

文章编号:1009-038X(2004)01-0075-04

六味地黄汤抑制大鼠生精细胞凋亡及其促进精子发生

凌庆枝¹, 敖宗华¹, 许泓瑜¹, 许正宏¹, 尹光耀², 陶文沂^{1*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 无锡市第三人民医院, 江苏 无锡 214041)

摘要: 用醋酸棉酚建造大鼠生精障碍模型, 用六味地黄汤灌胃治疗, 以市售六味地黄丸和甲基睾酮分别为对照和阳性对照, TUNEL 法检测实验各组大鼠睾丸生精细胞的凋亡情况, 计数实验各组大鼠精子数量, 考察实验各组大鼠精子的质量。结果表明, 六味地黄汤各治疗组、阳性对照组大鼠的精子数量、精子爬高均与模型组有显著性差异($P < 0.01$), 各治疗组大鼠的精子质量(活力)也显著优于模型组; 各实验组大鼠睾丸凋亡的生精细胞明显少于模型组。由此显示, 六味地黄汤复方可显著抑制大鼠睾丸生精细胞的凋亡, 对生精障碍大鼠有显著的促进生精作用, 并可显著提高大鼠精子的质量。

关键词: 六味地黄汤; 细胞凋亡; 大鼠; 精子; 醋酸棉酚

中图分类号: R 285

文献标识码: A

Effect of Liuwei Dihuang Decoction on Promoting Spermatogenesis and Inhibiting Spermatogonium Apoptosis of Rat

LING Qing-zhi¹, AO Zong-hua¹, XU Hong-yu¹,
XU Zheng-hong¹, YIN Guang-yao², TAO Wen-yi¹

(1. The Key Lab of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Wuxi Third Peoples' Hospital, Wuxi 214041, China)

Abstract: The model of spermatogenesis obstructive rat was built with gossypol acetate. Then Liuwei Dihuang decoction and methyltestosterone were administered to the Wistar rats. The numbers of sperm were counted, the quality of sperm was observed, and the spermatogonium apoptosis was tested by TUNEL. Result showed that the sperm quantity of the rats in LW treated groups was significantly different to that of the model group ($P < 0.01$), and higher than that of the positive group. The sperm quality of the rats in LW treated groups was better than that of the model group. The number of spermatogonium apoptosis of LW treated groups was smaller than that of the model group. It could be concluded that LW could promote the quantity and quality of the sperm and inhibit the spermatogonium apoptosis of the rats in model group.

Key words: liuwei dihuang decoction; apoptosis; rat; sperm

收稿日期: 2003-06-16; 修回日期: 2003-08-26.

作者简介: 凌庆枝(1963-), 男, 安徽合肥人, 讲师, 生物制药博士研究生; * 通讯作者。
万方数据

六味地黄汤(丸)(liuwei dihuang decoction, 简称 LW), 出自《小儿药证直诀》, 为宋代钱乙所创, 是滋阴补肾的经典名方, 其功效是滋阴补肾, 兼益肝阴。主治肾阴不足, 骨蒸潮热, 盗汗遗精, 消渴, 小便淋漓, 舌红少苔乏津, 脉细数或脉虚大等^[1]。本方在现代临床医学上亦有广泛的应用, 常作为滋阴补肾的基本方用于不孕不育症的治疗^[2,3]。现代临床实践表明, 用 LW 治疗少、弱精子的男性不育症有明显的疗效^[4,5], 但对其作用机理的研究报道甚少。为此, 作者对 LW 抑制生精障碍大鼠睾丸生精细胞的凋亡及其促进精子生成、提高精子质量的作用进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材 LW 复方组成按文献^[6], 即熟地黄 24 g, 山茱萸(制) 12 g, 山药 12 g, 泽泻 9 g, 茯苓 9 g, 牡丹皮 9 g。

药材购自无锡市山禾药业集团中药饮片有限公司。药材经中国药科大学宋学华教授鉴定, 均为符合药典规定之正品。

1.1.2 LW 的制备 中药饮片经粉碎后过 30 目筛, 按 LW 复方之组成准确称取各药材, 加药材质量 5~7 倍的去离子水, 浸 1 h, 沸水煎煮 60 min, 冷却, 3 500 r/min 离心 20 min, 留上清液, 沉渣再煎煮 60 min, 共煎煮 3 次。合并上清液, 55~60 °C 浓缩, 制备成每毫升 1.0 g 生药, 冷藏, 备用。各单味药有效部位提取后混合复煎一次为合煎, 仅将各单味药有效部位按复方配比混合为分煎^[6~8]。

1.1.3 实验动物 Wistar 雄性大鼠 60 只, 个体质量 160~180 g, 由东南大学实验动物中心提供。许可证号: SYXK(苏)2002-0057。

1.1.4 实验药品 醋酸棉酚。由江南大学食品学院提供, 纯度 99.9% (HPLC 法), 用食用的色拉油配成 50 mg/mL, 避光, 备用; 甲基睾酮: 上海信谊药业有限公司生产, 产品批号: 030201, 用 1 g/dL 的 CMC 配制成 4 mg/mL, 避光, 备用。

LW 市售品为“仲景”牌(浓缩丸), 河南省宛西制药股份有限公司生产, 生产批号: 020666, 每 200 丸相当于 75 g 生药, 直接制备成 1.0 g/mL。

其他试剂均为分析纯。

1.1.5 实验器材 Olympus 光学显微镜, Olympus BX60 型摄影显微镜, 均为日本 Olympus 光学公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠生精障碍模型的建造 将 Wistar 雄性

大鼠适应性饲养后随机分为空白组(10 只)和模型组(50 只), 造模参照文献^[9]加以改进, 按 50 mg/kg 个体质量灌胃醋酸棉酚, 隔日一次, 连续 2 周。

1.2.2 模型大鼠给药治疗 将 50 只已建成的模型大鼠随机再分为模型组、LW 分煎组、LW 合煎组、LW 市售组、甲基睾酮阳性对照组 5 组, 每组 10 只。空白组、模型组灌胃等量的生理盐水, 阳性对照组按 20 mg/kg 个体质量灌胃甲基睾酮, 治疗组按每公斤个体质量 10 g 生药, 分别灌胃给予相应的药物。每日一次, 连续 20 d。

1.2.3 实验大鼠精子计数及精子爬高 实验大鼠于末次给药 2 h 后处死, 立即剖腹取出睾丸、附睾, 剔除脂肪和结缔组织, 电子天平称重, 睾丸固定于 Bouin 氏固定液。计数精子并观察其活力情况, 同时按文献^[10]做精子爬高试验, 记录精子 30 min 的爬高距离, 以考察精子的质量。以 *t* 检验检验各组的精子数量及爬高的差异显著性。

1.2.4 实验大鼠睾丸生精细胞凋亡的检测 TUNEL 法检测大鼠睾丸生精细胞凋亡。试剂由南京建成生物工程研究所提供。

取 Bouin 氏固定液固定的睾丸, 纵切, 常规石蜡切片, 严格按 TUNEL 法检测试剂盒操作说明书进行检测。

2 实验结果

2.1 六味地黄汤对大鼠雄性生殖系统相关指标的影响

大鼠睾丸、附睾质量、精子数量及精子爬高结果见表 1。

2.1.1 精子计数结果 模型组与空白组、LW 各治疗组的精子数量均有显著性差异($P < 0.01$), 其中 LW 合煎组的精子数量与 LW 分煎组、LW 市售组、模型组亦有显著性差异($P < 0.01$); 模型组的精子指数与 LW 治疗组、阳性对照组亦有显著性差异($P < 0.01$)。结果表明, LW 有显著的促进生精功能, 且 LW 合煎的疗效大于分煎, 这亦即中药复方之功效所在。

2.1.2 精子爬高 LW 各治疗组的精子 30 min 爬高距离均与模型组有显著性差异($P < 0.01$)。实验结果表明, 经 LW 治疗后精子的质量得到明显提高。

2.1.3 精子活力观察 在精子计数之前观察精子的活力, 模型组精子活力很差, a 级精子很少, 大多数精子仅在原地缓慢地摇动; 而 LW 各治疗组和阳性对照组的精子活力明显优于模型组, 多数精子快速运动, a 级、b 级精子明显增多。这表明, 经 LW 治疗后, 精子的活力明显提高。

表 1 实验各组大鼠的睾丸质量、附睾质量、精子计数及精子爬高结果($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 The results of sperm quantity and sperm climb high, the weight of testicle and epididymis

组 别	睾丸质量/g	附睾质量/g	精子数 ($\times 10^9/L$)	精子爬高(cm/30min)	精子
			ΔP	$\Delta\Delta P$	指数*
空白组($n=9$)	1.72 \pm 0.11	0.53 \pm 0.11	40.67 \pm 10.04	0.86 \pm 0.06	23.62 \pm 5.83
模型组($n=9$)	1.67 \pm 0.09	0.43 \pm 0.03	16.11 \pm 3.45	0.62 \pm 0.05	9.67 \pm 2.07
分煎组($n=9$)	1.78 \pm 0.09	0.42 \pm 0.04	21.27 \pm 5.78	0.69 \pm 0.04	11.94 \pm 3.24
合煎组($n=9$)	1.74 \pm 0.16	0.48 \pm 0.05	26.19 \pm 4.68	0.78 \pm 0.05	15.04 \pm 2.69
市售组($n=9$)	1.69 \pm 0.15	0.47 \pm 0.05	22.44 \pm 8.76	0.82 \pm 0.05	13.28 \pm 5.18
阳性对照组($n=8$)	1.69 \pm 0.15	0.40 \pm 0.06	21.50 \pm 6.51	0.81 \pm 0.08	12.77 \pm 3.86

注: ΔP : 模型组的精子数量与空白组、各治疗组比较有显著性差异($P < 0.01$); $\Delta\Delta P$: 模型组的精子爬高与空白组、各治疗组比较有显著性差异($P < 0.01$); * 精子指数为每 100 g 睾丸精子数 10^{11} 个。

2.2 LW 对大鼠睾丸生精细胞凋亡的抑制作用

LW 对大鼠睾丸生精细胞凋亡的抑制见图 1~6。图中睾丸曲细精管周围的细胞, 凡细胞核有棕色颗粒者(深咖啡色)即是凋亡的生精细胞。由图中可见空白(对照)组大鼠的睾丸曲细精管周围仅有少量凋亡的生精细胞, 这是正常的生理状态下睾丸生精细胞的凋亡情况; 而模型组大鼠睾丸曲细精管周围则有许多凋亡的生精细胞, 数量明显多于空白(对照)组; 经 LW 治疗后的实验组及阳性对照组大鼠睾丸曲细精管周围凋亡的生精细胞明显少于模型组。实验结果表明, LW 可显著地抑制模型大鼠睾丸曲细精管生精细胞的凋亡。

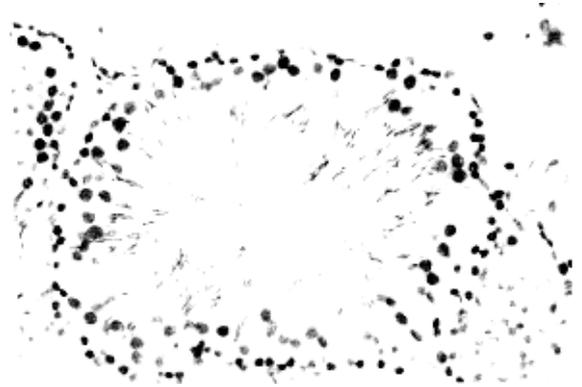


图 3 LW 分煎组

Fig. 3 LW separate group

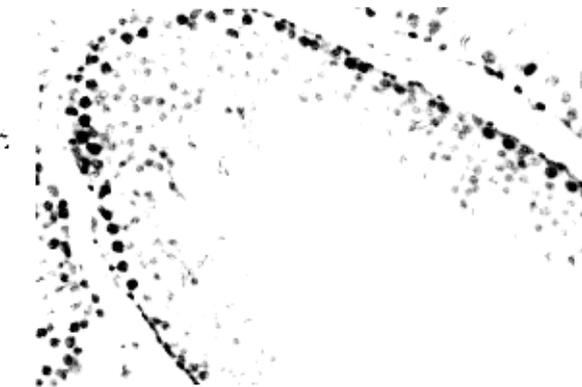


图 4 LW 合煎组

Fig. 4 LW mixed group



图 1 空白(对照)组

Fig. 1 Negative(control) group



图 5 LW 市售组

Fig. 5 LW market sale group



图 2 模型组



图6 阳性对照组

Fig. 6 Positive control group

3 讨论

醋酸棉酚的雄性抗生育作用为我国首创,其对Wistar大鼠精子发生的抑制作用是肯定的^[11]。

细胞凋亡(apoptosis),早期又称程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD),是近年来生命科学领域的研究热点。细胞凋亡是一种由基因控制的细胞自主性死亡,真核细胞在生理或病理条件下受到某种信号的刺激,即启动其自身的遗传机制而发生自动化的死亡。细胞凋亡可有效控制细胞数量,是机体自我平衡调节的有效途径^[12]。研究表明,睾丸的生精细胞凋亡是睾丸自我调节的重要方式。尽管有关中医药理论与细胞凋亡的研究较少,但现有的研究证明,大多数补益中药对细胞的凋亡有抑制作用^[13~15]。本实验结果表明,复方LW对大鼠睾丸

曲细精管的生精细胞凋亡有明显的抑制作用,并显著地促进精子的产生。

精子爬高试验又称精子毛细管精子穿透试验(capillary tube sperm penetration assay),是评价精子活力(质量)的一种特殊方法。该试验是用特制的毛细玻璃管,在管内充满精子介质,观察精子在一定时间内(30 min)在介质中前向运动的距离,以此来评价精子的活力。由于此试验毛细管是垂直放置,故又称精子爬高试验。精子所爬距离的高低即证明精子质量的优劣。本实验结果证明,LW可显著提高精子的质量。

LW是受我国历代医家所推崇的滋补肝肾的经典方剂,现代研究表明,该方具有提高机体免疫功能和滋阴补肾、延缓衰老等作用,现代临床上该方还用于男女性不孕不育症的治疗,但对其治疗作用的机理研究少见报道。本实验研究了LW分煎、合煎对生精障碍模型大鼠睾丸曲细精管生精细胞凋亡的抑制及其促进生精作用。结果表明,LW分煎、合煎均可显著地抑制睾丸生精细胞的凋亡,提高生精障碍大鼠的精子数量,各治疗组与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$)。在治疗组中,合煎组优于分煎组和市售组,LW显著地提高了精子的质量。这说明LW可能是通过阻止睾丸曲细精管生精细胞的凋亡而促进精子的发生,经LW治疗既提高精子数量,又提高了精子的质量。本研究为LW临床治疗男性少、弱精子不育症提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 于世良,史定文.中药名方精解[M].北京:中医古籍出版社,1993.136.
- [2] 赖益忠,黄倬伟.六味地黄丸(汤)现代研究新进展[J].中医药信息,1999,16(1):13-15.
- [3] 王瑞林,战为平.六味地黄丸系列及氯米酚治疗排卵障碍不孕25例疗效与B超观察[J].吉林中医药,2000,20(4):34.
- [4] 王书鸿.六味地黄丸和其衍生方在临床上的应用[J].广西医学院学报,1985,2(3):70.
- [5] 梅全喜.中成药临床新用[M].北京:人民卫生出版社,2001.175.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2000年版一部)[M].北京:化学工业出版社,2000.415-416.
- [7] 徐壬生,陈仲良.中草药有效成分提取与分离[M].上海:上海科学技术出版社,1993.135-167.
- [8] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2000.63-78.
- [9] 袁玉英,汤玉林,陈文颖,等.补肾增精颗粒剂治疗少、弱精子症及其所致男性不育的药效学研究[J].中草药,1999,30(增刊):163-165.
- [10] 张秀成.精子检测与分离[M].北京:北京科学技术出版社,1993.20-31.
- [11] 薛社普,梁德才,刘裕.男用节育药棉酚的实验研究[M].北京:人民卫生出版社,1983.2-66.
- [12] Miller L J,Marx J. Apoptosis[J]. Science,1998,281(5381):1301.
- [13] 刘玉涛,周禾,白小薇,等.枸杞多糖对小鼠胸腺细胞凋亡的调节[J].北京医科大学学报,1996,18(2):111-112.
- [14] 陈东鸿,李平,程建峰,等.柴胡及甘草酸对小鼠肝细胞凋亡的影响[J].第四军医大学学报,1998,19(3):279-281.
- [15] 牛建昭,魏育林,曹炜,等.人参抑制小鼠胸腺细胞凋亡的实验研究[J].解剖学报,1997,28(3):270-273.