

二紫胶囊对生精障碍大鼠凋亡调控基因的影响

李晖*

(河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] 目的:观察二紫胶囊对生精障碍大鼠凋亡调控基因的影响。方法:将 40 只健康雄性大鼠分为模型组、对照组、二紫胶囊高、低剂量组,以环磷酰胺注射液 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip 制造大鼠生精障碍模型,分别 ig 生理盐水、二紫胶囊浸膏 ($4.8, 2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 连续 60 d, 用 TUNEL 法检测大鼠睾丸生精细胞凋亡, 免疫组化法测定 Bax 和 Bcl-2 蛋白在大鼠睾丸组织中的表达。结果:与模型组相比较,二紫胶囊高、低剂量组生精细胞凋亡指数明显下调 [$(7.16 \pm 1.47)\%$, $(13.83 \pm 2.40)\%$ vs $(20.50 \pm 2.17)\%$], Bax 蛋白表达明显下调 [(16.01 ± 2.02) , (26.67 ± 1.79) vs (9.94 ± 1.14)] ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达明显上调 [(40.12 ± 3.06) , (22.87 ± 2.94) vs (16.26 ± 1.03)] ($P < 0.01$)。结论:二紫胶囊能通过下调 Bax 和上调 Bcl-2 表达,减少生精细胞凋亡的发生。

[关键词] 二紫胶囊; 生精障碍; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0226-03

Effect of Erzi Capsule on Apoptosis Genes in Rat with Spermatogenic Failure

LI Hui*

(Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[收稿日期] 20120426(316)

[通讯作者] *李晖, 主治医师, 硕士, 从事中医生殖医学研究, Tel:0371-60979825, E-mail:Leehui.2005@yahoo.com.cn

S 期和 G₂/M 期移行。关于其作用机制, 经槲皮素处理 48 h 后的肝癌 SMMC-7721 细胞, 抑癌基因 PTEN 的表达随着浓度的增高逐渐增多, 使 PIP3 的水平逐渐降低, 从而下调 PI3K/AKT 通路, 增强凋亡因子与降低抗凋亡蛋白的活性, 促进了肝癌细胞的凋亡。随着药物浓度的增高, 引发了一系列级联反应, 激活了 Caspase-9, 进一步促进了 SMMC-7721 细胞凋亡进程。

综上所述, 槲皮素通过 PI3K/AKT 信号通路的表达可能是诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的机制之一。

[参考文献]

- [1] 叶丽红, 赵冬耕, 俞晶华, 等. 抗癌扶正方对 HAC 移植性肝癌的抑制作用及形态影响[J]. 中医药信息, 2010, 27(1): 52.
- [2] 叶丽红, 皮文霞, 程海波, 等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 的 Bcl-2 基因表达的调控作用[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 372.
- [3] 叶丽红, 皮文霞, 程海波, 等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 的 p53 基因表达的调控作用[J]. 辽宁

中医杂志, 2010, 37(11): 2215.

- [4] 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 306.
- [5] Maehama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate [J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13375.
- [6] Mayo L D, Donner D B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor network[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(9): 462.
- [7] 陈培, 张钦宪. PTEN-PI3K/AKT 细胞信号转导通路与肿瘤[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(6): 484.
- [8] Sharrard R M, Norman J M. Regulation of protein kinase B activity by PTEN and SHIP2 in human prostate-derived cell lines[J]. Cell Signal, 2007, 19(1): 129.
- [9] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. 癌症, 2008, 27(3): 331.
- [10] 吴日平, 黄昌明. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤关系的研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(10): 1501.

[责任编辑 何伟]

[Abstract] Objective: To investigate effects of Erzi Capsule (EZC) on apoptosis genes in rats with spermatogenic failure and to explore the related mechanism of action for treatment of male infertility. **Method:** Forty male rats were randomly divided into 4 groups: model group, control group and two EZC dose groups (4.8, 2.4 g · kg⁻¹). The rat model of spermatogenic failure was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (40 mg · kg⁻¹). The treatments were lasted for 60 days. TUNEL method was used to determine apoptosis in spermatogenic cells. Bax and Bcl-2 expressions in testis were tested by immunohistochemical method. **Result:** Compared with the model group, two doses of EZC group decreased apoptosis index [(7.16 ± 1.47)%, (13.83 ± 2.40)% vs (20.50 ± 2.17)%], lowered Bax expression [(16.01 ± 2.02), (26.67 ± 1.79) vs (9.94 ± 1.14)] and increased Bcl-2 expression [(40.12 ± 3.06), (22.87 ± 2.94) vs (16.26 ± 1.03)] significantly (*P* < 0.01). **Conclusion:** EZC could downregulate the expression of Bax and upregulation Bcl-2 expression, reduce the incidence of apoptosis in spermatogenic cells.

[Key words] Erzi Capsule; spermatogenic failure; cell apoptosis

不育症是临床上的常见病、多发病。在各种原因导致的不孕不育中约有 15% ~ 20% 是由精子异常引起^[1]。睾丸生精细胞凋亡发生紊乱,是导致精子异常的因素之一,可能是引起男性不育的重要原因^[2]。二紫胶囊是著名妇科专家褚玉霞教授总结的经验方,前期临床研究发现该方具有提高精子质量,提高受孕率的作用。本研究通过腹腔注射环磷酰胺致小鼠生精障碍模型,观察二紫胶囊对生精细胞凋亡指数和凋亡调控基因 Bax, Bcl-2 的影响,探讨其疗效作用机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重(250 ± 20)g。由郑州大学实验动物中心提供。合格证号河南省实验动物管委会医动字第 4104041 号。

1.2 药品及试剂 二紫胶囊浸膏(由河南省中医院制剂室提供,主要药物:紫河车 180 g,紫石英 180 g,菟丝子 180 g,淫羊藿 180 g,熟地黄 120 g,枸杞子 120 g,香附 90 g,丹参 180 g,川牛膝 90 g 等,部分药物进行提纯,粉碎研末,含生药 2.2 g · g⁻¹)。0.9% 氯化钠注射液(郑州永和制药有限公司),原位细胞凋亡检测试剂盒(In Situ Cell Apoptosis Detection Kit I, POD,华美生物公司)。抗 Bax 抗体、抗 Bcl-2 抗体(为兔 IgG 多抗)(武汉博士德公司)。

1.3 仪器 SM-2000R 石蜡切片机、摄影显微镜(德国 Leica 公司), Ahbt-5B 光学显微镜(Olympus), Toollab vl. 11 图像分析系统(德国 Leica 公司), IMS 图像分析系统(上海申腾信息技术有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立^[3] 大鼠 30 只,以环磷酰胺 40 mg · kg⁻¹, ip, 1 次/d, 5 次即可成模。

2.2 分组及给药 造模成功的大鼠随机分为 3 组,每组 10 只,另设模型组(生理盐水)、二紫胶囊浸膏高、低剂量组(4.8, 2.4 g · kg⁻¹, 相当于成人用量 20, 10 倍)。各治疗组均于造模结束后开始 ig, 另设 1 次/d, 60 d 处死动物,进行指标的检测。

2.3 睾丸组织标本的制备 给药 60 d 后,颈椎脱臼法处死大鼠,取左侧睾丸,置 Bouin 液中固定,24 h 内取出,脱水、包埋、制片后备用。

2.4 指标测定

2.4.1 细胞凋亡检测 用 TUNEL 法检测,按试剂盒说明书步骤进行。光镜下观察凋亡细胞并计数。每组 6 只,每张切片选 5 个高倍视野(×400),计数正常细胞和凋亡细胞,并求出凋亡指数。

2.4.2 睾丸组织 Bax, Bcl-2 蛋白表达的检测 用免疫组化 SP 染色法,严格按照试剂盒操作步骤进行。镜下细胞质与细胞核呈棕黄色为 Bax 或 Bcl-2 阳性染色,每只大鼠观察 5 张切片,在图像分析系统上随机选取 5 个高倍视野(×400),测定吸光度(A),每片测量后取 5 个视野的平均值。

2.5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用单因素方差分析,两两比较用 *Q* 检验,同组治疗前后比较用配对 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对生精细胞凋亡指数的影响 细胞核中显棕黄色阳性颗粒者为凋亡细胞。正常组未见凋亡细胞;模型组大鼠生精细胞核内可见到较多棕黄色核染,且细胞核皱缩不规则,显示出较多凋亡细胞的特征,凋亡细胞以初级精母细胞为主。二紫胶囊高、低剂量组细胞凋亡有不同程度的下降,与模型组比较有统计学意义(*P* < 0.01),量效关系明显。见表 1。

表 1 二紫胶囊对生精细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡指数/%
正常	-	0
模型	-	20.50 ± 2.17
二紫胶囊	4.8	7.16 ± 1.47 ¹⁾
	2.4	13.83 ± 2.40 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对睾丸组织 Bax, Bcl-2 蛋白阳性表达的影响

与正常组相比,模型组 Bax 蛋白阳性表达升高, Bcl-2 蛋白表达下降 ($P < 0.01$);二紫胶囊高、低剂量组 Bax 蛋白表达明显下调 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$),且呈量效关系。见表 2。

表 2 二紫胶囊对睾丸组织 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax	Bcl-2
正常	-	9.94 ± 1.14	16.26 ± 1.03
模型	-	35.65 ± 4.26 ¹⁾	9.21 ± 1.56 ¹⁾
二紫胶囊	4.8	16.01 ± 2.02 ^{1,2)}	40.12 ± 3.06 ^{1,2)}
	2.4	26.67 ± 1.79 ^{1,2)}	22.87 ± 2.94 ^{1,2)}

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

细胞凋亡是一种基因调控的自主有序的死亡过程。在生理状态下,细胞凋亡参与体内正常细胞的更新和异常细胞的清除,对维持个体正常的生理过程和功能表达具有重要的生物学意义。生精细胞凋亡现象在生育和不育男性均可见到,但不育男性生精细胞发生凋亡的比率远远高于生育男性。这一过程的紊乱与多种疾病的发生密切相关,是引起男性不育的重要原因^[4]。

睾丸生殖细胞的凋亡同细胞的增殖分化一样受多种基因控制,凋亡刺激性基因和凋亡抑制性基因二者相互影响制约,维持着动态平衡,共同调控着生精细胞的凋亡。Bcl-2 是抑凋亡基因, Bax 是促凋亡基因。已知当 Bcl-2 蛋白在细胞中过量表达时,与所有 Bax 结合,细胞成活,凋亡抑制;当 Bax 过量存在,与 Bcl-2 形成异源二聚体,则细胞凋亡^[5-6]。

二紫胶囊是褚玉霞教授在长期临床实践的基础上,针对肾精亏虚、瘀血内停的病机,以滋肾补肾、理气化瘀为治则组方而成。临床研究表明,二紫胶囊对少、弱精症具有较好的临床疗效,可提高患者的精子质量和数量,与西药相比无明显的副作用。褚教授认为不育症是由于机体阴阳失调、气血失衡所致,病因之本在肾,血瘀为标,最终导致精血凝聚、瘀血内阻,冲任不能相资,引起不育,故肾虚血瘀是不育症的主要发病机制,补益肾气、活血化瘀是该病基本的治疗方法。以其法组方的二紫胶囊中紫河车可补肝肾、益精血,又可补阳益气;紫石英温肾助阳,二药合用补督脉、温肾阳,填精益髓,共为君药。菟丝子、枸杞子、熟地黄、淫羊藿、补益肝肾、生精补髓共为臣药。丹参、香附活血疏肝,砂仁行气健脾为佐。川牛膝引血下行为使。纵观全方,诸药共奏滋肾补肾、疏肝行气之功。

本研究表明,二紫胶囊可使生精障碍大鼠生精细胞凋亡指数下降,二紫胶囊高、低剂量组凋亡调控基因 Bax 蛋白表达明显下调 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。证实了二紫胶囊能通过对凋亡调控基因 Bax 和 Bcl-2 水平的调节抑制生殖细胞凋亡的发生,这可能是二紫胶囊有效治疗不育症的机制之一。

[参考文献]

- [1] 张挺. 中西医结合治疗精液不液化症 28 例[J]. 陕西中医, 2003, 19(2): 35.
- [2] Said T M, Paasch U, Glander H J, et al. Role of caspases in male infertility [J]. Hum Reprod update, 2004, 10(1): 39.
- [3] 陈守真, 靳儒. 冬虫夏草对抗环磷酰胺致小鼠生精障碍的作用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(11): 93, 98.
- [4] Yen P. The fragility [J]. Nat Genet, 2001, 29: 243.
- [5] 曹兴午, 李翠英, 袁长巍. 睾丸生精细胞凋亡的基因调控[J]. 中国性医学, 2011, 20(2): 52.
- [6] Furuchi T, Masukok, Nishimune, et al. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpression Bcl-2 in spermatogonia [J]. Development, 1996, 122: 1703.

[责任编辑 何伟]