

醋酸棉酚对雄性大鼠睾酮、黄体生成素(LH) 和卵泡刺激素(FSH)的影响

马晓年 李文君 孙亦彬

(国家计划生育委员会科学技术研究所)

提要 给大鼠口服醋酸棉酚 30 mg/kg/d 每周 6 次, 给药 2, 4 或 8 周, 用放射免疫法测血清睾酮、LH 和 FSH 水平。结果表明, 给药 2 周(生精上皮破坏不明显)和 6, 8 周(曲精细管严重破坏)血清睾酮水平显著下降, 而血清 LH 无变化。给药 8 周时血清 FSH 显著升高, 为对照组的 4 倍。实验结果提示棉酚可能影响间质细胞的功能。

关键词 醋酸棉酚; 睾酮; LH; FSH

虽然对棉酚的抗生育作用做了许多研究, 但其作用机制仍不清楚。关于棉酚对生殖内分泌轴系的影响, 是大家关心的问题。1980 年以前的实验室研究资料指出, 棉酚不影响“下丘脑—垂体—性腺”轴系⁽¹⁾。棉酚对大鼠血浆睾酮⁽²⁾和血 LH⁽³⁾, 以及大鼠注射 LHRH 后垂体的反应性⁽³⁾均无明显影响。形态学观察指出棉酚损伤曲精细管上皮, 而不损伤间质细胞⁽⁴⁾。对自愿服棉酚者的血浆睾丸酮类似物也无显著变化⁽⁵⁾。但给大鼠¹⁴C 棉酚做放射自显影研究表明, 睾丸中间质细胞活性较强⁽⁵⁾。临床试用中一过性性功能减退者占 4~10%。因此, 本文利用放射免疫测定法, 研究棉酚对雄性大鼠睾酮、LH 和 FSH 水平的影响。在本实验进行中国内⁽⁶⁾、国外^(7,8)均有类似的报道。

材料和方 法

采用成年 Wistar 大鼠, 控制饲养条件, 光照 7:00~19:00, 室温 20°C±2°C。自由进食饮水。

醋酸棉酚系西安油脂化工厂生产; 本室精制, 纯度 99.5%(非水滴定法), 熔点: 180.5~183.0°C。每周用 0.5% 甲基纤维素溶液配成棉酚混悬液, 给大鼠口服, 剂量为 30 mg/kg/d, 每周 6 次, 服用不同时间。共做实验 3 批。

实验 I 取体重 340~400 g 大鼠 40 只, 共分 4 组。1, 3 组分别给 0.5% 甲基纤维素 4 和 8 周做为赋形剂对照。2, 4 组给棉酚 4 或 8 周。在 2 和 6 周时眼眶取血, 实验结束时断头取血。全部血样在上午 8:00~10:00 采取, 分离血清, 储于 -20°C 冰箱备用。

将右侧睾丸用 Bouin 氏液固定, HE 染色供形态学检查。取左侧睾丸、附睾、精囊(排空液体)、腹前列腺、左侧肾上腺和垂体前叶, 剔除脂肪称重。将睾丸用磷酸缓冲液制成匀浆, 于 -20°C 冰箱中保存。

实验 II 按上法给 20 只大鼠(体重 265~330 g) 棉酚 4 周, 每周取血一次, 作动态观察。

实验 III 取体重 285~365 g 大鼠 20 只, 给药 2 周后取血和组织样品。

激素放射免疫测定法

1. 睾酮 全部甾体激素放射免疫匹配试剂均由世界卫生组织提供, 按手册方法操作⁽⁹⁾。血清和睾丸的回收率均为 85% 左右。质量控制高、中、低批内变异系数分别为 5.7%, 7.0% 和 8.6%; 批间分别为 12.7%,

16.1% 和 15.5%。

雌二醇 因需血量较大，将 5 只鼠血样合并测定。

2. LH 和 FSH 大鼠 LH 和 FSH 药箱由美国国家垂体制剂经销处供给。标准品型号：NIAMDD-大鼠-LH-RP-1 和 NIAMDD-大鼠-FSH-RP-10；抗血清型号：NIAMDD-A-大鼠 LH-S-5 和 NIAMDD-A-大鼠-FSH-S-10。FSH 标记物系新加坡大学 Kandang Kerbau 医院吴欣汉博士在京讲学时用 Iodogen 法标记的纯 FSH (NIAMDD 大鼠-FSH-I-5)。LH 标记物是由英国伦敦世界卫生组织协作中心、主任生物化学家 Sufi 先生提供。LH 批内变异系数高、中、低分别为 3.0%，7.9% 和 14.9%；FSH 批内变异系数为 6.4~18.0%。

组织学检查 按 Agger 等睾丸活检计分法⁽¹⁰⁾观察曲精细管破坏程度。观察 50 个曲精细管，满分为 10 分，曲精细管破坏越严重得分越少。至少观察 2 个切面、50 个间质间隙中间质细胞的数目。

统计学处理 先测变异，如 F 值有显著性，采用 t 检验或方差分析 X² 以检验两相间的显著性差异。

结 果

(一) 棉酚对血和睾丸组织中睾酮的影响

1. 血清睾酮水平 实验 I 的结果如图 1，给大鼠醋酸棉酚 30 mg/kg/d，2，6 和 8 周后血清睾酮浓度显著下降。对照组在 2，4，6 和 8 周时血睾酮水平为 4.47±0.58~5.74±0.79 (X±SE)ng/ml，而棉酚组血清睾酮水平为 1.82±0.48~4.04±0.72 ng/ml。给棉酚 2 周后，血睾酮水平降低到对照组的 36.2%，但给药 4 周后血睾酮水平恢复至正常，在给药 6 周和 8 周末，血睾酮水平再次明显下降。

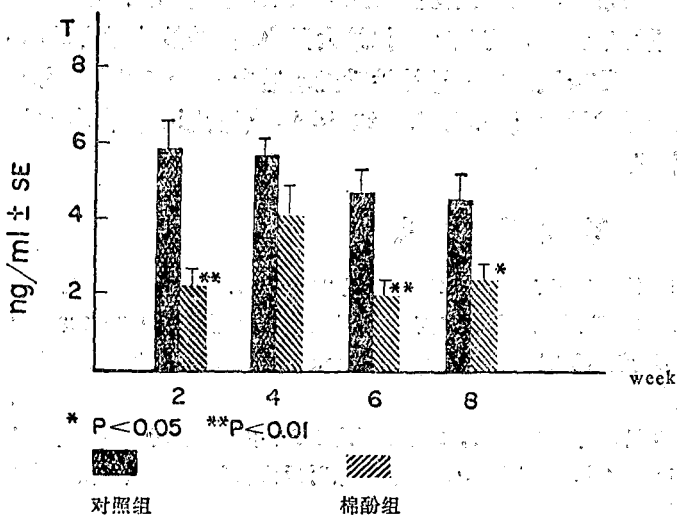


图 1 棉酚对血睾酮水平的影响

实验 II 是观察血睾酮的连续变化。在给棉酚 4 周中只在第 2 周末时观察到血睾酮的降低(表 1)，其浓度为 3.06±0.28 ng/ml，比对照组下降了 36.3%。在实验 III 给药 2 周末时也得到同样的结果。

2. 睾丸中睾酮含量 实验 I 给药 4 周和 8 周末时睾丸睾酮浓度在对照组与给药组间无明显差异(表 2)。由于给药 8 周末时给药组睾丸的重量显著下降，因此给药组整个睾丸中睾酮的含量显著的降低。在

实验 III 给棉酚 2 周末时，给药组睾丸重量与对照组无差异，但睾酮含量显著低于对照组。此结果有待进一步证实(表 2)。

(二) 棉酚对血清 LH 和 FSH 的影响

血清 LH 水平 实验 I 中 LH 水平在对照组与给药组间无明显区别。给棉酚 8 周血 LH 含量 22.0±3.69 ng/ml 与对照组 16.5±0.95 ng/ml 相比有增高的趋势，但无统计学意义。

血清 FSH 水平 给药 8 周末时给药组血清 FSH 含量增高为对照组的 415%(图 2)

(三) 棉酚对血清雌激素水平的影响 在给药 8 周末时，血雌二醇水平为 11.42 pg/ml，比对照组高 31.6%。

表 1 雄鼠血睾酮水平 (ng/ml±SE)

周	对照组 (10)	棉酚组 (10)	棉酚/对照 (%)
0	4.22±0.68	3.53±0.72	83.7
1	5.11±0.82	4.24±0.64	82.9
2	4.42±0.28	3.06±0.28**	68.7
3	4.76±0.82	4.06±0.57	85.5
4	3.86±0.36	3.69±0.89	95.1

** P<0.01; () 动物数

表 2 棉酚对睾丸睾酮水平的影响

周	睾酮 ng/辜丸±SE		辜丸 ng/g 辜丸±SE	
	对 照 组	棉 酚 组	对 照 组	棉 酚 组
2	386±32(9)	247±12(10)***	236±20(9)	151±18(10)***
4	477±61(10)	467±79(10)	288±36(10)	284±47(10)
8	544±56(11)	325±68(9)*	285±26(11)	308±40(9)

* P<0.05 *** P<0.001

(四) 棉酚对某些器官重量的影响

给棉酚 2 周或 4 周后睾丸组织的重量与对照组无明显差异。在 8 周末时给药组睾丸重量显著低于对照组，为 1012.0±153.2 mg，比对照组 1893.6±36.1 mg 降低了 46.6%。在 4 周和 8 周末时，附睾、精囊和腹前列腺重量分别下降 25.8%，28.1%，42.3%；26.6%，40.1%，29.9%；并有显著性差异。垂体前叶的重量在给药 4 周后无显著改变，但 8 周后给药组也明显下降(下降 26.2%)。肾上腺的重量在给药 4 周后显著增高(增加 31.0%)。8 周时又恢复至正常。这些结果说明给药 4 周时附性器官萎缩而肾上腺增生。

(五) 组织形态观察

以记分法显示给棉酚 8 周后睾丸组织损伤的程度，对照组曲精细管正常；平均记分为 9.56±0.09。给药 8 周后可见大多数曲精细管严重损伤。细胞数目减少，仅残留支持细胞和精原细胞，其平均计分为 4.61±0.64。但给药组中睾丸受损程度不一，3 号大鼠损伤严重计分为 3.08，而 5 号大鼠只稍受损伤，记分 8.90。给药 8 周后还观察到间质细胞的增生，给药组曲精细管间隙中有间质细胞 19.3±2.07 个；对照组为 10.43±0.57 个(图 3 a, b)。曲精细管损伤与间质细胞增生有密切关系。

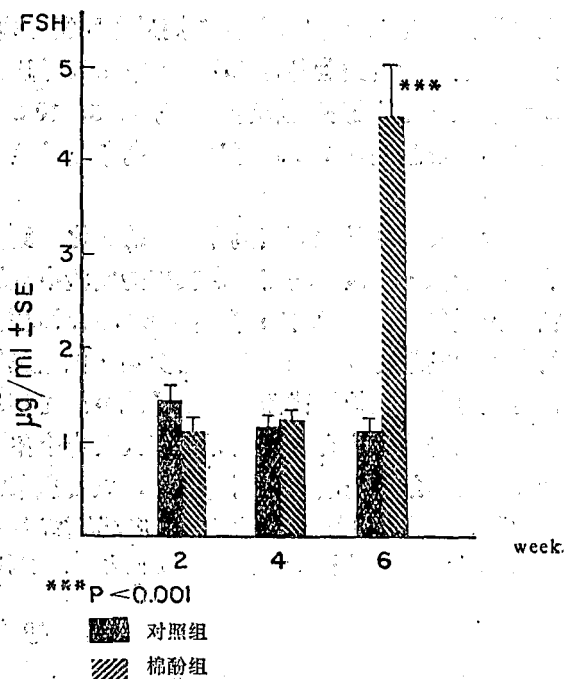


图 2. 棉酚对血清 FSH 水平的影响

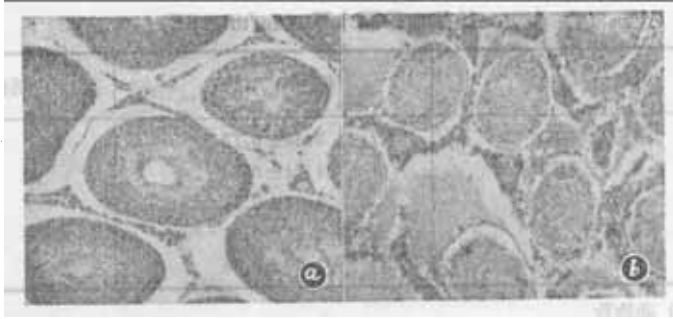


图 3 a. 正常大鼠睾丸曲精细管横断面。HE $\times 200$

b. 第 8 周棉酚组 3 号鼠, 示间质水肿, 间质细胞成分增生, 曲精细管仅残留支持细胞和少量精原细胞。HE $\times 200$

讨 论

本实验指出在给醋酸棉酚 2 周后血清睾酮有短暂的下降, 给药 3 和 4 周时血睾酮恢复至正常或接近正常。很难解释很快恢复的原因。当继续给药至 6 周血睾酮又下降, 并持续到给药 8 周。在给药 8 周末时, 睾丸萎缩, 间质细胞增生, 曲精细管损伤, 睾丸中睾酮含量下降。这些结果指出睾丸合成睾酮的能力受阻。给药 4 周后附性器官萎缩也反映了血睾酮的下降。以上结果提示, 棉酚可能影响了间质细胞的功能。梁素香等⁽⁶⁾给大鼠棉酚 17.2 mg/kg/d, 一个月后血睾酮水平显著下降, 但睾丸形态和重量无改变, 精子生成过程正常。Hadley 等⁽⁷⁾给大鼠醋酸棉酚 30 mg/kg/d, 5 周后血睾酮和血 LH 水平均明显下降, 但血 FSH 无变化。将两组大鼠的间质细胞各加 LH 500 ng/ml, 温孵 3 小时; 对照组产生的睾酮比给药组高 4 倍。Lin 等⁽⁸⁾给大鼠皮下注射醋酸棉酚 1, 5, 10 mg/kg/d, 1 周后血 LH 和睾酮都显著下降。给药组的间质细胞加 LH 温孵时产生的睾酮量显著低于对照组。但临床资料⁽¹¹⁾均未发现血睾酮下降。

我们实验中并未观察到血 LH 的变化。梁素香等得到与我们相似的结果, 但临床上志愿服棉酚者血 LH 显著增高。在我们的实验中血雌二醇在给药 8 周末有增高的趋势, 临床也观察到此现象⁽¹¹⁾。本实验又在给药 8 周末时观察到血 FSH 水平的增高, 而 FSH 的增高程度与睾丸曲精细管受损程度呈正比关系。曲精细管严重损伤使抑制素的产生减少, 因此使 FSH 的合成增加。在棉酚试用中, 精子减少或无精的志愿者中也得到相似的结果。由于不同种属动物对棉酚的反应有显著差异, 而大鼠中个体差异也较大, 本实验所用棉酚剂量也较临床剂量大, 实验结果与临床应用的关系, 以及血睾酮下降的机制都有待阐明。

致谢 本文承中国医学科学院药物研究所雷海鹏教授指导, WHO 和 NIH 提供放射免疫测定药箱, 吴欣汉博士和 Sufi 先生技术指导和提供标记物, 本室刘玮、石心泉等同志协助工作, 特此致谢

参 考 文 献

1. Xue S P: Studies on the antifertility effect of gossypol, a new contraceptive for males. In Chang C F & Griffin D (eds): Recent Advances in Fertility Regulation Symposium, Beijing, p 122, 1980
2. 王月娥等: 棉籽粉、棉酚的抗生育作用研究。药学报 14:662, 1979
3. 孙梅励等: 醋酸棉酚对男子血浆睾丸酮类似物及大鼠垂体性腺轴系功能的影响。科技资料选编(内分泌专辑), 第 1 页, 1979
4. 薛社普等: 棉酚对大鼠抗精子发生作用的细胞学, 放射自显影及超微结构的观察。中国科学 9:915, 1979
5. 薛社普等:¹⁴C 醋酸棉酚在大鼠体内的药物动力学的研究。I. 在大鼠体内分布、定位的整体及组织放射自显影的动态观察。实验生物学报 12:179, 1979
6. 梁素香等: 服棉酚大鼠血清睾丸酮和 LH 含量的放射免疫测定。实验生物学报 14:191, 1981

7. Hadley M A, et al: Effect of gossypol on the reproductive system of male rats. *J Androl* 2:190, 1980
8. Lin T, et al: Gossypol inhibits testicular steroidogenesis. *Fertil Steril* 35:563,1981
9. World Health Organization Collaborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction. WHO special programme of research, development and research training in human reproduction, Programme for the provision of matched assay reagents for the radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology, *Method Manual*, 5th ed, p 32,1981
10. Agger P, et al: Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicocele. *Fertil Steril* 29:52,1978
11. 张桂元等:比较棉酚和其它病因引起的无精症男性血清垂体促性腺激素和性激素的变化. *生殖与避孕* 3:31, 1983

EFFECT OF GOSSYPOL ACETIC ACID ON TESTOSTERONE, LH AND FSH LEVELS OF MALE RATS

MA Xiao-nian, LI Wen-jun and SUN Yi-bin

(National Research Institute for Family Planning, Beijing)

ABSTRACT

Ninety two male rats were used to study the effect of gossypol on the gonadal hormone levels. Rats were administered gossypol acetic acid orally at the dosage of 30mg/kg/day, six times per week, for 2,4 and 8 weeks. Serum testosterone, LH, FSH and testicular testosterone were determined by RIA. Results showed that at the end of 2,6 and 8 weeks of drug administration, serum testosterone levels were reduced significantly, while serum LH levels were not changed. At the end of 8 weeks of gossypol treatment serum FSH level was elevated to approximately 4 times the control value. Organ weights and morphology of the testes were measured and examined. At the end of 8 weeks of treatment, the weights of testes, epididymis, seminal vesicles and ventral prostates were significantly reduced. Scoring was used to investigate the degree of damage of the testes after 8 weeks gossypol treatment. Severe damage was discernible in most of the seminiferous tubules of the treated rats. All the results pointed to the possibility that gossypol affected the function of Leydig cells.

Key words Gossypol acetic acid; Testosterone; LH; FSH