

透明质酸酶、糜蛋白酶、 α -淀粉酶动物致畸胎试验研究

李纪元 周用相(荆州 434100 湖北荆州市中心医院)

在男性不育的病症原因中,有精液液化迟缓及不液化。而精液液化因子中的蛋白酶包括了 α -淀粉酶、糜蛋白酶样酶,透明质酸酶和溶菌酶等。因此在临床上常用这些酶来直接作用于不液化精液的治疗。为了使临床在使用上更具安全性及正确指导临床用药,我们进行了这3种酶对动物精子致畸性方面的研究工作。

1 材 料

1.1 动物:Wistar 大白鼠,体重 $200 \pm 20\text{g}$;昆明种小白鼠,体重 $22 \pm 2\text{g}$;纯种大白耳兔,体重 $2.12 \pm 0.27\text{kg}$ 。

1.2 药物:糜蛋白酶(上海生化制药厂);透明质酸酶(苏州化学制药厂); α -淀粉酶(杭大性系生物制药厂)。

2 实验方法与结果

2.1 给药组设计:实验共设计了3种品系,按酶的种类分4个给药组,每组为5只动物,♀♂分组详见表1。

表1 大白耳兔、Wistar、小白鼠分组情况

| | 糜蛋白酶 | | α -淀粉酶 | | 透明质酸酶 | | 空白 | |
|------------|------|---|---------------|---|-------|---|----|---|
| | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ |
| 大白耳兔 | 4 | 1 | 4 | 1 | 4 | 1 | 4 | 1 |
| 小白鼠 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| Wistar 大白鼠 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 |

2.2 作用剂量:从胚胎形成特点器官和到达特定的时间及发育阶段,一般随剂量的增加而使畸变率提高,对于非最危险期,如果计量不当可能出现阶段性结果,就精液液化试验的剂量设计而言,属于非最危险期,因此我们设计剂量在人体公斤体重的基础上对动物使用主药扩大了4倍,以确保实验的准确性。

2.3 给药途径及方法:原则上给药途径与临床用药途径一致,将药物制成微型栓剂,推入雌性动物的阴道内,但由于大白耳兔较好控制,在给药前先♀♂分开饲养一段时间,合笼前将栓塞入到雌兔的阴道内,然后合笼交配,其准确性与人体大体一致,因此结果比较可靠。而Wistar 大白鼠、小白鼠它们交配受环境、发情期及药物不适等多方面的影响,在白天不易观察到交配过程。因此♀♂鼠合笼时先塞入一粒微型栓,每天早上及时检查有无阴栓(鼠类交配后的特别现象),用显

显微镜检查雌性鼠阴道口的精子与否,并在发现后迅速补加一次给药。

2.4 观察各胎仔的致畸情况:对已确认发生交配后的鼠及兔,与雄性分开饲养,每天观察有无异常反应,根据实验设计,共进行两胎、两代的致畸实验。第一代孕期期满后各动物产仔情况(见表2)。

表2 第一代三组酶及空白产仔情况

| | 糜蛋白酶 (只) | α -淀粉酶 (只) | 透明质酸酶 (只) | 空白 |
|------------|-------------|----------------------|--------------|----|
| 大白耳兔 | 32 | 30 | 31 | 31 |
| Wistar 大白鼠 | 24 | 23 | 23 | 24 |
| 昆明小白鼠 | 27 | 26 | 25 | 26 |

检查每只仔兔、仔鼠生长发育及成长过程,所有第一代第一胎均发育正常,无畸型,然后进行第一代第二胎试验。取实验组各动物重复第一次操作,足月共产仔兔90只,Wistar 大白鼠74只,小白鼠80只,且发育均正常无畸形。又从实验组第一胎所产的大白耳兔中按3种酶的分组随机各取雌兔2只,空白组2只,共8只仔兔,进行第二代致畸试验,待仔兔长到上述公斤体重后,重复上述试验,第二代第一胎产70只仔兔,且发育均正常无畸型。

2.5 动物安全实验:取雌性Wistar 大白鼠6只,每日2次,连续14d分别将3种酶塞入其阴道内,处死动物,取阴道、心、脑、肝、肾组织切片镜检,无急性毒性反应。

2.6 染色体检查:取糜蛋白酶组大白兔8只,其中对照组2只(亲代及第一代仔兔各1只),实验组6只(亲代1只,第一胎仔兔2只,第二代第一胎2只,第二胎1只),取抗凝血心脏血2ml,采用常规微量全血培养法,培养72h加入秋水仙素,75h终止培养,收获细胞制片,油镜下分析观察每份血样分析100个中期分裂细胞,结果见表3。

检测结果表明试验组与对照组亲代及仔代兔染色体畸变无明显区别,两者均为阴性,初步分析证明置入糜蛋白酶对亲代及仔代兔均无影响。另两种酶按同样方法培养实验,检测结果均为阴性。

3 讨 论

3.1 动物的品质要求:动物的种类及品系很多,一般

表3 染色体畸变分析结果

| | 观察中期分裂 细胞数(%) | 染色体畸变 细胞(%) | 染色单体畸变 细胞率(%) | 总畸变细胞率 (%) |
|---------|------------------|----------------|------------------|---------------|
| 对照组 | | | | |
| 亲代大白兔 | 100 | 0 | 1 | 1 |
| 第一代仔兔 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 实验组 | | | | |
| 亲代大白兔 | 100 | 0 | 1 | 1 |
| 第一代一胎仔兔 | 100 | 0 | 0 | 1 |
| 第一代一胎仔兔 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 第二代一胎仔兔 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 第二代一胎仔兔 | 100 | 0 | 1 | 1 |
| 第一代二胎仔兔 | 100 | 0 | 0 | 0 |

动物由于质量不高,往往结果重复性很差,而高质量的纯系动物它是通过遗传,育种和微生物等多方面的控制,培养出具有个体动物的遗传均一性,对外界刺激敏感和实验再现性好的实验动物。因此本实验的动物均由鄂医科院动物室提供纯系 Wistar 大白鼠、小白鼠及

纯种大白耳兔进行实验,以保证了实验的准确。

3.2 致畸试验:局部使用酶制剂促进精液液化是治疗精液液化异常的有效方法之一,本实验中的糜蛋白酶、 α -淀粉酶、透明质酸酶直接作用于精液中均可使不液化精液迅速液化,根据文献报道证实了这一点。由于这几种酶是直接作用于精液,因此生殖细胞即精子、卵子的发生,形成交配,受精,合子形成,胚胎的形成发育与分配,受药物及环境因素等可能对全过程的某一或几个阶段产生影响,造成生殖过程的损害,特别在胚胎器官形成早期比较敏感,因此这几种酶类对胚胎的致畸性研究很有必要,通过前面的试验表明,糜蛋白酶、 α -淀粉酶,透明质酸酶直接用于精液中将对胎儿不产生致畸作用,对3种酶的剂型改革如栓剂,溶液剂,泡腾剂直接作用于精子治疗男性精液液化异常带来的不育提供了有价值的参考。它比单纯肌肉注射更直接、方便。