论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1362-04

美洛昔康对铝过负荷致雄鼠生殖损害的保护作用

汤召兵,苟 欣,王 明,何卫阳,刘朝东,邓远忠 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

【摘要】 **目的** 探讨COX-2抑制剂美洛昔康对慢性铝过负荷所致雄性大鼠生殖损害的保护作用。**方法** 雄性大鼠分为5组,每组6只,即正常对照组、铝负荷组[葡萄糖酸铝 Al^{3+} 200 mg/(kg·d)灌胃]、美洛昔康组[美洛昔康3 mg/(kg·d)灌胃]、铝负荷+小剂量美洛昔康组[葡萄糖酸铝 Al^{3+} 200 mg/(kg·d) +美洛昔康1 mg/(kg·d)灌胃]及铝负荷+大剂量美洛昔康组[葡萄糖酸铝 Al^{3+} 200 mg/(kg·d) +美洛昔康3 mg/(kg·d)灌胃]。每周给药5 d,连续20周后处死大鼠取出睾丸附睾称质量,分别计算每只大鼠睾丸、附睾系数(脏器质量/体质量);HE染色观察睾丸附睾的形态学变化。**结果** 正常对照组、美洛昔康组、铝负荷组、铝负荷+小剂量美洛昔康组、铝负荷+大剂量美洛昔康组大鼠体质量均值分别是572.2、568.8、451.8、552.3、565.7 g,睾丸质量均值分别是4.92、4.91、4.07、4.65、4.86 g,附睾质量均值分别是1.36、1.33、1.12、1.25、1.32 g,铝负荷组大鼠的体质量、睾丸及附睾质量明显降低($P<0.05$),美洛昔康组、铝负荷+大剂量美洛昔康组与正常对照组比较无显著差异($P>0.05$),铝负荷+小剂量美洛昔康组大鼠体质量降低无显著意义($P>0.05$),但睾丸附睾质量降低具有显著差异($P<0.05$),5组间睾丸附睾系数无显著性差异($P>0.05$)。HE染色见铝负荷组曲细精管的生精上皮明显变薄且几乎看不到精细胞、在曲细精管腔内精子数量很少或没有;铝负荷+大剂量美洛昔康组在曲细精管内见大量的各级精细胞及精子;美洛昔康组见睾丸的组织学形态完全正常。铝负荷组大鼠睾丸组织COX-2蛋白表达明显增加($P<0.05$);美洛昔康可明显抑制COX-2蛋白表达,大剂量美洛昔康(3 mg/kg)组抑制效应更明显($P<0.05$)。**结论** 美洛昔康具有改善铝所致的生殖损害的潜能;其机制可能与抑制COX-2活性,减轻炎症反应和氧化应激损伤有关。

【关键词】 美洛昔康;铝过负荷;生殖损害;睾丸;环氧化酶-2
【中图法分类号】 R363.13;R711.6;R971.1 【文献标志码】 A

Meloxicam protects aluminum overload-induced chronic reproductive deterioration in rats

Tang Zhaobing, Gou Xin, Wang Ming, He Weiyang, Liu Chaodong, Deng Yuanzhong (Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the protective effects of meloxicam on deterioration in reproductive performance induced by chronic aluminum overload in rats. **Methods** A total of 30 Wistar male rats were randomly and equally divided into 5 groups, normal control, aluminum gluconate group, meloxicam group, aluminum gluconate plus low- and high-dose meloxicam groups. Aluminum gluconate was intragastrically administered at 200 mg Al^{3+}/(kg·day), and meloxicam was given with same way in 30 min after aluminum administration at 1 or 3 mg/(kg·day). Rats of each group were administrated in 5 d every week for 20 weeks. After which, all rats were killed, and their testis and epididymis were dissected out and weighted for calculating their organic coefficient. Morphologic changes of testis were evaluated by HE staining. Expression of COX-2 was detected by Western blotting. **Results** The weights of body, testis and epididymis in the aluminum gluconate group was significantly lower compared with those of the other 4 groups ($P<0.05$). There was no significant difference in these values among meloxicam group, aluminum gluconate plus high-dose meloxicam groups and control ($P>0.05$). Though no difference was seen in body weight between the aluminum gluconate group and the aluminum gluconate plus low-dose meloxicam groups ($P>0.05$), obvious difference was found in the weights of testis and epididymis ($P<0.05$). There was no obvious difference in the testis and epididymis coefficients ($P>0.05$). HE staining showed that the germinal epithelium of the seminiferous tubules became obviously thinner and spermatids were almost absent; sperms were rare or absent in the lumen in the the aluminum gluconate group. But in the high-dose meloxicam group, there were large numbers of spermatids and

【基金项目】 重庆市卫生局课题(2010-2-033)
【通信作者】 汤召兵,E-mail:tangzhaobing1127@163.com

sperms in the seminiferous tubule lumen. Normal structure and morphology was found in the meloxicam group, as the control group. Meloxicam obviously inhibited the over-expression of COX-2, especially when it was at high dose ($P<0.05$). **Conclusion** Meloxicam has protective effects on reproductive deterioration induced by chronic aluminum overload in rats, which may be through inhibiting COX-2 activity and attenuating the inflammation and oxidative stress injury.

[Key words] meloxicam; aluminum overload; reproductive deterioration; testis; COX-2

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau(2010-2-003). Corresponding author: Tang Zhaobing, Tel: 86-23-89011485, E-mail: tangzhaobing1127@163.com

铝在环境中大量存在,可引起人类多种疾病。医学领域铝的化学复合物被广泛使用,如抗酸剂、磷酸盐黏合剂、阿司匹林缓释剂、止泻剂等。铝经过饮水、食物等被人体吸收而在体内聚积。研究发现 $AlCl_3$ 对动物具有胚胎毒性而致畸胎形成[1]。食入过多的铝可使其在靶器官内聚积,对人及动物的睾丸组织均有损害作用,在人精子及精浆中铝的浓度过高将降低精子的活动力及存活率[2]。Llobet 等[3]用硝酸铝做动物实验证实铝在雄鼠睾丸组织中聚积、精母细胞及精细胞坏死、生育力显著下降。Guo 等[4]经动物实验发现铝显著增加 NO 的产生且使睾丸组织内 cAMP 和睾酮水平显著减少,并证实铝的生殖毒性是通过产生过多的 NO 产物从而激活可诱导的 NO 合成酶起作用。美洛昔康为选择性 COX-2 抑制剂,为新一代非甾体类抗炎药杰出代表,具有显著而持久的抗炎作用及一定的止痛、解热作用,安全性、耐受性好,已在临床广泛使用。美洛昔康对铝所致的神经系统损害具有显著的保护作用已经被动物实验研究证实[5-6],那么,美洛昔康是否具有保护人或动物睾丸组织免受铝的毒性损害或进而能作为解毒剂呢?本实验从组织学水平上探讨美洛昔康是否能对抗铝负荷对雄性大鼠睾丸组织的毒性损害。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 220~250 g[重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(渝)20020003];主要试剂:美洛昔康(昆山龙灯瑞迪制药有限公司,批号:070502),六水三氯化铝($AlCl_3\cdot 6H_2O$)和葡萄糖酸钠为国产分析纯,WIP 组织细胞裂解液及蛋白定量试剂盒(BCA 法:北京博奥森)。

1.2 方法

大鼠在实验条件下饲养 3 d 以适应实验环境,将 30 只大鼠分为 5 组,每组 6 只(每组总体质量大致相等),即正常对照组、铝负荷组、美洛昔康组、铝负荷 + 小剂量美洛昔康组、铝负荷 + 大剂量美洛昔康组。17.9 g $AlCl_3\cdot 6H_2O$ + 9.9 g 葡萄糖酸钠溶于双蒸水中,溶液清澈后用 0.1 mol/L NaOH 将溶液滴定到 pH = 6.0,用双蒸水定容至 100 ml,配制成含 Al^{3+} 20 g/L 的葡萄糖酸铝溶液。铝负荷组灌胃给予葡萄糖酸铝溶液 10 ml/(kg·d)[Al^{3+} 200 mg/(kg·d)],美洛昔康组灌胃给予美洛昔康 3 mg/(kg·d),铝负荷 + 小剂量美洛昔康组及铝负荷 + 大剂量美洛昔康组灌胃给予葡萄糖酸铝溶液 10 ml/(kg·d),30 min 后再分别灌胃给予美洛昔康 1 mg/(kg·d)和 3 mg/(kg·d),正常对照组灌胃给予等体积 0.3% 羧甲纤维素钠溶液,每周给药 5 d,连续 20 周。停止给药后第 2 天,每只大鼠称质量后处死取出睾丸附睾,剔除附着于上的脂肪组织,睾丸、附睾分别称质量后(双侧总质量),一侧行病理标本制备处理:10% 甲醛固定后石蜡包埋、切片、HE 染色,400 倍光镜下观察,另外一侧用作睾丸 COX-2 蛋白含量测定:按照 WIP 组织细胞裂解液使用说明书提取睾丸总蛋白,蛋白定量测定采用 BCA 法,操作按照蛋白定量试剂盒说明书进行,COX-2 蛋白测定采用免疫印迹法(Western blot)。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行各组间均值单因素方差分析或 t 检验。

2 结果

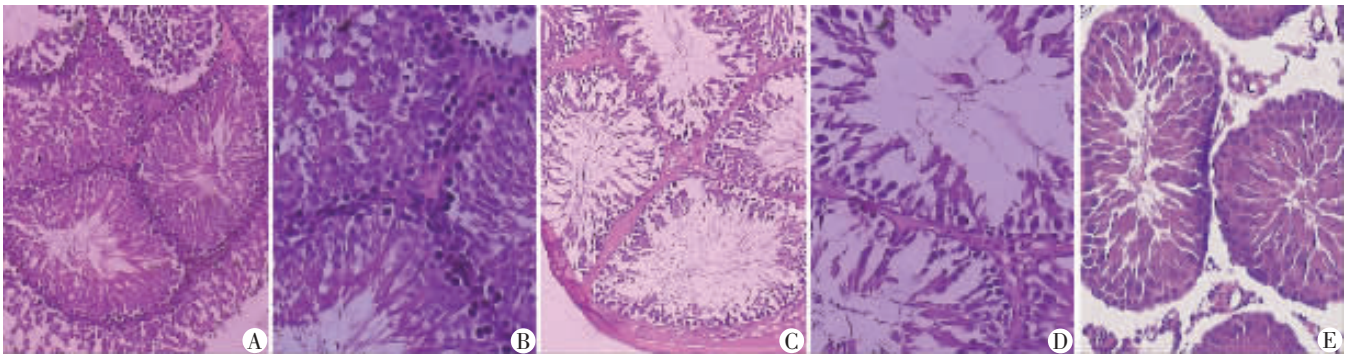
2.1 给药后大鼠体质量及睾丸、附睾质量

对照组、美洛昔康组、铝负荷 + 小剂量美洛昔康组及铝负荷 + 大剂量美洛昔康组间大鼠体质量无明显差异($P>0.05$),而铝负荷组大鼠体质量明显低于上述 4 组($P<0.05$);大鼠睾丸及附睾质量在对照组、美洛昔康组、铝负荷 + 大剂量美洛昔康组间无显著差异($P>0.05$),铝负荷组及铝负荷 + 小剂量美洛昔康组睾丸及附睾质量明显低于对照组、美洛昔康组、吕负荷 + 大剂量美洛昔康组($P<0.05$),铝负荷组睾丸及附睾质量明显低于铝负荷 + 小剂量美洛昔康组($P<0.05$);睾丸附睾系数在 5 组间无具显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1 实验后各组大鼠体质量及睾丸附睾质量($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	体质量(g)	睾丸(g)	睾丸系数(g/100 g)	附睾(g)	附睾系数(g/100 g)
对照组	572.2 ± 43.3[a]	4.92 ± 0.56[ab]	0.86 ± 0.11	1.36 ± 0.08[ab]	0.24 ± 0.04
美洛昔康组	568.8 ± 40.5[a]	4.91 ± 0.51[ab]	0.86 ± 0.09	1.33 ± 0.08[ab]	0.23 ± 0.03
铝负荷组	451.8 ± 32.4	4.07 ± 0.41	0.90 ± 0.07	1.12 ± 0.11	0.25 ± 0.04
铝负荷 + 小剂量美洛昔康组	552.3 ± 39.1[a]	4.65 ± 0.43[a]	0.85 ± 0.08	1.25 ± 0.13[a]	0.22 ± 0.03
铝负荷 + 大剂量美洛昔康组	565.7 ± 41.6[a]	4.86 ± 0.59[ab]	0.86 ± 0.09	1.32 ± 0.11[ab]	0.23 ± 0.04

a:$P<0.05$,与铝负荷组比较;b:$P<0.05$,与铝负荷 + 小剂量美洛昔康组比较



A:空白对照组;B:美洛昔康组;C:铝负荷组;D:铝负荷+小剂量美洛昔康组;E:铝负荷+大剂量美洛昔康组

图1 铝生殖毒性雄鼠模型及美洛昔康干预睾丸组织病理改变 (HE ×400)

2.2 睾丸组织病理改变

空白对照组及美洛昔康组雄鼠睾丸组织曲细精管管壁厚、管腔内见大量各级精细胞,间质细胞数量多;铝负荷组曲细精管的生精上皮明显变薄且几乎看不到精细胞、在曲细精管管腔内精子数量很少、间质细胞几乎看不到;铝负荷+小剂量美洛昔康组较铝负荷组上述损伤有所减轻,但不明显;而铝负荷+大剂量美洛昔康组雄鼠睾丸组织的损伤明显减轻:曲细精管管壁较厚、管腔内可见较多各级精细胞,也可见接近正常数量的间质细胞,见图1。

2.3 大鼠睾丸 COX-2 蛋白表达

对照组、美洛昔康组、铝负荷组、铝负荷+大剂量美洛昔康组、铝负荷+小剂量美洛昔康组 COX-2 蛋白表达结果(COX-2/β-actin)分别是 0.040±0.003、0.038±0.004、0.405±0.090、0.146±0.006、0.242±0.006。对照组及美洛昔康组雄鼠睾丸组织 COX-2 蛋白表达水平很低且无显著差异($P>0.05$),铝负荷组雄鼠睾丸组织 COX-2 蛋白表达水平显著升高(与其余4组比较,$P<0.05$),给予美洛昔康可明显抑制 COX-2 蛋白表达(与铝负荷组比较 $P<0.05$),以大剂量美洛昔康[3 mg/(kg·d)]组抑制效应更明显(与铝负荷组、铝负荷+小剂量美洛昔康组比较 $P<0.05$)。

3 讨论

3.1 铝的生殖毒性

铝是地壳中含量位居第三的重要元素,铝合金在工业、航天及建筑业广泛应用,铝加工从业者甚多且逐渐增加;另一方面,含铝化合物在医学上广泛使用,如抗酸剂、磷酸黏合剂、阿司匹林缓释片、疫苗、止泻剂、变应原注射剂[1],因此,人们可通过食物、饮水、药物、空气长期接触摄入铝[7]。作为环境污染的最主要物质,人们在日常生活及工作中想避免暴露于铝是不可能的。铝在人体内聚集可引起多个组织器官损害,包括血液、脑、肝、睾丸及肾脏,铝与多种疾病的发生、发展有关,铝对人及动物产生生殖毒性已被证实,产生的主要后果是引起人及动物的生育力下降[8-11]。具体的病理生理变化表现:①睾丸、附睾的相对质量(与体质量之比,即脏器系数)下降[12];②HE 染色见曲细精管的生精上皮明显变薄且几乎看不到精细胞、在曲细精管腔内精子数量很少或没有[13]。本实验也得出与上述比较一致的结果,铝负荷组大鼠体质量明显低于其余各组,除了铝对机体的毒性作用外,还有可能因为铝对胃肠道的毒性作用而引起大鼠食物摄入少[8];铝负荷组大鼠睾丸、附睾质量也明显低于其他各组,这与睾丸附睾组织病理变化一致。光镜下,对照组睾丸组织曲细精管排列整齐规则、管壁厚、管腔内见大量各级精细胞,间质细胞数量多;铝负荷组曲细精管排列紊乱、管壁(生精上皮)明显变薄且几乎看不到精细胞、在曲细精管腔内精子数量很少、间质细胞几乎看不到,这与 Yousef 等[8,13-14]用 $AlCl_3$ 引起的雄性大鼠及公兔生殖毒性损害相一致,与其他毒性物质引起的睾丸损害也相近[15]。

3.2 美洛昔康对铝引起的生殖毒性损害的保护作用

炎症反应与氧化应激同样参与了组织器官的损伤。炎症因子及其相关酶的表达参与了组织损伤过程。损伤性刺激诱导机体产生保护性炎症反应,而大量炎症因子的产生反过来又加重损伤,形成恶性循环。这些损伤性炎症因子有多个,如 IL-1、TNF(以及花生四烯酸(AA)的代谢产物前列腺素(PGs)等。细胞膜磷脂在磷脂酶 A2 的作用下生成 AA,AA 在环氧酶(Cyclooxygenase,COX)作用下合成大量 PGs,越来越多的研究表明 COX 在炎症相关性疾病中扮演了重要角色。COX 可能存在多种亚型,比较肯定且研究较多的是结构型 COX-1 和诱导型 COX-2。COX-1 主要存在于胃肠黏膜、血小板及肾脏等正常组织,并发挥十分重要的生理功能。除脑、精囊和肾脏等脏器外,COX-2 在正常组织表达较少,而在炎症发生时可在与炎症有密切关系的细胞如单核细胞、巨噬细胞中呈高水平表达,表达水平与炎症的严重程度相关[16]。已有研究证实,在铝过负荷致脑损伤、神经元退变以及其他组织损伤

过程中存在 COX-2 过表达,COX-2 抑制剂存在明显的保护作用[4-6,17-20]。美洛昔康为选择性 COX-2 抑制剂,为新一代非甾体类抗炎药杰出代表,具有显著而持久的抗炎作用及一定的止痛、解热作用,且安全性、耐受性好,已在临床上广泛使用。从本实验的结果可见,无论在大鼠体质量、睾丸附睾质量以及光镜下睾丸组织形态学上,铝负荷 + 大剂量[3 mg/(kg · d)]美洛昔康组与正常对照组及单纯 3 mg 美洛昔康组都比较一致($P>0.2$),显著优于铝负荷组及铝负荷 + 小剂量[1 mg/(kg · d)]美洛昔康组($P<0.05$),铝负荷 + 小剂量美洛昔康组又显著优于铝负荷组($P<0.05$),这表明 3 mg/(kg · d)美洛昔康能显著保护慢性铝过负荷所致的大鼠睾丸附睾的毒性损害,1 mg/(d · kg)美洛昔康也能部分改善慢性铝过负荷所致的大鼠睾丸附睾的毒性损害,3 mg/(d · kg)剂量具有良好的保护效果。睾丸及附睾系数虽然在 5 组间无显著差异($P>0.2$),但是,从光镜下可见,铝负荷组及铝负荷 + 小剂量美洛昔康组大鼠睾丸附睾正常的功能组织结构被明显损害,而部分被无生殖腺功能的脂肪结缔组织代替,故以脏器系数大小来评判该脏器是否产生毒性损害或损害程度已失去意义。

综上所述,慢性铝过负荷会显著引起雄性大鼠生殖毒性损害,而选择性 COX-2 抑制剂美洛昔康具有明显的保护作用,其机制可能与抑制 COX-2 活性,减轻炎症反应和氧化应激损伤有关。这为进一步研究铝的生殖毒性产生机制、寻找有效保护及治疗铝所致的男性不育药物有着十分重要的理论价值和应用价值。有关选择性 COX-2 抑制剂美洛昔康对铝过负荷所致生殖毒性损害保护机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Cranmer J M, Wilkins J D, Cannon D J, *et al*. Fetal-placental-maternal uptake of aluminium in mice following gestational exposure: effect of dose and route of administration[J]. Neurotoxicology, 1986, 7(2): 601-608.

[2] Dawson E B, Ritter S, Harris W A, *et al*. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels[J]. Biol Trace Elem Res, 1998, 64(1/3): 215-219.

[3] Llobet J M, Colomina M T, Sirvent J J, *et al*. Reproductive toxicology of aluminum in male mice[J]. Fundam Appl Toxicol, 1995, 25(1): 45-51.

[4] Guo C H, Lin C Y, Yeh M S, *et al*. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2005, 19(1): 33-40.

[5] 苏强, 杨俊卿, 张鹏. 美洛昔康对慢性铝超负荷致神经元退变大鼠海马环氧化酶 2 表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, 23(1): 6-10.

[6] Nivsarkar M, Banerjee A, Padh H. Cyclooxygenase inhibitors: a novel direction for Alzheimer's management[J]. Pharmacol Rep, 2008, 60(5): 692-698.

[7] Lambert V, Boukhari R, Nacher M, *et al*. Plasma and urinary aluminum concentrations in severely anemic geophagous pregnant women in the Bas Maroni region of French Guiana: a case-control study[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(5): 1100-1105.

[8] Yousef M I, EI-Morsy A M, Hassan M S. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid[J]. Toxicology, 2005, 215(1/2): 97-107.

[9] Yousef M I, Kamel K I, EI-Guendi M I, *et al*. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants[J]. Toxicology, 2007, 239(3): 213-223.

[10] Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, *et al*. Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats[J]. Reprod Toxicol, 2011, 31(2): 219-230.

[11] 王大勇, 杨猱超, 汪洋. 秀丽线虫中铝暴露导致的多重毒害在世代间具有可转移特性[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(1): 45-51.

[12] Aitken R J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function[J]. Reprod Fertil Dev, 1995, 7(4): 659-668.

[13] Kutlubay R, Oguz E O, Can B, *et al*. Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium[J]. Int J Toxicol, 2007, 26(4): 297-306.

[14] Yousef M I, Salama A F. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(6): 1168-1175.

[15] 曹波, 舒为群, 曹佳. 嘉陵江 C 市段水中有机污染物睾丸毒性分子机制初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 5-8.

[16] O'Banion M K, Winn V D, Young D A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(11): 4888-4892.

[17] Hirasawa N, Goi Y, Tanaka R, *et al*. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 93(4): 1306-1311.

[18] Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, *et al*. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system[J]. J Endod, 2009, 35(6): 843-846.

[19] Ribeiro F V, Nociti F H Jr, Sallum E A, *et al*. Effect of aluminum oxide-blasted implant surface on the bone healing around implants in rats submitted to continuous administration of selective cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2009, 24(2): 226-233.

[20] 肖小华, 张静, 杨俊卿. 慢性铝过负荷致大鼠认知功能损伤及尼莫地平保护作用观察[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11): 1028-1031.

(收稿 2011-03-11 修回 2011-05-12)

(编辑 龙 亮)