

不同补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡的影响

张晨曦, 王永辉*, 许凯霞, 王增鑫, 侯渊
(山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619)

[摘要] 目的:探讨不同补益方剂左归丸、右归丸、六味地黄丸、金匱肾气丸、五子衍宗丸、八珍汤对老龄小鼠生精细胞凋亡的影响。方法:将 80 只 15 月龄 BALB/c 小鼠随机分为老年组、左归丸组、右归丸组、六味地黄丸组、金匱肾气丸组、五子衍宗丸组、八珍汤组以及阳性药物(左卡尼汀)组,每组 10 只,另设 10 只 2 月龄 BALB/c 小鼠为青年组,各给药组按中药含生药 $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分别灌胃给予相应药物,左卡尼汀组肌肉注射给药 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 4 周。于末次给药 24 h 后将小鼠摘眼球取血,分离血浆、血清,利用酶联免疫吸附法(ELISA)测定小鼠血中丙二醛(MDA),一氧化氮合酶(NOS),促红细胞生成素(EPO),超氧化物歧化酶(SOD)以及外周血促卵泡生成激素(FSH),促黄体生成激素(LH),睾酮(T)的含量;采用免疫组化法检测各组小鼠睾丸组织 Ki-67 的表达;采用 TUNEL 法检测各组小鼠生精细胞凋亡情况。结果:与青年组比较,老年组小鼠 MDA, NOS, EPO 水平明显上升($P < 0.05$);与老年组比较,各治疗组小鼠血清 MDA, NOS, EPO 水平明显下降($P < 0.05$),除五子衍宗丸组和六味地黄丸组外,各治疗组小鼠血清 SOD 水平上升($P < 0.05$)。与青年组比较,老年组小鼠血清 FSH 明显升高及 LH, T 含量明显下降($P < 0.05$);与老年组比较,五子衍宗丸组小鼠血清 FSH 明显下降及 LH, T 含量明显升高($P < 0.05$)。免疫组化法检测结果显示,与青年组比较,老年组小鼠睾丸组织内 Ki-67 表达水平明显下降($P < 0.05$);与老年组比较,左卡尼汀组、六味地黄丸组、八珍汤组以及五子衍宗丸组小鼠睾丸组织 Ki-67 表达水平升高($P < 0.05$)。TUNEL 法检测结果显示,与青年组比较,老年组小鼠生精细胞凋亡率明显上升($P < 0.05$);与老年组比较,各治疗组小鼠生精细胞凋亡率均明显下降,以五子衍宗丸下降率最显著($P < 0.05$)。结论:6 个不同的补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡都有一定的抑制作用,其中以五子衍宗丸效果最佳。

[关键词] 左归丸; 右归丸; 六味地黄丸; 金匱肾气丸; 五子衍宗丸; 八珍汤; 生精细胞凋亡; 老龄小鼠

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0148-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180826

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1448.003.html>

[网络出版时间] 2018-01-26 10:27

Effect of Different Nourishing Formulas on Spermatogenic Cell Apoptosis of Aging Mice

ZHANG Chen-xi, WANG Yong-hui*, XU Kai-xia, WANG Zeng-xin, HOU Yuan

(School of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To the effect of different nourishing formulas Zuoguiwan, Youguiwan, Liuwei Dihuangwan, Jinkui Shenqiwan, Wuzi Yanzong Wan and Bazhentang on spermatogenic cell apoptosis of aging mice. **Method:** A total of 80 15-month-old aging mice were divided into 8 groups, aging group, Zuoguiwan group, Youguiwan group, Liuwei Dihuangwan group, Jinkui Shenqiwan group, Wuzi Yanzong Wan group, Bazhentang group and levocarnitine group, with 10 in each group. Another 10 2-month-old young mice were selected as control group. All of the drug groups were given the corresponding drugs by gavage at the dosage of $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and levocarnitine group was intramuscularly injected with the drug at the dosage of $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. All mice were administered once a day, for 4 weeks in a row. Twenty-four hours after the last administration, blood was collected

[收稿日期] 20171122(010)

[基金项目] 山西省青年科技研究基金项目(201601D021166)

[第一作者] 张晨曦,在读硕士,从事方剂创新药物及制剂研究, E-mail:1027389633@qq.com

[通信作者] *王永辉,博士,教授,硕士生导师,从事方剂创新及药物制剂研究, Tel:0351-3179745, E-mail:wyh766188@sina.com

from the mice by removing their eyes, and serum was separate to detect the contents of malondialdehyde (MDA), nitric oxide synthase (NOS), erythropoietin (EPO), superoxide dismutase (SOD), follicle stimulating hormone (FSH), leuteinizing hormone (LH) and testosterone (T). Then, the apoptosis of spermatogenic cells and the expression of Ki-67 in testis were detected in each group. **Result:** Compared with control group, the contents of MDA, NOS and EPO in aging group increased, with no significant difference in SOD ($P < 0.05$). Compared with aging group, the contents of MDA, NOS and EPO in treatment groups decreased, while their SOD increased (except for Wuzi Yanzong Wan group and Liuwei Dihuangwan) ($P < 0.05$). Compared with control group, aging group's FSN increased, while LH and T significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with aging group, the content of FSN significantly decreased, whereas LH and T increased ($P < 0.05$). Based on the immunohistochemical method, compared with control group, aging group's Ki-67 expression in testis decreased, Compared with aging group, Liuwei Dihuangwan group, Wuzi Yanzong Wan group, Bazhentang group and levocarnitine group showed an increase in the expression of Ki-67 in testis ($P < 0.05$). On the basis of Tunel method, compared with control group, the apoptosis rate of spermatogenic cells significantly increased in aging group, while that of all of the treatment groups decreased, especially in the Wuzi Yanzong Wan group ($P < 0.05$). **Conclusion:** All of the six different nourishing formulas have an inhibitory effect on the apoptosis of spermatogenic cells of aging mice, with the best efficacy in Wuzi Yanzong Wan.

[**Key words**] Zuoguiwan; Youguiwan; Liuwei Dihuangwan; Jinkui Shenqiwan; Wuzi Yanzong Wan; Bazhentang; apoptosis of spermatogenic cell; aging mice

WHO 预测男性不育症将是 21 世纪继心血管病和癌症之后,第 3 大威胁人类健康的疾病。据调查,约有 7% 的男性受到不育症的困扰,而少弱精子症是男性不育症的主要因素^[1]。随着生活压力的增大、环境污染等因素,生精细胞凋亡过度,导致精子数量和质量下降,是形成少弱精子症的主要原因^[2]。生精细胞凋亡是指生精细胞的程序性死亡,在精子发育及成熟过程中具有重要的作用^[3]。在正常生理条件下,生精细胞凋亡能帮助机体清除异常精子并有利于控制精子数量^[4]。因此促进精子发生,抑制生精细胞过度凋亡,提高男性精子质量以及数量,是治疗男性不育症的关键。

本病属中医“不育”“无子”“精寒”“精冷”范畴。男子的生殖功能强健与否,有赖于肾中精气的充盈;精血同源,若无气血之充养和滋润,则导致少、弱精。传统中医以整体观念为指导,辨证施治为原则,在治疗少弱精子症方面有很大优势。王晓云等^[5]临床疗效观察中表明左归丸能明显改善少弱精子症患者的精子质量;陈杰等^[6]通过氢化可的松建立肾虚模型表明右归丸可显著改善肾阳虚大鼠的体能状态,调节机体血清激素水平;毕焕洲等^[7]研究表明金匱肾气丸能修复微波辐射导致的睾丸损伤,提高精子活力;李延晖等^[8]研究表明,八珍汤、六味地黄丸对⁶⁰Co γ -射线导致的生殖系统损伤有一定的保护作用;朱纪伟等^[9]临床试验表示五子衍宗

丸汤剂对少弱精子症患者有较好的治疗作用。临床上治疗少弱精子症多从补肾填精入手,周建甫等^[10]通过对补肾类中药治疗男性不育症的随机对照实验文献进行统计分析,发现中医将少弱精子症分为肾阴虚、阳虚精亏、肾虚型、肾虚湿热、肾精亏虚 5 个证型,均含有肾虚的基本病机。故选用左归丸滋补肾阴;右归丸温补肾阳、填精止遗;金匱肾气丸温补肾阳,化气行水;六味地黄丸滋阴补肾;五子衍宗丸补益肾精;又因脾为后天之本,气血失养亦会影响先天之精,故加八珍汤^[11]益气补血,从补肾益精与益气补血两方面观察不同补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡的影响,期以从中选择最有效的补益方剂,为进一步的深入研究提供基础数据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 BALB/c 小鼠,雄性,2 月龄青年组,以及喂养至 15 月龄老年组。均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0006。本实验所涉及的动物相关操作均在山西中医药大学动物伦理委员会的批准下进行(编号 2017-016)。

1.2 药物及试剂 左归丸(河南省宛西制药股份有限公司,批号 150901);右归丸,金匱肾气丸(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,批号 16013016,16014124);左卡尼汀注射剂(美国 Sigma 公司,批号 150986);六味地黄丸(河南省宛西制药

股份有限公司,批号 140253);八珍汤(四川禾润制药有限公司,批号 141202);五子衍宗丸(太极集团四川绵阳制药有限公司,批号 1601002);小鼠睾酮(T),促黄体生成激素(LH),促卵泡激素(FSH),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮合酶(NOS),促红细胞生成素(EPO)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号分别为 1704133, 170413, 1704135, 1704131, 1704131, 1704131, 170413);DAB 浓缩型试剂盒、苏木素、中性树脂(hioswamp 公司,批号分别为 PAB180021, PAB180015, PAB180017);TUNEL 试剂盒 MK1022(博士德生物工程有限公司,批号 12D05A20)。

1.3 仪器 DENLEY DRAGON Wellscan MK 3 型酶标仪, Wellwash 4 MK2 型洗板机(芬兰 Thermo 公司);PYX-DHS 型数字显示隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);TGL-168 型离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 型漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);CX41 型奥林巴斯显微镜(日本 Olympus 公司);RM2235 型石蜡切片机(徕卡显微系统有限公司);TKD-TK 型摊片机(湖北康强医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将 80 只 15 月龄 BALB/c 小鼠随机分为老年组、左归丸组、右归丸组、金匱肾气丸组、六味地黄丸组、五子衍宗丸组、八珍汤组以及阳性药物(左卡尼汀)组,另设 10 只 2 月龄 BALB/c 小鼠为青年组,各给药组按中药 2.5 g·kg⁻¹ 分别灌胃给予相应药物,左卡尼汀组按剂量 45 mg·kg⁻¹ 肌肉注射给药,每天 1 次,连续 4 周。

2.2 指标的检测 末次给药后,禁食不禁水 12 h,所有小鼠摘眼球取血,常规分离血清后, -80 °C 超低温冰箱保存;分离小鼠睾丸组织,于 10% 福尔马

林中固定。

2.2.1 血清指标检测 取各组小鼠血清样品,采用双抗体夹心法按照各个 ELISA 试剂盒说明书检测各组小鼠血清 MDA, NOS, EPO, SOD 和性激素 FSH, LH, T。

2.2.2 免疫组化法检测睾丸组织 Ki-67 蛋白的表达 取双侧睾丸于 10% 福尔马林中固定 48 h, 脱水,透明,浸蜡,包埋,4~7 μm 切片,二甲苯脱蜡,逐级乙醇水化后抗原修复, DAB 显色,苏木素染色,中性树脂封片,显微镜下摄片。

2.2.3 TUNEL 法检测生精细胞凋亡 切片常规脱蜡入水,3% 双氧水室温处理 10 min, 37 °C 温箱消化 10 min, 加标记缓冲液 20 μL/片于 37 °C 烘箱标记 2 h, 加封闭液 50 μL/片于 37 °C 温箱孵育 30 min, 加生物素化抗地高辛抗体 37 °C 反应 30 min, 加 SABC 37 °C 反应 30 min, DAB 显色水洗,苏木素轻度复染,水洗,烘干封片。

2.3 统计学分析 实验数据采用 SPSS 22.0 软件系统进行统计学分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐的组间比较选择单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况观察 各灌胃组较老年组摄食良好,精神良好,毛发润泽,无恶寒倦卧、反应迟钝、少动、体毛干枯脱落、消瘦等症状出现。

3.2 对老龄小鼠血清 MDA, NOS, EPO, SOD 水平的影响 与青年组比较,老年组小鼠血清 MDA, NOS, EPO 水平明显升高($P < 0.05$), SOD 含量无明显变化;与老年组比较,各治疗组小鼠血清 MDA, NOS, EPO 水平明显下降($P < 0.05$)。除六味地黄丸组和五子衍宗丸组外,各治疗组小鼠血清 SOD 水平明显升高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同补益方剂对老龄小鼠血清 MDA, NOS, EPO, SOD 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of different nourishing formulas on levels of MDA, NOS, EPO, SOD in aging mice serum($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	NOS/ng·L ⁻¹	EPO/μg·L ⁻¹	SOD/ng·L ⁻¹
青年	-	34.21 ± 17.87	1 379 ± 253.8	4.94 ± 0.78	636.8 ± 181.7
老年	-	63.38 ± 13.57 ¹⁾	1 833 ± 195.8 ¹⁾	16.48 ± 3.99 ¹⁾	614.2 ± 138.3
左卡尼汀	0.045	53.28 ± 10.09	1 380 ± 179.8 ²⁾	11.30 ± 3.97 ²⁾	991.7 ± 193.2 ²⁾
左归丸	2.5	42.14 ± 10.16	1 408 ± 191.7 ²⁾	6.80 ± 1.88 ²⁾	992.7 ± 314.0 ²⁾
右归丸	2.5	40.79 ± 12.84	1 722 ± 264.8	7.01 ± 2.73 ²⁾	945.4 ± 142.9 ²⁾
六味地黄丸	2.5	36.20 ± 18.69 ²⁾	1 423 ± 101.2 ²⁾	5.42 ± 1.09 ²⁾	629.6 ± 301.6
金匱肾气丸	2.5	39.30 ± 76.69 ²⁾	1 467 ± 259.0 ²⁾	4.73 ± 1.32 ²⁾	708.1 ± 197.3 ²⁾
八珍汤	2.5	28.32 ± 7.81 ²⁾	1 519 ± 246.5	5.03 ± 2.26 ²⁾	802.1 ± 108.1 ²⁾
五子衍宗丸	2.5	20.75 ± 8.09 ²⁾	1 755 ± 195.2	5.57 ± 0.68 ²⁾	571.3 ± 106.3

注:与青年组比较¹⁾ $P < 0.05$;与老年组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.3 对老龄小鼠血清 FSH, LH, T 水平的影响 与青年组比较,老年组小鼠血清 FSH 含量明显升高, LH, T 含量下降 ($P < 0.05$); 与老年组比较,各治疗组小鼠血清 FSH 含量明显下降,五子衍宗丸组 LH, T 含量明显上升,左卡尼汀组与左归丸组 T 含量上升 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同补益方剂对老龄小鼠血清 FSH, LH, T 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of different nourishing formulas on levels of FSH, LH, T in aging mice serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FSH /U·L ⁻¹	LH /μg·L ⁻¹	T /μg·L ⁻¹
青年	-	1.98 ± 0.61	0.59 ± 0.04	1.48 ± 0.05
老年	-	17.12 ± 3.27 ¹⁾	0.46 ± 0.056 ¹⁾	0.30 ± 0.03 ¹⁾
左卡尼汀	0.045	19.14 ± 3.43	0.43 ± 0.04	0.53 ± 0.10 ²⁾
左归丸	2.5	5.62 ± 0.27 ²⁾	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.11 ²⁾
右归丸	2.5	4.15 ± 0.94 ²⁾	0.42 ± 0.05	0.29 ± 0.09
六味地黄丸	2.5	4.88 ± 1.29 ²⁾	0.04 ± 0.08	0.42 ± 0.09
金匮肾气丸	2.5	4.15 ± 1.94 ²⁾	0.48 ± 0.05	0.27 ± 0.08
八珍汤	2.5	2.81 ± 1.64 ²⁾	0.46 ± 0.05	0.33 ± 0.07
五子衍宗丸	2.5	3.10 ± 0.93 ²⁾	0.54 ± 0.05 ²⁾	0.57 ± 0.03 ²⁾

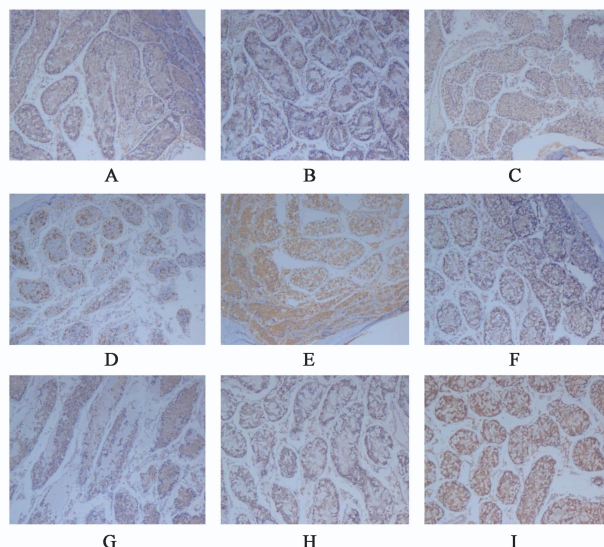
3.4 对老龄小鼠睾丸组织 Ki-67 蛋白表达的影响 与青年组比较,老年组小鼠睾丸组织内 Ki-67 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 与老年组比较,左卡尼汀组、六味地黄丸组、八珍汤组以及五子衍宗丸组小鼠睾丸组织 Ki-67 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 1。

表 3 不同补益方剂对老龄小鼠睾丸组织 Ki-67 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of different nourishing formulas on expression of Ki-67 protein in aging mice testis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ki-67
青年	-	3.12 ± 0.18
老年	-	2.85 ± 0.12 ¹⁾
左卡尼汀	0.045	3.36 ± 0.15 ²⁾
左归丸	2.5	2.43 ± 0.16
右归丸	2.5	2.87 ± 0.18
六味地黄丸	2.5	3.17 ± 0.15 ²⁾
金匮肾气丸	2.5	2.76 ± 0.17
八珍汤	2.5	3.54 ± 0.22 ²⁾
五子衍宗丸	2.5	3.57 ± 0.19 ²⁾

3.5 对老龄小鼠生精细胞凋亡率的影响 与青年组比较,老年组生精细胞凋亡率明显升高 ($P <$



A. 青年组; B. 老年组; C. 左归丸组; D. 左卡尼汀组; E. 右归丸组; F. 六味地黄丸组; G. 金匮肾气丸; H. 八珍汤组; I. 五子衍宗丸组 (图 2 同)

图 1 不同补益方剂对老龄小鼠睾丸组织 Ki-67 表达的影响 (免疫组化, ×100)

Fig. 1 Effect of different nourishing formulas on expression of Ki-67 protein in aging mice testis (IHC, ×100)

0.01); 与老年组比较,各药物治疗组小鼠生精细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$); 其中五子衍宗丸组生精细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 2。

表 4 不同补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of different nourishing formulas on apoptosis rate of spermatogenic cells in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
青年	-	7.35 ± 0.95
老年	-	18.21 ± 2.34 ¹⁾
左卡尼汀	0.045	10.58 ± 1.96 ²⁾
左归丸	2.5	13.31 ± 1.57 ²⁾
右归丸	2.5	14.62 ± 2.07 ²⁾
六味地黄丸	2.5	12.39 ± 1.86 ²⁾
金匮肾气丸	2.5	12.24 ± 1.77 ²⁾
八珍汤	2.5	12.40 ± 1.50 ²⁾
五子衍宗丸	2.5	9.33 ± 1.12 ²⁾

4 讨论

研究表明,ROS 与生精细胞凋亡有着密切的联系^[12]。ROS 通过损伤线粒体导致细胞供能障碍、损伤 DNA 双链结构、破坏蛋白质肽键、破坏生物膜稳定性等多种机制参与细胞凋亡,ROS 还能激活 Fas/FasL, B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)/Bcl-2 相关 x 蛋白

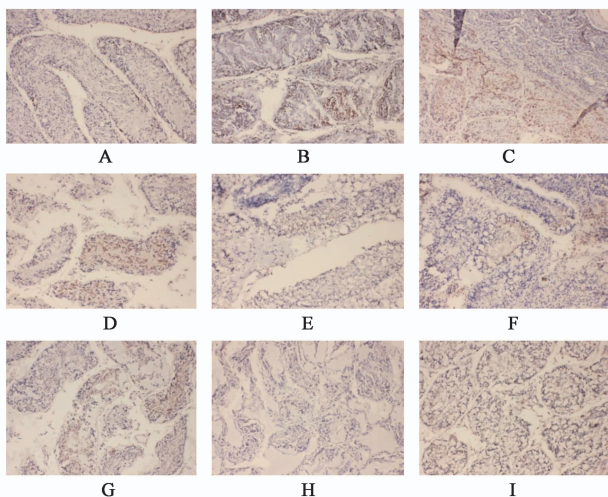


图 2 不同补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡率的影响 (TUNEL, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of different nourishing formulas on apoptosis rate of spermatogenic cells in aging mice (TUNEL, $\times 100$)

(Bax)等凋亡基因,或作为第二信使参与调控凋亡的信号通路^[13]。正常情况下,睾丸内氧自由基生成与清除处于一个动态平衡状态,然而,当细胞产生过多的 ROS 时将启动脂质过氧化反应,引起睾丸组织氧化与抗氧化系统失衡,导致氧化应激,从而引起睾丸组织的损伤和生精细胞凋亡,且由于生精细胞膜含有丰富的多不饱和脂肪,使生精细胞比体细胞更易受到 ROS 损伤^[14]。研究表明,MDA 是过氧化脂质的分解产物,通过 MDA 的测定可直接反应体内 ROS 的水平。而 MDA 可与蛋白质形成分子内和分子间交联,对细胞也有一定的毒性作用^[15]。Nrf2-ARE 是目前为止发现的最为重要的内源性抗氧化应激信号通路,通过增加下游抗氧化蛋白靶基因的表达,增加细胞的抗氧化应激能力^[16]。其中 SOD 作为该通路的下游效应分子之一,是体内主要的抗氧化酶,广泛存在于机体内的各组织中。SOD 能催化超氧阴离子发生歧化反应,使其生成 H_2O_2 , H_2O_2 进一步转变成 H_2O 和 O_2 ,从而清除自由基,在机体清除 ROS 的过程中起着关键作用^[17]。本实验研究结果显示,与老年组比较,左归丸、右归丸、六味地黄丸、金匱肾气丸、八珍汤 5 个治疗组小鼠血清 SOD 水平上升,MDA, NOS, EPO 水平下降,生精细胞凋亡率下降,提示其可能是通过改善小鼠睾丸内的氧化应激损伤来降低生精细胞凋亡的,其中,左归丸与右归丸的抗氧化能力优于六味地黄丸、金匱肾气丸、八珍汤。

精子发生需要经历精原细胞、各级精母细胞以及精子细胞,是下丘脑-垂体-性腺轴精密调控的结

果^[18]。睾丸内 T 的高浓度是精子发生的必要条件,如果睾丸内的 T 浓度 $< 70 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,精子发生过程将不会启动,而细胞凋亡程序则被启动,引起生精细胞凋亡^[19]。T 对精子发生所起的作用体现在^[20]促进血睾屏障紧密连接(tight junction, TJ)的构成,保护生精细胞免受免疫系统的攻击;促进附睾的发育和功能;促进生精细胞在睾丸支持细胞的附着和分化;控制精原细胞分化、减数分裂、精子细胞的分化和精子释放。垂体前叶嗜碱性细胞分泌的 FSH 和 LH 在维持睾丸内 T 的高浓度过程中扮演着十分重要的角色。FSH 的主要作用是刺激睾丸支持细胞的增殖和分化,从而促进雄激素结合蛋白 ABP 的释放^[21]。由睾丸支持细胞分泌的雄激素结合蛋白 ABP,是精子发生时睾丸维持高浓度 T 水平的必要因素^[22]。LH 的主要作用是促进睾丸间质细胞合成和分泌 T。而且内源性的睾酮与睾丸抗氧化能力密切相关^[23]。睾酮水平降低,可以伴随抗氧化能力降低,氧化应激损伤加重又可以抑制睾酮合成过程中关键酶的活性,引起睾酮水平下降。

另外性激素可以通过与激素受体结合的方式调控细胞的增殖。Ki-67 的表达水平可以反映细胞增殖状态,表达水平越高,细胞增殖越活跃。Ki-67 主要集中在表达于精原细胞及部分初级精母细胞,通过自身的磷酸化、去磷酸化支持核仁的消失与重现,以此来控制精原细胞的增殖与分化^[24]。

下丘脑-垂体-性腺轴类似于中医的肾-天癸-男子胞,中医认为少精弱精症大多数是由肾虚所致,肾气虚损、肾精亏耗是导致少精弱精的主要病机。如《素问·上古天真论》所说:“丈夫……二八,肾气盛,天癸至,精气溢泻,阴阳和,故能有子……七八……天癸竭,精少,肾脏衰……”。肾为先天之本,肾精(无形之精)是化生生殖之精(有形之精)的物质基础,脾为后天之本,气血生化之源,精血同源,脾旺则肾精得以生化之源,才能盈满,生殖之精也得以化生^[25]。本实验研究结果显示,与老年组比较,五子衍宗丸组小鼠血清 MDA 水平下降,FSH 含量显著下降,LH, T 含量上升 Ki-67 表达水平上升,生精细胞凋亡率下降,提示五子衍宗丸可能通过促进精子发生来降低生精细胞凋亡的。

综上所述,不同补益方剂除五子衍宗丸可能是通过激活 Nrf2-ARE 信号通路上调抗氧化蛋白 SOD 的表达,从而降低小鼠体内的氧化应激水平以抑制生精细胞的凋亡,其中左归丸与右归丸的抗氧化能力优于其他 3 个补益方剂;五子衍宗丸可能通过恢

复下丘脑-垂体-性腺轴的调控功能维持睾丸内适当的T水平促进精子发生来降低生精细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] 黄若辉,邹晓峰,杨军. 中西医结合治疗男性少弱精子症的系统评价[J]. 江西中医药大学学报,2014,26(2):69-72.
- [2] 钟小冬,俞旭君,安劬. 少、弱精子症治疗进展[J]. 中国性科学,2016,25(2):98-101.
- [3] 邓洋,袁卓珺,丁世霖,等. 生精细胞凋亡及相关中医药治疗概述[J]. 中华中医药学刊,2015,33(9):2130-2132.
- [4] 赵东海,黄建玉,韩晓培,等. 中药多糖对生精细胞凋亡影响的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2015,36(6):476-479.
- [5] 王晓云,沈婷. 左归丸治疗少弱精子症260例疗效分析[J]. 内蒙古中医药,2014,33(6):57.
- [6] 陈杰,李晶,封玉玲,等. 右归丸补肾填精的药理作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):134-137.
- [7] 毕焕洲,谢宗林,张宝文. 金匱肾气丸治疗微波辐射性雄小鼠生殖功能障碍的疗效研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(10):672-675,690.
- [8] 李延晖,张蓉,邹练,等. 八珍汤、六味地黄丸、自拟扶正解毒方剂对⁶⁰Co γ -射线致大鼠生殖系统损伤的防治作用[J]. 山东医药,2014,54(43):28-30.
- [9] 朱纪伟,苏娜,杜鹏. 五子衍宗丸汤剂治疗男性少弱精子症45例疗效观察[J]. 新中医,2014,46(10):88-89.
- [10] 周建甫,李倩,张秋红,等. 补肾类中医药治疗男性不育症随机对照试验的系统评价[J]. 中华男科学杂志,2015,21(9):833-840.
- [11] 李廷付,金保方. 八珍汤化裁治疗生殖系统疾病拾萃[J]. 中华中医药杂志,2014,29(12):3823-3825.
- [12] 熊普熹,刘晓红,韩林. 活性氧参与心血管钙化发病机制的研究进展[J]. 国际心血管病杂志,2014,41(5):291-293.
- [13] 孔维元,张铁辉. 线粒体介导的细胞凋亡与男性不育的研究进展[J]. 医学综述,2014,20(22):4058-4060.
- [14] 宾彬,陆海旺,王杰,等. 抗氧化中西药治疗男性不育症研究进展[J]. 四川中医,2013,31(8):185-188.
- [15] Pajovic B, Radojevic N, Terzic N, et al. Correlation between nitricoxide levels, the hypo-osmotic swelling test for sperm membranes and semen analysis in patients with varicocele[J]. Scand J Urol,2013,47(5):404-410.
- [16] 王宁,马慧萍,漆欣筑,等. Nrf2-ARE信号通路在机体氧化应激损伤防护中的研究进展[J]. 解放军医药杂志,2015,27(12):21-27.
- [17] 王君明,崔瑛,王峥涛,等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):265.
- [18] 李江源. 精子发生的内分泌激素调节[J]. 生殖医学杂志,2014,23(9):697-702.
- [19] 朱倩,崔毓桂. 精子发生的调节机制及其进展[J]. 生殖医学杂志,2016,25(4):378-383.
- [20] Walker W H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis [J]. Spermatogenesis, 2011, 1(2):116-120.
- [21] 孙大林,金保方. 中医药在男性生殖内分泌疾病中的应用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2014,33(6):458-461.
- [22] 彭馥芝,冉茂良,李智,等. 调控睾丸支持细胞增殖和分化的信号通路研究进展[J]. 生命科学,2016,28(11):1391-1397.
- [23] 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.
- [24] 刘民,杨榆玲,何永蜀,等. 小鼠睾丸发育过程中Ki67蛋白的表达规律[J]. 云南大学学报:自然科学版,2017,39(2):308-312.
- [25] 喻国华,赵智英,项豪华,等. 促精汤对小鼠生精细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3):162-165.

[责任编辑 周冰冰]