

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.19.004

丙酸睾酮对精索静脉曲张大鼠睾丸和精子的修复作用^{*}韩俊岭,汪磊,周成林[△]

江苏省泰州市人民医院临床医学检验中心,江苏泰州 225300

摘要:目的 探讨丙酸睾酮补充治疗对精索静脉曲张青春期大鼠睾丸和精子的修复作用。方法 将 30 只青春期 SD 雄性大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,通过结扎左肾静脉建立精索静脉曲张大鼠模型,假手术组、模型组大鼠每天注射 16 mg/kg 生理盐水,低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠每天分别注射丙酸睾酮 2、4、16 mg/kg,连续注射 14 d。观察各组大鼠精子活力、精子存活率、精子畸形率、脏器质量指数等相关指标。结果 模型组大鼠精子活力明显低于假手术组,中剂量组、高剂量组大鼠精子活力明显高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);低剂量组与中剂量组精子存活率明显高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);中剂量组睾丸结构有一定的恢复;中剂量组、高剂量组附睾指数明显高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);高剂量组肾脏指数明显大于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 补充中剂量的丙酸睾酮可提高精索静脉曲张大鼠精子活力和存活率,降低脏器指数,并可能通过此作用而达到改善精索静脉曲张大鼠精子质量,提高生育力的目的。

关键词:精索静脉曲张; 不育; 睾酮; 精子发生; 青春期; 大鼠

中图分类号:R697+.24

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)19-2764-04

Effect of testosterone propionate supplement on testis and sperm of rats with varicocele^{*}HAN Junling, WANG Lei, ZHOU Chenglin[△]Center of Clinical Laboratory, Jiangsu Taizhou People's Hospital,
Taizhou, Jiangsu 225300, China

Abstract: Objective To study the effect of testosterone on the testis and sperm of rats with varicocele. **Methods** A total of 30 SD rats were randomly divided into 5 groups including sham-operated group, model group, low-dose group, middle dose-group and high-dose group. Varicocele was induced by ligaturing left renal vein stenosis, rats in the sham-operated group and the model group were injected with 16 mg/kg of normal saline every day, and rats in the low-dose group, the medium-dose group and the high-dose group were injected with 2, 4 and 16 mg/kg of testosterone propionate respectively every day for 14 days. The sperm motility, survival rate, abnormality rate and viscera quality index were observed and compared in the five groups. **Results** The sperm motility in the model group was obviously lower than that in the sham-operation group, and which in the middle-dose group and high-dose group were significantly higher than that in the sham-operation group ($P<0.05$). The sperm survival rate in the middle-dose group and low-dose group were significantly higher than that of the model group ($P<0.05$). The structure of testis in the middle-dose group recovered in some degree. The testis index in the middle-dose group and high-dose group were significantly higher than that of model group ($P<0.05$). The kidney index in the high-dose group was significantly higher than that of model group ($P<0.05$). **Conclusion** Treated with the middle dose of testosterone propionate, the sperm motility and survival in rats with varicocele could be improved, and visceral index could be reduced, so this way might achieve the purpose of improving sperm quality and fertility.

Key words: varicocele; infertility; propionate; spermatogenesis; adolescent; rat

男性不育症已经成为一个世界性问题,精索静脉曲张是引起男性不育的最常见原因之一,其中成年男性发病率为 2%~22%,在精液常规检测结果异常的患者中,精索静脉曲张的患病率为 25%~40%^[1]。现

已证明精索静脉曲张可引起男性睾丸萎缩、精子产生不足、精液异常和生育力下降,但精索静脉曲张损伤精子的发生机制尚未完全阐明^[2]。有研究显示精索静脉曲张可损伤 Leydig 细胞功能,引起血清雄激素

^{*} 基金项目:江苏省泰州市人民医院院级课题(ZL201729)。作者简介:韩俊岭,男,主管技师,主要从事临床检验及男性生殖研究。 [△] 通信作者, E-mail: zjsyzcl@126.com。

合成减少^[3]。同时,附睾是性激素的应答器官,很多附睾分泌、结合的蛋白受雄激素的调控^[4],精索静脉曲张时由于睾酮降低,附睾受雄激素的调控减弱,影响精子的发育、成熟。本研究以雄激素对睾丸、精子的影响为切入点,探讨睾酮对生殖功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 30 只青春期雄性 SD 大鼠由滨州医学院动物实验中心提供,6 周龄,体质量 170~220 g,SPF 级。丙酸睾酮注射液购自上海通用药业(批号:110903)。血清促卵泡激素(FSH,KB3106)和促黄体生成素(LH,KB3130)ELISA 检测试剂盒购自上海凯博生化试剂有限公司。实验中所用其他化学试剂均为分析纯。ELISA 分析采用美国伯乐 Bio-Rad 550 型酶标仪,图像分析采用德国 Leica DMLB2 分析仪,全自动精子分析仪采用美国汉密尔顿(IVOS-CASA)系统。

1.2 方法

1.2.1 分组及精索静脉曲张手术 所有大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 6 只。购买后适应性生长 1 周,观察无异常后进行造模。模型制备参考文献^[5]的方法,经腹腔注射 80 mg/kg 的 1.5%戊巴比妥钠麻醉后,将大鼠仰卧固定于夹板上,常规消毒,行腹部正中切口,在精索静脉内侧、下腔静脉外侧及左肾静脉下钝性分离出一个开口,结扎左肾静脉,使左肾静脉直径缩小约 50%,50 000~60 000 U/kg 青霉素冲洗腹腔后逐层缝合切口、关闭腹腔,保持室温,将大鼠单笼饲养。假手术组大鼠暴露左肾静脉过程相同,但不结扎。术后 4 周,以左精索静脉最大直径大于 1 mm、左右肾质量无明显差异判定模型建立成功^[5]。以上述标准,判定造模全部成功。

1.2.2 采血及血清 FSH 和 LH 测定 术后 8 周,假手术组、模型组大鼠每天注射 16 mg/kg 生理盐水,低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠每天分别注射丙酸睾酮 2、4、16 mg/kg,连续注射 14 d。第 15 天所有大鼠经尾静脉取血。血液 4℃静置 15 min,1 500 r/min 离心 15 min,收集血清置于 4℃冰箱保存以备检测。标本收集完毕后,采用 ELISA 试剂盒检测血清 FSH 和 LH 水平。

1.2.3 精子活力、精子存活率及精子畸形率检测 取出两侧附睾,用眼科剪在附睾尾部剪一个小口收集精液,置于 37℃的 PBS 中。吸取 20 μL 精液于干净的玻片上,用全自动精子分析仪检测精子的相关指标。评估精子的活力等级,将其分为快速前向运动精子、非前向运动精子、不运动精子。累计检测 400 个精子,计算精子的总活力。精子活力=(前向运动精子数量+非前向运动精子数量)/精子总数×100%。即刻取上述精液滴加于玻片上,加等量的 1%的 HE 染液混匀,加盖玻片静置 30 s,用相差显微镜计数 400

个精子,计算存活率。将上述精液涂片,干燥后用甲醇固定 5 min,进行 HE 染色。低倍镜下找到背景清晰、精子无重叠、分布均匀的部位,用高倍镜顺序计数 400 个精子并检查精子形态,计数结构完整精子。

1.2.4 睾丸结构损伤及脏器质量指数 断颈处死大鼠后,取出睾丸、附睾、前列腺、肾脏等器官称重,计算相应器官的质量指数。质量指数=器官质量(mg)/大鼠体质量(g),并对睾丸组织做 HE 染色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两组比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠精子活力、精子存活率及精子畸形率比较 各组大鼠精子活力、精子存活率及精子畸形率相关指标均满足方差齐性,进行组间单因素方差分析,结果见表 1。模型组精子活力明显低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他 3 组用药后精子活力升高,中剂量组、高剂量组与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中以中剂量组最高,达到 $(45.75 \pm 2.58)\%$ 。模型组精子存活率明显低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$);低剂量组与中剂量组精子存活率明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组精子畸形率均明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

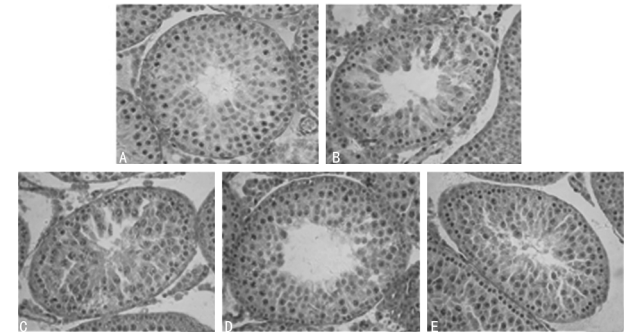
表 1 丙酸睾酮对大鼠精子生成的影响($\bar{x} \pm s, \%$)				
组别	<i>n</i>	精子活力	精子存活率	精子畸形率
假手术组	6	54.43±5.02	65.47±4.76	4.05±0.23
模型组	6	33.45±4.39*	60.09±2.59*	4.51±0.45*
低剂量组	6	34.02±3.91*	62.06±1.09*#	4.38±0.03*
中剂量组	6	45.75±2.58*#	64.17±3.75#	4.25±0.14*
高剂量组	6	37.03±1.99*#	61.98±3.02*	4.41±0.21*

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

2.2 各组睾丸组织形态学比较 假手术组睾丸生精小管内各级生精细胞排列整齐规则,结构完整,生精小管中少有脱落细胞。模型组发生精索静脉曲张后生精上皮细胞层变薄,尤其内层生精细胞明显减少,排列紊乱,且出现较多脱落的生精细胞。与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组出现生精小管增大,界膜完整性有不同程度的恢复,外形较为规则,生精细胞层数增多,结构接近假手术组,尤其在中剂量组最为明显,见图 1。

2.3 各组部分脏器质量指数比较 各组大鼠脏器质量指数满足方差齐性,逐一进行组间单因素方差分析,结果见表 2。模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠睾丸指数较假手术组明显降低,中剂量组睾丸

指数明显高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);而低剂量组、高剂量组睾丸指数与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。中剂量组与高剂量组附睾指数与模型组比较,明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组睾丸指数与假手术组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。高剂量组前列腺指数与假手术组和模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高剂量组肾脏指数与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。



注:A为假手术组;B为模型组;C为低剂量组;D为中剂量组;E为高剂量组

图 1 辜酮作用后辜丸组织变化(HE,×100,油镜观察)

表 2 各组部分脏器质量指数比较($\bar{x}\pm s$)					
组别	n	睾丸指数	附睾指数	前列腺指数	肾脏指数
假手术组	6	1.10±0.21	0.36±0.01	1.15±0.11	5.12±0.23
模型组	6	0.65±0.15*	0.30±0.09*	1.02±0.03	5.01±0.34
低剂量组	6	0.67±0.08*	0.33±0.02	1.04±0.16	5.15±0.47
中剂量组	6	0.86±0.15*#	0.37±0.05#	1.12±0.25	5.21±0.26
高剂量组	6	0.68±0.13*	0.36±0.07#	1.97±0.12*#	6.2±0.43*

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

2.4 各组血清激素水平比较 各组大鼠激素水平满足方差齐性,逐一进行组间单因素方差分析,结果见表 3。模型组血清 FSH 和 LH 水平与假手术组比较,明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),其他 3 组给予不同剂量的丙酸睾酮后其水平逐渐下降,其中中剂量组、高剂量组 FSH 和 LH 明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 各组血清激素水平比较($\bar{x}\pm s$,U/L)			
组别	n	FSH	LH
假手术组	6	2.81±0.41	4.76±0.71
模型组	6	5.35±0.46*	7.80±0.49*
低剂量组	6	4.67±0.34*	7.13±0.72*
中剂量组	6	3.16±0.79#	5.37±0.05*#
高剂量组	6	2.38±0.64#	4.36±0.07#

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

3 讨 论

精索静脉曲张影响男性生育功能,现已被 WHO 列为男性不育的首要原因^[6],该疾病日益引起人们的关注。精索静脉曲张的机制尚不完全清楚,其可以通

过多种途径影响睾丸、附睾的结构和功能,在精索静脉曲张的诸多发病机制中,精索静脉曲张对性激素水平的影响已受到重视,有学者认为精索静脉曲张患者的病理、生理变化与体内性激素的紊乱有关^[7]。抑制睾丸内睾酮的合成或释放能导致精子发育障碍,给予生理剂量的外源性睾酮能维持精子的正常发育,但是超过生理剂量的睾酮可以反馈抑制促性腺激素的分泌,使睾丸内睾酮水平下降,进而抑制精子的发生。有报道称不同剂量的睾酮能促进或抑制精子的产生^[8-10]。本研究发现,中剂量丙酸睾酮能明显增强精子的活力,当剂量达到高剂量时,精子活力反而下降,精子存活率明显降低。

本研究建立大鼠精索静脉曲张模型,观察其对相关脏器的影响,结果显示精索静脉曲张模型组睾丸出现萎缩,睾丸指数也减少,生精小管结构变得疏松,生精上皮细胞层变薄,排列紊乱,说明精索静脉曲张对睾丸组织造成了损伤,给予丙酸睾酮后,睾丸指数、生精上皮细胞层、生精小管直径均有明显改善,以中剂量组效果最好。精索静脉曲张后附睾和前列腺指数明显下降,可能是由于雄激素水平明显降低及睾丸微循环障碍所致^[11]。雄性激素的生理功能主要是刺激性器官发育并维持其功能,精索静脉曲张发生后由于血清睾酮水平降低,从而使性腺器官萎缩变小。在大剂量补充外源性睾酮后出现前列腺增大,该结果和其他报道的结果一致^[12],体现了雄性激素主要导致腺体增生的特点。大剂量补充睾酮后出现肾脏增大,猜测可能是由于用药后药物代谢负担加重及肾脏淤血,使肾脏出现代偿性增大,但具体机制需要进一步研究。

综上所述,精索静脉曲张可通过损坏睾丸 Leydig 细胞功能,从而导致其分泌的睾酮下降,睾酮通过反馈机制影响垂体 FSH 和 LH 激素的水平,最终影响睾丸生精功能的内分泌环境,使生育能力降低,本研究结果进一步证实了该假设,并且进一步发现随着丙酸睾酮剂量的增加,血清中 FSH 和 LH 的水平开始下降,甚至恢复到正常水平。值得注意的是,FSH 和 LH 的变化趋势和丙酸睾酮的剂量并不完全一致,具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] DOHLE G R,COLPI G M,HARGREAVE T B,et al. EAU guidelines on male infertility[J]. Eur Urol,2005,48(5):703-711.

[2] 李丹婷,白利鹏,蔡欣,等. 支持细胞功能状态调控精子发生的研究进展[J]. 中华男科学杂志,2018,24(9):829-833.

[3] 马林,李丹,李昀谦,等. 双酚 A 对小鼠睾丸间质细胞毒性及 miR-203-3p 表达的影响[J]. 环境与职业医学,2019,36(5):484-489.

[4] 刘明义,池宁娟,冯娟,等. 如意金黄贴对前列腺增生模型大鼠 P38、JNK2、NF-κBP65 和 STAT 3 蛋白的影响[J]. 中华男科学杂志,2018,24(12):1116-1121. (下转第 2770 页)

病变^[15],也支持了这一观点。

综上所述,本次研究表明,与对照组相比,T2DM 并发 AS 患者血清 IL-35 水平降低;Logistic 回归分析发现,IL-35 可能是 T2DM 是否伴 AS 的保护因素,LDL-C 可能是 T2DM 是否伴 AS 的危险因素,提示 T2DM 患者 AS 的发生可能与 IL-35 生物学作用减弱有关。因此,通过调控 T2DM 并发 AS 患者的 IL-35 水平,可能是延缓 T2DM 患者 AS 相关血管并发症的新途径。但是,AS 疾病是一种多因素疾病,本研究仅分析了 IL-35 在 T2DM 与 T2DM 并发 AS 患者中的表达,且本次研究样本量小,仍需大量体内外试验来进一步深入阐明 IL-35 在 T2DM 合并 AS 中的作用机制。

参考文献

- [1] AHMED M, DE WINTHER M P, BOSSCHE J V. Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes[J]. *Immunobiology*, 2017, 222(10): 937-943.
- [2] YANG W, LI Y, WANG J Y, et al. Circulating levels of adipose tissue-derived inflammatory factors in elderly diabetes patients with carotid atherosclerosis: a retrospective study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 317(1): 75-79.
- [3] RHEE S Y, KIM Y S. Peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab J*, 2015, 39(4): 283-290.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版)[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(10): 447-498.
- [5] PARK S Y, CHIN S O, RHEE S Y, et al. Cardio-ankle vascular index as a surrogate marker of early atherosclerotic cardiovascular disease in Koreans with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab J*, 2018, 42(4): 285-295.
- [6] LI X, MAI J, VIRTUE A, et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine—a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33628.
- [7] CHATURVEDI V, COLLISON L W, GUY C S, et al.

Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance[J]. *J Immunol*, 2011, 186(12): 6661-6666.

- [8] DIXON K O, VAN DER KOOIJ S W, VIGNALI D A, et al. Human tolerogenic dendritic cells produce IL-35 in the absence of other IL-12 family members[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(6): 1736-1747.
- [9] YUAN N, ZHANG H F, WEI Q, et al. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells, interleukin 10 and transforming growth factor β in newly diagnosed type 2 diabetic patients[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018, 126(2): 96-101.
- [10] LIN Y, HUANG Y, LU Z, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52490.
- [11] WANG B, DAI S, DONG Z, et al. The modulation of endoplasmic reticulum stress by chemical chaperone upregulates immune negative cytokine IL-35 in apolipoprotein e-deficient mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87787.
- [12] LI X, FANG P, YANG W Y, et al. IL-35, as a newly proposed homeostasis-associated molecular pattern, plays three major functions including anti-inflammatory initiator, effector, and blocker in cardiovascular diseases [J]. *Cytokine*, 2019, 122: 30169-30172.
- [13] KEMPE S, HEINZ P, KOKAI E, et al. Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(1): 440-447.
- [14] POSADAS-SÁNCHEZ R, PÉREZ-HERNÁNDEZ N, ANGELES-MARTINEZ J, et al. Interleukin 35 polymorphisms are associated with decreased risk of premature coronary artery disease, metabolic parameters, and IL-35 levels; the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study[J]. *Mediat Inflamm*, 2017, 2017: 6012795.
- [15] TAO L, ZHU J, CHEN Y, et al. IL-35 improves Treg-mediated immune suppression in atherosclerotic mice [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2469-2476.

(收稿日期: 2019-03-14 修回日期: 2019-05-21)

(上接第 2766 页)

- [5] 曹欢. 缺氧在精索静脉曲张导致不育中的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [6] 郭辉, 李洁, 胡文莉, 等. 部队官兵精索静脉曲张患者睾丸动脉 RI、PI 与精液质量相关性分析[J]. *空军医学杂志*, 2019, 35(1): 10-12.
- [7] 杨晓丽, 郭玲玲, 王云燕, 等. 体质量指数与不孕症患者性激素六项水平的相关性分析[J]. *山西医药杂志*, 2019, 48(11): 1267-1268.
- [8] 徐文峰, 徐硕, 马捷, 等. 高效液相色谱法用于丙酸睾酮注射液的含量测定[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(30): 134-137.
- [9] 高学勇, 林珊, 韩咪莎. 淫羊藿苷对环磷酰胺诱导生精障

碍大鼠下丘脑-垂体-睾丸轴的影响[J]. *解剖学杂志*, 2018, 41(2): 147-151.

- [10] 王一蓉, 周志宏, 汤长发. 补肾益元方对运动性低血睾酮大鼠 HPG 轴的影响及有效成分测定[J]. *中成药*, 2019, 41(4): 923-926.
- [11] 龙艳芳, 王新蕾, 王明璞, 等. 雄激素干预成年雄性大鼠中动脉阻断模型大鼠脑组织 Bcl-2、Bax 与 Cyt-C 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(27): 4344-4349.
- [12] ZEDAN H, EL-MEKHLAFI A, EL-NOWEIH A M, et al. Soluble Fas and gonadal hormones in infertile men with varicocele[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(2): 420-424.

(收稿日期: 2019-02-02 修回日期: 2019-05-10)