文章编号:1000-5404(2013)12-1229-04

论著

淫羊藿苷对大鼠睾丸间质细胞射线损伤的保护作用

张卫星,贾东辉,王 瑞,李 周,迟凯凯 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院泌尿外科,河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室)

[摘要] **目的** 研究中药单体淫羊藿苷对于大鼠睾丸间质细胞^{60}Co-γ照射后的保护作用。**方法** 50只成年雄性SD大鼠,完全随机分为A(正常对照组)、B(照射对照组)、C(3 d灌胃组)、D(7 d灌胃组)、E(15 d灌胃组)等5组($n=10$)。A、B 2组以生理盐水灌胃15 d,C、D、E组于照射前以淫羊藿苷[80 mg/(kg·d)]分别灌胃3、7、15 d后,B、C、D、E 4组行^{60}Co-γ射线8 Gy下腹部均匀照射1次。照射后空腹12 h处死大鼠,光镜下观察大鼠睾丸组织形态学变化,反转录PCR法检测睾酮合成限速酶胆固醇侧链裂解酶(P450scc)基因的表达量。ELISA法测定睾酮(T)、黄体生成素(LH)水平。**结果** B组睾酮较A组降低($P<0.05$),黄体生成素升高($P<0.05$)。C、D、E组较B组睾酮升高,其中D、E组与B组比较有统计学意义($P<0.05$),黄体生成素水平较B组降低,其中E组与B组比较有统计学意义($P<0.05$),P450scc表达量B组较A组降低,具有统计学意义($P<0.05$),C、D、E组较B组升高,其中E组与B组比较具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 淫羊藿苷对大鼠睾丸间质细胞射线照射具有保护作用,且以15 d灌胃组效果最佳。

[关键词] 射线;淫羊藿苷;睾丸间质细胞
[中图法分类号] R282.71;R322.64;R818.74 [文献标志码] A

Protective effect of icariin on radiation damage of Laydig cells in rats

Zhang Weixing, Jia Donghui, Wang Rui, Li Zhou, Chi Kaikai (Department of Urology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Open Laboratory of Key Disciplines of Henan Clinical Medicine, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the protective effect of icariin (ICA) on ^{60}Co-γ-induced damage of Laydig cells in rats. **Methods** Fifty male Wistar rats were randomly divided into five groups with 10 in each group including Group A (control), Group B (radiation control), Group C (ICA irrigation for 3 d), Group D (ICA irrigation for 7 d), and Group E (ICA irrigation for 15 d). The rats of Group A and Group B were irrigated with normal saline for 15 d, while those of Group C, Group D and Group E were irrigated with ICA [80 mg/(kg·d)] for 3, 7 and 15 d before irradiation, respectively. Then the lower abdomen of rats in Group B, Group C, Group D and Group E were exposed to the uniform radiation of ^{60}Co-γ with 8 Gy. All the animals were sacrificed 12 h later. The histological observation of the testis tissues were performed by microscopy, the levels of testosterone (T) and luteinizing hormone (LH) were determined by ELISA, and the expression of P450scc mRNA was determined by RT-PCR. **Results** Compared with Group A and Group B had a decreasing tendency for T ($P<0.05$) and an increasing tendency for LH ($P<0.05$). Group C, Group D and Group E all had increasing trends for T and decreasing trends for LH as compared with Group B, and the difference between Group B and Group E was statistically significant ($P<0.05$). The expression of P450scc mRNA in Group B was significantly lower than that in Group A ($P<0.05$). Compared with group B, the expression of P450scc mRNA increased in Group C, Group D and Group E, and the difference between Group B and Group E was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Traditional Chinese medicine monomer of ICA has a protective effect on radiation damage of Laydig cells in rats, especially in the group of ICA irrigation for 15 d.

[**Key words**] radiation; icariin; Laydig cell

Supported by the key Tackling Project of Science and Technology of Henan Province (102102310067). Corresponding author: Wang Rui, E-mail: huzi918@hotmail.com

[基金项目] 河南省科技攻关重点项目(102102310067)
[通信作者] 王 瑞,E-mail:huzi918@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1105.023.html(2013-03-21)

淫羊藿是我国传统补肾中药,其主要成分是以淫羊藿苷为代表的一类黄酮类化合物。药理学研究已证实淫羊藿苷具有增加睾酮生成[1],促进细胞分化[2],保护男性生殖系统[3]等作用。本研究旨在探讨淫羊藿苷对于暴露在射线下大鼠睾丸间质细胞的保护作用及其作用关系,以指导临床,确立治疗的最佳时机。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠50只,6~8周龄,体质量150 g左右,购自河南省实验动物中心。

1.1.2 实验药物 中药单体:淫羊藿苷单体,由郑州大学第一附属医院药剂科提供,纯度为99.5%;0.5%羧甲基纤维素钠购自郑州万利来食品添加剂有限公司(食品级)。

1.1.3 主要试剂及设备 大鼠性激素系列(T、LH)酶联免疫试剂盒(ELISA)购自美国RB公司;UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒(#k13211007)、Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided(#K0251)购自上海生工生物工程有限公司;GWGP80型同中心回转式钴60治疗机(郑州大学第一附属医院放疗科);倒置显微镜(日本Nikon公司);台式4 ℃离心机(eppendorf公司); 梯度PCR仪(Applied Biosystems)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 按照12 h白昼节律调节光照,温度、湿度分别控制为25℃和60%。适应性喂养大鼠1周后,以完全随机分组的方法将实验大鼠分为分为5组,每组10只。分别为A组(空白对照组)、B组(照射对照组)、C组(3 d灌胃组)、D组(7 d灌胃组)、E组(15 d灌胃组)。

1.2.2 造模方法 除A组外,其余各组均以^{60}Co-γ一次性局部照射1次,照射剂量:8.0 Gy,照射时间:517 s;照射靶距离60 cm。照射方法:大鼠以10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)腹腔内麻醉后,髂前上棘以上全部用6 mm厚的双层铅板覆盖,只照射小鼠下腹部。

1.2.3 给药方法 A、B组以0.5%羧甲基纤维素钠的生理盐水灌胃15 d,C组以0.5%羧甲基纤维素钠的生理盐水灌胃12 d后,以给予0.5%羧甲基纤维素钠配置的淫羊藿苷悬液[80 mg/(kg·d)]灌胃3 d,同C组,D组以0.5%羧甲基纤维素钠的生理盐水灌胃8 d后,以给予0.5%羧甲基纤维素钠配置的淫羊藿苷悬液灌胃7 d,E组大鼠以0.5%羧甲基纤维素钠配置的淫羊藿苷悬液灌胃15 d,1次/d。

1.3 观察指标

1.3.1 生殖激素的测定 于灌胃结束24 h,大鼠以水合氯醛麻醉后,切开腹部暴露下腔静脉,5 mL注射器向朝向远心端抽取约4 mL血液。3 379×*g*离心10 min,分离出血清,酶联免疫法测定血清中T、LH的含量。

1.3.2 睾丸组织形态观察 将各组大鼠双侧睾丸取出,左侧睾丸用Bouin氏液固定,常规乙醇脱水、石蜡包埋,切片机切成厚度约3 μm切片,行HE染色,光镜下观察睾丸组织形态。右侧睾丸放于液氮中保存。

1.3.3 反转录PCR(RT-PCR) Primer Premier 5.0软件设计P450scc及β-actin前后引物序列。取-80 ℃冻存的睾丸组织和研钵,按上海生物公司总RNA抽取试剂盒说明抽取,按EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司)的操作合成步骤将上述提取的RNA反转录合成cDNA的第1条链。依次向PCR管中加入,Template DNA,2×PCR Master Mix,Forward Primer,Reverse Primer,Water nuclease-free,至终反应体系为25 μL。设置PCR循环反应条件,扩增目的基因。利用引物软件合成的引物序列从5′端到3′端的顺序为(P450scc前引物:TGGGGTACTTCAGGGTCAGG;后引物:TGCCTCCAGACTTATTTGG 产物长度460 bp。β-actin前引物:AGCACCAGGTCGTTCACA;后引物 GATATCGCTGCG-CTCGTC。产物长度202 bp。)

1.4 统计学分析

应用SPSS 15.0统计软件进行方差分析,数据均以$\bar{x} \pm s$表示。

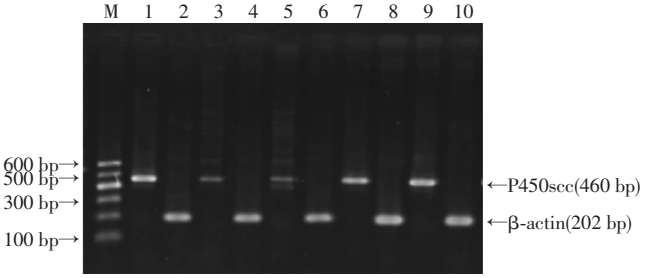
2 结果

2.1 实验动物情况

共有46只动物完成了实验,其中正常对照组10只,照射对照组10只,3 d灌胃组9只,7 d灌胃组8只,15 d灌胃组9只。死亡大鼠均因灌胃过程中误入气道导致的窒息死亡。

2.2 RT-PCR结果

B(0.37±0.12)、C(0.43±0.21)、D(0.58±0.17)、E(0.76±0.13)组大鼠P450scc表达量较A(1.00±0.15)组明显降低($P<0.05$)(图1),体现了射线对睾丸间质细胞的损伤作用。C、D、E组大鼠表达量较B组明显升高,且E较B组有统计学意义,体现了药物的保护作用。

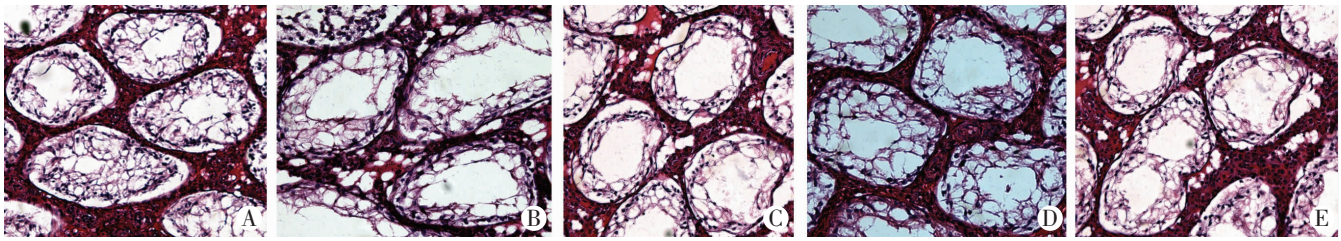


M:标准;1、2:A组;3、4:B组;5、6:C组;7、8:D组;9、10:E组

图1 ICA不同灌胃时间后8 Gy γ射线下腹部照射后检测P450scc与β-actin基因表达量

2.3 睾丸组织形态观察

A组:间质细胞形态正常,结构组织致密,厚度佳,细胞核清晰,胞质明显。B组:间质细胞形态异常,结构混乱,伴明显水肿,厚度减少,空泡化严重。细胞核固缩,胞质明显减少。C组:间质细胞形态异常,数目减少,结构混乱。水肿状况及间质细胞厚度较B组稍改善,空泡化严重。细胞核固缩,胞质明显减少。D组:间质细胞形态较较B组改善,细胞数目较多,细胞空泡化状况较B组改善。E组:间质细胞形态较正常,较B组明显改善,空泡化程度减轻。间质细胞厚度增显。见图2。



A:正常对照组;B:照射对照组;C:3 d灌胃组;D:7 d灌胃组;E:15 d灌胃组

图2 ICA不同灌胃时间后8 Gy γ射线下腹部照射后光镜下大鼠睾丸组织形态学观察 (HE ×200)

2.4 睾酮(T)与黄体生成素(LH)结果

B组睾酮较A组降低($P<0.05$),黄体生成素升高($P<0.05$)。C、D、E组较B组睾酮升高,其中D、E组与B组比较有统计学意义($P<0.05$),黄体生成素水平较B组降低,其中E组与B组比较有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 ICA不同灌胃时间8 Gy γ射线下腹部照射后大鼠血清LH、T水平 ($ng/L, \bar{x}\pm s$)

组别	n	LH	T
正常对照组	10	19.94±2.36	235.02±9.84
照射对照组	10	29.18±2.02[a]	162.61±12.38[a]
3 d灌胃组	9	27.31±1.92[a]	181.37±10.41[a]
7 d灌胃组	8	24.65±2.17[b]	201.97±8.36[a]
15 d灌胃组	9	21.31±2.41[b]	212.88±9.75[ab]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与照射对照组比较

3 讨论

随着放疗在临床应用日益增多,射线对机体的损害也越来越多的引起了人们的重视。射线具有强烈的氧化作用,可产生大量氧自由基[4]攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,引起脂质的过氧化,破坏细胞膜的稳定性,使细胞代谢障碍[5]。对于男性生殖系统而言,辐射可通过激活Fas因子,促进细胞的凋亡[6]。引起睾丸间质细胞、支持细胞及各级生精细胞功能不良,从而出现雄激素缺乏,男性不育[7]等一系列临床症状。

睾丸间质细胞(laydig cell)是一种由间充质分化而来的细胞。其多成群的分布在曲细精管间的间质内,或沿小血管周围排列。其主要功能是产生以睾酮为代表雄激素。雄激素对于男性生殖系统的发育、成熟直接相关。其分泌受到多种因素的影响,其中以下丘脑-垂体-睾丸轴系的调节最为重要。下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)通过作用于垂体远端的促性腺激素细胞,产生黄体生成素(LH),LH经血液运输到睾丸与间质细胞膜受体(LHR)结合,形成受体激素复合物,激活膜表面的腺苷酸环化酶,打开膜表面钙离子通道,从而启动细胞内从胆固醇向睾酮转变的过程[8]。而在这个转变的过程中,胆固醇侧链裂解酶(P450scc)是其中的一种限速酶。实验结果显示,B组大鼠较A组大鼠血清睾酮(T)含量明显减低($P<0.05$)。这是因为γ射线的局部氧化作用导致的睾丸间质细胞的损伤,睾酮合成量减少,这在以往的实验中已经得到证实[9]。由于实验中采取大鼠下腹部局部照射的方法,其上位的激素调节中枢未受到损伤,在下丘脑-垂体-睾丸轴负反馈调节下,LH升高,具有统计学意义($P<0.05$)。HE染色中,B组大鼠睾丸曲细精管空泡化严重,睾丸间质细胞厚度变薄,细胞核固缩,提示射线对睾丸间质细胞产生损伤。反转录PCR(RT-PCR)检测中,B组大鼠胆固醇侧链裂解酶(P450scc)基因的表达量较A组明显降低($P<0.05$),也从另一个侧面证实了间质细胞功能的受损,睾酮合成功能下降。

人们在研究中发现,植物药提取物及中药单体对男性生殖系统辐射损伤有保护作用,Sharma等[10]发现扁担草果的提取物可减少小鼠睾丸因辐射产生的损伤。近些年也陆续报道五加多糖[11]、葛根素[12]、枸杞多糖[13]等中药提取物对大鼠暴露在射线下的生殖系统具有保护作用。

淫羊藿苷是我国传统中药淫羊藿的一种黄酮类提取物,现代药理学研究表明淫羊藿苷具有促进干细胞的增殖分化[14],抗肿瘤[15]、营养神经[16-17]等多种生理活性。在男科方面,多利用其类雄激素的作用,可明显提高血清睾酮的含量[18],其机制可能与促进一氧化氮(NOs)生成有关[19]。张长城等[20]实验证明淫羊藿苷能显著增加模型组小鼠生精功能,改善环磷酰胺对睾丸间质细胞产生的病理损害。而章振宝等[21]认为淫羊藿苷不仅能增加血清睾酮水平,更能提高衰老大鼠血清SOD活性,改善局部微环境,具有明显的抗衰老作用。本实验中,C、D、E组大鼠较B组睾酮升高,其中D、E 2组升高明显($P<0.05$),以E组最为明显。而由于间质细胞功能的恢复,LH数值反馈性下降,E组在下降程度上已有统计学意义($P<0.05$)。在RT-PCR检测中P450scc表达量上,C、D、E组较B组呈上升的趋势,E组与B组比较具有统计学意义($P<0.05$)。睾丸组织HE染色光镜下形态学变化中也提

示:灌胃组大鼠睾丸间质细胞厚度得到了明显的恢复,氧化损伤造成的细胞空泡化、结构紊乱等表现得到了缓解。综上所述,我们认为,γ射线可对大鼠睾丸间质细胞产生损伤,导致细胞结构与功能上的变化,雄激素合成减少。而应用淫羊藿苷单体灌胃可明显缓解这一损伤,对暴露在射线下的睾丸间质细胞有一定的保护作用,且以15 d灌胃组效果最佳。

参考文献:

[1] 孙晓玲, 段小群. 淫羊藿苷及衍生物药理作用研究进展[J]. 华夏医学, 2010, 23(6): 807-810.

[2] Sun X, Sun X, Jin X, *et al*. Icariin induces mouse embryonic stem cell differentiation into beating functional cardiomyocytes[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 349(1/2): 117-123.

[3] 许青媛. 淫羊藿对大鼠性腺功能的影响[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(2): 22-23.

[4] Izard M A. Leydig cell function and radiation: a review of the literature [J]. Radiother Oncol, 1995, 34(1): 1-8.

[5] Borek D, Cymborowski M, Machius M, *et al*. Diffraction data analysis in the presence of radiation damage[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010, 66(Pt 4): 426-436.

[6] Embree-Ku M, Venturini D, Boekelheide K. Fas is involved in the p53-dependent apoptotic response to ionizing radiation in mouse testis [J]. Biol Reprod, 2002, 66(5): 1456-1461.

[7] Ahmadloo N, Bidouei F, Mosleh-Shirazi M A, *et al*. Impact of Scattered Radiation on Testosterone Deficiency and Male Hypogonadism in Rectal Cancer Treated with External Beam Pelvic Irradiation[J]. Middle East J Cancer, 2010, 1(3): 115-122.

[8] Walker W H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis[J]. Spermatogenesis, 2011, 1(2): 116-120.

[9] Shalet S M, Horner A, Ahmed S R, *et al*. Leydig cell damage after testicular irradiation for lymphoblastic leukaemia[J]. Med Pediatr Oncol, 1985, 13(2): 65-68.

[10] Sharma K, Sisodia R. Radioprotective potential of Grewia Asiatica fruit extract in mice testis[J]. Pharmacologyonline, 2010, 1: 487-495.

[11] 莫琳芳, 沈先荣, 何颖, 等. 刺五加多糖对60Coγ射线辐照大鼠胃肠道及生殖系统的保护作用[J]. 中国辐射卫生, 2012, 21(2): 153-155.

[12] 王瑞, 王磊, 张卫星, 等. 葛根素对钴60-γ射线致小鼠睾丸支持细胞急性损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 385-389.

[13] 李德远, 徐为春, 苏喜生, 等. 枸杞多糖抗辐射效应研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(7): 839.

[14] 陈克明, 葛宝丰, 马慧萍, 等. 淫羊藿苷对体外培养骨髓基质干细胞成骨性分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(9): 642-645, 632.

[15] Zhou J, Wu J, Chen X, *et al*. Icariin and its derivative, ICT, exert anti-inflammatory, anti-tumor effects, and modulate myeloid derived suppressive cells (MDSCs) functions[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(7): 890-898.

[16] 龚其海, 杨丹莉, 石京山, 等. 淫羊藿苷的神经药理作用及分子机制研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(7): 481-486.

[17] Shindel A W, Xin Z C, Lin G, *et al*. Erectogenic and neurotrophic effects of icariin, a purified extract of horny goat weed (Epimedium spp.) *in vitro* and *in vivo*[J]. J Sex Med, 2010, 7(4 Pt 1): 1518-1528.

[18] 包宇, 杨建雄, 孙润广. 淫羊藿苷可缓解肾阳虚小鼠睾酮及性腺雄激素受体基因的表达下调[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(2): 174-179.

[19] Liu W J, Xin Z C, Xin H, *et al*. Effects of icariin on erectile function and expression of nitric oxide synthase isoforms in castrated rats[J]. Asian J Androl, 2005, 7(4): 381-388.

[20] 张长城, 贾亮亮, 李守超, 等. 淫羊藿总黄酮对环磷酰胺致小鼠生精障碍保护作用的研究[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2052-2055.

[21] 章振保, 田生平, 杨镜秋, 等. 淫羊藿苷与睾酮治疗亚急性衰老雄性大鼠的实验研究[J]. 中国男科学杂志, 2006, 20(8): 13-18.

(**收稿**:2012-12-04;**修回**:2013-02-20)

(编辑 张 维)

(上接1214页)

2 讨论

自Wee等[1]1989年报道阴股沟皮瓣的诸多优点以来,该皮瓣在阴茎、阴囊、阴道再造术中得到广泛应用。阴股沟皮瓣位于股内侧上方与会阴部之间,上界平耻骨联合上缘、下界为两侧坐骨结节连线、内侧界为阴囊或大阴唇外侧缘、外侧界为股内侧皱襞。该皮瓣具有良好的感觉功能。会阴部骑跨伤导致尿道断裂患者于泌尿外科较为常见,此类患者局部皮肤软组织保留较好,仅行尿道吻合即可。爆炸致伤后重度瘢痕增生合并尿道断裂者罕见,此伤情严重影响患者正常排尿及性生活,患者心理及生理受到巨大伤害。术前设计行阴股沟皮瓣转移,考虑有以下优点[2]:①皮瓣血运丰富,成活率高;②皮瓣薄而柔软。塑造阴囊后外形接近正常;③皮瓣神经呈网状分布,可保留感觉功能;④供区隐蔽;⑤手术操作较为简便。本例术中会阴部瘢痕组织增生厚达8 cm,经分离去处瘢痕组织后充分松解尿道断端并给予吻合,以阴股沟皮瓣转移覆盖原瘢痕组织切除后缺损,取得了良好的手术效果,术后半年随访,患者排尿通畅,效果满意。

参考文献:

[1] Wee J T, Joseph V T. A new technique of vaginal reconstruction using neurovascular pudendal-thigh flaps: a preliminary report[J]. Plast Reconstr Surg, 1989, 83(4): 701-709.

[2] 曾又林, 刘继红. 阴股沟皮瓣解剖及在男科的应用进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2008, 23(8): 637-639.

(**收稿**:2013-02-25;**修回**:2013-04-25)

(编辑 栾 嘉)