维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0236-03

人参皂甙 Rg1 对镉诱导的大鼠睾丸损伤的保护作用

郝 杰[1],王应雄[2],何俊琳[2],刘学庆[2],刘孝云[2],陈雪梅[2],黎 刚[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院科研处;2.重庆医科大学公共卫生学院,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨人参皂甙 Rg1 对镉诱导的大鼠睾丸损伤的保护作用及作用机制。方法:30 只雄性 wistar 大鼠随机分为对照组、氯化镉组和 Rg1 + 氯化镉组。氯化镉组大鼠按 0.5mg/(kg·d)氯化镉腹腔染毒,Rg1+ 氯化镉组大鼠在 0.5mg/(kg·d)氯化镉腹腔染毒 2h 前进行按 100mg/(kg·d) Rg1 灌胃处理,连续 14 天后将动物处死,分离附睾,测定精子数量和质量。分离睾丸,测定金属硫蛋白(MT)含量,TUNEL 法检测睾丸切片凋亡情况。结果:氯化镉引起附睾中精子数量减少,质量降低,金属硫蛋白表达增加,睾丸中精细胞凋亡指数增加,而 Rg1 可以改善附睾中精子质量和数量,减少精细胞凋亡指数,并进一步上调金属硫蛋白表达。结论:人参皂甙 Rg1 对镉诱导的大鼠睾丸损伤具有保护作用,机制可能与上调金属硫蛋白表达有关。

【关键词】人参皂甙 Rg1;镉;睾丸损伤;金属硫蛋白

【中国图书分类法分类号】Q492 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-12

Ginsenoside Rg1 protect against Cadmium-induced tesicular damage in rat

HAO Jie, et al

(*Scientific Research Division, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effect and the possible mechanism of Rg1 on Cadmium-induced tesicular damage in rat. *Methods*: 30 wistar rats were divided into 3 groups: the control group, the Cd group and the Cd+Rg1 group. The Cd group rats injected intraperitoneally with 0.5 mg/(kg·d) cadmium for 14 days. The rats in the Cd+Rg1 group were pretreated with 75mg/ (kg·d) Rg1 by intragastric administration before injected intraperitoneally with 0.5 mg/ (kg·d) cadmium. All animals were killed after 14 days, the sperm count, the movable sperm percentage and the abnormal sperm rate in epididymis were analyzed. The content of MT in testis were detected and the apoptosis of testis genital cells were assessed by TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) technique. *Results*: 14 days after exposed to Cd caused a significant decrease in the sperm count and the movable sperm percentage. On the other hand, the abnormal sperm rate, the content of MT and the apoptosis percent of genital cells in testis were increased significantly. In the Cd+Rg1 group, the sperm count, the movable sperm percentage and the content of MT were higher than that of Cd group, while the abnormal sperm rate and the apoptosis percent of genital cells in testis were significantly lower than that of Cd group. *Conclusion*: Rg1 have protective effect on on tesicular damage induced hy Cd possihly through upregulating the expression of MT in testis.

【Key words】Ginsenoside Rg1; Cadmium; Tesicular damage; Metallothionein (MT)

人参皂甙含有各种单体,为研究各种单体间作用的差异,运用基因表达系列分析 (Serial analysis of gene expression, SAGE)技术,研究了人参皂甙单体 Rg1 与 Rb1 对老年大鼠睾丸细胞基因表达的影响,根据 SAGE 表达谱,发现 Rg1 显示出较强的上调金属硫蛋白表达的作用。

镉(Cadmium, Cd)在工业生产被广泛运用,如电池、电镀、染料、塑料、合金生产等。它对机体的毒性作用表现在多个方面,毒性作用机制非常复杂。Cd 对人类生殖系统具有潜在危害,雄性生殖系统是 Cd 作用的重要部位,睾丸对 Cd 特别敏感[1]。睾丸、附睾、前列腺等器官中普遍有金属硫蛋白(Metallothionein, MT)的表达,MT 的生理学功能广泛,主要参与微量元素的贮存、运输和代谢,具有拮抗电离辐射,清除自由基,重金属解毒等功能。由于 Rg1 能够上调睾丸 MT 表达,是否对镉中毒导致睾丸毒性具有保护作用,为此,本文将对此进行研究。

作者介绍:郝 杰(1975-),女,硕士,
主要研究方向:生殖功能。

基金项目:国家自然科学基金资助(30300422)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年雄性 wistar 大鼠 30 只，体重 250~300g，购于重庆医科大学动物中心；$CdCl_2$ 购于 Sigma；人参皂甙 Rg1 为中国药品生物制品检定所产品；TUNEL 试剂盒购于深圳晶美。

1.2 动物模型制备

将 30 只大鼠随机分为对照组、Cd 组、Rb1 + Cd 组。Cd 染毒组大鼠腹腔注射用生理盐水配制的 $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 溶液（按镉计 0.5mg/kg），每天 1 次，连续 14 天。Rb1+Cd 组大鼠腹腔注射 $CdCl_2 \cdot 2.5\ H_2O$ 溶液前 2h，灌胃 Rg1 75mg/(kg·d)，对照组大鼠腹腔注射等量的生理盐水，连续 14 天。14 天后将动物处死，分离大鼠睾丸、附睾。

1.3 精子数、活动精子率测定

取左侧附睾剪碎，放入盛有 5ml PBS 的试管中，37℃水浴中 10~15min，使精子充分游离，取 1 滴滴入血细胞计数板上计数。另取 1 滴涂片，观察 500 个精子，计数有活动力及没有活动力的精子数。精子活动率 = 活动精子数 /（活动精子数 + 不活动精子数）× 100%。

1.4 精子畸形率的测定

取上述细胞悬液涂片、晾干，甲醇固定 5min，1%伊红染色 10min，晾干后高倍镜检计数 500 个完整精子，记录畸形精子数，并计算出畸形精子率。畸形精子率 = 畸形精子数 /（畸形精子数 + 正常形态精子数）× 100%。

1.5 Cd- 血红蛋白饱和法测定睾丸 MT 含量

取大鼠睾丸，剥离被膜，将睾丸实质称重，剪碎。按 1:8 (w/v)的比例向睾丸中加入 Tris-HCl(pH8.6)缓冲液，4℃下制成匀浆。并于 4℃，15000g 高速离心 1h。取上清 200μl，加入 20μg/ml 的 $CdCl_2$ 溶液 200μl 及 Tris-HCl 缓冲液 1.5ml。室温放置 15min 后加入 200μl 牛血红蛋白。沸水浴 3min，12000r/min 离心 10min，吸出全部上清，重复加 200μl 牛血红蛋白以后的步骤 2 次。收集上清，应用原子吸收分光光度法测定上清中与 MT 结合的镉含量，换算成睾丸组织 MT 的含量(μg/g)。

1.6 原位细胞凋亡检测(TUNEL)

5μm 厚石蜡切片，粘于多聚赖氨酸预处理的载玻片上，60℃烤干 4h 备用。按照原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。石蜡切片脱蜡，3%H_2O_2 室温 10min；蛋白酶 K37℃消化 10min，加 TdT 和 DIG-dUTP 标记液 37℃标记 2h，PBS（pH 7.5）漂洗；滴加封闭液，室温 30min；加生物素化抗地高辛抗体，37℃孵育 30min，PBS 漂洗；滴加 SABC，37℃孵育 30min，PBS 漂洗；DAB 显色 10min，苏木精复染，脱水、透明、封片。阴性对照用 PBS 代替标记液，余步骤同上。光镜下观察结果，细胞核着色呈棕黄色为阳性。计数 1000 个精细胞中的阳性细胞数，计算生精细胞凋亡指数（apoptotic index，AI）。

1.7 统计学处理

采用 SPSS for windows11.0 统计软件进行数据处理分析，各组指标的检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 q 检验，$P < 0.05$ 视为差异有统计学显著性意义。

2 结 果

2.1 精子数量、活动精子率及精子畸形率分析

染 Cd 精子数和精子活动率均低于对照组（$P<0.01$），精子畸形率高于对照组（$P<0.01$），而 Rb1+Cd 组精子数量、活动精子率和精子畸形率与对照组差异不明显，与染 Cd 相比，精子数量和质量均明显提高（$P<0.01$）（表 1）。

2.2 大鼠睾丸中 MT 含量

Cd 染毒后，大鼠睾丸 MT 含量的影响增加，高于对照组（$P<0.01$），而 Rb1+Cd 处理组大鼠睾丸 MT 含量进一步上调（表 2）。

2.3 睾丸精细胞凋亡情况分析

TUNEL 结果显示，连续 14 天染 Cd 导致大鼠睾

表 1 精子密度不同组别精子数量、活动精子率和精子畸形率情况($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	精子密度(×10⁶/ml)	精子活动率(%)	畸形精子率(%)
对照组	9.40 ± 1.46	79.59 ± 12.12	9.21 ± 1.20
镉组	4.07 ± 0.79*	49.38 ± 7.96*	23.12 ± 1.63*
镉 +Rg1 组	8.7 ± 1.79*	65.5 ± 10.45*	11.5 ± 2.6*

*: $P<0.01$, *vs* 对照组；*: $P<0.01$, *vs* 镉组

表 2 不同组别睾丸 MT 含量($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	MT(μg/g)
对照组	45.8 ± 8.2
镉组	85.4 ± 10.3*
镉 +Rg1 组	127.3 ± 13.5#*

*: $P<0.01$, *vs* 对照组；*: $P<0.01$, *vs* 镉组

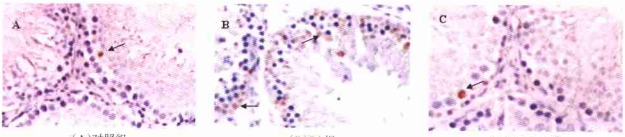
表 3 TUNEL 法分析 Cd 与 Rg1 对睾丸精细胞凋亡的影响

组别	二周亡指数
对照组	1.3 ± 0.08
镉组	29.3 ± 3.6*
镉 +Rg1 组	1.74 ± 0.12#*

*: $P<0.01$, *vs* 对照组；*: $P<0.01$, *vs* 镉组

维普资讯 http://www.cqvip.com

丸精细胞凋亡明显增加，凋亡指数 AI 相应增加（$P<0.01$），而预先灌胃 100mg/kg Rg1 可有效防止染 Cd 导致大鼠睾丸精细胞凋亡指数 AI 增加（表 3，图 1）



（A）对照组　（B）Cd 组　（C）Cd+Rg1 组

图 1　in situ TUNEL 分析睾丸精细胞凋亡

3　讨　论

镉是一种毒性金属，可以引起肝、肾、生殖系统的氧化压力和组织的退行性改变。一些物质，如 VitC、VitE 可以对抗 Cd 引起的氧化压力，减少对睾丸精细胞的损害，其作用的机制可能是通过加快清除活性氧[2,3]。

人参皂甙二醇型和人参皂甙三醇型在人参皂甙中占大多数，其代表单体分别为 Rb1 与 Rg1[4]。Rb1 与 Rg1 处理对睾丸细胞 SAGE 表达谱揭示二者对生殖系统活性各异，差异基因涉及精细胞分化、发育、睾丸激素合成、能量代谢等诸多方面（另文发表），其中 Rg1 表现出较强的上调睾丸 MT 表达的活性。

MT 是一种低分子量的金属结合蛋白，含有大量的半胱氨酸。MT 富含巯基的特殊结构，使其抗氧化损伤的作用成为近年来研究的一个热点[5]。机体低水平 MT 表达对 Cd 损伤的敏感性升高[6]。MT 在睾丸中的表达高于其它的镉作用靶器官，如肝脏、肾脏[7]。由于睾丸中 MT 的存在，一定量的镉又能诱导 MT 的生物合成，因此镉的雄性生殖毒性机制与 MT 存在有必然的联系，MT 在 Cd 导致的睾丸毒性中是一种重要的保护性的抗氧化蛋白。

实验结果显示，Cd 可以引起精子数量和活力降低，畸形精子数量增加，睾丸中精细胞凋亡指数增加，其机理与 Cd 引起的氧化损伤有关。而在灌胃 Rg1 处理后再进行腹腔染毒，与染 Cd 组比较，精子活力和数量都明显上升，而畸形精子数量减少，精细胞凋亡指数显著降低，显示出 Rg1 对 Cd 诱导的睾丸损害的保护作用。染 Cd 组睾丸中 MT 含量增加，说明 Cd 可以诱导睾丸 MT 的表达，表明机体对 Cd 的生殖毒性的具有一定的自我防御反应，但尚不足以完全对抗 Cd 的毒性作用。而 Rg1 + Cd 处理组中，睾丸中 MT 含量进一步上调。由于 MT 是机体对抗 Cd 导致的睾丸毒性的抗氧化蛋白，而 Rg1 可以上调 MT 表达，提示 Rg1 保护 Cd 诱导的生殖毒性作用的机制可能是通过上调 MT 的表达。

（通讯作者：蔡　刚，男，E-mail:Lg68sn@yahoo.com.cn，Tel:023-68485778）

参 考 文 献

[1] Santos FW, Graca DL, Zemi G, et al. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice[J]. Reprod Toxicol, 2006; 22(3): 546–550.

[2] Sen Gupta R, Kim J, Gomes C, et al. Effect of ascorbic acid supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in cadmium-treated male rats[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004; 221(1–2): 57–66.

[3] Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, et al. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2006; 21(3): 235–240.

[4] 张均田. 人参皂甙 Rgl 和 Rb1 药理作用的比较[J]. 基础医学与临床 2000; 20(5): 4–5.

[5] Xu LC, Sun H, Wang SY, et al. The roles of metallothionein on cadmium-induced testes damages in Sprague Dawley rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2005; 20(1): 83–87.

[6] Waisberg M, Joseph P, Hale B, et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis[J]. Toxicol, 2003; 192(2–3): 95–117.

[7] Cyr DG, Dufresne J, Pillet S, et al. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis[J]. J Androl, 2001; 22(1): 124–135.