

本文引用: 易文龙, 郭晓轶, 樊舒豪, 等. 商陆皂甙甲对大鼠的体外杀精作用 [J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (9): 688-690.

### 【基础研究】

## 商陆皂甙甲对大鼠的体外杀精作用

易文龙<sup>1</sup>, 郭晓轶<sup>2</sup>, 樊舒豪<sup>2</sup>, 湛曼荣<sup>2</sup>, 王育斌<sup>2</sup>

(1. 武汉科技大学附属天佑医院儿科, 湖北 武汉 430064; 2. 武汉科技大学医学院生理学系, 湖北 武汉 430065)

**摘要:** **目的** 探讨商陆皂甙甲 (EsA) 对大鼠的体外杀精作用及其机制。**方法** 采用手术方法采集 Sprague-Dawley 大鼠精子, 随机分为 EsA 组、生理盐水组及壬苯醇醚-9 (N-9) 组, 采用改良 Sander-Cramer 法, 将不同浓度 EsA 制剂在体外与大鼠精子作用, 测定 EsA 的杀精作用及杀精最低有效浓度; 精子尾液肿胀 (HOS) 试验、伊红 Y (EY) 染色法检测精子膜的完整性和活力, 固相法检测精子顶体酶 (ACE) 活性。**结果** 作用 20 s, 最低有效质量浓度为  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EsA 对大鼠精子具有快速杀精作用; 与生理盐水组比较, 最低有效质量浓度 ( $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 EsA 作用 20 s 后, 精子尾肿胀率显著下降 ( $P < 0.05$ ), EY 染色率显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与生理盐水组比较, EsA 各浓度组 ACE 活性均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 且药物浓度越大, ACE 活性降低越明显, 组间两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** EsA 对大鼠有体外杀精作用, 其机制可能与破坏精子膜和降低 ACE 活性有关。

**关键词:** 商陆皂甙甲;体外杀精;低渗肿胀试验;精子顶体酶

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)09-0688-03

### Spermicidal effect of esculentoside A on rats *in vitro*

YI Wen-long<sup>1</sup>, GUO Xiao-yi<sup>2</sup>, FAN Shu-hao<sup>2</sup>, SHEN Man-rong<sup>2</sup>, WANG Yu-bin<sup>2</sup>

(1. Department of Pediatrics, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China; 2. Department of Physiology, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei Province, China)

**Abstract: Objective** To study the spermicidal effect of esculentoside A (EsA) on rats *in vitro* and its mechanism. **Methods** The Sprague-Dawley rats' sperms were collected by operation method, which were randomly divided into EsA group, normal saline (NS) group and nonoxinol-9 (N-9) group. The different concentration EsA acted on rats' sperms *in vitro*, and the modified Sander-Cramer assayed was used to detect the spermicidal effect and spermicidal minimum effective concentration (MEC). The hypo-osmotic swelling (HOS) test and the eosin Y (EY) staining were used to detect the integrity of sperm membrane and vitality, the solid-phase method was used to detect the acrosomal enzyme (ACE) activity. **Results** MEC of EsA at 20 s was  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Compared with NS group, the rate of the tails swollen sperm was significantly reduced in EsA groups ( $P < 0.05$ ), the rate of stained sperm was significantly increased in EsA groups ( $P < 0.05$ ), the activity of ACE were all significantly reduced in EsA groups ( $P < 0.05$ ), and the reducing was associated with drug concentration, the differences were statistically significant by pairwise comparison ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EsA has spermicidal effect on rats *in vitro*, the spermicidal effect may occur by the disruption of the sperm membrane integrity and the reducing of the ACE activity.

**Key words:** esculentoside A; spermicidal effect *in vitro*; hypo-osmotic swelling; acrosomal enzyme

中药商陆为商陆属植物中国商陆和垂序商陆的干燥根,《神农本草经》记载其对水肿、疝瘕、痈肿及疮毒等有治疗作用。现代药理学研究发现,中国商陆含有商陆碱、硝酸钾、商陆皂甙及商陆多糖等多种成分,其中商陆皂甙甲(esculentoside A, EsA)是从

中国商陆的块根中提取的三萜皂甙类化合物,是中药商陆的主要活性成分<sup>[1-2]</sup>。EsA 具有抗炎、杀菌和增强免疫力等作用<sup>[3]</sup>,但其抗生育作用报道较少。本研究将不同浓度的 EsA 制剂与大鼠精子进行体外作用,观察其杀精功效并探讨其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只, 体质量 300~400 g, 10 周龄, 由武汉科技大学实验动物中心提供, 无特定病原体条件下饲养。

### 1.2 主要试剂及仪器

DOI:10.7683/xxvxxb.2014.09.004

收稿日期:2014-05-12

基金项目:国家级大学生创新训练项目(编号:201210488036);武汉市科学技术计划项目(编号:201051299451)

**作者简介:**易文龙(1967-),男,湖北武汉人,博士,教授,副主任医师,主要从事生殖健康研究。

通信作者:王育斌(1974-),男,湖南岳阳人,博士,副教授,主要从事生殖内分泌学研究。

技大学医学院药理学系提供;改良台氏液购自南京森贝伽生物科技有限公司;伊红 Y (eosin Y, EY) 染色、精子顶体酶 (acrosomal enzyme, ACE) 活性检测试剂盒购自武汉众一生物科技有限公司;壬苯醇醚-9 (nonoxinol-9, N-9) 由中国药科大学制药有限公司生产,国药准字: H20057496。相差显微镜 (日本 OLYMPUS);恒温浴槽 (成都泰盟科技有限公司);酶标仪 (美国 Biotek 公司)。

**1.3 精子悬液的制备** 将大鼠用颈椎脱臼法处死,仰卧位固定,无菌条件下取大鼠附睾,置于无菌小烧杯中,生理盐水清洗后加入改良台氏液,剪开附睾尾部,37 ℃ 孵育 10 min,使活精子游离,显微镜下进行精子总数和活动度测定,总数高于  $3.0 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 、活动度 >80% 者用于后续实验。

**1.4 体外杀精实验** 采用改良 Sander-Cramer 方法<sup>[4]</sup>,取上述大鼠精子悬液 1.0 mL (调整精子密度为  $1.0 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ ),加入到 1.0 mL 不同浓度 (0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 EsA 药液中,迅速混匀。于 20、40、60、120 s,分别取 1 滴混合液置于载玻片上,37 ℃ 控温显微镜下连续观察 5 个高倍视野,以全部精子制动为终点,计数活动精子数。用不同浓度 (0.25、0.50、1.00、2.00  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 N-9 溶液及生理盐水作为对照,每份标本均重复测 3 次,结果判定:全部精子完全固定不动,计为 -; <10% 精子颤动,计为 ±; <60% 活动精子,计为 +; ≥60% 活动精子,计为 ++。

**1.5 精子尾低渗肿胀 (hypo-osmotic swelling, HOS) 及 EY 染色试验** 参照世界卫生组织人类精液及精子宫颈黏液相互作用实验室检验方法<sup>[5]</sup>,并依据上述实验结果,取 1.0 mL 最低有效质量浓度的 EsA 溶液或 N-9 溶液分别与 1.0 mL 大鼠精子悬液 (调整精子密度为  $1.0 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ ) 混合,作用 20 s,取悬液 0.5 mL 与 1.0 mL 低渗液混合,37 ℃ 下培养 30 min,然后在相差显微镜下观察 200 个精子,计算精子尾肿胀百分率,以确定其低渗肿胀能力,检测药物对大鼠精子膜的影响;另取与药物作用后的精子悬液 1 滴,涂布在清洁载玻片上,EY 染色法检测大鼠精子活力:相差显微镜下观察 200 个精子,着红色为死精子,不着色为活精子,计算精子活率。

**1.6 ACE 活性测定** 大鼠精子悬液 1.0 mL (调整精子密度为  $7.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ),加入到 1.0 mL 不同浓度 (0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 EsA 药液中,混匀,37 ℃ 下培养 20 s,2 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,弃去精浆后采用固相法检测大鼠精子顶体酶活性,每份标本同时设测定管和空白管,具体操作按试剂盒说明书方法步骤进行。检测原理:精子顶体内的精氨

酸酰胺酶的活性可反映全部 ACE 的活性,固相捕获的精子精氨酸酰胺酶与  $\text{N}\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸- $\rho$ -硝酰基苯胺作用后,分解产生黄色的硝酰基苯胺,通过测定硝酰基苯胺的量便可计算 ACE 的活性。读取酶标仪 405 nm 波长光密度 (optical density, OD) 值,按试剂盒说明书方法计算酶活性。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,2 组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同质量浓度 EsA 对大鼠精子的体外杀精作用** 结果见表 1。EsA 在 20 s 时对大鼠精子的最低有效杀精质量浓度为 2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,镜下可观察到精子全部固定不动,部分精子出现破裂或头尾断裂现象,并呈随质量浓度和时间递增的趋势,表明 2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  EsA 对大鼠精子有快速杀精作用,其杀精效果与 1.00  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 N-9 相当。

表 1 EsA 对大鼠精子的体外杀精作用  
Tab.1 Spermicidal effect of EsA on rats *in vitro*

组别	<i>n</i>	时间			
		20 s	40 s	60 s	120 s
生理盐水组	16	++	++	++	++
EsA 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	+	+	±	±
EsA 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	±	±	-	-
EsA 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	-	-	-	-
EsA 4.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	-	-	-	-
N-9 0.25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	+	+	±	±
N-9 0.50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	±	±	±	-
N-9 1.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	-	-	-	-
N-9 2.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	16	-	-	-	-

注:-:精子完全固定不动;±: <10% 精子颤动;+: <60% 活动精子;++: ≥60% 活动精子。

**2.2 EsA 对大鼠精子膜的影响** 结果见表 2。与生理盐水组比较,最低有效质量浓度 EsA (2.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 或 N-9 (1.00  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与大鼠精子作用 20 s 后,精子尾肿胀率显著下降 ( $P < 0.05$ ),EY 染色率显著升高 ( $P < 0.05$ );与 N-9 组比较,EsA 组精子尾肿胀率略低、EY 染色率略高,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组 HOS 试验及 EY 染色结果  
Tab.2 Result of the HOS test and the EY staining in groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	精子尾肿胀率/%	EY 染色率/%
生理盐水组	16	80.13 ± 6.32	20.15 ± 2.11
EsA 组	16	11.88 ± 5.13 <sup>a</sup>	88.65 ± 6.64 <sup>a</sup>
N-9 组	16	18.77 ± 6.25 <sup>a</sup>	81.31 ± 7.56 <sup>a</sup>

注:与生理盐水组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 不同质量浓度 EsA 对大鼠 ACE 活性影响

生理盐水组及 EsA 0.5、1.0、2.0、4.0 g · L<sup>-1</sup> 组 ACE 活性分别为 91.23 ± 18.64、86.45 ± 17.86、48.49 ± 18.14、26.45 ± 10.55、12.18 ± 5.01, 与生理盐水组比较, EsA 各浓度组 ACE 活性均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 且药物质量浓度越大, ACE 活性降低越明显, 组间两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

生殖健康是近年来国际社会提出的一个新概念, 有效避孕是生殖健康的重要部分<sup>[6]</sup>。采用体外杀精剂避孕使用简便、安全有效。N-9 是目前普遍使用的一种外用杀精子药, 为非离子型表面活性剂, 其主要作用是通过降低精子脂膜表面张力、改变渗透压而杀死精子或致精子制动, 从而达到避孕的目的。但 N-9 对阴道黏膜有刺激作用, 反复使用能导致宫颈上皮细胞和阴道上皮细胞损害, 增加女性生殖道感染的机会<sup>[7-8]</sup>。

研究表明, EsA 能通过诱生干扰素、抑制核因子  $\kappa$ B 和丝裂原活化蛋白激酶信号通路等, 调节机体的免疫功能, 发挥抗炎、抗病毒及抗真菌等作用<sup>[9]</sup>。商陆和 EsA 可通过影响细胞外基质延缓阿霉素致肾硬化大鼠的肾小球硬化, 从而保护肾功能<sup>[10-11]</sup>, 亦有报道商陆总皂甙具抗生育活性<sup>[12]</sup>。从商陆中提取的一种抗病毒蛋白可抑制人体免疫缺陷病毒的复制, 对艾滋病具有一定的防治作用<sup>[13]</sup>。本研究结果表明, EsA 在体外对大鼠精子具有杀精作用, 快速 (20 s) 制动的质量浓度为 2.0 g · L<sup>-1</sup>, 镜下可观察到精子全部固定不动, 部分精子出现破裂或头尾断裂现象, 并呈现剂量依赖性, 其效果与 1.00 g · L<sup>-1</sup> N-9 相当。但镜下所见被制动的精子并非均是死精子, 采用 HOS 试验方法即将精子在低渗液中培养一定时间后, 活的精子膜可以转运液体至细胞质内, 导致精子肿胀及精子尾部弯曲, 故可根据精子尾肿胀率鉴定精子的死亡情况; 结合 EY 染色技术, 着红色为死精子, 不着色为活精子, 可进一步鉴定。本研究中 HOS 试验及 EY 染色结果显示, 最低有效质量浓度的 EsA 与大鼠精子作用 20 s 后, 精子尾肿胀率和 EY 染色率与同等实验条件下 N-9 对大鼠精子的影响基本一致。同时, 大鼠 ACE 活性检测结果表明, EsA 能显著降低其活性。据以上结果推测, 在体外 EsA 可能通过影响精子膜功能及完整性, 降低 ACE

活性, 从而发挥杀精作用, 但其确切机制还有待进一步的研究。

总之, 通过对商陆及其主要成分之一的 EsA 作用机制的进一步研究, 有望开发纯天然的具有避孕与抗感染双重作用的体外杀精避孕药, 其具有良好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 黄国英, 刘星星. 中药商陆的药理及应用研究 [J]. 中国实用医药, 2013, 8 (15): 249-250.
- [2] Ma J, Chen Q, Lai D, et al. Separation and purification of triterpene saponins from roots of *Radix phytolaccae* by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2010, 33 (4): 563-571.
- [3] Hu Z, Qiu L, Xiao Z, et al. Effects of esculentoside A on autoimmune syndrome induced by *Campylobacter jejuni* in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10 (1): 65-71.
- [4] Bharitkar Y P, Banerjee M, Kumar S, et al. Search for a potent microbicidal spermicide from the isolates of *Shorea robusta* resin [J]. *Contraception*, 2013, 88 (1): 133-140.
- [5] WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen [M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010: 26-30.
- [6] 吕雪梅, 邱毅, 王苏梅, 等. 桔梗五倍子提取液的体外杀精研究 [J]. 中外医疗, 2012, 31 (1): 111-112.
- [7] Jain R K, Jain A, Kumar R, et al. Functional attenuation of human sperm by novel, non-surfactant spermicides: precise targeting of membrane physiology without affecting structure [J]. *Human Reproduction*, 2010, 25 (5): 1165-1176.
- [8] Fuchs E J, Grohskopf L A, Lee L A, et al. Quantitative assessment of altered rectal mucosal permeability due to rectally applied non-oxynol-9, biopsy, and simulated intercourse [J]. *J Infect Dis*, 2013, 207 (9): 1389-1396.
- [9] Zhong W T, Jiang L X, Wei J Y, et al. Protective effect of esculentoside A on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *J Surg Res*, 2013, 185 (1): 364-372.
- [10] 朱永俊, 张克非, 郭明好. 商陆皂甙甲对阿霉素肾小球硬化大鼠细胞外基质的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2009, 26 (1): 19-22.
- [11] 朱永俊, 张克非, 郭明好, 等. 商陆延缓阿霉素肾硬化大鼠肾小球硬化 [J]. 新乡医学院学报, 2009, 26 (2): 119-121.
- [12] 王一飞, 崔蕴霞, 崔蕴慧, 等. 商陆总皂甙的抗生育活性 [J]. 河南医科大学学报, 1996, 31 (1): 91-93.
- [13] Tsoukas C, Gilbert L, Lewis T, et al. Improvements in immune function and activation with 48-week Darunavir/Ritonavir-based therapy: GRACE substudy [J]. *ISRN AIDS*, 2013, 12 (1): 1-10.

(本文编辑: 李胜利 英文编辑: 王 燕)