

淫羊藿苷通过调钙质改善运动性疲劳模型小鼠 精子发生的作用及机制

唐琨洋^{1,2}, 萧闵^{2,3}, 江晓翠^{2,3}, 陶晓雪^{1,2}, 邹悦^{1,2}, 赵纯纯^{1,2}, 方志鹏^{1,2*}

(1. 湖北中医药大学 体育健康学院, 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 武汉 430065;

3. 湖北中医药大学 实验动物中心, 武汉 430065)

[摘要] 目的:研究淫羊藿苷对运动性疲劳影响小鼠精子发生过程的作用并探讨有关的机制。方法:将ICR雄性小鼠进行游泳筛选并随机分为正常组,模型组,维生素C组,淫羊藿苷低、中、高剂量组,淫羊藿苷中剂量+N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)组,每组10只。除正常组外各组通过负重游泳训练建立运动性疲劳模型。负重训练前2周不进行灌胃处理,第3~4周淫羊藿苷低、中、高剂量组分别给予0.03、0.06、0.12 g·kg⁻¹淫羊藿苷灌胃,维生素C组给予0.2 g·kg⁻¹维生素C灌胃,L-NAME组给予0.06 g·kg⁻¹淫羊藿苷灌胃和0.01 g·kg⁻¹ L-NAMA腹腔注射,正常组和模型组灌服等量的生理盐水。实验结束后,记录各组小鼠体质量、末次力竭游泳时间;试剂盒检测各组小鼠血清尿素氮(BUN)、乳酸(LA)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、睾酮(T)、睾酮Ca²⁺/Mg²⁺-ATP酶(微量法)、睾丸环磷酸鸟苷(cGMP)水平和流式细胞术检测精子CD46水平,苏木素-伊红(HE)染色法观察睾丸生精小管并进行睾丸生精功能评分(TMS)评分;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸调钙质(RGN, SMP30)、环磷酸鸟苷依赖性蛋白激酶1(PKG)、环磷酸鸟苷依赖性蛋白激酶锚定蛋白(GKAP1)的蛋白表达;免疫荧光法(IF)检测睾丸Regucalcin的表达;显微镜下观察小鼠附睾精子质量;免疫组化(IHC)观察睾丸生精小管视黄酸刺激8(STRA8)、突触复合体蛋白3(SCP3)、过渡蛋白1(TNP1)荧光染色切片。结果:与正常组比较,模型组小鼠体质量下降、游泳力竭时间显著降低($P<0.01$),疲劳标志物LA、LDH、BUN和脂质过氧化产物MDA水平显著升高($P<0.01$),睾丸组织RGN、PKG、GKAP1、睾酮、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP酶、cGMP水平显著下降($P<0.01$),精子活力降低、精子数量减少、TMS评分下降,STRA8、SCP3、TNP1表达减少;与模型组比较,淫羊藿苷高剂量组游泳力竭时间显著增加($P<0.01$),LA、LDH、BUN、MDA水平显著下降($P<0.01$),SOD水平显著升高($P<0.01$),睾丸组织RGN、PKG、GKAP1、睾酮、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP酶、cGMP水平显著升高($P<0.01$),精子活力升高、精子数量增加、TMS评分上升,STRA8、SCP3、TNP1表达增多;与L-NAME组比较,淫羊藿苷中剂量组睾丸组织STRA8、SCP3、TNP1表达显著增加($P<0.01$),cGMP、GKAP1水平显著升高($P<0.01$)。结论:运动性疲劳使得小鼠RGN和cGMP/PKG/GKAP1信号通路蛋白表达减少,并经由这一途径导致小鼠精子发生出现异常,影响生殖功能;淫羊藿苷通过促进RGN和cGMP/PKG/GKAP1信号通路蛋白表达进而改善运动性疲劳小鼠精子发生障碍,缓解运动性疲劳对生殖系统的损伤。

[关键词] 运动性疲劳; 精子发生; 淫羊藿苷; 调钙质

[中图分类号] R277;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0117-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251744

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250911.1106.002>

[网络出版日期] 2025-09-11 12:12:08

[增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Effect and Mechanism of Icariin on Improving Spermatogenesis in Exercise-induced Fatigue Model Mice Through Regucalcin

TANG Kunyang^{1,2}, XIAO Min^{2,3}, JIANG Xiaocui^{2,3}, TAO Xiaoxue^{1,2}, ZOU Yue^{1,2},

ZHAO Chunchun^{1,2}, FANG Zhipeng^{1,2*}

(1. College of Physical Education and Health, Hubei University of Chinese Medicine,

[收稿日期] 2025-06-13

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2025AFD577);湖北省普通高等学校人文社会科学重点研究基地“体医融合·民族传统体育传承与创新基地”项目(鄂教科函[2024]4号);湖北省科学技术厅科技项目(2022BCE055)

[第一作者] 唐琨洋,在读硕士,从事运动性疲劳与男性生殖研究,E-mail:812468926@qq.com

[通信作者] *方志鹏,教授,硕士生导师,从事运动与中医药方向研究,E-mail:44352409@qq.com

Wuhan 430065, China; 2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China;
3. Laboratory Animal Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] Objective: This paper aims to investigate the effects of icariin on spermatogenesis in mice with exercise-induced fatigue and explore the underlying mechanisms. **Methods:** ICR male mice were screened by swimming and randomly divided into normal group, model group, vitamin C group, icariin groups with low, medium, and high doses, and medium-dose icariin+N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) group, with 10 mice per group. Except for the normal group, all the other groups underwent weighted swimming training to establish an exercise-induced fatigue model. No gavage was administered during the first two weeks of the weighted training. From week three to four, the icariin groups with low, medium, and high doses received 0.03, 0.06, and 0.12 g·kg⁻¹ icariin via gavage, respectively. The vitamin C group received 0.2 g·kg⁻¹ vitamin C. The L-NAME group received 0.06 g·kg⁻¹ icariin and 0.01 g·kg⁻¹ L-NAME via intraperitoneal injection. The normal and model groups received equivalent physiological saline. After the experiment, body weight and the last exhaustive swimming time were recorded. Blood urea nitrogen (BUN), lactate (LA), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), testicular testosterone (T), testicular Ca²⁺/Mg²⁺-adenosine triphosphatase (ATPase) (micro-assay), and the levels of testicular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were measured by using kits. Sperm CD46 levels were detected by flow cytometry. Testicular seminiferous tubules were observed via hematoxylin-eosin (HE) staining, and the testicular morphometric score (TMS) was used to evaluate the spermatogenic function. Protein expression of regucalcin (RGN, SMP30), cGMP-dependent protein kinase 1 (PKG), and cGMP-dependent protein kinase anchoring protein (GKAP1) was detected by Western blot. Testicular regucalcin expression was examined by immunofluorescence (IF). The epididymal sperm quality of mice was observed under a microscope. Fluorescence-stained sections of stimulated by retinoic acid gene 8 (STRA8), synaptonemal complex protein 3 (SCP3), and transition protein 1(TNP1) in testicular seminiferous tubules were assessed by immunohistochemistry (IHC). **Results:** Compared with the normal group, the model group showed decreased body weight and exhaustive swimming time ($P<0.01$), significantly increased fatigue markers (LA, LDH, and BUN) and lipid peroxidation product MDA ($P<0.01$), reduced testicular RGN, PKG, GKAP1, testosterone, Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase, and cGMP levels ($P<0.01$), decreased sperm motility, sperm count, and TMS scores, and downregulated the expression of STRA8, SCP3, and TNP1. Compared with the model group, the icariin group with high dose exhibited increased exhaustive swimming time ($P<0.01$), reduced LA, LDH, BUN, and MDA levels ($P<0.01$), elevated superoxide dismutase (SOD) ($P<0.01$), upregulated testicular RGN, PKG, GKAP1, testosterone, Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase, and cGMP levels ($P<0.01$), improved sperm motility, sperm count, and TMS scores, and enhanced STRA8, SCP3, and TNP1 expression. Compared with the L-NAME group, the icariin group with medium dose showed increased expression of STRA8, SCP3, and TNP1 in the testicular tissue ($P<0.01$) and elevated cGMP and GKAP1 levels ($P<0.01$). **Conclusion:** Exercise-induced fatigue reduces the expression of RGN and cGMP/PKG/GKAP1 in mice, thereby causing abnormal spermatogenesis and impairing reproductive function in mice. Icariin ameliorates spermatogenic dysfunction in exercise-induced fatigue mice by promoting the expression of RGN and cGMP/PKG/GKAP1, thereby mitigating the damage of exercise-induced fatigue to the reproductive system.

[Keywords] exercise-induced fatigue; spermatogenesis; icariin; regucalcin

随着健康观念不断普及,越来越多的人通过运动来维持与促进自身健康。但不科学、异常的、过量的运动可能会导致运动性疲劳(EIF)症状。EIF是指由运动引起身体工作能力下降的现象,短暂的EIF通常是一种正常的生理机制^[1],但长期处于EIF会对机体的健康状态造成影响,甚至诱发器质性疾病^[2]。目前认为高强度运动对男性生殖系统最大的影响源自下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)和下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴),通过睾酮等激素干预HPA和HPG轴及睾丸细胞进而直接影响男性生殖系统^[3],但具体的途径与机制还不够全面。

调钙质(RGN, SMP30),是一种钙结合蛋白,在钙离子稳态中起重要作用,在男性生殖系统中表现突出^[4],其受到类固醇性激素的调控,在睾丸中睾酮会促进RGN的表达。有研究表明环磷酸鸟苷依赖

性蛋白激酶1(PKG)和环磷酸鸟苷依赖性蛋白激酶锚定蛋白42 kDa(GKAP1)在调节生殖细胞和精子数量方面具有重要作用^[5-6],受到环磷酸鸟苷(cGMP)的调控,而睾丸细胞中的cGMP又易受到钙离子水平影响^[7]。另一方面,EIF会导致睾酮浓度降低^[8],并且EIF也会对睾丸钙离子水平造成不良影响^[9]。至此,拟认为EIF可以通过调控睾酮影响RGN,并经过cGMP/PKG/GKAP1影响精子发生和顶体反应。

淫羊藿是一种极具药用价值的中药^[10],在生殖系统领域有显著应用。本团队前期实验证明淫羊藿的提取物之一——淫羊藿多糖具有缓解EIF的作用^[11]。淫羊藿苷也是淫羊藿的主要提取物之一,有研究表明淫羊藿苷会促进睾酮的生成^[12],同时也可以通过抑制磷酸二酯酶5型(PDE5)提高可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)活性来增加cGMP的活性^[13-14],进

而可能从上游和下游2个角度分别干预RGN和cGMP/PKG/GKAP1的表达,以改善EIF影响下的精子发生。

本实验以存在RGN和cGMP/PKG/GKAP1影响途径为基本论点,通过负重游泳训练建立小鼠EIF模型,观察负重游泳训练对小鼠精子发生、精子活力和RGN、cGMP、PKG、GKAP1水平的影响,并进一步阐释淫羊藿苷改善EIF小鼠精子发生的机制,为防治EIF对男性生殖系统的损伤提供新的角度和依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性ICR小鼠70只,7周龄,体质量29~31 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产合格证号SCXK(湘)2019-0004,合格证编号No.430727241101582234。所有动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心,室温(22±2) °C,相对湿度50%~70%,每笼5只。

1.2 伦理 本实验通过湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准编号HUCMS88730183。

1.3 药物与试剂 淫羊藿苷、维生素C、*N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯(*L*-NAME)(上海源叶生物科技有限公司,货号分别为B21576、B21293、S20013);乳酸脱氢酶(LDH)、尿素氮(BUN)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为BC0685、BC1535、BC0025、BC5165);乳酸(LA)、睾酮(T)、cGMP检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号分别为MM-0766M2、MM-0569M2、MM-0021M2);RGN抗体、PKG抗体、GKAP1抗体、膜辅助因子蛋白(CD46)抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的免疫球蛋白G(IgG)山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫球蛋白(IgG)山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为17947-1-AP、21646-1-AP、11395-1-AP、12494-1-AP、SA00003-2、SA00001-2);苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1076)。

1.4 仪器 JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);BI0cut型病理切片仪(上海徠卡仪器有限公司);KZ-III-F型高速低温组织研磨仪、SCG-W2000型化学发光成像仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);CR21G型冷冻高速离心机(日本日立公司);DYCZ-40型电转仪、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一仪器厂);Multiskan FC型酶标仪(上海赛默飞世尔科技有限公司);E100型显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 先将7周龄ICR雄性小鼠适应性喂养7 d,进行游泳筛选,将通过筛选可以适应游泳训练的70只小鼠以数字随机分组法分为淫羊藿苷低、中、高剂量组,淫羊藿苷中剂量+*L*-NAME组(简称*L*-NAME组),正常组,模型组,维生素C组,每组10只。除正常组外各组小鼠每天进行负重游泳训练,持续4周。在进行负重游泳训练的第3周和第4周期间,淫羊藿苷低、中、高剂量组每天分别给予0.02、0.06、0.12 g·kg⁻¹淫羊藿苷灌胃^[15],维生素C组则给予0.2 g·kg⁻¹维生素C灌胃^[11,16],*L*-NAME组给予淫羊藿苷0.06 g·kg⁻¹灌胃和0.01 g·kg⁻¹ *L*-NAME(一种NOS抑制剂,可以通过减少NO进而降低sGC活性)腹腔注射^[17-18],正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。以上淫羊藿苷用药剂量根据《中药药理研究方法学》及参考文献^[15],按人与小鼠体表面积等效换算,得到小鼠等效剂量0.06 g·kg⁻¹,低、中、高剂量按照0.5:1:2设置,维生素C和*L*-NAME用药剂量则参照临床常用量或相关参考文献^[11,16-18]。

2.2 动物训练模型 除正常组外的其他组均进行负重游泳训练^[19]。根据课题组前期的EIF造模方法^[11],训练用泳槽水深50 cm,水温(31±2) °C。训练时将小鼠置于水面后,使用玻璃棒于小鼠旁轻幅度搅动,从而引导小鼠进行游泳运动。训练4周,第1周不负重,第2周负重2%体质量,第3周负重4%体质量,第4周负重5%体质量,每次力竭时结束训练。力竭标准:小鼠下沉后3 s不露出水面。在4周负重游泳训练结束后进行一次无负重游泳,每次均记录小鼠力竭时的游泳时间。当小鼠生长速率和力竭游泳时间相比正常组显著降低,血清LA、LDH、BUN水平相比正常组显著上升时,证明造模成功^[11,20]。

2.3 样本的取材和指标的检测 小鼠最后一次无负重力竭游泳后捞出擦干,麻醉后取血,血样静置1 h后于4 °C以3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm,下同),取血清。取小鼠肝脏、肾脏、左侧腓肠肌、两侧睾丸,左侧睾丸放入睾丸固定液中。取右侧附睾,挑破后放入37 °C的磷酸盐缓冲液(PBS)并送至37 °C水浴箱孵育,准备检测。血清、右侧睾丸置-80 °C冰箱保存^[21]。按照试剂盒说明书检测血清中LA、LDH、BUN、MDA、SOD水平和睾丸睾酮与Ca²⁺/Mg²⁺-ATP酶水平。

2.4 精子活力的分析

2.4.1 显微镜下观察精子状态 取出附睾后,将附

辜底部挑破使精子流出,并放置于预热好的37℃ PBS中,并在37℃水浴锅孵育1h,至完全液化,取得精子悬液。之后使用200目筛分离精子与组织碎片,再进行精子质量的检测^[22]。精子密度:取精子悬液10μL滴于血细胞计数板上,在光学显微镜下观察进行精子计数;精子活力:取精子悬液10μL,在光学显微镜下观察200个精子,计数运动中的精子,计算小鼠精子活力(精子活力=运动精子数/200×100%);精子存活率:在精子悬液中加入伊红染液5μL并吹吸混匀,取精子悬液10μL在光学显微镜下观察。死亡精子的头部出现深染色,活精子不着色或头部着浅色,计数500个精子,并记录其中活精子数(精子存活率=活精子数/500×100%)。

2.4.2 流式细胞术检测CD46表达 取处理好的精子悬液,使用200目筛分离精子与组织碎片,常温

1 200 r·min⁻¹离心5 min,弃上清并加入预热的37℃ PBS至1 mL,每1 mL悬液加入CD46抗体10 μL并于37℃孵育10 min,阴性对照不做处理。孵育结束后于4℃以1 200 r·min⁻¹离心5 min,弃上清后于4℃ PBS洗涤。每1 mL悬液加入FITC二抗10 μL,于4℃孵育10 min,阴性对照做相同处理。第2次孵育结束后再次于4℃以1 200 r·min⁻¹离心5 min,弃上清后用4℃ PBS洗涤,置4℃短暂保存后,于流式细胞仪上样检测。

2.5 HE染色观察小鼠睾丸生精小管 取固定后的睾丸组织,经脱水、透明、透蜡等处理后进行包埋,切取5 μm厚度切片^[22],进行HE染色,中性树脂封片后用显微镜观察并拍照,每个样品随机抽取10个曲细精管断面进行睾丸生精功能评分(TMS),总分为20分^[23-24],见表1。

表1 睾丸生精功能评分

Table 1 Total score of testicular spermatogenic function

| 项目 | 0分 | 1分 | 2分 | 3分 | 4分 | 5分 |
|---------------|--------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|
| 曲细精管内径(D, μm) | D<25 | 25≤D<50 | 50≤D<75 | 75≤D<100 | 100≤D<130 | 130≤D<160 |
| 管周膜厚度(M, μm) | M>13 | 10≤M<13 | 7≤M<10 | 5≤M<7 | 3≤M<5 | M<3 |
| 管壁生殖细胞层数(P,层) | 0 | 0<P≤1 | 1<P≤2 | 2<P≤3 | 3<P≤4 | P>4 |
| 生殖细胞成熟程度(S) | 仅有支持细胞 | 精原细胞 | 初级精母细胞 | 阻滞在次级精母细胞 | 阻滞在精子细胞阶段 | 成熟精子 |

2.6 免疫组化检测睾丸组织视黄酸刺激8 (STRA8)、突触复合体蛋白3(SCP3)、过渡蛋白1(TNP1)蛋白表达 取固定后的睾丸组织,经脱水、透明、透蜡等处理后进行包埋,按照免疫组化检测试剂盒操作说明进行操作。一抗STRA8、SCP3、TNP1(1:1 000)孵育过夜;HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:4 000)孵育50 min,光学显微镜下采集图片,计数阳性细胞个数并进行分析^[25]。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸RGN、PKG、GKAP1的表达 取睾丸组织20 mg,加入RIPA、PMSF蛋白酶抑制剂,研磨匀浆静置后以4℃条件下11 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,提取细胞核蛋白及组织全蛋白。蛋白定量法(BCA)测定蛋白浓度,再100℃10 min煮沸,制胶,上样,电泳跑胶,转膜,5%脱脂奶粉室温摇床封闭1.5 h, TBST洗涤3次,加入相应一抗工作液(RGN, 1:3 000; PKG, 1:5 000; GKAP1, 1:1 000),于4℃冰箱孵育过夜,回收一抗并用TBST洗涤3次,加HRP二抗(1:10 000),摇床孵育1 h,再用TBST洗涤3次,加入显影液后曝光。使用Image J图像处理软件分析结果。

2.8 免疫荧光分析睾丸组织中RGN荧光强度 取

固定好的睾丸组织石蜡切片,先烘烤石蜡切片,用二甲苯和梯度乙醇脱蜡,后进行水化和抗原回收。加入15%牛血清白蛋白(BSA)和0.5% Triton X-100溶液,切片在37℃孵育1 h,再加入RGN抗体,1:50在4℃下孵育。用PBS冲洗后,滴加二抗(1:1 000)并在37℃孵育30 min。PBS冲洗后,用染料标记细胞,在PBS冲洗后立即用荧光抗淬灭封片剂封片。使用荧光显微镜采集荧光图像,并使用Image J分析睾丸组织生精小管RGN的荧光强度,阳性结果用平均积分吸光度AA显示。

2.9 统计学方法 采用SPSS 22.0、Graph Prism 8.0软件进行分析和作图,用Image J软件进行图像分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有实验数据组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠一般情况、体质量及力竭游泳时间的影响 负重游泳训练开始后的第2周末,与正常组小鼠比较,非正常组小鼠毛发略显凌乱、活动度与体质量均显著下降($P<0.01$)。负重游泳训练的第4周末时,正常组小鼠毛发柔顺且活跃程度相比4周前

差异无统计学意义。与正常组比较,模型组小鼠毛发凌乱、体形消瘦且活跃程度显著降低,其余组情况好于模型组,但仍不及正常组小鼠。在负重游泳训练的第4周末,与正常组比较,模型组小鼠体质量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷各剂量组和维生素C组小鼠体质量明显升高($P<0.05$, $P<$

0.01);与正常组比较,模型组小鼠末次负重游泳力竭时间显著降低($P<0.01$);与模型组比较,维生素C组与淫羊藿苷中、高剂量组小鼠末次负重游泳力竭时间明显升高($P<0.01$)。从动物行为和体质量等宏观层面说明各组EIF模型造模成功,且淫羊藿苷可以改善EIF小鼠体质量、耐力和活跃程度。见表2。

表2 淫羊藿苷对小鼠末次游泳时间和体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of icaritin on last swimming time and body weight of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ $g\cdot kg^{-1}$ | 造模前/g | 造模2周/g | 干预2周/g | 末次游泳/min |
|----------|----------------------|------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 35.50±0.90 | 40.78±1.07 | 42.14±0.54 | 68.98±1.09 |
| 模型组 | | 35.86±1.21 | 38.64±2.12 | 38.24±1.58 ²⁾ | 45.53±0.99 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 36.12±0.68 | 38.83±1.26 | 40.05±1.27 ³⁾ | 59.13±4.05 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 35.81±1.57 | 38.22±1.33 | 38.34±1.34 ²⁾ | 49.00±3.82 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 36.04±2.21 | 38.55±1.60 | 38.54±1.91 ¹⁾ | 52.88±2.19 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 35.46±1.83 | 37.98±3.20 | 38.48±1.34 ²⁾ | 54.05±2.61 ⁴⁾ |
| L-NAME组 | 0.01 | 35.27±1.41 | 38.33±1.84 | 38.13±1.45 ²⁾ | 50.74±1.34 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与维生素C组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与淫羊藿苷中剂量组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$ (表3-表9同)

3.2 对小鼠LA、LDH、BUN水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清LA、LDH、BUN水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷高剂量组小鼠血清LA、LDH水平明显降低($P<0.05$)。从血清运动指标等微观层面说明各组运动性疲劳模型造模成功,且淫羊藿苷一定程度上缓解了EIF小鼠的疲劳程度。见表3。

表3 淫羊藿苷对小鼠运动指标的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of icaritin on exercise indicators of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/ $g\cdot kg^{-1}$ | LA/ $\mu g\cdot L^{-1}$ | BUN/ $mg\cdot L^{-1}$ | LDH/ $U\cdot mL^{-1}$ |
|----------|----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常组 | | 351.15±25.49 | 87.72±0.74 | 172.75±14.52 |
| 模型组 | | 480.58±26.35 ¹⁾ | 114.77±1.91 ²⁾ | 220.07±10.28 ¹⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 420.13±34.22 | 103.78±5.77 ²⁾ | 201.99±5.50 |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 465.77±51.53 | 112.29±3.98 | 194.30±13.51 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 423.85±51.82 | 103.38±2.57 | 192.39±10.21 |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 361.99±44.56 ³⁾ | 105.43±0.69 | 182.62±20.07 ³⁾ |
| L-NAME组 | 0.01 | 463.91±16.44 | 110.77±2.14 | 191.34±11.38 |

3.3 对小鼠血清中MDA、SOD水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠MDA水平明显升高($P<0.05$),SOD水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,维生素C组小鼠MDA水平明显降低($P<0.05$),维生素C组,淫羊藿苷中、高剂量组和L-NAME组小鼠SOD

水平显著升高($P<0.01$)。说明淫羊藿苷可以从抗氧化方面减轻EIF小鼠的疲劳程度。见表4。

表4 淫羊藿苷对血清MDA、SOD水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of icaritin on levels of MDA and SOD in serum ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ $g\cdot kg^{-1}$ | MDA/ $mmol\cdot L^{-1}$ | SOD/ $U\cdot mL^{-1}$ |
|----------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 1.62±0.20 | 21.30±2.29 |
| 模型组 | | 2.68±0.65 ¹⁾ | 14.00±0.82 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 1.69±0.30 ³⁾ | 18.24±0.54 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 2.38±0.09 | 15.74±0.39 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 2.08±0.15 | 17.73±0.15 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 2.07±0.18 | 19.16±0.59 ⁴⁾ |
| L-NAME组 | 0.01 | 2.49±0.46 | 17.42±0.15 ⁴⁾ |

3.4 对小鼠精子质量的影响 与正常组比较,模型组小鼠精子密度、精子活力和精子存活率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷各剂量组小鼠精子密度、精子活力和精子存活率明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与维生素C组比较,淫羊藿苷高剂量组小鼠精子活力和精子存活率升高($P<0.05$);与模型组比较,维生素C组的精子密度差异无统计学意义,L-NAME组的精子存活率差异无统计学意义。与正常组比较,模型组小鼠精子CD46水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,维生素C组、淫羊藿苷各剂量组和L-NAME组小鼠精子CD46水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与维生素C组比较,淫羊藿苷高剂量组小鼠精子CD46水平升高($P<0.05$)。说明

EIF会导致精子质量降低,而淫羊藿苷可以提升EIF 症状下的精子质量。见表5及增强出版附加材料。

表5 淫羊藿苷对小鼠精子质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

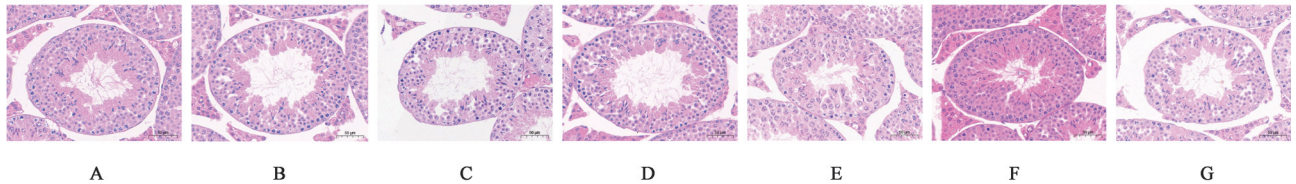
Table 5 Effect of icariin on sperm quality of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 精子存活率/% | 精子密度/10 ⁶ /mL | 精子活力/% | CD46/% |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 正常组 | | 87.33±3.51 | 5.77±0.40 | 56.33±3.06 | 50.07±2.05 |
| 模型组 | | 47.00±5.29 ²⁾ | 2.80±0.30 ²⁾ | 38.33±4.93 ²⁾ | 10.90±1.06 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 61.00±2.00 ³⁾ | 3.53±0.15 ²⁾ | 48.33±3.06 ⁴⁾ | 23.20±1.92 ³⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 65.33±1.53 ³⁾ | 4.10±0.30 ³⁾ | 48.00±2.65 ⁴⁾ | 18.23±2.90 ³⁾ |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 71.33±2.52 ³⁾ | 4.67±0.12 ⁴⁾ | 46.33±1.53 ⁴⁾ | 37.60±2.20 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 80.33±2.52 ⁴⁾ | 5.13±0.21 ⁴⁾ | 49.33±3.79 ⁴⁾ | 42.10±1.87 ^{4,5)} |
| L-NAME组 | 0.01 | 59.67±2.52 | 4.03±0.15 ³⁾ | 44.33±4.73 ³⁾ | 32.93±2.23 ³⁾ |

3.5 对小鼠睾丸组织病理形态及生精功能的影响

3.5.1 小鼠睾丸组织HE染色切片 与正常组比较,模型组生精细胞排列紊乱,精管分布疏松,曲精小管内细胞可见脱落,层数减少,少量精子存在于管腔中;与模型组比较,淫羊藿苷组与维生素C组睾丸组织形态

明显改善,曲精小管细胞层数变多,游离精子明显增多。与正常组比较,模型组睾丸TMS评分显著降低($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组TMS评分显著升高($P<0.01$)。在病理形态层面说明淫羊藿苷可以改善EIF导致的生精功能障碍。见图1、表6。



注:A.正常组;B.模型组;C.维生素C组;D.淫羊藿苷低剂量组;E.淫羊藿苷中剂量组;F.淫羊藿苷高剂量组;G.L-NAME组(图2-图4)
图1 淫羊藿苷对小鼠睾丸组织病理形态学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of icariin on pathological morphology of mouse testicular tissue (HE,×100)

表6 淫羊藿苷对小鼠睾丸组织病理形态学TMS评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of icariin on pathological morphology score of testicular tissue in mice (TMS score) ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | TMS评分/分 |
|----------|-----------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 18.67±1.15 |
| 模型组 | | 10.00±2.00 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 13.00±1.00 ²⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 17.33±0.58 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 14.67±0.58 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 12.67±2.08 ⁴⁾ |
| L-NAME组 | 0.01 | 13.33±1.52 |

3.5.2 小鼠睾丸组织 STRA8、SCP3、TNP1 免疫组化染色切片 与正常组比较,模型组小鼠睾丸组织 STRA8、SCP3、TNP1 表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,淫羊藿苷中、高剂量组小鼠睾丸组织 STRA8、SCP3、TNP1 表达显著升高($P<0.01$); L-NAME组睾丸组织 STRA8、SCP3、TNP1 表达没有显著性差异。与维生素C组比较,淫羊藿苷高剂量组小鼠睾丸组织 STRA8、SCP3、TNP1 表达明显升

高($P<0.05, P<0.01$)。与淫羊藿苷中剂量比较, L-NAME组睾丸组织 STRA8、SCP3、TNP1 表达显著降低($P<0.05, P<0.01$)。说明 EIF 从第1次减速分裂阶段开始抑制精子发生,而淫羊藿苷对此具有改善作用, L-NAME 会抑制淫羊藿对精子发生的改善作用。见图2和表7。

3.6 对小鼠睾丸中睾酮、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶活性、cGMP 的影响 与正常组比较,模型组小鼠睾酮水平、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶、cGMP 活性显著降低($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿苷高剂量组小鼠睾酮水平、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶、cGMP 活性明显升高($P<0.05, P<0.01$); L-NAME 组小鼠睾丸 cGMP 水平无统计学差异。说明 EIF 会降低小鼠睾酮水平、Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶和 cGMP 活性,且淫羊藿苷具有上调睾酮,提升 Ca²⁺/Mg²⁺-ATP 酶、cGMP 活性的治疗作用。见表8。

3.7 对小鼠睾丸 RGN/PKG/GKAP1 途径的检测 Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组小鼠睾丸 RGN、PKG、GKAP1 表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,淫羊藿苷各剂量组小鼠睾丸 RGN、

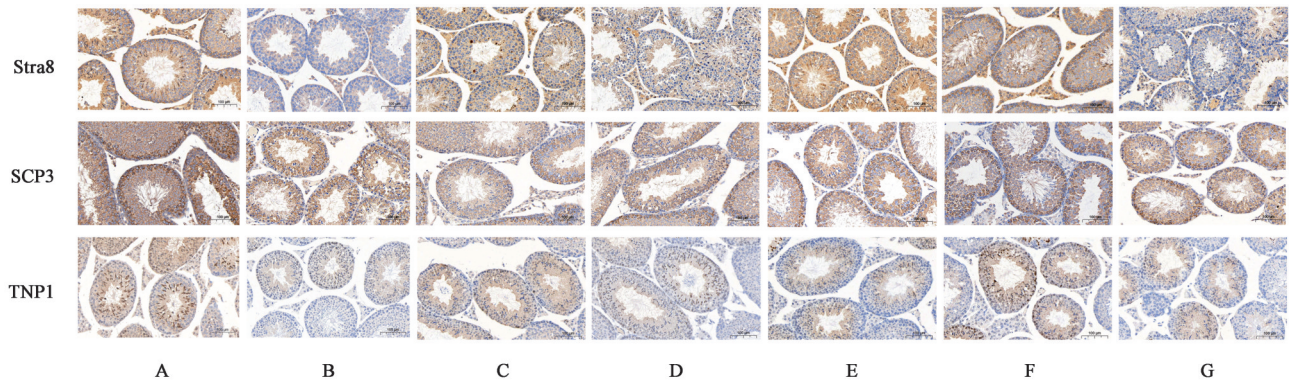


图2 淫羊藿苷对小鼠睾丸STRA7、SCP3、TNPI蛋白表达的影响(免疫组化,×50)

Fig. 2 Effect of icariin on protein expression of STRA7, SCP3 and TNPI in testes of mice (IHC, ×50)

表7 淫羊藿苷对小鼠睾丸STRA7、SCP3、TNPI表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 7 Effect of icariin on expression of STRA7, SCP3 and TNPI in testes of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | STRA8 | SCP3 | TNPI |
|----------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 正常组 | | 135.67±4.73 | 66.67±7.37 | 90.00±7.21 |
| 模型组 | | 32.00±4.58 ²⁾ | 24.00±7.00 ²⁾ | 24.67±4.73 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 66.33±3.51 ⁴⁾ | 40.67±4.51 ⁴⁾ | 41.67±3.79 ²⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 50.67±13.43 ²⁾ | 43.33±2.52 ⁴⁾ | 55.33±4.51 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 85.33±9.45 ⁴⁾ | 47.67±4.04 ⁴⁾ | 56.33±7.37 ⁴⁾ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 124.00±10.82 ^{4,6)} | 62.00±4.00 ^{4,5)} | 82.33±3.21 ^{4,6)} |
| L-NAME组 | 0.01 | 47.67±4.73 ^{2,8)} | 34.33±4.93 ^{2,7)} | 34.00±10.44 ^{2,7)} |

表8 淫羊藿苷对小鼠睾丸组织睾酮、ATP酶和cGMP含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 8 Effect of icariin on testosterone, ATPase and cGMP contents in testicular tissues of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 睾酮 /nmol·L ⁻¹ | Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -ATP酶 /U·mg ⁻¹ | cGMP /nmol·L ⁻¹ |
|----------|---------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------|
| 正常组 | | 6.27±0.28 | 143.28±1.67 | 9.20±0.41 |
| 模型组 | | 4.78±0.18 ²⁾ | 104.21±3.74 ²⁾ | 6.93±0.16 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 5.22±0.37 ¹⁾ | 117.34±3.09 | 7.00±0.34 ²⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 5.21±0.11 | 109.85±7.51 | 7.11±0.49 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 5.38±0.19 | 111.22±11.27 | 7.61±0.17 ³⁾ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 5.86±0.15 ³⁾ | 123.84±2.44 ³⁾ | 8.24±0.12 ⁴⁾ |
| L-NAME组 | 0.01 | 5.22±0.11 | 114.15±10.47 | 7.17±0.48 |

PKG、GKAP1表达显著升高($P<0.01$);L-NAME组小鼠睾丸GKAP1表达差异无统计学差异,睾丸RGN与PKG表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与维生素C组比较,淫羊藿苷高剂量组小鼠睾丸RGN、PKG、GKAP1表达显著升高($P<0.01$);免疫荧光结果显示,与正常组比较,模型组小鼠睾丸RGN阳性表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,淫羊藿

苷高剂量组小鼠RGN阳性表达水平显著升高($P<0.01$)。说明EIF经由RGN、PKG、GKAP1对精子发生和顶体反应造成损伤,但淫羊藿苷可以上调RGN、PKG、GKAP1以缓解EIF对精子发生和顶体反应的不良影响,但L-NAME会减少淫羊藿苷对PKG和GKAP1的上调作用。见图3、图4和表9。

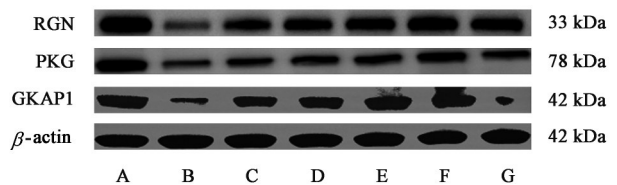


图3 小鼠睾丸组织RGN、PKG、GKAP1蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of RGN, PKG and GKAP1 protein expressions in mouse testicular tissue

4 讨论

适宜的运动可以促进人体的健康和防治各类慢性疾病并提高生活质量,但过度运动所导致的长期EIF不仅不利于体能的生长,还会使得机体各个系统出现不良反应^[26]。在运动过程中按计划补充维生素C常用作防治EIF的手段^[27],前期实验结果证明维生素C有改善EIF的作用,维生素C也可以改善精子质量^[28],因此本实验同样选取维生素C作为阳性药组。维生素C可以从抗氧化和促进类固醇代谢等角度改善精子状态和EIF^[11,28],但过量摄入可能影响其他维生素和抗氧化物质的正常代谢和功能^[29]。

淫羊藿记载始见于《神农本草经》,有“益精气,坚筋骨,补腰膝”之效,可“补肾壮阳,祛风除湿”。淫羊藿临床应用广泛,现代药理研究表明,其具有提高免疫功能、抗骨质疏松、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖、抗抑郁等多种药理作用,常出现在生殖领域的研究中^[30],淫羊藿的组成成分包括黄酮、多糖、生物碱和一些其他成分^[31],淫羊藿苷属于淫羊藿黄

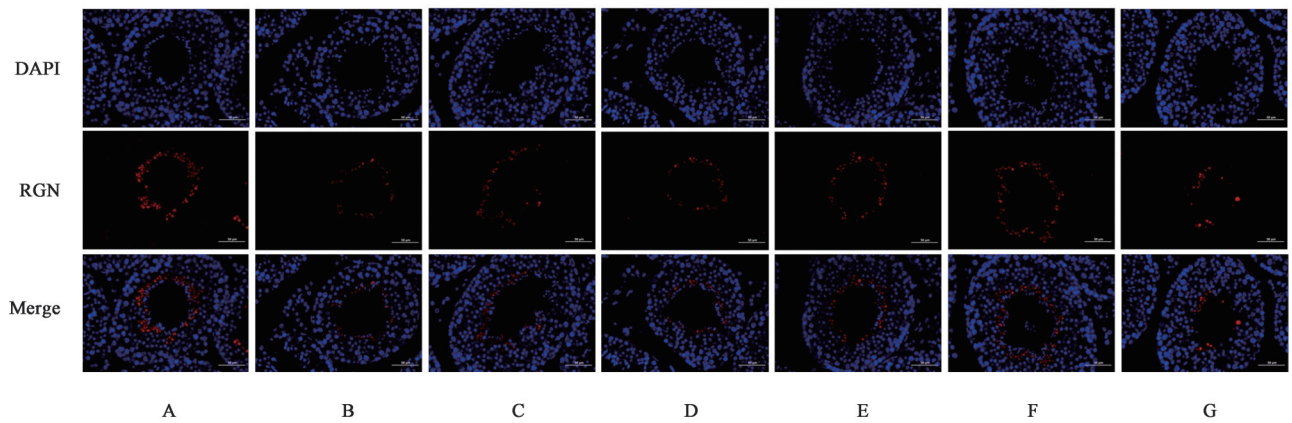


图4 淫羊藿苷对小鼠睾丸组织RGN表达的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 4 Effect of icariin on expression of RGN in mouse testicular tissue (IF,×100)

表9 淫羊藿苷对小鼠睾丸组织RGN、PKG、GKAP1蛋白表达的影响(̄x±s,n=3)

Table 9 Effect of icariin on protein expression of RGN, PKG and GKAP1 in testicular tissue of mice (̄x±s,n=3)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | RGN/β-actin | PKG/β-actin | GKAP1/β-actin | RGN免疫荧光 |
|----------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 正常组 | | 1.05±0.03 | 0.77±0.01 | 0.78±0.04 | 1.00±0.19 |
| 模型组 | | 0.13±0.10 ²⁾ | 0.14±0.02 ²⁾ | 0.21±0.05 ²⁾ | 0.23±0.08 ²⁾ |
| 维生素C组 | 0.20 | 0.37±0.11 ⁴⁾ | 0.34±0.09 ³⁾ | 0.55±0.01 ⁴⁾ | 0.45±0.12 ²⁾ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.03 | 0.61±0.05 ⁴⁾ | 0.35±0.09 ⁴⁾ | 0.61±0.02 ⁴⁾ | 0.24±0.07 |
| 淫羊藿苷中剂量组 | 0.06 | 0.69±0.01 ⁴⁾ | 0.38±0.07 ⁴⁾ | 0.80±0.04 ⁴⁾ | 0.52±0.10 |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.12 | 0.79±0.03 ^{4,6)} | 0.53±0.04 ^{4,6)} | 0.84±0.02 ^{4,6)} | 0.87±0.13 ⁴⁾ |
| L-NAME组 | 0.01 | 0.66±0.02 ⁴⁾ | 0.31±0.02 ³⁾ | 0.28±0.09 | 0.33±0.04 |

酮的成分之一,是淫羊藿黄酮中由异戊烯基取代的代表性成分。有研究表明,淫羊藿苷本身作为PDE5抑制剂而常用于治疗勃起障碍,而PDE5会下调cGMP的表达,也就是说淫羊藿苷可以提高cGMP的表达,而cGMP与精子发生具有高度关联^[13-14,32]。有研究表明,淫羊藿苷可以经由性腺或HPA轴上调睾酮的表达来影响生殖系统,改善生精障碍^[12,33]。这直接证明淫羊藿苷、EIF、精子发生和睾酮具有密切联系。

为了进一步研究淫羊藿苷对于运动性疲劳中精子发生障碍的治疗作用,加入NOS抑制剂L-NAME组以验证此过程中cGMP的作用。L-NAME可以阻断淫羊藿苷通过抑制PDE5上调cGMP的过程。课题组前期研究证明淫羊藿多糖通过抗氧化的方式,经由p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/NF-κB信号通路改善EIF小鼠运动系统^[11],淫羊藿苷和淫羊藿多糖同属淫羊藿提取物,均具抗氧化作用,因此推测淫羊藿苷可以改善EIF的运动系统。基于以上原因,本实验开展研究,拟探索淫羊藿苷在EIF中改善精子发生的作用。

判定小鼠是否发生EIF现象,通常可以通过该小

鼠的运动表现和常见的疲劳标志包括LA、LDH、BUN水平进行验证,同时可以结合MDA、SOD水平进一步佐证。EIF小鼠在运动方面通常表现出疲惫、乏力、持续时间短和精神萎靡的现象,在本实验中除正常组外的各组小鼠也有着相应的表现,但与模型组小鼠比较,维生素C组和淫羊藿各剂量组运动表现相对较好,提示淫羊藿苷有改善EIF小鼠运动功能的作用。LA是最常见的疲劳标志^[34]。LDH可以使乳酸转变为丙酮酸以更好地利用,在高强度运动中会大量产生^[35]。BUN与肾小球系统在运动过程中过滤功能下降有关,也是常见的疲劳标志物^[36]。在本实验中除正常组外各组小鼠的LA、LDH、BUN均显著上升,但与模型组比较,维生素C组和淫羊藿各剂量组与正常组更接近,提示淫羊藿苷具有减少代谢废物堆积,并缓解EIF程度的作用。氧自由基和氧化应激是导致EIF发生的重要原因之一,这是因为在高强度运动过程中线粒体清除自由基的能力减弱^[37],体内增多的自由基造成MDA等脂质过氧化物增多^[38],进而促进EIF的发生。SOD是重要的抗氧化物,其活性下降常引起铁死亡的发生^[39]。在本实验中,与模型组比较,维生素C组和淫羊藿各剂量组SOD水平更高而MDA水平更

低,这提示淫羊藿苷或许可以从抗氧化方面改善EIF。以上结果证明各组均EIF模型造模成功,且淫羊藿苷可以在整体上改善小鼠EIF症状,延缓EIF的发生。

研究结果表明,模型组小鼠精子质量与生精功能显著低于正常组小鼠,淫羊藿苷高剂量组精子质量与生精功能显著高于模型组小鼠,验证了EIF对小鼠的精子质量具有负面作用,并且淫羊藿苷可以改善EIF模型小鼠的精子质量与生精功能。CD46是精子顶体膜的组成部分之一,可以反映精子顶体反应能力^[40]。STRA8、SCP3、TNP1分别是减数分裂启动标记蛋白、减数分裂中标记蛋白、减数分裂后标记蛋白,可以反映EIF对小鼠精子发生的具体中断步骤^[41-43],本实验结果表明模型组CD46、STRA8、SCP3、TNP1显著少于正常组,淫羊藿苷高剂量组显著高于模型组,L-NAME组各项精子质量数据低于淫羊藿苷中剂量组或与模型组比较差异无统计学意义,提示EIF对小鼠精子发生的干预主要集中在减数分裂前期,淫羊藿苷可以改善EIF模型小鼠的精子发生功能,并且该过程与cGMP活性相关。

淫羊藿苷针对RGN和cGMP/PKG/GKAP1途径的影响方式有2种,分别是上调睾酮和抑制PDE5以上调cGMP。上调睾酮的过程包括通过提高ATCH经HPA轴上调睾酮^[44]、与睾丸间质细胞膜上Esr1受体结合促进睾酮^[12]、通过睾丸细胞内cGMP的提高进而提高cAMP并生成睾酮^[45]等。睾酮在运动过程中,HPA轴对其的调控作用增加^[46],有实验表明运动员在长期EIF下睾酮表现出显著低下的情况^[8]。睾酮减少会使得精子发生在一定程度上出现障碍^[47]。除此之外,Ca²⁺也在雄性生殖系统和EIF机制中起到十分重要的作用^[9],而RGN或许在雄性生殖系统中作为连接EIF和Ca²⁺的桥梁之一。RGN在雄性生殖系统表现出重要作用^[4],其受到睾酮水平调控的同时,又能调控钙泵(Ca²⁺/Mg²⁺-ATP酶)的活性,进而影响Ca²⁺水平^[48]以干预cGMP。在本实验中,淫羊藿苷高剂量组小鼠的睾酮水平、RGN水平和Ca²⁺/Mg²⁺-ATP酶活性相比模型组和维生素C组小鼠更高,这提示淫羊藿苷可以通过促进睾酮增加进而影响RGN水平进而改善睾丸细胞Ca²⁺状态。

当睾丸细胞中Ca²⁺增加时,会对精子发生和顶体反应造成影响^[49],主要是因为Ca²⁺水平增加时会导致cGMP表达降低^[50]。PKG是cGMP的下游产物,可以影响精子发生和顶体反应^[51-52]。GKAP1是一种cGMP依赖性蛋白激酶锚定蛋白,早期研究认为GKAP1通过与PKG协同影响精原细胞减数分

裂^[6],后有研究证明GKAP1缺陷会通过改变PKG活性使精子产量增加^[5]。在本实验中,模型组小鼠cGMP、PKG和GKAP1水平比正常组小鼠显著降低且有精子发生异常,这说明EIF通过cGMP/PKG/GKAP1途径影响精子发生;L-NAME组cGMP和GKAP1的显著降低验证了cGMP/PKG/GKAP1对精子发生的影响。另一方面,淫羊藿苷高剂量组小鼠cGMP、PKG和GKAP1水平相比模型组和维生素C组显著增高,这说明淫羊藿苷可以通过cGMP/PKG/GKAP1途径改善EIF下的精子发生功能,但更进一步的详细机制还有待研究。

综上所述,长期EIF会对机体造成不良影响,并损害生殖功能,而淫羊藿苷不仅可以改善EIF导致的运动系统损伤,还可以通过RGN调节cGMP/PKG/GKAP1改善EIF的精子发生障碍,增强机体生殖功能。本研究首次阐明了淫羊藿苷改善EIF所致精子发生障碍的重要作用靶点——RGN,并深入揭示了其下游信号通路为cGMP/PKG/GKAP1。这一发现不仅为淫羊藿苷的生殖保护作用提供了新的分子机制解释,也首次将RGN及其介导的信号轴与运动应激下的睾丸功能调控紧密联系起来,拓展了对生殖-运动交互作用机制的理解。尽管本研究初步揭示了淫羊藿苷改善EIF所致小鼠精子发生障碍的作用机制,但仍存在一些局限性和不足之处,例如向人类临床应用的转化仍存在疑问、实验周期短及信号通路之间的相互作用未深入探讨。还需要进一步的深入研究,以更多地理解阐明EIF对生殖系统的作用,并为其提供治疗与防护的有效方法。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TORNERO-AGUILERA J F, JIMENEZ-MORCILLO J, RUBIO-ZARAPUZ A, et al. Central and peripheral fatigue in physical exercise explained: A narrative review[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(7):3909.
- [2] YOSHIDA N, HORNSBY W G, SOLE C J, et al. Effect of neuromuscular fatigue on the Countermovement Jump characteristics: Basketball-related high-intensity exercises[J]. *J Strength Cond Res*, 2024, 38(1):164-173.
- [3] CREWETHER B T, HECHT M, GRILLOT R L, et al. Day-to-day coordination of the stress and reproductive axes: A continuous-time analysis of within-person testosterone and cortisol relationships in athletic and healthy men[J]. *Physiol Behav*, 2023, 263:114104.
- [4] SHARMA S, PEI X, XING F, et al. Regucalcin promotes dormancy of prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2021, 40(5):1012-

- 1026.
- [5] WANG H, WANG G, DAI Y, et al. Functional role of GKAP1 in the regulation of male germ cell spontaneous apoptosis and sperm number[J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(9): 1199-1209.
- [6] YUASA K, OMORI K, YANAKA N. Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase I α [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7): 4897-4905.
- [7] DUDA T, SHARMA R K. Multilimbed membrane guanylate cyclase signaling system, evolutionary ladder[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1022771.
- [8] CUPKA M, SEDLIAK M. Hungry runners - low energy availability in male endurance athletes and its impact on performance and testosterone: Mini-review [J]. *Eur J Transl Myol*, 2023, 33(2): 11104.
- [9] LUO X, LIU W, ZHENG B, et al. Sea cucumber peptides positively regulate sexual hormones in male mice with acute exhaustive swimming: Possibly through the Ca²⁺/PKA signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2023, 14(22): 10188-10203.
- [10] TONG X, WANG Y, DONG B, et al. Effects of genus *Epimedium* in the treatment of osteoarthritis and relevant signaling pathways [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 92.
- [11] 邹悦, 萧闵, 孟宇豪, 等. 基于 p38 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨淫羊藿多糖对运动性疲劳小鼠的影响及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(10): 20-28.
- ZOU Y, XIAO M, MENG Y H, et al. Effects and mechanism of *Epimedium* polysaccharide on exercise-induced fatigue in mice based on p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(10): 20-28.
- [12] SUN J, XU W, ZHENG S, et al. Icaritin promotes mouse Leydig cell testosterone synthesis via the Esr1/Src/Akt/CREB/Sf-1 pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 441: 115969.
- [13] ORHAN I E, RAUF A, SALEEM M, et al. Natural molecules as talented inhibitors of nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (PDEs)[J]. *Curr Top Med Chem*, 2022, 22(3): 209-228.
- [14] WISANWATTANA W, WONGKRAJANG K, CAO D Y, et al. Inhibition of phosphodiesterase 5 promotes the aromatase-mediated estrogen biosynthesis in osteoblastic cells by activation of cGMP/PKG/SHP2 pathway[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 636784.
- [15] 王瑞雯, 白亚楠, 史海龙, 等. 淫羊藿苷对东莨菪碱致小鼠认知障碍及海马神经元兴奋性的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(4): 1114-1119.
- WANG R W, BAI Y N, SHI H L, et al. Effects of icaritin on scopolamine-induced cognitive impairment and hippocampal neuronal excitability in mice[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(4): 1114-1119.
- [16] 关阳, 戴炜, 修雪婧, 等. 维生素对运动性疲劳影响的研究进展 [J]. *中国食物与营养*, 2023, 29(7): 57-61.
- GUAN Y, DAI W, XIU X J, et al. Research progress on the effects of vitamins on exercise-induced fatigue[J]. *Food Nutr China*, 2023, 29(7): 57-61.
- [17] CHEN S, WANG Q, BAKKER D, et al. Empagliflozin prevents heart failure through inhibition of the NHE1-NO pathway, independent of SGLT2[J]. *Basic Res Cardio*, 2024, 119(5): 751-772.
- [18] HUSSAIN S, BAHADAR H, KHAN M I, et al. Modulation of oxidative stress/NMDA/nitric oxide pathway by topiramate attenuates morphine dependence in mice[J]. *Heliyon*, 2024, 10(23): e40584.
- [19] BAI L, TAN C, REN J, et al. Cordyceps militaris acidic polysaccharides improve learning and memory impairment in mice with exercise fatigue through the PI3K/Nrf2/HO-1 signalling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 227: 158-172.
- [20] 孔海军, 李赵越, 周霞, 等. 低氧预处理通过调控 PKA/CREB 及 JAK1/STAT3 信号通路减轻低氧暴露力竭运动小鼠心肌损伤[J]. *航天医学与医学工程*, 2020, 33(6): 484-490.
- KONG H J, LI Z Y, ZHOU X, et al. Hypoxic preconditioning alleviates myocardial injury in mice exposed to hypoxic exhaustive exercise by regulating PKA/CREB and JAK1/STAT3 signaling pathways[J]. *Space Med Med Eng*, 2020, 33(6): 484-490.
- [21] 江晓翠, 田代志, 刘祺, 等. 参苓白术散调节 Nrf2/ARE 通路改善高尿酸血症型少弱精子症小鼠的生精功能[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(15): 22-30.
- JIANG X C, TIAN D Z, LIU Q, et al. Shenling Baizhu San regulates Nrf2/ARE pathway to improve spermatogenic function in mice with hyperuricemia-induced oligoasthenospermia[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(15): 22-30.
- [22] 陈曙辉, 萧闵, 姜兴宇, 等. 疏肝补肾毓麟汤通过 PINK1/Parkin 通路调控自噬流提高精子活力的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(3): 178-83, 280-282.
- CHEN S H, XIAO M, JIANG X Y, et al. Shugan Bushen Yulin decoction improves sperm motility by regulating autophagy flux via the PINK1/Parkin pathway[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(3): 178-183, 280-282.
- [23] 江晓翠, 萧闵, 刘祺, 等. 淫羊藿苷调控 P53/SLC7A11/GPX4 通路抑制睾丸细胞铁死亡改善少弱精子症小鼠生精功能[J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 44(11): 1372-1379.
- JIANG X C, XIAO M, LIU Q, et al. Icaritin inhibits testicular cell ferroptosis via the P53/SLC7A11/GPX4 pathway to improve spermatogenic function in mice with oligoasthenospermia[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2024, 44(11): 1372-1379.
- [24] 刘轶群, 萧闵, 江晓翠, 等. 疏肝补肾毓麟汤通过 IRS/Akt/FoxO1 信号通路改善弱精子症大鼠睾丸生精功能的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(14): 76-85.
- LIU Y Q, XIAO M, JIANG X C, et al. Mechanism of Shugan Bushen Yulin decoction in improving testicular spermatogenic function in rats with asthenospermia via the IRS/Akt/FoxO1 signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(14): 76-85.
- [25] 余何, 萧闵, 江晓翠, 等. 基于细胞间连接探讨左归丸对先天肾虚仔鼠皮肤屏障发育的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(13): 11-18.

- YU H, XIAO M, JIANG X C, et al. Effects of Zuogui pill on skin barrier development in congenital kidney deficiency offspring mice based on intercellular junctions[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(13): 11-18.
- [26] FESTA F, MEDORI S, MACRÌ M. Move your body, boost your brain: The positive impact of physical activity on cognition across all age groups[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(6): 1765.
- [27] ROGERS D R, LAWLOR D J, MOELLER J L. Vitamin C supplementation and athletic performance: A review[J]. *Curr Sports Med Rep*, 2023, 22(7): 255-259.
- [28] ZHAO Z M, MEI S, ZHENG Q Y, et al. Melatonin or vitamin C attenuates lead acetate-induced testicular oxidative and inflammatory damage in mice by inhibiting oxidative stress mediated NF- κ B signaling[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 264: 115481.
- [29] LYKKESFELDT J, CARR A C. Vitamin C-a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023[J]. *Food Nutr Res*, 2023, doi: 10. 29219/fnr. v67. 10300.
- [30] LUO M, ZHUGE X, JI L, et al. Icariin ameliorates spermatogenesis disorder in obese mice induced by high-fat diet through regulating the glycolytic pathway[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2023, 67(13): e2200524.
- [31] 李莉, 王嘉瑞, 王晶, 等. 淫羊藿的主要化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(11): 143-151.
- LI L, WANG J R, WANG J, et al. Research progress on main chemical constituents and pharmacological effects of *Epimedium* and predictive analysis of its quality markers[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2023, 41(11): 143-151.
- [32] ZHU D Y, LOU Y J. Icariin-mediated expression of cardiac genes and modulation of nitric oxide signaling pathway during differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes *in vitro*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(3): 311-320.
- [33] ZHENG X X, CHEN Y W, YUE Y S, et al. Icariin ameliorates learning and memory impairments through ERK/CaMKII α /CREB signaling and HPA axis in prenatally stressed female offspring[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109077.
- [34] WU D, ZHANG K, KHAN F A, et al. The emerging era of lactate: A rising star in cellular signaling and its regulatory mechanisms[J]. *J Cell Biochem*, 2023, 124(8): 1067-1081.
- [35] ZHOU Y, QI M, YANG M. Current status and future perspectives of lactate dehydrogenase detection and medical implications: A review[J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(12): 1145.
- [36] JAGURI A, AL THANI A A, ELRAYESS M A. Exercise metabolome: Insights for health and performance [J]. *Metabolites*, 2023, 13(6): 694.
- [37] POWERS S K, DEMINICE R, OZDEMIR M, et al. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe?[J]. *J Sport Health Sci*, 2020, 9(5): 415-425.
- [38] YOSHIKAWA T, YOU F. Oxidative stress and bio-regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3360.
- [39] DIXON S J, OLZMANN J A. The cell biology of ferroptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(6): 424-442.
- [40] DE TONI L, COSCI I, SABOVIC I, et al. Membrane cholesterol inhibits progesterone-mediated sperm function through the possible involvement of ABHD2[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9254.
- [41] SUN L, LYU Z, CHEN X, et al. Splicing factor SRSF1 is essential for homing of precursor spermatogonial stem cells in mice[J]. *eLife*, 2024, doi: 10. 7554/eLife. 89316.
- [42] WANG Y, WU Y, ZHANG S. Impact of bisphenol-A on the spliceosome and meiosis of sperm in the testis of adolescent mice [J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18(1): 278.
- [43] DONG J, DONG Y, CHEN H, et al. Ursonic acid attenuates spermatogenesis in oligozoospermia mice through inhibiting ferroptosis[J]. *Bioorg Chem*, 2024, 144: 107174.
- [44] 李波, 安睿, 王新宏. 淫羊藿苷和补肾复方对肾虚大鼠下丘脑CRH基因和垂体POMC基因表达的影响[J]. *中成药*, 2008, 30(1): 132-134.
- LI B, AN R, WANG X H. Effects of icariin and kidney-tonifying compound on the expression of CRH gene in hypothalamus and POMC gene in pituitary of kidney-Yang deficient rats[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2008, 30(1): 13213-13214.
- [45] ZHANG Z B, YANG Q T. The testosterone mimetic properties of icariin[J]. *Asian J Androl*, 2006, 8(5): 601-605.
- [46] MAHDIREJEI H A, PEERI M, AZARBAYJANI M A, et al. Fluoxetine combined with swimming exercise synergistically reduces lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by normalizing the HPA axis and brain inflammation in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2023, 232: 173640.
- [47] STOCKS B T, OPPENHEIMER A G, CAMPBELL K J, et al. Optimal restoration of spermatogenesis after testosterone therapy using human chorionic gonadotropin and follicle-stimulating hormone[J]. *Fertil Steril*, 2025, 123(4): 607-615.
- [48] DANISH M, AHMAD R. Functional pleiotropy of calcium binding protein regucalcin in signaling and diseases[J]. *Cell Signal*, 2023, 102: 110533.
- [49] AL-ALI H, BAIG A, ALKHANJARI R R, et al. Septins as key players in spermatogenesis, fertilisation and pre-implantation embryogenic cytoplasmic dynamics[J]. *Cell Commun Signal: CCS*, 2024, 22(1): 523.
- [50] ZHAI S, OTSUKA S, XU J, et al. Ca²⁺-dependent phosphodiesterase 1 regulates the plasticity of striatal spiny projection neuron glutamatergic synapses[J]. *Cell Rep*, 2024, 43(8): 114540.
- [51] WU K, MEI C, CHEN Y, et al. C-type natriuretic peptide regulates sperm capacitation by the cGMP/PKG signalling pathway via Ca²⁺ influx and tyrosine phosphorylation[J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 38(3): 289-299.
- [52] ZHANG J, LV C, YU Z, et al. Step-wise reproductive toxicities of imidazolium- and pyridinium-based ionic liquids on *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Hazard Mater*, 2024, 480: 136458.

[责任编辑 孙丛丛]