

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.004>

## 高压氧治疗对2型糖尿病大鼠睾丸的保护作用及其机制

聂文洁<sup>1</sup>, 郭冬婕<sup>2</sup>, 曹秀琴<sup>3</sup>, 邵贵强<sup>4</sup>

(1. 上海市闵行区吴泾医院病理科, 上海 200241; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院皮肤科, 上海 200437; 3. 上海市闵行区吴泾医院药剂科, 上海 200241; 4. 上海市闵行区吴泾医院高压氧科, 上海 200241)

**[摘要]** 目的: 研究高压氧对大鼠糖尿病睾丸病变的保护作用并探讨其机制。方法: 32只大鼠, 其中8只Wistar正常大鼠, 24只2型糖尿病GK大鼠, 分4组, 分别为对照组、模型组、二甲双胍对照组及高压氧组。对照组和模型组予纯净水5 mL/(kg·d)灌胃, 二甲双胍组予二甲双胍混悬液250 mL/(kg·d)灌胃, 高压氧组予纯净水5 mL/(kg·d)灌胃, 同时加以稳压纯氧0.15 MPa处理30 min。3周后集中处死, 摘取睾丸组织。睾丸组织经甲醛溶液固定后制成切片, 分别行HE染色观察组织结构变化; TUNEL法检测细胞凋亡情况, 免疫组织化学法检测NOS及SOD蛋白表达水平。结果: 对照组睾丸曲细精管HE染色后光镜下见丰富饱满, 生精细胞5~6层, 腔内见丝状精子; 模型组睾丸曲细精管萎缩, 生精细胞数量减少, 只有2~3层, 腔内精子减少; 高压氧组睾丸结构破坏较模型组明显减轻, 曲细精管内精子数量明显增多, 结构较完整。睾丸的凋亡主要发生在生精细胞, 模型组凋亡指数最高, 与其他3组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); 高压氧干预后凋亡细胞数较模型组减少, 但仍高于对照组( $P<0.05$ ), 与二甲双胍组类似。模型组NOS表达最强, 对照组最弱, 与其他3组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); 高压氧组NOS表达介于对照组和模型组之间( $P<0.05$ ), 与二甲双胍组类似。模型组SOD表达最弱, 对照组最强, 高压氧组介于两者之间, 与两组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: 糖尿病时氧自由基增多, 并引起凋亡增加是引起睾丸损伤的重要原因, 高压氧可以促进SOD的合成, 使其清除多余氧自由基, 通过此机制可以抑制细胞过度凋亡, 从而达到保护睾丸组织的目的。

**[关键词]** 高压氧; 2型糖尿病; 睾丸功能障碍; 氧化应激; 凋亡

## Effect and mechanism of hyperbaric oxygen protection on testis of GK rats

NIE Wenjie<sup>1</sup>, GUO Dongjie<sup>2</sup>, CAO Xiuqin<sup>3</sup>, SHAO Guiqiang<sup>4</sup>

(1. Department of Pathology, Wujing Hospital of Shanghai Minhang District, Shanghai 200241; 2. Department of Dermatological, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437; 3. Department of Pharmacy, Wujing Hospital of Shanghai Minhang District, Shanghai 200241; 4. Department of Hyperbaric Oxygen, Wujing Hospital of Shanghai Minhang District, Shanghai 200241, China)

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-20

通信作者 (Corresponding author): 曹秀琴, Email: caoxqin@163.com

基金项目 (Foundation item): 上海市闵行区科委自然科学基金课题 (2015MHZ063)。This work was supported by Science and Technology Commission of Minhang District of Shanghai, China (2015MHZ063).

**Abstract** **Objective:** To explore the effect and the mechanism of hyperbaric oxygen therapy on testis of GK rats. **Methods:** Twenty-four GK rats were randomly divided into a model group, a metformin hydrochloride group and a hyperbaric oxygen group, 8 normal Wistar male rats were in the control group. The rats in the control group, the model group and the hyperbaric oxygen group received purified water 5 mL/kg once a day, while the rats in the metformin group received intragastric administration with metformin hydrochloride 250 mg/kg once a day. In addition, the rats in the hyperbaric oxygen group inhaled pure oxygen under a constant pressure (0.15 MPa) for 30 minutes. After 3-week treatment, the testis of all rats were excised for examination. For each sample, the formalin fixed testicular tissue were made into slices. Then the slices were stained by HE to observe the tissue structure. Subsequently, the apoptosis and expression level of NOS and SOD were determined by TUNEL and immunohistochemistry. **Results:** Under the microscopy, the testis seminiferous tubules (HE staining) of rats in the control group were full with filamentous sperm in spermatogenic cell lumen and 5- to 6-layer sperm cells. In the model group, the rats' seminiferous tubules were atrophied, and quantity of spermatogenic cell decreased (2-3 layers). Compared with the model group, the testis structure of rats in the hyperbaric oxygen group was more integrated, and the quantity of sperm increased. The apoptosis of testis mainly occurs in the androgon. The amounts of apoptotic cells increased significantly in the model group ( $P<0.05$ ), while the apoptotic cells decreased after intervention of hyperbaric oxygen (more than the control group) whose effect was similar to the metformin group. The NOS level of the rats in the model group was much higher than that in the other group, while the level of the control group was the lowest ( $P<0.05$ ). The NOS expression of the hyperbaric oxygen group was weaker than the model group, but stronger than the control group ( $P<0.05$ ). Moreover, the SOD expression in the hyperbaric oxygen group was stronger than the model group, but weaker than the control group. **Conclusion:** Increased oxygen free radicals and apoptosis is an important cause of testicular injury in diabetes. However, hyperbaric oxygen can induce the generation of SOD, remove excess oxygen free radicals, and inhibit excessive apoptosis cells so as to protect the testis tissue.

**Keywords** hyperbaric oxygen treatment; type 2 diabetes; testicular dysfunction; oxidative stress; apoptosis

糖尿病并发症令患者的负担日益加重, 合并生殖系统损伤尤其困扰男性糖尿病患者, 其中勃起功能障碍(erection dysfunction, ED)和男性不育最为常见<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明: 糖尿病可引起睾丸形态学改变和生精阻滞, 从而改变性激素水平, 造成男性和雌性动物生殖系统损伤。尽管更深层次的机制尚不明确, 但高血糖引起的氧化应激反应加重并发症的发生这一观点得到公众认可<sup>[3]</sup>, 持续高血糖状态令机体各环节产生大量ROS, 加速组织细胞中的氧化反应, 促使多种糖尿病并发症的发生、发展。糖尿病氧化应激是自由基产生增加和抗氧化能力减弱的结果, 高压氧可以增加血氧含量, 促进细胞有氧代谢, 诱导超氧化物歧化酶的大量合成、清除过多的氧自由基, 抑制细胞过度凋亡<sup>[4]</sup>。本研究运用高压氧对糖尿病模型大鼠早期干预, 明确其对糖尿病性睾丸损伤有无保护作用, 并探讨其可能的作用机制, 为临床一线工作者及科研学者在糖尿病生殖损伤治疗领域提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

雄性5月龄SPF级Wistar大鼠8只, 体重(359.00±15.22)g。雄性5月龄SPF级GK大鼠, 体重(375.00±17.89)g; 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。

#### 1.1.2 主要试剂

NOS抗体、SOD抗体、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购于迈新生物技术开发有限公司, 二甲双胍(规格0.25g, 0903058)购于上海施贵宝有限公司, SV-0002二步法试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

高压氧动物舱购于上海减压器厂有限公司, 显微镜购于日本Olympus公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 大鼠高压氧治疗

适应性饲养雄性GK大鼠26只, 1周后从中挑选24只随机血糖在16.7 mmol/L以上者, 进行编号并随机分为3组, 每组8只: 模型组、二甲双胍组、高压氧组。对照组由8只雄性健康Wistar大鼠组成。二甲双胍组是阳性对照组。对照组和模型组每天予5 mL/kg纯净水灌服, 二甲双胍组每天予二甲双胍混悬液250 mg/kg灌胃, 高压氧组每天予纯净水5 mL/kg灌服, 同时加以纯氧稳压0.15 MPa处理30 min。治疗3周后, 将大鼠禁食12 h, 尾部采血测空腹血糖并记录, 用异氟醚麻醉后脱脊处死, 随即剥离睾丸, 固定, 石蜡包埋, 切成4 μm薄片。

### 1.2.2 组织切片 HE 染色

光学显微镜下观察大鼠睾丸组织形态变化。

### 1.2.3 TUNEL 法检测睾丸细胞凋亡

细胞凋亡检测参照TUNEL(BD公司产品)试剂盒说明书进行。凋亡细胞典型特征为胞质收缩, 细胞核呈紫蓝色。光镜下观察凋亡细胞并计算凋亡指数(apoptotic index, AI)。AI=阳性细胞数/总细胞数×100%, 每张切片随机计数5个高倍视野, 取平均值。

### 1.2.4 免疫组织化学检测 NOS 和 SOD 的蛋白表达水平

采用两步法检测法, 操作步骤参照试剂盒说明书。用Imagepro plus 5.0软件测量组织切片积分光密度(integrated optical density, IOD)。每1例组

织切片均选择5个高倍视野照片(400×)进行测定, 取平均值作为代表该例组织的阳性单位值<sup>[5]</sup>。

## 1.3 统计学处理

实验数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用SPSS 10.0软件进行各组间单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ , 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高压氧对糖尿病大鼠血糖的影响

治疗3周后, 模型组大鼠禁食4和12 h所测得血糖均显著高于对照组, 差异均有统计学意义( $P<0.01$ ), 可以作为糖尿病模型。高压氧组和二甲双胍组禁食4 h后, 血糖较模型组有不同程度的下降, 差异均有统计学意义( $P<0.01$ ); 禁食12 h血糖与模型组比较, 差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 2.2 高压氧对糖尿病大鼠睾丸组织 HE 染色的影响

正常对照组睾丸曲细精管上皮基膜完整, 各期生精细胞排列整齐, 生精细胞5~6层腔内可见精子, 无生精细胞脱落现象。模型组睾丸镜下见曲细精管萎缩, 直径减小, 各级生精细胞数量减少, 只有2~3层, 生精细胞脱落, 腔内精子数量减少, 基膜增厚等。高压氧组和二甲双胍组曲细精管结构基本完整, 曲细精管内精子数量明显增多, 病变介于对照组和模型组之间(图1)。

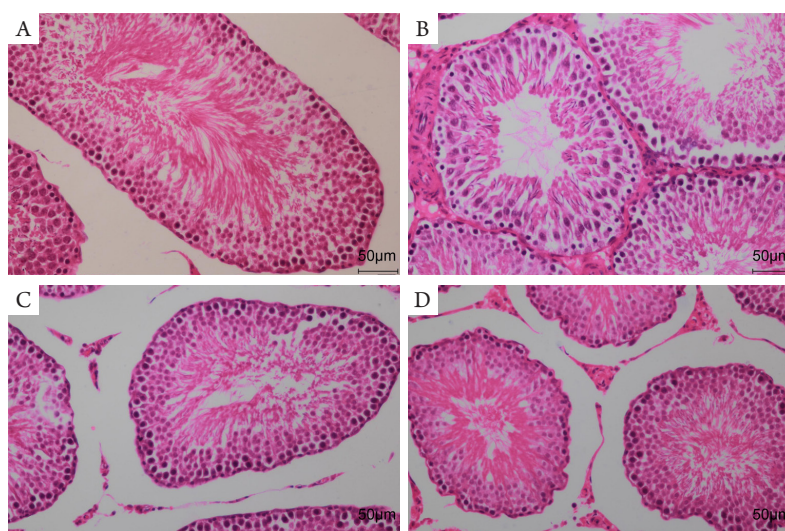


图1 大鼠睾丸组织HE染色

Figure 1 Testis tissue examined by HE staining

(A)对照组; (B)模型组; (C)二甲双胍组; (D)高压氧组。

(A) Control group; (B) Model group; (C) Metformin group; (D) Hyperbaric oxygen group.

### 2.3 高压氧对糖尿病大鼠睾丸生精细胞凋亡的影响

生精细胞核染色为深棕色颗粒者为凋亡细胞, 在正常组中表达最少, 显著低于其余各组; 模型组表达最多, 且显著高于其余各组; 高压氧干预后, 凋亡生精细胞数量较模型组少, 但不及正常组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ; 表1, 图2)。

### 2.4 睾丸细胞 NOS 蛋白表达水平

NOS表达情况: 模型组最高, 与其他3组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 高压氧组与二甲双胍

胍组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 高压氧组与对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 阳性表达介于对照组和模型组之间(表1, 图3)。

### 2.5 睾丸细胞 SOD 蛋白表达水平

与正常组大鼠相比, 糖尿病模型组大鼠SOD水平显著降低( $P < 0.05$ ), 高压氧组和二甲双胍组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 高压氧组表达介于对照组和模型组之间, 与模型组和对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ; 表1, 图4)。

表1 各组大鼠睾丸的凋亡指数以及SOD和NOS的表达( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Apoptotic index and SOD, NOS expression in testis tissue of each groups ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡指数/%	SOD(IOD)	NOS(IOD)
对照组	$2.11 \pm 1.17^{\#}$	$0.314 \pm 0.016^{\#}$	$0.163 \pm 0.022^{\#}$
模型组	$3.88 \pm 0.83^*$	$0.276 \pm 0.017^*$	$0.195 \pm 0.016^*$
二甲双胍组	$3.00 \pm 0.76^{*\#}$	$0.297 \pm 0.007^{*\#}$	$0.159 \pm 0.009^{*\#}$
高压氧组	$2.63 \pm 1.19^{*\#}$	$0.295 \pm 0.009^{*\#}$	$0.153 \pm 0.048^{*\#}$

与对照组相比,  $*P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^{\#}P < 0.05$ 。

Compared with the control group,  $*P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$ .

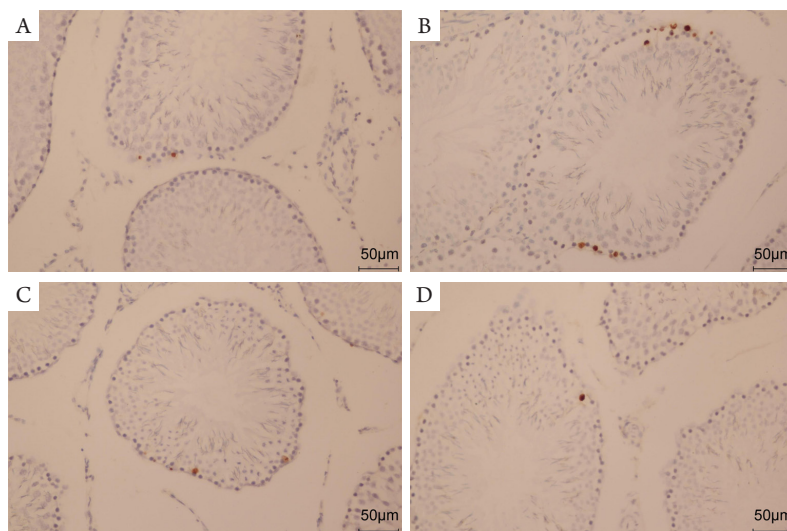


图2 大鼠睾丸组织TUNEL染色

Figure 2 Testis tissue examined by TUNEL staining

(A)对照组; (B)模型组; (C)二甲双胍组; (D)高压氧组。

(A) Control group; (B) Model group; (C) Metformin group; (D) Hyperbaric oxygen group.

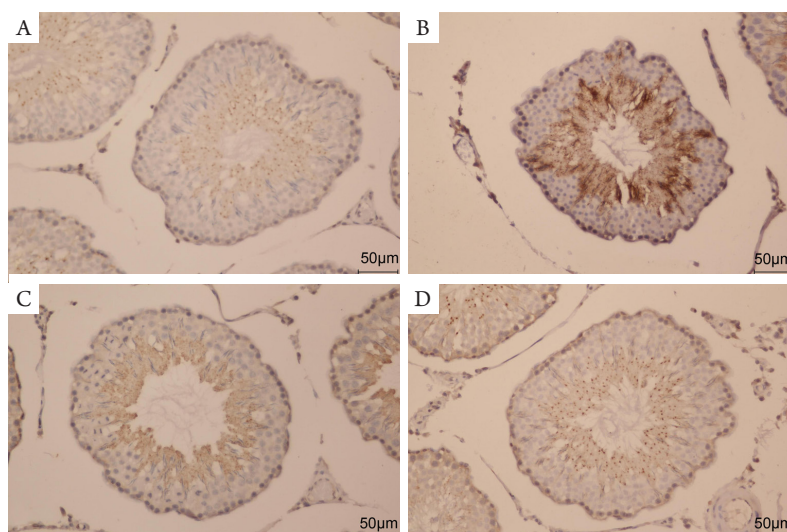


图3 大鼠睾丸组织NOS染色结果

Figure 3 Testis tissue examined by NOS staining

(A)对照组; (B)模型组; (C)二甲双胍组; (D)高压氧组。

(A) Control group; (B) Model group; (C) Metformin group; (D) Hyperbaric oxygen group.

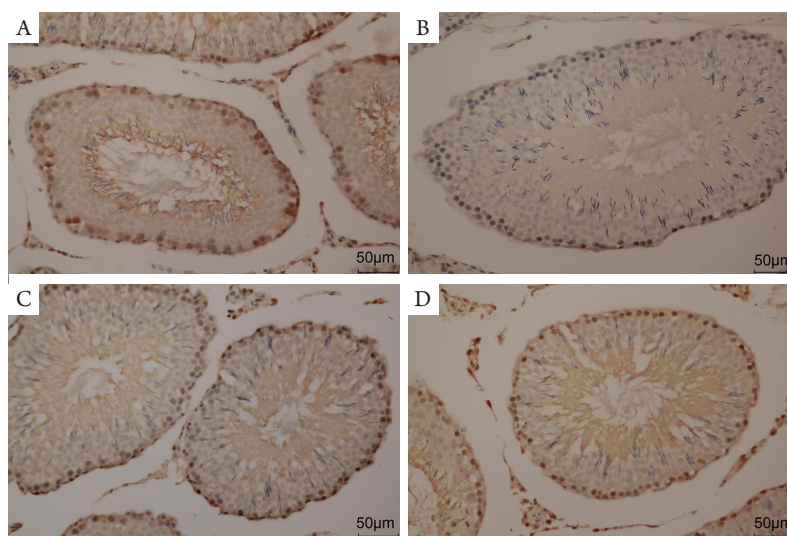


图4 大鼠睾丸组织SOD染色结果

Figure 4 Testis tissue examined by SOD staining

(A)对照组; (B)模型组; (C)二甲双胍组; (D)高压氧组。

(A) Control group; (B) Model group; (C) Metformin group; (D) Hyperbaric oxygen group.

### 3 讨论

高压氧可以减轻糖尿病大鼠的睾丸损伤,对睾丸组织具有保护作用。光镜下观察到模型组大鼠曲精管萎缩变形,生精上皮变薄,生精细胞明显减少并脱落,提示睾丸生精障碍。其实,睾丸损伤也可通过生精细胞凋亡率反映出来。生理状态下,生精细胞会在生成的同时凋亡,这时的

凋亡不仅可以帮助去除受损或染色体畸形的异常生精细胞,也能使精子细胞数量得到控制,整个过程完美地保证精子细胞的生存质量。但在病理状态下,受到有害物质的影响,生精细胞迅速凋亡,凋亡数量甚至超过生成数量,因此产生少精子或无精子症<sup>[6]</sup>。本实验中模型组凋亡的生精细胞数量显著高于正常对照组,也表明糖尿病大鼠睾丸发生生精障碍。经过高压氧治疗后,高压氧组

大鼠睾丸光镜下组织学结构较模型组明显改善, 凋亡指数较模型组下降, 表明高压氧对糖尿病大鼠睾丸具有保护作用。二甲双胍是公认的对糖尿病治疗有效的药物, 作为阳性对照组, 高压氧组与其差异不明显, 提示高压氧对糖尿病大鼠睾丸有一定的疗效。

高压氧可能通过降低糖尿病大鼠睾丸组织的氧化反应, 从而保护该组织并减少生精细胞凋亡。糖尿病时氧自由基增多, 并引起凋亡增加是引起睾丸损伤的重要原因。高血糖引起局部代谢障碍, 导致局部缺氧, 在多种细胞因子作用下促进睾丸产生大量的NOS, NOS可分解产生NO和超氧化阴离子(反应性氧化物ROS), ROS的过度生成和抗氧化物质代偿不足可导致氧化应激, 损伤线粒体, 导致细胞色素Cyt C的释放, 并激活凋亡蛋白酶, 使细胞发生凋亡<sup>[7]</sup>, 且高浓度NO原本就可导致精子细胞DNA结构异常。众所周知, SOD具有较强的抗氧化作用, 善于清除体内多余氧自由基。而高压氧能明显提高血氧含量, 改善微循环, 提高机体抗氧化能力, 提高氧分压。当组织的缺血缺氧状态得到改善, 即能加速生成SOD, 加速清除氧自由基, 从而减少细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本研究发现: 糖尿病模型大鼠睾丸组织中NOS水平异常升高, SOD异常下降, 说明高糖导致机体出现氧化应激状态, 睾丸组织中氧化应激尤为严重。高压氧组和对照组NOS表达降低, 相反SOD表达升高, 提示高压氧抗氧化应激作用可能是减轻睾丸损伤的机制之一。

## 参考文献

- Hidalgo-Tamola J, Chitale K. Review type 2 diabetes mellitus and erectile dysfunction.[J]. *J Sex Med*, 2010, 6(4): 916-926.
- Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Diabetes and sexual dysfunction: current perspectives[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014, 7(7): 95-105.
- Mollace V, Malara N, Gratteri S, et al. Bergamot polyphenolic fraction counteracts erectile dysfunction occurring in patients suffering from type 2 diabetes[J]. *PharmaNutrition*, 2016, 4(Suppl): S41-S46.
- Moen I, Stuhr LE. Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review[J]. *Targeted Oncology*, 2012, 7(4): 233-242.
- 李涛, 范好, 刘芳. 免疫组织化学图像光密度分析的标准化方法[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(5): 727-728.  
LI Tao, FAN Hao, LIU Fang. Standardization method of images optical density analysis for immunohistochemical[J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2008, 31(5): 727-728.
- Ameeramja J, Panneerselvam L, Govindarajan V, et al. Tamarind seed coat ameliorates fluoride induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in A549 cells[J]. *J Hazard Mater*, 2016, 301: 554-565.
- Li M, Liu Z, Zhuan L, et al. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats.[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1): 47-52.
- Tian X, Zhang L, Wang J, et al. The protective effect of hyperbaric oxygen and Ginkgo biloba extract on A $\beta$ 25-35-induced oxidative stress and neuronal apoptosis in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 242(1): 1-8.

本文引用: 聂文洁, 郭冬婕, 曹秀琴, 邵贵强. 高压氧治疗对2型糖尿病大鼠睾丸的保护作用及其机制[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1791-1796. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.004

**Cite this article as:** NIE Wenjie, GUO Dongjie, CAO Xiuqin, SHAO Guiqiang. Effect and mechanism of hyperbaric oxygen protection on testis of GK rats[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1791-1796. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.004