

· 论 著 ·

褪黑素在活性氧致精子线粒体功能损伤中的保护作用

商学军¹, 黄宇烽¹, 叶章群², 余 晓², 顾万建¹

(1. 南京军区南京总医院男科, 江苏 南京 210002;
2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的: 探讨活性氧(ROS)对精子线粒体功能的损伤以及褪黑素(MLT)的保护作用。方法: 采用 Percoll 梯度离心法选择具有正常生理功能的精子, 作为本实验的正常精子模型。应用次黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶体系产生 ROS, 在 MLT 存在与不存在情况下, 与精子模型分别孵育 30 和 60 min 后, 采用酶组织化学方法分析精子线粒体部位的琥珀酸脱氢酶(SDH)活性, 采用 Rhodamine 123 (Rh123) 荧光探针标记精子, 通过流式细胞仪检测线粒体膜电位。

结果: 正常精子与 ROS 孵育后, 精子线粒体膜电位明显降低, 线粒体 SDH 活力降低极为显著; 而 MLT 则减轻了 ROS 对精子线粒体功能的损伤。结论: ROS 可通过对精子线粒体膜电位和 SDH 活力的影响, 而导致精子线粒体功能损伤; MLT 可通过其有效的抗氧化能力, 保护精子对抗 ROS 对其线粒体功能的损伤。

关键词: 褪黑素; 活性氧; 琥珀酸脱氢酶; 线粒体膜电位; 精子

中图分类号: R335+.1; R321.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-3591 (2004) 08-0604-04

Protection of Melatonin against Damage of Sperm Mitochondrial Function Induced by Reactive Oxygen Species

Shang Xuejun, Huang Yufeng, Ye Zhangqun, Yu Xiao, Gu Wanjian

Department of Andrology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China (Shang XJ, Huang YF, Gu WJ); Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei 430030, China (Ye ZQ, Yu X)

Correspondence to: Shang Xuejun, E-mail: shangxj@androl.com

Abstract: Objective: To study the damage of mitochondrial function of sperm induced by reactive oxygen species (ROS), and the protection of melatonin (MLT) against the damage. Methods: Spermatozoa of normal physiological function selected from semen samples by Percoll gradient centrifugation technique were used as normal sperm models in the present study. Reactive oxygen species were generated by hypoxanthine xanthine oxidase system, and in the presence (or absence) of MLT (6 mmol/L), incubated with normal sperm models for 30 and 60 minutes. After incubation, the activity of succinate dehydrogenase (SDH) in mitochondria of spermatozoa was assessed by histochemical method, and spermatozoa were labeled with specific fluorescent probe of Rhodamine 123 to measure mitochondrial membrane potential (MMP) by flow cytometry. Results: After normal spermatozoa were incubated with ROS, MMP of spermatozoa significantly decreased, and the activity of SDH almost decreased to zero. However, MLT had effect on reducing the damage of the mitochondrial function of sperm induced by ROS. Conclusion: ROS can damage the mitochondrial function of sperm by affecting MMP of spermatozoa and the activity of SDH. MLT can protect sperm mitochondria from the damage induced by ROS through its effective antioxidative potential. Natl J Androl, 2004, 10(8): 604-607

Key words: melatonin; reactive oxygen species; succinate dehydrogenase; mitochondrial membrane potential; sperm

褪黑素(melatonin, MLT)化学名称为 5-甲氧基-N-乙酰色胺,是一种主要由松果腺合成和分泌的神经内分泌激素,在生物体内具有广泛的生理作用。MLT 不仅参与调节昼夜节律及性腺、甲状腺、肾上腺

收稿日期: 2004-02-15; 修回日期: 2004-08-05

作者简介: 商学军(1971-),男,江苏盱眙县人,主治医师,博士,从事男科学专业。

通讯作者: 商学军, E-mail: shangxj@androl.com

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FACS-Calibur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。

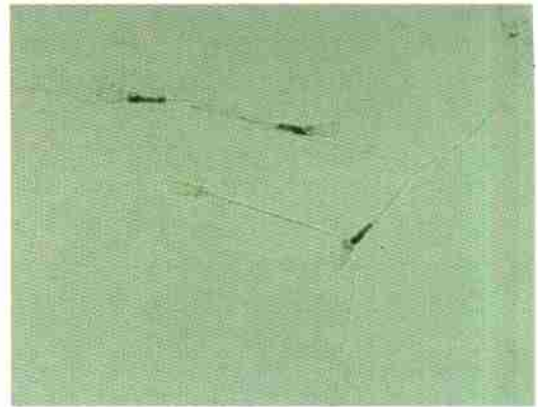


图1 精子SDH染色结果($\times 1000$)

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 **	0 **
D	80.83 \pm 2.92 *	48.00 \pm 4.65 **

与A组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

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

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

表2 孵育30和60 min时各组精子MMP检测结果($\bar{x} \pm s$, %)

Table 2. Results of the measurement of sperm MMP after 30 and 60 minutes incubation($\bar{x} \pm s$, %)

Group	Incubation time	
	30 min	60 min
A	249.85 \pm 11.84	229.27 \pm 10.95
B	245.53 \pm 8.60	220.83 \pm 10.96
C	177.57 \pm 22.37 **	122.46 \pm 16.33 **
D	232.04 \pm 8.69 *	200.04 \pm 11.80 *

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

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



图2 正常精子线粒体Rh123染色(x400)

Figure 2. Normal sperm mitochondria after Rh123 staining(x400)



图3 ROS作用30 min后精子线粒体Rh123染色(x400)

Figure 3. Sperm mitochondria exposed to ROS for 30 minutes after Rh123 staining(x400)

而引起精子功能损伤是不育的一个重要病因^[6]。目前研究认为,脂质过氧化作用可引起精子膜结构与功能改变,精子线粒体和DNA损伤^[7]。精子和精浆通过其抗氧化防御机制对抗ROS的影响,保护精子免遭氧化损伤。由于ROS产生增加可以导致抗氧化活性下降或抑制,目前主要的重点是研究可以保护精子对抗ROS和LPO有害作用的生物性和化学性抗氧化物^[8-11]。



图4 ROS作用60 min后精子线粒体Rh123染色(x400)

Figure 4. Sperm mitochondria exposed to ROS for 60 minutes after Rh123 staining(x400)

MLT是一种有效的内源性ROS清除剂,其作用与其受体介导的作用无关。MLT为一种广谱抗氧化物,可清除过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot HO$)、一氧化氮($NO\cdot$)、过氧亚硝基阴离子($ONOO\cdot$)、过氧化自由基($LOO\cdot$)和 $O_2^{\cdot-}$ 。MLT的抗氧化机制似乎与典型的抗氧化物如VC、VE和GSH不同,作为电子供体,典型的抗氧化物经历了氧化还原循环,因而,他们具有促进与阻止氧化反应的能力。而MLT作为一种富含电子的分子,可以通过一个加成反应与ROS作用形成几种稳定的终末产物从尿中排出,不经历氧化还原循环,因而不促进氧化反应。MLT清除ROS的能力不是以摩尔对摩尔的比例,如1个MLT分子可清除2个 $\cdot HO$ 分子。此外,MLT的代谢产物,如MLT与ROS作用时被产生的N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, N-acetyl-5-methoxykynuramine和6-hydroxy melatonin,也被认为是有效的ROS清除剂。MLT和它的代谢产物连续清除ROS的能力可以被定义为一种清除级联反应。MLT也与VC、VE和GSH协同作用清除ROS。因此,MLT是目前已知的最有效的抗氧化物之一^[12]。

Oner Iyidogan等^[13]研究证实,MLT可明显降低急性或慢性乙醇中毒大鼠睾丸脂质过氧化水平。Karbownik等^[14]也发现,MLT及其相关的一些吲哚类物质,可以对抗仓鼠睾丸中发生的自然氧化和铁诱导的脂质过氧化作用。体外实验也表明MLT可抑制实验条件下诱导的精子膜脂质过氧化作用^[3]。

本文研究也表明,MLT具有保护精子线粒体对抗ROS攻击的作用。精子线粒体是提供精子运动的能量源泉,其结构与功能的改变,必然影响到精子的运动能力。SDH是三羧酸循环中一个重要的关键酶,它位于线粒体内,可催化琥珀酸转变为延胡索

酸,脱下的氢通过氧化磷酸化最终生成ATP。因而,SDH活力的强弱,可以反映精子能量代谢的活跃程度^[5]。本研究发现,正常精子与ROS孵育后,精子SDH活力急剧降低,首次发现ROS可影响精子SDH活力,证实了精子线粒体中某些与能量产生有关的酶活性改变可能是ROS致精子活力低下的重要原因。同时,本研究也发现,MLT对ROS所致的精子线粒体SDH活力损伤具有一定的保护作用。

在正常精子线粒体中,由三羧酸循环产生的能量传递给电子,电子经呼吸链传递的同时,将质子从线粒体内膜的基质侧泵到内膜外,形成跨膜电位差,即为线粒体膜电位(m)。Rh123是一种阳离子亲脂性荧光染料,对膜具有通透性,由于活细胞线粒体内外膜之间存在着跨膜电位,因而能特异性地聚集于线粒体。Rh123荧光强度降低,反映线粒体数量减少和/或线粒体膜电位的降低或丧失^[15]。精子线粒体膜与其细胞膜一样均含有丰富的多聚不饱和脂肪酸,因而易受ROS攻击而发生脂质过氧化反应,引起膜对 H^+ 通透性增加,导致精子线粒体膜化后跨膜电位差明显降低。本文研究证实,正常精子与ROS孵育后,Rh123荧光强度降低,精子膜电位降低(图3、4),MLT也同样具有一定的对抗ROS致精子MMP降低的作用。

总之,本文结果表明,ROS可引起精子线粒体功能损伤,其中线粒体膜电位和三羧酸循环关键酶—SDH活力改变是其重要原因;MLT通过其有效的清除ROS能力,对ROS引起的精子线粒体功能损伤具有重要的保护作用。

参考文献

[1] Hardeland R. New actions of melatonin and their relevance to biome-

teology[J]. *Int J Biometeorol*, 1997, 41(2):47-57.

- [2] Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, *et al.* Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review[J]. *J Biomed Sci*, 2000, 7(6):444-458.
- [3] Cavella M, Liporac V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa[J]. *Arch Androl*, 2000, 44(1):23-27.
- [4] 商学军,黄宇烽,熊承良,等. 正常精形体外与活性氧作用后超微结构观察[J]. *中华男科学*, 2002, 8(2):106-108.
- [5] 薛小平,商学军,傅健,等. 精子线粒体琥珀酸脱氢酶检测及其意义[J]. *中华男科学*, 2003, 9(8):601-603.
- [6] Koksai IT, Usta M, Orhan I, *et al.* Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility[J]. *Asian J Androl*, 2003, 5(2):95-99.
- [7] Marchetti C, Obert G, Deffoesez A, *et al.* Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(5):1257-1265.
- [8] Gupta NP, Kumar R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility—a preliminary report[J]. *Int Urol Nephrol*, 2002, 34(3):369-372.
- [9] Vicari E, La Vignera S, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculopelvicididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(6):1203-1208.
- [10] Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity[J]. *Toxicology*, 2002, 180(1):33-44.
- [11] Verma A, Kanwar KC. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation *in vitro*[J]. *Asian J Androl*, 1999, 1(3):151-154.
- [12] Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin[J]. *Mech Ageing Dev*, 2002, 123(8):1007-1019.
- [13] Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Oner P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes[J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(2):89-93.
- [14] Karbownik M, Gtto E, Lewinski A, *et al.* Relative efficacies of indole antioxidants in reducing autoxidation and iron-induced lipid peroxidation in hamster testes[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 81(4):693-699.
- [15] Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, *et al.* Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1606(1-3):137-146.

(程童大 编发)

(上接 603 页)

作用,长期替代治疗是否会诱发肿瘤尚有待进一步观察。GH替代治疗应当谨慎,需严格选取病例,并注意适当剂量。

参考文献

[1] Hermann M, Berger P. Hormonal changes in aging men: a therapeutic indication[J]. *Exp Gerontol*, 2001, 36(7):1075-1082.

[2] 李江源,朱积川,窦京涛,等. 睾酮补充治疗中老年男子部分性雄激素缺乏(PADAM)初步研究[J]. *老年医学与保健*, 2001, 7(4):209-211.

[3] Becker AJ, Uckert S, Stief CG, *et al.* Serum levels of human growth hormone during different penile conditions in the cavernous and systemic blood of healthy men and patients with erectile dysfunction[J]. *Urology*, 2002, 59(4):609-614.

[4] Ho KK, Hoffman DM. Aging and growth hormone[J]. *Horm Res*, 1993,

40(1-3):80-86.

[5] Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, *et al.* Effects of human growth hormone in men over 60 years old[J]. *N Engl J Med*, 1990, 323(1):1-6.

[6] Gbney J, Wallace JD, Spinks T, *et al.* The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(8):2596-2602.

[7] Blackman MR, Sorokin JD, Munzer T, *et al.* Growth hormone and sex steroid administration in healthy aged women and men: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2002, 288(18):2282-2292.

[8] Pavel ME, Lohmann T, Hahn EG, *et al.* Impact of growth hormone on central nervous activity, vigilance, and tiredness after short-term therapy in growth hormone-deficient adults[J]. *Horm Metab Res*, 2003, 35(2):114-119.

(朱培元 编发)