

促精汤对小鼠生精细胞凋亡的影响

喻国华¹, 赵智英², 项豪华¹, 陈霞云¹

(1. 江西中医药高等专科学校附属医院, 江西 抚州 344000; 2. 临川区人民医院, 江西 抚州 344000)

[摘要] **目的:**探讨促精汤对模型小鼠精液常规、性激素和精子凋亡的影响。**方法:**40只雄性小鼠用环磷酰胺 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 5 d 造少精、弱精症模型,并随机分为模型组、促精汤低、中、高剂量组,每组10只,另设空白对照组。造模后,空白组与模型组给予生理盐水($0.5 \text{ mL}/\text{只}$)灌胃;促精汤低、中、高剂量($10, 5, 2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,均持续30 d。采用CASA技术检测精子质量,采用酶联免疫法检测血清性激素,采用流式细胞仪检测精子凋亡率。**结果:**造模后模型组小鼠各级精子密度、活力和活率均明显减少($P < 0.05$);促精汤各剂量组明显提高小鼠精子密度、活力和活率($P < 0.05$),高剂量组已与空白组小鼠无显著性差异;造模后,血清黄体生成素(LH)、睾酮(T)、雌二醇(E_2)显著升高,促卵泡生成激素(FSH)、催乳素(PRL)无明显变化,促精汤各剂量组能明显降低LH, T, E_2 水平($P < 0.05$),其中高剂量组已与空白组无显著差异。造模后,模型组小鼠精子凋亡显著升高($P < 0.05$),促精汤各组均能降低小鼠生精细胞凋亡率,高剂量组最明显,已与空白组比较无明显差异。**结论:**促精汤可增加各级精子密度、增强精子活力和活率,可修复睾丸病理损伤,有降低睾丸生精细胞凋亡率的作用。

[关键词] 促精汤; 细胞凋亡; 生精细胞; 精子活力; 精子密度; 精子活率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0162-04

[doi] 10.11653/syjf2014030162

Effects of Cujing Tang on Apoptosis of Mouse Spermatogenic Cells

YU Guo-hua¹, ZHAO Zhi-ying², XIANG Hao-hua¹, CHEN Xia-yun¹

(1. The Affiliated Hospital of Jiangxi Traditional Chinese Medicine College, Fuzhou 344000, China;

2. Pepole's Hospital of Linchuan District, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of Cujing Tang (CJT) on mouse semen routine, sex hormone and sperm apoptosis. **Method:** Fourty mice were used to build oligozoospermia and asthenozoospermia model with cyclophosphamide (CTX) $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 5 days, and randomly divided into model group, CJT low dose treatment group, middle dose treatment group and high dose treatment group, with 10 rats in each group. In addition, a blank control group was set up. The blank control group and model group received 0.5 mL normal saline per mouse by gavage. After modeling, low, middle and high dose treatment group were given with $2.5, 5, 2.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ CJT by gavage for 30 days. The quality of mice sperm were detected by CASA, serum sex hormone was detected by ELISA and sperm apoptosis was detected by flow cytometry. **Result:** After modeling the sperm density, vitality and viability of model group were significantly reduced ($P < 0.05$). CJT could significantly improve mice sperm density, vitality and viability ($P < 0.05$), and high dose goup had no significant difference compared with blank group. follicle-stimulating hormone (FSH) and prolactin (PRL) had no significant difference in all groups. luteotropic hormone (LH), testosterone (T) and estradial (E_2) of model group were significantly higher than other groups ($P < 0.05$). The LH, T and E_2 were reduced in all CJT group, and

[收稿日期] 20130601(002)

[基金项目] 江西省卫生计生厅中医处课题(2012A003)

[第一作者] 喻国华, 硕士, 主治医师, 从事男性病工作, Tel:0794-8626054, E-mail:yu20042005@sohu.com

especially high dose group had no significant difference compared with blank group. Sperm apoptosis of model group was significantly higher than that of blank group ($P < 0.05$). The apoptosis rate were decreased in all CJT group, especially high dose group, which had no significant difference compared with blank group. **Conclusion:** CJT can increase sperm density, motility and viability, repara testicular pathological injury and decrease the apoptosis rate of testicular spermatogenic cell.

[**Key words**] Cujing Tang; cell apoptosis; spermatogenic cells; sperm density; sperm vitality

近年来,男性不育症的发病率呈全球性的增高趋势^[1]。男性不育症主要有生殖器官发育异常、性功能障碍及精液异常等三方面原因^[2],本研究主要针对精液异常所致不育症,通过环磷酰胺造模,观察促精汤在改善精子活力、活率,对性激素和精子凋亡的影响,为临床治疗少精弱精症提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 药物 促精汤:生黄芪 30 g,熟地黄、淮山药、肉苁蓉、党参各 15 g,菟丝子、紫河车、淫羊藿各 12 g,山茱萸、枸杞子、黄精、炒白术、川续断、仙茅、地龙、黄柏、炒韭菜籽、当归各 10 g,三七、甘草各 5 g。生药饮片均由江西中医药高等专科学校附属医院中药房提供。取以上药物 452 g,加 8 倍水,浸泡 1 h 后煮沸 30 min 后滤过,药渣再加 6 倍水煮沸 20 min 后滤过,然后合并滤液。浓缩成 100% 的水提物,分装灭菌,40 °C 冰箱储存备用。环磷酰胺 (CTX,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 12102623)。

1.2 动物 成年雄性健康小鼠 50 只,体重 18 ~ 20 g,均购于南昌大学医学院实验动物研究所,许可证号 SCXK(赣)2010-0021。

1.3 试剂 人血清白蛋白 (HSA,成都蓉生药业有限公司,批号 201221),ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司,批号 201219),AnnexinV/PI 细胞凋亡试剂盒 (Biovisio 公司,批号 201127),BWW 高蛋白获能液、孵育缓冲液和 PBS 液等均为自配。

1.4 仪器 HERMLE2360K 型台式离心机 (德国 Hermle 公司),DR-HW-1 型恒温孵育箱 (北京市医疗设备总厂),wL9000 型伟力精子分析仪 (伟力公司),FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 造模 将雄性小鼠 50 只,按数字法随机分为空白组、模型组、促精汤低、中、高 (2.5, 5, 10 g·kg⁻¹) 剂量组,每组 10 只,适应性驯养 5 d 后进行实验。除空白组外,其余 4 组于实验开始日以环磷酰胺 (60 mg·kg⁻¹) ip,1 次/d,连续 5 d。第 6 天起,空白组与模型组给予生理盐水 (10 mL·kg⁻¹) ig,持续

30 d;低、中、高剂量组小鼠分别给予促精汤 2.5, 5, 10 g·kg⁻¹ ig,给药体积 10 mL·kg⁻¹,持续 30 d,次日处死小鼠测定各项免疫指标。

2.2 小鼠精液常规的测定 精子于 37 °C 恒温孵育箱中孵育 30 min 后,小心吸取上层液体,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,沉淀物加入 1 mL BWW 高蛋白获能液,置于 37 °C 恒温孵育箱中获能 2 h,采用 CASA 技术检测大鼠精子质量。

2.3 对小鼠血清性激素的影响 采用酶联免疫夹心法检测小鼠血清中促卵泡生成激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、催乳素 (PRL) 的含量,竞争法定量检测小鼠血清睾酮 (T)、雌二醇 (E₂) 的含量。

2.4 对小鼠精子凋亡的影响 精子于 37 °C 恒温孵育箱中孵育 30 min 后,吸取上层液体,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,沉淀物加入 PBS 液洗涤、离心、去上清液,重复洗涤 2 次,用冷 PBS 液稀释精子悬液,取 1 × 10⁶ 个精子于试管中,加 PBS 液洗涤、离心,去上清液,重复洗涤 1 次,用孵育缓冲液 1 mL 重悬浮,取 100 μL 放入试管中,加入 FITC-AnnexinV 10 μL 和 PI 0.3 μg 染色,室温下避光静置 15 min 后加 400 μL 孵育缓冲液,采用流式细胞仪检测。

2.5 睾丸病理形态学检测 取精子后,快速取双侧睾丸,置于 10% 甲醛溶液中浸泡,常规制片,光镜观察生精细胞、生精周期、间质细胞等变化。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠精液常规的影响 造模后模型组小鼠精子密度、活率、活力和畸形率均明显减少,与空白组有明显差异 ($P < 0.01$);服用促精汤后,精子密度、活力有不同程度的改善,较模型组有明显升高 ($P < 0.05$),且促精汤高剂量组小鼠 a 级、a + b 级和精子总密度均有明显改善,与模型组有明显差异 ($P < 0.01$)。促精汤高剂量组小鼠精子活率、活力与空白组无显著性差异,而促精汤低、中剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对小鼠血清性激素的影响 模型组 LH, T, E₂ (P < 0.01), 其中高剂量组已与空白组相似, 各组 FSH, PLR 无明显差异。见表 2。

表 1 促精汤对小鼠精液常规的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	精子密度/×10 ⁶ /mL	精子总活率/%	精子活力 a 级/%	精子活力 (a + b) / %	精子畸形率/%
空白	-	5.32 ± 1.06 ²⁾	15.23 ± 1.03 ²⁾	0.38 ± 0.03 ²⁾	0.74 ± 0.13 ²⁾	0.46 ± 0.11
模型	-	1.54 ± 0.47	6.24 ± 0.16	0.14 ± 0.02	0.36 ± 0.08	0.29 ± 0.07
促精汤	2.5	2.12 ± 0.86 ¹⁾	8.45 ± 0.34 ¹⁾	0.19 ± 0.04 ¹⁾	0.47 ± 0.07 ¹⁾	0.32 ± 0.06 ¹⁾
	5	3.23 ± 0.68 ¹⁾	11.26 ± 0.57 ¹⁾	0.23 ± 0.03 ¹⁾	0.58 ± 0.11 ¹⁾	0.38 ± 0.05 ^{1,4)}
	10	4.82 ± 0.49 ²⁾	14.89 ± 1.58 ²⁾	0.37 ± 0.05 ²⁾	0.73 ± 0.15 ²⁾	0.45 ± 0.12 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表 2 同)。

表 2 促精汤对小鼠血清性激素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FSH/mU·mL ⁻¹	LH/U·mL ⁻¹	T/μg·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	PRL/U·mL ⁻¹
空白	-	17.89 ± 0.34	6.59 ± 0.92 ²⁾	15.37 ± 2.12 ²⁾	556.12 ± 41.23 ²⁾	40.15 ± 2.48
模型	-	16.65 ± 1.36	9.47 ± 0.91	23.45 ± 1.14	846.25 ± 102.27	38.27 ± 1.48
促精汤	2.5	16.98 ± 1.03	7.15 ± 0.32 ¹⁾	21.46 ± 0.49 ¹⁾	756.17 ± 112.37 ¹⁾	38.35 ± 2.06
	5	17.58 ± 1.58	7.11 ± 0.28 ¹⁾	16.07 ± 0.51 ¹⁾	679.26 ± 104.28 ¹⁾	39.26 ± 2.57
	10	17.76 ± 1.01	6.63 ± 0.16 ¹⁾	15.34 ± 1.94 ¹⁾	581.15 ± 24.16 ¹⁾	39.37 ± 3.98

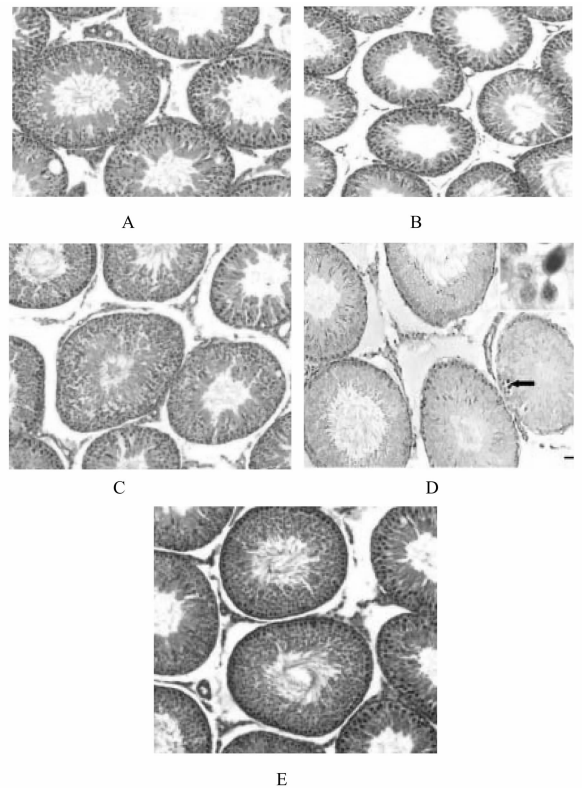
3.3 对小鼠精子凋亡的影响 模型组精子凋亡率显著高于空白组 (P < 0.01), 促精汤各剂量组精子凋亡率较均明显低于模型组 (P < 0.05), 其中高剂量组精子凋亡率已与空白组无明显差异。见表 3。

表 3 促精汤对小鼠精子凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
空白	-	8.67 ± 0.34 ²⁾
模型	-	15.16 ± 1.07
促精汤	2.5	14.24 ± 0.58 ¹⁾
	5	12.37 ± 0.39 ²⁾
	10	9.04 ± 0.14 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

3.4 睾丸病理形态学观察 空白组、促精汤高剂量组小鼠生精小管管腔饱满, 生精上皮外的界膜均匀、完整; 界膜、生精小管上皮没有明显改变, 可见不同发育阶段的生精细胞及成熟的精子; 空白组管腔内可见密度适当的精子, 睾丸间质细胞排列均匀, 疏松结缔组织中微血管丰富。但促精汤高剂量组部分生精小管可见支持细胞上生殖细胞脱落而呈空洞化。模型组、促精汤低、中剂量组均有各级生精细胞数量显著减少; 管腔面精子数量显著减少; 多数生精小管可见生精细胞脱落及排列紊乱; 睾丸间质细胞排列稀疏; 部分生精小管支持细胞变性。模型组、促精汤低剂量组可见变形、塌陷的生精小管数量增多; 界膜变薄, 部分脱落; 生精小管上皮变薄。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 促精汤 2.5 g·kg⁻¹ 组; D. 促精汤 5 g·kg⁻¹ 组; E. 促精汤 10 g·kg⁻¹ 组

图 1 促精汤对小鼠睾丸组织病理变化的影响 (HE, ×200)

4 讨论

男性不育症是临床常见的男科疾病, 少精弱精是引起男性不育的主要原因。中医认为少精弱精症

大多数是由肾虚所致,肾气虚损、肾精亏耗是导致少精弱精的主要病机^[3]。“肾为先天之本”,肾精(无形之精)是化生生殖之精(有形之精)的物质基础,肾精充足才能使精子保持正常的密度、活力、活率;脾为后天之本,气血生化之源,精血同源,脾旺则肾精得以生化之源,才能盈满,生殖之精也得以化生。脾肾相互促进,促使精子保持正常的密度、活力、活率^[4]。促精汤是笔者多年来的临床经验方,对少精弱精不育症有较好的疗效^[5]。促精汤具有温肾阳、补肾精的功效,体现“阳化气,阴成形”的理论^[6]。其中淫羊藿、仙茅、肉苁蓉、炒韭菜籽等温肾阳,山茱萸、枸杞子、黄精、熟地黄等补肾精,生黄芪、党参补肾气,山药、肉苁蓉、炒白术健脾益气,当归、三七、地龙活血祛瘀,生黄芪与当归益气养血,精血同源,血不养精也是男性不育的重要病机^[7]。黄柏、知母作为佐药,防温药太过,且有清下焦湿热作用。促精汤重在调节肾,而生殖之精来源于肾,从而调节肾-天癸-男子胞功能。全方温而不燥,补而不膩;气血双补,脾肾同治,精血双调^[8]。

CTX 是临床常用的免疫抑制剂和抗肿瘤药,是目前已明确可损害生精功能的化疗药之一。它不仅可杀伤分化中的精原细胞,导致长期无精或少精^[9]。本研究采用 CTX $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续 5 d ip 造模后。小鼠出现精神萎靡、嗜睡、活动减少、畏寒、体毛无光泽、稀疏、小便量多等类似于中医“肾虚”的症状和体征;精液分析显示,模型组小鼠精子活动率、活力、密度等均显著降低,睾丸形态学显示各级生精细胞数量显著减少,精子数量也减少,生精小管出现变形、塌陷等,生精细胞出现脱落、排列紊乱,睾丸间质细胞排列稀疏且有透明样变性,表明成功造出与中医“肾虚”证候表现相似的不育模型。

下丘脑-垂体-性腺轴类似于中医肾-天癸-男子胞,促精汤以补肾为主,推测促精汤能调节下丘脑-垂体-性腺轴功能。本实验已证实,CTX 可升高 LH, T, E₂ 水平,精子凋亡率明显增加,经促精汤治疗后,

精子密度、活力和活率等均有不同程度的改善, LH, T, E₂ 水平有明显下降,生精小管上皮致密、形态趋向完整,间质内毛细血管增多;生精细胞数量、精子数量增多;睾丸间质细胞无透明样变性;精子凋亡率明显降低,说明促精汤在促进睾丸组织形态学恢复、生精细胞发育及增加精子数量等方面发挥了重要作用。

综上所述,促精汤具有减轻睾丸细胞的损伤,下调下丘脑-垂体-性腺轴,降低血清 LH, T, E₂ 水平,从而促进精子生长,减少精子凋亡,增强精子活力和活率等作用。

[参考文献]

- [1] 吕逸清,陈斌,胡凯,等. 精子凋亡率与精子密度、活率、活力及活性氧关系探讨[J]. 中国男科学杂志, 2009, 23(2): 34.
- [2] 王鸿根,时萍,董加,等. 促育生精颗粒治疗男性少精弱精症 150 例[J]. 中医杂志, 2009, 50(2): 114.
- [3] 喻国华,刘建国,罗嫔. 胎盘多肽注射液联合促精汤治疗少精弱精症疗效观察[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(1): 39.
- [4] 宾彬,姚重华,王杰. 强精煎对模型小鼠睾丸生精细胞凋亡影响的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 91.
- [5] 喻国华. 自拟促精汤治疗脾肾虚型少精弱精症 122 例[J]. 中医杂志, 2011, 52(5): 419.
- [6] 徐金华,朱庆文,王甫. “填精助育汤”配合溴隐亭治疗激素异常致死精、少精不育症 80 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2011, 43(4): 40.
- [7] 喻国华,郑威,任毅. 喻文球治疗男性不育经验介绍[J]. 新中医, 2007, 39(7): 11.
- [8] 喻国华,刘建国. 胎盘多肽注射液联合促精汤改善精液质量的临床观察[J]. 新中医, 2008, 40(2): 22.
- [9] 岳丽琴,李旭良,魏光辉. 环磷酸胺对不同发育时期睾丸生精细胞毒性损伤的动物实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(1): 38.

[责任编辑 李玉洁]