

大鼠附睾尾部的精子参数与灌服 昆明山海棠乙醇提取物后的改变 及其抗生育效果观察

周激文 骆毅 潘汝能 刘黎闻 罗宁云 彭林 张宪民 吴大刚

摘要 本文报告 37 只 Wistar 成年大鼠附睾尾部的三项精子参数值及季节等因素对精子参数的影响, 并与每日灌服昆明山海棠乙醇提取物 TH_5 (116mg/kg) 30 天后的 21 只大鼠的改变及生育力进行比较。结果表明: 对照组大鼠左、右侧附睾尾部的三项精子参数值虽各不相等但无明显差异 ($P>0.05$), 与 TH_5 组停药 20 天后剖检的大鼠相比, 上述各项精子参数值间有极显著差异 ($P<0.01$), 且所有服药大鼠完全丧失生育力; 对照组于 4~6 月剖检的大鼠其精子活力明显低于 1~3 和 9~12 月剖检的大鼠; 用于生殖研究的大鼠的体重 $>400\text{g}$ 或睾丸容积 $>3.5\text{ml}$ 、 $<1.0\text{ml}$ 均可对精子质量有不良影响; 至于停药 TH_5 70 天后剖检的大鼠, 其精子参数值和生育力与对照组无异。

关键词 精子 昆明山海棠 抗生育 大鼠

Changes in sperm parameters in the cauda epididymides and antifertility effect after treatment with TH_5 in rats

ZHOU Jiwen, LUO Yi, PAN Runeng, LIU Liwen, LUO Ninyun,
PENG Lin, ZHANG Xianming*, WU Dagang*

Yunnan Family Planning Institute, Kunming 650021

* Kunming Institute of Botany, Academy of Science of China

Abstract This paper reports the changes of three sperm parameters of the cauda epididymides and fertility in 37 adult male Wistar rats, after treatment by garage with TH_5 of *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch. in ethanol extract in 21 rats ($116\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{d} \times 30\text{d}$). The studies showed that sperm parameters in the left and right sides of the cauda epididymides of the control rats were not significantly different ($P>0.05$), but were very significantly different ($P<0.01$) when compared to rats 20 days after discontinuation of treatment. All tested rats lost their fertility completely. In the control rats, the sperm motility of the cauda epididymis of rats killed in April~June were markedly lower than those of killed in other months. We found that the rats with body weight over 400g, with testis-volume above 3.5ml or under 1.0ml, can affect the sperm quality of the cauda epididymis. However, the sperm parameters and fertility in rats 70 days after discontinuation of treatment with TH_5 showed no difference from the controls.

Key words Sperm *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch. Antifertility Rats

近年来, 对大鼠的精子参数观察成为生殖医学及有关毒理学检测中的主要项目之一。鉴于大鼠每次射出的精液量仅 0.5~1ml 左右^[1], 故而除经输精管冲洗收集大鼠精子外^[2], 也可取大鼠附睾尾部的精子进行观察。我们对健

康 Wistar 成年大鼠经附睾尾部采集精子, 参考 WHO 的精液分析方法, 做了精子计数、

本课题为国家计划生育委员会和云南省科委资助项目
作者单位: 650021 昆明 云南省计划生育科学研究所
(周激文、骆毅、潘汝能、刘黎闻、罗宁云、彭林); 中国科学院昆明植物研究所(张宪民、吴大刚)

精子活率与活动度的检查。并与灌服昆明山海棠提取物 TH₅ 后的大鼠进行了比较, 以为评价昆明山海棠对雄性大鼠的抗生育作用提供初筛依据。

材料与方法

1. 动物与分组: 选用健康、体重为 200~300g 的 Wistar 成年大鼠, 饲养于本所普通合格动物房(一级)内, 自由进水进食, 每天光照 12 小时。适应性饲养一周后随机分为对照组与服药组进行试验。

2. 药物与剂量: 抗生育活性筛选物 TH₅ 系昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch.] 根的乙醇提取物经层析划定部位, 由中国科学院昆明植物研究所提供。对照组雄鼠每天灌服载体剂 1% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 1.0ml; 服药组雄鼠每天灌服 TH₅ 116mg/kg+1% CMC 1.0ml, 共 30 天。

3. 精子参数各项检查: 于灌液 30 天后, 各组雄鼠分别按 1:1 与成年未交配过的适龄雌性大鼠合笼 20 天。自合笼次日起, 以上午 8:00~9:00 阴道涂片发现精子为妊娠第一天。为防止漏检, 无论涂片发现精子与否, 均于合笼的第 21 天(雄鼠停药 20 天后)剖检雌鼠, 统计妊娠率及死活胎仔数。雄鼠用乙醚麻醉后开腹, 循两侧输精管取出睾丸与附睾, 剔除多余组织后, 取附睾尾部置 2ml Tyroid 液(用前配制, pH 7.8, 于 37℃ 备用)中剪碎, 37℃ 恒温 5 分钟, 取上层液 0.02ml 加入 0.38ml 精子稀释液(碳酸氢钠 5.0g, 甲醛 1.0ml, 加蒸馏水至 100ml), 参照 WHO 实验

室手册中的精液分析方法^[3], 对大鼠附睾尾部的精子进行计数、活率及活动度检查。同时, 将各大鼠的睾丸置扭力天平上称重及游标卡尺测量其长径(a)与横径(b), 按公式 $V = 1/4\pi ab^2K$ ($K=0.9$) 计算睾丸容积^[4]。继之, 将睾丸和部分右侧附睾组织用 Bouin 液固定, 常规制片, 光镜下检查。部分服药大鼠于第一次合笼剖检雌鼠后, 经饲养 30 天又再次按 1:1 与成年未交配过的雌鼠合笼 20 天才解剖(停药 70 天组), 所有各项检查指标同上。

4. 数据统计: 对各组大鼠的检查数据, 均按 *t* 检验进行统计学分析。

结 果

1. Wistar 成年大鼠附睾尾部的三项精子参数值及组间比较: 从表 1 可见, 对照组大鼠左、右侧附睾尾部的精子参数值虽各不相等, 但无显著差异($P>0.05$)。停药 TH₅ 20 天后剖检的大鼠, 其附睾尾部的精子参数明显低于对照组大鼠任何一侧附睾尾部的精子参数($P<0.01$), 所有服药大鼠完全丧失生育力。停药 TH₅ 70 天后剖检的大鼠, 其附睾尾部的各项精子参数及生育力则与对照组无异。

2. 不同月份剖检的 Wistar 成年大鼠附睾尾部的精子参数及其比较: 由表 2 可见, 在对照组中, 除发现 4~6 月剖检的大鼠附睾尾部精子活力(活率+活动度)明显低于其它月份剖检的大鼠($P<0.05$, $P<0.01$)外, 余无明显差异。但停药 TH₅ 20 天后于 10~12 月剖检的大鼠附睾尾部的三项精子参数, 无论和对照组中任一月份组相比均有显著差异($P<0.01$),

表 1 Wistar 成年大鼠附睾尾部三项精子参数值($\bar{x} \pm s$)及其组间比较

组 别	<i>n</i>	精子计数 ($\times 10^6 / \text{ml}$)	精子活动率 (%)	精子活动度 (0~3 级)	雌鼠妊娠率 (%)
对照组 左侧+右侧	54	59.09 \pm 22.49	69.89 \pm 18.46	2.76 \pm 0.55	93
左侧	37	61.46 \pm 23.86	66.62 \pm 21.19	2.68 \pm 0.63	
右侧	17	50.41 \pm 9.97	76.41 \pm 5.97	2.94 \pm 0.24	
TH ₅ 组 左侧					
停药 20 天后	15	16.93 \pm 9.94*	23.53 \pm 16.47*	1.53 \pm 0.52*	0
停药 70 天后	6	60.17 \pm 7.76	69.5 \pm 3	3.0 \pm 0	6/6

注: 与对照组相比 * $P<0.01$

表 2 不同月份剖检的 Wistar 成年大鼠左侧附睾尾精子参数值($\bar{x} \pm s$)及其比较

剖检月份	n	精子计数 ($\times 10^6 / \text{ml}$)	精子活动率 (%)	精子活动度 (0~3 级)
对照组				
1~3 月	12	54.58 \pm 11.16	74.17 \pm 5.13	2.92 \pm 0.29
10~12 月	16	67.63 \pm 32.38	75.93 \pm 8.5	2.94 \pm 0.25
4~6 月	9	59.56 \pm 16.68	41.56 \pm 30.01 [*]	1.89 \pm 0.78 [*]
TH ₅ 组				
10~12 月(停药 20 天后)	15	16.93 \pm 9.94 ^{**}	23.53 \pm 16.47 [*]	1.53 \pm 0.52 [*]
1~3 月(停药 70 天后)	6	60.17 \pm 7.76	69.5 \pm 3.78	3.0 \pm 0

注: 对照组组内相比或对照组与 TH₅ 组相比, ^{*} $P < 0.01$, ^{**} $P < 0.05$

$P < 0.05$); 停药 TH₅ 70 天后于 1~3 月剖检之大鼠附睾尾部的精子参数值则与对照组大鼠相近, 其精子活力也同样高于 4~6 月剖检的对照组大鼠。

3. Wistar 成年大鼠附睾尾部的精子参数与体重的关系及其比较: 由表 3 可见, 对照组体重 201~300g 与 301~400g 的大鼠相比, 虽然在其附睾尾部的精子计数与活率间均无差异 ($P > 0.05$), 但在这两种精子参数与其体重比值间则有明显差异 ($P < 0.01$), 体重越大所得上述比值越小。停药 TH₅ 20 天后剖检的体重为 300~400g 大鼠和对照组两个体重组大鼠相

比, 无论是附睾尾部的精子参数或精子参数与其体重比值间均有显著差异 ($P < 0.01$)。

4. Wistar 成年大鼠附睾尾部的精子参数与睾丸重量、大小的关系及比较: 由表 4 可见对照组大鼠的左右侧睾丸重量、大小和 TH₅ 组大鼠相比无显著差异 ($P > 0.05$)。但对照组大鼠中左右侧附睾尾部的精子活率与睾丸容积比值间有显著差异 ($P < 0.05$)。停药 TH₅ 20 天后剖检的大鼠, 所有精子参数与其睾丸重量、大小的比值, 与对照组任一侧相比均有显著差异 ($P < 0.01$)。停药 TH₅ 70 天后剖检的大鼠, 上述各项比值与对照组比较无显著差异

表 3 不同体重的 Wistar 成年大鼠左侧附睾尾精子参数值及其与体重比值($\bar{x} \pm s$)和组间比较

大鼠体重 (g)	n	精子计数 ($\times 10^6 / \text{ml}$)	精子计数 / 体重	精子活动率 (%)	精子活动率 / 体重
对照组					
201~300	6	54.0 \pm 15.97	0.20 \pm 0.05	76.16 \pm 11.72	0.27 \pm 0.04
301~400	10	48.3 \pm 4.62	0.14 \pm 0.02 [*]	77.7 \pm 6.41	0.22 \pm 0.02 [*]
TH ₅ 组					
301~400(停药 20 天后)	10	13.0 \pm 8.22 [*]	0.04 \pm 0.02 [*]	17.9 \pm 12.78 [*]	0.05 \pm 0.04 [*]

注: 对照组组内相比或对照组与 TH₅ 组相比 ^{*} $P < 0.01$ 表 4 Wistar 成年大鼠附睾尾精子参数及其与睾丸重量大小比值($\bar{x} \pm s$)及组间比较

组别	n	睾丸重 (g)	精子计数 / 睾丸重	精子活率 / 睾丸重	睾丸容积 (ml)	精子计数 / 睾丸容积	精子活率 / 睾丸容积
对照							
左侧	37	1.80 \pm 0.49	35.81 \pm 14.74	40.8 \pm 17.33	2.59 \pm 0.77	24.55 \pm 8.86	27.4 \pm 10.48
右侧	17	1.60 \pm 0.29	32.43 \pm 7.96	48.94 \pm 8.42	2.29 \pm 0.53	23.43 \pm 7.3	34.83 \pm 7.38 [*]
TH ₅ 左侧							
停药 20 天后	15	1.57 \pm 0.2	10.44 \pm 5.56 ^{**}	14.62 \pm 9.63 ^{**}	2.32 \pm 0.41	7.19 \pm 3.97 ^{**}	10.01 \pm 6.89 ^{**}
停药 70 天后	6	1.5 \pm 0.29	40.81 \pm 5.56	48.07 \pm 8.66	2.3 \pm 0.6	27.4 \pm 6.4	31.87 \pm 7.76

注: 对照组左右侧相比, ^{*} $P < 0.05$; 对照组与 TH₅ 组相比, ^{**} $P < 0.01$

($P > 0.05$)。

讨 论

本结果表明, Wistar 正常成年大鼠左右侧附睾尾部的三项精子参数值虽各不相等, 但其间并无显著差异(表 1)。因此, 我们认为无论取哪侧附睾尾部进行统一检测, 都不影响对其精子参数的分析与评价。值得一提的是, 在对照组大鼠中发现有一鼠左侧附睾尾部的精子活率为零, 在今后的避孕药物筛选等生殖试验中, 应采取相应措施, 以免影响分析。人们对大鼠的季节性繁殖已早有认识。可是, 对季节与大鼠精液质量之间的关系则尚无资料予以证明。本结果发现于 4~6 月剖检的大鼠, 其附睾尾部的精子活力明显低于 1~3 月和 10~12 月, 可能是造成盛夏大鼠繁殖率低的原因之一。欲排除气温变化的干扰, 就应将用于生殖研究的大鼠置于恒温恒湿的房内饲养。我们在不同体重组的对照大鼠中, 发现大鼠体重大于 400g, 或大鼠体重相近但其睾丸容积大于 3.5ml、小于 1.0ml 均可使其精子质量下降。再者, 成年大鼠睾丸过小(<1.0ml)必定与其睾丸发育不良或组织结构缺陷有关。因此, 在生殖医学试验中, 尤应注意认真选择体重与睾丸大小适宜并有生育能力的大鼠, 并考虑到各地季节气候间的迥异, 以防受试大鼠本身存在的生精功能障碍的干扰。

近年来, 我们从昆明山海棠根的乙醇提取物中先后获得了 TH₄、TH₅ 等 14 种粗提物。从这些粗提物中分离得到的三萜等单体成分, 有的与雷公藤的乙醇提取物 GW 相同, 有的则结构或(和)含量不同^[5]。为了减少昆明山海棠乙醇提取物可能产生的毒副作用, 本研究所用的 TH₅ 已被去除了其中所含生物碱成分。经我们用 Wistar 成年雄性大鼠进行抗生育活性筛选, 表明受试雄鼠灌服 TH₅ 后的生育率为零, 其附睾尾部的三项精子参数值均远低于对照组。停药 TH₅ 70 天后的大鼠其生育力又可完全恢复, 证明 TH₅ 对雄性大鼠的抗生育

作用具有良好的效果及可复性。

按 WHO 的 MB-50 筛选规程要求, 服药后的雄鼠应按 1:2 与未交配过、处于动情前期的雌鼠合笼进行交配试验。合笼后雌鼠经每天阴道涂片两个动情周期未查到精子, 需更换雌鼠重新进行交配试验(但每一服药雄鼠只限于作两次交配试验)。其目的在于防止漏检。本研究在初筛中仅按 1:1 与不明动情周期的雌鼠合笼 20 天, 由此显然会出现假阳性。本结果表明, 只要同批交配的对照组雌鼠妊娠率 >90%, 再经统计学处理有显著差异, 按国内现行的筛选标准判断, 仍可对所筛样品作出初步评价和为是否按 MB-50 规程进行深入验证提供导向。此外, 本研究中用服药后的雄鼠与雌鼠进行交配试验, 未做停药次日附睾尾部精子参数的检测。这样, 停药时间愈长, 漏检的可能也愈大。从本组的初筛结果分析, 停药 TH₅ 20 天后剖检的所有试验组大鼠附睾尾部的三项精子参数, 依然明显低于对照组($P < 0.01$), 证明 TH₅ 不但有抗生育活性, 而且揭示此种抗生育作用在停药 20 天后仍可维持其有效性。故而, 据此可排除因“延长期”而导致的假阴性。很显然, 要阐明 TH₅ 的确切有效性、起效时间、量效关系等, 有必要按 WHO 的惯例, 深入验证 TH₅ 的抗生育活性, 并按卫生部新药评审的要求, 系统进行昆明山海棠抗生育药的研究。

参 考 文 献

- 1 施新猷编著. 医用实验动物学. 西安: 陕西科学出版社, 1988. 362.
- 2 Srivastava A. Gupta G. Setty BS. Studies on mechanism of antifertility action of gossypol in rat and hamster. Contraception. 1989, 39:337.
- 3 WHO. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Singapore Published Press Concern, 1980. 9-12.
- 4 Dias PLR. The effects of vasectomy on testicular volume. Br J Urol. 1983, 55:83.
- 5 张宪民, 吴大刚, 周激文, 等. 昆明山海棠齐墩果烷型三萜成分. 云南植物研究, 1993, 15:92.

(收稿: 1994-04-14 修回: 1994-07-26)