

# 解脲脲原体感染对大鼠睾丸组织结构及分泌功能的影响\*

张涛<sup>1</sup>, 杨文选<sup>1</sup>, 余峰玲<sup>1</sup>, 管俊昌<sup>1△</sup>, 周蕾<sup>2</sup>, 甘怀勇<sup>2</sup>, 刘从森<sup>1</sup>

1. 蚌埠医学院病原生物学教研室(蚌埠 233030); 2. 蚌埠医学院病理学教研室(蚌埠 233030)

**【摘要】** 目的 探讨解脲脲原体(ureaplasma urealyticum, UU)感染对大鼠睾丸组织结构及分泌功能的影响。**方法** 40只清洁级SD大鼠随机分为4组,每组10只,实验组A、B(7d组、14d组),对照组C、D(7d组、14d组)。实验组膀胱注射0.6mL UU4型菌株[ $10^7$ 颜色改变单位(CCU)/mL],对照组膀胱注射等体积的UU液体培养基。分别于注射后7d、14d取各组大鼠睾丸组织于光镜和透射电镜观察镜下结构;化学发光法检测血浆睾酮和睾丸间质液睾酮含量。**结果** 光镜观察实验组(A、B)为炎症性病变,如生精细胞数量和层次减少,炎性细胞浸润,成熟精子数量稀少等,且B组损伤性病变更轻,A组轻,C、D对照组无明显炎症病变。透射电镜观察实验组(A、B)为生精细胞凋亡表现,如生精细胞核膜皱缩、核染色质浓缩、核破裂等,且B组凋亡情况较A组轻,C、D对照组睾丸生精细胞形态结构较为完整。血浆睾酮水平检测实验组(A、B)均低于C、D对照组( $P<0.01$ ),但A、B组间差异无统计学意义。睾丸间质液睾酮水平检测实验A组低于其余3组( $P<0.01$ ),而其余3组间差异无统计学意义。**结论** UU感染大鼠睾丸组织可出现多种病理损伤进而引起分泌功能改变,进一步证实UU感染与男性不育的关系,但上述改变均可自行恢复。

**【关键词】** 解脲脲原体 感染 生精细胞 凋亡 睾酮

**Influence of Ureaplasma Urealyticum Infection on Testicular Tissue Structure and Secretion Function in Rats** ZHANG Tao<sup>1</sup>, YANG Wen-xuan<sup>1</sup>, YU Feng-ling<sup>1</sup>, GUAN Jun-chang<sup>1△</sup>, ZHOU Lei<sup>2</sup>, GAN Huai-yong<sup>2</sup>, LIU Cong-sen<sup>1</sup>. 1. Department of Pathogen and Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

△ Corresponding author, E-mail: guanjc2013@126.com

**【Abstract】 Objective** To study the influences of ureaplasma urealyticum (UU) infection on testicular tissue structure and secretion function in rats. **Methods** Forty clean grade male SD rats were randomly divided into the experiment group A (at 7 d after surgery), experiment group B (at 14 d after surgery), control group C (at 7 d after surgery) and control group D (at 14 d after surgery). There were 10 rats in each group. The experimental groups were injected with 0.6 mL UU4 through bladder. In the same way, the control groups were injected with the same volume of UU liquid medium. At day 7 and 14 after injection, the structures of testis of all rats were observed by light microscopy and spermatogenic cells by transmission electron microscopy. The content of testosterone in plasma and testicular fluid were detected by chemiluminescence method. **Results** The changes of inflammatory pathology (including the layer and amount of spermatogenic cell decreasing, inflammatory cell infiltrating and mature sperms decreasing) in the testis of group A and group B were found by light microscopy, and the inflammatory changes in group B were lighter than those in group A. The structures of testicular tissue in group C and group D were normal. The apoptosis performances of germ cell (including the cell membrane corrugated, nuclear chromatin concentration and nuclear rupture) in the testis of group A and group B were found by transmission electron microscopy, and the changes in group B were lighter than those in group A. The structures of germ cell in group C and group D were normal. The levels of plasma testosterone in group A and group B were significantly lower than that in group C and group D ( $P<0.01$ ), the difference between group A and group B was not statistically significant. The testosterone level in testis interstitial fluid in group A was significantly lower than that in other groups ( $P<0.01$ ), the differences between other groups were not statistical significant. **Conclusion** The testicular tissue of UU infected rats can have various pathological damage and functional changes, further confirming that UU infection can cause male infertility. The pathological damage and functional changes of the testicular tissue of rats after UU infection can be gradually restored with the extension of the duration of the disease.

**【Key words】** Ureaplasma urealyticum Infection Sperm cell Apoptosis Testosterone

\* 国家自然科学基金(No. 81571454)和安徽省高校省级优秀青年人才基金资助项目(No. 2012SQRL093) 资助

△ 通信作者, E-mail: guanjc2013@126.com

解脲脲原体(*ureaplasma urealyticum*, UU)可导致男性泌尿生殖道多种疾病,如非淋菌性尿道炎、急性附睾炎、前列腺炎及不育等,许多研究已经证实 UU 感染可使男性不育患者的精液参数和精子数量及质量多方面出现异常,其与男性不育的关系十分密切<sup>[1-6]</sup>。睾丸作为男性生殖系统最重要的器官,其组织结构和分泌功能的正常在维持男性生育力方面起着决定性的作用<sup>[7]</sup>,UU 感染是否会对男性睾丸组织产生不利影响的研究报道尚不多见。本研究通过向大鼠膀胱注射 UU,逆行感染睾丸,构建 UU 感染动物模型,观察 UU 感染对大鼠睾丸组织结构和分泌功能的影响,从睾丸角度进一步分析 UU 感染与男性不育的关系,为探讨 UU 感染导致男性不育的机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及仪器

清洁级 SD 雄性大鼠(苏州大学动物实验中心);UU4 型菌株(南华大学微生物学教研室);UU 液体培养基(南京黎明生物公司);解脲脲原体核酸检测试剂盒(北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司);睾酮化学发光法测定盒(Siemens 公司);TGradient PCR 仪(Biometra 公司);全自动化学发光分析仪(Siemens immulite2000)等。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株培养** UU4 标准菌株溶于 UU 液体培养基,培养至变成桃红色,收集菌株连续传代 2~3 次。待性能稳定时,采用颜色改变单位(colorchangeunit,CCU)测定法进行菌株计数,调整菌株浓度为  $10^7$  CCU/mL 待用。

**1.2.2 动物造模及造模成功标准** 参考文献<sup>[8]</sup>,将 40 只清洁级 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,实验组 A、B(7 d 组、14 d 组),对照组 C、D(7 d 组、14 d 组)。实验组膀胱注射 0.6 mL UU4 型菌株( $10^7$  CCU/mL),对照组膀胱注射等体积的 UU 液体培养基。注射后按实验组和对照组设定时间提取各组大鼠睾丸组织 DNA,PCR 定性检测 UU 特异性核酸(脲酶基因)以确认造模成功。上海生工合成引物,序列(上游 5'-CACCCTTAAATCCTAAGGTTCC-3',下游 5'-CTGATGACATAATTGAGATTGCAC-3'),扩增片段长度为 121 bp,琼脂糖凝胶电泳,GIS 凝胶成像系统摄片。

**1.2.3 睾丸结构观察** 分别于膀胱注射后 7 d、14 d 取各组大鼠睾丸组织分别送蚌埠医学院第一附

属医院病理科和安徽省立医院病理科,经固定、包埋、切片、染色等处理,光学显微镜观察各组睾丸组织结构,透射电镜观察生殖细胞超微结构。

**1.2.4 睾酮测定** 分别于膀胱注射后 7 d、14 d 留取各组大鼠血浆和睾丸间质液,睾丸间质液的分离和留取参照文献<sup>[9]</sup>,化学发光法检测样品的睾酮水平。

### 1.3 统计学方法

组间比较采用方差分析和  $q$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 造模确定

PCR 结果显示,实验组(A、B)均检出 UU 病原体尿酶基因特异性片段,而对照组(C、D)未发现阳性结果,见图 1。表明实验动物无自然感染发生,实验造模成功。

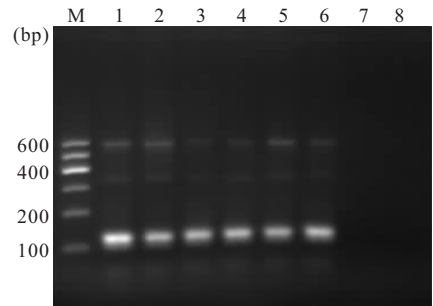


图 1 UU 感染大鼠睾丸组织中核酸检测

Fig 1 Detection of nucleic acid in the testicular tissue of rats infected with UU

M: Marker; 1-3: A group; 4-6: B group; 7: C group; 8: D group

### 2.2 睾丸组织光镜下结果

实验组(A、B)为炎症性病变,如生精细胞数量和层次减少,炎性细胞浸润,成熟精子数量稀少等,且 B 组损伤性病变较 A 组轻,C、D 对照组无明显炎症病变。见图 2。

### 2.3 生精细胞透射电镜下结果

实验组(A、B)为生精细胞凋亡表现,如生精细胞核膜皱缩、核染色质浓缩、核破裂等,且 B 组凋亡情况也较 A 组轻,C、D 对照组睾丸生精细胞形态结构较为完整。见图 3。

### 2.4 睾酮检测结果

血浆睾酮检测显示实验组(A、B)均低于对照组( $P < 0.01$ ),但 A、B 组间差异无统计学意义。睾丸间质液睾酮检测显示实验 A 组低于其余 3 组( $P <$

0.01), 而其余 3 组间差异无统计学意义。见附表。

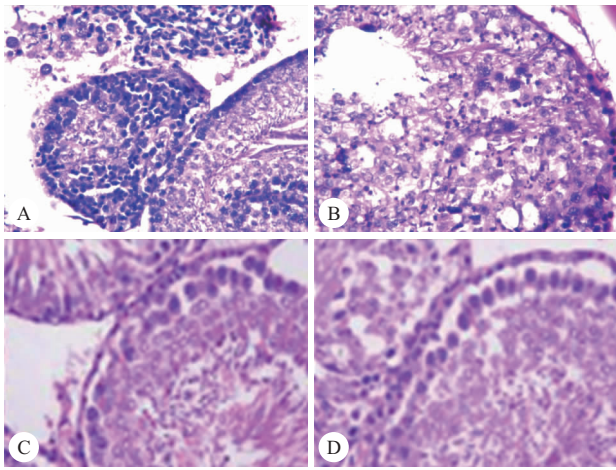


图 2 睾丸结构的 HE 染色。×400

Fig 2 HE staining of testicular tissue structure. ×400

A: A group; B: B group; C: C group; D: D group

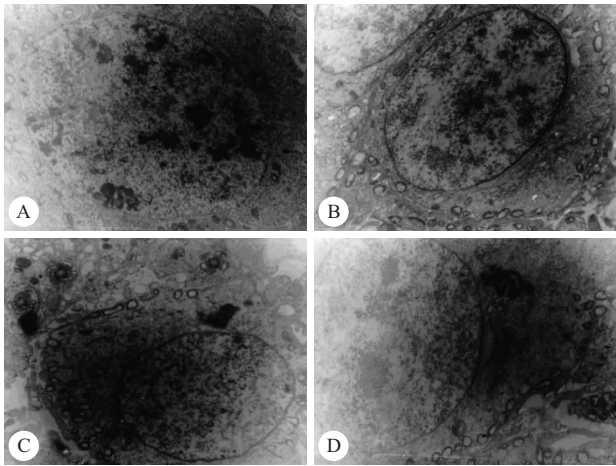


图 3 睾丸结构的透射电镜图片。×12 000

Fig 3 Spermatogenic cells under transmission electron microscopy. ×12 000

A: A group; B: B group; C: C group; D: D group

附表 各组睾酮水平变化比较

Table Comparison of testosterone levels in each group

Group	n	Testicular fluid/ (μg/mL)	Plasma/ (pg/mL)
A	10	56.31±23.36	45.75±16.47
B	10	150.27±46.78*	69.78±20.06
C	10	185.41±33.92*	473.36±216.15*·△
D	10	173.77±29.75*	466.82±209.34*·△
F		28.80	24.90
P		<0.01	<0.01

\* P<0.01, vs. A group; △P<0.01, vs. B group

性不育患者精液中的检出率高达 50%，明显高于正常生育者<sup>[10-11]</sup>，证实 UU 感染可能是男性不育的重要因素之一。UU 为原核细胞型微生物，是一种介于细菌和病毒之间的微小生物，常寄居于男性泌尿生殖道引起多种疾病，引发患者的精液参数异常和精子数量及质量下降，导致男性不育<sup>[12-15]</sup>。UU 感染与男性不育关系的研究目前已有报道，但其对睾丸组织结构和分泌功能影响的研究报道甚少。睾丸为男性最重要的性腺器官，其组织结构和分泌功能的正常是维持精液和精子数量及质量的基础，在维持男性生育力方面起着决定性的作用，UU 感染是否对睾丸组织结构和分泌功能产生不利影响，将有助于准确分析其与男性不育疾病的关系，为探讨 UU 感染导致男性不育的机制提供实验依据。

本研究显示 UU 感染后大鼠睾丸组织出现明显的炎症性病变，如睾丸组织萎缩甚至坏死、曲细精管萎缩、生精细胞数量及层次减少、炎细胞浸润、间质水肿、间质细胞数量减少、管腔中成熟精子细胞数量少见，此结果与相关研究报道一致<sup>[16]</sup>。研究发现睾丸组织的炎症性损伤可随病程延长呈现减轻趋势，如 B 组病理性变化较 A 组减轻，表现曲细精管肿胀减轻、间质水肿减弱、炎性渗出物减少，间质细胞及成熟精子增多，此结果国内报道尚不多见，可能与自身免疫调节有关，需进一步研究。UU 感染后大鼠生精细胞出现不同程度的细胞凋亡表现，如生精细胞胞核染色质浓缩、聚集化等，生精细胞的细胞凋亡也可随病程延长而呈现减轻趋势，如 B 组细胞凋亡较 A 组减轻，生精细胞的凋亡状况有所好转，此研究结果国内报道亦不多见，关于 UU 诱导生精细胞凋亡的确切机制目前尚不清楚，有待进一步研究。

睾酮由睾丸间质细胞合成和分泌，具有促进生精细胞的分化和精子成熟的功能，在维持正常生精过程中发挥重要的作用。睾酮浓度水平与男性不育患者精液参数有显著相关性<sup>[17]</sup>，测定其浓度有助于分析判断男性不育症的病情。本研究血睾酮浓度测定显示实验组血浆睾酮水平显著下降，如实验组 (A、B) 较对照组 (C、D) 均降低 (P<0.01)，此结果与有关报道相符<sup>[18-19]</sup>。UU 感染后大鼠血睾酮水平下降应与睾丸组织炎症性病变引发间质细胞合成和分泌睾酮功能下降有关，但具体机制有待进一步研究。血睾酮水平的降低可能对精子的生成产生负面影响，进而影响生育能力。进一步分析实验组间血睾酮水平的差异虽无统计学意义，但 B 组出现一定

### 3 讨论

引起男性不育的原因有很多，但 UU 菌株在男

程度地升高,说明随病程延长血浆睾酮水平有恢复的趋势,这与同时段睾丸组织炎症性损伤结果减轻相对应。UU 感染后大鼠血睾酮水平随着病程延长逐渐回升的状况目前报道甚少,提示 UU 感染后大鼠血浆睾酮水平与睾丸组织的炎症反应有一定相关性,推测大鼠睾丸组织损伤后恢复程度影响到其分泌功能的强弱。睾丸间质液睾酮测定显示实验 A 组低于其余各组( $P < 0.01$ ),而其余组间差异无统计学意义,此结果目前报道不多见。间质液睾酮测定进一步证实 UU 感染后睾丸组织的炎症损伤使间质细胞的数量减少,将直接影响到睾酮合成与分泌,从而表现出 A 组睾酮水平显著下降。实验 B 组间质液睾酮水平较 A 组升高,可能与睾丸组织炎症减轻、间质细胞代偿性增多、性腺激素与促性腺激素间存在负反馈调节的共同作用有关。睾酮的分泌受到下丘脑-垂体-性腺轴的调节,睾酮水平下降对促性腺激素分泌负反馈作用减弱,促性腺激素分泌增加,刺激间质细胞上调睾酮分泌水平,引发睾酮水平回升。本研究发现 B 组间质液睾酮水平已恢复正常,而血浆睾酮水平仍然处于较低水平,两者浓度水平存在差异<sup>[8]</sup>,此项结果报道尚不多见。分析原因可能是下丘脑和垂体是通过血液感知睾酮低水平,而调节睾酮水平的负反馈效应靶位在睾丸间质细胞,故最先影响间质液中睾酮水平,使局部睾酮水平能较快得以恢复,而血液中睾酮水平恢复相对滞后,从而表现出两者浓度水平的差异。

总之,UU 感染大鼠睾丸组织可出现多种病理性损伤:睾丸组织炎性病变;生殖细胞凋亡,继而引发睾酮分泌功能改变,睾丸间质液睾酮水平下降,血浆睾酮水平下降,进一步证实 UU 感染与男性不育的关系。UU 感染后大鼠睾丸组织的病理性损伤和功能性改变可随病程时间的延长有逐渐恢复的趋势。

### 参 考 文 献

- [1] SALMERI M, VALENTI D, VIGNERA SL, *et al.* Prevalence of ureaplasmaurealyticum and *Mycoplasma hominis* infection in unselected infertile men. *J Chemother*, 2012,24(2):81-86.
- [2] LEE JS, KIM KT, LEE HS, *et al.* Concordance of ureaplasmaurealyticum and *Mycoplasma hominis* in infertile couples: impact on semen parameters. *Infertility*, 2013,81(6): 1219-1224.
- [3] 李 赞, 杨 帆, 周俊彦, 等. 生殖道病原体感染对男性精液质量及精子形态学的影响. *中华实验和临床感染病杂志*, 2017,11(3):255-259.
- [4] 冯 玲, 乔 静, 周秀琴, 等. 男性不育患者解脲脲原体感染与精子质量的相关性. *国际检验医学杂志*, 2016,37(20): 2922-2923.
- [5] 王中兴, 刘 浩, 吴丽娟, 等. 男性不育症患者中常见病原体感染对精液参数的影响. *生殖医学杂志*, 2016,25(4):364-367.
- [6] 杨华君, 惠 亚, 施尚鹏, 等. 解脲脲原体和沙眼衣原体感染对男性不育影响的 Meta 分析. *中国男科学杂志*, 2015,29(5):36-42.
- [7] KLIESCH S. Testosterone and infertility. *Urologe A*, 2010, 49(1):32-36.
- [8] 杨文选, 余峰玲, 周 蕾, 等. 解脲脲原体感染对大鼠睾丸组织结构及睾酮水平的影响. *蚌埠医学院学报*, 2015,40(1):1-4.
- [9] SHARPE RM, COOPER I. Testicular interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. *J Reprod Fert*, 1983,69(1):125-135.
- [10] 洪艳华, 云国家. 鄂州地区 445 例男性解脲脲原体感染与精液质量检测分析. *中国优生与遗传杂志*, 2010,18(1):115-119.
- [11] 颜成裕, 李田妹. 在 312 例男性不育中解脲脲原体感染的影响. *中国民康医学*, 2010,22(13):1978-1679.
- [12] 刘 鹏, 孙建明, 练 锋, 等. 解脲脲原体感染男性不育症患者精液质量分析. *临床检验杂志*, 2015,33(4):277-278.
- [13] 徐 丽, 周运恒, 李 骞, 等. 男性不育患者解脲脲原体感染与精子质量和抗精子抗体的关系. *武警医学*, 2013,24(8): 686-692.
- [14] GUNYELI I, ABIKE F, DUNDER I, *et al.* Chlamydia, *Mycoplasma and ureaplasma* infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. *Arch Gynecol Obstet*, 2011,283(2):379-385.
- [15] HALA I, DAGHISTANI A, DAYEM MA. Clinical significance of asymptomatic urogenital *Mycoplasma hominis* and *ureaplasmaurealyticum* in relation to seminal fluid parameters among infertile Jordanian males. *Middle East Fertil Soc J*, 2010,15(1):29-34.
- [16] 刘安齐, 傅琳玲, 朱相贡, 等. 雄性 SD 大鼠各泌尿生殖器官感染解脲脲原体阳性率及病理改变的比较研究. *苏州大学学报(医学版)*, 2011,31(4):596-599.
- [17] 柳建明, 姜 辉, 洪 锴, 等. 男性不育患者精浆中游离睾酮、游离左旋肉碱水平与精液参数的相关性分析. *第二军医大学学报*, 2010,31(7):767-769.
- [18] 张明忠, 汪 琳. 男性生殖道解脲脲原体感染及血清睾酮水平对精液质量的影响. *数理医药学杂志*, 2014,27(6):656-657.
- [19] 刘 鹏, 孙建明. 感染解脲脲原体不育者血清性激素及精液参数的变化. *国际检验医学杂志*, 2017,38(13):1811-1813.

(2018-05-19 收稿, 2018-09-20 修回)

编辑 余 琳