

知柏地黄汤对 UU 感染大鼠生精细胞凋亡及 凋亡因子 Cyt-c、AIF 表达的影响

郭炫佐,何清湖*,李迎秋

(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨知柏地黄汤对解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)感染大鼠精液质量、生精细胞凋亡及凋亡因子 Cyt-c、AIF 表达的影响。**方法** 从 60 只雄性 SD 大鼠中随机抽取 45 只,经膀胱注射造成 UU 感染动物模型,剩余 15 只作为正常组。UU 感染模型动物再随机分成模型组、阿奇霉素组(西药组)和知柏地黄汤组(中药组),于接种后第 10 d 予以模型组和正常组生理盐水灌胃,阿奇霉素组和知柏地黄汤治疗组分别予相应药物灌胃,连续干预 21 d 后处死动物,检测各组精子运动参数、生精细胞凋亡率及细胞凋亡因子细胞色素 C(cytochrome c, Cyt-c)、细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠精子质量明显降低,UU 培养阳性率、生精细胞凋亡率及 Cyt-c、AIF 表达明显升高($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较,中药组、西药组精子质量提高,UU 培养阳性率、细胞凋亡率、Cyt-c、AIF 表达均降低($P<0.01$, $P<0.05$);与西药组比较,中药组改善精子质量较高($P<0.05$, $P<0.01$),降低 UU 感染率,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 知柏地黄汤改善 UU 感染大鼠精子质量优于阿奇霉素,且与阿奇霉素抗 UU 感染作用相当,其机制可能与其降低凋亡因子 Cyt-c、AIF 表达相关。

[关键词] 知柏地黄汤;解脲支原体;生精细胞;细胞色素 C;细胞凋亡诱导因子;熟地黄;知母;黄柏

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.01.003

Effects of Zhibai Dihuang Decoction on Spermatogenic Cell Apoptosis of UU Infected Rats and Apoptotic Factors Cyt-c and AIF Expression

GUO Xuanzuo, HE Qinghu*, LI Yingqiu

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Zhibai Dihuang Decoction on semen quality, spermatogenic cell apoptosis and apoptosis factors Cyt-c, AIF expression of *Ureaplasma urealyticum* (UU) infected rats. **Methods** 45 rats were randomly selected from 60 male SD rats, which were injected with UU by bladder to establish the infective animal models, and the remaining 15 rats were used as normal group. UU infection animal models were randomly divided into model group, azithromycin group (Western medicine group) and Zhibai Dihuang Decoction group (Chinese medicine group), on 10 d after inoculation, the model group and normal group were administrated with saline by gavage, azithromycin group and Zhibai Dihuang Decoction in the treatment group were given corresponding medicine gavage, the animals were executed after continuous intragastric administration for 21 days. The sperm motion parameters, germ cell apoptosis rate and cell apoptosis factor Cytochrome c (Cyt-c) and apoptosis inducing factor (AIF) expression level were detected. **Results** Compared with the normal group, the sperm quality of the model group was significantly decreased, the positive rate of UU, the apoptosis rate of the cells and the expression of Cyt-c and AIF were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the model group, the sperm quality of Chinese medicine group and Western medicine group were improved, the positive rate of UU, the apoptosis rate, AIF and Cyt-c expression were decreased obviously ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with Western medicine group, the sperm quality in Chinese medicine group improved obviously ($P<0.05$, $P<0.01$), and lower UU infection rate was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Zhibai Dihuang Decoction in improving sperm quality of UU infected rats is better than azithromycin, and its effect on resistant UU infection is equal to azithromycin. The mechanism may be related to decreased expressions of apoptosis factor cytochrome c and AIF.

[Keywords] Zhibai Dihuang Decoction; *Ureaplasma urealyticum*; spermatogenic cell; Cyt-c; AIF; prepared rehmannia root; anemarrhena; phellodendron

[收稿日期] 2015-08-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81373641);湖南省科技厅课题资助项目(2011sk3104);长沙市科技局课题资助项目(K1301014-31);湖南省科技计划项目(2012sk3138)。

[作者简介] 郭炫佐,男,医学硕士,主要从事中西医结合防治男科病研究。

[通讯作者] * 何清湖,男,教授,博士研究生导师,E-mail:Hqh1111@tom.com。

细胞色素 C(cytochrome c, Cyt-c)和细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)分别是细胞凋亡线粒体途径中两个关键的凋亡因子,在细胞凋亡的过程中,线粒体是调控细胞凋亡的中心,不同的凋亡刺激信号引发不同的凋亡信号转导通路,而 Cyt-c 从线粒体的释放和 AIF 保证凋亡的有序进行都在细胞凋亡通路中起着关键性的作用。解脲支原体(Ureaplasma urealyticum, UU)感染是男性不育、特别是继发性不育最重要的原因之一,有关其发病机制和防治方法的研究目前已成为各国学者关注的热点问题之一,本研究团队前期研究也证明 UU 感染导致男性不育的机制之一是诱导生精细胞凋亡从而减少成熟精子细胞的数量,降低精子运动活力。本文在前期临床和实验研究基础上,进一步研究在 UU 感染导致细胞凋亡的众多途径中,以线粒体凋亡途径为主的两条路径:Caspase 依赖途径的细胞凋亡因子 Cyt-c 的影响和非 Caspase 依赖途径的凋亡因子 AIF 的影响以及知柏地黄汤的干预作用。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 60 只 SPF 级 SD 健康雄性大鼠,大鼠培养 4~5 个月,体质量(200±20) g,由湖南斯莱克景达动物实验公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2011-0003,湖南中医药大学病原微生物专用动物实验室饲养,许可证号:SYXK(湘)2009-0001,实验室室温(25±2) °C,湿度 40%~55%,环境通风良好,备黑色窗帘,分笼饲养。光照 12 h,黑暗 12 h。自由饮食与饮水。定期投予饲料、饮水瓶及垫料。

1.1.2 药物 知柏地黄汤:药物组成、炮制及用量基本按《医宗金鉴》所载执行。熟地黄、山萸肉、淮山药、泽泻、牡丹皮、茯苓(不去皮)、盐知母、盐黄柏的用量比为 24:12:12:9:9:9:6:6。药材经中药师鉴定后,严格按照古法炮制,按以上比例由湖南中医药大学附属医林药号提供 950 g 药材。先加蒸馏水浸泡 30 min,水煎煮两次,2 次煎所得滤液混合后浓缩,生药含量为 1 g/mL,于 4 °C 冰箱中保存备用。阿奇霉素片(维宏):石药集团欧意药业有限公司生产,规格:0.25 g/片,批号:001120941。临用时用注射用水配成含阿奇霉素 25 mg/mL 的混悬液。

1.1.3 试剂与仪器 UU 标准株由南华大学微生物学教研室提供;25%的乌拉坦,PBS 液(Solarbio,中

国);细胞凋亡试剂盒 MK1020、AIF 酶联免疫分析试剂盒、Cyt-c 酶联免疫分析试剂盒、SP9001 试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供;JEOL-1230 型电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

1.2 方法

1.2.1 UU 效价滴定 将 UU 标准菌株(冻干品)复苏,于无菌条件下将 UU 标准菌接种于 UU 液体培养基中,37 °C 培养 16~24 h,取对数生长期菌体,培养基出现橙红色清亮菌液时进行倍比稀释,接种。本实验所用 UU 效价为 5×10^6 ccu/mL。

1.2.2 UU 感染大鼠动物模型造模方法 参照李楠等造模方法^[1]。随机抽取 45 只 SD 雄性大鼠,用无菌蒸馏水将乌拉坦配制成 20%注射液,按 0.5 mL/kg 剂量腹腔注射麻醉动物。在无菌条件下打开腹腔,充分游离膀胱,先用注射器将膀胱内残余尿液抽尽,然后再注入 UU4 型菌株液 0.5 mL/只,将膀胱放回原位,缝合腹腔。上述操作均严格无菌。正常组 15 只大鼠亦在同样条件下向膀胱内注入生理盐水 0.5 mL/只。

1.2.3 分组及给药方法 于接种后的第 7 天随机抽取 5 只 UU 感染造模大鼠睾丸穿刺液运用培养法行 UU 培养,均有阳性表达,判断造模成功^[1]。将造模成功的 45 只大鼠采用随机数字表法分为知柏地黄汤治疗组、阿奇霉素治疗组和模型组,每组 15 只。另有 15 只作为正常组,于动物接种的第 10 天开始给药,正常组、模型组灌胃给生理盐水。治疗组灌胃给相应药物。给药剂量按动物每公斤体质量占人体体表面积比值计算,知柏地黄汤组给药量为 7.8 g/(kg·d),阿奇霉素组给药量为 0.105 g/(kg·d)。各组均连续灌胃 21 d。

1.3 观察指标及检验方法

1.3.1 大鼠精液质量的检测 取附睾组织,用 37 °C 预温的 PBS 液冲洗 1 遍,然后将附睾尾放入盛有 3 mL 37 °C 预温的 PBS 液的培养皿中。用无菌手术刀从附睾尾近侧端至输精管深切 4~5 刀,避免切口暴露在空气中,避免精子暴露于空气中而死亡。将含精子的培养皿置 37 °C CO₂ 培养箱中,扩散 5 min,用镊子去除残余组织及未充分扩散的精子块,得到精子悬液。用 PBS 液采用 1:9 稀释,轻轻摇晃混匀,用彩色精子动态检测系统进行精子运动参数测定。

1.3.2 UU 培养检测 右侧的睾丸部分组织放进 UU 培养基里,保证操作无菌,然后把样本置于 37 °C 的恒温箱中进行一天一夜的孵化,观察试验结果。培养组织基液体颜色变为红色,混浊判断为阳性。培养

48 h 后培养基仍没有变成红色则为阴性。

1.3.3 睾丸生精细胞凋亡检测 采用脱氧核苷酸原位末端标记法(TUNEL)。结果判定:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞。

1.3.4 睾丸生精细胞凋亡因子 Cyt-c、AIF 表达的检测 取大鼠部分睾丸组织,按照 ELISA 试剂盒操作步骤操作检测 Cyt-c、AIF 表达浓度。

1.4 统计方法

计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,对样本先进行方差齐性检验,方差齐时,用 One-Way ANOVA 检验,并进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验,数据使用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, $P<0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠精子质量参数情况

与正常组比较,模型组大鼠 A 级精子、B 级精子、直线速度、平均速度等精子质量参数均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,中药组、西药组的 A、B 级精子,平均速度、曲线的速度、直线的速度均有较大提高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);中药组在提高 A、B 级精子、曲线速度和平均速度方面效果优于西药组,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠精子质量参数比较子力学 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量(g/kg)	A 级精子(%)	B 级精子(%)	直线速度($\mu\text{m/s}$)	曲线速度($\mu\text{m/s}$)	平均速度($\mu\text{m/s}$)
正常组	-	1.03±0.09	2.07±0.52	10.95±0.98	42.03±1.35	16.22±1.52
模型组	-	0.07±0.03**	0.35±0.13**	6.78±1.05**	38.10±7.65	10.05±1.80*
中药组	7.8	1.11±0.30 $\Delta\Delta\Delta$	2.40±0.59 $\Delta\Delta$	12.11±1.62 $\Delta\Delta$	54.30±2.35 $\Delta\Delta\Delta$	18.40±1.27 $\Delta\Delta\Delta$
西药组	0.105	0.60±0.19 Δ	1.32±0.27 Δ	11.47±1.21 Δ	45.75±1.64 Δ	16.69±1.02 Δ
χ^2		15.940	13.260	15.206	10.209	12.399
P		0.001	0.004	0.058	0.017	0.006

注:与正常组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与西药组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠 UU 感染检测结果比较

与正常组比较,模型组 UU 感染阳性率差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,中药组、西药组差异均有统计学意义($P<0.05$);中药组与西药组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 UU 感染检测结果比较

组别	n	UU 感染阳性数(只)	阳性率(%)	χ^2	P
正常组	15	0	0		
模型组	15	13	86.7*	9.717	0.05
中药组	15	5	33.3 Δ		
西药组	15	4	26.7 Δ		

注:与正常组比较 * $P<0.05$;与模型组比较 $\Delta P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠生精细胞凋亡率情况

模型组生精细胞凋亡率明显升高,与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);中药组、西药组生精细胞凋亡率不同程度降低,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

2.4 各组大鼠 Cyt-c、AIF 的表达水平情况

模型组凋亡因子 Cyt-c、AIF 表达均明显升高,与正常组比较有统计学意义($P<0.01$),经过治疗后的中药、西药组 Cyt-c、AIF 表达水平均明显降低,与模型组比较有统计学意义($P<0.01$)。而中药组与西药组两两比较均没有统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠生精细胞 Cyt-c、AIF 的表达水平及细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CytC (nmol/L)	AIF (nmol/L)	细胞凋亡率(%)
正常组	15	126.5±17.8	153.8±28.1	8.2±1.7
模型组	15	191.4±21.9**	230.4±29.3**	13.4±2.4**
西药组	15	150.0±21.3 $\Delta\Delta$	184.8±18.5 $\Delta\Delta$	10.5±2.1 $\Delta\Delta$
中药组	15	153.2±14.4 $\Delta\Delta$	179.4±19.7 $\Delta\Delta$	11.1±2.0 $\Delta\Delta$
F 值		29.661	25.652	5.725
P 值		0.000	0.000	0.003

注:与正常组比较 ** $P<0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3 讨论

近年来,UU 感染泌尿生殖道导致的不育不孕症逐渐受到关注,许多医学专家发现,此类感染会对男性精液的健康产生危害,免疫镜下可见 UU 吸附于精子表面,破坏精子膜结构,导致精子受精能力下降,影响精子穿透卵子的能力。Sanocka-Maciejewska 等^[9]研究发现,UU 等生殖道的感染会对精液的运动速度、活力和体积等造成一定的危害,并且出现精子的异常情况比较多。随着分子生物学和循证医学的发展,越来越多的研究更倾向于 UU 感染导致生精细胞凋亡的关系,细胞凋亡主要是由于线粒体的变化引起的,因为线粒体对于细胞凋亡的传递有着非常重要的作用。其中的信号通路对于线粒体有很大

的意义。凋亡刺激信号有很多种,启动时这些信号都会传递给线粒体;之后会对它进行分辨、整理和考察,确认是否执行凋亡,一旦开始执行就必然导致细胞凋亡。当决定发生凋亡后,线粒体通过释放内外膜间隙里的一些促凋亡因子延续凋亡程序,比如 Cyt-c^[4]。开始执行凋亡程序的阶段,Cyt-c 可以激活 Caspase 家族发挥凋亡作用,主要作用就是导致细胞内蛋白和 DNA 的降解,细胞形态学发生典型的改变。在很多的分析研究中,发现细胞的凋亡可能和 Cyt-c 有某种关系。因为在 Cyt-c 释放出后,处在线粒体外膜上的 Bcl-2 家族蛋白和线粒体通透性转换变成凋亡的关键因素。Cyt-c 一旦释放,可与人结合凋亡蛋白酶活化因子-1 (apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1)相互作用导致 Caspase-9 活化,继而 Cyt-c、Apaf-1 与 Caspase-9 复合物就是凋亡体,凋亡体继续激活下游效应因子 Caspase-3,引起级联反应,最终导致凋亡^[5],这种凋亡途径必须依赖 Caspase 家族完成,故又称为依赖 Caspase 凋亡途径。Narimon^[6]等针对其做出的实验——除去小鼠的 Apaf-1 基因,之后继续饲养,发现这些小鼠中只有百分之五的小鼠发育成熟。他们虽然脑活动正常,但是雄性小鼠的精子减少,由此直接可以得出结论:由 Cyt-c 参与的凋亡,可能只对生殖产生较大影响。

传统认为,细胞凋亡都与胱天蛋白酶的激活相联系,胱天蛋白酶对细胞凋亡的控制和执行起中心作用。但是近年来新发现的 AIF 却可以不依赖于胱天蛋白酶途径而行使细胞凋亡功能。Gabriel B 等^[7]向细胞注射了 Cyt-c 后,线粒体途径在发生凋亡时,对 Apaf-1、Caspase-9 所形成的凋亡体没有依赖,而是由 AIF 参与细胞凋亡的,其过程一旦发生无法逆转。且有研究证实真菌、线虫等细胞凋亡也有 AIF 同源分子的参与,因此,在细胞凋亡的时候 AIF 起重要作用,此途径更原始、更保守、更普遍的凋亡途径,也可能是细胞凋亡最主要的途径,相对于 Caspase 信号通路来说,AIF 是另一条独立的、普遍的线粒体凋亡途径。总之,Cyt-c 与 AIF 诱导的这两种不同的凋亡诱导途径提示了哺乳动物细胞死亡机制的复杂性和多样性。他们可能对应于不同的死亡触发刺激和执行程序,或者,相反它们可能一起诱导完整的细胞凋亡。

地黄汤滋阴补肾、主治肾阴不足,虚火上炎之证,《医方论》曰:“此方非但治肝肾不足,实三阴并治之剂,有熟地之赋补肾水,即有泽泻之宣泄肾浊以济之;有萸肉之温涩肝经,即有丹皮之清泻肝火以佐之;

有山药收摄脾经,即有茯苓淡渗脾湿以和之。药止六味,而有开有合,三阴并治,润补方之正部也。”再加之黄柏、知母相须为用,不仅能长于清相火,退虚热,且有泻火解毒之功,综观全方,滋阴补肾、清热利湿、活血化瘀,颇合 UU 感染性不育肾虚为本,湿热血瘀为标之病机,诚为治疗 UU 感染之中医基本方。临床以知柏地黄汤为主加减治疗因 UU 感染型精子活动力差,死精子多,成活率低,液化时间长等所致男性不育,收到了较好的效果。很多在半个月至一个月内精液常规指标基本转为正常。

本实验研究表明,知柏地黄汤具有较好的抗 UU 感染作用,其抗 UU 作用与阿奇霉素相当,UU 感染率与生精细胞凋亡率成正性相关,UU 感染促使生精细胞的凋亡可能导致精液质量下降的原因之一。UU 感染后伴随着两大凋亡途径核心因子的表达浓度显著增加,知柏地黄汤抗 UU 感染的同时能降低 Caspase 依赖途径的核心凋亡因子 Cyt-c 表达水平和下调 Caspase 非依赖途径关键效应因子 AIF 表达水平,使生精细胞凋亡减少,并提高精液质量。故凋亡因子 Cyt-c、AIF 表达的下降是知柏地黄汤治疗 UU 感染性不育症关键机制之一。

参考文献:

- [1] 李楠,林鸿春,聂晶,等.解脲支原体感染动物模型的研究进展[J].中国性科学,2015,24(1):64-66.
- [2] 郭军华,李迎秋,郭炫佐,等.知柏地黄汤对解脲支原体感染大鼠生精细胞线粒体琥珀酸脱氢酶的影响[J].湖南中医药大学学报,2014,34(11):1-4.
- [3] 刘朝圣,卢芳国,何清湖,等.知柏地黄汤对解脲支原体感染大鼠生精细胞凋亡及 Caspase-3、Caspase-9 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(9):1 254-1 258.
- [4] Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality[J]. Reprod Immunol 2005, 67(1-2):51-56.
- [5] Wang QS, Song F, Zhao X, et al. Expression changes of apoptotic-related proteins in nerve tissues of rats treated with allyl chloride[J]. Toxicology, 2007,231(1):58-67.
- [6] 吕科力,宁安红,黄敏,等.细胞色素 C 在诱导宫颈癌细胞凋亡中的作用[J].中国微生态学杂志,2010,22(6):504-506.
- [7] Honarpour N, Chunying DU, James A, et al. Adult apaf-1 deficient mice exhibit male infertility [J]. Dev Biol, 2000,218: 248-258.
- [8] Gabriel B, Sureau F, Casselyn M, et al. Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL [J]. Exp Cell Res, 2003,289(2):195-210.
- [9] 郭军华,何清湖.滋阴补肾方治疗解脲支原体感染性不育的临床疗效观察[J].中华中医药杂志,2014,29(6):2 053-2 056.