维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0911-04

银杏黄酮对环磷酰胺所致睾丸毒性的保护作用的实验研究

李禄生,李旭良,魏光辉,林 涛,何大维,刘俊宏,代江涛

(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:在先期研究已证实环磷酰胺(Cyclophosphamide,CP)代谢产物丙烯醛(Acrolein, ACR)的氧化应激作用损伤支持细胞是 CP 所致睾丸损伤的原因之一的基础上探讨具有抗氧化作用的银杏黄酮对其损伤的保护作用。方法:以原代培养的新生 Wistar 大鼠支持细胞为模型,实验组分为 1)添加银杏黄酮孵育细胞 12h 后加入 ACR 组;2)银杏黄酮、ACR 同时加入组;3)银杏黄酮和 ACR 孵育 12h 后再加入细胞组。对照组分为添加维生素 E 孵育细胞 12h 后分别加入 ACR 组,仅添加 ACR 的阴性对照组及不添加任何处理因素的阳性对照组。各组 3h 后用 MTT 法测定细胞活性,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度;硫代巴比妥法和 Fenton 法检测细胞丙二醛(MDA)、羟自由基($OH^{\cdot}$)含量,三价铁还原法、黄嘌呤氧化酶法和 NADPH 还原法测定细胞总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽还原酶(GR)活性。结果:银杏黄酮与 ACR 同时加入细胞组和银杏黄酮与 ACR 孵育 12h 后同时加入组较阴性对照组各测量参数无显著性差异($P>0.05$)。而提前添加银杏黄酮组较阴性对照组各参数均有显著性差异:1) 细胞活力较阴性对照组显著升高 ($P<0.05$);2) MDA 和 T-ACO 含量较阴性对照组明显降低 ($P<0.05$);3) T-AOC、SOD 和 GR 活性较阴性对照组明显升高 ($P<0.05$)。且银杏黄酮上述抗氧化作用明显强于 Vit E 组($P<0.05$)结论:CP 代谢产物 ACR 在对未成熟睾丸支持细胞产生氧化应激损害时,银杏黄酮可以提高支持细胞的抗氧化酶活性,清除氧自由基,对支持细胞具有明显的保护作用。为进一步探讨 CP 致睾丸损伤的防护措施奠定了基础。

【关键词】未成熟睾丸;支持细胞;银杏黄酮;丙烯醛;氧化应激

【中国图书分类法分类号】R726.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-02

The protective effect of ginkgetin in impairment to testicular toxicity by cyclophosphamide

LI Lusheng,et al

(*Department of Pediatric Urology,the Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the protective effect of ginkgetin from oxidative stress on immature testis induced by cyclophosphamide (CP) metabolite acrolein (ACR) in vitro. *Methods*:The sertoli cells were isolated from 7-days old SD rats' testes,culture and passage to F2 generations. Experiment groups were divided into: 1)Ginkgetin incubated for 12 hours and then treat with ACR 2) Ginkgetin and ACR add to cells at the same time 3) Ginkgetin and ACR were incubated for 12 hours,then add to cells. Control group include: 1) Vitamin E were incubated cells for 12 hours, then add ACR respectively 2) Added ACR only as the negative control group 3) Not add any factors as the positive control group. 3 h later the viability of sertoli cell were determined by MTT. Protein concentration was determinate by Coomassie Brilliant Blue. Malondialdehyde (MDA),hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$),total antioxidant capacity(T-ACO),Superoxide dismutase(SOD) and glutathione reductase (GR) activity were tested. *Results*:1) Ginkgetin(add before ACR) can significantly raise the viability of the cells($P<0.05$). 2) Ginkgetin can degrade MDA and $OH^{\cdot}$ of cells that treated by acrolein significantly($P<0.05$). 3) Ginkgetin raised Total antioxidant,GR and SOD activity of sertoli cells treated by acrolein significantly($P<0.05$). *Conclusion*:Ginkgetin can protect sertoli cells of immature testes from ACR oxidative injury in vitro.

【Key words】 Immature testicle;Sertoli cell;Cyclophosphamide;Acrolein;Oxidation stress

环磷酰胺(Cyclophosphamide,CP)可致睾丸损伤已逐渐得到公认,已经证实使用 CP 的儿童青少年成年后将出现不同程度的生精功能障碍,因此,寻找切实有效的防护措施已成为研究的热点。丙烯醛(Acrolein,ACR)是 CP 的主要毒性副产物[1],本研

作者介绍:李禄生(1977-)男,博士生,主要研究方向:小儿外科疾病。

基金项目:重庆市卫生局重点科研项目(编号:渝卫科教 200146)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

究小组前期实验已经证实 ACR 对体外培养的未成熟睾丸支持细胞具有明确的氧化应激损伤。银杏叶的主要活性成分银杏黄酮具有抗氧化清除自由基的作用，故本研究以大鼠未成熟睾丸支持细胞为模型，探讨银杏黄酮对 CP 所致未成熟睾丸损伤有无保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

特级胎牛血清、DMEM/F12 液体培养基和无血清培养基均购自美国 Hyclone 公司，Vit E、ACR(分析纯)、MTT 和无菌二甲基亚枫购自美国 Sigma 公司，考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、MDA 试剂盒、羟自由基试剂盒、总抗氧化试剂盒、SOD 试剂盒及 GR 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。银杏黄酮标准品由北京绿色金可生物有限公司惠赠。

1.2 细胞的处理与分组

Sertoli 细胞稳定传代至 F2 后，改用加或不加银杏黄酮的无血清培养基，培养 12h 后换液，ACR 浓度根据前期实验确定 3h 的 CD50 为 100μmol/L，银杏黄酮采用文献报道的体外有效活性浓度 160μg/ml[2]，实验组分为：A 组：添加银杏黄酮孵育细胞 12h 后加入 ACR 组；B 组：银杏黄酮、ACR 同时加入组；C 组：银杏黄酮和 ACR 孵育 12h 后再加入细胞组。对照组为：D：仅添加 ACR 的阴性对照组；E 组：添加维生素 E 孵育细胞 12h 后分别加入 ACR 组；F 组：不添加任何处理因素的阳性对照组。各组细胞处理后继续密闭培养 3h 后终止培养，收集细胞进行下一步实验。

1.3 MTT 法检测细胞活性

设置培养基、MTT、二甲基亚砜调零孔，培养基、MTT、二甲基亚砜对照孔，各组设 8 个复空，测各孔的吸光度值(OD 值)。计算平均细胞活力 (%)= 实验组平均 OD/ 对照组平均 OD。

1.4 丙二醛(MDA)和羟自由基(OH^-)测定

MDA 测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法，操作步骤按 MDA 测定试剂盒说明进行，细胞裂解(蒸馏水反复冻融裂解法)离心后上清液吸光度值(OD)，同时采用考马斯亮蓝法测定的蛋白浓度，计算细胞内 MDA 含量。OH^-测定采用 Fenton 反应，实验步骤按说明书进行。

1.5 T-AOC、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽还原酶 (GR)活性的检测

离心细胞弃上清，生理盐水重悬至 10^7/ml，冻融三次裂解细胞，考马斯亮蓝法测定蛋白浓度，采用黄嘌呤氧化酶法和 NADPH 还原法测定细胞总抗氧化能力、超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽还原酶(GR)具体步骤按照试剂盒说明书操作进行。

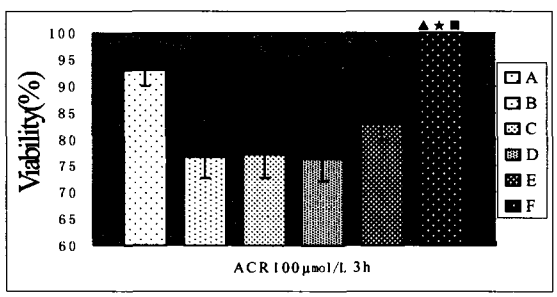
1.6 统计分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，SPSS12.0 软件分析，建立数据库，组间采用 One-Way ANOVA 分析，在同一剂量同一时期时分别两两比较 T 检验，检验水准 P=0.05。

2 结 果

2.1 MTT 法检测细胞活力

各组细胞活力检测结果见图 1，银杏黄酮和 ACR 同时添加组、银杏黄酮与 ACR 共孵育后加入细胞组与阴性对照组比较无显著差异(P>0.05)。预加银杏黄酮和 Vit E 组细胞活性均较阴性对照组显著升高(P<0.05)，但银杏黄酮的作用明显强于 Vit E (P<0.05)。



注：▲预加银杏黄酮(A)和较阴性对照组(D)细胞的活性显著升高(P<0.05)，与阳性对照无显著性差异(P>0.05)，而银杏黄酮作用强于 Vit E(E)(P<0.05)。★B 与 C 组较阴性对照(D)均无显著性差异(P>0.05)，与阳性对照(F)有显著性差异；■E 组与阴性对照(D)阳性对照(F)相比均有显著性差异(P>0.05)

图 1 银杏黄酮对接触 ACR 的支持细胞活性的改变及统计分析

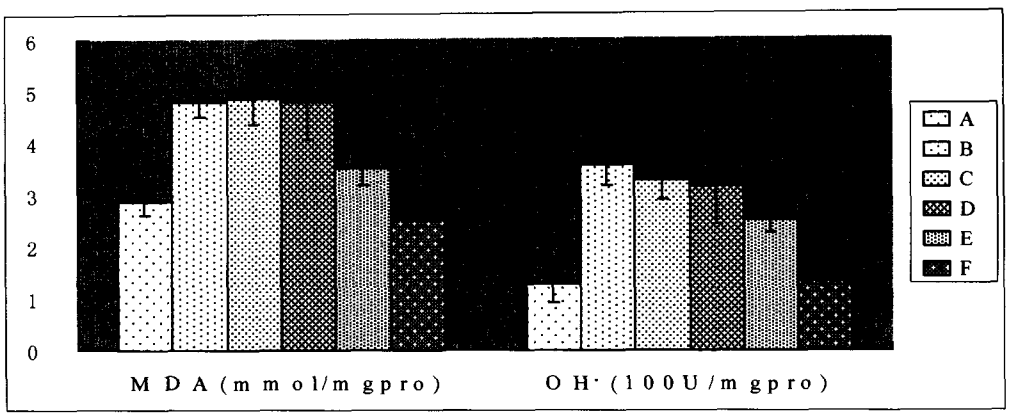
2.2 MDA 和 OH^-

预加银杏黄酮组较阴性对照组细胞内 MDA 和 OH^-的含量显著降低 (P<0.05)，而银杏黄酮作用较 Vit E 作用更明显(P<0.05)。同时添加 ACR 与银杏黄酮组和 ACR 与银杏黄酮共孵育后加入细胞组较阴性对照组均无显著差异(P>0.05)(图 2)。

2.3 T-AOC、SOD 和 GR 活性

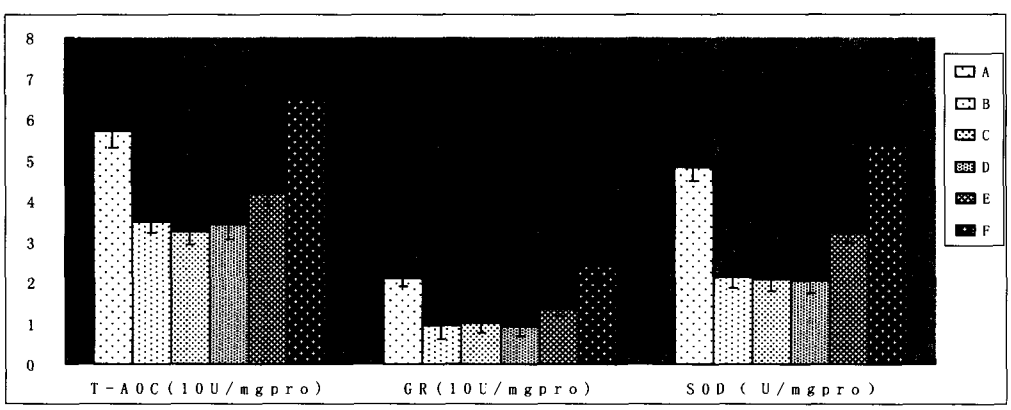
预加银杏黄酮组组细胞 T-AOC、SOD 和 GR 活性均较阴性对照组显著升高(P<0.05)，银杏黄酮作用较 Vit E 作用更明显(P<0.05)，同时添加 ACR 与银杏黄酮组和 ACR 与银杏黄酮共孵育后加入组较阴性对照组上述指标均无显著差异(P>0.05)(图 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



注:▲预加银杏黄酮(A)和较阴性对照组(D)细胞的 MDA 和 OH·显著升高($P<0.05$),与阳性对照无显著性差异($P>0.05$),而银杏黄酮作用强于 VitE (E)($P<0.05$)。★B 与 C 组较阴性对照(D)两项指标均无显著性差异($P>0.05$),与阳性对照(F)有显著性差异;■E 组与阴性对照(D)阳性对照(F)相比均有显著性差异($P>0.05$)

图 2 银杏黄酮对接触 ACR 的支持细胞的氧化应激反应标志物影响



注:▲预加银杏黄酮(A)和较阴性对照组(D)细胞的 T-AOC、GR 和 SOD 活性均显著升高($P<0.05$),与阳性对照无显著性差异($P>0.05$),而银杏黄酮作用强于 VitE (E)($P<0.05$)。★B 与 C 组较阴性对照(D)均无显著性差异($P>0.05$),与阳性对照(F)有显著性差异;■E 组与阴性对照(D)阳性对照(F)相比均有显著性差异($P>0.05$)

图 3 银杏黄酮对接触 ACR 的支持细胞的抗氧化能力影响

3 讨 论

虽已有临床和动物实验研究证实 CP 对男性生精功能具有明确的损伤作用[3],对儿童睾丸的损伤还将严重影响到成年后的生育功能及生活质量,因其对儿童期各类恶性肿瘤如白血病、骨髓移植前化疗及儿童自身免疫性疾病如肾病综合症等有显著的疗效,故至今仍广泛应用。因此进一步探讨 CP 对未成熟睾丸损伤的机理特别是防护就更显重要。

有研究提示,睾丸组织内氧化—抗氧化平衡破坏,自由基及其氧化产物造成组织损伤可能是 CP 导致生精功能障碍的主要原因之一[4,5]。毒性基因组和蛋白质组研究也证实,CP 可导致睾丸组织抗氧化酶 GST 的 mRNA 表达显著降低[6],同时 GST 蛋白质表达也较正常对照组明显降低[7]。Selvakumar 等[8,9]研究还发现,CP 可导致大鼠睾丸脂质过氧化水平升高,羟基化产物堆积,酶依赖性抗氧化能力和非酶依赖性抗氧化能力降低。这些研究均提示氧化应激损伤是 CP 所至睾丸毒性的主要机理之一。但是,它们仅证实其氧化应激损伤是 CP 所有代谢产物综合作用的结果,因此确定哪一种代谢产物所致的氧化应激损伤及寻找有效的防护物的相关研究尤为重要。

ACR 是 CP 在体内的主要毒性副产物(占所有毒性代谢产物 75%以上),研究证实是 CP 对肝脏、心脏、肾脏等器官的主要毒性因子[1]。ACR 具有较强的

维普资讯 http://www.cqvip.com

氧化活性,可与蛋白质巯基基团结合,攻击各种细胞膜引起膜脂类的过氧化分解,产生氧化应激损伤,导致细胞凋亡或坏死[10]。我们前期实验(未发表)已经证实,ACR 对体外培养的未成熟睾丸支持细胞具有明确的氧化应激损伤,可以导致细胞抗氧化能力下降,氧自由基堆积,从而降低细胞活性,这可能是 CP 对未成熟睾丸损伤的主要机理之一。

研究证实银杏叶中的有效成分—银杏黄酮具有良好的抗氧化清除自由基的作用,可以通过直接捕捉和清除超氧阴离子和过氧化氢等自由基,通过阻断或终止自由基连锁反应链,从而阻止或抑制氧自由基反应和脂质过氧化反应,抑制脂质过氧化物(LPO)及其代谢产物丙二醛(MDA)和共轭二烯等毒性物质的生成[11]。因此,采用具有抗氧化作用的银杏黄酮对抗具有氧化应激损伤的 CP 代谢产物 ACR,有可能使未成熟睾丸在 CP 化疗时受到保护。本研究为避免血清中蛋白质干扰,添加干预因素后均采用无血清培养基。MTT 法检测细胞活性结果显示,银杏黄酮和 ACR 同时添加组、银杏黄酮与 ACR 共孵育后加入细胞组与阴性对照组比较无显著差异($P>0.05$)。但是预加银杏黄酮和 Vit E 组细胞活性均较阴性对照组显著升高($P<0.05$),同时银杏黄酮的作用明显强于 Vit E($P<0.05$)。提示预先加入的银杏黄酮可以使支持细胞明显减轻 ACR 的氧化应激损伤。且其保护作用还明显优于目前的常用抗氧化剂 Vit E。证明银杏黄酮在体外可能具有对抗 ACR 毒性损伤的作用。

氧化应激反应大多通过破坏细胞自身氧化/抗氧化平衡机制,导致细胞内氧自由基的堆积,从而损伤细胞。男性生殖系统组织代谢活跃,氧化应激反应强烈,而且在交配过程中精子要穿越高浓度的氧环境。所以,抗氧化保护机制对保持活跃的生殖功能尤为重要。SOD 和 GR 是主要的清除生殖道有害氧化物的酶系统,构成了睾丸内主要的抗氧化系统,分别代表了总抗氧化能力中的非特异性和特异性抗氧化机制[12]。本研究结果显示,预加银杏黄酮组与阴性对照组比较,其细胞总抗氧化能力、SOD 活性和 GR 活性均显著提高,氧化应激反应标志物 MDA 和 OH^- 含量均显著降低,证实银杏黄酮可以增加细胞抗氧化能力,对抗 ACR 的氧化应激反应,清除氧自由基,从而减少支持细胞损伤,且其作用较 Vit E 更为显著。同时本试验中还发现银杏黄酮和 ACR 同时添加组、银杏黄酮与 ACR 共孵育后加入细胞无明显保护作用,进一步证实其保护机理并非银杏黄酮直接与 ACR 发生反应而降低毒性,而主要是通过改变细胞内的抗氧化活性,增强细胞自身抗氧化能力而发挥保护作用。

综上所述,应用 CP 前加入银杏黄酮可以增强未成熟睾丸支持细胞的抗氧化能力,清除氧自由基,可以明显减少其 CP 代谢产物 ACR 所致的氧化应激损伤。而且其保护作用明显强于目前常用抗氧化剂 Vit E,本研究为银杏黄酮应用于临床 CP 化疗睾丸毒性的防护提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] Zhang J,Tian Q,Yung C S,et al. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications[J]. Drug Metab Rev, 2005;37(4):611-703.

[2] Lim H,Son KH,Chang HW,et al. Effects of anti-inflammatory biflavonoid,ginkgetin,on chronic skin inflammation[J]. Biol Pharm Bull,2006;29(5):1046-1049.

[3] De Jonge ME,Huitema AD,Rodenhuis S,et al. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide[J]. Clin Pharmacokinet,2005;44 (11):1135-1164.

[4] Iuchi Y,Kaneko T,Matsuki S,et al. Carbonyl stress and detoxification ability in the male genital tract and testis of rats. Histochem[J]. Cell Biol,2004;121(2):123-130.

[5] Maiorino M,Ursini F. Oxidative stress,spermatogenesis and fertility[J]. Biol Chem,2002;383(3-4):591-597.

[6] Fukushima T,Yamamoto T,Kikkawa R,et al. Effects of male reproductive toxicants on gene expression in rat testes[J]. J Toxicol Sci, 2005;30(3):195-206.

[7] Yamamoto T,Fukushima T,Kikkawa R,et al. Protein expression analysis of rat testes induced testicular toxicity with several reproductive toxicants[J]. J Toxicol Sci,2005;30(2):111-126.

[8] Selvakumar E,Prahalathan C,Sudharsan PT,et al. Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity [J]. Clin Chim Acta,2006;367(1-2):114-119.

[9] Selvakumar E,Prahalathan C,Sudharsan PT,et al. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm[J]. Toxicology,2006;217(1):71-78.

[10] Kehrer JP,Biswal SS. The molecular effects of acrolein [J]. Toxicol Sci,2000;57(1):6-15.

[11] 张晓丹,马灵芝,邵碧霞. 银杏叶总黄酮的研究进展[J]. 中国心血管杂志,2006;(05):385-387.

[12] Sheweita SA,Tilmisany AM,Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility:role of antioxidants[J]. Curr Drug Metab,2005;6(5): 495-501.