

苋贝素对雄性大鼠血浆性激素水平及附睾精子质量的影响

曾宪彪, 韦宝伟*, 韦桂宁, 邓聿胤

广西壮族自治区中医药研究院, 广西 南宁 530022

摘要: **目的** 研究苋贝素对雄性大鼠血浆性腺激素水平、附睾精子质量、睾丸组织结构的影响, 探讨苋贝素降低雄性大鼠生育能力的作用机制。 **方法** 给雄性成熟大鼠 sc 苋贝素铵盐溶液 30 d, 末次给药后 2 h, 测定血浆性激素水平; 检查附睾精子质量; 观察睾丸组织结构。 **结果** 与对照组比较, 给药 30 d 后, 苋贝素高、中剂量 (40、20 mg/kg) 组大鼠血浆睾酮、黄体生成素、卵泡刺激素水平、附睾精子活率、精子密度明显降低, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 附睾精子畸形率和顶体完整率无明显变化, 显微镜下见睾丸组织呈萎缩性病变, 曲精细管扁平、塌陷, 管内精母细胞减少, 附睾精细管内精子稀少。 **结论** 苋贝素抑制丘脑-垂体-性腺轴活动, 降低雄性大鼠血浆性激素水平, 引起睾丸萎缩和附睾精子活率、精子密度降低, 使雄性大鼠生育能力下降。

关键词: 苋贝素; 雄性大鼠; 性激素; 精子; 睾丸; 附睾

中图分类号: R979.21

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)06-0414-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.003

Effect of embelin on sex hormone levels in plasma and sperm quality in epididymis of male rats

ZENG Xian-biao, WEI Bao-wei, WEI Gui-ning, DENG Yu-yin

Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530022, China

Abstract: Objective To study the effect of embelin on plasma sex hormone levels, epididymis sperm quality, testicular tissue structure, and its mechanism of reducing fertility action in male rat. **Methods** Sexually-mature rat received the hypodermic injection of embelin salt of ammonia, once daily, for 30 d. Plasma sex hormone levels were determined, epididymis sperm quality was checked up, and testicular tissue structure was observed 2 h after the last hypodermic injection of embelin. **Results** After hypodermic injection of embelin for 30 d, rat plasma levels of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, survival sperm rate, and sperm density in epididymis were decreased significantly, compared with control group ($P < 0.05$), no changes in sperm deformity rate and acrosome intact rate were found in all embelin-treated groups; convoluted seminiferous tubules were flat, collapsed, or atrophic pathological changes, decreased spermatogonium was observed in convoluted seminiferous tubule of testicular tissue, extremely low sperm counts were observed too in seminiferous tubule of epididymis under the microscope in high- (40 mg/kg) and mid-(20 mg/kg) dose embelin-treated groups. **Conclusion** Embelin inhibits the activity of hypothalamus-pituitary-sex gland axis, decreases plasma sex hormone level, leads to atrophy in testicular tissue, and decreases survival sperm rate and sperm density in epididymis, resulting in decreased fertility in male rats.

Key words: embelin; male rat; sex hormone; sperm; testicles; epididymis

苋贝素 (embelin) 是存在于紫金牛科酸藤子属植物包括酸藤子 *Embelia laeta* (Linn) Mez、白花酸藤果 *E. ribes* Burm. F、多脉酸藤子 *E. oblongifolia* Hemsl、网脉酸藤子 *E. rudis* Hand. Mazz、长叶酸藤

子 *E. longifolia* (Benth) Hemsl、大叶酸藤子 *E. subcoriacea* (C. B. Clarke) Mez、厚叶白花酸藤果 *Embelia ribes* Burm. F. var. *pachyphylla* (Chun ex C. Y. Wu et C. Chen) Pipoly & C. Chen、当归藤 *E.*

收稿日期: 2013-08-15

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2013GXNSFAA019261); 广西医疗卫生重点科研课题 (重 2012057); 广西中药质量标准研究重点实验室主任基金 (桂中重科 201103)

作者简介: 曾宪彪, 男, 助理研究员, 研究方向为药理学。Tel: (0771)5869102 E-mail: zxb51963@163.com

*通信作者 韦宝伟, 男, 副研究员, 研究方向为药理学。E-mail: weibaowei@163.com

parviflora Wall. ex A. DC、瘤皮孔酸藤子 *E. scandens* (Lour.) Mez 成熟果实中的苯醌类物质^[1], 具有明确的驱除肠道绦虫、镇痛、消炎作用^[2]。近年来的研究认为其还有抑制肝癌^[3]、降血糖和胰岛细胞保护^[4]、肝损害保护^[5]、抗氧化自由基^[6]、抗惊厥^[7]和降低雄性生育能力^[8]等。但蒺苈素通过何种机制影响性细胞或性激素分泌细胞致雄性生育能力降低, 目前尚不清楚。本实验观察蒺苈素对雄性大鼠血浆性腺激素水平、附睾精子质量、睾丸组织结构的影响, 探讨蒺苈素降低雄性大鼠生育能力的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物 蒺苈素是本课题组从广西容县等地5~6月份产酸藤子成熟果实提取分离的重结晶^[9], 经与蒺苈素标准物质(购自美国SIGMA-ALDRICH公司, 批号90M4731V)对比, 该结晶含蒺苈素92%以上, 不溶于水, 可与氨水反应生成溶于水的蒺苈素铵盐, 批号20110519。实验时取蒺苈素结晶800 mg和适量氨水, 反复研磨加超声波震荡至完全溶解, 用少量盐酸调整pH值为7.2, 以生理盐水补足至10 mL, 使之成质量浓度为80 mg/mL(以相当蒺苈素结晶量计, 下同)中性蒺苈素铵盐溶液, 再用生理盐水稀释成浓度为40、20、10 mg/mL的蒺苈素铵盐药液备用。

1.1.2 动物 雄性Wistar大鼠, 清洁级, 平均体质量(300±50) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号SCXK桂2009-0001。

1.1.3 仪器和试剂 酶联免疫分析仪(北京天石医疗仪器厂)。大鼠睾酮、黄体生成素、卵泡刺激素酶联免疫分析成套试剂盒(均为美国R&D公司产品), 批号分别为: rat testosterone ELISA Kit-16/04/2012, rat luteinizing hormone ELISA Kit-05/04/2012, rat follicle-stimulating hormone ELISA Kit-23/04/2012。其他试剂为市售色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 分组给药 实验大鼠置动物实验室适应饲养10 d后开始分组给药。取性成熟雄性大鼠40只, 随机分成蒺苈素高、中、低剂量组和对照组, 每组10只。给药组腋窝sc蒺苈素铵盐药液1 mL/kg, 剂量分别为40、20、10 mg/kg, 对照组注射等体积生理盐水。所有动物每天注射一次, 连续30 d, 每15天称体质量一次。

1.2.2 血清生化检测 末次给药后2 h, ip戊巴比

妥钠35 mg/kg麻醉, 从腹主动脉取血, 置肝素抗凝管中, 离心分离血浆, 作酶联免疫分析, 测定血浆睾酮、黄体生成素、卵泡刺激素水平。

1.2.3 病理组织检测 取睾丸、附睾称质量, 计算睾丸、附睾系数; 取右侧睾丸、附睾, 福尔马林固定, 石蜡包埋切片, HE染色, 显微镜下观察睾丸、附睾组织病理变化。

1.2.4 精子质量检测 取左侧附睾纵向切开, 置10 mL恒温(37℃)生理盐水中20 min, 使精子自由游出, 制成精子悬液; 以活精子悬液充池于精子计数板, 显微镜下观察, 以能直线运动或不定向移动的精子为活精子, 其余只能在原地打转或不活动的精子为死精子, 点计200个精子中活精子的数量, 计算精子活率。取精子悬液经50℃灭活精子, 用精子计数板作精子密度计数。取精子悬液用1%伊红溶液按10:1混匀染色, 涂片, 晾干, 甲醇固定, 显微镜下观察1000个精子, 计算精子畸变率。取精子悬液作姬姆萨染色, 同法涂片、固定, 显微镜观察精子顶体完整率。

1.3 统计

采用SPSS13.0统计软件包进行数据处理, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用一元方差分析, *F*检验, 组间比较采用*t*检验。

2 结果

2.1 对大鼠体质量、睾丸系数、附睾系数的影响

在本试验给药剂量下, 大鼠体质量、睾丸系数、附睾系数与对照组比较, 组间差异无统计学意义, 见表1。

2.2 对大鼠精子质量的影响

蒺苈素高、中剂量组精子活率、精子密度均低于对照组, 组间差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01), 见表2。3个剂量给药组与对照组比较, 附睾精子畸形率、顶体完整率, 组间差异无统计学意义。

2.3 对大鼠血浆性激素水平的影响

蒺苈素高、中剂量组大鼠血浆睾酮、黄体生成素、卵泡刺激素水平低于对照组, 组间差异有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01), 见表3。

2.4 对大鼠睾丸、附睾组织结构的影响

显微镜下见高、中剂量组睾丸组织呈萎缩性病变, 曲精细管扁平、塌陷, 分布混乱, 曲精细管内圆形精细胞层减少, 各级精细胞稀少, 核分裂细胞极少见, 较多圆形精细胞脱落, 游离于管腔中间, 睾丸间质细胞稀少, 胞核不明显, 着色淡薄。高、

中剂量组附睾精细管较少, 管内精子稀疏, 部分精子脱落, 游离, 可见未成熟精细胞, 畸形精子较少

见。对照组和低剂量组睾丸、附睾组织未见明显的器质性病理变化。见图1。

表1 蒺贝素对性成熟大鼠体重、睾丸系数、附睾系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of embelin on body weight, testicle coefficients and epididymis coefficients in sexually-mature male rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g			睾丸系数/%	附睾系数/%
		给药前	给药15 d	给药30 d		
对照	—	415.10±19.196	438.50±20.480	456.00±22.425	0.43±0.110	0.27±0.041
蒺贝素	40	418.30±28.566	440.80±27.683	455.60±30.233	0.44±0.152	0.25±0.050
	20	418.80±18.659	438.40±16.530	453.30±18.415	0.41±0.121	0.22±0.098
	10	422.00±21.157	442.90±20.491	460.10±22.903	0.37±0.096	0.26±0.055

表2 蒺贝素对性成熟大鼠附睾精子质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of embelin on epididymis sperm quality in sexually-mature male rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	精子活率/%	精子密度/($\times 10^{10} \cdot L^{-1}$)	精子畸形率/%	顶体完整率/%
对照	—	78.30±12.212	82.70±11.576	4.50±2.506	91.70±5.559
蒺贝素	40	54.50±15.138**	61.00±15.463**	3.20±2.251	93.20±4.442
	20	64.30±15.706*	68.30±17.062*	3.60±2.633	92.10±4.677
	10	76.40±14.175	77.70±14.213	3.90±2.283	90.90±3.348

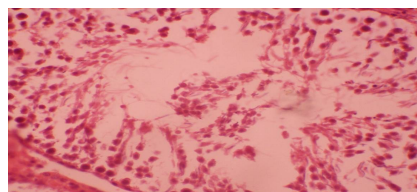
与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.01$; 下表同

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.01$ vs control group; same as bellow

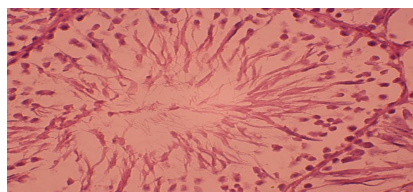
表3 蒺贝素对性成熟大鼠血浆性激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of embelin on plasma sex hormone levels in sexually-mature male rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

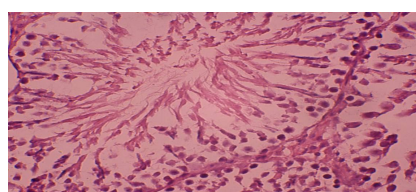
组别	剂量/	睾酮/(ng·mL ⁻¹)	黄体生成素/(IU·L ⁻¹)	卵泡刺激素/(IU·L ⁻¹)
对照	—	2 722.20±525.809	2.53±0.986	1.14±0.834
蒺贝素	40	1 819.30±426.510***	1.29±0.664**	0.46±0.276**
	20	2 224.80±377.860*	1.67±0.780*	0.53±0.221*
	10	2 631.30±652.759	2.46±0.597	1.19±0.628



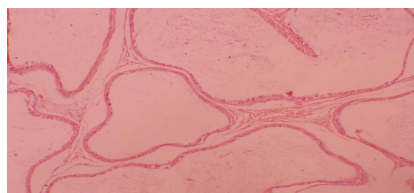
蒺贝素 40 mg·kg⁻¹ 组睾丸组织



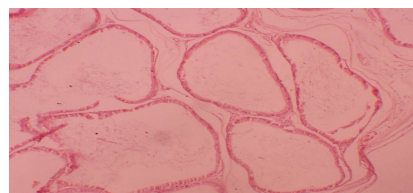
蒺贝素 20 mg·kg⁻¹ 组睾丸组织



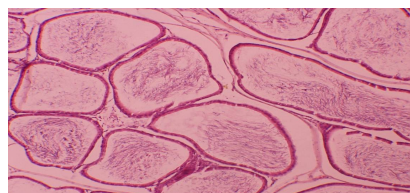
对照组睾丸组织



蒺贝素 40 mg·kg⁻¹ 组附睾组织



蒺贝素 20 mg·kg⁻¹ 组附睾组织



对照组附睾组织

图1 蒺贝素对大鼠睾丸和附睾组织结构的影响

Fig. 1 Effect of embelin on tissue structures of testicles and spididymis

3 讨论

睾丸生精能力及精子质量优良都有赖于性激素水平正常,下丘脑分泌卵泡刺激素控制睾丸精原细胞向精细胞分化,促进垂体分泌黄体生成素,黄体生成素维持各级精母细胞和精子生命活动并促进睾丸间质细胞分泌睾酮,睾酮则用于维持雄性特征。下丘脑、垂体、睾丸三者构成性腺轴。血浆中3种性激素水平对性腺轴反馈调节,维持性激素水平正常,使睾丸生精活跃,精子质量优良。阻断性腺轴中的某一环节,下游性腺会萎缩,相应的下游性激素会降低,上游性腺会因低下游性激素反馈而增加上游性激素分泌。下丘脑是性腺轴最高级中枢,抑制该中枢环节,3种性激素水平都会降低,下游性腺特别是睾丸将明显萎缩。本实验观察到性成熟雄性大鼠连续sc 葱贝素药液30 d后,高、中剂量(40、20 mg/kg)组3个性激素水平均降低、睾丸明显萎缩、附睾精子质量低劣,没有个性激素水平反馈性升高。说明性腺轴最高中枢受到抑制,在低性激素水平下,睾丸生精能力和睾酮分泌能力均低下,附睾精子缺少来源,自然质量低劣。查阅国外近年来的研究见:葱贝素可以透过血脑屏障^[10]、干扰基因表达^[11]、下调X连锁凋亡抑制蛋白^[12]、对某些正常细胞或癌细胞有诱导凋亡作用^[13]。所以,葱贝素或许是表观遗传修饰药,透过血脑屏障到达下丘脑,对卵泡刺激素分泌细胞基因修饰,使基因或其启动子沉默;或者葱贝素可以诱导下丘脑性激素分泌细胞凋亡。引起下丘脑性激素分泌受抑制,继发下游性腺轴性激素分泌减少,下游性腺特别是睾丸萎缩、附睾精子质量低劣。本实验没有观察停药后病变的可逆性,有待进一步深入研究。

参考文献

[1] 中国科学院《中国植物志》编写委员会. 紫金牛科酸藤子属, 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 58: 104-120.

- [2] Chitra M, Sukumar E, Suja V, *et al.* Antitumor, anti-inflammatory and analgesic property of embelin, a plant product [J], *Chemotherapy*. 1994, 40(2): 109-113.
- [3] 王世兵, 雷文, 徐燕华, 等. 葱贝素 (Embelin) 通过阻断 NF- κ B 信号通路抑制肝癌细胞 Bel7404 生长的研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(2): 161-167.
- [4] Mahendran S, Badami S, Maithili V. Evaluation of antidiabetic effect of embelin from *Embelia ribes* in alloxan induced diabetes in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010. doi: 10.1016/j.biopha.2010.08.003.
- [5] Singh D, Singh R, Singh P, *et al.* Effects of embelin on lipid peroxidation and free radical scavenging activity against liver damage in rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 105: 243-248.
- [6] Joshi R, Kamat J P, Mukherjee T. Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 167(2): 125-34.
- [7] Mahendran S, Thippeswamy B S, Veerapur V P, *et al.* Anticonvulsant activity of embelin isolated from *Embelia ribes* [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(2/3): 186-188.
- [8] Agrawal S, Chauhan S, Mathur R. Antifertility effects of embelin in male rats [J]. *Andrologia*, 1986, 18(2): 125-131.
- [9] 广西壮族自治区中医药研究院. 一种从酸藤果制备两性抗生育物质葱贝素的方法 [P]. 中国专利 201210082776, 2012-08-15.
- [10] Rakcs K J, Usha Z. Binding of potassium [³H] embelate to rat brain synaptosomes [J]. *Acta Pharm Sin*, 1991, 12(3): 216-219.
- [11] Kim S W, Kim S M, Bae H, *et al.* Embelin inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of Akt/mTOR/S6K1 signaling cascades [J]. *Prostate*, 2013, 73(3): 296-305.
- [12] Hu R, Zhu K, Li Y, *et al.* Embelin induces apoptosis through down-regulation of XIAP in human leukemia cells [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1584-1588.
- [13] Li Y, Li D, Yuan S, *et al.* Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G₂/M phase via the mitochondrial pathway [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3): 1005-1009.