

精液中硒含量与精子质量和精子 DNA 氧化损伤的关系

徐德祥 Ong Choonnam Shen Hanming Chua Laiha Chia Seneng

【摘要】 目的 探讨血清和精液中硒浓度与精子质量和精子 DNA 氧化损伤的关系。方法 用原子吸收光谱检测血清和精液中硒浓度,按 WHO 规范方法检测精液量、精子数、每次射出精子总数、活力和活动精子百分率及精子畸形率,用高压液相色谱-光电检测系统和高压液相色谱-紫外线检测器同时检测人精子 DNA 8-羟基脱氧核糖鸟苷(8-OHdG)和脱氧核糖鸟苷(dG)水平。结果 已孕组精液硒平均浓度(0.74 μmol/L)明显高于不孕组(0.56 μmol/L),而两组间血清硒平均浓度差异无显著性。已孕组精液量、精子数和每次射出精子总数的平均值(3.91 ml、46.4 ×10⁹/L 和 168.0 ×10⁶)明显高于不孕组(2.79 ml、36.5 ×10⁹/L 和 102.0 ×10⁶),两组间精子活力、活动精子百分率和精子畸形率的平均值差异无显著性。精液硒浓度与精子数、每次射出精子总数、精子活力、活动精子百分率之间呈明显的正相关,而血清硒浓度与精子质量均无明显相关关系。精子 DNA 8-OHdG 水平与精液硒浓度呈明显负相关,而与血清硒浓度无明显相关关系。结论 精液硒浓度与人类精子质量和精子 DNA 8-OHdG 有关,血清硒浓度不影响精子质量和精子 DNA 氧化损伤程度。

【关键词】 硒; 精子; 脱氧鸟苷; DNA 损伤

The associations between concentration of selenium in semen and sperm parameters as well as oxidative DNA damage in human sperm XU Dexiang*, ONG Choonnam, SHEN Hanming, et al.* Department of Toxicology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

【Abstract】 Objective To explore the associations between concentrations of selenium (Se) in serum and semen and sperm parameters as well as oxidative DNA damage in human sperm **Methods** Concentrations of selenium in serum and semen were determined using atomic absorption spectrophotometer (AAS). The sperm parameters were detected according to WHO laboratory manual for the examination of human sperm. The levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and deoxyguanosine (dG) in human sperm DNA were measured using HPLC-ECD and HPLC-UV. **Results** Mean semen concentration of selenium was significantly higher in fertile subjects (0.74 μmol/L) than that in infertile subjects (0.56 μmol/L), while there was no significant difference in serum concentrations of selenium between the two groups. Semen volume (3.91 ml vs. 2.79 ml), sperm density (46.4 ×10⁹/L vs. 36.5 ×10⁹/L) and sperm count (168.0 ×10⁶ vs. 102.0 ×10⁶) were significantly higher in fertile subjects than those in infertile subjects. There was no significant difference in motility and viability of sperm, and proportion of deformity sperm between the two groups. Significantly positive correlation was observed between semen concentration of Se and sperm density ($r=0.48$, $P<0.01$ for fertile subjects and $r=0.32$, $P<0.05$ for infertile subjects) as well as sperm count ($r=0.32$, $P<0.05$ for fertile subjects and $r=0.26$, $P<0.05$ for infertile subjects), sperm motility ($r=0.46$, $P<0.01$ for fertile subjects and $r=0.65$, $P<0.01$ for infertile subjects) and viability ($r=0.33$, $P<0.05$ for fertile subjects and $r=0.64$, $P<0.01$ for infertile subjects). There was no correlation between serum Se concentrations and sperm parameters. Moreover, 8-OHdG levels in sperm DNA inversely correlated with semen Se concentrations in fertile ($r=-0.21$, $P<0.05$) and infertile ($r=-0.28$, $P<0.05$) subjects. However, no significant correlation was found between 8-OHdG levels in sperm DNA and serum Se concentrations in all subjects. **Conclusions** Semen concentrations of Se were associated with sperm quality and 8-OHdG levels in human sperm. Serum concentrations of Se did not affect sperm quality and oxidative DNA damage in human sperm.

【Key words】 Selenium; Spermatozoa; Deoxyguanosine; DNA damage

基金项目:中华医学基金(98001)和安徽省教委自然科学基金(99j10095)资助项目

作者单位:230032 合肥市 安徽医科大学卫生毒理学教研室(徐德祥);新加坡国立大学社区、职业和家政医学系(Ong Choonnam, Shen Hanming, Chua Laiha, Chia Seneng)

在过去 50 年间人类精子质量不断下降,主要表现为精子活力和活率下降、精子畸形发生率升高^[1-3]。缺硒被认为是引起人类精子质量下降的原因之一^[4],人类精子密度与精液中硒浓度呈明显正相关^[5]。在不育者饮食中添加适量的硒,可明显改善精子活力和活率,并降低精子畸形率^[6]。我们进一步研究了血清和精液中硒浓度与精子质量的关系,并探讨血清和精液中硒浓度与精子 DNA 氧化损伤的关系。

对象与方法

1. 精液采集:28 名妻子正在怀孕的志愿者为已孕组,28 名结婚 2 年未生育并排除妻子不孕的志愿者为不孕组。56 名受试者均为非吸烟者,从不饮酒,无生殖系统外伤和肿瘤等疾患。所有受试者用手淫法采集精液至广口无铅塑料容器中,待完全液化后,按文献^[7]的方法检测受试者精液量、精子数、每次射出精子总数、活力和活动精子百分率及精子畸形率。剩余样品立即置 -70℃ 保存。

2. 试剂:核糖核酸酶、蛋白酶 K、二硫苏糖醇(DTT)、脱氧核糖核酸酶、核酸酶 P1 及碱性磷酸酶均为 Sigma 公司产品。

3. 精子 DNA 提取:按文献^[8]的方法提取 DNA。冰冻精液融化后立即置 4℃ 离心去精清。精子细胞用精子洗液(pH8)连续洗 3 次,然后依次按下列步骤提取精子 DNA:首先用 0.04 mol/L 二硫苏糖醇(DTT),0.5 mg/ml 蛋白酶 K,0.9% 十二烷基硫酸钠(SDS)裂解精子细胞并消化核蛋白,然后用 12.1 的氯仿-异戊乙醇混合液提取 DNA,用 50 mg/ml 的核糖核酸酶消化 RNA 后,再次用 12.1 的氯仿-异戊乙醇混合液提取 DNA,最后 DNA 沉淀于冰乙醇中。

4. DNA 消化和 8-羟基脱氧核糖鸟苷(8-OHdG)和脱氧核糖鸟苷(dG)检测:DNA 在 97℃ 变性后依次用 375 u/ml 的脱氧核糖核酸酶、25 u/ml 的核酸酶及 5 u/ml 的碱性磷酸酶消化 DNA,用高压液相色谱-光电检测系统和高压液相色谱-紫外线检测器系

统同时检测 8-OHdG 和 dG 浓度^[8],结果用 OHdG/10⁶dG 表示。

5. 硒浓度的检测:用原子吸收光谱检测血清和精液中硒浓度^[9]。

6. 统计分析:所有试验资料用 SPSS 软件分析。

结 果

1. 血清和精液硒平均浓度、精子质量比较(表 1):已孕组精液硒平均浓度(0.74 μmol/L)明显高于不孕组(0.56 μmol/L),其中已孕组精液硒浓度 < 0.51 μmol/L 者仅占 3.6%(1/28),明显低于不孕组的 35.7%(10/28),而两组间血清硒平均浓度差异无显著性。已孕组精液量、精子数和每次射出精子总数的平均值分别为 3.91 ml、46.4 ×10⁶/ml 和 168.0 ×10⁶,明显高于不孕组的 2.79 ml、36.5 ×10⁶/ml 和 102.0 ×10⁶,两组间精子活力和活动精子百分率以及精子畸形率的平均值差异无显著性。此外,对 2 组间精子 DNA 8-OHdG 水平进行比较,结果显示,已孕组与不孕组 8-OHdG 水平分别为 49.6/10⁶dG 和 53.2/10⁶dG,差异无显著性。

2. 血清硒和精液硒浓度与精子质量之间的相关关系:精液硒浓度与精子数(已孕组 $r = 0.48, P < 0.01$;不孕组 $r = 0.32, P < 0.05$)、每次射出精子总数(已孕组 $r = 0.32, P < 0.05$;不孕组 $r = 0.26, P < 0.05$)、精子活力(已孕组 $r = 0.46, P < 0.01$;不孕组 $r = 0.65, P < 0.01$)、活动精子百分率(已孕组 $r = 0.33, P < 0.05$;不孕组 $r = 0.64, P < 0.01$)之间呈明显正相关,而血清硒与受试者精子质量无明显相关关系。对血清硒和精液硒浓度与精子 DNA 8-OHdG 水平之间进行相关关系分析,结果显示:受试者精子 DNA 8-OHdG 水平与精液硒浓度呈明显负相关(已孕组 $Y = -0.3864X + 78.842, r = -0.21, P < 0.05$;不孕组 $Y = -0.4919X + 81.309, r = -0.28, P < 0.05$),而受试者精子 DNA 8-OHdG 水平与血清硒无明显相关关系(已孕组 $r = 0.00, P < 0.05$,不孕组 $r = -0.02, P < 0.05$)。

表 1 两组血清和精液硒浓度及各项精液常规指标的结果(几何均数)

组别	血清硒 (μmol/L)	精液硒 (μmol/L)	精液量 (ml)	精子数 (×10 ⁹ /L)	每次射出精子 总数(×10 ⁶)	活动精子 百分率	活力(%)	精子畸形率
已孕组	1.75 (1.31~2.34)	0.74* (0.42~2.42)	3.9* (2.0~17.5)	46.4* (16.2~133.0)	168.0* (55.9~1504.0)	0.67 (0.46~1.95)	57.0 (42.3~176.8)	0.76 (0.60~1.95)
不孕组	1.65 (1.35~1.97)	0.56 (0.33~0.93)	2.8 (1.4~15.6)	36.5 (7.9~167.0)	102.0 (22.2~1462.0)	0.72 (0.54~1.95)	54.6 (38.5~177.6)	0.86 (0.63~1.96)

与不孕组比较 * $P < 0.05$, 括号内为 95% 可信区间

讨 论

硒是人体重要的微量元素。硒在男性生殖过程的作用已经越来越引起人们的重视。据早期的研究报告,精液硒浓度为 $0.63 \sim 0.87 \mu\text{mol/L}$ 时精子活力最高,精液硒浓度为 $0.50 \sim 0.89 \mu\text{mol/L}$ 时精子受孕率最高,精液硒浓度低于 $0.46 \mu\text{mol/L}$ 即可能引起男性不孕^[10]。进一步的研究发现,随着男性生殖腺的发育成熟,性腺中硒含量明显上升^[11]。最近的研究显示,在不育者饮食中添加适量的硒,可明显改善精子活力和活动精子百分率,并降低精子畸形率^[6]。硒在男性生殖发育和改善精子活力、维持精子正常形态和功能中有重要作用。

本研究结果显示,已孕组精液硒平均浓度明显高于不孕组,不孕组精液硒浓度 $< 0.5 \mu\text{mol/L}$ 者明显高于已孕组;精液硒浓度与精子数、每次射出精子总数、精子活力、活动精子百分率之间呈明显的正相关,这些结果与文献一致^[5],进一步提示精液硒对维持正常精子数量、活力和活动精子百分率有重要作用。

据最新研究报道^[12],人类精子线粒体囊泡中存在一种特异谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx),称为磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶(PHGpX),硒是其重要组成成分。在精细胞,PHGpX 具有与其他 GSHPx 相同的过氧化物酶活性,但随着精子的成熟,其过氧化物酶活性逐步失活,并最终成为精子线粒体结构蛋白的一部分,对维持精子鞭毛结构和功能的完整性有重要作用。另有研究认为,精子 DNA 氧化性损伤是精子质量下降的重要机制^[13]。目前已经发现人类精子中大约有 20 种 DNA 氧化产物^[14],8-OHdG 是最有代表性的精子 DNA 氧化产物之一。Fraga 等^[15]首次证实人类精子 DNA 中 8-OHdG 含量与精液中抗氧化物维生素 C 浓度呈负相关。在本研究中,虽然已孕组和不孕组精子 DNA 8-OHdG 水平差异无显著性,但受试者精子 DNA 8-OHdG 水平与精液硒浓度均呈明显负相关。硒是人体内 GSHPx 的重要组成成分。GSHPx 种类很多且功能不一,目前已确定的 GSHPx 有 11 种,其中大多数参与清除体内活性氧、保护 DNA 免受活性氧引起的氧化损

伤^[16]。因此,有理由推测:精液缺硒引起的精子质量下降可能与缺硒引起的抗氧化作用下降有关。

本研究发现已孕组和不孕组平均血清硒浓度差异无显著性,血清硒与精子质量和精子 DNA 8-OHdG 水平之间均无明显相关关系,表明是精液硒影响人类精子质量并可能与精子 DNA 氧化损伤有关,血清硒与精子质量和精子 DNA 氧化损伤程度无关。

参 考 文 献

- 1 Carlsen E, Gwercman A, Keiding N, et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 1992, 305:609-613.
- 2 Auger J, Kuntsman JM, Czyglik F, et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*, 1995, 332:281-285.
- 3 Irvine DS. Falling sperm quality. *BMJ*, 1994, 309:476.
- 4 Hansen JC, Deguchi Y. Selenium and fertility in animals and man—a review. *Acta Vet Scand*, 1996, 37:19-30.
- 5 Xu B, Chia SE, Tsakok M, et al. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod Toxicol*, 1993, 7: 613-618.
- 6 Vezina D, Mauffette F, Roberts KD, et al. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol Trace Elem Res*, 1996, 53: 65-83.
- 7 World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 1992. 43-44.
- 8 Shen HM, Chia SE, Ni ZY, et al. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol*, 1997, 11: 675-680.
- 9 Xu B, Chia SE, Ong CN. Concentration of cadmium, lead, selenium, and zinc in human blood and seminal plasma. *Biol Trace Elem Res*, 1994, 40:49-57.
- 10 Bleau G, Lemarbre J, Faucher G, et al. Semen selenium and human fertility. *Fertil Steril*, 1984, 42:890-894.
- 11 Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*, 1994, 50:626-640.
- 12 Ursini F, Heim S, Kiess M, et al. Dual function of the selenoprotein PHGpX during sperm maturation. *Science*, 1999, 285:1393-1396.
- 13 Ni ZY, Liu YQ, Shen HM, et al. Does the increase of 8-hydroxyguanosine lead to poor sperm quality? *Mut Res*, 1997, 381: 77-82.
- 14 Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidant, antioxidant, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 7915-7922.
- 15 Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88:11003-11006.
- 16 Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc*, 1999, 99: 836-843.

(收稿日期:2000-11-22)

(本文编辑:周星)