·专题研究：精子 DNA 损伤性不育的中医证治体系构建与分子靶点研究·

五味扶正益精汤治疗男性不育症精子 DNA 损伤患者的蛋白质组学分析及初步实验验证*

马鹏[1]，张琦[2]，王祖龙[2]

1. 河南中医药大学第一临床医学院，河南 郑州 450000；2. 河南中医药大学第一附属医院男科，河南 郑州 450000

摘要：目的：分析五味扶正益精汤治疗男性不育症精子 DNA 损伤患者的蛋白质组学特征，并基于鞘脂代谢通路进行实验验证。方法：20 例男性不育症精子 DNA 损伤患者随机分为试验组与验证组各 10 例，均接受五味扶正益精汤治疗 12 周。另将 10 例健康体检者作为对照组。采用流式细胞术检测患者精子 DNA 碎片指数（DNA fragmentation index，DFI）。采用 DIA 蛋白质组学技术检测精浆蛋白质谱，筛选差异表达蛋白。采用 DAVID 数据库对差异表达蛋白进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。采用 ELISA 法检测精浆鞘磷脂磷酸二酯酶 1（sphingomyelin phosphodiesterase 1，SMPD1）、鞘氨醇－1－磷酸（sphingosine－1－phosphate，S1P）、神经酰胺（ceramide，Cer）含量。采用 RT－qPCR 法检测精浆 *SMPD1*、*S1P*、*Cer* 基因表达水平。结果：与治疗前比较，试验组和验证组治疗后患者精子 DFI 水平降低（$P<0.001$）。DIA 蛋白质组学鉴定出 2 753 种定量蛋白质。与对照组比较，试验组治疗前精浆中有 542 个差异表达蛋白（308 个蛋白上调，234 个蛋白下调）；与治疗前比较，试验组治疗后精浆中有 505 个差异表达蛋白（267 个蛋白上调，238 个蛋白下调）；两者的交集蛋白 235 个。KEGG 分析显示，差异表达蛋白和交集蛋白集中富集于鞘脂代谢通路。ELISA 检测显示，与对照组比较，验证组治疗前精浆中 SMPD1、Cer 含量升高，S1P 含量降低（$P<0.01$）；与治疗前比较，验证组治疗后精浆中 SMPD1、Cer 含量降低，S1P 含量升高（$P<0.01$）。RT－qPCR 检测显示，与对照组比较，验证组治疗前精浆 *SMPD1* mRNA、*Cer* mRNA 水平升高，*S1P* mRNA 水平降低（$P<0.01$）；与治疗前比较，验证组治疗后精浆 *SMPD1* mRNA、*Cer* mRNA 水平降低，*S1P* mRNA 水平升高（$P<0.01$）。结论：五味扶正益精汤可改善男性不育症患者的精子 DNA 损伤，其机制可能与调节鞘脂代谢通路有关。

关键词：五味扶正益精汤；男性不育症；精子 DNA 损伤；DNA 碎片指数（DFI）；蛋白质组学；鞘脂代谢
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.05.146
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)05－0911－08

Proteomic Analysis and Preliminary Experimental Verification of Wuwei Fuzheng Yijing Decoction in Treatment of Male Infertility Patients with Sperm DNA Damage

MA Peng[1]，ZHANG Qi[2]，WANG Zulong[2]

1. The First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450000；2. Department of Andrology，the First Affiliated Hospital to Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450000

Abstract：Objective：To analyze the proteomic characteristics of Wuwei Fuzheng Yijing Decoction in patients with sperm DNA damage in male infertility，and to carry out experimental verification based on sphingolipid metabolism pathway. Methods：A total of 20 patients with sperm DNA damage in male infertility were randomly divided into the experimental group and the verification group，with 10 cases

* **基金项目**：国家自然科学基金面上项目（82174377）；河南省自然科学基金项目（242300420431）

in each group, and all of them were treated with Wuwei Fuzheng Yijing Decoction for 12 weeks. In addition, 10 healthy subjects were used as the control group. Flow cytometry was used to detect the DNA fragmentation index (DFI) of the patient's sperm. DIA proteomics technology was used to detect seminal plasma protein profile, and differentially expressed proteins were screened. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of differentially expressed proteins was performed using the DAVID database. The contents of sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1), sphingosine - 1 - phosphate (S1P) and ceramide (Cer) were detected by ELISA. RT - qPCR was used to detect the expression levels of SMPD1, S1P and Cer genes in seminal plasma. Results: Compared with before treatment, the DFI level of sperm in the experimental group and the validation group decreased after treatment ($P < 0.001$). DIA proteomics identified 2 753 quantitative proteins. Compared with the control group, there were 542 differentially expressed proteins in the seminal plasma in the experimental group before treatment (308 proteins were up - regulated and 234 proteins were down - regulated). Compared with before treatment, there were 505 differentially expressed proteins in the seminal plasma in the experimental group after treatment (267 proteins were up - regulated and 238 proteins were down - regulated). There were 235 intersecting proteins between the two. KEGG analysis showed that the differentially expressed proteins and intersecting proteins were concentrated and enriched in the sphingolipid metabolism pathway. ELISA showed that compared with the control group, the contents of SMPD1 and Cer in seminal plasma increased and the content of S1P decreased in the validation group before treatment ($P < 0.01$), and compared with the content before treatment, the contents of SMPD1 and Cer in seminal plasma decreased and the content of S1P increased after treatment in the validation group ($P < 0.01$). RT - qPCR showed that compared with the control group, the levels of *SMPD1* mRNA and *Cer* mRNA in seminal plasma increased and the level of *S1P* mRNA decreased before treatment in the validation group ($P < 0.01$), and compared with the pre - treatment group, the levels of *SMPD1* mRNA and *Cer* mRNA in seminal plasma decreased and the level of *S1P* mRNA increased after treatment in the validation group ($P < 0.01$). Conclusion: Wuwei Fuzheng Yijing Decoction can improve sperm DNA damage in male infertility patients, and its mechanism may be related to the regulation of sphingolipid metabolism pathway.

Key words: Wuwei Fuzheng Yijing Decoction; male infertility; sperm DNA damage; DNA fragmentation index (DFI); proteomics; sphingolipid metabolism

育龄期夫妇婚后同居 1 年以上，性生活正常且未采取避孕措施，女方生育能力正常，由于男方因素致女方不孕，临床上称为男性不育症[1]。据世界卫生组织统计，全球约 15% 的育龄期夫妇受不育问题困扰，其中约 50% 为男方精液异常所致[2]。目前，男性不育症的诊断主要依赖于对精子质量的研究，包括对精子浓度、活力、形态等参数的分析。精子 DNA 完整性被认为是评价精子生育能力的重要指标之一。在精子生成过程中，细胞内外的蛋白质合成、修饰及分布都经历着动态调整，以确保精子发生、受精以及与卵子的相互作用。在这一系列过程中，任何环节的蛋白质组成、表达或功能状态异常，均可能导致精子染色质损伤，进而影响生育能力。精子 DNA 碎片指数（DNA fragmentation index，DFI）是评估精子遗传物质 DNA 完整性或受损程度的关键指标。精子 DNA 损伤不仅可能阻碍卵子的受精过程，还可能对胚胎的健康发育产生负面影响，增加早期流产的风险[3]。

精子 DNA 损伤可由内源因素和外源因素共同导致，包括高温暴露、吸烟、接触环境污染物、化疗药物，以及生殖细胞成熟障碍、细胞凋亡、氧化应激等[1]。目前，现代医学尚无治疗精子 DNA 损伤性不育的特效药物和治疗手段，辅助生殖技术也无法解决这一难题。中医药在男性不育症治疗领域形成了独特的理论体系。《悬解录》所载五子衍宗丸具有补肾益精功效，被誉为“古今种子第一方”。王祖龙教授基于多年临床经验，针对男性不育症精子 DNA 损伤的特点，以“扶正观”为基础，对五子衍宗丸进行加减改良，创制了五味扶正益精汤。临床研究显示，该方可显著改善男性不育症精子 DNA 损伤肾亏虚血瘀型患者精子 DFI、中医证候积分、精子存活率及精子浓度等，且未见明显不良反应[4-5]。

组学技术是对特定类型的分子群体[如蛋白质、脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）及代谢物等]进行的高通量分析，其在男性生殖领域的研究日益增多。越来越多与男性不育相关的蛋白质、基因、代谢物及表观遗传学特征得到鉴定，为揭示相关的分子生物标志物提供了可能。这些标志物对于实现成本低廉、简单且准确的诊断，进而识别不育病因及预测受精结局具有潜在价值。Intasqui 等[6]研究发现，精浆蛋白质组与精液氧化应激有关，并提出了精液生物标志物 Mucin - 5B。另有研究表明，精

浆蛋白质组改变与精子 DNA 片段化有关[7]。由此可见,精浆蛋白质组可直观反映精子的状态。因此,深入研究精浆蛋白质组有望为理解精子功能提供重要视角。

1　研究资料

1.1　一般资料　选取 2024 年 1 月至 2024 年 10 月在河南中医药大学第一附属医院男科就诊的 20 例男性不育症精子 DNA 损伤患者及 10 例健康体检者为研究对象。将 20 例患者随机分为试验组与验证组,每组各 10 例,试验组年龄(34.20 ± 8.09)岁,病程(14.00 ± 3.71)个月;验证组年龄(34.40 ± 7.37)岁,病程(13.20 ± 2.78)个月。两组患者接受五味扶正益精汤治疗 12 周,并留取治疗前及治疗后的精液样本。健康体检者不采取干预措施,并留取体检当日的精液样本,标记为对照组,年龄(28.80 ± 5.96)岁。将对照组与试验组患者的样本进行蛋白质组学检测,验证组患者的样本用于后续实验验证。所有受试对象自愿签署知情同意书并配合研究,本研究由河南中医药大学第一附属医院伦理委员会审核批准,伦理批件号:2023HL - 249 - 01。

1.2　诊断标准

1.2.1　西医诊断标准　根据《中医男科学(2017)》[1]和《男性生殖遗传学检查专家共识》[3]的相关诊断标准制订:(1)育龄夫妇婚后同居 1 年以上,性生活正常,未采用任何避孕措施,女方正常,由于男方因素致女方不孕;(2)健康体检者 DFI < 15%,试验组与验证组患者 DFI≥30%[8]。

1.2.2　中医诊断标准　参照《中药新药临床研究指导原则(2002)》[9]和男性不育症中西医结合多学科诊疗指南的肾虚血瘀证中医辨证标准。主症:腰膝酸痛;次症:(1)头晕;(2)耳鸣;(3)神疲乏力;(4)性欲减退;(5)口唇紫暗;舌脉:舌质紫黯,或见瘀点、瘀斑,舌下脉络迂曲,脉涩或沉细。以上主症必须具备,兼具次症中至少 1 项,并参考舌脉,即可诊断。

1.3　病例纳入标准　(1)符合西医诊断标准;(2)符合肾虚血瘀证中医辨证标准;(3)年龄 22 ~ 45 岁;(4)参加本研究前 2 周未服用对本研究有影响的药物;(5)符合医学伦理学标准;(6)签署知情同意书。

1.4　病例排除标准　(1)重度少精子症、无精子症者;(2)外生殖器先天性结构异常者(如阴茎短小、严重尿道下裂等);(3)精道不完全梗阻、精索静脉曲张等器质性疾病者;(4)染色体异常,包括核型异常、Y 染色体微缺失的个体;(5)合并生殖道感染、精浆生化或内分泌检查异常者;(6)合并严重心脑疾病,如造血功能、肝肾功能异常、精神异常者;(7)过敏体质或对本次试验药物过敏者。

1.5　病例脱落标准　(1)受试者主动退出试验并撤回知情同意书;(2)出现严重不良反应或并发症;(3)因其他原因失去联系或退出试验的受试者。

1.6　病例剔除标准　(1)诊断或筛选过程中出现偏差,入组后不满足研究方案所设定的纳入标准;(2)受试者擅自联合使用其他药物,包括可能对精子参数产生重大影响的药物,影响试验的安全性和有效性评价;(3)受试者在入组后未接受任何药物治疗。

1.7　治疗方法　试验组与验证组给予五味扶正益精汤加减,基本方:黄芪 30 g,枸杞子 15 g,川牛膝 15 g,五味子 15 g,车前子 12 g。中药统一采用颗粒剂(四川新绿色药业科技发展股份有限公司),由河南中医药大学第一附属医院药房提供。每日 1 剂,分 2 次开水冲服,12 周为 1 个疗程。

2　材料与方法

2.1　试剂与仪器　酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase,ASM)即鞘磷脂磷酸二酯酶 1(sphingomyelin phosphodiesterase 1,SMPD1)检测试剂盒、鞘氨醇 - 1 - 磷酸(sphingosine - 1 - phosphate,S1P)检测试剂盒(武汉云克隆有限公司,货号:SEB360Hu、CEG031Ge);神经酰胺(ceramide,Cer)酶联免疫分析试剂盒(武汉艾迪抗有限公司,货号:AD22762);反转录试剂盒、PCR 试剂盒(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,货号:E047 - 01B、E096 - 01A);总 RNA 提取试剂盒(上海雅酶有限公司,货号:YY101);氯仿(山东双双化工有限公司,货号:GB/T682 - 2002);无水乙醇(天津市恒兴化学有限公司,货号:分析纯 AR500)。

核酸定量仪、酶标仪、高效液相色谱仪、质谱仪、高速离心机(美国赛默飞世尔科技公司,型号:NANODROP 2000、Multiskan FC、Vanquish neo、Astral、Heraeus Fresco17);qPCR 仪(罗氏集团,型号:LightCycler480);色谱柱(美国赛默飞世尔科技公司,

150 μm × 15 cm)；4 ℃离心机(美国赛洛捷克公司，型号：CF1524R)；流式细胞仪(重庆医药集团河南有限公司，型号：DXP Athena)。

2.2　流式细胞术检测患者精子 DFI 水平　参照《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》[10]标准采集精液标本。所有受试者禁欲 2 ~ 7 d，手淫取精，4 ℃、11 150 r · min^{-1}离心 10 min，从精液中收集精浆，并使用 0.22 μm 滤膜过滤后放于 -80 ℃冰箱保存。

若治疗期间，患者的配偶成功怀孕，该患者将退出研究，此时需收集精液检测精子 DFI 作为最终研究数据；若治疗过程中患者配偶未怀孕，将在整个治疗周期结束后安排复查，采用流式细胞术检测患者精子 DFI 水平。

2.3　DIA 蛋白质组学技术检测患者精浆蛋白质谱　使用蛋白前处理试剂盒分离出每组患者精浆样本的总蛋白质，每个样品取 500 ng 总肽段，nano - UPLC 液相系统(Vanquishneo)分离后，质谱仪(Astral)进行数据采集。具体过程为：采用反相色谱(EASY - Spray™ HPLC，150 μm × 15 cm)进行色谱分离；流动相为 80% 乙腈 - 水 - 甲酸体系，其中 A 相为 0.1% 甲酸水溶液，B 相为 0.1% 甲酸、80% 乙腈溶液。将质谱数据导入 Spectronaut(version 19.0.240604.62635，Biognosys AG)软件，与 UniProtFASTA 数据库进行比对搜索。

根据蛋白表达量筛选差异表达蛋白，标准为差异倍数 > 1.2 或 < 0.83 且 P < 0.05。采用 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)对差异表达蛋白进行基因本体(Gene Ontology，GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG)富集分析，所有参数都设置为默认值[11]。其中，GO 分析包括生物过程(biological process，BP)、细胞成分(cellular component，CC)及分子功能(molecular function，MF)。

2.4　ELISA 法检测精浆鞘脂代谢相关因子含量　使用 ELISA 试剂盒检测患者精浆中鞘脂代谢相关蛋白 SMPD1、S1P、Cer 含量，严格按照试剂盒说明书进行操作，在 450 nm 处测量光密度值。

2.5　RT - qPCR 法检测精浆 *MPD1*、*S1P*、*Cer* 基因表达水平　使用 RNA 提取液提取患者精浆中总 RNA，按照试剂盒说明书进行逆转录反应。通过实时荧光定量 PCR 系统进行基因扩增，反应条件为：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃变性 10 s，72 ℃变性 10 s，重复 40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目标基因的相对表达水平。引物由苏州近岸蛋白质科技股份有限公司合成，见表 1。

表 1　引物序列

基因	上游引物(5′-3′)	下游引物(5′-3′)
SMPD1	CTGCGCACCCTCAGAATTGG	GAGCCAGAAGTTCTCACGGG
Cer	GGATCAACCTGGTCACCCTG	GGAGATCTGATGGACAGCGG
S1P	TGTCCCTACATGTGGCCCTA	GCTGCCAGTCAGGCTTATCT
GAPDH	ATTCCACCCATGGCAAATTCC	GACTCCACGACGTACTCAGC

2.6　统计学方法　采用 SPSS 29.0 软件进行统计分析。所有数据均符合正态分布，以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用独立样本 t 检验，治疗前后的比较采用配对样本 t 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　各组患者精子 DFI 水平变化　与治疗前比较，试验组和验证组治疗后患者精子 DFI 水平降低(P < 0.001)，见表 2。

表 2　各组患者精子 DFI 水平比较　($\bar{x} \pm s$)

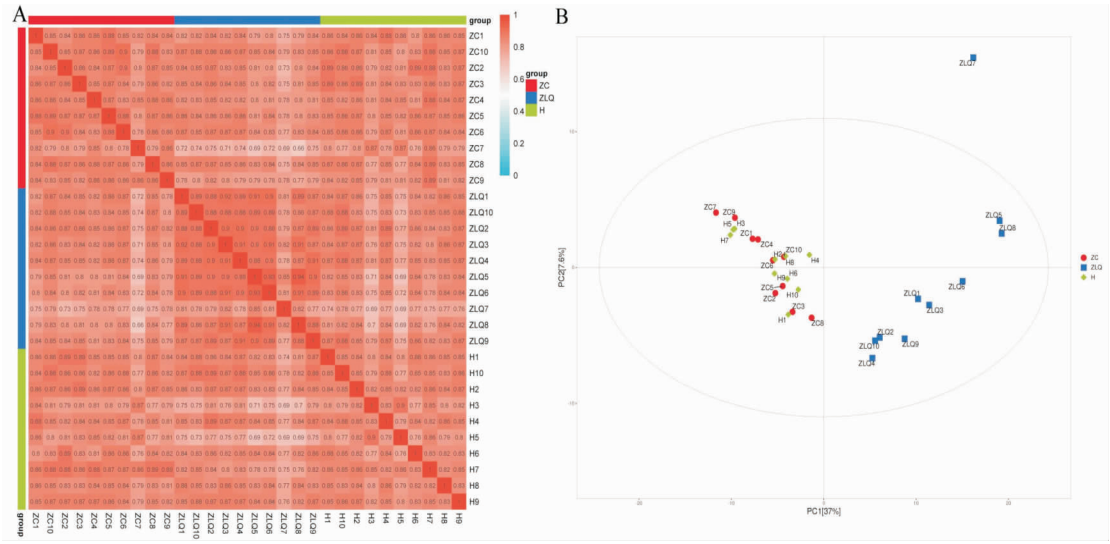
组别	n	DFI/%		t 值	P 值
		治疗前	治疗后		
对照组	10	9.07 ± 3.43	-	-	-
试验组	10	40.01 ± 10.76	21.88 ± 6.45***	9.856	< 0.001
验证组	10	40.52 ± 9.12	18.73 ± 5.98***	11.402	< 0.001

注：与治疗前比较，*** P < 0.001。

3.2　精浆蛋白质组学分析结果

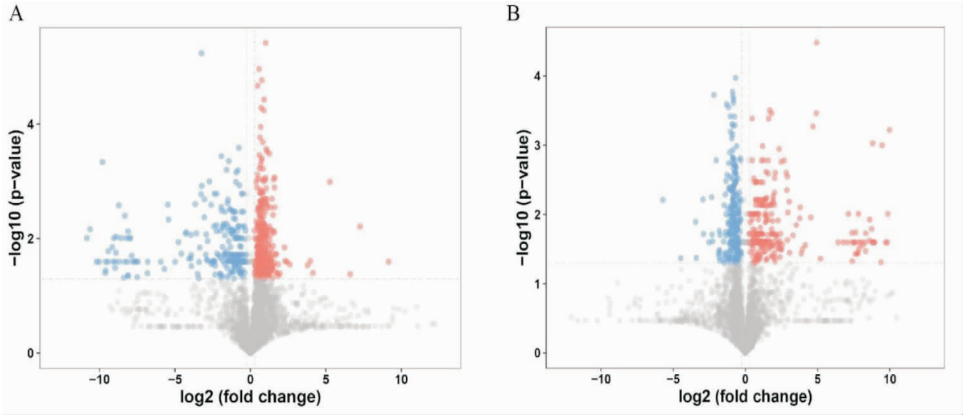
3.2.1　精浆蛋白质谱　通过 DIA 蛋白质组学技术鉴定了 2 766 种蛋白质，其中 2 753 种蛋白质可以定量。采用皮尔逊相关系数、主成分分析(principal component analysis，PCA)评估精浆样本和检测技术的可靠性。相关性分析显示，相关系数均 > 0.7，表明样本之间存在高度相关性，见图 1A。PCA 分析显示，组内样本离散度较小，试验组治疗前与对照组/试验组治疗后的样本离散度较大，表明试验组治疗前后的蛋白质表达谱发生了显著改变，见图 1B。

3.2.2　差异表达蛋白　与对照组比较，试验组治疗前筛选出 542 个差异表达蛋白，其中 308 个蛋白表达上调，234 个蛋白表达下调。与治疗前比较，试验组治疗后筛选出 505 个差异表达蛋白，其中 267 个蛋白表达上调，238 个蛋白表达下调，见图 2。进一步分析发现，两者的交集蛋白 235 个，见图 3。



注：A：相关性系数热图；B：主成分分析图；ZC：对照组；ZLQ：试验组治疗前；H：试验组治疗后。

图 1　各组患者精浆蛋白质组学数据分析图



注：A：对照组与试验组治疗前比较；B：试验组治疗后与治疗前比较；红色表示上调，蓝色表示下调。

图 2　差异表达蛋白火山图

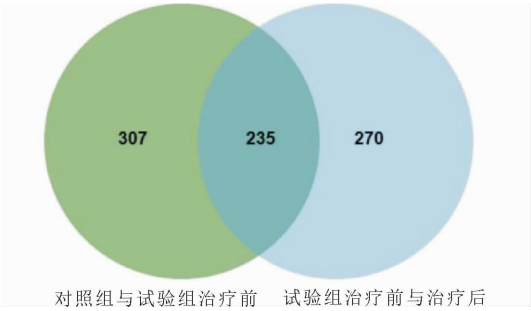
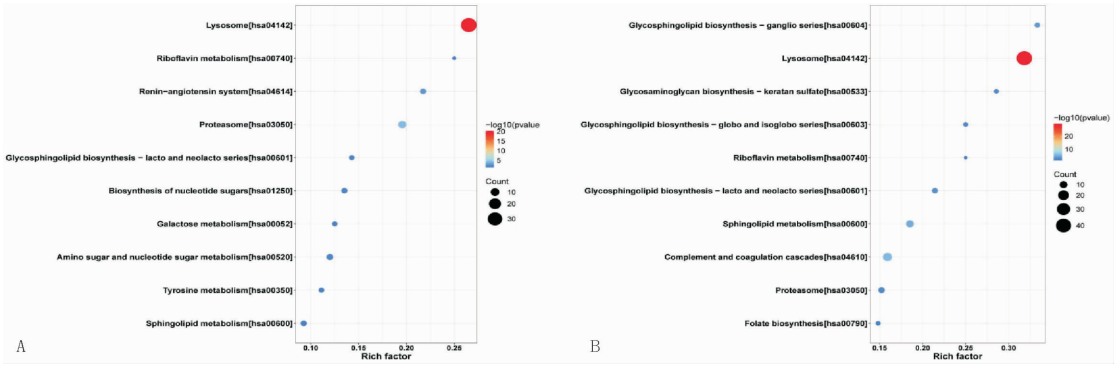


图 3　差异表达蛋白交集维恩图

3.2.3　GO 和 KEGG 富集分析　KEGG 分析显示，对照组和试验组治疗前的差异表达蛋白主要富集在鞘糖脂生物合成－乳酸和新乳酸系列、半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、酪氨酸代谢、鞘脂代谢等信号通路，见图 4A。试验组治疗前和治疗后的差异表达蛋白主要富集在鞘糖脂生物合成－神经节系列、糖胺聚糖生物合成－硫酸角蛋白、鞘糖脂生物合成－球脂和等球脂系列、鞘糖脂生物合成－乳酸和新乳酸系列、鞘脂代谢、叶酸生物合成等通路，见图 4B。

采用模糊 c 均值算法[12]对交集差异表达蛋白进行聚类分析，同一聚类中的蛋白质表现出相似的变化趋势，结果发现 4 个不同的时间模式簇，见图 5。其中，Cluster 2 代表先上调后下调的蛋白质，提示在疾病状态时上调，经药物治疗后下调。对 Cluster 2 的差异表达蛋白进行 GO 和 KEGG 分析，得到 319 个 GO 条目，包括 215 个 BP、48 个 CC、56 个 MF 以及 10 条 KEGG 通路。其中，BP 主要包括糖胺聚糖代谢过程、氨聚糖代谢、黏多糖代谢、糖蛋白代谢等；CC 主要包括溶酶体腔、内质网腔、嗜氮颗粒、细胞质囊腔等；MF 主要包括水解酶活性、锰离子结合、转移酶活性等，见图 6。KEGG 通路主要包括鞘脂代谢、糖胺聚糖降解、糖磷脂的生物合成等，见图 7。



注：A：对照组与试验组治疗前；B：试验组治疗前与治疗后；ZC：对照组；ZLQ：试验组治疗前；H：试验组治疗后。

图 4　差异表达蛋白 KEGG 通路气泡图

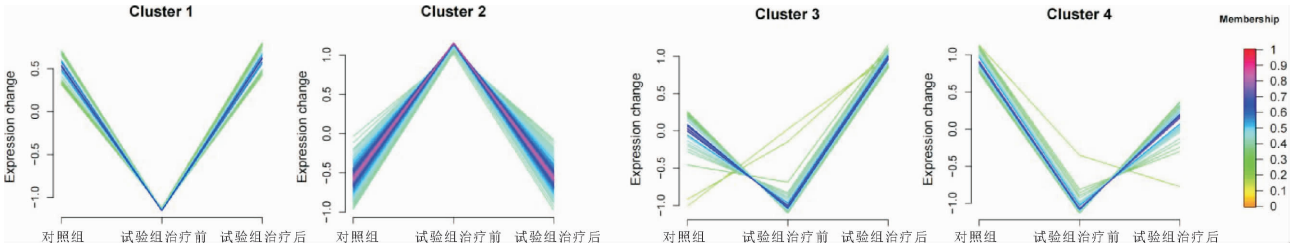


图 5　交集差异表达蛋白聚类分析折线图

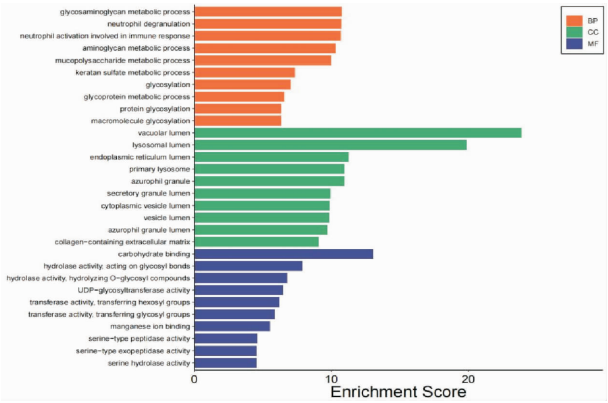


图 6　Cluster 2 差异表达蛋白 GO 分析条形图（top 10）

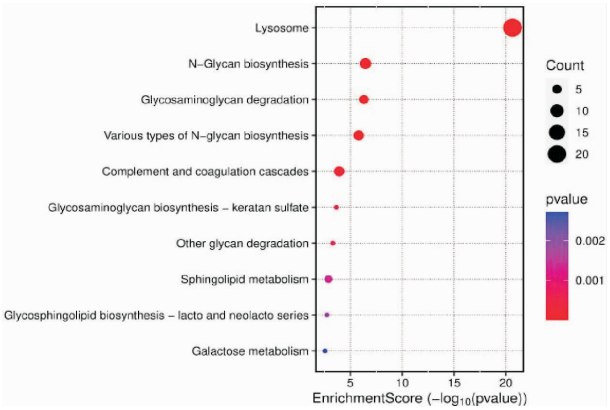


图 7　Cluster 2 差异表达蛋白 KEGG 通路气泡图

3.3　各组患者精浆 SMPD1、S1P、Cer 水平变化

ELISA 检测显示，与对照组比较，验证组治疗前精浆中 SMPD1、Cer 含量升高，S1P 含量降低（$P<0.01$）；与治疗前比较，验证组治疗后精浆中 SMPD1、Cer 含量降低，S1P 含量升高（$P<0.01$），见表 3。

表 3　各组患者精浆 SMPD1、S1P、Cer 含量比较　（$\bar{x}\pm s$，ng·L^{-1}）

组别	n	SMPD1	S1P	Cer
对照组	10	1.79±0.60	94.87±16.70	407.84±72.54
验证组治疗前	10	6.85±0.89**	53.50±10.30**	776.67±71.29**
验证组治疗后	10	2.29±0.70##	88.55±9.61##	442.67±78.05##
F 值	10	158.47	31.21	75.69
P 值	10	<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，**$P<0.01$；与验证组治疗前比较，##$P<0.01$。

RT-qPCR 检测显示，与对照组比较，验证组治疗前精浆 *SMPD1* mRNA、*Cer* mRNA 水平升高，*S1P* mRNA 水平降低（$P<0.01$）；与治疗前比较，验证组治疗后精浆 *SMPD1* mRNA、*Cer* mRNA 水平降低，*S1P* mRNA 水平升高（$P<0.01$），见表 4。

表 4　各组患者精浆 *SMPD1*、*S1P*、*Cer* 基因表达量比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	*SMPD1* mRNA	*S1P* mRNA	*Cer* mRNA
对照组	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
验证组治疗前	10	3.13±0.14**	0.41±0.27**	3.53±0.25**
验证组治疗后	10	2.14±0.14**##	0.70±0.71**##	2.22±0.21**##
F 值	10	898.21	441.98	445.37
P 值	10	<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，**$P<0.01$；与验证组治疗前比较，##$P<0.01$。

4　讨论

精子 DNA 作为遗传信息的载体，其异常可能导致遗传信息的缺失，进而影响精子的受精能力、受精卵的分裂及胚胎发育，导致不良妊娠的发生。研究表明，不育症患者精子 DFI 明显高于正常人群，约有 20% 的特发性不育与精子 DNA 损伤直接相关[13]。精子 DNA 损伤可归属于中医“男子艰嗣”“不育类病”等范畴，病位在肾，涉及脾、肝两脏。王祖龙教授认为，精子 DNA 损伤的本质为“正虚易感”，即正气虚弱导致脏腑功能失调，影响经络气血正常运行，破坏精子生成环境；正气监视与调控功能受损，卫外不固，影响精子生成，终致精子 DNA 损伤。因此，通过“扶正益气，补肾化瘀”可改善精子发生的微环境，减少睾丸支持细胞损伤，提高生育力。五味扶正益精汤依“扶正观”而立，针对男性不育症“正虚易感”的基本病机。其中，黄芪补气健脾、益卫固表；枸杞子补肝肾、益精血，川牛膝活血通经、补益肝肾；五味子滋肾阴、补肾涩精；车前子利尿固精、导膀胱水邪。诸药合用，补而不燥、涩中有通，具有益气补肾、活血化瘀的功效。研究表明，黄芪可改善精子活力及存活率[14]。枸杞子可促进生殖损伤的修复[15]，也可通过增强抗氧化酶活性恢复糖尿病大鼠的睾丸功能，提高精子数量及活力[16]。黄芪、川牛膝、五味子含有多糖成分，能通过清除氧自由基、调节下丘脑 - 垂体 - 性腺轴激素分泌等途径，保护并调节生殖系统功能[17]。车前子可通过降低前列腺组织内双氢睾酮水平，促进精液液化[18]。本研究显示，经五味扶正益精汤治疗 12 周后，能显著降低精子 DFI，减轻男性不育症精子 DNA 损伤。

蛋白质组学结果显示，差异表达蛋白 KEGG 分析均富集到鞘脂代谢相关信号通路。对 Cluster 2 的 GO 分析显示，富集到多条与生殖系统有关的生物过程和信号通路。其中，糖胺聚糖对精子获能至关重要[19]。内质网和溶酶体参与顶体的生物发生，其缺陷可能导致不孕或不育[20]。KEGG 富集分析显示，交集差异表达蛋白也富集到鞘脂代谢相关信号通路。以上结果提示，鞘脂代谢在男性不育症精子 DNA 损伤的发生与治疗过程中起重要作用。鞘脂代谢物存在于精子中，在睾丸病理应激后生殖细胞凋亡中起调节作用[21]。此外，鞘脂代谢在维持正常卵泡和卵母细胞生长中起关键作用[22]。

鞘脂作为生物活性脂质家族的重要成员，在调节细胞运动、生长、衰老及分化中发挥重要作用[23]。在精子总膜脂质组成中，鞘脂占 10% ~20%，关键成分包括 Cer、C1P、S1 - P 等[24]。SMPD1 在鞘脂代谢通路中富集，可将鞘磷脂降解为 Cer 和磷脂。Cer 在神经酰胺酶的作用下水解为 S1P 和 C1P 等脂质[25]。研究表明，SMPD1 是维持睾丸中正常鞘磷脂水平和正常精子活力的必需蛋白质[26]。Cer 通过棕榈酸酯和丝氨酸之间的缩合反应或鞘磷脂酶水解鞘磷脂而合成，是精浆和精子中的主要鞘脂[27]，也是鞘脂代谢的枢纽。Cer 可促进人类精子获能，在获能的精子中，Cer 触发顶体反应，促使其穿透透明带，实现卵母细胞受精[28]。S1P 作为一种溶血磷脂，是鞘脂代谢的产物之一，可通过激活 STAT3[29]，降低 Cer[30]，抑制细胞凋亡。Stobezki 等[31]研究表明，随着男性年龄增长，精子 DNA 的修复功能逐渐减弱，而 S1P 可通过上调 DNA 修复相关基因 *BRCA1* 的表达，增强精子 DNA 的修复能力。此外，提高 S1P 水平有助于维持线粒体稳定，抑制睾丸生殖细胞的凋亡[32]。本研究显示，参与鞘脂代谢的 SMPD1 及其下游蛋白 Cer 在治疗前升高，经五味扶正益精汤治疗后明显下降。S1P 在治疗前的男性不育症精子 DNA 损伤患者精浆中明显下降，经五味扶正益精汤治疗后显著上调。以上结果提示，鞘脂代谢紊乱可能参与男性不育症精子 DNA 损伤的发生，而五味扶正益精汤能够显著调节鞘脂代谢紊乱。

综上所述，五味扶正益精汤可改善男性不育症患者的精子 DNA 损伤，其机制可能与调节鞘脂代谢通路有关。

参考文献：

[1]秦国政. 中医男科学[M]. 北京：科学出版社，2017.
[2]MINHAS S，BETTOCCHI C，BOERI L，et al. European association of urology guidelines on male sexual and reproductive health：2021 update on male infertility[J]. Eur Urol，2021，80(5)：603 - 620.
[3]《男性生殖遗传学检查专家共识》编写组，商学军，陈亮，等. 男性生殖遗传学检查专家共识[J]. 中华男科学杂志，2015，21(12)：1138 - 1142.
[4]赵盼盼. 基于正虚易感学说观察五味扶正益精汤对男性不育患者精子 DNA 完整性的影响[D]. 郑州：河南中医药大学，2020.
[5]马慧杰，王祖龙，王诗琦，等. 王祖龙治疗精子 DNA 碎片率增高性不育症用药规律分析[J]. 中医药临床杂志，2018，30(6)：1050 - 1052.
[6]INTASQUI P，ANTONIASSI M P，CAMARGO M，et al. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal Semen parameters[J]. Fertil Steril，2015，104(2)：292 - 301.

[7] INTASQUI P, CAMARGO M, DEL GIUDICE P T, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma[J]. BJU Int, 2013, 112(6): 835 – 843.
[8] JIANG H, XIA X L, LUO Y, et al. Sperm DNA fragmentation index: limited effectiveness on predicting embryo quality in assisted reproduction technology treatments[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2025, 23(1): 14.
[9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
[10] WHO 人类精液检查与处理实验室手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
[11] WANG X, ZHI Y X. Altered urinary metabolomics in hereditary angioedema[J]. Metabolites, 2022, 12(11): 1140.
[12] FUTSCHIK M E, CARLISLE B. Noise – robust soft clustering of gene expression time – course data[J]. J Bioinform Comput Biol, 2005, 3(4): 965 – 988.
[13] SANDRO C E, ASHOK A, AHMAD M. An evidence – based perspective on the role of sperm chromatin integrity and sperm DNA fragmentation testing in male infertility[J]. Transl Androl Urol, 2017, 6(Suppl 4): S665 – S672.
[14] 梁培育, 李浩勇, 肖劲逐, 等. 添加黄芪注射液对人精子线粒体功能的影响[J]. 中国男科学杂志, 2004, 18(3): 11 – 13.
[15] 王继升, 邓省, 王彬, 等. 菟丝子 – 枸杞子改善少弱精子症机制的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 178 – 180, 305 – 306.
[16] ZHOU Y F, OLATUNJI O J, CHEN H X. Ameliorative effects of Lycium chinensis on male sexual dysfunction and testicular oxidative damage in streptozotocin – induced diabetic rats[J]. Food Sci Biotechnol, 2019, 28(4): 1217 – 1223.
[17] 杨柠, 张赫, 李家富, 等. 中药多糖生殖保护作用及机制研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(3): 224 – 228.
[18] 李冲冲, 龚苏晓, 许浚, 等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(6): 1233 – 1246.
[19] PARRISH J J, SUSKO – PARRISH J, WINER M A, et al. Capacitation of bovine sperm by heparin[J]. Biol Reprod, 1988, 38(5): 1171 – 1180.
[20] KHAWAR M B, GAO H, LI W. Mechanism of acrosome biogenesis in mammals[J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 195.
[21] TURATHUM B, GAO E M, GRATAITONG K, et al. Dysregulated sphingolipid metabolism and autophagy in granulosa cells of women with endometriosis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 906570.
[22] WANG D F, TANG Y D, WANG Z C. Role of sphingolipid metabolites in the homeostasis of steroid hormones and the maintenance of testicular functions[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1170023.
[23] HANNUN Y A, OBEID L M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(2): 139 – 150.
[24] LI N J, LI G B. Sphingolipid signaling in kidney diseases[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2025, 328(3): F431 – F443.
[25] 赵萌萌, 田百玲, 赵珊, 等. ASM 在免疫调节及自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(20): 2555 – 2562.
[26] OTALA M, PENTIKAINEN M O, MATIKAINEN T, et al. Effects of acid sphingomyelinase deficiency on male germ cell development and programmed cell death[J]. Biol Reprod, 2005, 72(1): 86 – 96.
[27] FURSE S, KUSINSKI L C, RAY A, et al. Relative abundance of lipid metabolites in spermatozoa across three compartments[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11655.
[28] VAQUER C C, SUHAIMAN L, PAVAROTTI M A, et al. Ceramide induces a multicomponent intracellular calcium increase triggering the acrosome secretion in human sperm[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867(7): 118704.
[29] FEUERBORN R, BECKER S, POTI F, et al. High density lipoprotein(HDL) – associated sphingosine 1 – phosphate (S1P) inhibits macrophage apoptosis by stimulating STAT3 activity and survivin expression[J]. Atherosclerosis, 2017, 257: 29 – 37.
[30] JOZEFCZUK E, GUZIK T J, SIEDLINSKI M. Significance of sphingosine – 1 – phosphate in cardiovascular physiology and pathology[J]. Pharmacol Res, 2020, 156: 104793.
[31] STOBEZKI R, TITUS S, HALICKA D, et al. Declining BRCA – mediated DNA repair in sperm aging and its prevention by sphingosine – 1 – phosphate[J]. Reprod Sci, 2020, 27(3): 940 – 953.
[32] 王华, 赵兴绪, 张勇, 等. 基于代谢组学探讨改良“益精方”治疗肾阳虚少弱精症大鼠的作用[J/OL]. 甘肃农业大学学报, 1 – 20 [2024 – 12 – 09]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1055.s.20241107.1501.006.html.

收稿日期: 2025 – 02 – 10
作者简介: 马鹏(1992 –), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治生殖与男科疾病。
通信作者: 王祖龙(1965 –), 男, 河南焦作人, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治生殖与男科疾病。E – mail: wangzulong123@126.com

编辑: 刘凯歌