· 实验研究 ·

木脂素对醋酸铅染毒小鼠生精功能影响*

沈楠[1], 王艳春[1], 范红艳[1], 李治伟[2], 路倩[1], 王燕[1], 刘师兵[1], 齐玲[1], 任旷[1]

摘　要: 目的　探讨木脂素对醋酸铅染毒小鼠生精功能的影响及其作用机制。**方法**　将昆明种雄性小鼠 60 只随机分为对照组、模型组、阳性对照组、木脂素组, 除对照组外, 其余 3 组小鼠均腹腔注射醋酸铅(40 mg/kg), 连续 10 d, 建立雄性小鼠生精障碍模型; 造模后第 2 d 开始, 阳性对照组小鼠腹腔注射绒毛膜促性腺激素(500 IU/kg), 木脂素组小鼠给予木脂素(200 mg/kg)灌胃, 对照组及模型组小鼠灌胃等量生理盐水, 连续 30 d; 末次给药 24 h 后, 处死小鼠, 取睾丸和附睾, 检测睾丸组织超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、三磷酸腺苷(ATP)酶含量。比较各组小鼠精子存活率。苏木精 – 伊红染色观察睾丸组织形态。**结果**　与对照组比较, 模型组小鼠精子活率[(53.2 ± 1.3)%]降低, LDH、SOD、Mg^{2+}、Ca^{2+} - ATP 酶活性[分别为(0.18 ± 0.03) U/gprot、(16.80 ± 2.23) U/mgprot、(31.03 ± 4.87)、(8.12 ± 1.24) μmolPi/(mgprot·hour)]降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 木脂素组小鼠精子活率[(68.7 ± 2.2)%]升高; LDH、SOD、Mg^{2+}、Ca^{2+} - ATP 酶活性[分别为(0.23 ± 0.09) U/gprot、(23.01 ± 3.86) U/mgprot、(64.21 ± 10.49)、(17.20 ± 5.18) μmolPi/(mgprot·hour)]升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论**　木脂素对醋酸铅所致生精障碍小鼠的生殖功能具有一定保护作用, 其机制可能与抗氧化损伤有关。

关键词: 木脂素; 醋酸铅; 抗氧化损伤; 生精功能
中图分类号: R 995　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)03-0321-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-03-20

Effects of lignans on spermatogenesis in mice exposed to lead acetate

SHEN Nan*, WANG Yan-chun, FAN Hong-yan, et al (* *Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jilin Medical College, Jilin, Jilin Province* 132013, China)

Abstract: Objective　To study effects of lignan on spermatogenesis and its mechanism in mice with lead acetate exposure. **Methods**　Sixty Kunming male mice were randomly divided into a control group, model group, positive drug group, and lignans group. Except for those in the control group, all the mice were injected lead acetate for 10 days at the dosage of 40 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ to establish spermatogenesis disorder model; two days after lead acetate injection, the mice in positive drug group were treated with human chorionic gonadotropin(500 $IU \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) via intraperitoneal injection and those in lignans group were given lignans(200 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) via gavage; the mice in the control group and model group were given normal saline; the experiment lasted for 30 days. Twenty-four hours after the last treatment, all the mice were sacrificed and testis and epididymis of the mice were sampled. Superoxide dismutase(SOD), lactate dehydrogenase (LDH), Mg^{2+} ATP enzyme and Ca^{2+} ATP enzyme in testicular tissue were detected and sperm viability was compared between the groups and the morphology of testicular tissue were observed with hematoxylin-eosin staining. **Results**　Compared with the control group, sperm motility was reduced; SOD, Mg^{2+} ATPase and Ca^{2+} ATPase contents were decreased; and LDH level was increased for the mice of the model group($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, sperm motility was increased, the level of SOD was increased, and that of LDH was decreased in the mice of lignans group($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion**　Lignans could protect spermatogenesis from lead acetate-induced damages in mice and the mechanism of the effect may related to anti-oxidativation of lignans.

Key words: lignans; lead acetate; oxidative damage; spermatogenesis

近年来, 随着生活节奏加快、不良生活习惯影响及环境污染的危害日益严重, 男性精子数量和质量均出现了不同程度降低, 使男性不育症的发生率呈全球性增高趋势[1]。传统中药在改善男性生殖功能方面具有良好疗效[2-4], 开发中药有效成分对改善男性生殖损伤具有十分重要的意义。木脂素广泛存在于植物的木质部、花和果实中, 具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种生物学活性[5-6]。本研究采用醋酸铅染毒建立雄性小鼠生精障碍模型, 探讨木脂素对醋酸铅染毒小鼠生精功能保护作用及机制, 结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*实验动物*　清洁级健康昆明雄性小鼠 60 只(吉林大学白求恩医学部动物实验中心), 4 ~ 6 周龄, 体重 22 ~ 25 g, 许可证号: SCXK(吉)2008-0005。

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81201671); 吉林省教育厅基金(2010254; 2013359)
作者单位: 1. 吉林医药学院药理学教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 湖南中医药高等专科学校
作者简介: 沈楠(1972 –), 女, 吉林吉林人, 副教授, 硕士, 研究方向: 中药药理毒理。(王艳春为本文并列第一作者)
通讯作者: 任旷, E-mail: renkuang@ sina. com
数字出版日期: 2015 – 2 – 15 9: 58
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150215.0958.004.html

1.2　主要试剂与仪器　木脂素(北华大学长白山资源保护与开发研究所);醋酸铅(上海化学试剂厂);绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)(马鞍山丰原制药有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、Mg^{2+}-三磷酸腺苷(ATP)酶和 Ca^{2+}-ATP 酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。MUSETM 智能触控细胞分析仪(美国默克密理博公司),全自动酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司),显微镜(德国 LEICA 公司),DP71 型图像采集设备(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3　生精障碍小鼠模型制备　根据文献[6-7],将 60 只雄性昆明小鼠适应性喂养 1 周后随机选取 15 只为对照组,其余小鼠腹腔注射醋酸铅制备生精障碍模型,剂量 40 mg/kg,1 次/天,连续 10 d,对照组给予等量生理盐水。

1.4　分组与处理　将造模成功[7-8](精子存活率明显下降,睾丸生精细胞受损,生精上皮明显变薄,生精小管萎缩,管腔中精子数量减少)的 45 只生精障碍小鼠随机分为 3 组,模型组、阳性对照组、木脂素组,每组 15 只。木脂素组小鼠每天灌胃给予 200 mg/kg 木脂素,阳性对照组小鼠每天腹腔注射 HCG 500 IU/kg,对照组、模型组小鼠给予等量生理盐水,连续 30 d。各组动物自由进食饮水,末次给药后 24 h,采用颈椎脱臼法处死小鼠,取双侧睾丸及附睾待检。

1.5　指标与方法

1.5.1　精子存活率检测　双侧附睾迅速置于预先加入 2 mL 生理盐水的培养皿中,用探针剥离附睾后置于 37.0 ℃恒温箱中孵育 10 min,使精子游出,过滤、得稀释后的精液;取稀释后精液 10 μL,按说明书要求上样至细胞分析仪检测精子存活率。

1.5.2　睾丸组织中生化指标检测　取小鼠左侧睾丸组织,制成 10% 组织匀浆,4 ℃条件下,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液严格按试剂盒说明书测定 SOD、LDH、MDA、Mg^{2+}、Ca^{2+}-ATP 酶含量。

1.5.3　睾丸组织病理学观察　取小鼠右侧睾丸组织,经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,常规石蜡包埋、切片。苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光镜下观察睾丸组织形态、生精小管上皮层数及管腔内精子数量。

2　结　果

2.1　木脂素对铅染毒小鼠精子活率影响　对照组、模型组、阳性对照组、木脂素组小鼠精子存活率分别为(81.6 ± 2.1)%、(53.2 ± 1.3)%、(68.5 ± 1.5)%、(68.7 ± 2.2)%;与对照组比较,模型组小鼠精子存活率明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组与木脂素组小鼠精子存活率明显升高($P < 0.05$),阳性对照组与木脂素组小鼠精子存活率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2　木脂素对铅染毒小鼠睾丸组织内生化指标影响(表 1)　与对照组比较,模型组小鼠睾丸组织内 MDA 含量明显升高,SOD、LDH、Mg^{2+}、Ca^{2+}-ATP 酶活性明显下降($P < 0.01$),提示造模成功;与模型组比较,阳对照组与木脂素组小鼠睾丸组织内 MDA 含量下降,SOD、LDH、Mg^{2+}、Ca^{2+}-ATP 酶活性明显升高($P < 0.05$);阳性对照组与木脂素组小鼠各指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1　木质素对铅染毒小鼠睾丸组织生化指标影响($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

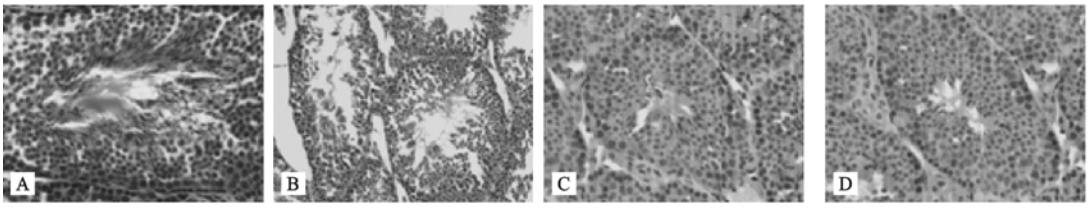
组别	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	LDH (U/gprot)	Mg^{2+}-ATP 酶 [μmolPi/(mgprot·hour)]	Ca^{2+}-ATP 酶 [μmolPi/(mgprot·hour)]
对照组	32.16 ± 3.95	0.31 ± 0.09	0.33 ± 0.03	91.49 ± 7.99	27.49 ± 6.31
模型组	16.80 ± 2.23[a]	0.49 ± 0.01[a]	0.18 ± 0.03[a]	31.03 ± 4.87[a]	8.12 ± 1.24[a]
阳性对照组	24.02 ± 3.91[b]	0.34 ± 0.05[c]	0.24 ± 0.06[b]	58.23 ± 8.04[c]	11.91 ± 1.28[b]
木脂素组	23.01 ± 3.86[b]	0.38 ± 0.07[b]	0.23 ± 0.09[b]	64.21 ± 10.49[c]	17.20 ± 5.18[c]

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与模型组比较,b $P < 0.05$,c $P < 0.01$。

2.3　木脂素对睾丸组织形态学影响(图 1)　对照组小鼠睾丸生精小管排列紧密,生精上皮层数多,上皮细胞排列规则紧密,生精小管内有较多精子形成(图 1A);模型组小鼠睾丸生精小管萎缩,生精上皮明显变薄,层数减少,排列紊乱,腔内精子数目减少(图 1B);与模型组比较,阳性对照组(图 1C)与木脂素组(图 1D)小鼠睾丸生精小管上皮层数多,排列较规则,生精小管萎缩现象明显好转,腔内有成熟精子;阳性对照组小鼠睾丸病变较木脂素组轻微。

3　讨　论

近年来,随着环境污染日益严重,不孕不育症的发病率在全球范围内呈上升趋势。研究表明,利用醋酸铅染毒可建立稳定的雄性动物生殖系统损伤动物模型[8-9]。本研究结果显示,小鼠睾丸组织中 SOD活力下降,提示铅可通过血睾屏障,使睾丸组



注：A：对照组；B：模型组；C：阳性对照组；D：木脂素组

图 1　木脂素对铅染毒小鼠睾丸组织形态学影响（HE，×200）

织发生脂质过氧化作用，导致生精上皮细胞膜，支持细胞和间质细胞受损。LDH 是睾丸间质细胞、支持细胞和生精上皮细胞膜和精子的标志酶，其活力改变导致睾酮分泌减少，精细胞生长因子减少，精子的发生和发育受阻，生精功能受损[10]。本研究结果表明模型组小鼠精子活率明显下降，睾丸组织内 SOD 及 LDH 活性降低，给予木脂素处理后，小鼠睾丸精子存活率明显上升，SOD 及 LDH 活性明显升高，提示木脂素对醋酸铅所致的小鼠睾丸组织损伤具有一定改善作用。

HCG 具有与黄体生成素（LH）类似的结构与功能，通过与黄体生成素受体结合，促进雄性激素（睾酮）的分泌，从而改善生精功能，对男性不育症的治疗具有重要意义。临床上常将 HCG 测定作为评价男性睾丸功能的依据之一，间接反映男性的生殖功能，因此，本研究选择 HCG 作为阳性对照物。本研究结果显示，醋酸铅可造成小鼠睾丸组织氧化损伤，减少精子数量，HCG 则可提高小鼠睾丸组织内 SOD 的活性，减少 MDA 含量，并使精子数量得以恢复。

Mg^{2+}、Ca^{2+}-ATP 酶作为精子利用能量的关键酶，是质膜上重要的离子泵，在维持细胞膜结构的完整性、膜内外离子平衡和渗透压平衡等方面具有关键作用，与精子动力臂收缩、精子运动有关，并可作为线粒体膜结构变化的灵敏指标[11－12]。当机体氧自由基增多引发氧化应激时，过多的氧自由基首先以线粒体为攻击目标，可导致线粒体功能障碍，从而引起 Mg^{2+}-ATP 酶与 Ca^{2+}-ATP 酶活性下降[13－14]。本研究结果表明，模型组小鼠睾丸组织内 Mg^{2+}、Ca^{2+}-ATP 酶活性下降，而木脂素组小鼠睾丸组织内 Mg^{2+}、Ca^{2+}-ATP 酶活性明显升高。提示木脂素对铅染毒所致小鼠睾丸生精功能影响具有一定保护作用，其机制可能与木脂素的抗氧化、稳定细胞膜作用有关。

参考文献

[1] 吕逸清，陈斌，胡凯，等. 精子凋亡率与精子密度、活率、活力及活性氧关系探讨[J]. 中国男科学杂志，2009，23(2)：34-37.

[2] 王瑞，徐磊，张卫星，等. 中药生精冲剂对生精障碍小鼠治疗作用的实验研究[J]. 中华男科学杂志，2008，14(11)：1046-1049.

[3] 郭凯华，高福禄，牛嗣云，等. 何首乌饮对衰老大鼠睾丸组织细胞 Rb/p53 信号转导通路的影响[J]. 解剖学报，2010，41(3)：435-439.

[4] 黄晓东，任旷. 五味子木脂素研究进展[J]. 吉林医药学院学报，2010，31(1)：46-49.

[5] Wang XY, Shi HM, Zhang L, et al. A new chalcone glycoside. a new tetrahydrofuranoid lignan, and antioxidative constituents from the stems and leaves of *Viburnum propinquum*[J]. Planta Medica, 2009, 75(11): 1262－1265.

[6] 马静，魏益民，郭波莉，等. 铅对人体和动物毒性作用[J]. 中国公共卫生，2009，25(3)：369-370.

[7] 张玉敏，马明月，崔金山. 醋酸铅对小鼠生精功能的影响[J]. 中国工业医学杂志，2004，17(5)：315-317.

[8] Shan G, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(1): 68－72.

[9] Gautam AK, Agarwal K, Shah BA, et al. Lead induced spermatoxicity in mouse and MPG treatment[J]. J Environ Biol, 2001, 22(4): 287－291.

[10] Marchlewica M, Michslska T, Wiszniewska B. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemil uminescence[J]. Chemosphere, 2004, 57(10): 1553－1562.

[11] 项翠琴，刘春芳，张云英，等. 铅对大鼠睾丸钙调素、ATP 酶的抑制作用[J]. 环境与职业医学，2002，19(3)：132-133.

[12] Silva E, Pinto V, Simao S, et al. Renal aging in WKY rats: changes in Na(+), K(+)-ATPase function and oxidative stress [J]. Experimental Gerontology, 2010, 45(12): 977－983.

[13] Zhang X, Zhang A, Jiang B, et al. Further pharmacological evidence of the neuroprotective effect of catalpol from *Rehmannia glutinosa*[J]. Phytomedicine, 2008, 15(6－7): 484-490.

[14] Gong Y, Pan X, Huang Y, et al. NP-induced biophysical and biochemical alterations of rat testicular Sertoli cell membranes related to disturbed intracellular Ca(2+) homeostasis[J]. Toxicol Lett, 2008, 183(1－3): 10－20.

收稿日期： 2014－10－24　　（解学魁编辑　吴少慧校对）