

益精方对腹腔注射环磷酰胺大鼠性腺组织的影响

柴可夫¹ 李 慧¹ 李春莲¹ 王永钧² 王 军² 俞公煌³

摘要 通过环磷酰胺(CTX)腹腔注射,造成大鼠性腺抑制,用中药益精方灌胃,从精子计数与活率、性腺和附性器官脏器系数、睾丸与附睾组织形态方面,观察益精方对用CTX后大鼠性腺组织的影响。结果,益精方各剂量组大鼠精子数量及活率显著高于模型对照组($P<0.05$, $P<0.01$),益精方能明显增加大鼠性腺及附性器官脏器系数,能明显改善大鼠睾丸及附睾的组织结构。说明中药益精方对CTX所致的性腺损伤有显著的改善作用。

主题词 性腺/药物作用 @ 益精方

大量临床资料表明,环磷酰胺(Cytosan,CTX)是目前治疗许多免疫性疾病(如难治性肾病、系统性红斑狼疮等)的有效药物,而CTX引起的对性腺的副作用,限制了该药在临床上的应用。由于CTX引起性腺抑制的机理尚不清楚,对此种情况也无较好的防治措施。故研究中医药防治CTX所致性腺抑制有实用价值。本实验通过观察中药益精方对应用CTX大鼠性腺组织的影响,以探讨益精方防治性腺损伤的作用机理,为临床安全有效地应用CTX提供新的措施。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养:雄性SD大鼠,6周龄(120~140g),由浙江省实验动物中心提供。分笼饲养,每笼10只,给予颗粒饲料喂养,自由饮水。

1.2 实验药品与主要试剂:益精方(由黄芪30g、当归10g、仙茅10g、淫羊藿10g、菟丝子10g、枸杞子15g、五味子10g、蛇床子30g、覆盆子10g组成)水煎液(浙江中医学院制剂室制备);CTX(200mg/支,上海华联制药厂生产,批号970410);枸橼酸氯米芬胶囊(500mg/粒,广州番禺市桥制药厂生产,批号980105)。

1.3 分组及给药方法:取雄性SD大鼠85只,随机分为6组。(1)正常对照组:不加任何处理因素;(2)模型对照组:每日灌胃同容积蒸馏水;(3)益精方高、中、低剂量组,每日分别灌胃益精方高、中、低剂量2ml(每毫升分别含生药3.2g、1.6g、0.8g);(4)阳性对照组:每日灌胃枸橼酸氯米芬2.5mg/kg。正常对照组10只,

其余各组均为15只。除正常对照组外,其余各组于灌胃1周后开始腹腔注射CTX,每次40mg/kg,分别于实验第8、24、40、56天腹腔注射1次。

枸橼酸氯米芬成人常用量为25ml/d,换算后大鼠用量为2.5mg/kg。枸橼酸氯米芬50mg溶解于200ml蒸馏水中,制成0.25mg/ml的溶液。枸橼酸氯米芬为目前临床用于治疗男性不育症的常用药物。它是一种人工合成的非类固醇复合物,可抑制下丘脑和垂体部位的雌激素受体,增加促性腺激素释放激素(GnRH)分泌而使黄体生成素(LH)和促卵泡素(FSH)分泌增加,并选择性刺激肾上腺雄激素的生物合成,加之LH对睾丸间质细胞的刺激使睾酮(Ts)分泌增加,最终促进精子生成。因此,我们选用其为阳性对照药物。枸橼酸氯米芬治疗男性不育症时的剂量有3种,高剂量(400mg/d)、中剂量(100~200mg/d)、低剂量(25~50mg/d),目前一般主张用低剂量,认为低剂量能促使精子数目显著增加。因此,本实验采用临床应用的低剂量(25mg/kg)换算至大鼠,其量为2.5mg/kg。整个实验共8周,于用药结束后第2天,摘眼球取血,分离血清,颈椎脱臼处死大鼠。

1.4 检测指标

1.4.1 精子计数、活率:将盛有6ml生理盐水的试管置于恒温水浴箱内预热至37℃,然后将一侧附睾剪断放入试管中,摇匀,37℃保温10~15分钟,使精子充分游离,然后取1滴滴入血细胞计数板上,高倍镜下计数5个中方格内精子数(n),每毫升精子数为 $n \times 5 \times 10^4$ 。另取1滴涂片,观察精子活率,至少观察100个精子,分别计数有活动力及无活动力的精子数。按下式计算:

精子活率 = $\frac{\text{活动精子数}}{\text{活动精子数} + \text{不活动精子数}} \times 100\%$

1.4.2 性腺及附性器官脏器系数:动物处死后,迅速分离睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、提肛肌。取提肛肌、一侧睾丸、附睾,分离干净表面的脂肪组织,直接称重。前列腺分离时宜小心,以防其液体流出,迅速称重。精囊腺取出后放于滤纸上,然后用表面光滑的砝码反复挤压,直至液体流出时再称重。根据动物体重,计算脏器系数。

1.4.3 睾丸、附睾组织形态:动物处死后,取睾丸、附睾、垂体的一小块组织,迅速投入10%甲醛溶液中固

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(396428)

1 浙江中医学院基础医学系,杭州庆春路立交桥西老浙大内(310053)

2 浙江中医学院附属第二医院

3 浙江省中西医结合医院

收稿日期:2000-01-14;修回日期:2000-03-20

表 1 各组大鼠精子计数、精子活率及性腺、附性器官的脏器系数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	精子数($10^6/\text{ml}$)	精子活率(%)	睾丸(g/kg)	附睾(g/kg)	前列腺(g/kg)	精囊腺(g/kg)	提肛肌(g/kg)
正常对照组	10	15.59 $\pm$ 4.41**	76.71 $\pm$ 10.12**	4.02 $\pm$ 0.73**	1.46 $\pm$ 0.33	1.32 $\pm$ 0.29**	1.57 $\pm$ 0.34*	2.24 $\pm$ 0.49*
模型对照组	10	10.84 $\pm$ 3.57	61.24 $\pm$ 9.14	3.18 $\pm$ 0.68	1.41 $\pm$ 0.33	0.91 $\pm$ 0.24	1.25 $\pm$ 0.3	1.76 $\pm$ 0.31
益精方高剂量组	12	14.99 $\pm$ 4.36*	72.74 $\pm$ 11.32**	4.16 $\pm$ 0.97*	1.54 $\pm$ 0.41	1.28 $\pm$ 0.49*	1.47 $\pm$ 0.26	2.16 $\pm$ 0.52*
益精方中剂量组	14	15.12 $\pm$ 3.26**	73.74 $\pm$ 11.32**	4.47 $\pm$ 1.26**	1.94 $\pm$ 1.02	1.38 $\pm$ 0.45**	1.60 $\pm$ 0.27**	2.22 $\pm$ 0.35**
益精方低剂量组	13	14.78 $\pm$ 3.51*	69.97 $\pm$ 11.31*	3.72 $\pm$ 0.88	1.46 $\pm$ 0.31	1.32 $\pm$ 0.41**	1.56 $\pm$ 0.49*	2.11 $\pm$ 0.54
阳性对照组	12	15.16 $\pm$ 4.21*	74.12 $\pm$ 12.34**	4.08 $\pm$ 0.62**	1.33 $\pm$ 0.87	1.33 $\pm$ 0.32**	1.69 $\pm$ 0.37**	2.24 $\pm$ 0.32**

与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

定,常规制作石蜡切片,HE 染色,然后在光镜下观察。

1.5 统计学处理:数据处理用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组均数间的比较用 F 检验,组间两两对比用 Q 检验;等级资料的比较采用 $Ridit$ 分析。

2 结果

2.1 症状及死亡率:正常对照组:大鼠食欲、活动及毛色与治疗前相比无明显改变,体重逐渐增加,至第 8 周,平均体重为 246g,无死亡。

模型对照组:大鼠食欲差,进食量较前减少,毛发失去光泽,活动量明显减少,半数以上大鼠出现血尿,体重增长缓慢,至第 8 周,平均体重为 200g,第 2 周死亡 2 只,第 4、6、7 周分别死亡 1 只,共死亡 5 只。

益精方高、中、低剂量组:大鼠于腹腔注射 CTX 后的 1~2 天内,进食较少,活动量减少,中剂量组偶有 1~2 只出现血尿(镜下红细胞+)。一般 3 天后,此症状即可改善,毛发有光泽,体重增长较模型组快。高、低剂量组中约有 5~6 只出现血尿(镜下红细胞+~++),体重增长缓慢,至第 8 周,高、中、低剂量组大鼠平均体重分别为 210g、232g、208g,死亡大鼠分别为 3 只、1 只、2 只。

阳性对照组:大鼠食欲、活动量及毛发光泽度稍优于模型组,但不及益精方中剂量组。体重增长缓慢,至第 8 周,平均体重为 195g。于第 2、4、5 周分别死亡 1 只,共死亡 3 只。

2.2 各组精子计数与活率比较:模型组大鼠精子数量及活率显著低于正常对照组($P < 0.01$),而应用益精方后,各剂量组大鼠精子数量及活率显著高于模型对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。益精方各剂量组间无显著差异,与阳性对照组间无显著差异。见表 1。

2.3 各组性腺及附性器官脏器系数比较:模型组大鼠睾丸、前列腺、精囊腺、提肛肌系数与正常对照组相比明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而益精方能够明显增加睾丸、前列腺、提肛肌系数。益精方中剂量组大鼠附睾系数明显高于其他各组,但各组间差异无显著性。见表 1。

2.4 各组睾丸与附睾组织形态比较:睾丸病变程度及

分级标准参考同济医科大学法医学系病理学教研室制定的标准。(1)轻度病变:曲细精管上皮各级细胞都存在,病变仅表现为精子细胞和精子数量减少,少数精母细胞胞浆内出现空泡;(2)中度病变:曲细精管变细,初级和次级精母细胞显著减少,精子细胞和精子消失,但精原细胞存在,部分精母细胞的核和胞浆内出现空泡,并见核固缩、核碎裂等坏死病变;(3)重度病变:曲细精管明显甚至极度变细,生精上皮大部分坏死消失,只剩下支持细胞及残留的少量精原细胞。用上述标准,对切片进行观察,按轻、中、重度 3 种病变分别计数,共数 100 个曲细精管切面,求出各种病变曲细精管的百分率,根据其百分率分 3 级,Ⅰ级:轻度病变的曲细精管在 66%以上,或其百分率在 50%以上,而轻度加中度病变的曲细精管在 75%以上;Ⅱ级:重度病变的曲细精管在 66%以上,或其百分率在 50%以上,而重度加中度病变的曲细精管在 75%以上;Ⅲ级:病变介于Ⅰ、Ⅱ级之间。各组 R 值为: $R_I = 0.3268$, $R_{II} = 0.6289$, $R_{III} = 0.5564$, $R_{IV} = 0.4547$, $R_V = 0.5211$, $R_{VI} = 0.5106$ (R 值越大,病变越严重)。根据 R 值可知,模型对照组病变最重,益精方各组以中剂量效果最好。经 $Ridit$ 分析, $P < 0.05$,可以认为模型组与正常对照组大鼠睾丸病变程度有显著差异。见表 2。附睾:(1)正常对照组:附睾的输出小管及附睾管管腔大小相对一致,排列整齐,腺上皮无明显增生现象;(2)模型对照组:大多数附睾的输出小管及附睾管管腔大小悬殊,拥挤扭曲,管内的精子退变呈凝固状坏死,有的附睾管管腔上皮是低乳头状增生,严重者腺上皮可呈筛孔状、实性状及腺内分支状增生,附睾间质慢性炎症细胞浸润。少数附睾病变较轻;(3)益精方各剂量组:大多数附睾输出小管及附睾管管腔不规整,但管壁腺上皮分化良好,无增生现象,管内可见成熟精子。少数附睾病变较重。(4)阳性对照组:多数附睾管管腔不规整,管壁腺上皮分化较好,无明显增生现象。有一些附睾管管壁腺上皮轻度增生,甚至呈现严重病变。

3 讨论

CTX 是一种烷化剂,它对 DNA 的损伤主要是通

表2 各组大鼠睾丸病变情况比较(只)

组别	鼠数	I级	II级	III级
正常对照组(I)	10	8	2	0
模型对照组(II)	10	3	3	4
益精方高剂量组(III)	12	4	6	2
益精方中剂量组(IV)	14	11	2	1
益精方低剂量组(V)	13	6	4	3
阳性对照组(VI)	12	8	1	3

过烷化作用,使DNA发生脱嘌呤,与蛋白质发生交联并使DNA链断裂,干扰细胞内DNA的合成,从而引起细胞周期的停滞和细胞死亡的发生,它对更新较快的组织、细胞作用更为明显。实验证实,CTX可导致睾丸精母细胞出现染色质的凝聚,精子细胞和精子的死亡,精子活率降低,附睾管管腔扭曲变形,管腔上皮低乳头状增生,腺上皮可呈筛孔状、突性状及腺内分支状增生,睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、提肛肌系数明显降低。

结合临床,应用CTX后,病人多有乏力、腰酸、脱发、性功能减退等症状。从中医学的角度看,诸症属肾虚,若肾阳虚损,温煦失职,或肾阴不足,精气化生乏

源,均可导致性腺功能低下。肾为先天之本,主生殖,主藏精。故采用补肾益精中药防治CTX所致性腺抑制。益精方主要由补肾中药组成,方中黄芪益气,仙茅、蛇床子、淫羊藿温肾壮阳,菟丝子、枸杞子补肾益精,五味子、覆盆子益肾固精;当归养血活血,诸药合用,共奏补肾益精,益气活血之效。现代药理研究认为,淫羊藿具有雄激素样作用,可以改善雄性动物性腺的损害,提高睾丸酮含量,并对垂体—性腺系统具有促进作用^[1]。蛇床子可以增加雄性小鼠前列腺、提肛肌的重量^[2]。实验结果表明,益精方可以明显改善睾丸及附睾的组织结构。睾丸曲细精管上皮各级生精细胞都存在,可见精子细胞和精子,精子活率显著提高。附睾管管腔较规整,且管壁腺上皮分化良好,无明显增生现象,管内可见成熟精子。睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、提肛肌的重量增加。因此认为,益精方可以减轻CTX对性腺组织的损伤,具体机理有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 许青媛.淫羊藿对大鼠性腺功能的影响.中药药理与临床,1996;12(2):22-23.
- 2 郭月英,邹莉波,于庆海.补益强壮药抗衰老作用的研究.中成药研究,1987;(6):21-23.

21世纪换代名品——神农牌陶瓷自动煎药机、包装机



—主要特点—

- ★科技含量高,自动化程度高,维修简便
- ★陶瓷内胆,不贴锅内胆,自动抽出装置
- ★随意调节文火、武火,随时先煎后下
- ★自动控制浸泡煎药时间,精确无误
- ★故障自测自检,报警显示功能



神奇可视自动煎药机 卷片式包装机

可与卷片式液体自动包装机及直立袋式液体自动包装机配套作用。

制造商:韩国日光机械株式会社

中国总代理:北京市农人贸易有限责任公司

电话:010-64290461/64290465/64290466 手机:13901387686/13901371994

传真:010-64292440

Homepage:www.nongren.com.cn

地址:北京朝阳区北三环东路甲11号维特写字楼505/507室

我们的目标是为用户提供一流的产品和服务

(广告编号:200106-19)

陶瓷自动煎药机

诚征各地区代理
商及经销商