

生脉注射液对青春期大鼠睾丸扭转复位后 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响

连艳艳, 郑月霞, 杨嫣青, 何跃斌, 吕钿, 卢凌亚, 毛维斯, 张金萍* (绍兴文理学院医学院临床医学系, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 目的 探讨生脉注射液对青春期大鼠睾丸扭转复位后 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响。方法 6 周龄健康 SD 大鼠, ♂, 16 只, 建立单侧睾丸扭转复位模型。随机分为睾丸扭转复位生理盐水(对照)组和睾丸扭转复位生脉注射液(实验)组, 每组 8 只。术后 9 周取双侧睾丸标本, HE 染色后观察睾丸组织形态改变; 免疫组织化学 ABC 法检测 Bcl-2/Bax 蛋白在睾丸组织中的表达。结果 实验组生精小管管壁完整, 生精上皮排列规则, 细胞层次清晰; 对照组生精小管管壁不完整, 生精上皮变薄, 细胞排列紊乱, 层次减少, 部分细胞可见核固缩, 核碎裂崩解, 可见多核细胞。与对照组相比, 实验组睾丸

基金项目: 绍兴文理学院学生科研项目(2010007); 绍兴文理学院第一批校级优秀教学团队建设成果(20097)

作者简介: 连艳艳, 女 Tel: 15068527031 E-mail: 990680970@qq.com *通信作者: 张金萍, 女, 教授 Tel: 13777315469

E-mail: pjzxuan@126.com

中国现代应用药学 2012 年 3 月第 29 卷第 3 期

Chin JMAP, 2012 March, Vol.29 No.3

· 201 ·

组织 Bcl-2 蛋白表达增加($P<0.05$), Bax 蛋白表达减少($P<0.05$)。结论 生脉注射液可能通过增加 Bcl-2 蛋白和降低 Bax 蛋白的表达减轻细胞凋亡, 对睾丸扭转复位后的损伤有保护作用。

关键词: 生脉注射液; 睾丸扭转; Bcl-2/Bax; 青春期大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)03-0201-04

Effects of Shengmai Injection on the Expression of Bcl-2 and Bax Following Testicular Torsion/Detorsion in Adolescent Rats

LIAN Yanyan, ZHENG Yuexia, YANG Yanqing, HE Yuebin, LÜ Dian, LU Lingya, MAO Weisi, ZHANG Jingping* (Department of Clinical Medicine, Medical College, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Shengmai injection extract on the expression of Bcl-2 and Bax following testicular torsion/detorsion in adolescent rats. **METHODS** Sixteen healthy adolescent male SD rats(6 weeks)were randomly divided into experimental group(testicular torsion/detorsion plus Shengmai injection extract, $n=8$) and control group(testicular torsion/detorsion plus saline, $n=8$). Animals were submitted to unilateral 720° testicular torsion,then detorsion was done in two hours. Nine weeks later, the expression of Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemical method. **RESULTS** In experimental group, the seminiferous tubule was complete, the spermatogenic epithelium arranged regularly and the levels of cells were more clear compared with those in the control group. There was some phenomenon such as pyknosis, karyorrhexis appearing in the cells of control group. In the torted testes, the apoptosis index of germ cell and Bax expression significantly increased compared with that in the control group ($P<0.05$) while Bcl-2 expression obviously decreased ($P<0.05$). The apoptotic cells were mostly pechytene spermatocytes and round spermatides. **CONCLUSION** Shengmai injection can obviously increase the expression of Bcl-2 while decrease the expression of Bax to inhibit the apoptosis.

KEY WORDS: Shengmai injection; testicular torsion; Bcl-2/ Bax; adolescent rat

睾丸扭转是导致睾丸损伤的泌尿外科急症之一,好发于 12~18 岁青少年,其发病率为 1/4 000^[1]。睾丸扭转发生后需立即手术,睾丸扭转复位时间越晚,影响越严重,超过 6 h,生精细胞将发生不可逆的损伤,影响生育功能。近年来,研究证实睾丸扭转复位对其功能的损伤是一种缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI),通过药物减少扭转复位后睾丸生精功能损害引起了许多研究者的关注。生脉注射液(Shengmai injection)是祖国传统中药,笔者前期的实验结果表明^[2],生脉注射液对青春期大鼠睾丸扭转复位后的 IRI 有良好的保护作用。因此,本研究通过建立青春期大鼠睾丸扭转复位动物模型,观察生脉注射液对青春期大鼠睾丸扭转复位后 Bcl-2/ Bax 蛋白表达的影响,从抗细胞凋亡方面探讨其保护机制,为临床上治疗睾丸扭转后生精低下提供一种新的治疗思路。

1 材料和方法

1.1 动物模型建立与分组

6 周龄健康 SD 大鼠, ♂, 16 只(浙江大学实验动物中心提供,实验动物合格证号: SCXK(浙)2007-0029), 2%戊巴比妥钠($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,采用 Turner 法^[3]建立睾丸扭转动物模型。随机分成睾丸扭转复位+连续注射生脉注射液组

(实验组)和睾丸扭转复位+连续注射生理盐水组(对照组),每组均为 8 只。所有动物模型按组分笼饲养。

实验组:左侧阴囊切开,绕精索顺时针扭转睾丸 720°,肉膜白膜缝合固定防止自发复位,阴囊缝合。2 h 后,第 2 次切开左侧阴囊,将扭转的睾丸复位固定,于复位前 30 min,腹腔缓慢注入生脉注射液 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药体积为 $0.4 \text{ mL}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ 体重,连注 7 d。生脉注射液购自江苏苏中药业集团股份有限公司(每支 20 mL),批号: 09081403。

对照组:方法同实验组,于复位前 30 min,腹腔缓慢注入等量生理盐水,连注 7 d。

1.2 取材及标本制作

于术后第 9 周处死动物,取两侧睾丸剔净附着的筋膜,冷生理盐水洗净血污后迅速置于 10% 的中性福尔马林中 4 °C 固定 24 h,石蜡包埋,4 μm 厚切片,常规苏木精-伊红(HE)染色,光镜下行病理学观察。

1.3 Bcl-2/Bax 蛋白表达检测

采用免疫组织化学 ABC 法。Bcl-2/Bax 单克隆一抗及免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒均购自北京中山生物技术公司,按免疫组化试剂盒说明书操

作, 阴性对照以 PBS 代替一抗。阳性细胞判别标准: 胞浆内呈颗粒状或均质状棕黄色, 深浅不匀。计算细胞阳性表达率。阳性表达率=视野阳性细胞数/视野总细胞数 \times 100。

1.4 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件分析, 用单因素方差分析进行各组内数据的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睾丸组织病理学观察

镜下见对照组手术侧生精小管管壁不完整, 生精上皮变薄, 层次减少, 细胞排列紊乱, 部分细胞可见核固缩, 核碎裂崩解, 可见多核细胞, 见图 1。实验组生精小管管壁完整, 生精上皮排列规则, 细胞层次清晰, 见图 2。

2.2 Bcl-2 蛋白表达

Bcl-2 的蛋白表达见表 1。对照组生殖细胞 Bcl-2 蛋白阳性表达较实验组明显减少($P < 0.01$), 且表达细胞多分布于靠近生精小管管壁部分, 阳性细胞胞质内可见散在分布的棕黄色颗粒, 见图

3。实验组则见 Bcl-2 蛋白颗粒在各级生殖细胞内均有不同程度表达, 尤以初级精母细胞和圆形精子细胞为多, 胞质内阳性颗粒分布不均, 见图 4。

2.3 Bax 蛋白表达

对照组生殖细胞 Bax 蛋白阳性表达较实验组明显增多($P < 0.01$), 结果见表 1。Bax 蛋白阳性表达见于各级生精细胞, 特别是初级精母细胞和部分圆形精子细胞呈强阳性表达, 细胞质内可见粗大分布不均的棕黄色颗粒, 同时可见胞核往往伴随着染色质的边聚和降解, 见图 5。实验组 Bax 蛋白阳性颗粒在胞质中散在分布, 呈弱阳性表达, 阳性细胞分布无明显特异性, 见图 6。

表 1 各组大鼠睾丸组织 Bax、Bcl-2 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=8$)
Tab 1 Effect of Shengmai Injection on the expression of Bax and Bcl-2 protein($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	蛋白阳性表达率/%	
	Bax	Bcl-2
对照组	79.9 \pm 2.2	30.3 \pm 0.2
实验组	25.2 \pm 1.2 ¹⁾	79.1 \pm 2.8 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$

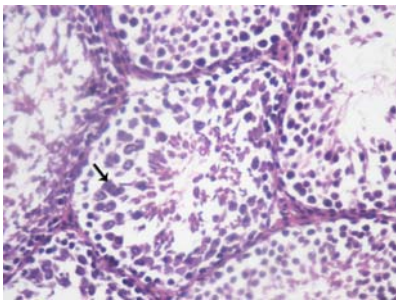


图 1 对照组睾丸组织病理切片(400 \times)
Fig 1 Seminiferous tubule walls is incomplete in the control group (400 \times)

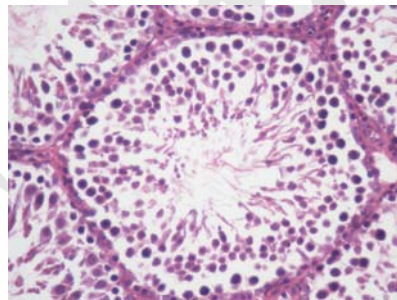


图 2 实验组睾丸组织病理切片(400 \times)
Fig 2 Seminiferous tubule walls is complete in the experimental group (400 \times)

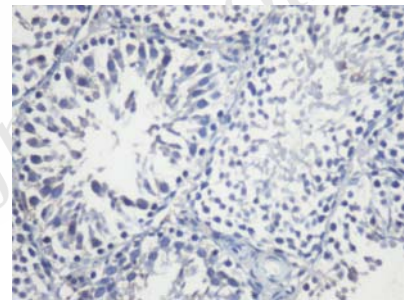


图 3 对照组 Bcl-2 蛋白在睾丸组织中的表达(400 \times)
Fig 3 Bcl-2 expression in the control group (400 \times)

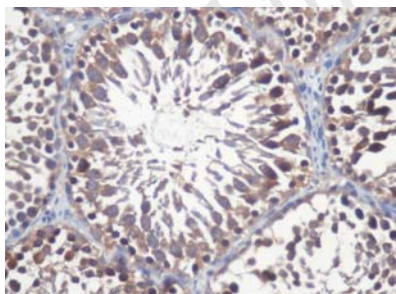


图 4 实验组 Bcl-2 蛋白在睾丸组织中的表达(400 \times)
Fig 4 Bcl-2 expression in the experimental group (400 \times)

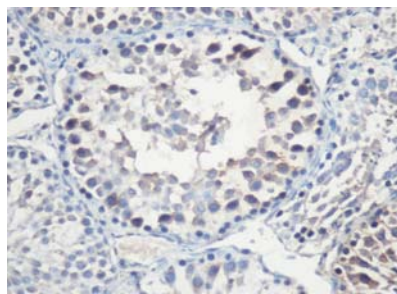


图 5 对照组 Bax 蛋白在睾丸组织中的表达(400 \times)
Fig 5 Bax expression in the control group (400 \times)

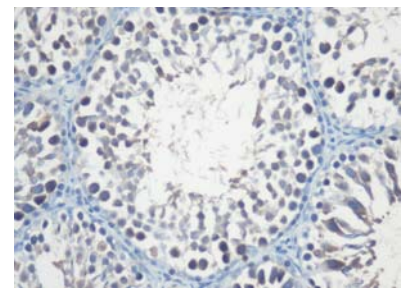


图 6 实验组 Bax 蛋白在睾丸组织中的表达(400 \times)
Fig 6 Bax expression in the experimental group (400 \times)

3 讨论

近年来, 研究证实睾丸扭转复位对其功能的损伤是一种缺血再灌注损伤, 是导致生精能力下降的主要因素。在缺血阶段, 呼吸链的电子传递受到抑制。再灌注时, 大量氧气进入睾丸细胞内, 组织内活性氧(ROS)过量生成启动了细胞凋亡程序。笔者的前期研究表明, 睾丸扭转复位后其超氧化物歧化酶(SOD)降低, 丙二醛(MDA)增高, 结果证实了睾丸组织抗氧化酶活性明显下降, 抗氧化酶系统遭破坏, 生成了过量的 ROS^[2]。ROS 一方面可介导线粒体渗透性转换孔(MPTP)的开放^[4], 促使线粒体膜间腔内细胞色素 C 释放入胞质, 活化天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶(caspase 酶类)^[5], 促进细胞凋亡; ROS 另一方面可使胞膜发生脂质过氧化反应, 影响生精细胞正常功能的发挥。

研究表明, 睾丸扭转复位后所出现的生精能力低下与生殖细胞凋亡增多有关^[6]。生脉注射液由人参、麦冬、五味子按 1:3.12:1.56 比例配伍组成。由于其具有良好疗效且不良反应极少, 临床广泛应用于治疗心血管疾病及抗休克等。生脉散总皂甙及麦冬总皂甙能抑制 PMN 被激活后产生 OFR 作用^[7]。其中人参皂甙可直接灭活黄嘌呤氧化酶, 清除氧自由基; 麦冬具有防止脂质过氧化、改善代谢作用, 五味子能直接清除活性 OFR^[8]。近来研究表明, 睾丸扭转复位后生殖细胞凋亡与 Bcl-2/Bax 蛋白表达密切相关, 生殖细胞内 Bcl-2/Bax 比值是决定细胞是否发生凋亡的因素之一^[9]。本实验研究发现, 对照组手术侧生殖细胞 Bcl-2 蛋白阳性表达较实验组明显减少, 且表达细胞大多分布于靠近生精小管管壁部分, 阳性细胞胞质内可见散在分布的棕黄色颗粒; Bax 蛋白阳性表达较实验组明显增多, 阳性表达见于各级生精细胞, 特别是初级精母细胞和部分精子细胞呈强阳性表达, 镜下调亡细胞可见核固缩及核碎裂, 生精细胞向管腔内脱落; 实验组手术侧睾丸组织 Bcl-2 蛋

白在各级生殖细胞内均有不同程度表达, 尤以初级精母细胞为多; Bax 阳性颗粒在胞质中散在分布, 呈弱阳性表达, 阳性细胞分布无明显特异性。上述结果表明, 生脉注射液能够通过调节 Bcl-2 蛋白的表达而减轻细胞凋亡, 对睾丸缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。其机制可能与生脉注射液能提高睾丸 I/R 后组织的抗脂质氧化能力, 减轻氧自由基所造成的睾丸组织损伤有关。具体作用机制、最佳给药作用时间、剂量多少等均有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] BLAIVAS M, BATTIS M, LAMBERT M, et al. Ultrasono-graphic diagnosis of testicular torsion by emergency physicians [J]. *Am J Emerg Med*, 2000, 18(2): 198-200.
- [2] ZHOU Y F, NI C C, ZHENG T T, et al. Effects of shengmai injection on testicular injury after torsion/detorsion in rats of different ages [J]. *Natl J Androl(中华男科学杂志)*, 2011, 17(2): 185-188.
- [3] TURNER T T, TUNG K S, TOMOMASA H, et al. Acute testicular ischemia result in germ cell-specific apoptosis in the rat [J]. *Bid Reprod*, 1997, 57(6): 1267-1274.
- [4] LIU Z M, ZHENG X M, LI S W, et al. The relationship between antioxidase activity and Bcl-2 expression and germ cell apoptosis following testicular torsion/detorsion in Rats [J]. *Natl J Androl(中华男科学杂志)*, 2003, 17(3): 157-159, 163.
- [5] LEMASTERS J J, NIEMINENEN A L, QIAN T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death; a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366(1/2): 177-196.
- [6] TENOVER J L. Testosterone alternative therapies of men in old ages [J]. *Natl J Androl(中华男科学杂志)*, 2001, 7(3): 141-146.
- [7] WANG H Y, YU B Y, LIU J, et al. Effects of the crude Saponins in Shengmaisan, Radix Geseng and Radix Ophiopogonis on the respiratory burst induced by different stimulants in rat polymorphonuclear leukocyte [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2001, 32(5): 384-387.
- [8] YIN X B. 40 examples about treating acute viral myocarditis using Danshen injection and Shengmai injection [J]. *J Emerg Syndromes Tradit Chin Med(中国中医急症)*, 2002, 11(5): 380.
- [9] LIU Z M, ZHENG X M, LI S W, et al. Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and bax following testicular torsion/detorsion in rats [J]. *Natl J Androl(中华男科学杂志)*, 2003, 9(1): 40-42, 68.

收稿日期: 2011-07-20