

• 短篇论著 •

菟丝子对热应激小鼠精子生成数量及活力的影响

韩洪军 金玉姬 王光慧 董传兴 别鹏飞 安家慧 陈为

【摘要】 目的 研究不同浓度的菟丝子对热应激小鼠精子生殖系统的影响。**方法** 将100只出生后8周健康清洁级昆明小鼠随机分为5组,分别为对照组、喂水组、精氨酸组、低浓度菟丝子组和高浓度菟丝子组。喂水组、精氨酸组、菟丝子低浓度组和菟丝子高浓度组放于41℃恒温培养箱中2h。造模后菟丝子组灌服菟丝子煎剂(高浓度100 mg/ml和低浓度20 mg/ml),精氨酸组灌服精氨酸制剂(20 mg/ml),喂水组灌服蒸馏水,剂量均为0.01 ml/g,每日一次,连续进行28 d和42 d。在第28天,从各组随机取出10只小鼠处死,其余小鼠在第42天处死。测定睾丸和附睾重量,计数各组小鼠精子数、顶体完整率及精子活力。**结果** 实验中测量各组小鼠的睾丸重、附睾重、精子数、顶体完整率、精子活力等指标,比较各项指标发现:菟丝子组和喂水组及对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);菟丝子低浓度组和精氨酸组相比无差异($P > 0.05$);菟丝子高浓度组和菟丝子低浓度组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);菟丝子高浓度组和精氨酸组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 菟丝子能够明显促进热应激小鼠睾丸和附睾损伤后的修复,能够增加小鼠精子数,增强小鼠精子生成的质量和活力,同时在一定范围内菟丝子浓度越高,促进作用越强,而且一定范围内高浓度菟丝子的促进作用强于精氨酸。

【关键词】 菟丝子 Δ ; 精氨酸; 热应激小鼠; 顶体完整率

菟丝子始载于《神农本草经》,为旋花科一年生寄生性蔓草植物菟丝子的成熟种子。菟丝子含生物碱、萜醌、香豆素、黄酮、甙类、甾醇、鞣酸、糖类等,亦含微量元素以及多种氨基酸,主产于山东惠民、聊城、莱阳,河北沧县、大城、青县及天津、山西、辽宁、河南、江苏等地。其功效是补益肝肾,固精缩尿。在现代临床机制中,菟丝子可提高巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数,能提高睾丸的重量,增加精子生成量及活力^[1]。菟丝子黄酮能促进下丘脑-垂体促性腺功能,提高垂体对促性腺释放激素的反应性,促进卵泡发育,可明显增加雄鼠睾丸及附睾的重量^[2]。研究发现菟丝子黄酮能明显促进大鼠腺垂体、睾丸及附睾的发育,能明显促进离体大鼠间质细胞睾酮的基础分泌,还能提高间质细胞对人绒毛膜促性腺激素(hCG)的反应性,增加睾丸对hCG的结合力^[3]。但是目前菟丝子对于热应激小鼠精子生成的影响却未见报道,本文作者用体内实验的方式,用菟丝子对热应激小鼠生殖系统的作用进行了实验研究,现报道如下。

一、材料和方法

1. 实验动物:实验所用小白鼠来自吉林大学动物实验中心,昆明种,雄性,100只,8周,体重在40~45 g,实验动物合格证号为SCXK-(吉)2011-0001。小鼠饲养在无特异病原的环境下。室温设定在22℃,相对湿度为(65±5)%,调控光照时间为12 h,按窝进行喂养,每窝4~5只小鼠,常规给水和饲料。每周换2次饲料和铺垫。

2. 各种试剂:菟丝子购自吉林市同仁堂药店,符合药典规定之正品。NaH₂PO₄·2H₂O(北京康普汇维科技有限公司),Na₂HPO₄·12H₂O(北京康普汇维科技有限公司),MgCO₃(无锡市泽辉化工有限公司),甲醛(无锡苏阳化工有限公司),1%刚果红

(批号为B11000118,上海创赛科学仪器有限公司),5%苯胺兰(批号为2008-02-20,天津市北方天医化学试剂厂)。

3. 各种仪器:DK-420S型恒温水浴箱(北京中仪伟信科技有限公司),体式显微镜(南京波长光电有限公司),白细胞计数板(北京东迅天地医疗仪器有限公司)。

4. 小鼠热应激模型的建立:将80只小鼠放于41℃恒温培养箱中2 h,要求小鼠睾丸完全浸在水中。另20只小鼠作为对照组,不做处理。

5. 给药实验及指标检测:将已造模小鼠随机分为喂水组,精氨酸组,菟丝子低浓度组,菟丝子高浓度组,每组20只。各组每日灌服相应的制剂,剂量为0.01 ml/g。菟丝子组每天灌服菟丝子煎剂(高浓度100 mg/ml和低浓度20 mg/ml),精氨酸组每天灌服精氨酸制剂(20 mg/ml),喂水组每天灌服蒸馏水(0.01 ml/g)。考虑到热应激效应后的恢复损伤时间以及精子发育过程大约需要6周时间^[4],选定4周作为阶段性对照,每日灌药一次,连续4周,于末次给药,各组随机抽取10只小鼠处死,检测各项指标,其余小鼠继续每日灌药一次,2周后处死小鼠,检测各项指标。

6. 指标检测:操作在超净工作台上。从每窝中随机抽取1只雄性仔鼠,处死后酒精喷洒体表消毒。迅速取出睾丸(连同附睾),用电子天平称重,用镊子夹住附睾尾部末端,剥离附睾尾周围的脂肪和血管,沿镊子夹取部位剪下双侧附睾尾后投入到盛有1 ml生理盐水的塑料培养皿中,用眼科剪刀沿管腔剪开。把培养皿置于37℃,5% CO₂的培养箱中温育15 min,使精子自由浮动后移出至培养皿。用可调微量移液器吸取精子悬液,用1%刚果红和5%苯胺兰对死亡精子进行染色,一个样本涂片3张,在400倍光学显微镜下观察,计数200个精子中的死精子数,每张片子计数2次,计算小鼠的精子活力(精子活力=向前移动精子数/精子总数×100%)。同时观察顶体完整率(顶体完整率=顶体完整数/精子总数×100%)^[4]。

7. 统计学分析:所有实验均重复3次,实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 11.5软件进行统计学分析。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.16.117

基金项目:吉林医药学院大学生科研基金(吉医学科学[2011]第02号)

作者单位:132013 吉林市,吉林医药学院基础医学院组胚教研室

通讯作者:金玉姬,Email:yujijin90@yahoo.com.cn

表1 各组小鼠睾丸重、附睾重、精子总数、顶体完整率及精子活力的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 28 d | | | | |
|---------|----|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 睾丸重(g) | 附睾重(g) | 精子数($\times 10^6$ /ml) | 顶体完整率(%) | 精子活力(%) |
| 对照组 | 20 | 0.142 ± 0.042 | 0.045 ± 0.002 | 6.12 ± 0.21 | 90.45 ± 5.23 | 80.69 ± 3.74 |
| 喂水组 | 20 | 0.126 ± 0.025 | 0.025 ± 0.001 | 1.35 ± 0.46 | 57.25 ± 1.89 | 32.41 ± 1.07 |
| 精氨酸组 | 20 | 0.160 ± 0.047 | 0.051 ± 0.003 | 6.62 ± 0.51 | 91.22 ± 2.01 | 82.04 ± 4.22 |
| 菟丝子低浓度组 | 20 | 0.164 ± 0.017 ^{ac} | 0.053 ± 0.002 ^{ac} | 7.02 ± 0.28 ^{ac} | 91.27 ± 3.09 ^{ac} | 83.27 ± 1.08 ^{ac} |
| 菟丝子高浓度组 | 20 | 0.173 ± 0.063 ^b | 0.062 ± 0.004 ^b | 7.72 ± 0.33 ^b | 92.15 ± 2.13 ^b | 90.38 ± 3.05 ^b |
| 组别 | 只数 | 42 d | | | | |
| | | 睾丸重(g) | 附睾重(g) | 精子数($\times 10^6$ /ml) | 顶体完整率(%) | 精子活力(%) |
| 对照组 | 20 | 0.169 ± 0.019 | 0.058 ± 0.003 | 6.92 ± 0.38 | 93.71 ± 3.26 | 83.37 ± 2.45 |
| 喂水组 | 20 | 0.141 ± 0.032 | 0.043 ± 0.002 | 3.42 ± 0.41 | 75.38 ± 2.31 | 58.62 ± 1.73 |
| 精氨酸组 | 20 | 0.182 ± 0.045 | 0.068 ± 0.004 | 7.12 ± 0.20 | 94.10 ± 5.83 | 84.82 ± 3.02 |
| 菟丝子低浓度组 | 20 | 0.188 ± 0.058 ^{ac} | 0.072 ± 0.006 ^{ac} | 7.48 ± 0.14 ^{ac} | 95.30 ± 4.12 ^{ac} | 85.64 ± 3.21 ^{ac} |
| 菟丝子高浓度组 | 20 | 0.221 ± 0.036 ^b | 0.084 ± 0.002 | 8.25 ± 0.44 ^b | 96.05 ± 2.67 ^b | 92.58 ± 1.27 ^b |

注:菟丝子组和喂水组及对照组相比, $P < 0.05$;与精氨酸组相比,^a $P > 0.05$,^b $P < 0.05$;与菟丝子高浓度组相比,^c $P < 0.05$

多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One Way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时,若方差齐时,采用SNK检验;若方差不齐时,采用Games-Howell检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

实验各组小鼠的睾丸重量、附睾重量、精子总数及顶体完整率和精子活力,结果见表1。实验表明菟丝子能够促进热应激小鼠睾丸、附睾的生长发育,促进热应激小鼠生精的功能,对热应激小鼠的精子有保护作用,能明显改善热应激小鼠的精子活力,表明在一定范围内浓度越大,菟丝子的促进作用越强。

三、讨论

热应激是指高温环境中的机体对于热环境对机体提出的任何要求所作出的反应的总和。随着全球气候变暖,热应激对人类健康和动物繁殖、饲养的危害越来越受到人们的关注,各项研究也如期而至。姜忠玲^[5]的实验证明,在42℃的热应激处理下,小鼠附睾内精子密度和顶体完整率,随着热应激持续时间的延长而不断降低,畸形率则不断升高。李德军等^[6]的研究进一步表明,热应激能够降低小鼠的精子数,并损伤小鼠的精子。林飞宏等^[7]及周宏超等^[8]的研究则从各个方面系统阐释了热应激不仅对小鼠的生殖系统有伤害,对于其他系统同样有伤害。热应激不但对小鼠有伤害,在现实生活中,热应激对于农业生产也有很大的损害,据de S Torres-Júnior等^[9]研究,热应激能减慢牛卵巢内卵泡的发育,对于热应激效应,机体内会发生相应的防御反应。据Selim等^[10]的研究,小鼠在发生热应激反应的时候,机体内会产生热休克蛋白来保护机体。另外Collier等^[11]发现机体对于热应激的反应是由基因控制的,相关的基因会改变机体的能量代谢来适应热应激。对于目前的抗热应激药物,主要有精氨酸、维生素等。曾春花^[12]研究,精氨酸能通过非激素途径或间接的激素途径来改善弱精症。此外,精氨酸在体外能改善弱精子症患者精子运动功能,并且能提高精子的顶体反应率。据Memon等^[13]研究,维生素能够促进热应激肉鸡体重增加。除此之外,Sahin等^[14]研究发现维生素还能促进热应激肉鸡的食欲。目前对于中药在抗热应激效应方面的研究还很少,尤其在

治疗和恢复热应激小鼠各系统功能方面的研究鲜见报道。笔者希望通过对传统的生精药物在抗热应激方面的研究,来探索抗热应激的新药。菟丝子作为传统中药,有固精缩尿、补益肝肾的功效,正是基于此,笔者才将菟丝子作为对抗热应激药物,应用于对热应激小鼠生殖系统的研究。

我们用小鼠活体实验,第一次进行菟丝子对热应激刺激后的对雄性小鼠睾丸受伤后的补救效应。实验结果明确提示:菟丝子能明显提高热应激小鼠精子生成的数量,同时改善精子生成的质量。而且在一定范围内,高浓度的菟丝子对于促进小鼠精子生成及活力方面优于精氨酸。其原因很可能是菟丝子黄体酮能促进下丘脑-垂体促性腺功能,提高垂体对促性腺释放激素的反应性。但对于菟丝子的抗热应激效应的具体作用细胞和作用途径以及产生机制等需深入研究。此外,对于其他传统的生精药物鹿茸、淫羊藿、枸杞等在抗热应激效应方面的作用,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李炳照,陈海霞,李丽萍,等. 中医方剂双解与临床实用. 北京:科学技术文献出版社,2008.
- [2] 柯江维,王建红,赵宏. 菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠海马-下丘脑-垂体-卵巢轴性激素受体的影响. 中草药,2006,37:90-92.
- [3] 余白蓉,秦达念,杨绮华. 菟丝子黄酮与淫羊藿黄酮对雄性生殖功能影响对比研究. 中华实用中西医,2003,3:842-844.
- [4] 房磊,吴瑕,杨晨. 鹿茸对昆明小鼠精子质量的影响. 畜禽业,2011,266:42-43.
- [5] 姜忠玲. 热应激对小鼠附睾内精子的形态学影响. 黑龙江动物繁殖,2009,6:2-4.
- [6] 李德军,田文儒,刘运枫,等. 热应激对鼠精液质量的研究. 黑龙江畜牧兽医,2010,52:101-102.
- [7] 林飞宏,宋代军. 畜禽热应激的生理变化. 饲料研究,2007,29:27-30.
- [8] 周宏超,杨鸣琦. 热应激对鸡的影响及抗热应激药物. 动物医学进展,2000,20:35-38.
- [9] de S Torres-Júnior JR, de FA Pires M, de Sá WF, et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in Bos indicus cattle. Theriogenology, 2008, 15:155-166.
- [10] Selim ME, Rashedel HA, Aleisa NA, et al. The protection role of heat

- shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation*, 2012, 6:58-64.
- [11] Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, et al. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci*, 2008, 91:445-454.
- [12] 曾春花. 精氨酸硫酸锌胶囊治疗少弱精子症的临床和作用机制的研究. 华中科技大学同济医学院硕士研究生学位论文, 2007.
- [13] Memon A, Qureshi NA, Rind MI. Effect of two commercial anti-stress drugs on the growth of artificially induced stressed broilers. *Pakistan Vet*, 2001, 21:36-38.
- [14] Sahin K, Kucuk O, Sahin N, et al. Optimal dietary concentration of vitamin E for alleviating the effect of heat stress on performance, thyroid status, ACTH and some serum metabolite and mineral concentrations in broilers. *Vet Med Czech*, 2002(4):110-116.

(收稿日期:2012-05-03)

(本文编辑:戚红丹)

韩洪军, 金玉姬, 王光慧, 等. 菟丝子对热应激小鼠精子生成数量及活力的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6(16):4909-4911.

