

· 基础研究 ·

腺嘌呤致大鼠睾丸损伤中标志酶的变化及淫羊藿总黄酮的干预作用*

张作涛¹, 谢高宇¹, 陈 凯², 齐敏友², 刘浩然^{3△}

(1. 贵阳中医学院基础医学院解剖学教研室 550002; 2. 浙江工业大学药学院药理教研室, 杭州 310042; 3. 湖南大学化学化工学院药理学教研室, 长沙 410082)

摘要:目的 研究淫羊藿总黄酮(TFE)对腺嘌呤致大鼠睾丸损伤中标志酶的干预作用。方法 将 70 只 Sprague Dawley 雄性大鼠随机分为 5 组: 正常对照组(蒸馏水灌胃)、模型组(蒸馏水灌胃)、TFE 组(TFE 100 mg/kg 灌胃)、维生素 E 组(维生素 E 10 mg/kg 灌胃)和甲基睾酮组(甲基睾酮 5 mg/kg 灌胃), 每组 14 只。除正常对照组外, 其余每组大鼠均予腺嘌呤 150 mg/kg 灌胃 14 d 建立大鼠睾丸病变模型, 第 15 天开始各组大鼠分别给予相应处理。30 d 后处死大鼠, 称量睾丸、附睾、精囊腺及大鼠质量, 计算脏器指数; 检测血清睾酮、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH); 睾丸中乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)、谷氨酰转氨酶(γ -GT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力及丙二醛(MDA)含量。结果 与正常对照组比较, 模型组各性腺脏器指数下降, 血清睾酮下降, 睾丸中 LDH、ACP 及 γ -GT 活力降低, MDA 含量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, TFE 组大鼠脏器指数、血清睾酮水平及特异性酶类活力提高($P < 0.05$)。结论 TFE 可能通过促进睾酮释放及抗氧化作用而显著提高腺嘌呤致大鼠睾丸损伤中标志酶活力。

关键词: 黄酮类; 淫羊藿属; 腺嘌呤; 睾丸; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)07-0683-03

Alteration of marker enzymes in adenine-induced impaired testis and the interference of total flavonoids of herba epimedii in rats*

Zhang Zuotao¹, Xie Gaoyu¹, Chen Kai², Qi Minyou², Liu Haoran^{3△}

(1. Department of Anatomy, Basic Medical College, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences of Zhejiang University of Technology, Zhejiang, Hangzhou 310042, China; 3. Department of Pharmacology, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China)

Abstract: Objective To study the interference effect of total flavonoids of herba epimedii(TFE) on marker enzymes in adenine-induced impaired testis in rats. **Methods** 70 Sprague Dawley male rats were randomly divided into 5 groups of 14 rats each: normal control group(intravenous infusion of distilled water), model group(gastric perfusion of distilled water), TFE group(gastric perfusion of TFE 100 mg/kg), Vitamin E group(gastric perfusion of vitamin E 10 mg/kg) and methyl testosterone group (gastric perfusion of methyl-testosterone 5 mg/kg), Except rats in normal group, those in the rest groups were subjected to gastric perfusion of adenine 150 mg/kg for 14 days to establish the rat models of testicular lesion. Rats in each group were accepted corresponding treatment from the 15th day, and then sacrificed after 30 days. The mass of testis, epididymis, seminal vesicles and rats were weighed, and the organ indexes were calculated. Serum testosterone, follicle-stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone (LH) and testicular lactate dehydrogenase (LDH), acid phosphatase (ACP), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) content were detected. **Results** Compared with the normal control group, the gonadal organ indexes, serum testosterone value and testicular LDH, ACP, γ -GT activity decreased, while MDA content increased in model group, with significantly difference($P < 0.05$). The rats organ indexes, serum testosterone levels and specific enzyme activity were increased in TFE group when compared to those in model group($P < 0.05$). **Conclusion** TFE may improve the activity of marker enzymes in adenine-induced impaired testis through promoting the testosterone release and anti-oxidation.

Key words: flavones; epimedium; adenine; testis; rats

腺嘌呤为制作慢性肾功能衰竭动物模型的常用试剂^[1], 但研究发现它也可造成下丘脑-垂体-性腺轴的损害, 引起睾丸退化性病变^[2]。淫羊藿为补肾壮阳的常用中药。本实验以中药化学技术提取分离淫羊藿的总黄酮成份, 干预腺嘌呤所诱导的大鼠睾丸病变, 观察其药物疗效。

1 材料与方法

1.1 药物、主要试剂及仪器 腺嘌呤(Adenine)为美国 AMRESKO 公司产品, 由南京生兴生物技术有限公司分装(批号: 1012S07)。淫羊藿总黄酮(total flavonoids of herba epimedii, TFE)由湖南中医药大学科研中心提供, 含总黄酮达

77.4%；维生素 E 购自西南合成制药股份有限公司（批号：101214）；甲基睾酮购自天津飞鹰制药股份有限公司（批号：101103）；乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒由南京建成生物工程有限公司提供。睾酮、促卵泡成熟激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)检测试剂盒由天津九鼎生物工程有限公司提供。主要仪器包括 SP-752 分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、HH-4 数显恒温水箱(金坛环宇科学仪器有限公司)、GC-1200 γ 放射免疫计数器(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

1.2 TFE 的提取 小檗科植物淫羊藿经石油醚脱脂,以 70% 乙醇提取,聚酰胺柱层析分离^[3]。以盐酸-镁粉法及薄层层析初步检识为黄酮类。参照中国药典 TFE 测定方法,以淫羊藿苷为参照化合物,采用紫外分光光度法在 270 nm 处检测总黄酮含量为 77.2%。

1.3 腺嘌呤致大鼠睾丸病变模型的制作 Sprague Dawley 雄性大鼠 70 只,180~220 g,由浙江医学科学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)2008-0033。将其随机分为 5 组:正常对照组、模型组、TFE 组、维生素 E 组和甲基睾酮组,每组 14 只。除正常对照组外,其余每组大鼠均予腺嘌呤 150 mg/kg 灌胃,1 次/d,连续 14 d,建立大鼠睾丸病变模型^[4]。从第 15 天开始,正常对照组与模型组大鼠予蒸馏水灌胃。TFE 组、维生素 E 组和甲基睾酮组大鼠分别予 TFE 100 mg/kg,维生素 E 10mg/kg 及甲基睾酮 5 mg/kg 灌胃,均 1 次/d。30 d 后处死大鼠,检测相关指标。

1.4 观察指标

1.4.1 脏器指数 处死大鼠,取出睾丸、附睾、精囊腺,精密称量上述脏器及大鼠质量并计算脏器指数,脏器指数=脏器质量/体质量。

1.4.2 生化检测 取大鼠血清以放射免疫法检测睾酮、FSH 及 LH 含量。取同一侧睾丸组织以生理盐水制成匀浆,检测 LDH、ACP、 γ -GT、SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量。

1.5 统计学处理 采用 PASW18.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TFE 对性腺及附属性器官脏器指数的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠睾丸、附睾、精囊腺与体质量的比值(脏器指数)均有下降($P < 0.05$),其中睾丸、精囊腺的脏器指数下降较为明显。与模型组比较,TFE 组、维生素 E 组及甲基睾酮组大鼠睾丸指数分别提高 35.9%、25.3% 及 38.5%;TFE 组及甲基睾酮组大鼠精囊腺指数分别提高 43.5%、34.4%;TFE 组、维生素 E 组及甲基睾酮组大鼠的附睾指数略有提高,但无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 TFE 对睾丸中 γ -GT、LDH、ACP 及睾酮的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠睾丸中 γ -GT、LDH、ACP 活力分别下降 46.0%、49.3%、50.8%($P < 0.05$)。TFE 及甲基睾酮组大鼠 γ -GT 活力相对于模型组提高 33.9%、27.7%、35.7%;TFE、维生素 E 及甲基睾酮组 ACP 活力相对于模型组分别提高 40.4%、19.6%、27.5%。见表 2。

表 1 TFE 对腺嘌呤致衰老大鼠睾丸、附睾、精囊腺脏器指数的影响

组别	n	药物剂量 (mg/kg)	睾丸	附睾	精囊腺
正常对照组	14	—	5.23±0.56	1.41±0.21	2.12±0.43
模型组	11	—	3.12±0.47*	1.03±0.24 [△]	1.31±0.18*
TFE 组	12	100	4.24±0.55 [#]	1.14±0.27	1.88±0.37 [#]
维生素 E 组	12	10	3.91±0.61 [#]	1.09±0.22	1.55±0.26
甲基睾酮组	11	5	4.32±0.66 [#]	1.22±0.19	1.76±0.35 [#]

*: $P < 0.01$,[△]: $P < 0.05$,与正常对照组比较;[#]: $P < 0.01$,与模型组比较;—:表示此项目无数据。

表 2 TFE 对腺嘌呤致衰老大鼠睾丸中 γ -GT、LDH 及 ACP 的影响

组别	n	药物剂量(mg/kg)	γ -GT (U/g protein)	LDH (U/g protein)	ACP (U/g protein)
正常对照组	14	—	174.6±42.9	3470.9±729.5	193.8±28.4
模型组	11	—	94.2±20.8*	1759.8±259.2*	95.4±22.9*
TFE 组	12	100	126.1±33.5 [#]	2261.3±298.4 [#]	133.9±23.3 [#]
维生素 E 组	12	10	103.9±28.7	2204.7±531.8 [△]	114.1±17.5 [△]
甲基睾酮组	11	5	120.3±31.9 [△]	2211.9±342.1 [#]	121.6±29.1 [#]

*: $P < 0.01$,[△]: $P < 0.05$,与正常对照组比较;[#]: $P < 0.01$,与模型组比较;—:表示此项目无数据。

表 3 TFE 对腺嘌呤致衰老大鼠睾丸中 SOD、GSH-Px 及 MDA 的影响

组别	n	药物剂量(mg/kg)	SOD(U/g protein)	GSH-Px(U/g protein)	MDA(nmol/mg protein)
正常对照组	14	—	159.8±46.1	42.7±7.4	2.71±0.50
模型组	11	—	89.1±20.5*	26.7±6.9*	4.60±0.75*
TFE 组	12	100	116.2±29.3 [△]	31.2±5.7	3.67±0.85 [△]
维生素 E 组	12	10	122.6±27.2 [#]	34.5±8.1 [#]	3.35±0.91 [#]
甲基睾酮组	11	5	104.5±35.8	27.3±6.7	4.06±0.76

*: $P < 0.01$,[△]: $P < 0.05$,与正常对照组比较;[#]: $P < 0.01$,与模型组比较;—:表示此项目无数据。

2.3 TFE 对睾丸中 SOD、GSH-Px 及 MDA 的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠睾丸中 SOD、GSH-Px 活力明显降低($P < 0.05$),MDA 含量显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,

TFE 组、维生素 E 组大鼠睾丸中 SOD 活性分别升高 30.4%、37.6%;维生素 E 组大鼠睾丸中 GSH-Px 活性升高 29.2%;TFE 组、维生素 E 组大鼠睾丸中 MDA 含量分别降低 20.2%、

27.2%；甲基睾酮组大鼠睾丸中上述指标无明显变化($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 TFE 对血清睾酮的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠血清睾酮及 LH 显著下降。与模型组比较,TFE 组、甲基睾酮组大鼠睾酮水平分别提高 37.5%、43.0%,LH 水平分别提高 25.5%、30.6%；各组大鼠 FSH 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 TFE 对腺嘌呤致衰老雄性大鼠血清睾酮、FSH、LH 的影响

组别	n	药物剂量 (mg/kg)	睾酮 (nmol/L)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)
正常对照组	14	—	24.5±6.2	1.77±0.26	15.8±3.4
模型组	11	—	14.4±2.6*	1.94±0.24	9.8±3.2*
TFE 组	12	100	19.8±4.5#	1.83±0.38	12.3±2.4 [△]
维生素 E 组	12	10	17.2±3.6	1.85±0.41	10.2±2.6
甲基睾酮组	11	5	20.6±5.5#	1.87±0.46	12.8±2.1 [△]

*: $P < 0.01$, [△]: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.01$, 与模型组比较; —: 表示此项目无数据。

3 讨 论

腺嘌呤通过间接和直接的方式造成睾丸功能的低下。它可导致大鼠慢性肾功能衰竭,继而通过下丘脑—垂体—睾丸轴的多个水平影响睾丸功能^[5-6]。慢性肾功能衰竭影响 LH 脉冲式释放、提高血清催乳素水平,释放尿毒症毒素^[7-10]。同时,腺嘌呤在体内代谢时由黄嘌呤氧化酶产生大量自由基,可直接影响合成睾酮的酶类(如 17 β 羟类固醇脱氢酶)的活性而致睾酮分泌减少^[11]。除了上述内分泌因素外,睾丸功能还受到局部生化因素的影响。睾丸中的特异性生化酶类主要为 LDH、ACP 和 γ -GT。LDH 主要存在于睾丸生精细胞内,参与能量代谢,并与生精上皮成熟有关;ACP 主要存在于睾丸 Sertoli 细胞中,参与蛋白质合成; γ -GT 则可促进精子的成熟^[12]。腺嘌呤造成大鼠类似人类由“肾虚”所致的睾丸病变,是制作实验动物模型的常用试剂。本实验中,TFE 使腺嘌呤模型大鼠睾丸、精囊腺脏器等指数相对模型组明显提高,标志性酶类 γ -GT、LDH 及 ACP 的活性增强,睾酮水平提高,且具有一定的抗氧化作用。与甲基睾酮相比,TFE 在改善睾丸标志性生化酶类活力及抗氧化方面优于前者,但其对血清睾酮值的改善低于前者。与维生素 E 相比,TFE 在改善睾丸标志性酶类活力、提高血清睾酮方面优于前者,但抗氧化作用弱于前者。从相关分析来看,推测 LDH 的活力可能主要受氧化应激的影响,而 γ -GT 可能与睾酮分泌相关,ACP 则与二者都有一定的关系。因此,仅提高睾酮的含量或仅改善氧化应激似乎均不能对睾丸损伤起到较为全面的改善作用。TFE 降低脂质过氧化代谢产物 MDA 的含量,且升高 SOD 的活性,这与以往实验报道结果一致^[13-14]。TFE 含多个黄酮类化合物,它们均具有酚羟基^[15],可能在代谢过程中通过自身的氧化而减轻组织的损伤,TFE 的抗氧化作用有利于保护睾丸组织,但其特异性并不强。而睾酮对睾丸组织的曲细精管、生精细胞、Sertoli 细胞的发育却是不可或缺的因素。因此,抗氧化与促进睾酮水平的提高是改善腺嘌呤所致睾丸病变中的两个重要因素,综合实验结果来看,TFE 兼具抗氧化及提高睾酮水平的作用。淫羊藿在临床上用

于肾阳不足、精气虚亏所致的性欲低下、阳痿以及因少精、精子活力低下所致的不育症^[16]。上述实验结果表明 TFE 具有明显改善腺嘌呤致大鼠睾丸损伤的作用,其机制可能是促进性激素释放及抗氧化作用。

参考文献:

- [1] 郑平东,朱燕俐.用腺嘌呤制作慢性肾功能衰竭动物模型[J].中华肾脏病杂志,1989,5(6):342-344.
- [2] 郑平东,朱燕俐,丁名城,等.腺嘌呤诱发“肾虚”动物模型的研制[J].中华中医药杂志,1990,5(3):68-73.
- [3] 余白蓉,秦达念,王晟,等.淫羊藿总黄酮对雄性大鼠生殖功能影响的初步研究[J].中国男科学杂志,2003,17(5):294-296.
- [4] Adachi Y, Sasagawa I, Tateno T, et al. Influence of adenine-induced chronic renal failure on testicular function in the rat[J]. Andrologia, 1998, 30(2): 115-118.
- [5] Yamamoto Y, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects of chronic renal failure on hypothalamo-pituitary-testicular axis function and fertility in rats[J]. Int J Urol, 1996, 3(6): 484-490.
- [6] Karagiannis A, Harsoulis F. Gonadal dysfunction in systemic diseases[J]. Eur J Endocrinol, 2005, 152(4): 501-513.
- [7] Buvat J. Hyperprolactinemia and sexual function in men; a short review[J]. Int J Impot Res, 2003, 15(5): 373-377.
- [8] Johansen KL. Treatment of hypogonadism in men with chronic kidney disease [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2004, 11(4): 348-356.
- [9] Holley JL. The hypothalamic-pituitary axis in men and women with chronic kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2004, 11(4): 337-341.
- [10] Johansen KL. Testosterone metabolism and replacement therapy in patients with end-stage renal disease[J]. Semin Dial, 2004, 17(3): 202-208.
- [11] 黄天伦,夏明珠,任开明.腺嘌呤致雄性不育和慢性肾衰大鼠模型的相关性研究[J].中国男科学杂志,2003,17(3):171-173.
- [12] 刘浩然,张琪,戴德哉,等.果糖二磷酸锶盐对 D-半乳糖致小鼠睾丸退行性病变的改善[J].中国新药杂志,2006,15(20):1735-1738.
- [13] 章振保,田生平,杨镜秋,等.淫羊藿苷与睾酮治疗亚急性衰老雄性大鼠的实验研究[J].中国男科学杂志,2006,20(8):13-18.
- [14] 曾南,孟宪雨,张艺,等.淫羊藿有效成分抗氧化作用研究[J].中国中药杂志,1997,22(1):47-49.
- [15] 徐美珍,程志铭.淫羊藿属植物的化学研究进展[J].中国中药杂志,1997,22(10):55-56.
- [16] 曹向明.淫羊藿菟丝子散为主治疗阳痿 52 例[J].中国民间疗法,1999,11(11):30-31.