

## 精液中 SCF/c-kit 值在肾虚男性不育辨证中的价值

张 芳,刘建荣\*,马月宏,丁彩云,尹海珍,高嵩丹  
(山西省人民医院,山西 太原 030012)

**〔摘要〕**目的 评价精液中干细胞因子(stem cell factor, SCF)及其受体(c-kit)在男性不育肾虚证中的临床诊断价值,为肾藏精主生殖的基本理论提供实验依据。**方法** 选取45例肾虚不育型患者与30例正常生育者进行对照研究,用酶联免疫吸附试验(ELISA法)测定两组精浆中SCF含量,用实时荧光定量PCR方法对精液离心沉淀物检测c-kit的ct值,并计算其相对表达量。**结果** 两组患者SCF浓度比较无差异( $P>0.05$ ),与正常生育组比较,肾虚不育患者前向运动精子数明显降低( $P<0.01$ )、精液离心沉淀物c-kit相对表达量升高( $P<0.05$ )。**结论** 男性不育肾虚证与精子活动和精液中c-kit表达量密切相关,两者可以作为男性不育肾虚证辨证时重要的客观指标,同时为中医肾藏精主生殖理论提供科学依据。

**〔关键词〕** 男性不育;肾虚证;干细胞因子;原癌基因蛋白质;弱精;精液

**〔中图分类号〕**R256.56 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.006

### The Value of SCF/c-kit in Semen of Infertile Male with Nephroasthenia Syndrome

ZHANG Fang, LIU Jianrong\*, MA Yuehong, DING Caiyun, YIN Haizhen, GAO Songdan  
(The People's Hospital of Shanxi, Taiyuan, Shanxi 030012, China)

**〔Abstract〕 Objective** To evaluate the value of SCF/c-kit in the diagnosis for male infertility with kidney deficiency, and to provide experimental references of the theory to the kidney stores the essence and controls reproductivity. **Methods** 45 infertile males with kidney deficiency were selected and 30 fertile men were used as control. SCF in seminal plasma was determined by ELISA. The relative expression of c-Kit was detected by real-time PCR, and the relative expression quantity was calculated. **Results** There is no difference of SCF concentration between the two groups ( $P>0.05$ ). Compared with fertile men, the forward movement of sperm in infertile men with kidney deficiency was decreased obviously ( $P<0.01$ ), and relative expression of c-kit was significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Kidney deficiency is closely related to sperm motility and the relative expression quantity of c-Kit in sperm., which can be as indicators for infertile male with kidney deficiency. This study provides scientific basis for the theory of kidney storing the essence and controlling reproductivity.

**〔Keywords〕** male infertility; nephroasthenia syndrome; stem cell factor; c-kit; asthenospermia; semen

男性不育症指的是夫妻同居一年以上,没有采取任何避孕措施,因为男方因素引起女方不孕。近年来,男性不育呈明显增高的趋势。中医诊疗男性不育积累了丰富的经验,但中医诊断男性不育需要辨证分型,临床的客观指标很少。中医学认为“肾藏精、主生殖”,精液是男性生殖的主要物质。新近认识的干细胞因子(stem cell factor, SCF)及其受体——原癌基因蛋白质(c-kit)具有调节生殖细胞增殖、分化、减数分裂和细胞凋亡的作用<sup>[1]</sup>。因此,研

究组拟从精液中研究SCF/c-kit与男性不育肾虚证的关系,从而揭示中医基础理论肾藏精、主生殖的分子基础。

### 1 资料与方法

#### 1.1 资料

1.1.1 一般资料 采集2013年1月-2014年6月山西省人民医院生殖医学门诊肾虚不育患者45例、年龄(25~35)岁,平均(29.3±3.8)岁,30例正常生

〔收稿日期〕2015-12-01

〔基金项目〕山西省卫生厅科研课题(201201061)。

〔作者简介〕张 芳,女,医学学士,主要从事生殖疾病的研究。

〔通讯作者〕\* 刘建荣,男,主任医师,硕士研究生导师, E-mail: liujianrong3@sina.com。

育者作为对照,年龄(25~35)岁,平均(28.9±3.9)岁,两组年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

1.1.2 纳入标准 研究分为两组:肾虚不育组、正常生育组。同时符合以下诊断的纳入肾虚不育组:(1)男性不育症诊断标准参照 WHO《人类精液及精子宫颈粘液相互作用实验室检验手册》<sup>[2]</sup>;夫妻有1年或1年以上正常性生活,在未采取避孕措施的情况下,妻子未怀孕,并且排除女方因素,诊断为男性不育症。(2)肾虚诊断参照《王琦男科学》标准<sup>[3]</sup>:①肾精气不足型,证候表现为头昏耳鸣,腰膝酸软,记忆力减退,神疲乏力,舌淡苔白,脉沉细尺弱,精子稀少;②肾阴虚衰型,证候表现为潮热盗汗,五心烦热,口干咽燥,头昏耳鸣,腰膝酸软,性欲减退或遗精,大便秘结,舌嫩红,脉细数而尺弱;③肾阳不足型,证候表现为精神萎钝,神疲乏力,腰膝酸软,畏寒肢冷,性欲减退或阳痿早泄,小便清长夜多,大便稀溏。舌淡胖嫩,脉迟而尺弱。

正常生育组同时符合以下①-⑤条件:①正常生育男性,且在一年内有生育;②没有任何症状,中医诊断未能确定任何证型;③年龄控制在25~35岁;④男性外生殖器检查正常,无明显异常;⑤精液检查结果未见异常。

1.1.3 排除标准 (1)逆行射精或不射精患者;睾丸体积小于10 mL患者;(2)精液中有白细胞或细菌培养阳性,或沙眼衣原体、解脲支原体、人型支原体阳性患者;(3)内分泌检测性腺功能异常及染色体核型异常者;(4)从事放射等特殊职业者;(5)服抗癫痫、抗肿瘤等有碍生精及精子活力的药物者;(6)有其他性传播疾病的患者;(7)合并严重心血管、肝、肾和造血系统其他疾病,精神病患者。

## 1.2 主要试剂与仪器

Trizol(Invitrogen,美国),逆转录试剂盒(Takara公司),实时荧光定量PCR试剂盒(Takara公司),人SCF免疫试剂盒(Boster公司),SynergyH4多功能读数仪(美国伯腾),CFX96实时荧光定量PCR仪(美国伯乐),-80℃冰箱,37℃水浴恒温箱,BioSpectrometer紫外/可见光分光光度计(Eppendorf),低速冷冻离心机(Eppendorf 5430R),T100梯度PCR仪(美国伯乐),WLJY9000精子分析仪(北京伟力公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 标本采集 精液采集时,要求患者禁欲3~7 d,均以手淫法进行精液采集,收集于无毒、无菌的塑料容器中,取50 μL进行精液分析,剩余精液离心3 000 r/min,分离精浆和精液沉淀物,于-80℃冰箱保存待测。

1.3.2 精液分析 将采集的精液置于37℃水浴恒温箱中,测定精液体积,待精液样本充分液化之后,进行精子活力检测。

1.3.3 精浆 SCF 浓度检测 标本统一复融,酶联免疫吸附实验测各组精浆 SCF 浓度,采用 SynergyH4 多功能读数仪测定,操作严格按照说明书。

1.3.4 实时荧光定量 PCR Trizol 试剂抽提精浆沉淀总 RNA,紫外/可见光分光光度计测定 RNA 纯度和浓度,经纯度鉴定和浓度测定后,取 500 ng 总 RNA,按逆转录试剂盒说明书行逆转录,取 1.0 μL 的 cDNA 作为模板,采用荧光定量 PCR 仪,按荧光定量检测试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 反应,β-actin 为内参。PCR 引物由上海生工生物工程有公司合成,c-kit 上游引物:5'-tcctcgctccaagaattgt-3',下游引物:5'-tcacaggtagtcgagcgttt-3',扩增片段长度为 156 bp,β-actin 的上游引物:5'-caccgcgagta-caaccttc-3',下游引物:5'-cccatacccaccatcacacc-3',扩增片段长度为 207 bp。用 20 μL 反应体系,反应参数:95℃变性 30 s,之后 95℃变性 5 s,60℃退火加延伸 30 s,共 40 个循环。目的基因的相对表达量为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

## 1.3.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间差异比较采用两独立样本  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 精液分析和 SCF 结果比较

精液检查结果显示,肾虚不育组前向运动精子(A+B)明显低于正常生育组( $P<0.01$ ),两组在精液量、精子密度、SCF 浓度上差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 两组精液分析和 SCF 浓度比较

组别	<i>n</i>	精液量(mL)	密度( $\times 10^6$ /mL)	前向运动精子(A+B)(%)	SCF(pg/mL)
正常生育组	30	2.72±0.79	44.26±17.32	51.24±10.36	96.33±28.45
肾虚不育组	45	2.42±0.85	31.48±21.41	21.83±15.25**	77.54±47.22
<i>t</i>			1.635	5.656	0.982
<i>p</i>			0.055	0.000	0.177

注:与正常生育组比较 \*\* $P<0.01$ 。

## 2.2 精液沉淀物 c-kit 结果比较

肾虚不育组 c-kit 表达高于正常生育组 ( $P < 0.05$ ), 结果见表 2。

表 2 两组精液沉淀物 c-kit 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	c-kit
正常生育组	30	1.07±0.93
肾虚不育组	45	2.39±1.37*
t		2.389
P		0.011

注:与正常生育组比较 \* $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

SCF/c-kit 在男性生殖中起着重要作用。精子的发生在性腺轴的控制之下,FSH 作用于支持细胞,支持细胞分泌 SCF,SCF 与生精细胞上的受体 c-kit 结合,调节生精细胞的自我更新和增殖,从而导致精子发生<sup>[4-5]</sup>。SCF 由支持细胞分泌,随着生育能力的逐渐旺盛,睾丸组织中的 SCF 表达也在逐渐增多,表明生精功能的增强与 SCF 表达增多有密切关系,SCF 受体即 c-kit 蛋白是由原癌基因 c-kit 表达的蛋白质,在各级生精细胞,睾丸中 c-kit mRNA 至少有两种形式<sup>[6]</sup>,c-kit 在生精细胞的表达与精子发生密切相关<sup>[7]</sup>。SCF 与其受体 c-kit 相互作用调节生精细胞增殖、分化、减数分裂和细胞凋亡,SCF/c-kit 系统可通过不同途径调节生精细胞的自我更新和增殖,通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)通路使 c-kit 阳性精原细胞从 G1 期向 S 期过渡,还通过激活分裂激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路控制生精过程的进程<sup>[8]</sup>。SCF/c-kit 在抗细胞凋亡方面也发挥重要作用,SCF 通过激活 c-kit 受体以维持细胞增殖和凋亡的平衡,从而调节着生精细胞的生存与凋亡<sup>[9]</sup>。

男性不育症病变关键在肾,益肾补精是治疗本病的重要原则<sup>[10]</sup>,因此我们拟从精液 SCF/c-kit 研究其在肾虚辨证中的变化情况。该研究中通过病史询问和精液检查,首先按照男性不育症的标准,确定了诊断,对于诊断为不育的患者再按照肾虚的标准确定肾虚不育患者,这些患者部分表现为弱精症,部分表现为少精症,部分两者皆有。研究结果表明两组患者比较精子密度没有差异( $P > 0.05$ ),精浆 SCF 表达两组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )、前向运动精子肾虚不育组明显低于正常生育组( $P < 0.01$ )、精液沉淀物中 c-kit 表达肾虚不育组高于正常生育组 ( $P < 0.05$ )。从该结果可以看出,精子密度和 SCF 两组比较没有差异,说明此两指标与肾虚辨证无关,SCF 是由支持细胞分泌,肾虚时可能支持细胞没有受损,因

此 SCF 表达没有变化。肾虚者前向运动精子降低、精液沉淀物中 c-kit 表达升高,c-kit 主要表达于原始的生精细胞,肾虚者睾丸受损,生精细胞脱落较多从而导致精液沉淀物中 c-kit 升高。中医学认为肾藏精、主生殖,肾虚与不育密切相关。肾藏之精包括先天之精和后天之精,内寓元阴元阳。肾气以肾精为物质基础,肾气充足才能有子。正如《素问·上古天真论》所说:“丈夫八岁,肾气实……二八肾气盛,天癸至,精气溢泻,阴阳和,故能有子……七八,……天癸竭,精少,肾脏衰,形体皆极”。可见,肾气充足才有子,肾气衰败则无子。精液是男性生殖的最终产物,因此可以通过精液了解肾气的盛衰。该研究通过精液检查,同时在精液中检测了生精过程中的重要物质 SCF/c-kit,结果表明,弱精和 c-kit 升高与肾虚不育密切相关,在临床辨证时除了症状外,还可以参考精液中精子活动、c-kit 这两个重要指标,从而为提高中医辨证的准确性提供客观指标,为中医肾藏精主生殖的基本理论提供科学依据。

## 参考文献:

- [1] Unni SK, Modi DN, Pathak SG, et al. Stage-specific localization and expression of c-kit in the adult human testis [J]. *Histochem Cytochem*, 2009, 57(9): 861-869.
- [2] 世界卫生组织.人类精液及精子宫颈粘液相互作用实验室检验手册[S].北京:人民卫生出版社,2001:12.
- [3] 王琦.王琦男科学[M].郑州:河南科技出版社,1997:333-395.
- [4] Shupe J, Cheng J, Puri P, et al. Regulation of sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling[J]. *Mol Endocrinol*, 2011,25(2):238-52.
- [5] Bhattacharya I, Pradhan BS, Sarda K, et al. A switch in Sertoli cell responsiveness to FSH may be responsible for robust onset of germ cell differentiation during prepubertal testicular maturation in rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(7):E886-898.
- [6] Yincent S, Segretain D, Nishikawa S, et al. Stage-specific expression of the kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a kit-KL interaction critical for meiosis [J]. *Development*, 1998, 125(22):4 585-4 593.
- [7] Tanigaki R, Sueoka K, Tajima H, et al. C-kit expression in spermatogonia damaged by doxorubicin exposure in mice [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2013,39(3):692-700.
- [8] Zhang M, Ma Q, Hu H, et al. Stem cell factor/c-kit signaling enhances invasion of pancreatic cancer cells via HIF-1 $\alpha$  under normoxic condition[J]. *Cancer Lett*, 2011, 303(2): 108-117.
- [9] Sikarwar AP, Rambabu MK, Reddy KV. Differential regulation of gene expression in mouse spermatogonial cells after blocking c-kit-SCF interaction with RNAi [J]. *J RNAi Gene Silencing*, 2008, 4(1): 302-311.
- [10] 周青,何清湖,周兴,等.谭新华工作室无子(男性不育症)中医诊疗方案[J].湖南中医药大学学报,2015,35(3):41-43.

(本文编辑 贺慧斌)