

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.24.015

补肾解毒方对核辐射所致生殖系统损伤的防护作用

匡振坤¹, 杨云霜², 张蓉^{2*}, 赵雪¹, 杜磊², 瞿彬², 李延晖²

(1. 锦州医科大学火箭军总医院, 辽宁省锦州市凌河区松坡路三段 40 号, 121001; 2. 中国人民解放军火箭军总医院)

摘要 目的 观察补肾解毒方对核辐射所致雄性小鼠生殖系统损伤的防护作用。方法 将 60 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为空白对照组、辐射模型组、补肾解毒方组, 每组 20 只, 补肾解毒方组给予补肾解毒方 13.5 g/(kg·d) 灌胃, 其他两组给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 各组均灌胃 24 天。除空白对照组外, 其余两组小鼠于第 11 天接受一次性 5Gy ⁶⁰Co γ -射线的全身照射。观察各组小鼠一般体征; 于辐射后第 1、14 天观察小鼠体质量, 计算睾丸指数; 于辐射后第 14 天光镜观察睾丸、附睾组织病理形态学变化。结果 辐射模型组附睾、睾丸组织细胞病理形态学有不同程度破坏, 补肾解毒方组组织结构基本正常。辐射后第 1 天, 与空白对照组比较, 辐射模型组和补肾解毒方组小鼠体质量、睾丸指数均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且补肾解毒方组睾丸指数高于辐射模型组 ($P < 0.05$); 辐射后第 14 天, 补肾解毒方组体质量、睾丸指数均较辐射模型组显著升高 ($P < 0.05$), 且与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 补肾解毒方能减轻辐射所致的生殖系统损伤, 提升睾丸指数。

关键词 生殖系统损伤; 补肾解毒方; 核辐射; 睾丸指数

核能作为一种极高效的能源, 被各国广泛应用于军事和核电事业。一定剂量的核辐射对人体多种组织、器官有不同程度的影响和损伤, 生殖系统对其高度敏感^[1], 其中辐射致热效应损伤最为突出, 易造成生殖细胞大量凋亡^[2-3]。中医学认为, 核辐射为外来致病邪气, 属于六淫火(热)邪气, 其性燔灼, 易伤津劫液, 生风动血。肾为水脏, 封藏生命精华, 主生殖, 火热易耗伤肝肾阴血, 动摇生命根本, 故核辐射损伤与肾阴精亏虚关系密切^[4]。六味地黄丸善滋阴补肾, 具有调节机体免疫、保护睾丸功能, 且常作为滋阴补肾的基本方用于不孕不育症的治疗^[5]。补肾解毒方以六味地黄丸为基础方进行优化调整, 本研究观察其对辐射损伤小鼠生殖系统的防护作用。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只, 3 月龄, 体重(28 ± 2) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2012-

0001。自由摄食进水, 普通颗粒饲料饲养, 于北京师范大学生命科学院实验动物中心饲养。

1.2 药品

补肾解毒方组成: 熟地黄 10 g, 山萸肉 12 g, 山药 10 g, 泽泻 10 g, 茯苓 10 g, 牡丹皮 10 g, 冬虫夏草 3 g, 白花蛇舌草 10 g, 由康仁堂药业有限公司配置成中药颗粒。

1.3 主要试剂和仪器

GS-伊红染色液(批号: 161020)、GS-苏木素染色液(批号: 161116)均为哈尔滨格林标本技术开发有限公司产品。电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司, 型号 00000246); ⁶⁰Co γ -辐照装置(北京伽玛高新有限公司, 型号: GM-41-03-A); 光学显微镜(奥林巴斯公司, 型号: BX53)。

1.4 分组、造模及处理

60 只 C57BL/6J 小鼠采用随机数字表法分为空白对照组、辐射模型组、补肾解毒方组, 每组 20 只。适应性饲养 7 天后, 补肾解毒方组每天上午 8:00 给予补肾解毒方 13.5 g/(kg·d) 灌胃, 空白对照组、辐射模型组给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 各组均连续灌胃 10 天。第 11 天辐射模型组、补肾解毒方组进行一次性 5Gy 的 ⁶⁰Co γ -射线照射, 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金(81673873); 第二炮兵总医院青年科研创新基金(41734113)

* 通讯作者: zhangrongyisheng@sina.com, 18910883010

笼置于伽马源可照射区域内, 剂量 1.00 Gy/min, 5 min。空白对照组不接受照射。各组照射当天不给药之后继续上述方法给药灌胃 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 包括精神状态、毛色、食欲、体质量、饮食等情况。

1.5.2 体质量 于辐射后第 1、14 天对小鼠进行称重。

1.5.3 睾丸指数 各组小鼠分别于辐射后第 1、14 天取材。辐射后第 1 天采用随机数字表法每组选取 6 只小鼠称重取材, 第 14 天全部存活小鼠称重后取材。摘眼球采血, 断颈处死后迅速取睾丸、附睾, 用冷生理盐水冲洗, 除去血液, 滤纸滤干。电子天平称重双侧睾丸, 计算睾丸指数, 睾丸指数 = 睾丸质量 / 取材当天体质量。

1.5.4 睾丸、附睾组织结构 右侧睾丸、附睾用中性甲醛固定, 4 μ m 厚切片, 苏木素-伊红染色, 光镜下观察睾丸、附睾组织结构。

取材不成功者不纳入统计, 解剖观察死亡小鼠脏器情况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况

实验过程中空白对照组死亡 1 只, 辐射模型组死亡 3 只, 补肾解毒方组死亡 1 只。空白对照组小鼠毛色光滑, 食欲、体质量、饮水均为正常水平。其余两组在辐射后当日均出现烦躁不安、易惊恐、饮食量下降等情况, 辐射后第 2 天饮食量明显下降, 体质量减轻。辐射后第 7 天, 辐射模型组精神萎靡, 毛色暗淡甚至片状脱毛, 体质量明显下降, 死亡小鼠解剖可见部分小鼠有腹水、肝肿大、胃肠胀气, 生殖器官充血、水肿, 余脏器肉眼未见明显异常。

2.2 各组小鼠辐射后不同时间体质量比较

表 1 示, 辐射后第 1 天, 与空白对照组比较, 辐射模型组和补肾解毒方组体质量均有不同程度的下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 补肾解毒方组与辐射模型组体质量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。辐射后第 14 天, 辐射模型组体质量明显低于空白对照组和补肾解毒方组 ($P < 0.05$), 且补肾解毒方组与空白对照组比较差异无统计学意义

($P > 0.05$)。与本组辐射后第 1 天比较, 空白对照组、补肾解毒方组体质量明显升高 ($P < 0.05$), 而辐射模型组体质量无明显变化 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠辐射后不同时间体质量比较 ($g, \bar{x} \pm s$)

组别	辐射后第 1 天	辐射后第 14 天
空白对照组	28.07 $\pm$ 1.25 (20)	28.71 $\pm$ 1.34 (13) Δ
辐射模型组	27.13 $\pm$ 1.18 (20) $**$	27.55 $\pm$ 1.36 (11) $*$
补肾解毒方组	27.47 $\pm$ 1.00 (20) $*$	28.16 $\pm$ 1.64 (13) $\Delta\Delta$

注: () 内为鼠数; 与空白对照组同时时间点比较, $*$ $P < 0.05$, $**$ $P < 0.01$; 与辐射模型组同时时间点比较, Δ $P < 0.05$; 与本组辐射后第 1 天比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.05$

2.3 各组小鼠辐射后不同时间睾丸指数比较

表 2 示, 辐射后第 1 天, 与空白对照组比较, 辐射模型组和补肾解毒方组睾丸指数均明显下降 ($P < 0.01$), 且补肾解毒方组高于辐射模型组 ($P < 0.05$)。辐射后第 14 天, 辐射模型组睾丸指数明显低于空白对照组 ($P < 0.01$), 补肾解毒方组睾丸指数明显高于辐射模型组 ($P < 0.05$), 且与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与本组辐射后第 1 天比较, 补肾解毒方组辐射后第 14 天睾丸指数明显升高 ($P < 0.05$)。

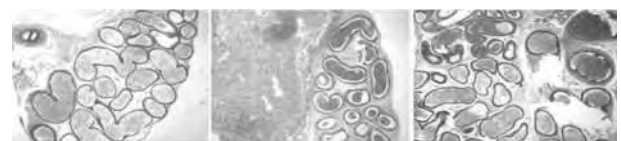
表 2 各组小鼠辐射后不同时间睾丸指数比较 ($mg/g, \bar{x} \pm s$)

组别	辐射后第 1 天	辐射后第 14 天
空白对照组	6.617 $\pm$ 0.795 (6)	6.641 $\pm$ 0.917 (13)
辐射模型组	5.242 $\pm$ 0.629 (6) $*$	5.294 $\pm$ 0.379 (11) $*$
补肾解毒方组	6.044 $\pm$ 0.666 (6) $* \Delta$	6.411 $\pm$ 0.651 (13) $\Delta\Delta$

注: () 内为鼠数; 与空白对照组同时时间点比较, $*$ $P < 0.01$; 与辐射模型组同时时间点比较, Δ $P < 0.05$; 与本组辐射后第 1 天比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.05$

2.4 各组小鼠生殖器官病理形态学情况

2.4.1 各组小鼠附睾病理形态 图 1 示, 空白对照组可见附睾头部输出小管高柱状细胞及低柱状细胞相间排列, 管腔尚规则, 附睾管腔规则, 内见大量精子。相较于空白对照组, 辐射模型组小鼠附睾组织细胞、间质细胞增生, 曲细精管数量减少, 间质纤维化; 补肾解毒方组曲细精管扩张, 散在凋亡细胞分布, 组织细胞结构基本正常。

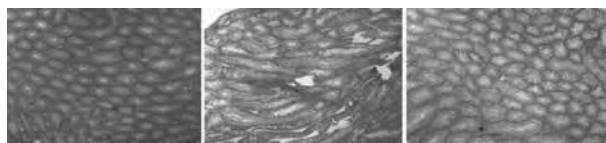


空白对照组 辐射模型组 补肾解毒方组

图 1 各组小鼠附睾病理图 ($\times 400$)

2.4.2 各组小鼠睾丸病理形态 图 2 示, 空白对照组见睾丸实质生精小管、各级精母细胞, 精子紧

密排列在生精小管管腔周围,组织细胞结构正常。相较于空白对照组,辐射模型组小鼠睾丸实质见多种细胞胞核固缩,散在凋亡细胞;补肾解毒方组睾丸实质内见细胞染色较淡,细胞核密度降低。



空白对照组 辐射模型组 补肾解毒方组

图2 各组小鼠睾丸病理图(×400)

3 讨论

中医理论认为,辐射线为热毒、火毒之邪。核辐射属于电离辐射范畴,高能辐射粒子与组织中的分子相互作用,其能量使生物分子的低轨道电子跃到较高级的轨道上,使分子处于激发态,分子被激发后很不稳定,容易向邻近的分子释放大量能量,引发电离现象。当辐射粒子作用于机体时,能量在短时间内以热的形式传递给机体,超出机体的承受能力,中伤机体;并使机体多种物质发生电离,致使机体多系统受到损伤^[1]。由辐射的致病机理可知,它属于中医病因理论火热毒邪范畴。热毒蕴于体内,充斥三焦,变化多端,侵袭下焦,则肝肾阴精耗损,阴虚内热。生殖系统位于人体下焦,其对辐射高度敏感,且辐射致热效应损伤最为突出。肾为封藏之本,藏精,主生殖,故辐射对生殖系统损伤的作用机制为肾脏阴精亏虚。因此,中医学的治法为滋阴填精,通过激发机体抗病能力,维持肾脏阴阳平衡而减轻机体阴精的损害。

补肾解毒方以六味地黄丸为基础方进行优化调整,减熟地黄用量至10g,加冬虫夏草3g,白花蛇舌草10g,针对辐射后脾胃运化功能减弱,本方减熟地黄滋腻有碍消化的弊端,加入提高机体免疫力、清热解毒药物。冬虫夏草补肺益肾,增加六味地黄丸滋阴清热之力,且冬虫夏草的多种有效成分如虫草多糖对网状内皮系统及巨噬细胞有明显激活作用,能促进淋巴细胞转化,是一种非特异性免疫增强及调节剂,具有促进造血功能、提高免疫力、抗癌、降血糖、降血脂等功效^[2]。白花蛇舌草具有清热解毒、消痈散结、利尿除湿之功,善清火热毒邪,减轻辐射的火热之性,防止痈疔疮生成,并通过“下法”促进病理代谢产物的排出^[3]。本方诸药合用,共奏扶正祛邪之功。

现代研究发现,辐射致热效应对生殖器官损伤最突出,可造成生殖细胞大量凋亡^[2-3]。Zhang H

等^[4]对小鼠睾丸分别进行1Gy、2Gy剂量的辐照,结果随着照射剂量的增加,睾丸重量减少,精子计数减少和精子形态显著异常。张卫星等^[5]设置四组不同剂量(4Gy+4Gy; 6Gy+6Gy; 2Gy+10Gy; 6Gy+8Gy)的辐照处理小鼠,发现睾丸损伤程度与照射总剂量呈正相关性。课题组前期对小鼠进行高剂量辐照发现7Gy的照射剂量损伤睾丸间质细胞,睾丸指数及精子相对计数明显下降,辐射后分别给予八珍汤、六味地黄丸、自拟扶正解毒方剂灌胃,睾丸间质细胞较辐射组都有所恢复,且自拟扶正解毒方剂组睾丸间质细胞形态最接近正常组小鼠^[6]。

本次研究在前者基础上,调整辐射为中等剂量(5Gy)⁶⁰Co γ-射线照射小鼠,建立实验动物模型。辐射对生殖系统损伤的主要标志性内容:睾丸间质细胞结构明显的损伤,睾丸指数显著下降,精子相对计数下降,组织细胞大量凋亡^[2,8-9]。本实验光镜观察到辐射后睾丸实质多种细胞胞核固缩,散在凋亡细胞;附睾组织细胞、间质细胞增生,曲细精管数量减少,间质纤维化。小鼠体重及睾丸指数有明显下降,表明成功建立了核辐射动物模型。前期研究发现,补肾解毒方对电离辐射损伤的具有防护作用。张云静等^[12]观察到补肾解毒方减轻辐射所致的白细胞损伤,提高机体免疫力。张箫月等^[13]发现补肾解毒方干预能够防护造血系统的损伤。李延晖等^[11]用六味地黄丸、自拟扶正解毒方剂干预电离辐射后的雄鼠,与辐射组相比,两组体质量、睾丸指数、精子相对计数均有升高,在病理形态学方面,自拟扶正解毒方剂组睾丸间质细胞形态接近正常。本研究采用的补肾解毒方是对六味地黄丸、自拟扶正解毒方剂的优化整合。结果显示,辐射后第1天,辐射模型组、补肾解毒方组小鼠体质量、睾丸指数与正常水平相比均有明显下降。辐射后第14天,各组体质量均有升高,空白对照组有大幅提高,辐射模型组与正常水平仍有较大差异,补肾解毒方组小鼠体质量提升最为显著,已接近于正常水平;辐射模型组睾丸指数与辐射后第1天相比上升,处于较低水平,补肾解毒方组睾丸指数较辐射模型组接近正常水平。光镜观察生殖器官病理形态学的变化,辐射模型组小鼠睾丸、附睾等组织辐射后有不同程度的细胞凋亡,组织萎缩。而补肾解毒方组则在辐射后第14天组织有明显修复,组织细胞结构基本正常。综上所述,补肾解毒方对C57BL/6J雄鼠生殖系统具有良好的核辐射防护效应,可提高辐射后小鼠体质量,修复生殖器官组织

病理形态学改变,减轻辐射对生殖系统的损伤,提升睾丸指数使其趋向正常,增强睾丸、附睾组织的自身修复能力。

参考文献

- [1] SHABAN NZ, AHMED ZAHARAN AM, EL-RASHIDY FH, et al. Protective role of hesperidin against γ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis [J]. J Biol Res (Thessalon), 2017, 24: 5. doi: 10.1186/s40709-017-0059-x.
- [2] ZHAO Q, MAO A, YAN J, et al. (56) Fe ion irradiation induced apoptosis through Nrf2 pathway in mouse testis [J]. Life Sci, 2016, 157: 32-37. doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.043.
- [3] 薛蕾, 王水明, 陈浩宇, 等. 微波辐射致小鼠 GC-2spd 细胞损伤效应研究 [J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(3): 201-206.
- [4] 张蓉, 石鹏展, 杨云霜, 等. 从肾阴亏虚探讨核辐射损伤的中医病因病机 [J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(3): 40-42.
- [5] 张宏博, 刘维, 房丹, 等. 六味地黄丸拮抗雷公藤对雄鼠生殖系统影响的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(9): 1325-1326.
- [6] 毛秉智, 陈家佩. 急性放射病基础与临床 [M]. 北京:

军事医学科学出版社, 2002: 84-92.

- [7] 杨颖, 黄俊明, 蔡玫, 等. 蛹虫草对辐射致免疫低下小鼠保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(5): 610-611.
- [8] 陈秀珍, 潘荣斌, 朱大诚. 白花蛇舌草对白细胞影响的研究进展 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 356-359.
- [9] ZHANG H, ZHENG RL, WEI ZQ, et al. Effects of pre-exposure of mouse testis with low-dose (16) O_8^+ ions or ^{60}Co - γ gamma-rays on sperm shape abnormalities, lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) activity induced by subsequent high-dose irradiation [J]. Int J Radiat Biol, 1998, 73(2): 163-167.
- [10] 张卫星, 杨杰, 王瑞, 等. ^{60}Co - γ 射线致大鼠睾丸间质细胞结构及睾酮合成功能的损害 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(17): 1823-1826.
- [11] 李延晖, 张蓉, 邹练, 等. 八珍汤、六味地黄丸、自拟扶正解毒方剂对 ^{60}Co - γ 射线致大鼠生殖系统损伤的防治作用 [J]. 山东医药, 2014, 54(43): 28-30.
- [12] 张云静, 杨云霜, 杨利丹, 等. 补肾解毒方对辐射小鼠外周血白细胞及脾脏 NF- κ Bp65 的影响 [J]. 暨南大学学报, 2015, 36(3): 490-495.
- [13] 张箫月, 杨云霜, 刘刃, 等. 补肾解毒方对辐射所致造血系统损伤的防护作用研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(2): 220-224.

Protective Effect of *Bushen Jiedu Decoction* (补肾解毒方) on Injury of Reproductive System Caused by Nuclear Radiation

KUANG Zhenkun¹, YANG Yunshuang², ZHANG Rong², ZHAO Xue¹, DU Lei², QU Bin², LI Yanhui²

(1. Rocket Force General Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou, 121001; 2. Rocket Force General Hospital of People's Liberation Army of China)

ABSTRACT Objective To observe the protective effect of *Bushen Jiedu Decoction* on injury of reproductive system caused by nuclear radiation in male mice. **Methods** Sixty C57BL/6J male mice were randomly divided into blank control group, radiation model group and *Bushen Jiedu Decoction* group, with 20 mice in each group. *Bushen Jiedu Decoction* group was given *Bushen Jiedu Decoction* (13.5 g/(kg · d)) by gavage. The other groups were given 0.2 ml of physiological saline by gavage. Each group was treated for 24 days. Except for blank control group, the other two groups received the whole body 5Gy ^{60}Co - γ -ray radiation for one time on the eleventh day. The general physical signs of mice in each group were observed. On the first day and the fourteenth day after radiation, the weight of mice was measured and the testis index was calculated. The pathomorphological changes of testis and epididymis were observed on the fourteenth day with light microscope. **Results** In the radiation model group, the pathomorphology of testes and epididymides showed injuries in different degrees. The tissue structure in *Bushen Jiedu Decoction* group was basically normal. On the first day after radiation, compared with the blank control group, the weight and testis index of the mice in radiation model group and *Bushen Jiedu Decoction* group decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The testis index in *Bushen Jiedu Decoction* group was higher than that in radiation model group ($P < 0.05$). On the fourteenth day after radiation, the weight and testis index in *Bushen Jiedu Decoction* group were both significantly higher than those in radiation model group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between *Bushen Jiedu Decoction* group and blank control group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Bushen Jiedu Decoction* group might reduce reproductive system damage caused by nuclear radiation and increase testis index.

Keywords reproductive system damage; *Bushen Jiedu Decoction*; nuclear radiation; testis index

(收稿日期: 2017-03-28; 修回日期: 2017-08-02)

编辑: 王利芬