

活性氧与男性不育

山东大学山东省立医院生殖中心(济南 250021) 谭迎春 陈子江 综述

氧对在氧环境中生存的细胞而言,是个矛盾。少量、持续的活性氧(reactive oxygen species, ROS)刺激有利于维持细胞的正常功能。过量的活性氧引起氧化应激,损伤机体的氧化防御系统。精子膜含有大量多聚脂肪酸,而细胞中含有低浓度氧化物清除酶,所以精子特别容易受到ROS诱导的损伤。有报道:25%~40%不育男性的精液可检测到高水平的ROS^[1]。由于高水平ROS对精子功能的潜在毒性,所以ROS越来越受到关注。

一、活性氧与精子生理

Aitken首先提出适量ROS在生理状态下调节精子功能^[2]。大量证据表明少量ROS对精子获得受精能力是必需的。动物在受精前精子获能和顶体反应时,通过一系列的生化反应,导致精子活力的变化,而这些变化是O₂⁻和H₂O₂导致的氧化过程的一部分。精子获能时,人精子质膜上含有的NADPH氧化酶的活性增高,O₂⁻增加^[3],加入SOD去除O₂⁻则抑制精子获能。在精液中加入次磺嘌呤-次磺嘌呤氧化酶-还原酶系统(X-XO-C)产生外源性O₂⁻,精子获能率显著增加,这表明O₂⁻是精子获能过程所必需的。在精子获能过程中O₂⁻可能参与了氨基葡聚糖导致的精子质膜的改变。研究发现低水平ROS能增加精子与透明带结合的能力,精子与低浓度H₂O₂共孵育,可袭击精子的获能、顶体反应和与卵子的融合能力^[4]。O₂⁻、NO被证明具有类似作用。精子质上的SOD酶系统氧化O₂⁻产生H₂O₂,H₂O₂浓度>50 μmol/L时使精子质膜上或线粒体膜上的蛋白巯基氧化,膜结构受损,精子活力显著降低;但是生理浓度的H₂O₂不但对精子无害,还可诱导精子的顶体反应。

二、ROS的产生与清除

(一) 精子自身产生的ROS

所有精液都具备ROS的潜在来源。每一份精液中都有部分精子受到氧化损伤并伴有功能受损,所以ROS对男性生殖病理的影响不是存在与否的问题,而是程度问题。Fisher和Aitken^[5]的研究揭示在从粗线期精母细胞到附睾尾部成熟精子的不同分化时期,成熟雄性大鼠、小鼠和豚鼠生殖细胞均能产生ROS。同样,不同分化时期的人类精子也能产生ROS。精子产生ROS有两种方式:一种是精子线粒体呼吸链的一系列氧化反应中产生的;另一种途径是存在于精子膜上的NADPH氧化酶与其底物反应生成ROS。线粒体系统产生ROS是男性精液ROS的主要来源。

精子发生过程受到损害时,胞质延伸机制功能缺陷,携带过量胞质的精子从生殖道上皮中释放出来。在这种情况下释放的精子往往是未成熟且功能缺陷的。Ollero等^[6]研究发现精液ROS水平与正常形态精子所占百分比成正比。未成熟精子的ROS水平较高,成熟精子ROS水平较低。产生ROS的未成熟精子的比例与成熟精子核DNA完整性成正相关,与精子活力成负相关。由此可假设在从附睾到输精管的迁移过程中,未成熟精子产生ROS的对成熟精子的氧化损伤可能是男性不育的重要原因。

(二) 白细胞产生的ROS

白细胞存在于整个男性生殖道,在每份精液中均可检出。精液中白细胞的临床意义目前仍然存在争议。一方认为:白细胞精子症与精子量下降、功能缺陷相关,有研究发现实验室诊断为白细胞精子症的不育男性,其精子悬液中的ROS水平明显高于无白细胞精子症的不育男性;另一方认为精液白细胞浓度与精子质量、功能缺陷无关。世界卫生组织规定白细胞精子症为过氧化物酶染色阳性的白细胞浓度>1×10⁶/ml精液。过氧化物酶染色阳性细胞包括多形核白细胞和吞噬细胞,前者占精液白细胞的50%~60%,后者占总数的20%~30%。这些白细胞主要来源于前列腺和精囊,是精液高水平ROS的主要来源。激活的白细胞能激活NADPH酶,产生的ROS的量是未激活白细胞的100倍。

多形核细胞和吞噬细胞中的绿色氧化酶(myeloperoxidase)也被激活,引起“呼吸爆发”,产生大量ROS。这种氧化爆发是针对炎症的早期有效的防御措施。如果精液白细胞浓度异常升高,例如白细胞精子症或辅助生殖技术中精浆被去除时,白细胞产生的ROS就会对精子造成损伤。

(三) ROS的清除

生命的进化使细胞发展了有效的抗氧化防御机制。在生殖系统中,具有多种保护精子对抗ROS损伤作用的抗氧化剂和抗氧化酶类。男子附睾是贮存营养、促使精子成熟的最佳部位,也是保护精子不受氧化损伤的部位。尽管精子胞浆本身含有少量抗氧化酶,但精浆具有的氧化防御机制可作为有力补充来保护精子。在射出体外的精液中,保护精子免遭ROS损伤的抗氧化剂主要为维生素E、维生素C、谷胱甘肽、牛黄酸、尿酸等小分子物质,抗氧化酶类主要为过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等。其中,最重要的

抗氧化物是超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶。每一种抗氧化物都具有特异性,其作用不能互相替代,且具有协同作用,从而达到对细胞的全面保护。

三、活性氧对精子的损伤

在人类生殖中,男性生殖道中 ROS 产生和清除之间存在一种平衡。与男性生殖道异常相关的 ROS 过量产生,能损伤精子和精浆的全部抗氧化防御措施,当超过临界水平时,引起一种氧化应激(oxidative stress, OS)状态。氧化应激的程度不仅取决于 ROS 的性质和数量,暴露于 ROS 的时机和时间长短,而且受温度、气压、外部环境成分(如离子、蛋白、ROS 清除剂)的影响。由于精子缺乏胞质抗氧化酶系统,所以不能对过量 ROS 造成的损伤进行及时地修复,这是精子对氧化攻击具有独特的易感性的原因之一。

(一)对精子膜脂质过氧化反应的影响

ROS 从脂肪酸侧链甲烯碳中夺取氢原子可启动脂质的过氧化,脂肪酸侧链中双链数目越多越容易失去氢原子,被夺去氢原子的脂质过氧化物又可从相邻脂肪酸侧链中夺取氢原子而扩展脂质过氧化链式反应。精子膜上富含多聚不饱和脂肪酸,后者具有两个或更多的双链,因此易受 ROS 攻击,发生过氧化反应,导致精子膜发生过氧化改变的损伤。过量的氧自由基能使精子质膜的脂质发生过氧化反应,质膜拓扑结构遭到破坏,导致精子中段缺陷数增高、活动度下降,都将损及精子获能和顶体反应的发生,影响精子的受精能力。

(二)对精子运动能力的影响

ROS 水平升高能显著降低精子的运动能力,可能与 ROS 影响了精子膜流动性,造成轴丝蛋白质磷酸化程度降低和精子制动有关。 H_2O_2 能渗入细胞膜内,抑制某些酶活性,如 G_6PDH , 导致 $NADPH$ 利用下降并伴随氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽的累积。这会引起精子抗氧化防御能力降低,最终导致膜磷脂的过氧化。Tomes 等^[7]认为精子尾部蛋白酪氨酸基团磷酸化可能是精子产生运动的机制之一。ROS 可使色氨酸、鸟氨酸等硝基化或羟化,使巯基氧化,导致生殖系统中使精子蛋白酪氨酸磷酸化-去磷酸化作用的一些酶以及的精子运动有关的许多重要的酶被抑制、灭活以及活性部位破坏,影响精子的运动。

(三)对精子 DNA 的影响

精子 DNA 以一种特殊的方式使染色质在核中紧密压缩并处于稳定状态^[8]。这种 DNA 构成方式不仅允许极其紧密的遗传信息被转移到卵中,而且保证了 DNA 能以一种物理的和化学的形式传递,这种形式允许发育中的胚胎获得遗传信息。有两个因素保护精子 DNA 免遭氧化攻击:精子 DNA 的特征性紧密包装以及精浆中存在的抗氧化物。将精子暴露于人工产生的 ROS 能

引起 DNA 损伤,这种损伤包括碱基被修饰,产生无碱基位点、缺失、移码、DNA 交联以及染色体重排^[9]。OS 也与高频率的单股和双股 DNA 断裂有关,在不育男性精液的高水平 ROS 往往伴随超出正常的精子 DNA 断裂^[10]。精子在体外与 ROS 共同孵育,可显著增加 DNA 片段,抗氧化剂预保护可降低对 DNA 的损伤。Trisini 等^[11]运用彗星实验检测精子 DNA, 并发现具有高水平 DNA 片段的精子的运动能力、密度也下降。

四、活性氧与辅助生殖技术

精液的处理是辅助生殖技术中的重要方面。辅助生殖技术(assistant reproductive techniques, ART)中常常需要应用离心、去除精浆、冷冻等技术。去除精浆不可避免地破坏了精浆中抗氧化酶的作用。研究发现离心、冷冻等步骤也不同程度的与活性氧相关。

(一)离心

研究发现精液多次离心会显著增加 ROS 水平^[12]。离心时间相对离心力来说,对人类精子 ROS 产生的影响更大。Zini^[13]发现密度梯度离心后精子运动能力的提高并不能提高精子 DNA 完整性。建议在现行精子准备技术中将尽量降低 DNA 损伤、减少潜在的基因突变的危险。

(二)冷冻

Mazzilli^[14]将上游法取得的精子冷冻保存,发现 42.2% 精子冷冻后 ROS 水平较冷冻前升高; 20% 冷冻前 ROS 阴性,冷冻后可检测到 ROS。由此证明冷冻保存可引发或增加 ROS 的产生, Wang^[15]等研究传统的慢速冷冻对精液 ROS 水平的影响,发现温度降至 4℃ 时,产生的 ROS 量最大。精子冷冻保存时,逐渐降低温度会显著提高 ROS 水平。去除白细胞或加入抗氧化剂可以提高精子存活率和功能。在精子冻融过程中,精液 GSH 活性降低 78%, SOD 活性降低 50%, 冷冻不仅增加 ROS 的产生,而且降低氧化防御系统的能力^[16]。Brouwers^[17]应用膜脂质过氧化反应探针 C11-BODIPY (581-591) 研究冻融对单个牛精子的影响,发现精子中段和尾部的损伤较头部重。

(三)ICSI 技术

暴露于高水平 ROS 的精子能引起 DNA 断裂,如果应用于辅助生殖技术中,可能产生不良后果。当采用宫腔内人工授精或体外授精时,这种损伤可能不会被关注,因为 DNA 损伤的精子不能发生受精。然而,当使用 ICSI 时,自然选择障碍被绕过,携带损伤 DNA 的精子被直接注射入卵中。DNA 损伤的精子用于 ICSI 是否损害受精过程和胚胎发育目前尚不清楚。一方面,最近的一项研究表明,携带明显 DNA 损伤的精子仍然保持一部分受精的能力^[18]; 另一方面, DNA 损伤精子的百分数与受精率呈负相关^[19]。此外,有一项新研究已经将精子 DNA 损伤与早期胚胎死亡增加联系起来^[8]。Tesarik^[19]研究发现精子 DNA 完

整性与8细胞胚胎的发育结局相关。此时,来源于精子的基因开始表达即晚期父方因素开始发挥作用。Bungum^[20]应用染色质结构分析法研究精子DNA完整性与ART妊娠结局的关系,发现精子DNA片段>27%时,ICSI组妊娠率高于IVF组。

结 语

少量持续的活性氧是精子受精、获能等生理过程中所必需的,但过量活性氧造成氧化应激,会导致精子膜损伤,影响精子功能。氧化应激不仅影响精子膜流动性,而且损伤精子核DNA的完整性。活性氧可以说是男性不育的重要病因和病理因素之一。在男性不育患者的药物治疗中,抗氧化治疗已经成为大家的共识,Vc、VE、己酮可可碱等药物已在临床广泛应用。随着辅助生殖技术的蓬勃发展,如何尽量减少ROS对ART的负面影响是需要关注的问题。

参 考 文 献

- 1 Padron OF, Brackett NL, Sharma RK. *et al. Fertil Steril* 1997; 67(6): 1115-1120
- 2 Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. *Biol Reprod* 1989; 41(1): 183-197
- 3 Meier B, Cross AR, Hancock JI. *et al. Biochem J* 1991; 275(1): 241-245
- 4 de Lamirande E, Gagnon C. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(2): 255-265
- 5 Fisher HM, Aitken RJ. *Exp Zool* 1997; 277(5): 390-400
- 6 Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, *et al. Hum Reprod* 2001; 16(9): 1912-1921
- 7 Tomes CN, Carballada R, Moses DF, *et al. Mol Hum Reprod* 1998; 4(1): 17-25
- 8 Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, *et al. Rev Reprod* 1999; 4(1): 31-37
- 9 Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. *Fertil Steril* 2000; 74(4): 715-720
- 10 Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. *Biol Reprod* 1997; 56(3): 602-607
- 11 Trisini AT, Singh NP, Duty SM, *et al. Fertil Steril* 2004; 82(6): 1623-1632
- 12 Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. *Arch Androl* 1994; 32(3): 169-174
- 13 Zini A, Finelli A, Phang D, *et al. Urology* 2000; 56(6): 1081-1084
- 14 Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, *et al. Acta Eur Fertil* 1995; 26(4): 145-148
- 15 Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, *et al. Urology* 1997; 49(6): 921-925
- 16 Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, *et al. Mol Reorod Dev* 2000; 55(3): 282-288
- 17 Brouwers JF, Gadella BM. *Free Radic Med* 2003; 35(1): 1382-1391
- 18 Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, *et al. Biol Reprod* 1998; 59(5): 1037-1346
- 19 Tesarik J. *Reprod Biomed Online* 2005; 10(3): 370-375
- 20 Bungum M, Humaidan P, Spano M, *et al. Hum Reprod* 2004; 19(6): 1401-1408

(2005-06-21 收稿)

(上接第67页)

- 12 McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. *Biol Reprod* 2002; 66(5): 1374-1379
- 13 von Schonfeldt V, Krishnamurthy H, Foppiani L, *et al. Biol Reprod* 1999; 61(3): 582-589
- 14 Dym M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11287-11289
- 15 Nagano M, Brinster RL. *APMIS* 1998; 106(1): 47-55
- 16 Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, *et al. Biol Reprod* 2003; 68(1): 272-281
- 17 Feng LX, Chen Y, Luis Dttin L, *et al. Science* 2002; 297(5580): 392-395
- 18 Shambloitt MJ, Axelman J, Wang S, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13726-13731
- 19 Lee DR, Kaproth MT, Parks JE. *Biol Reprod* 2001; 65(3): 873-878
- 20 杨延飞, 张涌. *细胞生物学杂志* 2005; 27(2): 221-224
- 21 Kerr DA, Llado J, Shambloitt MJ, *et al. J Neurol Sci* 2003; 23(12): 5131-5140
- 22 Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, *et al. Biol Reprod* 1998; 59(6): 1439-1444
- 23 Wentworth BC, Tsai H, Hallett JH, *et al. Poult Sci* 1989; 68(7): 999-1010
- 24 Brinster RL. *Science* 2002; 296(5576): 2174-2176
- 25 Oatley JM, de Avila DM, Mc Lean DJ, *et al. J Anim Sci* 2002; 80(7): 1925-1931

(2005-06-22 收稿)