

• 论 著 •

水陆二仙丹水提物对人精子膜结构和功能氧化损伤的保护作用

何碧英, 彭 明

(中山市中医院检验科, 广东中山 528400)

摘 要:目的 探讨水陆二仙丹治疗男性畸形弱精死精子症的作用机制。方法 选择健康的精子作为模型, 精子悬液分为维生素 C 组、正常组、模型组和水陆二仙丹水提物大、中、小剂量组, 剂量分别为每 1 mL 含 1.0、0.5 和 0.25 g 生药。应用次黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶体系产生活性氧, 在有氧环境下, 精子悬液与 0.25 g/L 维生素 C 及不同剂量(每 1 mL 含 1.0、0.5 和 0.25 g 生药)的水陆二仙丹水提物共同孵育后, 采用精子低渗膨胀试验, 对各组精子膜功能进行评估, 同时检测各组丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活力。结果 与模型组相比, 维生素 C 组及水陆二仙丹水提物大、中、小剂量组 1、3 及 6 h 的精子膨胀率及精子活率明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 且水陆二仙丹水提物中剂量组(0.5 g/mL)的精子膨胀率及精子活率显著高于维生素 C 组($P<0.05$)。与模型组相比, 维生素 C 组及水陆二仙丹水提物大、中、小剂量组 MDA 的水平均显著降低($P<0.05$), SOD 活力均显著升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 且中剂量水陆二仙丹水提物(0.5 g/mL)的作用明显优于维生素 C 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 水陆二仙丹水提物具有保护精子膜功能和结构的作用, 其作用与干预精子膜的脂质过氧化反应有关。

关键词:水陆二仙丹; 活性氧; 精子; 脂质过氧化
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.017 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)06-0760-03

Protective effect of extract from Shuilu Erxiandan on oxidative injury of structure and function of human sperm membrane

He Biying, Peng Ming

(Department of Clinical Laboratory, the Traditional Medicine Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Shuilu erxiandan against male's infertility and asthenospermia. **Methods** Human sperm with normal physiological function were collected, and then sperm suspension were divided into the normal group, the model group, Vitamin C group and the groups of large, medium and small dose of Shuilu erxiandan. The reactive of species was made from hypoxanthine-xanthine oxidase. In the oxygen environment, Vitamin C(0.25 g/L) and different content(1.0, 0.5, 0.25 g/mL) of extract from Shuilu erxiandan were hatched with sperm. Then the function of sperm membrane in every group was evaluated using hypoosmotic swelling. Meanwhile the content of MDA and SOD were detected. **Results** Expansion of sperm and sperm motility in all the groups of vitamin C and large, medium and small dose of Shuilu erxiandan's extract were significantly higher than that in the model group at time point of 1, 3 and 6 h ($P<0.05$). Also, medium dose of Shuilu erxiandan (0.5 g/mL) displayed more effective on expansion of sperm and sperm motility compared with that in the vitamin group C ($P<0.05$). All the groups of vitamin C and large, medium and small dose of Shuilu erxiandan's extract significantly indicated decreased MDA content and improved SOD activity compared with that in the model group ($P<0.05$). Also, this effect of medium dose of Shuilu erxiandan (0.5 g/mL) on MDA and SOD activity were superior to that in vitamin C group, which showed significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Extract from Shuilu erxiandan could significantly protect structure and function of sperm membrane, which is correlated with intervening its lipin peroxidation.

Key words: Shuilu erxiandan; active oxygen; sperm; lipin peroxidation

随着人们对男性生殖健康的关注, 精子氧化损伤和抗氧化剂在男性生殖系统中的应用引起广泛的研究探讨^[1]。在正常情况下, 精子产生少量的活性氧(ROS), 这些活性氧是受精、顶体反应和获能的必要条件。然而, 如果精子产生的 ROS 增加超过自身清除能力的增加, 就会导致精子质膜的过氧化损伤和 DNA 完整性的丢失, 最终导致精子细胞死亡、降低受精率。研究发现, 很多补益药具有抗氧化作用。水陆二仙丹载于《洪氏集验方》, 金樱子涩、酸、平, 功能涩肠止泻、固精缩尿止带, 芡实涩、甘、平, 功能健脾止泻、益肾固精、除湿止带^[2-3], 临床治疗多种男科疾病疗效显著。本文旨在观察水陆二仙丹水提物对人精子膜的影响, 从精子膜角度探讨治疗男性不育症的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 自愿供精者 50 名, 年龄 22~32 岁, 有生育能

力, 身体健康, 禁欲 4~6 d, 收取足够量的精液到无菌容器中, 采用计算机辅助精子分析系统常规分析, 白细胞小于 1×10^6 /mL, 正常形态精子大于 60%, 精子密度大于 60×10^6 /mL, a+b 级精子大于 50%, a 级精子大于 25%。制备具有正常生理功能的精子作为试验模型, 采用 Percoll 梯度离心法。具体操作方法见参考文献^[4]。

1.2 试验药物及其制备 水陆二仙丹组方: 芡实 30 g, 金樱子 30 g, 水提取液由北京中医药大学附属医院药剂科配制。制法: 按处方比例取芡实、金樱子, 加 10 倍量水浸泡 30 min, 加热煎煮 1 h, 过滤, 取滤液备用。药渣再加 8 倍量水, 煎煮 30 min, 过滤, 滤液合并, 浓缩至每 1 mL 含 1 g 生药, 静置沉降 24 h, 过滤取上清液。

1.3 方法 将精子悬液分为 6 份, 分别加入到以下 6 组中。

作者简介: 何碧英, 男, 主管技师, 主要从事临床方向研究。

水陆二仙丹大、中、小剂量组；HX-XO(终浓度/水平同模型组)＋水陆二仙丹水提取物(终水平分别为每 1 mL 含 1.0、0.5、0.25 g)；维生素 C(终水平为 0.25 g/L)＋HX-XO(终浓度/水平同模型组)为阳性药对照组；模型组，HX-XO(HX 终浓度为 1 mmol/L，XO 终水平为 50 U/L)；正常组，PBS 缓冲液(pH 7.4)；制作出来的精子标本均放入 5% CO₂ 恒温培养箱中 37 ℃ 培养 1～2 h。

1.4 观察指标

1.4.1 T-SOD 的活力 处理好的精子悬液在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 2 h 后，用紫外分光光度计(7530G)测定 T-SOD 的活力。对照管和测定管分别加入试剂盒中 1～4 号试剂，适当处理后倒入 1 cm 光径比色杯，波长 550 nm 处比色，抑制反应 50% 的 SOD 量为 SOD 活力单位，比较每毫升酶单位。计算公式和具体操作方法见参考文献[4]。

1.4.2 MDA 水平 处理好的精子悬液在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 2 h 后，用紫外可见分光光度计(7530G)测定，按照试剂盒说明书操作。标准空白管、标准管和测定管分别加入试剂盒中的 1 号试剂。标准空白管加入无水乙醇，标准品加入标准管，测定管加入精子悬液。适当处理后分别加入到光径比色杯中(1 cm)，用蒸馏水调零，在波长为 532 nm 的条件下比色。MDA 的产量能够表示精子膜脂质过氧化损伤的情况，对其进行定量。计算公式见参考文献[4]。1 nmol 代表 1×10⁸ 个精子。

1.4.3 精子的低渗膨胀实验 选取待检标本 0.1 mL，经过一定的处理后，在电子显微镜(高倍镜)下计数 b～g 型精子的百分水平，观察数目为 200 个精子。

1.4.4 精子存活率 处理后的精子悬液在 37 ℃ 恒温培养箱中孵育 1、3、6 h 后，取 5 μL 精子悬液与 5 μL 0.5% 伊红 Y 溶液混合均匀，在 22 ℃ 的恒温培养箱中温育 2 min 后加上盖玻片，在 400 倍的显微镜下，采用明视野观察，可以看到死精子被染成了红色，而活精子没有颜色。通过观察计数 300 个精子，然后计算精子存活率。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，比较采用 *t* 检验，*P*＜0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 水陆二仙丹水提取物对 MDA 水平、T-SOD 活力的影响 水陆二仙丹水提取物大、小剂量组与维生素 C 组精子悬液中 T-SOD 活力和 MDA 水平比较差异均无统计学意义(*P*＞0.05)，但水陆二仙丹水提取物中剂量组对精子悬液中 T-SOD 活力和 MDA 水平的影响则显著优于维生素 C 组，比较差异均有统计学意义(*P*＜0.05)。详见表 1。

表 1 各组 T-SOD 活力、MDA 水平比较		
组别	T-SOD 活力(U/mL)	MDA 水平(nmol/mL)
正常组	11.59±1.73	24.06±1.84
模型组	8.23±1.71*	46.69±2.03*
维生素 C 组	20.46±1.83*△	31.40±2.52△
水陆二仙丹高剂量组	20.21±1.78*△	30.98±2.36△
水陆二仙丹中剂量组	27.45±2.16*△#	26.84±2.18△#
水陆二仙丹低剂量组	20.96±1.82*△	28.91±2.07△

*：*P*＜0.05，与正常组比较；△：*P*＜0.05，与模型组比较；#：*P*＜0.05，与维生素 C 组比较。

2.2 水陆二仙丹水提取物对精子尾部低渗膨胀实验的影响 将活性氧与精子悬液在 37 ℃ 恒温培养箱中培养一段时间后，精子的结构和功能均出现了明显的受损现象。维生素 C 组与水

陆二仙丹水提取物大、中、小剂量组对精子总膨胀率的影响比较差异均无统计学意义(*P*＞0.05)，甚至已接近正常者水平。维生素 C 组与水陆二仙丹水提取物大、小剂量组对 g 型精子膨胀率的影响比较，差异均无统计学意义(*P*＞0.05)，但水陆二仙丹水提取物组中剂量组 g 型精子膨胀率显著优于维生素 C 组，两组比较差异有统计学意义(*P*＜0.05)。详见表 2。

表 2 各组精子尾部低渗膨胀结果比较(%)		
组别	精子总膨胀率	g 型精子膨胀率
正常组	71.95±1.74	29.42±1.89
模型组	21.23±4.71*	3.65±1.63*
维生素 C 组	69.46±2.83	18.40±2.62
水陆二仙丹高剂量组	69.23±2.78	18.98±2.36
水陆二仙丹中剂量组	69.45±2.16	22.54±2.68△
水陆二仙丹低剂量组	68.96±1.82	18.91±2.07

*：*P*＜0.05，与正常组比较；△：*P*＜0.05，与维生素 C 组比较。

2.3 水陆二仙丹水提取物对精子存活率的影响 维生素 C 组与水陆二仙丹水提取物大、小剂量组 1、3、6 h 的精子存活率比较，差异均无统计学意义(*P*＞0.05)；水陆二仙丹水提取物中剂量组的精子活率显著高于维生素 C 组比较，差异有统计学意义(*P*＜0.05)。水陆二仙丹水提取物中剂量组的精子存活率相对保持在较高水平，与正常组精子存活率比较，差异无统计学意义(*P*＞0.05)。详见表 3。

表 3 各组 1、3、6 h 样品中精子存活率比较(%)			
组别	不同时间精子存活率		
	1 h	3 h	6 h
正常组	50.35±3.74	39.42±2.49	26.42±1.69
模型组	20.23±3.71*	12.65±2.63*	5.93±1.73*
维生素 C 组	38.36±2.43*	28.40±3.62*	18.60±2.42*
水陆二仙丹高剂量组	39.23±2.38*	29.98±2.86*	18.38±2.76*
水陆二仙丹中剂量组	45.45±2.56△	34.54±2.38△	25.54±2.98△
水陆二仙丹低剂量组	39.96±2.82*	28.91±2.77	18.97±2.97*

*：*P*＜0.05，与正常组比较；△：*P*＜0.05，与维生素 C 组比较。

3 讨 论

精子膜结构和功能的完整性在一定程度上决定精子受精能力的大小，常作为评价精子治疗好坏的一个指标^[5-6]。精子膜结构是精子新陈代谢、活动力完整的基础，也是完成顶体反应和正常受精形成受精卵的必要条件^[7]。人精子膜的流动性依靠其中的多聚不饱和脂肪酸，若多聚不饱和脂肪酸的结构遭到破坏，精子和卵细胞就不能正常融合，阻碍受精卵的形成^[8]，在氧化应激的条件下，多聚不饱和脂肪酸的结构极易发生脂质过氧化反应，进而引起精子膜损伤。正常生理条件下，自由基的产生与清除维持动态平衡，一旦机体内自由基过量，超过机体本身的清除能力时，则会引起脂质过氧化，造成组织、器官或细胞的损伤。T-SOD 作为细胞内主要的抗氧化酶，催化超氧阴离子转化为过氧化氢或者氧，反映机体本身清除自由基的能力^[9-10]，而 MDA 是自由基水平过高造成氧化损伤的标志性产物，其量的高低直接反映了机体受氧化损伤的程度。在生殖系统内，由于氧化应激引起的 MDA 水平过高也会对精子膜结构和功能的发挥产生不利影响^[11-12]。

水陆二仙丹由金樱子和芡实由金樱子和芡实两味中药组成，两者均有很好的抗氧化活性^[13-14]，在传统应用中，其可用于男科疾病阳痿遗精，鉴于此，本试验从通过观察精子膜结构及功能的影响，探讨水陆二仙丹水提取物治疗男性不育症的机制。研究表明，精子活力下降的重要原因是精子膜结构中多聚不饱和脂肪酸的脂质过氧化程度增强^[15-16]。因此，本试验对

各组中 MDA 水平及 T-SOD 活力进行检测,同时对各组 1、3、6 h 的精子膨胀率及存活率进行测定。结果显示,与正常组比较,氧化损伤状态下的精子膨胀率及精子存活率明显降低($P<0.05$),MDA 水平显著增高($P<0.05$),T-SOD 活力显著降低($P<0.05$)。经维生素 C 及不同剂量的水陆二仙丹水提物作用后,与模型组相比,1、3、6 h 的精子膨胀率及精子活率明显升高($P<0.05$),且水陆二仙丹水提物中剂量组的精子膨胀率及精子活率显著高于维生素 C 组,这表明水陆二仙丹水提物对人精子膜的体外运动能力有一定保护及促进作用,且以 0.5 g/mL 水陆二仙丹水提物作用效果最佳。MDA 及 T-SOD 活力测定结果显示,经维生素 C 及不同剂量的水陆二仙丹水提物作用后,与模型组相比,MDA 的水平均显著降低($P<0.05$),SOD 活力显著升高($P<0.05$),且中剂量水陆二仙丹水提物的作用明显优于维生素 C 组($P<0.05$),提示水陆二仙丹水提物可增加精子 SOD 活力,降低脂质过氧化,这可能是水陆二仙丹水提物保护精子膜结构及功能的氧化损伤作用的一个环节,且水陆二仙丹水提物作用效果最佳。

综上所述,水陆二仙丹水提物具有保护精子膜功能和结构的作用,其作用与干预精子膜的脂质过氧化反应有关。

参考文献

[1] Aitken RJ,Deiuliis GN,Finnie JM,et al. Analysis of relationships between oxidative stress DNA damage and sperm vitality in a patient population;development of diagnostic criteria[J]. Hum Reprod,2010,25(10):2415-2426.

[2] Abd-Elmoaty MA,Saleh R,Sharma R,et al. Differences in blood and semen soxideative atatus in fertile and infertile men and their relationship with sperm quality[J]. Report Biomed Online,2012,25(3):300-306.

[3] 李刚琴.徐福松教授运用水陆二仙丹治疗男科疾病 2 例[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(4):524-525.

[4] 李刚,朱文斌,牛飞,等.肉苁蓉苯乙醇苷对大鼠精子体外化损伤的保护作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(9):2205-2207.

[5] Ros-Santaella JL,Domínguez-Rebolledo AE,Garde JJ. Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa

[J]. PLoS One,2014,9(11):112-118.

[6] Kadirvel G,Periasamy S,Kumar S. Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of Buffalo (Bubalus bubalis) sperm[J]. Reprod Domest Anim,2012,1(47):143-150.

[8] Beirão J,Soaresa F,Pousão-Ferreiraa P,et al. The effect of enriched diets on Solea senegalensis sperm quality[J]. Aquaculture,2015,21(435):187-194.

[9] Auletta L,Pasolini MP,Lamagna B,et al. Apoptosis occurrence in stallion sperm stored at+4 degrees C;superoxide dismutase(SOD) addition in transport media[J]. Reprod Domest Anim,2013,48(2):73.

[10] Sousa MI,Amaral S,Tavares RS,et al. Concentration-dependent Sildenafil citrate(Viagra) effects on ROS production,energy status,and human sperm function[J]. Syst Biol Reprod Med,2014,60(2):72-79.

[11] Ben KM,Montjean D,Menezo Y,et al. Malonaldehyde(MDA) formation and DNA fragmentation;two independent ROS induced spermdcays[J]. Human Reproduction,2010,25(7):1142.

[12] 沈蓓,袁冬平,伍城颖,等.芡实提取物对 SH-SY5Y 神经细胞损伤的保护作用及体外抗氧化活性研究[J]. 南京中医药大学学报,2013,29(1):39-43.

[13] 李刚琴.徐福松教授运用水陆二仙丹治疗男科疾病 2 例[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(4):524-525.

[14] Kumar D,Kumar P,Singh P,et al. Assessment of sperm damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes[J]. Cytotechnology,2014,11(6):169-170.

[15] Santiani A,Evangalista S,Sepúlveda N,et al. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa[J]. Theriogenology,2014,82(6):884-889.

[16] Jurewicz J,Radwan M,Sobala W,et al. Human urinary phthalate metabolites level and main semen parameters, sperm chromatin structure,sperm aneuploidy and reproductive hormones[J]. Reprod Toxicol,2013,42(1):232-241.

(收稿日期:2015-11-22)

(上接第 759 页)

[3] 付晶晶,周红平,刘发娣,等.2012 年江西地区重症手足口病病原分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(22):3024-3025.

[4] 王燕.手足口病病原及流行病学研究进展[J]. 中华医学杂志,2009,89(24):1724-1725.

[5] Tung WH,Sun CC,Hsieh HL,et al. EV71 induces VCAM-1 expression via PDGF receptor,PI3-K/Akt,p38 MAPK,JNK and NF-kappaB in vascular smooth muscle cells[J]. Cell Signal,2007,19(10):2127-2137.

[6] Prat C,Domínguez J,Rodrigo C,et al. Procalcitonin,C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection[J]. Pediatr Infect Dis,2003,22(11):963-968.

[7] 姚海林,刘绍珍,胡绍红,等.超敏 C 反应蛋白和白细胞计数联合检测对手足口病患儿诊治的意义[J]. 中国社区医师:医学专业,2010,12(18):158.

[8] Tempel Z,Grandhi R,Maserati M,et al. Prealbumin as a serum biomarker of impaired perioperative nutritional status and risk for surgical site infection after spine surgery[J]. J Neurol Surg A

Cent Neurosurg,2015,76(2):139-143.

[9] Whicher J,Bienvenu J,Monneret G. Procalcitonin as an acute phase marker[J]. Ann Clin Biochem,2001,38(5):483-493.

[10] 陆彩霞,王海兰,李春娥.新生儿败血症患儿血清降钙素原及白介素 6 水平变化研究[J]. 中国妇幼保健,2012,27(7):1016-1017.

[11] Maseda E,Suarez-de-la-Rica A,Anillo V,et al. Procalcitonin-guided therapy may reduce length of antibiotic treatment in intensive care unit patients with secondary peritonitis; a multicenter retrospective study[J]. J Crit Care,2015,30(3):537-542.

[12] 段发强,邓明惠,蔺咏梅,等.降钙素原等炎症标志物检测在儿童手足口病中的意义[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(4):446-448.

[13] 陈晓晴,葛海峰,谢奇朋.手足口病患儿血清降钙素原、C 反应蛋白、白介素-6 及白介素-10 检测的意义[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(1):54-57.

(收稿日期:2015-12-15)