大豆异黄酮对醋酸铅致小鼠睾丸组织损伤的影响

范红艳[1]，任　旷[1*]，王艳春[1]，路　倩[1]，沈　楠[2]，顾饶胜[1]，张以忠[3]

1. 吉林医药学院基础医学院 药理教研室，吉林 吉林　132013
2. 吉林医药学院基础医学院 实验中心机能实验室，吉林 吉林　132013
3. 吉林医药学院基础医学院 病理教研室，吉林 吉林　132013

摘　要：目的　研究大豆异黄酮对醋酸铅致雄性小鼠生殖系统损伤的保护作用及作用机制。**方法**　采用 ip 醋酸铅（20 mg/kg）连续 7 d 的方法制备雄性小鼠生殖系统损伤模型，造模第 2 天开始，大豆异黄酮低、中、高剂量（150、300、600 mg/kg）组分别 ig 给药，连续 30 d。检测雄性小鼠的睾丸指数、精子密度、精子畸变率，血清中 NO 的量，睾丸组织中乳酸脱氢酶（LDH）和丙二醛（MDA）的量及 Na^+, K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶活性等指标，并观察睾丸、附睾组织的病理改变。**结果**　与模型组比较，大豆异黄酮中、高剂量组的睾丸指数、精子密度增加，精子畸变率降低（$P<0.05$、0.01），睾丸组织中 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性增强（$P<0.05$、0.01），血清中 NO 的量降低（$P<0.05$、0.01）；大豆异黄酮低、中、高剂量组睾丸组织中 MDA 的量降低（$P<0.05$、0.01），高剂量可提高睾丸组织中 LDH 的活性（$P<0.05$）。病理观察可见，模型组睾丸组织生精上皮明显变薄，生精细胞层次和数量减少，多数生精小管腔未见精子形成，附睾液内未见精子，可见大量圆细胞，而大豆异黄酮可改善醋酸铅所致生精细胞的损伤。**结论**　大豆异黄酮对醋酸铅致小鼠睾丸组织损伤有一定保护作用，作用机制与抗氧化及降低 NO 的量有关。

关键词：大豆异黄酮；醋酸铅；生殖系统损伤；抗氧化；NO

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2014)02 - 0227 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.014

Effect of soybean isoflavone on testicular tissue injury induced by lead acetate in mice

FAN Hong-yan[1], REN Kuang[1], WANG Yan-chun[1], LU Qian[1], SHEN Nan[2], GU Rao-sheng[1], ZHANG Yi-zhong[3]

1. Department of Pharmacology, Jilin Medical College of Basic Medicine, Jilin Medical College, Jilin 132013, China
2. Department of Functional Experimental Science, Experimental Center, Jilin Medical College, Jilin 132013, China
3. Department of Pathology, Jilin Medical College of Basic Medicine, Jilin Medical College, Jilin 132013, China

Abstract: Objective　To explore the protective effect of soybean isoflavone on reproductive injury in male mice caused by lead acetate and its mechanism. **Methods**　The reproductive toxicity model in male mice was established by ip injection with lead acetate (20 mg/kg) for 7 d. The model mice were treated with low-, mid-, and high-dose (150, 300, and 600 mg/kg) soybean isoflavone, respectively through gavage for 30 d. The mice were sacrificed on day 31 for the measurement of testis index, sperm density, and sperm aberration rate. The contents of nitric oxide (NO) in serum and malondialdehyde (MDA), and the activities of lactate dehydrogenase (LDH), Na^+, K^+-ATPase, and Ca^{2+}-ATPase in testicular tissue homogenate were assayed with spectrophotometry respectively. The pathological changes of testicular and epididymal tissues were observed. **Results**　Compared with the model group, mid- and high-dose soybean isoflavone could increase the testis index and sperm density, decrease the sperm aberration rate and NO content in serum ($P < 0.05$, 0.01), and improve the activities of Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in testicular tissue homogenate ($P < 0.05$, 0.01). The content of MDA in testicular tissue homogenate was decreased ($P < 0.05$, 0.01) in the soybean isoflavone groups, and the LDH activity was increased ($P < 0.05$) in the high-dose soybean isoflavone group. In the model group, cell number of spermatogenic epithelium were lower than those in the control group on morphological testis; There was a decline of spermatogenic cells in levels and numbers; No spermiogenesis was observed in most seminiferous tubule; There were plenty of round cells and none of spermatozoon in

收稿日期：2013-05-07

基金项目：吉林省教育厅“十一五”科技研究资助项目（2010254）

作者简介：范红艳（1975—），女，硕士，副教授，主要从事生殖药理及心血管药理研究。E-mail: 583888330@qq.com

***通信作者**　任　旷（1963—），男，教授。E-mail: renkuang@sina.com

the epididymal liquid. The changes above could be reversed by soybean isoflavone. **Conclusion** Soybean isoflavone has certain protective effects on the testicular tissue injury in mice caused by lead acetate, and its mechanism is related to anti-oxidation and decreasing NO.

Key words: soybean isoflavone; lead acetate; reproductive injury; anti-oxidation; nitric oxide

大豆异黄酮属于异黄酮类植物雌激素，基本骨架为 3-苯基苯并二氢呋喃，包括金雀异黄素、大豆黄酮和黄豆素 3 种苷元及其葡萄糖苷，广泛存在于豆荚类植物中，大豆中的量尤为丰富（0.24～1.53 mg/g）。有研究显示大豆异黄酮具有增强免疫功能、抗肿瘤、抗衰老等多种作用[1-4]。本实验通过醋酸铅致雄性小鼠生殖系统损伤，观察大豆异黄酮对损伤小鼠睾丸及附睾的影响，并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物

昆明种小鼠，清洁级，雄性，体质量 18～22 g，由吉林大学基础医学部实验动物中心提供，动物合格证号 SCXK（吉）2008-0005。

1.2 药品与试剂

大豆异黄酮（质量分数 99%），郑州荔诺生物科技有限公司；醋酸铅，上海化学试剂厂；丙二醛（MDA）试剂盒、乳酸脱氢酶（LDH）试剂盒、ATP 酶试剂盒、考马斯亮蓝测定试剂盒，南京建成生物工程公司；NO 试剂盒，上海碧云天生物技术有限公司。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

昆明种小鼠 60 只，随机分为 5 组：对照组、模型组、大豆异黄酮（150、300、600 mg/kg）组，每组 12 只。除对照组外，各组均 ip 醋酸铅 20 mg/kg，连续 7 d，对照组同时给予相同剂量生理盐水，大豆异黄酮组自造模第 2 天开始 ig 给药 30 d，对照组和模型组 ig 相同体积的 0.25%羧甲基纤维素钠溶液。末次给药后禁食不禁水 24 h，小鼠称体质量后 10%水合氯醛（0.3 mL/kg）麻醉，快速取双侧睾丸和附睾，剥除粘连的组织后，用分析天平称质量、记录睾丸湿质量，计算睾丸指数（睾丸质量/体质量）。腹主动脉取血，制备血清备用。每组随机取小鼠 2 只，颈椎脱臼处死后取睾丸及附睾，用于 HE 染色。

2.2 精子密度检查（血细胞计数板法）

取双侧附睾，迅速置于预加入 2 mL 生理盐水的洁净培养皿中，用探针将附睾充分剥离开后置于 37.0 ℃恒温箱中加盖孵育 10 min，使精子游出。4 层擦镜纸滤过，得稀释后的精液。取上述精液 100 μL 加 3% NaCl 100 μL，按红细胞计数法计算精子数。对于压线精子的计数是数头不数尾，数上不数下，数左不数右。

2.3 精子畸变实验

取稀释后精液 1 滴于载玻片上涂片，空气中干燥，用甲醇固定 5 min 以上干燥，用 1%伊红染色 1 h，用水轻冲掉多余染剂，干燥。置于镜下统计畸变数目，每张片子计数 1 000 个精子。为了减少误差，对同一个样品进行 3 次精子数量检查，求其平均数。

2.4 睾丸组织 LDH 和 MDA 的测定

取小鼠睾丸组织，用生理盐水在冰浴下制成 10%组织匀浆，4 ℃，4 000 r/min，离心 15 min，取上清液严格按试剂盒说明（采用硫代巴比妥酸法）测定 MDA 的量，组织蛋白采用考马斯亮蓝法定量。取 1%睾丸组织匀浆上清液，严格按照试剂盒说明测定 LDH 的量。

2.5 睾丸组织中 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性的测定

取 1%睾丸组织匀浆上清液，严格按照试剂盒说明测定 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性。

2.6 血清 NO 的检测

取血清，严格按试剂盒说明用酶标仪检测血清中 NO 的量。

2.7 睾丸 HE 染色

将睾丸于 4%多聚甲醛固定 24 h，常规石蜡包埋，切片备用，用于 HE 染色，光学显微镜（×200）下观察，并拍照。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析，所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用方差分析及 q 检验。

3 结果

3.1 对小鼠睾丸指数的影响

与对照组比较，模型组小鼠睾丸指数明显降低（$P<0.05$）；与模型组比较，大豆异黄酮低剂量组睾丸指数升高，但无统计学差异（$P>0.05$），大豆异黄酮中、高剂量组睾丸指数明显升高（$P<0.05$、0.01），表明随剂量增加，大豆异黄酮能够明显提高小鼠的睾丸指数，见表 1。

3.2 对小鼠精子密度的影响

与对照组比较，模型组小鼠精子密度明显下降

（P＜0.01）；各剂量大豆异黄酮处理后，精子密度有所改善，大豆异黄酮中、高剂量组与模型组比较具有统计学差异（P＜0.05、0.01）。见表 1。

3.3 对小鼠精子畸变率的影响

小鼠精子畸变率在 0.3%～3.4%。结果显示，与对照组比较，模型组小鼠精子畸变率显著增加（P＜0.01），说明醋酸铅对小鼠精子生成有影响，提示精子的正常形成和成熟受到干扰，大豆异黄酮低、中、高剂量组的精子畸变率均降低，与模型组比较差异非常显著（P＜0.01），在一定程度上反映了大豆异黄酮对醋酸铅所致雄性小鼠生殖毒性有改善作用，见表 1。

表 1 大豆异黄酮对醋酸铅致睾丸组织损伤小鼠的睾丸指数、精子密度及精子畸变率的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 12）

Table 1 Effects of soybean isoflavone on testis index, sperm density, and sperm aberration rate of mice with testicular tissue injury induced by lead acetate ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量 /(mg·kg^{-1})	睾丸指数 /(mg·g^{-1})	精子密度 /(×10^7·mL^{-1})	精子畸变率 /%
对照	—	8.01±1.07	5.85±3.07	0.74±0.19
模型	—	6.87±1.00*	1.99±1.20**	1.66±0.24**
大豆异黄酮	150	7.20±0.53	2.92±0.78	1.23±0.21$^{\#\#}$
	300	7.94±1.14$^{\#}$	3.17±0.49$^{\#}$	0.87±0.17$^{\#\#}$
	600	9.38±0.28$^{\#\#}$	4.64±2.05$^{\#\#}$	0.55±0.20$^{\#\#}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05 $^{**}P$＜0.01；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05 $^{\#\#}P$＜0.01，下同

$^{*}P$ < 0.05 $^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05 $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group, same as below

3.4 对小鼠睾丸组织 MDA 和 LDH 量的影响

与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织 MDA 的量显著增高、LDH 的量显著降低（P＜0.01），表明醋酸铅通过氧化损伤影响睾丸的能量代谢和精子的生成和发育；低、中、高剂量大豆异黄酮治疗后 MDA 的量显著降低（P＜0.05、0.01），LDH 的量增高，其中高剂量组与模型组比较有统计学差异（P＜0.05），表明大豆异黄酮有一定的抗氧化作用，见表 2。

3.5 对小鼠睾丸组织中 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性的影响

结果表明，模型组小鼠睾丸组织中 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶的活性均明显低于对照组（P＜0.01）。大豆异黄酮中、高剂量组小鼠睾丸组织中 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶的活性明显高于模型组（P＜0.05、0.01），说明大豆异黄酮具有一定的提高 Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性的作用，见表 3。

表 2 大豆异黄酮对醋酸铅致睾丸组织损伤小鼠睾丸组织中 MDA、LDH 的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 12）

Table 2 Effects of soybean isoflavone on LDH and MDA in testicular tissue of mice with testicular tissue injury induced by lead acetate ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量 /(mg·kg^{-1})	MDA /(nmol·mg^{-1})	LDH /(U·g^{-1})
对照	—	1.52±0.42	2.61±0.43
模型	—	2.53±0.33**	1.41±0.24**
大豆异黄酮	150	1.82±0.84$^{\#}$	1.19±0.23
	300	1.68±0.54$^{\#\#}$	1.58±0.13
	600	1.59±0.44$^{\#\#}$	1.65±0.17$^{\#}$

3.6 大豆异黄酮对小鼠血清中 NO 量的影响

结果表明，模型组小鼠血清中 NO 的量显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，大豆异黄酮低、中、高剂量组大鼠血清中 NO 的量减少，大豆异黄酮中、高剂量组与模型组比较差异显著（P＜0.05、0.01），见表 3。

3.7 对小鼠睾丸、附睾病理改变的影响

HE 染色睾丸组织：对照组睾丸生精小管排列密集，生精上皮厚，生精细胞层次和数量多，生精小管腔均见精子形成；模型组与对照组比较，睾丸多数生精小管直径明显变细，间距较宽，生精上皮明显变薄，生精细胞层次和数量减少，多数生精小管腔未见精子形成，管腔内可见脱落的生精细胞；大豆异黄酮组与对照组比较，生精上皮厚度相对变薄，生精细胞层次和数量相对较少，生精小管腔内精子生成情况类似，但与模型组比较，生精上皮增厚，生精细胞层次和数量明显增多，见图 1。

HE 染色附睾组织：对照组附睾管管腔内充满大量精子，管壁厚，上皮呈高柱状；模型组与对照组比较，附睾上皮无差异，附睾液内未见精子，可见大量圆细胞；大豆异黄酮组与对照组比较，附睾液内可见类似量精子，但与模型组比较，附睾液内明显可见大量精子，见图 1。

表 3　大豆异黄酮对醋酸铅致睾丸组织损伤小鼠睾丸组织中 Na^+, K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-ATP 酶活性及血清中 NO 水平的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 12$）

Table 3　Effects of soybean isoflavone on activities of Na^+, K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in testicular tissue and level of NO in serum of mice with testicular tissue injury induced by lead acetate ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 / ($mg \cdot kg^{-1}$)	Na^+, K^+-ATP 酶 / ($\mu molPi \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$)	Ca^{2+}-ATP 酶 / ($\mu molPi \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$)	NO / ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
对照	—	0.26±0.04	0.32±0.05	2.68±0.96
模型	—	0.18±0.05**	0.22±0.04**	7.67±2.12**
大豆异黄酮	150	0.22±0.05	0.25±0.04	6.61±3.15
	300	0.23±0.05#	0.28±0.05#	3.54±1.93#
	600	0.24±0.04##	0.29±0.07#	2.76±1.50##

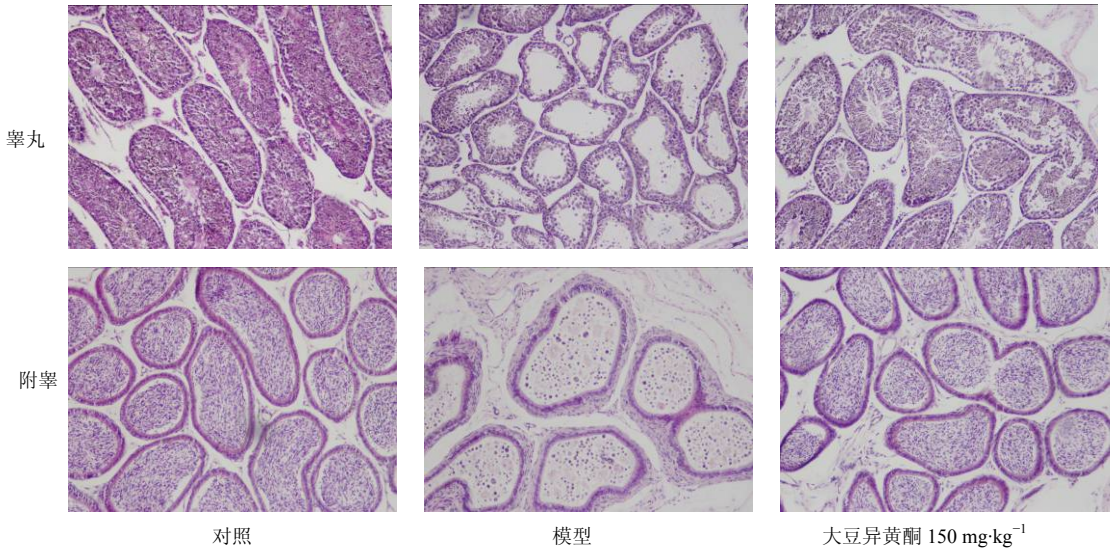

图 1　各组小鼠睾丸和附睾组织病理改变

Fig. 1　Pathologic changes of testis and epididymis tissues of mice in each group

4　讨论

近年来，随着环境问题（污染）日益严重、生殖系统感染性疾病发病率提高，不孕不育症的发病率呈上升趋势，生殖系统疾病及治疗的相关研究越来越受到人们的关注。铅对精子发育和成熟有干扰和阻碍作用，而且对精子有直接毒性。研究表明利用醋酸铅染毒可建立稳定的雄性动物生殖系统损伤模型[5-6]。本实验采用 ip 20 mg/kg 醋酸铅连续 7 d 的方法制备睾丸组织损伤小鼠模型。模型组小鼠睾丸指数降低，精子密度均明显下降，精子畸形率增高，睾丸、附睾病理可见小鼠的睾丸损伤明显，说明醋酸铅致小鼠的睾丸组织损伤模型复制成功。给予大豆异黄酮处理后，睾丸指数及精子密度均明显升高，精子畸形率降低，大豆异黄酮组睾丸、附睾组织病理改变较模型组明显减轻，由此可见大豆异黄酮对醋酸铅所致的睾丸组织损伤具有明显改善作用。

MDA 是脂质过氧化产物，MDA 是反映机体内活性氧的量高低的较好指标，过多的活性氧能够导致生殖细胞氧化损伤，破坏精子质膜的流动性，引起睾丸损伤和精子发生异常，从而使生精功能受损及精子质量下降[7]。Na^+, K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶作为精子利用能量的关键酶，是质膜上重要的离子泵，对维持细胞膜结构的完整性、膜内外离子平衡和渗透压平衡等方面起关键作用，与精子动力臂收缩而使精子运动有关，并可作为线粒体膜结构变化的灵敏指标[8]。而当机体氧自由基增多引发氧化应激时，过多的氧自由基首先以线粒体为攻击目标，可导致线粒体功能障碍，从而引起 Na^+, K^+-ATP 酶与 Ca^{2+}-ATP 酶活性下降[9-10]。本实验结果表明，模型组 MDA 的量显著性增加，Na^+, K^+-ATP 酶与

Ca^{2+}-ATP 酶活性下降，同时大豆异黄酮中、高剂量组 MDA 值明显降低，Na^+, K^+-ATP 酶与 Ca^{2+}-ATP 酶活性升高，与模型组比较具有统计学差异。说明大豆异黄酮可以通过抗氧化、稳定细胞膜作用阻止生殖细胞的脂质过氧化和清除自由基并维持正常的抗氧化体系，进而保护活性氧引起的生殖细胞氧化损伤。

精子发生常经历精原细胞增殖阶段、精母细胞成熟分裂阶段和精子形成阶段，并与睾丸中多种酶的活性密切相关。LDH 是糖酵解的一个关键酶，睾丸中的 LDH 主要存在于精母细胞、精子细胞胞质及精子尾中段线粒体，其活性与生精过程及精子活动、获能及受精有关，可作为评价生精能力的重要指标[11]。NO 是经几种不同的一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）催化合成，在生理剂量下通过 NO-cGMP 途径发挥松弛血管平滑肌、舒张血管和抑制内皮细胞增殖等多种生理学效应，而在病理状态下，各种刺激因子导致诱导型一氧化氮合酶（iNOS）的过度表达，生成大量 NO，在引起非特异性免疫作用的同时，对周围环境中的正常细胞也产生毒性效应，并可以影响多种细胞的功能。近年来的研究证明雄性生殖系统内存在 NOS，其诱导产生的 NO 与雄激素的分泌、精子的成熟、运动及获能均有密切关系[12-13]。本研究结果发现，模型组小鼠血清中 LDH 活性下降，NO 的量显著升高，说明醋酸铅可能通过 NO 机制对小鼠睾丸的能量代谢和精子生成产生影响，在一定程度上反映醋酸铅对雄性小鼠生殖细胞的遗传损害作用。大豆异黄酮高剂量组 LDH 升高，大豆异黄酮低、中、高剂量组小鼠血清中 NO 的水平降低，且随剂量增加药物作用依次增强，显示出大豆异黄酮改善小鼠生殖功能的作用与降低 NO 的水平密切相关。

综上所述，大豆异黄酮通过抗脂质过氧化及降低 NO 的量而对醋酸铅所致的小鼠睾丸组织损伤发挥保护作用，其在临床生精障碍疾病预防和治疗中具有一定的研究开发价值，但有关大豆异黄酮保护生殖系统功能的具体细胞信号转导机制还需进一步探讨。

参考文献

[1] Zhang G P, Han D, Liu G, *et al*. Effects of soy isoflavone and endogenous oestrogen on breast cancer in MMTV-erbB2 transgenic mice [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(6): 2073-2082.

[2] 范红艳, 顾饶胜, 王艳春, 等. 大豆异黄酮抗衰老作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2054-2057.

[3] 赵文玺, 汪 霞, 金爱花, 等. 大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝癌诱发初期肝脏氧化应激的干预作用 [J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 675-677.

[4] 蔡 标, 彭代银, 汪远金, 等. 大豆异黄酮对 AD 大鼠海马 NO-cGMP 信号转导系统的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 220-223.

[5] Gautam A K, Agarwal K, Shah B A, *et al*. Lead induced spermatoxicity in mouse and MPG treatment [J]. *J Environ Biol*, 2001, 22(4): 287-291.

[6] Shan G, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2009, 29(1): 68-72.

[7] 崔洪斌, 迟晓星, 李百祥, 等. 大豆异酮对雄性大鼠生殖系统的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(3): 164-166.

[8] Silva E, Pinto V, Simao S, *et al*. Renal aging in WKY rats: changes in Na(+), K(+)-ATPase function and oxidative stress [J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(12): 977-983.

[9] Zhang X, Zhang A, Jiang B, *et al*. Further pharmacological evidence of the neuroprotective effect of catalpol from *Rehmannia glutinosa* [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(6/7): 484-490.

[10] Gong Y, Pan X, Huang Y, *et al*. NP-induced biophysical and biochemical alterations of rat testicular Sertoli cell membranes related to disturbed intracellular Ca^{2+} homeostasis [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 183(1/3): 10-20.

[11] 张大雷, 杨 蓓, 吴 磊, 等. 人参皂苷保护小鼠精原细胞氧化损伤的研究 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(8): 1014-1016.

[12] 方 芳, 王志成, 刘 扬, 等. 低剂量电离辐射诱导小鼠睾丸 NO 含量 NOS 活性及 AIF 基因的变化 [J]. 中国辐射卫生, 2010, 19(1): 3-5.

[13] Eddi B, Reda Z M, Arianna V, *et al*. Single nucleotide polymorphism (SNP) of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene (Glu298AspVariant) in infertile men with asthenozoospermia [J]. *J Androl*, 2010, 31: 482-488.