

益精方对腺嘌呤法大鼠睾丸组织中TGF- β 3 mRNA 及蛋白表达影响的实验研究*

吕世军¹ 陈东² 丛萃² 王家辉^{2**}

1. 辽宁中医药大学 (沈阳 110847); 2. 海南医学院

摘要 目的 观察益精方对腺嘌呤法不育症大鼠睾丸组织中TGF- β 3 mRNA及蛋白表达水平的影响。方法 选用48只健康的SPF级Wistar雄性大鼠, 2月龄, 体质量(180±20)g, 随机分为空白组、模型组、复方玄驹组和益精方组, 每组12只。除空白组外, 其余各组均以腺嘌呤1 mL/(100g·d)的剂量连续灌胃12d; 从第13天开始, 空白组及模型组用等量生理盐水灌胃, 复方玄驹组以复方玄驹胶囊水溶液灌胃, 益精方组以益精方汤剂灌胃, 每天一次, 连续20d。实验结束后处死大鼠, 摘取睾丸, 采用免疫组化技术测定大鼠睾丸组织中TGF- β 3的表达; 采用RT-PCR技术测定TGF- β 3 mRNA的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组中TGF- β 3及TGF- β 3 mRNA的表达均升高, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较, 复方玄驹组和益精方组中TGF- β 3及TGF- β 3 mRNA的表达均有所下降, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 益精方对腺嘌呤法诱导的大鼠睾丸组织中TGF- β 3及TGF- β 3mRNA的高表达具有明显的抑制作用。

关键词 益精方; 腺嘌呤; 转化生长因子 β 3; 不育, 男性

doi:10.3969/j.issn.1008-0848.2015.08.002

中图分类号

Effects of *Yijing Fang* on the expression of TGF- β 3 in testicular tissues of adenine-induced infertility rats*

Lv Shijun¹, Chen Dong², Cong Cui², Wang Jiahui^{2**}

1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Hainan Medical University

Corresponding author: Wang Jiahui, E-mail: 1002459426@qq.com; Tel: 0898-66982198

Abstract Objective To observe the influence of *Yijing Fang* on the expression of TGF- β 3 in the testis tissues of adenine-induced infertility rats. **Methods** Total of 48 SPF-grade healthy male Wistar rats with March age, weight (180±20)g, were randomly divided into four groups such as the blank group, the model group, compound *Xuanju* group, *Yijing Fang* group, 12 rats in each group. Except rats in the blank group, rats in the other groups were intragastrically administrated with a dose of 1 mL/(100g d) adenine for 12 days; On the 13th day, rats in the blank group and the model group were intragastrically treated with normal saline, and the rats in compound *Xuanju* group with compound *Xuanju* capsule aqueous gavage, and the rats in *Yijing Fang* Group with *Yijing Fang* Decoction, once a day for 20 consecutive days. After the end of the experiment the rats were sacrificed and their testis and epididymis were collected for TGF- β 3 expression analysis. **Results** Compared with that of the blank group, the expression of TGF- β 3 model group was remarkably increased, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with that of the model group, the expressions of TGF- β 3 in compound *Xuanju* group and *Yi Jing Fang* Group were all decreased, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** *Yijing Fang* may obviously inhibit high expression of TGF- β 3 in testis of adenine-induced infertility rat.

Key words *Yijing Fang*; adenine; Transforming Growth Factor β 3; infertility, male

*基金项目资助: 国家自然科学基金项目 (81260591)

**通讯作者, E-mail: 1002459426@qq.com; Tel: 0898-66982198

目前,我国约有1250万对不孕不育夫妇,男性因素所致者约占40%,这其中70%以上病因不明,即使在已知病因的男性不育中,其发病机制尚未完全阐明,因此男性不育的诊治有其复杂性和特殊性。中医学以辨证论治为主,多层次、多环节、多靶点作用于机体,在男性不育的治疗中取得了较好的疗效^[1]。益精方是贾金铭教授根据自己几十年临床经验,在千年名方五子衍宗丸的基础上化裁所得的,临床应用近20年,对男性不育症有非常好的疗效。经体内体外实验证实,TGF- β 3可以控制血-睾屏障的开启与闭合,控制精子生成过程中生精细胞向管腔的运动,从而影响精子的产生,导致男性不育症^[2]。本实验拟观察益精方对腺嘌呤法不育症大鼠睾丸组织中TGF- β 3表达的影响。

材料与方

一、实验动物

选用48只健康的、具有生殖能力的SPF级Wistar雄性大鼠,2月龄,体质量(180±20)g,购于辽宁长生生物技术有限公司,动物合格证号:SCXK2010-0001,饲养于辽宁中医药大学动物实验中心,自由饮食。

二、实验药品

复方玄驹胶囊,0.42g×54粒,施强药业有限公司,批准文号:国药准字Z20060462。益精方:桑椹20g、桑螵蛸20g、菟丝子20g、肉苁蓉12g、仙灵脾12g、黄精15g、五味子15g、当归10g、红花6g、黄芪15g、苍术12g,共11味中药组成。所有饮片的采购、药物制备及质控均由辽宁中医药大学中药制剂室完成。

三、主要试剂及仪器

腺嘌呤,购自北京市化学试剂公司;兔抗大鼠TGF- β 3抗体,购自北京博奥森生物科技有限公司;免疫组化通用Sp试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京博奥森生物科技有限公司;Trizol,购自Invitrogen公司;两步法RT-PCR试剂盒和DNA marker购自北京全式金生物技术有限公司。脱水机(LEICA300型)、石蜡包埋机(EG1150型)、切片机(LEICARM2235)型均为德国徕卡公司生产。数码显微镜(OLYMPUS BX41型)、生物显微镜(CHA型)均为日本OLYMPUS公司生产。电泳仪,北京六一仪器设备厂生产。凝胶成像分析系统,美国Alphainnotech chemi Imager。水平摇床,北京六一仪器厂。

四、分组、模型的建立及干预方法

采用随机数字表法,将48只Wistar雄性大鼠平均分为4组:空白组,模型组,复方玄驹组和益精方组,每组12只,适应性喂养5d后进行模型建造。按王家辉等^[3]腺嘌呤改进法,除空白组外,其余各组将腺嘌呤按500 mg/mL浓度配置,并加入与腺嘌呤1:10比例的阿拉伯胶助溶,以1mL/100g·d剂量连续灌胃12d;从第13天开始,空白组及模型组用等量生理盐水灌胃,复方玄驹组以复方玄驹胶囊水溶液2mL灌胃,益精方组以益精方汤剂3mL灌胃,qd,连续20d。

五、检测指标及方法

(一)免疫组织化学法检测睾丸组织中TGF- β 3表达水平

各组大鼠干预后颈椎脱位处死,解剖摘取睾丸,4%多聚甲醛固定液固定,将固定好的睾丸组织取出,自来水下充分冲洗,冲洗后经全自动脱水机脱水,石蜡包埋、切片,石蜡切片常规脱蜡,采用SP法对组织中TGF- β 3表达水平进行检测。

(二)RT-PCR法检测睾丸组织中TGF- β 3 mRNA表达水平

采用Trizol法抽提睾丸组织中总RNA,依吸光度值,取等量总RNA进行逆转录,以逆转录产物为模板,采用Tag酶,按以下程序进行PCR反应。TGF- β 3上游引物为:5'-TGCGCCCCCTCTACATTG-3',下游引物为:5'-GGTTCGTGGACCCATT-CC-3',产物长85bp。同时以 β -actin为内参照,引物序列为:上游:5'-CCAACCGTGAGAAGATGACA-3';下游:5'-TCGCCAGAATCCAGAACAAT-3',扩增产物长130bp。反应条件为:94℃预变性120s,再经94℃变性30s,65℃退火30s,72℃延伸30s共30个循环,最后72℃终延伸120s。PCR反应产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,电泳完毕,取出凝胶。在波长为254nm的紫外灯下观察,于凝胶成像系统中拍照并保存。于凝胶成像分析系统中采集图像并测定目的基因及内参基因条带的积分光密度值,以(目的基因积分光密度值/内参基因积分光密度值)比值作为统计数据,进行统计分析。

六、统计学方法

采用SPSS 10.0软件,实验数据计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验和方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠睾丸组织中TGF- β 3蛋白的表达

各组大鼠睾丸组织中TGF- β 3、TGF- β 3mRNA表达比较,从表1显示:模型组大鼠睾丸组织中TGF- β 3表达水平较空白组明显提高($P<0.01$),而复方玄驹胶囊组及益精方组有明显下调作用($P<0.05$)。

表1 各组大鼠睾丸组织中TGF- β 3表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF- β 3
空白组	10	0.13 \pm 0.01**
模型组	10	0.27 \pm 0.01
复方玄驹组	10	0.22 \pm 0.01*
益精方组	10	0.20 \pm 0.02*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

免疫组织化学结果显示,TGF- β 3蛋白在睾丸组织的表达主要分布于胞浆,在组织切片中表现为胞浆染色呈黄色或棕褐色的阳性标志。凡染色强度明显高

于背景颜色的为阳性表达。空白对照组大鼠睾丸组织中TGF- β 3蛋白表达基本呈阴性,偶见弱阳性表达细胞,胞浆呈现淡黄色(见图1A)。模型对照组大鼠睾丸组织中TGF- β 3蛋白表达呈现强阳性,阳性细胞主要分布于各级生精细胞。镜下可见大量强阳性表达细胞(见图1B)。复方玄驹胶囊组大鼠睾丸组织中TGF- β 3蛋白表达呈现阳性,阳性细胞主要分布于次级精母细胞及精子细胞,阳性细胞浆内可见黄色或褐色阳性产物。阳性细胞数略多于益精方组,但明显少于模型对照组(见图1C)。益精方组大鼠睾丸组织中TGF- β 3蛋白表达呈现阳性,阳性细胞主要分布于次级精母细胞及精子细胞,阳性细胞浆内可见黄色或褐色阳性产物。阳性细胞数明显少于模型对照组(见图1D)。

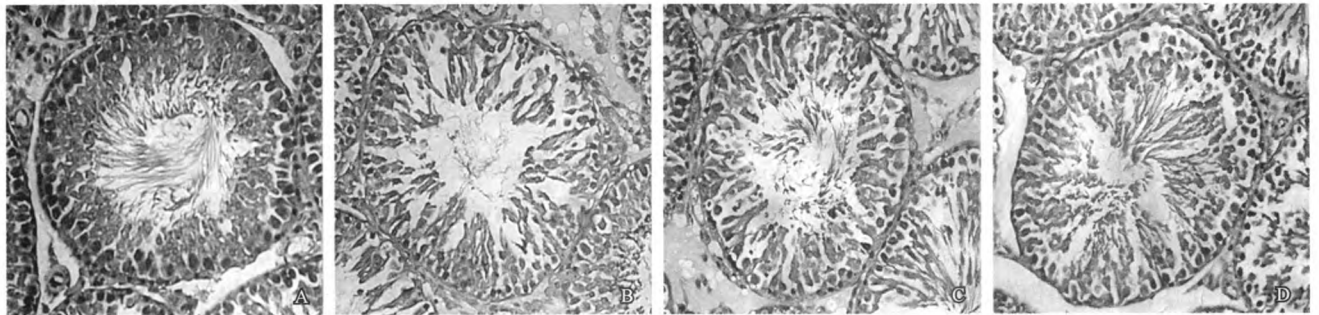


图1 免疫组织化学法检测睾丸组织TGF- β 3表达

A: 空白组大鼠睾丸生精上皮中TGF- β 3的表达(DAB, $\times 400$); B: 模型组大鼠睾丸生精上皮中TGF- β 3的表达(DAB, $\times 400$); C: 复方玄驹胶囊组大鼠睾丸生精上皮中TGF- β 3的表达(HE, $\times 400$); D: 益精方组大鼠睾丸生精上皮中TGF- β 3的表达(HE, $\times 400$)

二、RT-PCR法检测睾丸组织中TGF- β 3 mRNA表达水平结果

由TGF- β 3与内参 β -actin的扩增产物电泳结果可知,扩增产物为分子量大小约为85、130bp的两条条带,与预期结果一致(见图2)。

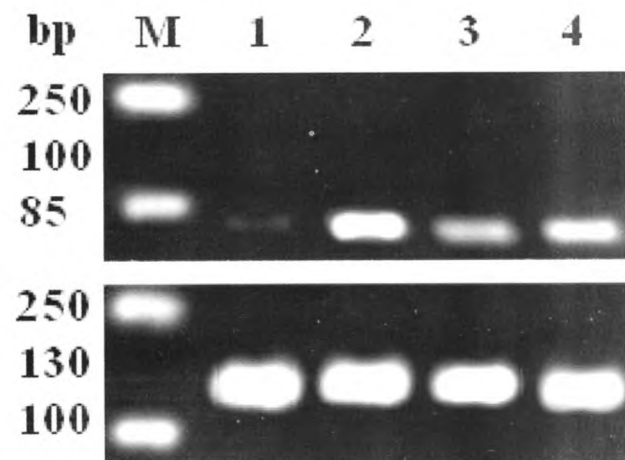


图2 TGF- β 3 mRNA扩增产物紫外凝胶成像

结果显示:与空白组比较,模型组TGF- β 3mRNA表达明显上调($P<0.01$);与模型组比较,复方玄驹胶囊组及益精方组均表现为明显的下调作用($P<0.05$), (见表2)。

表2 各组大鼠睾丸组织中TGF- β 3mRNA表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF- β 3mRNA
空白组	10	0.29 \pm 0.03**
模型组	10	0.69 \pm 0.04
复方玄驹组	10	0.54 \pm 0.04
益精方组	10	0.51 \pm 0.04*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

讨 论

本实验通过免疫组化技术和RT-PCR及紫外凝胶成像技术检测了腺嘌呤法不育症大鼠睾丸组织中TGF- β 3在蛋白和mRNA水平上的表达情况。国内外有关研究睾丸性不育动物的模型实验有多种,但有实

验表明,腺嘌呤有通过影响睾丸间质细胞中TGF- β 3的表达来抑制生精过程的作用^[4,5],因此本实验采用腺嘌呤模型。根据王家辉等^[3,6,7]的研究,确定以1mL/100 g·d剂量腺嘌呤连续灌胃12d,这是进行实验的最佳模型。模型动物从腺嘌呤灌胃开始逐渐出现发育迟缓,体质量减轻,体毛稀疏脱落且无光泽、反应迟钝、抱团取暖、少动萎靡等肾虚现象并伴有精子浓度、活力、T、LH水平等客观指标的明显下降,临床常用促生育的“益精方”有明显的调整作用。

精子发生需要在生精上皮的特殊微环境中进行,其中最为熟悉的是血-睾屏障(the blood-testis barrier, BTB),它主要由睾丸支持细胞之间的紧密连接所构成。一旦睾丸支持细胞的紧密连接受到损害就会阻碍睾丸的生精过程^[8]。目前,在睾丸支持细胞紧密连接内已经发现了三类结构膜蛋白: claudins、闭锁蛋白(occludins)和连接黏附分子JAMs,并鉴定了一些其他的周围膜蛋白,如闭合小环蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)和ZO-2等^[9]。研究证实, TGF- β 3可以与存在于支持细胞和生殖细胞中的受体结合,通过p38-MAPK信号途径下调BTB上的蛋白occludin, claudin-11、JAM-A和ZO-1的水平来干扰支持细胞紧密连接屏障,从而通过这些蛋白的表达来调控BTB的动态开放^[10-12]。BTB的有序开放有赖于occludins, claudins和连接黏附分子(JAMS)这三类结构膜蛋白的调节,从而保证精子的生成^[13]。研究发现,离体情况下, BTB的形成伴随的是TGF- β 2和TGF- β 3表达明显下降。在体实验证实,通过睾丸内注射TGF- β 3, BTB可被分解,并且这种分解是可逆的^[14]。本实验也证明了益精方对腺嘌呤法诱导的大鼠睾丸组织中TGF- β 3及TGF- β 3mRNA的高表达具有明显的抑制作用,从而改善了模型大鼠睾丸支持细胞的紧密连接状态,从这个方向阐述了益精方治疗男性不育的机制。

益精方是中国中医科学院贾金铭教授根据中医的理论,结合现代中药学的药理研究,经过多年临床经验总结出来的治疗男性不育症的方剂。全方由当归、红花、淫羊藿、菟丝子、桑螵蛸等11味中药组成。李柱等^[15]研究表明大剂量益精方干预可降低环磷酸腺苷小鼠精子的凋亡率,增加小鼠精子密度、活力,并增加精子线粒体功能,从而达到治疗少弱精子症的目的。王力等^[16]研究结果表明,益精方通过促进Bcl-2蛋白、抑制Bax蛋白的表达,抑制生精细胞的凋亡。王家辉等^[17]研究显示益精方能够改善腺嘌呤诱导的肾虚不育症大鼠的性激素水平,修复受损的生精

上皮,同时提高精子的活力和浓度。

本实验结果表明,益精方对腺嘌呤法不育症大鼠睾丸组织中TGF- β 3及TGF- β 3mRNA的表达升高具有明显的抑制作用,进而使模型大鼠睾丸支持细胞的紧密连接状态得到一定程度的恢复,其疗效与行业内公认的治疗男性不育症疗效突出的复方玄驹胶囊无显著性差异。今后将就益精方对腺嘌呤法肾虚不育症大鼠支持细胞紧密连接相关蛋白表达的影响进行研究,进而阐明该动物模型睾丸生精障碍的机制及益精方的药理作用。

参 考 文 献

- 1 王旭初,潘天明. 中医治疗男性不育研究进展. 河北中医 2012; 34(1): 148-149, 156
- 2 彭页,程义成,梅盛林,等. 电磁脉冲辐照对小鼠血-睾屏障早期影响及TGF- β 3表达意义. 中国体视学与图像分析 2007; 12(1): 11-15
- 3 王家辉,陈东,周建国,等. 腺嘌呤制作雄性Wistar大鼠肾虚型不育症动物模型最佳时效和量效的小样本研究. 中华男科学杂志 2008; 14(6): 565-570
- 4 Jung JC, Park GT, Kim KH, *et al.* Differential expression of transforming growth factor-beta in the interstitial tissue of testis during aging. *Cell Biochem* 2004; 92(1): 92-98
- 5 Ingman WV, Robertson SA. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 2002; 24(10): 904-914
- 6 贾金铭,王家辉,李森恺. Adenine 制作雄性Wistar 大鼠不育症动物模型最佳时相的小样本研究. 中医学药刊 2006; 24(2): 197-198
- 7 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. 中华男科学杂志 2013; 19(9): 820-825
- 8 蒋洪涛,梁芳,邵竹雄,等. 哺乳动物睾丸细胞间连接的动态调控. 中国细胞生物学学报 2011; 33(4): 415-421
- 9 赵勇,张远强. 睾丸支持细胞紧密连接的动力学调控. 细胞生物学杂志 2004; 26(2): 133-138
- 10 Xia W, Wong EW, Mruk DD, *et al.* TGF-beta3 and TNFalpha perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. *Dev Biol* 2009; 327(1): 48-61
- 11 Yan HH, Mruk DD, Lee WM, *et al.* Blood-testis

- barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and re-cycling in Sertoli cells. *FASEB J* 2008; 22(6): 1945-1959
- 12 Lui WY, Lee WM, Cheng CY. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* 2001; 142(5): 1865-1877
- 13 Setchell BP. Blood-testis barrier, functional and transport proteins and Spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2008; 636: 212-233
- 14 秦茂, 张秀平, 刘保兴. 细胞因子调控睾丸支持细胞紧密连接的研究进展. *中国男科学杂志* 2014; 28(10): 65-67
- 15 李柱, 罗少波, 贾金铭, 等. 益精方对小鼠精子线粒体功能的影响. *中国男科学杂志* 2014; 28(10): 10-14
- 16 王力, 陈东, 闵泽, 等. 益精方对不育症大鼠睾丸生精细胞凋亡及Bcl-2、Bax蛋白表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2014; 34(5): 602-605
- 17 王家辉, 陈东, 贾金铭, 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. *中华男科学杂志* 2013; 19(9): 820-825

(2015-03-01收稿)

(上接第7页)

- 15 Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154(8): 3821-3835
- 16 Ohman J, Magnusson B, Telemo E, *et al.* Langerhans cells and T cells sense cell dysplasia in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas--evidence for immunosurveillance. *Scand J Immunol* 2012; 76(1): 39-48

(2015-07-01收稿)