

益精方对不育症大鼠睾丸生精细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

王 力¹ 陈 东² 闵 泽¹ 王家辉²

摘要 目的 观察益精方对腺嘌呤法不育症大鼠睾丸生精细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响。**方法** Wistar 大鼠 75 只随机分为空白组、模型组、益精方高、中、低剂量组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组均以腺嘌呤连续灌胃 10 天; 从第 11 天开始, 空白组及模型组用等量生理盐水灌胃, 益精方高(3.38 g/100 g)、中(1.69 g/100 g)、低剂量(0.85 g/100 g)组分别以益精方各剂量灌胃, 每天 1 次, 连续 20 天。实验结束后将大鼠全部处死, 摘取睾丸, 采用原位缺口末端标记法(TUNEL)和免疫组化 SABC 法分别检测各组动物生精细胞的凋亡情况及 Bcl-2/Bax 蛋白的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组 Bcl-2 蛋白表达降低, Bax 蛋白表达升高, 细胞凋亡数升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 三个剂量组 Bcl-2 蛋白表达均升高($P < 0.01$, $P < 0.05$), 高、中剂量组 Bax 蛋白表达均降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 中剂量组细胞凋亡数降低($P < 0.01$)。**结论** 益精方能够通过调控睾丸组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达, 抑制生精细胞的凋亡。

关键词 益精方; 腺嘌呤; Bcl-2 蛋白; Bax 蛋白; 细胞凋亡

Effect of Yijing Recipe on Apoptosis of Testis Spermatogenic Cells and the Expression of Bcl-2 and Bax Protein in Infertility Rats WANG Li¹, CHEN Dong², MIN Ze¹, and WANG Jia-hui² 1 First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847), China; 2 College of Traditional Chinese Medicine, Hainan Medical College, Haikou (571199), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of Yijing Recipe (YR) on the apoptosis of testis spermatogenic cells and the protein expression of Bcl-2/Bax in rats with adenine induced infertility. **Methods** Totally 75 Wistar rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the blank control group, the model group, the high dose YR group, the middle dose YR group, and the low dose YR group, 15 in each group. Except those in the blank control group, rats in the rest groups were intragastrically administered with adenine for 10 successive days. From the 11th day, rats in the blank control group and the model group were fed with equal volume of normal saline. Rats in the YR groups were intragastrically administered with YR at different doses (3.38 g/100 g; 1.69 g/100 g; 0.85 g/100 g), once daily for 20 consecutive days. All rats were killed by the end of the experiment and their testes extracted. The apoptosis of spermatogenic cells and the expression of Bcl-2/Bax proteins were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling (TUNEL) and SABC method. **Results** Compared with the blank control group, the Bcl-2 protein expression decreased, the Bax protein expression increased, and the apoptosis index increased in the model group, showing statistical difference ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Bcl-2 protein expression increased in the three YR treated groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The Bax protein expression level decreased in the high and middle dose YR groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The apoptosis index decreased in the middle dose YR group ($P < 0.01$). **Conclusion** YR could inhibit the apoptosis of spermatogenic cells through regulating the expression of Bcl-2 and Bax protein in the testis.

KEYWORDS Yijing Recipe; adenine; Bcl-2 protein; Bax protein; apoptosis

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81260591); 海南省自然科学基金资助项目(No. 310050)

作者单位: 1. 辽宁中医药大学第一临床学院(沈阳 110847); 2. 海南医学院中医学院(海口 571199)

通讯作者: 王家辉, Tel: 0898-66982198, E-mail: 1002459426@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.05.0602

目前,全世界约有 15% 夫妻罹患不孕不育症,其中男性不育发病率约占 50%^[1],并呈逐年上升的趋势^[2]。中医药在治疗男性不育症方面具有疗效确切,患者易于接受的优点^[3]。益精方是中国中医科学院贾金铭教授经查阅古籍,结合现代药理实验所拟,经多年临床观察对治疗男性不育症疗效确切^[4]。研究发现,Bcl-2/Bax 基因在精子生成过程中的调控出现异常有可能引起精子生成障碍,形成少精子症或无精子症,导致男性不育症^[5]。本实验拟观察益精方对腺嘌呤法不育症大鼠睾丸生精细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响。

材料与方法

1 实验动物 有生育能力的清洁级成年雄性 Wistar 大鼠 75 只,1.5 月龄,体重(180±20)g,由辽宁中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(辽)2010-004,饲养于辽宁中医药大学动物实验中心,自由饮食。

2 药物 益精方药物组成:菟丝子 20 g、黄芪 15 g、仙灵脾 12 g、苍术 12 g、桑螵蛸 20 g、红花 6 g、当归 10 g、五味子 15 g 等 11 味中药组成,煎煮为汤剂。所有饮片的采购、药物制备及质控均由辽宁中医药大学附属医院中药局制剂中心完成。

3 主要试剂及仪器 腺嘌呤(北京市化学试剂公司,批号:65000194);一步法原位缺口末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所,批号:C1086);即用型 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德试剂公司,批号:SA2005);生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司,型号:BL-420S);免疫组化分析软件(成都泰盟科技有限公司,型号:BL-2000);荧光显微镜(BX51 型,日本 Olympus 公司),数码显微镜(BX41 型,日本 Olympus 公司)。

4 分组、模型制备及干预方法 将 75 只 Wistar 大鼠随机分为空白组,模型组,益精方高、中、低剂量组,每组 15 只。按王家辉等^[6]腺嘌呤改进法,除空白组外,其余各组将腺嘌呤按 500 mg/mL 浓度配置,并加入与腺嘌呤 1:10 比例的阿拉伯胶助溶,以 50 mL/(100 g·d)剂量连续灌胃 10 天,一次性成功;从第 11 天开始,空白组及模型组用等量生理盐水灌胃,按人与大鼠等效剂量换算^[7],益精方高(3.38 g/100 g)、中(1.69 g/100 g)、低剂量(0.85 g/100 g)组分别以益精方各剂量灌胃,每天 1 次,连续干预 20 天。

5 检测指标及方法 各组大鼠干预后颈椎脱位处死,解剖摘取睾丸,用波因(Bouin)氏固定液固定,

固定时持续灌流,石蜡包埋、切片(4 μm),HE 染色。

5.1 Bcl-2、Bax 蛋白表达检测 采用免疫组化 SABC 法。Bcl-2、Bax 细胞的胞浆(或胞膜)呈棕黄色者为阳性细胞。Bcl-2、Bax 阳性细胞计算方法:每张切片选取 10 个高倍视野(×400),测量其灰度值,灰度值越高表示阳性表达的细胞越多。

5.2 生精细胞凋亡检测 采用 TUNEL 法。用荧光标记液染色,通过荧光显微镜观察细胞呈绿色荧光者为凋亡细胞。凋亡指数(AI)计算:每张切片选取 10 个高倍视野(×400),计数 500 个细胞,求得每个视野的平均阳性细胞数。

6 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件,实验数据计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

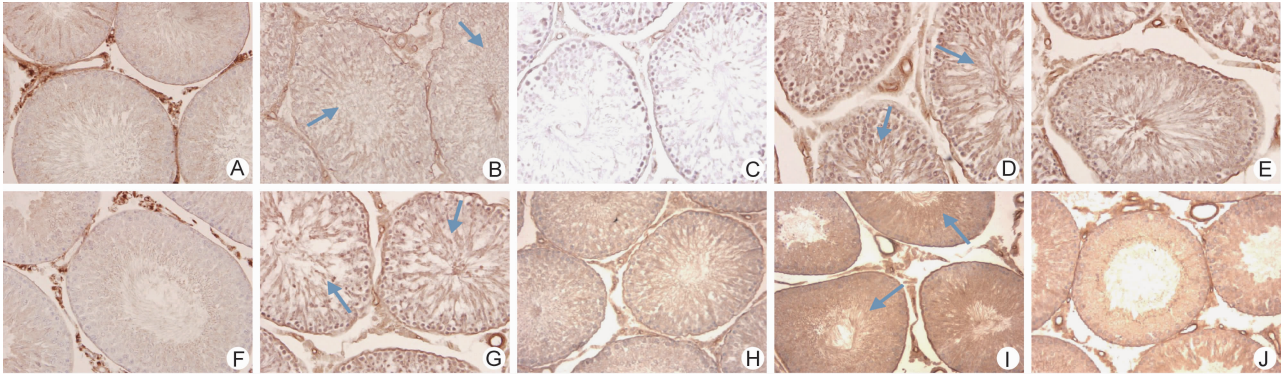
1 各组一般状态比较 干预期间空白组和益精方各剂量组大鼠较模型组反应灵敏,毛发润泽光滑;模型组大鼠体重增长较空白组和益精方各剂量组慢,且毛发脱落、反应迟钝、蜷缩拱背、抱团取暖,并陆续出现死亡现象;益精方各剂量组大鼠上述症状较模型组有不同程度的减轻。除空白组外,其余各组均有死亡,分别为模型组 5 只、高剂量组 2 只、中剂量组 3 只、低剂量组 4 只。死亡大鼠尸检,肺组织中未发现药液及出血点,排除因灌胃操作失误而造成的死亡;每只死亡大鼠均出现胃肠胀气,肾脏肿大,部分出现大白肾,甚至有明显的出血点,说明肾脏损害是其死亡的主要原因。

2 各组睾丸组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较(图 1,表 1) 与空白组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达降低,Bax 蛋白表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,三个剂量组 Bcl-2 蛋白表达均升高($P < 0.01, P < 0.05$),高、中剂量组 Bax 蛋白表达均降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 1 各组睾丸组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	剂量	Bcl-2 蛋白 (个/HPF)	Bax 蛋白 (个/HPF)
空白	10	2 mL/100 g	224 ± 12 **	187 ± 16 **
模型	10	2 mL/100 g	186 ± 14	232 ± 14
益精方高剂量	10	3.38 g/100 g	200 ± 8 *	211 ± 4 *
中剂量	10	1.69 g/100 g	216 ± 2 **	201 ± 13 **
低剂量	10	0.85 g/100 g	200 ± 6 *	223 ± 12

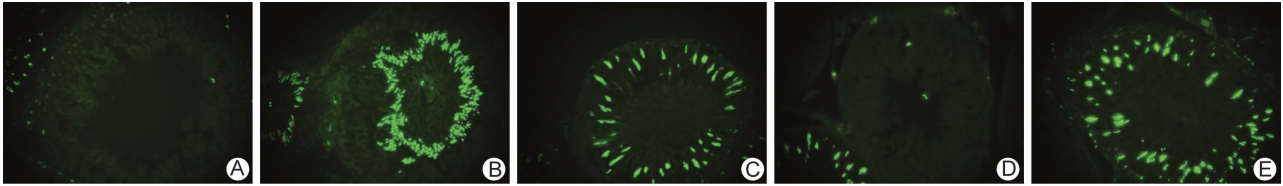
注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 各组睾丸组织生精细胞凋亡数比较(图 2,表 2) 与空白组比较,模型组细胞凋亡数升高($P < 0.01$)。与模型组比较,益精方中剂量组细胞凋亡数降低($P < 0.01$)。



注:A、F 为空白组;B、G 为模型组;C、H 为益精方高剂量组;D、I 为益精方中剂量组;E、J 为益精方低剂量组;A-E 为 Bcl-2 蛋白表达;F-J 为 Bax 蛋白表达

图 1 各组睾丸组织结构 (HE, ×400)



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为益精方高剂量组;D 为益精方中剂量组;E 为益精方低剂量组

图 2 各组睾丸组织生精细胞凋亡 (荧光染色法, ×400)

表 2 各组动物睾丸组织生精细胞凋亡数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	平均每个视野生精细胞凋亡数(个/HPF)
空白	10	2 mL/100 g	50 ± 16 **
模型	10	2 mL/100 g	691 ± 204
益精方高剂量	10	3.38 g/100 g	189 ± 37
中剂量	10	1.69 g/100 g	126 ± 22 **
低剂量	10	0.85 g/100 g	449 ± 127

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

本实验通过免疫组化技术检测了腺嘌呤法不育症大鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 的表达及睾丸生精细胞凋亡情况。在选择动物模型的表现以及实际操作方面而言,以腺嘌呤模型的效果最为理想^[6],用低剂量的腺嘌呤可导致大鼠睾丸形态学改变,而且肾脏的损害程度较轻,可成功地诱导肾阳虚不育模型^[8]。本实验观察到,随着腺嘌呤给药时间的延长,模型组大鼠出现发育迟缓、体毛脱落、反应迟钝、蜷缩拱背、抱团取暖、小便增多等类似于中医学肾阳虚的症状和体征。死亡的大鼠经剖检发现肾脏损害较重,甚至有的出现出血点。杨桂梅等^[9]研究发现腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下变成极难溶于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,后者沉积在肾小管,影响了氮质化合物的排泄,最终引起了肾功能的损伤。国外有学者指出摄入腺嘌呤后导致体内产生过多的氧自由

基和脂质过氧化也可能是腺嘌呤导致肾功能损伤的重要机制之一^[10]。

Bcl-2 和 Bax 是一对关系十分密切的凋亡基因, Bcl-2 促进睾丸生殖细胞存活, Bax 促进凋亡, 在细胞的凋亡调控过程中起着重要作用。Bcl-2 蛋白主要位于线粒体的外周膜、核周膜和内质网膜, 其主要生物学功能是延长细胞寿命并增加细胞对多种凋亡刺激因素的抗性。Yamamoto CM 等^[11]研究发现 Bcl-2 在生殖细胞的发育起关键性作用, 并有性别特异性。Bax 的主要作用是加速细胞凋亡, 并且是精原细胞正常发育过程中死亡所必须的^[12]。研究表明两者间可相互形成同源二聚体而发挥作用, Bcl-2 蛋白同源二聚体可抑制细胞色素 C、凋亡诱导因子的释放, 抑制细胞凋亡; Bax 蛋白是 Bcl-2 的同源基因, 为可溶性蛋白, 功能类似于穿孔素, 在高浓度时本身可启动细胞死亡, 低浓度时可使细胞器释放出一些活性分子, 引起半胱氨酸蛋白酶的活化, 并拮抗 Bcl-2 使细胞趋于凋亡^[13,14]。本实验结果表明睾丸生精细胞凋亡增多的同时, Bax 蛋白表达增高, 而 Bcl-2 蛋白表达降低, 这与文献报道相吻合。另有研究指出, 睾丸生精细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的改变可能是肾阳虚大鼠生精障碍的原因之一^[15]。

益精方是中国中医科学院广安门医院贾金铭教授应用传统的中医理论结合现代中药的药理研究, 经过

近十年临床实践总结的治疗男性不育症的有效方剂。全方由菟丝子、黄芪、仙灵脾、苍术、桑螵蛸、红花等 11 味中药组成,具有补肾填精、益气助阳、滋阴润燥的功效。主要治疗肾精亏虚、气化失司、天癸不足所致的睾丸功能障碍性男性不育症。王家辉等^[16]临床运用益精方治疗男性不育症,观察发现治疗后的精子运动速度明显提高,精子运动能力增强,受精能力提高,有利于受孕。罗少波等^[17]实验表明益精方可以通过提高 CatSper1 的表达量,增加小鼠精子密度、a + b 级和 a + b + c 级精子百分率,从而达到治疗少弱精子症的目的。焦拥政等^[18]研究结果表明益精方可以降低精子早期凋亡率,提高精子线粒体功能,这可能是益精方治疗少弱精子症的一个重要途径。本实验结果表明益精方有促进 Bcl-2 蛋白在睾丸生精细胞表达的作用,并且对 Bax 蛋白在睾丸生精细胞的表达有抑制作用,从而达到抑制细胞凋亡的作用。

综上所述,益精方对肾虚大鼠睾丸生精细胞凋亡有抑制作用,而各给药组中以中剂量组最为明显。本实验成功复制了肾虚不育大鼠的模型,并通过实验观察模型组与空白组及益精方高、中、低剂量组的细胞凋亡情况和 Bcl-2/Bax 蛋白的表达,阐释肾虚对睾丸生精细胞凋亡的影响,从而造成大鼠睾丸生精障碍。尽管本实验在动物模型的选择、药物剂量的推算以及实际操作等方面较以往有了很大的改善,但由于不育症病因病机复杂,益精方具体影响生精细胞凋亡的机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 郭应禄,胡礼泉主编.男科学[M].北京:人民卫生出版社,2004:934.
- [2] Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia[J]. J Biosci, 2003, 28(2): 163-168.
- [3] 李海松,徐庭华,王彬,等.补肾法治疗男性不育症临床研究述评[J].河南中医,2013,33(3):394-397.
- [4] 罗少波,贾金铭,马卫国,等.益精方治疗少弱精症 207 例[J].陕西中医,2010,31(4):410-413.
- [5] 宾彬,莫秋柏,陈定雄,等.强精煎对实验小鼠睾丸 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达影响研究[J].实用中医药杂志,2010,26(8):524-525.
- [6] 王家辉,陈东,周建国,等.腺嘌呤制作雄性 Wistar 大鼠肾虚型不育症动物模型最佳时效和量效的小样本研究[J].中华男科学杂志,2008,14(6):565-570.
- [7] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [8] 李蕊,刘曼丽,田心,等.不同剂量腺嘌呤诱导肾虚不育大鼠模型实验研究[J].安徽中医学院学报,2010,29(2):41-44.
- [9] 杨桂梅,黄胜华,李江,等.腺嘌呤和氧嗪酸制作高尿酸血症大鼠模型比较[J].实验动物科学,2011,28(2):23-26.
- [10] Ngai HH, Sit WH, Wan JM, et al. The nephroprotective effect of the herbal medicine preparation, WH30 + on the chemical induced acute and chronic renal failure in rats[J]. Am J Chin Med, 2005, 33(3):491-500.
- [11] Yamamoto CM, Hikim AP, Lue Y. et al. Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective over-expression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis[J]. J Androl, 2001, 22(6):981-991.
- [12] Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, et al. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis[J]. Biol Reprod, 2002, 66(4):950-958.
- [13] Hughes EG, Brennan BG. Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity[J]. Fertil Steril, 1996, 66(5):679-689.
- [14] 张长城,周安方,张茂林,等.实验性精索静脉曲张对大鼠睾丸生精细胞凋亡的影响[J].中国男科学杂志,2003,9(7):507-511.
- [15] 李欣,李建团,付广莉.肾虚大鼠睾丸生精细胞凋亡相关基因的表达[J].承德医学院学报,2007,24(2):117-119.
- [16] 王家辉,陈东,董佳晨,等.益精方加减治疗弱精症 20 例临床观察[J].实用中医内科杂志,2008,12(22):7-8.
- [17] 罗少波,贾金铭.益精方对小鼠精子尾部特异性钙通道 CatSper1 的影响[J].中华男科学杂志,2010,16(11):1047-1051.
- [18] 焦拥政,孟令东,马卫国,等.益精方对特发性少弱精子症精子凋亡和线粒体功能影响的研究[J].中华男科学杂志,2012,18(11):1045-1049.

(收稿:2013-09-27 修回:2014-02-11)