

• 基础研究 •

巴戟天水提物对人精子运动功能氧化损伤的保护作用

颜志中, 杨欣, 张永华, 丁彩飞, 杜静

[摘要] 目的 观察巴戟天水提物对人精子运动功能氧化损伤的保护作用。方法 采用体外培养精子模型,应用次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶(HX XO)体系产生活性氧,在有氧环境下,将活性氧和不同剂量的巴戟天水提物与精子悬液共同孵育后,检测精子运动参数,应用精子毛细管穿透试验评估精子运动功能,并与已知的抗氧化剂 Vit C 对照。结果 在活性氧作用下,精子的功能受损,运动功能和穿透能力明显下降,与正常精子相比有非常高度显著性差异($P < 0.001$);巴戟天水提物大、中、小剂量组在相同条件下均可明显改善精子的运动功能和穿透能力,与 Vit C 相比较,0.25 和 0.5 g/ml 巴戟天水提物的作用更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$),尤其对前向运动率和活力指数的改善最明显。结论 活性氧可导致精子运动功能和穿透能力的损伤,适宜剂量的巴戟天水提物对活性氧所致人精子过氧化损伤具有明显干预作用,对精子运动功能具有保护作用。

[关键词] 巴戟天;精子;氧化损伤

Protective Effect of Extract from Morindae Officinalis on the Oxidative Injury of Human Sperm Motility YAN Zhi-zhong, YANG Xin, ZHANG Yong-hua, et al. Zhejiang Province Cooperation of Chinese and Western Medicine Hospital, Hangzhou 310003, Zhejiang, China

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of extract from Morindae officinalis on the oxidative injury of human sperm motility. **Methods** The sperm specimens were cultivated in vitro, the reactive oxygen species (ROS) was made from hypoxanthine-xanthine oxidase (HX XO), and sperm specimens were co-incubated with ROS and different dosages of extract and oxygen. The motor parameters were evaluated, the motility were analyzed by the test of capillary tube penetrating, and compared with the control group. **Results** The sperm function were injured, the motility and penetrating ability decreased evidently under the action of ROS, and with a significant difference compared with the normal group ($P < 0.001$). The sperm motility and penetrating ability could be improved by all of the small, medium and massive extract compared with vitamin C, especially 0.25 and 0.5 g/ml Morindae officinalis had more evident action in the rate of progressive motility and vitality exponent. **Conclusion** The ROS can injury the sperm motility and penetrating ability, the appropriate content of extract from Morindae officinalis can significantly intervene peroxidation in sperm by the ROS, and protect the sperm motility.

Key words: Morindae officinalis; sperm; oxidative injury

[中图分类号] R321.1 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)08-0701-03

[本文著录格式] 颜志中,杨欣,张永华,等.巴戟天水提物对人精子运动功能氧化损伤的保护作用[J].中国康复理论与实践,2006,12(8):701—703.

精子的运动功能是决定男性生育能力的主要因素之一,因精子运动能力下降而造成的精子活力低下,即弱精子症,是男性不育的主要病因。据统计,弱精子症在男性不育症患者中约占 61.6%^[1]。造成精子运动能力下降的病因较多,其中活性氧类(reactive oxygen species, ROS)的作用已被关注。活性氧所介导的脂质过氧化作用可引起精子结构与功能的改变,是男性不育的一个重要病因^[2]。传统中药巴戟天(Morinda officinalis)具有补肾阳、强筋骨、祛风湿功效,是治疗男性不育症的常用药物。我们的临床观察和实验研究表明,巴戟天水提物能显著改善精子膜功能。本实验采

用体外培养精子模型,在体外有氧环境下,将活性氧、巴戟天水提物与精子共同培养,观察巴戟天水提物对活性氧所致人精子运动功能氧化损伤的干预作用,以及对精子的保护作用,为治疗弱精子症男性不育提供实验依据。维生素 C(vitamin C, Vit C)是一种水溶性活性氧高效清除剂,还具有还原剂的性质,在细胞内外起着重要的清除氧自由基、抗脂质过氧化作用,因此本实验以其为阳性对照药。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 WLJY-9000 伟力彩色精子质量检测系统;2K15C11 加热型冷冻高速台式离心机;FORMA-3111 水套式二氧化碳细胞培养箱;毛细玻璃管;精液池。

主要试剂为:Percoll 液;10×Earle's 液;1×Earle's 液;次黄嘌呤(hypoxanthine, HX);黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO);Vit C。

基金项目:杭州市科技发展计划项目(No. 2004433 Q15)

作者单位:浙江省中西医结合医院男科,浙江杭州市 310003。作者简介:颜志中(1969-),男,浙江龙游市人,主管技师,主要从事生殖医学实验研究。

90 %和 45 %Percoll 液的制备参见文献^[3]。

1.2 正常精子模型制备 选择 25 ~ 35 岁的健康、有生育能力的自愿供精者 15 名,禁欲 3 ~ 5 d,手淫留取精液于无菌容器,经计算机辅助精子分析系统常规分析,精子密度 > 60 × 10⁶/ml, a 级精子 > 25 %, a 级 + b 级精子 > 50 % (注: a 级为前向快速直线运动; b 级为前向慢速运动; c 级为非前向运动), 正常形态精子 > 60 %, WBC < 1 × 10⁶/ml。采用 Percoll 梯度离心法制备具有正常生理功能的精子作为实验模型, 具体操作如下^[3]: 在 14 ml 圆锥离心管中先加入 2 ml 90 % Percoll, 在其上层轻缓加入 2 ml 45 % Percoll, 然后在 45 % Percoll 的上层轻缓加入 2 ml 液化精液; 300 × g 离心 20 min; 吸去精液层和 45 % Percoll 层, 将 90 % Percoll 层与 4 ml 的 Earle's 液混匀, 300 × g 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用适量 Earle's 混悬, 并调整精子数为 2 × 10⁷/ml。

1.3 药物制备 巴戟天购自浙江省医药公司, 由我院制剂室制备。取巴戟天若干克加 10 倍量双蒸水浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 滤布过滤, 滤渣再加 5 倍量水同上法再处理 2 次, 各煮沸 30 min 和 15 min, 合并 3 次滤液, 用聚乙烯微孔滤管在减压下过滤, 除去煎出液中的悬浮粒子, 滤液于 70 ℃ ~ 80 ℃ 水浴中浓缩至每 1 ml 药液相当于 0.5 g 生药量, 冷藏保存备用。

1.4 方法 将精子悬液分为 6 组: I 组 (正常组), PBS 缓冲液 (pH 7.4); II 组 (模型组), HX-XO (HX 终浓度为 1 mmol/l, XO 终含量为 50 mU/ml); III 组 (阳性药对照组), Vit C (终含量为 0.25 g/l) + HX-XO (终含量同 II 组); IV、V、VI 组 (观察组), 精子悬液 + 巴戟天水提物 (终含量分别为 0.125、0.25、0.5 g/ml) + HX-XO (终含量同 II 组); 各组样本置 37 ℃, 5 % CO₂ 培养箱中孵育 1 ~ 2 h。

观察指标及方法: ①精子活动率、运动速度和活力

指数: 精子悬液孵育 30 min, 取样 5 μl 置 MACRO 精子计数盘的样本检测台, 盖上盖板, 计算机辅助精子分析系统于 20 × 倍物镜下观察; 计算精子活动率、前向精子运动率 [a 级 / (a 级 + b 级) %]、直线速度 (velocity straight line, VSL, μm/s)、平均路径速度 (velocity of average path, VAP, μm/s) 和精子活力指数。精子活力指数 (AI) = 活动率 × 速度 (v), AI 分为: 优秀 (a 级 × v)、良好 [(a 级 + b 级) × v] 和总活力 [(a 级 + b 级 + c 级) × v]。以良好级为标准进行比较; ②精子毛细管穿透试验^[4]: 精子悬液孵育 30 min, 取样 0.2 ml 置精液池, 穿透介质采用含牛血清白蛋白的精子营养液, 将注有穿透介质的毛细玻管下端垂直插入精液池中, 顶端用胶泥封闭, 37 ℃ 孵育 1 h, 在电视显微镜下观察精子在毛细玻管中的穿透高度, 并记录活动精子数。

1.5 统计学处理 结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件包进行方差齐性检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 对精子运动参数的影响 精子悬液与活性氧孵育 30 min 后, 与 I 组 (正常组) 相比, II ~ VI 组 (模型组、各观察组) 的精子活动率和前向运动率明显降低, 运动速度显著下降 ($P < 0.001$); Vit C 水溶液 (终含量 0.25 g/L) 和巴戟天水提物 (终含量分别为 0.125、0.25、0.5 g/ml) 在相同的条件下对精子的体外运动参数均具有不同程度的改善作用, 与 II 组 (模型组) 相比有非常高度显著性差异 ($P < 0.001$), 其中终含量 0.25 和 0.5 g/ml 的巴戟天水提物的作用明显优于 Vit C ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 尤其对前向运动率和活力指数的改善最明显, 已基本接近正常精子水平, 巴戟天水提物对精子运动参数的影响程度具有明显的剂量 - 效应关系 (见表 1)。

表 1 各组精子的运动参数 ($\bar{x} \pm s$, n = 15)

分组	剂量 mg/ml	活动率	前向运动率	运动速度 (μm/s)		活力指数
		(%)	(a 级 + b 级) %	VSL	VAP	(a 级 + b 级) × v
I 组		39.68 ± 2.98	21.61 ± 3.34	29.23 ± 4.41	32.86 ± 4.42	6.42 ± 1.87
II 组		17.54 ± 2.66	11.04 ± 1.91	12.28 ± 2.27	16.63 ± 2.29	1.33 ± 0.21
III 组	0.25	30.61 ± 4.53 ^a	18.84 ± 2.60 ^a	20.70 ± 2.23 ^a	24.77 ± 4.41 ^a	3.92 ± 0.79 ^a
IV 组	125	28.62 ± 2.31 ^a	14.93 ± 2.15 ^a	15.83 ± 3.68 ^a	18.61 ± 4.63 ^a	2.38 ± 0.76 ^a
V 组	250	33.11 ± 3.35 ^{a, b}	20.93 ± 2.21 ^{a, b}	19.53 ± 2.89 ^a	21.47 ± 2.66	4.08 ± 0.72 ^a
VI 组	500	34.43 ± 2.32 ^{a, c}	22.35 ± 3.85 ^{a, c}	22.30 ± 3.42 ^a	23.79 ± 4.50 ^a	5.00 ± 1.10 ^{a, c}

注: a. 与 II 组比较, $P < 0.001$; b. 与 II 组比较, $P < 0.05$; c. 与 III 组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 对精子毛细管穿透能力的影响 精子悬液与活性氧孵育 30 min 后, 各组精子的穿透能力 (穿透高度、穿透密度) 均明显下降, II ~ VI 组 (模型组、各观察组) 与 I 组 (正常组) 相比有非常高度显著性差异 ($P <$

0.001); Vit C 水溶液和巴戟天水提物均能显著改善精子的穿透能力, 与 II 组 (模型组) 比较, 有非常高度显著性差异 ($P < 0.001$); 终含量 0.25 和 0.5 g/ml 的巴戟天对精子穿透能力的影响与 Vit C 相比无显著性差异

($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 各组精子的毛细管穿透试验结果($\bar{x} \pm s, n=15$)

分组	剂量(mg/ml)	穿透高度(mm/HP)	穿透密度(个/HP)
I 组		34.67 ± 4.27	32.13 ± 6.42
II 组		6.80 ± 2.11	6.93 ± 2.15
III 组	0.25	20.67 ± 3.20 ^a	27.40 ± 4.21 ^a
IV 组	125	15.13 ± 2.61 ^a	20.93 ± 2.22 ^a
V 组	250	21.80 ± 2.40 ^a	22.87 ± 4.41 ^a
VI 组	500	22.27 ± 4.22 ^a	24.33 ± 4.29 ^a

注:a.与 II 组比较, $P < 0.001$ 。

3 讨论

在生理状态下,生物体内产生的少量活性氧对细胞生长调节、信号传递以及抗微生物防御和免疫监视等具有重要作用,但过多的活性氧则将造成人体组织细胞的病理损害和功能障碍。在生殖系统各器官组织(包括睾丸)中,活性氧的产生是一种正常的生理情况。早在 1989 年, Aitken 等首先提出少量的活性氧能以一种生理形式干预某些精子功能。随着研究的深入,活性氧在高浓度时对人类精子质量和功能的危害日益受到人们的关注。文献报道^[5],约 25%~40%的不育男性的精液中检测到高水平的活性氧。

本实验采用 HX XO 体系,使氧发生单价和双价还原反应,产生 O_2^- 和 H_2O_2 。后者可使精子膜上多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应。通过活性氧对人精子脂质过氧化作用,观察巴戟天水提物对人精子运动功能的保护作用。结果显示,在活性氧作用下,精子的功能受损,运动功能和穿透能力显著下降,与正常精子相比有非常高度显著性差异($P < 0.001$),巴戟天水提物大、中、小剂量组在相同条件下均可显著改善精子的运动功能和穿透能力,显示对活性氧的氧化损伤具有一定的干预作用,对精子的功能有保护作用。与 Vit C 相比较,0.25 和 0.5 g/ml 巴戟天水提物的作用更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$),尤其对前向运动率和活力指数的改善最明显,甚至已接近正常者水平,而且影响程度呈现剂量-效应关系。

人的精液中含有超氧化物歧化酶(superoxide dis-

mutase, SOD),能抑制过氧化损伤,对精子起到保护作用。丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)含量则反映精子脂质过氧化损伤的程度。有文献报道,巴戟天具有抗氧化活性,对超氧阴离子(O_2^-)、羟基自由基($\cdot OH$)具有良好的清除作用^[6]。我们的另一项实验结果也显示,巴戟天水提物能提高精子悬液 SOD 活力,降低 MDA 含量,抑制精子膜脂质过氧化反应,具有显著抗氧化作用。对精子悬液中 MDA 含量与精子运动参数的相关分析表明,精子悬液中 MDA 含量与精子活动率、前向运动精子百分率、直线速度(VSL)、平均路径速度(VAP)之间均存在显著负相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明 ROS 介导的脂质过氧化反应造成精子质膜的氧化损伤是精子运动功能降低的重要原因。巴戟天水提物改善精子运动功能可能与其抗氧化作用有关。

本实验结果表明,适宜剂量的巴戟天水提物对 ROS 所致人精子过氧化损伤具有明显干预作用,对精子的运动功能具有保护作用;抗氧化损伤可能是巴戟天水提物改善人精子体外运动功能的作用机制之一。

[参考文献]

[1] 张国宏,李铮,向祖琼,等. 男性不育患者精液检查 2211 例结果分析[C]. 中华医学会第五次全国男科学学术会议论文集,2004:176.

[2] Koksai IT, Usta M, Orhan I, et al. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility[J]. Asian J Androl, 2003, 5(2): 95-99.

[3] 杨欣,丁彩飞,张永华,等. 菟丝子水提物对人精子膜结构和功能氧化损伤的干预作用[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(7): 515-518.

[4] 黄宇烽. 男性病实验诊断手册[M]. 南京:东南大学出版社,1993:44.

[5] Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, et al. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury[J]. Fertil Steril, 1997, 67(6): 1115-1120.

[6] 李斐斐,吴拥军,屈凌波,等. 中药巴戟天抗自由基活性的研究[J]. 光谱实验室, 2005, 22(3): 553-555.

(收稿日期:2006-04-05 修回日期:2006-05-31)