

巴戟天低聚糖改善不育症小鼠生殖能力的作用研究^{*}

赵 君¹, 杨 欣^{2△}

(1. 广东省妇幼保健院, 广东 广州 510010; 2. 广州医科大学附属第五医院, 广东 广州 510070)

摘要: **目的** 探讨巴戟天低聚糖(oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis*, OMO)对小鼠生殖能力的保护作用。**方法** 实验分为 5 组, 对照组(蒸馏水)、模型组(肾阳虚组)、巴戟天低聚糖(OMO)低、中、高剂量治疗组(分别含药 0.02g、0.04g、0.08g, 灌胃给药)。采用“劳倦过度、房事不节”法复制小鼠肾阳虚模型。给药 6 周后, 观察生殖激素水平及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量。**结果** 肾阳虚小鼠灌胃 OMO 中、高剂量治疗后血促卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)、促性腺激素释放激素(GnRH)均明显升高($P<0.01$), 小鼠睾丸组织匀浆 MDA 浓度明显降低, 而 SOD、GSH-Px 浓度明显升高($P<0.01$)。**结论** OMO 可能通过调节垂体-下丘脑-性腺轴的功能来调节生精过程, 并且增强体内抗氧化酶活性, 增强睾丸功能, 从而发挥抗氧化作用, 保护睾丸精子免受氧化损伤。

关键词: 巴戟天低聚糖; 肾阳虚; 生殖激素; 抗氧化作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)01-0007-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.01.002

Study on Oligosaccharide Extracted from *Morinda officinalis* Improve the Reproductive Ability of Mice

ZHAO Jun¹, YANG Xin^{2△}

(1. Guangdong Maternal and Child Health Care Hospital, Guangzhou 510010, China;

2. The Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510070, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the effect of oligosaccharides of *Morinda officinalis* to protect the reproductive ability of mice. **Methods** The test were randomly divided into five groups, control group (constant volume distilled water), model group (deficiency of kidney yang), oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis* high-dose, medium-dose and low-dose groups group (the dosage of OMO was 0.02 g, 0.04 g, 0.08 g, respectively) with intragastrical administration. The mice model was induced by tired excessive sex not section method. After 6 weeks, the reproductive hormone levels, MDA, SOD and GSH-Px in mice were detected. **Results** The middle and high does of oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis* group was compared to the model group as follows: the containments of FSH, LH, T and GnRH in the blood became higher ($P<0.01$), containment of MDA in the epididymis tissue was lower, and concentrations of SOD and GSH-Px increased ($P<0.01$). **Conclusion** The oligosaccharides of *Morinda officinalis* might regulate the function of spermatogenic process by regulating the pituitary-hypothalamus-gonadal axis, and enhance the body antioxidant activity and epididymis, and thus play a role in the protection of epididymal sperm from oxidative damage.

KEY WORDS: oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis*; deficiency of kidney yang; reproductive hormone; antioxidant

目前, 不育症是影响全球男女生育的世界性问题^[1]。据 WHO 估计, 全世界约 15% 夫妇面临不育问

题, 在这些不育夫妇中, 男性不育患者占 50% 以上, 且比例呈逐年上升趋势^[2], 严重影响患者家庭的幸

^{*} 基金项目: 广州医科大学校级科研项目(2016C28)

收稿日期: 2018-01-18

作者简介: 赵君(1981-), 女, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 围产医学与生殖医学。

△通信作者: 杨欣, E-mail: chemist_yx@163.com

福。我国不育比率也逐年上升,预防和治疗不育症将迫在眉睫^[3]。巴戟天低聚糖^[4-5](oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis*, OMO) 是从补肾要药巴戟天^[6]中经提取、纯化分离制备的有效成分。现代药理研究显示 OMO 成分具有改善生殖系统药理学活性^[7-14]。鉴于 OMO 可明显改善精子的质量,促进精子发育,增强其活力,现通过小鼠体内实验对其治疗不育症作用进行探讨,为治疗男性不育临床制剂开发与应用提供一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57 BL/6 小鼠,6 周龄左右,体质量 16~20 g;由广东省医学实验动物中心提供,饲养环境 SPF 级,动物合格证号 SCXK(粤)2008-0085。

1.1.2 主要试剂及药品 戊酸雌二醇片,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号 189A;OMO,按前期已建立的方法自制^[4-5],低聚糖含量 58.04%,批号 20141101;促卵泡刺激素 FSH(货号 CEA830Mu)、黄体生成素 LH(货号 CEA441Mu)、睾酮 T(货号 CEA458Ge)生殖激素 ELISA 试剂盒(美国 USCN 公司);超氧化物歧化酶 SOD(货号 A001-3)、丙二醛 MDA(货号 A003-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px(货号 A003-1)检测试剂盒(南京建成科技有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 BP211D 电子天平(德国 Sartorius),Thermo D-37520 型高速冷冻离心机(德国 Heraeus);酶标仪(瑞沃德生命科技有限公司);紫外可见分光光度计(VARIAN Cary 50 probe);佳美 SK-1 快速混匀器(江苏金坛市佳美仪器厂);FK-AJJ-2 组织捣碎匀浆机(江苏金坛市佳美仪器厂)等。

1.2 方法

1.2.1 动物准备 雌鼠每天灌胃戊酸雌二醇混悬液 0.5 mL(含药 0.00468 mg),以阴道涂片检查角化细胞证实动情期的出现^[15]。将每只雄鼠与 6 只动情期雌鼠共笼,次日取出有阴道栓雌鼠笼中的雄鼠为实验用雄鼠。

1.2.2 实验分组与模型建立 将 30 只雄性 C57 BL/6 小鼠用计算机取随机数法随机等分为对照组、模型组、OMO 低、中、高剂量治疗组。对照组:常规饲养,每天以蒸馏水 0.4 mL 灌胃。模型组(肾虚组):采用

“劳倦过度、房事不节”法^[16];每天强迫小鼠游泳至无力而下沉时捞出,以诱导劳倦过度,每只雄鼠与 6 只动情期雌鼠共笼,以诱导房事不节。每天以蒸馏水 0.4 mL 灌胃。OMO 低、中、高剂量治疗组:造模方法同模型组。每天以 OMO 溶液 0.4 mL 灌胃,低、中、高剂量分别含药 0.02、0.04、0.08 g,给药 6 周后对各组小鼠进行指标测定。

1.2.3 生殖激素测定^[17] 采取摘除眼球的方式采血,4 ℃静置 4 h 后,低温离心(4 ℃,4 000 rpm × 15 min)分离血清,-20 ℃冻存待测,用酶标免疫法测定血清中促卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)的含量。断头后迅速取出下丘脑,用酸性甲醇匀浆,取适量上清液冷冻干燥,用放射免疫法测定其促性腺激素释放激素(GnRH)的含量^[18]。

1.2.4 氧化应激指标的测定^[19] 取小鼠睾丸组织用 4 ℃、0.9%的生理盐水在冰水浴中制成 5%的组织匀浆,将匀浆 3 000 r/min 离心 10 min,取组织匀浆上清液分别采用黄嘌呤氧化法、硫代巴比妥法、5,5'-二硫对硝基苯甲酸比色法测定 MDA、SOD、GSH-Px 的水平。

1.2.5 统计学分析 应用统计学软件 SPSS 22.0 处理,各项检测指标数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 生殖激素的变化 6 周后,模型组与对照组相比 FSH、LH、T、GnRH 均明显下降;OMO 各治疗组与模型组相比 FSH、LH、T、GnRH 均明显恢复。见表 1。

2.2 MDA、SOD、GSH-Px 含量的变化 6 周后,模型组与对照组相比 MDA 浓度明显升高($P < 0.01$),模型组与 OMO 中剂量治疗组相比浓度均显著降低($P < 0.01$),OMO 高剂量治疗组与对照组相比 MDA 无明显变化($P > 0.05$);模型组与对照组、OMO 中剂量治疗组相比 SOD、GSH-Px 浓度均显著降低($P > 0.01$),OMO 高剂量治疗组与对照组相比无明显差别($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

正常生理状态下下丘脑释放激素,垂体促激素及周围激素处于相对平衡^[20]。在下丘脑-垂体-靶腺轴调节功能的紊乱期血浆 FSH 和 LH 均见降低^[21]。本研究

表 1 OMO 对肾阳虚小鼠生殖激素的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	FSH/(mIU·mL ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	T/(ng·mL ⁻¹)	GnRH/(pg·mL ⁻¹)
对照组	1.53±0.10	4.78±0.11	15.22±0.38	9.34±0.21
模型组	1.18±0.11**	3.37±0.25**	10.28±0.37**	5.50±0.32**
低剂量治疗组	1.22±0.09**	3.94±0.31**▲▲	11.09±0.42**▲▲	5.96±0.35**▲
中剂量治疗组	1.48±0.08*▲▲	4.33±0.17**▲▲	14.43±0.2**▲▲	7.10±0.36**▲▲
高剂量治疗组	1.61±0.08▲▲	4.57±0.14*▲▲	15.10±0.30▲▲	7.96±0.35**▲▲
<i>F</i>	7.744	12.645	17.861	24.575
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组比较,▲*P*<0.05,▲▲*P*<0.01

表 2 OMO 对肾阳虚小鼠睾丸匀浆氧化应激水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(U·L ⁻¹)
对照组	1.78±0.14	20.48±0.73	427.25±10.05
模型组	6.66±0.60**	12.49±0.52**	203.75±8.85**
低剂量治疗组	5.84±0.69**	13.45±0.70**	300.50±11.73**▲▲
中剂量治疗组	3.38±0.52**▲▲	16.74±1.06**▲▲	321.25±10.75**▲▲
高剂量治疗组	2.50±0.17▲▲	19.78±0.75▲▲	448.50±11.03▲▲
<i>F</i>	14.125	21.837	42.394
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组比较,▲*P*<0.05,▲▲*P*<0.01

实验结果提示肾阳虚小鼠灌胃 OMO 治疗后血清 FSH、LH、T、GnRH 均明显升高,表明 OMO 对小鼠生殖的功能改善与下丘脑对性腺轴功能的调节作用密切相关,OMO 治疗肾阳虚小鼠可促进各种生殖激素的分泌,改善精子功能。这与沈自尹^[22]早期曾提出的肾阳虚与神经内分泌免疫系统(NEIS)有关,肾阳虚表现有下丘脑-垂体-靶腺轴调节功能的紊乱等观点一致。

不育症的临床表现^[23-25]精子运动能力、存活率和低渗肿胀率下降以及精子 DNA 损伤,从而引起男性不育,其病因与氧化应激有关。机体自身存在抗氧化系统,包括 MDA、SOD、GSH-Px 等抗氧化酶。一旦抗氧化平衡系统被破坏或不足,造成机体氧化损伤^[26]。MDA 是细胞膜脂质过氧化反应的终产物,常作为细胞氧化损伤程度的标志物^[27]。SOD 能清除氧自由基,是机体内最重要的抗氧化酶,对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要作用。GSH-Px 通过和还原酶的作用,互相转化,具有清除自由基电子的功能,也是衡量氧化应激的一个指标^[28]。为了验证下丘脑-垂体-靶腺轴调节功能的紊乱与机体是否存在氧化应激反应,以

MDA、SOD、GSH-Px 3 个氧化酶关键指标来检测小鼠精子氧化损伤程度。采用“劳倦过度、房事不节”法造肾阳虚小鼠模型,6 周后检测发现睾丸组织匀浆中 MDA 浓度与对照组相比显著升高,SOD、GSH-Px 浓度与对照组相比显著降低,表明肾阳虚小鼠精子受到氧化损伤;经 OMO 治疗后的小鼠睾丸组织匀浆检测其 MDA 浓度与造型组相比明显降低,而 SOD、GSH-Px 浓度与造型组相比显著升高,以上结果提示 OMO 可通过抗自由基抗脂质氧化等作用,提高活性氧清除酶的活性,降低脂质氧化产物含量,降低精子的畸形率,对精子膜结构和功能具有明显的保护作用。由于巴戟天中低聚糖类成分复杂,对于其单一成分或多成分共同协同作用的抗氧化治疗不育症的作用机制有待后续进一步研究阐明。

参考文献:

[1] JUNGWIRTH A,DIEMER T,DOHLE G R,et al. Guidelines on male infertility [S]. European Association of Urology,2013.

[2] DADA R,GUPTA N P,KUCHERIA K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligo-

- zoospermia and azoospermia[J]. Biosci, 2003, 28: 163–168.
- [3] 张久妹. 全面二孩高龄妊娠面临的问题与挑战[J]. 母婴世界, 2015(23): 156–157.
- [4] 杨欣, 宋健平, 关业枝, 等. D-900 型大孔吸附树脂纯化巴戟天低聚糖有效部位的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 16–19.
- [5] 杨欣, 宋健平, 关业枝, 等. 响应面法优化巴戟天低聚糖提取工艺[J]. 中国药房, 2015, 26(34): 4847–4850.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 81–82.
- [7] 林芳花, 林励, 肖凤霞, 等. 巴戟甲素对正常雄性小鼠交配能力和免疫器官系数的影响 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(22): 1924–1926.
- [8] 丁平, 梁英娇, 刘瑾, 等. 巴戟天寡糖对小鼠精子生成作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(19): 1467–1470.
- [9] DI LING CHEN, NING LI, LI LIN, et al. Confocal micro-Raman spectroscopic analysis of the antioxidant protection mechanism of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* on human sperm DNA [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(1): 119–124.
- [10] WU Z Q, CHEN D L, LIN F H, et al. Effect of bajijiasu isolated from *Morinda officinalis* F. C. how on sexual function in male mice and its antioxidant protection of human sperm[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 164: 283–292.
- [11] ZHAO J, YANG X, CHEN D L, et al. In vitro confocal Raman micro-spectroscopic approach to screen the mode of action of Chinese herbs on oxidative damaged human sperm [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2016, 47(7): 749–756.
- [12] 宋斌, 王玮. 巴戟天水提液有效萃取成分促进微波致雄性大鼠生殖损伤的修复[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26(2): 115–121.
- [13] 吴吉文, 高学勇, 王玮. 巴戟天对环磷酰胺诱导的大鼠睾丸生精功能的影响[J]. 解剖学杂志, 2016, 39(1): 39–42.
- [14] 李容, 张永红, 王凤娟, 等. 巴戟天对微波辐射致雄性大鼠生精障碍的作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(22): 5–9.
- [15] 李震, 刘黎青, 颜亭祥, 等“劳倦过度、房室不节”肾阳虚模型小鼠睾丸乳酸脱氢酶-X 活性的测定 [J]. 天津中医药, 2008, 25(2): 136–138.
- [16] 朱庆均, 肖丽, 杨军, 等. 基于 Fas/FasL 途径的金匱肾气丸对肾阳虚模型睾丸细胞凋亡的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017(2): 272–276.
- [17] 江凡, 邹建华, 张修发. 生殖激素测定在男性不育病因学诊断中的临床价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2014(16): 1361–1363.
- [18] 阎彬彬, 任淑军, 杨军, 等. 谷氨酸对雄性大鼠下丘脑 GnRH 基因表达的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(4): 270–272.
- [19] 杨欣. 巴戟天低聚糖的制备工艺、质量及其对 AD 模型保护机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [20] 王文健, 沈自尹, 张新民, 等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究[J]. 中医杂志, 1986(4): 32–36.
- [21] 苏洁, 陈素红, 吕圭源, 等. 杜仲及菟丝子对肾阳虚大鼠生殖力及性激素的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(9): 1087–1090.
- [22] 沈自尹. 肾的研究(续集)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 313.
- [23] 焦瑞宝, 唐吉斌. 氧化应激与男性不育[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 13–15.
- [24] 刘影, 田浩明. 氧化应激与糖尿病[J]. 华西医学, 2007, 22(1): 194–196.
- [25] 谢福贤, 翟国敏, 文海平, 等. 活血补肾法对改善不育症患者精子 DNA 损伤的临床研究 [J]. 国医论坛, 2017, 32(6): 29–31.
- [26] KERR M E, BENDER C M, MONTI E J. An introduction to oxygen free radicals[J]. Heart Lung, 1996, 25(3): 200–209.
- [27] 谭迎春, 陈子江. 补肾活血中药对弱精子症大鼠抗氧化作用的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(4): 231–233.
- [28] MIN Y N, NIU Z Y, SUN T T, et al. Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene[J]. Poult Sci, 2018, 97(4): 1238–1244.