

强精片调控 Keap1/Nrf2 信号通路减轻精索静脉曲张氧化应激损伤的作用及机制

董良^{1,2}, 阳方^{1,2}, 张静益³, 唐欣怡³, 李雨璘¹, 俞旭君^{1*}, 常德贵^{3*}

(1. 成都中医药大学医学与生命科学学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学附属生殖妇幼医院, 成都 610041; 3. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的: 基于 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1)/核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路介导氧化应激探讨强精片改善精索静脉曲张 (VC) 生精功能损伤的机制。方法: 将 10 只 SD 大鼠随机分为空白组和模型组, 病理检测验证模型稳定性。将 36 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、强精片低剂量组 (0.23 g·kg⁻¹)、强精片中剂量组 (0.46 g·kg⁻¹)、强精片高剂量组 (0.92 g·kg⁻¹) 和迈之灵组 (61.7 mg·kg⁻¹), 每组 6 只。通过部分结扎左肾静脉 (模拟人类胡桃夹综合征) 建立大鼠实验性左侧精索静脉曲张 (ELV) 模型, 按剂量连续灌胃 28 d, 每天 1 次。Transwell 小室培养法建立大鼠睾丸体外培养模型, 使用强精片含药血清 (2.3、4.6、9.2 g·kg⁻¹) 进行干预。显微镜观察左肾形态, 千分尺测量左侧精索静脉 (LSV) 的直径; 记录大鼠每周体质量, 并称重附睾和睾丸质量; 使用苏木素-伊红 (HE) 染色观察睾丸组织病理变化; 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测细胞培养上清液中的睾酮和大鼠睾丸组织中的活性氧 (ROS) 水平; 流式细胞分析 ROS 含量; 免疫组织化学染色分析 Keap1、Nrf2、3β-羟类固醇脱氢酶 (3β-Hsd)、GATA 结合蛋白-4 (Gata-4)、原癌基因受体酪氨酸激酶 (C-kit); 透射电子显微镜 (TEM) 观察组织超微结构; 原位末端标记法 (TUNEL) 染色检测细胞凋亡; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分析 Keap1、Nrf2、谷胱甘肽 S-转移酶 α2 (Gsta2)、谷胱甘肽 S-转移酶 μ1 (Gstm1)、血红素加氧酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (Nqo1)、硫氧还蛋白还原酶 1 (Txnrd1) 的表达。结果: 与空白组比较, 模型组 ROS 含量、凋亡细胞百分比显著升高 (P<0.01), 睾酮 (T) 浓度明显降低 (P<0.01), Keap1 的 mRNA 和蛋白表达显著增加 (P<0.01), Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1 和 Txnrd1 的 mRNA 和蛋白表达明显降低 (P<0.05); 与模型组比较, 强精片各剂量组 ROS 含量、凋亡细胞百分比明显降低 (P<0.05), Keap1 的 mRNA 和蛋白表达明显减少 (P<0.05), Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1 和 Txnrd1 的 mRNA 和蛋白表达明显升高 (P<0.05)。结论: 强精片改善 VC 生精功能的机制与调控 Keap1/Nrf2 信号通路、减轻氧化应激损伤有关。

[关键词] 精索静脉曲张; 中医药; 氧化应激损伤; Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1)/核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路; 体外实验模型

[中图分类号] R277; R285; R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)14-0347-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251935

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251009.1255.003>

[网络出版日期] 2025-10-09 16:04:26 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Qiangjing Tablets Alleviate Oxidative Stress Damage in Varicocele by Regulating Keap1/Nrf2 Signaling Pathway

DONG Liang^{1,2}, YANG Fang^{1,2}, ZHANG Jingyi³, TANG Xinyi³,
LI Yulin¹, YU Xujun^{1*}, CHANG Degui^{3*}

(1. School of Medical and Life Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. Reproductive & Women-Children Hospital, Chengdu University of TCM, Chengdu 610041, China; 3. Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[收稿日期] 2025-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82205131, 82274534); 四川省科技厅四川省青年基金项目 (2025ZNSFSC1798)

[第一作者] 董良, 博士, 讲师, 从事泌尿与生殖系统疾病中西医结合基础与临床研究, E-mail: dongliang@cdutcm.edu.cn

[通信作者] * 常德贵, 博士, 主任中医师, 从事泌尿男生殖系统中西医结合基础与临床研究, E-mail: changdegui@cdutcm.edu.cn;

* 俞旭君, 博士, 教授, 从事泌尿男生殖系统中西医结合基础与临床研究, E-mail: yuxujun@cdutcm.edu.cn

[Abstract] Objective: To explore the mechanism by which Qiangjing tablets (QJT) alleviate the spermatogenic function damage caused by varicocele (VC) based on the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway-mediated oxidative stress. **Methods:** Ten Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into a control group and a model group. Pathological examination confirmed the stability of the model. Thirty-six SD rats were randomized into control, model, low-dose ($0.23 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) QJT, medium-dose ($0.46 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) QJT, high-dose ($0.92 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) QJT, and mazhilin ($61.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups, with 6 rats in each group. A rat model of experimental left varicocele (ELV) was established by partially ligating the left renal vein to simulate the human nutcracker syndrome. The rats were administrated with corresponding agents once a day for 28 consecutive days. The *in vitro* testicular culture model of rats was established through the Transwell chamber method and intervened with QJT-containing sera ($2.3, 4.6, \text{ and } 9.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Microscopic observation was carried out for the morphology of the left kidney. A micrometer was used to measure the diameter of the left spermatic vein (LSV). The body weights of rats were recorded weekly, and the epididymis and testis weights were measured. The pathological changes of the testicular tissue was observed via hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of testosterone (T) in the cell culture supernatant and reactive oxygen species (ROS) in the rat testicular tissue were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Flow cytometry was employed to determine the ROS content. Immunohistochemical staining was conducted to analyze Keap1, Nrf2, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -Hsd), GATA-binding protein-4 (Gata-4), and proto-oncogene receptor tyrosine kinase (C-kit). The ultrastructure of the tissue was observed by transmission electron microscopy (TEM). Cell apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining. The expression of Keap1, Nrf2, glutathione S-transferase $\alpha 2$ (Gsta2), glutathione S-transferase $\mu 1$ (Gstm1), heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (Nqo1), and thioredoxin reductase 1 (Txnrd1) was quantified by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Results:** Compared with the control group, the ROS content and the percentage of apoptotic cells in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the T concentration was significantly decreased ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of Keap1 were significantly increased ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expressions of Nrf2, Gsta2, Gstm1, HO-1, Nqo1 and Txnrd1 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ROS content and the percentage of apoptotic cells in each dose group of the Qiangjing Tablets were significantly reduced ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expressions of Keap1 were significantly decreased ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expressions of Nrf2, Gsta2, Gstm1, HO-1, Nqo1 and Txnrd1 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** QJT improves sperm motility in the rat model of VC by modulating the Keap1/Nrf2 signaling pathway and reducing oxidative stress injury.

[Keywords] varicocele; traditional Chinese medicine; oxidative stress injury; Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway; *in vitro* experimental model

目前,我国生育形势十分严峻,其中男性因素愈发突出,男性精液质量已连续二十多年呈下降趋势^[1]。精索静脉曲张(VC)是男性不育症重要的致病因素之一,该病可引起睾丸生精环境中活性氧产物增多,进而出现氧化应激损伤,导致精子质量下降,其直接或间接影响了30%~40%的不育患者^[2]。VC的治疗常采用药物和手术相结合的治疗方式,药物治疗主要侧重于改善静脉回流、缓解局部疼痛等;由于术后复发、患者意愿、并发症及预后等原因,手术治疗的实际接受度并不高^[3]。因此,寻找更安全、有效的VC治疗方法一直是研究的重点。

中医学上,VC归属于“筋疝”“筋瘤”范畴,其关键病机是肾精不足、血液瘀滞,“肾虚”“血瘀”贯穿疾病的全程^[4]。四川省名中医常德贵教授长期致力于男科的理论研究与临床实践,首倡“肾虚血瘀兼湿热”病机理论,创制强精片,长期用于治疗男性不育症,取得了良好的疗效^[5]。研究显示强精片可显著提高不育男性的精液质量,特别是提高精子浓度、存活率、活力,以及降低精子畸形率,同时可调

节附睾功能,修复血睾屏障,具有明显的抗氧化作用^[6]。然而,强精片作用于VC的内涵尚不清晰,有必要进一步深入探索强精片治疗VC的作用机制。

研究报道VC可诱导睾丸生精微环境活性氧(ROS)增加,出现氧化应激损伤,进而导致生精功能障碍^[7]。核因子E₂相关因子2(Nrf2)通过结合Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)形成复合物,维持氧化还原稳态和细胞的正常功能^[8]。Keap1/Nrf2信号通路在抗氧化应激中起着关键作用,当其被激活时,能够激发下游抗氧化基因及蛋白的表达,发挥抗氧化作用,恢复氧化稳态^[9]。因此,调控Keap1/Nrf2信号通路可能是治疗VC的新策略。基于上述发现,本研究旨在深入探索强精片通过调控Keap1/Nrf2信号通路对VC生精功能损伤的改善作用及分子机制,以为中医药治疗VC提供更多的实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级SD大鼠46只,7周龄,体重315.4~406.3 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(川)2024-028。温度为20~

26℃,相对湿度保持在40%~60%,采用12 h/12 h明暗周期,大鼠密度为2只/笼。

1.2 伦理 本实验经成都中医药大学附属生殖妇幼医院生殖医学伦理委员会批准(批准号SP23-07)。

1.3 药物 迈之灵(德国礼达大药厂,国药准字ZJ20140002,批号9895,规格150 mg/片)。强精片(成都中医药大学附属医院,川药制字Z20070621,批号20230726,规格100片/瓶,含生药0.3 g/片)。

1.4 试剂 伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,货号YE2080);苏木素染液、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1004、G1003);Transwell®细胞培养小室系统(康宁公司,货号3422);杜尔贝科改良的Eagle培养基/营养混合物F-12HAM培养基(DMEM/F12)高糖培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号PM150310A);睾酮酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,货号ZC-36635);ROS试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号YJ856314);原位末端标记法(TUNEL)细胞死亡检测试剂盒(瑞士罗氏公司,货号1168479590);Nrf2抑制剂(美国MedChemexpress生物科技有限公司,货号HY-149508);Keap1、Nrf2抗体(赛默飞世尔科技,货号分别为PA5-99434、PA5-88084); β -羟类固醇脱氢酶(β -Hsd)、GATA结合蛋白4(Gata-4)抗体(美国Affinity公司,货号分别为DF6639、AF5245);原癌基因受体酪氨酸激酶(C-kit)抗体(成都正能生物技术有限责任公司,货号347321);iScript™cDNA合成试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美国Bio-Rad公司,货号分别为1708890EDU、1725270);Keap1、Nrf2、谷胱甘肽S-转移酶 α 2(Gsta2)、谷胱甘肽S-转移酶 μ 1(Gstm1)、血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶1(Nqo1)、硫氧还蛋白还原酶1(Txnrd1)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(爱博泰克生物公司,货号分别为A21724、AF0639、A7678、A17492、A1346、A23486、A4725、AC026)。

1.5 仪器 伟力WLJY-9000型数码彩色精子质量仪(TOX IVOS精子分析系统,美国Hamilton Thorne公司);BA210型Digital数码三目摄像显微镜(麦克奥迪集团);SpectraMAX Plus384型酶标仪(美谷分子仪器);JEM-1400 FLASH型透射电子显微镜(TEM,日本电子公司);QuantStudio TM3型Real-time PCR仪(美国Thermo Fisher仪器有限公司);

Pannoramic 250型数字切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH公司);JY-SCZ4+型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);5200 Multi型荧光图像分析系统(上海天能科技公司)。

2 方法

2.1 实验性左侧精索静脉曲张(ELV)模型及动物分组 大鼠在建模前均进行适应性喂养1周。将其中10只SD大鼠,通过部分结扎左肾静脉(模拟人类胡桃夹综合征)建立大鼠实验性左侧精索静脉曲张(ELV)模型(VC模型,模拟的病变程度相当于人类临床分级的Ⅲ级)^[10],进行预实验,以验证模型的稳定性。另外36只大鼠随机分为空白组,模型组,强精片低、中、高剂量组和迈之灵组,每组6只。通过上述方法建立ELV模型后,通过腹膜内注射左洛替利 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ +右美托咪定 $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 麻醉。采用腹部正中切口,将左肾静脉与左精索静脉(LSV)、左肾上腺静脉内侧和下腔静脉进行侧向分离,形成钝角通道区域,并在该区域的左肾静脉上放置直径为0.8 mm的金属棒,并用4-0线以适当的力量将该棒与左肾静脉结扎,避免损伤左肾静脉,结扎后轻轻抽出该棒,即完成左肾静脉的人工狭窄。随后,仔细观察并分离LSV的侧支,其中包括髂总静脉的分支等,并将所有这些分支结扎,以确保建模的成功率。如果发现LSV的细分支注入髂腰静脉,则在左睾丸静脉入口远端结扎髂腰静脉。整个手术过程采用无菌方式进行,温度保持在37℃。在空白组中,予以上述相同的方式麻醉后,进行腹部正中切口,仅将左肾静脉和左肾静脉外侧支分离,不进行结扎。每组腹腔注射头孢唑林钠3 d,以预防术后感染并降低大鼠死亡率。

2.2 动物给药 空白组和模型组采用生理盐水灌胃。迈之灵组灌胃迈之灵($61.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。强精片低、中、高剂量组采用强精片灌胃,剂量分别为0.23、0.46、0.92 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[11]。所有组连续灌胃28 d,每天1次。其中,强精片生药量为0.3 g/片,人用生药量 $4.5\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,按人标准体质量为60 kg计算,根据《中药药理研究方法学》^[12]中指出的大鼠与人等效剂量比为6.17:1,则大鼠的强精片等效剂量为 $4.5\text{ g}/60\text{ kg}\times 6.17\approx 0.46\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,本实验设置低、中、高剂量分组,中剂量为等效剂量,低、高剂量分别为等效剂量的0.5倍($0.23\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和2倍($0.92\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

2.3 VC体外实验

2.3.1 乳鼠睾丸组织采集 SPF级健康SD大鼠数只,7~9周龄,体质量:雄性280~310 g,雌性200~

230 g, 维持12 h光照/12 h黑暗周期循环, 换气次数: 20次/h以上, 温度: 20~26 °C, 相对湿度: 40%~60%, 适应性喂养1周, 按雌雄3:1的比例笼养以获得孕鼠。雄性乳鼠在出生当天计为第0天, 生长3 d。通过窒息处死24只3日龄的雄性乳鼠, 并在严格的无菌条件下切除双侧睾丸。去除筋膜后, 使用眼科剪制作适当大小(0.3~0.8 mm³)的睾丸组织碎片, 并用无菌PBS冲洗备用。睾丸组织的分离和培养步骤见增强出版附加材料。

2.3.2 左侧精索静脉采集血液 10只SD大鼠在适应性喂养1周后随机分为空白组和模型组, 每组5只。根据上述方法构建VC模型大鼠, 4周后, 对大鼠进行麻醉, 取腹正中切口, 暴露曲张的LSV, 用5 mL注射器在LSV注入左肾静脉处取血3~4 mL(用于制备ELV血清); 空白组未见精索静脉曲张, 但同样须在LSV注入左肾静脉处取血3~4 mL(用于制备空白组血清); 采血后立即用柠檬酸钠抗凝(按枸橼酸钠/血液体积比1:9)。所有血液样本均以4 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8.6 cm, 下同), 提取血清并储存在-80 °C下, 备用。

2.3.3 强精片含药血清制备 SPF级健康SD大鼠25只, 8周龄, 雄性, 体质量180~220 g。适应环境1周后, 将大鼠分为空白组, 强精片低、中、高剂量组(2.3、4.6、9.2 g·kg⁻¹)和迈之灵组(617 mg·kg⁻¹), 每组5只。在本实验中, 将10%的含药物血清加入细胞培养物中, 因此取上述动物实验剂量的10倍进行灌胃。最后1次给药后1 h, 通过腹主动脉采集血液样本。将血液注入含有柠檬酸钠溶液的离心管中, 使用低速离心机以3 000 r·min⁻¹离心10 min, 分离血清。将同一组的所有大鼠血清混合并储存在-80 °C下。体外实验模型含药物血清制备示意图见增强出版附加材料。

2.3.4 Transwell培养法建立大鼠睾丸组织体外培养模型 将上述乳鼠睾丸组织碎片转移到带有3个睾丸组织块/孔的Transwell悬浮插入培养皿中, 加入培养基直至刚好淹没组织。培养基为DMEM/F-12高糖培养基, 含有10%新生小牛血清(FBS)、1%双抗体(青霉素100 U·mL⁻¹, 链霉素100 mg·L⁻¹)、0.1 mol·L⁻¹碳酸氢钠20 μL及生长因子(2 mmol·L⁻¹谷氨酰胺、10 mg·L⁻¹胰岛素和5 mg·L⁻¹转铁蛋白)。随后, 将培养皿置于37 °C、5%CO₂浓度的恒温培养箱中, 每天更换1次培养基。分离的睾丸组织在培养3 d后进行分组和培养。体外实验模型分组培养示意图见增强出版附加材料。

2.3.5 细胞实验分组和干预 设置分组:(1)10%空白组血清+常氧组(2、3、6 d), 10%ELV血清+常氧组(2、3、6 d), 10%空白血清+低氧组(24、48、72 h), 10%ELV血清+低氧组(24、48、72 h), 为保证细胞存活率, 低氧组孵育时间为24、48、72 h。(2)10%空白血清+常氧培养3 d(空白组)、10%ELV血清+低氧培养72 h(模型组)、10%ELV血清/低氧造模+10%空白血清组(阴性血清对照组)、10%ELV血清/低氧造模+10%强精片低剂量含药血清组(强精片低剂量组)、10%ELV血清/低氧造模+10%强精片中剂量含药血清组(强精片中剂量组)、10%ELV血清/低氧造模+10%强精片高剂量含药血清组(强精片高剂量组)、10%ELV血清/低氧造模+10%强精片高剂量含药血清+5 μmol·L⁻¹Nrf2抑制剂ML 385干预组(强精片高剂量+Nrf2抑制剂组, ML 385采用100%的DMSO溶解, 用0.5%DMSO进行稀释, 浓度5 μmol·L⁻¹)、10%ELV血清/低氧造模+10%迈之灵含药血清组(MZL serum)。分离睾丸组织培养3 d后, 通过向每个孔中加入含有10%对照血清2 mL或10%ELV血清的培养基来更换培养基, 并将细胞培养板置于常氧(21%O₂+74%N₂+5%CO₂)或低氧(1%O₂+94%N₂+5%CO₂)条件下, 每24 h更换1次培养基。2 mL相应的含10%药物的血清培养基孵育48 h, 收集细胞。体外实验分组及培养示意图见增强出版附加材料。

2.4 显微镜观察肾脏形态及千分尺测量LSV直径 用显微镜观察左肾是否有萎缩及肾脏的形态和颜色, 并用千分尺测量LSV主干的直径。如果左肾没有出现萎缩等病理损伤, LSV和蔓状静脉丛明显扩张或静脉曲张, LSV直径≥1 mm, 提示ELV模型复制成功^[13]。

2.5 记录大鼠一般情况 记录大鼠一般情况 每周记录大鼠的体质量, 手术切除睾丸和附睾组织并称质量。取大鼠附睾, 置于预热的Ham'sF10培养液中, 剪碎, 在37 °C下孵育30·min, 在附睾精子充分释放后, 使用伟力WLIX-9000数码彩色精子质量仪检测精子质量, 包括精子总数、精子浓度、精子活力[A级, 快速前向运动(速度>25 μm·s⁻¹); B级, 慢速/呆滞前向运动; C级, 非前向运动(原地活动)]。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色观察病理变化 大鼠睾丸组织及体外实验中分离的睾丸组织碎片均采用4%多聚甲醛固定, 包埋在石蜡中, 切片(5 μm), 脱蜡, HE染色, 在光学显微镜下观察, 并收集图像。

2.7 ELISA检测睾酮和ROS水平 使用ELISA试

剂盒检测细胞培养上清液中的睾酮和大鼠睾丸组织中的ROS,并按照试剂盒的说明进行操作。

2.8 流式细胞仪分析ROS含量 收集细胞,将相当于其体积3倍的红细胞裂解物注入细胞沉淀物中获得细胞沉淀物,用PBS洗涤。向每管细胞中加入1 mL 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)稀释液(1:1 000, 10 μmol·L⁻¹),在37 °C下孵育20 min。随后,以1 500 r·min⁻¹离心5 min,吸出上清液,用PBS溶液重新悬浮细胞,用Beckman流量分析仪分析,并使用CytExpert软件分析ROS含量。

2.9 免疫组织化学染色检测Keap1、Nrf2、3β-Hsd、Gata-4、C-kit的表达 将组织固定、包埋、脱蜡、切片、在柠檬酸盐缓冲液中进行抗原修复,用3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶,封闭在山羊血清中,用一抗Keap1、Nrf2、3β-Hsd、Gata-4、C-kit(稀释倍数均为1:100)在4 °C下孵育过夜。将第二抗体在37 °C下孵育30 min,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,中性树脂胶密封,通过显微镜进行图像采集,并通过Indica实验室数据图像分析系统进行分析。

2.10 TEM观察睾丸组织超微结构变化 采用3%戊二醛预固定睾丸组织,再用1%四氧化锇重新固定,透化、包埋并超薄切片(60~90 nm),切片用乙酸铀酰染色,用柠檬酸铅重新染色,并通过TEM观察。

2.11 TUNEL染色检测细胞凋亡 将分离的睾丸组织固定、脱水、包埋、切片,用柠檬酸微波修复,在37 °C下用荧光TUNEL孵育溶液孵育1 h,通过添加4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行核染色,用甘油密封明胶,并使用Pannoramic 250数字切片扫描仪捕获图像并计数凋亡细胞。

2.12 Real-time PCR检测Keap1、Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1、Txnrd1的mRNA表达 使用动物总RNA分离试剂盒提取总RNA,使用iScript™ cDNA合成试剂盒逆转录为模板cDNA。Real-time PCR反应使用Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix试剂盒进行。PCR反应体系:95 °C预变性30 s,95 °C变性5 s,55 °C退火30 s,充分延伸采集荧光72 °C 30 s。以β-actin为内参,通过2^{-ΔΔCt}法计算相对表达。所有引物均交由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

2.13 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Keap1、Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1、Txnrd1蛋白水平 使用放射免疫沉淀分析缓冲液(RIPA)裂解物提取

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Keap1	上游 TGCTCAACCGCTTGCTGATGC	100
	下游 TCATCCGCCACTCATTCTCTCC	
Nrf2	上游 GCCTTCCTCTGCTGCCATTAGTC	110
	下游 TGCCTTCAGTGTGCTTCTGGTTG	
Gsta2	上游 GCAGCAGGAGTGGAGTTTGATGAG	147
	下游 GTTGAGAATGGCTCTGGTCTGTGC	
Gstm1	上游 GTTCAAACCTGGGCCTGGACTTCC	139
	下游 ACGAATCCGCTCCTCTCTGTCT	
HO-1	上游 CAGACAGAGTTTCTTCGCCAGAGG	129
	下游 TGTGAGGACCCATCGCAGGAG	
Nqo1	上游 AGGCTGCTGTGGAGGCTCTG	108
	下游 GCTCCCTGTGATGTCGTTTCTG	
Txnrd1	上游 CACGGATGAGGAGCAGACCAATG	122
	下游 CATAACGCTCTGAGCCAGCAATC	
β-actin	上游 GGGAAATCGTGCCTGACATT	76
	下游 GCGGCAGTGGCCATCTC	

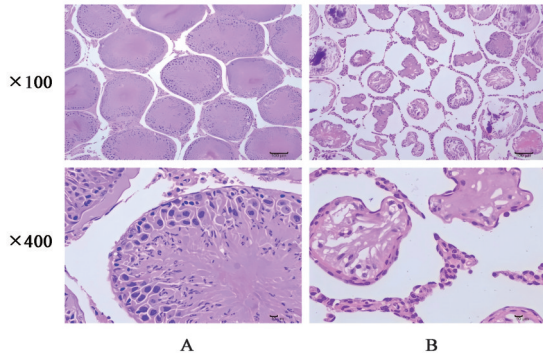
总蛋白,用蛋白定量法(BCA)测定总蛋白浓度,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用5%脱脂奶粉封闭,并加入Keap1、Txnrd1(1:1 000),Nrf2(1:2 000),Gsta2(1:20 000),Gstm1(1:100),HO-1(1:5 000),Nqo1(1:11 000)一抗4 °C孵育过夜,Tris缓冲盐溶液-聚山梨醇酯-20(TBST)洗涤,室温条件下孵育HRP标记山羊抗兔二抗(1:10 000)2 h,增强化学发光法(ECL)发光液中2 min后上机曝光,β-actin为内参。用Tanon荧光图像分析系统软件V2.0对条带进行曝光,并测得条带灰度值后比较各组间的差异性。

2.14 统计学分析 使用SPSS 20.0软件对获得的数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),各组间均值的两两多重比较采用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 VC模型大鼠验证 空白组左肾未见萎缩,外观和颜色正常,LSV和蔓状静脉丛无扩张或曲张,LSV < 1 mm;模型组左肾外观和颜色正常,无萎缩迹象,LSV和蔓状静脉丛明显扩张和曲张,LSV直径 ≥ 1 mm,见增强出版附加材料。空白组睾丸实质中的生精小管上皮保持完整,小管中不同发育阶段的生精细胞显示出正常的发育过程,并按一定的分层顺序排列。模型组睾丸组织均出现不同程度的生精小管萎缩、管腔狭窄、生精上皮结构紊乱和细

胞数量减少;部分生精上皮细胞形态模糊,可见明显变性,细胞质染色深,核浓缩。见图1。



注:A.空白组;B.模型组

图1 VC模型大鼠睾丸组织病理形态变化(HE)

Fig. 1 Changes of pathological morphology of testicular tissue in VC model rats (HE)

3.2 强精片对VC大鼠体质量、附睾和睾丸质量、精子质量、ROS、Keap1/Nrf2通路蛋白及血睾屏障的影响 与空白组比较,模型组大鼠体质量每周稳步增

加,但组间差异无统计学意义;与模型组比较,强精片各剂量组对大鼠体质量无明显影响,见表2。与模型组比较,强精片高剂量组大鼠双侧附睾和右侧睾丸的质量明显增加($P<0.05$),见表3。与模型组比较,强精片高剂量组的精子总数、精子浓度和A+B+C精子活力明显提高($P<0.05$),见表4。与空白组比较,模型组睾丸中ROS水平和Keap1的表达显著增加($P<0.01$),而Nrf2、Gsta2、Gstm1、Nqo1和Txnrd1的表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,强精片高剂量组和迈之灵组睾丸中ROS和Keap1的表达水平显著降低($P<0.01$),Nrf2、Gsta2、Gstm1、Nqo1和Txnrd1的表达显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表5、图2、表6、图3、表7。此外,空白组血睾屏障形态正常,结构完整清晰;模型组细胞结构受损,细胞质出现空泡样改变,血睾屏障破坏,紧密连接结构打开或溶解模糊,支持细胞之间存在明显间隙,部分支持细胞坏死。与模型组比较,强精片各剂量组和迈之灵组显著改善了上述表现,见图4。

表2 强精片对VC大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Qiangjing tablets on body weight of VC rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	0周	1周	2周	3周	4周	5周
空白组		474.83±41.38	487.66±33.63	515.26±37.45	521.70±32.69	548.93±35.00	561.23±33.35
模型组		439.38±60.07	464.21±49.97	495.53±50.77	508.76±57.05	529.15±60.80	526.81±79.06
强精片低剂量组	0.23	440.18±32.62	442.46±48.93	471.51±51.21	485.31±42.94	510.40±38.92	529.10±39.30
强精片中剂量组	0.46	469.10±53.44	480.03±52.56	503.30±59.88	513.38±57.10	549.88±57.47	570.75±50.40
强精片高剂量组	0.92	442.41±19.38	450.36±35.70	475.83±35.90	491.36±41.18	521.36±39.40	527.41±43.95
迈之灵组	0.061 7	449.50±45.63	464.23±42.28	497.46±38.67	509.13±35.84	542.71±38.64	545.51±18.09

表3 强精片对VC大鼠附睾和睾丸质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Qiangjing tablets on weight of epididymis and testis in VC rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	附睾		睾丸	
		左侧附睾	右侧附睾	左侧睾丸	右侧睾丸
空白组		0.64±0.02	0.63±0.02	1.78±0.07	1.77±0.10
模型组		0.52±0.09	0.57±0.05	1.60±0.40	1.76±0.06
强精片低剂量组	0.23	0.65±0.09	0.70±0.08	1.86±0.24	1.83±0.18
强精片中剂量组	0.46	0.71±0.04	0.76±0.06	2.05±0.13	2.05±0.12
强精片高剂量组	0.92	0.68±0.07 ¹⁾	0.67±0.11 ¹⁾	1.98±0.16	1.78±0.44 ¹⁾
迈之灵组	0.061 7	0.61±0.13	0.63±0.12	1.73±0.51	1.62±0.57

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$ (表4同)

3.3 VC体外实验模型构建及筛选 与10%空白血清+常氧培养3 d组比较,10%ELV血清+常氧培养3 d组上清液中的T浓度明显降低($P<0.05$),与10%空白血清+低氧培养48 h和72 h的组比较,10%ELV血清+低氧培养48 h和72 h组上清液中的T浓度明显降低($P<0.05$),见表8。与10%空白血清+低氧组比

较,10%ELV血清+低氧组显示生殖细胞变性和脱落,而常氧培养组显示相对较低程度的病变,见图5。在培养6 d时,与10%空白血清+常氧组比较,10%ELV血清+常氧组睾丸组织中凋亡细胞的百分比明显升高($P<0.05$),在培养72 h时,与10%空白血清+低氧组比较,10%ELV血清+低氧组睾丸组织的

表4 强精片对VC大鼠精子质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Qiangjing tablets on sperm quality of VC rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

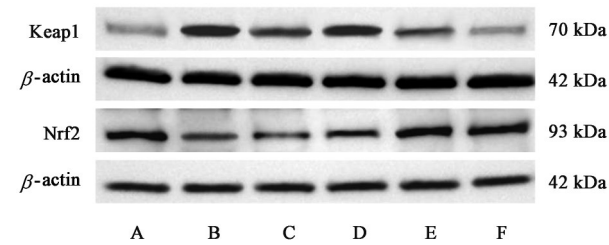
组别	剂量/g·kg ⁻¹	精子总数/个	精子浓度/个/mL	A+B级精子活动率/%	A+B+C级精子活动率/%
空白组		12.88±0.89	7.12±1.75	20.09±7.06	29.32±6.29
模型组		12.43±0.81	6.79±2.72	13.55±5.00	24.63±8.22
强精片低剂量组	0.23	14.39±4.14	8.61±2.64	12.17±3.97	20.91±4.05
强精片中剂量组	0.46	19.38±7.88	9.68±3.94	15.85±8.10	28.48±9.31
强精片高剂量组	0.92	35.86±14.43 ¹⁾	17.09±7.57 ¹⁾	19.05±9.08	40.79±8.45 ¹⁾
迈之灵组	0.061 7	31.12±5.66 ¹⁾	15.56±2.83 ¹⁾	9.64±4.63	16.82±7.79

表5 强精片对VC大鼠睾丸组织中的ROS水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Qiangjing tablets on ROS levels in testicular tissues of VC rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ROS/U·mg ⁻¹
空白组		1.35±0.22
模型组		2.47±0.38 ¹⁾
强精片低剂量组	0.23	2.06±0.28
强精片中剂量组	0.46	1.73±0.11 ²⁾
强精片高剂量组	0.92	1.34±0.20 ²⁾
迈之灵组	0.061 7	1.54±0.19 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表6同)



注:A.空白组;B.模型组;C.强精片低剂量组;D.强精片中剂量组;E.强精片高剂量组;F.迈之灵组(图3和图4同)

图2 VC大鼠Keap1、Nrf2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Protein expression of Keap1 and Nrf2 in VC rats

凋亡细胞百分比明显增加,差异具有统计学意义(P<0.05)。见图6、表9。

表6 强精片对VC大鼠Keap1、Nrf2蛋白表达影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Qiangjing tablets on protein expression of Keap1 and Nrf2 in VC rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1/ β -actin	Nrf2/ β -actin
空白组		1.10±0.09	1.06±0.07
模型组		3.11±0.28 ¹⁾	0.64±0.04 ¹⁾
强精片低剂量组	0.23	2.78±0.24	0.75±0.06
强精片中剂量组	0.46	1.58±0.17 ²⁾	1.19±0.11 ²⁾
强精片高剂量组	0.92	0.88±0.08 ²⁾	1.11±0.06 ²⁾
迈之灵组	0.061 7	1.75±0.14 ²⁾	0.69±0.06

3.4 强精片含药血清对VC体外模型的干预及影响
与空白组比较,模型组培养基上清液中的T浓度显著降低(P<0.01);与模型组比较,强精片中、高剂量组和迈之灵组培养基上清中的T含量明显升高(P<0.05),见表10。此外,模型组生精小管变性坏死,生精上皮结构紊乱,生精细胞胞浆呈嗜酸性,核浓缩,大量生精细胞坏死,核碎裂,组织内可见细胞碎片分布,强精片中、高剂量组可见少量生精细胞变性脱落,见图7。与模型组比较,强精片各剂量组凋亡细胞的百分比明显降低(P<0.05),见图8、表11。与强精片高剂量组比较,强精片高剂量+Nrf2抑制剂组T含量、凋亡细胞的百分比明显降低(P<0.05)。

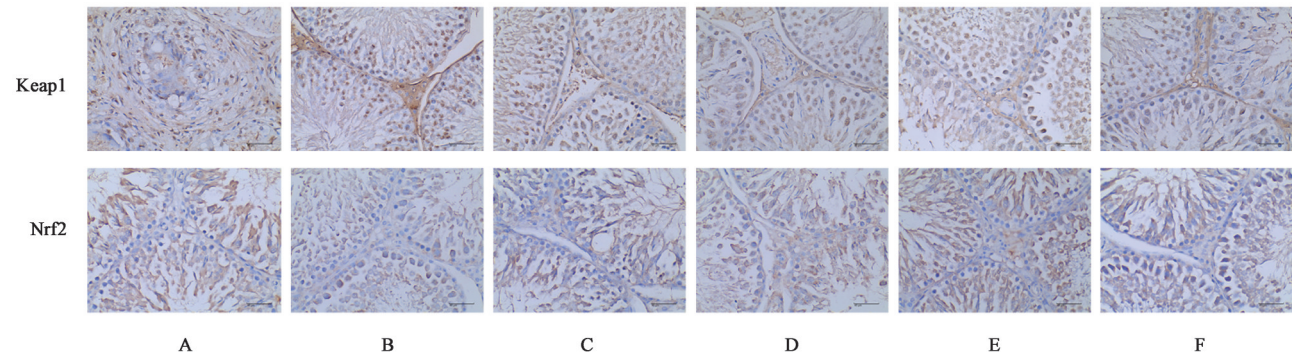


图3 强精片对VC大鼠睾丸组织中Keap1和Nrf2阳性表达的影响(免疫组化,×400)

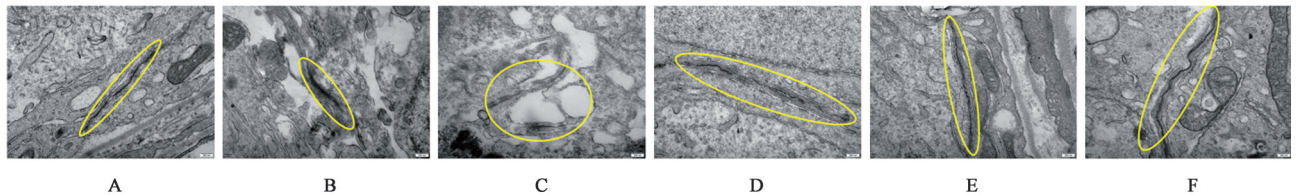
Fig. 3 Effect of Qiangjing tablets on positive expression of Keap1 and Nrf2 in testicular tissues of VC rats (IHC, ×400)

表 7 强精片对 VC 大鼠睾丸组织中 Keap1、Nrf2、HO-1、Nqo1、Gsta2、Gstm1、Txnrd1 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Qiangjing tablets on mRNA expression of Keap1, Nrf2, HO-1, Nqo1, Gsta2, Gstm1, and Txnrd1 in testicular tissues of VC rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1	Nrf2	HO-1	Nqo1	Gsta2	Gstm1	Txnrd1
空白组		1.00±0.02	1.00±0.03	1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.02	1.00±0.06	1.00±0.03
模型组		1.22±0.06 ¹⁾	0.87±0.05 ¹⁾	0.91±0.06 ¹⁾	0.80±0.04 ¹⁾	0.63±0.02 ¹⁾	0.81±0.04 ¹⁾	0.78±0.02 ¹⁾
强精片低剂量组	0.23	0.99±0.04 ²⁾	1.09±0.05 ²⁾	1.23±0.04 ²⁾	1.09±0.05 ²⁾	1.38±0.04 ²⁾	1.32±0.07 ²⁾	0.92±0.05 ²⁾
强精片中剂量组	0.46	0.91±0.03 ²⁾	1.24±0.05 ²⁾	1.33±0.02 ²⁾	1.07±0.04 ²⁾	1.52±0.05 ²⁾	1.21±0.06 ²⁾	0.94±0.05 ²⁾
强精片高剂量组	0.92	0.98±0.03 ²⁾	1.25±0.04 ²⁾	1.30±0.02 ²⁾	1.09±0.04 ²⁾	1.29±0.10 ²⁾	1.23±0.09 ²⁾	0.92±0.01 ²⁾
迈之灵组	0.061 7	1.00±0.03 ²⁾	1.16±0.03 ²⁾	1.24±0.05 ²⁾	1.02±0.04 ²⁾	1.04±0.03 ²⁾	0.94±0.06	1.07±0.04 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.01



注:黄色圆圈表示血睾屏障结构

图 4 强精片对 VC 大鼠睾丸组织血睾屏障结构的影响(TEM, ×50 000)

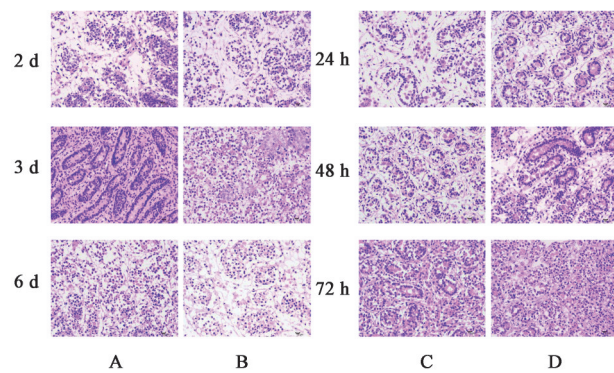
Fig. 4 Effect of Qiangjing tablets on blood-testis barrier structure in testicular tissue of VC rats (TEM, ×50 000)

表 8 不同培养条件对 T 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of different cultivation conditions on concentration of T ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	2 d	3 d	6 d	24 h	48 h	72 h	ng·L ⁻¹
10% 空白血清+常氧培养组	36.76±3.15	66.22±2.71	33.93±3.63	-	-	-	
10%ELV 血清+常氧培养组	31.37±2.37	53.60±5.28 ¹⁾	27.56±2.29	-	-	-	
10% 空白血清+低氧培养组	-	-	-	24.89±3.31	33.93±3.63	55.46±3.59	
10%ELV 血清+低氧培养组	-	-	-	21.23±3.17	21.23±4.02 ¹⁾	41.04±4.77 ¹⁾	

注:与 10% 空白血清+常氧培养组比较¹⁾P<0.05



注:A.10% 空白血清+常氧培养组;B.10%ELV 血清+常氧培养组;C.10% 空白血清+低氧培养组;D.10%ELV 血清+低氧培养组(图6同)

图 5 不同培养条件对睾丸组织病理的影响(HE, ×400)

Fig. 5 Effect of different cultivation conditions on histology of testicular tissue (HE, ×400)

3.5 强精片含药血清对 VC 体外模型 ROS、Keap1 和 Nrf2 水平的影响 与空白组比较,模型组睾丸组

织中 ROS 的含量显著增加($P<0.01$),与模型组比较,强精片各剂量组和迈之灵组 ROS 含量明显降低($P<0.05$),见表 12 及增强出版附加材料。与空白组比较,模型组睾丸组织中 Keap1 表达显著增强($P<0.01$),Nrf2 表达显著减弱($P<0.01$);与模型组比较,强精片中、高剂量组和迈之灵组睾丸组织中 Keap1 表达明显增强($P<0.05$),Nrf2 表达明显减弱($P<0.05$),见表 12、图 9。此外,与空白组比较,模型组 Keap1 的 mRNA 和蛋白质表达显著增加($P<0.01$),Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1 的 mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,强精片中、高剂量组和迈之灵组 Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1 和 Txnrd1 的 mRNA 和蛋白表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与强精片高剂量组比较,Nrf2 抑制剂(ML 385)抑制了强精片高剂量组的干预作用($P<0.05$),见表 13、图 10、表 14。

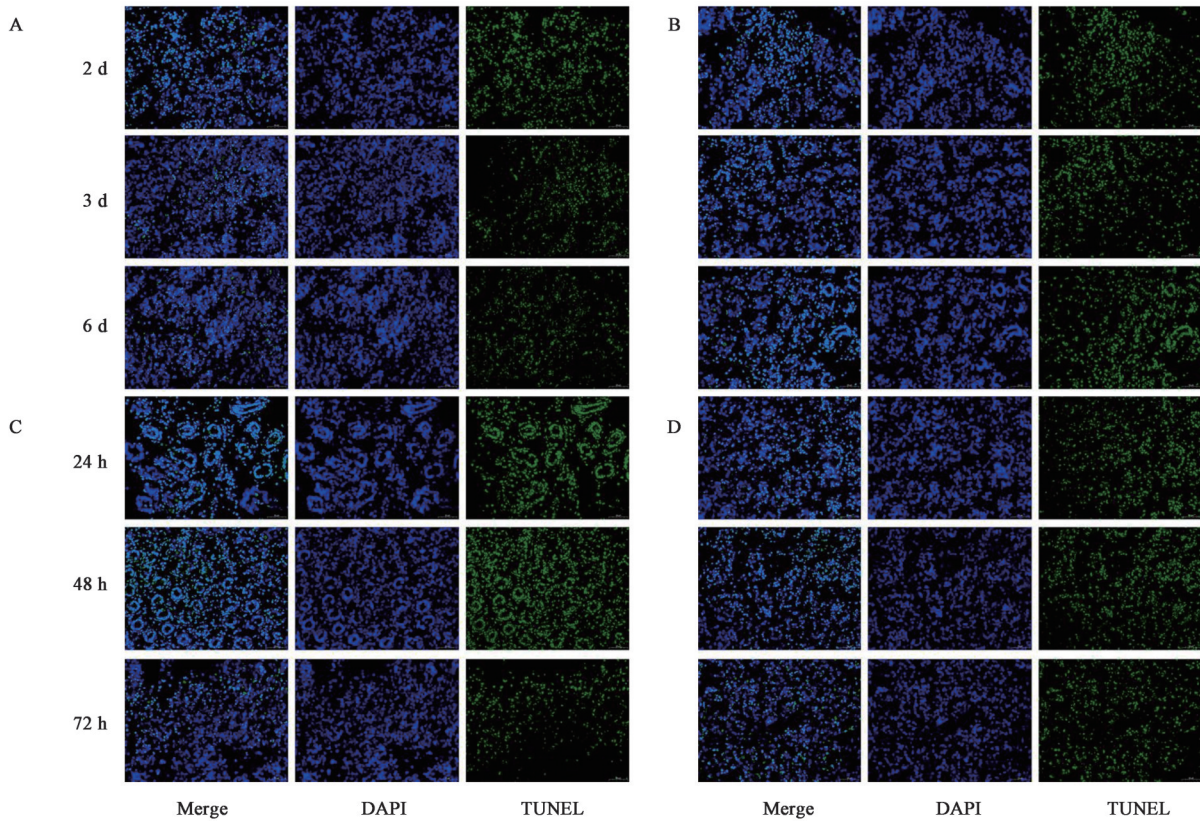


图6 不同培养条件对睾丸组织中凋亡细胞的影响 (TUNEL, ×400)

Fig. 6 Effect of different culture conditions on apoptotic cells in testicular tissue (TUNEL, ×400)

表9 不同培养条件对睾丸组织凋亡细胞百分比的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of different culture conditions on percentage of apoptotic cells in testicular tissue ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡细胞占比/%
10%空白血清+常氧培养组 6 d	46.25±18.25
10%ELV血清+常氧培养组 6 d	73.20±0.18 ¹⁾
10%空白血清+低氧培养组 72 h	48.04±24.57
10%ELV血清+低氧培养组 72 h	75.94±9.72 ²⁾

注:与10%空白血清+常氧培养组比较¹⁾ $P < 0.05$;与10%空白血清+低氧培养组比较²⁾ $P < 0.05$

4 讨论

中医认为VC的核心病机在于肾气亏虚、血液瘀滞^[14]。四川独特的地理气候与饮食习惯,使男性更易因湿邪困阻、阳气郁遏,加重气血瘀滞之势。川派男科常德贵教授团队洞察此中奥秘,秉持“补肾活血”之法,立足经典,推陈出新,拟定强精片,由人参、当归、枸杞子、菟丝子、车前子、淫羊藿、仙茅、益母草组成,方中人参、枸杞子、菟丝子补肾填精,固本培元;当归、益母草活血化瘀,通络祛浊;车前子利湿通淋,导热下行;仙茅、淫羊藿温肾壮阳,振奋阳气以推动气血运行,契合川派火神学术思想,彰显重视阳气之特色;兼以枸杞子、菟丝子平补肝

表10 强精片含药血清对VC体外模型中T浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

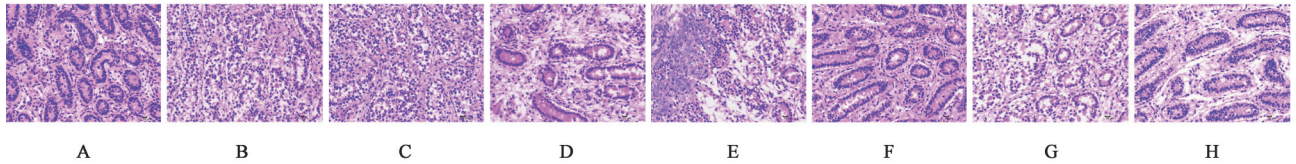
Table 10 Effect of drug-containing serum in Qiangjing tablets on concentration of T in VC *in vitro* model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	T/ng·L ⁻¹
空白组		66.21±3.29
模型组		41.15±5.65 ¹⁾
阴性血清对照组		42.19±3.76
强精片低剂量组	2.3 g·kg ⁻¹	49.55±2.61
强精片中剂量组	4.6 g·kg ⁻¹	50.33±3.66 ²⁾
强精片高剂量组	9.2 g·kg ⁻¹	57.33±3.21 ²⁾
强精片高剂量+Nrf2抑制剂组	9.2 g·kg ⁻¹ +5 μmol·L ⁻¹	49.55±2.61 ³⁾
迈之灵组	617 mg·kg ⁻¹	59.04±3.02 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与强精片高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表11-表14同)

肾,既防温燥伤阴,又达“阴中求阳”之效。体现川派男科善用温补、因势利导的精妙治法,更将川派“因地制宜”的用药理念融入其中,经临床实践验证,强精片在改善生精功能方面疗效显著^[15-17]。

本研究探究了强精片通过调控Keap1/Nrf2信号通路减轻氧化应激改善精索静脉曲张生精功能损伤。在本研究中,通过观察左肾的形态、LSV和睾丸的组织病理学变化,证实了通过部分结扎左肾



注:A.空白组;B.模型组;C.阴性血清对照组;D.强精片低剂量组;E.强精片中剂量组;F.强精片高剂量组;G.强精片高剂量+Nrf2抑制剂组;H.迈之灵组(图8-图10同)

图7 强精片含药血清对VC体外模型睾丸组织病理的影响(HE,×400)

Fig. 7 Effect of drug-containing serum of Qiangjing tablets on pathological changes of testicular tissue in *in vitro* model of VC (HE, ×400)

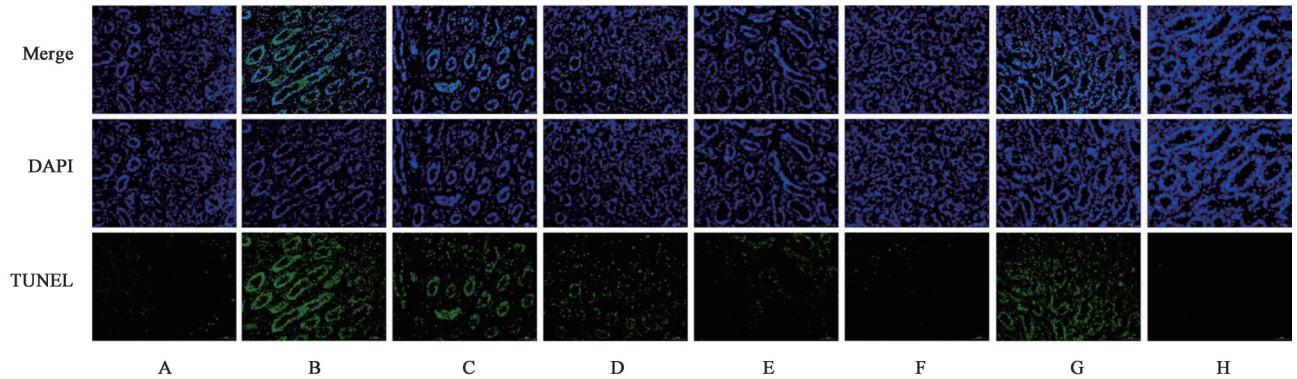


图8 强精片含药血清对VC体外模型睾丸组织内凋亡细胞百分比的影响(TUNEL,×400)

Fig. 8 Effect of drug-containing serum in Qiangjing tablets on percentage of apoptotic cells in testicular tissue of VC *in vitro* model (TUNEL, ×400)

表11 强精片含药血清对VC体外模型睾丸组织内凋亡细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of drug-containing serum in Qiangjing tablets on percentage of apoptotic cells in testicular tissue of VC *in vitro* model ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	凋亡细胞 /%
空白组		1.35±0.58
模型组		57.38±14.44 ¹⁾
阴性血清对照组		54.86±8.89
强精片低剂量组	2.3 g·kg ⁻¹	25.55±8.78 ²⁾
强精片中剂量组	4.6 g·kg ⁻¹	3.04±2.90 ²⁾
强精片高剂量组	9.2 g·kg ⁻¹	0.46±0.32 ²⁾
强精片高剂量+Nrf2抑制剂组	9.2 g·kg ⁻¹ +5 μmol·L ⁻¹	39.68±3.01 ³⁾
迈之灵组	617 mg·kg ⁻¹	0.19±0.04 ²⁾

静脉模仿人类胡桃夹综合征可以建立可靠的VC模型大鼠^[18]。此外,VC体外实验模型目前研究较少,可参考的方法也极其有限,在传统的细胞培养方法中,特别是细胞之间存在相互作用的情况下,单一类型细胞培养法往往难以反映他们在生物体中真实发生的增殖和分化状态。为了克服传统方法的局限性,本研究采用Transwell培养,可以允许细胞在相对独立的空间中进行交流,避免直接接触可能造成的干扰^[19],最终发现在Transwell培养方法的基

础上增加10%ELV血清+低氧培养72h与VC疾病的病理状态高度一致^[20],这为后续实验奠定了基础。

对VC导致男性不育的潜在机制研究表明,氧化应激、缺氧状态产生大量ROS损伤极为关键^[21]。精索静脉中血液的瘀滞状态可以导致炎症因子增加,激活炎症反应、白细胞聚集和ROS的产生,最终导致机体总抗氧化能力的降低^[22]。VC患者精液中的总ROS和超氧阴离子水平明显升高,与精液参数呈负性相关,与此同时,细胞内ROS水平与生殖细胞凋亡呈正相关^[23-24]。此外,过量ROS还会损害血睾屏障、精子质膜和精子DNA完整性,细胞内线粒体的正常生理功能也受到损伤,进而加剧ROS的产生,形成恶性循环^[25]。在本研究中,证实了VC疾病状态会导致ROS和氧化应激损伤显著增加,导致血睾屏障损伤和生精细胞凋亡,而强精片可以降低睾丸内氧化应激水平和细胞凋亡。

Keap1/Nrf2信号通路作为一种重要的细胞内信号通路在男性不育研究中受到了广泛关注,该通路通过调节抗氧化、抗凋亡和抗炎反应等关键生物过程,在维持生殖系统的正常功能方面发挥着重要作用^[26-27]。前期研究表明,强精片能够激活Keap1/Nrf2信号通路,增加Nrf2的活性,随后,与抗氧化反

表 12 强精片含药血清对 VC 体外模型 ROS 荧光强度及 Keap1 和 Nrf2 阳性区域面积占比的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 12 Effect of drug-containing serum of Qiangjing tablets on fluorescence intensity of ROS and proportion of Keap1 and Nrf2 positive area in *in vitro* model of VC ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	ROS 平均荧光强度	Keap1/%	Nrf2/%
空白组		11 894.50±391.80	19.38±1.22	43.39±1.76
模型组		36 334.50±635.80 ¹⁾	39.63±3.21 ¹⁾	17.95±2.78 ¹⁾
阴性血清对照组		36 084.90±1 360.90	40.05±3.56	14.72±2.16
强精片低剂量组	2.3 g·kg ⁻¹	25 008.20±1 046.80 ²⁾	34.01±2.26	26.59±2.15 ²⁾
强精片中剂量组	4.6 g·kg ⁻¹	20 567.20±279.30 ²⁾	32.71±3.30 ²⁾	31.04±1.46 ²⁾
强精片高剂量组	9.2 g·kg ⁻¹	17 265.10±2 014.80 ²⁾	26.53±4.06 ²⁾	35.83±1.58 ²⁾
强精片高剂量+Nrf2 抑制剂组	9.2 g·kg ⁻¹ +5 μmol·L ⁻¹	30 746.70±254.70 ³⁾	25.54±3.04 ³⁾	18.03±1.69 ³⁾
迈之灵组	617 mg·kg ⁻¹	17 687.60±303.90 ²⁾	28.09±4.77 ²⁾	35.06±1.44 ²⁾

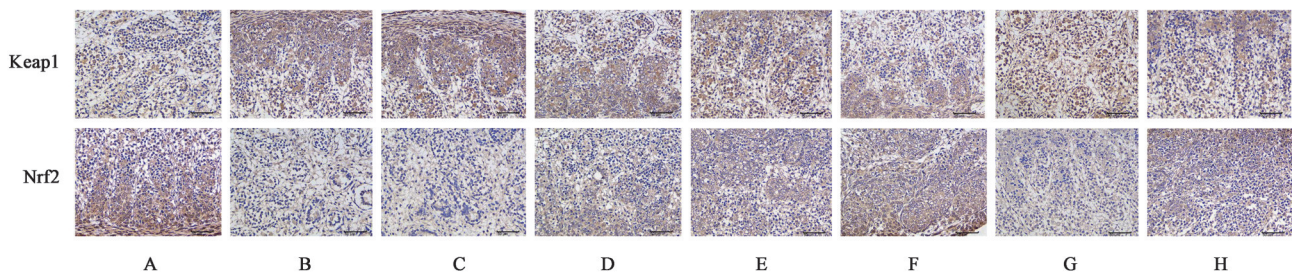


图 9 强精片含药血清对 VC 体外模型 Keap1 和 Nrf2 阳性区域面积占比的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 9 Effect of drug-containing serum in Qiangjing tablets on percentage of positive areas of Keap1 and Nrf2 in VC *in vitro* model(IHC, ×400)

表 13 强精片含药血清对 VC 体外模型 Keap1、Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1、Txnrd1 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 13 Effect of drug-containing serum of Qiangjing tablets on mRNA expression of Keap1, Nrf2, Gsta2, Gstm1, HO-1, Nqo1, and Txnrd1 in VC *in vitro* model ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	Keap1	Nrf2	Gsta2	Gstm1	HO-1	Nqo1	Txnrd1
空白组		1.01±0.18	1.02±0.26	1.00±0.07	1.00±0.14	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.06
模型组		2.81±0.32 ¹⁾	0.57±0.14 ¹⁾	0.46±0.12 ¹⁾	0.52±0.13 ¹⁾	0.26±0.04 ¹⁾	0.57±0.06 ¹⁾	0.92±0.19
阴性血清对照组		2.86±0.56	0.55±0.24	0.52±0.23	0.51±0.17	0.26±0.09	0.52±0.18	0.91±0.42
强精片低剂量组	2.3 g·kg ⁻¹	2.08±0.33 ²⁾	0.85±0.14	0.76±0.18 ²⁾	0.77±0.11	0.49±0.10 ²⁾	0.90±0.19 ²⁾	1.72±0.11 ²⁾
强精片中剂量组	4.6 g·kg ⁻¹	1.51±0.13 ²⁾	1.02±0.30 ²⁾	0.87±0.13 ²⁾	0.90±0.03 ²⁾	0.61±0.06 ²⁾	1.20±0.21 ²⁾	1.88±0.27 ²⁾
强精片高剂量组	9.2 g·kg ⁻¹	1.35±0.19 ²⁾	1.46±0.21 ²⁾	1.39±0.14 ²⁾	1.64±0.38 ²⁾	0.74±0.15 ²⁾	1.61±0.20 ²⁾	2.88±0.48 ²⁾
强精片高剂量+Nrf2 抑制剂组	9.2 g·kg ⁻¹ +5 μmol·L ⁻¹	1.28±0.30	0.74±0.16 ³⁾	0.66±0.26 ³⁾	0.64±0.23 ³⁾	0.37±0.04 ³⁾	0.69±0.17 ³⁾	1.44±0.17 ³⁾
迈之灵组	617 mg·kg ⁻¹	1.32±0.16 ²⁾	1.64±0.44 ²⁾	1.48±0.17 ²⁾	1.57±0.24 ²⁾	0.72±0.16 ²⁾	1.78±0.11 ²⁾	3.09±0.21 ²⁾

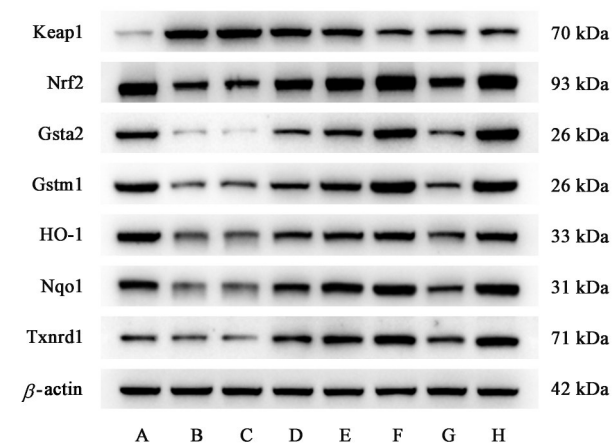


图 10 VC 体外模型中 Keap1/Nrf2 信号通路蛋白表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of protein expression of Keap1/Nrf2 signaling pathway in an *in vitro* model of VC

应元件(ARE)结合,从而触发并调控增强通路下游抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等的表达,提升弱精子症模型大鼠精子数量、活力,降低精子畸形率^[28]。此外,Keap1/Nrf2 信号通路的激活诱导大量下游抗氧化应激保护基因的转录表达,如 HO-1、谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)、Nqo1 和 Txnrd1,从而抵抗各种刺激引起的机体氧化应激损伤^[29]。在本研究中,通过体内、体外实验证实,强精片能够下调 Keap1,上调 Nrf2 的表达,激活和启动该途径下游抗氧化基因的转录表达,上调 Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1 和 Txnrd1 的水平以发挥抗氧化应激作用,这表明强精片可以通过 Keap1/Nrf2 信号通路减少 VC 中氧化应激损伤,进

表14 强精片含药血清对VC体外模型Keap1、Nrf2、Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1、Txnrd1的蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 14 Effect of drug-containing serum of Qiangjing tablets on protein expression of Keap1, Nrf2, Gsta2, Gstm1, HO-1, Nqo1, and Txnrd1 in VC *in vitro* model ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	Keap1 / β -actin	Nrf2 / β -actin	Gsta2 / β -actin	Gstm1 / β -actin	HO-1 / β -actin	Nqo1 / β -actin	Txnrd1 / β -actin
空白组		1.00±0.33	1.00±0.13	1.00±0.18	1.00±0.14	1.00±0.05	1.00±0.15	0.99±0.01
模型组		18.58±1.01 ¹⁾	0.41±0.03 ¹⁾	0.08±0.01 ¹⁾	0.14±0.01 ¹⁾	0.19±0.03 ¹⁾	0.27±0.07 ¹⁾	0.57±0.10 ¹⁾
阴性血清对照组		19.57±0.48	0.39±0.07	0.08±0.06	0.15±0.06	0.19±0.03	0.34±0.08	0.55±0.06
强精片低剂量组	2.3 g·kg ⁻¹	15.56±0.92 ²⁾	0.84±0.12 ²⁾	0.47±0.10 ²⁾	0.54±0.06 ²⁾	0.46±0.02 ²⁾	0.84±0.04 ²⁾	2.09±0.27 ²⁾
强精片中剂量组	4.6 g·kg ⁻¹	11.87±1.01 ²⁾	1.06±0.08 ²⁾	0.77±0.15 ²⁾	0.89±0.12 ²⁾	0.66±0.09 ²⁾	1.20±0.03 ²⁾	3.25±0.30 ²⁾
强精片高剂量组	9.2 g·kg ⁻¹	5.99±0.67 ²⁾	1.30±0.11 ²⁾	1.37±0.12 ²⁾	1.52±0.13 ²⁾	0.87±0.08 ²⁾	1.49±0.10 ²⁾	4.42±0.23 ²⁾
强精片高剂量+Nrf2抑制剂组	9.2 g·kg ⁻¹ +5 μ mol·L ⁻¹	5.68±0.51	0.63±0.10 ³⁾	0.32±0.03 ³⁾	0.34±0.04 ³⁾	0.37±0.03 ³⁾	0.54±0.11 ³⁾	1.23±0.24 ³⁾
迈之灵组	617 mg·kg ⁻¹	5.11±0.75 ²⁾	1.20±0.01 ²⁾	1.59±0.08 ²⁾	1.44±0.08 ²⁾	0.89±0.07 ²⁾	1.56±0.06 ²⁾	4.67±0.34 ²⁾

而改善生精功能,本实验强精片作用机制见增强出版附加材料。

综上所述,强精片基于四川“湿热易蕴、血瘀易生”地域特征,以“补肾活血、清热利湿”为治则,彰显川派辨证施治的地域特色,为VC提供了具有鲜明地域特色的中医治疗方案。本研究表明强精片通过靶向调控Keap1/Nrf2信号通路,下调Keap1表达,上调Nrf2和抗氧化应激基因(Gsta2、Gstm1、HO-1、Nqo1等)的表达,降低VC睾丸组织细胞内氧化应激水平,进一步修复血睾屏障损伤,恢复生精功能。目前本实验主要从Keap1/Nrf2信号通路及氧化应激方面进行探讨,之后将进一步从氧化应激其他角度进行挖掘,为强精片的临床应用提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BELLASTELLA G, CAROTENUTO R, CAIAZZO F, et al. Varicocele: An endocrinological perspective[J]. Front Reprod Health, 2022, 4: 863695.

[2] FALLARA G, CAPOGROSSO P, POZZI E, et al. The effect of varicocele treatment on fertility in adults: A systematic review and Meta-analysis of published prospective trials[J]. Eur Urol Focus, 2023, 9(1): 154-161.

[3] CAI B, SUN D, DENG W, et al. Mendelian randomization analysis and validation supports MEGF9 and MLLT11 as potential targets for the treatment of varicocele and male infertility[J]. Front Endocrinol, 2024, 15: 1416384.

[4] ZHIMIN C, MINGYUE A O, YUJIAO L, et al. Wuzi Yanzong prescription from traditional Chinese medicine for male infertility: A narrative review [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 43(2): 416-428.

[5] LI G, XU Y, LI Y, et al. Qiangjing tablets ameliorate asthenozoospermia via mitochondrial ubiquitination and

mitophagy mediated by LKB1/AMPK/ULK1 signaling [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 271-280.

[6] SHEN Y, YOU Y, ZHU K, et al. The traditional Chinese medicine Qiangjing tablet prevents blood-testis barrier injury induced by CdCl₂ through the PI3K/Akt/Rictor signaling pathway[J]. Environ Toxicol, 2023, 38(3): 591-603.

[7] WANG K, GAO Y, WANG C, et al. Role of oxidative stress in varicocele[J]. Front Genet, 2022, 13: 850114.

[8] QIAO P, ZHANG Y, YANG Y, et al. Oral isoniazid causes oxidative stress, oocyte deterioration and infertility in mice [J]. Toxicol, 2021, 455: 152749.

[9] KURIBAYASHI S, FUKUHARA S, KITAKAZE H, et al. KEAP1-NRF2 system regulates age-related spermatogenesis dysfunction[J]. Reprod Med Biol, 2024, 23(1): e12595.

[10] JIN Y S, CUI Y Q, XU Y P, et al. Activating transcription factor 6 mediates inflammation in experimental varicocele-induced epididymal epithelial cells[J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 7261-7274.

[11] LI G, ZHANG P, YOU Y, et al. Qiangjing tablets regulate apoptosis and oxidative stress via Keap/Nrf2 pathway to improve the reproductive function in asthenospermia rats[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 714892.

[12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.

CHEN Q. Methods in Pharmacological Research on Traditional Chinese Medicine [M]. 3rd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011.

[13] 尧冰, 韩大愚, 邓春华, 等. 青春期大鼠左侧精索静脉的解剖变异及其在实验性左侧精索静脉曲张模型中的运用[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(06): 505-509.

YAO B, HAN D Y, DENG C H, et al. Anatomical variability of the left spermatic vein and establishment of the experimental left varicocele model in adolescent rats [J]. Chin J Androl, 2014, 20(06): 505-509.

[14] 严旭洪, 陈帝昂, 尤耀东, 等. 强精片对初老雄性大鼠精子质量及雄激素生成、利用的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(12): 1482-1487.

- YAN X H, CHEN D A, YOU Y D, et al. Effects of Qiangjing tablets on sperm quality, androgen production and utilization in pre-aging male rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2024, 44(12): 1482-1487.
- [15] 尤耀东, 张玲, 朱坤, 等. 强精片对睾丸支持细胞Toll样受体信号通路的作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(11): 1363-1368.
- YOU Y D, ZHANG L, ZHU K, et al. Effects of Qiangjing tablets for Toll-like receptor signaling pathway in testicular support cells[J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 42(11): 1363-1368.
- [16] 申毅锋, 朱俊龙, 张静益, 等. 强精片对氯化镉致雄性小鼠血睾屏障损伤的保护作用[J]. *陕西中医药大学学报*, 2025, 48(3): 22-31.
- SHEN Y F, ZHU J L, ZHANG J Y, et al. Protective effect of Qiangjing tablet on the blood-testis barrier in male mice from the perspective of preventive treatment of disease [J]. *J Shaanxi Univ Chin Med*, 2025, 48(3): 22-31.
- [17] LI J, YOU Y, ZHANG P, et al. Qiangjing tablets repair of blood-testis barrier dysfunction in rats via regulating oxidative stress and p38 MAPK pathway [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 133.
- [18] ZHANG L, ZHAO X, WANG W. Disruption of anchoring junctions in the testes of experimental varicocele rats [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 887.
- [19] LAMBROT R, COFFIGNY H, PAIRAULT C, et al. Use of organ culture to study the human fetal testis development: Effect of retinoic acid [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(7): 2696-2703.
- [20] SAULNIER J, SOIREY M, KÉBIR N, et al. Complete meiosis in rat prepubertal testicular tissue under *in vitro* sequential culture conditions [J]. *Andrology*, 2023, 11(1): 167-176.
- [21] LAI T C, ROYCHOUDHURY S, CHO C L. Oxidative stress and varicocele-associated male infertility [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1358: 205-235.
- [22] FINELLI R, LEISEGANG K, KANDIL H, et al. Oxidative stress: A comprehensive review of biochemical, molecular, and genetic aspects in the pathogenesis and management of varicocele [J]. *World J Mens Health*, 2022, 40(1): 87-103.
- [23] SUN T C, LI D M, YU H, et al. Bilateral varicocele leads to ferroptosis, pyroptosis and necroptosis of human spermatozoa and affects semen quality in infertile men [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1091438.
- [24] SWAIN N, SAMANTA L, GOSWAMI C, et al. TRPV1 channel in spermatozoa is a molecular target for ROS-mediated sperm dysfunction and differentially expressed in both natural and ART pregnancy failure [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 867057.
- [25] TANG L, GUO X, WEN S, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress mediate testicular injury in a rat model of varicocele [J]. *Reprod Sci*, 2025, 32(5): 1589-1599.
- [26] SHAN W, LU S, OU B, et al. PACAP ameliorates the fertility of obese mice through PAC1/PKA/ERK/Nrf2 signal axis [J]. *J Endocrinol*, 2021, 248(3): 337-354.
- [27] LIU S, PI J, ZHANG Q. Signal amplification in the KEAP1-Nrf2-ARE antioxidant response pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102389.
- [28] LI G, ZHANG P, YOU Y, et al. Qiangjing tablets regulate apoptosis and oxidative stress via Keap/Nrf2 pathway to improve the reproductive function in asthenospermia rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 714892.
- [29] TU W, WANG H, LI S, et al. The anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(3): 637-651.

[责任编辑 孙丛丛]