◇ 综述 ◇

精索静脉曲张致不育机制的研究进展

朱少明,程帆

(武汉大学人民医院泌尿外科,湖北 武汉 430060)

摘要:精索静脉曲张(VC)是引起男性不育的常见病因,长时间及程度重的 VC 可以引起睾丸组织细胞损害,导致生精细胞本身及生精环境的破坏,造成精子质和量的改变,从而造成不育。但 VC 引起不育的确切机制目前尚不清楚。其机制有很多假说,该文对近年来炎症、氧化应激、凋亡、血睾屏障和免疫异常、内分泌变化、血管活性物质毒性作用、相关分子变化等与不育关系的研究进展,进行了综述。

关键词:精索静脉曲张;不育机制;凋亡;分子机制

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.11.001

A review: the mechanism of male sterility caused by varicocele

ZHU Shaoming, CHENG Fan

(Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Varicocele(VC) is the most common cause of male infertility. However, the mechanism of infertility caused by VC has not been fully understood. Long disease course and heavy VC can cause cell damage in the testis, which lead to the destruction of the cell itself and the environment of the sperm, the change of the quality and quantity of sperm. VC-induced male infertility research put forward a series of theories. This paper mainly summarizes VC from the inflammation and oxidative stress, apoptosis, blood testosterone barrier and immune abnormalities, endocrine changes, vasoactive substances toxicity, related molecular changes.

Key words: Varicocele; Sterility mechanism; Apoptosis; Molecular mechanisms

精索静脉曲张(VC)是引起男性不育的常见原因。在国外,VC在成年人群中的发病率在11.7%~15%,精液异常人群中的发病率为25.4%,不育人群中的发病率为40%左右^[1]。我国成年人群中的发病率与国外相近,国外约为10%~15%。VC左侧多于右侧,但双侧者达40%,单纯右侧极少见^[1-2]。尽管VC手术能改善VC患者术后精液质量,但是没有足够证据显示VC手术能显著提高患者术后的自然受孕率^[3-4]。VC引起不育的机制尚不清楚。VC引起不育的途径有很多,其确切机制尚不明确。本文就近年来炎症、氧化应激、凋亡、血睾屏障(BTB)和免疫异常、内分泌变化、血管活性物质毒性、相关分子变化等与不育关系的研究进展,进行综述。

1 炎症与氧化应激

VC能诱导睾丸组织产生炎症^[5],一般认为中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞是睾丸组织中细胞因子的主要来源^[6]。VC引起睾丸炎症的具体机制还不明确,可能与精索静脉内血液淤滞,血管内皮

及睾丸组织的缺氧等因素相关。

炎症细胞浸润、细胞因子释放、睾丸组织细胞能量代谢障碍以及线粒体损伤,使自由基产生增多。后者使一氧化氮合酶(NOS)合成更多的一氧化氮(NO)及氮氧化物底物超氧阴离子(O²⁻)。NO和O²⁻都属于反应性氧化物质(ROS)。过多的ROS破坏抗氧化系统[包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)等],使该系统的这些物质降低^[7]。研究发现,VC患者的睾丸组织中,NO等明显升高^[8-9]。环氧合酶(COX)包括COX-1,COX-2,是不饱和脂肪酸和花生四烯酸合成前列腺素的关键酶。在炎症中,细胞因子、甾族激素和线粒体损伤使COX-2表达增加。COX-2可作为细胞炎症和能量代谢障碍的标志物。Perrotta等^[10]发现VC患者的精子中COX-1和COX-2过量表达,尤其是在精子的顶部和整个尾部以及线粒体外膜。推测VC可能长期刺激精细胞,导致精细胞炎症或能量代谢障碍,最终导致了精子发育障碍,顶体反应下降,精子活力减弱。

2 凋亡

凋亡又称I型程序性死亡,其在组织或器官的

正常生长发育以及病理条件下的代偿应激中,发挥重要作用。细胞凋亡主要通过两条途径:一条是膜受体(如 Fas/FasL)途径,也称外始式途径,另一条是线粒体途径,也称内始式途径。Fas 是一种跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员。Fas 与 FasL 结合可以启动凋亡信号的转导,引起细胞凋亡。线粒体途径是介导凋亡的重要途径,主要是通过 Bcl-2 家族来完成。在 Bcl-2 家族中包含众多蛋白,如促进凋亡的蛋白(如 BAX、BAK 等)、抑制凋亡的蛋白(如 Bcl-2、Bcl-xL 等)和仅含 BH3 结构域的 BH3-only 蛋白^[11]。正常情况下,抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL 能与凋亡蛋白和 BH3-only 蛋白的 BH3 结构域结合,形成异源二聚体,阻止线粒体外膜透化(MOMP)。而在缺氧、氧化应激、高温、炎症等不利因素下,促凋亡蛋白生成增多,Bcl-2 绝对或相对减少,促凋亡蛋白与线粒体膜相结合,开启线粒体上的膜孔蛋白,最终导致 MOMP。MOMP 使线粒体内的半胱天冬酶、代谢水解酶释放进入细胞质,导致细胞质中的靶蛋白被大量降解,最终引起细胞不可逆死亡。

VC 可导致睾丸生精细胞、附睾上皮细胞、间质细胞凋亡^[12-13]。大量研究表明,长期的 VC 导致促凋亡蛋白基因(如 Bax)表达上升,抗凋亡蛋白基因(如 Bcl-2)表达下降^[14-15]。上述变化,使 MOMP,释放出大量的水解酶,包括细胞色素 C(CytC)、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)^[16]。这些水解酶释放到细胞质后,启动程序性死亡,引起睾丸细胞的凋亡。睾丸及其附属组织的异常凋亡,可能是 VC 不育最重要的也是最直接的原因。

3 BTB 和免疫异常

BTB 位于睾丸间质血管与生精小管之间,主要由 Sertoli 细胞之间的紧密连接构成,该连接是睾丸组织中最致密的屏障结构。BTB 不仅有致密的细胞结构,其功能也非常活跃^[9]。精细胞必须紧贴 Sertoli 细胞,慢慢向生精小管腔面方向移动,才能逐步完成发育。精细胞在此移行过程中,Sertoli 细胞间的黏附连接不断的分开和合拢。VC 导致 ROS 升高,激素变化等一系列变化,使 Sertoli 细胞之间紧密连接破坏,导致精细胞不能正常依附生精上皮(主要为 Sertoli 细胞)而脱落,导致不育^[17]。

正常情况下,由于 BTB 及免疫耐受的存在,机体对精子不会产生主动免疫。任何损伤 BTB 的因素都可引起对睾丸的自身免疫反应。有研究显示^[18],单侧睾丸附睾炎、睾丸扭转、VC、睾丸癌或创伤以及睾丸活检都可能引起抗精子抗体的产生。

抗精子抗体使精子大片凝集,精子的运动显著下降,因而影响精子与卵子结合形成受精卵,导致不育^[19]。但并非有抗精子抗体就一定出现不育,当抗精子抗体与精子的结合率达到 50% 才能明显损伤精子的活力^[20]。正常人群中抗精子抗体含量较低,而 VC 不育患者的精液中抗精子抗体的含量显著高于正常人群。对 VC 患者施行精索静脉高位结扎术后,抗精子抗体的含量会逐渐减少,精子运动能力也明显提高^[21]。提示,VC 引起 BTB 的破坏是可逆的。此外,机体的免疫状态也与抗精子抗体产生密切相关。处于免疫抑制状态的大鼠,并不能诱发精子抗体的形成。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞具有免疫抑制功能,其在 VC 患者的 CD4⁺T 细胞中的比例,也显著下降^[22]。其具体机制不详。

4 内分泌的变化

机体通过下丘脑-腺垂体-性腺轴来完成对生精功能的调控。下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH)作用于腺垂体,腺垂体分泌两种激素:卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)。FSH 作用于支持细胞,后者分泌抑制素和雄激素结合蛋白(ABP),抑制素能反过来抑制 FSH 的分泌从而调控支持细胞的功能。LH 则作用于间质细胞,后者合成睾酮(T),T 也可经 5 α -还原酶还原成双氢睾酮(DHT),DHT 生物活性明显增加。支持细胞分泌的 ABP 与 T 或 DHT 结合,使二者转运至生精小管,提高生精小管 T 浓度,利于生精。

文献报道^[9,23],VC 患者总体上外周血催乳素(PRL)、LH、T 无明显变化,但 FSH、雌激素(E₂)升高,抑制素 B 降低。睾丸组织内 T、抑制素 B 下降,ABP 无明显改变。VC 引起下丘脑-垂体-性腺轴内分泌功能的紊乱,可能与各种因素导致睾丸支持细胞,间质细胞损伤、凋亡有关。

5 血管活性物质的毒性作用

左侧精索内静脉与左肾静脉相通,当 VC 时,反流的血液可将肾、肾上腺代谢产物如 5-羟色胺(5-HT)、前列腺素 2 α 、类固醇激素、儿茶酚胺等带到睾丸组织,引起一系列损害^[1]。VC 时,曲张精索静脉的血液中肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺明显升高,且升高的幅度与 VC 的严重程度成正比^[24]。长期 VC,除这些激素本身水平升高,其对应的受体表达也增加。这些升高的激素可能通过以下途径影响生精:(1)儿茶酚胺类、5-HT 等引起睾丸血管过度收缩,直接影响睾丸血供,对生精细胞产生一系列的损害;(2)某些激素(如类固醇)直接对精子产生毒害作用;(3)儿茶酚胺类激素通过与氧气接触,

其被氧化,产生活性氧,毒害睾丸组织细胞。

6 相关分子的变化

在生精过程中,精子核经历了显著的组蛋白重组,最初由组蛋白来维持精子 DNA 的稳定,后期组蛋白由各种各样的蛋白质[如鱼精蛋白(PRM)]所取代^[25-26]。组蛋白更替和 PRM 的替换是由过渡蛋白(TPs)来完成的,其中最主要的为染色质重塑的过渡蛋白^[27-28]。PRM 与 DNA 形成复合物,维持 DNA 稳定,阻止内源或外源因子的袭击,保护精子 DNA 的完整性。另外组蛋白、过渡蛋白、PRM 还参与了精细胞染色质的折叠和浓缩。

TPs 和 PRM 均有两个亚型分别为 TP1、TP2 和 PRM1、PRM2。二者在生精过程中起重要作用,不管是过度蛋白基因(TNP)还是 PRM 基因的突变,都会影响到精子 DNA 的稳定。TNP 基因缺失导致 TPs 合成障碍,直接影响到精子染色质的正常折叠、凝聚,使精子 DNA 断裂,最终导致精子发育不良。TNP1 氨基酸序列在不同哺乳动物高度保守,但在 VC 致不育患者中,TNP1 基因内含子中的一个核苷酸被替代(g. IVS1 + 75T > C)^[29]。另有研究示 TNP 和 PRM 基因突变与男性生育功能低下高度相关,但 PRM 基因突变致 VC 引起不育,尚缺乏足够证据^[30]。TPs、PRM 的正确合成与热休克蛋白(HSP)密切相关,VC 睾丸组织中 HSP 蛋白的变化和 HSP 基因的多态性均能导致 TPs、PRM 不能正常合成,从而影响精子的正常发育。

Chan 等^[31]研究 VC II 度患者精子的蛋白质组学,发现 15 个蛋白差异表达。高表达的蛋白包括 HSP70 和 HSP90,并进行了免疫组化和 Western-blot 鉴定。VC 能引起睾丸组织温度的升高、氧化应激等,导致精细胞蛋白质合成时错误折叠。精细胞中 HSP 能帮助蛋白质组装折叠,打开错误折叠等过程^[32]。正常情况下,一系列特殊的 RNA 结合蛋白与特殊核苷酸序列特异识别,维持 mRNA 的稳定。而这些蛋白的装配和折叠很大程度上依赖 HSP70-2 在精细胞中的表达。染色质核心蛋白(包括 TP1、TP2 和 PRM1、PRM2)在精子成熟中是必须的。然而这些蛋白的正确折叠很大程度上依赖 HSP-70 蛋白,任何影响 HSP70-2 表达的因素均能导致精子染色质浓缩障碍,精子 DNA 损伤^[33-34]。Khosravian 等^[7]发现 VC 患者生精小管上皮出现严重的 RNA 损伤,HSP70-2 表达下降。热休克蛋白因子(HSFs)通过调节 HSP 发挥作用。Ferlin 等^[35],发现 HSPA4、HSF1、HSF2 在 VC 和少精子症患者中表达升高,HSPA4、HSF1、HSF2 可能在 VC 导致不育中发挥

重要作用。Ji 等^[36]发现 VC 患者精子中 miRNA-15a 表达显著下降,miRNA-15a 靶向作用于伴侣蛋白 HSPA1B。HSPA1B 通过阻止 CytC 从线粒体释放,防止氧化应激启动凋亡通路,保护精细胞。

聚合酶 γ (POLG)基因由一系列 CAG 重复序列组成,POLG 是目前已知唯一的线粒体聚合酶,与线粒体 DNA 复制有关。其中 10 个重复 CAG 序列是最常见的等位基因。10/10 CAG 重复序列等位基因的突变与男性不育少精子症相关^[30]。Heidari 等^[37]发现 10/10 基因型与 VC 严重程度高度相关。

VC 引起精子活动力下降的具体分子机制尚不清楚,可能与多种基因的异常表达有关。Chen 等^[38]在低活力精子中共筛选出 149 个基因高表达,其中包括睾丸特异蛋白-1,乳酸脱氢酶 C 等。Roppin 基因参与哺乳动物精子鞭毛鞘的形成,与精子活动力密切相关。Amer 等^[39]发现 Roppin 基因在 VC 患者术前术后精子中表达有明显的差异,术前比术后表达要明显低。Afiyani 等^[32]发现 VC 患者精子中 FasL 的 mRNA 表达明显上升,HSPA2 基因的 mRNA 表达也明显降低。有学者总结了一些男科疾病(包括 VC)和全身疾病的某些基因的多态性引起精子 DNA 损伤情况。包括雄激素受体(AR) CAG 的长度的变化,DNA 修复基因 XRCC1、XPD6、XPD23 的多态性,以及 GSTM1 的多态性等^[40]。

贺情情等^[41]利于双向电泳技术、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术检测睾丸组织差异蛋白。发现 21 个蛋白差异表达,这些蛋白涉及蛋白质合成、加工、降解、基因表达、信号转导、能量代谢、凋亡等。Agarwal 等^[42]对 VC 患者精子进行蛋白组学的研究,共筛选出 21 个差异表达蛋白与生殖功能相关,涉及精子的活动力、获能、过度活化、顶体反应、透明带结合等。其中 GSTM3、SPANXB1、CY135R2、CALGN、PARK7 的变化能反应 VC 的程度及精子参数不利的变化。另外 ENKVR、SEMG1、SPAM1 在双侧 VC 患者精子中表达明显升高。

7 小结

VC 致不育机制的研究,主要包括宏观因素及分子机制的研究。前者主要包括睾丸组织病理形态的变化、局部温度变化、相关激素的变化、代谢产物的变化等;后者主要包括相关基因表达的变化、mRNA、蛋白质的变化。尽管如此,目前对 VC 致男性不育机制的认识仍然有限。随着新检测技术的出现,蛋白组学、基因芯片等新技术的应用,人们会逐渐认识其发病机制,掌握解除 VC 这一疾病的钥匙。

参考文献

- [1] 王万荣, 谭艳, 谢胜, 等. EAU、AUA-ASRM、中国精索静脉曲张诊疗指南解读[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(50): 13-14, 16.
- [2] 郭震华, 那彦群. 实用泌尿外科学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 590-592.
- [3] EVERS JLH, COLLINS J, CLARKE J. Surgery or embolisation for varicoceles in subfertile men[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(1): CD000479.
- [4] BAAZEEM A, BELZILE E, CIAMPI A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment; a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair[J]. *Eur Urol*, 2011, 60(4): 796-808.
- [5] MOSHTAGHION SM, MALEKINEJAD H, RAZI M, et al. Silymarin protects from varicocele-induced damages in testis and improves sperm quality: evidence for E2f1 involvement[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2013, 59(5): 270-280.
- [6] RAZI M, SADRKHANLOO RA, MALEKINEJAD H, et al. Testicular biohistochemical alterations following experimental varicocele in rats[J]. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2012, 10(3): 209-218.
- [7] KHOSRAVANI H, RAZI M, FAROKHI F, et al. Simultaneous administration of dexamethasone and vitamin E reversed experimental varicocele-induced impact in testicular tissue in rats; correlation with hsp70-2 chaperone expression[J]. *Int Braz J Urol*, 2015, 41(4): 773-790.
- [8] 李忠远. 高压氧对精索静脉曲张大鼠睾丸组织 NOS 和 NO 的实验研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- [9] HA HK, PARK HJ, PARK NC. Expression of E-cadherin and α -catenin in a varicocele-induced infertility rat model[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2011, 13(3): 470-475.
- [10] PERROTTA I, SANTORO M, GUIDO C, et al. Expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 in human male gametes from normal patients, and those with varicocele and diabetes; a potential molecular marker for diagnosing male infertility disorders[J]. *J Anat*, 2012, 221(3): 209-220.
- [11] GREEN DR, WALCZAK H. Apoptosis therapy: driving cancers down the road to ruin[J]. *Nat Med*, 2013, 19(2): 131-133.
- [12] 张长城, 周安方, 张茂林, 等. 实验性精索静脉曲张对大鼠睾丸生精细胞凋亡的影响[J]. *中华男科学*, 2003, 9(7): 507-509, 511.
- [13] 赵豫刚, 周吉, 张雪军, 等. 大鼠精索静脉曲张后附睾上皮细胞凋亡及管腔 α -1,4-葡糖苷酶、唾液酸含量观察[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(7): 619-621.
- [14] 陈乐仲. 精索静脉曲张对青春期大鼠生精细胞凋亡基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[D]. 汕头: 汕头大学, 2006.
- [15] 何学军, 陈乐仲, 方德信, 等. 精索静脉曲张对青春期大鼠生精细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(4): 497-499, 518.
- [16] 成建军, 张雁钢, 李超鹏. Bcl-2、CytC 和 caspase-3 在实验性精索静脉曲张大鼠生精细胞中的表达及意义[J]. *中国医药导报*, 2012, 9(5): 11-12, 15.
- [17] GRIMA J, SILVESTRINI B, CHENG CY. Reversible inhibition of spermatogenesis in rats using a new male contraceptive, 1-(2,4-dichlorobenzyl)-indazole-3-carbohydrazide[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(5): 1500-1508.
- [18] CESUR Ö, ASLAN MK, AYVA SK, et al. Effect of P/E-selectin blockage on antisperm antibody development and histopathological alterations in experimental orchitis[J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(10): 2164-2170.
- [19] WANG YX, ZHU WJ, JIANG H. Sperm exposure during menses is a risk factor for developing antisperm antibody (ASA) in female[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 288(5): 1145-1148.
- [20] BARRATT CL, DUNPHY BC, MCLEOD I, et al. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies[J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(1): 95-98.
- [21] DJALADAT H, MEHRSAI A, REZAZADE M, et al. Varicocele and antisperm antibody: fact or fiction[J]. *South Med J*, 2006, 99(1): 44-47.
- [22] 朱伟, 朱庆国, 叶烈夫, 等. 精索静脉曲张不育患者 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2014, 29(8): 703-705.
- [23] 陈云斌. 精索静脉曲张与雄性激素水平的相关性研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2013.
- [24] 许宁, 曹林升, 薛学义, 等. 精索静脉曲张患者血中儿茶酚胺浓度的变化[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2007, 12(5): 323-324.
- [25] DEPA-MARTYNOW M, KEMPISTY B, LIANERI M, et al. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007, 45(Suppl 1): S79-S85.
- [26] LEWIS JD, SAPERAS N, SONG Y, et al. Histone H1 and the origin of protamines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(12): 4148-4152.
- [27] MYLONIS I, DROSOU V, BRANCORSINI S, et al. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(12): 11626-11631.
- [28] SIASI E, ALEYASIN A, MOWLA J, et al. Association study of six SNPs in PRM1, PRM2 and TNP2 genes in iranian infertile men with idiopathic azoospermia[J]. *Iran J Reprod Med*, 2012, 10(4): 329-336.
- [29] MOSTAFA T, RASHED LA, NABIL N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism relationship with semen parameters and oxidative stress in infertile oligoasthenozoospermic men[J]. *Urology*, 2015, 85(5): 1058-1061.
- [30] AOKI VW, CHRISTENSEN GL, ATKINS JF, et al. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(5): 1416-1422.
- [31] CHAN CC, SUN GH, SHUI HA, et al. Differential spermatozoal protein expression profiles in men with varicocele compared to control subjects; upregulation of heat shock proteins 70 and 90 in varicocele[J]. *Urology*, 2013, 81(6): 1371-1379.
- [32] AFIYANI AA, DEEMEH MR, TAVALAEE M, et al. Evaluation of heat-shock protein A2 (HSPA2) in male rats before and after varicocele induction[J]. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(8): 766-776.