

影响精子DNA损伤因素研究进展

戴汝琳 刘睿智

(吉林大学白求恩医学院细胞生物学教研室, 吉林省生殖医学研究所, 长春, 130021)

【摘要】精子DNA损伤是引起不育的原因之一, 同时可以增加遗传缺陷风险, 因此对精子DNA损伤的研究已成为生殖医学的热点之一。精子DNA检测在评价男性不育患者时越来越受到重视。精子中的DNA包括核DNA和线粒体DNA, 它们均易受损伤, 损伤机制可能有氧化应激、精子染色质组装缺陷、异常凋亡。精子DNA损伤与很多因素有关, 如化学治疗和放射治疗、高龄和生活方式、睾丸温度升高、吸烟与生殖道炎症、环境毒素、精索静脉曲张、激素等, 它是多因素共同作用的结果。

关键词: 精子; DNA损伤; 核DNA; 线粒体DNA

中图分类号: R698⁺.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-357X(2009)06-0385-05

精子DNA对繁衍后代有重要意义。精子DNA损伤会影响受精、受精卵分裂和胚胎发育, 最终导致不孕不育、流产死胎、胎儿、婴儿发育异常, 如子代智力低下和染色体疾病等^[1]。而常规精液分析不能对男性生育能力和辅助生殖的预后进行准确评价, 且很多不育是不明原因的。精子DNA检测能弥补其不足, 故精子DNA检测在评价男性不育患者时越来越受到重视。精子DNA损伤可由很多原因造成, 是多因素共同作用的结果。了解影响精子DNA损伤因素, 可对其加以预防和治疗。

1 精子DNA

与体细胞松散的染色体结构不同, 人类精子DNA双链则是与鱼精蛋白分子(主要是精氨酸)紧密缠绕形成的高度有序的紧密环。这种特殊结构, 即鱼精蛋白中尤其是巯基(SH)不断氧化成二硫键(S=S)与DNA紧密结合, 使其更具有抗酸能力, 染色质浓

缩, 从而使染色体结构稳定^[2]。精子中的DNA成分包括2个部分: 位于精子头部的核DNA以及位于精子中段线粒体中的线粒体DNA(mtDNA)。精子DNA大部分由核DNA构成, 小部分为mtDNA。核DNA和mtDNA异常均会使精子DNA损伤, 导致精子DNA完整性异常。

1.1 精子核DNA

精子核包含了父方遗传物质, 其主要成分为DNA及核蛋白。在精子发生、形成、成熟过程中, 生精细胞核DNA及核蛋白均发生一系列变化, 其中核DNA浓缩过程中进行了局部重排, DNA结合蛋白组型转换以及核小体结构丢失并最终形成高度浓缩的核DNA。只要任何一项变化发生异常, 均会直接导致生育力异常。在这里要特别指出: DNA结合蛋白组型转换过程中, 精子细胞核内组蛋白被鱼精蛋白替代, 使核基质和核蛋白结合更加紧密, 从而使精子细胞核重新塑形和浓缩, 对保护精子基因组在精子面临外界应激时完整性具有重要作用(如温度升高和女性生殖道的氧化作用)。已有文献表明: 鱼精蛋白水平改变易导致精子DNA损伤, 从而导致不育或影响辅助生殖技术结果^[3]。

本课题为吉林省科技厅资助项目, 项目号: 20060724

通讯作者: 刘睿智; Tel: +86-431-88883399;

E-mail: lrz420@126.com

1.2 精子线粒体DNA

mtDNA 较小, 环状, 不与蛋白结合。由于 mtDNA 各基因紧密排列甚至相互重叠, 缺少组蛋白和非组蛋白保护, 且无 DNA 损伤修复系统, 易受氧化磷酸化所产生的活性氧的损伤^[4], 故有较高的突变率。虽然 mtDNA 主要是由母系遗传, 但也有相关报道证实父代 mtDNA 有部分可变异传递给子代(不超过 1%)^[5]。所以, 检测 mtDNA 对男性不育评估诊断有一定意义。

2 精子DNA损伤机制

精子DNA损伤主要表现为精子DNA双链断裂, 其损伤机制可能有以下几种:

2.1 氧化应激

氧化应激主要由精液中活性氧(reactive oxygen species, ROS)和精浆抗氧化能力不平衡所产生。在生殖系统各器官和组织中, ROS 的产生是一种生理现象, 少量适当的 ROS 有助于精子获能和顶体反应; 过量 ROS 超过了抗氧化系统的清除能力和防御能力时, 则导致精子 DNA 双链断裂、产生单链。且由于精子细胞膜中含有大量不饱和脂肪酸, 因此理论上精子极易受到 ROS 的损害。ROS 可能通过直接氧化精子 DNA 碱基, 也可能通过脂质过氧化产物与 DNA 的共价结合, 引起精子 DNA 链断裂。男性生殖系统中高水平的活性氧类主要由精液中白细胞和非成熟精子细胞产生。精液中增多的白细胞可以刺激人类精子产生 ROS, 这种刺激可以通过细胞-细胞接触或白细胞产生的可溶性产物等多种途径介导^[6]。25%~40% 的不育男性精液中存在高水平的 ROS。有研究指出^[7]: 男性原发性少精和隐睾引起不育的患者, 精液中 ROS 水平明显增高, 其精子 DNA 损伤高于正常对照组, 说明氧化应激与精子 DNA 损伤有显著相关性。

2.2 精子染色质组装缺陷

染色质组装正确是正常精子功能的基础。精子染色质组装异常可导致精子DNA双链断裂; 导致精子核DNA损伤的主要环节是鱼精蛋白替代组蛋白时出现异常^[8]。在精子发生过程中, 一方面, 染色质的组装需要内源性核酶(拓扑异构酶 II)和转运蛋白参与, 以建立和连接 DNA 缺口, 有助于组蛋白被鱼精蛋白替换过程中染色质重组, 但也可能造成精子发生异常或精子 DNA 损伤。另一方面, 是鱼精蛋白

出现缺陷: 受到损伤或不成熟的精子, 其鱼精蛋白的大量巯基(SH)不能氧化成二硫键, 故不能与 DNA 紧密结合, 结果形成结构松散的染色质, 结构不稳定, 其 DNA 在酸的作用下变性成单链, 最终导致精子 DNA 损伤。Aoki 等研究证实^[9]: 鱼精蛋白-1(P1)或鱼精蛋白-2(P2)浓度降低的不育患者精子 DNA 损伤明显增高。因此, 鱼精蛋白缺陷也是导致精子 DNA 损伤的原因之一。

染色质组装出现异常, 也可能是由于 DNA 双链断裂出现了异常, 因为 DNA 双链的断裂能自然发生于精子发生过程中染色质重组准备阶段和染色质组装的过程中。因此, 检测染色质组装缺陷可解释精子 DNA 损伤。

2.3 凋亡异常

精子发生过程中, 凋亡维持了生精细胞和支持细胞数量上的平衡, 且控制精子生成和增殖水平, 保持精子在数量、形态和功能上的平衡。有研究指出^[8]: 生精细胞的凋亡主要由生精细胞表面的 Fas 和支持细胞表面的 Fas 配体(Fas ligand, FasL)通过 Fas/FasL 途径介导, Fas/FasL 途径可能是控制精子凋亡的重要途径^[10]。有生育力男性 Fas 阳性精子比例很少, 而精液参数异常者 Fas 阳性精子高达 50%, 提示其清除 DNA 受损精子的能力不足, 易导致精子 DNA 损伤^[11]。凋亡异常导致精子 DNA 损伤的另一个机制与半胱天冬酶(caspase)有关: 内源线粒体膜中的 Fas/FasL 被阻断, 导致了 caspase 8 和 9 激活, 传导到 caspase 受体信号, 进而脱氧核糖核酸酶(DNA 断裂因子 40)被活化, 最终使精子 DNA 断裂。

3 影响精子DNA损伤的因素

精子DNA损伤与男性不育之间关系密切, 包括睾丸内外的因素。国内外已分别有相关报道证实以下因素可造成精子DNA损伤发生率增高, 根据这些因素可以了解男性不育病因, 给予相应预防和治疗。

3.1 化学治疗和放射治疗致精子DNA损伤

化学治疗和放射治疗是肿瘤患者提高存活率和治疗效果的主要途径, 但同时也带来许多副作用。在经过肿瘤特异性治疗和细胞毒性药物治疗后, 往往导致不育发生, 其原因可能因为快速增殖的睾丸生精上皮是化疗和放疗的天然作用靶位, 放、化疗在对肿瘤治疗的同时, 也损害了生精上皮^[12,13]。尽管没

有临床证据,但大多数专家建议患者在放、化疗后12~24个月后受孕。由于肿瘤化学治疗和放射治疗刺激生殖腺的作用,对将要进行放、化疗的年轻男性患者,都建议进行精子冷冻保存,以备以后使用。Sakamoto等指出^[13]:有患者在经过肿瘤放、化疗后严重影响生育能力,进行卵胞浆内精子注射技术(ICSI)后仍然不能受孕。

Spermon等对双侧睾丸生殖细胞癌患者进行化疗前、后激素水平测定,结果显示^[14]:标准剂量化疗不会导致睾酮水平的显著降低,但会使血清促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH)水平增高。

3.2 高龄和生活方式

高龄父母生育孩子越来越受到社会关注,主要是年龄与异常妊娠和出生缺陷之间的联系。女性生育力下降主要归因于卵母细胞的丢失,高龄产妇容易导致流产、产生染色体异常的后代。同样,尽管男性老年化时精子发生过程仍然能正常进行,但已证实男性生育力随着年龄增加而降低,然而仍不能解释精子DNA完整性异常主要类型(基因突变、易位、缺失、染色体出现单、双链断裂和非整倍体等)与男性年龄的依存关系^[15]。

Schmid等对80位不吸烟的健康人群(平均年龄46.4岁)用单细胞凝胶电泳实验进行精子DNA损伤检测^[16],结果显示男性年龄增长和精子DNA损伤有关联;同时指出:每天喝3杯或更多咖啡的人群,其精子DNA双链断裂发生率大大提高,所以认为精子DNA损伤与咖啡因摄入量呈正相关。其原因是咖啡因是一种生物碱,有2种生物活性可以解释:咖啡因代谢产物为可可碱和黄嘌呤,可减少 Cu^{2+} ,产生氧自由基,增加氧化应激而导致DNA双链断裂;

咖啡因是DNA双链修复的有效抑制剂,所以高剂量咖啡因可导致精子DNA双链断裂。

3.3 睾丸温度升高

正常人类睾丸位于阴囊中,温度比腹腔低,为睾丸生精过程提供适宜环境。睾丸温度升高会影响精子发生过程,目前关于高温对睾丸生精过程的影响和精子DNA损伤确切机制尚不清楚。Stephen等用小鼠实验研究睾丸温度升高与男性不育的关系^[17],给小鼠施加30 min 42℃热应激,结果证实阴囊温度增高可导致精液质量和精子DNA完整率均下降。其原因可能是:作用在睾丸和附睾的热应激导致冷诱导RNA结合蛋白(Cirp)表达减少,而使生殖细胞凋亡数

量增多,造成生精能力丧失。睾丸温度升高可导致精子DNA损伤的例证对要行体外受精(IVF)和ICSI的患者有重要的临床意义。另外,睾丸温度升高导致精子DNA损伤的机制有:高热可造成组氨酸/精氨酸比率增高,即组蛋白与鱼精蛋白比率增加,最终导致精子DNA结构改变,使精子DNA损伤。

一些日常行为,如桑拿、热浴、直接睾丸热疗以及长期使用计算机和长时间驾驶都可使阴囊温度增高。

3.4 吸烟与生殖道炎症

已有研究探讨过吸烟与男性不育的关系,如吸烟对精液质量的有害影响,Ramlau-Hansen对2542名健康男性进行检测^[18],结果显示吸烟与精液量、精子数目和活率呈负相关;吸烟对精子DNA有负面影响。Sepaniak等用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测51名吸烟男性和57名不吸烟男性DNA损伤程度,结果吸烟者DNA链断裂发生率显著高于不吸烟者,分别为32%和25.9%($P<0.01$),证实吸烟对精子核质量有损害效应^[19]。分析吸烟导致精子DNA损伤的原因,可能是精液中白细胞产生的活性氧类增加,但确切机制还有待进一步研究。

生殖道感染性疾病是导致男性不育重要因素之一。生殖道感染和非特异性炎症增加了精子DNA损伤,其原因可能为炎症导致精液中白细胞数量增加^[20,21]。预防男性生殖道炎症,对防治男性不育有重要意义。

3.5 环境毒素

男性不育影响因素之一是人们密切接触并赖以生存的环境质量变化,环境因素与精子DNA损伤间存在一定关系。Rubes等对间断性暴露于高于美国空气质量标准环境中生活的捷克人行精子染色质结构分析试验(SCSA)^[22],结果显示:暴露于空气污染环境中的人,精子DNA损伤率有显著增高,从而导致男性不育、流产死胎等情况。同样,环境中还存在其他环境污染物质,塑料制品和农药的大量使用使环境中持续存在难溶性降解产物,继而对男性生殖系统产生损害。研究表明^[20]:尿中邻苯二甲酸酯单酯酶和氧化代谢产物均与精子DNA损伤有显著相关性。丙烯腈(CAN)或其代谢产物作为一种体内多效应遗传毒性物质,可以诱导生精过程中精子DNA链断裂^[23]。农药也能对精子DNA产生损伤。此外,甲苯、2,4,

6-三硝基甲苯及其代谢产物等均可诱发精子DNA氧化性损伤^[24]。

3.6 精索静脉曲张

精索静脉曲张已被证实是导致男性不育的重要原因之一。虽然现在精索静脉曲张导致睾丸功能和生育力下降的发病机制还不是很清楚^[26],但已有研究表明^[27-29]:即使精液常规分析正常,精索静脉曲张也是导致睾丸功能继发性损害和不育的危险因素之一。在精索静脉曲张患者中,精子DNA损伤程度远高于正常人群,且精子DNA损伤程度与精浆中活性氧浓度呈正相关。有实验研究得出^[27, 28]:精索静脉曲张患者在行完精索静脉曲张结扎术后,精子DNA完整性能得到显著提高,同时术后患者精浆抗氧化能力增强,而使氧化应激减弱^[29]。

3.7 激素

卵泡刺激素缺乏可引起精子染色体缺陷,动物实验显示^[30]:与野生型小鼠相比,卵泡刺激素受体基因敲除小鼠所表达的精子核精氨酸和睾酮水平低下,细胞核鱼精蛋白含量降低,生育力受损,且DNA损伤更严重。

Anderson等在使用6种雌激素混合物处理人类精子后也观察到精子细胞DNA受到损伤,其原因可能是:试验者体内过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和维生素C都明显下降,提示抗氧化能力下降,氧化应激增强而导致精子细胞DNA损伤^[31]。

综上所述,精子DNA损伤可以增加遗传缺陷风险,是引起不育的重要原因。精子DNA损伤的可能机制主要有氧化应激、精子染色质组装缺陷、凋亡异常。精子DNA损伤可由很多原因造成,是多因素共同作用的结果,根据这些因素可以了解男性不育的病因,给予相应的预防和治疗。

参考文献:

[1] Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 2000, 15(4):830-9.

[2] Boe-hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, et al. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, 2006, 21(6):1576-82.

[3] Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007, 5(8):36-51.

[4] St John JC, Jokhi RP, Barratt CL. The impact of mitochondrial

genetics on male infertility. *Int J Androl*, 2005, 28(2):65-73.

[5] Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *Ugeskr Laeger*, 2003, 165(38):3627-30.

[6] Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, 2002, 78(6):1215-24.

[7] Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Méd Chil*, 2007, 135(3):279-86.

[8] Muratori M, Marchiani S, Maggi M, et al. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci*, 2006, 11(1):1491-9.

[9] Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Andrology*, 2005, 26(6):741-8.

[10] Xu C, Lu MG, Feng JS, et al. Germ cell apoptosis induced by ureaplasma urealyticum infection. *Asian J Androl*, 2001, 3(3):199-204.

[11] Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod*, 2003, 9(4):331-45.

[12] Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl*, 2002, 25(5):255-61.

[13] Sakamoto H, Oohta M, Inoue K, et al. Testicular sperm extraction in patients with persistent azoospermia after chemotherapy for testicular germ cell tumor. *Int J Urol*, 2007, 14(2):167-70.

[14] Spermon JR, Ramos L, Wetzels AM, et al. Sperm integrity pre-and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod*, 2006, 21(7):1781-6.

[15] Slotter E, Nath J, Eskenazi B, et al. Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril*, 2004, 81(4):925-43.

[16] Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*, 2007, 22(1):180-7.

[17] Banks S, King SA, Irvine DS, et al. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 2005, 129(3):505-14.

[18] Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, et al. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod*, 2007, 22(1):188-96.

[19] Sepaniak S, Forges T, Gerard H, et al. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*, 2006, 223(1-2):54-60.

[20] Kopa Z, Wenzel J, Papp GK, et al. Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital

- tract inflammation. *Andrologia*, 2005, 37(5):188-94.
- [21] Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, et al. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl*, 2002, 23(5):717-23.
- [22] Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod*, 2005, 20(10):2776-83.
- [23] Hauser R, Meeker JD, Singh NP, et al. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod*, 2007, 22(3):688-95.
- [24] Xu DX, Zhu QX, Zheng LK, et al. Exposure to acrylonitrile induced DNA strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa. *Mutat Res*, 2003, 537(1):93-100.
- [25] Nakai N, Murata M, Nagahama M, et al. Oxidative DNA damage induced by toluene is involved in its male reproductive toxicity. *Free Radic Res*, 2003, 37(1):69-76.
- [26] Cozzolino DJ, Lipshultz LI. Varicocele as a progressive lesion: positive effect of varicocele repair. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(1):55-8.
- [27] Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod*, 2006, 21(4):986-93.
- [28] Zini A, Blumenfeld A, Libman J, et al. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod*, 2005, 20(4):1018-21.
- [29] Chen SS, Huang WJ, Chang LS, et al. Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. *J Urol*, 2008, 179(2):639-42.
- [30] Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR. Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(7):697-701.
- [31] Anderson D, Schmid TE, Baumgartner A, et al. Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the comet assay). *Mutat Res*, 2003, 544(2-3):173-8.

(2008年6月17日 收稿)

(正文见第349页 refer to p.349)

Effect of Protein Kinase B (AKT) Inhibitors on Cell Division of Mouse 1-Cell Embryos

Xin DENG¹, Gen-song LI¹, Li-na ZHU¹, Zhou-hong WEI¹, Yang SONG¹,
Ying LIU², Cheng CUI³, Xiao-han SUN², Bing-zhi YU²

(1. Experimental Center of the Functional Subjects, China Medical University, Shenyang, 110001)

(2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang, 110001)

(3. Department of Physiology, China Medical University, Shenyang, 110001)

【ABSTRACT】 Objective: To study the effect of AKT cell division of mouse 1-cell embryos. Methods: Effect of AKT inhibitors on MPF activity, cell division and dephosphorylation status of pCDC2 Tyr15 in mouse 1-cell embryos was detected respectively by activity analysis, counting under dissecting microscope and Western blotting. Results: MPF activity was blocked by the inhibitors of AKT, division rate of 1-cell embryos was decreased by the inhibitors of AKT, dephosphorylation status of pCDC2 Tyr 15 was blocked by the inhibitors of AKT. Conclusion: In 1-cell embryos of mouse, MPF activity, cell division and pCDC2 tyr 15 were regulated by AKT inhibitors.

Key words: AKT; mouse; fertilized eggs; G₂/M transition