

引用本文:余宏亮,朱琛艳,刘艳丽,等.咪喹莫特对精子浓度、活动率及DNA碎片指数的影响[J].安徽医药,2023,27(5):1027-1030.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.05.041.



◇药物与临床◇

咪喹莫特对精子浓度、活动率及DNA碎片指数的影响

余宏亮,朱琛艳,刘艳丽,仵晴晴

作者单位:河南省生殖健康科学技术研究院、河南省生殖妇产医院、国家卫生健康委出生缺陷预防重点实验室、河南省人口缺陷干预技术研究重点实验室男科,河南 郑州 450002

基金项目:河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHCJ20190826);河南省基本科研项目(JBKY2020013)

摘要: **目的** 通过观察在培养液中加入咪喹莫特后精子浓度、活动率及DNA碎片指数(DFI)的变化,以明确免疫调节剂咪喹莫特是否会影响男性精子质量。**方法** 选取2021年9月至2022年1月河南省生殖妇产医院体检的健康男性志愿者新鲜液化的精液标本10份,每份分为不添加药物的空白对照组和咪喹莫特0.3、0.6、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。上游法培养60 min后分别检查四组上层精子浓度、活动率和精子DFI。**结果** 被测人员年龄(30.5 \pm 4.1)岁,精子浓度(48.82 \pm 24.43) $\times 10^9/\text{L}$,总活动率(50.83 \pm 23.33)%。培养后空白对照组精子浓度(23.53 \pm 15.45) $\times 10^9/\text{L}$,总活动率(16.54 \pm 16.04)%。培养后咪喹莫特组精子浓度(22.23 \pm 16.85) $\times 10^9/\text{L}$,精子总活动率(16.79 \pm 13.89)%。培养后各组精子浓度及活动率与培养前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);培养后各组精子浓度和活动率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。培养后及各咪喹莫特剂量组均处于正常范围,与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 当免疫调节剂咪喹莫特浓度在0.3~3.0 $\mu\text{mol/L}$ 范围内时,对精子浓度、活动率及DFI等精子质量指标无明显影响。

关键词: 咪喹莫特; 精子; 精液质量; DNA碎片指数; 精液分析

Effect of imiquimod on sperm concentration, motility and DNA fragmentation index

YU Hongliang, ZHU Chenyan, LIU Yanli, WU Jingjing

Author Affiliation: Department of Andrology, Henan Institute of Reproductive Health Science and Technology, Henan Provincial Reproductive Obstetrics and Gynecology Hospital, National Health Council Key Laboratory of Birth Defect for Research and Prevention, Henan Key Laboratory of Population Defects Prevention, Zhengzhou, Henan 450002, China

Abstract: **Objective** To observe the changes of sperm concentration, motility and DNA fragmentation index (DFI) after adding a certain dose of imiquimod into the culture medium, in order to determine whether immunomodulator imiquimod has effect on male sperm quality. **Methods** A total of 10 freshly liquefied semen samples from healthy male volunteers who had physical examination in Henan Reproductive Maternity Hospital from September 2021 to January 2022 were selected. Fresh liquefied semen samples were assigned into imiquimod group and negative control group, imiquimod group includes 0.3, 0.6, 3.0 $\mu\text{mol/L}$ group. The upper sperm concentration, motility and sperm DFI of the four groups were examined after 60 min. **Results** The mean age was (30.5 \pm 4.1) years. Sperm concentration averaged was (48.82 \pm 24.43) $\times 10^9/\text{L}$; total motility was (50.8 \pm 23.33)%. After culture, the average concentration of sperm in the negative control group was (23.53 \pm 15.45) $\times 10^9/\text{L}$; total motility was (16.54 \pm 16.04)%. In imiquimod group, the sperm concentration was (22.23 \pm 16.85) $\times 10^9/\text{L}$, the mean total sperm motility was (16.79 \pm 13.89)%; the concentration and motility of each group were different before and after culture ($P < 0.05$). There was no significant difference in sperm concentration and motility among the three groups of imiquimod ($P > 0.05$). After culture and imiquimod dose groups were in the normal range, and the sperm DFI were no significant difference among the each dose of imiquimod group and the negative control group ($P > 0.05$). **Conclusion** When the concentration of imiquimod was 0.3-3.0 $\mu\text{mol/L}$, there was no significant effect on sperm concentration, motility and DFI.

Key words: Imiquimod; Sperm; Semen quality; Sperm DNA fragmentation index; Semen analysis

精子学与免疫调节剂是当今临床研究的热点之一^[1], Toll样受体7(toll-like receptor 7, TLR7)激活剂咪喹莫特(imiquimod)具有强大的免疫活性和有效的间接抗病毒活性^[2], 目前已经被用于治疗人乳头瘤病毒感染引起的外生殖器疣、多种自身免疫性

疾病以及肿瘤的治疗^[3-4]。最近有研究表明,咪喹莫特会使小鼠体外精子活动率下降^[5-6], 还有研究表明,在与含有一定剂量的咪喹莫特培养液共同孵育后,细胞会发生凋亡^[7]。上述研究表明,应用免疫调节剂咪喹莫特可能会对人类生殖特别是对精子有

潜在影响,但是,至今为止,咪喹莫特对人精子影响的研究未见报道,为了解咪喹莫特是否会对人的精子质量有影响,本研究拟在上述研究的基础上^[5-6],通过在培养液中添加一定剂量咪喹莫特后,观察精子的浓度、活动率以及DNA碎片指数(sperm DNA fragmentation index, DFI)的变化趋势,来了解咪喹莫特是否会对人类精子质量产生影响,具体如下。

1 资料与方法

1.1 标本分组及实验内容 选取2021年9月至2022年1月河南省生殖妇产医院体检的健康男性志愿者新鲜液化的精液标本10份,每份分为咪喹莫特组和不添加药物的空白对照组,咪喹莫特组按含有不同的咪喹莫特浓度,分为0.3、0.6、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 三组。统计培养前后精子的浓度、活动率;并使用染色质扩散法(sperm chromatin dispersion test, SCD法)检测培养后空白对照组和咪喹莫特组精子DFI。

1.2 咪喹莫特配制 咪喹莫特1 mg用二甲基亚砜(DMSO)溶解后形成浓度为1 mol/L的原液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,在使用前添加至人类输卵管液(HTF)中。D-葡萄糖加入1 mL去离子纯净水,配制成1 mol/L,使用时按每0.499 mL培养液添加1 μL 葡萄糖倍数添加,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,1周内使用。

1.3 实验步骤 每份液化的精液标本分四组,分别取0.3 mL,加至10 mL离心管底部,离心后去除精浆部分,分别添加HTF培养液0.5 mL和含有不同浓度咪喹莫特的HTF培养液0.5 mL,稍微倾斜培养管,培养60 min后竖直,取上层0.3 mL,分别统计培养前后精子浓度、活动率,并使用SCD法检测精子DFI。

1.4 精子浓度及活动率计数 精子浓度及活动率均由同一组人完成,具体方法参照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第五版^[8]。精子DFI检测方法参照文献^[9-11]。

1.5 试剂、仪器设备及软件 咪喹莫特(上海陶素生化科技有限公司,批号H20031230)、二甲基亚砜(西格玛奥德里奇)、DFI试剂盒(安徽安科生物工程有限公司)、人类输卵管液(HTF,上海源叶生物科技有限公司)、D-葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司)、离心机(国产)、移液器(国产)、精子分析系统、Nikon ECLIPSE E200显微镜(日本尼康),冰箱(国产)其他国产分析纯及培养设备。

1.6 统计学方法 应用SPSS 13.0软件包进行数据处理,检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析(Tukey HSD检验),检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 被测人员年龄及精液标本情况 年龄范围22~40岁,年龄(30.5 \pm 4.1)岁,禁欲天数3~7 d,精

子浓度(17.0~100.3) $\times 10^6/\text{L}$,总活动率43%~74%。

2.2 培养前后各组精子浓度和活动率比较 培养后各组精子浓度与培养前比较,差异有统计学意义($F=4.98, P=0.002$)。培养后各组精子活动率与培养前比较,差异有统计学意义($F=9.73, P=0.001$)。培养后各组精子浓度($F=0.10, P=0.962$)和活动率($F=0.22, P=0.885$)比较,均差异无统计学意义。见表1。

表1 培养前后精子浓度及活动率比较/ $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 份数 | 精子浓度/ $\times 10^6/\text{L}$ | 精子活动率/% |
|-----------------------------|----|---------------------------------|-------------------|
| 培养前 | 10 | 48.82 \pm 24.43 | 50.83 \pm 23.33 |
| 培养后 | | | |
| 空白对照组 | 10 | 23.53 \pm 15.45 | 16.54 \pm 16.04 |
| 咪喹莫特0.3 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 10 | 23.84 \pm 19.18 | 17.15 \pm 12.67 |
| 咪喹莫特0.6 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 10 | 22.15 \pm 17.70 | 16.85 \pm 14.91 |
| 咪喹莫特3.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 10 | 20.69 \pm 14.58 | 16.38 \pm 15.09 |

2.3 培养后各组精子DFI值比较 培养后空白对照组和咪喹莫特0.3、0.6、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 组精子DFI值分别为5.72 \pm 2.02、3.99 \pm 1.86、4.29 \pm 2.27、5.68 \pm 2.76($F=1.96, P=0.134$),各咪喹莫特剂量组精子DFI均处于正常范围,培养后空白对照组与各剂量组精子DFI值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

TLR是I型跨膜糖蛋白,由胞外或胞内染色体结构域上的富亮氨酸重复序列(leucine rich repeat, LRR)组成^[12],是重要的模式识别受体,参与固有免疫应答^[13]。TLR家族从果蝇到人类都是高度保守的,具有结构和功能上的相似性,人类TLR家族包含11个成员,作为TLR家族成员,TLR7在病原体识别和先天免疫激活中起着重要作用,TLR7可以感测来自RNA病毒序列的单链RNA寡核苷酸,这种识别发生在浆细胞样树突状细胞和B细胞的体内中。在浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, PDC)中,TLR7激活髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)信号通路,导致干扰素调节因子7(interferon regulator factor 7, IRF7)的磷酸化和激活以启动信号^[14]。

自从发现人类TLR7以来,TLR7调节免疫系统的能力使它成为有吸引力的治疗靶点。最近,已经开发出部分小分子TLR7激动剂如咪喹莫特^[15],咪喹莫特是一种咪嗪啉胺类似物,可特异性激活TLR7,在体外和体内研究中显示出了较强的活性^[16]。咪喹莫特制剂目前在有关国家已经被批准用于抗病毒、癌症和其他疾病的临床治疗^[17],但是至今为止,咪喹莫特对生殖特别是对男性精子的影

响并不十分清楚,而现有的研究认为,TLR7基因主要在肺、脾及生殖系统表达,与发育密切相关,最近有动物研究报道,TLR7信号通过影响线粒体膜电位的方式间接消耗ATP从而影响精子运动,该影响依赖于MyD88及磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)通路,也有研究报道称0.3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的咪喹莫特与小鼠精子共培养1 h即可以抑制部分小鼠精子的活动,从而导致上游精子浓度减少。但是目前尚没有可靠的资料证明咪喹莫特对男性精子能够产生同样的作用。基于以上原因,了解TLR7激动剂咪喹莫特是否会对男性精子等生殖细胞产生影响就显得非常重要,我们的研究初步表明,0.3 ~ 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的咪喹莫特短时间共培养后对男性精子的活动性可能并没有影响,至于出现这种与动物实验结果不一样的原因,可能是既往的研究者没有把精子在体外培养时,随着时间推移精子自身能量会消耗殆尽,逐渐失去活动能力以及死亡等作为重要影响因素考虑进去。另外,作为小分子的咪喹莫特是否能够在短时间内进入精子并准确识别TLR7,进而与之迅速结合,产生级联反应也需要进一步明确。

活的精子DNA完整性受损后往往启动死亡和(或)凋亡程序,引起细胞或精子的死亡和(或)凋亡,因此,临床与精子生育功能相关的关键特征之一是精子核DNA的完整性,基于此原理,一些DNA完整性检测作为精子质量指标在近年来被应用于临床。精子DNA受损特别是DNA碎片的评估有几种方法,这些方法包括末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记测定法[dexynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL]、精子染色质结构测定(sperm chromatin structure assay, SCSA)、精子染色质扩散试验(SCD法)及流式细胞仪检测。其中SCD法具有经济、快捷、准确的优点被广泛认可。我们的研究表明即使3.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的咪喹莫特作用精子1 h后,与空白对照组比,也不会导致精子的DFI增加,因此,我们认为,3.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的TLR7激动剂咪喹莫特的对男性精子DFI没有影响。由于精子在体外的存活时间有限,更长时间的体外培养不太容易实现,从临床应用角度来说也无必要。

总之,免疫调节剂咪喹莫特单独或与其他药物联合治疗,在病毒、癌症、免疫性皮肤病方面显示出了较好的效果,并且已在临床使用,但是,有关咪喹莫特的研究依然在进行中。在关于咪喹莫特对精子影响的研究中,不同研究者得出了不同的结果,目前还不清楚这种差异的具体原因。我们推测引

起这些差异的原因,可能包括作用时间长度不同、作用种属不同、作用细胞差异、相关协同作用分子使用以及还有其他因素等,由于免疫调节剂涉及的机制是复杂的,涉及到的细胞因子是众多的^[18-19],需要在未来的研究和治疗策略中综合考虑^[20]。

参考文献

- [1] 王骏,李世东,景阳,等.TOLL样受体9/激活蛋白-1信号通路在过敏性鼻炎中的作用[J].安徽医药,2022,26(2):247-250.
- [2] ANGELOPOULOU A, ALEXANDRIS N, KONSTANTINOOU E, et al. Imiquimod-A toll like receptor 7 agonists an ideal option for management of COVID 19[J]. Environ Res, 2020, 188: 109858. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109858.
- [3] SCHÖN MP, SCHÖN M, KLOTZ KN. The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7-and TLR8- independent fashion[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(6): 1338-1347.
- [4] TWOROWSKI D, GOROHOWSKI A, MUKHERJEE S, et al. COVID19 drug repository: text-mining the literature in search of putative COVID19 therapeutics[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(1): 1113-1121.
- [5] UMEHARA T, TSUJITA N, SHIMADA M. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm[J]. PLoS Biol, 2019, 17(8): e3000398. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000398.
- [6] UMEHARA T, TSUJITA N, ZHU Z, et al. A simple sperm-sexing method that activates TLR7/8 on X sperm for the efficient production of sexed mouse or cattle embryos[J]. Nat Protoc, 2020, 15(8): 2645-2667.
- [7] PATCHETT AL, DARBY JM, TOVAR C, et al. The immunomodulatory small molecule imiquimod induces apoptosis in devil facial tumour cell lines[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168068. DOI: 10.1371/journal.pone.0168068.
- [8] WHO. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 国家人口和计划生育委员会科学技术研究所, 中华医学会男科学分会, 中华医学会生殖医学分会精子库管理学组, 译. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 2, 22.
- [9] 余宏亮, 薄立伟, 曹恒海, 等. 五子衍宗煎剂对精子DFI的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(10): 1922-1924.
- [10] 余宏亮, 薄立伟. 达泊西汀对体外培养精子DNA碎片指数的影响[J]. 现代泌尿外科杂志, 2017, 22(7): 507-509.
- [11] 余宏亮, 常明秀, 曹恒海, 等. 人参皂苷CK、淫羊藿苷对体外培养精子的剂量负荷试验[J]. 中国工程科学, 2015, 17(6): 86-88.
- [12] WANG Y, ZHANG S, LI H, et al. Small-molecule modulators of toll-like receptors[J]. Acc Chem Res, 2020, 53(5): 1046-1055.
- [13] 蔡青云, 杨留生, 张贺川. Toll样受体2、Toll样受体4mRNA和蛋白在急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中的表达及意义[J]. 安徽医药, 2022, 26(1): 82-86.
- [14] OWEN AM, FULTS JB, PATIL NK, et al. TLR agonists as mediators of trained immunity: mechanistic insight and immunotherapeutic potential to combat infection[J]. Front Immunol, 2021, 11: 622614. DOI: 10.3389/fimmu.2020.622614.
- [15] ALURI J, COOPER MA, SCHUETTPELZ LG. Toll-like receptor

- signaling in the establishment and function of the immune system [J]. *Cells*, 2021, 10(6):1374.
- [16] TALUKDAR A, GANGULY D, ROY S, et al. Structural evolution and translational potential for agonists and antagonists of endosomal toll-like receptors [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(12):8010-8041.
- [17] GAITANIS G, BASSUKAS ID. A review of immunocryosurgery and a practical guide to its applications [J]. *Diseases*, 2021, 9(4):71.
- [18] KANG Y, NII T, ISOBE N, YOSHIMURA Y. Effects of TLR ligands on the expression of cytokines and possible role of NFκB in its process in the theca of chicken follicles [J]. *J Poult Sci*, 2018, 5(4):288-300.
- [19] HINKS TSC, MARCHI E, JABEEN M, et al. Activation and in vivo evolution of the mait cell transcriptome in mice and humans reveals tissue repair functionality [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(12):3249-3262.
- [20] FEDERICO S, POZZETTI L, PAPA A, et al. Modulation of the innate immune response by targeting toll-like receptors: a perspective on their agonists and antagonists [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(22):13466-13513.

(收稿日期:2022-03-09,修回日期:2022-03-27)

引用本文:路云丽,孙萍.全球领导人共识营养不良诊断标准在临床实践中的实施方法与应用[J].安徽医药,2023,27(5):1030-1036.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.05.042.

◇ 专论 ◇



全球领导人共识营养不良诊断标准在临床实践中的实施方法与应用

路云丽¹,孙萍²作者单位:¹山西医科大学第一临床医学院,山西 太原 030001;²山西医科大学第一医院营养科,山西 太原 030001

通信作者:孙萍,女,主任医师,硕士生导师,研究方向为老年疾病与营养,Email:sunping888@126.com

摘要: 营养不良是全球性的问题。随着疾病谱的改变,人们关注到除摄入不足、吸收障碍外,疾病相关的营养不良的重要性。2018年达成的全球领导人共识营养不良诊断标准(GLIM),旨在对成年病人进行营养不良评定及严重程度分级,及早营养支持治疗可以降低30 d全因死亡率、入重症监护室概率及再住院率以及远期并发症。鉴于各系统疾病的差异,在实施GLIM标准第一步时营养风险筛查并无统一筛查工具,各筛查工具及评估方法的适用性不同,且在GLIM标准下不同组合的临床效用也不同。该综述旨在探讨GLIM标准下各筛查工具及评定方法在诊断营养不良的适用情况以及GLIM标准在临床实践中的有效性,为临床诊断营养不良提供便捷。

关键词: 营养不良; 全球领导人共识营养不良诊断标准; 营养风险筛查; 营养评估

Implement method and application of the GLIM criteria for diagnosis of malnutrition in clinical practice

LU Yunli¹, SUN Ping²Author Affiliations:¹Shanxi Medical University, First School of Clinical Medicine, Taiyuan, Shanxi 030001, China;²Department of Nutrition, The First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Malnutrition is a global problem. As the disease spectrum changes, attention is drawn to the importance of disease-related malnutrition in addition to inadequate intake and malabsorption. The global leadership initiative on malnutrition (GLIM) in 2018, aims to diagnose and grade the severity of malnutrition in adult patients. Early nutritional support can reduce 30-day all-cause mortality, admission to intensive care unit, readmission rate and long-term complications. In view of the differences in various system diseases, there is no uniform screening tool for nutritional risk screening in the first step of implementing GLIM criteria. Meanwhile, the applicability of each screening tool and evaluation method is different, and the clinical utility of different combinations by GLIM criteria is also different. The purpose of this review aims to explore the application of screening tools and evaluation methods in the diagnosis of malnutrition, and the effectiveness of GLIM standard in clinical practice, so as to provide convenience for clinical diagnosis of malnutrition.

Key words: Malnutrition; The glim criteria; Nutritional risk screening; Nutrition assessment