

非选择性磷酸二酯酶抑制剂用于人工精子激活的研究进展

邹乾兴, 黄芬, 杨冠群, 梁媛媛, 曲晓力, 罗平*

柳州市人民医院 生殖医学科, 广西 柳州 545006

摘要: 人工精子激活基础研究和临床辅助生殖技术治疗中应用最广泛的精子激活因子为非选择性磷酸二酯酶(PDE)抑制剂。利用非选择性 PDE 抑制剂处理精子能够全面抑制 PDE 的活性, 通过加强胞内环磷酸腺苷(cAMP)信号来提升精子运动能力。基于人工精子激活的重要作用靶点 PDE, 综述了 3 种常用非选择性 PDE 抑制剂咖啡因、己酮可可碱和茶碱对人精子运动的激活效应的研究进展, 为非选择性 PDE 抑制剂用于人工精子激活提供参考。

关键词: 非选择性磷酸二酯酶抑制剂; 磷酸二酯酶; 人工精子激活; 咖啡因; 己酮可可碱; 茶碱

中图分类号: R983 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)01-0234-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.041

Research progress on non-selective phosphodiesterase inhibitors in artificial sperm activation

ZOU Qian-xing, HUANG Fen, YANG Guan-qun, LIANG Yuan-yuan, QU Xiao-li, LUO Ping

Department of Reproductive Medicine, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, China

Abstract: Non-selective phosphodiesterase (PDE) inhibitor is the most widely used sperm activating factor in basic research of artificial sperm activation and clinical treatment of assisted reproductive technology. Treatment of sperm with non-selective PDE inhibitors can comprehensively inhibit the activity of PDE, and enhance sperm motility by enhancing intracellular cAMP signal. Based on the important target PDE of artificial sperm activation, this paper reviewed the research progress of the activation effect of three commonly used non-selective PDE inhibitors, caffeine, pentoxifylline, and theophylline, on human sperm motility, providing a reference for the application of non-selective phosphodiesterase inhibitors in artificial sperm activation.

Key words: non-selective phosphodiesterase inhibitor; phosphodiesterase; artificial sperm activation; caffeine; pentoxifylline; theophylline

精子质量低下是造成男性不育的常见原因。尽管辅助生殖技术中卵细胞质内单精子注射的应用极大解决了因男方精子因素引起的不孕不育症, 然而, 对于精子活力极弱的严重弱精子症患者和无精子症患者, 当前常规卵细胞质内单精子注射的受精结果仍不理想。因此, 体外人工激活精子运动将有望提高卵细胞质内单精子注射受精率, 并改善最终临床结局。人工精子激活方式可分为物理激活和化学激活^[1]。物理激活一般是利用低强度氩氦激光照射精子, 从而能够一定程度地刺激精子运动^[2]。化学激活是指利用有效化学试剂, 如非选择性磷酸二酯酶(PDE)抑制剂、血小板激活因子、生物素和

精子激动剂等, 体外与精子孵育一定时间, 从而达到激活精子运动的目的^[3-6]。目前, 人工精子激活基础研究和临床辅助生殖技术治疗中应用最广泛的精子激活因子为非选择性 PDE 抑制剂, 包括咖啡因、己酮可可碱和茶碱。PDE 是细胞内一类负责降解环磷酸腺苷(cAMP)的水解酶。利用非选择性 PDE 抑制剂处理精子能够全面抑制 PDE 的活性, 导致胞内 cAMP 水平升高^[7]。cAMP 是一种重要的第二信使, 在众多精子生理功能中尤其与精子运动调控最为密切。cAMP 介导的蛋白激酶 A 和下游信号通路能够诱导轴丝蛋白磷酸化, 进而促进精子运动^[8]。因此, 非选择性 PDE 抑制剂主要是通过加强

收稿日期: 2022-10-08

基金项目: 柳州市人民医院引进高层次人才科研启动基金项目(LRYGCC202208); 柳州市人民医院内科研项目(lry202011)

作者简介: 邹乾兴(1993—), 男, 助理研究员, 博士, 从事雄(男)性生殖生理研究。E-mail: zou_qianxing@163.com

*通信作者: 罗平(1971—), 男, 副主任技师, 硕士, 从事辅助生殖临床和科研工作。E-mail: luop521@163.com

胞内 cAMP 信号来提升精子运动能力。本文基于人工精子激活的重要作用靶点 PDE, 综述了 3 种常用非选择性 PDE 抑制剂咖啡因、己酮可可碱和茶碱对人精子运动的激活效应的研究进展, 为非选择性 PDE 抑制剂用于人工精子激活提供参考。

1 PDE 是人工精子激活的重要作用靶点

基于 cAMP 在精子运动调控中的重要作用, 提高胞内 cAMP 水平是人工精子激活的一种有效手段。精子胞内 cAMP 水平处于动态平衡状态, 由其生成和降解两种途径共同决定。因此, 精子胞内 cAMP 含量增加可通过促进其生成或抑制降解这两种方式实现。cAMP 由腺苷酸环化酶 (AC) 催化三磷酸腺苷 (ATP) 分解产生, 而其降解由 PDE 完成, PDE 能将 cAMP 水解为 5'-单磷酸腺苷 (5'-AMP)^[9]。目前, 利用 PDE 抑制剂抑制 PDE 对 cAMP 的水解是提高细胞内 cAMP 含量的主流方式。

PDE 是一类选择性降解胞内 cAMP 和环磷酸鸟苷 (cGMP) 的水解酶家族。根据其家族成员结构、动力学和代谢底物等属性差异, 哺乳动物中至少存在 11 种 PDE, 其中 PDE4、7、8 特异性水解 cAMP, PDE5、6、9 特异性水解 cGMP, PDE1、2、3、10、11 能同时水解 cAMP 和 cGMP^[10]。这些 PDE 在机体内广泛分布, 且参与了众多细胞生理学过程。人成熟精子中被报道存在多种 PDE, 包括 PDE1、3、4、5、10^[11-12]。据此, PDE 抑制剂常被用于人工精子激活试验和临床辅助生殖技术研究。研究表明, PDE 特异性抑制剂, 如 PDE4 抑制剂咯利普兰、PDE5 抑制剂西地那非, 虽然它们体外对人精子运动具有一定促进作用^[13-14], 但激活效应并不显著。这很可能是因为人精子中存在 PDE 的代偿作用, 即一种 PDE 被抑制后, 其他 PDE 活性得到加强。因此, 只有利用广谱的 PDE 抑制剂非选择性 PDE 抑制剂才能明显增加精子胞内 cAMP 水平, 进而显著激活精子运动。甲基黄嘌呤类生物碱, 包括咖啡因、己酮可可碱和茶碱, 是最常用的 3 种非选择性 PDE 抑制剂。

2 人工精子激活中的非选择性 PDE 抑制剂

2.1 咖啡因

咖啡因 (1,3,7-三甲基黄嘌呤) 是一种黄嘌呤生物碱化合物, 在自然界中主要来源于咖啡豆、茶叶。由于咖啡因具有刺激中枢神经系统、维持机体兴奋的作用, 因此人们常在日常工作和生活中饮用咖啡、茶以及含咖啡因饮料抵抗疲劳。纯咖啡因是一

种白色结晶粉末, 在临床上具有较大应用价值, 如能够解除昏睡引起的中枢神经抑制、增加机体基础代谢率、提升肌肉耐力等^[15]。

作为一种非选择性 PDE 抑制剂, 咖啡因于 20 世纪 70 年代被用于人精子运动激活研究。最早的报道显示咖啡因 (10 mmol/L) 体外处理人精子能够增加活动精子比例和精子运动速率^[16]。然而, 当时的报道中没有明确指出人精液标本来源、样本数量以及咖啡因与精子孵育时间。随后 1 项研究的研究者收集了 18 份人精液标本, 发现其中的 12 份 (2/3) 精子样品对咖啡因刺激存在响应, 10 mmol/L 咖啡因体外与精子孵育 30 min 能使活动精子比例增加 30%~50%^[17]。最近研究表明, 正常人精子和弱精子症患者精子体外经 10 mmol/L 咖啡因处理 1 h 后, 精子前向运动均显著加强^[18]。精子冷冻是男性生育力保存的一种重要手段。然而, 冷冻与复苏过程会不可避免的对精子质量造成损害, 其中以精子活力下降最严重。研究显示咖啡因除对新鲜的人精子运动具有激活效应外, 还具有维持冻融后精子活力的作用。与对照组相比, 冻融精子悬液中添加 2 mmol/L 咖啡因即可一定程度地阻止精子前向运动和超活化运动下降, 并促进线粒体活性恢复^[19-20]。

2.2 己酮可可碱

己酮可可碱是一种甲基黄嘌呤衍生物。基于其对 PDE 酶类的广谱抑制效应, 己酮可可碱作为一种血管活性药物在临床上广泛用于血管性疾病治疗, 并通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准。此外, 己酮可可碱在人工精子激活研究和临床辅助生殖技术治疗中同样具有重要应用价值。

研究表明, 己酮可可碱对人精子的基础运动、超活化运动和顶体反应均具有促进作用。正常人精子和弱精子症患者精子体外与 1 mg/mL 己酮可可碱孵育 10 min, 精子曲线速率、直线速率和鞭打频率等运动参数均得到明显提升^[21]。获能条件下, 1 mg/mL 己酮可可碱处理人精子 30 min 能够显著增加精子超活化运动、自发顶体反应以及钙离子载体 (A23187) 诱导的顶体反应^[22]。己酮可可碱可能通过增加精子胞内 cAMP 含量, 促进一氧化氮生成, 提高肌酸激酶活性, 激活人精子生理功能^[23-24]。除对新鲜射出的人精子功能具有促进作用外, 2.4 mmol/L 己酮可可碱孵育 5 min 能够明显激活冷冻复苏、附睾穿刺和睾丸穿刺精子^[25-26]。

基于己酮可可碱在人工精子激活中的显著效

果,其被成功应用于临床辅助生殖技术治疗。特别是对于严重弱精子症患者和需睾丸穿刺取精的无精子症患者,由于精子活力极弱,造成常规卵细胞质内单精子注射程序中挑选活精子进行注射比较困难,同时会延长卵母细胞在培养箱外的停留时间,损害卵母细胞质量,导致受精结果不理想。报道显示,卵细胞质内单精子注射操作前,利用 20 mg/mL 己酮可可碱处理精子 5 min 可以明显激活精子运动,从而有助于活精子挑选并加快卵细胞质内单精子注射操作完成,进而提高受精率和可用胚胎数量,最终获得更好临床结局^[27-28]。

有研究发现,己酮可可碱可能对卵母细胞功能和早期胚胎发育具有一定不良反应^[29]。另外,由于己酮可可碱能够诱导精子发生顶体反应,若在体外受精程序中添加己酮可可碱可能导致顶体反应过早发生,致使精子丧失受精能力。因此,己酮可可碱在辅助生殖技术中的应用尚存争议。最近, Satish 等^[30]基于 PDE-己酮可可碱复合体结构模型设计并合成了多种己酮可可碱类似物。他们发现其中的一种类似物 PTXm-1 在低于己酮可可碱 (1 mmol/L) 的使用剂量下 (0.25 mmol/L),对正常人精子、弱精子症患者精子和睾丸穿刺精子运动激活具有与己酮可可碱相似的效应,并且对精子顶体反应无明显影响。这提示 PTXm-1 可能是一种比己酮可可碱更理想的人精子激活剂,然而,其在人工精子激活和临床辅助生殖技术治疗中的应用还需未来更全面、深入的研究。

2.3 茶碱

茶碱 (1,3-二甲基黄嘌呤) 也是黄嘌呤家族的成员之一,它的结构和药理学特性与咖啡因十分相似,在自然界中同样主要存在于茶叶、咖啡豆中。作为一种 PDE 抑制剂药物,茶碱在临床上常被用于慢性阻塞性肺疾病、哮喘等呼吸系统疾病治疗。此外,茶碱也是人工精子激活中的一种重要激活剂。

茶碱能够显著增强人精子的受精能力。在 1 项去透明带仓鼠卵母细胞穿透试验中,正常人精子和不育患者精子与 10 mmol/L 茶碱孵育 5 h,它们的卵母细胞穿透率均明显提升^[31]。茶碱对人精子运动能力同样具有激活效应。正常人精子和弱精子症患者精子经 3.6 μg/mL 茶碱处理 10~30 min 后,精子总运动和前向运动得到显著加强^[32]。此外,在新鲜射出精子和睾丸穿刺精子冷冻过程中,冷冻液中添加 40 mmol/L 茶碱能够减小复苏后精子活力下降的

幅度^[33],提示茶碱还具有保护精子抵抗冷冻损伤的作用。

与己酮可可碱作用类似,多项研究显示辅助生殖技术中利用茶碱对精子进行人工激活能够改善临床结局。目前,知名辅助生殖试剂提供商德国 Gynemed 公司已生产可直接使用的商品化茶碱溶液,称为 SpermMobil,并通过欧盟 CE 安全认证。Ebner 等^[34]在复苏后的睾丸精子悬液中添加 SpermMobil (1:20) 能够立即激活精子运动,从而有助于活动精子筛选,并缩短卵细胞质内单精子注射完成时间。与对照组相比,SpermMobil 添加组的受精率和囊胚形成率显著升高,并且获得更高的临床妊娠率。此外,在 1 例逆行射精不育患者的辅助生殖技术治疗中,利用 SpermMobil (1:20) 处理从尿液中回收的完全无活力精子,随后通过卵细胞质内单精子注射运动激活精子至其配偶卵母细胞中,受精后第 3 天获得 1 枚 6-细胞优质胚胎,移植后成功妊娠,并最终活产 1 名健康女婴^[35]。1 项回顾性研究表明,卵细胞质内单精子注射操作前利用 SpermMobil 激活人精子运动对后期胚胎发育以及妊娠风险等级不会产生明显影响^[36],提示 SpermMobil 可能是一种相对安全的精子激活剂。

3 结语

人工精子激活是临床辅助生殖技术治疗中提高受精成功率的一种重要技术手段。目前有多种精子激活方式被报道,其中以 PDE 为作用靶点的非选择性 PDE 抑制剂应用最广泛。现有研究表明咖啡因、己酮可可碱和茶碱体外对人精子运动均具有明显激活效应。在辅助生殖技术治疗中,己酮可可碱和茶碱是两种主要的精子激活剂。特别是对于精子活力极弱、需采用卵细胞质内单精子注射进行受精的辅助生殖技术治疗周期,利用己酮可可碱或茶碱激活精子运动能够显著提高受精率和可用胚胎数,进而获得更好临床结局。然而,已有临床研究多为小样本研究,而且非选择性 PDE 抑制剂对辅助生殖技术后代的远期影响尚缺乏跟踪调查。此外,非选择性 PDE 抑制剂激活人精子的具体分子机制以及其是否存在潜在不良反应仍不完全清楚。因此,非选择性 PDE 抑制剂在人工精子激活中的有效性和安全性仍需进一步研究。当前辅助生殖技术治疗中非选择性 PDE 抑制剂的应用应严格把握临床适应证,并在患者充分知情情况下谨慎使用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 单芳, 胡蓉, 王飞苗, 等. 精子激活在辅助生殖技术中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(12): 1668-1671.
- [2] Siqueira A F, Maria F S, Mendes C M, *et al.* Effects of photobiomodulation therapy (PBMT) on bovine sperm function [J]. *Lasers Med Sci*, 2016, 31(6): 1245-1250.
- [3] Sharpe A, Bhandari H, Miller D. Is there a role for phosphodiesterase inhibitors in the treatment of male subfertility [J]. *Hum Fertil (Camb)*, 2022, 25(1): 13-23.
- [4] Archer S L, Roudebush W E. Enhancement of sperm motility using pentoxifylline and platelet-activating factor [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 927: 241-245.
- [5] Salian S R, Nayak G, Kumari S, *et al.* Supplementation of biotin to sperm preparation medium enhances fertilizing ability of spermatozoa and improves preimplantation embryo development [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(2): 255-266.
- [6] Gu Y F, Zhou Q W, Zhang S P, *et al.* The clinical and neonatal outcomes after stimulation of immotile spermatozoa using SperMagic medium [J]. *Andrologia*, 2018, 50(7): e13056.
- [7] Drobnis E Z, Nangia A K. Phosphodiesterase inhibitors (PDE inhibitors) and male reproduction [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1034: 29-38.
- [8] Raju D N, Hansen J N, Rassmann S, *et al.* Cyclic nucleotide-specific optogenetics highlights compartmentalization of the sperm flagellum into cAMP microdomains [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 648.
- [9] Balbach M, Beckert V, Hansen J N, *et al.* Shedding light on the role of cAMP in mammalian sperm physiology [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 468: 111-120.
- [10] Maurice D H, Ke H, Ahmad F, *et al.* Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(4): 290-314.
- [11] Lefièvre L, de Lamirande E, Gagnon C. Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 423-430.
- [12] Maréchal L, Guillemette C, Goupil S, *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases in human spermatozoa and seminal fluid: Presence of an active PDE10A in human spermatozoa [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(2): 147-156.
- [13] Fisch J D, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: Differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(5): 1248-1254.
- [14] Mostafa T. *In vitro* sildenafil citrate use as a sperm motility stimulant [J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(4): 994-996.
- [15] Grgic J, Trexler E T, Lazinica B, *et al.* Effects of caffeine intake on muscle strength and power: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2018, 15: 11.
- [16] Haesungcharern A, Chulavatnatol M. Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine [J]. *Fertil Steril*, 1973, 24(9): 662-665.
- [17] Makler A, Makler E, Itzkovitz J, *et al.* Factors affecting sperm motility. IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolically active compounds [J]. *Fertil Steril*, 1980, 33(6): 624-630.
- [18] Banihani S A, Khaled H J. Caffeine increased progressive motility of human spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic semen samples and enhanced activity of seminal creatine kinase [J]. *Andrologia*, 2021, 53(6): e14052.
- [19] Pariz J R, Hallak J. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods [J]. *Andrologia*, 2016, 48(9): 961-966.
- [20] Pariz J R, Rané C, Monteiro R A C, *et al.* Melatonin and caffeine supplementation used, respectively, as protective and stimulating agents in the cryopreservation of human sperm improves survival, viability, and motility after thawing compared to traditional TEST-yolk buffer [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6472945.
- [21] Tesarik J, Thébault A, Testart J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens [J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(9): 1257-1263.
- [22] Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, *et al.* Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization *in vitro* [J]. *Hum Reprod*, 1993, 8(12): 2102-2107.
- [23] Banihani S A, Abu-Alhayja R F, Amarin Z O, *et al.* Pentoxifylline increases the level of nitric oxide produced by human spermatozoa [J]. *Andrologia*, 2018, 50(2): e12859.
- [24] Banihani S A, Abu-Alhayja R F. The activity of seminal creatine kinase is increased in the presence of pentoxifylline [J]. *Andrologia*, 2016, 48(5): 603-604.
- [25] Nabi A, Khalili M A, Talebi A R, *et al.* *In-vitro* application of pentoxifylline preserved ultrastructure of spermatozoa after vitrification in asthenozoospermic patients [J]. *Urol J*, 2017, 14(4): 4038-4043.
- [26] Xian Y, Jiang M, Liu B, *et al.* A cryoprotectant supplemented with pentoxifylline can improve the effect of freezing on the motility of human testicular sperm [J]. *Zygote*, 2022, 30(1): 92-97.
- [27] Amer M, Metawae B, Hosny H, *et al.* Beneficial effect of

- adding pentoxifylline to processed semen samples on ICSI outcome in infertile males with mild and moderate asthenozoospermia: A randomized controlled prospective crossover study [J]. *Iran J Reprod Med*, 2013, 11(11): 939-944.
- [28] Navas P, Paffoni A, Intra G, *et al.* Obstetric and neo-natal outcomes of ICSI cycles using pentoxifylline to identify viable spermatozoa in patients with immotile spermatozoa [J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34(4): 414-421.
- [29] Scott L, Smith S. Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos [J]. *Fertil Steril*, 1995, 63(1): 166-175.
- [30] Satish M, Kumari S, Deeksha W, *et al.* Structure-based redesigning of pentoxifylline analogs against selective phosphodiesterases to modulate sperm functional competence for assisted reproductive technologies [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 12293.
- [31] Loughlin K R, Agarwal A. Use of theophylline to enhance sperm function [J]. *Arch Androl*, 1992, 28(2): 99-103.
- [32] Abbas H S, Mossa H A L, Al-Anbari L A, *et al.* A stimulatory approach for *in vitro* activation of human sperm motility by using theophylline [J]. *Int J Adv Res*, 2018, 6(4): 1128-1132.
- [33] Gorji E, Farsi M M, Khafri S, *et al.* Analysis of the impact of cryopreservation and theophylline on motility of sperm [J]. *Middle East Fertil S*, 2018, 23: 98-102.
- [34] Ebner T, Tews G, Mayer R B, *et al.* Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(6): 1331-1336.
- [35] Ebner T, Shebl O, Mayer R B, *et al.* Healthy live birth using theophylline in a case of retrograde ejaculation and absolute asthenozoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(2): 340-343.
- [36] Sandi-Monroy N L, Musanovic S, Zhu D, *et al.* Use of dimethylxanthine theophylline (SpermMobil®) does not affect clinical, obstetric or perinatal outcomes [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 300(5): 1435-1443.

[责任编辑 解学星]