

补肾活血方对实验性精索静脉曲张大鼠睾丸组织 SOD NOS MDA 水平的影响

张长城¹, 周安方², 张茂林², 曹继刚²

(1 三峡大学医学院中医系, 湖北 宜昌 443002; 2 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061)

摘要:目的: 观察模型大鼠睾丸组织超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮合酶(NOS)、丙二醛(MDA)水平, 以及补肾活血方对模型大鼠睾丸组织 SOD、NOS、MDA 水平的影响, 揭示补肾活血方治疗精索静脉曲张性不育的机理。方法: 将 75 只 3 月龄雄性 SD 大鼠先随机抽出 15 只为假手术组, 其余 60 只大鼠采用肾静脉结扎法建立精索静脉曲张的病理模型, 造模完成后再随机均分为模型组、补肾活血方低剂量组、中剂量组、高剂量组。造模完成后 48 天开始给药, 连续给药 60 天, 取出左侧睾丸, 匀浆, 分别检测其 SOD、NOS、MDA 水平。结果: 模型组大鼠睾丸组织 SOD 水平显著下降, NOS、MDA 水平显著上升, 与假手术组比较有非常显著性差异($P < 0.01$); 补肾活血方能显著提高模型大鼠睾丸组织 SOD 水平, 降低 NOS、MDA 水平。结论: 自由基损害是精索静脉曲张引起不育的重要病理因素, 补肾活血方能减少模型大鼠睾丸组织内自由基的生成, 提高其抗自由基能力, 这可能是补肾活血方治疗精索静脉曲张性不育的机制之一。

关键词: 补肾活血方; 精索静脉曲张; 男性不育; 自由基

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0054-03

Effect of Bushen Huoxue Prescription on the Levels of SOD、NOS、 MDA in the Testis of Rat with Varicocele

ZHANG Chang-cheng¹, ZHOU Anfang², ZHANG Mao-lin², CAO Ji-gang²

(1 Department of Tradition Chinese Medicine, Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; 2 Hubei College of Tradition Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China)

Abstract: Objectives: Observing the levels of SOD、NOS、MDA in the testis of rats with varicocele, and the effect of Bu Shen Huo Xue Prescription on it, to investigate the mechanism of Bu Shen Huo Xue Prescription for male sterility with varicocele. Methods: Seventy-five Sprague-Dawley (SD) male rats were divided into five groups: control group, model group, Bu Shen Huo Xue Prescription low dose group, middle dose group, and high dose group. Experimental varicocele was created in the rats by partial ligation of left renal vein. Forty-eight days after establishing the model, medicine was given for sixty days. Then left testis was collected to measure the levels of SOD、NOS、MDA. Results: Marked decrease in the level of SOD and marked increase in the levels of NOS、MDA were found for the model ($P < 0.01$). Bu Shen Huo Xue Prescription could increase the level of SOD and decrease the levels of NOS、MDA. Conclusions: The damage of free radicals may be the mechanism of varicocele causing male sterility. Bu Shen Huo Xue Prescription can decrease the creation of free radicals and inhibit the damage of free radicals, this might be the mechanism of Bu Shen Huo Xue Prescription for treating male sterility with varicocele.

Key words: Bu Shen Huo Xue Prescription; varicocele; male sterility; free radical

精索静脉曲张是引起男性不育的主要原因之一。研究表明, 自由基损害是精索静脉曲张导致不

育的病机之一^[1]。本实验观察补肾活血方对实验性精索静脉曲张大鼠睾丸组织内自由基的影响, 从而揭示补肾活血方治疗精索静脉曲张性不育的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠, 雄性, 3 月龄, 体重 180~220g, 购自同济医科大学实验动物中心。

1.2 药物及制备 补肾活血方由熟地 15g、枸杞子

收稿日期: 2004-02-24

基金项目: 湖北省教育厅基金资助(NO: 2001Z04005)

通讯作者: 张长城, Tel: (0717) 6396558, E-mail: greatwall@ctgu.

edu.cn

15g、菟丝子 10g、淫羊藿 10g、巴戟天 10g、川芎 15g、当归 10g、丹参 15g、红花 10g 等组成,由湖北中医学院附属医院制剂室制备。具体制备方法为水煎提取 2 次,过滤,浓缩成每 mL 含生药 4g 煎膏剂,高压蒸汽灭菌后密封保存。用时用双蒸水配成 0.6g/mL、1.2g/mL 和 1.8g/mL 的混悬液。

1.3 模型的建立 将大鼠普通饲养 3d,观察无异常后即可造模。模型的制备参照 Saypol^[2]法,用 3% 戊巴比妥钠 40mg/kg 体重腹腔注射麻醉,将大鼠仰卧固定于夹板上,常规消毒,腹部切口,小心暴露左侧肾静脉、肾上腺静脉、睾丸静脉和下腔静脉,于肾上腺静脉和睾丸静脉内侧、下腔静脉外侧用微血管钳小心分离肾静脉深面,穿一根 3/0 丝线,置一自制金属探针(直径 1.03mm)于肾静脉前壁,然后将静脉与金属探针一同结扎,小心拨出探针,使肾静脉部分复通,逐层缝合腹壁;假手术组只行肾静脉分离,不缩窄左肾静脉。

1.4 分组及给药 本实验设 5 组;将 75 只 SD 雄性大鼠先随机抽出 15 只为假手术组,其余 60 只大鼠于造模完成后再随机均分为模型组、补肾活血方低剂量组、中剂量组、高剂量组。给药剂量与方法:①假手术组:按 1mL/100g 体重给予生理盐水灌胃,每日 1 次;②模型组:按 1mL/100g 体重给予生理盐水灌胃,每日 1 次;③补肾活血方低剂量组:用双蒸水将补肾活血方浸膏稀释成含生药 0.6g/mL 药液,按 1mL/100g 体重灌胃,每日 1 次;④补肾活血方中剂量组:用双蒸水将补肾活血方浸膏稀释成含生药 1.2g/mL 药液,按 1mL/100g 体重灌胃,每日 1 次;⑤补肾活血方高剂量组:用双蒸水将补肾活血方浸膏稀释成含生药 2.4g/mL 药液,按 1mL/100g 体重灌胃,每日 1 次。

1.5 动物取材制样 每组随机取 12 只大鼠,脱臼处死,打开腹腔,取出左侧睾丸,用 4℃ 预冷的生理盐水洗净血液,滤纸吸干水分,用眼科剪剪取一部分睾丸组织,称重,用玻璃匀浆器匀浆,按每克睾丸组织加 10mL 生理盐水,制备成 10% 的睾丸组织匀浆,4000r/min 离心 10min,取上清液置 4℃ 保存待测。另每组取 5 只大鼠部分左侧睾丸组织,用 Bouin's 液固定,常规石蜡切片包埋,HE 染色,光镜下观察其组织学变化。

1.6 试剂 SOD、MDA、NOS 试剂盒均购自北京邦定泰克生物技术有限公司。

1.7 检测方法 SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测

定;MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定;NOS 活性采用化学比色法测定,蛋白含量用考马斯亮蓝法测定。

1.8 统计学分析 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠睾丸组织病理学改变 假手术组:在低倍镜与高倍镜下见曲细精管与精子发生均正常。间质无水肿,微血管无瘀血。模型组:在低倍镜下见正常与异常曲细精管成片交错存在,表现为典型的“斑点样”改变。在高倍镜下见精子发生终止在精子细胞与精母细胞阶段,生精细胞脱落,曲细精管萎缩,管壁层次紊乱,甚则曲细精管塌陷,支持细胞和精原细胞减少甚至消失;间质水肿,间质细胞空泡样变性。补肾活血方各组:低剂量组在低倍镜下见典型的“斑点样”改变,在高倍镜下见部分曲细精管萎缩,少见曲细精管塌陷;精原细胞和支持细胞减少,部分精子发生终止在精子细胞与精母细胞阶段,间质水肿,间质细胞空泡样变性。中剂量组在低倍镜下见“斑点样”改变,但异常曲细精管明显减少。在高倍镜下见部分曲细精管萎缩,管壁层次较清楚。精原细胞和支持细胞比模型组明显增多,精子细胞较多见。高剂量组在低倍镜下见“斑点样”改变;异常曲细精管较少。在高倍镜下见部分曲细精管萎缩,管壁层次较清楚;精原细胞和支持细胞比模型组明显增多,精子细胞较多。

2.2 各组大鼠睾丸组织内 SOD、MDA、NOS 含量 模型组大鼠睾丸组织 SOD 水平显著下降,NOS、MDA 水平显著上升,与假手术组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$);补肾活血方能显著提高模型大鼠睾丸组织 SOD 水平,降低 NOS、MDA 水平,与模型组比较有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠睾丸组织内 SOD、MDA、NOS 含量 ($n = 12; \bar{x} \pm s$)

组别	SOD ($\times 10^3$ U/g)	MDA (μ mol/g)	NOS ($\times 10^3$ U/g)
假手术组	98.32 \pm 18.11 ²⁾	21.24 \pm 7.07 ²⁾	8.04 \pm 1.93 ²⁾
模型组	60.78 \pm 8.72 ¹⁾	42.28 \pm 7.53 ¹⁾	18.20 \pm 5.28 ¹⁾
补肾活血方低剂量组	73.18 \pm 11.28 ²⁾	31.35 \pm 8.29 ²⁾	12.86 \pm 2.49 ²⁾
补肾活血方中剂量组	80.37 \pm 10.47 ²⁾	27.61 \pm 8.20 ²⁾	11.76 \pm 2.87 ²⁾
补肾活血方高剂量组	81.65 \pm 11.33 ²⁾	26.14 \pm 9.79 ²⁾	11.17 \pm 3.15 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;²⁾ 与模型组比较 $P < 0.01$ 。

3 讨论

活性氧(ROS)主要包括过氧化氢、过氧离子、氢氧离子等自由基。在正常情况下,睾丸中可生成一

定程度受控的活性氧,它与精子的生理功能有关。由于人精子膜上富含不饱和脂肪酸,易受活性氧的过氧化伤害,当 ROS 的产生超出了抗氧化系统的清除能力时,则会对精子产生毒性作用,引起精子膜脂质过氧化,使其形态、功能及代谢异常,从而导致男性不育^[3-5]。

精索静脉曲张时,睾丸及精索内血液循环障碍,导致自由基的生成增多、清除障碍^[6,7]。丙二醛(MDA)是过氧化脂质的分解产物,通过 MDA 的测定可反应体内自由基产生的程度^[8]。超氧化物歧化酶(SOD)是细胞中主要的抗氧化酶之一,它在机体清除氧自由基(ROS)的过程中起着关键作用^[9]。本实验结果表明,模型组及各治疗组大鼠睾丸组织内 MDA 含量均较假手术组高,而模型组大鼠睾丸组织内 SOD 水平显著下降;补肾活血方各组大鼠睾丸组织内 MDA 水平显著降低,而 SOD 水平升高。

NO 是活性氧的一种,它不仅是生物体内重要介质,而且能对细胞产生毒性作用。在精索静脉曲张时,由于精索静脉内血流减慢,提高了各种因素、代谢产物对 NOS 的有效刺激,使 NOS 的活性增强,NO 合成增加^[10,11]。过量的 NO 可导致生精障碍,从而导致不育^[12]。本实验结果显示,模型组大鼠睾丸组织内 NOS 水平明显升高,补肾活血方各组大鼠睾丸组织内 NOS 水平显著低于模型组。

研究表明,补肾中药具有较好的清除自由基的作用^[13,14]。模型大鼠睾丸组织内自由基生成增多,自由基清除能力下降,补肾活血方能提高模型大鼠睾丸组织内 SOD 含量,降低 MDA、NOS 含量,从而改善模型大鼠的生精功能。自由基生成增多及清除障碍是精索静脉曲张导致生精障碍的病理因素之一,而补肾活血方具有较好的清除自由基作用,这可能是补肾活血方治疗精索静脉曲张所致不育的重要机制。

参考文献:

[1] 陈俊汇,章咏裳. 精索静脉曲张所致男性不育的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2001, 15(3): 209-211.
[2] Saypol DC, Howards SS, Turner TT, et al. Influence of

surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs[J]. J Clin Invest, 1981, 68(1): 39-45.

[3] De Lamirand E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balance act between beneficial and detrimental effects[J]. Hum Reprod, 1995, 10(suppl1) 15-21.
[4] Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal property of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma[J]. Fertil Steril, 1979, 31: 531-537.
[5] Sikka Sc, Rajasikaran M, Hellstrom W. Role of oxidative stress and antioxidant in male infertility[J]. J Urol, 1995, 16: 464-468.
[6] 秦文波,王淑秋,王跃生. 氧自由基与精索静脉曲张不育关系的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17(11): 689-691.
[7] Henin BN, Kolettis PN. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity[J]. J Urol, 1999, 161(6): 1831-1837.
[8] 曹国华,陈吉棣,刘小鹏,等. 缺锌及补锌对鼠脂质过氧化与超氧化物歧化酶的影响[J]. 中华医学杂志 1991, 71(11): 623-626.
[9] 董强,杨宇如. 精浆抗氧化酶与男性不育[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2001, 21(6): 254-256.
[10] Ozbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, et al. Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele[J]. Eur Urol. 2000, 37(2): 172-178.
[11] Mitropoulos D, Deliconstanlinos G, Zervas A, et al. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction[J]. J Urol, 1996, 156(6): 1952-1958.
[12] Aksoy H, Aksoy Y, Ozkey I, et al. The relationship between varicocele and semen nitric oxide[J]. Urol Res, 2000, 28(6): 357-359.
[13] 陈晏珍,江家贵,杨宏德. 肾虚与超氧化物歧化酶关系初探[J]. 中医杂志, 1989, (4): 42-43.
[14] 刘劲,曲长江. 自由基与中医学的气、血、精[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(12): 16-19.