利用输精管切除术建立附睾管腔酸性微环境破坏大鼠模型

冯 潇,程 胖,赵 洁,李 伟,张远强,李 臻 (第四军医大学人体解剖与组织胚胎学教研室,陕西 西安 710032)

[摘 要] **目的** 探索采用输精管切除术建立大鼠附睾管腔酸性微环境破坏的方法。**方法** SPF 级成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠,选取 60 只,随机分为假手术组 25 只、手术模型组 35 只。2 组动物行输精管切除术后于相同条件下饲养 8 周,采用敏感的 pH 试纸检测附睾各节段 pH 变化并通过 HE 染色检测组织结构的变化。**结果** 与假手术组相比,手术组大鼠附睾头部、体部与尾部的管腔结构变化差异显著,表现为管腔直径增大或扭曲,管腔间隙狭窄,精子密度增高,管腔液 pH 值均显著升高而酸性环境被破坏($P<0.05$)。**结论** 输精管切除术能够成功建立术后附睾管腔酸性微环境破坏大鼠模型,方法简单可靠,可应用于男性不育与避孕及相关临床及基础实验研究。

[关键词] 输精管切除;动物模型;大鼠

[中图分类号] R339.2;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)05-0469-03

Establishment of postoperative epididymis luminal acidification destroy model in rats

FENG Xiao, CHENG Pang, ZHAO Jie, LI Wei, ZHANG Yuan-qiang, LI Zhen (Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

Abstrac: Objective To establish a rat model to destroy postoperative epididymis luminal acidification. **Methods** Totally 60 healthy adult SD rats were randomly divided into the sham group($n=25$) and the model group($n=35$). Rats in the two groups were given a normal feeding for 8 weeks after operation. The changes of pH and the changes of epididymal morphology were examined. Results The morphological changes of epididymal were significant differenct between the two groups, and the pH in the model group increased obviously when compared with that in the sham group ($P<0.05$). **Conclusion** The postoperative epididymis luminal acidification destroy model can be successfully established through vasectomy, which is simple, reliable and can be used in many related clinical and basic experimental studies.

Keywords: vasectomy; model; rats

不孕症是现在世界上 1/6 的夫妇主要的健康问题。在不同人种中所做的调查表明,近 50 年来男性的生育能力显著下降[1],其中生殖功能紊乱占很大比例。男性不育症常见的病因是精子运动能力低下和精卵结合力降低[2-3]。众所周知,精子的结构和功能正常是受精成功和胚胎顺利发育的先决条件。精子在睾丸中完成形态分化后需要通过附睾,经历复杂的变化后,才能获能而达到功能上的成熟并在附睾内储存[4]。研究表明,附睾管腔液中的 pH 值对影响精子的功能起着至关重要的作用,酸性 pH 能够抑制精子的趋化运动,而碱性 pH 能够诱导精子的趋化运动[5]。附睾管腔液的酸性环境能够保证精子在附睾储存时处于静息状态,避免了精子在附睾提前获能[6-8]。鉴于附睾管腔酸性微环境的重要作用,建立一种研究附睾酸性微环境的动物模型,对研究男性不育症的诊断和治疗必将起到重要的作用。本文报道一种简单实用的输精管切除术后附睾酸性微环境破坏大鼠模型的建立方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级正常成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠,体质量(350 ± 0.5) g,由第四军医大学实验动物中心提供。60 只 Sprague-Dawley 大鼠随机地分为 2 组,对照组为假手术组,25 只大鼠;模型组为手术组,35 只大鼠,按照动物房标准进行分笼饲养。温度控制在(23 ± 1) ℃,相对湿度控制在(50 ± 10)%。

1.2 方法

1.2.1 手术方法 输精管切除术模型组大鼠,3% 的戊巴比妥钠,50 mg/kg,腹腔注射麻醉。麻醉后四肢固定于动物手术台上,腹部备皮后,碘伏、酒精消毒铺巾。于下腹部正中线做长约 3 cm 的切口,依次切开皮肤、腹壁肌肉后进腹。探查到睾丸,寻找到附睾尾部。沿着附睾膨大的尾部有两支,沿着睾丸走行的为附睾的体部,远离睾丸的一支为输精管,伴行有血管走行。小心分离输精管周边的筋膜及伴行的血管。在距离附睾尾部 1 cm和 3 cm 两处,用 4-0 手术线分别结扎,将结扎段切除。用 4-0 手术线分别间断缝合筋膜、腹肌及皮肤。注意保温(笼子底部台灯近距离照射或者加厚底料)。动物清醒后,正常饲养。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201305003

[基金项目] 国家自然科学基金(81170614);陕西省自然科学基金(2010JM4001)

[通讯作者] 李 臻,电话:(029)84774052,E-mail:lizhenhe@fmmu.edu.cn

[收稿日期] 2013-06-06 [修回日期] 2013-06-20

假手术组只行腹部切开手术即暴露输精管但不行切除术。

1.2.2 标本采集与处理 输精管切除术后饲养 8 周,采用 3% 戊巴比妥钠麻醉剂,以 50 mg/kg 的剂量,行腹腔注射麻醉,后分离大鼠附睾。

1.2.3 附睾各节段 pH 值测定 附睾分离为头部、体部以及尾部三段组织,用来测定 pH 值。采用 Avenel Joseph 的敏感 pH 试纸法[9](Hydrion pH paper, Microfine; Micro Essential Laboratory, pH 6.4 ~ 7.4, 0.2 units)检测 pH 的改变。检测时必须 3 个人在场,同时读数。

1.2.4 组织病理学观察 完整的附睾组织用 Bouin's 液固定 24 h 后,按照头部、体部以及尾部 3 部分分离,修剪为适当大小的组织块,梯度的乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋组织,4 μm 厚切片,烤片台 37 ℃过夜后,常规脱蜡至水,进行 HE 染色,透明后中性树胶封片。实验室 Zeiss Axioimager M1 型显微镜拍照,观察假手术组与手术组附睾形态差异。

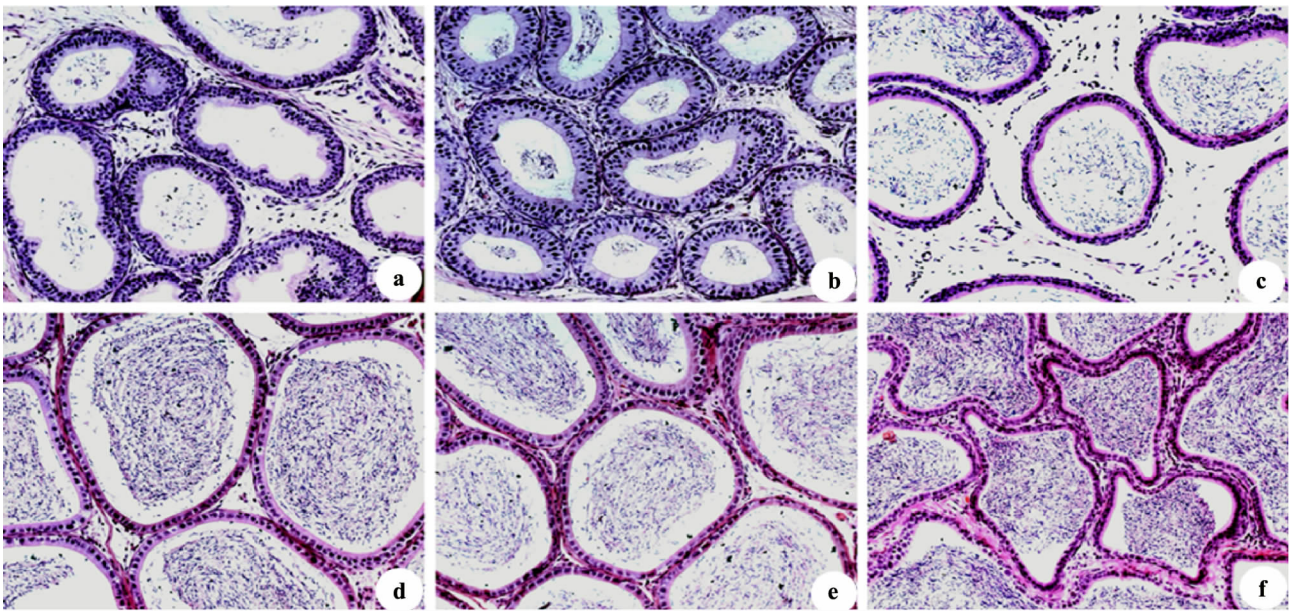
1.3 统计学处理

所有数据应用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析。实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组数据之间的比较,采用 t 检验分析,$P < 0.05$ 表示差异有显著性,具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学表现

手术模型组与假手术组比较,可见手术模型组头部、体部管腔增大,上皮变薄,管腔间隙变窄;尾部管腔扭曲变形,上皮变薄,管腔间隙狭窄。手术模型组整个附睾的管腔内精子密度增高(图 1)。

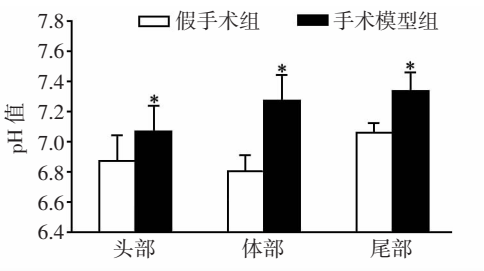


a:假手术组附睾头部;b:假手术组附睾体部;c:假手术组附睾尾部;d:手术模型组附睾头部;e:手术模型组附睾体部;f:手术模型组附睾尾部

图 1 输精管切除后大鼠附睾各部的形态变化(HE 染色 ×100)

2.2 输精管切除后大鼠附睾各节段 pH 值的变化

手术模型组与假手术组相比,$P < 0.05$,手术模型组大鼠附睾各部 pH 值明显增高,见图 2。



*:与假手术组比较,$P < 0.05$

图 2 输精管切除后大鼠附睾各部 pH 值的变化

3 讨论

精子的产生、分化、成熟、获能以及精子卵子的结合是个相当复杂而又十分精细的过程。这个过程是许多因素共同调控的结果,其中包括生殖道管腔的酸性与碱性的微环境。附睾管腔内存在大量的无机离子和有机小分子,与血清相比附睾管腔内液体是低钠、高钾和 pH 值偏低。近年来大量实验发现改变附睾管腔内 pH 值可以影响精子成熟,如 Yeung 等[10]发现 c-ros 敲除鼠中因附睾管腔液的 pH 值比杂合子鼠高 0.3 而影响精子成熟并导致不育,Pastor 等[7]报道无论是基因突变还是环境因素所导致的附睾管腔酸性环境破坏,均可引起精子成熟障碍和雄性不育。因此,研究男性生殖道管腔酸性微环境的形成机制以及其对于精子的正常与功能具有关键的意义,而且对人类生殖健康的作用长久而深远,能为优生优育和治疗不孕不育研究提供重要的理论基础。

目前关于附睾酸性微环境的研究大多在细胞离体水平进行,在体动物的研究很少,针对附睾管腔酸性微环境的动物模型也未见有明确报道。为此本研究采用输精管切除术对能否成功建立附睾管腔酸性微环境动物模型进行了探索,结果表明输精管切除 8 周后可在整个附睾宫腔检测到 pH 升高,表明实验动物附睾管腔酸性微环境被破坏、该方法可以成功制作附睾管腔酸性微环境破坏的动物模型。在实验过程中我们也注意到术后需要较长时间才可以检测到 pH 的升高,其原因可能是术后短期附睾管腔的酸性改变是一个缓慢的过程,而在 8 周之后附睾管腔液的微环境才会因失代偿而紊乱的。因此术后所有大鼠在同种条件下需要正常饲养 8 周。在输精管切除术后附睾酸性微环境破坏大鼠模型过程中,需要注意以下问题:①首先是动物的麻醉不要过深,注意选择复苏时间较短的麻醉剂;术后注意保暖。②在打开腹部操作过程中要注意无菌操作,探查输精管时操作要轻柔,总的操作时间宜在 30 min 之间,以便尽可能将每个模型的破坏轻重程度控制在同一水平;③与输精管伴行的血管一定要分离开,否则会引起较大的出血。

本组实验结果表明模型组大鼠附睾管腔 pH 值明显增高。正常大鼠附睾起始段近端 pH 值为(7.20 ± 0.06)、远端为(6.79 ±0.03)、头部 pH 值最低达(6.64 ±0.03),尾部的 pH 值(6.85 ± 0.03),相对于头部呈梯度增加的趋势[11]。而输精管切除术后 8 周,大鼠附睾各节段的 pH 均有所升高。本文通过多样本的模型与对照来建立附睾酸性微环境破坏大鼠模型,相比其他方法如精索静脉曲张等更简单、经济快速,可重复性强,不需要特别控制实验条件,适合于推广与普及。

[参考文献]

[1] Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, et al. Is human fecundity declining? [J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 2 – 11.

[2] Aitken RJ. Sperm function tests and fertility[J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 69 – 75, 105 – 108.

[3] Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility[J]. Hum Reprod, 2002, 17(11): 2904 – 2911.

[4] Cornwall G A. New insights into epididymal biology and function[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(2): 213 – 227.

[5] Zuo WL, Li S, Huang JH, et al. Sodium coupled bicarbonate influx regulates intracellular and apical pH in cultured rat caput epididymal epithelium[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22283.

[6] Acott TS, Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor[J]. Biol Reprod, 1984, 30(4): 926 – 935.

[7] Carr DW, Usselman MC, Acott TS. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison[J]. Biol Reprod, 1985, 33(3): 588 – 595.

[8] Pastor-Soler N, Piétrement C, Breton S. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction[J]. Physiology (Bethesda), 2005, 20: 417 – 428.

[9] Joseph A, Hess RA, Schaeffer DJ, et al. Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function[J]. Biol Reprod, 2010, 82(5): 948 – 957.

[10] Yeung CH, Breton S, Setiawan I, et al. Increased luminal pH in the epididymis of infertile c-ros knockout mice and the expression of sodium - hydrogen exchangers and vacuolar proton pump H+ -ATPase[J]. Mol Reprod Dev 2004, 68(2): 159 – 168.

[11] 冯 潇, 肖 岚, 李 臻. 附睾管腔酸性微环境的调节机制[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(1): 36 – 41.

(编辑:左艳芳)

(上接第 468 页)

by ischemia and reperfusion in the human forearm vasculature[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(10): 996 – 1001.

[3] Penna C, Tullio F, Moro F, et al. Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats[J]. Basic Res Cardiol, 2010, 105(2): 181 – 192.

[4] Chiari PC, Pagel PS, Tanaka K, et al. Intravenous emulsified halogenated anesthetics produce acute and delayed preconditioning against myocardial infarction in rabbits[J]. Anesthesiology, 2004, 101(5): 1160 – 1166.

[5] Liu L, Ran K, Chang Y, et al. Effect of isoflurane delayed preconditioning on the expression of Bcl-2 and caspase-3 in myocardium during ischemia reperfusion in rabbits[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 35(4): 346 – 350.

[6] 田 毅, 柳培雨, 田国刚, 等. 异氟醚和卡托普利联合预处理对兔心肌缺血 – 再灌注细胞超微结构的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(6): 602 – 604.

[7] Karlsson LO, Zhou AX, Larsson E, et al. Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2010, 15(2): 182 – 189.

[8] Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160 (2): 220 – 232.

[9] Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, et al. Isoflurane attenuates myoglobin release during ischemic and/or reperfusion periods[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2008, 52(5): 650 – 657.

[10] Lucchinetti E, Jamnicki M, Fischer G, et al. Preconditioning by isoflurane retains its protection against ischemia-reperfusion injury in postinfarct remodeled rat hearts[J]. Anesth Analg, 2008, 106(1): 17 – 23.

(编辑:左艳芳)