·临床研究·

# 益肾生精方对精子DNA损伤及PRM1、PRM2 mRNA表达水平的影响※

欧阳洪根*　林建敏　林绍彬

**摘　要　目的：**观察中药益肾生精方治疗肾阳虚型男性不育患者精子DNA损伤的临床疗效，并初步探讨其作用机制。**方法：**将符合纳入标准的80例患者随机分为治疗组50例与对照组30例。治疗组口服益肾生精方，对照组口服多维元素片（29），两组均治疗2个月。观察治疗前后精液常规参数、精子核DNA完整性（DFI）以及精液PRM1、PRM2 mRNA表达水平的变化。**结果：**共78例患者完成研究，其中治疗组48例，对照组30例。治疗组治愈率及总有效率均显著高于对照组（$P<0.05$）；治疗组治疗后精子浓度、活力及DFI均较治疗前显著改善（$P<0.01$）；精液体积治疗前后比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。对照组治疗后DFI较治疗前改善（$P<0.05$）；精子浓度、活力及精液体积治疗前后比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。治疗后组间比较，治疗组精子DFI、活力及浓度的改善程度均显著优于对照组（$P<0.01$）。治疗组治疗后PRM1、PRM2 mRNA表达水平高于治疗前（$P<0.05$或$P<0.01$）；对照组治疗后PRM1、PRM2 mRNA表达水平与治疗前比较均无统计学意义（$P>0.05$）。治疗后组间比较，治疗组PRM1、PRM2 mRNA表达水平提高程度均优于对照组（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论：**益肾生精方能显著改善肾阳虚型男性不育患者的精子浓度、活力及精子DNA损伤，疗效优于多维元素片（29），其作用机制可能与上调PRM1、PRM2 mRNA表达有关。益肾生精方是治疗肾阳虚型精子DNA损伤男性不育患者的有效方法。

**关键词**　男性不育；精子DNA损伤；PRM1；PRM2；益肾生精方

不孕不育是一个全球性问题，其发病率呈上升趋势，其中约半数由男方因素引起[1]。研究表明，精子DNA损伤与不育症关系密切，其损伤程度不仅影响男性生育能力，也与精液质量的主要参数密切相关[2-4]。另有研究显示，精核蛋白与男性生育密切相关，可能导致精子DNA损伤及畸形精子等问题[5]。目前尚无公认的治疗精子DNA受损的特效药物，西药疗效尚不理想，而中医中药在治疗男性不育精子异常方面显示出一定优势。益肾生精方是我院治疗男性不育的经验方，笔者发现该方在改善男性不育患者精子DNA损伤方面效果良好，现报告如下。

## 1　资料与方法

**1.1　一般资料**　收集2023年6月至2025年12月于厦门市妇幼保健院就诊的不育患者80例。为确保更多受试者接受试验性治疗，同时兼顾组间可比性，本研究采用随机数字表法，按5∶3的比例将80例患者分为治疗组（50例）与对照组（30例）。治疗组年龄（32.15±6.84）岁，病程（2.83±1.65）年；对照组年龄（31.86±7.16）岁，病程（2.79±1.68）年。两组年龄、病程比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。两组患者治疗前精液体积、精子浓度、活力及DNA碎片率（DFI）比较，差异亦无统计学意义（$P>0.05$）。本研究已获厦门市妇幼保健院医学伦理委员会审核批准（伦理审批号：KY-2023-151-H01）。

**1.2　诊断标准**

1.2.1　西医诊断标准　男性不育诊断标准参照《中国男科疾病诊断治疗指南与专家共识（2016版）》[6]制定：育龄夫妻有正常性生活且未采取避孕措施，因男

※基金项目　厦门市扶持中医药发展项目（No.XWZY-2023-0624）

* 作者简介　欧阳洪根，男，主任医师。研究方向：中医药防治男科疾病。E-mail：57053771@qq.com

·作者单位　厦门大学附属妇女儿童医院/厦门市妇幼保健院（福建 厦门 361003）

方因素导致女方在1年内未能自然受孕。

1.2.2　中医证候诊断标准　参照《中药新药临床研究指导原则》[7]及《中医病证诊断疗效标准》[8]中肾阳虚证拟定。主症：①婚后不育；②性欲淡漠；③精子稀少。次症：①腰膝酸软；②夜尿增多；③舌淡苔白；④脉沉细无力。具备主症①及另一项主症，或主症①加任意两项次症，即可辨为本证。

**1.3　纳入标准**　①符合男性不育诊断标准；②符合肾阳虚证辨证标准；③精子DFI>30%；④年龄23～45岁；⑤患者知情同意并签署知情同意书。

**1.4　排除标准**　①配偶存在明确导致不孕的疾病者；②患有隐睾、染色体或基因异常等先天性疾病者；③Ⅱ级及以上精索静脉曲张者；④生殖系统感染尚未治愈者；⑤长期吸烟、酗酒成瘾或有明确环境毒物接触史者。

**1.5　脱落标准**　①依从性差，难以按计划完成本研究随访者；②主动或自行要求退出研究者；③治疗过程中出现严重不良事件者。

**1.6　治疗方法**

1.6.1　治疗组　采用益肾生精方治疗。药物组成：菟丝子15 g，沙苑子15 g，盐补骨脂10 g，炙淫羊藿10 g，覆盆子10 g，金樱子10 g，熟地黄10 g，枸杞子15 g，党参10 g，黄芪15 g，山药10 g，骨碎补10 g，制何首乌10 g，陈皮6 g。上述中药均由厦门市妇幼保健院中药房提供，每日1剂，水煎分早晚2次温服，连续治疗2个月。

1.6.2　对照组　口服多维元素片(29)(惠氏制药有限公司，国药准字H10950026，产品批号3A2F)，每日1片，连续治疗2个月。

**1.7　观察指标**　两组患者分别于治疗前后各检测1次精液常规、精子核DNA完整性及PRM1、PRM2 mRNA表达水平。

1.7.1　精液常规　参照WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第5版)的标准方法，采用西班牙SCA全自动精液质量分析仪进行检测。

1.7.2　精子核DNA完整性检测　采用精子DNA染色质结构分析(SCSA)法进行检测。检测试剂由浙江星博生物科技股份有限公司提供。其原理为：吖啶橙(AO)与双链或单链DNA结合后分别发出红色或绿色荧光，据此通过流式细胞仪检测精子荧光信号。红色或红绿色荧光强度百分率即为单个精子变性DNA占总DNA的比率。每份精液标本DFI值以主群以外精子所占百分率表示，即DNA受损精子占总精子数的比率。

1.7.3　PRM1和PRM2 mRNA检测　①精液纯化与RNA提取：采用Precoll细胞分离液[购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司]与Earle's平衡盐溶液(10×EBSS，无钙镁糖酚红，购自上海创赛科技有限公司)分离出精子沉淀。用预热至37 ℃的磷酸盐缓冲液(PBS)加入含精子沉淀的EP管内，吹打洗涤，离心弃上清，重复2～3次，留精子沉淀备用；采用SPARKeasy组织/细胞RNA快速提取试剂盒(购自山东思科捷生物技术有限公司)提取RNA，检测RNA浓度。②qPCR引物PRM1、PRM2及GAPDH引物均由北京擎科生物科技股份有限公司提供。引物序列如下：PRM1上游为AGAAGTCGCAGACGAAGGAG，下游为TGTCTTCTACATCGCGGTCTG；PRM2上游为GCAAGAGCAAGGACACCAC，下游为AGCCTCTGCGATGCCTCCT；GAPDH上游为CCACCCAGAAGACTGTGGAT，下游为TTCTAGACGGCAGGTCAGGT。③cDNA合成：qPCR反应体系20 μL，含总RNA 1 μg、反转录酶20 U、随机引物200 ng、5×反应缓冲液4 μL，42 ℃反应50 min。④qPCR反应：扩增PRM1、PRM2和GAPDH。循环条件：50 ℃、2 min；95 ℃预变性10 min；95 ℃变性30 s；60 ℃退火40 s，循环40次；72 ℃末次延伸5 min。标准曲线的制备：采用BIECHE的标准曲线制备方法[5]。定量分析：根据标准曲线计算标本中PRM1、PRM2和GAPDH的每毫升拷贝数，以PRM1/GAPDH、PRM2/GAPDH作为PRM1、PRM2 mRNA的相对表达水平。

**1.8　疗效判定标准**　治愈：治疗2个月后精子DFI<30%。有效：治疗2个月后精子DFI较治疗前改善，但未降至30%以下。无效：治疗2个月后精子DFI较治疗前无改善或升高。

**1.9　统计学处理**　采用SPSS 27.0软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用独立样本$t$检验，组内治疗前后比较采用配对样本$t$检验；计数资料以例数(%)表示，组间比较采用$\chi^2$检验；等级资料采用秩和检验。$P$<0.05为差异有统计学意义。

## 2　结果

**2.1　两组脱落情况**　研究期间，治疗组因未完成随访脱落2例，最终纳入统计分析者共78例，其中治疗

组48例，对照组30例。

**2.2　两组疗效比较**　治疗组治愈率及总有效率与对照组比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表1。

**表1　两组疗效比较[n(%)]**

| 组别 | n | 治愈 | 有效 | 无效 | 总有效 |
|---|---|---|---|---|---|
| 治疗组 | 48 | 25(52.08)[1)] | 13(27.08) | 10(20.80) | 38(79.17)[1)] |
| 对照组 | 30 | 6(20.00) | 9(30.00) | 15(50.00) | 15(50.00) |

注：与对照组比较，[1)]$P<0.05$

**2.3　两组治疗前后精液参数比较**　治疗组治疗后精子浓度、活力及DFI与治疗前比较，差异均有统计学意义（$P<0.01$）；精液体积治疗前后比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。对照组治疗后精子DFI较治疗前改善，差异有统计学意义（$P<0.05$）；精液体积、精子浓度及活力治疗前后比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。组间比较，治疗组治疗后精子浓度、活力及DFI的改善程度均优于对照组（$P<0.01$）。见表2。

**表2　两组治疗前后精液参数比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 项目（单位） | 治疗组（n=48） | | 对照组（n=30） | |
|---|---|---|---|---|
| | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| 体积（mL） | 3.18±1.53 | 3.69±1.48 | 3.21±1.64 | 3.28±1.59 |
| 浓度（$10^6$/mL） | 51.60±13.50 | 84.30±15.40[1)3)] | 52.50±12.80 | 55.20±13.40 |
| 活力（%） | 26.30±11.40 | 35.70±10.90[1)3)] | 25.90±10.70 | 28.20±11.20 |
| DFI（%） | 43.50±11.80 | 27.60±14.30[1)3)] | 42.70±12.30 | 35.40±11.30[2)] |

注：与本组治疗前比较，[1)]$P<0.01$，[2)]$P<0.05$；与对照组治疗后比较，[3)]$P<0.01$

**2.4　两组治疗前后PRM1、PRM2 mRNA相对表达水平比较**　治疗组治疗后PRM1、PRM2 mRNA表达水平高于治疗前（$P<0.05$或$P<0.01$）；对照组治疗后PRM1、PRM2 mRNA表达水平与治疗前比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。组间比较，治疗组治疗后PRM1、PRM2 mRNA表达水平提高程度均优于对照组（$P<0.05$或$P<0.01$）。见表3。

**2.5　安全性评价**　治疗观察期间，两组患者均未出现明显不良反应，生命体征平稳，尿常规、肝肾功能等实验室指标未见明显异常。

**表3　两组治疗前后PRM1、PRM2 mRNA相对表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 项目(单位) | 治疗组（n=48） | | 对照组（n=30） | |
|---|---|---|---|---|
| | 治疗前 | 治疗后 | 治疗前 | 治疗后 |
| GAPDH（$\times10^3$copy/mL） | 6.02±1.91 | 5.74±2.23 | 5.29±0.77 | 5.41±1.88 |
| PRM1（$\times10^4$copy/mL） | 2.63±1.42 | 4.00±2.94 | 2.68±1.35 | 3.36±1.27 |
| PRM2（$\times10^4$copy/mL） | 2.66±1.64 | 4.56±2.60 | 2.81±1.56 | 3.55±1.64 |
| PRM1/GAPDH | 4.17±1.63 | 5.71±3.32[1)] | 3.74±1.75 | 4.34±1.67 |
| PRM2/GAPDH | 4.16±1.35 | 7.21±3.97[2)] | 3.94±1.81 | 4.48±1.64 |

注：与治疗前比较，[1)]$P<0.05$，[2)]$P<0.01$；与对照组治疗后比较，[3)]$P<0.05$，[4)]$P<0.01$

## 3　讨论

精子DFI是指发生核DNA链断裂的精子占全部精子的百分比，反映精子DNA结构的完整性[10]，目前已作为评估精子DNA损伤的主要指标。随着生殖医学研究的不断深入，DFI已成为评估男性生育能力的重要指标。精子DNA损伤与男性不育密切相关，损伤程度越严重，生育能力越低。多项研究表明，精子DNA损伤可降低精子的受精能力及胚胎的发育潜能，从而降低临床妊娠率并增加自然流产风险[11-13]。

精核蛋白是一类在晚期精子细胞中出现的富含精氨酸和半胱氨酸的碱性蛋白质，能够将DNA高度压缩，形成高度致密的核蛋白结构，从而保护父系基因组免受外界因素的损伤[14-15]。精核蛋白可分为两类：一类为P1型精核蛋白（PRM1），存在于所有哺乳动物的精子细胞中；另一类为P2型精核蛋白（PRM2），仅存在于人类及少数几种哺乳动物中[16]。国内学者蒋卫军等[4]研究报道，PRM1表达量降低时可导致精子发生紊乱、精子数量减少，而PRM2表达量异常则会影响精子染色质的凝聚与稳定性，进而引起精子DNA损伤及畸形精子等问题，增加不育风险。孙昌瑞等[17]研究发现，少精子症患者的PRM1、PRM2 mRNA表达水平显著低于健康人群，提示PRM1、PRM2 mRNA表达量降低与精子发生障碍密切相关。

临床上导致精子DNA损伤的因素较为复杂，常见原因包括生殖系统疾病、全身性疾病、环境污染物、高温环境、不良生活方式、高龄、禁欲时间过长及药物损害等[18-20]。西药治疗多采用补充维生素和微量元素等方法，但疗效并不理想；而中医中药在该领域已展现出一定优势，日益受到关注与认可。中医学认为，肾藏精，主生殖，肾中精气的盛衰直接影响人的生殖功能。肾精能激发和推动全身组织器官的生理活动。若先天禀赋不足，或后天房事不节，或大病之后肾气失充、精气亏损，均可导致精子异常，进而引发男性不育。谢卓庭等[21]研究发现，益肾活血类中药有助于降低精子DNA损伤，改善自然妊娠结局。关伟等[22]研究发现，具有补肾健脾活血功效的不育1号方可提高精子活力，降低精子DFI值，改善精子质量。卞廷松等[23]

研究发现，具有益肾健脾功效的聚精颗粒能提高少弱精子症患者的精子浓度和活力，并能显著增加精核蛋白含量。

益肾生精方是根据“肾主生殖”理论，结合临床用药经验，以温阳补肾益精为本，辅以健脾理气活血之法组方。方中沙苑子、菟丝子、炙淫羊藿、补骨脂、覆盆子、金樱子补肾温阳固精；熟地黄、何首乌、枸杞子滋补肾精、助阳固精，阴中求阳；党参、黄芪、山药健脾益气助精，补后天以养先天；骨碎补既能补肾又可活血，改善局部微循环，优化精子生存环境。鉴于众多补肾之品性质滋腻，易碍脾胃运化，故佐以陈皮健脾理气以防滋腻。万物凡籽，皆藏生机，以子补精，同气相求，故方中重用种子类中药，取象比类，寓“种子”之意。全方共奏温阳补肾益精、健脾理气活血之功，以改善精室生精育精功能，从而提高精子质量。

补益类中药具有调节免疫、调节内分泌及抗氧化应激等作用；补肾温阳药可改善下丘脑—垂体—睾丸性腺轴功能，促进精子质量提升，减轻睾丸生精细胞损伤[24]。补肾中药如菟丝子、淫羊藿等含黄酮类化合物，枸杞子含多糖类化合物，均具有较强的抗氧化作用[25]；枸杞子可促进生殖损伤修复，并通过增强抗氧化酶活性以提高精子质量[26-27]。补肾中药可能经多途径协同改善精子质量，可显著降低精液氧化应激水平，通过清除过量活性氧保护精子细胞膜完整性，从而减少核DNA损伤；能促进生精细胞增殖并抑制其凋亡；还具有抗炎、免疫调节及改善睾丸微循环等多重药理作用，上述作用均对改善精子质量具有积极意义[28]。

本研究发现，服用益肾生精方的治疗组，其治愈率及总有效率均优于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；治疗组治疗后精子活力、浓度及DFI的改善程度均优于对照组（$P<0.01$），PRM1、PRM2 mRNA表达水平高于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。综上所述，益肾生精方治疗肾阳虚型精子DNA损伤男性不育具有较好的临床疗效，尤其是在改善精子浓度、活力、DFI方面疗效显著。精核蛋白的表达与精子发生、精子活力及精子染色质关系密切。国外学者MILLER等[15]研究报道，精核蛋白可保护精子DNA免受损伤。本研究显示，益肾生精方能显著上调PRM1、PRM2 mRNA表达水平，且对PRM2 mRNA表达的促进作用更为明显。国内亦有学者[23]发现，具有补肾健脾功效的中药可增加精核蛋白含量。据此推测，益肾生精方改善男性不育患者精子质量的机制可能与上调PRM1、PRM2 mRNA表达有关。本研究初步探索了益肾生精方治疗男性不育的部分基因调控机制，但鉴于基因调控网络的复杂性，未来尚需开展更深入的研究以阐明其内在作用机制。此外，患者在服用益肾生精方治疗期间未见明显不良反应，提示该方治疗肾阳虚型精子DNA损伤男性不育患者安全有效，值得临床进一步推广应用。

## 参考文献

[1]胡嘉琪，王中伟，骆洁，等.不育男性精子DFI、HDS与精子畸形程度及患者年龄的相关性研究[J].中华男科学杂志，2022，28(10)：881-885.

[2]ZEQIRAJ 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.

[3]SANTI D，SPAGGIARI G，SIMONI M，et al.Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management-meta-analyses [J]. Reprod Biomed Online，2018，37(3)：315-326.

[4] SALEHI M，AFARINESH M R，HAGHPANAH T，et al. Impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome and incidence of apoptosis of human pre-implantation embryos obtained from in vitro matured MII oocytes[J].Biochem Biophys Res Commun，2019，510(1)：110-115.

[5]蒋卫军，张静，夏欣一，等.鱼精蛋白基因多态性与男性不育相关性研究进展[J].中华男科学杂志，2015，21(12)：1134-1137.

[6]中华医学会男科学分会.中国男科疾病诊断治疗指南与专家共识(2016版)[M].北京：人民卫生出版社，2017：39.

[7]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，2022：383-387.

[8]国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[M].北京：中国医药科技出版社，2016：192.

[9]邓君，刘蔚，洪华，等.MUC1基因表达与其他肿瘤标志物在乳腺癌诊断中的应用[J].实用医院临床杂志，2016，13(6)：23-25.

[10]周雪，周艳芬，孙国海，等.男性精子DNA碎片指数与精液常规参数的相关性研究[J].中国性科学，2021，30(3)：6-10.

[11]LARSON-COOK K L，BRANNIAN J D，HANSEN K A，et al.Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay[J].Fertility and sterility，2003，80(4)：895-902.

[12]刘鹏，孙建明，韩文均，等.精子DNA碎片指数与精浆生化指标及精液参数的相关性分析[J].中华男科学杂志，2019，25(3)：272-274.

[13]周成刚.左卡尼汀联合他莫昔芬对精子DNA碎片率的影响研究[J].系统医学，2019，4(3)：86-88.

[14]LALANCETTE C L I Y，MILLER D，etaL.Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus[J].Asian jounral of andrology，2008，10：535-541.

（下转第55页）