

五味子多糖对环磷酰胺致生精障碍大鼠的治疗作用及对生殖激素的影响

张 艳¹ 沈 楠² 齐 玲³ 陈 为² 董 正³ 赵东海³

摘要 **目的** 探讨五味子多糖对环磷酰胺(CTX)致生精障碍大鼠的治疗作用及其对生殖激素的影响。**方法** 醇碱法提取五味子多糖。50 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组以及五味子多糖低、中、高剂量组。除正常组外,其余 4 组均给予腹腔注射 CTX 80 mg/(kg·d)连续 5 天,制备生精障碍大鼠模型。造模后,五味子多糖低、中、高剂量组分别给予五味子多糖 100、200、400 mg/(kg·d)灌胃,正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,均每天 1 次,连续 60 天。末次灌胃后 24 h,取大鼠血清和睾丸组织。酶联免疫法测定大鼠血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)和睾丸组织匀浆睾酮(T)水平;比较各组大鼠精子密度、活率及精子畸形率;HE 染色观察睾丸组织形态。**结果** 与正常组比较,模型组精子密度和精子活率降低,精子畸形率升高,血清 FSH 和 LH 水平升高,睾丸组织匀浆中 T 含量降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,五味子多糖各剂量组精子密度、精子活率升高,精子畸形率降低,血清 FSH 和 LH 水平降低,睾丸组织匀浆中 T 含量升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$),且五味子多糖各剂量组呈剂量依赖性。组织学观察显示,五味子多糖各剂量组大鼠睾丸组织病理学损害均得到改善。**结论** 五味子多糖对 CTX 所致大鼠生精障碍具有明显的治疗作用,其机制可能与恢复下丘脑—垂体—性腺轴的调控功能有关。

关键词 五味子多糖;环磷酰胺;生精障碍;生殖激素

Efficacy of *Schizandra Chinensis* Polysaccharide on Cyclophosphamide Induced Dyszoospermia of Rats and Its Effects on Reproductive Hormones ZHANG Yan¹, SHEN Nan², QI Ling³, CHEN Wei², DONG Zheng³, and ZHAO Dong-hai³ 1 Department of Academic Affairs, Jilin Medical College, Jilin (132013), China; 2 Experiment Center, Jilin Medical College, Jilin (132013), China; 3 Department of Pathology, Jilin Medical College, Jilin (132013), China

ABSTRACT **Objective** To explore the efficacy of *Schizandra Chinensis* polysaccharide (SCP) on cyclophosphamide (CTX) induced dyszoospermia of rats and its effects on reproductive hormones. **Methods** SCP was extracted by ethanol-alkali solution. Fifty male Wistar rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the normal control group, the model group, the low dose SCP group (100 mg/kg), the middle dose SCP group (200 mg/kg), and the high dose SCP group (400 mg/kg). Except the normal control group, the dyszoospermia rat model was established by peritoneal injection of CTX at the daily dose of 80 mg/kg, once daily for 5 successive days. After modeling, SCP was intragastrically administered at corresponding dose to the three SCP groups. Equal volume of normal saline was given to rats in the normal control group and the model group by gastrogavage. All the medication was performed once daily for 60 successive days. The blood serum and testis were withdrawal 24 h after the last intragastric administration. The levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and testosterone (T) in the testis homogenate were determined by enzyme linked immunosorbent assay. The sperm count, the motility rate, and the teratospermia rate were compared. The morphology of the testis was observed using HE staining. **Results** Compared with the normal control group, the sperm count and the motility rate decreased, the teratospermia rate increased, the serum levels of FSH and LH increased, the T content in the testis homogenate decreased in the model group, showing statistical difference ($P < 0.01$). Compared with the model group, the sperm count and the motility rate increased, the

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字[2012]第 331 号)

作者单位:1.吉林医药学院教务处(吉林 132013);2.吉林医药学院实验中心(吉林 132013);3.吉林医药学院病理学教研室(吉林 132013)

通讯作者:赵东海, Tel:0432-64560025, E-mail:zdh1027@sina.com

teratospermia rate decreased, the serum levels of FSH and LH decreased, the T content in the testis homogenate increased in the model group, showing statistical difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). All the indices showed dose-dependent manner in the SCP groups. The histological results showed the pathological injury in the testicular tissue was improved in all SCP groups. Conclusion SCP showed obvious therapeutical effects on CTX induced dyszoospermia in rats, and its mechanisms might be correlate with recovering the regulation function of hypothalamus-hypophysis-gonad axis.

KEYWORDS *Schizandra Chinensis* polysaccharide; cyclophosphamide; dyszoospermia; reproductive hormone

少精或弱精等精子质量异常是男性不育的主要原因^[1]。目前治疗少精症及弱精症的药物较少,治疗效果也不明显,传统中药方剂在改善男性生殖功能方面具有良好疗效^[2-4],因此研制和开发中药有效成分,并研究其在生殖保护方面的作用具有良好的应用价值。五味子为木兰科五味子属植物,具有补肾、益气、生津、固涩等功效,临床用于治疗久咳虚喘、梦遗滑精、津伤口渴、气短脉虚、内热消渴和心悸失眠等症。现代药理学研究证明,五味子不仅对免疫系统、心血管系统、神经系统等具有调节作用,还有抑制肿瘤、抗氧化、抗衰老等作用^[5]。补肾壮阳中药多糖对雄性大鼠生殖系统有保护作用^[6]。前期实验发现,五味子多糖有改善大鼠生精功能的作用(另文发表),但五味子多糖的生精作用尚缺乏系统和深入的研究。本实验研究五味子多糖对环磷酰胺(CTX)诱导的生精障碍大鼠的治疗作用,为五味子多糖防治生殖障碍的临床应用提供实验基础和理论依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重(190 ± 10) g,购自吉林大学实验动物中心,合格证号:SCXK(吉)2008-0005。适应性饲养,环境温度(22 ± 2) °C。

2 药物及试剂 北五味子,购自吉林大药房;注射用 CTX(批号:11061921),购自江苏恒瑞医药股份有限公司;卵泡刺激素(FSH,批号:20100627)、黄体生成素(LH,批号:20100908)和睾丸组织匀浆睾酮(T,批号:20100415)酶联免疫试剂盒,购自北京科美东雅生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

3 五味子多糖的制备 取北五味子果实 500 g,洗净后研磨成粉,参考文献[7]方法并加以改进,以醇碱法提取五味子多糖。提取液醇碱溶剂 pH 值为 7.8,含醇浓度为 7%,提取温度为 100 °C,料液比为 1:25,提取 2 次,每次 1.5 h,提取总时间为 3 h,得浅棕色粗多糖。用 Seveg 法除蛋白,并加入 10 g/L 活性炭脱色,并将滤液于透析袋中透析 48 h,除去无机

盐,得多糖纯化物。以葡聚糖溶液为对照品做标准曲线,用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量。样品含糖量约为 46.5 mg/g。

4 分组、造模及给药 50 只 Wistar 大鼠适应性喂养 5 天后,以单纯随机抽样法分为正常组、模型组以及五味子多糖低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常组外,根据预实验结果以及参考文献[8]方法给予其余 4 组腹腔注射 CTX 80 mg/(kg·d),连续 5 天,制备生精障碍模型。造模大鼠于开始腹腔注射 CTX 第 2~3 天起,逐渐出现精神萎靡,恶寒,体毛稀疏、无光泽,消瘦,甚至体重下降。造模后,五味子多糖低、中、高剂量组分别给予五味子多糖 100、200、400 mg/(kg·d)(分别相当于成人剂量的 5、10、20 倍)灌胃,正常组和模型组均灌胃等体积生理盐水,各组灌胃给药容积为 0.5 mL/mg,均每天 1 次,连续 60 天。

5 观察指标及检测方法

5.1 取材 全部大鼠末次给药后 24 h,称体重,腹主动脉取血并分离血清。取右侧睾丸放入 4% 福尔马林固定行组织形态学检测。左侧取附睾和睾丸,其中睾丸制成匀浆,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液, -20 °C 冰箱保存待测;附睾进行精子数及精子活动率检测。

5.2 精子密度、活率及畸形率测定 将盛有 10 mL 精子营养液^[9]的试管置于恒温水浴箱中预热至 37 °C,取单侧附睾去除结缔组织和脂肪,眼科剪剪碎组织并放入试管中,37 °C 静止 10 min,待精子充分游离。取 1 滴滴于血细胞计数板上,按照细胞计数法计算精子密度。另从试管中取 5 μ L 与等量伊红-Y 混匀,室温下放置 10 min,加盖玻片,在光镜下观察,死精子被染色呈粉红色,活精子不被染色而胞质透明。每份标本计数 200 个精子,计算精子活率;另从试管中取 5 μ L 用甲醇固定 5 min,晾干后用 2% 伊红水溶液染色 1 h,冲洗,吹干。在低倍镜下找到背景清晰,精子重叠较少的部位,用高倍镜按顺序检查精子形态。每只大鼠检查完整的精子 1 000 个,精子头部无钩、香蕉形、无定形、胖头、

双头等判定为畸形,计算精子畸形率。

5.3 生殖激素测定 取分离后血清,利用酶联免疫试剂盒测定血清 FSH 和 LH 及睾丸组织匀浆 T 水平,实验步骤和方法按照试剂盒说明书完成。

5.4 睾丸组织形态学观察 取大鼠睾丸石蜡切片,HE 染色,光镜观察睾丸组织内精原细胞与各级生精细胞的分布情况。

6 统计学方法 应用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠精子密度、活率及畸形率比较(表 1) 与正常组比较,模型组大鼠精子密度和精子活率降低,精子畸形率升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,五味子多糖各剂量组精子密度和精子活率提高,精子畸形率降低,差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$)。与五味子多糖低剂量组比较,五味子多糖中、高剂量组精子密度和精子活率升高,精子畸形率降低,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),且五味子多糖高剂量作用优于五味子多糖中剂量($P < 0.05$)。

2 各组大鼠生殖激素比较(表 2) 与正常组比较,模型组血清 FSH 和 LH 含量增高,睾丸组织匀浆 T 含量降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,五味子多糖各剂量组血清 FSH 和 LH 含量降低,睾丸组织匀浆 T 含量增高,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与五味子多糖低剂量组比较,五味子多糖中、高剂量组血清 FSH 和 LH 含量降低,睾丸组织匀浆 T 含量增高,差异均有统计学意义($P <$

$0.05, P < 0.01$),且五味子多糖高剂量作用优于五味子多糖中剂量($P < 0.05$)。

3 各组大鼠睾丸组织形态学比较(图 1) 光镜观察,正常组睾丸生精小管直径宽,排列密集,生精上皮厚,生殖细胞层次和数量多,生精小管均见精子形成。模型组大鼠睾丸生精小管退化、萎缩,生精上皮变薄,上皮层数减少,排列紊乱,腔内精子数目减少。与模型组比较,五味子多糖低剂量组生精小管生精上皮层数增多,排列较规则,生精小管退化、萎缩的现象明显好转;五味子多糖中剂量组生精小管结构改善更加明显,生精上皮层数和数量明显增多,排列整齐;五味子多糖高剂量组睾丸生精上皮层数较模型组显著增多,各级生精上皮排列规则,腔内有成熟精子,基本为完整的睾丸组织形态。

讨 论

CTX 是临床常见的抗肿瘤药物,其主要通过对 DNA 的烷化作用干扰细胞内多种生物学功能。生殖毒性是 CTX 的主要副反应之一^[10]。临床研究表明,CTX 的生殖毒性可引起无精症或少精症,导致不育或子代遗传性缺陷或畸形的发生^[11]。

五味子是传统的滋补中药,具有收纳肾气、固精止泻、补肾宁心的作用,《本草纲目》中记载五味子具有“补元气之不足,吸耗散之气”及“壮水镇阳”之功效,也是传统的治疗男性生殖功能障碍的常用组方药。

本研究利用 CTX 制备大鼠生精障碍模型,并探讨五味子多糖对 CTX 所致生精障碍的保护作用。结果显示:与正常组比较,模型组大鼠精子密度减少,精子活率降低,精子畸形率增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。五味子多糖各剂量组精子密度增加,精子活率增强,精子畸形率降低,与模型组比较,差异均有

表 1 各组大鼠精子密度、活率及畸形率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精子密度 (×10 ⁶ /mL)	精子活率 (%)	精子畸形率 (%)
正常	10	63.14 ± 11.41	65.25 ± 3.64	6.27 ± 0.56
模型	10	26.21 ± 6.73 *	32.14 ± 5.68 *	13.42 ± 1.23 *
五味子多糖低剂量	10	38.24 ± 7.53 △△	41.96 ± 12.45 △△	10.12 ± 1.57 △
五味子多糖中剂量	10	47.08 ± 10.45 △△▲	52.34 ± 9.58 △△▲	9.58 ± 0.69 △△▲
五味子多糖高剂量	10	59.15 ± 12.66 △△▲▲○	63.37 ± 11.27 △△▲▲○	6.75 ± 1.25 △△▲▲○

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与五味子多糖低剂量组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与五味子多糖中剂量组比较,○ $P < 0.05$;表 2 同

表 2 各组大鼠生殖激素比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FSH (U/L)	LH (U/L)	T (nmol/L)
正常	10	4.38 ± 1.21	5.68 ± 1.32	10.59 ± 0.64
模型	10	8.44 ± 1.47 *	9.36 ± 2.14 *	5.48 ± 1.23 *
五味子多糖低剂量	10	6.36 ± 1.15 △	8.33 ± 1.58 △	7.12 ± 1.57 △
五味子多糖中剂量	10	5.98 ± 1.24 △△▲	6.67 ± 1.25 △△▲	10.68 ± 0.73 △△▲
五味子多糖高剂量	10	4.62 ± 0.68 △△▲▲○	5.69 ± 1.42 △△▲▲○	11.82 ± 0.46 △△▲▲○

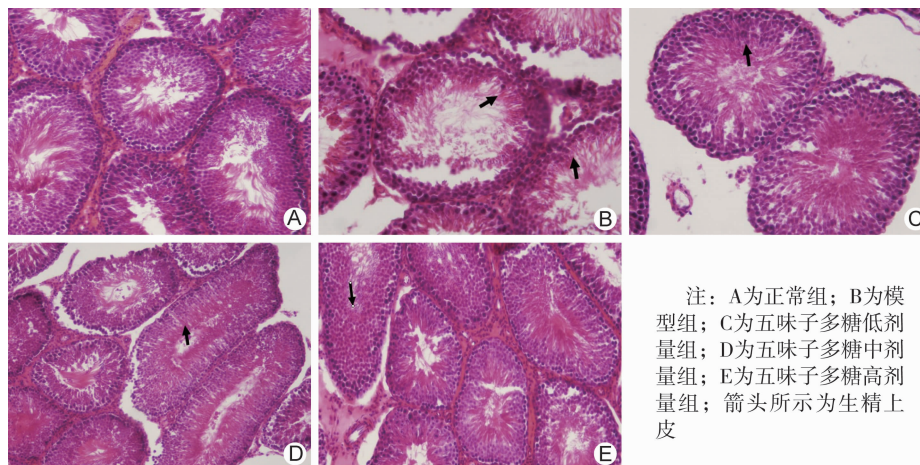


图 1 各组大鼠睾丸组织形态学比较 (HE, $\times 200$)

统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。表明五味子多糖对受损睾丸及精子的形成具有显著的促进作用。睾丸组织学观察显示,五味子多糖治疗后模型大鼠睾丸生精上皮层数明显增多,细胞层次分明,生精细胞排列整齐、紧密,管腔内可见较多精子,提示五味子多糖在改善和恢复生殖细胞形态方面具有较好作用。

睾丸的生精功能受下丘脑—垂体—性腺轴内分泌激素水平的调控。FSH、LH 为垂体分泌的糖蛋白类激素,FSH 与曲细精管的支持细胞膜受体结合,刺激性激素结合球蛋白的生成,使得曲细精管腔内 T 维持较高水平,以促进生殖细胞分化为成熟的精子^[12]。LH 主要促进睾丸间质细胞增生,刺激间质细胞合成和分泌 T,以供精子生成的需要。LH 可协同 FSH 促进精子成熟,并与精子活动力有关^[13]。本研究模型组血清 FSH 和 LH 水平较正常组明显增高,睾丸组织匀浆 T 水平明显降低,可能因为 CTX 通过诱导间质细胞和支持细胞大量凋亡,使 T 分泌减少,下丘脑—垂体—性腺轴反馈性调节促进腺垂体分泌 FSH 和 LH,使二者血清水平反应性增高。五味子多糖各剂量组 FSH 和 LH 水平均降低,尤其高剂量组基本恢复到正常水平,且五味子多糖各剂量组 T 水平也显著增高。提示五味子多糖可能通过促进睾丸组织再生,使激素分泌正常,恢复下丘脑—垂体—性腺轴调控作用而达到提高精子数量和质量,改善生精功能的作用。本研究初步探讨了五味子多糖对 CTX 致生精障碍大鼠的治疗作用,为五味子多糖在生殖不育中的应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 王益鑫,郑菊芬. 男性不育研究新进展[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(9): 771-774.
- [2] 徐磊,王瑞,张卫星,等. 生精冲剂对环磷酰胺致生精障

碍小鼠的治疗作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(2): 267-270.

- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 许珂玉,肖建英. 五味子粗多糖提取物对大鼠肝纤维化的防治作用研究[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1743-1745.
- [6] 黄晓兰,杨明亮,吴晓旻,等. 枸杞多糖对大鼠生殖系统保护作用的机制探讨[J]. 武汉大学学报(医学版), 2004, 25(1): 29-41.
- [7] 范荣军,任涛,刘成柏,等. 五味子多糖提取工艺的比较研究[J]. 中成药, 2008, 30(6): 827-831.
- [8] 沈国球,鲁功成,潘铁军,等. 环磷酰胺诱导少精子/无精子症大鼠模型所致睾丸、附睾 bFGF 的变化[J]. 中华男科学杂志, 2010, 24(2): 28-30.
- [9] 陈德宇,刘丽敏,谢庆东,等. 抗精液抗体对精子线粒体功能的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2008, 21(1): 4-6.
- [10] 张长城,贾亮亮,李守超,等. 淫羊藿总黄酮对环磷酰胺致小鼠生精障碍保护作用的研究[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2052-2055.
- [11] Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, et al. High risk of infertility and long-term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood[J]. Cancer, 2001, 91(3): 613-621.
- [12] 钟影,吴东,艾玲,等. 272 例无精子男性睾丸与生殖激素测量结果分析[J]. 四川医学, 2002, 23(10): 1000-1002.
- [13] 陈斌鸿,陈社安. 69 例少精、无精症患者血清性激素水平分析[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(7): 406-408.

(收稿:2012-05-07 修回:2012-12-10)