

九香虫对慢性锰中毒大鼠生殖损伤的保护作用

王凤月, 刘川燕, 付惠惠, 王涌, 王乾兴, 侯晓晖

(遵义医学院基础医学院, 贵州遵义 563000)

摘要: 本文利用九香虫对慢性锰中毒的雄性 SD 大鼠生殖系统损伤进行干预, 并探讨其作用机制。结果表明, 一方面九香虫低、中、高干预组大鼠交配行为能力中插入次数分别是模型组的 2.65、2.62 和 1.65 倍; 射精次数分别是模型组的 2.01、1.94 和 1.25 倍; 同时血清睾酮水平较模型组分别提高了 1.14、1.22 和 1.23 倍, 说明九香虫能够修复慢性锰中毒大鼠生殖功能的损伤; 另一方面九香虫各干预组的大鼠睾丸组织形态结构虽明显优于模型组, 但睾丸和附睾的脏器系数以及精子数目等生殖能力方面的改善不明显。另外, 九香虫低、中、高干预组睾丸组织 T-SOD 水平分别提高了 1.23、1.54 和 1.60 倍, 且 T-AOC 水平也分别提高了 1.28、1.54 和 1.39 倍, 认为九香虫对慢性锰中毒的雄性 SD 大鼠生殖系统损伤的保护作用可能与其抗氧化作用有关, 为生殖损伤的药物开发提供了选择。

关键词: 九香虫; 锰暴露; 生殖损伤; 生殖保护; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2017)7-31-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.005

Protective Effect of *Aspongopus chinensis* on Reproductive Injury Caused by Chronic Manganese Exposure in Male Rats

WANG Feng-yue, LIU Chuan-yan, FU Hui-hui, WANG Yong, WANG Qian-xing, HOU Xiao-hui

(Zunyi Medical University Basic Medicine College, Zunyi 563000, China)

Abstract: *Aspongopus chinensis* was used for the intervention of damages caused by chronic manganese exposure to the reproductive system of male Sprague Dawley (SD) rats, and its mechanism of action was explored. The results showed that compared with the model group, the mating ability defined by the numbers of penile insertion, in the low-, medium-, and high-dose *Aspongopus chinensis* intervention groups was boosted by 2.65, 2.62, and 1.65 times, respectively. The corresponding ejaculation frequencies were increased by 2.01, 1.94, and 1.25 times, respectively, and the corresponding levels of serum testosterone were increased by 1.14, 1.22, and 1.23 times, respectively. The results suggested that *Aspongopus chinensis* could repair damages caused by chronic manganese poisoning to the reproductive function of rats. Meanwhile, the morphological structures of the testicular tissue of the *Aspongopus chinensis* intervention groups were obviously improved when compared with those of the model group. However, there was no significant improvement in the organ coefficient of the testis and epididymis, the sperm count, as well as other aspects of reproductive ability. Furthermore, compared with the model group, the total superoxide dismutase (T-SOD) activity of the low-, medium-, and high-dose *Aspongopus chinensis* intervention groups was increased by 1.23, 1.54, and 1.60 times, respectively, and the corresponding total antioxidant capacities (T-AOCs) were increased by 1.28, 1.54, and 1.39 times, respectively. The results suggested that the protective effect of *Aspongopus chinensis* on reproductive injury in male SD rats was related to its antioxidant activity. This study provides a basis for the development of drugs to treat reproductive injury.

Key words: *Aspongopus chinensis*; manganese exposure; reproductive injury; protective effect on the reproductive system; oxidative stress

收稿日期: 2016-11-08

基金项目: 贵州省教育厅“125 计划”重大科技专项(黔教合重大专项字[2014]031); 遵义市科技创新人才团队培养项目(遵市科合[2015]40号); 贵州省中药现代化科技产业研究开发项目(黔科合中药字[2012]5001-1号); 贵州省“西部之光”项目; 遵义医学院博士启动基金项目([2013]69)

作者简介: 王凤月(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 九香虫的生殖保护作用研究

通讯作者: 侯晓晖(1980-), 女, 教授, 研究方向: 药用昆虫资源及开发利用

随着现代社会的不断发展, 锰及锰产品以其优越的性能广泛应用于我们的生产生活中, 常见的有锰矿石的开采、钢铁冶炼、以及电焊条制造、作业等。因此, 从事上述工作的工人有可能因过量锰蓄积而导致锰中毒, 进而成为锰中毒的高发人群。锰中毒是由于长期吸入或接触锰烟、锰尘而致, 慢性锰中毒是其主要类型^[1]。有研究证实锰中毒会导致雄性动物生殖系统受损, 其通过血-睾屏障后蓄积在睾丸内, 导致睾丸萎缩、精子数目减少、精子活力降低, 最终引起生精

功能障碍^[2,3]。另外,锰暴露也可以引起大鼠睾丸 LDH 活性降低、p53 高表达、Bcl-2 低表达以及抗氧化能力下降,可能是大鼠生精细胞凋亡的重要因素^[4,5]。

九香虫是我国传统的药用昆虫和保健食品,中医临床上广泛用于各类疼痛、阳痿等症,且我国贵州和四川等地素有食用九香虫的习俗。《本草纲目》和《中药大辞典》中均有记载:九香虫对脾肾阳虚的腰膝酸软乏力、阳痿和遗尿等症有显著疗效。现代医学证实九香虫不仅含有丰富的蛋白质、脂肪等营养物质具有很好的食疗滋补作用,而且具有抗菌、抗癌、抗炎以及促血管生成等作用^[6-10]。近年研究发现,九香虫可用于改善环境污染物导致的急性生殖器官损伤,进而证实其保护或修复作用的可能机制^[11,12]。本研究利用对慢性锰中毒的雄性 SD 大鼠进行九香虫干预,通过检测大鼠的行为学指标、总精子生成数、睾丸和附睾的脏器系数及血清性激素水平等指标,判断九香虫对锰中毒导致的生殖系统损伤的保护作用,并且通过检测睾丸组织 T-SOD、T-AOC 的含量探讨其可能的修复机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

8 周龄雄性和雌性 SD 大鼠各 50 只,购于第三军医大学动物实验室[许可证号:SCXK(渝)2012-0005]。

1.1.2 九香虫饲料

九香虫干粉与普通饲料混匀,加适量水后定型为一定质量的饲料块,置于烘箱中烘干备用。

1.1.3 主要试剂

九香虫购于药房,T-SOD、T-AOC、总蛋白定量测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所,苯甲酸雌二醇和黄体酮购于上海化成工业发展有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建及九香虫干预实验

按照随机分组方法,将 50 只 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分成 5 组($n=10$),即空白组、模型组和九香虫高、中、低剂量干预组。除空白组注射等体积的生理盐水外,其余 4 组连续 16 周按 2 mg/(kg·d)腹腔注射 $MnCl_2$ 溶液(5 d/w);九香虫干预组给予九香虫饲料(高、中、低剂量组分别含九香虫 20%、10%和 5%),而模型组和空白组给予普通饲料。

1.2.2 行为学观察实验

实验前将雌鼠腹腔注射麻醉后行双侧卵巢切除术,且术后 3 d 肌注青霉素 2 万 U。术后 2 周进行行为学观察实验,分别在合笼前 48 h 和 4 h 肌注 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 苯甲酸雌二醇和 2 mg/kg 黄体酮,获得发情雌鼠。选择晚上 7~12 时进行实验,先将雄鼠放入透明盒内稍作适应,再放入发情良好的雌鼠,在红光灯下观察 15 min 内雄性大鼠的交配活动,包括扑捉次数、骑跨次数、插入次数和射精次数。

1.2.3 血清睾酮和黄体生成素的测定

按照 ELISA 试剂盒说明书的操作方法来检测各组大鼠血清睾酮和黄体生成素的含量。

1.2.4 睾丸和附睾脏器系数及精子数目测定

取大鼠睾丸和附睾进行称重,计算其脏器系数,即脏器重量(g)与体重(g)之比乘以百分之百。取左侧附睾置于 4 mL PBS 缓冲液中剪碎附睾尾,于 37 °C 水浴箱中孵育 15 min 后制成精子混悬液,将 10 μL 精子混悬液与 90 μL PBS 混合后取 10 μL 置于血球细胞计数板,计算出总精子数 n ,则每毫升精液中含有的精子数为 $n \times 25/5 \times \text{稀释倍数}(10) \times 10^7$ 。

1.2.5 睾丸组织抗氧化能力的测定

按照试剂盒说明书的操作方法进行睾丸组织总超氧化物歧化酶(T-SOD)及总抗氧化能力(T-AOC)测定。

1.2.6 睾丸形态学的观察

通过常规方法进行睾丸组织 HE 染色切片,置于光学显微镜下观察大鼠睾丸生精上皮细胞、支持细胞和曲细精管的结构完整性及排列情况,并观察管腔中是否有细胞脱落。

1.2.7 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验结果以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 行为学

由表 1 可知,与空白组比较,模型组大鼠的扑捉、骑跨、插入及射精次数均明显减少($p < 0.05$),具有统计学意义;与模型组相比,九香虫各干预组大鼠的扑捉、骑跨、插入及射精次数均有不同程度的增加,其中九香虫中、低剂量组交配行为的各指标显著高于模型组($p < 0.05$),而九香虫高剂量组与模型组无显著性差异($p > 0.05$)。

表1 九香虫对染锰雄性大鼠交配行为的影响

Table 1 Effect of *Aspongopus chinensis* on the mating behaviors of male rats exposed to manganese ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	扑捉次数	骑跨次数	插入次数	射精次数
空白组	81.667±13.317	38.333±5.508	32.000±1.732	30.000±3.464
模型组	57.000±15.890 ^a	20.600±4.037 ^a	12.667±8.505 ^a	14.429±8.223 ^a
九香虫低剂量组	74.875±11.532 ^b	33.000±8.989 ^b	33.500±11.976 ^b	29.000±6.164 ^b
九香虫中剂量组	82.000±16.869 ^b	33.800±8.585 ^b	33.167±8.035 ^b	28.000±9.309 ^b
九香虫高剂量组	70.625±9.319	28.800±7.396	20.833±9.474	18.000±8.832

注: 与空白组比较, ^a $p<0.05$; 与模型组比较, ^b $p<0.05$ 。

2.2 血清睾酮(T)和黄体生成素(LH)

表2 九香虫对染锰雄性大鼠血清睾酮和黄体生成素含量的影响

Table 2 Effect of *Aspongopus chinensis* on serum luteinizing hormone and testosterone levels of male rats exposed to manganese ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	T/(nmol/L)	LH/(nmol/L)
空白组	97.823±3.418	19.410±1.753
模型组	78.417±2.987 ^a	21.935±2.324 ^a
九香虫低剂量组	89.275±5.593 ^b	21.124±1.709
九香虫中剂量组	95.584±7.155 ^b	21.353±1.690
九香虫高剂量组	96.148±4.226 ^b	19.921±1.778 ^b

注: 与空白组比较, ^a $p<0.05$; 与模型组比较, ^b $p<0.05$ 。

由表2可知, 与空白组比较, 模型组大鼠血清睾酮水平明显降低, 而血清黄体生成素水平则明显升高

($p<0.05$), 差异具有统计学意义; 与模型组相比, 九香虫各干预组大鼠血清睾酮水平均明显升高, 而血清黄体生成素水平仅九香虫高剂量干预组呈现显著的降低趋势 ($p<0.05$)。

2.3 睾丸和附睾脏器系数以及精子数目

由表3可知, 与空白组相比, 模型组大鼠睾丸与附睾脏器系数均明显降低($p<0.05$), 差异具有统计学意义; 与模型组相比, 除九香虫高剂量组大鼠睾丸脏器系数显著增加外($p<0.05$), 其余各干预组大鼠的睾丸和附睾脏器系数均没有明显改善。

由表3可知, 与空白组相比, 模型组大鼠精子数目明显降低($p<0.05$), 差异具有统计学意义; 与模型组相比, 九香虫各干预组大鼠精子数目有所增加, 但差异不具有统计学意义。

表3 九香虫对染锰雄性大鼠睾丸和附睾脏器系数及精子数目的影响

Table 3 Effect of *Aspongopus chinensis* on the organ coefficient of the testis and epididymis, as well as the sperm count of male rats exposed to manganese ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	睾丸脏器系数/%	附睾脏器系数/%	精子数($\times 10^8$)
空白组	0.573±0.008	0.454±0.077	2.800±0.976
模型组	0.475±0.051 ^a	0.359±0.027 ^a	1.550±0.212 ^a
九香虫低剂量组	0.490±0.055	0.367±0.029	1.810±0.567
九香虫中剂量组	0.536±0.052	0.371±0.049	1.829±0.427
九香虫高剂量组	0.555±0.026 ^b	0.391±0.053	1.978±1.070

注: 与空白组比较, ^a $p<0.05$; 与模型组比较, ^b $p<0.05$ 。

表4 九香虫对染锰雄性大鼠睾丸组织 T-SOD 和 T-AOC 水平的影响

Table 4 Effect of *Aspongopus chinensis* on the T-SOD and T-AOC levels of the testis tissue of male rats exposed to manganese ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	T-SOD/(U/mg prot)	T-AOC/(U/mg prot)
空白组	88.75±28.88	47.49±8.56
模型组	86.15±11.26 ^a	32.93±6.01 ^a
九香虫低剂量组	106.27±24.47 ^b	42.27±11.04
九香虫中剂量组	133.05±10.50 ^b	50.56±9.24 ^b
九香虫高剂量组	137.48±7.46 ^b	45.78±8.79 ^b

注: 与空白组比较, ^a $p<0.05$; 与模型组比较, ^b $p<0.05$ 。

2.4 睾丸组织 T-SOD 和 T-AOC

由表 4 可知,与空白组相比,模型组大鼠睾丸组织的 T-SOD 和 T-AOC 活力明显降低($p<0.05$),差异具有统计学意义;与模型组比较,除九香虫低剂量组 T-AOC 活力外,其余各干预组的 T-SOD 和 T-AOC 活力均有明显增高($p<0.05$),差异具有统计学意义。

2.5 睾丸组织形态学变化

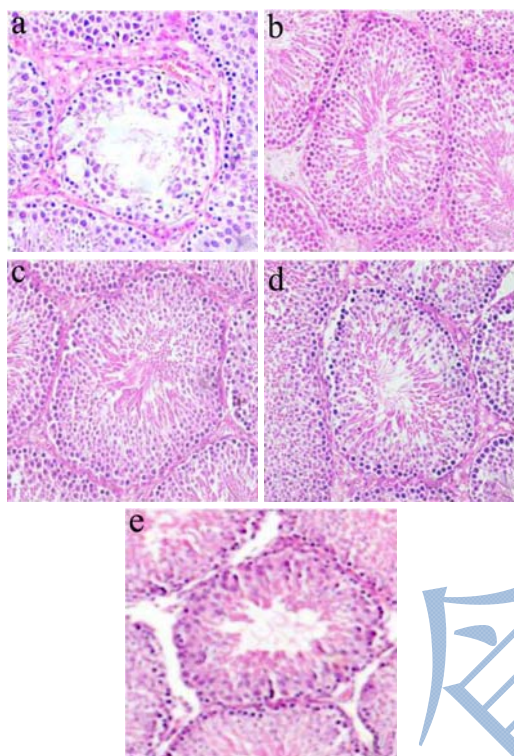


图 1 九香虫对染锰雄性大鼠睾丸组织形态学的影响

Fig.1 Effect of *Aspongopus chinensis* on the morphological structure of the testicular tissue of male rats exposed to manganese (10×40)

注: a, 模型组; b, 空白组; c, 九香虫低剂量组; d, 九香虫中剂量组; e, 九香虫高剂量组。

空白组大鼠睾丸组织曲细精管排列规则,结构完整,管腔中无脱落的细胞,支持细胞的数量和结构均正常。模型组大鼠睾丸组织曲细精管排列明显不规则,生精上皮细胞严重受损,支持细胞锐减,且呈现空泡样改变。九香虫干预组的睾丸组织结构得到了明显改善,生精小管管腔逐渐变小、基膜逐渐完整,生精上皮细胞排列有序、细胞界限清晰,以中、低剂量组为佳,其睾丸组织形态结构基本完整,形态接近于正常大鼠的睾丸组织形态结构(见图 1)。

3 讨论与结论

3.1 随着锰及其产品在生产生活中的广泛应用,作为

环境污染物之一的锰与男性生殖健康的问题越来越受到广泛地关注。张先平^[13]等研究证实锰接触能够引起一系列雄性动物生殖系统损伤,包括生精细胞的凋亡、睾丸生长发育与成熟延迟、精液浓度和精子活率降低以及生精功能障碍等表现。睾丸是锰敏感性较高的脏器,可以通过血睾屏障蓄积于睾丸组织,继而引发生精功能损伤,抑制精子的发生。高颖晖^[14]等研究发现九香虫提取物能够显著增加运动大鼠骨骼肌抗氧化酶 SOD、CAT 和 GST 的活性。何志全等^[11,12]研究证实九香虫干预对急性染锰引起的大鼠生殖系统损伤具有修复作用,并且可以降低血清及睾丸组织的 MDA 水平,可以提高 SOD 活力及 T-AOC 水平,并且明显改善急性染锰大鼠睾丸组织的形态结构。因此,通过九香虫干预可以不同程度地改善锰中毒引起的雄性大鼠生殖系统损伤并且具有明显的抗氧化活性作用,与我们本次实验结果一致。

3.2 锰造成生精细胞损伤的机制与生物体内适量的锰可以对抗自由基氧化作用,而过多的锰则激活细胞色素氧化酶 P450 的活性,产生大量自由基,损伤线粒体,引起 ATP 合成减少和水解增加而中断电子传递链,或使凋亡调控蛋白从线粒体释放而引起细胞凋亡^[15,16]。因此,自由基增多可能就是锰致雄性大鼠生精细胞凋亡的最直接因素,而 T-SOD 作为一种自由基清除剂,可以清除超氧阴离子自由基进而保护组织免受自由基的损伤,故组织中 T-SOD 和 T-AOC 活力的高低可以间接反映其清除自由基的能力。由此可以看出,本研究中九香虫干预组可以通过提高睾丸组织的 T-SOD 和 T-AOC 活力来保护生精细胞免受自由基的攻击。

3.3 本研究中九香虫各干预组对慢性锰中毒大鼠生殖系统损伤具有不同程度的改善,虽与前人研究结果一致^[11,12],但是高剂量组的某些指标(如形态学、行为学和激素水平等)却不如中、低剂量组的效果显著,一方面可能是由于本研究所设置的高剂量组并非九香虫使用的最佳剂量,其用量过高反而带来相反的作用,而最佳给药剂量还有待结合相关研究并进一步探讨;另一方面行为学检测实验可能存在人为干扰因素,可考虑采用计算机实时记录进而消除人为因素对实验大鼠的影响,获得更为精确地数据。

3.4 综上所述,九香虫可在一定程度上改善慢性低剂量染锰导致的大鼠生殖功能和能力的损伤,其对生殖系统修复作用以中剂量组效果最佳,同时九香虫作为一种外源的抗氧化物,其作用机制可能是通过减轻自由基引起的组织损伤进而实现修复作用,为其开发为功能性保健品提供基础研究数据。

参考文献

- [1] 陈灏珠.实用内科学(上册)[M].北京:北京人民卫生出版社,2005
CHEN Hao-zhu. Practice of internal medicine (I) [M]. Beijing: Beijing People's Medical Publishing House, 2005
- [2] 武英,崔金山,张玉敏,等.氯化锰对雄性大鼠亚急性生殖毒性机制研究[J].中国工业医学杂志,2004,17(3):183-185
WU Ying, CUI Jin-shan, ZHANG Yu-min, et al. Study on mechanisms of subacute reproductive toxicity in male rats exposed to manganous chloride [J]. Chinese Journal of Industrial Medicine, 2004, 17(3): 183-185
- [3] Sharpe R M. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals [J]. Toxicology Letters, 2001, 120(1/3): 221-232
- [4] 才秀莲,郭海,伍冬梅.染锰大鼠血清和睾丸 LDH 活性的变化[J].遵义医学院学报,2010,33(2):101-103
CAI Xiu-lian, GUO Hai, WU Dong-mei. Changes of the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in serum and testis of rats exposed to manganese [J]. Journal of Zunyi Medical University, 2010, 33(2): 101-103
- [5] 张先平,王乾兴,才秀莲,等.锰对大鼠生精细胞凋亡的影响[J].工业卫生与职业病,2008,34(2):85-88
ZHANG Xian-ping, WANG Qian-xing, CAI Xiu-lian, et al. Effect of manganese on apoptosis of spermatogenic cell of rats [J]. Industrial Health and Occupational Diseases, 2008, 34(2): 85-88
- [6] 侯晓晖,孙廷,李晓飞.九香虫粗提物对 SGC-7901 和 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响[J].时珍国医国药,2013,24(1): 108-109
HOU Xiao-hui, SUN Ting, LI Xiao-fei. Effects of crude extracts from *Aspongopus chinensis* on the proliferation and cell cycle of SGC-7901 and HepG2 [J]. Li shi zhen Medicine and Materia Medica Research 2013, 24(1):108-109
- [7] 刘伦沛,郁建平.九香虫的营养成分分析与评价[J].食品科学,2008,29(2):406-410
LIU Lun-pei, YU Jian-ping. Analysis and evaluation of nutritional of *Aspongopus chinensis* dallas [J]. Food Science, 2008, 29(2): 406-410
- [8] Luo X H, Wang X Z, Jiang H L, et al. The biosynthetic products of Chinese insect medicine, *Aspongopus chinensis* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 754-758
- [9] Shi Y N, Tu Z C, Wang X L. Bioactive compounds from the insect *Aspongopus chinensis* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24(22): 5164-5169
- [10] Yan Y M, Ai J, Shi Y N, et al. (+/-)-Aspongamide A, an N-acetyldopamine trimer isolated from the insect *Aspongopus chinensis* is an inhibitor of *p-Smad3* [J]. Organic Letters, 2014, 16(2): 532-535
- [11] 何志全,张莉,侯晓晖.九香虫对染锰雄性大鼠生殖损伤的保护[J].中成药,2016,38(2):258-261
HE Zhi-quan, ZHANG Li, HOU Xiao-hui. Protection of stink-bug on manganese-induced reproductive damage to male rats [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(2): 258-261
- [12] 何志全,孙志诚,侯晓晖.九香虫对大鼠生殖损伤的修复机制探讨[J].中成药,2016,38(4):924-927
HE Zhi-quan, SUN Zhi-cheng, HOU Xiao-hui. Study on the repair mechanism of *Aspongopus chinensis* for the rats of reproductive damage [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(4): 924-927
- [13] 张先平,王乾兴,才秀莲,等.锰对大鼠睾丸抗氧化能力及生精细胞凋亡的影响研究[J].中国计划生育学杂志,2007, 15(7):408-410
ZHANG Xian-ping, WANG Qian-xing, CAI Xiu-lian, et al. Effect of manganese on testis antioxidative capacity and apoptosis in spermatogenic cell of rats [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2007, 15(7): 408-410
- [14] 高颖晖,周万红,窦鹏,等.九香虫醇提物对运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性及其基因表达水平的影响[J].生物技术通报,2015,31(12):146-149
GAO Ying-hui, ZHOU Wan-hong, DOU Peng, et al. The effects of ethanol extract from *Aspongopus chinensis* on the activities of antioxidant enzymes in skeletal muscle of exercised rats and their gene expression levels [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(12): 146-149
- [15] Liang W Y, Tang L X, Yang Z C, et al. Calcium induced the damage of myocardial mitochondrial respiratory function in the early stage after severe burns [J]. Burns, 2002, 28(2): 143-146
- [16] Gottlieb R A. Mitochondria and apoptosis [J]. Bid Signals Recept, 2001, 10(3-4): 147-161