

益肾生精方治疗少弱精子症的药效评价及作用机制

胡语杰¹, 徐砚通², 高健², 陈聪¹, 李佳林¹, 张懿², 马全涛¹, 刘逍遥¹, 王伟玲^{2*}, 王婷^{2,3*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029;

3. 国家中医药管理局名医名方重点实验室, 北京 100029)

【摘要】 目的:采用环磷酰胺致大鼠少弱精子症模型,研究益肾生精方对少弱精子症的治疗作用及作用机制。方法:随机选取8只SD雄性大鼠为正常组,其余大鼠连续5 d腹腔注射环磷酰胺($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)制备大鼠少弱精子症模型,而后随机分为模型组、益肾生精方低、中、高剂量组(2.91 、 5.83 、 $11.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),五子衍宗丸组($1.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),左卡尼汀组($0.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组8只。药物干预28 d后,记录大鼠体质量、睾丸质量和指数;采用计算机辅助精子分析(CASA)系统检测附睾中精子质量;苏木素-伊红(HE)染色观察睾丸组织形态;比色法检测睾丸组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)的水平;原位末端标志法(TUNEL)检测睾丸组织中细胞的凋亡情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸组织中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、活化的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量、睾丸质量和指数、精子浓度和活力显著降低($P < 0.01$),睾丸病理评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,益肾生精方中、高剂量组、五子衍宗丸组和左卡尼汀组可提高体质量、睾丸质量和指数,并提高精子浓度和活力;降低睾丸病理评分。氧化应激水平检测结果显示,与正常组比较,模型组大鼠睾丸组织中SOD水平显著降低($P < 0.01$),MDA水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,益肾生精方高剂量组、五子衍宗丸组和左卡尼汀组可以明显提高SOD活性,降低MDA水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。血清激素水平检测结果显示,与正常组比较,模型组T水平显著降低($P < 0.01$),FSH和LH水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,益肾生精方组、五子衍宗丸组和左卡尼汀组可以显著提高T水平($P < 0.01$),降低LH水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TUNEL结果显示,与正常组比较,模型组生精细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,益肾生精方中剂量组、五子衍宗丸组和左卡尼汀组可显著降低凋亡率($P < 0.01$)。Western blot结果显示,与正常组比较,模型组Bcl-2蛋白水平明显降低($P < 0.05$),Bax和cleaved Caspase-3蛋白水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);益肾生精方高剂量组、五子衍宗丸组和左卡尼汀组可以明显升高Bcl-2蛋白水平,降低cleaved Caspase-3蛋白水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:益肾生精方可改善少弱精子症模型大鼠的精子质量,其机制可能与抗氧化、调节性激素水平以及抑制生精细胞凋亡等多个途径有关。

【关键词】 少弱精子症; 环磷酰胺; 氧化应激; 细胞凋亡; 性激素; 五子衍宗丸

【中图分类号】 R22;R242;R2-031;R2-0;R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2022)11-0093-09

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20220824

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220216.0925.001.html>

【网络出版日期】 2022-02-16 12:56

Efficacy and Mechanism of Yishen Shengjing Prescription in Treatment of Oligoasthenospermia

HU Yu-jie¹, XU Yan-tong², GAO Jian², CHEN Cong¹, LI Jia-lin¹, ZHANG Cai², MA Quan-tao¹,
LIU Xiao-yao¹, WANG Wei-ling^{2*}, WANG Ting^{2,3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of

【收稿日期】 2021-11-10

【基金项目】 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2017ZX09301011)

【第一作者】 胡语杰,在读硕士,从事中医药防治生殖系统疾病研究,E-mail:huyujie1995@sina.com

【通信作者】 *王婷,博士,教授,博士生导师,从事中药新药研发、中药药效物质基础及作用机制研究,E-mail:wangting1973@sina.com;

*王伟玲,博士,副研究员,从事中药药效物质基础研究,E-mail:wangwl_1014@163.com

Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Key Laboratory of Famous Doctors and Famous Prescriptions of National Administration of TCM, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: We aimed to investigate the efficacy and mechanism of Yishen Shengjing Prescription (YSP) in the treatment of oligoasthenospermia in rats. **Method:** The oligoasthenospermia rat model was established by injection with cyclophosphamide ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 5 consecutive days. Rats were randomly assigned into control group (without treating with cyclophosphamide), model group, low- (YSP-L), medium- (YSP-M), and high- (YSP-H) dose (2.91 , 5.83 , and $11.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively) groups, Wuzi Yanzongwan (WYW, $1.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and L-carnitine ($0.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, with 8 rats in each group. After 28 days of drug intervention, the body weight, testicular weight, and testicular index of rats were recorded. The sperm quality in epididymis was detected by computer-assisted sperm analysis (CASA) system. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed for observation of testicular tissue morphology. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in testicular tissue were detected by colorimetry. The levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and testosterone (T) in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) was employed to detect the apoptosis of testicular cells. The protein levels of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bax, and cleaved Caspase-3 in testicular tissue were detected by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the model group showed decreased body weight, testicular weight and index, sperm concentration and motility ($P < 0.01$) and increased testicular pathological score ($P < 0.01$). Compared with the model group, the YSP-M, YSP-H, WYW, and L-carnitine groups showed increased body weight, testicular weight, testicular index, sperm concentration and motility and decreased testicular pathological score. After modeling, the SOD level decreased ($P < 0.01$) while the MDA content increased ($P < 0.01$) in the testicular tissue. YSP-H, WYW, and L-carnitine reversed the SOD and MDA level changes caused by modeling. Compared with the control group, the model group exhibited declined T level ($P < 0.01$) and increased FSH and LH levels ($P < 0.01$). Compared with the model group, YSP, WYW, and L-carnitine increased the T level ($P < 0.01$) and decreased the LH level ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The apoptosis rate of spermatogenic cells in the model group was higher than that in the control group ($P < 0.01$), whereas YSP-M, WYW, and L-carnitine reversed such changes ($P < 0.01$). The model group rats showed decreased expression of Bcl-2 ($P < 0.05$) and increased expression of Bax and cleaved Caspase-3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared the model group, YSP-M, YSP-H, WYW, and L-carnitine up-regulated the Bcl-2 expression and down-regulated the cleaved Caspase-3 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YSP improved the sperm quality of oligoasthenospermia model rats by regulating the antioxidant system and sex hormone levels and inhibiting the apoptosis of spermatogenic cells.

[Keywords] oligoasthenospermia; cyclophosphamide; oxidative stress; apoptosis; sex hormones; Wuzi Yanzongwan

近年来,受环境污染、生育年龄延迟、生活方式改变和工作压力增大的影响,男性不育症的发病率逐渐上升^[1-5],WHO预测,不孕不育将成为继肿瘤和脑血管疾病之后,影响人类健康的第三大疾病^[6]。研究表明^[7-9],少弱精子症是导致不育的首要因素。少弱精子症以精子浓度减少和活力下降为主要临床表现,根据最新版《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》的规定^[10],精子密度 $< 15 \times 10^6$ 个/mL为少精子症;精子活力 $< 32\%$ 为弱精子

症。目前已经明确少弱精子症可受到遗传因素、生殖道感染、精索静脉曲张、有毒物质的侵害、免疫紊乱、性激素失调、微量元素缺乏等多种因素的影响^[11]。西医疗本病主要针对病因治疗,临床上以左卡尼汀、维生素E及抗雌激素药物等应用地较为广泛,但由于疗效不确切以及存在诸多不良反应,在临床使用中常常受到限制^[12-13]。中医认为“肾藏精,主生殖”,少弱精子症主要责之“肾精亏虚”^[14]。肾中精气的充足与否和男性的生殖功能强弱密切

相关。肾中精气不足,则精子化生无源、活化无能,从而形成少弱精子症。中医药治疗具有多成分、多途径、多靶点、作用温和等特点,相较于西医治疗具有独特优势^[15]。益肾生精方来源于全国名老中医秦月好主任医师的临床经验方,主要由枸杞子、黄精、山药、丁香、薤白等组成,由古代名方“五子衍宗丸”化裁所得,有补肾益气填精之功,临床疗效较好,然而益肾生精方治疗少弱精子症的作用机制尚不清楚。本研究拟从整体动物水平上,在明确益肾生精方疗效的基础上,从抗氧化、调节性激素、减少细胞凋亡等多角度探讨其内在作用机制,以期益肾生精方治疗少弱精子症提供实验依据和基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性SD大鼠56只,体质量240~280 g,7周龄,购买于北京维通利华生物科技公司,合格证号SCXK(京)2016-0011,饲养于北京中医药大学屏障环境动物房,使用许可证号SYXK(京)2020-0033。动物饲养室内温度20~25℃,湿度40%~70%,光照周期明暗时间各12 h,净化通风系统良好。实验期间所有大鼠自由饮水,摄食。经北京中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理审查编号BUCM-4-2021102701-4032。

1.2 药材 益肾生精方由黄精(批号20201004)、山药(批号20201002)、枸杞子(批号20201013)、桑葚(批号20200924)、覆盆子(批号20200329)、益智仁(批号20200726)、丁香(批号20200301)、葛根(批号20201013)、麦芽(批号20200924)、薤白(批号20200801)组成,以上饮片购买于北京本草方源集团有限公司。五子衍宗丸(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,批号20035043);左卡尼汀(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号200318);注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号20101225)。

1.3 试剂 TUNEL Bright Green Apoptosis Detection Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号A112-02),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)生化检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A001-3-2、A003-1-2),BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号P0010),卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)酶联免疫检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,货号分别为CEA830Ra,CEA441Ra,CEA458Ge),MED 199 HANKS(Invitrogen公司,货号12350039),兔抗B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)多克隆

抗体(Proteintech,货号26593-1-AP),兔抗Bcl-2相关X蛋白(Bax)单克隆抗体、兔抗活化的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)单克隆抗体、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体、小鼠抗兔单克隆二抗(Cell Signaling Technology公司,货号分别为14796、14220、4970、93720),ECL发光液、4%~15%预制胶(北京普利莱基因技术有限公司,货号分别为P1050、T201911)。

1.4 仪器 R2003KE型旋转蒸发器(上海Senco科技有限公司),ZKXFB-2型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),WLJY-9000型精子质量检测系统(北京伟力新世纪科技发展股份有限公司),MM400型高通量组织研磨机(德国Retsch公司),Multiskan GO型全波长酶标仪、EVOS™ FL Auto 2型台式自动化成像仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],GelView6000Plus智能图像工作系统(广州博鹭腾生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 益肾生精方由黄精7.5 g、山药10 g、枸杞子5 g、桑葚5 g、覆盆子5 g、益智仁5 g、丁香3 g、葛根7.5 g、麦芽15 g、薤白5 g组成,按原方配比,先加入药材总质量10倍的去离子水,煮沸后文火煮1 h,过滤收集药液,再加入原药材总质量8倍的去离子水,煮沸后文火煮0.5 h。合并2次药液,依次进行浓缩、干燥,打粉。所得干膏粉出膏率约为34%。临用前用水配制成相应浓度药液。

2.2 动物造模与给药 将56只SD雄性大鼠适应性饲养7 d后,按体质量随机分为正常组8只和造模组48只。造模组大鼠每只按 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射环磷酰胺^[16],连续注射5 d后,造模组按照体质量重新随机分为模型组、益肾生精方低、中、高剂量组、五子衍宗丸组、左卡尼汀组,每组8只,给予相应药物每天灌胃1次,连续28 d。末次灌胃24 h后,检测大鼠附睾中精子的质量,以模型组大鼠精子浓度和活力较正常组下降且具有统计学意义,为模型制备成功的标准^[16]。正常组、模型组每天以等量去离子水灌胃。益肾生精方临床应用剂量为每日生药68 g,按成人70 kg、人和大鼠体表面积比1:6计算得大鼠等效剂量^[17]为 $5.83 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,大鼠所用益肾生精方低、中、高剂量为 2.91 、 5.83 、 $11.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,五子衍宗丸组和左卡尼汀组分别按 1.03 、 $0.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药。大鼠灌胃量按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标准进行。

2.3 一般情况观察 观察大鼠的一般情况,包括毛发、活动度以及精神状态等方面。并在造模前和取

材前,对大鼠进行称质量并记录。

2.4 睾丸指数的计算 末次灌胃24 h,以1%戊巴比妥钠4 mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉,分离两侧睾丸,预冷的生理盐水漂洗数次,蘸干后,分析天平称取两侧睾丸质量,计算睾丸指数,睾丸指数=双侧睾丸质量(mg)/体质量(g)。

2.5 附睾中精子质量检测 取左侧附睾,沿附睾头尾纵向剪开,于1 mL M199培养基中,37 °C孵育5 min, M199培养基稀释5倍,取10 μL,滴加在载玻片上,采用精子质量检测系统进行测试。在20倍目镜下随机选取5个视野,2 min内完成测试,得到精子浓度和活力2项指标。

2.6 睾丸组织病理形态学观察 取左侧睾丸,以10%中性甲醛固定,修块、脱水、包埋,制成3 μm的组织切片,苏木素-伊红(HE)染色后中性树胶封片,光镜下观察大鼠睾丸组织结构及形态。对睾丸组织结构损害进行4分制评分^[18-19]:正常睾丸,生精上皮各级生精细胞依次排列规则、结构完整,管腔内可见大量成熟精子,计为1分;轻度损害,睾丸个别生精小管内生精细胞排列不规则,结构较松散,可见脱落的生精细胞,计为2分;中度损害,睾丸多个生精小管内生精细胞排列紊乱,生精细胞层数减少,管腔内精子明显减少,计为3分;重度损伤,睾丸内生精小管出现萎缩,生精上皮无生精细胞,管腔内无精子,生精小管呈现空化,计为4分。

2.7 睾丸组织SOD、MDA水平测定 取右侧睾丸,称取0.1 g左右并剪碎,按照质量(g)-体积(mL)为1:9加入生理盐水,匀浆,在4 °C、3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径6 cm,下同),取上清,按照说明书进行检测。

2.8 血清FSH、LH、T水平检测 麻醉后,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液按ELISA试剂盒说明书进行操作。

2.9 睾丸组织切片TUNEL染色 取睾丸组织的石蜡切片,按照TUNEL试剂说明书上的步骤依次操作,在荧光显微镜下观察,拍照。每组各取3张切片,每张切片随机选取10个生精小管,计算其阳性细胞(亮绿色)占总生精细胞数的比值为凋亡率。

2.10 睾丸组织中Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3蛋白检测 取右侧睾丸,按照组织-蛋白裂解液1:9加入蛋白裂解液(RIPA裂解液+100×磷酸酶抑制剂+50×蛋白酶抑制剂)提取睾丸总蛋白,BCA法测蛋白水平,SDS-PAGE凝胶电泳,半干转法转膜至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗Bcl-2(1:500)、

Bax(1:500)、cleaved Caspase-3(1:1 000)、β-actin(1:1 000)4 °C孵育过夜, TBST漂洗3次后,二抗(1:3 000)室温孵育1 h, TBST漂洗3次,滴加ECL发光液,采用智能图像工作系统检测, Image J 6.0分析蛋白条带,以目的蛋白与内参蛋白灰度比值表示目的蛋白的相对表达量,并进行均一化处理。

2.11 统计学方法 使用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,当数据同时满足正态分布及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析;不满足正态分布或方差不齐时,组间比较采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 与正常组比较,模型组大鼠逐渐出现毛色发黄、光泽暗淡、伴有脱落,蜷缩少动,精神萎靡等情况,体质量显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组毛发发黄暗淡的程度稍轻,活动度和精神状态较好,其中益肾生精方中、高剂量组,五子衍宗丸组大鼠的体质量明显上升($P < 0.05$)。见表1。

表1 益肾生精方对大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Yishen Shengjing prescription (YSP) on rat body weight ($\bar{x} \pm s, n=8$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	取材前
正常组		324.88±10.12	446.63±14.67
模型组		325.13±10.27	375.88±33.57 ²⁾
益肾生精方低剂量组	2.91	326.50±10.46	383.38±27.07
益肾生精方中剂量组	5.83	323.25±9.38	401.63±17.43 ³⁾
益肾生精方高剂量组	11.66	320.13±12.97	400.63±21.35 ³⁾
五子衍宗丸组	1.03	326.13±9.03	398.88±17.87 ³⁾
左卡尼汀组	0.17	322.88±11.95	396.5±15.96

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⁾ $P < 0.01$ (表2-表5同)

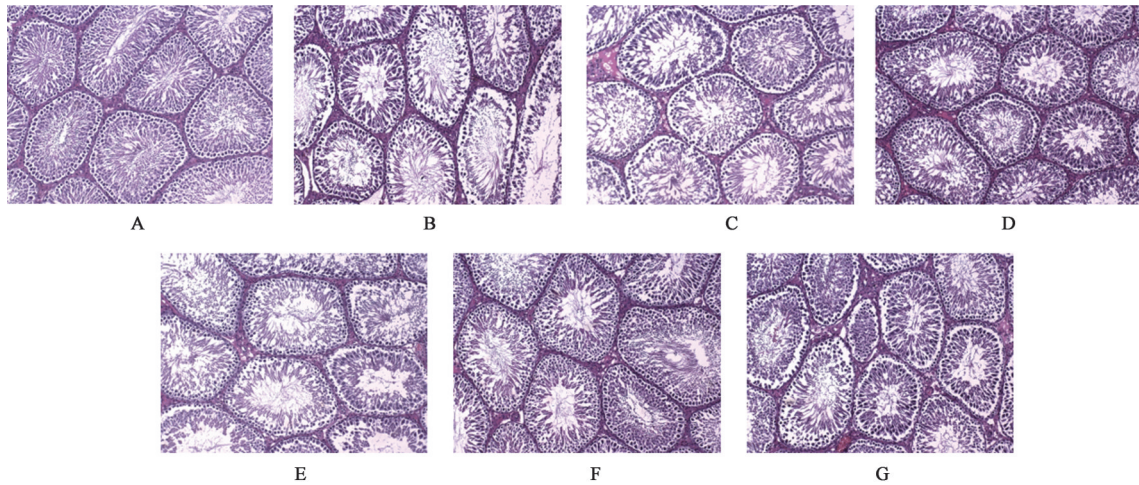
3.2 对睾丸指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠睾丸质量和睾丸指数均显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,益肾生精方中、高剂量组的睾丸质量明显上升($P < 0.05, P < 0.01$),睾丸指数明显上升($P < 0.05, P < 0.01$)。见表2。

3.3 对睾丸病理组织形态的影响 与正常组比较,模型组大鼠睾丸中多数生精小管内出现细胞脱落,生精细胞层数和管腔内精子明显减少,结构松散,病理评分显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,益肾生精方中、高剂量组和左卡尼汀组大鼠睾丸的生精细胞层数和生精细胞数量增加,结构有所恢复,管腔内精子明显增多,病理评分明显降低($P < 0.05$)。见图1和表2。

表2 益肾生精方对大鼠睾丸和精子质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of YSP on testicular and sperm quality in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	睾丸质量/g	睾丸指数	病理评分/分	精子浓度(1×10 ⁶)/个/mL	精子活力/%
正常组		3.57±0.28	8.07±0.69	1.13±0.35	115.39±29.11	62.32±14.19
模型组		2.78±0.13 ²⁾	6.05±0.58 ²⁾	2.88±0.35 ²⁾	57.70±22.31 ²⁾	35.00±11.03 ²⁾
益肾生精方低剂量组	2.91	2.84±0.17	7.23±0.56	2.63±0.52	85.09±20.04	49.54±9.84
益肾生精方中剂量组	5.83	3.23±0.22 ⁴⁾	7.72±0.63 ⁴⁾	2.25±0.46 ³⁾	111.06±53.47 ⁴⁾	65.05±18.50 ⁴⁾
益肾生精方高剂量组	11.66	3.09±0.22 ³⁾	7.66±0.75 ⁴⁾	2.38±0.52 ³⁾	84.12±46.15	48.63±22.94
五子衍宗丸组	1.03	3.02±0.23	7.43±0.55 ³⁾	2.50±0.53	99.87±26.46 ³⁾	48.92±11.22
左卡尼汀组	0.17	3.02±0.35	7.60±0.61 ³⁾	2.38±0.52 ³⁾	108.25±34.68 ⁴⁾	50.57±15.22 ³⁾



注:A. 正常组;B. 模型组;C-E. 益肾生精方低、中、高剂量组;F. 五子衍宗丸组;G. 左卡尼汀组(图2、图3同)

图1 益肾生精方对大鼠睾丸形态学变化的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of YSP on pathomorphological changes of testis in rats (HE, ×200)

3.4 对精子质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠的精子浓度和活力均显著下降($P<0.01$)。与模型组比较,益肾生精方中剂量组和左卡尼汀组大鼠的精子浓度和精子活力明显升高($P<0.05, P<0.01$);五子衍宗丸组大鼠精子浓度明显升高($P<0.05$),精子活力有升高的趋势,但差异无统计学意义。见表2。

3.5 对睾丸组织氧化应激情况的影响 与正常组比较,模型组大鼠睾丸组织中SOD的活性显著降低($P<0.01$),MDA水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,益肾生精方高剂量组、五子衍宗丸组、左卡尼汀组大鼠睾丸组织中SOD水平明显升高($P<0.05, P<0.01$);MDA水平明显下降($P<0.05, P<0.01$),益肾生精方中剂量组大鼠睾丸组织中SOD水平明显升高($P<0.05$),MDA水平有下降的趋势,但差异无统计学意义。见表3。

3.6 对血清性激素水平变化的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中T水平显著下降($P<0.01$),LH、FSH水平显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,益肾生精方低剂量有升高血清T水平的趋势,但差

表3 益肾生精方对大鼠睾丸组织SOD、MDA的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of YSP on SOD and MDA in rats testis ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /μmol·g ⁻¹
正常组		195.34±30.81	0.43±0.22
模型组		141.22±17.54 ²⁾	1.12±0.28 ²⁾
益肾生精方低剂量组	2.91	161.24±7.51	1.05±0.37
益肾生精方中剂量组	5.83	173.00±32.78 ³⁾	0.86±0.14
益肾生精方高剂量组	11.66	180.18±26.11 ⁴⁾	0.73±0.16 ⁴⁾
五子衍宗丸组	1.03	172.38±18.87 ³⁾	0.86±0.11 ³⁾
左卡尼汀组	0.17	199.27±21.72 ⁴⁾	0.67±0.20 ⁴⁾

异无统计学意义,能降低血清LH和FSH水平($P<0.05, P<0.01$),益肾生精方中、高剂量组中血清T水平升高($P<0.01$),LH水平降低($P<0.05, P<0.01$),血清FSH水平有降低趋势,差异无统计学意义。五子衍宗丸和左卡尼汀均可逆转模型大鼠血清T、LH和FSH的异常变化($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

表4 益肾生精方对大鼠血清性激素的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of YSP on serum hormone in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	T	LH	FSH
正常组		5.15±1.05	5.57±0.63	7.50±3.63
模型组		3.04±0.73 ²⁾	9.54±0.75 ²⁾	21.92±7.59 ²⁾
益肾生精方低剂量组	2.91	3.50±1.03	7.70±1.97 ³⁾	13.03±4.02 ⁴⁾
益肾生精方中剂量组	5.83	4.83±1.19 ⁴⁾	6.71±2.07 ⁴⁾	20.58±6.81
益肾生精方高剂量组	11.66	5.19±1.94 ⁴⁾	5.08±1.82 ⁴⁾	20.68±9.38
五子衍宗丸组	1.03	4.72±1.00 ⁴⁾	5.19±1.42 ⁴⁾	14.98±4.75 ³⁾
左卡尼汀组	0.17	4.74±1.05 ⁴⁾	3.73±0.99 ⁴⁾	15.61±4.60 ³⁾

3.7 对大鼠睾丸组织中细胞凋亡的影响 与正常组大鼠比较,模型组大鼠睾丸组织中发生凋亡的细胞显著增多($P<0.01$);与模型组比较,益肾生精方中

剂量组、五子衍宗丸组和左卡尼汀组大鼠的睾丸组织中发生凋亡的细胞显著减少($P<0.01$)。见图2和表5。

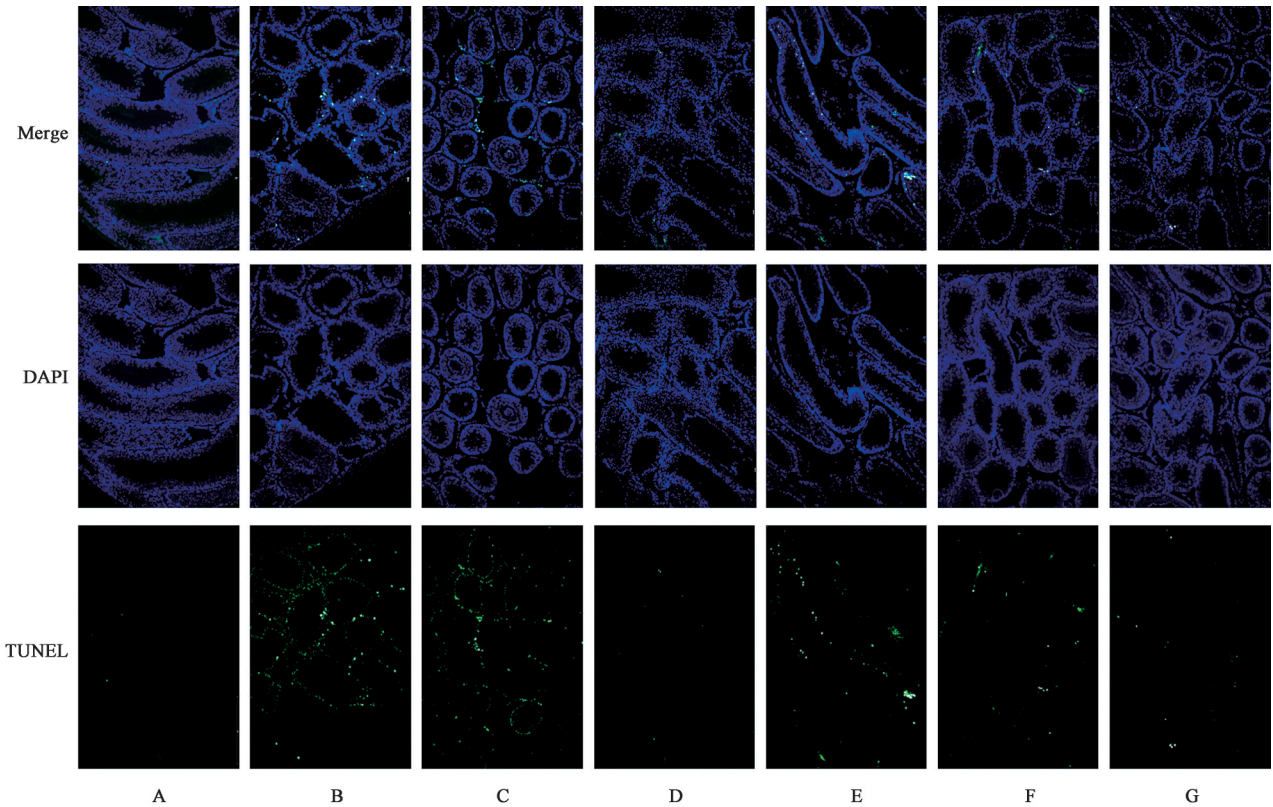


图2 益肾生精方对大鼠睾丸组织中细胞凋亡的影响(TUNEL, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of YSP on apoptosis in rat testis(TUNEL, $\times 100$)

3.8 对睾丸组织中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠睾丸中 Bcl-2 蛋白表达明显降低($P<0.05$), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,益肾生精方低剂量组有升高 Bcl-2 蛋白水平和降低 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白水平的趋势,但差异无统计学意义;益肾生精方中剂量组能够降低模型大鼠睾丸 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白水平

($P<0.05, P<0.01$),具有升高 Bcl-2 蛋白水平的趋势,但差异无统计学意义;益肾生精方高剂量明显升高 Bcl-2 蛋白水平($P<0.05$)、降低 cleaved Caspase-3 蛋白水平($P<0.01$), Bax 蛋白水平有降低的趋势,但差异无统计学意义。五子衍宗丸和左卡尼汀均能显著升高 Bcl-2 蛋白水平和降低 cleaved Caspase-3 蛋白水平($P<0.01$), Bax 蛋白水平均有降低的趋势,但差异无统计学意义。见图3和表6。

表 5 益肾生精方对大鼠睾丸组织中生精细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of YSP on apoptosis rate of spermatogenic cells in rat testis ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	凋亡率/%
正常组		1.66±0.21
模型组		7.73±0.71 ²⁾
益肾生精方低剂量组	2.91	7.06±1.01
益肾生精方中剂量组	5.83	1.93±0.06 ⁴⁾
益肾生精方高剂量组	11.66	6.40±1.38
五子衍宗丸组	1.03	4.07±0.57 ⁴⁾
左卡尼汀组	0.17	3.35±0.74 ⁴⁾

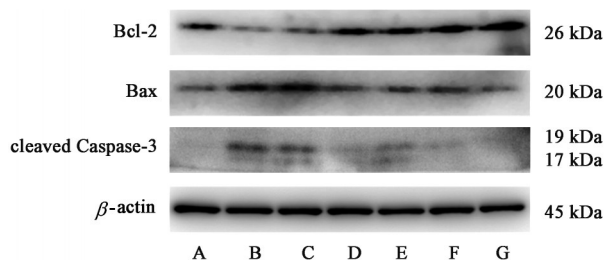


图 3 大鼠睾丸组织中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Bcl-2, Bax and cleaved Caspase-3 in rats testis

4 讨论

益肾生精方来源于全国名老中医秦月好主任医师的临床经验方,其临床应用历史悠久,疗效明确。此方处处着眼于“肾虚”,从多方面提高男性的生精功能,最终达到改善少弱精子症的目的。方中黄精味甘性平,归肺脾肾经,功能补气养阴,健脾益肾,《本草纲目》谓其“补诸虚,填精髓”;山药味甘性平,同归肺脾肾经,补脾养胃,生津益肺,补肾涩精,《本草纲目》记载:“益肾气,健脾胃”,为补虚良品;二药平补肺脾肾,益气养阴,同助先天补肾精,养后天健脾气,共为君药。枸杞甘平,归肝肾经,滋肝肾之阴,《得配本草》记载:“补肝经之阴,益肾水之

阳”,为平补肾精肝血之品;桑椹甘酸,滋阴补血,生津润燥,《滇南本草》谓其“益肾脏而固精,久服黑发明目”;覆盆子甘酸,微温,补肾助阳,固精缩尿;益智仁辛温,暖肾固精缩尿,补肾助阳;以上四药共为臣药。丁香辛温,入肾经,有温肾助阳起痿之功;薤白辛苦温,《本草纲目》记载:“温补,助阳道”;葛根甘辛,《本经逢原》谓其能“鼓舞胃气”;生麦芽健胃消食、可增补益之功;此四药共为佐使。诸药合用,共奏补肾益气填精之功。本研究发现,在环磷酰胺致少弱精子症大鼠模型中,益肾生精方能显著提高精子浓度和活力,明显降低睾丸组织病理损害评分,增加体质质量、睾丸质量和指数,其中益肾生精方中剂量组提高精子质量的效果要优于五子衍宗丸组和左卡尼汀组。五子衍宗丸被誉为“古今种子第一方”,常作为中医治疗少弱精子症的基础方;左卡尼汀,又名左旋肉碱,是一种可以促进脂肪酸 β -氧化作用的物质,在精子能量代谢中发挥着重要作用,并且还具有较强的抗氧化作用,是西医治疗少弱精子症的常用药物^[20],本研究选用这 2 种药物作为阳性药,结果发现,在环磷酰胺致少弱精子症大鼠模型中,益肾生精方治疗少弱精子症药效良好,对精子质量的改善作用甚至优于五子衍宗丸和左卡尼汀,为益肾生精方临床治疗少弱精子症提供实验依据。

精子的产生受到下丘脑-垂体-睾丸轴的调控:下丘脑释放促性腺激素释放激素(GnRH)作用于垂体,垂体在上一级信号的作用下释放 FSH 和 LH, LH 可以促进睾丸中间质细胞合成 T, FSH 和 T 则共同促进精子的生成, T 又可以通过负反馈效应,调节 FSH 和 LH 的合成与释放,以维持性激素之间的相对平衡^[21]。FSH、LH 和 T 三者 in 精子的形成过程中发挥着重要作用,是评价男性生精功能的重要指标^[22]。本研究发现模型组大鼠血清中 T 水平降低、

表 6 益肾生精方对大鼠睾丸中 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of YSP on Bcl-2, Bax and cleaved Caspase-3 proteins in rats testis ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin
正常组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		0.63±0.12 ¹⁾	1.89±0.34 ¹⁾	1.65±0.18 ²⁾
益肾生精方低剂量组	2.91	0.92±0.13	1.43±0.09	1.39±0.06
益肾生精方中剂量组	5.83	0.94±0.07	1.09±0.19 ³⁾	1.15±0.30 ⁴⁾
益肾生精方高剂量组	11.66	1.01±0.12 ³⁾	1.14±0.33	1.27±0.24 ³⁾
五子衍宗丸组	1.03	1.19±0.30 ⁴⁾	1.37±0.21	1.15±0.11 ⁴⁾
左卡尼汀组	0.17	1.62±0.41 ⁴⁾	1.58±1.03	0.99±0.12 ⁴⁾

FSH和LH水平升高,与临床报道一致^[23],少弱精子症患者也表现为T水平降低、FSH和LH水平代偿性升高。益肾生精方能够降低FSH和LH的水平,升高T的水平,表明益肾生精方对性激素的合成与释放具有重要的调节作用,从而影响精子的生成。

适量的活性氧是机体内一些正常生理反应不可或缺的一部分,可一旦超过体内抗氧化系统的清除能力,就会引起氧化应激反应^[24],造成DNA损伤、脂质过氧化、酶活性下降等,从而影响生精过程的各个环节,最终导致精子浓度和活力下降^[25]。SOD是睾丸组织内最重要的一种抗氧化酶,MDA是脂质过氧化形成的终产物,睾丸组织中的SOD活性和MDA水平可以反映组织氧化应激损伤的程度。研究表明,少弱精子症患者精液中SOD活性显著降低,MDA水平显著升高^[26],提示氧化应激是导致精子质量下降的重要原因。本研究发现,环磷酸腺苷造模后,大鼠睾丸组织中的SOD活性降低、MDA水平升高,与AGHAIE等^[27]研究结果相一致,造成睾丸组织中氧化应激的发生,提示环磷酸腺苷造模能够模拟少弱精子症的疾病状态。而益肾生精方能够增加睾丸组织中SOD活性,降低MDA水平,提示益肾生精方能够提高机体的抗氧化能力,减轻氧化应激损伤,从而改善精子质量,王艳和王远辉的研究显示黄精、山药能够增强机体抗氧化能力、降低氧化应激损伤^[28-29],益肾生精方治疗少弱精子症的药效物质基础需要进一步的研究。

正常情况下,生精细胞中存在一定数量的凋亡,以便清除染色体异常的细胞,并且使生精细胞的数量能够维持在支持细胞所能调节的最合适的范围之内,具有重要的生理意义^[30]。当机体受到外在或者内在因素的刺激时,Bax、Caspase-3等基因被激活,Bcl-2等基因被抑制,细胞凋亡增加,导致精子浓度下降。研究表明,氧化应激、T水平降低、高温、辐射、有毒物质等多种因素都可以促进生精细胞的凋亡^[31]。本研究发现环磷酸腺苷能够诱导睾丸中生精细胞凋亡,可能通过干扰DNA复制和转录过程导致细胞凋亡^[32],也可能通过氧化应激造成细胞凋亡。结果显示,益肾生精方可以明显降低睾丸组织中生精细胞的凋亡率以及Bax、cleaved Caspase-3蛋白水平,升高Bcl-2蛋白水平。提示益肾生精方能够通过抑制生精细胞的凋亡增加精子的数量。

综上所述,本研究以精子质量为主要指标,以睾丸病理组织形态、睾丸指数、体质量为次要指标,从多个角度评价了益肾生精方治疗少弱精子症的

疗效,并初步探讨了其作用机制。研究结果表明,益肾生精方通过提高抗氧化能力、调节性激素水平和减少生精细胞凋亡等多个途径,提高精子质量,改善睾丸损伤,从而发挥治疗少弱精子症的作用。本研究为益肾生精方治疗少弱精子症提供了理论依据,但其具体作用靶点和药效物质基础有待进一步明确。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 曾云俊. 云南部分地区成年男性精液质量调查与重要影响因素分析[D]. 昆明:昆明医科大学,2020.
- [2] MINGUEZ-ALARCÓN L, WILLIAMS P L, CHIU Y H, et al. Secular trends in semen parameters among men attending a fertility center between 2000 and 2017: Identifying potential predictors [J]. *Environ Int*, 2018, 121: 1297-1303.
- [3] 曲仕浩,徐槌炎,黄晓清,等. 广东省阳江地区初婚育龄夫妇不孕不育症流行病学调查[J]. *广东医学*, 2017,38(10):1586-1588.
- [4] 吴山强,杨怡艳. 桂东南地区1918例男性精液质量结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2019,16(20):3016-3018.
- [5] CHABCHOUB I, NOUIOUI M A, ARAOUD M, et al. Effects of lead, cadmium, copper and zinc levels on the male reproductive function [J]. *Andrologia*, 2021, 53(9): e14181.
- [6] 孙文希,胡凌娟. 国内外不孕不育症现状及我国的干预策略探讨[J]. *人口与健康*, 2019(12):19-23.
- [7] 李彦红,姚志娟. 388例男性不育患者精液分析[J]. *中国现代药物应用*, 2020,14(1):62-63.
- [8] 马宝良,高轲,陈思,等. 甘肃地区6325例不育男性精液分析[J]. *中国男科学杂志*, 2019,33(1):36-39.
- [9] 彭娅娅,王维,陈东峰,等. 广州地区男性不育患者精液分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018,18(76):171-172.
- [10] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第5版)[M]. 谷翊群,陈振文,卢文红,等,译. 北京:人民卫生出版社,2011.
- [11] 王哲,陈亿慧,蔡平平. 少弱精子症中西医研究进展[J]. *河北中医*, 2017,39(9):1434-1440.
- [12] 施长春,白文俊. 睾丸生精功能障碍的促生精治疗[J]. *中国男科学杂志*, 2020,34(3):59-62.
- [13] 郭亭飞,黄平平,高翔,等. 弱精子症病因与治疗研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018,18(88):122-123,140.
- [14] 王继升. 补肾生精法治疗少弱精子症的数据挖掘及

- 其调控生精细胞的机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2021.
- [15] 李博悻,王琦,朱斌,等. 中医药治疗男性少弱精子症疗效的Meta分析[J]. 北京中医药大学学报,2018,41(10):863-872.
- [16] 郑燕飞. 黄精赞育胶囊化学成分及改善少弱精子症的作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [17] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1861.
- [18] 李博悻. 五味子甲素通过SCF/c-kit信号通路调控少、弱精子症大鼠模型精子凋亡作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2018.
- [19] 陈慰填,陈德宁,覃湛,等. 加味聚精食疗汤对少精、弱精症大鼠曲细精管结构改善的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(9):178-180.
- [20] 李海松,王继升. 少弱精子症中西医融合药物治疗共识[J]. 中国男科学杂志,2021,35(5):80-82,86.
- [21] KELESTIMUR H, BULMUS O, SERHATLIOGLU I, et al. Effects of treadmill exercise on sexual behavior and reproductive parameters in chronically stressed-male rats [J]. *Physiol Res*, 2021, 70 (5) : 765-775.
- [22] 吴剑锋. 男性基础性激素水平与精子质量参数的相关性探讨[J]. 现代检验医学杂志,2020,35(3):69-71,77.
- [23] 陈伟文,杨龙,吴荣海,等. 不育男性抗苗勒管激素与生殖激素及精液质量参数关系的研究[J]. 生殖医学杂志,2020,29(2):214-219.
- [24] KESHAVARZI Z, AMIRESMAILI S, SHAHROKHI N, et al. Neuroprotective effects of auraptene following traumatic brain injury in male rats: The role of oxidative stress [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 177: 203-209.
- [25] 刘建国,赵红乐,金保方. 氧化应激与男性不育研究进展[J]. 中华中医药学刊,2016,34(9):2104-2106.
- [26] 陈君颖,黄清勇,张美雪,等. 男性不育症患者精浆丙二醛和超氧化物歧化酶活性测定及临床价值研究[J]. 中国医药科学,2017,7(16):242-244.
- [27] AGHAIE S, NIKZAD H, MAHABADI J A, et al. Protective effect of combined pumpkin seed and ginger extracts on sperm characteristics, biochemical parameters and epididymal histology in adult male rats treated with cyclophosphamide [J]. *Anat Sci Int*, 2016, 91(4): 382-390.
- [28] 王艳,董鹏,金晨钟,等. 黄精多糖组成及其抗氧化活性分析[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(5):2191-2199.
- [29] 王远辉,余晓宇. 铁棍山药多糖纯化及抗氧化活性[J]. 食品科技,2018,43(3):165-172,180.
- [30] ZHANG X, LIU Z, CHEN S, et al. A new discovery: Total *Bupleurum saponin* extracts can inhibit the proliferation and induce apoptosis of colon cancer cells by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, doi:10.1016/J.JEP.2021.114742.
- [31] 王随心,张玉华,李向阳,等. 生精细胞凋亡相关基因[J]. 生命的化学,2011,31(3):389-394.
- [32] AFKHAMI - ARDAKANI M, HASANZADEH S, SHAHROOZ R, et al. *Spirulina platensis* (Arthrospira platensis) attenuates Cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male Wistar rats: Evidence for sperm apoptosis and p53/Bcl-2 expression [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(8): e13854.

[责任编辑 张丰丰]