

# 大鼠睾丸白膜下注射 12 种昆明山海棠单体 对其附睾尾精子影响的观察<sup>△</sup>

周激文 骆毅<sup>√</sup> 彭林 潘汝能 刘黎闻 张宪民 吴大刚

R 169.41

**摘要** 本研究通过向 Wistar 大鼠睾丸白膜下注射从昆明山海棠乙醇提取物(TH<sub>5</sub>)中分离而得的 12 种单体化合物进行抗生育活性初筛。结果表明,其中 4 种单体 THF、TH<sub>3</sub>、TH<sub>7</sub>和 T<sub>8</sub>能使大鼠附睾尾精子计数明显下降(P<0.01),最后,并讨论了这种初筛方法的可取与不足之处。

**关键词** 昆明山海棠 大鼠 抗精子发生剂 附睾尾 精子计数

Observation of effect on the epididymal caudal sperms after  
subalbuginea testis injection of 12 monomer compounds isolated  
from *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch. in rats

ZHOU Jiwen, LUO Yi, PENG Lin, PAN Runeng, LIU Liwen, ZHANG Xianming\*, WU Dagang\*  
Yunnan Family Planning Institute, Kunming 650021  
\* Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science

**ABSTRACT** Injection into subalbuginea testes in Wistar rats was used as a screening method for the antifertility activity of 12 monomer isolated from the ethanol extract(TH<sub>5</sub>)of *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch. In control groups, the rats were injected with 7.5% ethanol 0.1ml or with gossypol 0.5 or 1.0mg/7.5% ethanol 0.1ml for per testis. In experimental groups, the rats were injected with a simple 1.0mg/7.5% ethanol 0.1ml respectively. Once a week for 2 weeks, on the 15th day brought up for anatomy. The results showed that THF, TH<sub>3</sub>, TH<sub>7</sub>, and T<sub>8</sub> compounds significantly reduced the number of sperms in rat epididymal cauda (P<0.01), furthermore, THF and T<sub>8</sub> also reduced the sperm motility (P<0.05). The preliminary screening by means of this method bears many advantages, such as less sample and animal used, short experimental cycle, easiness for comparison and repetition.

**Key Words** *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch Rat Antispermato-genesis agent

实验研究表明,昆明山海棠(*Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch)的乙醇提取物 TH<sub>5</sub> 对雄性成年 Wistar 大鼠有明显的抗生育作用<sup>[1]</sup>。近年来,我们以 TH<sub>5</sub> 为基础,开展了精细的化学分离工作,获得了 20 种单体化合物。鉴于现行的男用避孕药筛选周期长,所需动物及样品

用量大,目前也无一种简便的体内筛选方法,为了排除没有抗生育活性的单体,我们参考 Wiebe 等<sup>[2]</sup>的方法并在许焯等指导下,通过向大鼠睾丸白膜下注射昆明山海棠单体进行了初筛。

本文主要介绍大鼠睾丸白膜下注射筛选方法(简称睾内注射),以及注射 12 种昆明山海棠单体化合物后对大鼠附睾尾精子计数与活率等的影响,并对本方法的改进提出建议,以期能加快昆明山海棠男性抗生育药研究的进程。

本研究为国家计划生育委员会资助项目  
作者单位:650021 昆明云南省计划生育科研所(周激文、骆毅、彭林、潘汝能、刘黎闻);中国科学院昆明植物研究所(张宪民、吴大刚)

## 材料与方法

1. 动物: 选用体重 250~300g、能明显触及两侧睾丸(约 2cm 长, 相当于人体睾丸测量模型的 2~3 号大小)的 Wistar 大白鼠, 置普通合格动物房内饲养, 自由进水进食。随机分为对照组与试验组, 分批试验。

2. 单体样品: 采用现代物理和化学方法, 从昆明山海棠的抗生育有效部位 TH<sub>3</sub> 中分离获得。12 种结构各不相同的单体化合物, 其化学成分与雷公藤男性抗生育研究中的环氧二萜内酯化合物也不尽相同。用于阳性对照的消旋棉酚由江苏省计划生育研究所许焯惠赠。

3. 剂量: 因各单体化合物皆不溶于水, 故先用无水乙醇助溶。空白对照组大鼠每侧辜内注射 7.5% 乙醇 0.1ml; 阳性对照组大鼠每侧辜内注射棉酚 0.5 或 1.0mg/7.5% 乙醇 0.1ml; 试验组大鼠每侧辜内注射单体 1.0mg/7.5% 乙醇 0.1ml。各注射液均于用前配制。配液时按无菌原则操作, 分次加入注射用水稀释并充分研磨。

4. 注射方法: 固定大鼠两侧辜丸, 常规消毒阴囊皮肤后, 选择辜丸长轴与横轴正中相交处, 避开皮下血管, 用结核菌素注射器及  $4\frac{1}{2}$  注射针头, 垂直穿刺阴囊皮肤进入白膜下(此时有一“落空”感)。将针头与辜丸长轴平行, 紧贴白膜下推进 3~4mm, 缓缓注入药液。每鼠每周注射一次, 共两次。

5. 实验室检查: 于首次注射后第 15 天, 用乙醚麻醉大鼠, 取出两侧辜丸与附辜。剔除多余结缔组织后, 在 5 分钟内完成辜丸称重(扭力天平)和用卡尺测量其长径与横径(a 与 b, cm), 随即用 Bouin's 液固定辜丸。同时, 将左侧附辜尾部置 2ml Tyrode's 液中(用前配制, pH7.8, 于 37℃ 备用)剪碎, 37℃ 恒温 5 分钟, 取上层液 0.02ml 加入 0.38 ml 精子稀释液中, 按 WHO 实验室手册中的精液分析标准<sup>[3]</sup>, 进行精子计数、精子活动率与精子活动级别的检查。然后, 按公式  $V = 1/4\pi ab^2K$  ( $K = 0.9$ )<sup>[4]</sup> 计算辜丸容积。已固定辜丸作石蜡包埋, 常规制片, HE 染色, 光镜

下检查。

各组数据, 均采用 *t* 检验进行统计学分析。

## 结 果

1. 大鼠辜丸白膜下注射昆明山海棠各单体化合物后对其附辜尾液的精子计数、活率与活动级别的影响: 表 1 显示, THF、TH<sub>3</sub>、TH<sub>17</sub> 和 T<sub>8</sub> 单体可使大鼠附辜尾的精子计数明显下降 ( $P < 0.01$ ), THF 与 T<sub>8</sub> 单体同时可使其精子活动率下降 ( $P < 0.05$ )。若加大棉酚的剂量, 则对大鼠附辜尾精子计数与活率的影响更明显。

2. 大鼠辜丸白膜下注射昆明山海棠单体化合物后对辜丸重量与大小的影响(表 2): 这 12 个单体化合物中, 除 TH<sub>3</sub> 和 TH<sub>17</sub> 组大鼠的辜丸重量减少 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ), 其余无明显改变。

表 1 大鼠辜丸白膜下注射昆明山海棠单体对精子的影响( $\bar{x} \pm s$ )

列号	组别	标本数	剂量 (mg)	精子计数 ( $\times 10^6/ml$ )	精子活动率 (%)	活动级别 (0~3)
V	对照	6		61.5±9.1	77.8±6.6	2.3±0.5
	棉酚	6	0.5	38.5±9.1**	56.5±27.3	2.0±0.6
	THA	8	1.0	56.4±5.9	82.8±4.1	3.0±0.0
	THF	6	1.0	40.7±12.3**	64.0±11.2*	2.2±0.4
	TH <sub>3</sub>	6	1.0	32.2±8.3**	74.2±2.8	3.0±0.0
	TH <sub>17</sub>	6	1.0	31.5±7.6**	71.0±6.6	2.7±0.5
VI	对照	6		47.5±7.5	79.2±4.8	3.0±0
	棉酚	6	1.0	8.2±1.9**	7.7±6.6**	1.0±0
	T <sub>1</sub>	6	1.0	47.6±6.0	75.3±4.3	3.0±0
	T <sub>6</sub>	6	1.0	45.5±6.7	70.5±6.3	3.0±0
	T <sub>7</sub>	6	1.0	45.2±9.2	47.1±34.1*	2.7±0.5
	T <sub>8</sub>	6	1.0	26.7±4.5**	64.5±3.4*	3.0±0
VII	对照	6		53.3±10.0	80.5±4.6	3.0±0
	棉酚	6	1.0	16.0±15.3**	10.0±16.7**	0.3±0.5
	T <sub>12</sub>	6	1.0	51.2±3.0	72.3±5.4	3.0±0
	T <sub>15</sub>	6	1.0	52.8±6.1	79.2±6.2	3.0±0
	T <sub>16</sub>	6	1.0	42.8±5.7	79.7±5.0	3.0±0
	T <sub>22</sub>	6	1.0	50.3±4.5	77.7±7.1	3.0±0

注: 与同批对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (表 2 同)

3. 大鼠辜丸白膜下注射昆明山海棠单体化合物对其辜丸组织病理学的影响(图 1, 2): 检查发现除个别对照组与试验组外, 多数辜丸均受到不同程度的破坏, 但光镜下的生殖病理学

表 2 大鼠睾丸内注射昆明山海棠单体后的  
睾丸重量与容积变化 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

列号	组别	剂量 (mg)	睾丸重量 (g)	睾丸容积 (ml)
V	对照		1.5±0.3	2.6±0.9
	棉酚	0.5	1.5±0.2	2.2±0.4
	THA	1.0	1.5±0.2	1.9±0.2
	THF	1.0	1.7±0.3	1.9±0.2
	TH <sub>3</sub>	1.0	1.1±0.1**	1.6±0.3
	TH <sub>17</sub>	1.0	1.1±0.2*	1.9±0.3
	TH <sub>4</sub>	1.0	1.4±0.3	2.1±0.2
VI	对照		1.4±0.3	2.1±0.2
	棉酚	1.0	1.0±0.1**	1.4±0.5
	T <sub>4</sub>	1.0	1.4±0.0	2.3±0.4
	T <sub>6</sub>	1.0	1.4±0.1	2.2±0.3
	T <sub>7</sub>	1.0	1.4±0.1	1.9±0.4
	T <sub>8</sub>	1.0	1.3±0.2	2.1±0.6
	T <sub>12</sub>	1.0	1.2±0.1**	1.7±0.2*
VII	对照		1.4±0.1	2.4±0.2
	棉酚	1.0	1.2±0.1**	1.7±0.2*
	T <sub>12</sub>	1.0	1.6±0.1	2.9±0.4
	T <sub>15</sub>	1.0	1.5±0.2	2.6±0.4
	T <sub>16</sub>	1.0	1.3±0.1	2.5±0.6
T <sub>22</sub>	1.0	1.5±0.1	2.7±0.3	

改变却大同小异。主要表现为曲细精管内的各级生精细胞数量减少,变性、坏死、脱落、消失,腔内无精子发生;生精上皮细胞排列紊乱,精子发生严重受阻;间质血管充血及有少许出血,部分曲细精管间有不等的炎性细胞浸润和(或)异物巨细胞反应等。其中,尤以棉酚组大鼠的睾丸病变发生率、病变程度及受损范围最为明显。

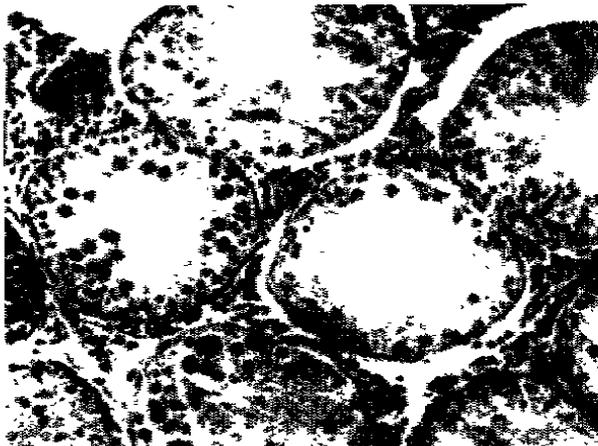


图 1 TH<sub>3</sub> 组大鼠睾丸。示曲细精管腔内生精细胞排列紊乱、数目减少,精子发生受阻滞 ( $\times 20$ )



图 2 棉酚组大鼠睾丸。示曲细精管腔内的多核巨细胞及精原细胞明显消失 ( $\times 40$ )

## 讨 论

1. 对筛选结果及大鼠睾丸白膜下注射筛选法的初步评价:关于棉酚对雄性大鼠的抗生育效果,已早有定论<sup>[5]</sup>,与本实验结果一致。根据向大鼠睾丸白膜下注射 12 种昆明山海棠单体化合物后对其附睾尾液精子的检查表明,THF、TH<sub>3</sub>、TH<sub>17</sub>和 T<sub>8</sub>4 种单体可使其精子计数明显下降 ( $P < 0.01$ ),而且 THF 和 T<sub>8</sub> 还对其精子活动率有抑制作用 ( $P < 0.05$ )。将这几种单体的上述作用与睾丸白膜下注射棉酚对大鼠附睾尾精子的影响相比,除 T<sub>8</sub> 外,其间无明显差异;与口服昆明山海棠乙醇提取物 TH<sub>5</sub> (116mg/kg) 30 天后,导致大鼠附睾尾精子计数明显减少的结果完全一致<sup>[1]</sup>。特别值得一提的是这 4 种昆明山海棠单体对大鼠睾丸曲细精管精原细胞的损伤,均比棉酚轻,故而上述受损睾丸的结构与功能,可能也易于恢复正常。因此,我们认为,能像棉酚和 TH<sub>5</sub> 那样对大鼠的精子计数与活率表现明显抑制作用的单体,即为初筛具有潜在抗生育活性的单体。关于 TH<sub>3</sub> 和 TH<sub>17</sub> 组大鼠的睾丸重量明显小于其它组大鼠,究其原因,不排除是单体本身的毒副作用对睾丸的影响所致。至于睾丸内注射后出现的睾丸重量减轻或容积变小和睾丸组织学破坏之间有何关系,因所见例

数太少(每组仅一鼠),目前尚难以定论。本研究结果显示:采用大鼠睾丸白膜下注射法进行初筛,不仅可及时发现有抗生育活性的样品,而且还能预测其毒副作用提供某些参考依据。虽然此法难以成为常规给药方式而应用于临床,但与其它男用避孕药物的筛选方法相比(如体外细胞培养等),因其试验周期短,动物和样品用量小,且无需特别技术和条件,确不失为一种经济、易行、便于重复的筛选方法。

2. 大鼠睾丸白膜下注射法可望改进的几点技术:由于注射产生的物理作用,如穿刺损伤、液体静压力变化等,也对睾丸组织产生影响,甚而将干扰免疫功能<sup>[7]</sup>。因此,今后倘能以某种无创伤性的方式,通过直接或快速渗透的作用向睾丸内给药,也许会降低由此种非特异性因素所致的干扰。此外,由于注射液中含有助溶剂乙醇,尽管其浓度仅为 7.5%,但也无法排除注入乙醇后对睾丸生精细胞的毒性作用<sup>[8]</sup>。另一方面,由于注射量小,要求药物的溶解度大,故而限制了某些药物的影响,可能会发生“漏筛”。因此,对初筛判为阳性的样品,则有必要按常规筛

选法对其有效性进行验证并作有关免疫学检测。今后,如能找到一种既能溶解样品又不会对睾丸产生毒性或抑制作用的溶剂,则大鼠睾丸白膜下注射法在生殖医学与环境监测等领域中的应用前景将更为广阔。

### 参 考 文 献

- 1 周激文,骆毅,潘汝能,等.昆明山海棠对雄性大鼠的抗生育初试报告.云南医药,1991,12:232.
- 2 Wiebe JP, Barr KJ, Buckingham KD. Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. Contraception, 1989, 39: 447.
- 3 WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Singapore, Published Press Concern, 1980: 9-12.
- 4 郭贤坤,陈炳石,吕学洋.输精管结扎术后睾丸体积变化的研究.临床泌尿外科杂志,1987,2:51.
- 5 薛社普主编.男用节育药棉酚的实验研究.北京:人民卫生出版社,1983:218.
- 7 Alexander NJ, Anderson DJ. Immunology of semen. Fertil Steril, 1987, 47: 192.
- 8 李曼,安勃.酒精对男性生殖系统的影响(综述).国外医学.计划生育分册,1990,3:156.

(收稿:1993-03-11 修回:1993-06-14)

## 作者书写计量单位须知

本刊实行法定计量单位,建议作者在写稿或修稿时参照《法定计量单位在医学上的应用》(中华医学会编辑出版部编),对计量单位按下列不同情况进行适当处理。

一、如某组分在文中只出现一二次,可以分别先写法定计量单位数值,其后加括号注旧制单位数值。

二、如某组分在文中多次出现,应在正文首次出现时先写法定单位数值,后加括号注新制正常参考值,和(或)易于心算的新变旧换算系数,例如全血葡萄糖 8.4mmol/L(1 μmol=118 mg/dl,正常参考值 3.9~5.6mmol/L),下文可以只写法定单位数值,不必再加括号注旧制单位数值,如该组分首先出现在表格上,应在表内列法定单位数值,且在表下注出该组分的换算系数及新制正常参考值,以后的表和正文不必再加注释。

三、以 mEq/L 表示浓度的一、二价元素,可在首次出现时加括号注旧制单位数值,如钾 4.1mmol/L(4.1mEq/L),钙 2.1mmol/L(4.2mEq/L),下文不必再注旧制单位数值。

四、血压、眼压、脑脊液压的数值逐个先写法定单位数值,后加括号注旧制单位数值,例如:血压 20.0/12.0 kPa (150/90 mmHg)。

五、血红蛋白、红细胞数、白细胞数、血小板数、白细胞分类可只列新制数值,如:中性粒细胞 0.81,不必加括号注 81%。

六、注意事项:(1)所有计量单位符号一律用正体,不加缩写点。(2)以科学家姓氏命名的单位,其符号第一个字母用大写字母,大于 10<sup>3</sup>(千)的词头和升(L)单位独出现时也用大写,其他均用小写。(3)词头不得单独用以表示单位,如 μ 应改为 μm。(4)词头不得重复使用,如 mmμm 应改为 nm。(5)词头不得与单位符号间有间隙,如 m m 应改为 mm。(6)C 不得拆开,如 37 C 不得写 37°C。

本刊编辑部