

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.015

长期酒精摄入对雄性大鼠生殖系统的损伤

马 瑞 张振华 马劲夫 陈 东 赵 强[△]

(解放军第 305 医院 北京 100017)

摘要 目的: 研究长期酒精摄入对雄性大鼠生殖系统的损伤机制。**方法:** 选用 8 周龄的 SD 大鼠, 进行随机分组: 对照组(5% 蔗糖, 口服); 酒精组(4g/kg, 口服)。连续 12 周后, 分别取附睾考察精子数目、活力; 取血清检测睾酮和促黄体生成素(LH)含量; 计算睾丸-体重比, 并检测睾丸中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量以及谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性; 同时检测凋亡相关蛋白 bax, bcl-2 以及 caspase-3 前体和剪切体的蛋白表达。**结果:** 酒精组 12 周后, 大鼠的睾丸-体重比明显降低($P<0.05$), 精子数目减少($P<0.01$), 精子活力下降($P<0.01$); 血清中睾酮含量下降($P<0.05$), LH 含量增加($P<0.05$); 睾丸中 MDA 含量增加($P<0.01$), GSH 含量降低($P<0.05$), GPx 和 SOD 活性下降($P<0.01$); 凋亡相关蛋白 bax 表达增加($P<0.05$), caspase-3 剪切体与前体的比值增加($P<0.01$)。**结论:** 长期摄入酒精引起的大鼠睾丸内氧化应激水平的增加是其导致其生殖系统损伤的重要因素之一。

关键词: 酒精; 氧化应激水平; 雄性生殖系统损伤

中图分类号: Q95-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)05-858-04

Chronic Alcohol Intake Contributes to the Injury in Reproductive System of Male Rats

MA Rui, ZHANG Zhen-hua, MA Jin-fu, CHEN Dong, ZHAO Qiang[△]

(The 305 Hospital of People's Liberation Army, Beijing, 100017, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of chronic alcohol intake contributed to the injury in reproductive system of male rats. **Methods:** Male SD rats, aged 8 weeks old, were randomly divided into two groups and treated as follows: (i) control (5% sucrose, orally) daily for 12 weeks, (ii) ethanol (4 g/kg, orally) daily for 12 weeks. 12 weeks later, epididymises were removed and analyzed for sperm number and motility. Serum was isolated and analyzed for concentration of testosterone and LH. Testis were removed and content of MDA and GSH, activity of GPx and SOD, expression of bax, bcl-2, caspase-3 and cleaved caspase-3 were analyzed. **Results:** 12 weeks later, the ratio of testicular weight and body weight decreased in ethanol-treated group ($P<0.05$). The number and motility of sperm decreased ($P<0.01$), and the concentration of testosterone and LH in serum decreased ($P<0.05$) and increased ($P<0.05$), respectively. The content of MDA ($P<0.01$) and GSH ($P<0.05$) increased. The activity of GSH and GPx decreased ($P<0.01$). The expression of bax increased ($P<0.05$) and the ratio of cleaved caspase-3 and caspase-3 elevated ($P<0.01$). **Conclusion:** The augmentation of oxidative stress contributes to the ethanol-induced reproductive injury in male rats.

Key words: Ethanol; Oxidative stress; Male reproductive system

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-858-04

前言

随着成人酗酒现象的增加, 长期、大量酒精的摄入对于机体健康的影响越来越受到人们的关注, 慢性酒精中毒已成为影响男性生殖系统健康的重要因素之一^[1,2]。临床研究发现, 男性阳痿、乳房女性化以及性欲丧失均与酒精中毒具有一定的相关性。在长期酗酒者中 31% -58% 的人群存在性欲减退或丧失, 酒精中毒者中约有 8% 出现阳痿等症状, 长期、大量的酒精摄取会导致睾丸萎缩、性腺分泌失常甚至男性不育等^[3,4]。目前为止,

男性生殖系统的酒精损伤机制尚不明确^[5-7], 本文通过机体氧化应激水平的改变来解释酒精中毒对男性生殖系统的损伤机制。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

SD 大鼠 (清洁级, 中国科学院上海分院实验动物中心), MDA 检测试剂盒, GSH 检测试剂盒, GPx 检测试剂盒以及 SOD 检测试剂盒 (南京碧云天公司), 睾酮检测试剂盒 (美国 R&D 公司), LH 放免检测试剂盒 (上海史瑞可生物科技有限公司), CELL-VU[®] RDRM-600 精子计数板 (美国 Millennium Sciences 公司), bax, bcl-2 和 cleaved caspase-3 抗体 (美国 cell-signalling 公司), caspase-3 (美国 Santa cruz 公司), 酒精 (99.99% 色谱纯, 默克公司), RIPA 裂解液 (碧云天公司)。

1.2 实验分组

作者简介: 马瑞 (1983-), 男, 双学位硕士, 主管药师, 主要研究方向: 医院药学、公共卫生管理, 电话: 010-63098097,

E-mail: maruipla@126.com;

[△] 通讯作者: 赵强, E-mail: frankzhao1972@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2013-07-09 接受日期: 2013-07-30)

8 周龄 SD 大鼠分为 2 组:对照组(蔗糖按照 5% 质量比稀释,剂量是 10 mL/kg 体重)、酒精组(酒精按照 20% 体积比稀释,剂量是 4 g/kg 体重),均经过口胃管灌胃,每日一次,持续进行 12 周。

1.3 精子计数和活力的考察

取大鼠一侧附睾,加 PBS 2 mL,破碎;于 30 ℃ 水浴振摇 20 min,使精子自行移至溶液中;吸取 4 μ L 样品,置于 CELL-VU® RDRM-600 精子计数板的载玻片点样区的最边缘,倒置显微镜观察,查看计数板网格,计数网格中 60 个小方格中的所有活动和不活动的精子^[8];总的精子数除以 12,结果就是精子的浓度:millions/mL;精子的存活率(%)为:存活率 = 活动精子数 / 总的精子数 $\times$ 100%。

1.4 睾酮和 LH 的检测

断头法处死大鼠,取血,室温放置 2 h,离心 20 min 分离血清;应用睾酮检测试剂盒和 LH 放免检测试剂盒分别检测血清

中的睾酮和 LH 含量^[9,10]。

1.5 睾丸中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量以及谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性的检测

取一侧睾丸,按照各个试剂盒要求进行处理,检测各项指标。

1.6 睾丸中蛋白表达的检测

取另一侧睾丸,加 3 mL 的 RIPA 裂解液中匀浆,经 4 ℃、14000 rpm 离心 20 min,取上清;测浓度后,蛋白煮沸变性。制备 SDS-PAGE 凝胶,以 35 μ g 蛋白 / 泳道上样,经 10% SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜。丽春红(Ponceau S)染色确定转膜情况并标记蛋白质标准参照物位置,用 5%脱脂奶粉封闭。依次加入一抗(按照表 1 所示浓度)和相应的二抗,DAB 显色剂显色,用 GIS 系统定量扫描灰度值。以同一标本 β -tubulin 的产物光密度值作为内参,校正各自目的蛋白的积分光密度值,按公式(相对值 = 目标蛋白表达强度 β -tubulin 表达强度)计算出相对值^[11-13]。最终结果用对照组的倍数乘以百分比表示。

表 1 用于 Western blotting 检测的一抗
Table 1 Primary antibodies used for Western blotting

Name	Source	Dilution
Bcl-2	rabbit polyclonal antibody	1:1000
Bax	rabbit polyclonal antibody	1:1000
cleaved Caspase-3	rabbit polyclonal antibody	1:1000
Caspase-3	rabbit polyclonal antibody	1:3000
β -actin	mouse monoclonal antibody	1:20000

1.7 统计分析

结果中计量资料均以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用 SPSS 12.0 统计软件分析,ANOVA(方差分析)进行组间差异显著性检验。P<0.05 定义为有统计学差异。

2 结果

2.1 睾丸 - 体重比与精子活力

酒精摄入 12 周后,大鼠的睾丸体重比明显降低(如图 1),精子数目减少,精子活力下降(如图 2)。

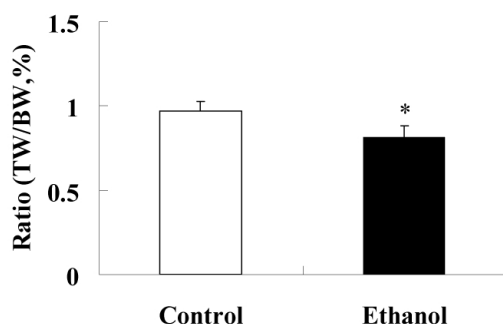


图 1 睾丸体重比值(n=11)

Fig.1 The ratio between testicular weight and body weight of rats (n=11 in each group), TW: testicular weight, BW: body weight,

* P<0.05 vs control group

2.2 MDA、GSH、GPx 及 SOD 活性检测

睾丸中 MDA 含量增加, GSH 含量降低(P<0.05), GPx

(P<0.01)和 SOD(P<0.01)活性下降(如图 4)。

2.3 睾酮和 LH 含量

血清中睾酮含量下降, LH 含量增加(如图 3)。

2.4 睾丸蛋白表达检测

凋亡相关蛋白 bax 表达增加(P<0.05), caspase-3 剪切体与前体的比值增加(P<0.01), bcl-2 的表达变化不明显(P>0.05)(如图 5)。

3 讨论

本研究结果提示,长期大剂量的酒精摄入可导致大鼠睾丸出现明显萎缩,依据精子损伤程度,睾酮的分泌减少,睾丸凋亡相关蛋白增加等数据可认为慢性酒精中毒对雄性 SD 大鼠生殖系统能够造成显著伤害^[14]。机体对雄性生殖系统的调节主要是通过下丘脑-腺垂体-睾丸轴(HPG axis)来完成,而下丘脑、腺垂体和睾丸分泌的激素之间的相互且复杂的调控关系构成了下丘脑-腺垂体-睾丸轴。下丘脑合成、分泌促性腺激素释放激素(GnRH)进入垂体, GnRH 可调节腺垂体分泌促性腺激素黄体生成素(LH)。LH 作用于睾丸 Leydig 细胞,促进睾酮合成。以往多次实验认为酒精是通过影响下丘脑-腺垂体-睾丸轴,间接影响生殖系统^[15,16]。

本文的结果显示长时间的酒精摄入,可致大鼠血清中 LH 的水平增加。这个结果提示酒精对雄性生殖系统的影响主要是作用于外周睾丸水平而非中枢,血清中 LH 水平的增加是由于睾酮水平的下降所引起的负反馈调节导致的。本文的另一个重要结果是酒精摄入后,大鼠睾丸的氧化应激水平和细胞凋亡的

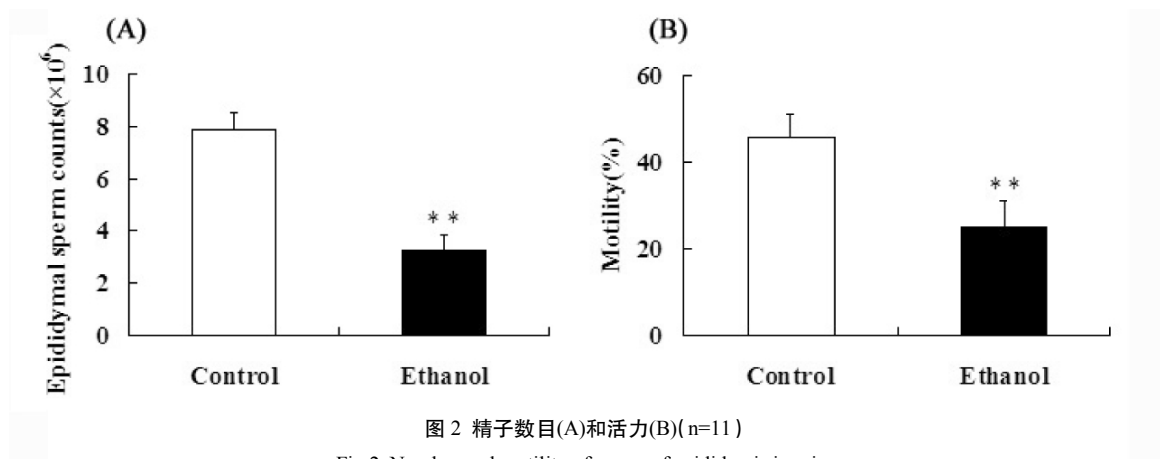


图2 精子数目(A)和活力(B)(n=11)
Fig.2 Number and motility of sperm of epididymis in mice
(n=11 in each group), ** P<0.01 vs control group

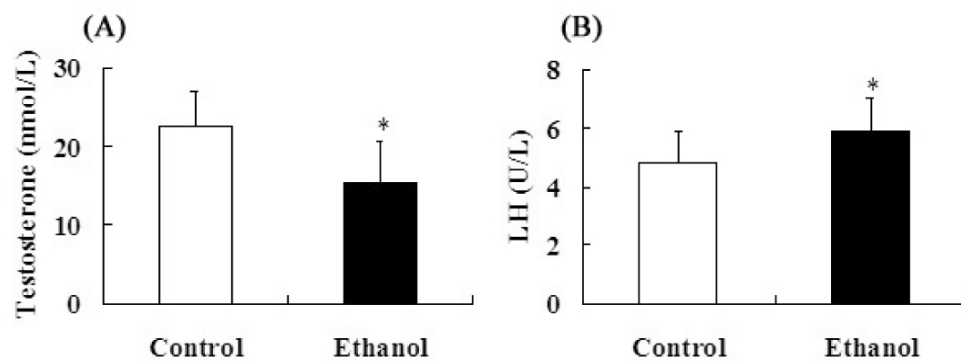


图3 睾酮 T(A)和 B 促黄体生成素 LH(B)浓度的检测(n=11)
Fig.3 concentration of testosterone and luteinizing hormone (LH) in serum of rats
(n=11 in each group), LH: luteinizing hormone, * P<0.05 vs control group

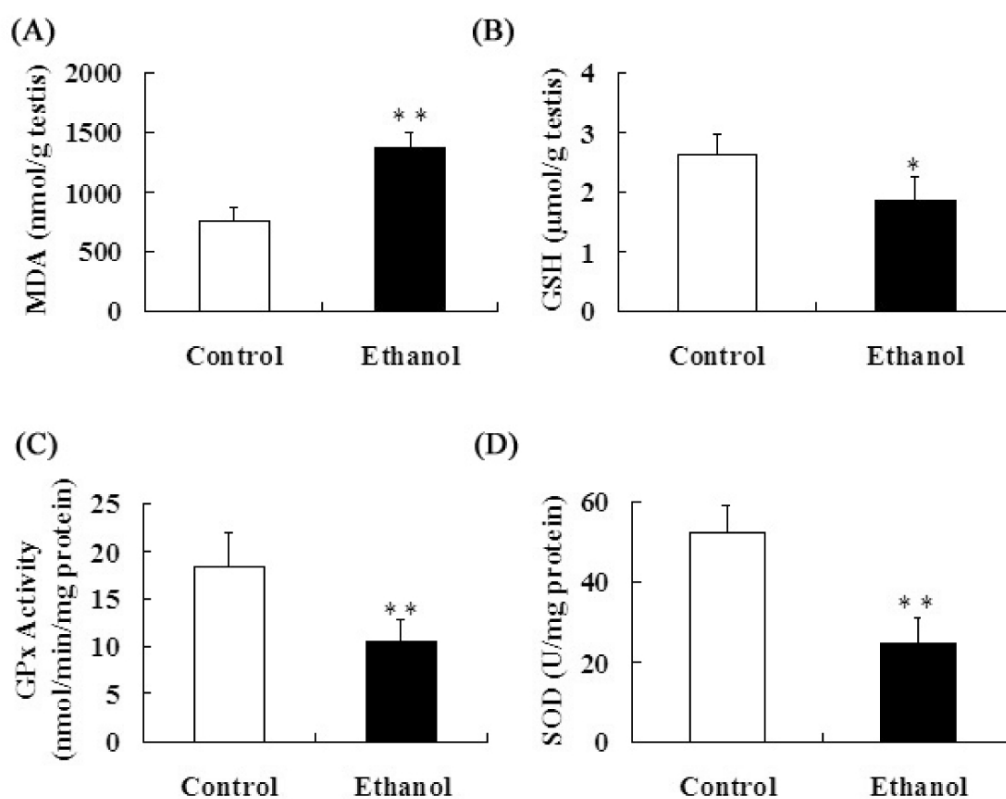


图4 睾丸 MDA(A)、GSH(B)、GPx(C)、SOD(D)检测(n=11)

Fig.4 Concentration of MDA, GSH, GPx and SOD (n=11 in each group)

MDA: malondialdehyde, GSH: glutathione, GPx: glutathione peroxidase, SOD: superoxide dismutase, * P<0.05, ** P<0.01 vs control group

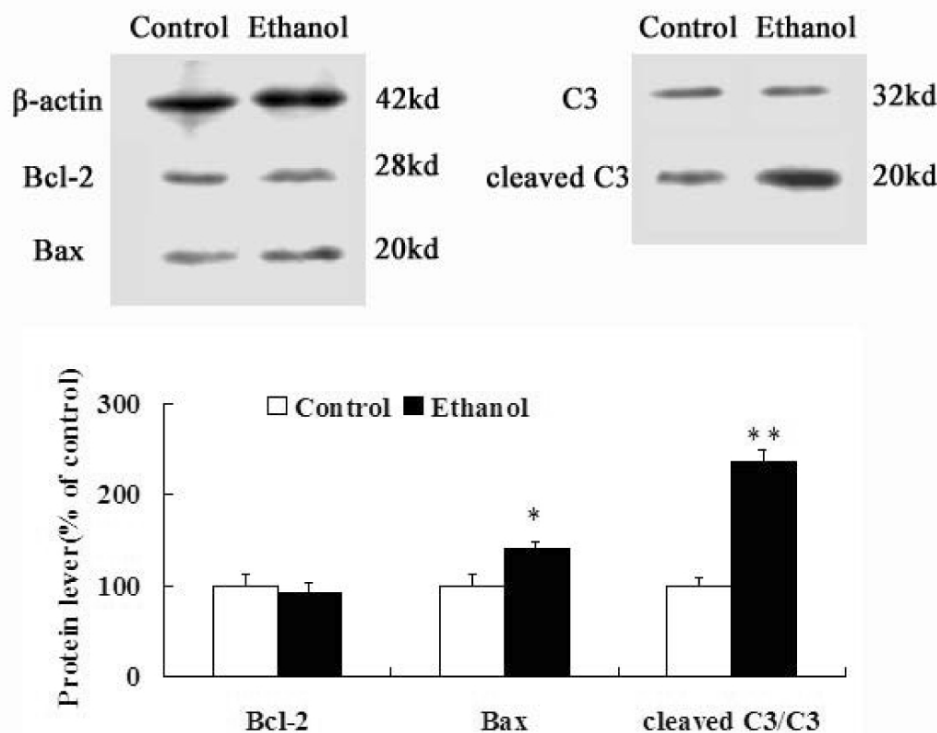


图5 睾丸凋亡相关蛋白 bcl-2, bax 和 caspase-3 前体和剪切体蛋白的表达变化

Fig.5 Expression of bax, bcl-2, caspase-3 and cleaved caspase-3 in testis of rats

C3: caspase-3, * P<0.05, ** P<0.01 vs control group, the experiment was tripled

增加。酒精摄入导致氧化应激水平增加在以往的中报道多见于酒精对心血管系统的损伤^[17,18]。而本研究结果表明酒精损伤睾丸的一个重要原因可能是其导致了氧化应激水平的增加。同时,通过进一步实验发现,酒精引发的凋亡主要是通过调节促凋亡因子 bax,而不是抑制凋亡因子 bcl-2 引起的。

综上所述,大鼠经过长时间、大剂量的酒精摄入后,睾丸中氧化应激的水平增加是导致其雄性生殖系统损伤的重要原因之一。

参考文献(References)

- [1] Theodore J. Cicero, Bruce Nock, Lynn O'Connor, et al. Acute alcohol exposure markedly influences male fertility and fetal outcome in the male rat [J]. Life Sci, 1994, 55: 901-901
- [2] Yoshishige Ida, Shusaku Tsujimaru, Katsura Nakamura, et al. Effects of acute and repeated alcohol ingestion on hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal functioning in normal males [J]. Drug Alcohol Depend, 1992, 31: 57-57
- [3] Qianlong Zhu, Jeremy Meisinger, Nicholas V. Emanuele, et al. Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2000, 10: 1550-1556
- [4] El-Sokkary GH. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rats [J]. Neuro endocrinol Lett, 2001, 22: 93-99
- [5] Arto K. Orpana, C.J.Peter Eriksson, Matti Härkänen. Ethanol- induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat leydig cells; role of culture medium composition [J]. J Steroid Biochem, 1989, 33: 1243-1248
- [6] Tom V. Widenius, C.J.Peter Eriksson, Reino H. Ylikahri, et al. Inhibition of testosterone synthesis by ethanol: role of luteinizing hormone [J]. Alcohol, 1989, 6: 241-241
- [7] Ellingboe J. Acute effects of ethanol on sex hormones in non-alcoholic men and women [J]. Alcohol and Alcoholism. Supplement 1987, 1: 109-116
- [8] 王水明, 彭瑞云, 高亚兵, 等. 极短期微波辐射对雄性大鼠生殖系统的影响 [J]. 军事医学, 2011, 35(5): 375-378
Wang Shui-ming, Peng Rui-yun, Gao Ya-bing, et al. Effect of extreme short-term microwave radiation on male reproduction in rats [J]. Mil-Med Sci, 2011, 35(5): 375-378
- [9] 罗琼, 任世成, 杨明亮等. 海带多糖对睾丸受辐射雄性大鼠性功能的影响 [J]. 营养学报, 2009, 31(3): 259-262
Luo Qiong, Ren Shi-cheng, Yang Ming-liang, et al. Effect of Laminarin Japonica Polysaccharides on Sexual Function of Male Rats After Irradiation of Testis [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(3): 259-262
- [10] 高海燕, 李杰, 司纪亮等. 妊娠期二月桂酸二丁基锡暴露对子代雄性大鼠生殖系统的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(11): 952-954
Gao Hai-yan, Li Jie, Si Ji-liang, et al. Effects of Dibutyltin Dilaurate Exposure during Gestation period on Reproductive System of Male Offspring Rats [J]. J Environ Health, 2010, 27(11): 952-954
- [11] 陈通文, 曾金雄, 王海鹰等. 补肾生精法对老龄大鼠睾丸蛋白表达谱的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(5): 442-445
Chen Tong-wen, Zeng Jin-xiong, Wang Hai-ying, et al. Effect of Therapy of Tonifying Kidney and Replenishing Essence on Protein Expression Profile in Testes of Aged Rats [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2008, 25(5): 442-445

(下转第 869 页)

- nced and diffusion-weighted breast MR imaging parameters [J]. Radiology, 2012, 263(2):374-382
- [10] Mami L, Denis LB, Ryosuke O, et al. Apparent diffusion coefficient as an MR imaging biomarker of low-risk ductal carcinoma in situ: a pilot study [J]. Radiology, 2011, 260(2):364-372
- [11] Soley B, Nisreen E, Angelica MG, et al. Predictive factors for BRCA1/BRCA2 mutations in women with ductal carcinoma in situ [J]. Cancer, 2012, 118:1515-1522
- [12] Stephanie KC, Yu-Hui C, Margaret MD, et al. Impact of margin status on local recurrence after mastectomy for ductal carcinoma in situ [J]. International Journal of Radiation Oncology, biology, physics, 2013, 85(4):948-952
- [13] Jeremy S, Hiram C, Lee T, et al. Radiation field design and regional control in sentinel lymph node-positive breast cancer patients with omission of axillary dissection [J]. Cancer, 2012, 118:1994-2003
- [14] Sabin BM, Sharad G, Meena SM, et al. Ductal carcinoma in situ treated with breast-conserving surgery and radiotherapy: a comparison with ECOG study 5194 [J]. Cancer, 2011, 117:1156-1162
- [15] 周飞华, 徐海峰, 巴红珍, 等. (18)F-FDG PET 和治疗量(131)I 全身扫描对分化型甲状腺癌根治术后转移灶检测的临床价值评估[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(03):489-492+463
- Zhou Fei-hua, Xu Hai-feng, Ba Hong-zhen, et al. Assessment of the Clinical Value on 18F-FDG PET and 131I Whole Body Scan for Detecting the Metastases in Differentiated Thyroid Cancer After Operation[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(03):489-492+463
- [16] Elaine SW, Mary LL, Cheryl SA, et al. Effect of radiotherapy boost and hypofractionation on outcomes in ductal carcinoma in situ [J]. Cancer, 2011, 117:54-62
- [17] Craig A, Stewart JA, Soonmyung P, et al. Adjuvant tamoxifen reduces subsequent breast cancer in women with estrogen receptor-positive ductal carcinoma in situ: a study based on NSABP protocol B-24 [J]. Journal of Clinical Oncology, 2012, 30(12):1268-1273
- [18] Monica M. Refining the use of endocrine therapy for ductal carcinoma in situ [J]. Journal of Clinical Oncology, 2012, 30(12):1249-1251
- [19] Shelley H, Aseem L, Yunn-Yi C, et al. Genomic alterations and phenotype of large compared to small high-grade ductal carcinoma in situ [J]. Human Pathology, 2011, 42:1467-1475
- [20] 杨庄青, 邹天宁, 陈德滇, 等. 乳腺癌腋窝淋巴结清扫术后上肢淋巴水肿的危险因素分析 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(35):6909-6911+6916
- Yang Zhuang-qing, Zou Tian-ning, Chen De-dian, et al. Analysis of the Risk Factors of Arm Lymphedema Following Axillary Lymph Node Dissection with Breast Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(35):6909-6911+6916

(上接第 861 页)

- [12] 刘祥梅, 吴宇强, 谭军, 等. 力竭运动 24h 后大鼠睾丸酶活性及 Bcl-2、Bax 蛋白表达变化 [J]. 山西师大体育学院学报, 2010, 25(5): 121-124
- Lu Xiang-mei, Wu Yu-qiang, Tan Jun, et al. the Testis Activity and Bcl-2, Bax Protein Expression Changes of the Rat after 24 hours Exhaustive Exercise [J]. Journal of Physical Education Institute of Shanxi Normal University, 2010, 25(5): 121-124
- [13] Jinhua Sun, Ming Ying, Hui Li, et al. Role of UCH-L1/ubiquitin in acute testicular ischemia-reperfusion injury [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 366(2): 539-544
- [14] 邓旭辉, 廖卫公, 张荣华等. 养精种子汤对缺氧雄性大鼠生殖细胞凋亡的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(8): 721-723
- Deng Xu-hui, Liao Wei-gong, Zhang Rong-hua, et al. Yang Jing Zhong Zi decoction attenuates apoptosis of spermatogenic cells of hypoxic injured rats [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2009, 31(8): 721-723
- [15] JS Gavalier, T Urso, DH Van Thiel. Ethanol: its adverse effects upon the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. Subst Alcohol Actions Misuse, 1983, 4(2-3): 97-110
- [16] Qin Shi, Dale B. Hales, Nicholas V. Emanuele, et al. Interaction of Ethanol and Nitric Oxide in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in the Male Rat [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1998, 22(8): 1754-1762
- [17] Mehmet Fatih Sönmez, Figen Narin, Esra Balcioglu, et al. Melatonin and Vitamin C Attenuates Alcohol-Induced Oxidative Stress in Aorta [J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2009, 105 (6): 410-415
- [18] Kazim Husain, Manuel Vazquez, Rais A. Ansari, et al. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2008, 307(1-2): 51-58