

实验研究

补肾填精方对肾虚雄性小鼠
及其雄性仔鼠睾丸组织形态学的影响孙洁¹, 周安方², 周艳艳², 方婷²

摘要 **目的**: 观察补肾填精方对肾虚雄性小鼠及其雄性仔鼠睾丸组织学的影响。**方法**: 将 30 只雄性昆明小鼠随机分为正常对照组、模型组和补肾组。采用“房劳加惊恐伤肾法”造模, 从造模次日起, 所有小鼠与正常发情雌鼠配对饲养 5 d, 处死, 取睾丸。另取出雌鼠待其分娩。仔鼠饲养至 6 周龄时每组随机取出 10 只, 取睾丸。分别观察父代小鼠及其仔鼠睾丸组织病理学改变。**结果**: 模型组小鼠生精小管边界扭曲, 界膜轻度增生。Johnsen 积分、生精小管直径及生精上皮厚度都明显低于正常组。其仔鼠睾丸组织呈现出类似改变, 只是病变程度略轻。补肾组小鼠及其仔鼠 Johnsen 积分和生精小管直径与正常组相比均无显著差异。**结论**: “惊恐、房劳”肾虚模型小鼠受损的生精功能可以传递至没有受到造模因素影响的雄性仔鼠。

关键词: 肾精亏虚; 动物模型; 组织形态学; 补肾填精方

中图分类号: R 285.5; Q 95-33

文献标识码: A

文章编号: 1007-6948(2008)05-0479-04

Effect of Bushen Tianjing(补肾填精) Recipe of Histologic Morphology of Testes of Mice of Insufficient Shen Jing(肾经) and their Male Offspring Sun Jie, Zhou Anfang, Zhou Yanyan, et al. *Department of Urology, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou(310006), China*

Abstract **Objective** To study the effect on the pathohistology of testes of mice of insufficient ShenJing(肾经) and their male offspring. **Methods** KunMing mice, 6 weeks old, 30 male and 330 females, were allocated to 3 groups (blank control group, model group, BuShen(补肾) group) randomly. The mice of the model group and the BuShen group were processed by the “fearness combined with excessive sexual behavior” to make the model of insufficient ShenJing. The mice in BuShen group were lavaged of concentrated solution of BuShenFang, the dosage was 0.16 ml/10 g based on their weight. Other groups were treated with physiological saline at the same dosage. This phase would continued 21 days. All the 3 groups were matched - pairs with healthy female mice for 5 days after model making. The microstructure and ultrastructure of testis of male mice and their male offspring was observed. **Results** Compared with normal (9.6 ± 0.46) group, the average Johnsen scores of the model group (8.97 ± 0.65) were decreased significantly ($P < 0.05$); the diameter length ($115.27 \pm 15.39 \mu\text{m}$) and the thickness ($26.13 \pm 5.62 \mu\text{m}$) of seminiferous tubule of the model group were decreased too (normal group $127.61 \pm 19.16 \mu\text{m}$, $33.70 \pm 6.82 \mu\text{m}$, BuShen group $125.94 \pm 17.56 \mu\text{m}$, $29.5 \pm 4.97 \mu\text{m}$, $P < 0.05$). There was no significant difference between normal group and BuShen group ($P < 0.05$). The average Johnsen scores (8.88 ± 0.6), the diameter length ($116.49 \pm 15.18 \mu\text{m}$) and the thickness ($25.86 \pm 5.35 \mu\text{m}$) of seminiferous tubule of F1 of model mice were lower than those of the normal (9.71 ± 0.51 , $128.15 \pm 18.35 \mu\text{m}$, $33.57 \pm 6.94 \mu\text{m}$). But there was no significant difference of these data between the F1 male mice of model group and BuShen group. **Conclusion** Fearness combined with excessive sexual behavior can damage the microstructure and ultrastructure of testis of model mice, and these pathologic changes can be transferred to their male offspring. BuShen can interrupt this effect.

Keywords insufficient ShenJing, animal model, histomorphology, recipe BuShen TianJing

湖北省自然科学基金资助(2004ABA184)

1. 浙江省中医院泌尿外科(杭州 310006)

2. 湖北中医学院

工作压力所带来的情绪压力与男性生育力下降有关^[1],其机制以及其他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。本研究观察了肾精亏虚对雄性小鼠及其雄性仔鼠睾丸组织的影响,以及补肾填精方对肾虚雄性小鼠及其雄性仔鼠睾丸组织学的影响。

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 ± 2.5) g,购自湖北省医学科学院,动物饲养合格证号:SCXK(鄂 2003 - 0005)。

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℃ 冰箱保存。

1.3 造模与分组

1.3.1 动情雌鼠制作 将 300 只雌鼠用计算机取随机数方法随机分为 5 组,每组 60 只,分别记为 A、B、C、D、E 组。按文献方法^[2],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 mg/(kg·d),5 d 一个循环。每组雌鼠在灌胃后的 3 d 处于动情期,可将其用于复制雄鼠肾精亏虚模型。

1.3.2 造模与分组 将 30 只雄性昆明小鼠用计算机取随机数法随机等分为正常对照组、模型组和补肾组 3 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 只大家猫的大笼中,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 补肾组每天给予补肾填精方浓缩液灌胃,0.16 mL/10 g 体重。正常对照组及模型组予等量生理盐水灌胃。自造模 1 d 起开始给药,共 21 d。

1.5 取材时间及方法 子代小鼠出生后,选出雄性

仔鼠,饲养至 6 周龄时分别随机取出 10 只取材。颈椎脱臼处死,打开腹腔,取出右侧睾丸,用 Bouin 溶液固定 24 h 后石蜡制胚,HE 染色;取出左侧睾丸,4℃ 预冷的锇酸电镜固定液固定 24 h 后超薄切片。

1.6 睾丸组织显微结构评估方法 睾丸组织病理学评分方法参照文献,选用 Johnsen 10 级积分法^[3],在光镜下($\times 400$)对每张切片随机选取 20 个生精小管进行评分。积分共分 10 级,积分越高,精子发生越好;反之,积分越低,精子发生障碍程度越严重。同时用 HMIAS-2000 彩色医学图文分析系统(武汉清平影像技术有限公司)测量生精小管直径和生精上皮厚度,每张切片在光镜下($\times 400$)分析 20 个视野,取平均值作为该切片生精小管直径和生精上皮厚度。进行统计学分析,评估睾丸的生精功能。

1.7 统计学处理 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。以 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 睾丸组织显微结构 光镜下可见正常组小鼠睾丸组织中各生精小管排列整齐,生精小管中可见各级生精细胞和支持细胞,管腔面有很多精子。生精小管边界整齐,其各层细胞排列有序,无生精细胞脱落(见图 1)。模型组小鼠生精小管边界扭曲,部分生精小管界膜轻度增生。生精小管萎缩,生精上皮变薄,各层细胞排列欠整齐,甚至紊乱,细胞疏松,部分小管可见生精细胞脱落。在支持细胞中可见小脂滴。部分小管管腔内几乎没有成熟精子细胞(见图 2)。补肾组小鼠生精小管各层细胞排列整齐,生精上皮完整,管腔面有很多精子,较少见到脱落的生精细胞。

正常组仔鼠睾丸组织结构正常。模型组仔鼠睾丸组织呈现与其父代类似的改变,主要表现为界膜轻度增生,生精小管萎缩,生精上皮变薄,细胞排列紊乱,偶见生精细胞脱落,支持细胞中有小脂滴(见图 3)。补肾组仔鼠结构基本正常,生精上皮各层细胞排列整齐,偶见支持细胞中有小脂滴。

模型组小鼠 Johnsen 10 级积分、睾丸生精小管直径和生精上皮厚度明显低于正常组;补肾组生精上皮厚度、生精小管直径与正常组相比无差异,比模型组好,结果见表 1。模型组仔鼠 Johnsen 10 级积分、睾丸生精小管直径、生精上皮厚度明显低于正常组。补肾组仔鼠睾丸 Johnsen 10 级积分、生精小管直径和生精上皮厚度与正常组及模型组之间均无显

著性差异。结果见表 2。

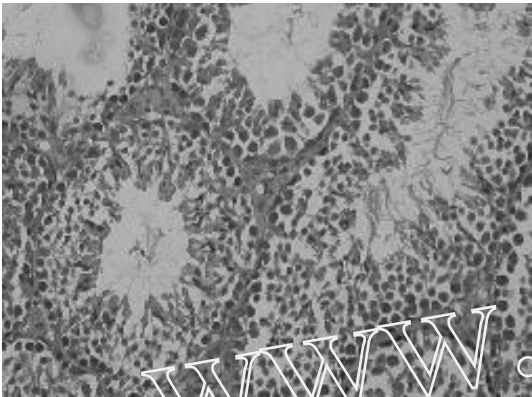


图 1 正常组小鼠睾丸组织 HE 染色 ×400
生精细胞排列整齐

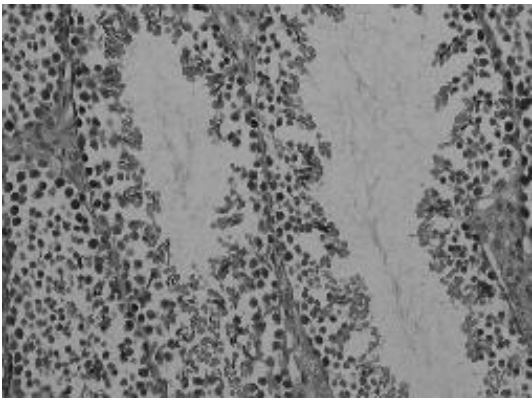


图 2 模型组小鼠睾丸组织 HE 染色 ×400
生精细胞排列紊乱,生精上皮明显变薄

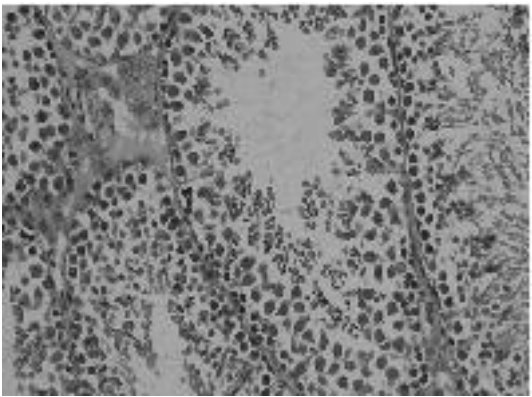


图 3 模型组小鼠睾丸组织 HE 染色 ×400
生精细胞排列紊乱,生精上皮明显变薄,有生精细胞脱落

2.2 睾丸组织超微结构 电镜下可见正常组小鼠生精小管界膜清晰、完整,胶原纤维排列规则。生精小管中可见不同发育阶段的生精细胞包括精原

细胞、精母细胞、精子细胞及精子,精原细胞与基底膜接触,细胞核圆形或椭圆形,核仁可见,细胞浆内有少量的线粒体及粗面内质网。精母细胞核呈圆形,胞浆内见较多的线粒体、粗面内质网、高尔基体及一些核糖体及糖元。支持细胞间的紧密连接完整。

表 1 肾虚对雄性小鼠睾丸组织病理学评分
及生精上皮厚度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	n	Johnsen10 级积分	生精小管直径(μm)	生精上皮厚度(μm)
正常组	10	9.6 $\pm$ 0.46	127.61 $\pm$ 19.16	33.70 $\pm$ 6.82
模型组	10	8.97 $\pm$ 0.65 *	115.27 $\pm$ 15.39 **	26.13 $\pm$ 5.62 * *
补肾组	10	9.4 $\pm$ 0.74	125.94 $\pm$ 17.56	29.5 $\pm$ 4.97 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $P < 0.05$

表 2 雄性小鼠肾虚对其仔鼠睾丸组织病理学评分
及生精上皮厚度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	n	Johnsen10 级积分	生精小管直径(μm)	生精上皮厚度(μm)
正常组	10	9.71 $\pm$ 0.51	128.15 $\pm$ 18.35	33.57 $\pm$ 6.94
模型组	10	8.88 $\pm$ 0.6 *	116.49 $\pm$ 15.18 *	25.86 $\pm$ 5.35 **
补肾组	10	9.50 $\pm$ 0.69	126.08 $\pm$ 17.35	29.20 $\pm$ 5.05

注:正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

模型组小鼠生精小管界膜增厚,有时呈棘样突入生精上皮,亦可见界膜不连续,界膜下有低电子密度沉积物。支持细胞中可见脂质空泡,排列紊乱的线粒体内可见少量空泡,内质网水样变性。各级精母细胞内均可见胞质空泡、胞质致密小体,核膜增厚。管腔中常可发现顶体脱落或缺陷的精子细胞(见图 4)。

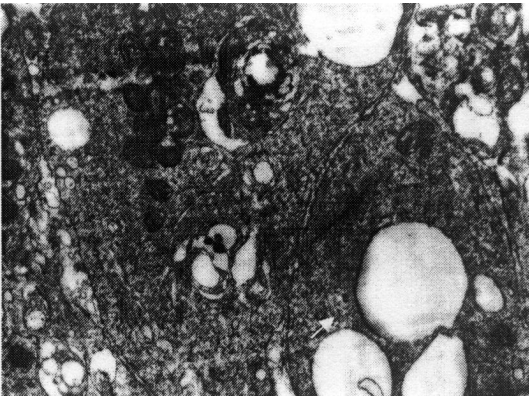


图 4 模型组小鼠生精细胞线粒体明显肿胀变形,形成空泡 ×8 000

补肾组小鼠睾丸组织超微结构基本正常,偶见生精小管界膜增厚及界膜不连续,支持细胞及各级

精母细胞内均少见变性的细胞器,偶尔可见线粒体轻度水肿(见图 5)。

正常组仔鼠睾丸组织超微结构正常。模型组仔鼠可见轻度增厚的生精小管界膜及界膜下低电子密度沉积物。支持细胞中可见变性的线粒体和内质网。各级精母细胞可见胞空泡和胞质致密小体。精子细胞变形过程中可见顶体脱落或缺陷及线粒体鞘形成不规则(见图 6)。补肾组仔鼠超微结构基本正常。

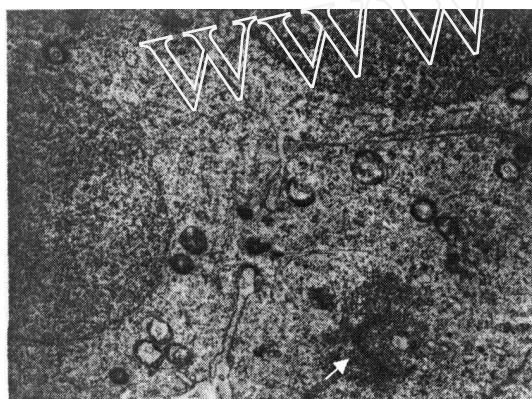


图 5 补肾组小鼠精母细胞中可见线粒体变性 ×8 000

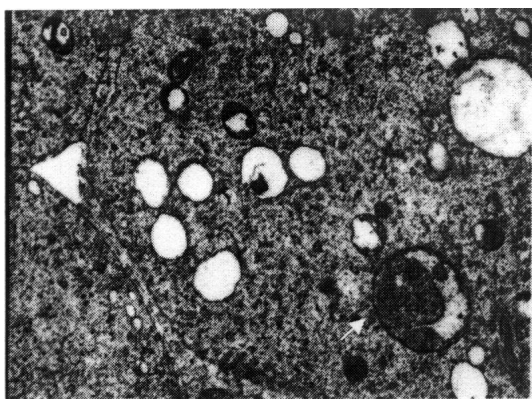


图 6 模型组仔鼠精母细胞线粒体水肿 ×8 000

3 讨论

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,其治当补肾填精,使

男子肾精充足,以免子嗣夭弱。补肾填精方中熟地黄质地滋腻纯厚,味甘,性温,入足少阴肾经,用之补肾填精,为君药。制首乌味苦、甘、涩,微温,归肝、肾经,乃补益精血之良药;枸杞子味甘、平,归肝、肾经,是添精固髓之佳品。此二味与熟地共用则补肾填精之力益强,且无阴阳偏盛之虞。淫羊藿味辛、甘、性温,归肝、肾经,补肾壮阳,益精气、坚筋骨。补阳药与补肾填精药同用,有阴中求阳,阳中求阴之妙。用之以佐助。全方功专益肾,既可以直入肾经,专补天一之水,又能阳中求阴,可以生化无穷而无凝滞之弊,故能治肾精亏虚之证。本研究用之以补益肾精,观察补肾对肾精亏虚雄性小鼠及其仔鼠睾丸的病理形态学影响。

经“房劳加惊恐法”造模后,肾精亏虚模型组小鼠生精小管出现明显的病理损伤,其仔鼠睾丸组织呈现出类似改变,只是病变程度略轻。而补肾组小鼠及其仔鼠睾丸组织受损均明显较轻。电镜下对睾丸组织超微结构进行观察的结果进一步支持了光镜所见,并发现肾虚导致小鼠生精功能受损的主要靶点可能是支持细胞。位于生精小管的支持细胞不仅可以合成和分泌蛋白质、细胞因子、类固醇等精子生成所需要的各种物质,还可以决定睾丸的最终体积和精子生成数量,因此对正常的生精功能有着重要的意义^[4]。由于支持细胞受损,不能为生精细胞提供合适的微环境,各级精母细胞也出现轻度变性,胞浆中可见胞质空泡、胞质致密小体,细胞核核膜增厚。实验结果提示,肾虚模型小鼠受损的生精功能可以传递至没有受到造模因素影响的雄性仔鼠,但是病变程度有所减轻。对父代小鼠及时给予补肾治疗可以阻断这种病理变化。

参考文献:

- [1] Einat K, Sheiner E, Eyal Sheiner, Refael Carel, et al. Potential Association Between Male Infertility and Occupational Psychological Stress [J]. JOEM, 2002, 44(12): 1093.
- [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.
- [3] Johnsen SG, Agger P. Quantitative evaluation of testicular biopsies before and after operation for varicocele[J]. Fertil Steril, 1978, 29(1): 58.
- [4] 郭应禄, 辛钟成. 男子生殖医学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2002: 20 - 21.

(收稿: 2007 - 11 - 08 修回: 2008 - 05 - 09)

(责任编辑 刘洪斌 田在善)