

枸杞、黄芪对大鼠睾丸支持细胞抑制素合成的影响

赵龙坡, 徐 铮, 张 文, 孙辉臣*, 汤 菲
(白求恩国际和平医院, 河北 石家庄 050082)

[摘要] 目的: 探讨中药枸杞、黄芪对大鼠睾丸支持细胞功能的作用及机制。方法: 对 18~ 22 d 的大鼠睾丸支持细胞进行分离培养, 用 MTT 法检测枸杞、黄芪对支持细胞增殖的影响, 用免疫组化方法检测枸杞、黄芪对正常状态和过氧化物(H_2O_2) 损伤状态下支持细胞抑制素 βB 亚基 (INH βB) 合成的影响。结果: 枸杞、黄芪及杞芪合剂对支持细胞的增殖有促进作用; 在正常培养状态下, 枸杞、黄芪及杞芪合剂对支持细胞 INH βB 合成具有促进作用; 在过氧化物(H_2O_2) 损伤状态下, 枸杞、黄芪及杞芪合剂对支持细胞 INH βB 合成具有保护作用。结论: 枸杞、黄芪及杞芪合剂对体外培养的支持细胞抑制素 βB 亚基合成具有促进和保护作用。

[关键词] 枸杞; 黄芪; 支持细胞; 抑制素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0058-04

The Effect of Fructus Lycii and Radix Astragali on Synthesis of Inhibin in Sertoli Cells of Rat Testis

ZHAO Long-po, XU Zheng, ZHANG Wen, SUN Hui-chen*, TANG Fei
(Bethune International Peace Hospital, Hebei Shijiazhuang 050082, China)

[Abstract] **Objective:** To establish in vitro culture of rat Sertoli cells and to investigate the effects of Chinese herbal medicines to their functions and the mechanism. **Methods:** Sertoli cells aged 18~ 22 days were separated and cultured from rat testis; the effect of Fructus Lycii, Radix Astragali and the combined administration of the two medicines on the proliferation of Sertoli cells in vitro were detected by means of MTT assay; the effect of Fructus Lycii, Radix Astragali and the combined administration of the two medicines on the level of INH βB in Sertoli cells in vitro were investigated in both normal environment and peroxide-damaging environment by means of immunohistochemistry. **Results:** The proliferation of Sertoli cells in vitro was promoted when treated with Fructus Lycii, Radix Astragali and the combined administration of the two medicines; Sertoli cells INH βB was up regulated by Fructus Lycii, Radix Astragali and the combined administration of the two medicines in vitro; Fructus Lycii and Radix Astragali were found to have protective effect on synthesis of INH βB in Sertoli cells with injury induced by peroxide (H_2O_2). **Conclusion:** The function of promotion and protection were found when Sertoli cells cultured in vitro treated with Fructus Lycii, Radix Astragali and the combined administration of the two medicines.

[Key words] Fructus Lycii; Radix Astragali; Sertoli cells; Inhibin

支持细胞(Sertoli 细胞)是睾丸中营养生精细胞并参与生精过程调控的一种细胞,其分泌的抑制素

(INH)释放入血。INH是由 α 和 β 亚基通过二硫键构成的异质二聚体,由于 β 亚基有 βA 、 βB 两种,所以INH有两种形式:INH A($\alpha\beta A$)和INH B($\alpha\beta B$)。在成年雄性体内INH的主要形式为INH B。近年来INH B在生精功能上的研究越来越引起人们的关注,而

[收稿日期] 2006-07-14

[通讯作者] * 孙辉臣, Tel: (0311) 87978567; E-mail:

wangmin5701@tom.com

Sertoli 细胞作为 INH B 合成、分泌的主要来源,也成为生殖学研究的一个新亮点。我们将常用于补肾益气、促进睾丸功能的枸杞、黄芪作用于正常培养及过氧化物(H_2O_2)损伤的 Sertoli 细胞,以 Sertoli 细胞所分泌的 INH β B 亚基 (INH β B) 为主要研究参数,来探讨枸杞、黄芪及二者联合使用(组成杞芪合剂)对 Sertoli 细胞功能的影响,为深入研究 Sertoli 细胞的功能及精子发生的调控提供实验资料。

1 材料

1.1 动物 鼠龄 18~22 日的 SD 雄性大鼠(以睾丸未降出腹腔为准),河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂 胰蛋白酶与胶原酶 IV: Gibco 公司产品;枸杞多糖:由宁夏启元药业惠赠,为棕黑色水溶性产品,纯度 $\geq 59\%$;黄芪注射液:成都地奥九泓制药厂,批号:0501042,每毫升相当于原药材 2 g; H_2O_2 :天津恒兴化学试剂公司产品,浓度为 30%;抗 Fas-L 抗体:武汉博士德公司产品;抗 INH β B 抗体:美国 Serotec 公司产品。

2 方法

2.1 Sertoli 细胞分离及培养方法 SD 大鼠乙醚吸入麻醉,仰卧固定于操作台上,75%酒精消毒,开腹,于附睾尾部附着处剪断部分睾丸被膜,将睾丸组织剥离出被膜,置于盛有生理盐水的培养皿中,移入超净工作台,去除血管,反复冲洗。用生理盐水将胰蛋白酶稀释为 0.05% 的浓度,将睾丸组织置于其中约 10~20 min 以消化去除间质细胞及类肌细胞等杂细胞,其间用眼科镊子反复拨动睾丸组织以使其充分散开,用滴管反复吹打睾丸组织,以利于更好地去除杂细胞,小牛血清终止消化,800 r/min 离心(5 min \times 2 次)去除胰酶。0.1% IV 型胶原酶 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 条件下消化 30~60 min 直至残存的睾丸组织变为溶液状,经高压灭菌过的 100 目钢网过滤以去除胶原组织,加入 DMEM/F12 培养液调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,将细胞植入 24 孔培养板中,在 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 培养箱中培养。48 h 后全量更换培养液。当细胞生长至 50% 以上融合时,用 0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 以 1:2(V/V) 消化传代培养。

2.2 大鼠 Sertoli 细胞鉴定及纯度测定 取第三代细胞,植入已预置小盖玻片的 24 孔培养板中,置于 CO_2 培养箱中在 37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 条件下进行培养。在盖玻片上的细胞达 50% 融合时,取出小盖玻片用预

冷(4 $^{\circ}C$)的 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 2 次晾干后丙酮固定 20 min,吹干。进行常规 HE 染色和抗 Fas-L 抗体免疫组化染色,光镜下观察 Sertoli 细胞染色情况。

2.3 枸杞、黄芪对大鼠 Sertoli 细胞增殖的影响 取指数生长期的大鼠睾丸 Sertoli 细胞经 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 按 1:2(V/V) 消化后用 DMEM/F12 培养液制成 1×10^5 /mL 的细胞悬液并以每孔 200 μ L 等量种植于 96 孔培养板中,然后放入 CO_2 培养箱中进行培养,待 24 h 细胞牢固贴壁后吸去上清液,将细胞分为枸杞(F)、黄芪(R)、杞芪合剂(F+R)组(每组药物又以不同浓度分为 4 小组)和对照组共 13 小组,每小组 4 孔细胞,枸杞组加入终浓度分别为 50、100、200、400 μ g/mL 的枸杞多糖,黄芪组加入终浓度分别为 12.5、25、50、100 mg/mL 的黄芪提取液,杞芪合剂组加入与上述枸杞、黄芪相对应的枸杞与黄芪,终浓度分别为枸杞 50 μ g/mL+黄芪 12.5 mg/mL,枸杞 100 μ g/mL+黄芪 25 mg/mL,枸杞 200 μ g/mL+黄芪 50 mg/mL,枸杞 400 μ g/mL+黄芪 100 mg/mL,以上均用 DMEM/F12 培养液配制,对照组加入正常的 DMEM/F12 培养液,每孔细胞所加的液体量均为 200 μ L,然后将细胞放入 CO_2 培养箱中在 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 条件下培养 24 h 后取出,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 10 μ L,室温避光振荡 10 min,待结晶完全溶解后,在酶标仪上读取每孔 570 nm 处的 OD 值。

2.4 枸杞、黄芪对正常培养的大鼠睾丸 Sertoli 细胞 INH β B 合成的影响 大鼠睾丸 Sertoli 细胞制成 1×10^5 /mL 的细胞悬液(同上),并以 1 mL/孔等量种植于已事先预置好无菌小盖片的 24 孔培养板中,置于 CO_2 培养箱中培养 24 h 后吸去上清液,将细胞分为枸杞(F)、杞芪合剂(F+R)、黄芪(R)、与对照 4 组,枸杞组加入终浓度为 400 μ g/mL 的枸杞多糖,杞芪合剂组加入终浓度为 400 μ g/mL 的枸杞多糖与 100 mg/mL 的黄芪组成的杞芪合剂,黄芪组加入终浓度为 100 mg/mL 的黄芪溶液,对照组加入 DMEM/F12 培养液,4 组均为每孔加 1 mL,轻轻振荡混匀后放入 CO_2 培养箱,在 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 条件下培养 24 h 后取出培养板,吸尽上清液,用生理盐水冲洗后取出小盖片,晾干后用冷丙酮固定,最后进行 INH β B 的免疫组化染色。

2.5 枸杞、黄芪对过氧化物损伤的大鼠 Sertoli 细胞 INH β B 合成的影响 同上制备的 1×10^5 /mL 的 Sertoli 细胞悬液,以 1 mL/孔等量种植于已事先预置

好无菌小盖片的 24 孔培养板中,置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后吸去上清液,将细胞分为枸杞(F)、杞芪合剂(F+R)、黄芪(R)、H₂O₂ 对照与正常 5 组,前 3 给药组剂量与前一试验同,对照组与正常组加入 DMEM/F12 培养液,5 组均为每孔加 1 mL,然后向枸杞组、杞芪合剂组、黄芪组、对照组 4 组各加入浓度为 100 mmol/L 的 H₂O₂ 水溶液 15 μL/孔,轻轻振荡混匀后细胞培养及处理同前一试验。

2.6 免疫组织化学染色步骤及结果判断 免疫组化染色步骤按说明书进行操作,在细胞爬片中加入一抗、二抗孵育后用联苯二胺(DAB)显色,苏木精复染。阴性对照以磷酸盐缓冲液代替一抗。结果判断:以 Sertoli 细胞胞膜和胞浆出现棕黄色颗粒为阳性着色。阴性对照除细胞核染成蓝色外,其它部位无棕黄色着色。采用 HPIAS-1000 彩色病理图文分析系统测定 INHβB 表达的平均光密度。

2.7 统计学分析 采用 Excel 2000 处理实验数据,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS10.0 软件进行成组设计的 *t* 检验或 *t'* 检验。

3 结果

3.1 Sertoli 细胞体外培养的形态学观察及鉴定 在倒置显微镜下可见,新制备的 Sertoli 细胞悬液经台盼蓝计数活细胞数占细胞总数的 95% 以上,培养 24 小时后可见有多个突起,胞体呈长柱状贴壁生长细胞,即为 Sertoli 细胞。另外可见少量睾丸间质细胞及成纤维细胞并可见少量未贴壁悬浮细胞。培养 48 小时后, Sertoli 细胞相互连接成网状,胞体增大,细胞核位于胞体中央及边缘,清晰可见,其间有少量成纤维细胞。经 HE 染色后在光镜下可见 Sertoli 细胞胞体为宽大的柱状或不规则状,有多个粗大的突起,细胞核呈卵圆或不规则形,胞质内可见吞噬物及小空泡。经 Fas-L 免疫组化染色后在普通光学显微镜下可观察到: Sertoli 细胞胞浆及胞膜呈棕黄色着色,为 Fas-L 阳性表达,而成纤维细胞、睾丸间质细胞均无 Fas-L 表达。经计数,阳性着色的细胞数量占细胞总数的 90% 以上。

3.2 枸杞、黄芪对大鼠睾丸 Sertoli 细胞增殖的影响 见表 1。

3.3 枸杞、黄芪对大鼠睾丸 Sertoli 细胞 INHβB 合成的影响 见表 2。

3.4 枸杞、黄芪对过氧化物损伤状态下大鼠睾丸 Sertoli 细胞 INHβB 合成的影响 见表 3。

表 1 枸杞、黄芪对大鼠睾丸 Sertoli 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量(F: μg/mL, R: mg/mL)	OD(570 nm) 值
枸杞组(F)	F50	0.355 0 ± 0.012 9 ⁴⁾
	F100	0.367 5 ± 0.017 1 ³⁾
	F200	0.377 5 ± 0.015 0
	F400	0.390 0 ± 0.008 2 ¹⁾
黄芪组(R)	R12.5	0.370 0 ± 0.018 3 ³⁾
	R25	0.380 0 ± 0.016 3
	R50	0.387 5 ± 0.020 6 ¹⁾
	R100	0.392 5 ± 0.017 1 ¹⁾
杞芪合剂组(F+R)	F50+ R12.5	0.370 0 ± 0.021 6 ³⁾
	F100+ R25	0.387 5 ± 0.012 6 ¹⁾
	F200+ R50	0.395 0 ± 0.020 8 ¹⁾
对照组	F400+ R100	0.400 0 ± 0.021 6 ²⁾
	DMEM/F12	0.362 5 ± 0.012 6

注:与对照组比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01, 与 F400+ R100 比³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01。

表 2 枸杞、黄芪对大鼠睾丸 Sertoli 细胞 INHβB 合成的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(F: μg/mL, R: mg/mL)	平均光密度	↑ %
F	F400	0.284 0 ± 0.014 2 ^{2,3,4)}	20.8
F+R	F400+ R100	0.310 2 ± 0.023 5 ²⁾	31.9
R	R100	0.253 0 ± 0.019 0 ^{1,3)}	7.6
对照		0.235 1 ± 0.015 5	

注:与对照组比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; F, R 与 F+R 比;³⁾ *P* < 0.01; ⁴⁾ F 和 R 比, *P* < 0.01。

表 3 枸杞、黄芪对过氧化物损伤的睾丸 Sertoli 细胞 INHβB 合成的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(F: μg/mL, R: mg/mL)	平均光密度	↑ %
F+H ₂ O ₂	F400	0.151 5 ± 0.014 1 ^{1,2)}	22.9
F+R+H ₂ O ₂	F400+ R100	0.168 2 ± 0.018 9 ¹⁾	36.4
R+H ₂ O ₂	R100	0.143 9 ± 0.014 6 ^{1,3)}	16.7
H ₂ O ₂		0.123 3 ± 0.014 1	
正常对照		0.232 3 ± 0.021 1 ^{1,3)}	

注:与 H₂O₂ 组比¹⁾ *P* < 0.01, ²⁾ *P* < 0.05; F, R 与 F+R+H₂O₂ 比, ³⁾ *P* < 0.01。

4 讨论

4.1 枸杞、黄芪对大鼠睾丸 Sertoli 细胞增殖的影响 将枸杞、黄芪用于分离培养的睾丸 Sertoli 细胞的研究,国内外均未见有报道。我们的实验结果证实枸杞、黄芪及杞芪合剂对离体培养的大鼠睾丸 Sertoli 细胞的增殖确有一定的促进作用。但是杞芪合剂对 Sertoli 细胞的促增殖作用并不高于枸杞或黄芪单一

药物的促增殖作用,二者并没有表现出一定的协同效应,根据目前对枸杞与黄芪药理作用的研究进展,我们分析杞芪合剂对 Sertoli 细胞的增殖作用可能是从以下几个方面进行的:①增加细胞营养。枸杞子中最有效的主要成份是枸杞多糖,其含有葡萄糖、甘露醇、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等和多种氨基酸及微量元素^[1],黄芪提取液中含有丰富的葡聚糖,杂多糖,多种氨基酸,蛋白质及微量元素等^[2],对体外培养的 Sertoli 细胞进行了有益的营养补充,对细胞的分裂增殖有一定的促进作用。②抑制细胞凋亡,延缓细胞衰老。陈智松等^[3]报道,枸杞多糖能使年老小鼠骨髓细胞 C-myc 基因表达水平明显下降,说明枸杞多糖的作用机理之一可能是通过抑制原癌基因 C-myc 的表达以而抑制细胞凋亡,最终达到延缓衰老,提高机体生命力的目的。我们认为在对睾丸 Sertoli 细胞的增殖影响中,枸杞多糖也发挥了类似的作用。③促进细胞代谢。黄芪可使细胞的生理代谢增强,这可能是通过细胞内 cAMP 的调节作用来完成的,黄芪还对蛋白质更新有促进作用,这也可能是黄芪扶正的一个重要机理。

4.2 枸杞、黄芪对大鼠 Sertoli 细胞 INH β B 合成的影响 我们的研究发现,枸杞、黄芪对体外培养的大鼠睾丸 Sertoli 细胞均有明显的影响,枸杞、黄芪均能明显增加正常状态下 Sertoli 细胞中 INH β B 的合成数量,保护过氧化物损伤状态下 Sertoli 细胞中 INH β B 的合成功能。枸杞与黄芪均能促进 INH β B 的合成与分泌,但是两种药物的作用强度经统计学分析有一定的差异,这说明在此方面枸杞的作用可能要优于黄芪。在对过氧化物损伤状态下 Sertoli 细胞 INH β B 合成数量的影响方面,我们发现枸杞与黄芪均对 INH β B 的合成有一定的保护作用,虽然枸杞单纯在数值上比黄芪略有增高,但是经统计学分析,这二者的保护作用并没有差异。另外从结果分析,对于单个 Sertoli 细胞而言,黄芪组的 INH β B 水平并没有增加。而枸杞组的 INH β B 的合成数量的增加值远远高于 Sertoli 细胞本身数量的增加值,因此对于单个 Sertoli 细胞而言,在枸杞多糖的作用下其所分泌的 INH β B 水平明显升高。由此看来,就单个 Sertoli 细胞合成、分泌 INH β B 而言,枸杞的作用有可能强于黄芪。

我们的研究还发现,杞芪合剂对大鼠 Sertoli 细

胞体外培养的 INH β B 合成水平有明显增强作用,并且其作用均强于单用枸杞组或黄芪组,其差异均有统计学意义。这说明枸杞与黄芪在促进 INH β B 合成过程中具有一定的协同效应。在过氧化物损伤状态下,大鼠 Sertoli 细胞 INH β B 合成水平明显下降,而杞芪合剂对 Sertoli 细胞具有非常明显的保护作用。

4.3 INH B 在男性精子发生过程中的作用 目前,INH B 在男性精子发生过程及男性不育诊断中的作用越来越受到人们的重视。Eckardstein 等^[4]认为唯支持细胞综合征(SCO)的发生与 INH B 高度相关($r = -0.58, P < 0.01$),其相关性比与 FSH 水平的相关性($r = 0.34, P < 0.05$)更强。Klingmuller 等^[5]认为 INH B 是睾丸外分泌功能的指标,它与精子密度的关系比 FSH 更密切,精子密度正常的男性血清 INH B 水平高于 112 pg/mL,若以 < 80 pg/mL 的 INH B 浓度来预测精子密度是否低于 20×10^6 /mL,其准确率为 100%。这些研究均表明:血清 INH B 水平是男性精子发生最好的内分泌标志物。

在生殖调控机制的研究中,INH B 的发生与调控机制正成为生殖生物学与临床生殖医学研究的热点。我们的研究结果,既为中药在生殖方面的作用研究提供一定的科学依据,也为 Sertoli 细胞分泌的 INH B 与生殖调控的关系提供一定的基础实验数据。

[参考文献]

- [1] 张熙,谢先春.枸杞多糖抗氧化作用实验研究[J].中国中药杂志,1993,18(2):110-112.
- [2] 云秦川.中药黄芪的药理研究进展[J].内蒙古中医药,2004,6(11):33-34.
- [3] 陈智松,农志飞,吴志奎,等.枸杞多糖对衰老小鼠原癌基因 C-myc 表达的影响[J].中成药,2001,23(5):356-359.
- [4] Eckardstein SV, Simoni M, Bergmann M, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle stimulating hormone(FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue sample[J]. J Clin Endo Metab, 1999, 84(7): 2496-2501.
- [5] Klingmuller D, Haidl G. Inhibin in men with normal and disturbed spermatogenesis[J]. Hum Reprod, 1997, 12(11): 2376-2378.