

成年男性阴囊局部“热压”后精液参数、精子顶体酶活性及表皮生长因子含量的改变

张爱东 张美华 陈峰 仕治达 于建春 邱毅 刘以训

【摘要】 目的 观察成年男性阴囊局部热压后精液参数、精子顶体酶活性及精液表皮生长因子(EGF)的改变。方法 30 例已婚成年健康男性志愿者阴囊外部放置恒温加热带(睾丸热压,THT),热压温度 40~43 ℃,每周 2 次,每次 50 min,连续 3 个月。分别在试验开始前和试验 1、2、3 个月采用化学发光免疫分析法测定血清生殖激素 T、FSH、LH,精液常规分析、精子低渗肿胀实验(HOS)、精子染色质扩散(SCD)实验及精子顶体酶活性和 EGF 的含量。对 THT 试验前后进行自身对照。结果 试验 1、2、3 个月和停止 THT 试验 1 个月后的精子浓度、活动率、正常形态精子及正常 HOS 与 THT 试验前比较,差异均有统计学意义;停止 THT 试验 2、3 个月后的精子浓度、活动率与 THT 试验前比较,差异均有统计学意义。停止 THT 试验 2 个月后正常形态精子及 SCD 均恢复到试验前水平,差异均无统计学意义。THT 试验 1 个月后血清 LH 及 FSH 较试验前无变化;血清睾酮(T)水平比试验前明显升高,差异有统计学意义。THT 试验 3 个月后精液量、T 水平明显低于试验前,LH 和 FSH 高于试验前。停止 THT 试验 3 个月后,精液量、T、FSH、LH 均恢复到试验前水平。试验 1 个月、2 个月和 3 个月后,精子 DNA 完整比率较试验前下降明显,停止试验 1 个月后精子 DNA 完整比率下降仍然非常明显;停止试验 2、3 个月后精子 DNA 完整比率与试验前无差异。THT 试验 1、2、3 个月及停试验 1、2 个月后精子顶体酶活性比试验前下降;停止试验 2 个月后上述各项指标又恢复到试验前水平。试验前后 EGF 含量无差异。结论 短期恒温睾丸热压可以使精子密度、活动率、精子顶体酶活性和精子 DNA 完整性比率较快下降,精子畸形率升高,抗生育效果明显,THT 停止后可较快恢复,THT 可能作为男性的一种避孕方法而应用。

【关键词】 睾丸热压; 男性; 抗生育; 顶体酶; 表皮生长因子

精子发生对温度非常敏感,睾丸局部温度升高能导致睾丸生精功能障碍甚至不育。研究发现,隐睾导致的不育与生精细胞大量凋亡有关^[1-5],但生精细胞凋亡的机制尚未完全明确。Gou 等^[6]将食蟹猴每天放置在 43 ℃ 温水中,对其睾丸局部温浴 30 min,连续 2 天共 60 min 后,在终止温浴的 1 个月内,发现精液中精子数比温浴前下降了 80%。本文对正常成年男性睾丸局部温浴(热压)后的精液参数、精子顶体酶活性及精液内表皮生长因子(EGF)的改变进行了观察,报告如下。

对象与方法

1. 对象:选取 2012 年 5 月—2015 年 10 月已婚成年健康男性志愿者 30 例。临床试验入选标准为无心血管系统、呼吸系统、泌尿系统及神经系统疾病,无传染病史,需采取避孕措施节育,身体健康、已

婚且至少生育有 1 个子女男性(32~48 岁,有二胎生育指标),志愿接受 43 ℃ 男性避孕装置避孕试验。填写知情同意书,一式 3 份,受试者 1 份,课题组 1 份,科研科存档 1 份。

2. 男性检查:男性第二性征、阴茎、阴囊、精索、输精管、睾丸、附睾等。每次睾丸热压(testis heat treatment, THT)后进行阴囊皮肤、睾丸大小、张力等检查,并询问自愿受试者的性生活情况,有无勃起功能障碍、不射精等发生。本临床试验经过山东省计划生育科学技术研究所医学伦理委员会批准。

3. 阴囊外部放置恒温加热带(睾丸热压, testis heat treatment, THT):热压温度 40~43 ℃,每周 2 次,每次 30~50 min,连续进行 3 个月。进入试验前进行 3 次精液常规检查和 1 次血生殖激素 T、FSH、LH 检测,试验期间每月进行 2 次精液常规检查,T、FSH、LH 检测 1 次,停止 THT 试验后 2 周、1 个月、2 个月、3 个月、半年抽血查 T、LH、FSH 含量及精液常规分析;禁欲 3~5 d 取精液进行常规检查。

4. 男用阴囊局部“热压”装置带的研制及实验器材:恒温控制器、定时器及交流电变压装置的设计和研制。变压装置输入电压 200~250 V,输出电压

基金项目:十二五国家科技支撑计划(2012BAI31B08)

作者单位:250002 山东济南,国家卫生计生委生育调控技术重点实验室 山东省优生技术重点实验室山东省计划生育科学技术研究所(张爱东,张美华,仕治达,于建春,邱毅);新泰市计划生育服务站(陈峰);中国科学院动物研究所(刘以训)

通讯作者:邱毅(qiuyi987@sina.com)

为 12 V,时间控制器为 1~60 min;选择无毒性的化学材料,制作“热压”带,温度控制在 43 ℃左右(42.5~43.5 ℃),安置在特制的内用裤头上。

5. 精液常规分析及精子低渗肿胀实验(HOS):精液常规分析每月取平均值进行实验数据统计。THT 试验前后进行自身对照。

按照 WHO 规定的方法进行精液常规分析^[7]。

6. T、FSH、LH 测定:化学发光免疫分析法测定血清生殖内分泌激素 T、FSH、LH。常规抽空腹静脉血 2 ml,将血样置于 37 ℃水浴箱 30 min,待测血液完全凝固后再取出,1 500 rpm/min 离心 15 min,分离血清,取 300.0 μl 血清上机检测。

7. 精子染色质扩散(SCD)实验:根据文献^[8-9]略加修改。用中草药皂角提取液代替原精子裂解液中的三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐-乙二胺四乙酸二钠盐(Tris-Borate-EDTA, TBE)缓冲液,效果相同,且皂角无毒性。(1)精液标本处理:精液标本用磷酸盐缓冲液(pH 6.8)调至 10×10^6 /ml,37 ℃孵育;精子混合液滴在琼脂预处理过的载玻片上,4 ℃放置 5 min。(2)精子变性及裂解:标本载玻片浸入 0.08 mol/L 的盐酸(HCl)内变性 7 min;然后浸入精子裂解液内(pH 7.3)20 min。(3)脱水:然后将标本载玻片依次放入 70%、90% 和 100% 的乙醇中脱水。(4)染色:在标本上滴 50 ml(2 μg/ml)DAPI 染色,立即在荧光显微镜下观察。如用普通光学显微镜观察,需进行瑞氏-姬姆萨染色。(5)结果判断:计数 500 个精子,观察精子光晕大小。根据光晕与精子头部横径的比例,粗分为大、中、小和无光晕 4 个等级,大和中光晕表示精子 DNA 完整无碎片,小和无光晕表示精子 DNA 断裂为碎片。小光晕以 \leq 精子头直径 1/4 为判断标准,中光晕 $>$ 精子头直径四分之一而 \leq 精子头直径 2/3,大光晕 $>$ 精子头直径 2/3。

8. 精子顶体酶活性检测:按照深圳华康生物医学工程有限公司提供的试剂盒说明书(改良 Kennedy 法)进行检测。

9. 精液 EGF 检测:按照南京建成生物工程研究所[Bioengineering Institute of Nanjing Jiancheng(Nanjing, Jiangsu, China)]提供的试剂盒说明书进行检测。

10. 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示,采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异统计学意义。

结果

1. THT 试验前后阴囊、睾丸改变及性生活情况:每次 THT 试验后阴囊皮肤轻微发红,无其他损伤,睾丸张力在 1 个月时无改变,2~3 个月时有个别受试者睾丸张力轻微减低,睾丸大小无明显改变。THT 试验前后性生活均正常,无改变。

2. THT 试验前后精子浓度、活动率、正常形态精子、HOS 结果:试验 1、2、3 个月和停止 THT 试验 1 个月后的精子浓度、活动率、正常形态精子及正常 HOS 与 THT 试验前比较,差异均有统计学意义;停止 THT 试验 2、3 个月后的精子浓度、活动率与 THT 试验前比较,差异均有统计学意义,见表 1。THT 试验 1 个月后有 1 例出现无精子,2 个月后精子密度下降到 15×10^6 /ml 以下 5 例(16.7%, 5/30),精子活动率 $< 20\%$ 11 例(36.7%, 11/30);3 个月后,精子密度下降到 15×10^6 /ml 以下 6 例(20.0%, 6/30),精子活动率 $< 20\%$ 9 例(30.0%, 9/30)。停止 THT 试验 1 个月后精子密度仍 $< 15 \times 10^6$ /ml 2 例(6.6%, 2/30),精子活动率 $< 20\%$ 2 例(6.6%, 2/30)。停止 THT 试验 2 个月后正常形态精子及 SCD 均恢复到试验前水平,差异均无统计学意义,见表 1。停止 THT 试验 2 个月和 3 个月分别有 2 例和 6 例受试者失访。

表 1 THT 试验前、后各项数据比较($\bar{x} \pm s$)

试验时间	例数	精子浓度 ($\times 10^6$ /ml)	活动率 (%)	正常形态 (%)	正常 HOS (%)	精液量 (ml)	T (ng/ml)	FSH (U/L)	LH (U/L)	SCD 测定 DNA 碎片(%)
试验前	30	85.7 \pm 40.8	70.7 \pm 17.4	22.9 \pm 7.7	81.2 \pm 10.6	2.8 \pm 0.6	16.35 \pm 6.55	3.95 \pm 1.94	4.21 \pm 2.31	18.6 \pm 4.5
试验 1 个月	30	52.3 \pm 32.2*	40.2 \pm 23.2*	12.1 \pm 8.9*	36.1 \pm 19.6*	2.69 \pm 0.5	18.92 \pm 4.12#	4.02 \pm 1.79	4.97 \pm 2.98	52.5 \pm 30.5*
试验 2 个月	30	42.6 \pm 24.1*	32.7 \pm 21.7*	7.1 \pm 6.4*	28.9 \pm 15.8*	—	—	—	—	69.0 \pm 25.8*
试验 3 个月	30	41.2 \pm 25.8*	32.4 \pm 20.8*	6.1 \pm 5.0*	29.1 \pm 15.0*	2.4 \pm 0.6#	11.77 \pm 3.91#	5.42 \pm 2.93#	6.41 \pm 2.11#	81.6 \pm 20.5*
停 1 个月	30	55.4 \pm 28.1*	47.5 \pm 22.6*	16.3 \pm 5.9#	56.8 \pm 12.0#	—	—	—	—	25.3 \pm 9.8#
停 2 个月	28	72.5 \pm 32.4#	55.7 \pm 22.3#	18.8 \pm 6.5	78.5 \pm 13.7	—	—	—	—	18.3 \pm 5.9
停 3 个月	24	100.8 \pm 56.3#	56.6 \pm 19.7#	23.5 \pm 9.0	79.9 \pm 8.8	2.7 \pm 0.4	17.10 \pm 5.21	3.86 \pm 1.63	4.36 \pm 2.20	19.1 \pm 5.3

注:与 THT 试验前比较,**P* < 0.001, #*P* < 0.05;—为无此项数据;停止 THT 试验 2 个月和 3 个月分别有 2 例和 6 例受试者失访

3. THT 试验前后血清生殖内分泌激素 T、FSH、LH 及 SCD 测定结果:THT 试验 1 个月后精液量、血清 LH 及 FSH 较试验前无变化,差异无统计学意义;血清睾酮(T)水平比试验前明显升高,差异有统计学意义。THT 试验 3 个月后精液量、T 水平明显低于试验前,LH 和 FSH 高于试验前,差异有统计学意义。停止 THT 试验 3 个月后,精液量、T、FSH、LH 均恢复到试验前水平。SCD 实验显示,试验 1 个月、2 个月和 3 个月后,精子 DNA 完整比率较试验前下降明显,停止试验 1 个月后精子 DNA 完整比率下降仍然非常明显,差异均有统计学意义;停止试验 2、3 个月后精子 DNA 完整比率与试验前无差异,见表 1。

4. 精子顶体酶活性及精液表皮生长因子(EGF)改变:THT 试验 1、2、3 个月及停试验 1、2 个月后精子顶体酶活性比试验前下降,差异有统计学意义;停止试验 2 个月后上述各项指标又恢复到试验前水平。试验前后 EGF 含量比较,差异无统计学意义,见表 2。

表 2 THT 试验前后精子顶体酶活性及表皮生长因子改变 ($\bar{x} \pm s$)

试验时间	例数	精子顶体酶活性 ($\mu\text{IU}/10^6$ 精子)	例数	EGF (浓度 ng/L)
试验前	26	246.5 ± 48.6	30	271.6 ± 49.6
试验 1 个月	25	28.8 ± 6.2 *	30	242.3 ± 44.2
试验 2 个月	26	46.7 ± 16.0 *	30	254.9 ± 46.5
试验 3 个月	26	26.1 ± 4.8 *	29	272.9 ± 50.7
停 1 个月	24	148.9 ± 25.2 #	30	229.9 ± 42.0
停 2 个月	20	106.3 ± 21.4 #	28	264.7 ± 50.0
停 3 个月	20	125.9 ± 39.3	23	258.7 ± 53.9

注:与 THT 试验前比较,* $P < 0.01$,# $P < 0.05$;精子顶体酶活性测定试验前、试验 1 个月、2 个月、3 个月、停止试验 1、2、3 个月分别有 4、5、4、4、6、8 和 4 例未测定;EGF 试验 3 个月和停止试验 3 个月分别有 1 例精液标本量不够未进行测定

讨论

精子发生是在比体温低 4~5 °C 的阴囊内完成。隐睾症患者不育,长期处于高温工作环境下的青年男性生育力下降,43 °C 局部温浴睾丸诱发生精细胞凋亡,精液中精子数下降,提示温度影响精子发生^[2]。Guo 等^[6]建立了两种“热压”动物模型:(1)通过隐睾手术将一侧睾丸移入腹腔,对侧睾丸留在阴囊作为对照。对大鼠和恒河猴的研究结果发现,隐睾后 1~5 周睾丸内圆形精子和变态精子几乎全部凋亡,而精原细胞不受影响;(2)另一种动物模型就是将睾丸局部浸入 43 °C 温水中每天温浴 30 min,

每天一次,连续 2 天。在终止温浴的 1 个月内,精液中的精子数目比温浴前降低了 80%,热激处理后 84 天,恢复正常的生精过程。热激不仅直接诱发生精细胞凋亡^[4],且也可通过影响支持细胞去分化过程促进生精细胞凋亡。实验证实,这两个过程都是可逆的。本试验显示,THT 试验 1~3 个月后精子数量、活动率、精子正常形态、精子 DNA 完整率及精子顶体酶活性开始下降,与试验前比较有差异。实验 1 个月后有 1 例出现无精子,即马上减低阴囊加热温度,从 43 °C 加 0.5 °C 度降低到 41 °C,防止睾丸造成不可逆损伤。精子浓度、活动率和正常形态在试验 2 个月后开始下降,这可能与人的生精过程有关。因为一个生精周期大约需要 70 天。控制性和短时的外界温度的升高,对抑制人类睾丸精子产生是一个相对缓慢的过程,可能是机体在环境条件改变的情况下,进行的自身缓慢调节,是适应生理反应和生理阈值的。如果是超高温和硬性损伤,超过了机体生理阈值范围,就可能导致睾丸永久失去生精功能,破坏睾丸的生精过程。因此,从停止 THT 试验结果可知,精子密度、活动率和精子 DNA 完整率都能够在停止 2 个月后(60 d)恢复,说明睾丸实质组织没有受到不可逆性的损害。THT 与其他方法(小剂量激素或体外杀精子剂)联合应用,是有其避孕价值的,也为男性参与计划生育提供了一种可行和有效的方法。

研究表明,“热压”不明显影响实验动物体内 FSH 和 LH 变化^[2,6]。隐睾手术后外周血睾酮(T)水平从第 1 天起明显降低,之后一直保持较低水平,这可能与孤儿受体 LHR-1 和 LXR_s 在睾丸中表达异常有关。本研究通过对志愿受试者的试验观察,试验 1 个月后血清水平明显增高,可能与试验刚开始机体保护性反应有关,实验 3 个月后,血清 T 明显下降,LH 及 FSH 水平明显增高,与试验前比较有差异。精浆 EGF 水平无明显改变,说明 THT 对睾丸上皮细胞的影响不大。

初步试验证明,睾丸“热压”主要影响早 I-IV 和晚 XII-XIV 期生精细胞的凋亡。Guo 等^[6]对 60 余只食蟹猴的实验证实,43 °C 局部温浴睾丸合并长效睾酮埋植对生精细胞凋亡则有叠加效应,处理后到 28 d 后即可达到避孕目的,到 40⁺ d 后达到无精效果。在 84 d,抽出睾酮埋植胶囊,到 144 d 精液中精子数恢复处理前水平。这些发现为设计简单方便的睾丸热压避孕或热压组合长效睾酮男性避孕措施提供了重要的可行的理论基础和科学依据。本研究观察到人 THT 1 个月、2 个月和 3 个月后,精子正常形

态和精子 DNA 完整率明显下降,说明 THT 能够对精子形态和精子 DNA 造成损伤。

睾丸热压试验是为男性参与计划生育提供参考数据,真正用于临床男性避孕还需要与其他避孕方法联合应用以加强避孕效果。但目前能够用于男性避孕节育的方法不多,而控制人口数量仍然是我国计划生育长期的目标。通过睾丸温浴引起精子质量下降达到避孕目的。本文进行了初步临床试验,特别是睾丸温浴后精子 DNA、形态及功能等变化,也可能为男性不育的研究提供一些参考数据。睾丸局部温度过高在人类 1 个月即可出现精子功能、DNA、结构及数量的异常,个别可达无精子状态。因此,不育男性应该引起注意,避免较长时间在高于体温环境下生活或工作。

参 考 文 献

- 1 Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, 2015, 149:159-167.
- 2 刘以训. 我国男性避孕研究的发展前景. *自然科学进展*, 2004, 14: 249-255.
- 3 Zhang CP, Yang JL, Zhang J, et al. Notch signaling is involved in

ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology*, 2011, 52:2437-2447.

- 4 Zhang MH, Shi ZD, Yu JC, et al. Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-specific proteinases 3 changes in fertile men, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2015, 32:747-755.
- 5 Zhang MH, Zhang AD, Shi ZD, et al. Changes in Levels of Seminal Nitric Oxide Synthase, Macrophage Migration Inhibitory Factor, Sperm DNA Integrity and Caspase-3 in Fertile Men after Scrotal Heat Stress *PlosOne*, 2015, 29.
- 6 Guo J, Tao SX, Liu YX. Heat treatment induces liver receptor homolog-1 expression in monkey and rat Sertoli cells. *Endocrinology*, 2006, 148:1255-1265.
- 7 World Health Organisation 2010 WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press, Prepublication version:30-32.
- 8 Qiu Y, Wang LG, Zhang LH, et al. Sperm chromosomal aneuploidy and DNA integrity of infertile men with anejaculation. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29: 185-194.
- 9 Qiu Y, Wang LG, Zhang LH, et al. Quality of Sperm Obtained by Penile Vibratory bratory Stimulation and Percutaneous Vasal Sperm Aspiration in Men with Spinal Cord Injury. *J Andrology*, 2012, 33: 1036-1046.

(收稿日期:2016-04-28)

(编辑:车艳)

(上接第 74 页)

损害卵巢^[11],这也表明 IVF-ET 成功的关键还取决于获卵的质量,而需要选取合理的 Gn 剂量,获得最佳获卵率。本研究中获卵数随着 hCG 日 E₂ 的增加呈上升趋势,说明 hCG 日 E₂ 的增加对排卵具有促进作用。

综上所述,要想提高 IVF-ET 的胚胎着床率和临床妊娠率,必须获得足够多的高质量卵母细胞,因此要针对不同的受孕者制订个性化的超促排卵计划,但是本文选取的样本有限,对于 hCG 日 E₂ 具体剂量研究还存在不足,需要在以后的实验中扩大样本空间,提高结论的完整性。

参 考 文 献

- 1 蒋彦,曹琴英,李淑贤等. IVF 获卵数、全胚冷冻与体外受精胚胎移植妊娠结局的关系. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21: 97-98.
- 2 Borini A, Cattoli M, Bulleted C, et al. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1127:49-58.
- 3 许定飞,伍琼芳. 超长方案和拮抗剂方案在 PCOS 患者行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗中的应用比较. *江西医药*, 2015, 10: 13-15.
- 4 张帅,张玉环. 腹腔镜保守性手术联合戈舍瑞林治疗重度卵巢内异症疗效及影响因素分析. *现代仪器与医疗*, 2014, 11: 110-112.

- 5 Maheshwari T, Kalampokas J, Davidson S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 2013, 100:1615-1621.
- 6 孙丽君,孙革青. 改良超长方案在体外受精-胚胎移植中的应用. *中国实用医刊*, 2014, 41: 7-9.
- 7 李萍,丁露,沙艳伟. 影响 IVF-ET 妊娠结局的相关因素分析. *中国妇幼保健*, 2013, 28: 2247-2249.
- 8 杨见青,张英. 月经不调青年女性的超声表现及相关影响因素分析. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2013, 2: 25-27.
- 9 Shi W, Hongwei T, Zhang W, et al. A Prospective Randomized Controlled Study of Laser-Assisted Hatching on the Outcome of First Fresh IVF-ET Cycle in Advanced Age Women. *Reprod Sci*, 2016, 23:1397-1401.
- 10 Chang EM, Han JE, Kim YS, et al. Use of the natural cycle and vitrification thawed blastocyst transfer results in better in-vitro fertilization outcomes: cycle regimens of vitrification thawed blastocyst transfer. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2011, 28:369-374.
- 11 柒铭铭,凌国灿,周建萍. 促排卵联合 Pureception™ 密度梯度法优选精子在 AIH 中的应用. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2013, 30:38-41.

(收稿日期:2016-07-01)

(编辑:车艳)