

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.03.013

实验研究

知柏地黄汤对解脲脲原体感染模型大鼠精子线粒体能量代谢的影响

宾东华^{1,2}, 王孙亚², 何清湖^{2*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市韶山中路 95 号, 410007; 2. 湖南中医药大学)

摘要 目的 探讨知柏地黄汤治疗解脲脲原体感染所致男性不育症的可能机制。方法 采用经大鼠膀胱注射解脲脲原体标准菌株液 2 ml/只建立解脲脲原体感染大鼠模型, 将造模成功的 64 只大鼠随机分为中药组、西药组、中西组、模型组, 每组 16 只, 另设假手术组 15 只。造模成功后第 2 天假手术组、模型组用 0.9% 氯化钠注射液 2 ml/d 灌胃, 中药组给予知柏地黄汤 1.88 g 生药/d, 西药组给予强力霉素 4 mg/d, 中西组给予等量的知柏地黄汤与强力霉素, 各组均连续灌胃 21 天。检测大鼠精子线粒体膜通道孔 (mPTP) 开放程度及精子线粒体二磷酸腺苷 (ADP)、三磷酸腺苷 (ATP)、一磷酸腺苷 (AMP) 含量, 计算能荷 (EC) 值。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠精子 mPTP 开放吸光度值下降, 精子 ATP、ADP 及 EC 降低, AMP 值上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠精子 mPTP 开放吸光度值均有上升, 西药组、中西组大鼠精子 ATP、ADP 及 EC 值上升, AMP 值下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与中药组比较, 中西组大鼠精子 mPTP 开放吸光度值上升 ($P < 0.05$); 中西组大鼠精子 ATP 高于中药组和西药组, 中西组 ADP 及 EC 值高于中药组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 知柏地黄汤能够降低解脲脲原体感染大鼠精子 mPTP 开放程度, 维护线粒体能量代谢, 进而提高精子质量, 这可能是其治疗解脲脲原体感染所致不育症的机制之一。

关键词 解脲支原体; 不育症; 知柏地黄汤; 精子; 线粒体膜通道孔; 能量代谢

解脲脲原体是生殖道感染的常见病原体, 是生殖道感染导致男性不育的高危因素之一^[1]。研究表明, 男性不育者精液中解脲脲原体检出率达 40% ~ 58%, 明显高于正常生育者 10% ~ 31%^[2]。由于抗生素的滥用及解脲脲原体自身耐药株的易发性, 再者男性生殖器结构的特殊性, 一般药物在经过血-睾屏障后血清药物浓度会出现骤减, 以致药物疗效不佳^[3]。研究表明, 解脲脲原体感染可导致男性生精细胞内线粒体空泡化, 线粒体功能受损, 影响精子能量供给, 进而干扰精子的发生及成熟, 引起精子数量减少、存活率下降、畸形率增加及膜破损等微结构变化, 导致不育^[4]。本研究在既往知柏地黄汤治疗解脲脲原体感染不育的临床研究^[5]基础之上, 通过动物实验的方法检测知柏地黄汤对解脲脲原体感染大鼠精子线粒体膜通道孔

(mPTP) 开放程度及线粒体二磷酸腺苷 (ADP)、三磷酸腺苷 (ATP)、一磷酸腺苷 (AMP) 能量指标的影响, 进一步探讨知柏地黄汤治疗解脲脲原体感染所致男性不育症的部分可能机制, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物及菌株

SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只, 12 ~ 14 周龄, 体重 (220 ± 10) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2013-0004。大鼠均自由饮水、进食, 饲养室温 18 ~ 22℃。解脲脲原体标准株由南华大学微生物学教研室提供, 将标准菌株 (冻干品) 复苏、接种, 体外实验用效价为 10×10^6 ccu/ml 的菌液。

1.2 药物

知柏地黄汤由熟地黄、山药、山萸肉、牡丹皮、泽泻、茯苓、盐知母、盐黄柏组成, 用量比例为 24 : 12 : 12 : 9 : 9 : 9 : 6 : 6, 药材由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供, 煎得药液浓

基金项目: 国家自然科学基金 (81603634, 81373641); 湖南省中医药管理局课题资助项目 (2015101)

* 通讯作者: hqh1111@tom.com, 13787105021

缩至生药 0.94 g/ml, 4℃ 保存备用。强力霉素 (盐酸多西环素片), 0.1 g/片, 江苏联环药业股份有限公司, 国药准字: H32021266, 临用时用灭菌注射用水配成浓度 2 mg/ml 的混悬液。

1.3 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 型号 Waters1525); 紫外检测器 (美国 Waters 公司, 型号 Waters 2489); 台式离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 型号 TGL-16M); 荧光酶标仪 (北京原平皓生物技术有限公司, 型号 Modulus™ II)。ADP 对照品 (货号: A2754, 含量 ≥ 95%)、ATP 对照品 (货号: A26209, 含量 ≥ 99%)、AMP 对照品 (货号: 01930, 含量 ≥ 99%), 美国 Sigma 公司产品; GENMED 染色液 (Reagent A)、GENMED 中和液 (Reagent B), 上海杰美基因医药科技有限公司产品, 货号 GMS20024; 0.9% 氯化钠注射液, 湖南科伦制药有限公司, 国药准字: H43020455。

1.4 动物造模与分组

将 90 只 SD 大鼠采用随机数字表法选取 75 只, 参照文献 [6] 中造模方法建立解脲脲原体感染动物模型。动物于造模前禁食不禁水 12h, 实验当天禁水。以 10% 水合氯醛 4 ml/kg 剂量腹腔注射进行麻醉, 于大鼠外尿道上 2 cm 处, 碘伏消毒, 打开腹腔, 游离膀胱, 先用一个注射器抽尽膀胱内残余尿液, 然后注射解脲脲原体标准菌株液 2 ml/只, 缝合腹腔。于接种后的第 10 天采用随机数字表法取出 5 只造模大鼠处死, 取睾丸穿刺液运用培养法检测解脲脲原体, 培养出解脲脲原体说明造模成功。造模期间有 6 只大鼠因感染而死亡, 剩余 64 只造模成功大鼠采用随机数字表法分为中药组、西药组、中西组、模型组, 每组 16 只。剩余 15 只设置为假手术组, 膀胱内注射 0.9% 氯化钠注射液 2 ml/只。

1.5 给药方法

于动物造模成功后的第 2 天开始给药, 假手术组、模型组用 0.9% 氯化钠注射液 2 ml/d 灌胃, 中药组给予知柏地黄汤 2 ml/d (1.88 g/d, 相当 60 kg 成人用量), 西药组给予强力霉素 2 ml/d (4 mg/d), 中西组给予等量的知柏地黄汤与强力霉素, 各组均连续灌胃 21 天。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 附睾组织中解脲脲原体检测 将大鼠颈椎脱臼处死后, 将大鼠一侧附睾剪碎, 组织放在解脲脲原体培养基中, 置于 37℃ 培养 16~18 h, 培养基出现橙红色清亮菌液, 说明组织中有解脲脲原体生长。

1.6.2 精子 mPTP 开放检测 无菌操作取另一侧附睾, 剔除附睾上的脂肪组织, 小心除掉小血管, 用预温到 37℃ 的 PBS 冲洗 1 遍, 剪碎, 摇匀, 将含有精子的培养皿置 37℃ CO₂ 培养箱中, 充分扩散 5 min, 用无菌镊将精子块充分分离并去除附睾, 用 200 目尼龙网过滤, 用 PBS 液依照 1:5 比例稀释精子, 制备精子悬液。用 Clark 等 [7] 方法分离精子线粒体置于冰槽备用。移取线粒体样品 100 μl (总量为 0.2 mg) 到 1.5 ml 离心管, 放进 4℃ 温度条件下的台式离心机中离心 5 min, 速度为 16000 r/min, 小心抽去上清液, 加入 50 μl 含有 GENMED 染色液 (Reagent A) 和 GENMED 中和液 (Reagent B) 的 GENMED 染色工作液, 充分混匀, 放进 37℃ 细胞培养箱里孵育 15 min, 避免光照。移取 100 μl 上述悬液到 100 μl 比色杯或黑色 96 孔板, 即刻放进荧光酶标仪, 激发波长 488 nm, 散发波长, 测量吸光度值。

1.6.3 精子线粒体中 ATP、ADP、AMP 定量检测

采用随机数字表每组选取 5 只大鼠, 用高效液相色谱仪检测精子线粒体中 ATP、ADP、AMP 含量, 按照各试剂盒操作步骤进行。

1.6.4 能荷 (EC) 值计算 公式: $EC = (ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$

1.7 统计学方法

使用 SPSS17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先进行方差齐性检验, 方差齐时用 One-Way ANOVA 检验, 方差不齐时用秩和检验, 先用 Kruskal-Wallis Htest 比较总的差异, 再用 Mann-Whitney U 进行两组之间比较; 计数资料采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠附睾组织中解脲脲原体感染情况比较

实验期间假手术组大鼠无死亡, 模型组有 2 只大鼠因感染因素致死, 中药组和中西组各有 1 只大鼠因肠道梗阻致死, 西药组有 1 只大鼠因打斗致死。假手术组大鼠解脲脲原体阳性率为 0, 模型组为 92.9% (13/14), 中药组为 33.3% (5/15), 西药组为 26.7% (4/15), 中西组为 20.0% (3/15)。与假手术组比较, 模型组大鼠解脲脲原体阳性率升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药组、西药组、中西组大鼠解脲脲原体阳性率均降低 ($P < 0.05$), 各治疗组间解脲脲原体阳性率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠精子 mPTP 开放情况比较

表 1 示, 与假手术组比较, 其余各组大鼠精子 mPTP 开放吸光度值均有下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠精子 mPTP 开放吸光度值均有上升 ($P < 0.01$)。与中药组比较, 中西组大鼠精子 mPTP 开放吸光度值上升 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠精子 mPTP 开放情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	吸光度值
假手术组	15	0.913 $\pm$ 0.036
模型组	14	0.637 $\pm$ 0.046*
中药组	15	0.750 $\pm$ 0.051* Δ
西药组	15	0.762 $\pm$ 0.029* Δ
中西组	15	0.824 $\pm$ 0.019* Δ ▲

注: mPTP, 线粒体膜通道孔; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药组比较, ▲ $P < 0.05$

2.3 各组大鼠精子线粒体能量代谢指标比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠精子 ATP、ADP 及 EC 值降低, AMP 值上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 西药组、中西组大鼠精子 ATP、ADP 及 EC 值上升, AMP 值下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与中西组比较, 中药组大鼠精子 ATP、ADP 及 EC 值下降, AMP 值上升, 西药组大鼠精子 ATP 值下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

解脲脲原体是一种无细胞壁、结构简单, 能在无生命培养基中生长繁殖的最小原核微生物, 是男性生殖泌尿道感染的常见病原微生物。解脲脲原体感染主要通过损害和干扰睾丸的生精能力、降低精子生成数量和质量来影响男性生殖能力^[8]。知柏地黄汤出自《医宗金鉴》, 方中“三补”即熟地黄滋阴补肾填精; 山茱萸滋肾益肝; 山药益肾补脾, 且能固精, 共成三阴并补, 既能补肾精不足, 又能防精气之耗散。此方又有“三泄”, 泽泻配熟地黄泻肾浊; 茯苓配山药渗脾湿而促脾运; 牡丹皮配山茱萸泻肝火而柔肝阴, 以泄为补, 有“补中有泄,

补而不腻”的特点, 加上知母清热泻火、滋阴润燥, 与苦寒之黄柏相须为用, 更增强了滋肾阴清相火的功用。知柏地黄丸在治疗免疫性不育、精液异常性不育、解脲脲原体感染性不育、慢性前列腺炎及精囊炎合并男性不育等方面疗效显著^[9]。

线粒体是精子能量供给的主要场所, 通过氧化磷酸化作用合成 ATP, 为精子的运动提供能量, 因此线粒体的能量代谢正常是精子功能正常的前提。横跨线粒体内外膜之间的非选择性高导电性通道是 mPTP, 由多种蛋白质复合组成, mPTP 的开放在线粒体调控细胞凋亡中起到重要的作用, 与线粒体的功能障碍密切相关^[10]。线粒体内氧化磷酸化产生的 ATP 是生命活动能直接利用的能源。氧化磷酸化速率主要受 ADP/ATP 比率调节, 当细胞活动消耗 ATP 后, ADP 水平升高, 促进氧化磷酸化, 以补充 ATP, 同时也促进三羧酸循环提供更多的还原当量^[11]。细胞在代谢过程中, 组织内 ATP、ADP、AMP 相互转化, 从而使组织内 3 种高能化合物的含量发生了改变, 最终导致机体的代谢能力产生变化^[12]。EC 是反映细胞能量动态平衡的一个参数^[13], EC 值高, 说明细胞生成 ATP 活跃, EC 值低, 说明细胞生成 ATP 不足或机体利用率增加。

本研究结果显示, 解脲脲原体感染大鼠精子 mPTP 开放程度增加, ATP、ADP 及 EC 值下降。经知柏地黄汤干预后, 解脲脲原体感染大鼠精子线粒体 mPTP 开放程度减少, ATP、ADP 及 EC 值上升, 其中中西组改善最为明显, 说明知柏地黄汤联合强力霉素通过调节解脲脲原体感染大鼠精子 mPTP 开放, 保证了 ATP、ADP 在线粒体与胞浆间的有效转运, 维护了大鼠精子线粒体正常的呼吸链耦联和细胞呼吸功能, 提升精子的能量供给, 抑制了线粒体凋亡因子的释放, 从而使精子的密度、存活率及活力得以提高, 这可能是知柏地黄汤治疗解脲脲原体感染性不育症的机制之一。

表 2 各组大鼠精子能量代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ATP (mg/L)	ADP (mg/L)	AMP (mg/L)	EC
假手术组	5	203.41 $\pm$ 13.16	129.87 $\pm$ 14.68	149.05 $\pm$ 5.65	0.56 $\pm$ 0.01
模型组	5	96.22 $\pm$ 12.55*	99.87 $\pm$ 3.28*	212.53 $\pm$ 19.43*	0.36 $\pm$ 0.03*
中药组	5	101.99 $\pm$ 5.97▲▲	104.99 $\pm$ 16.40▲	183.97 $\pm$ 12.43 Δ ▲	0.40 $\pm$ 0.01▲▲
西药组	5	159.44 $\pm$ 33.16 Δ ▲▲	118.51 $\pm$ 12.99 Δ	160.64 $\pm$ 14.19 Δ ▲	0.50 $\pm$ 0.06 Δ ▲
中西组	5	194.07 $\pm$ 9.36 Δ ▲	121.62 $\pm$ 9.41 Δ	150.21 $\pm$ 12.87 Δ ▲	0.55 $\pm$ 0.01 Δ ▲

注: ATP, 三磷酸腺苷; ADP, 二磷酸腺苷; AMP, 一磷酸腺苷; EC, 能荷; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与中西组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

参考文献

- [1] 张圣杰. 男性解脲脲原体检测与男性不育患者的关系 [J]. 吉林医学, 2011, 32(27): 5643-5644.
- [2] 何清湖, 张迅, 刘朝圣. 解脲脲原体感染与男性不育的研究进展 [J]. 中国男科学杂志, 2003, 17(6): 421-423.
- [3] 刘丽, 宋春花. 解脲脲原体、人型支原体感染检测及耐药性分析 [J]. 当代医学, 2008, 14(2): 82-84.
- [4] 卢芳国, 何清湖, 刘朝圣, 等. 知柏地黄汤对解脲支原体感染大鼠睾丸组织病理变化与超微结构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 380-384.
- [5] 郑毅春, 何清湖, 卢芳国. 中西医结合治疗解脲脲原体感染性不育症 56 例 [J]. 中医药学刊, 2002, 20(11): 109-110.
- [6] 李楠, 林鸿春, 聂晶, 等. 解脲支原体感染动物模型的研究进展 [J]. 中国性科学, 2015, 24(1): 64-66.
- [7] CLARK JB, NICKLAS WJ. The metabolism of rat brain mitochondria: Preparation and characterization [J]. J Biol Chem, 1970, 245(18): 4724-4731.
- [8] LIAO ZH, LU JY, CHEN J, et al. Analysis of infection patterns and drug resistance of urogenital mycoplasma in changsha district [J]. China J Mod Med, 2004, 14(8): 49-51.
- [9] 宾东华, 韩忠, 何清湖. 知柏地黄丸在男性不育中的应用 [J]. 中国性科学, 2016, 25(12): 84-87.
- [10] HUANG P, FENG L, OLDHAM EA, et al. Superoxide dismutase as target for the selective killing of cancer cells [J]. Nature, 2000, 407(6802): 390-395.
- [11] 赵伟康, 周志东, 金国琴. 老年期肾阴阳虚损大鼠的线粒体能量代谢及其调控机制的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(3): 191-193.
- [12] 常芸, 林福美, 陈小同, 等. 运动心脏结构可复性的研究 [J]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(3): 202.
- [13] 陈卫东, 雷振东, 李永国. 注射用内给氧对缺血再灌注损伤兔肝脏能量代谢的影响 [J]. 生命科学研究, 2008, 12(2): 174-178.

Effect of Zhibai Dihuang Decoction (知柏地黄汤) on Energy Metabolism of Sperm Mitochondria in Rats with Ureaplasma Urealyticum Infection

BIN Donghua^{1,2}, WANG Sunya², HE Qinghu²

(1. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Zhibai Dihuang Decoction (知柏地黄汤, ZDD) in treating male infertility caused by ureaplasma urealyticum infection. **Methods** Ureaplasma urealyticum standard strain liquid (2 ml per rat) was injected through bladder to establish rat model of ureaplasma urealyticum infection. The 64 successfully modelled rats were randomized into Chinese medicine group, western medicine group, the integrative medicine group and the model group, with 16 rats in each group, and another 15 rats were set in the sham operation group. On the second day after model establishment, the sham operation group and the model group were orally administered 0.9% sodium chloride injection (2 ml/d), Chinese medicine group received crude drug of ZDD (1.88 g/d), Western medicine group received 4 mg/d of doxycycline, and the integrative medicine group was given equal amount of ZDD and doxycycline. Each group was treated for 21 days. The open degree of mitochondrial membrane pore (mPTP) and the content of mitochondrial ATP, ADP and AMP in the sperm were measured and the energy charge (EC) was calculated. **Results** Compared with those in the sham operation group, the open light absorbance of sperm mPTP in the model group decreased, ATP, ADP and EC decreased, while AMP increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the open light absorbance of sperm mPTP increased in all treatment groups, and ATP, ADP and EC in Western medicine group and the integrative medicine group increased while the AMP decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with Chinese medicine group, the open light absorbance of sperm mPTP in the integrative medicine group increased ($P < 0.05$); ATP in the integrative medicine group was higher than that in Chinese medicine group and Western medicine group, and the ADP and EC in the integrative medicine group were higher than those in Chinese medicine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** ZDD could reduce the open degree of sperm mPTP in rats infected with ureaplasma urealyticum and maintain the energy metabolism of mitochondria, thereby improving the sperm quality, which may be one of the mechanisms for its treatment of infertility caused by ureaplasma urealyticum infection.

Keywords ureaplasma urealyticum; infertility; Zhibai Dihuang Decoction (知柏地黄汤); sperm; mitochondrial membrane pore; energy metabolism

(收稿日期: 2017-08-27; 修回日期: 2017-10-12)

编辑: 邓 媛