

五子衍宗方对实验性隐睾小鼠生精功能的保护作用

曾晓¹, 张长城¹, 狄国杰¹, 刘苗苗¹, 艾红², 袁丁¹, 王婷^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002;
2. 三峡大学第一临床医学院宜昌市中心人民医院检验科, 湖北 宜昌 443003)

〔摘要〕 目的:研究五子衍宗方对实验性隐睾小鼠生精功能的保护作用。方法:取 5~6 周龄 BALB/c 小鼠,手术建立小鼠隐睾模型,分为假手术组,模型组,五子衍宗方低、高剂量(100,200 mg·kg⁻¹)组,手术 14 d 后给药,用药 14 d,于末次给药 24 h 后检测小鼠的睾丸质量、精子密度、活率,光、电镜观察睾丸组织学结构的变化,检测小鼠睾丸内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的变化。结果:五子衍宗方能够显著增加模型小鼠的睾丸质量($P<0.01$),明显增加精子密度($P<0.05$),提高精子活率($P<0.01$),改善隐睾小鼠睾丸组织的病理性变化,显著升高 SOD 和 GSH-Px 活性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),显著降低 MDA 含量($P<0.01$)。结论:五子衍宗方提高睾丸组织内抗氧化损伤能力,从而减轻隐睾对小鼠睾丸生殖功能的损害。

〔关键词〕 五子衍宗方; 隐睾; 自由基; 生精障碍
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0201-04
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0909.004.html>
〔网络出版时间〕 2012-10-12 9:09

Protective Effects of Wuzi Yanzong Decoction
on Experimental Cryptorchid Mice

ZENG Xiao¹, ZHANG Chang-cheng¹, DI Guo-jie¹, LIU Miao-miao¹, AI Hong², YUAN Ding¹, WANG Ting^{1*}
(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Yichang Central People's Hospital,
The First College of Clinical Medical Science, Three Gorges University, Yichang 443003, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To investigate the protective effect of Wuzi Yanzong decoction on experimental cryptorchidism mice. **Method:** Five-six weeks old BALB/c mice cryptorchidism was induced and divided into four groups as sham, model, low dose of Wuzi Yanzong decoction (100 mg·kg⁻¹), high dose of Wuzi Yanzong decoction (200 mg·kg⁻¹). At the end of the study, testis tissues were collected for detection of testes weight, sperm density, live rate, histological structure changes of testis, detection of testes glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) activity and the malonyldialdehyde (MDA) content changes. **Result:** The Wuzi Yanzong decoction treated mice in the cryptorchid group significantly increased the mice testis weight ($P<0.01$), sperm density ($P<0.05$), sperm live rate ($P<0.01$) and showed an improved histologic appearance. Wuzi Yanzong decoction treatment significantly increased the reduced SOD and GSH-Px enzyme activities ($P<0.05$ or $P<0.01$) and decreased the elevated tissue malondialdehyde (MDA) levels ($P<0.01$) in testis tissues samples. **Conclusion:** Wuzi Yanzong decoction is a potential beneficial agent to reduce testicular damage in cryptorchid mice by decreasing oxidative stress.

〔Key words〕 Wuzi Yanzong decoction; free radical; cryptorchidism; dyszoospermia

〔收稿日期〕 20120724(013)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(30973928)
〔第一作者〕 曾晓, 硕士生, 从事中药药理研究, Tel:0717-6397466, E-mail: zengx_love@163.com
〔通讯作者〕 * 王婷, 医学博士, 副教授, 从事中药药理学研究, Tel:0717-6397466, E-mail: wangtingx@yahoo.com.cn

隐睾是指睾丸未能按正常发育过程通过腹股沟管沿着腹膜鞘突下降至阴囊底部,而停留在下降途中任何部位,是男性常见的泌尿生殖系统先天畸形。Thonneau 等^[1]研究发现隐睾症是引起男性不育的主要危险因素。隐睾可导致睾丸内自由基产生明显增多,生精细胞大量凋亡而致生精障碍^[2],隐睾不仅易使睾丸受到损伤,发生扭转,更重要的是增加男性先天不育的危险,且在儿童期行睾丸固定术并不能改善其不育率^[3]。手术治疗隐睾是公认的治疗方法,但隐睾患者精子质量在隐睾术后可能继续有损害^[4]。中医药在提高男性的精液质量和生殖功能方面具有其独特的优势,有较好的临床疗效^[5],是目前治疗男性不育的主要方法之一^[6]。五子衍宗方为临床治疗男性不育的常用方剂,本实验探讨五子衍宗方对实验性隐睾小鼠生精功能的保护作用。

1 材料

1.1 药品与试剂 五子衍宗方为中医经典方剂,组成为枸杞子 400 g,菟丝子(炒)400 g,覆盆子 200 g,五味子(蒸)50 g,车前子(盐炒)100 g,按照传统方法煎药,浓缩干燥至粉末,提取率为 35%,临用前用蒸馏水溶解。Bouins 液:苦味酸饱和水溶液 750 mL,甲醛 250 mL,冰醋酸 50 mL。精子营养液(BWW, NaCl 0.554 g·L⁻¹, KCl 0.035 6 g·L⁻¹, CaCl₂ 0.025 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.016 2 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.029 4 g·L⁻¹, NaHCO₃ 0.210 g·L⁻¹, NaPyr 0.003 g·L⁻¹, Nalac 0.370 g·L⁻¹, Glucose 0.100 g·L⁻¹, 质量分数 0.5% 的酚红 1.0 mL,青霉素 10 000 u,质量分数 0.3% 的 BSA)。其余药品均为分析纯。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物 BALB/c 种小鼠,SPF 级,5~6 周龄,22~25 g,雄性,湖北省实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(鄂)2008-0005。

1.3 仪器 SQIAS-2000 彩色精液质量图文分析仪(武汉千屏影像技术有限责任公司),DMR 型多功能显微镜及图像分析系统(德国 Leica 公司),H-7500 型透射式电子显微镜(德国 Leica 公司),ULTRACUT R 型超薄切片机(奥地利莱卡公司),JA2003 型电子分析天平(上海天平仪器厂)。

2 方法

2.1 隐睾模型的建立、分组及给药 40 只 Balb/c

雄性小鼠,随机分为 4 组,依次为假手术组,模型组,五子衍宗方低、高剂量组,每组各 10 只。各组小鼠用 2% 戊巴比妥钠 80 mg·kg⁻¹ 麻醉后,腹中线开口,将双侧睾丸提入腹腔,假手术组即关闭切口,其余各组切断韧带,缝合腹股沟,关闭切口。手术后常规饲养 14 d,于术后第 15 天,假手术组和模型组每天灌服纯净水 0.01 mL·g⁻¹,五子衍宗方低、高剂量组分别灌服五子衍宗方 100,200 mg·kg⁻¹(对应生药量分别为 285,570 mg·kg⁻¹),各组小鼠连续给药 14 d。

2.2 小鼠生殖器官质量的测定 末次给药 24 h 后称重,处死小鼠,取睾丸和附睾并称湿重。

2.3 小鼠精子密度及精子活率的测定 将盛有 6 mL 精子营养液^[7]的试管置于恒温水浴箱预热至 37 ℃,取单侧附睾,去除脂肪,剪碎放入试管中,摇匀,37 ℃ 保温 10~15 min,使精子充分游离,接着取 1 滴滴入牛鲍氏血细胞计数板上,计算每 1 mL 精子数。用微量移液器吸取 10 μL 精子悬液,利用 SQIAS-2000 彩色精液质量图文分析仪进行精子活率测定。

2.4 小鼠睾丸组织形态学及超微结构观察 取单侧睾丸,石蜡切片(4 μm 厚),HE 染色,光镜观察睾丸组织内精原细胞与各级生精细胞的分布情况。环氧树脂包埋,做超微切片,透射电镜观察睾丸组织内曲细精管及各级生精细胞超微结构的变化。

2.5 小鼠睾丸内抗氧化指标的检测 取单侧睾丸组织用 4 ℃ 0.9% 的生理盐水在冰水浴中制成 5% 的组织匀浆,将匀浆 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清进行 SOD, GSH-Px, MDA 的测定。

2.6 统计学处理 数据资料用 $\bar{x} \pm s$, 应用 SPSS 13.0 for Windows 进行统计学处理,各组均数之间比较进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对模型小鼠脏器指数的影响 模型组小鼠睾丸质量显著低于假手术组,五子衍宗方各剂量均可增加生精障碍小鼠的睾丸质量,其中五子衍宗方低、高剂量对睾丸有显著的增重作用(表 1)。

3.2 对模型小鼠精子密度及精子活率的影响 模型组小鼠精子密度、精子活率显著低于假手术组。五子衍宗方低、高剂量均可显著提升生精障碍小鼠的精子密度和精子活率,且表现出剂量依赖关系。(表 2)。

表 1 五子衍宗方对模型小鼠睾丸质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重/g	睾丸质量/mg	睾丸指数/ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$
假手术	—	31.0 ± 1.41	230.4 ± 24.91	743.53 ± 114.09
模型	—	31.8 ± 2.29	$65.2 \pm 3.83^{2)}$	$210.75 \pm 24.28^{2)}$
五子衍宗方	100	30.4 ± 0.91	$76.8 \pm 6.81^{4)}$	$252.78 \pm 23.04^{3)}$
	200	30.9 ± 5.11	$82.1 \pm 6.27^{4)}$	$271.11 \pm 47.38^{3)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

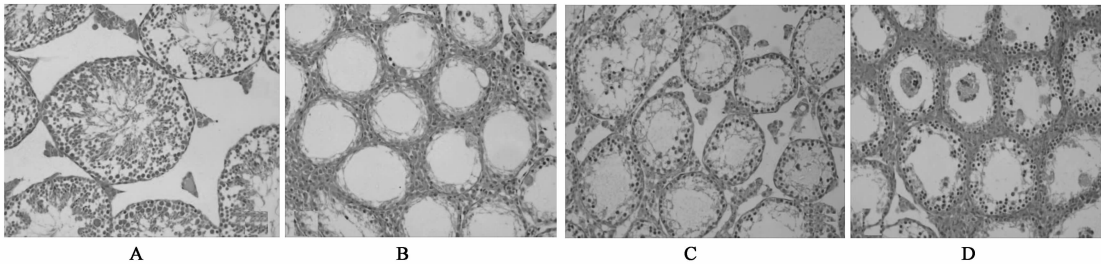
表 2 五子衍宗方对模型小鼠精子计数和活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	精子计数/ $\times 10^8 \cdot \text{L}^{-1}$	精子活率/%
假手术	—	32.30 ± 15.03	38.50 ± 10.85
模型	—	$0.13 \pm 0.14^{1)}$	$0.00 \pm 0.00^{2)}$
五子衍宗方	100	$1.83 \pm 0.89^{3)}$	$22.25 \pm 8.92^{4)}$
	200	$2.99 \pm 1.45^{3)}$	$30.00 \pm 11.58^{4)}$

3.3 对模型小鼠睾丸组织形态学的影响 光镜可见,阴囊睾丸中精子发生正常,曲细精管形态正常,隐睾手术 14 d 后,模型组生精细胞退化,生精上皮变薄,曲细精管中仅保留支持细胞及少量精原细胞,

几乎未见精母细胞。五子衍宗方低剂量给药 14 d 后,生精上皮结构基本完整,可见少量初级精母细胞。五子衍宗方高剂量给药 14 d 后,生精细胞的有序排列基本不变,可见圆形精子细胞。见图 1。

3.4 对模型小鼠睾丸组织超微结构的影响 电镜下可见,阴囊睾丸中可见形态正常的精子细胞,精子发生正常。模型组精原细胞胞核散开、染色变浅,曲细精管内出现很多脂滴,精母细胞不能进入分裂状态,生精受阻,未见精子细胞。五子衍宗方组可见精原细胞胞核染色变深,曲细精管内脂滴减少,并可见精子细胞。见图 2。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 五子衍宗方 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 五子衍宗方 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 五子衍宗方对模型小鼠睾丸组织形态学的影响(HE, $\times 200$)

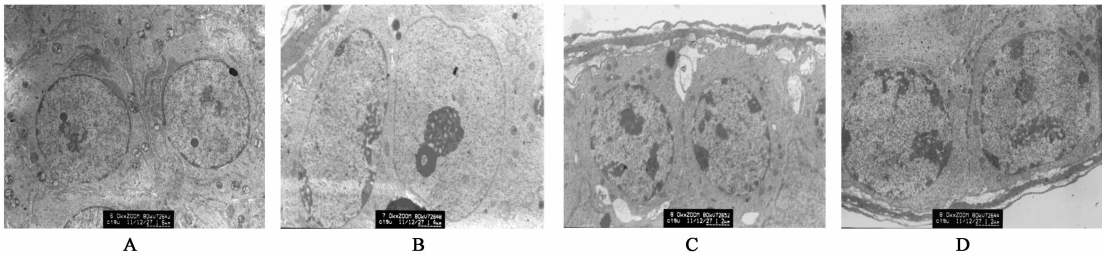


图 2 五子衍宗方对模型小鼠睾丸组织超微结构的影响(透射电镜,A. $\times 6\text{K}$; B. $\times 7\text{K}$; C,D. $\times 8\text{K}$)

3.5 对模型小鼠睾丸内 SOD,MDA,GSH-Px 的影响 与假手术组相比,模型组的 MDA 含量明显增高,SOD 和 GSH-Px 活性明显降低,而给药组能使 MDA 含量降低,SOD 和 GSH-Px 活性升高,从而表明五子衍宗方对损伤有保护作用。见表 3。

4 讨论

精子发生对温度变化非常敏感,多数哺乳动物睾丸的温度较腹腔温度低,精子生成的适宜温度为 35~36℃,隐睾侧睾丸处于 37℃ 体温下,在这种高温环境下精子的发生明显受到影响,睾丸维持低温

表 3 五子衍宗方对模型小鼠睾丸内 SOD,MDA,GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
假手术	—	60. 65 ± 4. 87	71. 08 ± 10. 01	0. 66 ± 0. 13
模型	—	38. 11 ± 3. 63 ²⁾	36. 64 ± 3. 64 ¹⁾	2. 63 ± 0. 46 ²⁾
五子衍宗方	100	59. 07 ± 8. 75 ⁴⁾	20. 73 ± 5. 26 ⁴⁾	2. 63 ± 0. 22
	200	53. 39 ± 8. 85 ³⁾	23. 10 ± 2. 90 ⁴⁾	1. 48 ± 0. 17 ⁴⁾

条件为睾丸的发育和功能提供了最适环境,男性隐睾症和实验诱发的动物隐睾中,生精细胞通过凋亡而丢失,导致雄性生殖力下降或不育^[8]。睾丸内温度升高造成大量氧自由基的形成,过量的氧自由基损伤生殖细胞,使生精阻滞在精原细胞,造成雄性不育。

中医药在提高男性的精液质量和生殖功能方面具有其独特的优势,可显著提高雄性不育大鼠的精液质量与生殖功能^[9],但目前有关中药对隐睾的生精保护作用还少有研究。五子衍宗方为临床治疗男性不育的常用方剂,我们前期研究显示,五子衍宗方具有增强体内抗氧化损伤能力,并可减轻环磷酰胺所致小鼠生精功能障碍^[10];本实验探讨了五子衍宗方对实验性隐睾小鼠生精功能的保护作用,研究发现,五子衍宗方能够增加模型小鼠的睾丸质量,增加精子密度,提高精子活率,改善隐睾小鼠睾丸组织的病理性变化,并可升高睾丸组织内 SOD,GSH-Px 的活性,降低 MDA 含量,从而减轻隐睾对睾丸生精功能的损害。

[参考文献]

[1] Thonneau P F, Gandia P, Mieusset R. Cryptorchidism: incidence, risk factors, and potential role of environment; an update [J]. J Androl, 2003, 24 (2): 155.

[2] Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of

quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50 (3 / 4): 719.

[3] Tasian G E, Zaid H, Cabana M D, et al. Proximal hypospadias and risk of acquired cryptorchidism [J]. J Urol, 2010, 184 (2): 715.

[4] Gregory E Tasian, Adam B Hittelman, Grace E Kim, et al. Age at orchiopexy and testis palpability predict germ and leydig cell loss: clinical predictors of adverse histological features of cryptorchidism [J]. J Urol, 2009, 182 : 704.

[5] 张慧珍, 张晓芬. 补肾活血法治疗男性弱少精子不育症 40 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (12): 296.

[6] 贾金铭, 马卫国. 中西医结合治疗男性不育症的思路 [J]. 中国男科学杂志, 2006, 20 (7): 1.

[7] 陈德宇, 刘丽敏, 谢庆东, 等. 抗精液抗体对精子线粒体功能的影响 [J]. 汕头大学医学院学报, 2008, 21 (1): 4.

[8] Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011, 25 (2): 271.

[9] 马亮, 刘华剑, 南亚昀, 等. 金匱肾气丸对腺嘌呤致不育大鼠精子质量与肾脏功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (8): 184.

[10] 张长城, 贾亮亮, 许佳, 等. 五子衍宗汤对环磷酰胺致小鼠生精障碍保护作用的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16 (7): 570.

[责任编辑 聂淑琴]