

灵芝多糖对精子膜及DNA作用的研究

房振亚¹, 张美华¹, 李安娜¹, 马彦超^{2*}

¹国家卫健委生育调控技术重点实验室, 山东省妇幼保健院, 山东 济南

²菏泽市立医院妇产科, 山东 菏泽

Email: *mayanchao1212@163.com

收稿日期: 2021年3月16日; 录用日期: 2021年5月17日; 发布日期: 2021年5月24日

摘要

目的: 主要针对灵芝多糖的针对性疗效展开了细化的分析, 据此尝试对其对于精子膜和DNA完整性的影响形成全面而深刻的认识, 从而在临床上为少弱精子症提供针对性的治疗方案。方法: 为实现这一研究目的, 本次实验的开展主要选取了正常的成年男性, 取其精液进行对照比较, 形成对照的主要有等量的生理盐水及不同浓度灵芝多糖溶液(0.25, 1.0, 5.0 mg/ml)。通过伊红-Y染色试验、精子低渗肿胀实验(HOS)以及精子染色质扩散(SCD)实验, 针对不同浓度的灵芝多糖所产生的影响展开了细化的研究与探讨, 试图了解到其对精子膜以及DNA实际产生的作用力情况表现。结果: 从结果表现来看, 不同浓度的灵芝多糖都可以对精子的存活时间起到拉长效果, 从而使得精子的存活率因此得到切实的提升, 并且在这一过程中切实使得精子膜和DNA得到不同程度的保护功效。从具体对比分析来看, 中高灵芝多糖起到的作用效果明显更高, 呈现出更为优秀的结果表现。结论: 灵芝多糖有体外提高精子存活率和保护精子DNA完整性的作用。

关键词

灵芝多糖, 精子, 体外, DNA完整性

Effect of Polysaccharide from *Ganoderma lucidum* on Sperm Membrane and DNA Integrity

Zhenya Fang¹, Meihua Zhang¹, Anna Li¹, Yanchao Ma^{2*}

¹Key Laboratory of Birth Regulation and Control Technology of National Health Commission of China, Maternal and Child Health Care Hospital of Shandong Province, Jinan Shandong

²Heze Municipal Hospital, Heze Shandong

Email: *mayanchao1212@163.com

*通讯作者。

Received: Mar. 16th, 2021; accepted: May 17th, 2021; published: May 24th, 2021

Abstract

Objective: To observe the effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on sperm membrane and DNA integrity *in vitro*. It provides a new way for the treatment of oligoasthenospermia. **Methods:** Normal adult male, abstinence 3 - 5 d masturbation method semen. They were divided into 5 groups, and 0.2 ml semen was collected from each group. The control group was semen stock, and the other 4 groups were added with equal amounts of normal saline, and ganoderma polysaccharides solution of different concentrations (0.25, 1.0, 5.0 mg/ml). The effects of different concentrations of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on sperm survival rate, sperm membrane integrity and sperm nucleus DNA were observed by eosin-Y staining, HOS and SCD. **Results:** Under the same conditions, low, medium and high concentrations of *Ganoderma lucidum* polysaccharides could increase sperm survival time, improve sperm survival rate and motility, reduce sperm DNA damage rate, and protect sperm membrane function and DNA. The effect of polysaccharides in the 1.0 mg/ml and 5.0 mg/ml (medium and high) *Ganoderma lucidum* group was significantly better than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** *Ganoderma lucidum* polysaccharides can improve sperm survival rate and protect sperm DNA integrity *in vitro*.

Keywords

Ganoderma Polysaccharide, Sperm, *In Vitro*, DNA Integrity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

从世界范围来看，不育症是重要的影响较大的健康问题。精液异常，主要表现为弱精子症、少精子症、畸形精子症(简称少弱畸精子症，OAT)或无精子症，是引起男性不育的常见病因之一，而弱精子症最为常见[1] [2] [3] [4]。特发性少弱畸精子症的主要治疗方法仍是药物治疗，例如抗氧化剂和能量补充，这些方法有局限性，存在着一些相对不良的反应，而中医药在特发性少精子症的治疗中具有一定的优势和特点[2] [3]。我们以在前期对中草药灵芝所做的研究为基础，对灵芝多糖采取体外精子培养的方式，探讨灵芝体外活化精子机制，为研制新的精子培养液及通过中药治疗的方式来针对性治疗少弱精症提供数据上的支撑，进而推动其治疗取得较好的成效，也切实通过这样的方式，不断开阔我们的研究视野，推动我们的针对性研究能够切实取得较大程度的突破。

2. 材料与方方法

(一) 灵芝中药材选取及多糖制备

取 100 克干燥的灵芝原料研碎(购自山东省济南市漱玉平民大药房)。，放置在 0.9%的生理盐水中浸泡 1 小时，放置在 100℃的金属浴中加热，取出后过滤去渣得到灵芝提取液。将灵芝提取液置于 62℃的条件下干燥 2 小时。然后加入 250 毫升石油醚，于 62℃~90℃回流 1 小时，进行脱脂，过滤，回收石油醚。滤渣、挥干溶媒，用 250 毫升 80%浓度的乙醇浸渍过夜，于 80℃~90℃温度下回流提取 2 次，每次

1.5 小时。接着,于过滤所得的药渣中加蒸馏水 500 毫升浸 1 小时,于 90℃温浸提取 40 分钟。过滤,接着再加蒸馏水 250 毫升相同温度下温浸 30 分钟后,过滤,合并滤液,减压浓缩至体积 75 毫升。脱去蛋白质,加入 1%的活性炭脱色 2 次。过滤得褐色灵芝粗多糖。灵芝多糖的分离纯化:应用蒸馏水洗脱纤维素柱,然后梯度洗脱,上过柱 5 次,共上样 16 克,收集洗脱液,流水透析 3 天。

(二) 体外活化精子试验

1、精液采集及常规分析:

1) 选择成年(25~35 岁)男性 50 名,入选标准为无心血管系统、呼吸系统、泌尿系统及神经系统疾病,无传染病史,身体健康、已婚且至少生育有 1 个子女,填写知情同意书。精液质量标准:量 2 毫升~6 毫升, pH 7.0~8.0,液化时间 < 30 分钟,精子前向运动率 > 32%,前向运动率与非前向运动率 > 40%,精子密度 > 15×10^6 /毫升,畸形精子率 < 4%。2) 活化精子实验:将选定的精液按 1:1 的比例分别加入不同浓度的药物,观察精子活动情况。加入药液后 30 分钟、24 小时及 48 小时等分别进行观察。

2、分组

每份精液分为 5 组,每组分别加入 0.2 毫升精液,对应的分别为正常组(A,单纯精液),生理盐水组(B)和灵芝多糖低、中、高剂量组(0.25 mg/ml, 1.0 mg/ml 和 5.0 mg/ml, C, D 和 E)。各组分别与精液共同孵育 24 h 及 48 h 后,从而对精子膜的实际存活力等综合表现加以检测。

3、精子存活率检测

按照邱毅等报道的方法[5],于 0.5 克曙红-Y 和 0.1 克吉姆萨(Q/GHSC1092-1999 上海试剂三厂)混合物中,加入 0.9%的生理盐水至 100 毫升,充分混匀溶解,配置成 0.5%浓度的曙红-Y 染液(EY)。然后过滤所得的滤液室温保存备用。取等体积温育 24 小时后的精子悬液和等量的 EY 染液,室温下放置 2 分钟,加盖玻片观察。

4、EY 结合低渗膨胀(HOS, EY-HOS)实验检测精子膜完整性

精子低渗肿胀实验(HOST)同样采用邱毅等报道的方法[5],具体步骤如下:首先称取 0.735 克柠檬酸钠和 1.35 克果糖,加双蒸水至 100 毫升,配置成离子强度为 0.15,渗透压 150 mOsm 的低渗液。取 0.5 克伊红及 0.1 克吉姆萨,按照上节曙红-Y 染液的配制方法配制伊红-吉姆萨(EG)染液:双层滤纸过滤观察在灵芝提取液的作用下精子膜的完整性;取 0.1 毫升精液加入 1 毫升 150 mOsm 的低渗液中,混匀,37℃水浴 30 分钟后,加入 0.1 毫升的伊红-吉姆萨染液,混匀。2 分钟后吸取 50 微升精液-伊红-吉姆萨混合液滴在清洁载玻片上,观察并计算。

5、精子染色质扩散(SCD)实验

按照 Qiu 等[5] [6]描述的方法进行 SCD 实验,将结果划分为大光晕、中光晕、小光晕和无光晕 4 个等级。

(三) 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用方差分析,两两比较采用 Dunnett 法, $P \leq 0.05$ 为差异统计学意义。

3. 结果

(一) 结果发现,可以对正常状态下的男子精液的具体表现得到清晰的了解,从而了解其普遍的水准情况,便于我们进行对照分析。

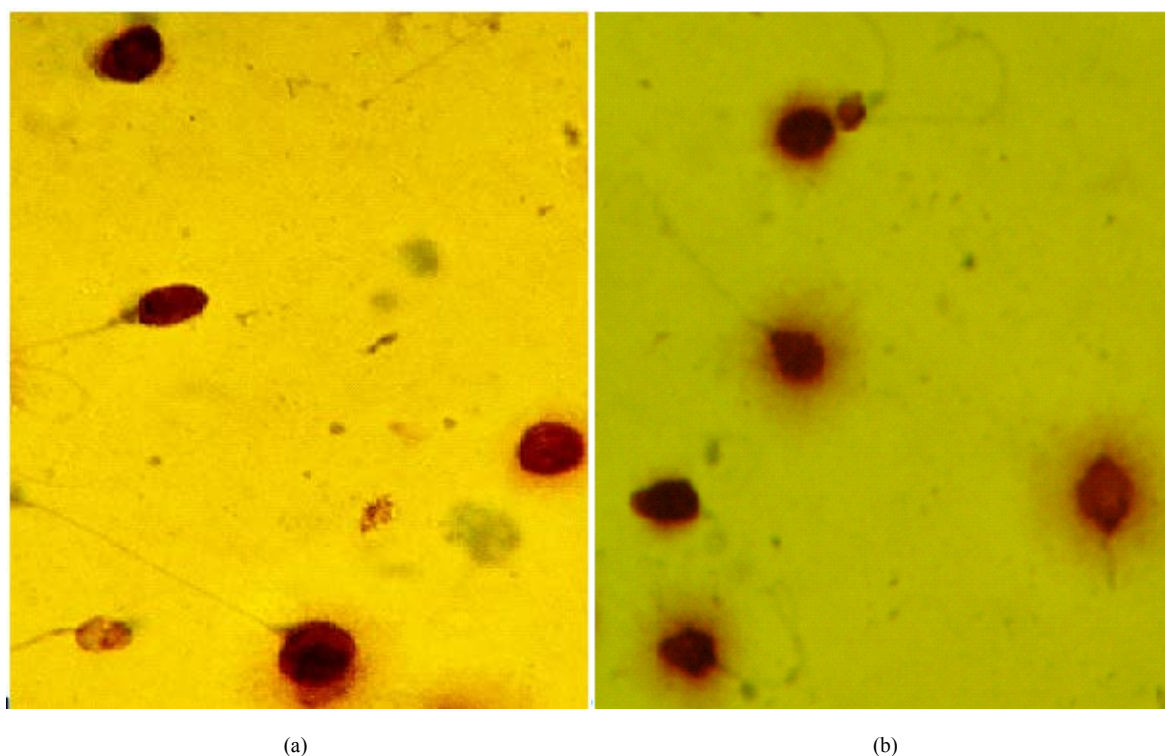
(二) 在对精液进行孵育 24 h 及 48 h 之后,通过对比研究的方式,我们进一步发现,从精子存活率的综合表现来看,中高组的实际表现明显更优,呈现出综合状况较为令人满意的整体态势(见表 1)。

Table 1. Sperm survival rate of each group was determined by EY after 24 h and 48 h ($\bar{x} \pm s$)**表 1.** 各组 24 h 及 48 h 后 EY 检测精子存活率($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(C/mg·ml ⁻¹)	精子存活率(%)	
			24 h	48 h
A	50	--	17.9 ± 2.3	3.2 ± 1.3
B	50	--	13.2 ± 4.1	3.4 ± 2.1
C	50	0.25 mg/ml	31.0 ± 3.9	6.8 ± 2.6 ^a
D	50	1.0 mg/ml	37.1 ± 3.1	9.7 ± 2.7 ^{bc}
E	50	5.0 mg/ml	38.2 ± 3.6	9.2 ± 3.2 ^{bc}

(三) 灵芝多糖对精子膜及 DNA 完整性的影响

50 例精液分别加入生理盐水(对照)、维生素 C 组和灵芝多糖低、中、高剂量孵育 48 h 后各组的精子。精子 DNA 碎片比例 0.25 mg/ml 灵芝多糖组低于对照组和生理盐水组, 维生素 C 组, 1.0 mg/ml 和 5.0 mg/ml 灵芝多糖组的精子 DNA 碎片低于正常组及生理盐水组及维生素 C 组(见表 2)。对照组及灵芝多糖体外孵育 48 h 后对人精子 DNA 的影响见图 1。



油镜放大 10*100 倍

Figure 1. Effects of control group and *Ganoderma lucidum* polysaccharide on DNA of human sperm after 48 h *in vitro* incubation. (a) Sperms in the control group had no halo (DNA integrity damage); (b) *Ganoderma lucidum* polysaccharide can be seen with large halo sperm

图 1. 对照组及灵芝多糖体外孵育 48 h 后对人精子 DNA 的影响。(a) 对照组精子均为无光晕(DNA 完整性损伤); (b) 灵芝多糖可见大光晕精子

Table 2. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on human sperm membrane and DNA after 48 h incubation *in vitro* ($n = 50, \bar{x} \pm s$)**表 2.** 灵芝多糖体外孵育 48 h 后对人精子膜及 DNA 的影响($n = 50, \bar{x} \pm s$)

	剂量(C/mg·ml ⁻¹)	HOS-EY 后精子膜改变类型(%)				SCD (%)
		A	B	C	D	DNA 碎片
A	--	5.4 ± 1.3	1.6 ± 0.5	44.2 ± 1.7	48.8 ± 2.1	41.6 ± 2.1
B	--	4.5 ± 1.2 ^a	1.5 ± 0.8	44.0 ± 2.1	50.0 ± 3.1 ^a	42.1 ± 3.1
C	0.25 mg/ml	10.9 ± 1.5 ^a	2.1 ± 0.6	41.3 ± 4.1	45.7 ± 4.9 ^a	29.5 ± 2.2 ^{b,c}
D	1.0 mg/ml	12.3 ± 1.8 ^{b,c}	2.7 ± 0.6	40.0 ± 3.1	45.0 ± 3.2 ^{b,c}	28.5 ± 2.2 ^{b,c}
E	5.0 mg/ml	13.9 ± 1.3 ^{b,c}	2.1 ± 0.7	39.5 ± 3.1	44.5 ± 3.2 ^{b,c}	27.9 ± 1.8 ^{b,c}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与生理盐水组、维生素 C 组及低剂量灵芝多糖组比较, ^c $P < 0.01$ 。

4. 讨论

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一味名贵中药, 又叫灵芝草、木灵芝等。灵芝既可以日常食用, 又具有较高的药用价值, 特别是在药用表现上受到了较高的推崇。灵芝原来均为野生, 味甘, 性平, 归心、肺、肝、肾经。灵芝味甘, 性平, 归心、肺、肝、肾经。在中医看来, 灵芝对人体的益处是较为突出的, 可以实现较好的滋补、消炎等综合功效, 而且本身也是安全的, 没有什么副作用; 调节免疫功能; 并推动骨髓细胞蛋白质、核酸的形成, 从而使得放射性损伤能够得到较大程度的保护。

通过深入的研究, 我们进一步认识到灵芝之中有着较多的有效成分, 从生理活性成分的角度来看, 主要有灵芝多糖、腺苷、灵芝酸和氨基酸等重要组成。其中灵芝多糖是其中的重要成分, 产生的作用也是其中最为突出的, 里面富含多种异多糖, 其中不仅有葡萄糖的成分, 还同时有着多种单糖的组合。一些多糖还有着明显的肽链, 这样一来则通过研究我们发现其药理活性表现更佳, 呈现出明显更好的整体态势, 通过其形成的综合作用, 可以进一步使得血液微循环因此得到加速的呈现, 使得血液的供氧功能因此得到切实的提高, 并且使得整个人体的无效供氧情况得到较大程度的缓解, 进一步消除体内自由基, 进而使得细胞膜的封闭度因此得到较大程度的提高, 抗放射性, 促进肝脏、血液等能够更好地合成蛋白质, 使得机体所需要的蛋白质因此得到较大程度的补充。灵芝多糖还能够进一步使得单核巨噬细胞系统得到相应的刺激, 从而使其吞噬异物的能力能够最大程度地发挥出来, 便于机体能够在此基础上快速地形成抗体, 这样一来, 机体整体的免疫能力便大大加强, 从而能够很好地对抗肿瘤的侵袭, 能够保持机体运转取得更为顺畅的实现。但灵芝多糖对精子体外及体内作用研究则较少报道, 呈现出综合研究相对较少的状态, 这又进一步限制了我们的研究活动的进一步推动。

从实验表现来看, 我们可以清晰地看到, 灵芝多糖的存在可以对精子膜以及精子 DNA 产生较强的保护作用, 这也在一定程度上使得精子的活动能力因此增强, 进而使其体外存活时间据此实现了有效的延长。从发生作用的具体情况来看, 灵芝多糖对剂量有着较为明显的依赖性, 中高剂量下可以使得精子的存活时间进一步得到较为明显的延长。

要想提高人工受精的成功概率, 需要加强离体精液的处理, 在对其进行针对性处理之后, 可以进一步得到精子密度较高并且综合活力较强的精子, 将这些精子用于体外人工受精之中, 多用于临床治疗弱精子症等相应的病症, 可以使得患者的病症能够取得针对性的疗效。不仅如此, 在生殖医学领域范围内, 高质量的精子培养液是较受欢迎的, 特别是辅助生育技术的不断发展与成熟的基础上, 这一培养液越发

受到了医学的关注与重视，对其展开了细化的尝试运用。

通过本次实验的开展，我们进一步发现，适量的灵芝多糖可以使得精子的体外存活率得到较大程度的提高，进而减少精子膜和 DNA 的损失，从而使得精子膜据此得到了较大程度的保护，进而在对弱精症患者提供针对性治疗的基础上，可以使得体外精子得到相应的营养液的支持，从而使得弱精症男性不育问题能够得到针对性的解决，形成一条新的发展路径，也便于我们在研究这一系列问题时能够开阔眼界，从全新的视角来看待这一问题，找到针对性较强的解决之道。

近年以来，国内学者针对性地通过中医药来尝试治疗稍弱精子症，并且从整体的疗效来看，还是较为理想的[6]。当前，我们对中草药的实际特征了解的还是较为粗浅的，还有不少地方很不清楚，需要在不断的实践之中予以挖掘。我们如果可以根据此研制出中草药体内外活化精子制剂，用来代替西药制剂，应用前景将十分广阔[7] [8] [9]。而从灵芝多糖对精子功能产生的实际影响来看，目前尚未见报道。

基金项目

本课题受山东省中医药科技发展计划项目(2017-286)资助。

参考文献

- [1] Ambulkar, P.S., Waghmare, J.E., Chaudhari, A.R., Wankhede, V.R., Tarnekar, A.M., Shende, M.R. and Pal, A.K. (2016) Large Scale 7436-bp Deletions in Human Sperm Mitochondrial DNA with Spermatozoa Dysfunction and Male Infertility. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **10**, GC09-GC12. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/22412.8843>
- [2] Zhang, K.S., Fu, L.L., An, Q., Hu, W.H., Liu, J.X., Tang, X.M., Ding, Y., Lu, W.H., Liang, X.W., Shang, X.J. and Gu, Y.Q. (2020) Effects of Qilin Pills on Spermatogenesis, Reproductive Hormones, Oxidative Stress, and the TSSK2 Gene in a Rat Model of Oligoasthenospermia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **20**, 42. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2799-7>
- [3] Zhang, K.S., Ge, Z.Y., Fu, L.L., An, Q., Zhou, F., Guo, Y., Wang, X.W., Lu, W.H., Liang, X.W., Wang, S.S., Shang, X.J. and Gu, Y.Q. (2018) Qilin Pills Alleviate Oligoasthenospermia by Inhibiting Bax-Caspase-9 Apoptosis Pathway in the Testes of Model Rats. *Oncotarget*, **9**, 21770-21782. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24985>
- [4] Ji, J., Xu, M.F., Huang, Z.Y., Li, L., Zheng, H.X., Yang, S.P., Li, S.L., Jin, L., Ling, X.F., Xia, Y.K., Lu, C.C. and Wang, X.R. (2017) Mitochondrial DNA Sequencing and Large-Scale Genotyping Identifies MT-ND4 Gene Mutation m.11696G>A Associated with Idiopathic Oligoasthenospermia. *Oncotarget*, **8**, 52975-52982. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17675>
- [5] Qiu, Y., Wang, L.G., Zhang, L.H., *et al.* (2012) Quality of Sperm Obtained by Penile Vibratory Bratory Stimulation and Percutaneous Vasal Sperm Aspiration in Men with Spinal Cord in Jury. *Journal of Andrology*, **33**, 1036-1046. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014902>
- [6] Qiu, Y., Wang, L.G., Zhang, L.H., *et al.* (2012) Sperm Chromosomal Aneu-Ploidy and DNA Integrity of Infertile Men with an Ejaculation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **29**, 185-194. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9688-4>
- [7] 张美华, 邱毅, 董云玲, 王磊光, 孙士青. 茯苓多糖体外对小鼠精子膜及 DNA 的保护作用[J]. 中国男科学杂志, 2014; 8(12): 200-201.
- [8] 邱毅, 张美华, 董云玲, 王磊光, 孙士青. 茯苓多糖体外对大鼠精子膜及 DNA 的保护作用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2013, 13(20): 39-40.
- [9] Qiu, Y., Wang, L.G., Jia, Y.F., *et al.* (2011) The Effects of the Extract of Chinese Polygala Tenuidolia Willd on Human Sperm *In Vitro*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **12**, 448-454. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000347>