

2004

2

等功能,还具有镇静镇痛、抗肿瘤、抗氧化和免疫调节等作用^[1]。最近研究表明,MLT具有高亲脂性和部分亲水性,可弥散穿透各种生理屏障,在细胞膜、细胞质和细胞核中均发挥强大的抗氧化作用^[2]。近年来,MLT抗氧化特性也亦受到男科学家的重视^[3]。本研究观察了活性氧(ROS)对精子线粒体的氧化损伤效应和MLT的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂 Earle液、人血清白蛋白、硝基四氮唑蓝(NBT)、二甲基亚砜、MLT和荧光探针 Rhodamine 123(Rh123)均为Sigma公司产品;琥珀酸钠购于北京双环化学试剂厂;其余试剂购于南京化学试剂采购供应站,均为分析纯。

1.2 仪器 Olympus BH2型相差显微镜;Nikon E400型荧光显微镜;流式细胞仪(美国BD公司FACSCalibur型)。

1.3 正常精子模型制备 按文献[4]介绍的方法制备。制备好的精子调整密度为 $20 \times 10^6/\text{ml}$,即为本实验所需要的精子模型。

1.4 实验分组及检测

1.4.1 实验分组与处理 将处理好的精子悬液1式4份,每份0.5 ml,分成4组:A组,精子悬液;B组,精子悬液+MLT(终浓度为6 mmol/L);C组,精子悬液+次黄嘌呤(终浓度为1 mmol/L)+黄嘌呤氧化酶(终浓度为50 mU/ml);D组,精子悬液+MLT(终浓度为6 mmol/L)+次黄嘌呤(终浓度为1 mmol/L)+黄嘌呤氧化酶(终浓度为50 mU/ml)。在37℃,有氧环境中孵育30和60 min后,离心,洗涤,再用培养液悬浮到原体积。

1.4.2 精子线粒体SDH检测 按文献[5]介绍的方法进行精子线粒体SDH检测。精子颈部(线粒体所在部位)有蓝紫色颗粒沉着,即为精子SDH阳性(图1)。

1.4.3 精子线粒体膜电位(MMP)检测 Rh123首先用蒸馏水配成1 mg/ml的贮备液,然后按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞加10 μl ,使终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,37℃孵育30 min,然后用PBS洗2次,上流式细胞仪检测(激发峰488 nm,发射峰525 nm)。测定数据按FACS2Calibur配置的软件进行数据处理。所有检测均在60 min内完成。

1.5 统计学分析 采用SAS软件对各组数据进行方差分析(ANOVA),比较4个实验组每两组之间的均数差异。

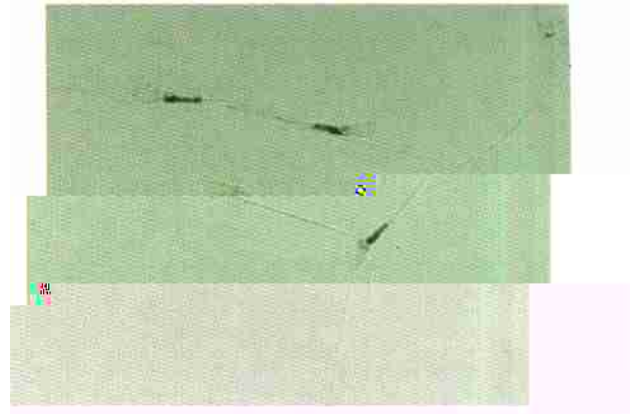


图1 精子SDH染色结果($\times 1000$)

Figure 1. Results of sperm SDH staining($\times 1000$)

2 结果

2.1 各组精子线粒体SDH检测结果 见表1。A和B组精子线粒体SDH阳性率在30和60 min时均无显著性差异($P > 0.05$);C组精子在30 min时,SDH阳性率急剧降低,而在60 min时,其线粒体SDH均未着色;D组精子线粒体SDH阳性率在30 min时与A、B两组有显著性差异($P < 0.05$),而在60 min时,其精子线粒体SDH阳性率与A、B两组相比,差异有极显著性($P < 0.01$)。

表1 孵育30和60 min时各组精子线粒体SDH检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1. Results of the measurement of sperm mitochondria SDH after 30 and 60 minutes incubation($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Incubation time	
	30 min	60 min
A	88.67 \pm 2.35	86.42 \pm 2.23
B	86.83 \pm 3.56	84.58 \pm 2.56
C	9.25 \pm 3.67 ^{3 3}	0 ^{3 3}
D	80.83 \pm 2.92 ³	48.00 \pm 4.65 ^{3 3}

与A组相比,3 : $P < 0.05$, 3 3 : $P < 0.01$

Compared with Group A, 3 : $P < 0.05$, 3 3 : $P < 0.01$

2.2 各组精子MMP检测结果 见表2和图2~4。A和B组精子MMP在30和60 min时均无显著性差异($P > 0.05$);C组与A、B和D组相比,精子MMP在30和60 min时均显著下降,而MLT可显著减缓ROS所致的精子MMP下降。

3 讨论

在众多男性不育的病因中,因脂质过氧化作用

www.cnki.net

www.cnki.net