论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411259

左卡尼汀在男性不育患者精子DNA损伤中的保护作用

商学军[1],莫敦胜[2],詹绪新[3],蔡鸿财[4],葛京平[5],黄宇烽[1] [210002 南京,南京大学医学院附属金陵医院(南京军区南京总医院)男科[1],泌尿外科[5];545005 柳州,柳州市工人医院泌尿外科二病区[2];710004 西安,西安市第四医院生殖医学科[3];210002 南京,南方医科大学附属金陵医院男科[4]]

[**摘要**] **目的** 探讨左卡尼汀口服液在男性不育患者精子DNA损伤中的保护作用。**方法** 选择88例合并有精子DNA完整性异常[DNA碎片化指数(DNA fragmentation index,DFI)>15%]的不育症患者,分为左卡尼汀组44例和对照组44例:治疗组口服左卡尼汀口服溶液,1 g/次,3次/d;对照组服用五子衍宗丸,6 g/次,2次/d,共3个月。分别于治疗前及治疗3个月末,采用计算机辅助精子分析(computer-aided sperm analysis, CASA)系统与流式细胞术分别检测精液常规参数和DFI。使用SPSS 13.0统计软件对治疗前后各项精液参数及DFI进行数据分析。**结果** 治疗前2组精子浓度、精子总活率、前向运动精子百分比和DFI差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗3个月后,左卡尼汀组精子总活率[(47.28±17.65)%]与对照组[(33.82±14.33)%]及治疗前[(25.45±15.36)%]相比显著提高($P<0.01$);前向运动精子百分比[(35.13±13.24)%]较对照组[(25.42±11.34)%]及治疗前[(19.87±10.88)%]显著提高($P<0.01$);精子浓度[(30.74±15.51)×10^6/mL]较对照组[(24.46±15.36)×10^6/mL]及治疗前[(22.60±18.39)×10^6/mL]显著提高($P<0.05$);DFI[(13.57±5.89)%]较对照组[(20.34±5.28)%]及治疗前[(23.83±6.32)%]显著下降($P<0.05$)。对照组精液参数与治疗前相比有所改善,但差异均无显著性($P>0.05$)。**结论** 应用左卡尼汀口服液治疗男性不育可以显著改善精子活力与精子DNA完整性。

[**关键词**] 左卡尼汀;精子DNA碎片;精液参数

[**中图法分类号**] R698.2; R969.4; R977.22 [**文献标志码**] A

L-carnitine protects sperm DNA damage in male infertility

Shang Xuejun[1], Mo Dunsheng[2], Zhan Xuxin[3], Cai Hongcai[4], Ge Jingping[5], Huang Yufeng[1] ([1]Department of Andrology, [5]Department of Urology, Jinling Hospital, School of Medicine Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu Province, 210002; [2]Department of Urology, Liuzhou Workers' Hospital, Liuzhou, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 545005; [3]Department of Reproductive Medicine, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an, Shaanxi Province, 710004; [4]Department of Andrology, Jinling Hospital, Southern Medical University, Nanjing, Jiangsu Province, 210002, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of L-carnitine on the sperm DNA damage in the patients with male infertility. **Methods** Eighty-eight infertile men with abnormal sperm DNA integrity [DNA fragmentation index (DFI) > 15%] admitted in Jinling Hospital from September 2012 to April 2014 were recaited in this study, and then randomly divided into a treatment group (44 patients) treated orally with L-carnitine (1 g, tid) and a control group (44 patients) treated with Wuziyanzong bolus (6 g, bid), both for 3 months. Semen parameters were measured by computer assisted semen analysis (CASA) and sperm DFI was

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81370750);江苏省"六大人才高峰"项目(WS-076);2014年度南京军区南京总医院军事医学项目资助计划(YYZD2014004)

[**通信作者**] 葛京平,E-mail:gjp_doctor@aliyun.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150722.0904.002.html(2015-07-22)

detected by flow cytometry before and after treatment. **Results** There were no significant differences in the DFI, sperm concentration, percentage of total sperm motility and progressive motility between the 2 groups before treatment ($P>0.05$). After treatment for 3 months, remarkable improvement was observed in the percentage of total sperm motility in the treatment group [(47.28±17.65)%], compared with the control group [(33.82±14.33)%] and before treatment [(25.45±15.36)%, $P>0.01$]. The progressive motility was higher in the treatment group [(35.13±13.24)%] than in the control group [(25.42±11.34)%] and before treatment [(19.87±10.88)%, $P<0.01$]. The treatment group [(30.74±15.51)×10^6/mL] showed significant increase in the sperm concentration compared with the control group [(24.46±15.36)×10^6/mL] and before treatment [(22.60±18.39)×10^6/mL, $P<0.05$]. The sperm DFI was significantly decreased in the treatment group [(13.57±5.89)%] compared with the control group [(20.34±5.28)%] and before treatment [(23.83±6.32)%, $P<0.05$]. After treatment, the above parameters had no significant changes in the control group ($P>0.05$). **Conclusion** L-carnitine may effectively improve the sperm motility and sperm DNA integrity in the patients with male infertility.

[**Key words**] L-carnitine; sperm DNA fragmentation; sperm parameters

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81370750), the "Six-Talent Peak" Project of Jiangsu Province (WS-076) and the Project of Military Medicine From Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command (YYZD2014004). Corresponding author: Ge Jingping, E-mail: gjp_doctor@aliyun.com

不育症是一个世界性的医学问题,男性不育症相关的病因有诸多方面,临床上主要依靠精液常规参数来评估男性生育力,可以大致反映精子质量。但是,精液常规参数容易受各种因素的干扰,并不能很好地预测精子受精能力和妊娠结局,约有15%的男性不育患者精液检查结果是正常的。近年,精子DNA碎片成为男性不育症领域研究的热点,被认为是评价精液质量和预测生育能力的新指标。研究表明,精子DNA损伤率>30%,可以严重影响自然生育,即使对严重少、弱精子症患者采用卵细胞质内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)治疗,也无法改善因精子DNA损伤造成的不良生育结局[1]。精子DNA完整性异常可导致不育、流产、死胎、子代智力低下和染色体病等。但是对于精子DNA损伤的治疗目前尚未发现效果显著且得到公认的药物。本研究团队前期已发现左卡尼汀与精子总活率、前向运动精子百分比、精子直线运动速度等精液参数之间存在相关性[2]。目前已采用左卡尼汀和(或)乙酰左卡尼汀治疗少、弱精子症等男性不育症,并且取得较好疗效。我们在临床实践中以左卡尼汀口服液治疗男性不育症,观察其对不育患者精子DNA完整性的影响,取得了较好的临床疗效,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

入选标准:夫妇未采取任何避孕措施同居1年以上,性生活正常,排除女方不孕者,所有患者精液参数检查结果异常(参照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第5版标准),同时伴有DFI>15%的男性不育患者。排除标准:隐睾、泌尿生殖道感染、内分泌疾病、睾丸发育不良、精索静脉曲张、未按规定接受治疗或资料不全或有其他全身疾病的患者。所有患者治疗前3个月未服用任何治疗药物。

本研究共选择88例男性不育且合并有精子DNA完整性异常(DFI>15%)的患者,为2012年9月至2014年4月在南京军区南京总医院男科门诊就诊的不育患者。随机分为2组:治疗组44例,年龄25~40(30.2±6.3)岁;对照组44例,年龄24~41(29.4±5.7)岁。病程:治疗组病程最长9年,最短15个月;对照组病程最长10年,最短13个月。两组患者间年龄、病程差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

治疗组患者口服左卡尼汀口服液(商品名:东维力,东北制药总厂生产),1.0 g/次,3次/d,共3个月;对照组:予五子衍宗丸,6.0 g/次,2次/d,共3个月。治疗期间保持正常性生活,定期排精。于治疗前及治疗后3个月,分别检测DFI及精液常规参数。

1.3 精液检查

精液常规参数检查:禁欲3~5 d,手淫法获取精液,室温静置30 min后采用计算机辅助精子分析(computer-aided sperm analysis, CASA)系统进行精液

常规参数检查;DFI检测:使用精液优化处理与精子核完整性染色试剂盒进行染色,流式细胞仪检测DFI,试剂盒购自浙江星博生物科技有限公司。

1.4 统计学分析

采用SPSS13.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,2组治疗前后精液参数及DFI的对比采用配对 t 检验,治疗后2组精液参数及DFI的比较采用独立样本的 t 检验。

2 结果

2.1 基本治疗情况

本组88例患者,在试验周期内,11例被剔除,其中4例自动退出,2例不按规定服药,5例失访。试验结束后可评估病例77例,其中左卡尼汀组38例,对照组39例。

2.2 治疗前后2组患者精液参数变化情况比较

治疗前2组间精子浓度、精子总活率、前向运动精子百分比差异无统计学意义($P>0.05$)。经过3个月治疗后,左卡尼汀组精子总活率、前向运动精子百分比较治疗前显著提高($P<0.01$),精子浓度、DFI较治疗前显著提高($P<0.05$);而对照组上述指标与治疗前比较有所改善,但差异无显著性($P>0.05$)。治疗3个月后,左卡尼汀治疗组精子总活率、前向运动精子百分比与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),精子浓度、DFI与对照组比较差异亦有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 治疗前后2组精液参数及DFI变化情况的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精子浓度(10^6/mL)	精子总活率(%)	前向运动精子百分比(%)	精子DFI(%)
对照组	39				
治疗前		21.13±16.87	29.50±11.81	21.30±10.16	22.72±7.55
治疗后		24.46±15.36	33.82±14.33	25.42±11.34	20.34±5.28
治疗组	38				
治疗前		22.60±18.39	25.45±15.36	19.87±10.88	23.83±6.32
治疗后		30.74±15.51[a]	47.28±17.65[b]	35.13±13.24[b]	13.57±5.89[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与本组治疗前及对照组治疗后相比

3 讨论

目前已知多种因素包括环境污染、香烟、生殖系统感染、放疗、化疗及睾丸局部温度升高等可以引起局部活性氧(ROS)增加,导致精液氧化应激反应。精子DNA核酸含有亲核基团,而ROS能与其碱基反应,使DNA链聚集,改变DNA正常结构,造成DNA链断裂,也可以通过脂质过氧化作用影响DNA,引起超氧化物歧化酶(SOD)基因表达变化,SOD合成减少,从而使精子DFI上升[3]。研究表明,不育患者精子DNA损伤程度高于生育男性,可导致不良生殖结局,如出现受精异常、胚胎发育异常、种植异常及先天性畸形和儿童疾病等[4]。同时,DNA断裂作为精子凋亡的主要特征之一与男性不育关系密切。研究人员在人工敲除端粒酶催化亚基基因小鼠的实验中通过诱导细胞进入凋亡应激状态后发现,其精子DFI是实验前的7倍[5],推测小鼠精子DFI显著增加可能与其凋亡应激状态有关。因此,检测精子DNA损伤可以作为一种预测体内或体外受孕结局的重要手段。

DFI作为反映精子DNA损伤的指标,近年来被广泛应用。目前用于检测DFI的主要实验方法包括末端转移酶介导的dUTP末端标记法(TdT mediated-dUTP nick end labeling, TUNEL)、吖啶橙实验(acridine orange, AO)、苯胺蓝染色法、单细胞凝胶电泳(single cell geleletrophoresis, SCGE)、精子染色质扩散实验(sperm chromatin dispersion, SCD)、精子染色质结构分析(sperm chromatin structure assay, SCSA)等[6]。DFI是指变性DNA精子的百分数,与精液常规参数呈低度相关,而与妊娠率高度相关,因此可以作为独立于精液常规参数之外预测男性不育的指标。

鱼精蛋白表达异常、ROS过表达及精子发生过程中细胞的异常凋亡等参与了精子DNA损伤过程。不育男性的精子DNA氧化程度明显高于正常生育男性[7],大约25%的不育男性精液中发现有高水平的ROS。精液中ROS主要由精子(尤其是有缺陷精子或未成熟精子)或精液中的白细胞产生,生理浓度的ROS有助于精子保持正常的生理功能[8]。最新研究也显示,ROS在生理浓度下可能通过泛素化机制调控体内DNA损伤的自我修复[9]。而过高的ROS则可以引起精子DNA产生单链或双链的断裂,出现精子DNA损伤,引起功能异常[8]。另外,丰富的不饱和脂肪酸使人类精子膜具有流动性,保证了精子活力、顶体反应及精卵结合得以顺利进行。但不饱和脂肪酸的特性使人类精子易受到ROS的攻击,出现脂质过氧化物的堆积,引起精子DNA损伤。外源性和内源性的ROS可以引起精子DNA损伤,从而更确信ROS在男性不育患者精子DNA损伤中所起的关键作用。精浆中ROS可以增加精子DNA损伤,故考虑可以使用抗氧化

剂治疗精子DNA损伤。

研究已证明左卡尼汀对氧化应激诱导的共济失调毛细血管扩张症患者的DNA损伤具有保护作用[10]。Thangasamy等[11]证实左卡尼汀可以显著改善老年小鼠淋巴细胞的DNA损伤。Abdelrazik等[12]也证明了左卡尼汀可以显著减少小鼠胚胎中H_2O_2诱导的DNA损伤并提高体外胚囊发育率。同时,精液又是抗氧化物的重要来源,可以保护精子免受氧化物的损伤。研究表明,在体内,附睾组织、精浆和精子中含有最高的游离左卡尼汀浓度,其中附睾是精浆中游离左卡尼汀的主要来源。左卡尼汀作为一种有效的抗氧化物质,可阻止ROS产生,清除过多ROS,保护精子细胞免遭氧化损伤[13]。Abad等[14]报道了使用抗氧化剂可以显著减少精子DNA碎片,同时提高了精子DNA完整性的持续时间。在弱精子症男性精液中,左卡尼汀浓度与精子浓度、活率、膜功能、核DNA完整性及宫颈黏液穿透试验呈正相关。另外,Balercia等[15]发现采用左卡尼汀和乙酰左卡尼汀联合治疗特发性弱精子症可以显著改善患者的精子活力,并提高了精液总氧自由基清除能力。Bucak等[16]发现,在精子冷冻保存前使用左卡尼汀可以减少冷冻保存所致的精子DNA损伤,但具体机制目前尚未完全明了。另一方面,康宁等[17]发现左卡尼汀可以减少糖尿病大鼠的生精细胞凋亡。Kanter等[18]在研究中发现,对接受双侧睾丸放射的雄性大鼠使用左卡尼汀治疗可以显著减少生精细胞的凋亡,有利于精子发生。体外实验也证实,一定浓度的左卡尼汀可以减少弱精子症患者的精子凋亡率[19]。而Garcia-Peiro[20]等报道了鱼精蛋白在精子生发过程中参与了组蛋白的替换,而鱼精蛋白1与鱼精蛋白2的比值异常和人类精子DNA碎片化显著相关。因此,我们推测,左卡尼汀可能不仅是通过减少氧化物水平,可能还通过改善精子核重构过程来提高精子DNA完整性。

五子衍宗丸是治疗男性不育的经典古方,方由五味子、枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子组成,具有填精补髓、补益肾气等功能,其在男性不育的治疗中已得到了广泛的认可。研究表明,五子衍宗口丸能改善睾丸支持细胞的氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,从而改善睾丸生精功能[21-22]。杨明等[23]研究也发现五子衍宗丸可以提高男性不育症患者精子DNA单倍体数目。另外研究还发现五子衍宗方对环磷酰胺所致的小鼠DNA损伤具有较好的保护作用[24]。因此,在目前仍缺乏有效改善精子DNA损伤的治疗药物情况下,在本次研究中,我们选用了五子衍宗丸作为对照组;而在治疗组中,我们则给予患者使用左卡尼汀口服液。治疗3个月后,对照组精子总活率及前向运动精子百分比有所改善,但与治疗前相比,差异无显著性($P>0.05$),精子浓度及DFI则变化不大,这可能与本次试验纳入患者人数过少有关。治疗组患者精子总活率($P<0.01$)、前向运动精子百分比($P<0.01$)及精子浓度($P<0.05$)均显著提高,与以往报道一致[2,15];同时,左卡尼汀治疗3个月后患者DFI显著降低($P<0.05$),以上指标改善情况均优于五子衍宗丸。这可能与左卡尼汀作为一种有效的抗氧化剂有关,其通过提高精液清除ROS的能力,阻止ROS产生,从而促进精子DNA修复。另外,还可能与左卡尼汀影响精子发生的早期阶段有关[25],左卡尼汀通过减少生精细胞的凋亡率,从而减少精子DNA断裂。然而,对于左卡尼汀具体通过何种机制改善精子DNA完整性,目前仍尚完全明了,仍需进一步研究。但是,左卡尼汀作为一种安全、有效且体内本身所具有的物质,其在男性不育中的应用仍然十分重要。同时,研究结果提示我们,使用左卡尼汀能够有效地提高精子DNA的完整性,是一个值得期待的研究领域。

参考文献:

[1] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, *et al*. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome[J]. Hum Reprod, 2007, 22(1): 174-179.

[2] 商学军,黄宇烽,李克,等. L-肉碱治疗附睾结节伴弱精子症初步观察[J]. 中华男科学杂志, 2004, 10(9):671-672, 675.

[3] Dada R, Shamsi M B, Venkatesh S, *et al*. Attenuation of oxidative stress & DNA damage in varicocelectomy: implications in infertility management[J]. Indian J Med Res, 2010, 132: 728-730.

[4] Sigman M, Baazeem A, Zini A. Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? [J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(2): 115-123.

[5] Rodriguez S, Goyanes V, Segrelles E, *et al*. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation[J]. Fertil Steril, 2005, 84(4): 843-845.

[6] Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, *et al*. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage[J]. Asian J Androl, 2012, 14(1): 24-31.

[7] Agarwal A, Varghese A C, Sharma R K. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity[J]. Methods Mol Biol, 2009, 590:377 – 402.

[8] Smith R, Kaune H, Parodi D, *et al*. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress[J]. Rev Med Chil, 2007, 135(3): 279 – 286.

[9] Lee J G, Baek K, Soetandyo N, *et al*. Reversible inactivation of deubiquitinases by reactive oxygen species in vitro and in cells[J]. Nat Commun, 2013, 4:1568.

[10] Berni A, Meschini R, Filippi S, *et al*. L-carnitine enhances resistance to oxidative stress by reducing DNA damage in Ataxia telangiectasia cells[J]. Mutat Res, 2008, 650(2): 165 – 174.

[11] Thangasamy T, Jeyakumar P, Sittadjody S, *et al*. L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats[J]. Biogerontology, 2009, 10(2): 163 – 172.

[12] Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, *et al*. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos[J]. Fertil Steril, 2009, 91(2): 589 – 596.

[13] 商学军, 王修来, 黄宇烽. 肉碱与男性生殖[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(8): 726 – 729.

[14] Abad C, Amengual M J, Gosalvez J, *et al*. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA[J]. Andrologia, 2013, 45(3): 211 – 216.

[15] Balercia G, Regoli F, Armeni T, *et al*. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia[J]. Fertil Steril, 2005, 84(3): 662 – 671.

[16] Bucak M N, Tuncer P B, Sariozkan S, *et al*. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage[J]. Cryobiology, 2010, 61(3): 248 – 253.

[17] 康宁, 马洁桦, 周鑫, 等. L-肉碱对糖尿病大鼠生精细胞凋亡及附睾精子数量和活动率的影响[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(5):422 – 426.

[18] Kanter M, Topcu-Tarladacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats[J]. J Mol Histol, 2010, 41(2/3): 121 – 128.

[19] 叶飞君, 吕杰强, 葛红山. L-肉碱在体外对人精子凋亡的影响[J]. 海峡药学, 2012, 24(5): 268 – 269.

[20] Garcia-Peiro A, Martinez-Heredia J, Oliver-Bonet M, *et al*. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm[J]. Fertil Steril,2011,95(1):105 – 109.

[21] 殷金龙, 徐渊, 吴斌. 五子衍宗复方对睾丸支持细胞氧化应激损伤和细胞凋亡的影响[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(3):257 – 261.

[22] 孙志伟, 李玉洲, 张长城. 五子衍宗丸药理作用及其临床研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(12): 179 – 181.

[23] 杨明, 王树声, 陈志强, 等. 中药对肾阳虚不育症患者精子DNA的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(10): 889 – 891.

[24] 刘苗苗, 袁丁, 黄威峰, 等. 五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠DNA损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6): 38 – 40.

[25] Amendola R, Bartoleschi C, Cordelli E, *et al*. Effects of L-acetylcarnitine (LAC) on the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. 1. Recovery after X-irradiation[J]. Andrologia, 1989, 21(6): 568 – 575.

(**收稿**:2014-11-29;**修回**:2015-01-09)

(编辑 龙 亮)