

• 临床研究 •

精浆中尼古丁和可替宁含量对精液参数的影响

李秀秀, 胡巨伟, 蔡婕, 梁坤, 戎春浩, 周黎明, 李脉, 徐亚男, 李洁

【摘要】目的 探讨精浆中尼古丁和可替宁含量对精液参数的影响。**方法** 前瞻性收集 2022 年 4—7 月在宁波大学附属妇女儿童医院生殖医学中心进行精液检查的 293 名男性为研究对象, 收集精浆样本并采用气相色谱质谱联用技术检测尼古丁和可替宁的含量, 分析尼古丁和可替宁含量对精子浓度、精子前向运动率及 DNA 碎片指数 (DFI) 等精液参数的影响。**结果** 在 293 份精浆样本中, 尼古丁的检出率为 72.01%, 平均含量为 $(20.31 \pm 36.61) \mu\text{g/L}$; 可替宁的检出率为 54.27%, 平均含量为 $(100.96 \pm 389.67) \mu\text{g/L}$ 。白细胞含量异常组和精子形态异常组的尼古丁含量均高于白细胞含量正常组和精子形态正常组 (均 $P < 0.05$); 精子前向运动率异常组、总活率异常组和 DFI 异常组的可替宁含量均高于精子前向运动率正常组、总活率正常组和 DFI 正常组 (均 $P < 0.05$)。精浆中尼古丁含量是白细胞含量异常、精子形态异常的危险因素 (均 $P < 0.05$), 可替宁含量是精子前向运动率异常、精子总活率异常及 DFI 异常的危险因素 (均 $P < 0.05$)。**结论** 精浆中尼古丁和可替宁是精子活力、功能、炎症与形态等指标的危险因素, 危害男性精子质量与生育力。

【关键词】 尼古丁; 可替宁; 精液参数; 精浆

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.04.010

【中图分类号】 R698 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)04-0459-04

吸烟是世界上最受关注的公共卫生问题之一。中国作为世界人口大国和最大的烟草生产及消费国, 具有高达 3.16 亿的吸烟者, 更有超过 7 亿二手烟人群^[1]。烟草燃烧的烟雾中含有 4 000 多种化学物质, 这些物质不仅危害呼吸系统和心血管系统, 还对人类生育力产生不良影响^[2]。尼古丁是烟草中主要的生物碱之一, 其进入人体后在肝脏中通过细胞色素 P450 代谢为可替宁^[3]。研究发现, 尼古丁和可替宁可在人体各种体液和组织细胞中积聚, 进而影响精子活力等^[4]。然而, 不同个体吸烟方式不同, 对尼古丁和可替宁的吸收和代谢效率也存在差异, 并有二手烟人群的存在, 因此仅凭简单的吸烟支数、时长等统计, 难以准确量化危害物质的积累程度。现有相关研究大多聚焦于血液和尿液样本, 对于精子直接接触的体液环境—精浆样本的研究较少。因此, 本研究通过气相色谱质谱联用技术 (GC-MS) 检测 293 名男性精浆中尼古丁及可替宁的含量, 并分析其与精液参数的关系, 以探

讨其对男性精子质量的影响, 现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 前瞻性收集 2022 年 4—7 月在宁波大学附属妇女儿童医院生殖医学中心进行精液检查的 293 名男性为研究对象。排除标准: (1) 染色体异常; (2) 生殖系统解剖结构异常; (3) 患有无精子症; (4) 患有睾丸、附睾等附属性腺疾病; (5) 酗酒; (6) 有生殖器官外伤史; (7) 最近 3 个月发生过高热、感染; (8) 有遗传性疾病家族史。本研究获得宁波大学附属妇女儿童医院医学伦理委员会批准, 所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 精液常规参数检测 所有研究对象手淫取精并将精液收集于无菌取精杯中, 置于 37 °C 恒温水浴箱中液化 30 ~ 60 min, 按照《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》(第五版) 标准方法分别测定体积, 并采用北京穗加 SSA-II CASA 计算机辅助精子分析仪检测精子浓度、精子前向运动率及精子总活率, 并计算精子总数, 计算公式为精子总数=精子浓度×体积。精子浓度的正常参考值为 $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$, 精子总数的正常参考值为 $\geq 39 \times 10^6$ 个, 精子前向运动率的正常参考

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2019RC268); 宁波市临床医学研究中心 (2024L002); 宁波市胚胎源性疾病预防重点实验室

作者单位: 315012 宁波, 宁波大学附属妇女儿童医院

通信作者: 李洁, Email: lijie80s@163.com

值为 $\geq 32\%$,精子总活率的正常参考值为 $\geq 40\%$ 。

1.2.2 精子形态分析 采用改良巴氏染色法(深圳华康公司),按照《WHO人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)形态学判读标准计数,油镜下至少计数200个精子,并计算正常形态率,正常形态率=(正常形态精子数/精子总数) $\times 100\%$ 。以正常形态率 $\geq 4\%$ 为精子形态良好。

1.2.3 精子染色质结构分析试验 采用精子核完整性染色试剂盒(浙江星博生物科技公司)对精子进行吖啶橙染色,荧光信号通过流式细胞仪(BD Calibur)进行分析,流式分析结果通过DFI-Viewer软件进行处理,得出DNA碎片指数(DNA fragmentation index, DFI),即精子核染色质损伤程度;以及精子高DNA可染性(high DNA stainability, HDS),即为核未成熟精子百分率。以DFI $\leq 15\%$ 为精子DNA完整性良好,HDS $\leq 10\%$ 为精子核成熟度正常。

1.2.4 精液白细胞检测 使用精液白细胞染色试剂盒(过氧化物酶染色法)(安徽安科生物工程有限公司)进行精液样本染色,过氧化物酶阳性的细胞即为白细胞,计数并计算。精液白细胞含量的正常参考值为 $< 1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

1.2.5 尼古丁和可替宁含量检测 精液经1500 r/min离心10 min,分离精浆,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。通过TSQ8000 二重四极气相色谱串联质谱仪(Thermo Fisher Scientific,德国)用于检测精浆中尼古丁和可替宁的含量,色谱柱为TR-Pesticide(Thermo Fisher Scientific,德国)。采用不分流进样法,进样量为2 μl ,进样口温度为 $270\text{ }^{\circ}\text{C}$,升温程序为:初始温度为 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,持续1 min; $30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升至 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持1 min; $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,上升至 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持2 min; $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升至 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$; $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升温至 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持5 min。质谱扫描模式为SRM模式。信噪比(S/N) > 3 的色谱峰被认为是有效峰。根据外标法计算样品浓度。将11个连续空白样本检测值的标准差的3倍设定为检出限(limit of detection, LOD),若含量低于LOD,则该样本含量估算为LOD/2,尼古丁和可替宁的检出限均为 $0.005\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ 。检出率=(含量高于LOD的样本量/总样本量) $\times 100\%$ 。

1.3 统计方法 采用SPSS 22.0统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验;采用logistic回归分析尼古丁和可替宁的含量对精液参数的影响。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况与精液参数检查结果 293名研究对象的年龄、体质量指数、精子浓度、精子总数及精子前向运动率等精液参数检查结果见表1。

2.2 尼古丁和可替宁含量检测结果 在293份精浆样本中,尼古丁的检出率为72.01%,平均含量为 $(20.31 \pm 36.61)\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$;可替宁的检出率为54.27%,平均含量为 $(100.96 \pm 389.67)\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ 。此外,由于尼古丁和可替宁含量数据分布较为离散,为更好地体现数据特点,还分别列举其最大值、最小值、中位数与百分位数,见表2。

2.3 不同精液参数的研究对象精浆中尼古丁和可替宁含量比较 根据各精液参数是否符合正常参考值将研究对象分为正常和异常两组,白细胞含量异常组和精子形态异常组的尼古丁含量均高于白细胞含量正常组和精子形态正常组(均 $P < 0.05$);精子前向运动率异常组、总活率异常组和DFI异常组的可替宁含量均高于精子前向运动率正常组、总活率正常组和DFI正常组(均 $P < 0.05$),见表3。

2.4 精浆中尼古丁和可替宁含量对精液参数的影响 精浆中尼古丁含量是白细胞含量异常、精子形态异常的危险因素($OR=1.010$ 、 1.009 ,均 $P < 0.05$),可替宁含量是精子前向运动率异常、精子总活率异常及DFI异常的危险因素($OR=1.002$ 、 1.004 、 1.001 ,均 $P < 0.05$)。

3 讨论

流行病学研究显示,吸烟危害男性生育能力,主要表现为精液中精子浓度降低、运动能力减弱、形态异常以及体外受精妊娠率降低等^[5]。尼古丁是烟草

表1 293名研究对象的一般情况与精液参数检查结果

指标	检测值
年龄(岁)	32.8 $\pm$ 5.4
体质量指数(kg/m^2)	24.26 $\pm$ 3.55
禁欲天数(d)	4.17 $\pm$ 1.88
精子浓度($\times 10^6/\text{ml}$)	66.39 $\pm$ 52.70
精子总数($\times 10^6$ 个)	230.83 $\pm$ 175.35
精子前向运动率(%)	31.76 $\pm$ 14.04
精子总活率(%)	37.16 $\pm$ 15.90
DNA碎片指数(%)	16.31 $\pm$ 10.60
高DNA可染性(%)	7.81 $\pm$ 6.19
白细胞含量($\times 10^6/\text{ml}$)	0.76 $\pm$ 0.90
正常形态率(%)	5.96 $\pm$ 2.41

表 2 293 名研究对象的精浆中尼古丁和可替宁含量检测结果

指标	检测率(%)	含量($\mu\text{g/L}$)	最小值	最大值	百分位数($\mu\text{g/L}$)		
			($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	P_5	P_{50}	P_{95}
尼古丁	72.01	20.31 $\pm$ 36.61	< LOD	234.83	< LOD	0.39	93.63
可替宁	54.27	100.96 $\pm$ 389.67	< LOD	3 693.10	< LOD	1.09	480.02

注:LOD 为检出限

表 3 不同精液参数的研究对象精浆中尼古丁和可替宁含量比较

精液参数	组别	尼古丁			可替宁		
		含量	t 值	P 值	含量	t 值	P 值
精子浓度	正常组	20.50 $\pm$ 37.46	0.30	> 0.05	103.96 $\pm$ 404.46	0.44	> 0.05
	异常组	18.20 $\pm$ 25.61			67.40 $\pm$ 142.35		
精子总数	正常组	20.35 $\pm$ 37.00	0.08	> 0.05	101.38 $\pm$ 397.12	0.08	> 0.05
	异常组	19.51 $\pm$ 27.75			30.81 $\pm$ 91.72		
精子前向运动率	正常组	18.79 $\pm$ 37.49	0.54	> 0.05	30.81 $\pm$ 92.72	3.08	< 0.05
	异常组	21.04 $\pm$ 34.39			171.92 $\pm$ 540.73		
精子总活率	正常组	19.22 $\pm$ 38.55	0.47	> 0.05	23.00 $\pm$ 73.21	3.47	< 0.05
	异常组	21.24 $\pm$ 34.96			167.57 $\pm$ 517.82		
DNA 碎片指数	正常组	20.04 $\pm$ 39.59	0.14	> 0.05	39.40 $\pm$ 149.40	2.67	< 0.05
	异常组	19.44 $\pm$ 30.32			179.87 $\pm$ 566.98		
高 DNA 可染性	正常组	18.17 $\pm$ 33.52	0.86	> 0.05	88.45 $\pm$ 378.74	1.09	> 0.05
	异常组	22.84 $\pm$ 40.12			156.88 $\pm$ 580.86		
白细胞含量	正常组	17.77 $\pm$ 33.00	2.55	< 0.05	98.11 $\pm$ 411.02	0.08	> 0.05
	异常组	33.54 $\pm$ 47.95			103.28 $\pm$ 167.62		
正常形态率	正常组	17.79 $\pm$ 32.28	2.34	< 0.05	91.86 $\pm$ 373.52	0.77	> 0.05
	异常组	30.18 $\pm$ 46.33			135.04 $\pm$ 450.14		

的主要危害成分之一,进入人体后,可通过血睾屏障对生殖细胞造成不同程度的伤害。如诱发精子顶体过早反应,降低精子活力,增加精子凋亡等,且伤害程度存在浓度依赖的特点^[6-7]。本研究结果显示精浆中尼古丁含量是精液白细胞含量异常和精子形态异常的影响因素。

王丽洁等^[8]研究显示,烟草烟雾暴露会引起血液中白细胞计数的增加,且烟雾暴露浓度越高,白细胞和中性粒细胞含量异常的风险越大。血液中白细胞含量升高可能是全身炎症反应和亚临床疾病的先兆,精液中的白细胞含量可反映男性生殖道的炎症状态,其含量升高可能意味着精子发生、成熟与运输途径中的氧化应激损伤和细胞凋亡增加,从而影响精子质量。

有研究表明尼古丁处理组大鼠精子的运动能力明显降低,附睾内的精子数量显著减少,精子出现形态异常^[6],本研究结果与之一致。这可能是因为尼古丁作为一种强效的促氧化剂,可以通过诱导膜损伤,降低精子顶体的完整性,导致精子出现形态异常^[9]。高氧化应激状态还可能影响精子染色体的致密性,导致 DNA 稳定性降低,突变率增加,畸形精子率升高。

张云山等^[10]研究还发现,精子正常形态率与吸烟量相关,吸烟 ≤ 10 支/d 组的精子正常形态率明显高于吸烟 11 ~ 20 支/d 组,也提示尼古丁对精子形态的危害具有剂量依赖性。

可替宁是尼古丁的代谢产物,尼古丁的半衰期仅约为 2 h,可替宁在人体内的半衰期可达 16 h^[11],在机体中更易高浓度聚积且具有更长久的危害时间。本研究对精浆样本的研究也证实了这一结论,精浆中尼古丁的含量为(20.31 $\pm$ 36.61) $\mu\text{g/L}$,而可替宁的含量可达(100.96 $\pm$ 389.67) $\mu\text{g/L}$,平均为尼古丁的 5 倍。而精浆中高浓度的可替宁可能与精子总活率降低,膜功能下降以及精子获能障碍有关^[12]。

本研究结果显示精浆中可替宁含量的增加是精子前向运动率和精子总活率的降低的危险因素。有一项包括 5 865 名男性的 Meta 分析显示,吸烟与精子数量和活动率减弱有关,吸烟者精子活力下降约 3.48%^[13]。烟草成分可能是通过降低精液中重组蛋白活性,导致山梨糖醇转化为果糖比例减少,从而抑制精子获能过程,降低精子活力^[14]。更为严峻的是,可替宁对精子质量的影响还具有代际效应。母体在妊娠期 > 10 ng/ml

的可替宁暴露,可导致其年轻男性子代的精子质量显著降低,损害子代生育力,而即使在妊娠前7周进行戒烟也不能逆转这一损害,并且重度吸烟孕妇子代精子质量的降低更甚于轻度吸烟孕妇子代^[15]。

本研究结果还显示,精浆中的可替宁是精子DFI异常的危险因素。精子DFI水平对IVF受精、胚胎发育及临床妊娠结局等均具有显著影响,是重要的精子功能指标之一。与包华琼等^[16]的研究结果一致。这可能是因为吸烟会引起精囊腺、前列腺等腺体的炎症反应,导致顶体完整性和线粒体活性的降低,进而引起精子DNA断裂增加^[17]。此外,吸烟人群往往存在过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶等抗氧化酶活性增加,脂质过氧化水平升高,长期不平衡的抗氧化/氧化比率和高氧化应激状态也会易导致精子DNA损伤。

综上所述,精浆中尼古丁和可替宁的污染与精子活力、功能、炎症和形态等精液参数有关,可能通过影响氧化应激、炎症、膜稳定性等途径危害男性生育力,为生殖临床诊疗中精子指标异常的病因诊断和干预提供了理论依据。由于本研究样本量有限,未能明确尼古丁和可替宁预示精子损伤作用的含量临界值,有待在未来进行大样本量队列研究加以完善。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李秀秀:质谱检测分析、论文撰写;胡巨伟:样本收集与预处理;蔡婕、梁坤:患者纳入;戎春浩:各项精液参数检测;周黎明:项目指导;李脉:数据收集整理;徐亚男:数据统计分析;李洁:研究设计、论文撰写

参 考 文 献

- [1] WAN X. Protecting people from tobacco smoke in China: Current status and challenges[J]. China CDC Wkly, 2022, 4(21): 460-464.
- [2] PARAMESWARIR, SRIDHARAN T B. Cigarette smoking and its toxicological overview on human male fertility-a prospective review[J]. Toxin Reviews, 2019, 40(2): 145-161.
- [3] LKHAGVADORJ K, MEYER K F, VERWEIJ L P, et al. Prenatal smoke exposure induces persistent Cyp2a5 methylation and increases nicotine metabolism in the liver of neonatal and adult male offspring[J]. Epigenetics, 2020, 15(12): 1370-1385.
- [4] ABU-AWWAD A, ARAFAT T, SCHMITZ O J. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, and nicotine N-oxide in human plasma, semen, and sperm by LC-Orbitrap MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408: 6473-6481.
- [5] SCHUPPE H C, KÖHN F M. Impact of lifestyle and environmental factors on male reproductive health[J]. Urologie, 2022, 61(11): 1217-1228.
- [6] OMOLAOYE T S, EL SHAHAWY O, SKOSANA BT, et al. The mutagenic effect of tobacco smoke on male fertility[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(41): 62055-62066.
- [7] CONDORELLI R A, LA VIGNERA S, GIACONE F, et al. In vitro effects of nicotine on sperm motility and bio-functional flow cytometry sperm parameters[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2013, 26(3): 739-746.
- [8] 王丽洁, 刘成娟, 孟亚清, 等. 烟草烟雾暴露水平与血细胞计数的关系研究[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(9): 1457-1460.
- [9] 杨芳, 徐汪节, 杨芳, 等. 尼古丁对小鼠精子顶体的影响[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2019, 39(11): 886-894.
- [10] 张云山, 马天仲, 董丽娟, 等. 吸烟对男性不育患者生育能力的影响[J]. 临床泌尿外科杂志, 2018, 33(10): 825-828, 832.
- [11] AVILA-TANG E, AL-DELAIMY W K, ASHLEY D L, et al. Assessing secondhand smoke using biological markers[J]. Tob Control, 2013, 22(3): 164-171.
- [12] SOFIKITIS N, TAKENAKA M, KANAKAS N, et al. Effects of cotinine on sperm motility, membrane function, and fertilizing capacity in vitro[J]. Urol Res, 2000, 28(6): 370-375.
- [13] SHARMA R, HARLEV A, AGARWAL A, et al. Cigarette smoking and semen quality: A new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen[J]. Eur Urol, 2016, 70(4): 635-645.
- [14] DAI J B, XU W J, ZHAO X L, et al. Protein profile screening: reduced expression of sord in the mouse epididymis induced by nicotine inhibits tyrosine phosphorylation level in capacitated spermatozoa[J]. Reproduction, 2016, 151(3): 227-237.
- [15] HÖRVIG K K, PETERSEN K U, GIWERCMAN A, et al. Fetal exposure to maternal cigarette smoking and male reproductive function in young adulthood[J]. Eur J Epidemiol, 2022, 37(5): 525-538.
- [16] 包华琼, 孙岚, 杨学妞, 等. 吸烟对育前男性精浆活性氧含量及精子质量的影响[J]. 中华男科学杂志, 2019, 25(1): 41-45.
- [17] KUNZLE R, MUELLER M D, HANGGI W, et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples[J]. Fertil Steril, 2003, 79(2): 287-291.

收稿日期: 2024-01-15

(本文编辑: 陈志翔)