

补肾强精颗粒剂的药效学研究

倪崖¹,陈文颖¹,李春波²,袁玉英¹,毛伟²,陈璋辉¹,石其贤^{1*} (1.浙江省医学科学院,杭州 310013;2.浙江医药股份有限公司新昌制药厂,浙江 新昌 312500)

摘要:目的 对具有温肾助阳、补肾育精和血补气、回春固本作用的补肾强精颗粒剂进行有关的男性不育症药效学研究。方法 以肉苁蓉、制何首乌、海龙、狗鞭、仙茅、菟丝子、补骨脂等 10 味中药组成的补肾强精颗粒剂为试验材料,采用乙酸棉酚造模大鼠研究其对精子生成、精子活率及其活力的作用,试验其药效作用。结果 补肾强精颗粒剂可显著地增加乙酸棉酚造模大鼠精子数量、精子活率及其活力,并能增强精子对毛细管的穿透能力。体外试验证明,可直接提高豚鼠精子活力及其受精能力。结论 该方剂具有一定的补肾助阳功能,使用该方剂可用于治疗因少精子症、弱精子症和少精子伴弱精子症所致的男性不育症。

关键词:补肾强精颗粒;乙酸棉酚;男性不育

中图分类号:R285.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)04-0268-04

Study on pharmacodynamics of Bushen Qiangjin granules

NI Ya¹, CHEN Wen-ying¹, LI Chun-bo², YUAN Yu-ying¹, MAO Wei², CHEN Zhang-hui¹, SHI Qi-xian^{1*} (1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. Zhejiang Medicine Co., Ltd. Xinchang Pharmaceutical Factory, Xinchang 312500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the therapy effect of Bushen Qiangjin granules (BSQJG) on oligozoospermia, asthenozoospermia and oligoasthenozoospermia in rat induced by gossypol. **METHODS** Gossypol acetic acid was given to male adult rats by oral three-day at a dosage of 50mg/kg for 15 days, and then BSQJ with various dosage from 5g/kg to 10g/kg was given to the rats-pretreated using gossypol on everyday for one month. Spermatogenesis in testis and sperm maturation in cauda epididymis were evaluated for the therapy effect of BSQJ. **RESULTS** BSQJ granules obviously increase the sperm quantity, improve their viability and enhance their motility on rat infertility model caused by gossypol acetic acid. Furthermore, it can also promote the ability that sperm penetrate the medium in the capillary tube. It directly enhance the guinea pig sperm motility and their fertilization ability at the same time in vitro. **CONCLUSION** BSQJ granules can be used to cure the male infertility caused by oligozoospermia and asthenozoospermia.

KEY WORDS: Bushen Qiangjin granules; gossypol acetic acid; male infertility

受精是精子与卵子相互结合并形成合子的过程。它包括一系列严格有序、协调发育、精卵相互作用的复杂过程。不育的原因最常见的是精子或卵子有缺陷,或生殖细胞的遗传物质异常,导致受精失败,或胚胎不能正常发育而流产^[1]。补肾强精颗粒剂由肉苁蓉、制何首乌、海龙、狗鞭、仙茅、菟丝子、补骨脂等 10 味中药组成,临床试验初步表明,对治疗因少精子症、弱精子症和少精子伴弱精子症所致的男性不育治疗效果为:治愈率为 20%,显效率 22.9%,总有效率达 85.7%^[2]。为进一步按国家新药开发的规范要求进行研发,我们较全面地研究了该方剂的药效学功能。大量的实验和临床研究证明,棉酚可明显地抑制大鼠及人睾丸精子发生和附睾精子成熟,导致生育力下降^[3-5]。本试验以乙酸棉酚诱发大鼠睾丸生精障碍为模型,结合豚鼠精子的体外实验,观察补肾强精颗粒剂对大鼠及豚鼠睾丸生精过程和附睾精子

功能的作用。

1 实验材料

1.1 动物

雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 56 只,体重 170~180g,由浙江省实验动物中心提供,持有有效合格证(浙医实验动物 96001 号,以下同)。雄性豚鼠 5 只,体重 750~850g,由浙江大学医学院实验动物供应中心提供,持有有效合格证书(证号 96002)。

1.2 药物

补肾强精颗粒剂由浙江省医学科学院药物研究所药剂研究室制备并提供,为淡棕色颗粒剂,每克颗粒剂含生药 2.6g,批号为 950515,用前溶于 50℃ 温开水中,配成含生药 5~10g/mL 的溶液;乙酸棉酚为淡黄色粉末,由无锡轻工业大学粮油系提供(含量 99%),批号 950310,用色拉油配制成浓度

基金项目:浙江省人事厅项目,浙江新昌制药厂。

作者简介:倪崖,男,副研究员,硕导,主要从事生殖生物学研究。

通讯作者:石其贤,男,研究员,硕导,主要从事生殖生理和生殖药理学研究。

为 50mg/mL 的混悬液;甲基睾酮由上海信谊药厂提供,批号为 950101,用 10% CMC-Na 配制悬液,给药体积为 0.4mL/100g BW。

精子培养液采用改良的缺 Ca^{2+} 最小获能培养液 (MCM-DF Ca)^[6]。补肾强精颗粒剂,临用前取 1g 颗粒剂加 5.8mL 蒸馏水,在 37℃ 温育 10min,使之充分溶解,再用定量滤纸过滤,滤液相当于 0.43g 生药/mL,然后用 1mmol/L NaOH 调节 pH 至 7.2。

1.3 仪器

相差显微镜及其摄影装置 (Olympus HB-2,日本产);CO₂ 孵箱 (Queuc,美国产);恒温水浴 (Polystate,德国产);精密分析天平 (Shimadzu,日本产);pH 计 (Orion model 301,美国产)。

2 实验方法

2.1 空白对照组

雄性大鼠 12 只,仅服溶媒,未服用其他任何药物。

2.2 补肾强精颗粒剂组

雄性大鼠 23 只,按乙酸棉酚 50mg/kg 体重 (BW) 灌胃给药,3d 给药 1 次,连续 5 次,即为棉酚造模大鼠。停喂棉酚后,给其灌服补肾强精颗粒剂,13 只大鼠为高剂量组 (10g 生药/kg BW),10 只大鼠为低剂量组 (5g/kg BW)。每日分 2 次给药 (以下同),连续给药 1 个月,末次给药 2 h 后处死动物,打开腹腔,取出睾丸和附睾。在洁净滤纸上剔除脂肪组织和结缔组织,在分析天平上称重,记录重量,然后一侧睾丸和附睾经 Bouin's 液固定,HE 染色,进行病理组织学观察和显微摄影。另一侧作附睾内容物检查,包括精子计数、活率和精子功能评价等。

2.3 模型动物组

12 只,棉酚模型大鼠停喂棉酚后,仅给蒸馏水,未给其他任何药物。

2.4 阳性对照组

10 只,棉酚模型大鼠停喂棉酚后,灌服甲基睾酮 25mg/kg BW,每日 1 次,连续 1 个月。

2.5 附睾内容物检查

取附睾尾部组织约 50mg,置于胚胎手术杯中,立即加入 1:20 大鼠精子培养液^[7],用眼科手术剪,充分剪碎,并在 37℃ 恒温水浴箱中孵育 10min,使精子充分释入培养液中;再用 Miracloth (Behring Diagnostics, La Jolla, CA, 美国) 迅速过滤,除去非精子等组织,然后用精密取液器 (Gilson, 法国产),取 10 μ L 于洁净载玻片上,加盖玻片 (22 \times 22mm),置相差显微镜下,按 WHO (1992)^[8] 标准,观察精子活率 (精子活率以 1% 台盼兰排斥试验证实,以下同),至少计数 200 个精子;并按常规方法用血球计数板计算精子密度。另取 200 μ L 精子悬液,作精子毛细管穿透试验 (Sperm penetration test, SPT)^[9]。毛细管一端用石蜡纸 (Paraffin paper) 封口,未封口端插入精液池内约 5mm,置 37℃ 5% CO₂, 95% 空气培养箱培养 30min;取出,拭去毛细管表面液体,用暗视野显微镜 (Olympus, BH-2) 观察先头活动精子的穿透距离及其活力。结

果以均值 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异显著性测定采用方差分析或秩和检验 (以下同)。

2.6 补肾强精颗粒剂对豚鼠体外精子活力、超激活运动和顶体反应的影响

按袁玉英等^[10]和钟翠铃等^[11]报道方法稍加改良,即精子取自豚鼠附睾尾部和输精管,经上游法 (swim-up) 筛去高质量的上层活动精子,底层活力较差的精子用作试验。记录精子活力 (此时精子活力 70% 为 C 级,10% 为 B 级,20% 为 I 级不活动精子),并将精子数调节至约 50×10^6 个/mL;然后在 5% CO₂, 95% 空气孵箱内 38.5℃ 培养 5h;培养结束后,经 55% Percoll 离心 (444 \times g, 12min),除去死精,然后用新鲜 MCM-DF Ca^{2+} 离心洗涤一次 (250 \times g, 8min) 调节精子数至 5×10^6 精子/mL (精子活率经 1% 台盼兰排斥试验证实);然后将精子悬液 6 等份,每份 1mL。试验从不同动物得到精子,重复 3 次。① 对照组:加 10 μ L 生理盐水;② 阳性对照组:孕酮 10 μ L (5 μ mol/L),溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, DMSO 浓度不超过 0.5%,该浓度对上述精子参数没有影响^[12]。③ 补肾强精颗粒剂组:分 5.4, 10.8, 21.5 和 43.0mg (生药)/mL 4 组,加入药液体积均为 10 μ L,然后孵育 15min,再加入 200 μ L 0.1mol/L CaCl₂ (使终浓度为 2mmol/L) 15min 后,根据 Wooley^[13]以及 Shi 和 Friend 报道方法^[14] 分别评价超激活运动 (HAM) 和顶体反应 (AR)。

3 实验结果

3.1 附睾尾部内容物检查

3.1.1 精子活率 喂服高剂量补肾强精颗粒剂组精子活率明显高于模型动物组 ($P < 0.001$),并与空白对照组相似,表明该制剂可提高精子活率;且补肾强精颗粒剂低剂量组与高剂量组之间存在着明显的量效关系 ($P < 0.01$),见表 1。

3.1.2 精子密度 (10^6 细胞/100mg 附睾尾部组织) 灌服补肾强精颗粒剂低剂量组和高剂量组的精子密度均显著高于模型动物组 ($P < 0.001$),表明补肾强精颗粒剂可明显地增加乙酸棉酚造模大鼠精子数量,见表 1。

3.1.3 对精子毛细管穿透 (SPT) 的作用 据 WHO (1992) 和卫生部药政局 (1993)^[15] 颁布的“中药新药临床指导原则”中均将 SPT 作为评价精子功能的重要指标。试验结果表明,高剂量组 SPT 明显高于低剂量组 ($P < 0.05$),表明两个用药组之间存在明显的量效关系;低剂量组又明显高于模型动物组 ($P < 0.01$),表明补肾强精颗粒剂可显著地提高精子活力,见表 1。

模型动物组在精子活率、精子密度和对毛细管穿透力均明显低于空白对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$),表明乙酸棉酚造模是成功的。

3.2 睾丸组织学观察

空白对照组大鼠睾丸横切面上,曲细精管呈饱满圆形或椭圆形,各期生精细胞,排列有序,层次分明,内含众多的精子见图 1A,其附睾管腔内充盈精子见图 1B。灌服棉酚后,模型动物组睾丸曲细精管相对缩小,生精上皮层次明显减少,排列疏松,细胞组合紊乱,部分精母细胞核固缩,精子细胞减

少,出现空泡,腔内成熟精子少见,睾丸曲细精管之间间隙扩大,间质细胞减少见图 1C。附睾管腔内精子明显减少见图 1D。灌服强精冲剂 1 个月后,无论低剂量组与高剂量组,大

鼠睾丸形态基本恢复正常,细胞层次清晰,近腔缘可见精子见图 1E, F。阳性对照组大鼠睾丸和附睾尾部形态也基本恢复正常见图 1G。

表 1 补肾强精颗粒剂对乙酸棉酚造模大鼠精子数量及其活率和毛细血管穿透试验 (SPT) 的作用 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effect of Bushenqiangjin granules on the rat infertility model caused by gossypol acetic acid ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	精子活率 (%)	精子密度 ($\times 10^6 / 100\text{mg EP}^*$)	SPT(mm)
空白对照组	12	63.3 ± 20.1 ^a	93.5 ± 29.8 ^c	79.0 ± 15.8 ^a
模型动物组	11	27.4 ± 21.0	61.8 ± 19.7	16.0 ± 12.2
阳性对照组 (12.5mg/kg 甲基睾酮)	10	47.3 ± 21.6	85.4 ± 25.4 ^d	43.7 ± 29.3 ^b
补肾强精颗粒剂组 5g 生药 /kg 组	13	42.5 ± 26.1	100.8 ± 20.1 ^b	43.6 ± 25.6 ^b
10g 生药 /kg 组	10	62.9 ± 11.0 ^{a,d}	124.2 ± 35.0 ^{b,f,d}	72.1 ± 17.7 ^{a,e,g}

注: * EP: 附睾。^a与模型动物组比较, $P < 0.001$; ^b与模型动物组比较, $P < 0.01$; ^c与模型动物组比较, $P < 0.05$; ^d与强精颗粒剂 5g 生药 /kg 组比较, $P < 0.05$; ^e与强精颗粒剂 5g 生药 /kg 组比较, $P < 0.01$; ^f与阳性对照组比较, $P < 0.05$; ^g与阳性对照组比较, $P < 0.01$ 。

Note * EP: caudal epididymis. ^aas compared to the model rats $P < 0.001$; ^bas compared to the model rats $P < 0.01$; ^cas compared with the model rats $P < 0.05$; ^dwhen compared to 5g BSQJG, $P < 0.05$; ^ewhen compared to 5g BSQJG, $P < 0.01$; ^fas compared to the positive rats (treatment of methyl testosterone), $P < 0.05$; ^gas compared to the positive rats (treatment of methyl testosterone), $P < 0.01$.

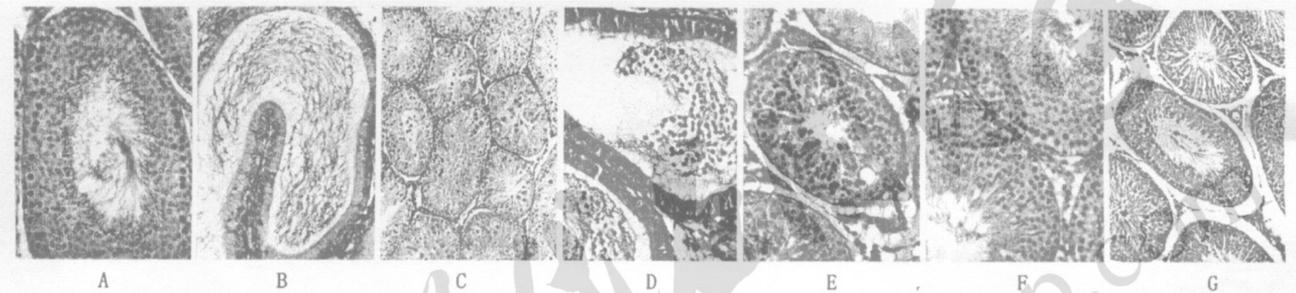


图 1 大鼠睾丸和附睾横切面,石蜡包埋,HE 染色。睾丸横切面,放大倍率 200 ×,附睾横切面,放大倍率 40 ×

Fig 1 Histological cross section of rat testis and caudal epididymis showing several seminiferous tubules and various stages of spermatogenesis

A. 空白对照组,灌服适量溶媒,每日 2 次,连续 1.5 个月。大鼠睾丸形态正常; B 空白对照组大鼠附睾尾形态正常,腔内精子充盈; C 棉酚模型组,以 50mg/kg BW (体重)棉酚灌胃,3 日 1 次,连续给药 5 次;停药棉酚后,再喂服蒸馏水。大鼠睾丸曲细精管内各级生精细胞层次明显减少,排列疏松,细胞组合紊乱,部分精母细胞核固缩,腔缘内仅见极少量精子; D. 棉酚模型组大鼠,附睾管内精子数量明显减少; E 和 F. 强精颗粒剂组,棉酚模型大鼠,停药棉酚后,继续灌服强精颗粒剂,分低剂量组 (5g 生药 /kg BW) 和高剂量组 (10g /kg BW),每日 2 次给药,连续 1 个月。低、高剂量组大鼠睾丸曲细精管结构恢复正常,细胞层次清晰,可见各级生精细胞和精子; G. 阳性对照组,棉酚模型大鼠,停药棉酚后,再喂甲基睾酮 25mg/kg BW 经胃给药,每日 1 次,连续 1 个月后,大鼠睾丸的损伤基本恢复正常。

A. cross-section of a stage VIII seminiferous tubule of normal rat testis showing the normal structure of the germinal epithelium; B. section of ductus epididymidis from a normal rat. Spermatozoa are permeated with the lumen; C. cross-section of various stage seminiferous tube from rat testis after gossypol treatment (50mg/kg/day per three day for 15 days) showing vacuolation and karyorrhexis of spermatids; D. the duct of epididymidis is treated with gossypol. Exfoliated spermatids are seen in the lumen; E and F. BSQJG (5g/kg and 10g/kg BW) were repeatedly given to the rats (two times per day for one month) by pre-treatment of gossypol for 15 day as described in the methods. Spermatogenesis in the testis was recovered; G. positive control after gossypol treatment for 15 days and then the rats were treated with methyl testosterone (25 mg/kg BW /day for one month). Spermatogenesis was almost reformed.

3.3 补肾强精颗粒剂对豚鼠体外精子活力、超激活运动 (HAM) 和顶体反应 (AR) 的影响

结果见表 2。补肾强精颗粒剂可明显地增强豚鼠精子活力、HAM 和 AR,其作用随浓度而增加,当浓度为 10.8mg 生药 /mL 时达到最大值,与空白对照组比较,在统计学上有极其显著差异 ($P < 0.05 \sim P < 0.005$),而与阳性对照组相似;此后随浓度增加,对精子活力、HAM 和 AR 逐渐呈下降趋势。这一结果与体内试验相一致,表明补肾强精颗粒剂可促进豚鼠体外精子活力、超激活运动和顶体反应。

4 讨论

棉酚可显著地抑制人及大鼠睾丸精子发生,并干扰附睾精子成熟,导致生育力下降^[4,6]。本试验结果表明,补肾强精颗粒剂均可明显地增加棉酚造模动物精子数量,促进附睾精子成熟,降低畸形精子率,提高精子活力,并能增加精子对毛细血管的穿透能力。体外试验也证明,补肾强精颗粒剂在一定浓度下 (10.8mg 生药 /mL),可直接提高豚鼠精子的受精能力,如精子活力、超激活运动和顶体反应率等,这些结果与方中制何首乌、海龙、覆盆子、菟丝子具有补肾阳,益精血之功效。

表 2 补肾强精颗粒剂对豚鼠体外精子活率、超激活运动和顶体反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The effect of Bushenqiangjin granules on hyperactivation and acrosome reaction of guinea pig spermatozoa ($\bar{x} \pm s$)

组别	活率 (%)	活力 (%) (A+B级)	超激活运动 (%)	顶体反应 (%)
空白对照	88.7 ± 2.3	30.0 ± 6.2 ^a	19.0 ± 5.3 ^b	27.7 ± 1.5 ^a
阳性对照 (孕酮 1.6 μg/mL)	90.0 ± 2.0	64.0 ± 3.6	43.0 ± 2.0 ^c	43.3 ± 2.1
补肾强精颗粒剂 5.4mg生药/kg	87.7 ± 2.5	55.7 ± 4.0 ^e	29.0 ± 3.6 ^a	37.7 ± 2.5 ^{c,e}
10.8mg生药/kg	91.6 ± 5.8	62.7 ± 3.2 ^e	43.3 ± 1.5 ^e	46.3 ± 3.5 ^e
21.5mg生药/kg	91.6 ± 5.8	57.0 ± 8.5 ^e	27.6 ± 8.7 ^{a,g}	30.7 ± 2.5 ^{a,c,g}
43.0mg生药/kg	91.0 ± 6.9	9.3 ± 3.2 ^a	6.3 ± 3.2 ^{b,c,e,h}	21.3 ± 2.5 ^a

注: $n=3$; ^a与阳性对照组比较, $P < 0.01$; ^b与阳性对照组比较, $P < 0.001$; ^c与补肾强精颗粒剂 43.0mg生药/mL比较, $P < 0.01$; ^d与补肾强精颗粒剂 43.0mg生药/mL比较, $P < 0.001$; ^e与补肾强精颗粒剂 5.4mg生药/mL比较, $P < 0.01$; ^f与补肾强精颗粒剂 5.4mg生药/mL比较, $P < 0.001$; ^g与补肾强精颗粒剂 10.8mg生药/mL比较, $P < 0.01$; ^h与补肾强精颗粒剂 10.8mg生药/mL比较, $P < 0.001$.

Note: $n=3$; ^awhen compared to the positive control, $P < 0.01$; ^bas compared to the positive control, $P < 0.001$; ^cas compared with BSQJG 43.0mg/mL rough medicine (RM), $P < 0.01$; ^das compared to BSQJG 43.0mg/mL RM, $P < 0.001$; ^ewhen compared with BSQJG 5.4mg/mL RM, $P < 0.01$; ^fwhen compared to BSQJG 5.4mg/mL RM, $P < 0.001$; ^gas compared to BSQJG 10.8mg/mL RM, $P < 0.01$; ^hwhen compared with BSQJG 10.8mg/mL RM, $P < 0.001$.

相符。据报道,海龙可明显地增加环磷酸腺苷造模小鼠睾丸和附睾性腺重量以及精子数和精子活率^[15],也支持了本试验结果,并且与临床上观察到补肾强精颗粒剂可治疗肾阳虚证所致的少精子症、弱精子症以及少精伴弱精症也是相符合的^[2,16]。据此,本试验结果为补肾强精颗粒剂治疗少精子症、弱精子症以及少弱精子症提供了药理学资料。

参考文献

[1] Ni Y, Zhou S C, Shi Q X. The diagnoses and applications of ZP3 in male's procreation [J]. Journal of Chinese Modern Gynaecology and Obstetrics(中华现代妇产科学杂志), 2005, 2(7): 598-600.

[2] Yuan Y Y, Yao K S, Wang M D, et al. The I stage clinical research of Qiangjing Chongji for the therapy of oligozoospermia, asthenozoospermia [J]. Reproduction & Contraception(生殖与避孕), 1996, 16(6): 469-470.

[3] China Male Contraception Drug Cooperation Unit. The new male contraception drug-gossypol [J]. National Medical Journal of China(中华医学杂志), 1978, 58(8): 455-460.

[4] Lei H P. The perspective research of gossypol [J]. Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 1982, 17: 1-4.

[5] Shi Q X, Zhang Y G, Yuan Y Y. The antifertility research of gossypol II: It's antifertility effect to male rats [J]. Acta Zoologica Sinica(动物学报), 1981, 27: 22-28.

[6] Shi Q X, Friend D S. Gossypol-induced inhibition of guinea pig sperm capacitation in vitro [J]. Biol Reprod, 1983, 29: 1027-1032.

[7] Shanlgi R, Motilyahn A, Nebel L. The role of Carbohydrates in sperm-egg interaction in rats [J]. Biol Reprod, 1986, 34: 446-452.

[8] World Health Organization(1992). The Laboratory manual for the

examination of human sperm and sperm-cervix mucus interaction [M]. 3th. ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994.

[9] Pandya I J, Mortimer D, Sawers R S. A standardized approach for evaluating the penetration of human spermatozoa into cervical mucus in Vitro [J]. Fenil Steril, 1986, 45: 357-360.

[10] Yuan Y Y, Gu Z P, Shi Q X, et al. In vitro inhibition of celastrol on spermatozoa fertilization ability of guinea pig [J]. Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 1995, 30(5): 331-335.

[11] Zhong C L, Ge R S, Shi Q X. DL-propranolol inhibits guinea pig sperm capacitation, acrosome reaction, sperm-egg fusion in vitro [J]. Acta Pharmacologica Sinica(中国药理学报), 1990, 11: 169-172.

[12] Jia Z Y, Yuan Y Y, Shi Q X. The transducing pathway of Ca^{2+} influx during progesterone-initiated acrosome reaction of guinea pig sperm [J]. Acta Physiologica Sinica(生理学报), 1997, 49: 349-353.

[13] Woolley D M. Hyperactivation: Mechanisms and function. In: Advanced topics in andrology[M]. The Medical Society of London, Lettsom House, 1993, 11-12.

[14] Shi Q X, Friend D S. Effect of gossypol acetate on guinea pig epididymal spermatozoa in vivo and their susceptibility to capacitation in vitro [J]. J Androl, 1985, 6: 45-52.

[15] Zhang C H, Xu G J, et al. Research of sea dragon for drug use [J]. The theses of first ocean life active substances and natural drugs research, Beijing, 1996, 227-230.

[16] Yao K S, Xu H M, Dai H Y. The clinical curative effect of Qiangjing Chongji for the therapy of oligozoospermia and asthenozoospermia [J]. Chinese Journal of Family Planning(中国计划生育学杂志), 1998, 6(2): 68.

收稿日期: 2005-04-12