doi:10.11659/jjssx.03E018109

·基础研究·

巴戟天水提取物对精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波型蛋白表达的影响

丁小明[1],林文东[2] (1.泉州医学高等专科学校基础医学部解剖教研室,福建 泉州 362010;2.泉州医学高等专科学校动物实验室,福建 泉州 362010)

[摘 要] **目的** 探究巴戟天水提取物对精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波型蛋白表达的影响。**方法** 选取处于青春期的健康雄性 SD 大鼠 40 只,按照数字随机表法分为假手术组、对照组、观察 1 组和观察 2 组,按组别分别使用相应剂量的生理盐水和巴戟天水提取物灌胃,然后使用 MTT 法检测细胞活性,使用实时荧光定量 PCR 法检测 mRNA 相对表达量,使用 Western blotting 法检测波形蛋白表达。**结果** 4 组大鼠支持细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$);对照组支持细胞波形蛋白 mRNA 和波形蛋白表达水平显著低于假手术组($P<0.05$),观察 1 组和观察 2 组显著高于对照组($P<0.05$),并且观察 2 组显著高于对照组和观察 1 组($P<0.05$)。**结论** 巴戟天水提取物具有提高精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波形蛋白 mRNA 表达水平和波形蛋白表达水平的作用。

[关键词] 精索静脉曲张;巴戟天;支持细胞;波型蛋白

[中图分类号] R697 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-03-13

Effect of aqueous extracts from Morinda officinalis on expression of vimentin in sustentacular cells of SD rats with varicocele

DING Xiao-ming[1], LIN Wen-dong[2] (1. Discipline of Anatomy, Faculty of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362010, China; 2. Animal Laboratory, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362010, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of aqueous extracts from Morinda Officinalis on the expression of vimentin in sustentacular cells of SD rats with varicocele. **Methods** A total of 40 adolescent, healthy male SD rats were selected and divided into a sham-operated group, a control group, an observation group 1 and an observation group 2 according to the random number table. These rats were intragastrically administered with the corresponding dose of normal saline and aqueous extracts from Morinda Officinalis respectively. Then, the cell activity of rats was detected by MTT, the relative expression of mRNA in rats was detected by real-time quantitative PCR method, and the expression of vimentin in rats was detected by Western blotting. **Results** Thedifference of activity in sustentacular cells among the four groups was notstatisticallysignificant($P>0.05$). The expression levels of vimentin mRNA and vimentin in sustentacular cells of the control group was significantly lower than the sham-operated group($P<0.05$), those of the observation group 1 and the observation group 2 were significantly

[基金项目] 泉州市科技计划项目(2016Z059)

[通信作者] 丁小明,E-mail:179533609@qq.com

[24] Katoh D, Nagaharuk K, Shimojo N, et al. Binding of alphavbeta1 and alphavbeta6 integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells[J]. Oncogenesis, 2013, 2: e65. doi:10.1038/oncsis.2013.27.

[25] Miao ZF, Li WY, Wang ZN, et al. Lung cancer cells induce senescence and apoptosis of pleural mesothelial cells via transforming growth factor-beta1[J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2657-2665. doi:10.1007/s13277-014-2888-7.

[26] Zhu H, Luo H, Shen Z, et al. Transforming growth factor-beta1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer[J]. Tumour boil, 2016, 37(6): 7075-7083. doi:10.1007/s13277-016-5028-8.

[27] Chen Y, Zhang K, Li Y, et al. Estrogen-related receptor alpha participates transforming growth factor-beta (TGF-beta) induced epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells[J]. Cell adhesion & migration, 2017, 11(4): 338-346. doi:10.1016/j.yexcr.2015.11.020.

[28] Kim H, Choi JA, Kim JH. Ras promotes transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced epithelial-mesenchymal transition via a leukotriene B4 receptor-2-linked cascade in mammary epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(32): 22151-22160. doi:10.1074/jbc.M114.556126.

[29] Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by delta EF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(9): 3533-3544. doi:10.1091/mbc.E07-03-0249.

[30] Saitoh M. Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor-beta signaling during tumor progression[J]. Cancer science, 2015, 106(5): 481-488.

[31] Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. Current opinion in oncology, 2013, 25(1): 76-84.

(编辑:刘 艺)

higher than the control group($P<0.05$), and that of the observation group 2 was significantly higher than that of the control group and the observation group 1($P<0.05$). **Conclusion** Aqueous extracts from Morinda Officinalis plays a role in increasing the expression level of vimentin mRNA and vimentin in sustentacular cells of SD rats with varicocele.

Keywords: varicocele; Morinda officinalis; sustentacular cells; vimentin

精索静脉曲张(varicocele,VC)是一种发生于精索内蔓状静脉丛的血管病变,是导致疼痛、不适及进行性睾丸功能减退的重要原因,也是导致男性不育的最常见原因之一[1]。支持细胞在精子的生成中具有重要作用,是为发育中的精子提供保护和营养的细胞[2]。男性不育治疗的研究一直是热点,但相关西医疗法效果不佳,近年来中医中药研究取得了一定进展。有研究发现巴戟天(morindaofficinalis)具有提升性功能强度的作用,在治疗 VC 中有具有较好疗效,这可能与巴戟天具有改善波形蛋白(vimentin)表达水平的作用有关,但关于其治疗机理的相关研究极少[3-4]。本文应用动物建模实验研究巴戟天水提取物对精索静脉曲张 SD 大鼠支持细胞波型蛋白表达的影响,探究巴戟天治疗 VC 的机理,为巴戟天治疗 VC 在临床上的推广提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料准备

选取处于青春期的健康雄性 SD 大鼠 40 只作为研究对象,平均体质量(195.86 ± 13.86)g,按照数字随机表法分为假手术组(假手术组)、VC + 生理盐水组(对照组)、VC + 巴戟天水提取物 200 mg/kg 组(观察 1 组)以及 VC + 巴戟天水提取物 400 mg/kg 组(观察 2 组),每组 10 只。除假手术组外,均对肾静脉给予逆行结扎,形成 VC 模型。在 VC 模型形成 30 d 后,观察 1 组、观察 2 组按照不同组别分别使用不同剂量巴戟天水提取物进行灌胃,假手术组、对照组使用同体积生理盐水进行灌胃,时间持续 30 d。颈椎脱臼处死 VC 模型 SD 大鼠后取出睾丸,剔出膜组织,剪碎后使用 D-Hanks除去清液,将组织分别使用 0.25% 胰蛋白酶、0.10% 胶原酶 I 型消化,将悬浊液使用 200 目的细胞筛过滤,使用高速离心机离心 10 min(1 500 r/min),使用 DMEM 高糖培养基重悬细胞,使用细胞计数板计算细胞密度。

1.2 细胞活性检测

使用 MTT 法检测细胞活性,将每份细胞悬液样本于 96 孔板中培养,每孔加入 20 μg 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,震荡 30 s 后在 5% CO_2、35 ℃条件下培养 4 h。培养后吸去每孔上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶解结晶物,使用酶标仪检测每孔在 490 nm 波长处的吸光度(absorbance,A),细胞存活率 = [(A 实验组 - A 空白组)/(A 假手术组 - A 空白组)] × 100%。

1.3 支持细胞波形蛋白 mRNA 表达水平

1.3.1 总 RNA 提取 细胞悬液加入 Trizol 裂解后加入三氯甲烷震荡 1 min 后在 0 ℃下静置 5 min,并在 4 ℃下离心 15 min(15 000 r/min),收集上清液分别使用异丙醇、乙醇使用离心法洗涤,最后加入 DEPC 水溶解得到 RNA 溶液。使用核酸蛋白仪检测 RNA 纯度,A 在 1.8 ~ 2.0 视为 RNA 纯度较高。

1.3.2 使用反转录法合成 cDNA 使用反转录法合成 cDNA,试剂盒购买于伯乐生命医学产品(上海)有限公司,严格按照说明书操作进行。

1.3.3 引物设计 本次演技引物参照相关文献[5],引物长度为 150 bp,上游:5-ATGAAAGTGTGGCTGCCAAGAAC-3',下游:5'-GTGACTGCACCTGTCTCCGGTA-3'。

1.3.4 检测 mRNA 相对表达量 使用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR)法检测,试剂盒购买于伯乐生命医学产品(上海)有限公司,将稀释后的 cDNA 样本 2 μL 以及引物各 2 μL 建立反应体系(10 μL),按照以下条件孵化,50 ℃、2 min,95 ℃、2 min,60 ℃、1 min,共进行 40 个循环,使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.4 支持细胞波形蛋白表达水平

使用 Western blotting 法检测波形蛋白表达,方法如下:使用胰酶消化后使用苯甲基磺酰氟裂解细胞 30 min,后在 4 ℃条件下离心 10 min(15 000 r/min),收集上清液,蛋白定量方法为 BCA 法。配制基层胶(60 V、30 min)和分离胶(100 V、60 min),封闭后分别加入兔抗大鼠 Vimentin 单克隆抗体(1∶1 000),4 ℃孵化 12 h,TBST 洗涤,入羊抗兔 IgG(1∶3 000),25 ℃孵化 1 h,TBST 洗涤,进行电泳,将电泳结果拍照,使用 Quantity One 软件分析波形蛋白相对表达水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4组大鼠支持细胞活性比较

4组支持细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 4组大鼠支持细胞活性比较($n=10$)

组别	A值	细胞活性(%)
假手术组	0.68±0.08	100.00
对照组	0.66±0.09	97.05
观察1组	0.67±0.10	98.53
观察2组	0.68±0.11	100.00

2.2 4组大鼠支持细胞波形蛋白mRNA表达水平比较

对照组支持细胞波形蛋白mRNA表达水平显著低于假手术组($P<0.05$),观察1组和观察2组波形蛋白mRNA表达水平显著高于对照组($P<0.05$),并且观察2组显著高于对照组和观察1组($P<0.05$),见表2。

表2 4组大鼠支持细胞波形蛋白mRNA表达水平比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	相对表达水平	t/P
假手术组	1.00±0.00	
对照组	0.47±0.06	$t_1=11.435, P_1=0.000$
观察1组	0.72±0.11	$t_1=7.867, P_1=0.000; t_2=7.128, P_2=0.000$
观察2组	0.89±0.12	$t_1=3.947, P_1=0.000; t_2=10.464, P_2=0.000; t_3=5.751, P_3=0.000$

t_1、P_1:与假手术组比较;t_2、P_2:与对照组比较;t_3、P_3:与观察1组比较

2.3 4组大鼠支持细胞波形蛋白表达水平比较

支持细胞的波形蛋白表达凝胶电泳图见图1,对照组支持细胞波形蛋白表达水平显著低于假手术组($P<0.05$),观察1组和观察2组波形蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$),并且观察2组显著高于对照组和观察1组($P<0.05$),见表3。



健康组 对照组 观察组1 观察组2

图1 支持细胞波形蛋白凝胶电泳图

表3 4组支持细胞波形蛋白表达水平比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	蛋白表达水平	t/P
假手术组	1.00±0.00	
对照组	0.13±0.03	$t_1=23.323, P_1=0.000$
观察1组	0.70±0.14	$t_1=8.039, P_1=0.000; t_2=20.548, P_2=0.000$
观察2组	0.91±0.13	$t_1=3.393, P_1=0.001; t_2=21.687, P_2=0.000; t_3=5.946, P_3=0.000$

t_1、P_1:与假手术组比较;t_2、P_2:与对照组比较;t_3、P_3:与观察1组比较

3 讨论

VC是一种血管病变,精索内蔓状静脉丛的异常扩张、伸长和迂曲,由于包绕精索的精索静脉和蔓状静脉丛的扩张而引起的血管性精子发生障碍,不但会使患者感觉疼痛,而且导致不育,给患者、家庭和社会带来不利因素。VC在在男性不育症中占19%~41%[6]。目前对于VC的治疗主要为护理性治疗、药物治疗以及手术治疗,其中一般护理性治疗主要为饮食调节、注意生活方式、降温或阴囊托等,此类方法疗效不理想;手术方法主要为经腹股沟管精索内静脉高位结扎术、经腹膜后精索内静脉高位结扎等,虽具有一定效果,但患者选择时出于安全性考虑较为犹豫;药物治疗主要为中药治疗,疗效较好,但其治疗机理一直是研究热点[7-8]。

巴戟天为为双子叶植物茜草科,巴戟天水提取物中的主要成分为巴戟天多糖、甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚等蒽醌物质,在中医中常用于治疗主治阳痿遗精、宫冷不孕等生殖问题[9]。研究发现巴戟天可提高VC大鼠紧密连接相关蛋白的表达提高支持细胞的紧密连接作用[10]。支持细胞不是生殖细胞株的一部分,但支持细胞曲细精管中紧邻生殖细胞,为精子提供保护和营养,支持细胞不但在间质间隙与浸泡生殖上皮的液体之间起功能性屏障作用,还具有分泌介质促进精子产生和成熟、吞噬发育不良的精子、分泌睾网液促进精子的排出等作用[11]。研究发现VC导致的支持细胞发育异常是导致不育的重要原因[12]。波形蛋白具有维持细胞骨架的完整性的作用[13]。有研究显示VC大鼠的波形蛋白mRNA表达水平低于健康大鼠,提示可能由于VC导致波形蛋白表达分泌异常,导致支持细胞体积失去支持,出现胞体变小、形态异常,从而影响支持细胞功能,影响精子的生成[14-15]。

本次研究结果显示,经巴戟天灌胃治疗大鼠的支持细胞活性与假手术组相比无显著差异,说明巴戟天水提取物具有一定的安全性。对照组的波形蛋白mRNA表达水平以及波形蛋白表达水平均显著低于假手术组,验证了VC会引起波形蛋白表达异常,与过往研究结果一致[16]。观察1组和观察2组波形蛋白mRNA表达水平和波形蛋白表达水平显著高于对照组,并且观察2组显著高于对照组和观察1组,说明巴戟天水提取物具有提高波形蛋白表达的作用,随着剂量的增加,这种效果越明显。Ghaffari等[17]研究发现VC的波形蛋白表达水平显著低于健康人群,而通过治疗可使波形蛋白水平显著升高,疗效佳组波形蛋白水平

升高更加显著。李容等[18]研究发现巴戟天水、醇提物对手机辐射致大鼠生殖障碍有修复功效,且水提物效果优于醇提物。王凤娟等[19]研究发现巴戟天水提物可促进微波辐射大鼠睾丸的修复和促进精子生成,巴戟天醇提物可改善损伤的大鼠睾丸生精细胞的形态,而对精子的生成作用不明显,但可显著下调下丘脑GnRH的表达提示巴戟天水提取物中的活性成分可通过提高波形蛋白的表达促进支持细胞的生长分化,保持支持细胞正常的大小、形态,恢复支持细胞功能,并恢复支持细胞与生精细胞间的连接,从而治疗VC导致的不育症状[18-20]。综上所述,巴戟天水提取物具有提高VC大鼠支持细胞波形蛋白mRNA表达水平和波形蛋白表达水平的作用,并且对细胞活力无明显影响。

[参考文献]

[1] Masson P, Brannigan RE. The Varicocele[J]. Urologic Clinics of North America, 2014, 41(1): 129 - 144. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.001.

[2] Dirami G, Ravindranath N, Achi MV, et al. Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice[J]. Journal of Andrology, 2015, 22(6): 944 - 952. doi: 10.1002/j.1939 - 4640.2001.tb03434.x.

[3] Yong J, Lu C, Huang S, et al. Chemical components isolated from the roots of morindaofficinalis[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2015, 51(3): 548 - 549. doi: 10.1007/s10600 - 015 - 1338 - 0.

[4] Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting[J]. Microcirculation, 2014, 21(4): 333 - 344. doi: 10.1111/micc.12111.

[5] Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, et al. GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease[J]. Glia, 2015, 63(6): 1036 - 1044. doi: 10.1002/glia.22800.

[6] Fazlioglu A, Yilmaz I, Mete O, et al. The effect of varicocele repair on experimental varicocele-induced testicular germ cell apoptosis[J]. J Androl, 2015, 29(1): 29 - 34. doi: 10.2164/jandrol.107.002717.

[7] Nork JJ, Berger JH, Crain DS, et al. Youth varicocele and varicocele treatment: a meta-analysis of semen outcomes[J]. Fertility & Sterility, 2014, 102(2): 381 - 387. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.049.

[8] Camoglio FS, Zampieri N. Varicocele treatment in paediatric age: relationship between type of vein reflux, surgical technique used and outcomes[J]. Andrologia, 2016, 48(4): 389 - 392. doi: 10.1111/and.12458.

[9] 崔承彬,杨 明,姚志伟,等. 中药巴戟天中抗抑郁活性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(1): 36 - 39. doi: 10.3321/j.issn:1001 - 5302.1995.01.003.

[10] 苗 蕊,贾晓鹏,李 斌,等. 精索静脉曲张对大鼠睾丸内分泌功能的影响[J]. 解放军医药杂志, 2015, 27(5): 29 - 32. doi: 10.3969/j.issn.2095 - 140x.2015.05.009. doi: 10.1155/2016/5365291.

[11] Gungorordueri NE, Tang EI, Celikozenci C, et al. Ezrin is an actin binding protein that regulates sertoli cell and spermatid adhesion during spermatogenesis[J]. Endocrinology, 2014, 155(10): 3981 - 3995. doi: 10.1210/en.2014 - 1163.

[12] Razi M, Malekinejad H. Varicocele-Induced Infertility in Animal Models[J]. International Journal of Fertility & Sterility, 2015, 9(2): 141. doi: 10.3978/j.issn.2223 - 4683.2014.01.07.

[13] 李 蒙,吴玖斌,张培彤. E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白及波形蛋白在肿瘤转移中应用的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2016, 28(2): 132 - 136. doi: 10.3760/cma.j.issn.1006 - 9801.2016.02.017.

[14] Alam MS, Kurohmaru M. Disruption of Sertoli cell vimentin filaments in prepubertal rats: an acute effect of butylparaben in vivo and in vitro[J]. ActaHistochemica, 2014, 116(5): 682 - 687. doi: 10.1016/j.acthis.2013.12.006.

[15] Lakpour MR, Koruji M, Shahverdi A. The Expression ofTLR2andTLR3in Sertoli Cells of AzoospermicPatients[J]. Cell Journal, 2017, 19(3): 375 - 385. doi: 10.22074/cellj.2017.4300.

[16] Egea RR, Puchalt NG, Varghese AC. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology[J]. Journal of Human Reproductive Sciences, 2014, 7(2): 73 - 92. doi: 10.4103/0974 - 1208.138857.

[17] Ghaffari NM, Mirfakhraie R, Nazarian H. Aberrant Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in Testis of Azoospermic Men? [J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2015, 5(3): 373 - 377. doi: 10.15171/apb.2015.051.

[18] 李 容,刘良财,王凤娟,等. 巴戟天对手机辐射致雄性大鼠生殖障碍的作用[J]. 广东医学, 2015, 15(1): 58 - 60. doi: 10.13820/j.cnki.gdyx.2015.01.051.

[19] 王凤娟,王 玮,李 容,等. 巴戟天根两种提取物对微波损伤大鼠生精功能的影响[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(4): 340 - 345. doi: 10.13263/j.cnki.nja.2013.04.002.

[20] 陈桐君,相健美,王 玮. 巴戟天萃取物对环磷酰胺诱导生精障碍大鼠支持细胞的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(19): 2855 - 2859. doi: 10.13820/j.cnki.gdyx.20161021.006.

(编辑:左艳芳)