

· 经典名方 ·

龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠生殖损伤的保护作用及机制

陆包伟¹, 刘露梅¹, 王能¹, 丁劲^{1,2}, 盛文¹, 何清湖^{1,3*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 广州中医药大学第七临床医学院附属宝安中医院, 广东深圳 518100;

3. 湖南医药学院, 湖南怀化 418000)

[摘要] 目的:探索龟鹿二仙胶改善糖尿病大鼠生殖损伤的疗效及可能作用机制。方法:将53只SD雄鼠随机分成5组,选取其中1组作为正常组,剩余4组合并成造模组用高脂饲料喂养联合30 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立糖尿病模型,以连续3次随机血糖均>16.7 mmol·L⁻¹作为纳入糖尿病生殖损伤模型标准。将成模的大鼠按血糖高低随机分成模型组、龟鹿二仙胶组(2 g·kg⁻¹)、维生素E组(0.03 g·kg⁻¹)、五子衍宗丸组(0.6 g·kg⁻¹),给予相应药物剂量灌胃,每天1次,连续治疗4周,每周测体质量和血糖。4周后取材进行指标检测,苏木素-伊红(HE)染色观察睾丸及附睾组织形态学变化,原位末端标记法(TUNEL)染色观察睾丸细胞凋亡情况;精液分析仪检测精子浓度和精子活力;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)水平;ELISA检测睾丸组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醇(MDA)、活性氧(ROS)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测睾丸组织Nrf2、HO-1、Bax、Bcl-2蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠睾丸组织萎缩,生精小管数量减少,附睾管壁增生,管腔狭窄;精子浓度和活力下降($P<0.01$);血清T、FSH和LH水平降低($P<0.01$);睾丸中ROS和MDA含量增加($P<0.01$),SOD和GSH-Px水平减少($P<0.01$);Bax表达增加($P<0.01$),Nrf2、HO-1、Bcl-2表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,龟鹿二仙胶组睾丸及附睾组织病变得得到一定改善;精子浓度和活力提升($P<0.05$, $P<0.01$);血清T和LH含量上升($P<0.05$, $P<0.01$),FSH含量差异无统计学意义;睾丸中ROS和MDA含量降低($P<0.01$),SOD和GSH-Px水平增加($P<0.01$);Bax表达下降($P<0.01$),Nrf2、HO-1、Bcl-2表达上升($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:龟鹿二仙胶能在一定程度上改善糖尿病大鼠生殖损伤,提升精子质量,其机制可能与改善氧化应激,抗凋亡作用有关。

[关键词] 龟鹿二仙胶;糖尿病;生殖损伤;氧化应激;凋亡

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)19-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221936

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220721.1909.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-22 11:51

Protective Effect of Guilu Erxianjiao on Reproductive Injury in Diabetic Rats and Its Mechanism

LU Baowei¹, LIU Lumei¹, WANG Neng¹, DING Jing^{1,2}, SHENG Wen¹, HE Qinghu^{1,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Affiliated Bao'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, The Seventh Clinical Medical College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, henzhen 518100, China;

3. Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Guilu Erxianjiao on improving reproductive injury in diabetic rats and its possible mechanism. **Method:** Fifty-three SD male rats were randomly divided into 5

[收稿日期] 2022-06-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973863);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH30);湖南中医药大学“东健”研究生创新项目(2020dj03)

[第一作者] 陆包伟,在读硕士,从事中西医结合男科学研究,E-mail:lubaowei@qq.com

[通信作者] *何清湖,教授,博士生导师,从事中西医结合男科学研究,E-mail:hph19651111@163.com

groups, with 1 group as the normal group and the other 4 groups as the modeling groups. Rats in the modeling groups were fed with a high-fat diet combined with $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection to induce diabetes, with the random blood glucose $>16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 3 consecutive times as the criteria for inclusion in the model of diabetic reproductive injury. The rats with diabetic reproductive injury were then randomly divided into a model group, a Guilu Erxianjiao group ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a Vitamin E group ($0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a Wuzi Yanzong pill group ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) according to the blood glucose level. The rats were given the corresponding drug dose intragastric administration, once a day for 4 weeks, and their body weight and blood glucose were measured weekly. After 4 weeks, samples were collected for index determination. Morphological changes in testis and epididymis were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and apoptosis of testis cells was observed by *in situ* end labeling (TUNEL) staining. Sperm concentration and motility were detected by the semen analyzer. Serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and testosterone (T) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The content of superoxide dismutase (SOD), propylene glycol (MDA), reactive oxygen species (ROS), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the testicular tissue was determined by ELISA. The expressions of nuclear respiratory factor-2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax) in the testicular tissue were detected by Western blot. **Result:** As compared with the normal group, testicular tissue atrophy, decreased spermatogenic tubules, epididymal wall hyperplasia, and lumen stenosis were observed in the model group. Sperm concentration and motility decreased ($P < 0.01$), and serum levels of T, FSH, and LH decreased ($P < 0.01$) in the model group. The content of ROS and MDA in the testis increased ($P < 0.01$), while that of SOD and GSH-Px decreased ($P < 0.01$) in the model group. The expression of Bax increased ($P < 0.01$), and the expressions of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 decreased ($P < 0.01$) in the model group. As compared with the model group, the pathological changes in the testis and epididymis in the Guilu Erxianjiao group were improved to some extent. Sperm concentration and motility increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the Guilu Erxianjiao group, serum levels of T and LH increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while FSH levels showed no significant difference. The content of ROS and MDA in the testis decreased ($P < 0.01$), while that of SOD and GSH-Px increased ($P < 0.01$) in the Guilu Erxianjiao group. The expression of Bax decreased ($P < 0.01$), and the expressions of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the Guilu Erxianjiao group. **Conclusion:** Guilu Erxianjiao improves the reproductive injury and sperm quality of diabetic rats to a certain extent, and the mechanism may be related to the improvement of oxidative stress and anti-apoptosis.

[Keywords] Guilu Erxianjiao; diabetes; reproductive injury; oxidative stress; apoptosis

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,主要是由于胰岛素生物活性或效应相对或绝对不足以及胰高血糖素活性相对或绝对过多引起的糖、脂肪、蛋白质等的代谢紊乱。中国大陆地区18岁及以上人群中,根据美国糖尿病协会(ADA)2018年诊断标准,总糖尿病和前驱糖尿病的估计患病率分别为12.8%和35.2%,男性患病率高于女性^[1]。长期高血糖状态会损害男性生殖系统,造成男性睾丸曲细精管、间质细胞、生精细胞等组织结构损伤,导致精液质量下降^[2],男性不育率升高。且在已确诊的男性不育症患者中,糖尿病男性的精子浓度与活力均明显低于正常血糖男性,与空腹血糖呈负相关,影响优生优育^[3]。随着三孩政策到来,公众对生育需

求相对扩大,糖尿病引起的男性不育已成为一个亟待解决的社会问题。

龟鹿二仙胶作为祖国医学经典名方,出自明代《医便》,其卷一载曰:“此方试极效,专治男、妇真元虚损,久不孕育。”全方由鹿角胶、龟甲胶、人参、枸杞子组成,具有补气血、益肾髓,养精种子之功,常用于治疗男子性功能障碍、少、弱精子症^[4],对改善化疗后免疫抑制、减轻不良反应^[5],治疗肝硬化引起的低蛋白血症^[6]等也有较好的疗效。本课题组前期研究提示,龟鹿二仙胶可改善腺嘌呤诱导的生殖损伤大鼠睾丸病变,提升精液质量,其机制可能与氧化应激、凋亡和脂代谢等相关^[7-8],但对糖尿病生殖损伤的影响尚未有相关研究。因此,通过建立糖尿

病生殖损伤大鼠模型,观察龟鹿二仙胶对大鼠睾丸、附睾和精液质量的影响,初步探索龟鹿二仙胶对治疗糖尿病生殖损伤的作用及可能机制,为后续进一步实验研究提供依据。

1 材料

1.1 动物 53只SPF级SD雄性大鼠,6周龄,体质量(210±10)g,购自湖南斯莱克景达有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心,室内温度控制在(24±2)℃,相对湿度维持在50%~70%。大鼠均自由摄食、饮水,适应性喂养1周后开始实验。此实验由湖南中医药大学动物实验伦理委员会审核批准,伦理编号LL2021061501。

1.2 药物 龟鹿二仙胶(中成药)(湖南中医药大学附属医院治未病中心,10g/包,批号20211001);维生素E软胶囊(杭州益品新五丰药业有限公司,50mg/粒,批号20091102);五子衍宗软胶囊(佛山手心制药有限公司,0.6g/粒,批号2106841)。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ)、柠檬酸钠缓冲液(SCB)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为S8050、C1013);大鼠睾酮(T)、大鼠卵泡刺激素(FSH)、大鼠黄体生成素(LH)、大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、大鼠丙二醛(MDA)、大鼠活性氧(ROS)、大鼠谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏晶美生物技术有限公司,批号分别为JM-01983R2、JM-01972R2、JM-02030R2、J3262-A、J8503-A、J3686-A、J3642-A);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(瑞士Roche公司,批号11684817910);核因子E₂相关因子2(Nrf2)多克隆抗体、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)多克隆抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)多克隆抗体(美国AAB公司,批号分别为A18579、A23918、A11171);血红素加氧酶-1(HO-1)多克隆抗体(美国Affinity公司,批号AF5393);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号MD6553);苏木素-伊红(HE)染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号DH0006)。

1.4 仪器 EZ-7 Lite型血糖仪(北京华益精点生物技术有限公司);AS-CASA型全自动精液分析系统(俄罗斯ArgusSoftLtd公司);HWS-24型电热恒温水浴槽(上海一恒恒温设备厂);Infinite F50型酶标分析仪(瑞士Tecan公司);3-30K型低温离心机(德国Sigma公司);TS-100型脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司);NIKON ECLIPSE型正置荧光显微镜

(日本尼康公司);BG-subMIDI型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);ChemiScope6100型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);GelDoc-It310型凝胶成像系统(美国UVP公司)。

2 方法

2.1 动物造模分组与给药 53只SD雄性大鼠按体质量高、低随机数字表法分成5组,随机选取1组作为正常组,其余4组合为1组进行造模。正常组用普通饲料喂养8周,造模组用高脂饲料喂养8周。8周后,造模组大鼠空腹状态下30mg·kg⁻¹STZ腹腔注射建立糖尿病模型^[9]。注射后每3d测1次随机血糖,以连续3次随机血糖均>16.7mmol·L⁻¹作为纳入糖尿病生殖损伤模型标准^[10]。血糖不达标的大鼠补打20mg·kg⁻¹STZ后按前述步骤继续观察,若补打2次血糖仍未达标者,剔除造模组麻醉下处死。待造模组大鼠均成模后,按3次随机血糖均值高低进行分组,分为模型组、龟鹿二仙胶组、维生素E组、五子衍宗丸组。龟鹿二仙胶用磨粉机打成粉剂后,加入蒸馏水溶解,制成1g·mL⁻¹溶液,龟鹿二仙胶临床用量为每日20g,按成人60kg体质量,人和大鼠等效剂量换算系数6.17计算出龟鹿二仙胶每日灌胃量约为2g·kg⁻¹^[11];维生素E和五子衍宗丸软胶囊均用1mL注射器抽出胶囊内液体,放入无菌15mL离心管内保存。依据药品说明书上临床使用剂量,按上述等效剂量换算出维生素E每日灌胃量约为0.03g·kg⁻¹,五子衍宗丸每日灌胃量约为0.6g·kg⁻¹,给药体积10mL·kg⁻¹,正常组与模型组大鼠用等体积蒸馏水灌胃,1次/d,连续灌胃28d。

2.2 体质量和血糖检测 每周定期用电子天平称量体重,大鼠禁食12h后测空腹血糖,将血糖试纸插入血糖仪,对大鼠尾部用碘伏棉球杀毒,干棉球擦净,采血针刺破大鼠尾部毛细血管,用血糖试纸吸取血液,待血糖仪读数后记录,连续检测4周。

2.3 血清性激素测定 大鼠麻醉后腹主动脉取血,5000r·min⁻¹离心10min(离心半径15cm)后得到血清冻存于-80℃冰箱保存。ELISA试剂盒检测血清中T、FSH、LH的水平,具体步骤按试剂说明书进行。

2.4 HE染色观察睾丸和附睾形态学变化 取大鼠双侧睾丸、附睾称重。将一侧睾丸、附睾分别泡入4%多聚甲醛中固定,经脱水,石蜡包埋切片,二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水后,进行HE染色,光镜下观察大鼠睾丸、附睾病理形态学变化。

2.5 TUNEL染色检测睾丸组织细胞凋亡 取大鼠

睾丸组织石蜡切片,经二甲苯脱蜡,乙醇脱水后,按试剂盒步骤进行TUNEL染色,显微镜下观察。

2.6 精液质量分析 取大鼠另一侧附睾,在装有1 mL 37 °C预热台式液的培养基中剪碎,用移液枪反复吹打,使精子充分游离出附睾,然后吸取上层白色稠状液体10 μL放入装有990 μL预热台式液离心管中稀释,从稀释液中吸取10 μL滴于精子计数板上,用精液分析仪检测精子浓度与活力。

2.7 睾丸氧化应激和凋亡相关指标检测 取大鼠右侧睾丸,切成数块分装冻存,一部分用ELISA试剂盒检测睾丸中ROS、MDA、SOD、GSH-Px水平,具体操作按说明书进行。另一部分用做Western blot检测,取睾丸组织加液氮进行匀浆,加裂解液混匀,冰浴超声破碎细胞,4 °C,12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm),收集上清,BCA蛋白定量法测定蛋白浓度,制备SDS-PAGE凝胶,加入相应体积的总蛋白样品与5×蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混合,煮

沸变性后进行电泳,转至PVDF膜,封闭液中封闭1 h,分别加Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax和β-actin抗体,4 °C过夜,TBST洗涤3次,加二抗孵育1 h,洗膜,加入显色剂,用Image J软件对条带进行分析。

2.8 统计学分析 采用SPSS 25.0分析数据,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若符合正态性和方差齐性,用单因素方差分析;若不符合正态性或方差齐性,用Kruskal-Wallis H检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病大鼠体质量及空腹血糖的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$),空腹血糖显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,龟鹿二仙胶组大鼠体质量在第1~3周期间明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),空腹血糖差异无统计学意义,维生素E组和五子衍宗丸组与模型组比较,大鼠体质量及空腹血糖在4周内差异均无统计学意义。见表1和表2。

表1 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *Guilu Erxianjiao* on body weight of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
正常组		9	660.00±58.96	653.56±58.60	650.56±64.46	655.00±69.98	678.33±61.32
模型组		9	486.89±72.05 ²⁾	435.89±65.84 ²⁾	442.00±62.03 ²⁾	428.89±61.92 ²⁾	459.22±60.78 ²⁾
龟鹿二仙胶组	2	10	536.30±47.84	515.30±73.51 ⁴⁾	502.30±65.59 ³⁾	483.30±56.71 ³⁾	496.30±44.92
维生素E组	0.03	8	523.38±36.17	480.00±44.68	476.13±41.67	452.88±48.28	504.38±42.54
五子衍宗丸组	0.6	8	517.88±41.84	471.13±43.11	475.00±45.41	448.38±41.30	486.63±43.73

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6同)

表2 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *Guilu Erxianjiao* on fasting blood glucose in diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

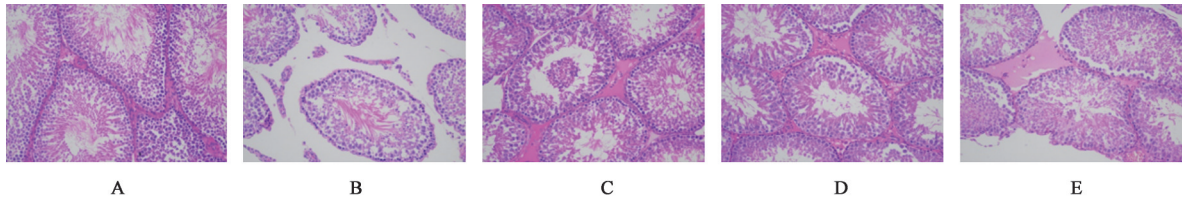
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
正常组		9	4.62±1.27	4.94±0.70	4.32±0.83	3.72±0.51	4.12±0.47
模型组		9	16.68±6.38 ²⁾	18.40±7.62 ²⁾	19.97±6.62 ²⁾	19.29±3.95 ²⁾	19.63±10.89 ²⁾
龟鹿二仙胶组	2	10	17.10±6.45	18.84±6.45	19.00±6.28	19.20±7.01	20.42±5.60
维生素E组	0.03	8	15.18±5.54	15.64±4.55	19.25±4.76	16.70±8.06	17.38±5.57
五子衍宗丸组	0.6	8	15.25±5.16	18.26±8.20	18.25±7.32	19.75±7.78	18.54±8.28

3.2 对糖尿病大鼠睾丸及附睾的影响 与正常组比较,模型组睾丸及附睾体积明显减小,HE染色显示睾丸生精小管数量减少,生精细胞数量减少排列疏松;附睾管壁增生变厚,管腔萎缩,精子数量减少。与模型组比较,龟鹿二仙胶、维生素E和五子衍宗丸组大鼠睾丸及附睾体积明显增加,睾丸及附睾病理损伤均得到不同程度的改善。见图1和图2。

3.3 对糖尿病大鼠睾丸细胞凋亡的影响 对睾丸组织进行TUNEL染色,与正常组比较,模型组睾丸

凋亡细胞数量明显增多;与模型组比较,龟鹿二仙胶组、维生素E组和五子衍宗丸组睾丸凋亡细胞数量明显减少,更趋近于正常水平。见图3。

3.4 对糖尿病大鼠精子质量的影响 与正常组比较,模型组精子浓度、前向运动精子百分比和前向+非前向运动精子百分比显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,龟鹿二仙胶组精子浓度显著升高($P < 0.01$),前向运动精子百分比升高($P < 0.05$),前向+非前向运动精子百分比显著升高($P < 0.01$)。维生素E组精子浓



注:A.正常组;B.模型组;C.龟鹿二仙胶组;D.维生素E组;E.五子衍宗丸组(图2-图4同)

图1 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠睾丸形态结构的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Guilu Erxianjiao on morphology and structure of testis in diabetic rats (HE, ×200)

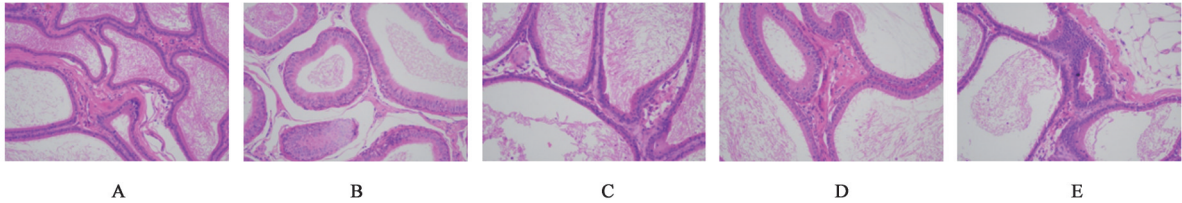


图2 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠附睾形态结构的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Guilu Erxianjiao on morphology and structure of epididymis in diabetic rats (HE, ×200)

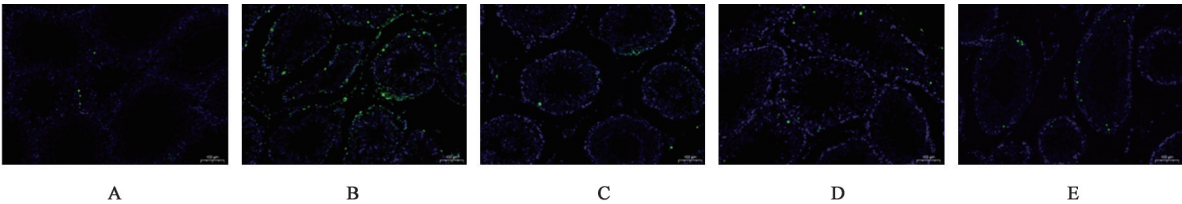


图3 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠睾丸细胞凋亡的影响(TUNEL,×200)

Fig. 3 Effect of Guilu Erxianjiao on apoptosis of testicular cells in diabetic rats (TUNEL, ×200)

度、前向运动精子、前向+非前向运动精子百分比显著升高($P<0.01$)。五子衍宗丸组精子浓度显著升高

($P<0.01$),前向运动精子百分比升高($P<0.05$),前向+非前向运动精子百分比显著升高($P<0.01$)。见表3。

表3 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠精子质量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Guilu Erxianjiao on sperm quality of diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	精子浓度/1×10 ⁶ 个/mL	前向运动精子/%	前向+非前向运动精子/%
正常组		9	70.48±16.58	41.20±6.13	51.04±6.67
模型组		9	11.46±7.85 ²⁾	7.22±10.60 ²⁾	11.64±15.24 ²⁾
龟鹿二仙胶组	2	10	40.89±18.93 ⁴⁾	24.19±12.00 ³⁾	41.40±15.56 ⁴⁾
维生素E组	0.03	8	38.17±16.65 ⁴⁾	31.09±15.55 ⁴⁾	42.04±20.84 ⁴⁾
五子衍宗丸组	0.6	8	48.51±16.88 ⁴⁾	26.77±9.18 ³⁾	43.26±12.85 ⁴⁾

3.5 对糖尿病大鼠血清性激素的影响 与正常组比较,模型组血清T、LH、FSH水平均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,龟鹿二仙胶组血清T、LH水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),FSH水平差异无统计学意义。维生素E组血清T、LH、FSH水平显著升高($P<0.01$)。五子衍宗丸组血清T水平明显升高($P<0.05$),LH、FSH水平无明显差异。见表4。

3.6 对糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激相关因子的影响 与正常组比较,模型组ROS、MDA含量显著上升($P<0.01$),SOD、GSH-Px水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,龟鹿二仙胶组ROS、MDA含

量显著下降($P<0.01$),SOD、GSH-Px含量显著升高($P<0.01$),维生素E组ROS、MDA含量显著下降($P<0.01$),SOD、GSH-Px水平显著升高($P<0.01$),五子衍宗丸组ROS、MDA含量显著下降($P<0.01$),SOD、GSH-Px水平明显升高($P<0.05$)。见表5。

3.7 对糖尿病大鼠睾丸组织Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax表达的影响 与正常组比较,模型组睾丸组织Bcl-2、Nrf2、HO-1表达水平显著降低($P<0.01$),Bax表达显著上升($P<0.01$);与模型组比较,龟鹿二仙胶组睾丸组织Bcl-2、Nrf2、HO-1表达水平明显升高

表4 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠血清性激素的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Guilu Erxianjiao on serum sex hormones in diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	T/ng·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹
正常组		9	247.91±36.67	36.20±6.05	10.43±1.16
模型组		9	143.88±33.40 ²⁾	23.34±5.55 ²⁾	7.88±1.24 ²⁾
龟鹿二仙胶组	2	10	177.91±37.57 ³⁾	30.94±4.67 ⁴⁾	8.58±1.31
维生素E组	0.03	8	215.04±41.69 ⁴⁾	39.92±3.33 ⁴⁾	9.45±1.50 ³⁾
五子衍宗丸组	0.6	8	186.70±31.37 ³⁾	26.90±5.23	7.96±1.56

表5 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠睾丸组织氧化应激相关因子的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of Guilu Erxianjiao on oxidative stress factors in testis of diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ROS/ng·L ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	SOD/μmol·L ⁻¹	GSH-Px/U·L ⁻¹
正常组		9	410.21±34.07	25.33±3.11	80.08±5.42	427.41±42.91
模型组		9	780.93±33.86 ²⁾	50.34±3.23 ²⁾	36.97±5.90 ²⁾	209.09±25.16 ²⁾
龟鹿二仙胶组	2	10	578.40±48.49 ⁴⁾	35.30±3.26 ⁴⁾	62.93±5.49 ⁴⁾	310.15±48.33 ⁴⁾
维生素E组	0.03	8	551.30±43.78 ⁴⁾	32.10±3.23 ⁴⁾	68.40±5.93 ⁴⁾	307.31±19.29 ⁴⁾
五子衍宗丸组	0.6	8	625.09±35.27 ⁴⁾	37.04±3.83 ⁴⁾	59.83±6.51 ³⁾	288.00±29.60 ³⁾

($P<0.05$, $P<0.01$), Bax 表达显著降低 ($P<0.01$), 维生素E组睾丸组织 Nrf2、HO-1 表达水平显著升高 ($P<0.01$), Bax 表达显著降低 ($P<0.01$), 五子衍宗丸组睾丸组织 Nrf2 表达水平明显升高 ($P<0.05$), Bax 表达明显降低 ($P<0.05$)。见图4、表6。

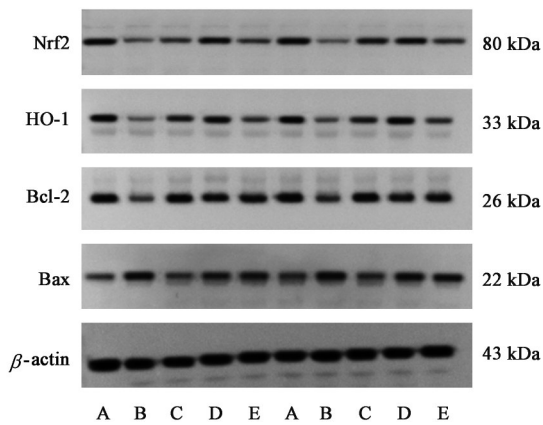


图4 糖尿病大鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Nrf2, HO-1, Bcl-2 and Bax protein expression in testicular tissue of diabetic rats

表6 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Table 6 Effect of Guilu Erxianjiao on Nrf2, HO-1, Bcl-2 and Bax expression in testis of diabetic rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
正常组		0.64±0.08	0.63±0.05	0.71±0.05	0.42±0.08
模型组		0.30±0.07 ²⁾	0.32±0.01 ²⁾	0.38±0.02 ²⁾	0.69±0.06 ²⁾
龟鹿二仙胶组	2	0.47±0.09 ⁴⁾	0.48±0.03 ³⁾	0.71±0.03 ⁴⁾	0.41±0.07 ⁴⁾
维生素E组	0.03	0.57±0.08 ⁴⁾	0.59±0.07 ⁴⁾	0.53±0.09	0.55±0.03 ⁴⁾
五子衍宗丸组	0.6	0.42±0.08 ³⁾	0.43±0.03	0.57±0.06	0.57±0.03 ⁴⁾

4 讨论

近年来,我国成人糖尿病发病率不断上升,以2型糖尿病为主,男性高于女性^[12],育龄期糖尿病男性患者逐渐增多。糖尿病会对男性精子的发生、成熟和活力等多方面产生不利影响,造成男性不育。龟鹿二仙胶主治男、妇久不孕育,临床应用历史悠久。方中鹿角胶性温味甘咸,补肝肾,益精养血;龟甲胶性凉味甘咸,滋阴养血,二胶皆血肉之品,另类有情,补肾益精血之效更甚,共为君药。人参补气益脾肺,枸杞子养血益肝肾,同为臣药。《古今名医方论》有载:“是方也,一阴一阳,无偏胜之忧;入气入血,有和平之美。由是精生而气旺,气旺而神昌,庶几龟鹿之年矣,故曰二仙。”药理研究发现鹿角胶可调节肾阳虚大鼠性腺功能,提升精子密度及活力^[13];龟甲胶能降低肾阴虚大鼠睾丸病理损伤,抑制生精细胞凋亡,改善精子发生环境^[14];人参、枸杞子均有良好的抗氧化作用^[15-16]。而糖尿病引起的生殖损伤可能与氧化应激、炎症和凋亡等密切相

关^[17],故推测龟鹿二仙胶可能具有改善糖尿病生殖损伤的作用。维生素E是西医治疗男性不育较为常用药,又名生育酚,具有抗氧化作用,能提升精子活力^[18]。五子衍宗丸是中医治疗男子不育的传统名方,在动物实验和临床上都能有效改善精子质量^[19]。因此,本实验选用这两种药物作为阳性药。

由于目前龟鹿二仙胶、五子衍宗丸、维生素E对血糖影响的相关研究较少,所以对这3种药物在灌胃过程中的血糖变化进行监测。结果显示在没有降糖药物干预下,与正常组比较,其余各组大鼠空腹血糖明显升高。与模型组比较,龟鹿二仙胶、五子衍宗丸和维生素E组大鼠空腹血糖变化不明显,提示这3种药物不会明显加重空腹血糖负担。

睾丸是分泌T和产生精子的场所。睾丸形态完整性,睾酮水平,精子浓度及活力是反映雄性生殖功能的重要参数。高脂饮食联合STZ诱导的糖尿病模型大鼠精子浓度及活力显著降低,光镜下模型组大鼠睾丸生精小管数量减少,发生不同程度萎缩退化,生精细胞排列稀疏,精液检测显示精子数量减少,活力降低,提示糖尿病对雄鼠产生较为明显的生殖损伤。与模型组比较,龟鹿二仙胶能在一定程度上改善糖尿病引起的睾丸组织病理改变,提升精子浓度及活力。

下丘脑-垂体-性腺轴(HPGA)协调稳态是促进精子生长成熟,维持正常生殖功能的关键。研究发现糖尿病大鼠血清FSH、LH和T水平出现明显降低^[20]。可能是由于糖尿病大鼠胰岛素(INS)分泌相对或绝对不足,导致下丘脑中促性腺激素释放激素(GnRH)分泌减少^[21],引起FSH和LH水平降低,且伴随睾丸组织破坏,T合成减少。本实验显示模型组大鼠血清LH、FSH和T水平均有下降,HPGA轴功能产生明显紊乱;与模型组比较,龟鹿二仙胶能明显提升T、LH水平,调节HPGA轴分泌功能。

细胞凋亡是机体调控自身生长发育的正常生理过程,在糖尿病状态下细胞过度凋亡,从而造成器官功能损伤。Bax是促凋亡蛋白,会释放细胞色素C,激活下游胱天蛋白酶(Caspase)相应酶系,促进细胞凋亡;Bcl-2是抗凋亡蛋白,可通过与Bax聚化结合,干扰细胞色素C的释放,从而抑制凋亡^[22]。有研究提示糖尿病大鼠睾丸中Bax/Bcl-2值增加,凋亡信号通路激活,引起睾丸病理性损伤^[23]。本实验显示与正常组比较,模型组大鼠睾丸组织中Bax表达明显增加,Bcl-2表达明显降低,二者比值增加,促进睾丸细胞凋亡,TUNEL染色可见睾丸组织内凋亡

细胞数量明显增多;与模型组比较,龟鹿二仙胶可能是通过降低Bax/Bcl-2,发挥抗凋亡作用,其睾丸组织中凋亡细胞数量显著减少。

氧化应激被认为是糖尿病继发性并发症发生的主要机制之一,也是睾丸功能障碍的主要原因。ROS是机体氧化反应的主要产物,普遍存在于各个组织细胞中,精子质量与ROS密切相关,正常低水平ROS对精子获能、活化、顶体反应都有着重要作用^[24]。而高血糖状态会释放大量ROS进入细胞质,ROS与脂质发生过氧化反应形成MDA,因此MDA含量也能间接反映氧化损伤程度。实验显示所有糖尿病大鼠睾丸中ROS和MDA含量均有不同程度升高,提示糖尿病状态下睾丸氧化应激损伤加重。

Nrf2是抵御氧化中起关键作用的一个上游转录因子,可通过调节细胞内抗氧化剂来改善过度氧化应激。正常生理情况下,Nrf2被Keap1锚定在细胞质中,但当细胞受到ROS损伤时,Nrf2从Keap1中解离进入细胞核,结合抗氧化反应元件(ARE),激活并转录受Nrf2调控的抗氧化酶基因表达,HO-1是一种抗氧化、抗炎和抗凋亡的微粒体应激蛋白,受到Nrf2调控并相互作用,共同参与抗氧化反应^[25]。而SOD、GSH-Px作为下游抗氧化酶产物,能有效地清除过量ROS,维持机体氧化与抗氧化平衡。研究发现糖尿病会导致睾丸中Nrf2表达下调,加重睾丸氧化损伤和炎症反应,引起精子质量下降^[26]。实验显示模型组大鼠睾丸中Nrf2、HO-1表达明显下调,SOD、GSH-Px水平降低,ROS、MDA含量升高;与模型组比较,龟鹿二仙胶组大鼠睾丸中Nrf2、HO-1表达明显增加,增加SOD、GSH-Px水平升高,ROS、MDA水平降低,提示机体抗氧化应激能力增强。

综上所述,龟鹿二仙胶能在一定程度上改善糖尿病大鼠睾丸及附睾病变,增加大鼠精子浓度及活力;提升大鼠血清T和LH水平,调节HPGA分泌功能;可能通过调控Bcl-2与Bax的表达,抑制睾丸细胞凋亡;通过上调Nrf2、HO-1表达,使SOD、GSH-Px水平增加,从而降低ROS、MDA水平,发挥抗氧化作用,改善糖尿病大鼠生殖损伤。值得关注的是,本研究仅追踪大鼠4周空腹血糖状况,并未监测灌胃后是否会对血糖产生波动,对长期用药下空腹或随机血糖的影响还有待进一步实验论证。高血糖是引起男性生殖损伤根本原因,有效控制血糖仍是预防和治疗糖尿病及其并发症的主要措施。后续可考虑将龟鹿二仙胶与降糖药联合应用,探索联合

疗法对糖尿病生殖损伤的效果及机制,为临床试验提供一定参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LI Y, TENG D, SHI X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: National cross sectional study [J]. *BMJ*, 2020, doi: 10.1136/bmj.m997.
- [2] HE Z, YIN G, LI Q Q, et al. Diabetes mellitus causes male reproductive dysfunction: A review of the evidence and mechanisms [J]. *In Vivo*, 2021, 35(5): 2503-2511.
- [3] 马婧, 邓佩佩, 韩瑞钰, 等. 糖尿病与不育男性精液质量关系 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(11): 1537-1540, 1543.
- [4] 宾东华, 李玲, 唐宇, 等. 谭新华基于“补、固、和”法运用龟鹿二仙胶治疗男科疾病经验 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(6): 903-906.
- [5] 黄小玲. 龟鹿二仙胶汤治疗阴阳两虚型中晚期大肠癌因性疲乏患者的临床观察及对免疫功能的影响 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [6] 王玉涛, 王琮, 李牧婵, 等. 龟鹿二仙胶加减治疗肝硬化低蛋白血症 30 例临床观察 [J]. *北京中医药*, 2019, 38(2): 102-105.
- [7] 刘子毓, 何清湖, 孙贵香, 等. 两种剂型龟鹿二仙胶对于腺嘌呤诱导肾阳虚型少弱精子症大鼠的干预作用 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(5): 1384-1389.
- [8] 丁劲, 何清湖, 周兴, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨龟鹿二仙胶治疗少、弱精子症作用机制 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(12): 4490-4504.
- [9] SRINIVASAN K, VISWANAD B, ASRAT L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(4): 313-320.
- [10] HE W, LIU H, HU L, et al. Icarin improves testicular dysfunction via enhancing proliferation and inhibiting mitochondria-dependent apoptosis pathway in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 168.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2021, 41(5): 482-548.
- [13] 胡海林. 鹿角胶对阳虚少弱精子症大鼠的改善作用及 CFTR 蛋白表达影响的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [14] 盛文. 基于 Bcl-2/Bax 通路及线粒体功能探讨龟甲胶治疗肾阴亏虚型少弱精子症的作用机制 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [15] 阎茹玉, 吴宿慧, 方亚影, 等. 原人参二醇延缓衰老及抗氧化应激作用的机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(1): 56-62.
- [16] 邱树磊, 胡国柱, 陈玉库, 等. 枸杞多糖的提取纯化及体内外抗氧化活性研究 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42(10): 56-61.
- [17] ZHANG P, LI T, WU X, et al. Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies [J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 583-600.
- [18] GHAFARIZADEH A A, MALMIR M, NADERI NOREINI S, et al. The effect of vitamin E on sperm motility and viability in asthenoteratozoospermic men: *In vitro* study [J]. *Andrologia*, 2021, 53(1): e13891.
- [19] 李浩, 俞旭君, 阳方, 等. 五子衍宗丸治疗男性不育症 64 例临床研究 [J]. *中国性科学*, 2020, 29(10): 123-126.
- [20] LEI X, HUO P, WANG Y, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides improve testicular spermatogenic function in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 164.
- [21] ÖZTIN H, ÇAĞILTAY E, ÇAĞLAYAN S, et al. Kisspeptin levels in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism diagnosed male patients and its relation with glucose-insulin dynamic [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(12): 991-994.
- [22] 胡善明, 王亚楠, 许正茂, 等. Bcl-2 家族分子在细胞凋亡中的作用研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42(10): 85-89.
- [23] NNA V U, BAKAR A, AHMAD A, et al. Diabetes-induced testicular oxidative stress, inflammation, and caspase-dependent apoptosis: The protective role of metformin [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2020, 126(5): 377-388.
- [24] GIBB Z, GRIFFIN R A, AITKEN R J, et al. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility [J]. *Anim Reprod Sci*, 2020, 220: 106456.
- [25] BISWAS C, SHAH N, MUTHU M, et al. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(39): 26882-26894.
- [26] WANG Y, ZHANG Z, GUO W, et al. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307(1): 14-23.

[责任编辑 孙丛丛]