

本文引用:张峰,王守英,韩金红,等. 纳米细菌对人精子质量的影响[J]. 新乡医学院学报,2023,40(2):125-130. DOI:10.7683/xyxyxb.2023.02.005.

### 【临床研究】

## 纳米细菌对人精子质量的影响

张 峰<sup>1</sup>, 王守英<sup>2</sup>, 韩金红<sup>3</sup>, 李 军<sup>1</sup>

(1. 新乡医学院第三附属医院泌尿外科,河南 新乡 453003;2. 新乡医学院管理学院,河南 新乡 453003;3. 新乡医学院基础医学院,河南 新乡 453003)

**摘要:** 目的 探讨纳米细菌对人精子浓度和运动能力的影响。方法 选择 2021 年 10 ~ 12 月新乡医学院第三附属医院泌尿外科收治的 12 例Ⅲ型前列腺炎患者为研究对象,收集患者前列腺液标本,分离培养和鉴定前列腺液标本中纳米细菌,依据培养结果将患者分为纳米细菌阴性组和纳米细菌阳性组。应用计算机辅助精子分析系统(CASA)分析纳米细菌阴性组和纳米细菌阳性组患者的精液量、精子总活力、精子前向运动力。另取 10 例健康男性精液,优化处理后分为对照组和实验组;实验组精子与纳米细菌悬液共孵育,对照组精子与输卵管液共孵育;分别于孵育 0、2、4、8 h 时,应用 CASA 检测 2 组精子浓度、总活力、前向运动力、直线速度(VSL)、曲线速度(VCL)、平均路径速度(VAP)、精子头部侧摆幅度(ALH)和精子形态及凝集情况。**结果** 培养的纳米细菌为沉积在管底的白色沉淀,且培养基颜色变黄;阴性标本颜色与培养基对照组相比,颜色略有变黄。茜素红钙染色结果显示,不同视野下的纳米细菌常聚集成簇,单个细菌由于形体微小不可见,成簇的纳米细菌可被染成红色。12 例Ⅲ型前列腺炎患者的前列腺液标本中,5 例纳米细菌培养阳性,7 例纳米细菌培养阴性。纳米细菌阴性组与纳米细菌阳性组患者的年龄、精液量、总活力比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),纳米细菌阳性组患者的精子浓度、前向运动力显著低于纳米细菌阴性组( $P<0.001$ )。实验组和对照组精子形态各时间点无明显变化,均未出现明显凝集。实验组和对照组精子浓度随孵育时间的延长呈下降趋势( $F=135.420、132.925, P<0.001$ );孵育 0 h 时,对照组和实验组精子浓度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );孵育 2、4、8 h 时,实验组精子浓度显著低于对照组( $P<0.001$ )。对照组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 随着孵育时间的延长呈下降趋势( $F=304.494、48.012、95.780、53.538、383.257、287.428, P<0.001$ ),且实验组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 随着孵育时间的延长亦呈下降趋势( $F=1758.057、924.174、297.114、244.244、1173.730、290.031, P<0.001$ )。孵育 0 h 时,对照组和实验组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );孵育 2、4、8 h 时,实验组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 显著低于对照组( $P<0.05$ )。**结论** 纳米细菌可显著降低精子浓度和运动参数,进而影响患者的生育能力。

**关键词:** 纳米细菌;精子;精子浓度;精子运动

中图分类号: R697.33 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)02-0125-06

## Effect of nanobacteria on human sperm quality

ZHANG Feng<sup>1</sup>, WANG Shouying<sup>2</sup>, HAN Jinhong<sup>3</sup>, LI Jun<sup>1</sup>

(1. Department of Urology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. School of Management, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of nanobacteria on the concentration and motility of human sperm. **Methods** Twelve patients with type III prostatitis admitted to the Department of Urology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from October to December 2021 were selected as research subjects, and prostate fluid specimens from the patients were collected, the nanobacteria was isolated, cultured and identified; then, the patients were divided into the nanobacteria-negative group and nanobacteria-positive group according to the culture results, and the semen volume, total sperm motility and sperm forward motion of patients in the nanobacteria-negative group and nanobacteria-positive group were analyzed by the computer-assisted sperm analysis (CASA). The semen collected from 10 healthy male people were divided into

DOI:10.7683/xxxyxb.2023.02.005

收稿日期:2022-04-13

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(编号:LHGJ20200534)。

作者简介:张 峰(1986-),男,河南周口人,硕士,主治医师,研究方向:不育症。

通信作者:李 军(1979-),男,河南信阳人,硕士,副主任医师,研究方向:前列腺炎发病机制;E-mail:80832625@qq.com。

control group and experimental group after optimization;the sperm in the experimental group was co-incubated with nanobacterial suspension,while the sperm in the control group was co-incubated with oviductal fluid;the sperm concentration,total viability, forward motility, straight line velocity (VSL), curve velocity (VCL), average path velocity (VAP), sperm head swing amplitude (ALH), sperm morphology and agglutination in the two groups were measured by CASA at 0,2,4 and 8 hours of incubation, respectively. **Results** The cultured nanobacteria were white precipitates deposited at the bottom of the tubes and the color of the medium turned yellow;the color of the negative specimens turned slightly yellow compared with the medium control. The results of alizarin red calcium staining showed that nanobacteria in different fields of view were often gathered into clusters and individual bacteria was too small to be visible, and clusters of nanobacteria could be stained red. Among the 12 patients with type III prostatitis, 5 cases were positive for nanobacteria culture and 7 cases were negative for nanobacteria culture. There were no significant differences in the age, semen volume and total motility of sperm of the patients between the nanobacteria-negative group and nanobacteria-positive group ( $P>0.05$ ); but the sperm concentration and forward motility of sperm of patients in the nanobacteria-positive group were significantly lower than those in the nanobacteria-negative group ( $P<0.001$ ). There was no significant change in sperm morphology at all time points, and no obvious agglutination was observed in the experimental group and control group. The sperm concentration showed decreasing trend with the increase of incubation time in the experimental group and control group ( $F=135.420, 132.925; P<0.001$ ); At 0 hour of incubation, there was no significant difference in the sperm concentration between the experimental group and control group ( $P>0.05$ ); the sperm concentration in the experimental group was significantly lower than that in the control group at 2, 4, and 8 hours of incubation ( $P<0.001$ ). The total sperm motility, forward motility, VCL, VSL, VAP and ALH showed decreasing trend with the increase of incubation time in the control group ( $F=304.494, 48.012, 95.780, 53.538, 383.257, 287.428; P<0.001$ ) and experimental group ( $F=1758.057, 924.174, 297.114, 244.244, 1173.730, 290.031; P<0.001$ ). At 0 hour of incubation, there was no significant difference in total sperm motility, forward motility, VCL, VSL, VAP and ALH between the control group and experimental group ( $P>0.05$ ); at 2, 4 and 8 hours of incubation, the total sperm motility, forward motility, VCL, VSL, VAP and ALH in the experimental group were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Nanobacteria can significantly reduce sperm concentration and motility parameters, thereby affect the fertility of patients

**Key words:** nanobacteria; sperm; sperm concentration; sperm motility

各种先天性和获得性的泌尿生殖系统异常、男性副腺感染、阴囊温度升高、内分泌紊乱、遗传因素和免疫因素等均可影响男性生育能力<sup>[1]</sup>, 其中炎症和感染是最主要的因素<sup>[2]</sup>。已有越来越多的病原体被证明能影响精子运动能力和功能, 如大肠埃希菌、淋球菌、支原体、衣原体等<sup>[2]</sup>。纳米细菌最早由芬兰科学家 Kajander 等在培养哺乳动物细胞时发现, 形态微小, 可通过 0.22  $\mu\text{m}$  除菌滤器, 常规细菌培养方法难以生长, 需在细胞培养基中才能生长<sup>[3]</sup>。目前, 纳米细菌已被证实与泌尿系结石、钙化性疾病密切相关<sup>[4-6]</sup>, 而且能在体外对多种细胞产生毒性作用<sup>[7-8]</sup>。ZHOU 等<sup>[9]</sup>成功从 III 型前列腺炎患者前列腺液中分离培养出纳米细菌。随后, SHEN 等<sup>[10]</sup>研究表明, 纳米细菌可能是 III 型前列腺炎的致病因素。因为前列腺液是精液的重要组成部分, 所以推测存在于前列腺炎尤其是 III 型前列腺炎患者体内的纳米细菌可对患者精子产生影响而导致患者不育。ZHANG 等<sup>[11]</sup>从睾丸微石症的不育患者精液中分离出纳米细菌, 提示纳米细菌可能与微石症患者的不育有关。LIN 等<sup>[12]</sup>用纳米细菌成功诱导大鼠生精小管管腔形成睾丸微石, 并提出纳米细菌可致睾丸组织出现病变。基于此, 本研究将从 III 型前列

腺炎患者的前列腺液标本中分离培养纳米细菌, 并将纳米细菌体外感染人精子细胞, 利用计算机辅助精子分析系统 (computer-assisted sperm analysis, CASA) 分析纳米细菌体外对人精子运动参数的影响, 探讨纳米细菌对人精子细胞的影响, 从而为一些不明原因的不育症患者提供新的诊疗思路。

## 1 资料与方法

**1.1 标本来源** 选择 2021 年 10 ~ 12 月新乡医学院第三附属医院泌尿外科收治的 12 例 III 型前列腺炎患者为纳米细菌标本来源对象。病例纳入标准: (1) 符合 III 型前列腺炎的诊断标准<sup>[13]</sup>; (2) 首诊发现; (3) 前列腺炎症状持续 3 个月以上; (4) 年龄 29 ~ 33 岁; (5) 具有完整的临床相关资料。病例排除标准: (1) 合并急性前列腺炎、前列腺增生、前列腺肿瘤、泌尿系结石、尿路感染等疾病; (2) 合并心、脑血管疾病; (3) 合并肝、肾功能不全等疾病。同时选择 2021 年 11 月至 2022 年 1 月于新乡医学院第三附属医院生殖男科体检的 10 名无泌尿生殖系统疾病的健康青年男性为精子来源对象。本研究已获新乡医学院第三附属医院伦理委员会的批准 (批准文号: K2021-018-01 号), 研究过程中严格遵守伦理

学相关要求,保护患者隐私;所收精液标本均为体检后剩余标本,故已申请豁免患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 纳米细菌的培养 参照 KAJANDER 等<sup>[3]</sup>和 SHEN 等<sup>[10]</sup>的方法,收集Ⅲ型前列腺炎患者的前列腺液标本,置于无菌杯中,无菌生理盐水对倍稀释前列腺液,充分震荡混匀后,依次用 0.45 μm 和 0.22 μm 除菌滤器过滤,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,置于含体积分数 5% 二氧化碳的 37 ℃ 培养箱中培养,每 2 周换液 1 次,培养 4~6 周,观察结果;同时设不加标本的培养基作为阴性对照。

1.2.2 纳米细菌的茜素红染色 将“1.2.1”项中培养的纳米细菌菌液 4 ℃ 下 14 000 × g 离心 30 min,弃上清,下层沉淀用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)重悬,然后,4 ℃ 下 14 000 × g 离心 5 min,重复 3 次,取下层沉淀涂在载玻片上。按照茜素红染色试剂盒说明书和李永国等<sup>[14]</sup>报道方法对细菌进行茜素红钙染色:将涂有细菌的玻片自然晾干后用体积分数 95% 乙醇和乙醚(二者比例为 1:1)固定 15 min,蒸馏水冲洗后置于 70 ℃ 恒温烤箱中烤片,使细菌更好固定于玻片上,10 min 后,小心加入适量染液覆盖在菌膜上,室温下孵育 5 min,然后用蒸馏水冲洗,晾干后镜下观察并拍照,参考文献[14-15]中的标准:以白色沉淀形式存在于培养管底部,且为微小颗粒,常聚集成簇,茜素红钙染色呈深红色判断纳米细菌。根据染色结果将患者分为纳米细菌阴性组和纳米细菌阳性组。

1.2.3 CASA 系统分析纳米细菌阴性组和纳米细菌阳性组患者的精子特征 应用 CASA 系统分析 2 组患者的精液量、精子浓度、总活力、前向运动力。

1.2.4 纳米细菌悬液的制备 将“1.2.1”项中的纳米细菌菌液 4 ℃ 下 14 000 × g 离心 30 min,弃上清,下层沉淀用无菌生理盐水清洗后,4 ℃ 下 14 000 × g 离心 5 min,重复 3 次,然后用无菌生理盐水将菌液浓度调至 2 麦氏备用。

1.2.5 精子悬液的制备 10 名健康男性禁欲 3 d,手淫法采集精液,置于无菌容器中,液化精液,并经上游法优化处理,使前向运动精子百分比达 50% 以上、精子活率 80% 以上后,再用输卵管液调节精子浓度为 70 × 10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 后备用。

1.2.6 纳米细菌体外感染精子细胞 取精子悬液随机分为对照组和实验组。对照组和实验组分别用输卵管液、纳米细菌悬液各 100 μL 与等体积精子悬

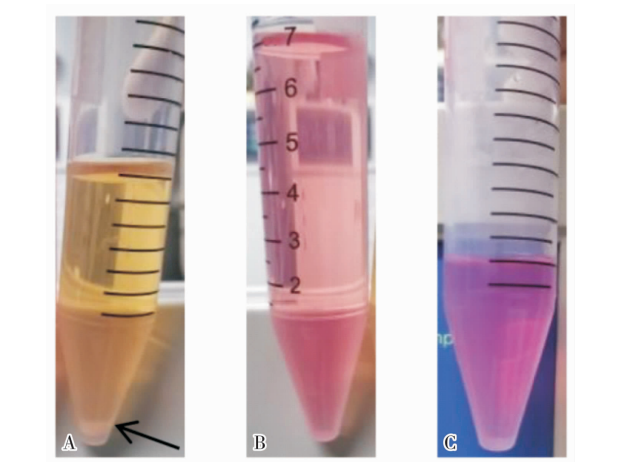
液充分混匀,接种于细胞培养板中,置于 37 ℃ 恒温水浴箱中孵育。

1.2.7 CASA 系统分析实验组和对照组的精子形态和运动能力 分别于孵育 0、2、4、8 h 时,采用 CASA 系统分析 2 组精子形态、凝集情况、精子数量和精子运动能力,每份标本观测 10~15 个视野。主要观测指标包括:精子形态和凝集现象、精子浓度、总活力、前向运动力、直线速度(velocity straight linear,VSL)、曲线速度(velocity curve linear,VCL)、平均路径速度(velocity average path,VAP)和精子头部侧摆幅度(amplitude of lateral head displacement,ALH)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 25.0 软件进行数据统计与分析,应用 Graph Pad Prism9 软件作图;计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验,组内不同时间点比较采用重复测量方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 纳米细菌培养结果 结果见图 1。培养的纳米细菌为沉积在管底的白色沉淀,且培养基颜色变黄;阴性标本颜色与培养基对照组相比,颜色略有变黄。

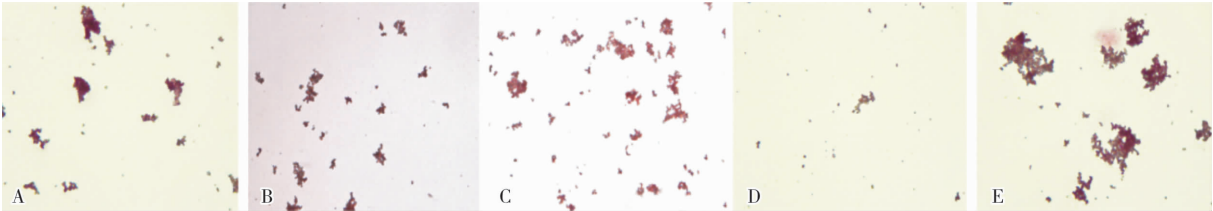


A: 前列腺液标本中纳米细菌阳性培养结果;B: 前列腺液标本中纳米细菌阴性培养结果;C: 阴性对照培养结果。

图 1 前列腺液标本中纳米细菌培养结果

Fig.1 Cultured results of nanobacteria in prostatic fluid samples

2.2 纳米细菌茜素红染色结果 结果见图 2。茜素红染色结果显示,不同视野下的纳米细菌常聚集成簇,单个细菌由于形体微小不可见,成簇的纳米细菌可被染成红色。12 例Ⅲ型前列腺炎患者的前列腺液标本中,5 例判断含有纳米细菌,7 例判断未含有纳米细菌。



A、B、C、D、E 分别为 5 份前列腺液标本纳米细菌培养阳性染色结果,成簇的纳米细菌可被染成红色。

图 2 前列腺液标本中纳米细菌茜素红染色结果 ( ×400)

Fig.2 Alizarin red staining of nanobacteria in prostatic fluid samples ( ×400)

2.3 纳米细菌阴性组与纳米细菌阳性组Ⅲ型前列腺炎患者的临床特征比较 结果见表 1。纳米细菌阴性组与纳米细菌阳性组患者的年龄、精液量、总活力比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 纳米细菌阳性组患者的精子浓度、前向运动力显著低于纳米细菌阴性组, 差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。

表 1 纳米细菌阴性组与纳米细菌阳性组Ⅲ型前列腺炎患者的相关临床资料比较

Tab.1 Comparison of clinical data of patients with type III prostatitis between the nanobacteria-negative group and nanobacteria-positive group

组别	<i>n</i>	年龄/岁	精液量/mL	精子浓度/( ×10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	总活力/%	前向运动力/%
纳米细菌阴性组	7	31.43 ± 1.51	3.27 ± 0.18	63.29 ± 1.80	68.43 ± 1.72	62.86 ± 0.90
纳米细菌阳性组	5	31.00 ± 1.58	3.34 ± 0.15	57.12 ± 2.14	66.80 ± 0.84	56.20 ± 1.30
<i>t</i>		-0.475	0.692	-5.415	-1.942	-10.530
<i>P</i>		>0.05	>0.05	<0.001	>0.05	<0.001

2.4 实验组和对照组精子形态和凝集情况比较 显变化,均未出现明显凝集。

结果见图 3。显微镜下,2 组精子形态各时间点无明显

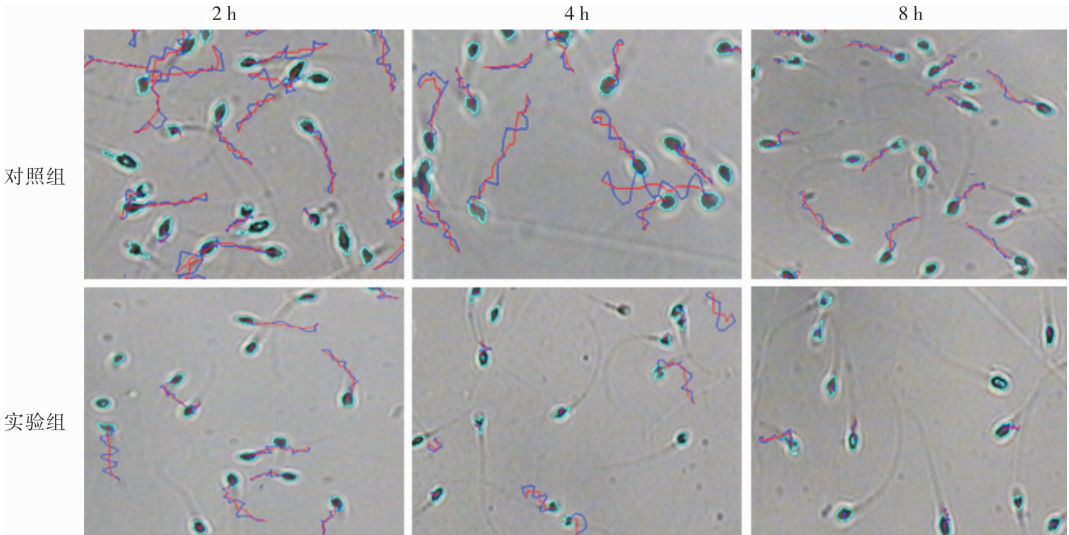


图 3 实验组和对照组精子不同孵育时间点形态 ( ×400)

Fig.3 Morphology of sperm in the experimental group and control group at different incubation time points ( ×400)

2.5 对照组和实验组精子浓度比较 结果见表 2。和实验组精子浓度比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 孵育 2、4、8 h 时, 实验组精子浓度显著低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。

表 2 对照组和实验组体外孵育不同时间点精子浓度比较

Tab.2 Comparison of sperm concentration between the control group and experimental group at different incubation time *in vitro*

组别	<i>n</i>	精子浓度/( ×10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )				<i>F</i>	<i>P</i>
		孵育 0 h	孵育 2 h	孵育 4 h	孵育 8 h		
对照组	10	69.97 ± 0.05	69.00 ± 0.44	66.36 ± 1.32	64.23 ± 2.10	132.925	<0.001
实验组	10	69.97 ± 0.01	65.60 ± 0.73	63.13 ± 1.38	59.03 ± 2.78	135.420	<0.001
<i>t</i>		0.430	12.626	5.342	4.724		
<i>P</i>		>0.05	<0.001	<0.001	<0.001		

**2.6 对照组和实验组体外孵育不同时间点精子运动参数的比较** 结果见表 3。对照组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 随着孵育时间的延长呈下降趋势 ( $F=304.494, 48.012, 95.780, 53.538, 383.257, 287.428, P<0.001$ ), 且实验组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 随着孵育时间的延长亦呈下降趋势 ( $F=1\,758.057$ 、

**表 3 对照组和实验组体外孵育不同时间后运动参数的比较**

Tab.3 Comparison of motor parameters between control group and experimental group after different incubation time <i>in vitro</i>							
( $\bar{x} \pm s$ )							
组别	<i>n</i>	总活力/%	前向运动力/%	VCL/( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	VSL/( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	VAP/( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	ALH/ $\mu\text{m}$
对照组	10						
孵育 0 h		88.93 $\pm$ 1.75	56.33 $\pm$ 4.03	47.27 $\pm$ 4.79	30.74 $\pm$ 3.51	36.53 $\pm$ 2.17	5.35 $\pm$ 0.32
孵育 2 h		66.06 $\pm$ 10.46	50.01 $\pm$ 7.85	31.20 $\pm$ 3.30	20.93 $\pm$ 1.95	22.47 $\pm$ 1.76	4.45 $\pm$ 0.28
孵育 4 h		53.33 $\pm$ 10.32	35.74 $\pm$ 8.46	28.35 $\pm$ 3.34	19.19 $\pm$ 1.16	20.28 $\pm$ 1.68	2.98 $\pm$ 0.44
孵育 8 h		33.80 $\pm$ 9.57	30.80 $\pm$ 4.37	28.78 $\pm$ 0.78	16.26 $\pm$ 1.70	18.25 $\pm$ 1.32	2.41 $\pm$ 0.37
实验组	10						
孵育 0 h		88.11 $\pm$ 2.51	55.63 $\pm$ 2.79	47.87 $\pm$ 4.39	31.64 $\pm$ 0.99	36.06 $\pm$ 1.33	5.30 $\pm$ 0.33
孵育 2 h		41.34 $\pm$ 5.18 <sup>a</sup>	29.88 $\pm$ 5.44 <sup>a</sup>	28.04 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>	16.76 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	18.52 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	3.53 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
孵育 4 h		17.30 $\pm$ 3.99 <sup>a</sup>	8.86 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	18.62 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>	13.73 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	15.27 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	2.46 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
孵育 8 h		10.89 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	5.17 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	18.14 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>	12.00 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>	13.09 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

3 讨论

许多病原体可导致男性生殖系统感染,进而影响精子的生成以及精子运动参数,损害患者的生殖能力<sup>[16]</sup>。其中细菌性感染在众多病原体中的检出率较高,纳米细菌这一特殊的纳米级微生物也被证实与男性泌尿生殖系统感染密切相关,尤其是结石患者,甚至还会在患者体内形成生物膜从而影响到治疗效果<sup>[17-18]</sup>。纳米细菌不易在普通细菌培养环境中生长,依赖于细胞培养环境,白色培养物易黏附于管底,这是纳米细菌培养成功的一个重要的微生物学特征;其次是纳米细菌在培养过程中能产生羟基磷灰石矿化外壳,可通过钙染色进行鉴定;且钙染色特异性较高,假阳性率较低,可作为鉴别纳米细菌的重要参考指标<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,对Ⅲ型前列腺炎患者的前列腺液标本培养后管底有白色沉淀,且培养基颜色变黄;阴性标本颜色与培养基对照组相比,颜色也略有变黄;茜素红钙染色结果显示,不同视野下有红色染色细菌;这证明,本研究参照文献方法成功分离培养出纳米细菌。

本研究结果显示,纳米细菌阳性组患者的精子浓度、前向运动力显著低于纳米细菌阴性组,这提示纳米细菌可对Ⅲ型前列腺炎患者精子细胞产生影

924.174、297.114、244.244、1173.730、290.031、 $P<0.001$ )。孵育 0 h 时,对照组和实验组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );孵育 2、4、8 h 时,实验组精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 显著低于对照组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

响。此外,本研究体外将纳米细菌与精子共孵育后,精子浓度、精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 随孵育时间的延长呈下降的趋势;纳米细菌与精子共孵育 2、4、8 h 时,精子浓度、精子总活力、前向运动力、VCL、VSL、VAP 及 ALH 显著低于对照组。因为共孵育 8 h 后,对照组精子浓度和活力已不符合推荐参考值范围;所以,本研究未对后续时间点数据进行展示。另外,由于纳米细菌本身生长缓慢,可以忽略在共孵育过程中因纳米细菌增殖导致营养消耗、菌液与精子比例不一致等因素带来的干扰。因此,以上研究结果证实,纳米细菌可在体外降低精子浓度及各运动参数。推测纳米细菌产生细胞毒性作用的机制如下:(1)纳米细菌感染靶细胞后,纳米细菌的羟基磷灰石矿化外壳可能会直接损伤细胞<sup>[10]</sup>;(2)纳米细菌产生的脂多糖样内毒素也可能对靶细胞产生毒性作用<sup>[19]</sup>;(3)纳米细菌也可作为外来物质激活靶细胞溶酶体酶,诱导活性氧系统的活化,最终导致细胞凋亡、自噬<sup>[8,20]</sup>;(4)纳米细菌感染机体后除了细菌对靶细胞的直接作用外,也能诱导免疫细胞产生细胞因子间接导致机体靶细胞损伤。SHEN 等<sup>[10]</sup>通过纳米细菌感染 SD 大鼠诱导前列腺组织炎症模型,从模型大鼠前列腺组织中检出了较高水平的白细胞介素-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;而白



细胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α 会对精子数量和精子参数产生不利的影响<sup>[21]</sup>。然而,这些是否是纳米细菌对精子产生不利影响的机制仍需进一步验证。

细菌对精子的黏附是导致精子聚集和活力下降的原因之一。决定黏附作用的物质既包括细菌自身成分也包括精子细胞膜上的成分,二者相互作用导致精子黏附和聚集,如大肠杆菌、支原体、葡萄球菌等<sup>[2]</sup>。本研究结果显示,显微镜下,对照组和实验组精子形态各时间点无明显变化,均未出现明显的聚集与黏附,推测这可能与纳米细菌的特殊性有关;考虑到精子浓度呈显著下降趋势,推测纳米细菌对精子的影响更趋向于毒性损伤而非黏附,因为精子细胞的完整性同样也能影响精子活力<sup>[22]</sup>。

综上所述,纳米细菌可降低精子浓度和运动参数,进而可能影响患者的生育能力。由于纳米细菌生长周期较长、培养条件异于常规培养方式,故很容易被忽略;因此,对于不育男性患者应综合考虑各种感染性因素。考虑纳米细菌对精子的影响更趋向于毒性损伤而非黏附,需进一步探讨纳米细菌对精子毒性作用的机制。

参考文献:

[1] JAFARI H,MIRZAIHNAJMABADI K,ROUDSARI R L,*et al.* The factors affecting male infertility:a systematic review[J]. *Int J Reprod Biomed*,2021,19(8):681-688.

[2] FARSIMADAN M,MOTAMEDIFAR M. Bacterial infection of the male reproductive system causing infertility[J]. *J Reprod Immunol*,2020,142:103183.

[3] KAJANDER E O,CIFTCIOGLU N. Nanobacteria;an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1998,95(14):8274-8279.

[4] CIFTCIOGLU N,BJÖRKLUND M,KUORIKOSKI K,*et al.* Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation[J]. *Kidney Int*,1999,56(5):1893-1898.

[5] ALTUNDAG K. Association between nanobacteria and microcalcifications in breast[J]. *J BUON*,2021,26(1):280-281.

[6] ANSARI H,AKHAVAN SEPAHI A,AKHAVAN SEPAHI M. Different approaches to detect "nanobacteria" in patients with kidney stones;an infectious cause or a subset of life?[J]. *Urol J*,2017,14(5):5001-5007.

[7] ZHANG M,YANG J,SHU J,*et al.* Cytotoxicity induced by nanobacteria and nanohydroxyapatites in human choriocarcinoma cells[J]. *Nanoscale Res Lett*,2014,9(1):616.

[8] WU J,TAO Z,DENG Y,*et al.* Calcifying nanoparticles induce cy-

tototoxicity mediated by ROS- JNK signaling pathways[J]. *Urolithiasis*,2019,47(2):125-135.

[9] ZHOU Z,HONG L,SHEN X,*et al.* Detection of nanobacteria infection in type III prostatitis[J]. *Urology*,2008,71(6):1091-1095.

[10] SHEN X,MING A,LI X,*et al.* Nanobacteria;a possible etiology for type III prostatitis[J]. *J Urol*,2010,184(1):364-369.

[11] ZHANG Q H,LU G S,SHEN X C,*et al.* Nanobacteria may be linked to testicular microlithiasis in infertility[J]. *J Androl*,2010,31(2):121-125.

[12] LIN X C,GAO X,LU G S,*et al.* Role of calcifying nanoparticles in the development of testicular microlithiasis *in vivo*[J]. *BMC Urol*,2017,17(1):99.

[13] KHAN F U,IHSAN A U,KHAN H U,*et al.* Comprehensive overview of prostatitis[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,94:1064-1076.

[14] 李永国,文宇,杨竹林,等. 胆汁纳米细菌的培养与鉴定[J]. *中华医学杂志*,2002,82(22):1557-1560.

LI Y G,WEN Y,YANG Z L,*et al.* Culture and identification of bile nanobacteria[J]. *Natl Med J China*,2002,82(22):1557-1560.

[15] GUO Y,ZHANG D,LU H,*et al.* Association between calcifying nanoparticles and placental calcification[J]. *Int J Nanomedicine*,2012,7:1679-1686.

[16] OGHBAEI H,RASTGAR REZAEI Y,NIKANFAR S,*et al.* Effects of bacteria on male fertility:spermatogenesis and sperm function[J]. *Life Sci*,2020,256:117891.

[17] ZHENG J,TANG J,YIN S,*et al.* Comparison of polymerase chain reaction and immunologic methods for the detection of nanobacterial infection in type-III prostatitis[J]. *Urology*,2014,84(3):731.

[18] FAYEZ HASS N,KHALED IBRAHIM M,YOUSEF EL S,*et al.* Characterization of biofilm producer nanobacteria isolated from kidney stones of some egyptian patients[J]. *Pak J Biol Sci*,2021,24(9):953-970.

[19] HJELLE J T,MILLER-HJELLE M A,POXTON I R,*et al.* Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease[J]. *Kidney Int*,2000,57(6):2360-2374.

[20] WU J H,DENG Y L,LIU Q,*et al.* Induction of apoptosis and autophagy by calcifying nanoparticles in human bladder cancer cells[J]. *Tumour Biol*,2017,39(6):1010428317707688.

[21] KURKOWSKA W,BOGACZ A,JANISZEWSKA M,*et al.* Oxidative stress is associated with reduced sperm motility in normal semen[J]. *Am J Mens Health*,2020,14(5):1557988320939731.

[22] DEHGHAN MARVAST L,TALEBI A R,GHASEMZADEH J,*et al.* Effects of Chlamydia trachomatis infection on sperm chromatin condensation and DNA integrity[J]. *Andrologia*,2018,50(3):e12918.

( 本文编辑:周二强 )