

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.13.010

生精方对肾虚型少弱精子症不育患者精子印记基因 H19 表达的影响

连 方^{1*}, 孙金龙¹, 郭 亮², 孙振高¹, 吴海萃¹

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市文化西路 42 号, 250011; 2. 山东中医药大学临床医学院)

基金项目: 山东省自然科学基金高校、科研单位联合专项计划资助项目 (2009ZRB14036); 高等学校博士学科点专项科研基金联合资助项目 (20093731110006)

[摘要] 目的 观察生精方治疗肾虚型少弱精子症不育患者临床疗效及可能作用机制。方法 将 67 例少弱精子症不育患者随机分为治疗组 34 例和对照组 33 例, 治疗组给予生精方, 每日 1 剂; 对照组给予五子衍宗丸, 每次 6 g, 每日 2 次, 共治疗 12 周。于治疗前后检测患者精子印记基因 H19 的表达, 观察两组患者治疗前后肾虚证候评分、精液常规检查指标变化, 观察配偶临床妊娠率及不良反应。结果 治疗组治疗后印记基因 H19 丢失率明显降低 ($P < 0.05$); 两组患者治疗后肾虚证候评分、精子密度、(a+b) 级精子活力均明显改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 治疗后治疗组印记基因 H19 丢失率、肾虚证候评分、精子密度、(a+b) 级精子活力明显优于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。治疗组临床妊娠率为 55.88%, 对照组为 33.33%, 治疗组明显优于对照组 ($P < 0.05$)。结论 生精方可以改善少弱精子症不育患者的精液质量, 提高临床妊娠率, 其机制可能与改善精子印记基因 H19 的表达有关。

[关键词] 少弱精子症; 印记基因; 生精方; 肾虚证

基因组印记即遗传印记, 是指通过单亲传递某些遗传学性状的现象。正常情况下, 某些印记基因呈现亲源依赖性的单等位基因表达, 而另一等位基因不表达或表达极弱^[1]。人 H19 印记基因即属此类, 该基因定位于 11p15.5, 不具备表达蛋白质的功能, 只在 mRNA 水平上发挥作用, 具有调控精子成熟及其他基因表达的作用^[2]。本研究以精子印记基因 H19 为靶点观察生精方对男性少弱精子症不育患者的干预作用, 为进一步的临床和实验研究提供依据。

1 临床资料

1.1 一般资料

67 例男性少弱精子症不育患者均来自 2011 年 7 月至 2012 年 1 月山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心门诊, 采用随机数字表法分为治疗组 34 例、对照组 33 例。治疗组中继发不育者 7 例, 原发不育者 27 例; 年龄 24~43 岁, 平均

年龄 (32.12 ± 4.04) 岁; 平均肾虚证候评分 (16.62 ± 3.82) 分, 平均精子印记丢失率 14.71%, 平均精子密度 (9.85 ± 5.80) $10^6/\text{ml}$, 平均精子活动力 (a+b) 级 (25.88 ± 7.04)%, 平均正常精子形态率 (14.76 ± 2.97)%。对照组中继发不育者 8 例, 原发不育者 25 例; 年龄 26~45 岁, 平均年龄 (30.27 ± 5.46) 岁; 平均肾虚证候评分 (17.21 ± 3.47) 分, 平均精子印记丢失率 21.21%, 平均精子密度 (11.62 ± 6.50) $10^6/\text{ml}$, 平均精子活动力 (a+b) 级 (28.70 ± 8.06)%, 平均正常精子形态率 (14.70 ± 2.68)%。两组患者临床资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 诊断标准

男性不育症诊断标准参照《世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册》^[3], 性功能正常、未采取避孕措施 1 年以上女方未孕者, 即可诊断; 少弱精子症诊断标准^[4]: 取精液后 60 min 内, a 级精子活力 $< 25\%$ 或 (a+b) 级精子活力 $< 50\%$, 同时精子密度 $< 20 \times 10^6/\text{ml}$ 。

* 通讯作者: f_ljian@163.com, (0531)68617800

中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[5]拟定,肾虚型男性不育主症:不育,性欲淡漠,精液稀少,精子活动力低下;次症:腰膝酸软或腰膝酸痛,大便溏薄,夜尿频多或余淋不尽,舌淡苔薄白,脉沉细弱。以上主症“不育”必须具备,兼具其余各项中 1 项和次症中的 2 项,即可诊断。

1.3 纳入标准

符合上述诊断及辨证标准;男方精子质量密度在 $(10 \sim 20) \times 10^6/\text{ml}$,属轻度少、弱精子症患者;女方妇科检查无异常;自愿接受本试验方案。

1.4 排除标准

患子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征或卵巢储备功能低下者、患内膜疾病影响着床者;未能按期随访观察者。

2 方法

2.1 治疗方法

治疗组采用生精方治疗,每日 1 剂,治疗 6 天后停药 1 天,服用 12 周。生精方组成:枸杞子 15g,菟丝子 15g,桑椹 15g,车前子 15g,覆盆子 15g,熟地黄 15g,山药 12g,山萸肉 12g,茯苓 9g,泽泻 9g,牡丹皮 9g,杜仲 15g,断续 15g。对照组口服五子衍宗丸(北京同仁堂制药厂,批号:2030125),口服每次 6g,每日 2 次,共治疗 12 周。

2.2 观察指标及方法

中医证候评分^[5]:包括腰膝、四肢酸软(痛),性欲淡漠,夜尿频多或余淋不尽,阳痿遗精,精神萎靡疲惫,自汗或盗汗,健忘,每个症状根据严重程度依次分为。持续发作、影响日常生活者计 6 分,反复发作者计 4 分,偶有发作者计 2 分,无症状者计 0 分。各症状积分相加即为证候评分,于治疗前后各评分 1 次。

实验室观察指标:分别于服药开始前及治疗 12 周后,进行计算机辅助精液分析(CASA),并

行精子印记基因 H19 检查。治疗完成后观察配偶临床妊娠率。

不良反应:观察两组患者治疗前后血、尿、便常规及肝肾功能血清学指标检查。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本均数比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 两组患者治疗前后精子 H19 基因印记丢失率比较

H19 基因的 cDNA PCR 产物长度为 637 bp,经 RsaI 酶切后产物 452 bp 和 185 bp。生理状态下 H19 为单等位基因表达,酶切产物为 637 bp 或 452 bp 和 185 bp;电泳后如果 637 bp、452 bp 和 185 bp 同时存在,说明出现双等位基因表达,即发生了印记丢失。见图 1。表 1 示,治疗组治疗后 H19 基因印记丢失率较本组治疗前显著降低($P < 0.05$),并且亦明显低于对照组治疗后($P < 0.05$)。

表 1 两组少弱精子症不育患者治疗前后精子 H19 基因印记丢失率比较

组别	时间	例数	H19 基因印记丢失率(%)
治疗组	治疗前	34	(5/34) 14.71
	治疗后	34	(1/34) 2.94
对照组	治疗前	33	(7/33) 21.21
	治疗后	33	(6/33) 18.18

3.2 两组患者治疗前后肾虚证候评分及精液检查结果比较

表 2 示,治疗后两组患者肾虚证候评分、精子密度、(a+b)级活力精子均较本组治疗前明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);治疗后治疗组肾虚证候评分、精子密度、(a+b)级活力精子明显优于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。治疗组治疗后正常形态精子较治疗前降低($P < 0.05$)。

表 2 两组少弱精子症不育患者治疗前后肾虚证候评分及精液检查结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	肾虚证候评分(分)	精子密度($10^6/\text{ml}$)	a+b 级精子(%)	正常形态精子(%)
治疗组	治疗前	34	16.62 $\pm$ 3.82	9.85 $\pm$ 5.80	25.88 $\pm$ 7.04	14.76 $\pm$ 2.97
	治疗后	34	13.18 $\pm$ 1.36* $\Delta\Delta$	26.18 $\pm$ 9.05** $\Delta\Delta$	54.29 $\pm$ 6.30** Δ	13.09 $\pm$ 1.40*
对照组	治疗前	33	17.21 $\pm$ 3.47	11.62 $\pm$ 6.50	28.70 $\pm$ 8.06	14.70 $\pm$ 2.68
	治疗后	33	14.15 $\pm$ 1.33*	19.97 $\pm$ 5.93**	49.09 $\pm$ 10.38**	13.52 $\pm$ 1.81

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

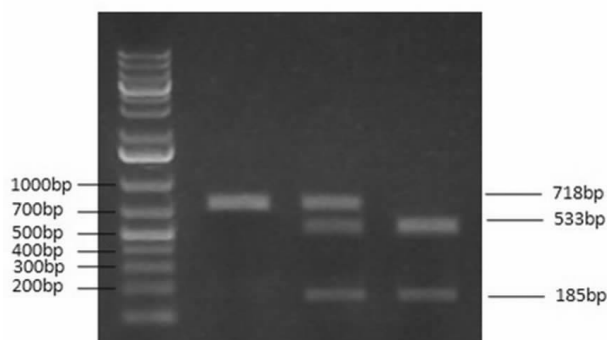


图 1 H19 基因印记丢失电泳图

M: DNAmaker; 1: 未切开; 2: 发生印记丢失; 3: 未发生印记丢失

3.3 两组患者配偶妊娠率的比较

治疗组 34 例, 妊娠 19 例, 妊娠率为 55.88%; 对照组 33 例, 妊娠 11 例, 妊娠率为 33.33%。治疗组效果明显优于对照组 ($P < 0.01$)。

3.4 不良反应

两组患者均未发现明显不良反应。

4 讨论

中医学认为不育症与肾脏的关系最为重要。肾藏精、主生殖而为先天之本。既为先天, 则必得自母体或者遗传, 这与表观遗传学的诸多内容是相通的。表观遗传学认为, 基因印记现象保证了基因的正常表达。如果某些异常因素的存在致使导致这些基因无法正常表达, 出现双等位基因表达或者不表达, 机体就会出现一系列的异常表现。人类胎儿的精原细胞中 H19 甲基化印迹是缺失的, 而成人精子发生的不同阶段却一直存在。这种特异性的 H19 差异性甲基化印迹是建立在增殖期精原细胞进入减数分裂之前^[6]。因此, 精子发生障碍可能与印迹异常有关, 精液中精子质量低可能与 H19 甲基化异常有相关性^[7]。这正与传统中医学“肾藏精, 主生殖”理论不谋而合, 因此推断印记基因 H19 应是肾主生殖的重要组成部分。

中医学所讲的生殖之精可以认为是由睾丸生成, 包括精子以及相关激素等物质。精子的生成依赖于肾阴的滋养和肾阳的温煦, 生精方中熟地黄、山药、山萸肉等滋补肾阴, 枸杞子等温补肾阳, 以求“阴中求阳、阳中求阴”, 全方调补气血、阴阳

互求。肾虚不育患者命门火衰, 肾精不足, 下焦虚寒, 命火温煦无力, 阳气无法鼓动, 气化无力, 致使精液生成受到阻碍, 精液稀少, 而生精方温补肾阳, 重塑命火的温煦之功, 同时滋补肾阴, 坚实精子生成的物质基础, 阴阳双补, 共同维护精子正常生成的生命活动。中医学认为, 肾中阳气不仅直接参与精子的生成, 还影响精子正常的运动活力。如肾阳虚衰, 阳气无法正常鼓动, 则精子的正常运输活动就会出现偏差和障碍, 生精方通过对肾中阳气的温煦作用, 直接提升了精子的运动能力。本研究发现, 肾虚患者的印记基因 H19 的表达出现异常, 通过补肾法改善患者的肾虚证候可直接改善印记基因 H19 的表达, 相应的精子密度和活力也有了明显的改善。以往也有文献研究, 补肾中药可能通过改善机体的活性氧水平以及精子 DNA 的完整性^[8]来改善印记基因 H19 的表达。

由于本实验的临床研究时间尚短, 缺乏大样本量的研究, 确切的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Swales AK, Spears N. Genomic imprinting and reproduction[J]. Reproduction, 2005, 130(4): 389-399.
- [2] 葛少钦, 李向阳, 李建忠, 等. DNA 甲基化在精子发生中的作用[J]. 生命的化学, 2012, 32(3): 221-227.
- [3] 李铮, 张忠平, 黄翼然, 等. 世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 3.
- [4] 谷栩群, 陈振文, 于和鸣, 等. 世界卫生组织人类精液及精子宫颈粘液相互作用实验室检验手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 29.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 385-390.
- [6] Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis[J]. Human Molecular Genetics, 2000, 9(14): 2183-2187.
- [7] 叶静, 龙霞, 张芳婷, 等. 印记基因 H19 在少弱精子中印记状态的检测[J]. 陕西医学杂志, 2005, 37(1): 47-49.
- [8] 连方, 孙金龙, 孙振高, 等. 补肾法改善精子质量提高体外受精、胚胎移植技术受精率的初步研究[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(4): 377-380.

Effects of *Shengjing Formula* (生精方) on the Expression of H19 Imprinted Gene in Infertile Patients Caused by Oligoasthenospermia With Kidney Deficiency Syndrome

LIAN Fang¹, SUN Jinlong¹, GUO Liang², SUN Zhengao¹, WU Haicui¹

(1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province 250011; 2. The Clinical Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effects and mechanism of *Shengjing Formula* (formula to improve the sperm production, 生精方) on infertile patients caused by oligoasthenospermia with kidney deficiency syndrome. **Methods** Totally 67 cases of infertility caused by oligoasthenospermia were randomized into the treatment group of 34 cases and control group of 33 cases. The treatment group was given *Shengjing Formula* (生精方) one dose daily. The control group was given *Wuzi Yanzong Pills* (五子衍宗丸) 6 g each time, twice daily. The treatment lasted for 3 months. The expression of H19 was detected before and after treatment. The syndrome scores, semen analysis results and adverse reactions were observed. The clinical pregnancy rates of spouses were evaluated. **Results** The loss rate of H19 was significantly improved in the treatment group after treatment ($P < 0.05$). The syndrome scores, sperm density and sperm motility (a+b class) were significantly improved in both groups after treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in the treatment group ($P < 0.05$). The clinical pregnancy rate in the treatment group and control group was 55.88% and 33.33% respectively, with a significant difference between groups ($P < 0.01$). **Conclusion** *Shengjing Formula* (生精方) can improve semen quality and clinical pregnancy rate possibly by improving the expression of H19 imprinted genes in human sperm.

Keywords oligoasthenospermia; imprinted gene; *Shengjing Formula* (生精方); kidney deficiency syndrome

(收稿日期: 2013-11-08; 修回日期: 2014-03-09)

[编辑: 洪涛]

当飞利肝宁胶囊临床应用及基础研究有奖征文活动通知

病毒性肝炎、药物性肝炎、脂肪肝等肝脏疾病严重威胁人们的身体健康,已成为当前重大公共卫生问题。消除传染性肝炎、防治肝损伤以及治疗肝病的合理用药,已经成为肝病防治领域的共同心声和行动。当飞利肝宁胶囊是由“肝炎草”当药与保肝药水飞蓟精炼组方而成的抗炎保肝中成药,具有保护肝细胞膜及线粒体,减轻肝细胞变性、坏死及炎症性反应,减轻肝脏脂质沉积,改善胰岛素抵抗及抗脂质过氧化作用。为了更好探索当飞利肝宁胶囊抗炎保肝作用机理及对各类肝损伤患者的有效影响,完善肝病防治方案,中华中医药学会内科肝胆病专业委员会、中医杂志社、中国脂肪肝防治与康复网将联合开展“开启新视野,成就肝健康”当飞利肝宁胶囊临床应用及基础研究有奖征文活动。具体要求如下。

一、征文内容: 1. 当飞利肝宁胶囊在抗炎保肝方面的临床应用、基础研究的论著、荟萃分析、合理用药方案研究等; 2. 当药的药学研究、生物学研究、文献研究及基础理论研究等。

二、论文要求: 1. 文章力求立题新颖、设计严格、数据完整,具有新颖性和指导性; 2. 内容具有严谨性和科学性,论点鲜明、论证充分、逻辑严谨,结果真实可靠; 3. 文章应符合学术期刊论文发表的要求,要求未公开发表及未在全国性会议上交流。

三、投稿方式: 文章以 word 格式发至邮箱: jtcmen@163.com。

四、征文截止日期: 2015 年 3 月 31 日。

五、评选规则: 所有论文由中华中医药学会内科肝胆病专业委员会和中医杂志社邀请相关专家组成评选委员会进行评选,结果将公布在《中医杂志》、《中西医结合肝病杂志》、《胃肠病学和肝病学杂志》及《中国脂肪肝防治与康复网》。

六、奖项设置: 特等奖 1 名,支持科研基金 20000 元; 一等奖 3 名,支持科研基金 10000 元; 二等奖 8 名,支持科研基金 8000 元; 三等奖 15 名,支持科研基金 5000 元; 纪念奖若干,支持科研基金 1000 元。特等奖论文将推荐在 SCI 期刊发表,一至三等奖符合发表要求论文将推荐发表在国内专业期刊上,优秀科研成果将邀请参加全国性学术大会报告及交流。