

· 中医中药 ·

肾精亏虚对雄性小鼠及其雄性仔鼠生育力的影响

孙 洁¹, 周安方², 周艳艳², 方 婷²

(1. 浙江省中医院泌尿外科, 浙江 杭州 310006; 2. 湖北中医学院中医基础理论教研室, 湖北 武汉 430061)

摘要: 目的: 观察肾精亏虚对雄性小鼠及其雄性仔鼠生育力的影响。 方法: 将 30 只 6 周龄雄性昆明小鼠随机均分为正常对照组、模型组和补肾组 3 组。模型组和补肾组采用房劳加惊恐的复合伤肾法制造肾精亏虚模型。补肾组每天给予 0.16 ml/10 g 体重的补肾填精方浓缩液灌胃。正常对照组及模型组予等量生理盐水灌胃, 造模并给药 21 d。从造模结束次日起, 所有小鼠与正常动情期雌鼠配对饲养 5 d 后检测其精子密度及活动率。取出雌鼠待其分娩, 分别计算各组配对雌鼠妊娠率和每胎生产数 (仔鼠总数/妊娠并分娩的雌鼠只数) 以评估父代小鼠生育力。雄性仔鼠饲养至 6 周龄时每组随机取出 10 只检测其精子密度及活动率。 结果: 模型组每胎生产数 $[(7.00 \pm 1.73) \text{只}]$ 明显比正常对照组 $[(9.43 \pm 1.27) \text{只}]$ 和补肾组 $[(8.80 \pm 1.10) \text{只}]$ 低 ($P < 0.05$); 模型组小鼠精子密度 $[(9.70 \pm 1.45) \times 10^6/\text{ml}]$ 及活动率 $[(66.72 \pm 10.12) \ %]$ 均明显低于正常对照组 $[(14.08 \pm 1.15) \times 10^6/\text{ml}, (81.75 \pm 3.56) \ %]$ 和补肾组 $[(12.20 \pm 1.55) \times 10^6/\text{ml}, (78.55 \pm 4.38) \ %]$, $P < 0.01$, 而正常对照组与补肾组之间则没有差异 ($P > 0.05$); 模型组仔鼠精子密度 $[(10.1 \pm 1.79) \times 10^6/\text{ml}]$ 及活动率 $[(71.86 \pm 7.48) \ %]$ 均低于正常对照组 $[(15.30 \pm 1.83) \times 10^6/\text{ml}, (79.86 \pm 5.68) \ %]$ 和补肾组仔鼠 $[(14.20 \pm 2.21) \times 10^6/\text{ml}, (81.92 \pm 2.51) \ %]$, $P < 0.05$, 正常对照组与补肾组仔鼠之间没有差异 ($P > 0.05$)。 结论: “惊恐、房劳” 可以明显降低小鼠生育力, 其仔鼠生育力亦可受累。补肾法可以阻断这种损伤的发生。

关键词: 肾精亏虚; 房劳; 惊恐; 生育力; 小鼠

中图分类号: R256; R287; R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3591 (2007) 08-0754-04

Kidney-jing Deficiency Reduces the Fertility of Male Mice and Their Male Offspring

SUN Jie¹, ZHOU An-fang², ZHOU Yan-yan², FANG Ting²

1. Department of Urology, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310006, China; 2. Department of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China

Correspondence to: ZHOU An-fang, E-mail: zhouanfang@21cn.com

Abstract: Objective: To investigate the effects of kidney-jing deficiency on the fertility of male mice and their male offspring. Methods: Thirty 6-week-old Kunming male mice and 300 female ones were randomly allocated to a blank control group, a model group and a kidney-tonifying group. The model and the kidney-tonifying groups were stressed by fear plus excessive sex to establish a kidney-jing deficiency model, and meanwhile the latter were given concentrated solution of Kidney-tonifying Recipe intragastrically at the dose of 0.16 ml/10 g. The control and the model groups were treated with physiological saline at the same dose for 21 days. Then all the male mice were mated with the healthy estrous females for 5 days. The sperm density and motility of each group of the male mice were

收稿日期: 2006-11-27; 修回日期: 2007-03-15

基金项目: 湖北省自然科学基金 (编号 2004ABA184)

作者简介: 孙 洁 (1975-), 男, 湖北孝感市人, 医师, 博士, 从事中医男科研究。E-mail: sjde008@163.com

通讯作者: 周安方, E-mail: zhouanfang@21cn.com

examined, and their fertility was assessed by comparison of the pregnancy rate and the number of baby mice at each birth among their female mates. And the sperm density and motility of the male offspring were detected at 6 weeks. Results: The average number of baby mice at each birth in the model group was (7.00 ± 1.73) , significantly smaller than those in the control (9.43 ± 1.27) and the kidney-tonifying group (8.80 ± 1.10) ($P < 0.05$). The sperm density and motility of the model mice were $(9.70 \pm 1.15) \times 10^6 / \text{ml}$ and $(66.72 \pm 10.12) \%$, lower than those of the control $([14.08 \pm 1.15] \times 10^6 / \text{ml}$ and $[81.75 \pm 3.56] \%)$, and the kidney-tonifying group $([12.20 \pm 1.55] \times 10^6 / \text{ml}$ and $[78.55 \pm 4.38] \%)$ ($P < 0.05$). There was no significant difference between the latter two groups ($P > 0.05$). The sperm density and motility of the offspring of the model mice were $(10.10 \pm 1.79) \times 10^6 / \text{ml}$ and $(71.86 \pm 7.48) \%$, lower than those of the control $([15.30 \pm 1.83] \times 10^6 / \text{ml}$ and $[79.86 \pm 5.68] \%)$, and the kidney-tonifying group $([14.20 \pm 2.21] \times 10^6 / \text{ml}$ and $[81.92 \pm 2.51] \%)$ ($P < 0.05$), with no significant difference between the latter two groups ($P > 0.05$). Conclusion: Fear plus excessive sex could reduce the fertility of male mice and even that of their male offspring. And kidney-tonifying therapy could counteract this effect. Natl J Androl, 2007, 13 (8): 754-757

Key words: kidney-jing deficiency; excessive sex; fear; fertility; mouse

肾藏精,为先天之本,主生长、发育、生殖。肾精是子嗣禀赋之源,如果男子肾中精气不足,则不仅自身生殖功能会受到影响,其子代亦可能因为禀受的先天之精不足而发生多种病症,故汪绮《理虚元鉴·虚证有六因》说:“因先天者,指受气之初……精血不旺,亦令所生之子夭弱”。恐为肾志,惊恐太过则伤肾,若此时合而有子则其子夭弱。现代医学认为情绪应激是自然界中常见的应激原之一,强烈而持久的情绪刺激会引起人体神经内分泌系统的紊乱并最终影响生殖系统。研究发现工作压力所带来的情绪压力与男性生育力下降有关^[1],但是情绪影响男性生育力的机制以及不良情绪反应的生殖毒性是否会影响子代的健康尚不清楚。因此,本文观察了肾精亏虚对雄性小鼠及其雄性仔鼠生育力的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6周龄雄性昆明小鼠 30只,雌性昆明小鼠 330只,体重 (32.0 ± 2.5) g,均购自湖北省医学科学院。

1.2 药物及制备

1.2.1 补肾填精方 由熟地黄、制首乌、枸杞子、淫羊藿等组成。由湖北中医学院实验中心煎制成浓缩液,含生药量 0.8 g/ml 。

1.2.2 左炔诺孕酮炔雌醚片 北京紫竹药业有限公司生产(国药准字 H11021378,产品批号 20040111)。每次取 18 mg 溶于 150 ml 蒸馏水中,配成 0.12 mg/ml 的长效避孕药混悬液, 4°C 冰箱保存。

1.3 造模与分组

1.3.1 动情雌鼠制作 将 300只雌鼠随机分为 5组,每组 60只,分别记为 A、B、C、D、E组。按文献[2]方法,从 A组开始,每天依次取 1组雌鼠灌服长效避孕药左炔诺孕酮炔雌醚混悬液,灌胃剂量为

$2.34 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 5 d 1个循环。每组雌鼠在灌胃后的第 5 d正好处于动情期,可用于与肾精亏虚模型雄鼠合笼。

1.3.2 造模与分组 将 30只雄性昆明小鼠随机等分为正常对照组、模型组和补肾组。其中模型组和补肾组采用房劳加惊恐的复合伤肾法制造肾精亏虚模型。每天每只雄鼠按照 1:2的比例与动情期雌鼠合笼,每天 20:00投入动情期雌鼠,至次日 8:00取出,20:00再投入另一批动情期雌鼠,至次日 8:00取出,如此反复,让其房劳伤肾;每日 8:00~20:00,将雄鼠放入特制的小铁丝笼内,再将此小笼固定在装有 1只成年家猫的大笼中,让猫与小鼠仅一网之隔,使猫爪能碰到但无法抓到小鼠,并每天 10:00、15:00各另取 2只活的小鼠喂猫示众,使其惊恐伤肾。连续 21 d,制造肾精亏虚模型。3组实验小鼠均自由饮食。

1.4 给药剂量与方法 补肾组每天给予 $0.16 \text{ ml}/10 \text{ g}$ 体重的补肾填精方浓缩液灌胃。正常对照组及模型组予等量生理盐水灌胃。自造模第 1 d起开始给药,共 21 d。

1.5 取材时间

1.5.1 父代小鼠取材时间 从造模结束次日起所有小鼠均立即按照 1:1比例与正常发情雌鼠配对饲养 5 d。于第 6 d处死父代小鼠,留取标本以备检测。取出雌鼠待其分娩,分别计算各组配对雌鼠妊娠率和每胎生产数(仔鼠总数/妊娠并分娩的雌鼠只数)以评估父代小鼠生育力。

1.5.2 子代小鼠取材时间 子代小鼠出生后,选出雄性仔鼠,饲养至 6周龄时每组随机取出 10只取材。

1.6 附睾精子数量及活率检测 摘取双侧附睾尾,剪数剪,置于 $6 \text{ ml } 1 \times \text{TNE}$ 溶液中, 37°C 水浴 30 min,并轻轻振荡,制备精子悬液。用血球计数板计数精子,以 $\times 10^6 / \text{ml}$ 表示。同时观察至少 200个

精子,计算活动精子百分率。

1.7 统计学分析 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据应用 SPSS 13.0统计包进行分析,计量资料比较采用方差分析, F 值检验,进一步多重比较采用 Turkey分析,计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 造模后小鼠出现毛色枯槁、潮湿,精神萎靡,体重增长缓慢,扎堆,反应迟钝等肾精亏虚表现。正常对照组及补肾组则无此表现,证明造模成功。模型组小鼠死亡 1只。

2.2 各组父代小鼠生育力观察 各组父代小鼠致孕率及生产数见表 1。模型组妊娠率低于正常对照组和补肾组,但没有统计学差异。模型组每胎生产数与正常对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$),补肾组与正常对照组及模型组相比均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 肾精亏虚对雄性小鼠生育力的影响

Table 1. Effect of kidney-jing deficiency on the fertility of the male mice

Group	n	Pregnancy(n)	Average number of baby mice at each birth ($\bar{x} \pm s$)
Normal	10	7	9.43 $\pm$ 1.27
Model	9	3	7.00 $\pm$ 1.73*
Kidney-tonifying	10	6	8.80 $\pm$ 1.10

与正常组比较, *: $P < 0.05$

Compared with the normal group, *: $P < 0.05$

2.3 各组父代小鼠及其仔鼠精子 精子密度及活动率见表 2、3。模型组小鼠精子密度及活动率较正常对照组明显降低 ($P < 0.01$);补肾组和正常对照组之间相比,精子密度、活动率没有显著差异 ($P > 0.05$);补肾组精子密度较模型组显著升高 ($P < 0.01$),精子活动率也比模型组高 ($P < 0.05$)。模型组仔鼠精子密度及精子活动率均明显低于正常对照组和补肾组,有显著性差异 ($P < 0.05$),而补肾组和正常对照组之间相比,精子密度、活动率均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

肾主生殖,肾精亏虚可以降低生育力,是不育等生育疾病的最主要病机。生育力的下降不仅表现为生育率降低,生育质量也会受其影响。

实验发现,模型组每胎生产数明显比正常对照

表 2 各组雄性小鼠附睾精子密度与精子活动率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Sperm density and motility in the epididymis of the male mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Density ($\times 10^6$ /ml)	Motility (%)
Normal	10	14.08 $\pm$ 1.15**	81.75 $\pm$ 3.56**
Model	9	9.70 $\pm$ 1.45	66.72 $\pm$ 10.12
Kidney-tonifying	10	12.20 $\pm$ 1.55**	78.55 $\pm$ 4.38*

与模型组比较, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

Compared with the model group, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

表 3 各组雄性仔鼠附睾精子密度与精子活动率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Sperm density and motility in the epididymis of the offspring of the male mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Density ($\times 10^6$ /ml)	Motility (%)
F1 of normal	10	15.30 $\pm$ 1.83*	79.86 $\pm$ 5.68*
F1 of model	10	10.10 $\pm$ 1.79	71.86 $\pm$ 7.48
F1 of Kidney-tonifying	10	14.20 $\pm$ 2.21*	81.92 $\pm$ 2.51*

与模型组比较, *: $P < 0.05$

Compared with the model group, *: $P < 0.05$

组和补肾组低,说明模型组小鼠生育力受到了影响,补肾治疗则可以保护其生育力。精液质量是反映生育力的最直接指标。本实验显示,模型组小鼠精液质量明显降低,与正常对照组和补肾组之间有显著差异。其子代雄鼠精液质量虽然有所改善,但较正常对照组和补肾组仔鼠仍有显著差异,说明经“惊恐、房劳”因素干预后,雄鼠出现精液质量下降、生育力降低等肾精亏虚表现。虽然这些肾精亏虚雄鼠使雌鼠受孕的能力降低,但如果它们在肾精亏虚状态下使雌鼠受孕,则其仔鼠也表现为精液质量下降。补肾法可以阻断“惊恐、房劳”对小鼠生育力的影响,因此其仔鼠精液质量正常,与正常对照组仔鼠相比没有差异。

“肾主生殖”,肾精亏虚则艰于“种子得嗣”,“恐伤肾”肾精亏虚模型和“房劳过度”肾精亏虚模型动物均表现出生育力下降^[3-5]。此外,“肾主生殖”也包括“肾主后代禀赋”,肾精亏虚则其子禀赋多弱,“诸虚不足,胎禀怯弱,皆肾之本脏病也”(明·万全《幼科发挥·卷四》)。“恐伤肾”不仅可以降低模型小鼠生育力,还会对其子代造成影响。“恐伤肾”孕鼠所产仔鼠精液质量下降,说明母代肾精亏虚可以殃及子代^[6]。我们的实验结果则显示父代肾精亏虚亦可使其雄性子代生育力受损,表现为精子密度下降,精子活动率降低。由于子代这些改变出现在生殖系统,因此有

可能对仔鼠的下一代继续造成影响。本实验同时也观察到仔鼠精液质量比之父代已经有所改善,加之生物对外界不良环境的适应力,如果造成肾精亏虚因素不再继续作用于子代,那么这种生育力的下降应该会随着时间推移而逐渐消失,不至于使其世代均受其累,出现“一代肾虚,代代肾虚”的情况。但需要对更多世代观察之后才能得出最后的结论。

本实验结果显示,“惊恐、房劳”可以明显降低小鼠生育力,其仔鼠生育力亦可受累。补肾法可以阻断这种损伤的发生。说明肾精亏虚则生育力下降,其子所禀不足,亦会出现类似改变,病变程度较其父代轻。

参考文献

- [1] Sheiner EK, Sheiner E, Carel R, et al Potential association be-

tween male infertility and occupational psychological stress[J]. J Occup Environ Med, 2002, 44(12): 1093-1100.

- [2] 陈英华,谢玲玲,杨华伟,等. 左炔诺孕酮炔雌醚片所致动情期同步的雌性小鼠的研制[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(1): 46-50.
- [3] 沈 雁,匡调元,张伟荣,等. “恐伤肾”的实验研究[J]. 中国医药报, 1991, 6(1): 13.
- [4] 陈英华,谢玲玲,杨华伟,等. 实验性房室不节对雄性小鼠生殖机能影响的初步研究[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(5): 297-299.
- [5] 王米渠,丁维俊,曾祥国,等. 造模先天肾精亏虚证对子代鼠睾丸病理形态初报[J]. 浙江中医学院学报, 1998, 22(2): 33-36.
- [6] 郑东利,廉印玲,赵 卫. 精室为奇恒之腑的临床意义[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(7): 660-661, 665.

(程童大 编发)

第二期全国男科医师培训班在乌鲁木齐成功举办

由中华医学会男科学分会主办,新疆佳音男科医院、新疆宝科达医院和《中华男科学杂志》编辑部承办的第二期全国男科医师培训班于 2007 年 8 月 3~7 日在乌鲁木齐成功举办。来自全国各地的专家和学员约 70 人参加了培训班。中华医学会男科学分会主任委员朱积川教授、副主任委员王益鑫、李江源、黄宇烽教授,学会秘书长贺占举、姜辉教授,国家人口与计划生育科研所陈振文教授、上海第九人民医院泌尿外科主任王忠教授、湖南长沙中信湘雅专科医院范立青教授,《中华男科学杂志》编辑部主任商学军副教授以及佳音男科医院黄卫东院长、新疆宝科达医院艾尔肯院长出席了培训班开幕式并授课。

培训班采用理论授课与影像资料演示的方式,具有实用性、先进性、规范性和系统性等特点。培训班内容既有 ED、PADAM、前列腺炎、基因病、染色体病以及男科疾病的心理问题的诊疗新进展,也有临床质量管理、精液分析标准化与精子功能以及人类受精能力等方面的评估研究;既有男性抗衰老和男科学相关的基础及流行病学研究、BPH 药物治疗、肉碱在男科临床治疗中的研究进展等理论授课,也有外生殖器矫形手术演示。学员感到受益匪浅,一致认为这次培训班受邀授课者水平高,内容丰富,演示手术实用。