مجله علمی پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکی زنجـــان
دوره 13، شمـاره 53، زمستان 1384، صفحـات 1 تا 7

تأثیر عصاره‌ی الکلی گیاه گلرنگ *(Carthamus tinctorius)* بر محور هورمونی هیپوفیز ـ گناد و بافت شناسی بیضه در موش‌های کوچک آزمایشگاهی

دکتر مهرداد مدرسی*

نویسنده‌ی مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مبارکه mehrdad_modaresi@hotmail.com

دریافت : 84/11/6 پذیرش: 85/2/11

چکیده

زمینه و هدف: *گیاه گلرنگ (Carthamus tinctorius) از دیرباز توسط افراد شناخته شده و از آن به عنـوان داروی مـسهل، مـسکن، معـرق، ضدالتهاب، تحلیل برنده‌ی تومور و قاعده‌آور استفاده می‌شود. شواهد نشان‌گر آن است که این گیاه به عنـوان عامـل محـرک جنـسی و افـزایش دهنده‌ی قدرت جنسی نیز استفاده می‌شود و برای درمان ناتوانی جنسی بسیار مفید است. بنابراین تحقیق حاضر به منظور تعیین تـاثیر عـصاره‌ی این گیاه بر محور هورمونی هیپوفیز ـ گناد و تغییرات بافت بیضه طی سال 1382 تا 1383 در مبارکه اصفهان انجام گرفت.*

روش بررسی: *در این تحقیق تجربی چهار گروه موش که هر یک شامل هشت موش نر بالغ بودند به ترتیب به عنوان گروه کنترل و گـروه‌هـای تیمار 1، 2 و 3 مورد بررسی قرار گرفتند. عصاره‌ی گیاه گلرنگ در سه غلظت متفاوت 0/7، 1/4 و 2/8 میلی‌گرم در روز به صورت داخل صفاقی در یک دوره‌ی بیست روزه به موش‌های گروه تیمار 1، 2 و 3 تزریق شد. هر یک از گروه‌های تیمار با گروه کنترل از نظر پارامترهایی نظیر وزن بیضه، تغییرات بافت‌شناسی بیضه، تعداد اسپرم و غلظت هورمون‌های LH, FSH و تستوسترون موجود در سرم خون با استفاده از آزمـون‌هـای آماری توکی و آنالیز واریانس مقایسه گردیدند.*

یافته‌ها: *نتایج تحقیق نشان داد که گیاه گلرنگ می‌تواند عامل تغییردهنده‌ی پتانسیل تولید مثل جنس نر باشد و فعالیت‌های تولیـد مثلـی را تغییـر دهد و نیز بر عملکرد اندوکرین بیضه‌ها مؤثر واقع شود، به طوری که تزریق عصاره‌ی گلرنگ در دو دوز 1/4 و 2/8 میلی‌گـرم در روز بـه طـور معنی‌داری سبب افزایش غلظت تستوسترون موجود در سرم گردیده (P= 0/01) و موجب خود کنترل فیزیکی منفی ترشح تستوسترون شد. در نتیجه‌ی تزریق عصاره‌ی این گیاه تغییرات بافتی، تغییر در تعداد اسپرم و وزن بیضه‌ها چشمگیر نبود.*

نتیجه‌گیری: *گیاه گلرنگ قادر است با ایجاد تغییر در محور هورمونی هیپوفیز ـ گناد در فعالیت‌های تولید مثلی مؤثر واقع شود. انجـام تحقیقـات بیشتر توصیه می‌گردد.*

واژگان کلیدی: عصاره‌ی گیاه گلرنگ ، محور هیپوفیز ـ گناد، قدرت باروری

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها از دیربـاز در جوامع بشری معمول بوده و تا حدود نیم قرن پیش گیاهان یکی از مهم‌ترین منابع تأمین دارو برای درمان دردها به شـمار می‌رفتند. لزوم بررسـی اصـولی و واقـع بینانـه‌ی طـب سـنتی وگیاهان دارویی از مدت‌ها قبل در جوامـع علمـی کـشورمان احساس گردیده و در سال‌هـای اخیـر بـه ضـرورت بررسـی اثرات گیاهان دارویی توجه بسیاری شده است. نتیجـه‌ی ایـن

* دکترای زیست شناسی تکوینی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مبارکه

تحقیقات نشان داده که بسیاری از این گیاهان (از جمله گلرنگ) اثرات قابل توجهی در درمان بعضی از این بیماری‌ها دارند.

گلرنگ گیاهی است یکساله یا دو ساله ، دارای ساقه‌ای به ارتفاع 30 تا60 سانتی‌متر که به صورت بوته‌ای استوار رشد می‌کند. گل‌های این گیاه دوجنسی و لوله‌ای هستند و کاپیتول بزرگی را در بالای ساقه تشکیل می‌دهند. این گل‌ها اوایل به رنگ نارنجی هستند و پس از مدتی به رنگ قرمز در می‌آیند. گیاه گلرنگ بومی مشرق زمین است و امروزه در اغلب کشورها کاشته می‌شود. از نظر ترکیبات شیمیایی در گلچه‌های گلرنگ دو ماده‌ی رنگی سافران زرد و سافران قرمز وجود دارد (3ـ1).

گلرنگ از جمله داروهای گیاهی است که بسیاری از مطالعات بالینی و آزمایشگاهی بر استفاده از آن برای رفع مشکلات قاعدگی و بیماری‌های قلبی عروقی تکیه دارند. هم‌چنین گل‌های این گیاه از دیرباز به عنوان داروی محرک جنسی استفاده می‌شده است (۴،۲) و شواهدی مبنی بر کاربرد آن در درمان ناتوانی جنسی و نازایی وجود دارد (۶،۵). این شواهد لزوم بررسی علمی این گیاه و آثار درمانی آن را مطرح می‌سازد. از این رو مطالعه‌ی حاضر به منظور تعیین اثر عصاره‌ی گیاه گلرنگ بر محور هورمونی هیپوفیز ـ گناد و تغییرات بافتی بیضه موش‌های آزمایشگاهی نر طی سال 1382 تا 1383 در مبارکه اصفهان انجام شد.

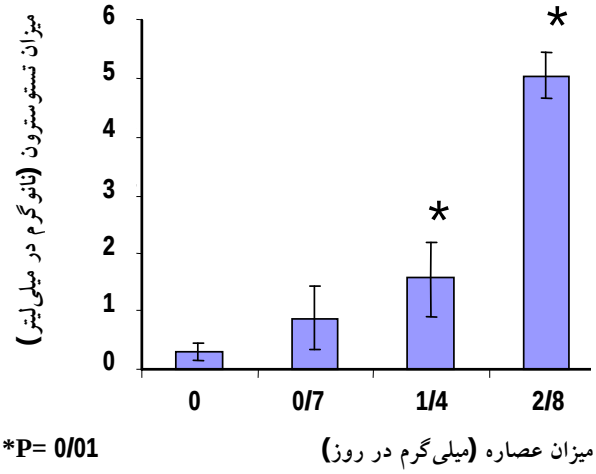
روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های کوچک آزمایشگاهی به عنوان مدل استفاده گردید. تعداد 32 موش نر کوچک آزمایشگاهی در محدوده‌ی وزنی 35 تا 40 گرم انتخاب و در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی با دمای 25 تا 30 درجه‌ی سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگه‌داری شدند. موش‌ها به 4 دسته تحت عنوان گروه کنترل و گروه‌های تیمار1، 2 و3 تقسیم شدند. جهت تهیه‌ی عصاره‌ی الکلی گیاه گلرنگ، پودر خشک گل‌های گلرنگ در اتانل 96 درصد به مدت 24 ساعت نگه‌داری و سپس به مدت 3 دقیقه کاملا مخلوط و صاف گردیدند. حجم نهایی مایع صاف شده به 100 میلی‌لیتر رسانده شد و به صورت درون صفاقی و در یک دوره‌ی 20 روزه به موش‌های گروه تیمار 1، 2 و3 به ترتیب به میزان 0/7، 1/4 و 2/8 میلی‌گرم در روز تزریق شد. به منظور دستیابی به غلظت پایه‌ی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون سرم خون و نیز بافت طبیعی بیضه، در گروه کنترل مداخله‌ای انجام نشد. پس از این مدت از قلب حیوان برای اندازه گیری هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون به میزان 3 میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد و پس از جدا نمودن سرم، هورمون‌ها با تکنیک ایمونواسی (روش ELISA) و با استفاده از کیت‌های تشخیص هورمونی (کارخانه Biomerio ـ آمریکا) اندازه‌گیری شدند.

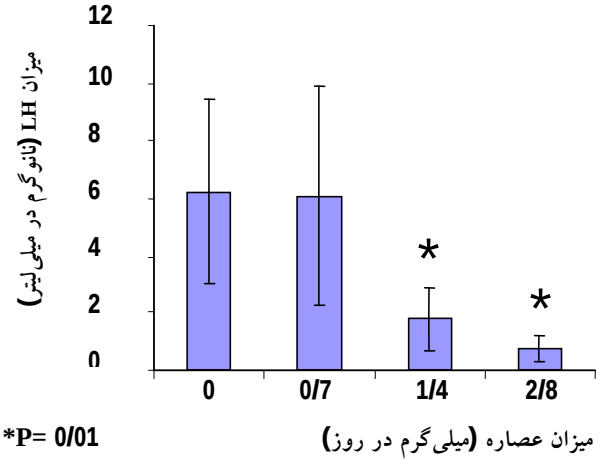
به منظور بررسی بافت شناسی، بیضه ها با برشی مناسب خارج و وزن گردیدند. مقاطع بافتی بیضه و مجرای اپی‌دیدیم نیز به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین تهیه شد. پس از تهیه‌ی سوسپانسیون اپی‌دیدیمی، شمارش اسپرم با لام هموسیتومتر انجام شد و جهت محاسبات آماری از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده گردید و مقادیر P< 0/05 معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از سنجش های بیوشیمیایی نشان داد که میزان تستوسترون در گروه تیمار 2 نسبت به گروه کنترل 1/25 و در مقایسه با تیمار یک 0/675 نانوگرم در میلی‌لیتر افزایش داشته که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (P= 0/01)، هم‌چنین میزان این هورمون در گروه تیمار 3 نسبت به گروه کنترل، تیمار یک و تیمار2 به ترتیب 4/73، 4/16 و 3/48 نانوگرم در میلی‌لیتر افزایش داشته که این تفاوت‌ها



نمودار1 : مقایسه‌ی میانگین تستوسترون سرم در گروه‌های آزمایش و کنترل، مبارکه 1382_83

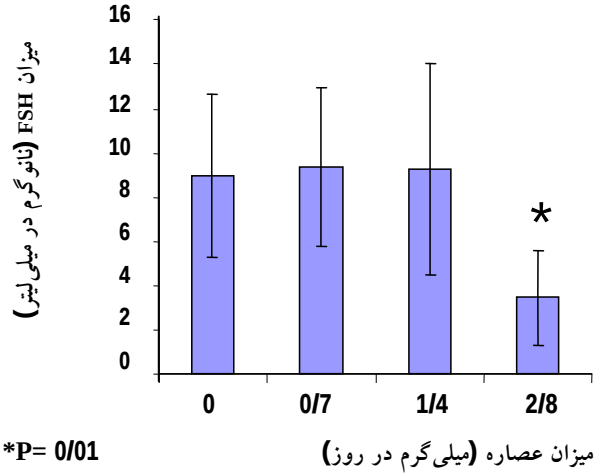


نمودار2 : مقایسه‌ی میانگین LH سرم در گروه‌های آزمایش و کنترل، مبارکه 1382_83

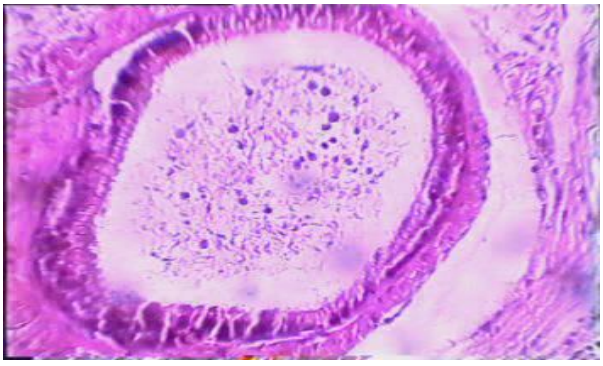
نیز از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P= 0/01)، اما افزایش میزان تستوسترون در گروه تیمار یک نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (نمودار 1). نتایج نشان داد که میزان LH سرم در گروه تیمار 2 نسبت به گروه کنترل 4/46 و در مقایسه با تیمار یک، 4/28 میلی واحد بین المللی در میلی‌لیتر (mIu/ml) کاهش داشته که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (P= 0/01). میزان LH در گروه تیمار 3 نسبت به گروه کنترل و تیمار یک به ترتیب 5/48 و 5/31 mIu/ml کاهش معنی‌داری نشان داد (P=0/001). به علاوه کاهش میزان این هورمون در گروه تیمار یک نسبت به گروه کنترل و در گروه تیمار 3 در مقایسه با تیمار 2 معنی‌دار نبود (نمودار 2).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری هورمون FSH نیز حاکی از آن است که میزان این هورمون در گروه تیمار3 نسبت به گروه کنترل، تیمار یک و تیمار 2 به ترتیب 5/56، 5/88 و 5/8 میلی‌واحد بر میلی لیتر کاهش یافته که از نظر آماری معنی‌دار بود (P= 0/01). تغییرات این هورمون در گروه تیمار یک و2 نسبت به گروه کنترل و در گروه تیمار 2 در مقایسه با تیمار 3 معنی‌دار نبود (نمودار 3).

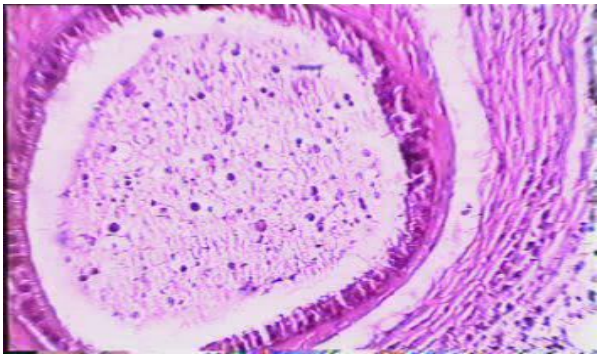
از سوی دیگر نتایج بافت شناسی بیان‌گر آن است که تزریق غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گلرنگ سبب افزایش معنی‌داری در وزن بیضه و تعداد اسپرم نمی‌گردد. هم‌چنین در نتیجه‌ی تزریق عصاره‌ی این گیاه تغییرات بافتی نیز چشمگیر نمی‌باشد. تصاویر (1) و (2) بیان‌گر عدم تغییر مشخص در تعداد اسپرم اپی‌دیدیمی است.



نمودار 3 : مقایسه‌ی میانگین FSH سرم در گروه‌های آزمایش و کنترل، مبارکه 1382_83



شکل 1: فتومیکروگراف برش عرضی لوله های اپی‌دیدیم در گروه کنترل (با بزرگ‌نمایی 410×)



شکل 2: فتومیکروگراف برش عرضی لوله‌های اپی‌دیدیم در گروه تیمار 3 (با بزرگ‌نمایی 410×)

بحث

نتایج مطالعه نشان داد که گیاه گلرنگ قادر است با ایجاد تغییر در محور هورمونی هیپوفیز ـ گناد در فعالیت‌های تولید مثلی مؤثر واقع شود. در رابطه با تأثیر تزریق عصاره‌ی گیاه گلرنگ بر عوامل یادشده گزارشی در دسترس محقق قرار نگرفت، اما اثرات عصاره‌ی گلرنگ برجنین و جوشانده‌ی آن بر رحم و کیسه‌ی منی کما بیش مطالعه شده است. گزارشات حاکی از آن است که دانه‌های گلرنگ غنی از فیتواسترول می‌باشند. این ترکیبات آنالوگ‌های ساختاری کلسترول بوده و مانع عمل استرول‌ها (تستوسترون ـ استروژن ـ پروژسترون) می‌شوند و به این ترتیب از بروز بسیاری از سرطان‌ها (سرطان سینه و پروستات) جلوگیری می‌کنند (۸،۷). نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق عصاره‌ی گلرنگ در دو دوز 1/4 و 2/8 میلی‌گرم روزانه می‌تواند سبب افزایش غلظت تستوسترون موجود در سرم گردد .به نظر می‌رسد که علت افزایش سطوح تستوسترون در غلظت‌های بالاتر عصاره‌ی گلرنگ اثر مستقیم آن بر سلول‌های لیدیگ و دخالت در روند بیوسنتز هورمون تستوسترون باشد و احتمالاً این عمل را از طریق تحریک سنتز پروستاگلاندین‌های سری 2 انجام می‌دهد. به دلیل این که گلبرگ‌های گیاه گلرنگ دارای اسیدهای چرب گامالینولنیک اسید (ALA)، آلفالینولنیک اسید (GLA) می‌باشند (9) می‌تواند به دی هموگامالینولنیک اسید (Dihomogamma Linolenic Acid [DGLA]) و سپس به آراشیدونیک اسید (AA) تبدیل شود که خود پیش ساخت انواع 2 پروستاگلاندین‌ها مانند PGE2 است (10). به نظر می‌رسد که AA نقش مهمی را در استروئیدوژنز بیضه ایفا نماید، به طوری که تحقیقات (1993) نشان می‌دهد که AA و متابولیت آن (PGE2)، تولید آدنیلات سیکلاز حلقوی (CAMP) را افزایش می‌دهند و باعث افزایش سرعت شکسته‌شدن زنجیره‌ی جانبی کلسترول و تحریک تولید تستوسترون می‌شود. بنابراین ترکیبات مذکور تولید تستوسترون را از طریق اعمال پیام‌رسانی میانجی‌گری می‌کنند. مطالعات بر روی نوعی ماهی نشان می‌دهد که پروستاگلاندین‌های سری E (PGE) همگی تولید تستوسترون را در بیضه تحریک می‌کنند و قدرت PGE2 بیشتر از PGE1 و PGE3 می‌باشد (11). به علاوه نتایج تحقیق سال 1995 نشان داد که PGE2 سنتز اندروژن را در سمندر (Triturus Carnifex) از طریق آدنیلات سیکلاز و فسفولیپاز C تنظیم می‌کند. به طوری که PGE2 در ابتدای فصل تولید مثل (ژانویه) سنتز اندروژن بیضه را افزایش و برعکس در انتهای فصل تولید مثل (مارس) سنتز اندروژن را

کاهش می‌دهد (12). از سوی دیگر نتایج برخی از مطالعات (2001) نشان داده که AA و متابولیت آن (PGE2)، رشد غده‌ی پروستات را تحریک می‌کنند، چرا که غده‌ی پروستات یکی از اندام‌هایی است که بیش از همه تحت تأثیر تستوسترون قرار می‌گیرد. در ضمن ALA، به عنوان اسید چرب دیگر گیاه گلرنگ، می‌تواند به ایکوسانوئیدهای مختلف تبدیل شود. ایکوسانوئیدها در تولید استروئید دخالت دارند، به طوری که مصرف ناکافی ALA و در نتیجه تولید غیرطبیعی ایکوسانوئیدها منجر به نازایی می‌شود (۱۴،۱۳).

از سوی دیگر احتمال دارد افزایش میزان تستوسترون به دلیل وجود عنصر روی در گلبرگ‌های گیاه گلرنگ باشد، چرا که این عنصر برای تولید مثل ضروری است و کمبود آن باعث ضعف پروستات و نازایی در مرد و زن می‌شود. در یک تحقیق 37 بیمار که علت نازایی آن‌ها ناشناخته بود و برای مدت بیشتر از 5 سال نازا بودند، 25 میلی‌گرم عنصر روی را به مدت 45 تا 50 روز دریافت کردند و نتیجه، افزایش مشخص در سطوح تستوسترون همراه با 9 مورد باروری بود (۱۵،۱۴). هم‌چنین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تزریق عصاره‌ی گلرنگ در غلظت‌های بالاتر سبب کاهش میزان LH وFSH می‌شود. به نظر می‌رسد که علت کاهش سطوح این هورمون‌ها کنترل فیدبکی منفی ترشح تستوسترون باشد. بیشترین قسمت این مهار از محرکه‌ی اثر مستقیم تستوسترون بر روی هیپوتالاموس و کاهش دادن هورمون محرکه‌ی گنادوتروپین (GnRH) ناشی می‌شود. این موضوع موجب کاهش تعادلی در ترشح LH و FSH توسط هیپوفیز قدامی می‌شود و کاهش ترشح LH ترشح تستوسترون توسط بیضه را کاهش می‌دهد. تستوسترون به طور مستقیم یک اثر فیدبکی منفی ضعیف بر غده‌ی هیپوفیز قدامی دارد که این فیدبک هیپوفیزی به طور اختصاصی ترشح LH را کاهش می‌دهد (16). بر اساس نتایج تحقیق تزریق عصاره‌ی این گیاه تاثیر معنی‌داری بر تغییرات بافتی و تغییر در وزن بیضه‌ها نداشت که احتمال دارد علت آن، کوتاه بودن دوره‌ی آزمایش و کم بودن دوز تزریقی باشد. ممکن است تزریق دراز مدت عصاره‌ی گلرنگ و افزایش میزان عصاره‌ی تزریق شده سبب القاء تغییرات بافتی محسوس و افزایش معنی‌دار در وزن بیضه گردد. در پژوهش حاضر نتایج شمارش اسپرم نشان داد که تزریق عصاره‌ی گیاه گلرنگ باعث افزایش معنی‌دار در تعداد اسپرم نمی‌گردد، ولی تزریق غلظت‌های بالاتر عصاره‌ی گیاه گلرنگ سبب افزایش میزان تستوسترون سرم می‌شود.به نظر می‌رسد که علت عدم تغییر در تعداد اسپرم همراه نبودن افزایش تستوسترون با افزایش میزان هورمون FSH باشد. چرا که FSH به سلول‌های سرتولی متصل شده و ساخته شدن پروتئین مخصوص اتصال اندروژن (ABP) را سبب می‌شود. ABP یک گلیکوپروتئین است که تستوسترون به آن متصل می‌شود. ABP در فضای لوله‌های سمینیفر ترشح می‌شود و در جریان این فرآیند با تستوسترونی که به وسیله سلول‌های لیدیگ ساخته شده است با غلظت خیلی زیاد به مکان ساخت اسپرماتوزوئید حمل می‌شود. انجام این مرحله بسیار با اهمیت است و به کاربردن تستوسترون به تحریک اسپرماتوژنز کمکی نمی‌کند (17).

هرچند وجود تستوسترون برای اسپرماتوژنز ضروری می‌باشد، اما تاکنون نقش مشخص هورمون مذکور در این پدیده روشن نشده است. ممکن است تستوسترون در آخرین مراحل اسپرماتوژنز موثر باشد، (چون در بیضه‌ی نابالغ تستوسترون قادر نیست اسپرماتوژنز را آغاز نماید)، هم‌چنین در حیواناتی که هیپوفیز آن‌ها قطع شده است به دلیل نقش اساسی هیپوفیز و هومون‌های آن، تولید اسپرم صورت نمی‌گیردو فرآیند اسپرماتوژنز سیر قهقرایی پیدا می‌کند و تستوسترون نیز قادر به اصلاح آن نیست (17). به طوری که نتایج تحقیقات (1999) نشان داده‌اند که در پرندگان تغذیه‌ی این اسیدهای چرب بر روی ترکیب فسفولیپید غشاء اسپرم و توان باروری تاثیر دارد (18). از سوی دیگر ممکن است عصاره‌ی

گلرنگ بر دوران عمر اسپرماتوزوئید و تعداد اسپرماتوزوئید زنده مؤثر باشد. چنان‌چه در نتیجه‌ی برخی تحقیقات (1990) جوشانده‌ی گیاه گلرنگ را به طور موفقیت آمیزی برای معالجه‌ی نازایی مردان و بیماری فزونی اسپرم مرده به کار برده‌اند (۱۹،۲۰).

نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که اثر عصاره‌ی گلرنگ بر پارامترهای اسپرم از طریق مکانیسم‌هایی غیر از افزایش تعداد اسپرم صورت می‌گیرد که خود احتیاج به بررسی بیشتر دارد. احتمال دارد عصاره‌ی گلرنگ سبب تغییر در شکل، قابلیت تحرک اسپرماتوزوئید و قدرت باروری گردد و به نظر می‌رسد که اسیدهای چرب پلی انوئیک موجود در گلبرگ‌های گیاه گلرنگ (مانند ALA) بر ترکیب فسفولیپیدی غشاء اسپرم و توان باروری اثر داشته باشد. انجام تحقیقات بیشتر توصیه می‌گردد.

منابع

1ـ زرگری علی. ***گیاهان داروئی.*** جلدسوم. تهران: دانشگاه تهران، 1352، صفحات 563 تا 565 .

2ـ میرحیدر حسین. ***کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها با ارائه آخرین تحقیقات علمی محققان و دانشمندان جهان.*** جلد دوم. تهران: انتشارات دفتر نشر فرهنگ اسلامی، 1375، صفحات 406 تا 410 .

3- Weiss EA. ***Castor, Sesame and Safflower.*** New york: Barnes and Noble Inc; 1971, 529-744.

4- Li D, Hans-Henning M, Carthamus TL. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. ***International plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy Plants.*** 1996; 23 (6): 83.

5- Weiss EA. ***Oilseed Crops.*** London: Longman Group limited, Longman House; 1983, 216-81.

6- Zhou W. Tian Ying's prescription was used for treatment on sterility of 77 cases***. Traditional Chinese Medicine.*** 1986; 27 (12): 31-2.

7- Awad AB, Fink CS. Phytosterols as anti cancer dietary component. ***J Nutr.*** 2000; 130: 2127-30.

8- Ling WH, Jones PJH. Dietary phytosterols. ***Life Sci.*** 1995; 57 (3): 195-206.

9- Li Y, Che Q. Studies on chemical components of carthamus tinctorius petals. ***Yao Xue xueBao.*** 1998; 33 (8): 626-8.

10- Armes C. Hormones, Diet, and your metabolism; 9-11. [Cited 2002]. Avaiable from: ***www. doctorphyto. com/ Products . 2004.***

11- Wade MG, Van der Kraak G. Arachidonic acid and PGE2 stimulate testosteron prodution. ***Gen Comp Endocrinol.*** 1993; 90 (1): 109-18.

12- Gobbetti A, Zerani M. Androgen Synthesis modulation by PGE2. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 1995; 211 (3): 1047-52.

13- Eritsland J. Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. ***Am J Clin Nutr.*** 2000; 71: 197s-201s.

14- George M, Helmkamp JR. Eicosanoids and inflammation. [Cited 2000]. Available from: ***http: // www. Kumc. edu/medicine/biochemistry.***

15- Byrnes S. Solutions to male Sexual problems. (Cited 2004). Available from: ***http:// www. Kumc. Edu/medicine/.***

16ـ شادان فرخ. ***در ترجمه‌ی فیزیولوژی پزشکی گایتون،*** جلد دوم. تهران: انتشارات چهر 1387، صفحه‌ی 1506 .

17ـ بلاغی مصباح‌الدین، فیروز رأی محسن، کوچکی شلمانی اسماعیل. ***مروری بربیوشیمی (هارپر)،*** جلد دوم. تهران: انتشارات بخش فرهنگی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی، 1360، صفحات 481 تا 494 .

18- Abayasekara DR, Wathes DC. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. ***Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid.*** 1999; 61 (5): 275-87.

19- Qin Y. The Clinical treatment of male Sterility. ***Jiangxi Traditional Chinese Medicine.*** 1990; 21 (3): 21-2.

20- Qu C. Clinical Observation on dead Sperm exess disease of 182 cases. ***Shanghai Traditional Chinese.*** 1990; 5: 28-9.