浓度为 $(12.00 \pm 2.65) \times 10^6/\text{mL}$ 。

1.2.3 精液冷冻与解冻

精液样本与冷冻保检测方法均参考 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)要求, 每份标本检测 3 次, 数据取平均值作为最终结果。充分混匀保护剂后, 分别将冷冻管绑定于不同的冷冻支架上并放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱平衡 1 h, 取出后将冷冻支架置于装满液氮的自制容器上, 在距离液氮面 1 cm 处熏蒸 10 min, 随后转入冷冻罐保存 2 周, 2 周后取出液氮中的冷冻管, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中静置 10 min。

1.2.4 检测指标

分别在冷冻保护剂混合前、解冻后取样置于精子专用计数板(MAKLER 板)上, 用计算机辅助精子质量自动分析系统检测精子活力、活率、浓度等指标。检测方法参考 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)要求, 每份标本检测 3 次, 数据取平均值作为最终结果。

1.2.5 氧化还原电位的检测

精液解冻静置后, 用移液枪吸取 20~40 μL 的标本加入检测芯片的样品槽。开机, 按“Insert Sensor”提示将芯片传感器插入卡槽, 2 min 内加样至芯片传感器。样品槽有海绵吸样的功能, 样品通过芯片内的微型管路就可以到达参比电极, 从而开始进行样品的氧化还原反应检测。样品检测时间为 4 min, 检测结束读取数值。“Static ORP”为氧化应激自由基平衡值。每份标本检测 3 次, 读取平均值作为最终结果。

1.2.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 或率(%)表示; 计量资料中符合正态分布数据用 t 检验, 非正态分布数据采用非参数检验(Mann-Whitney U -test)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金丝桃苷、淫羊藿苷在正常精液冷冻保存中的作用

分别比较添加金丝桃苷、淫羊藿苷的冷冻保护剂在正常精液冷冻保存过程中的效果, 结果见表 1。按 1:1 比例混合的组中, H-2 和 I-1 组冷冻保存效果分别在添加不同浓度的金丝桃苷和淫羊藿苷中表现最好, 解冻后精子活率、前向活动精子百分率、非前向活动精子百分率均明显高于其他添加比例组($P < 0.05$)。在 1:2 混合比例组中, H-2 和 I-1 组冷冻保存效果分别在添加不同浓度的金丝桃苷和淫羊藿苷中表现最好, 解冻后精子活率、前向活动精子百分率显著

高于其他添加比例组($P < 0.05$)。Control、H-1、H-2、I-1 和 I-2 组中,金丝桃苷和淫羊藿苷在同一添加浓度下,1:1 和 1:2 的混合比例对比,解冻后的活率存在显著差异($P < 0.05$)。

表1 添加金丝桃苷、淫羊藿苷的冷冻保护剂对正常精液冷冻保存效果比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	混合比例	冷冻前			解冻后		
		总活率	前向运动精子率	非前向运动精子率	总活率	前向运动精子率	非前向运动精子率
对照组	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	51.00 ± 2.65 [△]	39.00 ± 1.73 [△]	12.67 ± 2.52 [△]
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	47.33 ± 2.08 ^{△*}	33.00 ± 1.73 [△]	14.33 ± 1.53
H-1	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	55.33 ± 0.58	39.67 ± 1.53	15.67 ± 1.15
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	51.67 ± 3.06 [*]	37.00 ± 3.61	14.67 ± 1.53
H-2	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	65.67 ± 5.86 [△]	45.33 ± 3.51 [△]	20.33 ± 3.06 [△]
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	57.33 ± 4.04 ^{△*}	43.33 ± 5.77 [△]	14.00 ± 1.73
H-3	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	54.33 ± 2.89	39.00 ± 3.61	15.33 ± 1.15
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	54.33 ± 3.21 [△]	42.00 ± 5.29	12.33 ± 2.08
I-1	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	63.67 ± 5.86 [△]	44.67 ± 2.89 [△]	19.00 ± 4.58 [△]
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	55.00 ± 4.36 ^{△*}	41.33 ± 5.77 [△]	13.67 ± 1.53
I-2	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	54.00 ± 1.73	39.67 ± 1.53	14.33 ± 2.52
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	50.00 ± 1.00 [*]	37.67 ± 2.52	12.33 ± 2.08
I-3	1:1	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	48.67 ± 0.58	36.67 ± 3.21	12.00 ± 2.65
	1:2	70.67 ± 5.13	51.00 ± 5.20	19.67 ± 3.79	47.00 ± 1.73	36.33 ± 3.06	10.67 ± 2.19

注:“△”表示不同组之间比较有显著性差异($P < 0.05$);“*”表示同组内不同混合比例比较有显著性差异($P < 0.05$)。H-1、H-3、H-3 分别为添加金丝桃苷 0.25、0.5、1.0 mg/mL;I-1、I-2、I-3 分别为添加淫羊藿苷 0.5、1.0、2.0 mg/mL。

2.2 金丝桃苷、淫羊藿苷在少弱精患者精液冷冻保存中的作用

分别比较添加金丝桃苷、淫羊藿苷的冷冻保护剂对少弱精患者精液冷冻保存的效果,结果如表 2 所示。在 1:1 混合比例组中,H-2 和 I-1 组冷冻保存效果分别在添加不同浓度的金丝桃苷和淫羊藿苷中效果最好,解冻后精子活率、前向活动精子百分率、非前向活动精子百分率均显著高于其他添加比

例组($P < 0.05$)。在 1:2 混合比例组中,H-2 和 I-1 组冷冻保存效果分别在添加不同浓度的金丝桃苷和淫羊藿苷中表现最好,解冻后精子活率、前向活动精子百分率高于其他添加比例组,但差异并不显著($P > 0.05$)。H-2、H-3、I-1 和 I-3 组中,淫羊藿苷和金丝桃苷在同一添加浓度下,1:1 与 1:2 的混合比例相比较,解冻后的活率存在显著差异($P < 0.05$)。

表2 添加金丝桃苷、淫羊藿苷的冷冻保护剂对少精症精液冷冻保存效果比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	混合比例	冷冻前			解冻后		
		总活率	前向运动精子率	非前向运动精子率	总活率	前向运动精子率	非前向运动精子率
对照组	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	29.60 ± 4.14 [△]	19.60 ± 3.75 [△]	10.00 ± 2.40 [△]
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	28.00 ± 3.46	19.67 ± 3.21	8.33 ± 0.58
H-1	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	33.90 ± 4.61 [△]	23.30 ± 4.08	11.60 ± 2.88
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	33.33 ± 1.53	24.67 ± 3.06	8.67 ± 2.08
H-2	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	38.40 ± 6.22 [△]	25.40 ± 5.03 [△]	13.00 ± 2.83 [△]
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	34.67 ± 7.57 [*]	24.00 ± .21	10.67 ± 1.15
H-3	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	35.60 ± 5.42 [△]	24.60 ± 4.81 [△]	11.00 ± 2.36
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	32.00 ± 7.00 [*]	24.33 ± 6.43	7.67 ± 0.58
I-1	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	36.50 ± 4.28 [△]	25.50 ± 4.20 [△]	11.00 ± 1.94
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	38.00 ± 1.00 [*]	27.00 ± 3.61	11.00 ± 3.00
I-2	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	33.00 ± 4.08	23.10 ± 3.87	9.90 ± 2.47
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	33.33 ± 1.53	24.00 ± 4.00	9.33 ± 3.21
I-3	1:1	61.90 ± 6.12	43.20 ± 5.98	18.70 ± 5.93	27.90 ± 4.20	19.20 ± 4.34	8.70 ± 1.89
	1:2	62.67 ± 2.52	47.67 ± 8.08	15.00 ± 8.19	22.33 ± 10.69 [*]	24.67 ± 7.51	7.67 ± 3.21

注:“△”表示不同组之间比较有显著性差异($P < 0.05$);“*”表示同组内不同混合比例比较有显著性差异($P < 0.05$)。H-1、H-3、H-3 分别为添加金丝桃苷 0.25、0.5、1.0 mg/mL;I-1、I-2、I-3 分别为添加淫羊藿苷 0.5、1.0、2.0 mg/mL。

2.3 金丝桃苷、淫羊藿苷在保护精液氧化还原电位中的效果

与对照组相比,少弱精症患者的精液氧化还原电位显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与对照组相比,加入金丝桃苷、淫羊藿苷冷冻保护剂后的精液氧化还原电位显著降低($P < 0.05$)。见表3。

表3 少弱精冷冻前后氧化还原电位比较($\bar{x} \pm s$)

组别	氧化还原电位
对照组	$39.92 \pm 7.58^{\Delta}$
少弱精组(冷冻前)	$83.74 \pm 26.54^{\Delta}$
少弱精组(解冻后)	$29.02 \pm 12.39^{\Delta}$

注:“ Δ ”表示不同组之间比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

冷冻后的精子能够刺激精液产生过量的活性氧(ROS)、并且精液(浆)的总抗氧化能力会被削弱,从而使精子处于氧化应激状态,因此损伤了精子的功能^[12]。作为体内重要的非酶类抗氧化剂,维生素E和左旋肉碱(L-carnitine)可以对抗ROS对精子质膜的氧化损伤,起到稳定保护精子细胞结构及活力的作用。添加一定浓度水溶性维生素E或左旋肉碱的精液冷冻保护液,可以减少精子冻融过程中产生的过量ROS,并减轻ROS对精子质膜的氧化应激损伤,提高冻融后的精子活力^[8,13]。

众多临床研究表明,中医药在治疗少弱精症中有一定疗效,可以明显改善患者精子质量。研究发现菟丝子的水煎剂能明显促进人精子的运动功能和膜功能,可能在治疗男性不育中有益,并可能有助于提高人工授精的成功率^[14]。研究发现,在猪和牛颗粒冻精研究中,中药提取液在冷冻-解冻过程中可以有效保护精子,提高精子的生存质量和受精潜能;研究表明,淫羊藿、菟丝子等中药本身含有的各种化学物质相互协同,可能改变了精子细胞膜中磷脂和胆固醇的含量或比例,通过溶解磷脂而使精子膜具有一定的流动性,尽可能地保护膜脂的有效性,从而改善精子细胞的通透性,防止冷冻时精子遭受的低温损伤^[15]。金丝桃苷、淫羊藿苷分别作为补肾中药菟丝子和淫羊藿的有效成分,均具有抗氧化功能。

本研究结果显示:在正常精液冷冻保存过程中,添加0.5 mg/mL 金丝桃苷的冷冻保护剂解冻后活率最高,添加0.5 mg/mL 淫羊藿苷的冷冻保护剂解冻后活率次之。与1:2混合比例冷冻相比,精液和冷冻保护剂解冻后按1:1比例混合效果较好。在少弱精冷冻保存过程中,添加0.5 mg/mL 金丝桃苷的冷冻保护剂和添加0.5 mg/mL 淫羊藿苷的冷冻保护剂解冻后活率最

好,精液和冷冻保护剂按1:1比例混合较1:2的混合比例冷冻效果好。在TGG冷冻保护剂中添加0.5 mg/mL 金丝桃苷,精液和冷冻保护剂按1:1比例混合后,应用快速冷冻和快速解冻法,可以有效地提高少精症患者精液冷冻保存效果。

ORP值是反应生物体内氧化与抗氧化作用平衡状态的重要指标,可用于评估临床疾病的严重程度,目前的证据已经证实了ORP与卒中、关节炎、肝病、肾病、心血管疾病等疾病的密切关系。一项研究显示,男性不育患者中有80%ROS水平显著升高。ROS水平对精子的生理功能起着关键作用,精浆中高水平的ROS能诱导氧化应激,进而降低精子活力、活率、受精潜能及增加DNA碎片率(DFI)。因此高水平的ROS是男性不育的独立危险因素^[16]。2016年,美国ASHOK AGARWAL教授首次创新性的应用Aytu MiOXSYS体外诊断精液分析仪,完整准确评估了由于氧化应激造成的DNA损伤,证实了ORP与精子活率和形态学的相关性,证明ORP是一种评价精液氧化应激状态的可靠有效指标^[17-18]。本研究证明,在常用的基础精液冷冻保护剂中按一定比例添加金丝桃苷、淫羊藿苷,可以有效改善精液氧化应激状态,降低氧化应激损伤,对精子有较好的保护作用。

该研究首次在常用的基础精液冷冻保护剂中添加了中药单体金丝桃苷和淫羊藿苷,并筛选了中药单体与基础精液冷冻保护剂的最佳配比关系,配合快速冷冻和快速解冻方法,可以有效地改善少精症精液冷冻保存效果,为少弱精症冷冻后精子质量下降提供了潜在的解决方案。今后将进一步研究含有中药单体的冷冻液对冷冻后精子迁移能力、DNA碎片、ROS浓度、MDA浓度的影响,以及其抗氧化保护作用机制。

参考文献:

[1] PARIZ J R, HALLAK J. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods[J]. Andrologia, 2016, 48(9): 1-6.

[2] KARIMFAR M H, NIAZVAND F, HAGHANI K, et al. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm[J]. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2015, 28(1): 69-76.

[3] ZAHRA B, LEILA A, MARZIYEH T, et al. Addition of Tempol in semen cryopreservation medium improves the post-thaw sperm function[J]. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2014, 60(4): 245-250.

[4] MARCHIANI S, TAMBURRINO L, RICCI B, et al. SUMO1 in human sperm: new targets, role in motility and morphology and relationship with DNA damage[J]. Reproduction (Cambridge, England), 2014, 148(5): 453-567.

- [5] 聂晓伟,钱云,刘承勇,等. 少弱精子冷冻保存在宫腔内人工授精中的应用[J]. 中华男科学杂志,2010,16(3):232-235.
- [6] SANCHEZÁ J, CANOCORRES R, FUENTESARDERIU X. A Complement for the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (first edition, 2010) [J]. EJIFCC, 2012, 23(3):167-176.
- [7] SAEID N, MARYAM S N, MOHAMMAD N, et al. Effect of Trolox on sperm quality in normozoospermia and oligozoospermia during cryopreservation[J]. Cryobiology, 2016, 72(2):106-111.
- [8] ZHANG W, LI F, CAO H F, et al. Protective effects of l-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation[J]. Zygote, 2016, 24(2):293-300.
- [9] SAEEDNIA S, BAHADORAN H, AMIDI F, et al. Nerve growth factor in human semen: effect of nerve growth factor on the normozoospermic men during cryopreservation process. [J]. Iranian journal of basic medical sciences, 2015, 18(3):292-299.
- [10] 聂晓伟,谈勇,徐福松,等. 中药提取液在大鼠附睾精子冷冻保存中的应用效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3):145-147.
- [11] 盛文洁,聂晓伟,谈勇,等. 金丝桃苷、淫羊藿苷在大鼠附睾精子冷冻保存中的作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(3):470-475.
- [12] WANG A W, ZHANG H, IKEMOTO I, et al. Loughlin. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation [J]. Urology, 1997, 49(6):921-925.
- [13] NEKOONAM S, NASHTAEI M S, NAJI M, et al. Effect of Trolox on sperm quality in normozoospermia and oligozoospermia during cryopreservation. [J]. Cryobiology, 2016, 72(2):106-111.
- [14] 彭守静,陆仁康,俞丽华,等. 菟丝子、仙茅、巴戟天对人精子体外运动和膜功能影响的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(3):145-147.
- [15] 郑红,李波,角建林,等. 中药在猪精液冷冻中的应用[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(3):57-59.
- [16] VALERIA M I, ELENA A, ALSSANDRA D R, et al. Ejaculate oxidative stress is related with sperm dna fragmentation and round cells [J]. International Journal of Endocrinology, 2015, 2015:321901.
- [17] AGARWAL A, SHARMA R, ROYCHOUDHURY S, et al. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma[J]. Fertility and sterility, 2016, 106(3):566-573.
- [18] AHMAD M, MOHAMAD A, MOHAMED M, et al. Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men [J]. Arab Journal of Urology, 2018, 16(1):87-95.

(收稿日期:2021-08-20)