

西地那非与左旋肉碱联合用药对改善糖尿病大鼠精子质量的研究

郑雅雅¹, 张琪^{1*}, 商学军², 康宁², 马博¹

(¹南京工业大学药学院, 南京 210009; ²南京军区南京总医院生殖遗传研究室, 南京 210002)

摘要 以糖尿病大鼠为研究模型, 分别用左旋肉碱与西地那非单独或联合用药, 研究二者对于糖尿病大鼠精子质量的影响。单独使用西地那非、左旋肉碱或联合用药时, 大鼠睾丸精子计数分别为 29.02 ± 3.12 , 32.24 ± 2.81 , 36.06 ± 2.03 ($\times 10^6/100\text{ mg}$); 3个给药组别的生精细胞的凋亡率分别是(39.52 ± 4.22)%、(34.61 ± 3.82)%和(12.74 ± 2.88)%。从实验数据可以得出联合用药对于糖尿病大鼠的精子质量的改善作用明显优于单独用药。通过机制研究发现, 该联合用药主要是从调节性腺激素分泌及增强抗氧化能力两方面达到治疗效果。

关键词 西地那非; 左旋肉碱; 糖尿病; 男性不育症; 精子活动率

中图分类号 R587.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)04-0357-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130414

Effect of combination of sildenafil and L-carnitine on sperm ability of diabetic male rats

ZHENG Yaya¹, ZHANG Qi^{1*}, SHANG Xuejun², KANG Ning², MA Bo¹

¹School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009;

²Department of Clinical Pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China

Abstract To provide experimental data and theory basis for treatment of male infertility in diabetics, a combination of sildenafil and L-carnitine was applied on male rats with diabetes mellitus (DM). Adult male Sprague-Dawley rats were treated with streptozotocin (STZ) to induce type 2 diabetes model. Then, DM rats were then treated with sildenafil, L-carnitine, and the combination of sildenafil and L-carnitine respectively. The sperm indexes, endocrine hormones and oxidative stress of DM rats were analyzed and evaluated. As a result, the combination of sildenafil and L-carnitine had better ameliorated the sperm indexes, endocrine hormones and oxidative stress than L-carnitine or sildenafil alone. It was found that sildenafil and L-carnitine can improve the sperm quality, inhibit spermatogenic cell apoptosis, increase the gonadal hormone levels and relieve the oxidative stress in diabetes-induced erectile dysfunction rats. Furthermore, it was firstly confirmed that the use of the combination of sildenafil and L-carnitine is more beneficial for treatment of DMED through their own antioxidant and hormone regulation properties as compared to the use of sildenafil or L-carnitine alone.

Key words sildenafil; L-carnitine; diabetes mellitus; male infertility; sperm mobility

不育症是男科临床中常见的一种病症。据世界卫生组织建议, 育龄夫妇同居1年, 未采取避孕措施, 因男方原因造成不生育者称为男性不育。勃起功能障碍(ED)以及精子质量低下是导致男性不育症的重要因素^[1]。近年来, 男性精子异常所致

不育症有逐年上升趋势^[2]。

糖尿病(DM)是由遗传、免疫功能紊乱、氧化应激、内分泌功能异常等多种致病因素作用于机体而导致的一种糖、脂肪和蛋白质代谢紊乱疾病, 其中以2型糖尿病为主, 可引起全身多种系统、多种

脏器的损伤,从而引发多种并发症^[3]。有研究报道,男性糖尿病患者表现一定的勃起功能障碍、性腺机能减退、不孕不育^[4]。

目前,治疗糖尿病勃起功能障碍的一线药物是5型磷酸二酯酶抑制剂(PDE5i)西地那非,它是一种强效的PDE5i,患者使用后阴茎海绵体内PDE5的活性得到抑制,进而抑制5-环磷酸鸟苷(cGMP)的水解,cGMP水平增加,阴茎海绵体平滑肌松弛,动脉血流增加,使得阴茎产生可以正常勃起^[5-7]。自1998年上市至今,西地那非已成为口服治疗各种ED的首选药物,其安全性和有效性已经通过多例临床实验得到验证^[8-9]。目前已有文献报道西地那非对于精子质量的作用,但是具有一定的争议^[10-12]。精子数量和活率是评价精子质量的重要指标。

左旋肉碱在男性生殖中具有重要的作用,且已经被用于临床治疗男性的不育症。其是转运脂肪酸进入线粒体的重要载体,具有参与精子能量代谢、降低血浆中活性氧化物质、稳定精子细胞膜、抗精子凋亡等作用^[13]。本研究通过用链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠糖尿病模型,再用西地那非、左旋肉碱、左旋肉碱联合西地那非分别给糖尿病大鼠灌胃,观察实验性糖尿病大鼠精子活动率、精子计数及生精细胞凋亡的变化,并从性腺激素调节、抗氧化作用两方面研究药物的作用机制。为寻找治疗患糖尿病男性患者因勃起功能障碍和精子异常所致不育症的方法提供实验数据。

1 材 料

1.1 试 剂

左旋肉碱(纯度98%,东北制药总厂);西地那非(辉瑞制药有限公司,规格50 mg,);链脲佐菌素(STZ)(美国Sigma公司,纯度≥98%);盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞药业公司,规格2 mL);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(南京联科生物科技有限公司);睾酮、卵泡刺激激素(FSH)及黄体生成素(LH)检测试剂盒(美国RB公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及总抗氧化能力(TAC)检测试剂盒(南京建成生物试剂公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

血糖仪(强生医疗器材有限公司);电子天平

(德国Mettler公司);光学显微镜(日本Olympus公司);FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 动 物

清洁级雄性SD大鼠40只,体重200~220 g,由南京军区总医院比较医学科提供,合格证号SCXK(苏)2007-0008。

2 方 法

2.1 动物分组与给药

将40只大鼠随机等分为A、B、C、D、E 5组。A组为对照组,其余4组大鼠空腹(大鼠禁食12 h以上)一次性注射链脲佐菌素(STZ,65 mg/kg),4周后分别测定4组大鼠的血糖浓度。结果显示4组大鼠血糖浓度均高于16.7 mmol/L,提示糖尿病大鼠建模成功。各组大鼠分别给予如下剂量:A组(对照组):生理盐水;B组(糖尿病DM模型组):生理盐水;C组(西地那非组):西地那非溶液5 mg/kg;D组(左旋肉碱组):左旋肉碱溶液300 mg/kg;E组(西地那非+左旋肉碱组):西地那非2.5 mg/kg+左旋肉碱150 mg/kg,每天1 mL,连续灌胃6周。

大鼠于末次给药24 h后麻醉(氯胺酮,iv),心脏取血后处死。血液于4℃条件下2 000 r/min离心15 min,收集上层血清用于检测血清睾酮、FSH和LH水平。取各组大鼠的两侧附睾及睾丸备用。

2.2 大鼠精子计数

取各组大鼠一侧附睾的尾部,称重后置小离心管中,加入生理盐水1 mL,剪碎,使精子充分溢出。过滤后以4 000 r/min转速离心5 min。精子固定液1 mL加入沉淀物中,固定5 min后,将混悬液滴入血细胞计数板,静置3 min后,按常规方法计数。每100毫克附睾重的精子相对个数=附睾精子数/附睾尾质量×100。

2.3 大鼠精子活率检测

取各组大鼠另一侧附睾,切除附睾头和附睾尾,中间部分置于生理盐水中温育30 min,将生理盐水置于30℃的水浴锅里,精子完全充分游离后,使用数码彩色精子质量检测系统(WLJY-9000),检测精子活动率。

2.4 生精细胞凋亡检测

取大鼠一侧睾丸,撕去外膜,置于平皿中,加入PBS(pH 7.4,0.01 mol/L)10 mL,将去皮后的睾丸

研磨成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤,滤液置于离心管中,1 500 r/min 转速下离心 3 次,各 5 min。弃上清液后,轻轻混匀管内的细胞,加入 PBS 溶液,定容至 1 mL,校正细胞浓度至每毫升 5×10^5 个。使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测,具体步骤按说明书操作。处理完毕后使用 FACS-Calibur 流式细胞仪检测其凋亡率。

2.5 睾酮、FSH、LH 水平检测

取“2.1”中处理的血清,按照睾酮、FSH 及 LH 检测试剂盒说明书中具体步骤进行。

2.6 MDA、SOD、TAC 水平检测

取大鼠另一侧的睾丸,用生理盐水漂洗,滤纸拭干称重后加入生理盐水中,匀浆成 10% 的组织匀浆液,于 4 ℃ 条件下,2 000 r/min 离心 8 min,分

别取上清液,检测 MDA、SOD 及 TAC,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

3 结 果

3.1 各组大鼠精子数量、精子活性及生精细胞凋亡的变化

由表 1 可见,与空白对照组相比,模型组大鼠的附睾头部和尾部的精子活力以及附睾尾处的精子计数显著性降低($P < 0.01$),表明糖尿病大鼠的精液有显著性的改变。与模型组相比,C 组或 D 组大鼠的精液质量均有不同程度的提高,主要表现在精子活力和精子数均显著性增加($P < 0.01$)。E 组大鼠的附睾头、附睾尾尾精子活力、附睾尾处精子计数与 B、C、D 组大鼠相比均显著提升($P < 0.01$)。

Table 1 Sperm motility and sperm count of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Caput epididymidis sperm motility/%	Cauda epididymidis sperm motility/%	Cauda epididymis sperm count ($\times 10^6/100$ mg)
A Control (Saline)	$60.42 \pm 4.38^{**}$	$77.05 \pm 8.15^{**}$	$48.16 \pm 4.87^{**}$
B DM ^a (Model)	$30.18 \pm 1.86^{\triangle\triangle}$	$32.93 \pm 6.70^{\triangle\triangle}$	$21.41 \pm 5.01^{\triangle\triangle}$
C Sildenafil (5 mg/kg)	$35.74 \pm 3.61^{*\triangle\triangle}$	$39.97 \pm 5.81^{*\triangle\triangle}$	$24.55 \pm 7.34^{*\triangle\triangle}$
D L-carnitine (300 mg/kg)	$45.94 \pm 6.64^{**\triangle\triangle}$	$50.30 \pm 6.96^{**\triangle\triangle}$	$32.06 \pm 5.20^{**\triangle\triangle}$
E Sildenafil + L-carnitine (2.5 mg/kg + 150 mg/kg)	$57.87 \pm 5.82^{**}$	$74.76 \pm 5.00^{**}$	$46.07 \pm 6.10^{**}$

^aDiabetes mellitus. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group B; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs group E

由表 2 可见,与正常组相比,模型组大鼠生精细胞凋亡率显著上升($P < 0.01$);经西地那非及左旋肉碱治疗后,C、D 组生精细胞凋亡率均比模型组显著降低($P < 0.01$),且 D 组生精细胞凋亡率低于 C 组。经西地那非与左旋肉碱联合治疗后,E 组大鼠生精细胞凋亡率显著低于 B、C、D 组($P < 0.01$)。

Table 2 Changes in spermatogenic cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Apoptotic rate/%
A Control (Saline)	$10.50 \pm 2.75^{**}$
B DM (Model)	$50.34 \pm 6.00^{\triangle\triangle}$
C Sildenafil (5 mg/kg)	$44.43 \pm 6.16^{*\triangle\triangle}$
D L-carnitine (300 mg/kg)	$40.76 \pm 4.93^{*\triangle\triangle}$
E Sildenafil + L-carnitine (2.5 mg/kg + 150 mg/kg)	$12.89 \pm 3.70^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group B; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs group E

3.2 各组大鼠血清内睾酮、FSH、LH 水平的变化

如表 3 所示,B 组大鼠的睾酮、FSH 和 LH 的水平比 A 组均显著的降低($P < 0.01$),表明糖尿病大鼠的雄性激素降低。西地那非治疗后的 C 组与

左旋肉碱治疗后的 D 组睾酮、FSH 和 LH 水平均显著高于 B 组($P < 0.01$)。联合用药后的 E 组睾酮、FSH、LH 水平比 B 组显著升高($P < 0.01$),且 E 组大鼠的睾酮水平比 C 组、D 组均有显著性提高($P < 0.01$)。

3.3 大鼠睾丸内 MDA、SOD、TAC 水平的变化

如表 4 所示,B 组糖尿病大鼠 MDA 水平明显高于正常对照组($P < 0.01$),而 SOD、TAC 水平则相应的低于对照组($P < 0.01$)。C 组及 D 组 MDA 水平与 B 组相比,均有显著性降低($P < 0.01$),而 SOD、TAC 水平则相应的有显著性增加($P < 0.01$)。西地那非治疗的 C 组与左旋肉碱治疗的 D 两组相比,C 组 MDA 水平高于 D 组,而 SOD、TAC 水平低于 D 组($P < 0.01$),用西地那非和左旋肉碱联合治疗后的 E 组,MDA 水平比模型组、西地那非治疗组、左旋肉碱治疗组均显著下降($P < 0.01$),而 SOD、TAC 水平显著升高($P < 0.01$),同时显著高于 C 组、D 组($P < 0.01$)。

Table 3 Changes in the levels of testosterone, FSH, LH in rats of different groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Testosterone/(nmol/L)	FSH/(IU/L)	LH/(ng/L)
A Control	25.43 \pm 2.83 * *	6.81 \pm 0.73 * *	717.14 \pm 40.12 * *
B DM (Model)	9.59 \pm 1.63 $\triangle\triangle$	2.02 \pm 0.44 $\triangle\triangle$	374.29 \pm 22.86 $\triangle\triangle$
C Sildenafil	14.14 \pm 3.01 * * $\triangle\triangle$	3.13 \pm 0.47 * * \triangle	431.14 \pm 28.57 * * \triangle
D L-carnitine	12.31 \pm 2.78 * * $\triangle\triangle$	2.71 \pm 0.35 * * $\triangle\triangle$	377.43 \pm 29.31 * * $\triangle\triangle$
E Sildenafil + L-carnitine	23.99 \pm 2.64 * *	5.81 \pm 0.46 * *	711.48 \pm 34.39 * *

FSH: Follicle-stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone

* * $P < 0.01$ vs group B; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs group E**Table 4** Changes in the levels of MDA, SOD, TAC in penis of different groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)	TAC/(U/mg prot)
A Control	0.94 \pm 0.094 * *	48.97 \pm 2.01 * *	2.33 \pm 0.18 * *
B DM (Model)	1.81 \pm 0.063 $\triangle\triangle$	20.72 \pm 2.15 $\triangle\triangle$	1.03 \pm 0.20 $\triangle\triangle$
C Sildenafil	1.73 \pm 0.047 * $\triangle\triangle$	22.14 \pm 1.21 * $\triangle\triangle$	1.07 \pm 0.16 * $\triangle\triangle$
D L-carnitine	1.55 \pm 0.063 * $\triangle\triangle$	30.12 \pm 1.29 * * $\triangle\triangle$	1.62 \pm 0.22 * * $\triangle\triangle$
E Sildenafil + L-carnitine	1.01 \pm 0.078 * *	45.17 \pm 2.01 * *	2.24 \pm 0.17 * *

MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; TAC: Total antioxidant capacity

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group B; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs group E

4 讨论

男性不育症本身是由多种疾病或多种因素引起的,患者体内长期高血糖导致睾丸、附睾等生殖器官形态发生改变,全身新陈代谢失控,内分泌紊乱等是导致糖尿病男性患者不育症的主要原因^[14-15]。目前对于男性不育症的治疗方法主要是补充激素或者人工辅助受孕。性腺激素对雄性生殖与勃起功能具有重要作用,睾酮可以促进精母细胞的减数分裂,并增进生殖细胞的分化、成熟,促使精子的产生、成熟及释放,对阴茎勃起的作用主要通过激发和维持性欲。LH 促进睾酮的合成与分泌,FSH 与睾酮一起参与并维持生精过程的正常进行^[16]。氧化应激是指病理状态下体内氧化与抗氧化作用失衡,是导致机体多种疾病的一个主要因素。糖尿病病理条件下,长期高血糖状态使糖基化反应增强,产生过多的活性氧(ROS),机体内不饱和脂肪酸受自由基作用而发生脂质过氧化进而生成脂质过氧化物(LPO),LPO 分解产生 MDA,超氧化物歧化酶(SOD)是细胞中主要的抗氧化酶之一,其在机体清除活性氧的过程中发挥关键作用^[17-18]。

本研究结果表明,与单独用药组相比,联合用药组大鼠的精子数量和活率均有显著性提高($P < 0.01$),生精细胞凋亡率显著低于单独用药组($P < 0.01$),且与正常对照无显著性差异,说明西地那非与左旋肉碱合用对于糖尿病大鼠的精子质量有很好的改善作用。对性腺激素水平以及氧化应激

的研究显示,与正常组相比,模型组大鼠的性腺激素睾酮、FSH、LH 水平显著性降低($P < 0.01$),体内 ROS、MDA 水平显著性提高($P < 0.01$),而 SOD 水平显著性降低($P < 0.01$),说明糖尿病大鼠体内的性腺激素分泌降低,机体受到严重氧化应激的作用。经西地那非与左旋肉碱联合用药治疗后,性腺激素分泌显著性增加,氧化应激明显减弱,且联合用药的效果显著性高于单独用药($P < 0.01$)。

西地那非对于糖尿病所致勃起功能障碍的治疗效果早已得到临床证实,而其对于精子质量方面的作用研究甚少,左旋肉碱尚未被应用到糖尿病患者的不育症治疗中。本实验首次将西地那非、左旋肉碱两种作用机制不同的药物剂量减半后联合应用于治疗糖尿病大鼠的勃起功能障碍及精子质量低下,实验结果显示出了良好的协同作用,为临床治疗由糖尿病所致的勃起功能障碍和精子质量低下导致的男性不育症提供参考数据。

参 考 文 献

- [1] Chen JR. Holistic and differential treatment oil on male infertility [J]. Chin J Human Sexuality (中国性科学), 2007, 16(2):6-9.
- [2] Wang YX, Zheng JF. Male infertility update [J]. Nat J Androl, 2006, 12(9):771 - 774.
- [3] Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies [J]. Lancet, 2010, 375(9733):2215 - 2222.

- [4] Seftel A. Male hypogonadism. Part II: etiology, pathophysiology, and diagnosis [J]. *Int J Impot Res*, 2006, **18**(1): 223–228.
- [5] Hecht MJ, Neundorfer B, Kiesewetter F, et al. Neuropathy is a major contributing factor to diabetic erectile dysfunction [J]. *Neurol Res*, 2001, **23**(6): 651–654.
- [6] Kang N, Ma JH, Zhou X, et al. Effects of L-carnitine on the apoptosis of spermatogenic cells and epididymal sperm count and motility in rats with diabetes mellitus [J]. *National J Androl* (中华男科学杂志), 2011, **17**(5): 422–426.
- [7] Kang N. The effect of L-carnitine combined with sildenafil on reproductive parameter and erectile function in diabetic male rats [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2011(2011-10-31).
- [8] Hatzimouratidis K. Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction: an overview of the clinical evidence [J]. *Clin Interv Aging*, 2006, **1**(4): 403–414.
- [9] McMurray JG, Feldman RA, Auerbach SM, et al. Long-term safety and effectiveness of sildenafil citrate in men with erectile dysfunction [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2007, **3**(6): 975–981.
- [10] Ali ST, Rakkah NI. Neurophysiological role of sildenafil citrate (Viagra) on seminal parameters in diabetic males with and without neuropathy [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2007, **20**(1): 36–42.
- [11] Mostafa T. Tadalafil as an *in vitro* sperm motility stimulant [J]. *Andrologia*, 2007, **39**(1): 12–15.
- [12] Purvis K, Muirhead GJ, Harness JA. The effects of sildenafil on human sperm function in healthy volunteers [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2002, **53**(S1): 53–60.
- [13] Sharifi AM, Zare B, Keshavarz M, et al. Effect of short term treatment of L-carnitine on tissue ACE activity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Pathophysiol*, 2009, **16**(1): 53–56.
- [14] Sudha S, Valli G, Julie PM, et al. Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2000, **108**(1): 14–20.
- [15] Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, **212**(2): 167–178.
- [16] Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, et al. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms [J]. *J Androl*, 2004, **25**(5): 706–719.
- [17] Michno A, Raszeja-Specht A, Jankowska-Kulawy A, et al. Effect of L-carnitine on acetyl-CoA content and activity of blood platelets in healthy and diabetic persons [J]. *Clin Chem*, 2005, **51**(9): 1673–1682.
- [18] Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility [J]. *J Androl*, 1995, **16**(6): 464–468.

· 校园信息 ·

中国药科大学举办校企战略联盟座谈会

7月2日,中国药科大学校企战略联盟座谈会在江宁校区举行,来自江苏恒瑞医药股份有限公司、浙江华海药业股份有限公司、浙江医药股份有限公司、石药集团有限公司、广州威尔曼药业有限公司、山东绿叶制药有限公司、江苏康缘药业股份有限公司、南京圣和药业有限公司等国内知名医药企业的负责人和全体校领导出席会议。会议由副校长王广基主持。校党委书记徐慧首先致欢迎辞,他代表学校对知名医药企业负责人在百忙之中莅临中国药科大学,共同商讨校企战略联盟筹建事宜表示热烈欢迎。徐书记表示,希望各位企业家们在一起能够畅所欲言,为实现校企强强联合、互利共赢多出点子,多提宝贵意见和建议。

中国药科大学校长来茂德详细介绍了对于打造校企战略联盟的具体构想和思路。他指出,高校和企业各有优势,校企合作是一种多赢,中国药科大学希望依托自身的学科优势,与知名药企共同打造校企战略合作联盟,在平台共建、人才培养、项目合作、承办学术活动、信息沟通与共享等方面进行合作,共同打造“药物研发关键技术研究院”。同时,来校长还就校企战略联盟合作的方式方法以及需要企业提供的资源进行了说明。随后,副校长张效联从项目目标及定位、设计理念、功能布局、相关配套、科研优势等方面,向与会企业家们介绍了江宁校区科研大楼的规划情况。座谈会上,与会双方还就校企战略联盟的目标定位、平台运行模式等问题深入交换了意见。

(本刊讯)