

- target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis [J]. *Nat Med*, 2002; 8(9): 1004 - 1010
- 4 Brooks HL, Caballero S, Newell CK, *et al.* Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal derived factor - 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 112(12): 1801 - 1807
- 5 Butler JM, Guthrie SM, Koc M, *et al.* SDF - 1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1): 86 - 93
- 6 Meleth AD, Agron E, Chan CC, *et al.* Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(11): 4295 - 4301
- 7 Guinto G, del Valle R, Nishimura E, *et al.* Primary empty sella syndrome; the role of visual system herniation [J]. *Surg Neurol*, 2002, 58(1): 42 - 47
- 8 康前雁, 杨玉, 王玉琴, 等. 糖尿病视网膜病变与血清 VEGF 含量的相关性 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2003, 24(4): 392 - 393
- 9 Lip PL, Chatterjee S, Caine GJ, *et al.* Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin - 2, and soluble angiopoietin receptor tie - 2 in diabetic retinopathy: effects of laser photocoagulation and angiotensin receptor blockade [J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88(12): 1543 - 1546
- 10 陈凌燕, 吕林, 李永浩, 等. 增殖性糖尿病视网膜病变玻璃体 SDF - 1 和 VEGF 的含量分析 [J]. *眼科学报*, 2008, 24(1): 6 - 8
- (收稿日期: 2012 - 05 - 30)
(修回日期: 2012 - 06 - 28)

药物对青春期前大鼠单侧睾丸扭转复位后健侧睾丸生精功能的影响

林孝坤 秦 乐 谢添纯 赵军锋 陈聪德 张浩川 陈肖鸣

摘 要 **目的** 探讨药物对青春期前大鼠单侧睾丸扭转复位后健侧睾丸在青春期后的组织学以及附睾精子生成的影响。**方法** 将 28 只健康雄性 SD 大鼠, 随机分为假手术组 (A 组, $n = 7$)、睾丸扭转复位组 (B 组, $n = 7$)、N - 甲基 - L - 精氨酸 (L - NMMA) 组 (C 组, $n = 7$) 和环孢素组 (D 组, $n = 7$)。按 Turner 法建立左侧睾丸扭转模型, 并做相应的药物处理, 喂养至术后 8 周时处死, 取右侧睾丸标本行组织病理学观察, 同时取右侧附睾尾部行精子计数及活动率测定。**结果** 与 B 组相比, C 组和 D 组生精上皮层数增多, 平均曲细精管直径 (MSTD) 增大, 睾丸组织结构评分降低, 同时附睾精子密度与活动率明显升高, 其差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** L - NMMA 和环孢素能够减轻青春期前大鼠单侧睾丸扭转复位后健侧睾丸组织损害, 使附睾精子生成显著增多。

关键词 睾丸扭转 L - NMMA 环孢素 生精功能

Effect of Drug on Testicular Spermatogenetic Function of the Contralateral Testicular After Unilateral Testicular Torsion in Prepubertal Rats. Lin Xiaokun, Qin Le, Xie Tianchun, *et al.* Department of Pediatric Surgery, The Affiliated Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the effect of drug on the histological changes and spermatogenesis of the contralateral testis in prepuberty after unilateral testicular torsion in prepubertal rats. **Methods** Twenty - eight prepubertal male Sprague - Dawley rats were equally randomized into group A (sham - operation), group B (torsion/detorsion), group C (L - NMMA) and group D (cyclosporine), with 7 rats in each. The testicular torsion/detorsion model was established by the Turner method, then the rats took the corresponding drug treatment. All the rats were fed under the same condition for 8 weeks and sacrificed. Histopathological observation was performed on the right testis. Sperm counting and activity analysis were performed in epididymis. **Results** Compared with group B, there were significant differences in seminiferous epithelial layers, MSTD and testicular histological score between group C and D. Sperm concentration of epididymis and sperm motility in rats of torsion group were also increased significantly. **Conclusion** L - NMMA and cyclosporine can reduce the

基金项目: 国家人口和计划生育委员会基金资助项目 (C1 - 81); 温州市科技局基金资助项目 (Y20100305)

作者单位: 325027 温州医学院附属育英儿童医院小儿外科 (林孝坤、秦乐、赵军锋、陈聪德、张浩川、陈肖鸣); 325027 温州医学院附属眼视光学院 (谢添纯)

通讯作者: 陈肖鸣, 电子信箱: cxm@wzmc.net

damages of contralateral testis after unilateral testicular torsion in prepubertal rats and increase the spermatogenesis remarkably.

Key words Testicular torsion; L - NMMA; Cyclosporine; Testicular spermatogenetic function

单侧睾丸扭转 (unilateral testicular torsion, UTT) 是常见的小儿泌尿外科急诊之一,即使早期手术复位成功,仍有 36% ~ 39% 的患儿成年后出现精液异常表现如精子畸形增多、精子总量减少及死精子等,严重者甚至不育^[1]。因此,UTT 手术复位后的药物治疗越来越受到小儿外科医师临床和科研的极大关注。本实验通过建立青春期前大鼠单侧睾丸扭转模型,探讨药物对青春期前大鼠单侧睾丸扭转复位后健侧睾丸在青春期后的组织学以及附睾精子生成的影响。现报道如下。

材料与方法

- 1. 动物分组:健康雄性青春前期 SD 大鼠 28 只,体重约 90 ~ 110g,鼠龄约 28 ~ 32 天,购自中国科学院上海实验动物中心。随机分为假手术组 (A 组, $n = 7$)、睾丸扭转复位组 (B 组, $n = 7$)、L - NMMA 组 (C 组, $n = 7$) 和环孢素组 (D 组, $n = 7$)。
- 2. 动物模型建立及取材:所有大鼠术前均以 2% 戊巴比妥 (50mg/kg) 行腹腔注射麻醉,睾丸扭转模型按照 Turner 法制备:取左下腹小切口,充分显露左侧睾丸,切断睾丸引带及周围筋膜,完全游离睾丸^[2]。A 组仅将单侧睾丸游离后直接缝合固定于阴囊壁。其余 3 组则将左侧睾丸沿精索方向顺时针扭转 720° 维持 4h 后再复位左侧睾丸。其中 C 组大鼠在睾丸扭转复位前 30min 静脉注射 L - NMMA 针 (30mg/kg), D 组大鼠则在术后 1 个月内每日 1 次腹腔注射环孢素针 (5mg/kg)。各组大鼠喂食至术后 8 周时处死,采集右侧睾丸及右侧附睾尾部。
- 3. 检测方法: (1) 睾丸组织病理学检查:睾丸组织用 10% 甲醛固定过夜,常规石蜡包埋,切片厚度为 4 μ m,行 HE 染色,由非课题组病理科医师置于光镜下镜检,测定睾丸组织生精上皮层数及平均曲细精管直径,并根据 Cosentino 法按 1 ~ 4 级行睾丸组织结构评分,等级 1:正常睾丸;等级 2:睾丸损伤较轻;生殖细胞紧贴精细小管排列,但结构较松散;等级 3:睾丸损伤较重,生殖细胞脱落或缺失,可伴有核固缩;等级 4:睾丸损伤严重,生殖细胞出现典型的凝固性坏死。 (2) 精子计数及活动率测定:取附睾尾部置于 4ml 生理盐水的平皿中,用眼科

- 剪适当剪碎制成精子悬液,迅速置于 37℃ 温水中孵育 20min 以便精子充分游离,用精子技术板检测精子密度,结果以每毫升精子数表示。同时取 1 ~ 2 滴上述孵育后的精子悬液滴于载玻片上,高倍显微镜下随机记录 200 个精子中活动精子的百分率。
4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较用单因素方差分析,组间两两比较方差齐性用 LSD 检验,方差不齐性用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 睾丸组织形态学观察:4 组大鼠右侧睾丸组织肉眼未见明显异常。HE 染色下可见 A 组生精细胞排列紧密有序,层次分明,精细小管结构完整。B 组生精上皮层排列紊乱,可见毛玻璃样改变,精细小管结构连续性中断。C 组生精上皮层尚紧贴精细小管排列,精细小管结构较完整。D 组精细小管结构较完整,生精细胞层次较分明,生精细胞排列相对紧密 (图 1)。

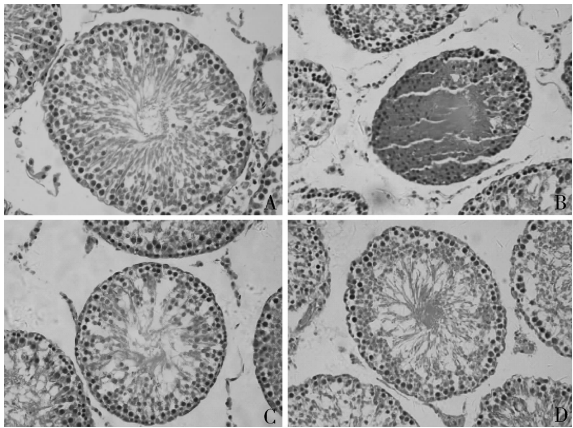


图 1 4 组大鼠睾丸组织精细小管结构 (×400)

2. 睾丸组织病理学指标比较:C 组与 D 组在生精上皮层数、MSTD、睾丸组织结构评分上与 B 组比有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 4 组大鼠睾丸组织病理学比较

分组	生精上皮层数	MSTD (μ m)	结构评分	精子密度 ($\times 10^6$ /ml)	活动率 (%)
A 组	4.71 $\pm$ 0.39 *	284.26 $\pm$ 14.82 *	1.14 $\pm$ 0.38 *	52.1 $\pm$ 14.2 *	49.1 $\pm$ 13.3 *
B 组	2.26 $\pm$ 0.93	206.01 $\pm$ 24.98	3.57 $\pm$ 0.53	30.6 $\pm$ 8.2	9.3 $\pm$ 4.9
C 组	3.89 $\pm$ 0.64 *	260.31 $\pm$ 18.20 *	2.29 $\pm$ 0.49 *	43.4 $\pm$ 10.1 *	37.6 $\pm$ 10.5 *
D 组	3.21 $\pm$ 0.70 *	241.94 $\pm$ 43.99 *	2.85 $\pm$ 0.90 *	47.0 $\pm$ 10.7 *	41.3 $\pm$ 13.1 *

与 B 组比较, * $P < 0.05$

3. 附睾精子分析: C 组与 D 组精子密度与活动率与 B 组比有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

讨 论

UTT 导致健侧睾丸生精功能受损的原因较为复杂, 其早期影响和晚期影响机制有所不同。缺血再灌注损伤可能是 UTT 后健侧睾丸生精功能早期损伤的主要原因^[3]。再灌注时局部睾丸组织生成过量的一氧化氮及氧自由基等导致健侧睾丸组织损伤。UTT 后健侧睾丸生精功能晚期损伤的主要原因可能是自身免疫性交感性睾丸炎^[4]。睾丸扭转后血睾屏障破坏使自身抗原释放入血, 激活机体免疫系统, 引起自身免疫性交感性睾丸炎, 继而导致生精细胞损伤。

青春期前单侧睾丸扭转不仅可以导致青春期后健侧睾丸组织生精细胞水肿、凋亡增加、生精上皮结构破坏、炎性细胞因子增多, 而且可以使精子活力和密度降低、数量减少^[5]。本研究显示扭转复位组生精上皮层计数与平均曲细精管直径分别 2.3 ± 0.9 、 $206 \pm 25 \mu\text{m}$, 与假手术组 (4.7 ± 0.4 、 $284 \pm 15 \mu\text{m}$) 相比较明显降低, 结构评分则明显升高, 表明青春期前单侧睾丸扭转复位后, 青春期后健侧睾丸组织损害明显。同时本实验显示扭转复位组大鼠睾丸组织精子密度为 $(30.6 \pm 8.2) \times 10^6/\text{ml}$, 活动率为 $9.3\% \pm 4.9\%$, 与假手术组 [$(52.1 \pm 14.2) \times 10^6/\text{ml}$, $49.1\% \pm 13.3\%$] 相比明显下降, 表明大鼠单侧睾丸扭转可以引起健侧睾丸精子密度下降, 活动能力减弱。这也进一步表明青春期前大鼠单侧睾丸扭转后, 健侧睾丸组织由于生精上皮细胞发育不佳, 引起精子数量减少和活动率降低, 从而降低精子的受精能力最终导致不育。

人们已经认识到 UTT 后即使早期手术复位固定仍可能出现成年后精液异常甚至不育。因此药物治疗研究的重点就是如何有效合理地阻断 UTT 复位过程中的各种病理生理改变。目前已有多种实验研究包括性激素治疗、抗氧化剂治疗、辣椒碱交感神经阻滞等证实能够有效减轻 UTT 复位后健侧睾丸组织损伤^[6-8]。鉴于此, 手术后早期药物辅助治疗成为今后睾丸扭转研究的重要方向之一。L-NMMA 是一种非选择性一氧化氮合酶抑制剂, 广泛用于治疗缺血再灌注损伤, 通过抑制诱生型和固有型一氧化氮合酶的活性来抑制一氧化氮的生成, 从而抑制组织炎症反应, 改善组织微循环。单侧睾丸扭转复位后, 一方面扭转侧睾丸可以生成过量的一氧化氮、氧自由基以及两者结合形成更具毒性的 ONOO^- , 通过血液循环作用间接于健侧睾丸组织; 另一方面健侧睾丸由于缺血

再灌注损伤生成一氧化氮及氧自由基等炎症递质, 直接通过脂质过氧化反应、诱导生精细胞凋亡等作用于健侧睾丸组织。L-NMMA 可以通过抑制睾丸组织一氧化氮合酶的活性与产生, 减少一氧化氮的生成, 改善局部睾丸组织的缺血再灌注损伤。环孢素是一种新型的免疫抑制剂, 不仅能特异性地抑制辅助 T 淋巴细胞的活性从而抑制细胞免疫反应, 而且可以抑制 B 淋巴细胞的活性从而对体液免疫亦有抑制作用。

睾丸是一种免疫豁免器官, 血睾屏障可以使睾丸内的自身抗原与机体免疫系统相对隔离。各种原因引起的血睾屏障破坏, 如睾丸扭转、外伤等, 可以使精子等自身抗原溢出生精管入血, 激活机体免疫系统生成抗精子抗体等多种自身抗体。自身抗体一方面可以形成抗原抗体复合物沉积于曲精小管基膜及间质区直接引起健侧睾丸损伤, 另一方面可以进一步通过激活补体等后续免疫杀伤效应导致健侧睾丸各级生精细胞损伤。环孢素可以通过抑制机体免疫系统减少自身抗体的生成。本实验应用上述两种药物治疗后健侧睾丸组织不仅生精上皮层数增多, MSTD 增大, 睾丸组织结构评分降低, 而且精细小管结构完整, 生精细胞发育良好, 精子密度和活动率明显升高。总之, L-NMMA 和环孢素能够减轻青春期前大鼠单侧睾丸扭转复位后健侧睾丸组织损害, 保护健侧睾丸生精功能, 使附睾精子生成显著增多。

参考文献

- 1 辛锋, 申吉泓, 赵晖. 睾丸扭转的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2009, 29(4): 548-550
- 2 Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair[J]. J Urol, 2004, 172(6): 2574-2578
- 3 陈林, 陈悦, 詹维伟. 单侧睾丸扭转致对侧睾丸损伤的研究进展[J]. 中国男科学杂志, 2010, 24(4): 66-68
- 4 林孝坤, 秦乐, 陈聪德, 等. 早期 NO 抑制对大鼠睾丸生精功能迟发性损伤保护的研究[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(24): 1676-1678
- 5 曹朴, 贾瑞鹏. 睾丸扭转与缺血再灌注损伤[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(6): 426-428
- 6 Savas C, Ozguner M, Ozguner F, et al. The effects of human chorionic gonadotropin on the contralateral side in unilateral testicular torsion[J]. Int Urol, 2003, 35(3): 237-245
- 7 Romeo C, Antonuccio P, Esposito M, et al. Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury[J]. Urol Res, 2004, 32(5): 367-371
- 8 Sarioglu - Buke A, Erdem S, Gedikoglu G, et al. Capsaicin effectively prevents apoptosis in the contralateral testis after ipsilateral testicular torsion[J]. Br J Urol, 2001, 88(7): 787-789

(收稿日期: 2012-06-23)

(修回日期: 2012-06-28)