

雄性小鼠肾虚对其雄性仔鼠睾丸生精细胞凋亡的影响

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, 湖北 武汉 430061)

摘 要:目的:观察雄性小鼠肾虚对其雄性仔鼠睾丸生精细胞凋亡的影响。方法:将 30 只雄性昆明小鼠用计算机取随机数法随机分为正常对照组、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。从造模结束次日起,所有小鼠与正常发情雌鼠配对饲养 5 天后,取出雌鼠待其分娩。仔鼠饲养至 6 周龄时每组随机取出 10 只雄性仔鼠,取出右侧睾丸,流式细胞术分析睾丸组织生精细胞凋亡率。结果:模型组仔鼠 (16.68 ± 4.68) 与正常组 (4.41 ± 1.81) 及补肾组 (8.81 ± 2.41) 相比其睾丸细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$), 1C 细胞比例明显降低 (53.94 ± 5.19 vs 70.61 ± 9.25, 65.51 ± 8.83, $P < 0.01$), 2C、4C 细胞比例则未见显著性差异 ($P > 0.05$)。正常组仔鼠与补肾组仔鼠之间睾丸组织生精细胞凋亡率, 1C、2C、4C 细胞比例均没有统计学差异 ($P > 0.05$)。结论:惊恐、房劳因素复制的肾虚模型小鼠的仔鼠睾丸生精细胞凋亡率明显上升, 1C 细胞比例下降, 并导致精子密度降低。补肾法可以有效地降低其仔鼠睾丸生精细胞凋亡率, 从而改善睾丸生精功能。

关键词:肾精亏虚; 动物模型; 子代; 生精细胞; 凋亡; 流式细胞术; 补肾填精方

中图分类号: R - 33

文献标识码: A

文章编号: 1673 - 7717(2009)07 - 1441 - 03

Effect of Kidney-jing Deficiency on Apoptosis of Spermatogenic Cell of Male Offspring

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

(1. Department of Urology, Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China;

2. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of kidney - jing deficiency of male mice on the the apoptosis of spermatogenic cell of their male offspring. Methods: Thirty 6-week-old Kunming male mice were randomly allocated to a blank

15.9%、24.1%、60.0%, 2005 年分别为 18.1%、32.6%、49.3%。从卫生费用占政府财政支出的比重看,“七五”期间为 2.53%,“八五”期间为 2.37%,“九五”期间为 1.98%, 2000 年 1.71%, 2002 年只有 1.59%。由此可见,这些年来,尽管政府投入的绝对额在上升,但比重却在明显下降,而个人负担部分却大幅增长,所承担的部分大约占 60%。

其次,疾病预防体制不完善。过去我国在这方面取得了很大成就,但后来有所减弱。以疾病预防控制中心为例,1990 年全国有 3618 个,2000 年为 3741 个,2005、2006、2007 年则分别为 3585 个、3548 个、3585 个。这表明,这些年从事疾病预防控制的机构有所减少。

最后,改革开放以后,医疗卫生工作也逐渐走向了市场化,医疗机构为了在市场经济条件下获得发展,单纯追求经济利益,出现了开大处方、滥用检查、乱收费、以药养医等不合理现象。医疗机构片面追求经济效益,基础性公共卫生服务被忽视。

3.3 疫情统计和信息公布不利

信息系统不健全、反应不灵敏、报告不及时、信息渠道

不畅通和信息统计不准确一直是我国公共卫生领域面临的突出问题。尽管卫生系统建设有国家疾病预防控制和公共卫生信息网络,设有疾病监测点,但尚未形成反应灵敏、运转协调、信息完备的完整体系。

防治 SARS、禽流感等疫情的事实表明,对于传染病的预防和控制工作,首先要作好检疫和监测,监测诊断要准确及时,不仅对患者个体要诊断准确,尤其对群体的传染病学态势分析要准确慎重,报告和公布疫情、发病数字及流行趋势更要准确。疫情要公开,信息要透明。夸大疫情会引起社会恐慌,掩盖真相会造成思想麻痹,加剧疫情的扩散。

参考文献

- [1] 马克思恩格斯选集(第四卷)[M]. 北京:人民出版社,1995: 383
- [2] 张强. 传染病的全球蔓延给我们敲响了警钟[J]. 国际技术经济研究, 2004(2): 2
- [3] 罗伊·波特. 剑桥医学史[M]. 张大庆,译. 长春:吉林人民出版社,2000: 21 - 25
- [4] 万超群. 军团病的预防与控制[J]. 中国公共卫生, 2004(4): 511 - 512
- [5] 威廉·科克汉姆. 医学社会学[M]. 杨辉,张拓红,译. 北京:华夏出版社,2000: 84
- [6] 程玉萍,华川. 我国 HIV/AIDS 流行现状及危险因素[J]. 中国误诊学杂志, 2004(5): 697
- [7] 吴彤. 健康与疾病:不仅仅是医学问题 - 从多学科视野看防治 SARS[J]. 清华大学学报(哲学社会科学版), 2003(4): 45

收稿日期: 2009 - 03 - 01

基金项目: 湖北省自然科学基金资助课题(2004ABA184)

作者简介: 孙洁(1975 -),男,湖北孝感人,医师,博士,从事中医男科研究。

通讯作者: 周安方(1948 -),男,湖北孝感人,教授、主任医师,博士研究生导师。E-mail: zhouanfang@21cn.com。

control group, a model group and a kidney-jing-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 later were given concentrated solution of Kidney-tonifying recipe intragastrically at the doses of 0.16mL/10g. 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 apoptosis rates of spermatogenic cell of male offsprings were detected by flow cytometry at 6 weeks. Results: The apoptosis rates of spermatogenic cell were higher in model groups (16.68 ± 4.68) compared with blank control group (4.41 ± 1.81) and Kidney-jing-tonifying group (8.81 ± 2.41) significantly ($P < 0.01$), and the rate of 1C cells were lower significantly at the same time (53.94 ± 5.19 vs 70.61 ± 9.25 , 65.51 ± 8.83 , $P < 0.01$). All groups have no difference rate of 2C and 4C cells. There were no statistical difference between kidney-jing-tonifying and blank group. Conclusion: The fear plus excessive sex could increase apoptosis rates of spermatogenic cell of male offspring, and Kidney-tonifying method could protect spermatogenic cell from this process.

Key words: Kidney-jing deficiency; animal model; offspring; spermatogenic cell; flow cytometry; kidney-jing-tonifying recipe

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。正如万全所言:“子之羸弱。皆父母精血之弱也。”(《幼科发挥·卷之一·胎疾》)。前期研究发现,用“惊恐复合房劳”的方法复制小鼠肾精亏虚模型,不但可以显著降低雄性小鼠生育力,其雄性仔鼠精子质量亦明显下降^[1]。凋亡是机体的一种基本生理机制,通过生殖细胞凋亡机制,生殖细胞增殖和死亡之间维持着微妙的平衡。如果这种平衡被打破,则可导致睾丸生精功能障碍而致精子密度和质量的变化。本文观察肾精亏虚雄性小鼠之仔鼠生精细胞凋亡率的变化,以探讨凋亡机制在其精子质量下降中的地位。

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,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 0.8g/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 18mg溶于 150mL蒸馏水中,配成 0.12mg/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 2.34mg/(kg·d),5天 1个循环。每组雌鼠在灌胃后的第 3天正好处于动情期,可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天,制造肾精亏虚模型。3组实验小鼠均自由饮食。

1.3.3 给药剂量与方法 补肾组每天给予 0.16mL/10g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天起开始给药,共 21天。

1.4 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天。取出雌鼠待其分娩。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,切取左侧睾丸, -7℃保存,备作流式细胞检测。

1.5 检测方法

1.5.1 试剂 RNaseA,购自 TaKaRa/宝生物工程(大连)有限公司。PI染液(pH7.4, PI 100μg/mL, TritonX - 100 0.1%, EDTA 0.1mmol/L, RNaseA 50mg/L,用棕色瓶 4℃避光保存)。

1.5.2 检测方法 取睾丸组织 0.1g,加入 10倍体积 0.25%的胰蛋白酶 37℃消化 25min,消化过程中应振荡数次以帮助组织消化。然后 300目筛网过滤,2000r/min离心 10min,去上清,加入 2mL磷酸盐缓冲液(PBS),振荡后 2000r/min离心 10min,去上清,重复 PBS洗涤、离心过程 1次后,加入 PI染液 1.5mL。常温下,避光染色 15min,300目筛网过滤,上机分析,用 CELLQuest软件分析数据。

1.5.3 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, P值检验,进一步多重比较采用 Turkey分析,计数资料用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

各组仔鼠睾丸生精细胞流式细胞分析细胞分布直方图显示,正常组可见 3个峰,分别为 1C峰、2C峰、4C峰,无凋

亡峰出现(见图 1);模型组在 1C 峰前出现明显的凋亡峰(见图 2);补肾组亦可可见凋亡峰(见图 3)。各组仔鼠睾丸细胞凋亡率比较:模型组仔鼠显著高于正常组及补肾组,有非常显著的差异($P < 0.01$),补肾组与正常组相比没有统计学差异($P > 0.05$)。各组仔鼠睾丸 1C 细胞比例比较:模型组明显低于正常组,有非常显著的差异($P < 0.01$),补肾组与正常组比较无显著性差异($P > 0.05$),但与模型组相比明显较高,有显著性差异($P < 0.05$)。各组仔鼠睾丸 2C、

4C 细胞比例均无显著性差异($P > 0.05$)。各组仔鼠睾丸生精细胞凋亡率及各级生精细胞数比较见表 1。

表 1 雄性小鼠肾虚对其仔鼠睾丸各级生精细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率	1C	2C	4C
正常组仔鼠	10	4.41 ± 8.1 ^{△△}	70.61 ± 25.2 ^{△△}	13.43 ± 19	6.09 ± 5.2
模型组仔鼠	10	16.68 ± 6.8 ^{**}	53.94 ± 19 ^{**}	16.01 ± 8.2	5.98 ± 7.03
补肾组仔鼠	10	8.81 ± 2.41 ^{△△}	65.51 ± 8.3 [△]	14.84 ± 4.5	7.87 ± 0.5

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

3 小结与讨论

凋亡是机体的一种基本生理机制,在睾丸生殖细胞的生长、发育、分化过程中起着重要作用。出生后 10~15 天,出现第一批生精细胞分裂时就有一次大规模的生精细胞凋亡,以调整生精细胞数量,使之与支持细胞在数量上保持一个适宜的比例关系。精母细胞在成熟分裂期也经常可以见到凋亡,这样一个初级精母细胞实际仅产生 2 个精子细胞而不是 4 个精子细胞;而在精子形成期,细胞凋亡更为常见。从生殖细胞类型看,凋亡频率最高的是精原细胞和精子细胞。通过生殖细胞凋亡机制,保持了生殖细胞增殖和生殖细胞死亡之间的平衡^[3]。生精细胞的凋亡超过了正常范围,则可导致睾丸生精功能障碍而致不育^[4]。

本实验研究显示,在正常组的细胞分布直方图上,只出现单倍体、二倍体和四倍体 3 个峰(见图 1),而在模型组和补肾组的细胞分布直方图上,在 1C 峰前可见新的峰(见图 2、图 3)。这个峰由断裂的 DNA 形成,代表凋亡细胞的数量。实验数据显示模型组仔鼠生精细胞凋亡率明显比正常组高,接受补肾治疗的小鼠,其仔鼠生精细胞细胞凋亡率可以得到有效的控制。与正常组相比,模型组仔鼠睾丸组织 1C 细胞比例也明显下降,提示生精功能受损,睾丸内精子细胞数量下降,这与实验 2 中观察到的模型组仔鼠附睾精子密度明显较低的结果是一致的。模型组仔鼠睾丸组织中 2C 及 4C 细胞比例与正常组相比没有显著性差异,说明虽然模型组生精功能受损,但是没有明显的生精阻滞,生精功能的损伤出现在精子细胞或其下游阶段。

本实验证实,“惊恐、房劳”因素复制的肾虚模型小鼠的仔鼠睾丸生精细胞凋亡率明显上升,1C 细胞比例下降,并导致精子密度降低。补肾填精方可以有效地降低其仔鼠睾丸生精细胞凋亡率,从而改善睾丸生精功能。

参考文献

- [1] 孙洁,周安方,周艳艳,等. 肾精亏虚对雄性小鼠及其仔鼠生育力的影响[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13(8): 754-757.
- [2] 陈英华,谢玲玲,杨华伟,等. 左炔诺孕酮炔雌醇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): 46-51.
- [3] 郭应禄,胡礼泉. 男科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004: 324.
- [4] 曹兴午,曹育爱,金合武. 生殖细胞凋亡与男性不育症[J]. 中国性科学, 2004, 13(6): 3-8.

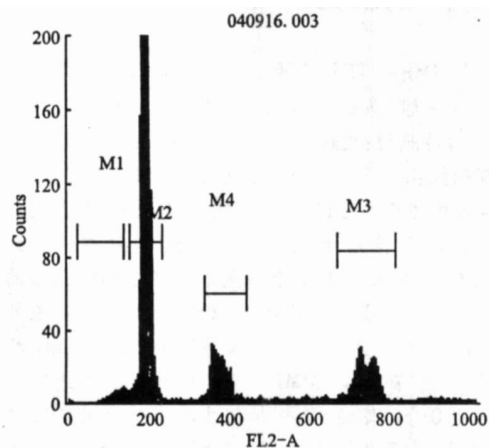


图 1 正常组无凋亡峰

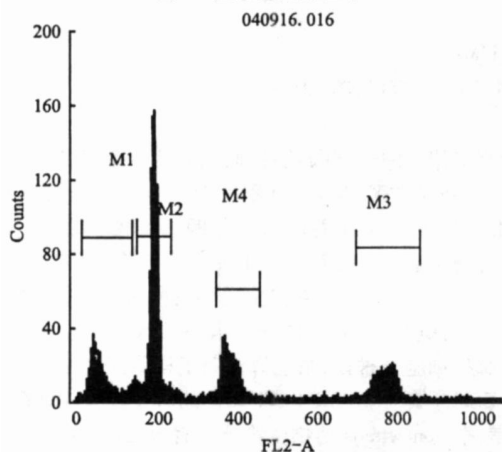


图 2 模型组可见明显凋亡峰(M1)

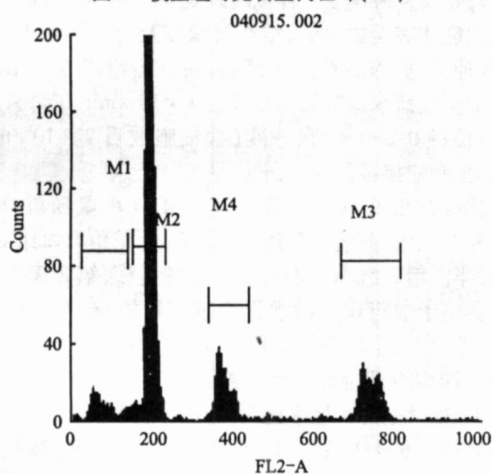


图 3 补肾组可见较低凋亡峰(M1)