

# 人参皂苷CK、淫羊藿苷对体外培养精子的剂量负荷试验

余宏亮,常明秀,曹恒海,薄立伟,杨永俊,李聪敏,李 铭

(河南省人口和计划生育科学技术研究院,郑州 450002)

**[摘要]** 目的:项目拟通过观察在培养液中加入较高剂量的人参皂苷CK(Ginsenoside, G组)、淫羊藿苷(Icraiin, I组)两种药物前、后精子死亡率数据,评估两种药物单体在较大剂量时对体外精子的死亡率的影响。方法:新鲜液化的精液(semen)标本40份, F-10培养液调整浓度为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ ,分别添加不同剂量的人参皂苷CK(Ginsenoside, Gin CK)、淫羊藿苷(Icraiin, Icr)按照不同药物浓度, G组分为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组( $G_1$ 组), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组( $G_2$ 组), I组分为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $I_1$ 组), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $I_2$ 组); 设不添加任何物质的F-10组(F-10, F组)为阴性对照组,培养24 h后分别检查各组精子活动率和死亡率。结果:培养24 h后,精子死亡率从低到高分别是培养24 h后,  $I_2$ 组死亡率为 $41.31 \pm 17.49$ , F组死亡率为 $47.50 \pm 19.85$ ,  $G_2$ 组死亡率为 $55.75 \pm 24.93$ ,  $I_1$ 组死亡率为 $58.05 \pm 19.06$ ,  $G_1$ 组死亡率为 $98.84 \pm 1.62$ 。精子死亡率从低到高分别是 $I_2$ 组、F组、 $G_2$ 组、 $I_1$ 组、 $G_1$ 组,各组比较有差异( $P < 0.05$ )。结论:较大剂量的Gin CK、Icr,均可引起体外培养的精子死亡率增高;在0.1 mg/mL的浓度下的Gin CK对精子的致死作用已经比较明显,而0.5 mg/mL对体外培养精子来说是致死剂量(98.84%),在0.1 mg/mL的剂量下的淫羊藿苷对精子的致死作用并不明显,在0.5 mg/mL剂量下Icr对精子致死作用有所提高,但远未达到Gin CK 98.4%的致死率。

**[关键词]** 人参皂苷CK;淫羊藿苷;精子;致死剂量

**[中图分类号]** R394 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2015)06-0086-03

## 1 前言

根据相关报导的有效作用剂量<sup>[1,2]</sup>,本研究拟通过观察在培养液中加入较大剂量的人参皂苷CK(Ginsenoside, Gin CK)、淫羊藿苷(Icraiin, Icr)前、后精子死亡率数据,了解其对体外精子死亡率的影响,以便筛对两者安全选出疗效确切,药物成分明确,药理机制透彻的中药单体制剂,减少患者和医生的选择盲目性。

## 2 资料和方法

### 2.1 资料

本院化实验室检验用后废弃精液标本40份(经患

者同意并经院伦理委员会批准),精子浓度少于 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 的不纳入。

### 2.2 方法

F-10培养液调整浓度为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ ,分别添加不同剂量的人参皂苷CK(Ginsenoside, G组; $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{18}$ ,分子量为622.87)、淫羊藿苷(Icraiin, I组; $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$ ,分子量为676.65),按照不同浓度, G组分为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组( $G_1$ 组), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组( $G_2$ ), I组分为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $I_1$ 组), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $I_2$ 组); 设不添加任何物质的F-10组(F组)为阴性对照组,34  $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后分别检查各组精子死亡率。

### 2.3 检测方法

人参皂苷CK,水溶性 $V_E$ 用F-10培养液溶解后

**[收稿日期]** 2015-03-10

**[基金项目]** 河南省属科研院所基本科研业务费专项资金项目(2014JBKY006)

**[作者简介]** 余宏亮,1978年出生,男,河南卫辉市人,主治医师,研究方向为生殖健康;E-mail: hongliangyu19780@sina.com

使用;淫羊藿苷先用二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide 或 DMSO)溶解,在使用前用添加至 F-10 液使用;死亡率(伊红染色, Eosin)参照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第五版<sup>[3]</sup>精子死亡率检测方法。

## 2.4 试剂、仪器设备及软件

Gin CK(美仑生物), Icr(美仑生物), 伊红(Sigma), DMSO(永大), 其他国产分析纯、离心机(国产)、移液器(国产)、全自动精子分析系统(Proiser)、Nikon ECLIPSE E200(Nikon)。

## 2.5 数据统计

SPSS13.0 软件包进行数据处理,检测数据用  $Mean \pm s$  表示,对多组比较采用方差分析检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 试验结果

1) 培养 24 h 后, I<sub>2</sub> 组死亡率为  $41.31 \pm 17.49$ , F 组死亡率为  $47.50 \pm 19.85$ , G<sub>2</sub> 组死亡率为  $55.75 \pm 24.93$ , I<sub>3</sub> 组死亡率为  $58.05 \pm 19.06$ , G<sub>1</sub> 组死亡率为  $98.84 \pm 1.62$ 。

2) 精子死亡率从低到高分别是 I<sub>2</sub> 组、F 组、G<sub>2</sub> 组、I<sub>3</sub> 组、G<sub>1</sub> 组, 各组经伊红染色后的死亡率有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 精子死亡率及排序(由低到高)

Table 1 The values of mortality for human semen (from low to high)

组别	样本	死亡率/%	顺序(1→5)
I <sub>2</sub>	40	$41.31 \pm 17.49$	1
F	40	$47.50 \pm 19.85$	2
G <sub>2</sub>	40	$55.75 \pm 24.93$	3
I <sub>3</sub>	40	$58.05 \pm 19.06$	4
G <sub>1</sub>	40	$98.84 \pm 1.62$	5

## 4 讨论

中药治疗男性不育方面的药物及组方很多,但由于中医药的药物成分复杂,作用靶点多,药物作用机理难以明确<sup>[4]</sup>,而中药单体的研究相对容易,因此,中药单体治疗男性不育的研究逐渐成为男科临床的热点之一<sup>[5]</sup>。中医认为,男性不育以虚证为主,多施以温补之药,人参和淫羊藿是男科临床的常用药物,其中的有效成分主要是人参皂苷和淫羊藿

苷,动物研究表明在改善精子质量方面具有良好疗效<sup>[6]</sup>,但是有关二者单体成分的致死剂量即单位体积的最大负荷剂量未见报导,药物安全性方面的研究也多未涉及。

Gin 是人参中的主要活性成分, Gin CK 是天然的二醇型人参皂苷在人肠道内的代谢产物,是人参在体内发挥活性的实体<sup>[7]</sup>,且有良好的水溶性。研究表明<sup>[8]</sup>, Gin CK 是一个多靶点、高活性化合物,有研究表明其在抗肿瘤、抗炎、保肝和抗过敏方面体现了良好的活性,而且在神经系统及免疫系统方面也具有很好的调节作用<sup>[9]</sup>。淫羊藿是男科临床治疗不育症的常用药<sup>[10]</sup>,现代药理实验研究表明,淫羊藿能增加血管血流量、促进造血功能、免疫功能及代谢,具有抗衰老、抗肿瘤等功效<sup>[11]</sup>, Icr 是淫羊藿的主要活性成分,是现代男科药物研究领域的主要对象之一<sup>[12]</sup>,由于难溶于水,其作为细胞生物学领域的研究对象时多用二甲基亚砷溶解后使用。

根据文献[13]报道,集既往经验,不同个体精子的精子活动率相差悬殊,即使同一个体,同一标本,同一分析人员,同一精子分析系统做出的结果往往有较大误差,特别是该标本精子活动率较高时,在短时间内做体外培养时(特别是培养液中的药物作用相近时)该种误差减少程度有限,而当培养 24 h 以上时,不同药物及剂量下的精子活动率减少有显著差异,可有效避免相关统计误差,伊红染色观察精子死亡率简单快速,一般误差较小,培养时间的选择和死亡率方法的正确选择有助于提高统计结果的准确性。

本次项目通过对 Gin CK、Icr 等药物单体成分的进行深入的临床研究,观察了其在体外对精子质量的影响:a. 较大剂量的 Gin CK、Icr, 均可引起体外培养的精子死亡率增高,在 0.1 mg/mL 的浓度下的 Gin CK 对精子的致死作用已经比较明显,而 0.5 mg/mL 对体外培养精子来说是致死剂量(98.84%),在 0.1 mg/mL 的剂量下的淫羊藿苷对精子的致死作用并不明显,在 0.5 mg/mL 剂量下 Icr 对精子致死作用开始显现;b. Icr 对精子的细胞毒性作用非常微弱,而大剂量的 Gin CK 对精子的细胞毒性作用非常显著。

## 参考文献

- [1] 陈智,刘继红,尹春萍,等. 人参皂甙 Rb1 体外对人精子运动参数的影响[J]. 中国男科学杂志, 2006, 20(6): 6-8.
- [2] 杨欣,张永华,丁彩飞,等. 应用体外培养法研究淫羊藿水提取物对人精子膜功能损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学

- 疗学,2007,1(6):663-667.
- [3] 国家人口和计划生育委员会科学技术研究所,等. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2011.
- [4] 于庆生,余宏亮,潘晋方,等. 芪黄煎剂对缺血-再灌注大鼠肠黏膜上皮细胞 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3、9 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(2):223-227.
- [5] 余宏亮,于庆生,潘晋方,等. 芪黄煎剂对缺血-再灌注大鼠肠黏膜上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(12):1096-1099.
- [6] 余宏亮,薄立伟,曹恒海,等. 男性染色体断裂率增高的中医药治疗[J]. 辽宁中医杂志,2014,46(6):1169-1170.
- [7] 王 筠,侯金才,向丽华,等. 栀子苷与人参皂苷 Rg1 配伍对缺氧诱导损伤小鼠小胶质细胞炎症因子分泌的平衡调节作用[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(1):94-95.
- [8] 周 伟,罗振时,周 颢. 反相高效液相色谱法测定人参皂甙 Compound—K 的含量[J]. 色谱,2005,23(3):270-272.
- [9] 张大雷,杨摇蓓,吴摇磊,等. 人参皂苷保护小鼠精原细胞氧化损伤的研究[J]. 中国药理学通报,2010,26(8):1014-1016.
- [10] 李 丹,魏莎莉,谢 怡,等. 淫羊藿苷对糖尿病大鼠睾丸中亚硝基谷胱甘肽还原酶及 Bcl2 的影响[J]. 解剖学杂志,2013,36(1):27-28.
- [11] 高学勇,林 珊,韩咪莎. 淫羊藿苷调节雄性大鼠生殖功能[J]. 解剖学杂志,2013,36(4):799.
- [12] 王嘉琪,李雪雁,吴河龙,等. 淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):199.
- [13] Cooper T G, Noonan E, Sigrid von Eckardstein, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics [J]. Human Reproduction Update,2009,16(3):231-245.

## The lethal dose test of Ginsenoside CK and Icrainin for sperm in vitro

Yu Hongliang, Chang Mingxiu, Cao Henghai, Bo Liwei,  
Yang Yongjun, Li Chongmin, Li Ming

(Henan Province Research Institute for Population and Family Planning, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the effects of Ginsenoside CK (Gin CK), Icrainin (Icr) for sperm survive in vitro. Methods: 40 sample of male semen were cultured in medium and grouped it in vitro, To adjust the semen concentration is  $1.0 \times 10^7/\text{mL}$  by culture medium of F-10 (F-10), To add respect Ginsenoside (Gin<sub>1</sub> group, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Gin<sub>2</sub> group, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Icrainin (Icr<sub>1</sub> group, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Icr<sub>2</sub> group, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added respectively. F-10 alone was the control groups. To compare with them of groups sperm tmortality. Results: The values of sperm mortality after cultured for 24 h. The motality of I<sub>2</sub> group was  $41.31 \pm 17.49$ , F group was  $47.50 \pm 19.85$ , G<sub>2</sub> group was  $55.75 \pm 24.93$ , I<sub>3</sub> group was  $58.05 \pm 19.06$ , G<sub>1</sub> group was  $98.84 \pm 1.62$ . Rank-ing them from less to more motality were I<sub>2</sub> groups, F groups, G<sub>2</sub> groups, I<sub>1</sub> groups, G<sub>1</sub> group s ( $P < 0.05$ ). Conclusion: When the concentration was 0.1 mg/mL, Gin CK can increase the sperm mortality significantly and Icr was not; When the concentration was 0.5 mg/mL, it is the lethal dose for Gin CK and Icr can increase the sperm mortality but it is not.

**[Key words]** Ginsenoside CK; Icrainin; sperm; lethal dose