

# 白藜芦醇苷对大鼠睾丸扭转缺血和再灌注损伤的保护作用

孙玉薇, 朱孝娟, 崔清波

哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086

**摘要:** **目的** 探讨白藜芦醇苷对大鼠睾丸扭转的保护作用。 **方法** 选取 4 周龄雄性 SD 大鼠 36 只, 随机分为 3 组: 假手术组(A 组)、扭转复位组(B 组)、扭转复位+白藜芦醇苷组(C 组)。B 组和 C 组大鼠建立睾丸扭转复位模型, A 组不扭转。扭转 4 h 后复位睾丸, 复位前 15 min B 组腹腔注射生理盐水 1 ml; C 组腹腔注射白藜芦醇苷 1 ml (5.0 mg/kg)。复位后 4 h 处死所有动物取睾丸待测。以原位缺口末端标记法 (TUNEL) 检测生精细胞凋亡指数; 化学比色法测定睾丸组织中总抗氧化能力 (T-AOC) 活性, 羟胺法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, TBA 法测定丙二醛 (MDA) 含量; 精密称重睾丸后睾丸组织 HE 染色观察组织形态变化。 **结果** B 组 T-AOC [ (20.31±2.55) U/mg ], SOD [ (72.76±5.58) U/mg ] 比 A 组 [ (33.62±3.29) U/mg ], [ (165.33±5.42) U/mg ] 明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 而 C 组 T-AOC [ (30.05±2.08) U/mg ], SOD [ (103.15±14.16) U/mg ] 较 B 组明显升高 ( $P<0.05$ )。B 组 MDA [ (42.38±8.94) U/mg ] 比 A 组 [ (11.51±1.89) U/mg ] 明显升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 而 C 组 [ (23.87±4.47) U/mg ] 较 B 组明显减低 ( $P<0.05$ ); C 组凋亡指数 [ (12.2±1.34)% ] 较 B 组显著下降 ( $P<0.05$ ); B 组睾丸扭转复位后损伤的组织学改变较 A 组损伤明显; 生精小管变薄, 细胞脱落坏死。C 组的组织学改变较 B 组明显改善; 生精小管变薄减少, 细胞脱落坏死减少。 **结论** 白藜芦醇苷具有明显对抗睾丸扭转复位后的氧化损伤, 对因睾丸扭转导致的缺血再灌注损伤具有保护作用。

**关键词:** 白藜芦醇苷; 扭转复位; 睾丸缺血再灌注; 凋亡指数

**中图分类号:** R151.42 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)05-0625-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.05.032

睾丸扭转 (testicular torsion, TT) 是泌尿外科急症, 处理不及时易造成睾丸缺血性坏死。发病有两个高峰, 为婴幼儿和青少年期。单侧睾丸扭转不仅极大地影响患侧睾丸的功能, 对健侧睾丸也造成一定的损伤, 术后常出现生精能力降低, 改变各种激素的产生, 从而诱发不育<sup>[1]</sup>。临床发现, 急性精索扭转睾丸的损害程度与扭转程度和缺血持续时间呈正相关, 睾丸扭转即使及时复位, 仍可导致睾丸缺血/再灌注 (I/R) 损伤, 从而导致睾丸组织生化和形态的改变<sup>[2]</sup>, 所以对睾丸扭转复位后的治疗已成为重要课题。近年有研究发现, 白藜芦醇苷可有效抑制羟自由基<sup>[3]</sup>, 具有广泛性抗氧化和清除氧自由基作用, 能够通过限制脂质氧化和细胞凋亡, 保护心肌缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>。本实验应用大鼠睾丸急性扭转复位损伤模型, 研究白藜芦醇苷对大鼠睾丸扭转复位继发损伤的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验主要试剂、仪器** 总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 含量测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 细胞凋亡试

剂盒 (德国罗氏公司), 白藜芦醇苷 (深圳海王药业股份有限公司)。其余有关分子生物学试剂由中心实验室提供。

**1.2 动物分组及模型制备** 清洁 4 周龄雄性 SD 大鼠 36 只 (体重 90~100 g) [哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK (黑) 2013-001 号, 实验动物使用许可证号为 SYXK (黑) 2013-002 号]。实验期间实验环境条件 (如: 温度 20℃~24℃, 湿度 46%~55%, 12 h 明暗交替), 随机分成 3 组: 假手术组 (A 组): 无菌手术切开左侧阴囊, 分离提睾肌, 暴露左侧睾丸后还纳入阴囊, 缝合阴囊切口; 扭转复位组 (B 组); 扭转复位+白藜芦醇苷组 (C 组)。每组 12 只, B 组和 C 组大鼠参照 Turner 法<sup>[5]</sup>建立睾丸扭转模型, 扭转 4 h 复位扭转睾丸。复位前 15 min B 组腹腔注射生理盐水 1 ml; C 组腹腔注射白藜芦醇苷 (5 mg/kg) 1 ml。复位 4 h 后所有试验动物颈椎离断处死, 取睾丸组织, 用于组织匀浆和石蜡切片的制备。

**1.3 T-AOC、SOD 活力和丙二醛 (MDA) 含量的测定** 剔净睾丸附着筋膜。用电子天平称取睾丸组织, 加睾丸重量 9 倍的预冷生理盐水, 用眼科剪将组织剪碎, 2 000 r/min 冰上匀浆 15 min, 离心后取上清液进行测

**作者简介:** 孙玉薇 (1981-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 本科学历, 营养师, 研究方向: 肠内营养临床应用。

定化学比色法测定睾丸组织中 T-AOC 活性,TBA 法测定 MDA 含量,羟胺法测定 SOD 活性。操作步骤严格按照说明书进行。

1.4  睾丸重量及组织 HE 染色  去除睾丸及附睾组织表面附着的筋膜及脂肪,以滤纸吸去表面残血,迅速精密称重。4%甲醛固定制备切片 HE 染色。将组织切片置于光学显微镜下,100 倍镜下观察其组织形态。

1.5  生殖细胞凋亡的检测  采用 TUNEL 法<sup>[6]</sup>测定凋亡细胞。胞核呈棕黄色为凋亡细胞,阴性对照以 PBS 代替末端转移酶。将组织切片置于光学显微镜下观察,每张切片均于 400 倍光镜下随机选择 5 个视野进行阳性细胞计数,求得阳性细胞率即为凋亡指数。

1.6  统计学分析  运用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析。计量资料采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )进行描述。多组数据的组间比较采用方差分析(总体方差齐,进一步通过 SNK-*q* 检验进行多重比较)或 Kruskal-Wallis *H* 检验(总体方差不齐,进一步通过 Nemenyi 法进行多重比较)。检验水准  $\alpha=0.05$ (双侧)。

2  结 果

2.1  白藜芦醇苷对缺血再灌注损伤大鼠睾丸组织总抗氧化能力 T-AOC、SOD 活力和 MDA 含量的影响

见表 1。三组大鼠睾丸 T-AOC、SOD 活性和 MDA 含量总体比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。进一步进行两两比较显示,B 组 T-AOC、SOD 比 A 组明显降低,而 C 组较 B 组明显升高;B 组 MDA 比 A 组明显升高,而 C 组较 B 组明显减低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1  各组大鼠睾丸 T-AOC、SOD 活性和 MDA 含量的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	T-AOC(U/mg prot)	SOD(U/mg prot)	MDA(U/mg prot)
A	33.62±3.29	165.33±5.42	11.51±1.89
B	20.31±2.55*	72.76±5.58	42.38±8.94
C	30.05±2.08 <sup>△</sup>	103.15±14.16	23.87±4.47

注:A:假手术组;B:扭转复位组;C:扭转复位+白藜芦醇苷; \*与 A 组比较, $P<0.05$ ;  $\Delta$ 与 B 组比较, $P<0.05$ 。下同。

2.2  白藜芦醇苷对缺血再灌注损伤大鼠睾丸组织形态的影响  HE 染色切片结果显示,假手术组镜下见睾丸组织生精小管和间质结构完整,无病理性生精上皮细胞脱落,未见生精上皮空泡变。扭转复位组睾丸在缺血再灌注损伤后睾丸组织生精小管明显萎缩变薄,生精上皮细胞减少,间质水肿及出血。白藜芦醇苷组的睾丸组织生精小管少量变薄,上皮细胞饱满,少量细胞脱落坏死。见图 1。

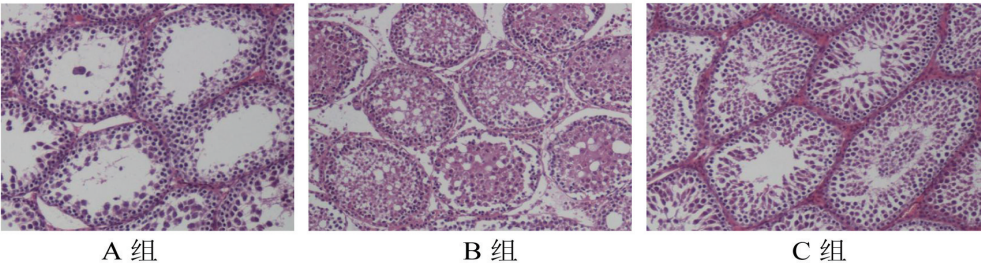


图 1  各组睾丸组织生精小管结构(HE×100)

2.3  生殖细胞凋亡情况  假手术组镜下偶见凋亡细胞;睾丸受缺血再灌注损伤后可见生精上皮变薄;生精小管出现明显萎缩,其中可见大量呈棕黄色凋亡细胞。使用白藜芦醇苷后使缺血诱发的组织学改变明显改善,偶见生精上皮空泡变,仅有散在分布的凋亡生精细胞,见图 2。B 组凋亡指数较 A 组明显上升( $P<0.05$ ),

C 组凋亡指数较 B 组明显降低( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2  各组凋亡指数比较(% , $\bar{x}\pm s$ )

组别	凋亡指数
A	5.70±0.67
B	42.20±3.21*
C	12.20±1.34 <sup>△</sup>

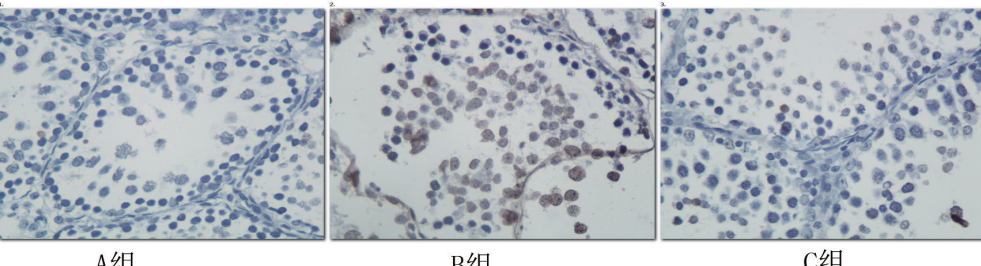


图 2  各组睾丸组织生殖细胞凋亡情况(TUNEL×400)



### 3 讨论

睾丸扭转是指精索沿其纵轴旋转,造成精索内血液循环障碍,导致睾丸缺血甚至坏死。手术复位是治疗睾丸扭转的主要方法,可以避免睾丸因缺血而坏死。本实验参照 Turner 法<sup>[5]</sup>建立睾丸扭转模型,顺时针方向扭转大鼠左侧睾丸 720°,扭转 4 h 后复位造成睾丸缺血再灌注损伤。睾丸扭转复位的损伤是一个典型的缺血再灌注损伤过程,在这一过程中,产生了过量的活性氧,睾丸氧化应激反应增加可引起生精细胞能量代谢障碍、炎症递质和基因转录异常是睾丸缺血再灌注损伤的病理生理基础<sup>[7]</sup>。睾丸扭转局部缺血再灌注后嗜中性粒细胞浸润和活性氧的释放,细胞脂双层脂膜在氧化过程中断裂,从而造成细胞膜的完整性损伤,继而对细胞造成破坏<sup>[8]</sup>。正常机体内存在抗氧化防御系统,可以清除 ROS 及其代谢产物,过量的 ROS 则会对机体有害。SOD 是机体抗氧化、清除 OFR 最主要的金属蛋白酶类<sup>[9]</sup>,其活性可以间接反映睾丸组织受氧化损伤的程度。T-AOC 是综合反映组织抗 OFR 对脂质膜损害,清除活性氧,防止 OFR 对组织损伤能力的指标<sup>[10]</sup>。细胞膜受 OFR 攻击后产生大量 MDA,可间接反映机体内自由基的生成量<sup>[11]</sup>。NO 是生物体内一种反应性极强的自由基,可清除体内 OFR,抑制脂质过氧化<sup>[12]</sup>,睾丸扭转后该侧睾丸髓过氧化物酶活性和丙二醛水平升高,说明睾丸缺血再灌注后睾丸内聚集了很多中性粒细胞,产生了大量的活性氧<sup>[13]</sup>。ROS 可直接损害或者通过一系列过氧化链式反应引起广泛细胞结构的破坏,因此,清除 ROS 对减轻睾丸的氧化损伤至关重要<sup>[14]</sup>。白藜芦醇苷减轻缺氧再灌注造成的细胞损伤,抑制细胞内钙聚集;提高 SOD 活性、降低 MDA 含量清除氧自由基;抑制氧化应激和抑制细胞凋亡等作用<sup>[15]</sup>。

本实验中扭转/复位组 T-AOC、SOD 活力明显低于假手术组,MDA 高于假手术组,这一结果反映了睾丸扭转复位后其抗氧化系统遭受了破坏,这就导致了氧自由基过度产生,进而导致了睾丸生精缺陷。而白藜芦醇苷可以使 T-AOC、SOD 活性明显提高,MDA 含量明显降低。说明白藜芦醇苷对扭转复位睾丸具有保护作用,在一定程度上减轻睾丸扭转损伤,这对提高扭转睾丸的生精能力有着非常重要的意义。白藜芦醇苷是多酚类物质,是一种生物性很强的天然抗氧化剂,研究证实,白藜芦醇能清除或抑制自由基生成,抑制脂质过氧化,调节抗氧化相关酶活性等,可降低心、肝、脑的缺血再灌注损伤<sup>[16-19]</sup>。

本实验利用大鼠睾丸急性扭转复位损伤模型来研

究白藜芦醇苷对睾丸缺血再灌注损伤的保护作用,发现睾丸扭转复位后,虽然存活,但随后出现萎缩,生精功能低下,生精小管出现明显萎缩,生精上皮细胞减少,间质水肿及出血。另外,本实验发现睾丸缺血再灌注损伤可以诱导生精细胞出现凋亡,睾丸扭转复位后其凋亡指数明显升高,而白藜芦醇苷可以有效缓解缺血再灌注诱导的生精细胞退变并有效降低凋亡指数。白藜芦醇苷对睾丸缺血再灌注损伤具有保护作用在组织学方面得到了证实。

综上所述,认为白藜芦醇苷对抗缺血再灌注生化和组织病理学损伤具有明显保护作用,降低活性氧含量,从而减轻睾丸缺血再灌注损伤。但有关白藜芦醇苷对睾丸缺血再灌注损伤保护作用的具体机制有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 徐波,陈海琛,黄国显,等. 褪黑激素对大鼠睾丸扭转缺血和再灌注损伤的保护作用[J]. 中华小儿外科杂志, 2012, 33(7): 532-535.
- [2] 张晓文,李建华,徐赫,等. 丹参酮 IIA 对成年大鼠睾丸扭转的保护作用和机制研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2017, 36(5): 795-799.
- [3] 高大宽,章翔,蒋晓帆,等. 白藜芦醇对暂时性氧糖剥夺致神经元损伤的保护作用[J]. 实用预防医学, 2010, 26(5): 732-734.
- [4] 吴昇兰,郑国华,林如辉. 白藜芦醇预防性给药诱导裸鼠胃癌移植瘤细胞凋亡的观察[J]. 中国预防医学, 2010, 11(7): 717-720.
- [5] Turner TT, Lysiak JJ, Shannon JD, et al. Testicular torsion alter the presence of specific proteins in the mouse testis as well as the phosphorylation status of specific proteins[J]. J Androl, 2006, 27(2): 285-293.
- [6] 杨阳,周大宇,李强,刘洋,等. 叶酸与 Vit B<sub>12</sub> 联合应用对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的调控[J]. 实用预防医学, 2016, 23(11): 1330-1334.
- [7] Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, et al. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat[J]. Pediatr Surg Int, 2006, 22(1): 99-105.
- [8] Yıldız H, Durmus AS, Simes H, et al. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion[J]. Clinics, 2011, 66(1): 137-142.
- [9] Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules[J]. Eur Heart J, 2007, 28(14): 1683-1693.
- [10] 王炜朴. 热量限制及姜黄素对大鼠血清及肝脏 SOD、MDA、TAOC 水平影响的观察[D]. 保定: 河北医科大学, 2009.
- [11] 朱慧民,李辉,朱天民,等. 红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注损伤模型心肌 NADPH 氧化酶 mRNA 及 SOD、MDA 的影响[J]. 中草药, 2011, 42(5): 935-939.
- [12] 张高泽,许琛琛,阎俊文,等. 生脉注射液对青春前期大鼠睾丸扭转/复位缺血再灌注的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(17): 1358-1360.
- [13] 王江涛. 一氧化氮在人精子体外获能过程中作用的实验研究[D]. 厦门: 福建医科大学, 2011.
- [14] 陈碧瑶,李斌,韦思明,等. 缺血后处理对大鼠睾丸缺血再灌注损伤的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25(2): 130-134.
- [15] 高大宽,章翔,蒋晓帆,等. 白藜芦醇对暂时性氧糖剥夺致神经元损伤的保护作用[J]. 实用预防医学, 2010, 26(5): 732-734.
- [16] 杨洁,张建华,吕晓晓,等. 不同药物对青春前期大鼠睾丸扭转复位侧睾丸的远期影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(8): 1500-1504.
- [17] 刘旭丹,于晓璐,赵越,等. 白藜芦醇通过 TLR4/MyD88 依赖性信号通路对 SW1353 细胞发挥抗骨关节炎作用的实验研究[J]. 实用预防医学, 2017, 24(11): 1296-1299.
- [18] 任亚浩,李翠,赵越,等. 白藜芦醇对衰老小鼠氧化应激和血清同型半胱氨酸的影响[J]. 实用预防医学, 2017, 24(10): 1172-1174.
- [19] 唐玲丽,余平,陈新瑞,等. 白藜芦醇对类风湿关节炎滑膜细胞增生及凋亡的影响[J]. 实用预防医学, 2005, 12(1): 84-87.

收稿日期: 2017-11-16