基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.005

雄性大鼠脊髓损伤对生殖系细菌感染及 IL-1、TNF-α、SOD 表达的影响

杨春林，王　明，邓远忠，田禄海
（重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆　400016）

【摘　要】目的：了解脊髓损伤后雄性大鼠前列腺、附睾、睾丸细菌感染及 IL-1、TNF-α、SOD 蛋白的表达情况。方法：80 只 SD 大鼠采用随机数字法分为对照组（n=40）和实验组（n=40），采用改良 Allen 法建立脊髓损伤动物模型，分别喂养 1、2、4、8、16 d，2 组均于每个时间点摘取 8 只大鼠的前列腺、附睾、睾丸组织进行细菌培养和免疫组织化学 SABC 法检测白介素-1（Interleukin-1，IL-1）、肿瘤坏死因子-α（Tumor necrosis factor-α，TNF-α）、超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）的表达。结果：与对照组相比，实验组前列腺、附睾细菌培养阳性数显著提高（P<0.05），大肠杆菌的检出率高于其他细菌；睾丸 IL-1、TNF-α 表达明显增多（P<0.05），实验组间以术后第 4 天表达水平最高（P<0.05）；SOD 表达无明显差异（P>0.05）。结论：脊髓损伤后大鼠前列腺、附睾易受到以大肠杆菌为主的细菌感染，睾丸炎性反应增强，生殖系抗氧化反应可能很弱。

【关键词】脊髓损伤；生殖系；超氧化物歧化酶；白介素-1；肿瘤坏死因子-α
【中国图书分类法分类号】R697　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-08-03

Spinal cord injury in male rats can impact bacterial infection of reproductive system, and IL-1, TNF-α and SOD expressions

YANG Chun-lin, WANG Ming, DENG Yuan-zhong, TIAN Lu-hai
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expressions of IL-1, TNF-α, SOD and bacterial infection in male rats' reproductive system after spinal cord injury. *Methods*: 80 SD rats were divided into control group (40 rats) and experimental group (40 rats) randomly. Animal models of spinal cord injury were established by 'Allen' method. Both groups of rats were fed for 1 day, 2 days, 4 days, 8 days, and 16 days respectively. Then 8 rats' prostates, testes and epididymises in each group were extirpated for bacterial culture and immunohistochemistry by SABC to detect the expressions of proteins (IL-1, TNF-α, SOD) at each time point. *Results*: Compared with control group, the risk of *E.coli* infection in prostate and epididymis was increased significantly in the experimental group (P<0.05); the expressions of testicular IL-1 and TNF-α were increased (P<0.05) and the expression level was the highest in the fourth days after surgery (P<0.05). SOD expression showed no significant difference in the whole reproductive system (P>0.05). *Conclusion*: Prostate and epididymis of the rat after spinal cord injury are easily infected by bacteria (E.coli); inflammatory response was enhanced in testicular, and the antioxidant activity of reproductive system may be very weak.

【Key words】spinal cord injury; reproductive system; superoxide dismutase (SOD); interleukin-1 (IL-1); tumor necrosis factor-α (TNF-α)

生育能力降低是脊髓损伤患者重要并发症之一。目前国外学者已证实脊髓损伤后患者在精子数量、活力、密度、运动力等方面明显降低，精子形态结构异常[1-3]。但其生精功能障碍的具体发病机制尚不明确，既往的研究多集中于射精功能、泌尿系感染、内分泌紊乱、性激素水平降低，生殖细胞凋亡与抗凋亡蛋白的异常表达等[4]。鉴于肿瘤坏死因子（Tumour necrosis factors，TNF）可拮抗卵泡刺激素（Follicle-stimulating hormone，FSH）间接抑制生精小管形成；白介素-1（Interleukin-1，IL-1）、TNF-α、细菌感染能明显激活生殖系统的白细胞并产生大量的活性氧等物质[5,6]；大肠杆菌还能引起机体抗精浆免疫抑制剂抗体，激活补体系统，对精子产生免疫性损伤[7]；超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）能有效清除机体产生的大量氧自由基等活性氧对组织细胞的损伤。本实验拟通过对生殖系细菌数量和 IL-1、TNF-α、SOD 蛋白的检测，探讨脊髓损伤早期对生精功能的可能影响。

作者介绍：杨春林（1981-），男，硕士，
研究方向：脊髓损伤与不育。
通信作者：王　明，男，副教授，Email：wangmxr@sohu.com。
基金项目：重庆市卫生局医学科研资助项目（编号：06-2-019）。

1 材料与方法

1.1 动物来源及分组

80 只雄性成年 SD 大鼠均购置于重庆医科大学动物中心（清洁级喂养），体重 250~300 g，采用随机数字法分为 2 组：实验组和对照组，每组 40 只，术后分别喂养 1、2、4、8、16 d，2 组均于每个时间点摘取 8 只大鼠的前列腺、附睾、睾丸进行实验。

1.2 动物模型建立

实验组采用改良 Allen 法建立脊髓损伤模型，用 10%水合氯醛溶液腹腔内注射（0.3 ml/100 g）麻醉，背部常规脱毛、消毒、铺巾、以 T9 为中心作 1 个长约 4 cm 切口，充分显露硬脊膜长约 1 cm，于硬脊膜表面贴 1 个凹型塑料片，上方置 1 根细玻璃管，将 10 g 砝码在上方 2.5 cm 处沿玻璃管垂直落下造成致伤力，对照组仅暴露脊髓而不损伤脊髓。实验组术毕以大鼠双后肢迟缓性瘫痪及无摆尾活动为成功模型，每日给予普通饲料及饮水喂养，膀胱按摩 3~5 次，帮助排尿，会阴及肛门周围温开水清洗 1 次，前 3 d 每只大鼠给予皮下注射生理盐水 5 ml（观察到大鼠术后 3 d 内可能因麻醉及切口疼痛，不喜饮水）。

1.3 标本采集

于不同实验时间点，10%水合氯醛溶液过量麻醉处死，无菌条件下打开盆腔取 1 小块前列腺、附睾、睾丸组织剪碎放于无菌培养瓶内。另取前列腺、附睾、睾丸组织放于 4%多聚甲醛溶液固定 48 h 左右，睾丸固定时间适当延长并在白膜下打孔便于固定液浸入。

1.4 细菌培养鉴定

将已采集好的无菌组织块捣碎放于 LB 肉汤培养基（上海叶源生物技术公司提供，培养基采用 120℃高压蒸气灭菌），在 37℃温箱进行增菌培养 48 h。取培养液 1 ml 用无菌超纯水稀释成 5 ml，再取 1 ml 接种于全自动细菌培养鉴定仪（重庆医科大学附属第一医院检验系提供），其操作规程及试剂盒按说明进行，细菌培养鉴定参考《伯杰氏细菌学手册》。

1.5 免疫组化检查及结果判定

将固定好的组织标本修剪成 1 cm×1 cm×1 cm 大小，梯度脱水、二甲苯透明、常规石腊包埋、5 μm 切片行免疫组化 SABC 法染色（SOD、IL-1、TNF-α 一抗（1:100）和试剂盒由武汉博士德生物技术公司提供）。细胞染色呈棕黄色，不论染色强弱，均计为阳性细胞，PBS 液为阴性对照。每组 8 张切片，每张切片随机选取 10 个（以 1 个生精小管或 1 个腺体组织为中心）高倍视野（400 倍）为计数对象，分别计数阳性细胞个数，再计算出每张切片每个高倍视野平均阳性细胞数，阳性细胞数（W）≤20 个为阴性，20<W≤40 个为弱阳性，40<W≤60 个阳性，≥60 个强阳性。

1.6 统计学方法

数据处理采用 SAS9.2 统计分析软件，阳性细胞数采用“均数±标准差”进行描述。实验组与对照组细菌培养的阳性标本数比较采用卡方检验，细菌种类鉴定采用统计图；同一时间点，实验组与对照组的阳性细胞数差异采用 t 检验；不同时间点，实验组之间的阳性细胞数差异采用区组设计的方差分析，并用 SNK 法进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察

实验组大鼠均表现出完全性截瘫，排尿障碍及不同程度的血尿与大便障碍，部分大鼠尿液混浊甚至脓尿，膀胱区肿胀压痛。对照组麻醉苏醒后无异常表现。

2.2 细菌培养

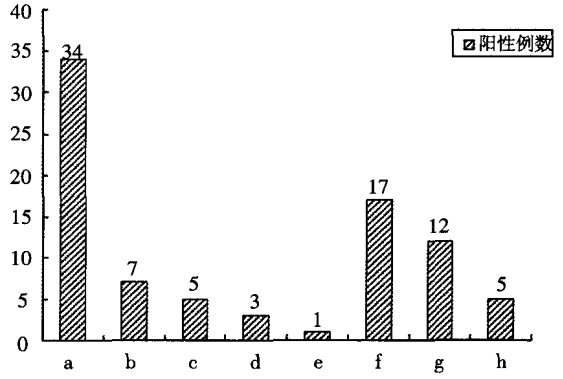
实验组中细菌培养阳性标本总数 46 例，以前列腺，附睾感染例数多，与对照组比较差异有显著性（$P<0.05$）；睾丸感染较少，与对照组比较无差异（$P>0.05$）；感染细菌中主要为大肠杆菌，其次为粪肠球菌，和金黄色葡萄球菌。细菌培养鉴定结果详见表 1、图 1。

表 1 不同部位细菌培养阳性标本数

（所有时间点统一计数阳性与阴性标本例数）

组别	前列腺*		附睾*		睾丸	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
实验组	22	18	20	20	4	36
对照组	0	40	0	40	0	40

*：$P<0.05$ 所有时间点不同部位实验组与对照组比较



a.大肠杆菌；b.克雷伯杆菌；c. 变形杆菌；d. 绿脓杆菌；e. 产气杆菌；f. 粪肠球菌；g. 金黄色葡萄球菌；h. 其他细菌

图 1 细菌鉴定结果

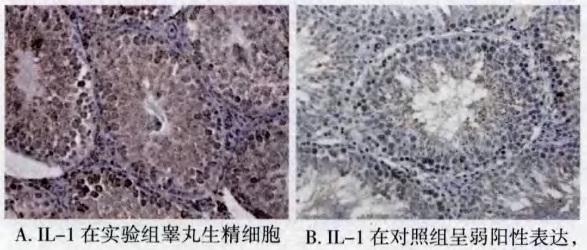
2.3 IL-1、TNF-α、SOD 蛋白的免疫组化检测

IL-1、TNF-α 主要表达于睾丸生精细胞膜、间质细胞的细胞膜及精子细胞。每 1 个时间点实验组 IL-1、TNF-α 表达明显高于对照组（$P<0.05$）；不同时间点实验组总体比较，IL-1、TNF-α 蛋白表达有差异（$P<0.05$）；两两比较中，d_4 组表达最高且差异最显著（$P<0.05$）。SOD 仅有少量前列腺腺体细胞膜、附睾主细胞膜和细胞质、睾丸生精细胞表达。同一时间点实验组与对照组比较及不同时间点实验组之间比较 SOD 表达均无明显差异（$P>0.05$）。见表 2、3，图 2~6。

表 2 IL-1、TNF-α 在睾丸组织中的平均阳性细胞数/每高倍视野（×400）

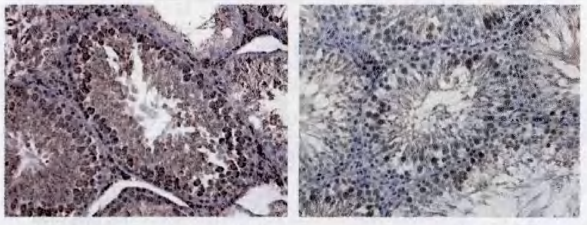
时间点	IL-1		TNF-α	
	实验组	对照组	实验组	对照组
d_1	36.39 ± 3.02*	14.36 ± 1.75	33.62 ± 2.48*	10.93 ± 1.19
d_2	47.13 ± 3.58*	14.61 ± 2.22	56.28 ± 3.15*	13.38 ± 1.83
d_4	86.71 ± 4.68*Δ	14.88 ± 2.02	91.29 ± 3.10*Δ	11.93 ± 1.77
d_8	56.33 ± 3.79*	14.68 ± 1.50	55.95 ± 3.69*	12.39 ± 2.04
d_{16}	36.59 ± 2.83*	13.84 ± 2.23	55.31 ± 4.83*	12.41 ± 1.90

*：$P<0.05$ 每个时间点实验组与对照组比较；Δ：$P<0.05$ 实验组之间比较



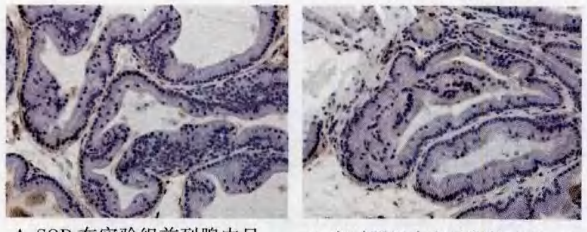
A. IL-1 在实验组睾丸生精细胞及支持细胞中呈强阳性表达　B. IL-1 在对照组呈弱阳性表达，二者比较有差异（$P<0.05$）

图 2 IL-1 在睾丸中免疫组化表达（IHC×400）



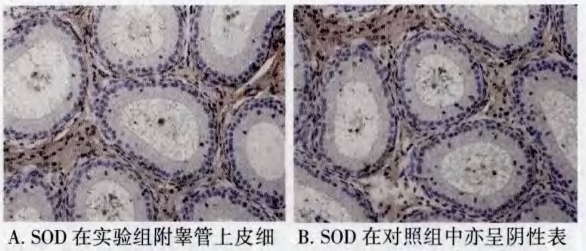
A. TNF-α 在实验组睾丸生精细胞及支持细胞中呈强阳性表达　B. TNF-α 在对照组中呈弱阳性表达，二者比较有差异（$P<0.05$）

图 3 TNF-α 在睾丸中免疫组化表达（IHC×400）



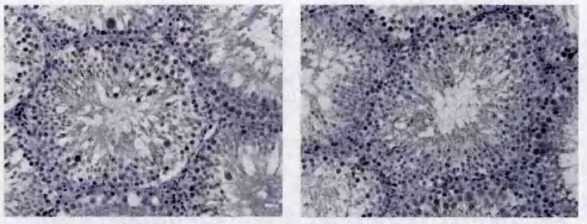
A. SOD 在实验组前列腺中呈阴性表达　B. 在对照组中亦呈阴性表达，二者比较无差异（$P>0.05$）

图 4 SOD 在前列腺中免疫组化表达（IHC×400）



A. SOD 在实验组附睾管上皮细胞中呈阴性表达　B. SOD 在对照组中亦呈阴性表达，二者比较无差异（$P>0.05$）

图 5 SOD 在附睾中免疫组化表达（IHC×400）



A. SOD 在实验组睾丸呈阴性表达　B. 在对照组中亦呈阴性表达，二者比较无差异（$P>0.05$）

图 6 SOD 在睾丸中免疫组化表达（IHC×400）

3 讨 论

3.1 脊髓损伤后生殖系感染与精液质量

脊髓损伤（Spinal cord injury，SCI）后患者持续尿路感染或无症状菌尿已得到公认，但在长期的随访中也会因为治疗措施和个体状况的差异，尿路感染的检出率不同。发病主要因素包括膀胱内高压、括约肌逼尿肌协同失调、尿道痉挛、前列腺肥大引起尿滞留及输尿管反流、尿道黏膜损伤、免疫机能低下、个人卫生、居住条件等，这可能增加了前列腺，附睾感染的危险。本次实验结果显示，大鼠 SCI 后 2 d，前列腺、附睾细菌感染数开始升高，但睾丸不易受到细菌感染，具体机制尚不清楚。已知男性精液由精子与精浆组成，前者产生于睾丸，后者产生于前列腺、精囊、尿道球腺。已有研究表明大肠杆菌能引起精子凝集抑制精子运动，甚至杀死精子，这种相互作用是精子表面甘露糖残基与大肠杆菌上的甘露糖连接位点结合所致[7]。本次实验细菌培养标本中分离所得细菌主要为大肠杆菌，这与以往大部分文献报道尿路感染培养结果基本一致，其次为粪场球菌、金黄色葡萄球菌。且近期亦有

表 3 SOD 蛋白在前列腺、附睾、睾丸的平均阳性细胞数/每高倍视野（×400）

时间点	前列腺		附睾		睾丸	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
d_1	7.94 ± 1.49	8.36 ± 1.44	4.67 ± 1.30	5.46 ± 0.96	10.95 ± 1.15	11.43 ± 1.63
d_2	9.24 ± 1.65	10.08 ± 1.74	6.13 ± 0.79	5.79 ± 1.03	11.81 ± 1.05	12.42 ± 1.29
d_4	9.18 ± 0.62	9.17 ± 1.36	6.35 ± 0.87	6.53 ± 1.17	11.41 ± 0.93	12.01 ± 1.04
d_8	8.66 ± 0.89	8.70 ± 1.03	5.96 ± 0.79	6.18 ± 1.26	11.36 ± 1.29	12.19 ± 1.33
d_{16}	9.01 ± 0.86	9.40 ± 1.16	5.91 ± 0.89	5.71 ± 0.94	10.73 ± 1.63	11.59 ± 1.90

注：同一时间点实验组与对照组比较及不同时间点实验组之间比较 P 值均大于 0.05

实验结果显示革兰阳性菌能降低精子密度、精子活动率、ab 级精子[8]。因此细菌感染可通过上述多种途径导致精子运动能力减弱，各项参数受到抑制；同时激活免疫细胞产生更多的炎症介质。

3.2 IL-1、TNF-α 对生殖细胞的破坏作用

IL-1、TNF-α 等炎症介质主要是单核巨噬细胞等产生的细胞因子，是睾丸内各种不同细胞繁杂的局部调节和信号传导的重要因素。近期研究 IL-1 能改变血睾屏障的固有防御功能，增大细菌或氧自由基等有害物质进出睾丸的机会[9]。TNF-α 的增多可能主要表现在以下方面[10,11]：①拮抗由 FSH 调控的体外培养的 Sertoil 细胞功能导致睾丸内雄/雌激素比例改变影响生精功能。②TNF-α 对人精子线粒体功能有影响，能干扰精子能量代谢，降低精子活动能力；还有可能通过线粒体凋亡途径，促进精子凋亡，导致不育。③TNF-α 还可减少正常精液中亚硝酸盐的含量，影响一氧化氮（Nitric oxide，NO）合成，而内源性 NO 对精子运动是必需的。本次实验结果提示 SCI 患者睾丸内生精细胞及精子细胞中 IL-1、TNF-α 的含量明显提高，并且从术后第 1 天到第 16 天始终处于高水平状态，第 4 天表达最高。可以推断脊髓损伤后生殖细胞炎性反应强烈，持续时间长，推断这种异常的炎性反应可能与 SCI 后盆腔器官受神经支配功能障碍或细菌感染相关。以上途径均能加深对生殖细胞的损害，造成精子活力下降，抑制精子的顶体反应和精卵融合等，减少成功受孕的机率。此外，IL-1 和 TNF-α 还可能共同激发人精子产生更多活性氧。

3.3 SOD 蛋白对生殖细胞的保护作用

活性氧（Reactive oxygen species，ROS）是生物体内一类活性含氧化合物的总称。正常情况下维持较低水平，在抗菌、消炎和抑制肿瘤等方面具有重要意义。由于精子膜脂质富含不饱和脂肪酸，细胞内几乎没有细胞质，抗氧化条件较差，在高反应能力的活性氧作用下，精子可能损伤，导致精子膜过氧化、引起碱基突变、DNA 链的断裂和蛋白质的损伤[12]。SCI 引起的泌尿生殖系感染可以使组织及精液中的白细胞激活。研究表明精液白细胞，特别是多形核白细胞和巨噬细胞受刺激后发生“呼吸爆发”，释放比未激活白细胞多 100 倍的 ROS[13-15]。如前述，维持精子结构和功能的前列腺及附睾明显受到细菌感染，这可能预示在精子的储存与运输中会产生大量的 ROS，从而加深对精子的破坏。SOD 作为重要的氧自由基清除剂，有维持精子质膜正常形态和功能的作用，本实验结果显示 SCI 后大鼠生殖系 SOD 蛋白的表达与对照组相比均无明显增强，免疫组织化学染色基本呈阴性，提示大鼠生殖系在应激状态下可能自身抗氧化能力不足，氧化与抗氧化系统平衡被打破引起细胞损伤，导致生精功能障碍。亦有研究提示早期氧化应激是后期睾丸生精细胞凋亡的重要因素[4]。

上述研究结果提示，SCI 后不育的发生机制可能与泌尿生殖器细菌感染，炎症介质的活性增强和抗氧化能力低下有关。

参 考 文 献

[1] Alabama B.Spinal cord injury:Facts and figures at a glance[J].Spinal Cord Med,2007,30:301-302.

[2] Monga M,Dunn K,Rajasekaran M.Characterization of ultrastructural and metabolic abnormalities in semen from men with spinal cord injury[J].Spinal Cord Med,2001,24(1):41-46.

[3] Momen M N,Fahmy I,Amer M,et al.Semen parameters in men with spinal cord injury:changes and aetiology[J].Asian Androl,2007,9(5):684-689.

[4] 魏 勇，张孝斌.脊髓损伤对大鼠睾丸生精细胞 iNOS、Bcl-2 基因表达的影响[J].中华男科学杂志，2003，9(1)：43-46.

[5] Trabulsi E J,Shupp-Byrne D,Sedor J,et al.Leukocyte subtypes in electroejaculates of spinal cord injured men[J].Arch phys Med Rehabil,2002,83(1):31-34.

[6] Terry T,Jeffrey J.Oxidative stess:a cammon facter in testicular dysfunction[J].Journal of anddrology,2008,29(5):488-493.

[7] Frayne J,Taylor A,Cameron G,et al.Structure of insoluble rat sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) via heterotetramer formation with escherichia coli GAPDH reveals target for contraceptive design[J].J Biol Chem,2009,284(34):22703-22712.

[8] 宋士伟，李克秋.精液微生物感染对精子质量的影响及其检测意义[J].中国医学检验杂志，2007，8(6)：396-398.

[9] Sarkar O,Premendu P,Mathur C,et al.Interleukin 1 Alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat[J].Biology of Reproduction,2008,73(3):445-454.

[10] 郭贤坤，边 疆，杜 丹，等.rhTNF-a 在体外对人正常精子线粒体和质膜的影响[J].生殖与避孕，2005，25(2)：78-81.

[11] Lewis S E,Donnelly E T,Sterling E S,et al.Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa:evIdence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility[J].Mol Hum Reprod,1996,2(11):873-878.

[12] Agarwal A,Prabakaran S A.Mechanism,measurement,and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology[J].Indian J Exp Biol,2005,43(11):963-974.

[13] Isidorl A,Latini M.Treatment of male infertility[J].Contraception,2005,72(4):314-317.

[14] Dokmec D.Oxidative stess,male infertility and the role of canitines [J].Folia Med plovdiv,2005,47(1):26-30.

[15] Sheweita S A,Tilmisany A M,A1-Sawaf H.Mechanisms of male infertility:role of antioxidants[J].Curr Drug Metab,2005,6(5):495-501.

（责任编辑：冉明会）