

高效液相色谱法测定不育男子精浆左卡尼汀及其临床意义

上海第二医科大学附属仁济医院(上海 200001) 谷荣华* 李 铮 刘 勇
向祖琼 曹小蓉 王益鑫

在男性不育症中,因少、弱精子症原因引起者分别占10.9%~15.0%^[1]。引起不育症患者精子活率、活力降低的原发因素和继发因素较多,附睾功能的下降是较为直接的原因之一。测定精浆左卡尼汀(Levocarnitine,肉毒碱)可部分反映附睾功能。精浆中左卡尼汀含量是血浆的10倍^[2],与精子功能成熟获得运动能力有关,90%左右来源于附睾,是附睾的重要功能性指标。我们应用高效液相色谱法对弱精子症患者精浆中左卡尼汀含量进行测定,并与正常捐精者相比较,现报告如下。

材料与方法

一、标本采集

本研究分实验组与对照组。实验组30例,来自我院男科门诊,年龄28~45岁,平均33.5岁,均为婚后半年以上不育的患者,经检查排除内分泌异常、隐睾、精索静脉曲张、附睾睾丸炎、前列腺炎、精囊炎等疾病,排除女方因素而导致的不育,为特发性男性不育患者。按WHO标准筛选少、弱精患者,经两次精液检查精子密度 $< 20 \times 10^6/\text{ml}$,但 $> 5 \times 10^6/\text{ml}$;且精子活率(a+b级) $< 50\%$,或a级 $< 25\%$ 。对照组20例,年龄25~32岁,平均31岁,经严格筛查符合卫生部“人类精子库技术规范”要求的合格捐精者。按要求禁欲3~5d,用手淫方法取得精液,经精液分析后,精液3000r/min离心10min,取精浆100 μl 置-30℃冻存备用。

二、实验方法

采用高效液相色谱仪(Agilent-1100, USA),配备G1311型四元泵、G1322A型脱气机、G1313A自动进样器和G1314A可变波长检测器。色谱柱为Kromasil 150 \times 4.6mmID(Eka, Sweden),流动相为含70%异丙醇的柠檬酸缓冲液(4mm三乙胺加1.6mm柠檬酸),流速1ml/min,检测波长260nm。进样量为10 μl 。精浆样品处理如下:吸取10 μl ,精浆样品加500 μl 乙晴,振荡后离心10min,吸取上清液160 μl 加入20 μl 。加入左卡尼汀衍生试剂,混匀后60℃保温2h,吸取10 μl 进样分析,按峰高进行定量计算。结果同相应的左卡尼汀标准品浓度进行比较,浓度表示单位 $\mu\text{mol/L}$ 。

三、统计分析

采用SAS6.0软件包对统计结果进行分析,统计结果($\bar{x} \pm s$)表示。对两组均数进行t检验。

结 果

经液相色谱法测定少、弱精子症组与捐精组左卡尼汀的精浆浓度分别为:(116.25 \pm 23.25) $\mu\text{mol/L}$ 、(195.77 \pm 31.67) $\mu\text{mol/L}$;少、弱精子症组与捐精组左卡尼汀的精浆总量分别为(235.98 \pm 18.67) mol、(368.45 \pm 25.30) mol。统计学处理,两组差异非常显著, $P < 0.01$ 。

讨 论

精浆是由附睾及附属性腺分泌物组成的混合物,其中10%来自于附睾,精浆与精子接触时间短暂,但对精子活动、精子代谢、精子获能以及精子受精都起着至关重要的作用,而其中主要来自于附睾的左卡尼汀或称肉毒碱,对精子的成熟和运动有直接的影响。因此,对精浆中左卡尼汀含量的测定,可反映附睾功能正常与否^[3]。我们在本研究中对少、弱精子症与正常捐精者精浆左卡尼汀的浓度和总量运用高效液相色谱法进行测定,前者精浆左卡尼汀浓度与总量均低于后者。

科学家们发现哺乳动物附睾组织中具有丰富的左卡尼汀,且其单位体积的含量明显高于其他器官组织。人体左卡尼汀主要来自饮食摄取和体内生物合成,其合成部位主要是肝、脑和肾,左卡尼汀分布于体内多种组织,以附睾中的浓度最高,附睾本身并不合成左卡尼汀,通过检测附睾左卡尼汀的水平,可了解附睾的分泌和吸收功能。近年来的研究还认为左卡尼汀与精子成熟、运动能力的获得密切相关。左卡尼汀参与脂肪酸氧化过程,它可以转运长链脂肪酰辅酶A进入线粒体内膜进行氧化,左卡尼汀作为脂肪酸代谢的重要辅助因子,为精子在附睾内成熟提供必要的能量来源^[3]。左卡尼汀在精浆中有很高的浓度,其不仅参加精子的能量代谢还与精子的质量有关^[4]。精子在附睾成熟过程中最明显的变化之一是运动能力的获得。众所周知睾丸精子无运动能力或只有微弱的运动能力,从附睾尾部释放出来的精子是完全成熟的。用放射性同位素标记的实验证明诱导精子突然出现活动能力的地点与附睾上皮活跃地转运左卡尼汀的

*进修医师 谷荣华:浙江省温州市计划生育指导站(温州 325003)

地点一致,而且附睾液内左卡尼汀浓度和精子的活动力平行地增加。提示左卡尼汀与精子运动的诱导有密切关系。用附睾远侧的肉毒碱浓度孵育附睾头部近侧的不动精子可使其运动产生。附睾尾部高浓度的左卡尼汀,可能就是起了一个保持附睾尾部精子处于静息状态,以作能量储备,为射出精子的活跃运动提供充分的能量基础^[5]。近年,运用口服补充左卡尼汀治疗不育症,目前已经双盲研究证实可提高不育患者的精子运动质量^[6],尤其当患者合并前列腺炎、附睾炎等疾病时,口服补充左卡尼汀治疗不育症效果显著^[7,8]。

经典检测精浆肉毒碱或左卡尼汀的方法为采用 DTNB 法^[9],其过程复杂,影响结果的变量较多,如取得样本后要减压蒸发至干燥,要通过肉毒碱酰基转移酶,催化生成乙酰肉毒碱,还要制备标准曲线等。高效液相色谱法现已发展成快速准确的分离、分析方法,尤其适应于待测物成分复杂、分子众多的体液成分分析。我们在血液分析左卡尼汀含量的基础上,初步建立了高效液相色谱法分析精浆左卡尼汀的方法。结果发现,测量快速、准确,有待于进一步临床研究。

综上所述,精浆中的左卡尼汀与精子的运动能力密切相关,弱精子症组精浆左卡尼汀浓度低于对照组,其原因有待于进一步研究。另外对特发性少、弱精子症患者,应补充左卡尼汀以增加精子密度,提高精子的运动能力。对某些睾丸穿刺获得的精子可考虑运用左卡尼汀进行孵育,以用于卵泡浆内单精子注射等方面的问题都应进一步作临床探讨。

关键词 精浆左卡尼汀 高效液相色谱法
中图分类号 R 698⁺.2

参 考 文 献

- Gurbuz B, Yalti S, Ficicioglu C, *et al.* Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *J Obstet Gynaecol* 2003; 23: 653-656
- Xuan W, Lamhonwah AM, Librach C, *et al.* Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306(1): 121-128
- Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez JA, Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl* 2001; 24(6): 335-340
- Yeung CH, Anapolski M, Depenbusch M, *et al.* Human sperm volume regulation. Response to physiological changes in osmolality, channel blockers and potential sperm osmolytes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1029-1036
- Enomoto A, Wempe MF, Tsuchida H, *et al.* Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J Biol Chem* 2002; 277: 36262-36271
- Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, *et al.* Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003; 79(2): 292-300
- Vicari E, La Vignera S, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculopididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* 2002; 78(6): 1203-1208
- Vicari E, Calogero AE Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostates-vesiculopididymitis. *Hum Reprod* 2001; 16: 2338-2342
- 熊承良, 吴明章. 人类精子学. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 466

(2004-01-14 收稿)

精索静脉曲张手术的一点改进

浙江瑞安市人民医院 (瑞安 325200) 张 胜

精索静脉曲张临床较常见。原发性精索静脉曲张伴有严重症状都具有手术指征^[1]。由于长期的精索静脉曲张,患者静脉淤血,精索不断拉长,使左右两侧阴囊外观不成比例,尤其以中、重度患者更为明显。对此,我们自2000年10月~2003年5月对45例原发性精索静脉曲张手术做了一点改进:即将远端静脉断

端直接悬吊固定在腹内斜肌上以缩短精索,取得了良好的效果。现报告如下。

资料与方法

一、一般资料

本组患者45例,年龄平均为22.5岁,最大40岁,最小13岁。临床诊断为原发性精索静脉曲张,屏气时更