

疏肝补肾毓麟汤调节VDAC2基因甲基化影响弱精症大鼠精子 线粒体功能改善精子质量

萧闵, 王威, 魏巍, 周艳艳, 陈曙辉, 姜兴宇, 赵敏, 曹继刚*
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的:明确疏肝补肾毓麟汤抑制电压依赖性阴离子通道2(VDAC2)基因甲基化,通过环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)通路,调节线粒体功能,提高精子活力的作用机制。方法:雄性SD大鼠40只随机分成空白组、模型组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量组及左卡尼汀组,每组8只。采用腺嘌呤(0.05 g·kg⁻¹)灌胃14 d,复制少弱精症大鼠模型;疏肝补肾毓麟汤组给予疏肝补肾毓麟汤高、低剂量(32.4, 8.1 g·kg⁻¹)灌胃;左卡尼汀组予以左卡尼汀(0.27 g·kg⁻¹)灌胃。全自动精子分析仪检测精子活力;苏木素-伊红(HE)染色观察睾丸组织病理形态学变化;流式细胞法检测精子线粒体膜电位差;免疫荧光法检测睾丸VDAC2的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测睾丸组织VDAC2 mRNA表达;亚硫酸氢盐测序法检测睾丸组织VDAC2基因甲基化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测睾丸组织cAMP表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸组织PKA蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组精子密度及活动率均显著降低($P<0.01$),线粒体膜电位显著增高($P<0.01$),睾丸组织VDAC2的mRNA及蛋白,PKA蛋白,cAMP含量均显著降低($P<0.01$),VDAC2甲基化程度显著增高($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量组精子密度及活动率、线粒体膜电位均显著升高($P<0.01$),睾丸组织VDAC2的mRNA及蛋白,PKA蛋白,cAMP含量均显著升高($P<0.01$),VDAC2甲基化程度显著降低($P<0.01$);与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤低剂量组精子密度及活动率、线粒体膜电位均显著降低($P<0.01$),睾丸组织VDAC2的mRNA及蛋白,PKA蛋白,cAMP含量表达均显著降低($P<0.01$),VDAC2甲基化程度显著升高($P<0.01$)。结论:疏肝补肾毓麟汤可能通过抑制VDAC2基因甲基化,增加VDAC2表达,调节cAMP/PKA通路,改变线粒体膜电位增强精子活力。

[关键词] 弱精症; 疏肝补肾毓麟汤; 电压依赖性阴离子通道2; 甲基化; 线粒体膜电位

[中图分类号] R2-0;R289;R33;Q954.43+4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0072-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212338

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211018.1635.008.html>

[网络出版日期] 2021-10-19 10:22

Shugan Bushen Yulin Decoction Regulates VDAC2 Gene Methylation to Affect Sperm Mitochondrial Function and Improve Sperm Quality in Asthenospermia Rats

XIAO Min, WANG Wei, WEI Wei, ZHOU Yan-yan, CHEN Shu-hui, JIANG Xing-yu,
ZHAO Min, CAO Ji-gang*

(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Shugan Bushen Yulin decoction in inhibiting voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC2) gene methylation, affecting sperm mitochondrial function, and improving sperm motility through the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway. **Method:** Forty male SD rats were randomly divided into the blank group, model group, high- and low-dose Shugan Bushen Yulin decoction groups, and L-carnitine group, with eight rats in each group.

[收稿日期] 20210824(003)

[基金项目] 2021湖北中医药大学科研团队建设项目;第四批全国中医优秀人才研修项目(国中医药人教发[2017]24号);武汉市中青年中医名医项目(武卫[2019]17号);湖北省卫计委资助项目(81ZY2019F047)

[第一作者] 萧闵,博士,副研究员,从事中医基础理论及藏象学说(不孕不育方向)研究,E-mail:531637551@qq.com

[通信作者] *曹继刚,博士,教授,主任医师,从事中医基础理论及藏象学说(不孕不育方向)研究,E-mail:774941339@qq.com

Adenine ($0.05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) was administered by gavage for 14 d for inducing oligospermia and asthenospermia. Rats in the Shugan Bushen Yulin decoction groups were treated with intragastric administration of 32.4 , $8.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Shugan Bushen Yulin decoction, respectively, while those in the L-carnitine group received $0.27 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ L-carnitine by gavage. Following the measurement of sperm motility using an automatic sperm analyzer, the pathological changes in testicular tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Sperm mitochondrial membrane potential was detected by flow cytometry. The expression of VDAC2 in the testicular tissue was determined by immunofluorescence assay. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was conducted for detecting VDAC2 mRNA expression in testicular tissue. The methylation of VDAC2 gene was examined using bisulfite sequencing. The cAMP expression in testicular tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the PKA protein expression in testicular tissue by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group exhibited significantly decreased sperm density and motility ($P<0.01$), increased mitochondrial membrane potential ($P<0.01$), down-regulated VDAC2 mRNA and protein expression, PKA protein expression, and cAMP content in testicular tissue ($P<0.01$), and elevated VDAC2 gene methylation ($P<0.01$). Compared with the model group, L-carnitine and Shugan Bushen Yulin decoction at the high and low doses all remarkably increased the sperm density and motility and mitochondrial membrane potential ($P<0.01$), up-regulated VDAC2 mRNA and protein expression, PKA protein expression, and cAMP content in the testicular tissue ($P<0.01$), and lowered the methylation of VDAC2 in testicular tissue ($P<0.01$). The comparison with the L-carnitine group showed that the sperm density and motility and mitochondrial membrane potential in the low-dose Shugan Bushen Yulin decoction group declined significantly ($P<0.01$). The VDAC2 mRNA and protein expression, PKA protein expression, and cAMP content in the testicular tissue were significantly down-regulated ($P<0.01$), while the methylation of VDAC2 was significantly enhanced ($P<0.01$). **Conclusion:** Shugan Bushen Yulin decoction may inhibit VDAC2 gene methylation, increase VDAC2 expression, regulate cAMP/PKA pathway, and change mitochondrial membrane potential to enhance the sperm motility.

[Keywords] asthenospermia; Shugan Bushen Yulin decoction; voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC2); methylation; mitochondrial membrane potential

弱精症(AS)指精液向前运动的精子小于50%,或a级(快速前向)运动的精子<25%的病症,又称精子活力低下,是70%~80%男性不育症的主要原因^[1]。近年来,受环境污染、滥用药物、不良生活方式、心理压力等因素影响,我国男性精液质量呈逐年下降趋势,不育症患病率持续递增^[2],防治AS已成为一项亟待重视与解决的挑战。有关AS的治疗,虽然辅助生殖技术能满足绝大多数AS患者的生育需求,但由于操作要求高、费用高,药物治疗仍是首选。目前,激素、抗氧化药物是临床上治疗AS的常用药物^[3],这些药物的疗效仍待于进一步评估,且药物的不良反应和副作用也不容忽视。因此,寻找安全有效的药物对于AS的防治是十分必要的。

AS中医治疗有一定优势,分析表明中药复方可促进前向运动精子的增加,增强精子活力提高妊娠率,总有效率优于西药^[4]。全国名医周安方根据多年临床经验,认为男科疾病,病位责之肝与肾,肝郁肾虚虚实夹杂,提出疏肝补肾法是其重要治疗大

法^[5],由此拟定疏肝补肾毓麟汤,疏肝补肾调高精子活力。前期临床实验证实,疏肝补肾毓麟汤可明显提高弱精子症患者的精子活力^[6],但其中机制尚不明确。

电压依赖性阴离子通道2(VDAC2)是线粒体外膜通道蛋白调控三磷酸腺苷(ATP),钙离子(Ca^{2+})的转运和交换,广泛分布于精子鞭毛中段,VDAC基因表达与精子活力呈正比^[7]。有研究发现,AS患者精液中VDAC2基因启动子区甲基化异常增加^[8],DNA甲基化是AS发生的重要机制之一,VDAC2基因出现甲基化修饰异常,可能影响能量代谢及相关的信号通路,导致AS发生^[9]。精子活力的调控机制十分复杂,目前普遍认为环磷酸腺苷/蛋白激酶(cAMP/PKA)信号通路可正向调节精子运动,在其中起重要作用^[10]。研究显示,知柏地黄汤上调VDAC2表达改善线粒体结构,提升精子活力^[11];五子衍宗丸提高 Ca^{2+} 浓度,cAMP含量改善精子活力^[12]。然而,中药复方是否通过调节VDAC2

基因的甲基化及cAMP/PKA通路治疗AS,尚无文献报道。本研究以VDAC2的DNA甲基化与Ca²⁺, cAMP/PKA通路为研究方向,探讨疏肝补肾毓麟汤改善AS可能的作用机制,为防治AS提供新的思路与实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠40只,体质量(199.21±8.70)g,购于三峡大学动物实验中心,合格证号SCXK(鄂)2017-0012,饲养于湖北中医药大学实验动物中心,饲养环境温度为(22±2)℃,相对湿度为50%~70%,适应性喂养1周后开展实验。本实验操作由湖北中医药大学动物实验伦理委员会批准,伦理批号HUCMS201909013。

1.2 药物与试剂 疏肝补肾毓麟汤由刺蒺藜15g,郁金15g,仙茅15g,生地黄20g,熟地黄20g,枸杞子15g,巴戟天15g,淫羊藿20g,菟丝子15g,肉苁蓉15g,鹿角胶(烊)10g,当归30g,黄芪30g,党参30g,川芎15g组成。所有饮片购于湖北中医药大学黄家湖医院药房,由湖北中医药大学周艳艳教授鉴定,根据《医疗机构中药煎药室管理规范》煎煮中药。先加入冷水(液面高出药物2cm),浸泡30min后煎煮第1次,取出药液;再加温水适量,进行第2次煎煮,取出药液。将2次药液混匀,旋转蒸发器,得生药含量为1.5g·mL⁻¹的汤剂。腺嘌呤(成都普利斯生物科技有限公司,DST190701-013);左卡尼汀口服液(东北制药集团沈阳第一制药有限公司生产,H19990372)。

DNA提取试剂盒,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒, TaKaRa Taq Hot Start DNA聚合酶,重亚硫酸盐DNA甲基化试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为DP304-02, DP209, DR007A, 151012343];线粒体膜电位试剂盒[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号abs9103];苏木素-伊红(HE)试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号G1001);TRIzol裂解液[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号15596026];荧光染料(SYBR Green Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司,批号Q111-02);兔多抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,杭州贤至生物科技有限公司,批号AB-P-R001);兔多抗VDAC2,兔多抗PKA(江苏亲科生物科技有限公司,批号分别为AF5397,AF7746);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物科技有限公司,批号BA1054);SYBR实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂,蛋白裂解液,超敏

发光液(ECL)(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为QPK-201,R0010,PE0010)。

1.3 仪器 CR21G型冷冻高速离心机(日本日立公司);DYCZ-40型电转仪(北京六一仪器厂);5900型Real-time PCR仪(美国ABI公司);E100型显微镜(日本尼康公司);NikonDS-U3成像系统(日本尼康公司);FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司);EDC-810型Real-time PCR仪(东胜创新生物科技有限公司);KZ-III-F型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);WLJY-9000型伟力彩色精子质量检测系统(北京伟力科技公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药 将SPF级40只SD雄性大鼠,适应性喂养7d后,随机数字法分为空白组,模型组,左卡尼汀组,疏肝补肾毓麟汤高、低剂量组,每组8只。腺嘌呤与阿拉伯胶干粉按1:10的比例,配制成50g·L⁻¹质量浓度腺嘌呤溶液(阿拉伯胶干粉为助溶剂)。空白组除外,其余组给予腺嘌呤(0.05g·kg⁻¹)灌胃(ig)14d,复制少弱精症大鼠模型,精子活力下降为模型成功标准^[13]。造模结束后,阳性药组给予左卡尼汀(0.27g·kg⁻¹)ig;疏肝补肾毓麟汤大鼠给药剂量根据参考文献^[6]临床给药剂量,按照体表面积换算,设计高、低剂量组(32.4, 8.1g·kg⁻¹),低剂量为临床等效剂量;疏肝补肾毓麟汤按10mL·kg⁻¹胃容量ig,连续4周。空白组、模型组ig等体积生理盐水。

2.2 全自动精子分析仪检测精子活力 2%戊巴比妥钠(0.035g·kg⁻¹)麻醉大鼠,取附睾头,放置于37℃预热磷酸盐缓冲液(PBS)中,37℃水浴锅孵育1h,制备精子悬液,200目筛过滤,分离精子与组织残片然后进行精子的密度和活动率分析。

2.3 HE染色观察睾丸形态评估生精功能 取左侧睾丸,4%多聚甲醛固定液固定48h后;梯度乙醇脱水;二甲苯1h进行透明;浸蜡1h,包埋;4μm切片后,脱蜡,HE染色,脱水,透明,中性树脂封片,光镜观察并拍照。每例标本镜下随机观察10个曲细精管断面,分别测定曲细精管内径D,管周膜厚度M,管壁生殖细胞层数P,生殖细胞成熟程度S,每个项目按0~5分评分,满分为20分,总分为TMS^[14]:曲细精管内径D(130≤D<160μm)5分,轻度缩小(100≤D<130μm)4分,中度缩小(75≤D<100μm)3分,明显缩小(50≤D<75μm)2分,重缩小(25≤D<50μm)1分,<25μm为0分;管周膜厚度M:正常<3μm(5分),轻度增生(3≤M<5μm)4分,中度增生

($5 \leq M < 7 \mu\text{m}$) 3分, 明显增厚($7 \leq M < 10 \mu\text{m}$) 2分, 严重增厚($10 \leq M < 13 \mu\text{m}$) 1分, $> 13 \mu\text{m}$ 为0分; 管壁生殖细胞层数 P: > 4 层(5分), 3~4层(4分), 2~3层(3分), 1~2层(2分), 1层(1分), 0层(0分); 生精细胞成熟程度 S: 成熟精子(5分), 阻滞在精子细胞阶段(4分), 阻滞在次级精母细胞(3分), 初级精母细胞(2分), 精原细胞(1分), 仅有支持细胞(0分)。

2.4 JC-1法检测精子线粒体膜电位差 取附睾头, 放置于37℃预热PBS, 37℃水浴锅孵育1h, 200目筛过滤, 制备精子悬液。采用血细胞计数器, 光镜下计算调整精子悬液浓度为 1×10^6 个/mL, 备用。取精子悬液0.5 mL, 严格按照JC-1线粒体膜电位试剂盒试剂配置样本, 使待测细胞均匀悬浮, 37℃, 5%CO₂的培养箱中培育15 min, Buffer液清洗2次, 第2次悬浮细胞, 流式细胞仪上机测试。

2.5 亚硫酸氢盐测序法检测睾丸组织VDAC2基因甲基化 使用UCSU网站 Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) 选取VDAC2基因甲基化岛区域为目标区域, 使用利用甲基化设计的网站 Meth Primer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>), 在线设计。引物序列为VDAC2 M: 上游5'-GTTTAGATTTAGTAGAGGAGGACG-3', 下游5'-GATATACCCCGCAAATCAC-3', 长度178 bp; VDAC2 U: 上游5'-AGTTTAGATTTAGTAGAGGAGGATG-3', 下游5'-AAACAATATACCCCACAAATCAC-3', 长度183 bp。

取睾丸组织50 mg, 加入TRIzol 1 mL提取DNA, 超微量分光光度计测定DNA浓度。取DNA样本20 μL , 使用试剂盒重亚硫酸盐转换。引物 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 甲基化回收产物 $1.5 \mu\text{L}$, 按比例配置40 μL 反应体系, 进行PCR扩增, 反应条件为预变性95℃, 5 min; 40次循环体系(95℃变性30 s; 55℃退火30 s); 末段72℃延伸5 min; 16℃降温2 min。最终产物电泳。发生甲基化的胞嘧啶(M)能被转化为尿嘧啶(U), 说明甲基化程度增强, 取电泳条带灰度值, 采用尿嘧啶(U)灰度值/胞嘧啶(M)灰度值+尿嘧啶(U)灰度值评估基因甲基化程度。

2.6 Real-time PCR检测睾丸组织VDAC2 mRNA表达 取睾丸组织50 mg, 加TRIzol 1 mL提取总RNA, 超微量分光光度计测定RNA浓度。采用第一链cDNA合成试剂盒将RNA转录为cDNA, 反应条件: 25℃反应5 min, 52℃反转录15 min, 83℃变性5 min, 4℃退火10 min。取cDNA($5 \times$ 稀释)4 μL 加入上、下游引物各0.2 μL 进行Real-time PCR检

测, 循环程序参数为93℃预变性10 min; 40次循环体系(95℃变性10 s; 60℃退火30 s)。引物序列为VDAC2上游5'-AACCTTGCTTGGACATCAGG-3', 下游5'-CTTCCCGTCTACCAGAGCAG-3', 长度180 bp; GAPDH上游5'-ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3', 下游5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3', 长度233 bp, 引物由武汉塞维尔生物科技有限公司提供。绘制扩增曲线溶解曲线, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算分析。

2.7 免疫荧光法检测睾丸VDAC2蛋白的表达 取包埋好的蜡块, 4 μm 切片, 用3% H₂O₂溶液室温封闭10 min, PBS冲洗, 0.01% 枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复, 37℃, 22 min, 避光孵育、封闭后, 加1:200稀释后的VDAC2抗体4℃冰箱过夜后取出, PBS冲洗, 兔抗羊二抗孵育, DAB显色之后, 封片, 荧光显微镜拍照, 利用Image Pro Plus 5图像分析样本平均荧光强度。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测检测睾丸组织PKA蛋白表达 取睾丸组织50 mg, RIPA裂解液1 mL提取蛋白, BCA法检测蛋白浓度。取蛋白样本50 μL 上样、转膜、封闭后, 分别加入鼠多抗PKA(1:200), GAPDH抗体(1:1 000), 4℃孵育过夜; 再次洗涤、加入兔抗羊二抗、孵育、洗膜等处理后, 用超敏ECL发光液显影, 成像系统成像, Image J软件分析条带灰度值。各组条带灰度值/GAPDH灰度值作为PKA蛋白的相对表达量。

2.9 ELISA检测睾丸组织cAMP表达 取睾丸组织50 mg, 加入PBS(pH7.4)1 mL, 冷冻高速匀浆, 4℃离心20 min($3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径12 cm), 收集上清, BCA蛋白浓度测定。取样本50 μL , 严格按照ELISA试剂盒步骤操作, 首先标准品的稀释、加样加酶、温育、洗涤、显色、每孔加终止液50 μL , 终止反应, 450 nm波长依序测量各孔的吸光度A, 根据标准曲线, 计算cAMP蛋白浓度。

2.10 统计学分析 实验数据采用SPSS 21.0软件分析, 数据先进行正态及方差齐性检测, 若两项皆符合, 运用单因素方差分析, 若数据不符合正态分布或者方差不齐, 用非参数检验。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠精子活力的影响 与空白组比较, 模型组精子密度、活动率显著减少或减弱($P < 0.01$); 与模型组比较, 左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量组精子密度、活动率均显著性增多或增强($P < 0.01$);

与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤低剂量组精子密度、活动率显著降低($P<0.01$)。见表1。

表1 疏肝补肾毓麟汤对大鼠精子密度和活动率的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Effect of Shugan Bushen Yulin decoction (SBYD) on sperm density and motility of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

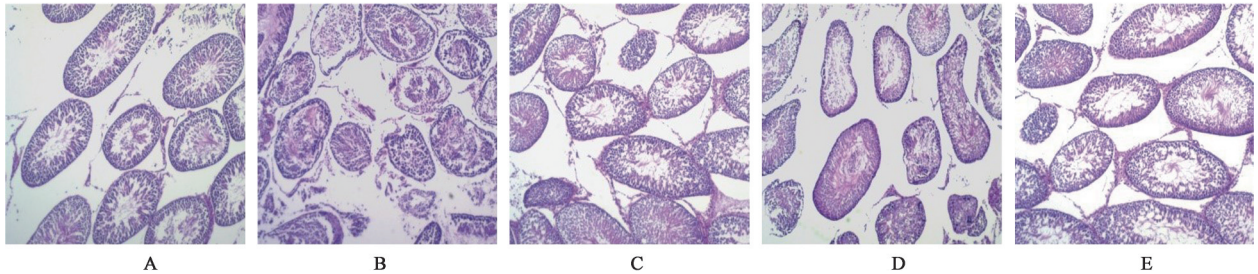
组别	剂量/g·kg ⁻¹	精子密度 /1×10 ⁶ 个/mL	精子活动率 /%
空白		55.48±3.09	46.47±1.23
模型		17.54±1.68 ¹⁾	24.05±1.74 ¹⁾
左卡尼汀	0.27	50.79±2.35 ²⁾	42.53±2.07 ²⁾
疏肝补肾毓麟	32.4	50.97±1.98 ²⁾	43.19±1.78 ²⁾
	8.1	31.09±1.36 ^{2,3)}	35.63±2.61 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与左卡尼汀组比较³⁾ $P<0.01$ (表2,3,5同)。

3.2 对大鼠睾丸组织病理形态及生精功能的影响
空白组睾丸组织内可见结构清晰的呈椭圆形的曲细精管,形状规整,上皮丰满,管腔内有不同发育阶段的生精细胞层次分明排列有序,成条索状,管

中央可见精子;模型组睾丸组织曲细精管轮廓塌陷不成椭圆形,萎缩、变形,管腔内各级生精细胞排列紊乱稀疏,数量明显减少,管中央不见精子可见少量脱落上皮细胞;高剂量组睾丸组织可以见到曲细精管,部分结构较为清晰,形状较规整,其上皮丰满且管腔中的生精细胞数量很少,且排列较为紊乱,管中央可见精子;低剂量组睾丸组织内可见少量结构较为清晰完整的曲细精管,形状不规整,其管腔中的生精细胞大多排列循序较为紊乱,数量明显减少,管中央可见少量精子;左卡尼汀组睾丸组织曲细精管生精上皮细胞排列较疏松,生精细胞脱离基底向管腔移动,曲细精管壁各层稍紊乱,支持细胞和生精细胞呈分离状,管腔内精子减少。见图1。

与空白组比较,模型组大鼠生精功能显著降低($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量组大鼠生精功能显著升高($P<0.01$);与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤高剂量组大鼠生精功能显著升高($P<0.01$)。见表2。



A. 空白组;B. 模型组;C. 左卡尼汀组;D. 疏肝补肾毓麟汤高剂量组;E. 疏肝补肾毓麟汤低剂量组(图3,4同)

图1 疏肝补肾毓麟汤对大鼠睾丸组织形态的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of SBYD on testis histopathological changes in rats (HE,×100)

表2 疏肝补肾毓麟汤对大鼠生精功能的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of SBYD on spermatogenic function in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	D/μm	M/μm	P/分	S/分	TMS/分
空白		145.23±12.34	3.21±0.24	5.00±0.00	5.00±0.00	19.75±0.46
模型		117.34±10.18 ¹⁾	3.16±0.31	1.23±0.12 ¹⁾	1.09±0.12 ¹⁾	12.50±1.19 ¹⁾
左卡尼汀	0.27	140.79±12.28 ²⁾	3.23±0.42	2.12±0.45 ²⁾	1.78±0.11 ²⁾	14.12±1.13 ²⁾
疏肝补肾毓麟	32.4	143.54±11.47 ²⁾	3.19±0.18	3.72±0.22 ²⁾	3.21±0.21 ^{2,3)}	16.75±1.39 ^{2,3)}
	8.1	139.09±14.55 ²⁾	3.21±0.33	3.21±0.32 ²⁾	2.78±0.13 ²⁾	15.88±1.64 ²⁾

3.3 对大鼠精子线粒体膜电位差的影响 与空白组比较,模型组大鼠线粒体膜电位差显著降低($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量的线粒体膜电位差皆显著升高($P<0.01$);与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤低剂量组线粒体膜电位差显著降低($P<0.01$)。见表3。

3.4 对大鼠睾丸组织VDAC2基因甲基化及

VDAC2 mRNA的影响 与空白组比较,模型组VDAC2基因甲基化及VDAC2 mRNA表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量组显著升高($P<0.01$);与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤低剂量组的VDAC2指标显著降低($P<0.01$)。见表4。

MSP法检测睾丸组织VDAC2基因甲基化结果

表3 疏肝补肾毓麟汤对大鼠精子线粒体膜电位差的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of SBYD on sperm mitochondrial membrane potential difference in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	线粒体膜电位差
空白		43.30±1.56
模型		13.40±0.78 ¹⁾
左卡尼汀	0.27	34.36±0.84 ²⁾
疏肝补肾毓麟	32.4	33.44±1.08 ²⁾
	8.1	22.26±0.93 ^{2,3)}

表4 疏肝补肾毓麟汤对大鼠睾丸组织VDAC2基因甲基化及VDAC2 mRNA的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of SBYD on methylation of VDAC2 gene and Vdac2 mRNA in testicular of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VDAC2基因甲基化	VDAC2 mRNA
空白		0.35±0.02	1.00±0.00
模型		0.69±0.11 ¹⁾	0.31±0.05 ¹⁾
左卡尼汀	0.27	0.38±0.07 ³⁾	0.84±0.13 ³⁾
疏肝补肾毓麟	32.4	0.55±0.09 ^{2,4)}	0.76±0.03 ³⁾
	8.1	0.33±0.04 ³⁾	0.50±0.05 ^{3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与左卡尼汀组比较⁴⁾ $P<0.01$ 。

显示,空白组的条带较暗,显示阳性表达降低,其甲

基化程度较低;模型组条带明亮,显示阳性表达增强,其甲基化程度明显。与空白组比较,模型组、睾丸组织VDAC2基因甲基化显著增强($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高剂量组显著降低($P<0.01$),疏肝补肾毓麟汤低剂量组明显降低($P<0.05$);与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤低剂量组显著增强($P<0.01$)。见图2,表4。

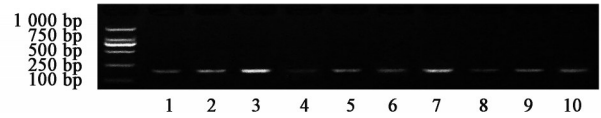
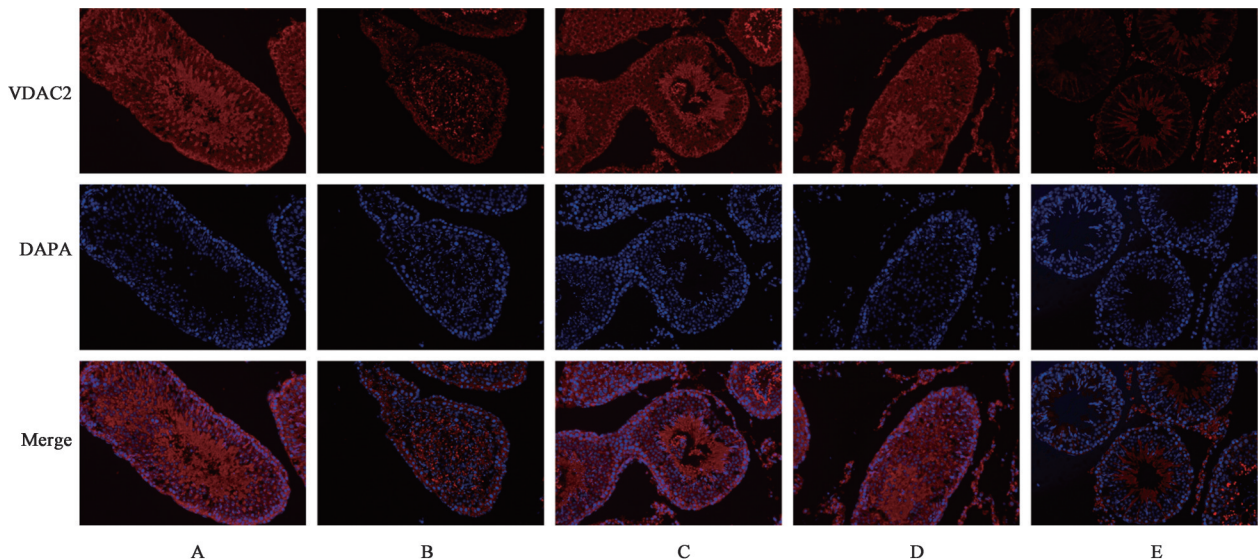


图2 大鼠睾丸组织VDAC2基因甲基化电泳

Fig. 2 Electrophoretic of Vdac2 gene methylation detected in testicular of rats

3.5 对大鼠睾丸组织VDAC2蛋白表达的影响 空白组VDAC2蛋白荧光反应物沉积物主要呈线性点片状沿细胞膜表面排列,与空白组平均荧光强度(52.54±3.84)比较,各组荧光强度显著降低($P<0.01$);与模型组(25.85±4.36)比较,左卡尼汀组(44.87±2.74),疏肝补肾毓麟汤高(42.16±1.56),低(31.75±1.74)剂量组荧光强度显著增加($P<0.01$);与左卡尼汀组比较,疏肝补肾毓麟汤低剂量组荧光强度明显降低($P<0.05$)。见图3。



红色荧光.VDAC2蛋白表达;蓝色荧光.DAPI显示精子细胞核

图3 疏肝补肾毓麟汤对睾丸组织VDAC2蛋白的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of SBYD on VDAC2 proteins expression in testicular of rats (IF, ×200)

3.6 对大鼠睾丸组织cAMP/PKA信号通路的影响 Western blot检测睾丸组织PKA蛋白表达结果显示,与空白组比较,模型组PKA蛋白表达显著降低

($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量PKA蛋白表达显著升高($P<0.01$);与左卡尼汀组,疏肝补肾毓麟汤低剂量组PKA蛋白

表达显著降低($P<0.01$)。见图4,表5。

ELISA检测睾丸组织cAMP含量结果比较显示,与空白组比较,模型组的cAMP含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,左卡尼汀组、疏肝补肾毓麟汤高、低剂量的cAMP含量均显著升高($P<0.01$);与左卡尼汀组,疏肝补肾毓麟汤低剂量组的cAMP含量则显著降低($P<0.01$)。见表5。

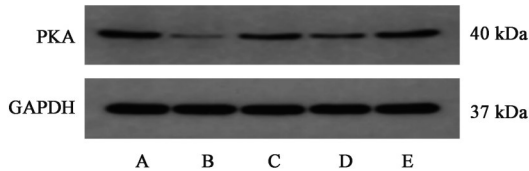


图4 大鼠睾丸组织PKA蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of PKA proteins in testicular of rats

表5 疏肝补肾毓麟汤对大鼠睾丸组织cAMP/PKA信号通路的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of SBYD on cAMP/PKA signaling in rats testicular ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKA/GAPDH	cAMP/ng·L ⁻¹
空白		0.64±0.06	476.52±6.78
模型		0.13±0.02 ¹⁾	341.34±16.28 ¹⁾
左卡尼汀	0.27	0.49±0.06 ²⁾	423.26±13.46 ²⁾
疏肝补肾毓麟	32.4	0.45±0.05 ²⁾	414.78±13.43 ²⁾
	8.1	0.23±0.03 ^{2,3)}	373.32±5.21 ^{2,3)}

4 讨论

“肾藏精、主生殖”,故少弱精症病位在肾,补肾填精法是最基本大法。肾阳亏虚,相火衰微,不能温煦精子;肾阴不足,精血无源,则精室空虚;肾气不足,推动能力降低,肾精化生无源。随着社会发
展,人们生活方式改变,弱精症形成原因日渐复杂,因此,在补肾填精基础上又佐以清热利湿、活血化痰、补脾益气、疏肝解郁等方法治疗^[15]。现阶段,人们处于高压生活方式下,焦虑呈常态化,情志对精子质量影响日显突出^[16]。“肝主疏泄,条畅情志”,故疏肝在治疗男性不育症中运用越来越受重视。肝主疏泄正常,则肝气调达、肝血充足,则冲任得以协调,男子生育正常^[17]。疏肝补肾毓麟汤是全国名老中医周安方教授的经验方,顾名思义,此方为疏肝补肾法治疗男性不育之方。疏肝乃疏肝解郁,行气活血之意;补肾乃补肾阴阳,补气补血之意;毓为育、生、养之意,麟为古之四灵之一的麒麟,麒麟在民间有送子之说,故毓麟乃生育孩子之意^[18]。

疏肝补肾毓麟汤由刺蒺藜、郁金、仙茅、生地黄、当归、菟丝子、熟地黄、巴戟天、淫羊藿、黄芪、肉

苁蓉、枸杞子、鹿角胶、党参、川芎等组成。方中刺蒺藜入足厥阴肝经,疏肝解郁,行气活血,鹿角胶温肾壮阳,益精填髓,二者配伍,共为君药,条畅肝气,充盈肾精;郁金、川芎行气开郁,与刺蒺藜相伍,加强疏散气机郁滞之功,仙茅、淫羊藿、肉苁蓉、巴戟天温补肾阳,加强提振肾阳之效,共为臣药;佐以黄芪、党参峻补元气,当归、生地黄滋补营血,使气血和合。全方并补肝肾与气血,补泻与阴阳齐调,提高精子活力。临床运用表明,疏肝补肾毓麟汤具有改善精子质量提高精子活力的作用^[6]。

线粒体是产生ATP的主要场所,线粒体膜电位正常是维持氧化磷酸化产生ATP的先决条件^[19]。在精子中,线粒体主要位于精子鞭毛中段,所产生的ATP为精子活动提供能量,因此,线粒体膜电位已经做为评估男性生育力的临床指标^[20]。精子线粒体膜电位与精子活力、存活率和受精能力呈正相关^[21]。VDAC2是线粒体外膜上的通道蛋白,具有传递能量和代谢产物的作用,能直接调节线粒体功能。研究发现,精子活力受到VDAC2 mRNA变化的影响,且特异性抗体阻断VDAC2时精子运动能力显著降低,提示VDAC2表达与精子活力密切相关^[22]。现阶段,男性不育与表观遗传相关度越来越受关注,有研究显示,VDAC2基因启动子区高水平的甲基化可能通过抑制VDAC2 mRNA的表达而引发弱精子症^[23]。VDAC2基因高甲基化导致转录VDAC2 mRNA降低,而mRNA降低直接影响VDAC2蛋白翻译水平,因此,VDAC2基因高甲基化可导致VDAC2蛋白减少。VDAC2蛋白减少直接降低线粒体Ca²⁺跨膜转运^[24]。研究显示,Ca²⁺直接激活腺苷酸环化酶,催化ATP转化为cAMP来活化PKA,PKA使其底物蛋白发生酪氨酸磷酸化,来启动并维持精子的前向运动^[25]。

本研究结果显示,少弱精症模型大鼠给予疏肝补肾毓麟汤治疗后,精子线粒体膜电位明显上调,精子密度、活动率明显提高;表明疏肝补肾毓麟汤具有保护精子线粒体功能,提高精子活力的作用。深入探讨机制发现,疏肝补肾毓麟汤能降低弱精子症模型大鼠睾丸组织VDAC2基因高甲基化,促进VDAC2蛋白表达,升高睾丸组织中cAMP水平,上调PKA蛋白的表达;表明疏肝补肾毓麟汤提高精子活力的机制是降低VDAC2基因高甲基化,促进VDAC2蛋白表达,增强线粒体功能,通过cAMP/PKA通路影响精子活力。

疏肝补肾毓麟汤作为中药复方,具有多靶点、

多调节方式的特点,本研究的结果只能说明此方提高肝郁肾虚型弱精子症大鼠的精子活力,可能与降低VDAC2的DNA甲基化水平,部分恢复了VDAC2蛋白作为能量和代谢物质的传递通道的功能有关,而cAMP/PKA信号通路是否为直接作用靶点以及是否其他通路存在相应的差异性改变,需要进一步讨论。此外,针对甲基化调控VDAC2基因表达的机制,尚需进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BARRATT C, BJÖRND AHL L, DE JONGE C J, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities [J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 660-680.
- [2] 白符,刘畅,樊延军. 不孕不育防控策略研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2018, 34(9): 1303-1305.
- [3] SHAHROKHI S Z, SALEHI P, ALYASIN A, et al. Asthenozoospermia: cellular and molecular contributing factors and treatment strategies [J]. *Andrologia*, 2020, 52(2): 13463-13478.
- [4] 欧卓荣,杨颖辉,徐福松. 中医药诊治男性少弱精子症的Meta分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(9): 2268-2273.
- [5] 王朝阳,曹继刚,舒劲松,等. 周安方教授学术思想及临床经验简介 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(4): 983-986.
- [6] 魏巍,曹继刚. 疏肝补肾毓麟汤治疗肝郁肾虚型弱精症引起男性不育的临床观察 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(10): 110-112.
- [7] MAURYA S R, MAHALAKSHMI R. Mitochondrial VDAC2 and cell homeostasis: highlighting hidden structural features and unique functionalities [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2017, 92(4): 1843-1858.
- [8] KWON W S, PARK Y J, SA M, et al. Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(2): 354-361.
- [9] PAN L, QIU D, LI J, et al. Idiopathic male infertility in the Han population in China is affected by polymorphism in the VDAC2 gene [J]. *Oncotarget*, 2016, 50(7): 82594-82601.
- [10] MARTÍNEZ-LEÓN E, OSYCKA-SALUT C, SIGNORELLI J, et al. Fibronectin modulates the endocannabinoid system through the cAMP/PKA pathway during human sperm capacitation [J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(2): 224-238.
- [11] 宾东华,李玲,唐宇,等. 基于线粒体途径研究知柏地黄汤对解脲脲原体感染大鼠生精细胞活力的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11): 5775-5779.
- [12] 黄峰,李莉,吴德玲,等. 五子衍宗丸对少弱精子症模型大鼠睾丸组织Catsper1蛋白及其mRNA表达影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35(5): 70-73.
- [13] 魏巍,曹继刚,萧冈,等. 肝郁肾虚型少弱精症大鼠模型的建立及相关指标评价初探 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2021, 42(3): 293-302.
- [14] 俞建军,陈昭典. 精索静脉曲张大鼠睾丸生精功能的定量研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, doi: 10.3321/j.issn:1000-4718.2003.01.034.
- [15] 王诗琦,王祖龙. 王祖龙治疗弱精子症辨证规律分析 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(1): 62-64.
- [16] ILACQUA A, IZZO G, EMERENZIANI G P, et al. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 115-123.
- [17] 萧冈,周艳艳,袁芳,等. 肝司生殖浅析 [J]. *新中医*, 2013, 45(12): 22-25.
- [18] 魏巍. 疏肝补肾毓麟汤对少弱精症大鼠VDAC2及cAMP/PKA通路表达的影响及其机制研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2021.
- [19] ALAMO A, DE LUCA C, MONGIOÌ L M, et al. Mitochondrial membrane potential predicts 4-hour sperm motility [J]. *Biomedicine*, 2020, 8(7): 13432-13457.
- [20] DURAIRAJANAYAGAM D, SINGH D, AGARWAL A, et al. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction [J]. *Andrologia*, 2021, 53(1): 13666-13687.
- [21] 胡剑麟,孙健,陈威,等. 黄精赞育胶囊对弱精子症患者精子线粒体膜电位的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2017, 23(12): 1116-1120.
- [22] XU A, HUA Y, ZHANG J, et al. Abnormal hypermethylation of the VDAC2 promoter is a potential cause of idiopathic asthenospermia in men [J]. *Sci Rep*, 2016, 54(6): 37836-37854.
- [23] XU A, HUA Y, ZHANG J, et al. Abnormal hypermethylation of the VDAC2 promoter is a potential cause of idiopathic asthenospermia in men [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 1-9.
- [24] WHITFIELD M, GUITON R, RISPAL J, et al. Dyslipidemia alters sperm maturation and capacitation in LXR-null mice [J]. *Reproduction*, 2017, 154(6): 827-842.
- [24] 陈璇,金一. 酪氨酸磷酸化在精子获能过程中的作用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(9): 2486-2491.

[责任编辑 孙丛丛]