

补肾滋阴法对肾上腺皮质激素型肾阴虚大鼠 睾丸组织超微结构的影响

应 荐¹, 陈海勇², 徐福松³

(1. 上海中医药大学康复教研室, 上海 201203; 2. 香港浸会大学, 香港; 3. 江苏省中医院男科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨补肾滋阴法对肾上腺皮质激素型肾阴虚大鼠睾丸组织超微结构的影响。**方法:**30 只大鼠, 随机分为正常对照组、模型组、二地鳖甲煎治疗组, 每组 10 只。建立糖皮质激素型肾虚大鼠模型。在光学显微镜及透射电镜下观察大鼠睾丸组织结构及超微结构的变化。**结果:**模型组光学显微镜下睾丸曲细精管生精上皮变薄, 生精细胞减少; 睾丸间质水肿, 间质细胞数量减少, 胞质淡染。透射电镜下曲细精管生精上皮细胞结构松散; 睾丸间质细胞胞浆内线粒体变性, 溶酶体增多, 胞质内有大量空泡, 可见染色质边聚和细胞核固缩现象。二地鳖甲煎治疗组病理改变明显减轻。**结论:**补肾滋阴药二地鳖甲煎能拮抗糖皮质激素诱导的大鼠睾丸病理改变。

[关键词] 补肾; 滋阴; 睾丸; 性激素; 大鼠

[中图分类号] R69 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)06-0620-04

Effects of herbs for replenishing yin to tonify kidney on testicular ultra-structural changes in rats with glucocorticoid-induced kidney deficiency

Jian YING¹, Hai-Yong CHEN², Fu-Song XU³

(1. Department of Rehabilitation, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China; 3. Department of Andrology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu Province 210029, China)

ABSTRACT **Objective:** To investigate the effects of herbs for replenishing yin to tonify kidney on testicular ultrastructural changes in rats with glucocorticoid-induced kidney deficiency. **Methods:** Thirty rats were randomized into three groups: normal control group, untreated group and Erdi Biejia Decoction (EDBJD)-treated group. Kidney deficiency rat model was induced by glucocorticoid. Testicular structure and ultrastructure were observed under the light microscope and the transmission electron microscope. **Results:** The light microscope revealed the decreased thickness of seminiferous epithelium layer, reduced number of spermatogenic cells, interstitial tissue edema, and a qualitative reduction in the number of interstitial cells and hematoxylin-eosin stained cytoplasm in the untreated group. The transmission electron microscope revealed loose structure of seminiferous epithelium, degenerative mitochondria, and increased amounts of lysosome, presence of numerous cytoplasmic vacuolation and chromatin in interstitial cell cytoplasm in the untreated group. The aggregates of heterochromatin around the nuclear membrane and the shrinkage of nucleus were also observed. Compared to the untreated group, these pathological changes were inconspicuous in EDBJD-treated group. **Conclusion:** EDBJD as replenishing yin to tonify kidney herbs can suppress glucocorticoid induced pathological changes in the testes of rats.

[基金项目] 上海市重点学科建设资助项目(No. T0304)

Correspondence to: Jian YING. E-mail: yingjian37@hotmail.com

KEY WORDS reinforcing kidney; nourishing yin; testis; ultrastructure; sex hormones; rats

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao/J Chin Integr Med, 2006, 4(6): 620-623 www.jcimjournal.com

勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)是男性最常见的一种性功能障碍。据统计 40~70 岁男子中有 52% 患有不同程度的 ED^[1], 因此必须加强对 ED 的诊断和治疗研究。但 ED 的病理机制目前尚不明确, 但可以肯定的是 ED 的发生与神经、内分泌、血管及心理和药物等因素密切相关。近年来, 有关阴茎勃起的基础研究已经有所突破, 其中 NO-cGMP 通路调控作用的发现是最重要的^[2]。目前 ED 的研究多从 NO 学说和阴茎局部入手, 而神经、内分泌以及全身整体调节等方面对阴茎勃起的影响研究并不多。而中医药临床治疗 ED 的思路正是通过调整神经、内分泌系统, 从而达到整体调节的目的。本研究观察了肾上腺皮质激素型大鼠睾丸组织超微结构, 以及补肾滋阴中药二地鳖甲煎对肾上腺皮质激素型大鼠睾丸组织的影响, 从神经内分泌角度探讨中医药治疗 ED 的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂 二地鳖甲煎由生地黄、熟地黄、菟丝子、茯苓、枸杞子、金樱子各 10 g, 鳖甲(先煎)、牡蛎(先煎)各 20 g, 牡丹皮、丹参、天花粉、续断、桑寄生各 10 g 组成, 具有补肾滋阴之效。由南京中医药大学植物药深加工中心制备; 氯化可的松注射液, 规格 10 mg(2 ml)/支, 由北京市第三制药厂生产(批号 020301)。PBS 液、1% 四氧化钼液、饱和醋酸铀染色液、5% 戊二醛等均由南京医科大学江苏省生殖医学中心提供; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液由南京中医药大学病理学教研室提供。

1.2 实验仪器 Jeol 1010 型透射电子显微镜, 由日本电子公司生产; LEICA 型超薄切片机, 由德国 Hermalce 公司生产; U-ND25-2 型 Olympus 荧光多功能显微镜, 由日本 Olympus 公司生产。

1.3 动物分组与造模 清洁级雄性 30 日龄 SD 大鼠 30 只, 由南京中医药大学动物实验中心提供。随机分为 3 组: 正常对照组、模型组和二地鳖甲煎(Erdi Biejia Decoction, EDBJD)治疗组, 每组 10 只。参照《中药药理研究方法学》^[3], 采用肾上腺皮质激素型模型建立法, 建立糖皮质激素型肾阴虚模型。以上 3 组大鼠, 除正常对照组皮下注射灭菌生理盐水外, 其余 2 组均皮下注射醋酸氢化可的松注射液, 45 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 用药 6 d。

1.4 给药方法 造模后第 7 天开始, 正常对照组和模型组大鼠予蒸馏水 20 ml/kg 灌胃; 二地鳖甲煎治疗组予二地鳖甲煎混悬液(40 g·kg⁻¹·d⁻¹) 20 ml/kg 灌胃; 每天上午 9:00~10:00 时处理 1 次, 连续 2 周。

1.5 标本采集及镜下观察 末次给药后 2 h, 脱颈处死各组大鼠, 取出两侧睾丸。将右侧睾丸组织迅速投置于 10% 中性福尔马林中固定; 酒精脱水后, 用二甲苯透明, 浸腊、包埋; 由切片机制成 2~3 μm 厚的石蜡切片, 并进行脱腊; HE 染色, 再脱水、透明, 最后滴加树胶封片; 在光学显微镜下读片。

将摘取的左侧睾丸, 迅速在 4℃ 环境下, 用 5% 戊二醛固定 2 h; 1 500 r/min PBS 离心清洗 3 次, 5 min/次; 4℃ 环境下, 1% 四氧化钼固定 2 h; 再用 PBS 液清洗 5 min; 4℃ 环境下, 饱和醋酸铀染色 2 h; 50%、70%、90% 和 100% 丙酮梯度脱水(2 次/级, 15 min/次); 树脂浸渍、包埋, 60℃ 烘箱内聚合 36 h; 用超薄切片机制作成 600~700 Å 超薄切片; 铅染色 5 min; 在透射电子显微镜上观测。

2 结 果

光学显微镜下, 睾丸曲细精管生精上皮变薄或腐脱; 生精细胞明显减少, 部分管腔可见大量生精细胞脱落; 各级生精细胞排列紊乱、连接松散。睾丸间质水肿, 间质细胞数量减少, 间质细胞质的改变呈现去分化现象, 失去系列结构特征, 表现出类似于成纤维细胞或呈现明显的退化现象, 被周围的结缔组织纤维包围, 细胞皱缩, 细胞质淡染。经二地鳖甲煎给药后, 病理改变好转。见图 1、2。

透射电子显微镜下, 正常睾丸间质细胞, 除了含有胞浆的普通成分外, 可见管状嵴线粒体, 还可见丰富的滑面内质网, 内质网的膜管纵横交错排列, 以此吻合成网, 显示出有分泌固醇类细胞的形态特点。肾虚模型组标本透射电子显微镜下, 曲细精管生精上皮细胞结构松散, 细胞呈空泡变性, 有的细胞核内出现包含物; 睾丸间质细胞胞浆内线粒体变性、嵴模糊不清, 滑面内质网、脂滴及类脂质减少, 溶酶体增多, 胞质内有大量空泡、自噬泡和脂褐素, 甚至出现大的晶体结构, 可见染色质边聚和核固缩现象。经二地鳖甲煎给药后, 透射电子显微镜下可见标本病理改变好转。见图 3、4。

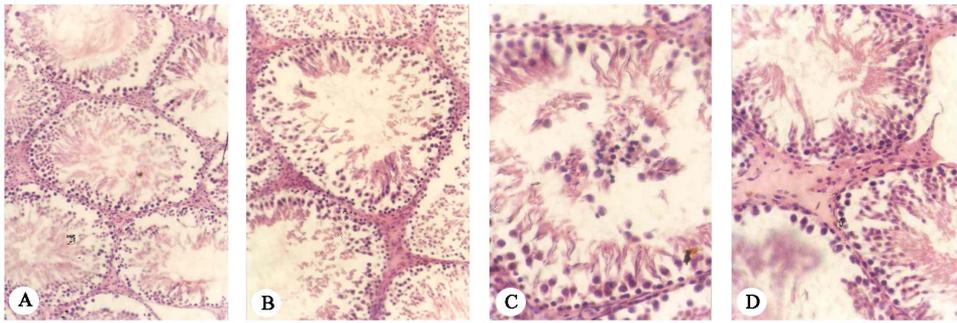


图 1 光学显微镜下模型组大鼠睾丸组织形态学变化

Figure 1 Morphological changes of testicular tissue of a rat in untreated group by an optical microscope.

HE staining. A: $\times 100$; B: $\times 400$; C: $\times 400$; D: $\times 400$.

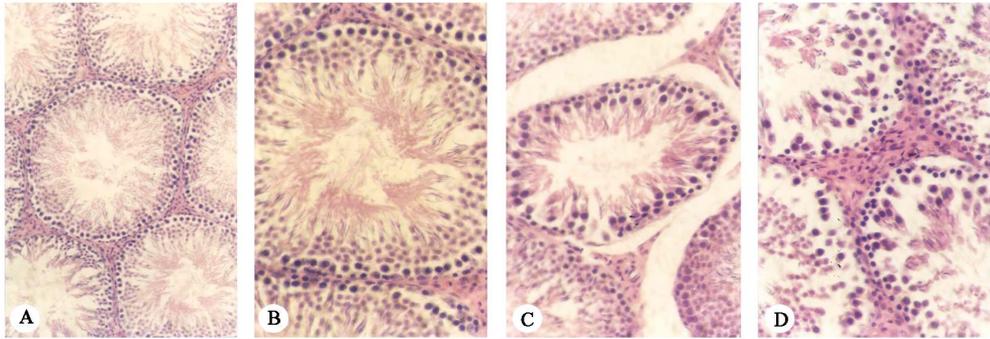


图 2 光学显微镜下二地鳖甲煎治疗组大鼠睾丸组织形态学变化

Figure 2 Morphological changes of testicular tissue of a rat in EDBJD-treated group by an optical microscope.

HE staining. A: $\times 100$; B: $\times 400$; C: $\times 400$; D: $\times 400$.

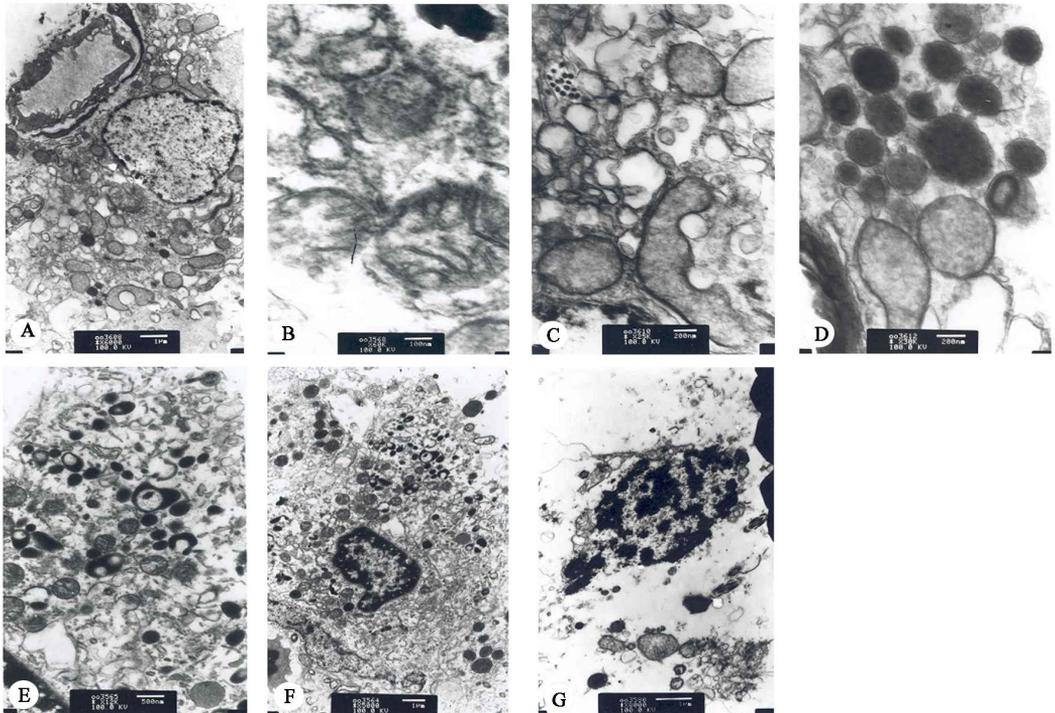


图 3 电子显微镜下模型组大鼠睾丸组织超微结构

Figure 3 Ultrastructure of testicular tissue of a rat in untreated group by an electron microscope.

A: $\times 6\ 000$; B: $\times 60\ 000$; C: $\times 25\ 000$; D: $\times 30\ 000$; E: $\times 12\ 000$; F: $\times 5\ 000$; G: $\times 8\ 000$.

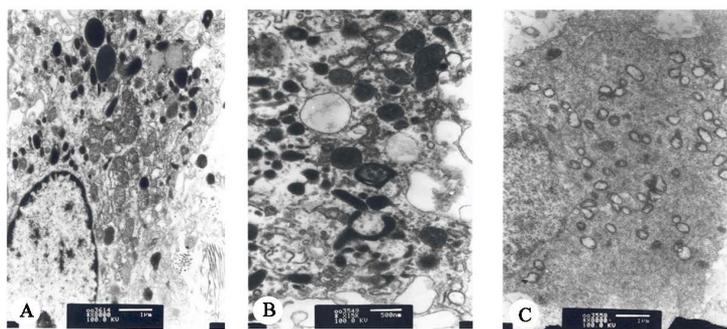


图 4 电子显微镜下二地鳖甲煎治疗组大鼠睾丸组织超微结构

Figure 4 Ultrastructure of testicular tissue of a rat in EDBJD-treated group by an electron microscope.

A: $\times 8\ 000$; B: $\times 15\ 000$; C: $\times 8\ 000$.

3 讨论

我们的前期研究发现:补肾中药很可能是通过对生物体多系统、多层次、多靶点的综合调节来改善和恢复性功能,决不是单纯的类性激素药物^[4]。

二地鳖甲煎方通过补益肝肾,收摄君相二火,达到补益肾精,使机体整体状态得到调整,进而达到治疗 ED 的目的。

对去势大鼠 ED 模型进行实验研究,发现去势的动物阴茎勃起功能明显减弱^[5];临床亦发现严重性腺机能低下的病人,夜间正常生理性阴茎勃起反应均消失^[6]。睾丸间质细胞中睾酮合成水平是由单个间质细胞合成睾酮能力和睾丸内间质细胞总的数量决定的。有学者发现:因情绪紧张或其他因素引起的睾酮水平降低是由于高浓度糖皮质激素直接抑制了睾丸间质细胞中睾酮的合成^[7,8]。已有研究证实,糖皮质激素能抑制睾丸间质细胞中睾酮合成相关酶的活性,导致细胞合成睾酮的能力降低^[9]。还有文献报道,人工合成的糖皮质激素,能诱导大鼠睾丸间质细胞凋亡^[10]。

雄激素参与中枢神经系统多巴胺能神经元的突触连接,对勃起中枢具有调节作用^[11];许多盆腔神经反射弧的构成成分受睾酮的调控,在 NO 的调控过程中睾酮亦起了重要的维持作用。有学者进一步证实,雄激素睾酮和双氢睾酮能恢复 NOS 活性,维持 NO 介导的大鼠阴茎勃起^[12]。因此,睾丸间质细胞的过度凋亡使雄激素水平下降,必然导致性功能和性行为失常,发生 ED。

本研究发现肾虚模型组睾丸间质细胞出现胞浆空泡化、滑面内质网减少、染色质团聚、核固缩、凋亡小体形成等现象,可见睾丸间质细胞发生了显著的细胞凋亡,而二地鳖甲煎能抑制睾丸间质细胞凋亡。这很可能是中医药补肾疗法治疗 ED 的机制之一。

[参考文献]

- 1 朱积川. 男子勃起功能障碍诊治指南. 中国男科学杂志, 2004, 18(1): 68-72.
- 2 Sezen SF, Burnett AL. Intracavernosal pressure moni-

- toring in mice; responses to electrical stimulation of the cavernous nerve and to intracavernosal drug administration. *J Androl*, 2000, 21(2): 311-315.
- 3 陈奇. 中药药理研究方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- 4 应荐, 李彪, 贺菊乔. 清宫龙凤宝抗阳痿的实验研究. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(7): 27-29.
- 5 Mills TM, Dai YT, Stopper VS, *et al.* Androgenic maintenance of the erectile response in the rat. *Steroids*, 1999, 64(9): 605-609.
- 6 Granata AR, Rochira V, Lerchl A, *et al.* Relationship between sleep-related erection and testosterone levels in men. *J Androl*, 1997, 18(5): 522-527.
- 7 Monder C, Sakai RR, Miroff Y, *et al.* Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 1994, 134(4): 1193-1198.
- 8 Gao HB, Shan LX, Monder C, *et al.* Suppression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology*, 1996, 137(5): 1714-1718.
- 9 Welsh TH Jr, Bambino TH, Hsueh AJ. Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol Reprod*, 1982, 27(5): 1138-1146.
- 10 Morris AJ, Taylor MF, Morris ID. Leydig cell apoptosis in response to ethane dimethanesulphonate after both in vivo and in vitro treatment. *J Androl*, 1997, 18(3): 274-280.
- 11 Heaton JP, Varrin SJ. Effects of castration and exogenous testosterone supplementation in an animal model of penile erection. *J Urol*, 1994, 151(3): 797-800.
- 12 Lugg JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology*, 1995, 136(4): 1495-1501.