

益肾通络方对无症状特发性弱精子症不育患者精子DNA碎片指数及精子线粒体膜电位的影响

郝高利¹, 何鑫², 樊立鹏¹, 陈建设¹, 李勋¹, 张辉¹, 陈翔¹, 吕水林¹, 付晓君¹, 孙自学^{1*}

(1. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450002;

2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨益肾通络方对无症状特发性弱精子症不育患者精子DNA碎片指数(DFI)及精子线粒体膜电位(MMP)的影响。方法:将128例无症状特发性弱精子症不育患者随机分为观察组和对照组,各64例;观察组给予益肾通络方治疗;对照组给予五子衍宗丸+左卡尼汀口服液治疗,12周为1疗程;分别于治疗前后观察比较两组患者配偶受孕率、精子前向运动百分率(PR)、精子总活力(PR+NP)、精子功能(精子尾部低渗膨胀率、精子顶体酶活性)、精子DFI、精子MMP等疗效指标,观察记录研究期间出现的不良反应,系统评价临床疗效与安全性。结果:共有121例患者完成了该项研究,观察组61例,对照组60例。观察组配偶妊娠率14.75%(9/61),高于对照组6.67%(4/60),但差异无统计学意义。两组临床疗效比较观察组优于对照组($Z=-2.980, P<0.05$)。与体温治疗前比较,治疗后两组患者精子PR、精子PR+NP、精子尾部低渗膨胀率、精子顶体酶活性、精子DFI、精子MMP均明显改善($P<0.05$),观察组优于对照组($P<0.05$);在精子浓度方面,治疗后两组均无明显改变。研究过程中,两组患者均未出现安全性指标异常与明显不良反应。结论:采用益肾通络方治疗无症状特发性弱精子症不育具有较好的临床疗效,益肾通络方可以提高该病患者的精子活力、配偶妊娠率,改善精子功能,且具有良好的安全性,其机制可能与降低精子DFI、提高精子MMP有关。

[关键词] 益肾通络方; 男性不育; 弱精子症; 精子DNA碎片指数; 精子线粒体膜电位

[中图分类号] R256;R287;R697 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)20-0145-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250628

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250126.1134.002>

[网络出版日期] 2025-01-26 12:39:57



Effect of Yishen Tongluo Prescription on Sperm DNA Fragmentation Index and Sperm Mitochondrial Membrane Potential in Patients with Asymptomatic Idiopathic Asthenospermia Infertility

HAO Gaoli¹, HE Xin², FAN Lipeng¹, CHEN Jianshe¹, LI Xun¹, ZHANG Hui¹, CHEN Xiang¹,
LYU Shuilin¹, FU Xiaojun¹, SUN Zixue^{1*}

(1. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Yishen Tongluo prescription on sperm DNA fragmentation index (DFI) and sperm mitochondrial membrane potential (MMP) in patients with asymptomatic idiopathic asthenospermia infertility. **Methods:** A total of 128 patients with asymptomatic idiopathic asthenospermia were randomly assigned to an experimental group (64 cases) and a control group (64 cases). The experimental group received Yishen Tongluo prescription, while the control group was treated with

[收稿日期] 2024-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82274536);河南省重点科技攻关课题(222102310100);河南省“中原英才计划”(ZYMY201809);河南省防治生殖障碍性疾病中医药重点实验室项目(2021ZDSYS10)

[第一作者] 郝高利,博士,从事中医药防治生殖与男科疾病研究,E-mail:haogaoli@126.com

[通信作者] *孙自学,硕士,主任医师,教授,博士生导师,从事中医药防治生殖与男科疾病研究,E-mail:sunhxz@163.com

Wuzi Yanzongwan combined with *L*-carnitine oral solution. One treatment course lasted 12 weeks. Spouse pregnancy rate, sperm progressive motility (PR), total sperm motility (PR+NP), sperm function (sperm tail hypotonic swelling rate, sperm acrosin activity), sperm DFI, and sperm MMP were compared between the two groups before and after treatment. Adverse reactions were observed and recorded during the study, and clinical efficacy and safety were systematically evaluated. **Results:** A total of 121 patients completed the study, including 61 in the experimental group and 60 in the control group. The spouse pregnancy rate in the experimental group was 14.75% (9/61), higher than that in the control group at 6.67% (4/60), though the difference was not statistically significant. Clinical efficacy in the experimental group was superior to that in the control group ($P<0.05$). Compared with the results before treatment, sperm PR, PR + NP, sperm tail hypotonic swelling rate, sperm acrosin activity, sperm DFI, and sperm MMP were significantly improved in both groups after treatment ($P<0.05$), with greater improvements in the experimental group ($P<0.05$). However, there was no significant change in sperm concentration in either group after treatment. During the study, no abnormal safety indicators or significant adverse reactions occurred in either group. **Conclusion:** The kidney-tonifying and collateral-dredging method shows good clinical efficacy in the treatment of asymptomatic idiopathic asthenospermia infertility. Yishen Tongluo prescription can improve sperm motility, increase spouse pregnancy rate, enhance sperm function, and demonstrates good safety. Its mechanism may be related to reducing sperm DFI and increasing sperm MMP.

[Keywords] Yishen Tongluo prescription; male infertility; asthenospermia; sperm DNA fragmentation index; sperm mitochondrial membrane potential

男性不育具有较高的发病率,目前已成为全球性的社会问题。据统计,世界范围内约有15%的育龄夫妇面临着生育问题,其中由男方因素导致者约占50%^[1],随着我国人口老龄化的加剧和生育率的降低,男性生育问题开始受到越来越多的关注^[2]。由精子活力低下导致的弱精子不育症是男性不育的常见类型,占精液质量异常导致男性不育的20%~40%^[3]。弱精子症病因机制复杂,临床上有30%~40%的患者找不到明确的原因,被称为特发性弱精子症^[4],其中无证可辨的特发性弱精子症不育占有较大的比例,由于症状、体征不明显或者无明确的症状、体征,很难运用传统的中医四诊做到精确辨证,加之病因机制不明,给中西医治疗带来了难度。中医药治疗男性不育的历史源远流长,积累了丰厚的经验,形成了独具特色的论治方法。近年来,笔者所在团队基于理论研究和临床实践,创新性地提出肾虚络阻是无症状特发性弱精子症不育的潜在病机,基于此潜在病机,临床采用益肾通络方治疗本病疗效显著,该方源于《证类本草》,具有益肾填精、活血通络之效^[5]。此外,由于精子活力、浓度等常规指标评估男性生育能力的价值有限^[6],精子DNA碎片指数(DFI)与精子线粒体膜电位(MMP)作为新的男性生育能力评价指标在临床中开始受到广泛重视与应用。本研究通过观察益肾通络方对无症状特发性弱精子症不育患者精子DFI与精子MMP的影响,系统评价其临床疗效和安全性,以期为本病的临床治疗提供行之有效的治法和方药。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究病例来源为2022年10月至

2023年9月于河南省中医院生殖男科就诊且符合无症状特发性弱精子症不育诊断的门诊患者。根据关于本病的前期中医药临床研究^[7],使用PASS 11.0软件计算所需纳入样本量^[8],共纳入研究病例128例,采用SPSS 20.0软件将患者随机分为观察组64例、对照组64例。观察组患者年龄23~45岁,平均(31.74±4.83)岁,病程13~52个月,平均(32.21±9.64)个月;对照组患者年龄24~46岁,平均(32.25±4.96)岁,病程12~54个月,平均(29.55±10.49)个月。两组患者年龄、病程比较,差异无统计学意义,具有可比性。本研究经河南省中医院伦理委员会审查通过(伦理审批号20221020)。研究流程见图1。

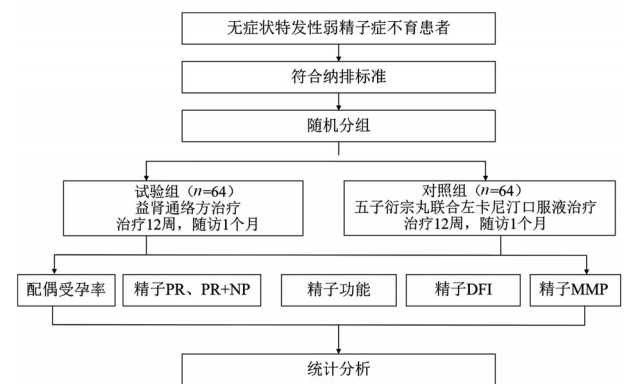


图1 研究流程

Fig. 1 Research process

1.2 诊断标准 参照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》^[9]并结合临床实际,制订特发性弱精子不育症诊断标准:①育龄夫妇婚后未采取避孕措施同居1年及以上未育,性生活正常,女方生育能力正常,由男方因素导致者;②2次或2次以上精液分析提示前向运动精子百分率(PR)<32%,其他

精液参数正常;③无明确致病原因。①②③项同时具备,即可诊断。

1.3 纳入标准 ①符合特发性弱精子不育症诊断;②除患有不育症外,无其他明显的临床症状,亦无其他中医辨证要点;③患者年龄为22~48岁;④依从性良好,自愿参加本研究并签署知情同意书。

1.4 排除标准 ①死精子症、畸形精子症、精液液化不良、免疫性不育患者;②近3个月服用过同类改善生精药物或接受过相关外治疗法;③近3个月曾服用抗肿瘤、抗风湿、免疫抑制剂、激素等影响生精药物;④生殖器官发育不良或畸形(如阴茎短小、严重尿道下裂等),后天睾丸萎缩、射精功能异常、精道不完全梗阻、精索静脉曲张等器质性疾病;⑤合并生殖道感染、精浆生化或内分泌检查异常;⑥合并严重心脑血管疾病,造血功能、肝肾功能异常,精神异常者;⑦有严重影响精子质量的不良习惯且无法纠正者;⑧过敏体质或对本次试验药物过敏者。

1.5 脱落、剔除标准

1.5.1 脱落标准 ①未完成整个观察周期,自行退出;②研究病例失访;③未按时复诊、复查,导致研究资料不完整。

1.5.2 剔除标准 ①误诊、误纳;②依从性差,未按时服药或病情变化,合并其他用药;③研究病例随机化后无任何用于评价的有效数据。

1.6 治疗方法

1.6.1 观察组 采用益肾通络方治疗,药由菟丝子20 g、熟地黄10 g、淫羊藿20 g、黄芪20 g、丹参30 g、烫水蛭6 g、川牛膝10 g组成,以上药物由河南省中医院统一采购,经药学部汪坤主管中药师鉴定均为正品,中药房统一煎煮。服用方法:每剂药煎取300 mL,每次服用150 mL,分早晚2次温服。

1.6.2 对照组 采用五子衍宗丸(北京同仁堂制药厂,国药准字Z11020188,规格60 g×1瓶)联合左卡尼汀口服液(东北制药集团沈阳第一制药厂,国药准字H1990372,规格10 mL×6支×1盒)治疗。服用方法:五子衍宗丸,每次6 g,每日2次,口服;左卡尼汀口服液,每次1支,每日2次,口服。

1.6.3 疗程与随访 两组均以12周为疗程,疗程结束后随访1个月。

1.7 观察指标

1.7.1 疗效指标 ①配偶受孕率。②PR、精子总活力(PR+NP)。③精子功能(精子尾部低渗膨胀率、精子顶体酶活性)。④精子DFI,采用Accuri™ C5型

流式细胞仪(美国BD公司)与精子核完整性染色试剂(浙江星博生物公司,批号220901)。⑤精子MMP,采用Accuri™ C5型流式细胞仪与精子尾部中段染色试剂(浙江星博生物公司,批号221001)。

1.7.2 安全性指标 观察记录试验前后患者呼吸、脉搏、血压、心率等生命体征,血、尿常规,肝肾功能,不良反应等。

1.8 疗效判定标准 参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[10],并结合《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》^[9]相关标准进行疗效判定:①痊愈:患者配偶怀孕;②治疗后患者配偶未怀孕,但精子PR恢复正常,即 $PR \geq 32\%$;③治疗后患者配偶未怀孕,精子PR未达到正常值,但较治疗前有提升;④治疗后患者配偶未怀孕,精子PR较治疗前无变化,甚至下降。

1.9 统计学处理 采用SPSS 20.0统计学软件对研究数据进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布者,组间比较采用独立样本的 t 检验,组内比较采用配对样本的 t 检验,不符合正态分布者,采用秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验;等级资料使用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者脱落与剔除情况 研究期间,观察组因后期失访脱落病例2例,因未规律服用药物剔除病例1例;对照组因未完成观察周期自行退出脱落病例2例,因治疗期间合并用药剔除病例2例。最终获得可评估有效病例121例,观察组61例,对照组60例。

2.2 两组患者配偶妊娠率比较 观察组患者配偶妊娠9例(治疗期间受孕2例、随访期间受孕7例),妊娠率14.75%(9/61);对照组患者配偶妊娠4例(治疗期间受孕1例、随访期间受孕3例),妊娠率6.67%(4/60),观察组妊娠率高于对照组,但差异无统计学意义。见表1。

表1 两组患者配偶妊娠率比较

Table 1 Comparison of pregnancy rates between two groups

组别	例数	妊娠率 例(%)
对照组	60	4(6.67)
观察组	61	9(14.75)

2.3 两组患者临床疗效比较 治疗后两组临床疗效的等级资料,经秩和检验比较,观察组优于对照组($Z = -2.980, P < 0.05$)。见表2。

表2 两组患者临床疗效比较

Table 2 Comparison of clinical efficacy between two groups

组别	例数	例(%)				
		治愈	显效	有效	无效	总有效
对照组	60	4(6.67)	14(23.33)	28(46.67)	14(23.33)	46(76.67)
观察组	61	9(14.75)	28(45.91)	15(24.59)	9(14.75)	52(85.25) ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P<0.05$

表3 两组患者精液主要参数变化比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of key semen parameters between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	PR/%	PR+NP/%	精子浓度(10^6)/个/mL
对照组	60	治疗前	21.27±5.81	31.52±4.88	38.11±10.55
		治疗后	26.71±7.57 ¹⁾	39.85±5.58 ¹⁾	39.54±11.16
观察组	61	治疗前	23.14±4.91	32.87±5.55	39.49±8.51
		治疗后	35.25±9.06 ^{1,2)}	45.51±5.97 ^{1,2)}	40.56±9.91

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P<0.05$;与对照组治疗后比较²⁾ $P<0.05$ (表4-表6同)

2.5 两组患者精子功能比较 治疗前两组患者精子尾部低渗膨胀率、精子顶体酶活性差异无统计学意义。与治疗前比较,治疗后两组患者精子尾部低渗膨胀率、精子顶体酶活性均提高($P<0.05$),治疗后观察组优于对照组($P<0.05$)。见表4。

表4 两组患者精子功能比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of semen function between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	精子尾部低渗膨胀率/%	精子顶体酶活性(10^6)/U
对照组	60	治疗前	55.95±11.52	41.19±12.44
		治疗后	62.16±7.67 ¹⁾	51.86±7.73 ¹⁾
观察组	61	治疗前	56.99±10.63	41.76±11.63
		治疗后	67.47±6.64 ^{1,2)}	59.08±13.62 ^{1,2)}

2.6 两组患者精子DFI比较 治疗前两组患者精子DFI差异无统计学意义。与本组治疗前比较,治疗后两组患者精子DFI均明显降低($P<0.05$),治疗后观察组精子DFI降低水平优于对照组($P<0.05$)。见表5。

表5 两组患者精子DFI比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of semen DNA fragmentation index between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后
对照组	60	27.39±7.27	19.45±6.07 ¹⁾
观察组	61	27.34±5.78	14.66±5.69 ^{1,2)}

2.7 治疗前后两组患者精子MMP比较 治疗前两组患者精子MMP差异无统计学意义。与本组治疗前比较,治疗后两组患者精子MMP均明显提高($P<$

2.4 两组患者精液主要参数变化比较 治疗前两组患者精子PR、PR+NP、精子浓度差异无统计学意义。与本组治疗前比较,治疗后两组患者精子PR、PR+NP均明显提高,差异有统计学意义($P<0.05$),治疗后观察组优于对照组($P<0.05$)。但在精子浓度方面,治疗后两组均无明显变化,差异无统计学意义。见表3。

0.05),治疗后观察组精子MMP提高水平优于对照组($P<0.05$)。见表6。

表6 两组患者精子MMP水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of semen mitochondrial membrane potential between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后
对照组	60	41.64±6.18	52.63±9.31 ¹⁾
观察组	61	42.26±4.64	59.38±10.74 ^{1,2)}

2.8 安全性指标评价 在试验观察期间,两组患者均未出现明显的不良反应,试验前后患者呼吸、脉搏、血压、心率等生命体征平稳,血、尿常规及肝功能未见明显异常。

3 讨论

男性不育症病因机制复杂,根据大量的临床实践,笔者所在团队发现部分弱精子不育症患者,除精液分析表现为精子活力低下外,临床上并无其他特殊症状表现,且病因机制不明,其舌苔、脉象、二便等也无异常,称之为无症状特发性弱精子症不育。相关研究表明,临床中约有34%的男性不育患者无法做到精准的辨证分型,57.6%的患者体质属于平和质^[11];此外,一项针对成都地区500例男性不育患者的中医症候研究发现,无证可辨的男性不育比例约占26%^[12]。由于病因机制不明,且无证可辨,给临床治疗带来了难度,治疗效果也不尽如人意。近年来,随着现代医学诊疗技术的进步,临床中大量“无症状疾病”被不断发现^[13],由于缺乏必要的四诊信息,给传统中医辨证论治带来了挑战。针对西医诊断明确,而中医“无证可辨”的疾病,现代

医家提出了“隐证”“潜证”等概念,即虽无与方证对应的明显的症状、体征,但确实存在病机之中,影响着疾病的发展、转归的病理变化,并提出了“辨病论治”“微观辨证”“以方测证”等对策^[14-16]。弱精子不育症可归属于中医“精冷”“精薄”“精清”等范畴,“辨病论治”方面,中医认为男子以肾为先天,肾藏精,主生殖,肾精亏虚是男性不育的重要原因,补肾法是男性不育的主要治法^[17];“微观辨证”方面,男性不育多病程较长,“久病多虚、多瘀”“久病入络”等中医理论与现代医学微循环障碍是男性不育的重要病理因素观点不谋而合^[18];“以方测证”方面,临床中采用补肾活血通络类中药治疗男性不育往往可以取得较好的临床疗效^[19]。据此,笔者所在团队认为,肾虚络阻是本病的潜在病机,治疗无症状特发性弱精子症不育当以“益肾通络”为大法。

基于“益肾通络法”研制的益肾通络方,主要由菟丝子、熟地黄、淫羊藿、黄芪、丹参、烫水蛭、川牛膝组成。方中菟丝子、熟地黄,补肾强阴、益精填髓为君药。淫羊藿,温补肾阳,强壮筋骨;黄芪,乃补气之要药,补气兼有行血散瘀之功,两者与君药阴阳相助,且有“阳中求阴”之意,使生殖之精泉源不竭、生化无穷,两者共为臣药。丹参、烫水蛭,破血逐瘀、活血通络为佐药。川牛膝,逐瘀通络、利尿通淋,又善引药下行、直达病所。全方用药得当,补而不滞,活血通络而不伤正气,诸药配伍,以凑益肾填精、活血通络之效。针对益肾通络方,笔者所在团队前期临床研究表明,该方疗效确切,可以提高肾虚络阻型男性不育患者的精子活力、浓度及配偶受孕率,改善精子形态,降低精子DFI等^[5,20-22],该方的加减方对免疫性不育、精子DNA损伤性不育也有较好的治疗效果^[23-25];实验研究表明,该方可以防护BaP染毒大鼠精子DNA甲基化改变^[26],通过调控PI3K/Akt/mTOR通路,CatSper-1、HSPA2蛋白及mRNA表达,改善少弱精子症大鼠模型精液质量等^[27]。

在对照组药物选择方面,本研究选取五子衍宗丸联合左卡尼汀口服液作为对照组治疗用药。五子衍宗丸、左卡尼汀口服液是男性不育症的常用治疗药物,目前已被多个指南共识列为无明显症状特发性弱精子症的推荐治疗用药^[28-29]。

精子DFI与精子MMP作为反映精子受精能力与精子活力的新型检测指标,在不明原因性男性不育临床诊治中显示出较高的价值^[30-31]。其中精子DFI与精子活动能力、精卵结合能力密切相关,研究

表明,精子DNA的完整性损伤在男性不育患者中发生率较高,精子DFI升高常伴发弱精、少精等,因此,对不明原因的男性不育患者,进行精子DFI的测定和评价具有重要意义^[29];精子MMP反映了精子线粒体的能量状态,研究显示精子MMP与精子活力呈正相关,高MMP组的精子活动率、精子PR显著高于低MMP组,此外,精子MMP还关系到精子的受精能力,精子MMP低下将导致顶体反应时溶解穿透卵丘透明带的能力降低,受精能力下降^[31]。

本研究结果显示,益肾通络方在提高本病患者精子PR、PR+NP,改善精子功能方面,均优于对照组;治疗后,两组患者精子DFI均降低,精子MMP均提高,其中观察组优于对照组;研究期间所有患者均未出现明显的不良反应,具有良好的安全性;在配偶妊娠率方面,观察组高于对照组,但差异无统计学意义,可能与随访观察时间短有关。综上,采用益肾通络方治疗无症状特发性弱精子症不育具有较好的临床疗效,益肾通络方可以提高本病患者的精子活力、配偶妊娠率,改善精子功能,且具有良好的安全性,其机制可能与降低精子DFI、提高精子MMP有关。

本研究为临床治疗无症状性不育提供了可以借鉴的治法,同时为益肾通络方治疗无症状特发性弱精子症不育的推广应用及男性不育新药开发提供一定的临床数据支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] INHORN M C, PATRIZIO P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(4): 411-426.
- [2] 李宏军,洪镛,李铮,等. 男性不育诊疗指南[J]. 中华男科学杂志, 2022, 28(1): 66-76.
LI H J, HONG K, LI Z, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of male infertility [J]. Natl J Androl, 2022, 28(1): 66-76.
- [3] AGARWAL A, BASKARAN S, PAREKH N, et al. Male infertility [J]. Lancet, 2021, 397(10271): 319-333.
- [4] JUNGWIRTH A, GIWERCMAN A, TOURNAYE H, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: The 2012 update [J]. Eur Urol, 2012, 62(2): 324-332.
- [5] 张芳,孙自学,邱荃,等. 益肾通络方治疗少弱精子型男性不育症肾虚瘀阻证的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 112-116.
ZHANG F, SUN Z X, QIU Q, et al. Clinical efficacy on

- Yishen Tongluofang for treatment of male infertility with deficiency and stasis of kidney [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2021, 27(11): 112-116.
- [6] GUZICK D S, OVERSTREET J W, FACTOR-LITVAK P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(19): 1388-1393.
- [7] 孙自学, 李鹏超, 何鑫, 等. 益肾通络补气方治疗无症状性弱精子症不育患者的疗效评价[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(9):5660-5663.
- SUN Z X, LI P C, HE X, et al. Evaluation of curative effect of Yishen Tongluo Buqi formula in treating asymptomatic infertile patients with weak sperm [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(9): 5660-5663.
- [8] 魏凤江, 胡良平. PASS软件在观察性研究设计样本含量估算中的应用[J]. *四川精神卫生*, 2017, 30(5):401-404.
- WEI F J, HU L P. Application of PASS in the sample size estimation of the observational study design [J]. *Sichuan Ment Hlth*, 2017, 30(5): 401-404.
- [9] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011:16-20.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 16-20.
- [10] 国家药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:383-387.
- NATIONAL M P A. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicines: Trial edition [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002: 383-387.
- [11] 秦国政, 李曰庆, 裴晓华, 等. 《基于脾肾两虚夹瘀论治无症状性弱精子不育症》专家共识[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(6):2235-2238.
- QIN G Z, LI Y Q, PEI X H, et al. Expert consensus of the treatment for asymptomatic asthenospermia infertility based on dual deficiency of spleen and kidney with blood stasis [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(6): 2235-2238.
- [12] 俞旭君, 余清霞, 常德贵, 等. 成都地区男性不育症中医证型分布的调查研究[J]. *中华男科学杂志*, 2019, 25(10): 909-913.
- YU X J, YU Q X, CHANG D G, et al. Distribution of traditional Chinese medicine syndrome types of male infertility in Chengdu area [J]. *Natl J Androl*, 2019, 25(10): 909-913.
- [13] 李静, 钟森杰, 资源, 等. 无症状性疾病的辨证策略[J]. *中医学报*, 2022, 37(5):930-934.
- LI J, ZHONG S J, ZI Y, et al. Strategy analysis of syndrome differentiation for asymptomatic diseases [J]. *Acta Chin Med*, 2022, 37(5): 930-934.
- [14] 张倩, 钟森杰, 熊霞军, 等. 基于微观辨证体系探讨“无证可辨”的对策[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(3):668-670.
- ZHANG Q, ZHONG S J, XIONG X J, et al. Discussion on countermeasures for "no syndrome to differentiate" based on microscopic differentiation system [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(3): 668-670.
- [15] 张晓芳, 廖凌虹. 对中医“无证可辨”的探讨[J]. *中医杂志*, 2019, 60(9):801-803.
- ZHANG X F, LIAO L H. Discussion on "no syndrome to differentiate" in traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 60(9): 801-803.
- [16] 陈士奎. 我国开创的中西医结合科研及其启示(四)——沈自尹院士与中医“肾”本质的中西医结合“探微索隐”研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(12):1414-1417.
- CHEN S K. Scientific researches of integrative medicine launched in China and their inspiration (IV) - integrative medical research on the essence of shen by academician SHEN Zi-yin [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2016, 36(12): 1414-1417.
- [17] 王旭昀, 李曰庆. 补肾法治疗男性不育症探析[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(2):289-290.
- WANG X Y, LI Y Q. Analysis of method of kidney Tonifying in male infertility [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2011, 29(2): 289-290.
- [18] 孙大林, 金保方. 微循环理论在男性不育症中西医结合诊疗中的应用价值探讨[J]. *北京中医药*, 2022, 41(12): 1346-1350.
- SUN D L, JIN B F. Application value of microcirculation theory in the diagnosis and treatment of male infertility with traditional Chinese and western medicine [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2022, 41(12): 1346-1350.
- [19] 金亦涵, 金保方, 孙大林, 等. 补肾活血法在男性生殖系统疾病治疗中的应用[J]. *中国性科学*, 2023, 32(9):115-118.
- JIN Y H, JIN B F, SUN D L, et al. Application of nourishing kidney and activating blood in male reproductive system diseases [J]. *Chin J Hum Sex*, 2023, 32(9): 115-118.
- [20] 张芳, 赵沛沛, 孙自学, 等. 隔药灸脐法联合益肾通络方治疗肾阳虚络阻型特发性弱精子症不育的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(4):97-103.
- ZHANG F, ZHAO P P, SUN Z X, et al. Clinical observation on herb-partitioned moxibustion on navel combined with Yishen Tongluo prescription in treatment of infertility induced by idiopathic asthenozoospermia with kidney-yang deficiency and collateral obstruction syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(4): 97-103.
- [21] 孙自学, 陈翔, 祝莉, 等. 益肾通络方治疗肾络阻型特发性死精子不育症疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2):1185-1188.
- SUN Z X, CHEN X, ZHU L, et al. Evaluation on the curative effect of Yishen Tongluo prescription in the treatment of idiopathic necrozoospermia with kidney deficiency and collateral obstruction [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(2): 1185-1188.
- [22] 陈翔, 孙自学, 赵帅鹏, 等. 益肾通络方联合微创手术治疗

- 精索静脉曲张伴弱精子症的疗效评价[J]. 中华男科学杂志, 2020, 26(4): 341-345.
- CHEN X, SUN Z X, ZHAO S P, et al. Yishen Tongluo recipe combined with minimally invasive surgery for the treatment of varicocele-associated asthenospermia [J]. Natl J Androl, 2020, 26(4): 341-345.
- [23] 张迪, 孙自学, 欧阳静雯, 等. 益肾通络清抗汤治疗无症状性免疫性不育症患者的临床研究[J]. 中药材, 2023, 46(3): 760-763.
- ZHANG D, SUN Z X, OUYANG J W, et al. Clinical study on the treatment of asymptomatic immune infertility with Yishen Tongluo Qingkang decoction [J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(3): 760-763.
- [24] 华众, 李鹏超, 李凝华, 等. 中药栓剂联合益肾通络清抗汤治疗免疫性不育的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(15): 114-119.
- HUA Z, LI P C, LI N H, et al. Clinical efficacy of traditional Chinese medicine suppository combined with Yishen Tongluo Qingkang decoction in treatment of immune infertility [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(15): 114-119.
- [25] 张迪, 孙自学, 门波, 等. 益肾通络祛湿方治疗精子DNA损伤不育症的临床研究[J]. 中药材, 2022, 45(7): 1753-1756.
- ZHANG D, SUN Z X, MEN B, et al. Clinical study on the treatment of sperm DNA damage infertility with Yishen Tongluo Qushi decoction [J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(7): 1753-1756.
- [26] 孙自学, 张宸铭, 李鹏超, 等. 益肾通络方对苯并(a)芘染毒雄性大鼠精子DNA甲基化改变的防护作用[J]. 中华男科学杂志, 2019, 25(2): 154-159.
- SUN Z X, ZHANG C M, LI P C, et al. Protective effect of Yishen Tongluo recipe against benzo (a) pyrene-induced sperm DNA methylation changes in male rats [J]. Natl J Androl, 2019, 25(2): 154-159.
- [27] 孙自学, 邱荃, 何鑫, 等. 益肾通络方对少弱精子症大鼠睾丸组织PI3K-Akt-mTOR通路、CatSper-1、HSPA2蛋白及mRNA表达的影响[J]. 中华男科学杂志, 2022, 28(5): 437-444.
- SUN Z X, QIU Q, HE X, et al. Effects of Yishen Tongluo prescription on the PI3K-Akt-mTOR pathway and the protein and mRNA expressions of CatSper-1 and HSPA2 in the testis tissue of oligoasthenospermia rats [J]. Natl J Androl, 2022, 28(5): 437-444.
- [28] 中成药治疗优势病种临床应用指南标准化项目组. 中成药治疗特发性少、弱精子男性不育症临床应用指南(2021年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(6): 645-652.
- Standardization Project Group of Clinical Application Guidelines for the Treatment of Dominant Diseases with Chinese Patent Medicine. Clinical application guideline for treating idiopathic oligospermia and asthenospermia male ateriaility by Chinese patent medicine(2021)[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(6): 645-652.
- [29] 北京中医药学会男科疾病专家共识组. 少弱精子症中西医结合药物治疗共识[J]. 中国男科学杂志, 2021, 35(5): 80-82, 86.
- Beijing Association of Chinese Medicine Andrology Disease Expert Consensus Group. Consensus on integrated traditional Chinese and western medicine drug therapy for asthenospermia and oligospermia [J]. Chin J Androl, 2021, 35(5): 80-82, 86.
- [30] 倪昊花, AGARWAL A, 孙莹璞, 等. 精子DNA碎片检测的临床专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2023, 32(2): 170-180.
- NI W H, AGARWAL A, SUN Y P, et al. Clinical expert consensus on sperm DNA fragmentation detection [J]. J Reprod Med, 2023, 32(2): 170-180.
- [31] 戎春浩, 李洁, 史海跃, 等. 精子线粒体膜电位与精液参数和IVF妊娠结局的相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2022, 28(7): 612-617.
- RONG C H, LI J, SHI H Y, et al. Correlation of sperm mitochondrial membrane potential with semen parameters and outcomes of *in vitro* fertilization [J]. Natl J Androl, 2022, 28(7): 612-617.

[责任编辑 张丰丰]