

· 实验研究 ·

调治天癸方对不育症模型大鼠睾丸组织病理形态的观察[※]

● 袁轶峰^{1*} 朱文雄^{1▲} 沈磊² 刘涛² 陈其华¹ 周兴¹ 贺菊乔¹

摘要 目的:观察调治天癸方对腺嘌呤法不育症大鼠睾丸组织病理形态的影响。方法:Wistar成年雄性大鼠72只随机分为正常对照组、模型对照组、生精胶囊组、调治天癸方大剂量组、调治天癸方中剂量组、调治天癸方小剂量组,每组12只。除正常对照组外,其余各组均以腺嘌呤连续灌胃10天造模;从第11天开始,正常对照组和模型对照组用等量生理盐水灌胃,根据实验动物与人等剂量换算,调治天癸方大剂量组每天以(2.24g/100g)剂量的、调治天癸方中剂量组每日以(1.12g/100g)剂量的、调治天癸方小剂量组每日以(0.56g/100g)剂量的调治天癸方水煎液灌胃,连续灌胃48天。实验结束后将大鼠全部脱颈处死,解剖摘取大鼠双侧睾丸、附睾观察外观形态并称重,固定、灌流、石蜡包埋、切片、HE染色,镜检。结果:与模型对照组相比,正常对照组、生精胶囊组、大、中、小剂量治疗组的睾丸质量有显著性差异($P<0.01$);与正常对照组相比调治天癸方高、中、低剂量治疗组睾丸质量无显著性差异($P>0.05$);光镜显示下,模型对照组生精小管管壁塌陷,管腔内各级生精细胞数量减少,生精小管间质水肿,可见炎性细胞;调治天癸方各剂量组生精小管基膜轮廓变得完整清晰,基膜基本完整,管壁厚而圆,管腔内生精细胞的层次增多,排列也趋于条状,生精小管管腔中由精子细胞变态发育为精子的数量相对模型组大鼠显著增多。结论:调治天癸方可改善不育症大鼠的生精环境,增加不育症大鼠的睾丸质量。

关键词 调治天癸方;不育症;HE染色;睾丸病理形态

近年来,随着人们生活水平的普遍提高,传统的生活方式发生了较大的改变,诸如生活节奏越来越

快,工作压力、心理压力越来越大,精神压抑、暴饮暴食、长期熬夜等,使得男性生殖能力下降^[1],男性不育症的发病率逐年提高^[2],精子质量越来越差,导致男性不育症的病因日趋复杂化^[3]。如何有效提高男性生殖能力,提高精子活力成为当下关注的焦点。目前,现代医学治疗不育症的研究仍集中于人工授精、试管婴儿等辅助生殖技术及感染、梗阻等方面,临床尚无解决不育症的根本办法^[4]。中药治疗不育症历史悠久,具有创伤小、毒副作用少、效果明显等优点^[5]。我院国家级名老中医贺菊乔教授根据多年治疗男性不育症的临床经验,制定出效验方药——调治天癸方。通过前期研究及临床实践积累,发现调治天癸方能改善男性不育症,疗效确切,但具体作用

※基金项目 湖南省中医药科研计划项目(No.201832);湖南省技术创新引导计划临床医疗技术创新引导项目(No.2017SK50305);国家自然科学基金面上项目(No.81673984);湖南省男性疾病中医临床医学研究中心(No.2018SK4012)。

* 作者简介 袁轶峰,男,副主任医师。主要从事中医男科临床和科研工作。

▲通讯作者 朱文雄,男,主治医师。E-mail:957199337@qq.com。

• 作者单位 1.湖南中医药大学第一附属医院(湖南长沙410007);2.湖南中医药大学(湖南长沙410208)

机制不明确。本实验观察调治天癸方对不育症模型大鼠睾丸病理组织的影响以探讨其作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 具有生育能力 SPF 级健康成年雄性 Wistar 大鼠 72 只, 1.5 月龄, 体重(160~200)g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK-(京)2018-2019。

1.2 药品 调治天癸方, 药由酒炙黄芪、酒炙黄精、盐炒菟丝子、枸杞子、炒车前子、熟地黄、酒萸肉、紫河车等组成。由湖南中医药大学第一附属医院中药房统一提供, 并由湖南中医药大学第一附属医院煎药房统一熬制成 0.16g/mL 浓度的药液。生精胶囊, 由遵义廖元和堂药业有限公司提供, 国药准字 Z20027672, 规格: 0.4g/粒, 产品批号 20170905。

1.3 主要试剂及仪器 腺嘌呤、0.9%生理盐水、波因氏固定液: 购自长沙市化学试剂公司; 不锈钢三用电热恒温水箱, 购自北京东霞科学仪器厂; 隔水式恒温培养箱, 购自上海一恒科技有限公司; BA200Digital 数码三目摄像显微摄像系统, 购自麦克奥迪实业集团有限公司。

2 实验方法

2.1 动物分组及给药 72 只大鼠适应性饲养 1 周后, 按体重随机分为 6 组, 每组 12 只, 即模型对照组、正常对照组、调治天癸方大剂量组、调治天癸方中剂量组、调治天癸方小剂量组、生精胶囊组。除正常对照组外, 其余 5 组均按文献^[6]腺嘌呤改进法造模: 将腺嘌呤按 500mg/mL 浓度配置, 并加入与腺嘌呤 1:10 比例的阿拉伯胶助溶, 以 5mL/100g/d 剂量连续灌胃 10 天, 一次性成功。造模结束后, 停止腺嘌呤灌胃, 开始调治天癸方灌胃治疗。正常对照组与模型对照组用等量生理盐水灌胃治疗, 按人与大鼠等效剂量换算^[10], 调治天癸方组分别每日用大剂量组(2.24g/100g)、中剂量组(1.12g/100g)、小剂量组(0.56g/100g)天癸方灌胃。生精胶囊组每日用(0.48/100g)生精胶囊灌胃, 连续灌胃 48 天。

2.2 标本采集 实验结束后各组雄性大鼠采用颈椎脱位处死。处死后解剖摘取雄性大鼠睾丸、附睾, 观察外观形态并称重。摘取所有雄性大鼠睾丸, 用波音(Bouin)氏固定液固定, 睾丸固定时持续灌流, 石蜡包埋, HE 染色^[7-9], 切片、封片, 进行睾丸组织学观察。

3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 多组比较采用单因素方差分析, 方差齐性用 LSD、S-N-K 检验, 方差不齐采用秩和检验。P<0.01 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 大鼠一般情况观察 实验前各组大鼠活动自如、反应灵敏、状态良好、毛色润泽光滑。造模期间各组大鼠排尿量逐渐增加, 并随剂量加大而加重。造模后除正常对照组较实验前无明显改变外, 其余各组均表现为不同程度的活动减少、反应迟钝、抱团取暖、食欲减退、饮水量增加, 毛色枯槁等表现; “天癸方”灌胃开始到实验结束, 正常对照组与实验前无明显变化, 天癸方大、中、小剂量组较造模期均有所好转, 中剂量组改善最为明显。

4.2 大鼠性腺 与模型对照组相比, 正常对照组、生精胶囊组、大、中、小剂量治疗组的睾丸质量有显著性差别(P<0.01); 与正常对照组相比调治天癸方大、中、小剂量治疗组睾丸质量无显著性差别(P>0.05)。

表 1 各组大鼠睾丸、附睾重量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左侧		右侧	
		睾丸(g)	附睾(g)	睾丸(g)	附睾(g)
正常对照组	12	2.71±0.20	1.80±0.13	2.86±0.10	1.82±0.16
模型对照组	12	2.25±0.18*	1.71±0.15	2.27±0.08*	1.80±0.15
大剂量组	12	2.78±0.15#	1.68±0.10	2.66±0.11#	1.72±0.17
中剂量组	12	2.77±0.16#	1.70±0.16	2.67±0.22#	1.73±0.09
小剂量组	12	2.79±0.14#	1.60±0.18	2.70±0.20#	1.70±0.10
生精胶囊组	12	2.62±0.22#	1.81±0.11	2.76±0.19#	1.75±0.12

注: 与正常对照组比较, *P<0.01; 与模型对照组比较, #P<0.01。

4.3 大鼠睾丸组织 HE 染色 各组大鼠睾丸组织切片, HE 染色光镜显示: 正常对照组大鼠睾丸生精上皮完整、各级生精细胞排列规则, 血管丰富, 生精小管腔均可见大量成熟精子, 生精小管间质无充血水肿, 无炎性细胞浸润及纤维结缔组织增生(图 1A); 模型对照组睾丸生精上皮变薄、变形、部分生精小管管腔阻塞或塌陷, 生精细胞排列紊乱, 大部分曲细精管发生退化、变性、各级生精细胞变性, 数量减少细胞间隙增大, 支持细胞连接变宽, 间质水肿、轮廓不清(图 1B); 生精胶囊组和调治天癸方各剂量治疗组治

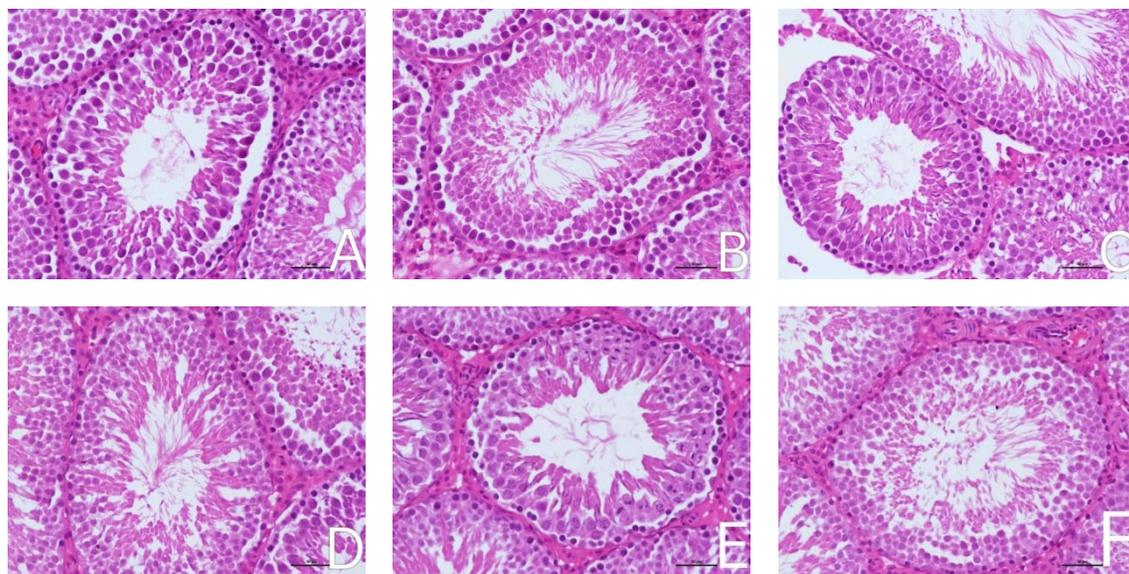


图1 200倍镜下各组睾丸组织

(A. 正常对照组 B. 模型对照组 C. 生精胶囊组 D. 天葵方大剂量组 E. 天葵方中剂量组 F. 天葵方小剂量组)

疗后(如图1CDEF)生精小管基膜轮廓变得完整清晰,基膜基本完整,管壁厚而圆,管腔内生精细胞的层次增多,排列也趋于条状,生精小管管腔中由精子细胞变态发育为精子的数量相对模型组大鼠显著增多,间质细胞成群分布于生精小管之间的疏松结缔组织内。

5 讨论

男性不育症在我国早有记载,其在古代被称为“无嗣”“不男”“男子艰嗣”“无子”“绝育”等。中医药治疗不育具有悠久的历史,尤其对男性不育的生理特点、病因病理、辨证施治等方面都有丰富的记载^[1]。但由于封建思想及失传等历史原因,尚未形成系统的独立专科。近年来男性不育治疗的研究集中于显微外科及辅助生殖技术方面,在药物治疗上方兴未艾。中药治疗不育有确切疗效,但当前传统医学在此领域的理论基础尚不完善^[12-13]。调治天葵方是由国家级名老中医贺菊乔教授根据中医肾-天葵-肾子轴的理论,结合多年临床实践总结得出来的治疗男性不育症的方剂。全方由黄芪、黄精、菟丝子、枸杞子、车前子、熟地黄、山茱萸、紫河车8味中药组成。方中黄芪甘、温,用于补中益气;黄精味甘、平,健脾益气,填精生髓;菟丝子辛甘、微温,滋补肝肾,肝肾为生殖之本;枸杞子味甘平,补肾阴而生肾精;山茱萸理肝肾;紫河车大补元气。诸药调和,填精益肾,共同作用治疗男性不育症。但具体作用效果及机制

尚不明确。其改善精子质量的作用机制尚不明晰,特别是对睾丸精子发生微环境等方面的研究尚不够深入。

本实验通过腺嘌呤法成功复制大鼠不育症模型。并随着腺嘌呤给药时间延长,模型对照组大鼠与正常对照组相比明显出现反应迟钝、抱团取暖、小便增多,类似中医肾阳虚的症状和体征。调治天葵方各组在用药48天后,大鼠活动度、反应灵敏度均有提高,且以中剂量组改善效果最为显著,提示调治天葵方能改善不育症模型大鼠的一般情况。调治天葵方各剂量治疗组睾丸质量均显著增加,与模型对照组相比,存在差异显著性($P < 0.01$)。本实验睾丸组织病理学形态观察结果显示:调治天葵方各组病理改变均轻于模型对照组,生精小管基膜轮廓变得完整清晰,基膜基本完整,管壁厚而圆,管腔内生精细胞的层次增多,排列也趋于条状,生精小管管腔中由精子细胞变态发育为精子的数量相对模型组大鼠显著增多。提示调治天葵方可增加睾丸质量、促进睾丸生精上皮的恢复、促进生殖细胞分化为成熟的精子^[14]、减轻生精小管间质水肿,最终改善性腺器官的形态结构,从而改善睾丸生精功能,提高生殖能力。生精细胞、间质细胞及和支持细胞三种细胞主要维持睾丸的生理功能^[15-16]。睾丸的生殖功能主要依赖于间质细胞和支持细胞辅助生精细胞生成精子。

综上所述,调治天葵方可明显改善不育症大鼠的生精环境,提高其生殖功能。其机制可能为促进

睾丸生精上皮的恢复^[7]、促进生殖细胞分化、减轻生精小管间质水肿,并最终改善性腺器官的形态结构,为精子的成熟提供良好的环境。

参考文献

[1]王家辉,陈东,王力,等.益精方治疗腺嘌呤法大鼠不育症动物模型的药效学研究[J].中华男科学杂志,2013,25(9):820-825.

[2]王彬,李霄,马凤富,等.左归丸对少弱精子症模型大鼠睾丸组织干细胞因子及其mRNA表达的影响研究[J].中国全科医学,2018,22(3):65-98.

[3]Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, et al. Guidelines on male infertility[S].European Association of ur0109y,2013.

[4]马凤富.左归丸治疗少弱精子型男性不育症的临床和实验研究[D].北京中医药大学,2016.

[5]孙松.左归丸治疗肾阴不足型男性不育少弱精子症的临床和实验研究[D].北京中医药大学,2018.

[6]王家辉,陈东,周建国,等.腺嘌呤制作雄性Wistar大鼠肾阳虚型不育症动物模型最佳时效和量效的小样本研究[J].中华男科学志,2008,14(6):565-570.

[7]韦丽萍.病理技术HE染色应用于病理诊断的临床分析[J].大家健康(中旬版),2017,11(11):27-32.

[8]王超.病理诊断中病理技术HE染色的应用分析[J].饮食保健,2018,5(50):78.

[9]张敏.HE染色在临床病理诊断中的应用[J].齐齐哈尔医学院学报,2011,40(4):552-553.

[10]黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.

[11]马文君.男性不育症中医证型分布及危险因素的调查研究[D].北京中医药大学,2015.

[12]王想购,张宏,孙占学,等.良医药治疗男子不育症研究进展.中华中医药学刊,2015,33(4):975-977.

[13]曲晓伟,陈帝昂,李广森,等.强精片对雷公藤所致不育症大鼠精液质量的影响及机制[J].山东医药,2017(20):34-37.

[14]蔡新,王礼文,何映.男性不育症中医证型与精液参数及血清性激素关系的初步探讨[J].中华男科学杂志2003,9(5):396-399.

[15]欧阳斌,赵玉,耿强.欧洲泌尿外科学会男性不育症诊疗指南[J].生殖与避孕,2015,35(1):9-14.

[16]EwWong, MrukDd, LeeWm, et al. Par3/par6 polarity complex coordinates apical ectoplasmic specialization and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis[J]. ProcNatIAcadSci USA, 2008, 105(28): 9657-9662.

[17]JungwirthA, GiwercmanA, TournayeH, etal. European Association of Urology guidelines on male infertility:The 2012up-date[J].Eur Urol,2012, 62(2):324-332.

(收稿日期:2019-07-29)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第63页)

(5):1391-9.

[4]Xie J, Guo L, Ruan Y, Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2010, 391(1):958-62.

[5]Grasso RJ, West LA, Guay RC, et al. Inhibition of yeast phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: reversibility of the effect and enhanced suppression in cultures of stimulated macrophages [J]. J Immunopharmacol. 1982-1983,4(4): 265-78.

[6]陈先华,牛军,郝飞.烟曲霉菌对唑类抗真菌药的耐药机制研究进展[J].中华临床医师杂志,2016, 10(3): 418-423.

[7]李蓝杨.编译,付琛.审校.棘白菌素抗真菌药物的耐药机制[J].国外医药抗生素分册,2018,39(5):430-434.

[8]张美泉.65例肺曲霉病患者的危险因素和临床特点研究[J].辽宁医学杂志,2019,33(1):63-67.

[9]刘善收,虎晓岷,杨婧,等.2013-2017年急诊重症室侵袭性真菌病菌群特点及耐药分析[J].临床急诊杂志,2017,18(8):617-621.

[10]赵文杰,席丽艳,马黎,等.马尔尼菲青霉对巨噬细胞模式识别受体TLR-2、TLR-4、Dectin-1的表达及TNF-α分泌的影响[J].南方医科大学学报,2008,28(1):37-40.

(收稿日期:2019-07-29)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第30页)

1596-1598.

[3]李凡成.鼻部炎症辨证论治规律探讨[J].湖南中医学院学报,2006(1):34-35.

[4]何慧嫦,张少聪,刘成彬,等.治肺兼以调肝胆——浅谈过敏性鼻炎的中医药治疗[J].光明中医,2009,24(2):241-243.

[5]赵翠英,周益法.过敏性鼻炎辨证施治的探讨[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2001,9(1):17.

(收稿日期:2019-06-25)

(本文编辑:蒋艺芬)