

生脉注射液对青春前期大鼠睾丸扭转/
复位对健侧睾丸的远期影响

余益栋, 杨葵葵, 赵姝琪, 许琪琛, 阎俊文, 张高泽, 张金萍*
(绍兴文理学院医学院, 浙江 绍兴 312000)

[摘要] 目的:观察青春前期大鼠睾丸单侧扭转复位后对健侧睾丸的远期影响,并探究生脉注射液对其的保护作用。方法:5 周龄健康 SD 雄性大鼠 24 只,随机分为生脉注射液组(实验组),生理盐水组(对照组)和假手术组,每组 8 只,建立左侧睾丸扭转复位模型,术后 7 周取健侧睾丸及附睾,分别测定睾丸质量和附睾尾中精子活率,睾丸组织内超氧化物歧化酶(SOD),一氧化氮合酶(NOS)活性和丙二醛(MDA)含量。结果:与对照组比较,实验组和假手术组健侧睾丸质量与精子活率,睾丸组织中 SOD 活性显著升高($P<0.05$),NOS 活性和 MDA 含量显著下降($P<0.05$)。实验组与假手术组比较,健侧睾丸精子活率与睾丸质量下降,健侧睾丸组织中 SOD 活性降低,NOS 活性和 MDA 含量升高,但均无统计学意义。结论:青春前期大鼠单侧睾丸扭转复位后可致健侧睾丸损伤,生脉注射液对青春前期大鼠睾丸扭转复位后健侧睾丸损伤远期效果具有一定的保护作用。

[关键词] 生脉注射液;睾丸扭转;青春前期大鼠;健侧睾丸
[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)09-0259-04

Long-term Effects of Shengmai Injection on Contralateral Testis with
Unilateral Testicular Torsion/Detorsion in Prepubertal Rats

YU Yi-dong, YANG Kui-kui, ZHAO Shu-qi, XU Qi-chen, YAN Jun-wen, ZHANG Gao-ze, ZHANG Jin-ping*
(Shaoxing University Medical College, Shaoxing 312000, China)

[Abstract] Objective: To observe long-term effects of contralateral testis with unilateral testicular torsion/detorsion in prepubertal rats, and investigate the protective effect of Shengmai injection on it. Method: Twenty-four healthy male SD rats aged 5 weeks were equally randomized into a Shengmai injection group (experimental group), saline group (control group) and a sham operation group, 8 rats per group. The rats with testicular torsion were killed after 7 weeks of surgery and excised their right testes and epididymides immediately for the measurement of superoxide dismutase (SOD), nitric oxide synthase (NOS) activity and malondialdehyde (MDA) content in the testis, the weights of testis and the sperm motility in epididym. Result: Compared with the controls, the experimental group and the sham operation group exhibited a remarkable increase in the weights, the sperm motility, SOD activity ($P<0.05$) and an obvious decrease in NOS activity, MDA content ($P<0.05$). Compared with the sham operation group, the experimental group showed no significant changes in the sperm motility, the weights of testis, SOD, NOS activity and MDA content. Conclusion: The contralateral testis of prepubertal rats can be damage dafter unilateral testicular torsion/detorsion. Shengmai injection has the long-term protective effect role in prepubertal rat testicular injury after torsion/detorsion.

[Key words] Shengmai injection; testicular torsion; prepubertal rats; contralateral testis

[收稿日期] 20111202(010)
[基金项目] 2008年浙江省大学生科技创新计划项目(200810);绍兴文理学院医学院学生科研课题(201014);绍兴文理学院第一批优秀教学团队建设成果(20097)
[第一作者] 余益栋, Tel:15068527982
[通讯作者] * 张金萍, 教授, E-mail: pjzxuan@126.com

睾丸扭转是泌尿外科急症,25 岁以下青少年发病率为1/4 000^[1]。及时的手术复位可使睾丸组织重新获得血供,以免睾丸组织萎缩,大量实验研究表明扭转复位所致缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)^[2]可以加剧睾丸组织损伤,最终导致不育。生脉注射液是用红参、麦冬、五味子提取精制而成的复方制剂,有较强缓解氧自由基和抑制脂质过氧化物生成的能力。本实验通过建立青春前期大鼠单侧睾丸扭转/复位模型,探讨生脉注射液对大鼠睾丸单侧扭转复位后对健侧睾丸的远期影响,推测其成年后的生育功能,为临床上治疗睾丸扭转复位后生精功能低下提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 分组与模型建立 选择 5 周龄健康 SD 雄性大鼠 24 只(浙江大学动物实验中心,0013451),随机分为实验组、对照组和假手术组,每组 8 只,按组分笼饲养。Turner^[3]法建立睾丸扭转模型,10% 水合氯醛(50 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉。

实验组:将左侧阴囊切开,绕精索顺时针扭转睾丸 720°后,肉膜白膜缝合固定防止自发复位,阴囊缝合。2 h 后,第 2 次切开左侧阴囊,将扭转的睾丸复位固定,并于复位前 30 min,腹腔缓慢注入生脉注射液 50 mg·kg⁻¹,给药体积为 0.005 mL·g⁻¹体重。术后每天注射生脉注射液 1 次,连注 7 d。生脉注射液购自江苏苏中药业集团股份有限公司(每支 20 mL),批号 09081403。

对照组:方法同实验组。于复位前 30 min,腹腔缓慢注入等量生理盐水。术后每天注射等量的生理盐水 1 次,连注 7 d。

假手术组:将左侧阴囊切开游离睾丸,不予扭转。

1.2 睾丸质量和精子活率的测定 实验组、对照组和假手术组大鼠均于术后 7 周处死,取右侧睾丸,剔除睾丸附着筋膜,冷生理盐水洗净血污后滤纸拭干、称重。分离右侧附睾尾,用眼科剪剪碎后放入 2~10 mL 生理盐水,用 2 层擦镜纸过滤,制成精子悬液,37℃水浴箱中孵育 10 min,在高倍镜下计数约 200 个精子,计算精子活率。

1.3 睾丸匀浆和组织标本的制备 用电子天平称取睾丸组织约 0.15 g,加入 9 倍冷生理盐水,用眼科剪剪碎后转入组织匀浆器中,睾丸匀浆 3 000 r·min⁻¹离心 20 min,取上清液进行各项指标测定。

1.4 SOD, NOS 活性和 MDA 含量的测定 羟胺法测定睾丸组织中 SOD 活性;化学比色法测定 NOS

活性;TBA 法测定 MDA 含量。严格按试剂盒说明书进行操作(试剂盒购自南京建成生物医学工程研究所)。

1.5 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件分析,用单因素方差分析进行各组内数据的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。健侧睾丸组内、组间数据均使用 SPSS 12.0 统计软件中的 Tukey 检验进行方差分析。

2 结果

与对照组比较,实验组和假手术组健侧睾丸质量和精子活率显著升高($P < 0.05$),实验组与假手术组比较,精子活率与健侧睾丸质量下降,但均无统计学意义(表 1)。与对照组比较,实验组和假手术组睾丸组织中 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),NOS 和 MDA 含量显著下降($P < 0.05$)。实验组与假手术组比较,健侧睾丸组织中 SOD 活性降低,NOS 和 MDA 含量升高,但均无统计学意义(表 2)。

表 1 各组大鼠健侧睾丸质量和附睾尾精子活率的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	睾丸质量/g	精子活率/%
实验	1.97 ± 0.11 ¹⁾	68.13 ± 1.62 ¹⁾
对照	1.81 ± 0.05 ²⁾	34.34 ± 1.85 ²⁾
假手术	2.05 ± 0.10	75.02 ± 6.85

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与假手术组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 各组大鼠健侧睾丸组织 SOD, NOS 活性和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	SOD	NOS	MDA
	/U·mg ⁻¹	/mmol·g ⁻¹	/μmol·g ⁻¹
实验	122.89 ± 9.22 ¹⁾	1.44 ± 0.33 ¹⁾	1.80 ± 0.15 ¹⁾
对照	80.18 ± 6.40 ²⁾	3.01 ± 0.52 ²⁾	3.54 ± 0.22 ²⁾
假手术	145.91 ± 32.75	1.12 ± 0.03	1.52 ± 0.34

3 讨论

青春前期单侧睾丸扭转是否影响健侧睾丸成熟后生精功能尚未得到一致结果。通过对睾丸扭转患者健侧睾丸的研究发现,健侧睾丸生精细胞凋亡增加,尤以精母细胞和早期及后期精子细胞凋亡最明显^[4]。贾建华等^[5]通过监测健侧睾丸血流,发现单侧睾丸扭转后,健侧睾丸血管反射性地收缩,致血流速度相应减缓,造成组织缺血缺氧,而解除睾丸扭转可使健侧睾丸的血流急剧增加,继而造成健侧睾丸的局部缺血-再灌注损伤。由 IR 损伤的发生机制可知,在缺血组织恢复血供之后,大量氧分子产生的羟自由基和超氧阴离子等,超过了睾丸清除氧自由基

的能力,使生物膜上的不饱和脂肪酸受到攻击而引发脂质过氧化作用,造成大量脂质过氧化物 MDA 的堆积,最终导致细胞凋亡^[6]。

SOD 是反映氧化损伤的指标^[7-9],缺血再灌注大鼠睾丸中 SOD 活性明显低于正常大鼠,提示受缺血再灌注损伤组织抗活性氧攻击的能力降低,而 MDA 含量升高的程度进一步反应机体细胞受损伤的严重程度。此外,再灌注时过量的氧自由基与 NO 结合并使其失活,形成更具毒性的 ONOO-,而 ONOO-能降低精子活力,影响生殖功能;NO 还具有促进炎症递质聚集、过度扩张血管、诱导细胞凋亡等作用;同时,上述损伤超过了机体自身的抵抗能力,会激活更多的 NOS 致 NO 大量合成,形成恶性循环,造成更严重的组织损伤^[10-13]。

本实验结果显示,对照组健侧睾丸质量和精子活率,睾丸组织中 SOD 活性明显低于假手术组($P < 0.05$),NOS 活性和 MDA 含量明显高于假手术组($P < 0.05$),说明睾丸缺血再灌注后睾丸组织中大量活性氧聚集,细胞膜发生脂质过氧化作用,产生大量 MDA,所导致健侧睾丸损伤在其发育成熟后仍然存在,自然状态下,健侧睾丸缺血再灌注损伤难以恢复到正常生理状态,这与林涛等^[14]认为的未成熟睾丸血管壁发育不完全,不存在缺血再灌注损伤这一观点不符。实验组健侧睾丸质量和精子活率,睾丸组织中 SOD 活性明显高于对照组($P < 0.05$),而 NOS 活性、MDA 含量明显低于对照组($P < 0.05$),实验组与假手术组比较,实验组健侧精子活率,睾丸质量和睾丸组织中 SOD 活性降低,MDA 含量和 NOS 活性升高,但均无统计学意义,表明生脉注射液不仅可以提高睾丸组织抗氧化能力,清除过量氧自由基,还能抑制 NOS 的活性,抵抗 NO 的毒性作用,对青春前期大鼠睾丸缺血再灌注所致健侧睾丸远期损伤具有一定的保护作用。

综上所述,青春前期大鼠睾丸缺血再灌注所致健侧睾丸损伤在其发育成熟后仍然存在,自然状态下,健侧睾丸缺血再灌注损伤无法恢复到正常生理状态。生脉注射液具有较强的清除氧自由基和抗氧化作用,生脉注射液对青春前期大鼠睾丸扭转复位后健侧睾丸损伤远期效果具有一定的保护作用,但是否对大鼠生育能力有所影响尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kapoor S. Testicular torsion: a race against time[J]. Int J Clin Pract, 2008, 62 (5): 821.
- [2] 王洪华,马超龙,赵永平. 前列腺素 E₁ 对大鼠睾丸缺血再灌注后的影响[J]. 中华男科学杂志, 2007, 21 (5): 44.
- [3] Turner T T, Lysiak J J, Shannon J D, et al. Testicular torsion alters the presence of specific proteins in the mouse testis as well as the phosphorylation status of specific proteins[J]. J Androl, 2006, 27 (2): 285.
- [4] 桂西青,黄建平,韩从辉,等. β -七叶皂苷钠对睾丸扭转/复位后生精细胞凋亡的影响[J]. 中国医师杂志, 2005, 7(1): 33.
- [5] 贾建华,关有良,张春阳. 厄多斯坦对大鼠单侧睾丸扭转后双侧睾丸生精功能的保护作用[J]. 解剖科学进展, 2010, 16(5): 445.
- [6] 刘子明,郑新民. 单侧睾丸扭转后生精细胞凋亡的分子途径[J]. 中华男科学杂志, 2009(2): 144.
- [7] 李红月,陈超. 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (1): 117.
- [8] 王君明,崔英,王峥涛,等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (7): 265.
- [9] 叶锦霞,梁日欣,王岚. 氧化应激与心血管疾病的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14 (10): 68.
- [10] 蒋玉清,李文平,左岩. 黄芪注射液对大鼠扭转复位后睾丸组织的保护作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2010, 16(4): 445.
- [11] 姚启盛,叶章群,王晓康,等. 一氧化氮在一侧睾丸扭转对侧睾丸损伤中的作用[J]. 中华男科学杂志, 2004, 18(2): 26.
- [12] 蒋红梅,逯惠敏,刘莲. 复方丹参注射液抗睾丸缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (1): 85.
- [13] 许成勇,黄泉智,王发渭. 中药复方对拟血管性痴呆模型损伤级联反应影响的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 259.
- [14] 林涛,李旭良,王莽,等. 未成熟睾丸单侧扭转后对健侧血流供应影响的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(11): 74.

[责任编辑 邹晓翠]

白藜芦醇联合姜黄素对 SMMC-7721 肝癌细胞作用

杜琴,胡兵*,沈克平,邓珊
(上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科中医肿瘤研究所,上海 200032)

[摘要] 目的:观察白藜芦醇联合姜黄素对体外人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖和凋亡的影响及相关信号通路。方法:不同浓度白藜芦醇、姜黄素及两药联合干预 SMMC-7721 细胞,MTT 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡、Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡形态变化,比色法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3,caspase-8,caspase-9 酶活性,Western blot 法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶切割底物(PARP)。结果:与对照组相比,白藜芦醇、姜黄素单独或联合作用 SMMC-7721 细胞均可抑制 SMMC-7721 细胞增殖,两药联合后抑制作用更显著。白藜芦醇、姜黄素联合较单独用药可增强 SMMC-7721 细胞凋亡,呈现凋亡形态改变,白藜芦醇、姜黄素及联合组细胞凋亡率分别为(17.39±1.41)%,(14.96±2.23)%,(25.36±2.68)%;同时提高 SMMC-7721 细胞 caspase-3,caspase-8 及 caspase-9 活性,促使 PARP 蛋白剪辑。结论:白藜芦醇、姜黄素联合使用可增强对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抗癌作用,并可能与 caspase-8,caspase-9/caspase-3/PARP 信号通路介导细胞凋亡相关。

[关键词] 肝癌;白藜芦醇;姜黄素;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;切割底物

[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)09-0262-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120224.1734.005 [网络出版时间] 2012-02-24 17:34

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120224.1734.005.html>

Combination of Resveratrol and Curcumin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Hepatocarcinoma SMMC-7721 Cells

DU Qin , HU Bing* , SHEN Ke-ping , DENG Shan
(Department of Oncology, Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM) in Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

[Abstract] Objective: To observe the combinational effects of resveratrol and curcumin on cell proliferation, apoptosis and the possible mechanisms in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells *in vitro*. Method: SMMC-7721 cells were treated with resveratrol or curcumin or both. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, apoptotic morphology was visualized by hoechst 33258 staining. Caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities were detected by colorimetric assay, and cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) was detected by Western blot. Result: Compared with the control, resveratrol and curcumin significantly inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells. The combination of resveratrol and curcumin was found to be more effective in inhibiting growth ($P < 0.01$), and inducing apoptosis in SMMC-7721 as indicated by apoptotic morphological change and PI/Annexin V-FITC staining. The apoptosis rate of resveratrol, curcumin and combination group was (17.39±1.41)%, (14.96±2.23)%, and (25.36±2.68)% respectively. In addition, caspase-3, caspase-8 and caspase-9 were significantly activated by combinational treatment of resveratrol and curcumin, accompanied by increased PARP cleavage, and compared with either agent

[收稿日期] 20111031(009)

[基金项目] 上海市基础研究重点项目(09JC1413600);龙华医院国家中医临床研究基地“龙医团队、龙医学者”项目(LYTD-04)

[第一作者] 杜琴,硕士,从事中西医结合肿瘤基础与临床研究,Tel:021-64385700,E-mail:lsduqin123@126.com

[通讯作者] *胡兵,博士,副研究员,硕士生导师,从事肿瘤生物学、功能基因组与抗癌中药作用及配伍研究,Tel:021-64385700,E-mail:beearhu@hotmail.com