

## · 论著 ·

# 西地那非对大鼠单侧睾丸扭转后对侧睾丸的影响及作用研究

吴臻斐 林孝坤 秦 乐 林进汉 李仲荣 陈肖鸣

**【摘要】 目的** 探讨大鼠单侧睾丸扭转后对侧睾丸的损伤以及西地那非(万艾可)的保护机理。**方法** 将 72 只健康雄性 SD 大鼠,随机分为假手术组、安慰剂组、西地那非组。3 组分别在假手术/左侧睾丸扭转复位术后 4 h、24 h、2 周时,各组各处死 8 只大鼠。分别观察右侧睾丸组织病理学变化、测定右侧睾丸组织中 MDA、NO/NOS 含量。**结果** 术后 4 h,各组间组织病理学变化、MDA、NOS 含量无明显差异,睾丸组织未见损伤,但 NO 在西地那非组较假手术组、安慰剂组明显增加( $P < 0.05$ )。术后 24 h,假手术组右侧睾丸组织损伤最小,西地那非组较严重,安慰剂组最为严重;与假手术组比,其余两组 MDA、NO/NOS 含量明显升高( $P < 0.05$ );西地那非组 NO/NOS 含量与安慰剂组相比明显下降( $P < 0.05$ );术后 2 周时,睾丸组织损伤有不同程度恢复,但仍以安慰剂组最为严重;与假手术组比,其余两组 MDA、NO/NOS 含量仍然升高( $P < 0.05$ );西地那非组 NO/NOS 含量与安慰剂组相比明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** 大鼠单侧睾丸扭转复位后,对侧睾丸组织术后 4 h 时,睾丸组织未见损伤。12 h 后睾丸组织明显损伤,并且持续至 2 周后。早期应用适量西地那非(万艾可)可促局部 NO 增加,扩血管作用加强,拮抗交感神经缩血管作用,进而保护对侧睾丸。

**【关键词】** 精索扭转;再灌注损伤;大鼠

**Effects of Sildenafil on rat's testicular function of the contralateral testicular after the unilateral Testicular Torsion/Detorsion.** WU Zhen-fei, LIN Xiao-kun, QIN Le, et al. Department of Pediatric Surgery, Yuying Children Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China

**【Abstract】 Objective** To study the injury of the contralateral testicular after unilateral testicular torsion in prepubertal rats, and the protective effects of Sildenafil against the injury of contralateral testicular spermatogenic function after unilateral testicular torsion. **Methods** 72 prepubertal Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups ( $n = 24$ ): sham-operation group, saline group and Sildenafil group. All the rats except sham-operation group underwent torsion/detorsion operation that rotated left testicle 720° clockwise and kept in torsion for 4 hours. All the rats except sham-operation group received corresponding drug orally before anesthesia. In all groups, The right (contralateral) testicle were removed from each groups ( $n = 8$ ) 4 hours, 24 hours and 2 weeks respectively after the operation for histopathological analysis as well as the test of malondialdehyde (MDA) and NO/NOS levels. **Results** 4 hours after the operation: the histopathological change of testes, MDA and NOS levels were not statistically different among three groups. However, the NO level has a obviously increase in Sildenafil group than other two groups ( $P < 0.05$ ). 24 hours after the operation: in the saline (placebo) group, histopathological change of testes were much worse than sham-operation group and Sildenafil group. However, compared with the sham-operation group, the test levels of MDA and NO/NOS were statistically higher in saline group and Sildenafil group ( $P < 0.05$ ). in those two groups, saline group has the higher levels than Sildenafil group ( $P < 0.05$ ). 24 hours after the operation: the histopathological analysis show there are most serious injury of contralateral testes of the saline group. Compared with the sham-operation group, the test levels of MDA and NO/NOS were statistically higher in saline group and Sildenafil group ( $P < 0.05$ ). in those two groups, saline group has the higher levels than Sildenafil group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** The contralateral testicular has no significant injury after unilateral testicular torsion/detorsion in prepubertal rats for 4 hours later. It turns injury at 24 hours after the torsion/detorsion operation, and sustained until 2 weeks later. Sildenafil has a protective effect on contralateral testicle after unilateral testicular torsion-detorsion injury, though the protective effect of Sildenafil seems to increase the NO level in focal organizations, dilate the blood vessel and antagonize the blood vessel constriction of sympathetic nerves.

**【Key words】** Spermatic Cord Torsion; Reperfusion Injury; Rats

睾丸扭转即精索扭转,指因睾丸引带先天或后天的各种异常状态,致睾丸在阴囊内以精索为轴出现异常旋转,使睾丸急性缺血<sup>[1]</sup>。临床上睾丸扭转超过 6 h 者坏死率高。但睾丸复位后对对侧睾丸的影响,目前尚有较多的争议。本研究通过青春前期 SD 大鼠制造睾丸扭转模型,探讨睾丸扭转复位后对对侧睾丸是否存在损伤及损伤的可能机制,同时应用西地那非观察睾丸复位后对对侧睾丸是否有保护作用。

## 材料和方法

### 一、动物分组

30 日龄健康雄性 SD 大鼠 72 只,随机分成假手术组、生理盐水(安慰剂)组、西地那非组,每组 24 只。

### 二、模型建立

睾丸扭转模型按照 Turner 法<sup>[2]</sup>制备,术前大鼠均以戊巴比妥行腹腔麻醉(50 mg/kg),下腹部脱毛,常规消毒铺巾,做左下腹小切口,显露左侧睾丸并切断睾丸引带,分离筋膜至附睾头。①假手术组将左侧睾丸游离后缝于阴囊壁固定。4 h 后还纳睾丸,缝合切口后。②安慰剂组左侧睾丸顺时针扭转 720°,维持 4 h 后松解复位固定于阴囊内。在麻醉前采用灌胃法即时按 1.25 mg/kg 灌入生理盐水。③西地那非组手术方式同安慰剂组。麻醉前采用灌胃法即时按 1.25 mg/kg 灌入西地那非(万艾可)溶剂(将万艾可 1.0 溶解于注射用水)。

### 三、标本处理

各组大鼠分别于假手术后、扭转复位手术后 4 h、24 h、2 周用快速脱颈法处死 8 只,采集右侧(未扭转侧)睾丸标本,剥净附着筋膜和脂肪组织,用冷生理盐水洗净后滤纸拭干。将所有睾丸标本沿中轴切开分为两部分,一部分睾丸用分析天平称取重量,加入 9 倍冷生理盐水,眼科剪将组织剪碎并转入组织匀浆器内,制成 10% 组织匀浆,将上述匀浆按 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液置于 EP 管中,保存于 -80 °C 冰箱中待检;另一部分睾丸迅速置于

Bouin 氏固定液中待制作石蜡切片常规 HE 染色。

### 四、睾丸组织病理学检查

①平均曲细精管直径(MSTD):光镜下恒定倍数,应用朗珈图像采集系统随机摄取标本,图片输入计算机,应用朗珈图像分析系统进行自动处理。每张标本切片测量 10 个最圆曲细精管的直径,取平均值。②生精上皮细胞计数:每张切片在 400 倍光镜下观察 10 个最圆曲细精管半径内的生殖细胞层数,每个睾丸数 3 张切片,取平均值。③睾丸活检评分:400 倍光镜下观察 10 个最圆曲细精管内生殖细胞发育状况,采用 Cosentino 评分法<sup>[3]</sup>评价睾丸的生精功能。

### 五、生化指标检测

按试剂盒要求制备组织匀浆;以硝酸还原酶法测定 NO 含量,化学比色法测定丙二醛(MDA)含量与 NOS 活性。

### 六、统计学分析

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS17.0 统计软件进行分析,多组比较用单因素方差分析,组间两两比较方差齐性用 LSD 检验,方差不齐性用 Dunnett's  $t_3$  检验。

## 结果

### 一、睾丸组织病理学比较

术后 4 h,各组在生精上皮层数、平均曲细精管直径、睾丸组织结构评分上均无显著性差异;术后 24 h,安慰剂组与西地那非组在精上皮层数、平均曲细精管直径、睾丸组织结构评分方面与假手术组相比都有显著性差异( $P < 0.05$ );而与安慰剂组相比,西地那非组术后 24 h 平均曲细精管直径(MSTD)和组织结构评分有显著性差异( $P < 0.05$ ,表 3)。术后 2 周时,与假手术组相比,安慰剂组和西地那非组在生精上皮层数、平均曲细精管直径(MSTD)、睾丸组织结构评分上有显著性差异( $P < 0.05$ );与安慰剂组相比,西地那非组在生精上皮层数、平均曲细精管直径(MSTD)、睾丸组织结构评分上有显著性差异( $P < 0.05$ ,表 1~3)。

表 1 术后 4 h 时不同组别睾丸组织病理学比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	生精上皮层数	MSTD( $\mu\text{m}$ )	结构评分
假手术组	3.55 $\pm$ 0.63	292.24 $\pm$ 19.53	1.21 $\pm$ 0.21
安慰剂组	3.32 $\pm$ 0.53	268.23 $\pm$ 24.65	1.31 $\pm$ 0.13
西地那非组	3.45 $\pm$ 0.46	271.46 $\pm$ 20.42	1.29 $\pm$ 0.17
F 值	2.82	3.17	2.41

注: 各组相比,  $P$  值均  $> 0.05$ 表 2 术后 24 h 时不同组别睾丸组织病理学比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	生精上皮层数	MSTD( $\mu\text{m}$ )	结构评分
假手术组	3.75 $\pm$ 0.43	189.36 $\pm$ 21.53	1.38 $\pm$ 0.49
安慰剂组	1.88 $\pm$ 0.36 *	134.12 $\pm$ 18.64 *	3.68 $\pm$ 0.93 *
西地那非组	2.45 $\pm$ 0.41 **	160.54 $\pm$ 13.74 **	2.47 $\pm$ 0.74 **
F 值	14.93	10.67	29.82

注: 与假手术组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与安慰剂组相比, #  $P < 0.05$ 表 3 术后 2 周时不同组别睾丸组织病理学比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	生精上皮层数	MSTD( $\mu\text{m}$ )	结构评分
假手术组	4.75 $\pm$ 0.56	275.45 $\pm$ 17.75	1.23 $\pm$ 0.42
安慰剂组	2.33 $\pm$ 0.41 *	204.65 $\pm$ 23.45 *	3.23 $\pm$ 0.64 *
西地那非组	3.23 $\pm$ 0.46 **	242.84 $\pm$ 15.65 **	2.23 $\pm$ 0.54 **
F 值	19.26	23.34	33.58

注: 与假手术组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与安慰剂组相比, #  $P < 0.05$ 

假手术组术后 4 h、24 h 和 2 周时, 生精上皮分别为 3 层、3 层和 5 层, 均紧贴精细小管生长, 排列紧密有序。安慰剂组 24 h 和 2 周时, 精细小管结构不连续, 损伤明显, 管腔内有大量渗出。生精上皮层排列紊乱, 仅基层层较明显, 其余生精上皮层或缺

失, 或脱落, 且见毛玻璃样改变, 病理评分均为 4 分。西地那非组术后 24 h 部分精细小管结构变形, 生精上皮层排列紊乱, 生精细胞脱落, 病理评分为 3 分; 术后 2 周时精细小管结构较完整, 生殖细胞排列相对紧密, 病理评分为 2 分。

## 二、丙二醛(MDA)含量比较

术后 4 h 时, 各组无显著性差异。术后 24 h 和术后 2 周时, 与假手术组相比, 其余两组 MDA 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ); 术后 24 h 和术后 2 周时, MDA 含量仍为高水平, 安慰剂组与西地那非组之间无显著性差异, 见表 4。

表 4 不同组别丙二醛(MDA)含量比较( $\text{nmol/g}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	术后 4 h	术后 24 h	术后 2 周
假手术组	122.47 $\pm$ 15.37	133.76 $\pm$ 16.3	1115.43 $\pm$ 14.58
安慰剂组	136.95 $\pm$ 16.65	267.38 $\pm$ 28.53 *	240.28 $\pm$ 15.67 *
西地那非组	130.32 $\pm$ 15.78	236.29 $\pm$ 17.71 *	231.31 $\pm$ 17.70 *
F 值	3.37	37.89	20.76

注: 与假手术组比, \*  $P < 0.05$ 

## 三、NO/NOS 含量比较

术后 4 h 时, 西地那非组较假手术组和安慰剂组, NO 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ), NOS 各组无显著性差异。术后 24 h 时, 与假手术组相比, 其余两组 NO/NOS 含量明显升高 ( $P < 0.05$ ); 西地那非组的 NO/NOS 含量与安慰剂组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 术后 2 周含量仍为高水平, 西地那非组与安慰剂组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。

表 5 术后 4 h、24 h、2 周不同组别 NO/NOS 含量比较( $\mu\text{mol/g}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	术后 4 h	术后 24 h	术后 2 周
假手术组	32.15 $\pm$ 8.32/5.32 $\pm$ 1.12	37.34 $\pm$ 9.74/6.32 $\pm$ 1.34	33.15 $\pm$ 9.33/5.74 $\pm$ 1.28
安慰剂组	38.54 $\pm$ 7.67/6.13 $\pm$ 2.28	188.62 $\pm$ 23.53 */14.41 $\pm$ 2.43 *	172.32 $\pm$ 8.75 */13.22 $\pm$ 2.35 *
西地那非组	66.42 $\pm$ 6.75 **/6.43 $\pm$ 1.53	111.42 $\pm$ 17.87 **/9.65 $\pm$ 1.74 **	118.78 $\pm$ 7.37 **/8.65 $\pm$ 1.43 **
F 值	27.63/3.04	36.82/17.39	39.74/30.21

注: 与假手术组比, \*  $P < 0.05$ ; 与安慰剂组比, #  $P < 0.05$ 

## 讨 论

单侧睾丸扭转(UTT)复位后其未扭转侧睾丸出现损害的报道见于上世纪 70 年代末; 少数学者认为未扭转侧睾丸不会受到损害, 但绝大多数实验证实对侧睾丸存在损害; 早期研究主要考虑可以导致迟发性损害的自身免疫性交感性睾丸炎, 自 Tuner 1993 年成功研制稳定的大鼠睾丸扭转模型后, 研究

方向开始转移到短期损害机制(即在数小时至数星期内发生的损伤)上; 当前认为, UTT 复位后致对侧睾丸受损的短期机制包括交感神经相关与缺血再灌注损伤相关等二大类机制<sup>[4-7]</sup>。

与交感神经反射相关因素为: 两侧睾丸营养血管的舒缩由交感神经控制, 部分学者认为损伤侧大量释放的自由基及组织坏死产物可以刺激同侧交感神经, 引起血管收缩, 并进一步通过交感神经反射弧作用到对侧, 导致对侧睾丸营养血管收缩, 引起继发

性缺血再灌注损伤。

缺血再灌注损伤包括自由基学说、凋亡学说、NO 学说<sup>[8-10]</sup>。自由基学说:睾丸扭转复位后因缺血-再灌注损伤引起大量自由基释放,细胞内钙超载,能量衰竭,白细胞激活等导致扭转侧睾丸受损。部分学者认为此类生成的自由基可能通过局部血液循环作用于对侧睾丸组织(如精索动脉交通支),引起损害。作为细胞膜脂质受氧自由基攻击后的产物,其浓度高低可间接反映氧自由基攻击睾丸组织(即脂质过氧化反应)的强度。本研究应用对侧睾丸组织的 MDA 浓度测定与对照组相比,发现睾丸扭转复位后 4 h,MDA 还处于低水平,24 h 达高水平,2 周时仍持续高水平,可以推测睾丸扭转复位后因缺血-再灌注损伤产生自由基,24 h 后对侧睾丸损伤明显,持续至 2 周后。凋亡学说:缺血-再灌注过程中大量氧化物释放,可能造成血睾屏障损害,而血睾屏障损伤可引发凋亡激活因子(如 Caspase8、Caspase9 等)释放,致对侧睾丸细胞凋亡增加,造成损伤。NO 学说:作为内源性抗血管收缩因子,NO 在调节睾丸血流的过程中起重要作用。NO 作为当前公认的人体内存在最广泛的小分子扩血管剂,早期在对侧睾丸即可增加,其药理作用与 UTT 复位后对侧睾丸神经缩血管机制相拮抗。当缺血-再灌注时,损伤侧 NO 大量生成,一方面与氧自由基结合形成更具毒性的亚硝基,另一方面通过过度扩张血管、促炎症介质聚集、促细胞凋亡作用对两侧组织造成更大伤害。

有学者<sup>[6]</sup>以 200 mg/kg 的 L-arg 给睾丸扭转的 SD 大鼠股静脉推注,同时另取一组睾丸扭转的 SD 大鼠予静脉注射 L-NMMA,得出 NO 在 UTT 复位后对侧睾丸的损伤中主要起加重损害作用,应用 NOS 抑制剂可以减轻损害;Dokucu<sup>[8]</sup>以 3 mg/kg 的极低剂量 L-arg 予睾丸扭转后的大鼠股静脉微泵推注,与对照组(即单纯扭转组)比较后得出 NO 对睾丸组织有保护作用的结论。生理状态下的 NO 在男性生殖系统中呈保护、促进作用;病理状态下 NO 浓度升高时则起损害作用。我们推测单侧睾丸扭转复位后不久,即 <4 h 时,对侧睾丸中的 NO 可能尚处于不足以拮抗神经缩血管作用的生理浓度,此时若将浓度适量增加,则可以拮抗神经缩血管作用,进而避免组织损害→NOS 激活→NO 升高→组织损害的恶性循环。

组织器官内的 NO 浓度增加可激活 GC(鸟苷酸环化酶),进而使 cGMP 浓度上升,通过一系列化学

信号转导,最终使血管扩张(NO/cGMP 信号转导系统)。cGMP 在体内广泛分布于海绵体平滑肌、血小板、血管、内脏平滑肌以及骨骼肌内,可为 5 型磷酸二酯酶(PDE5)所分解,而使 NO/cGMP 信号转导系统失去效用。万艾可则通过选择性抑制 PDE5 生成来维持并增强 NO 的作用。

本研究对对侧睾丸组织的 NO 含量测定发现,早期给予适量西地那非,可使组织 NO 含量升高,拮抗神经缩血管作用,避免组织损害→NOS 激活→NO 升高→组织损害的恶性循环,保护对侧睾丸,UTT 复位后对侧睾丸损伤超早期交感神经缩血管反射作用较缺血-再灌注自由基损伤强,中晚期可能产生协同作用。

## 参考文献

- 1 曾令奇,甘为东,陈金章. 泌尿外科诊疗决策[M]. 第 1 版,上海:第二军医大学出版社,2001,24-26.
- 2 林涛,李旭良. 单侧睾丸扭转后对另侧睾丸影响的研究进展[J]. 临床小儿外科杂志,2003,2(6):442-443.
- 3 Turner TT, Brown KJ. Spermatogenic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow[J]. Biol Reprod, 1993,49:401-407.
- 4 Savas C, Ozgul C, I Karaoz E, et al. Ischemia, whether from ligation or torsion, causes ultrastructural changes on the contralateral testis[J]. Scand J Urol Nephrol, 2002, 36(4):302-306.
- 5 Paredes Esteban RM, Ramirez Chamond R, Carracedo Anon J, et al. Experimental testicular torsion: its effect on contralateral testicle[J]. Cir Pediatr, 1999, 12(4):152-154.
- 6 Cerasaro TS, Nachtsheim DA, Otero F, et al. The effect of testicular torsion on contralateral testis and the production of antisperm antibodies in rabbits[J]. J Urol, 1984, 132(3):577-579.
- 7 Otcu S, Durakogugil M, Orer HS, et al. Contralateral Genitofemoral sympathetic nerve discharge increases following ipsilateral testicular torsion[J]. Urol Res, 2002, 30(5):324-328.
- 8 Kehinde EO. The significance of measuring the time course of serum Malondialdehyde concentration in patients with torsion of the testis[J]. J Urol, 2003, 169(06):2177-2180.
- 9 Hadziselimovic F. Increased apoptosis in the contralateral testis in patients with testicular torsion[J]. Lancet, 1997, 350:118.
- 10 Hayri Ozokutan. The Role of Nitric Oxide in Testicular Ischemia-Reperfusion Injury[J]. Journal of Pediatric Surgery, 2000, 35(1):101-103.