

雄性小鼠肾虚对其雄性仔鼠睾丸组织氧化应激水平的影响*

孙洁¹, 周安方², 周艳艳², 方婷²

(¹浙江省中医院, 杭州 310006; ²湖北中医学院, 武汉 430061)

摘要: 目的: 观察雄性小鼠肾虚对其雄性仔鼠睾丸氧化应激水平的影响。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。补肾组每天给予0.16ml/10g体质量的补肾填精方浓缩液灌胃。正常组及模型组予等量生理盐水灌胃, 造模并给药21d。从造模结束次日起, 所有小鼠与正常发情雌鼠配对饲养5d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, 取出左侧睾丸, 检测其组织匀浆上清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、总抗氧化能力(total antioxygen capacity), T-AOC。结果: 模型组仔鼠睾丸组织MDA水平(24.26 ± 6.05) $\mu\text{mol/gprot}$ 明显高于正常组(16.54 ± 1.47) $\mu\text{mol/gprot}$ 及补肾组 (15.04 ± 1.50) $\mu\text{mol/gprot}$, ($P < 0.01$)。模型组仔鼠睾丸组织T-AOC水平(2.71 ± 0.55)U/mgprot与正常组仔鼠(4.33 ± 1.54)U/mgprot比较明显降低($P < 0.01$), 与补肾组(4.08 ± 0.91)U/mgprot比较亦有所下降($P > 0.05$)。补肾组与正常组之间无显著性差异($P > 0.05$)。而各组仔鼠睾丸组织SOD水平之间均无显著性差异($P > 0.05$)。结论: 模型组仔鼠睾丸内抗氧化能力下降, 并可能因此而致氧化应激水平上升, 补肾法可以有效地拮抗这种病理变化。睾丸内氧化抗氧化体系的失衡可能是肾虚仔鼠生育力下降的重要原因之一。

关键词: 肾精亏虚; 动物模型; 子代; 补肾填精方; 氧化应激

Effect of Kidney-jing Deficiency on oxidative stress of male offspring

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

(¹Zhejiang Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China; ²Hubei College of TCM, Tanhualin, Wuhan 430061, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of kidney-jing deficiency of male mice on the oxidative stress of their male offspring. Methods: Thirty 6-weeks-old Kunming male mice were divided into three groups randomly: the blank control group, the model group and the 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 0.16ml/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 malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase (SOD) and total antioxygen capacity (T-AOC) of testicle of male offsprings were detected at 6 weeks. Results: The level of MDA in model group was higher than that in blank control group and kidney-tonifying group significantly(24.26 ± 6.05 vs 16.54 ± 1.47), (15.04 ± 1.50) $\mu\text{mol/gprot}$ ($P < 0.01$), and the level of T-AOC in model group were lower than that in normal group and kidney-tonifying group significantly(2.71 ± 0.55) of model group vs (4.33 ± 1.54)U/mgprot of blank group, $P < 0.01$, (2.71 ± 0.55) of model group vs (4.33 ± 1.54)U/mgprot of Kidney-tonifying group ($P < 0.05$). There were no statistical difference of the level of SOD between groups. Conclusion: The fear plus excessive sex could reduce AOC level of male offspring, and kidney-tonifying could rivalry this pathological change. The results means the variation of oxidative system was one of the reasons for fertility damage on these male offsprings.

Key words: Kidney-jing deficiency; Animal model; Offspring; Oxidative stress; Kidney-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, 故汪绮《理虚元鉴·虚证有六因》说: “因先天者, 指受气之

*湖北省自然科学基金资助课题 (No.2004ABA184)

通讯作者: 孙洁, 杭州市邮电路54号浙江省中医院泌尿外科, 邮编: 310006, 电话: 0571-87070985, E-mail: sjde008@163.com

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],前期研究表明“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。但是这种损伤的机制并不清楚。氧化应激是多种生殖损伤的共同通路^[2],因此本文观察了雄性小鼠肾虚对其雄性仔鼠睾丸组织氧化应激水平的影响,以探讨氧化应激与肾虚雄鼠仔鼠生育力之间的影响。

材料与方法

1. 实验动物 清洁级6周龄雄性昆明小鼠30只,雌性昆明小鼠330只,体质量(32 ± 2.5)g,均购自湖北省医学科学院。

2. 药物及制备

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。

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。

3. 试剂 丙二醛(MDA)、过氧化歧物化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

4. 造模与分组

4.1 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^[3],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),5d一个循环。每组雌鼠在灌胃后的第3d正好处于动情期,可用于复制雄鼠肾精亏虚模型。

4.2 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,再将该小笼固定在装有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21d,制造肾精亏虚模型。3组实验小鼠均自由饮食。

5. 给药剂量与方法 补肾组每天给予0.16ml/10g体质量的补肾填精方浓缩液灌胃。正常组及模型组予等量生理盐水灌胃。自造模第1d起开始给药,共21d。

6. 取材时间及方法 从造模结束次日日起所有小鼠均应即按1:1比例与正常发情雌鼠配对饲养5d后取出雌鼠,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,打开腹腔,取出左侧睾丸,用4℃预冷的生理盐水洗净血液,滤纸吸干水分,用眼科剪剪取一部分睾丸组织,称重,玻璃匀浆器匀浆,按每克睾丸组织加10ml生理盐水,制备成10%的睾丸组织匀浆,4000r/min离心10min,取上清液置4℃保存待测。

7. 检测方法 睾丸组织总蛋白含量用考马斯亮蓝法测定;MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定;SOD活性采用黄嘌呤氧化酶法测定;T-AOC采用化学比色法测定。

8. 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。

结果

见表1。各组MDA含量比较:模型组仔鼠较正常组仔鼠显著升高,有非常显著的差异($P < 0.01$),补肾组仔鼠较正常组仔鼠略有降低,但无显著性差异($P > 0.05$),较模型组仔鼠显著降低,有非常显著的差异($P < 0.01$)。各组T-AOC水平比较:模型组仔鼠较正常组仔鼠明显降低,有非常显著的差异($P < 0.01$);补肾组仔鼠与正常组仔鼠相比无显著性差异($P > 0.05$),较模型组仔鼠高,有显著性差异($P > 0.05$)。而各组SOD含量之间均无显著性差异($P > 0.05$)。

表1 雄性小鼠肾虚对其雄性仔鼠睾丸组织MDA、总SOD、T-AOC的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA($\mu\text{mol/gprot}$)	SOD(U/mgprot)	T-AOC(U/mgprot)
正常组仔鼠	10	16.54 $\pm$ 1.47	114.77 $\pm$ 12.92	4.33 $\pm$ 1.54
模型组仔鼠	10	24.26 $\pm$ 6.05**	122.20 $\pm$ 9.77	2.71 $\pm$ 0.55**
补肾组仔鼠	10	15.04 $\pm$ 1.50	115.54 $\pm$ 5.77	4.08 $\pm$ 0.91

注:与正常组仔鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组仔鼠比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

讨论

虽然在1943年Macleod等^[4]就间接证明了人类精子有产生活性氧片段(ROS)的能力,但直到1987年才首次得到人和动物的精子产生ROS的直接证据。此后,人们逐渐发现适量的ROS与精子的运动功能、获能等生理功能有关,人类精子产生低水平的ROS以激发例如酪氨酸磷酸化等与获能有关的关键事件^[5]。但是,由各种原因产生的生殖道ROS会影响睾丸功能,降低精子质量。活性氧的这种负性影响既可能是直接对睾丸、精子等靶点产生氧化损伤的结果^[6],也可能只是作为启动因素触发其他细胞损伤机制^[7]。

放射^[8]、感染^[9]、缺血^[10]、吸烟^[11]等多种病理因素均可通过活性氧介导的过氧化损伤引起睾丸功能受损。ROS可以使睾丸间质细胞及其线粒体的质膜发生脂质过氧化,从而导致间质

细胞分泌功能下降,血清睾酮水平降低^[12],这种脂质过氧化介导的损伤也发生于支持细胞,是引起不育的重要原因之一^[2]。男性生殖道中最容易受到氧化损伤的细胞是各级生精细胞。ROS可以使不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,引起精子细胞流动性降低^[13],也可以直接损伤生精细胞、精子的细胞核及线粒体DNA^[14]。

SOD是需氧生物和耐氧生物体内共有的清除氧自由基最主要的氧化酶。SOD不仅自身能将过氧化氢(H_2O_2)转化为 H_2O ,而且对过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化酶(GPX)将 H_2O_2 转化为 H_2O 的反应具有催化作用,被称为“细胞内自由基的排污槽”,在清除氧自由基ROS的过程中具有关键作用。机体的抗氧化防御体系包括酶促和非酶促两个体系,非酶促反应体系中主要为维生素、氨基酸和金属蛋白质等。两种防御体系的总和即被称为总抗氧化能(T-AOC)。丙二醛(MDA)是过氧化脂质的分解产物,可以用来作为衡量氧化应激程度的指标^[15]。

实验发现模型组小鼠睾丸组织MDA与正常组和补肾组相比均有非常明显的上升,说明模型组小鼠睾丸内脂质过氧化水平上升,超氧化反应活跃。而补肾则可以拮抗肾虚引起的氧化损伤。虽然模型组T-AOC水平明显下降,但是其SOD活性与正常组相比没有显著性差异,提示肾虚小鼠睾丸抗氧化能力的下降可能与SOD活性无关,其抗氧化防御体系的受损可能主要在SOD以外的其他酶系如过氧化氢酶等,或非酶促反应体系,如金属离子、维生素等。但是作为一种金属酶,当SOD与Cu、Zn、Mn、Fe等不同金属离子结合时,其生物学特性也有所不同,所以不能排除肾虚小鼠的抗氧化能力下降与SOD某种金属酶亚型活性的改变有关。

本实验表明,模型组小鼠睾丸内抗氧化能力下降,并可能因此而导致氧化应激水平上升,补肾法可以有效地拮抗这种病理变化。睾丸内氧化抗氧化体系的失衡可能是肾虚小鼠生育力下降的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Einat K Sheiner, Eyal Sheiner, Refael Carel, et al. Potential Association Between Male Infertility and Occupational Psychological Stress. *JOEM*, 2002, 44(12): 1093-1100
- [2] O WS, Chen H, Chow PH. Male genital tract antioxidant enzymes-Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, Jan 25; [Epub ahead of print]
- [3] 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. *中国实验动物学报*, 2003; 11(1):

46-51

- CHEN Ying-hua, XIE Lin-lin, YANG Hua-wei, et al. Study on the Reproductive Capacity of Male Mouse due to Excess Sexual Activity. *Acta Laboratoriun Animalis Scientia Sinica*. 2003; 11(1): 46-51
- [4] Alvarez J G, Touchstone J C, Blasco L, et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 1987, 8(5): 338-348
- [5] Baker M A, Aitken R J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005(3): 67
- [6] Anim J T, Kehinde E O, Prasad A, et al. Morphological responses of the rabbit testis to ischemic/reperfusion injury due to torsion. *Urol Int*, 2005, 75(3): 258-263
- [7] Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*, 2005, 39(7): 697-705
- [8] Manda K, Bhatia A L. Pre-administration of beta-carotene protects tissue glutathione and lipid peroxidation status following exposure to gamma radiation. *J Environ Biol*, 2003, 24(4): 369-372
- [9] Saleh R A, Agarwal A, Kandirali E, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, 2002, 78(6): 1215-1224
- [10] Anim J T, Kehinde E O, Prasad A, et al. Morphological responses of the rabbit testis to ischemic/reperfusion injury due to torsion. *Urol Int*, 2005, 75(3): 258-263
- [11] Sepaniak S, Forges T, Monnier-Barbarino P. Consequences of cigarette smoking on male fertility. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2005, 34 Spec No 1: 3S102-11
- [12] Allen JA, Diemer T, Janus P, et al. Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine*, 2004, 25(3): 265-275
- [13] DE Iulius G N, Wingate J K, Koppers A J, et al. Definitive evidence for the non-mitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 2: Epub ahead of print
- [14] Sawyer D E, Mercer B G, Wiklendt A M, et al. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Utat Res*, 2003, 529(112): 21-34
- [15] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al. Protective Effect of Resveratrol on Ethanol-induced Lipid Peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol*, 2006, 3: Epub ahead of print

(收稿日期: 2008年1月20日)