

## 五子衍宗丸干预线粒体通透性转换孔抑制精子凋亡的机制

刘红娟, 吴德玲, 童小慧, 李莉, 王桐生\*

(安徽中医药大学, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**[摘要]** 目的:研究五子衍宗丸对电压依赖性阴离子通道1(VDAC1),腺嘌呤核苷酸转位酶(ANT),环孢菌素A结合蛋白D(CypD)等蛋白表达影响,分析其干预精子线粒体通透性转换孔(mPTP)开放的机制。方法:将40只大鼠随机分为正常组,模型组,阳性组(生精胶囊,1.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),五子衍宗丸组(4.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。除正常组外其余各组灌服雷公藤多苷(30 mg·kg<sup>-1</sup>),连续8周,建立少弱精子症模型,从造模的第5周开始,各组按剂量灌胃给药,连续给药4周,末次给药后禁食12 h,3%水合氯醛麻醉动物,摘取睾丸和附睾组织。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠睾丸组织VDAC1,ANT,CypD,B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)蛋白表达;透射电镜观察精子线粒体的超微结构;原位末端标记(TUNEL)法检测大鼠睾丸生殖细胞凋亡情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠VDAC1,CypD,Caspase-3,Caspase-9蛋白表达显著升高,Bax/Bcl-2显著升高(P<0.01);与模型组比较,生精胶囊组、五子衍宗丸组的VDAC1,CypD,Caspase-3,Caspase-9蛋白表达显著下降,Bax/Bcl-2显著降低(P<0.01);各组间ANT,Bcl-2蛋白表达无明显变化。电镜检查显示,模型组大鼠精子线粒体大小不一,排列紊乱,出现大量肿胀和空泡,生精胶囊组和五子衍宗丸组精子线粒体结构较完整,排列较整齐,肿胀和空泡现象明显减少;TUNEL检测结果显示,与正常组比较,模型组大鼠生精细胞凋亡率显著增加(P<0.01);与模型组比较,生精胶囊组、五子衍宗丸组细胞凋亡率显著降低(P<0.01)。结论:五子衍宗丸可能通过抑制VDAC1,CypD,Bax蛋白表达,降低mPTP的通透性,阻止Caspase凋亡蛋白家族的级联激活反应,发挥抗生殖细胞凋亡作用。

**[关键词]** 五子衍宗丸;少弱精子症;生殖细胞凋亡;线粒体通透性转换孔

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0034-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202005

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200727.1050.011.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-27 14:12

### Effect of Wuzi Yanzong Wan on Sperm Apoptosis by Intervening with Mitochondrial Permeability Transition Pore

LIU Hong-juan, WU De-ling, TONG Xiao-hui, LI Li, WANG Tong-sheng\*

(Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Wuzi Yanzong Wan on the expressions of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), adenine nucleotide transposase (ANT), cyclophilin D (CypD) and other proteins, and analyze its mechanism in intervening with sperm mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. **Method:** Forty rats were randomly divided into 4 groups, namely normal group, model group, positive group (Shengjing capsule, 1.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and Wuzi Yanzong Wan group (4.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), with 10 rats in each group. Except for the normal group, tripterygium wilfordii glycosides (GTW, 30 mg·kg<sup>-1</sup>) was intragastrically administered for 8 weeks to establish the oligozoospermia model. After the 4<sup>th</sup> week, each group was given drugs through intragastric administration for 4 weeks, and fasted for 12 h after the last administration.

**[收稿日期]** 2020329(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81473674)

**[第一作者]** 刘红娟,硕士,从事中药复方机制研究,E-mail:2727548311@qq.com

**[通信作者]** \*王桐生,博士,教授,硕士生导师,从事方药效应机制研究,E-mail:wtsyl@163.com

These rats were anesthetized with 3% chloral hydrate, and their testis and epididymis tissues were collected. Western blot was used to determine the protein expressions of VDAC1, ANT, CypD, B-cell lymphoma/leukemia2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase-3, Caspase-9 in rat testis, Testicular tissue and its ultrastructure were observed under electron microscopy. The apoptosis in spermatogenic cells was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). **Result:** Western blot results showed that compared with the normal group, the expressions of VDAC1, CypD, Caspase-3, Caspase-9 and Bax/Bcl-2 in the model group were increased ( $P<0.01$ ). The expressions of VDAC1, CypD, Caspase-3, Caspase-9 and Bax/Bcl-2 were significantly decreased in the positive group and the Wuzi Yanzong Wan group compared with the model group ( $P<0.01$ ). There was no significant change in the expressions of ANT and Bcl-2 protein between the groups. Testicular ultrastructural evaluation showed different sizes and disordered arrangement of sperm mitochondria and a large number of swelling and vacuoles in the model group, while complete structure and neat arrangement of sperm mitochondria and much less swelling and vacuole in positive group and Wuzi Yanzong Wan group. TUNEL results showed that the apoptosis rate of spermatogenic cells in the model group was significantly higher than that of the normal group ( $P<0.01$ ), while the apoptosis rate in the positive drug and Wuzi Yanzong Wan group was significantly lower than that of the model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Wuzi Yanzong Wan may resist germ cell apoptosis by inhibiting the expressions of VDAC1, CypD and Bax, reducing the permeability of mPTP, and preventing the cascade activation reaction of the Caspase family of apoptosis proteins.

**[Key words]** Wuzi Yanzong Wan; oligozoospermia; germ cell apoptosis; mitochondrial permeability transition pore

少弱精症是导致男性不育的最常见原因,现代医学认为其发生可能与遗传缺陷、内分泌紊乱、微生物感染、微量元素缺乏等有关,由于发病机制尚不完全清楚,缺乏有效的治疗药物,多采用内分泌治疗、抗感染、抗氧化应激、补充微量元素等经验性治疗措施<sup>[1]</sup>。中医学文献中无该病名,大多归属于“精少、精薄、精冷、精清”等范畴,其病机以肾精亏虚为主,夹杂血瘀、湿热、痰浊、气滞等,病位多在肾、肝、脾,补肾填精法是治疗少弱精症的根本大法<sup>[2-3]</sup>。五子衍宗丸出自《摄生众妙方》卷十一,是临床治疗少弱精子症的常用方剂和基本方剂,由枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子组成,具有滋肝补肾、填精益髓的功效<sup>[4-5]</sup>。本课题组前期研究发现,五子衍宗丸能明显降低少弱精症模型大鼠精子线粒体的通透性、抑制基质金属蛋白酶(MMP)下降、显著改善精子质量,但其干预机制不清<sup>[6]</sup>。本研究通过建立少弱精症大鼠模型,观察五子衍宗丸对线粒体通透性转换孔(mPTP)相关蛋白表达的影响,分析其抗生殖细胞凋亡机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,雄性,SPF级,6~8周龄,体重180~220g,由安徽省实验动物中心提供,合格证号SCXK(皖)2017-001号。饲养环境温度控制在

22~26℃,湿度维持在60%~70%;每天12h光照12h黑暗。每笼5只,所有大鼠均自由饮食饮水。适应性饲养1周后开展试验。

**1.2 药物与试剂** 五子衍宗丸(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,批号18035040);生精胶囊(遵义廖元和堂药业有限公司,批号20190412);雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司,批号190702);VDAC1抗体(碧云天生物技术有限公司,批号011518191009);B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)抗体(美国Abcam公司,批号GR3239757-2);半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3抗体,Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为18,8);Caspase-9,环孢菌素A结合蛋白D(CypD)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,HRP标记的山羊抗鼠IgG(美国Abbkine公司,批号分别为ATRAU2801,ATRDE2401,ATRJA2201,ATRNO1401);腺嘌呤核苷酸转位酶(ANT)抗体(美国Affinity公司,批号35d7800);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号19F00408);dUTP缺口末端标记技术(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号031819190703)。

**1.3 仪器** TS-12A型生物组织自动脱水机(孝感市宏业医用仪器有限公司);YD-6L型生物组织包埋机,YD-315型切片机,YD-6L型生物组织冷冻台(金华市益迪医疗设备有限公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);LAS4000 GE型凝胶成像系统(美国GE公司);RT-6000型酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);LKB-NOVA型超薄切片机(瑞典LKB公司);JEM-1400型透射电镜(日本电子株式会社)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、给药及取材** 将40只SD大鼠随机分成正常组、模型组、阳性组[生精胶囊,  $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ],五子衍宗丸组[ $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ](相当于成人临床用量的20倍),每组10只,适应饲养1周后,除正常组外,其他各组动物灌胃雷公藤多苷片[ $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ]连续8周,制备少弱精症模型,正常组给予等容量蒸馏水。从造模第5周开始各组按剂量灌胃给药,连续给药4周。末次给药后,各组动物禁食不禁水12 h,3%的水合氯醛( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉,摘取睾丸和附睾,部分组织 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,另取部分睾丸4%多聚甲醛溶液固定保存。

**2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 取各组大鼠睾丸组织200 mg,快速加入2 mL  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的含有蛋白酶抑制剂PMSF的RPI裂解液,迅速用玻璃匀浆器研磨,冰上操作。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液,BCA测定总蛋白浓度,加入Loading buffer,煮沸变性, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。SDS-PAGE凝胶电泳,将蛋白转移至PVDF膜上,5%BSA封闭2 h,分别加入VDAC1一抗(1:2 000),CypD一抗(1:2 000),ANT一抗(1:1 000),Bax一抗(1:1 000),Bcl-2一抗(1:1 000),Caspase-3一抗(1:1 000),Caspase-9一抗(1:1 000),GAPDH一抗(1:1 000) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,TBST清洗10 min,分别加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:2万)和HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:2万),室温孵育2 h,TBST清洗后ECL发光液显色并曝光并借助Image J软件分析灰度值。

**2.3 透射电镜观察精子线粒体超微结构** 取附睾头部组织体积 $1 \text{ cm}^3$ ,迅速于2.5%的戊二醛固定液中固定6 h, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.2)浸洗2 h,1%四氧化锇固定液固定2 h,分别用30%,50%乙醇梯度脱水15 min,70%乙酸铀乙醇饱和液中24 h,环氧树脂Epon812浸透、包埋,聚合后作半超薄切片 $1 \sim 2 \text{ } \mu\text{m}$ ,亚甲蓝染色后光学显微镜

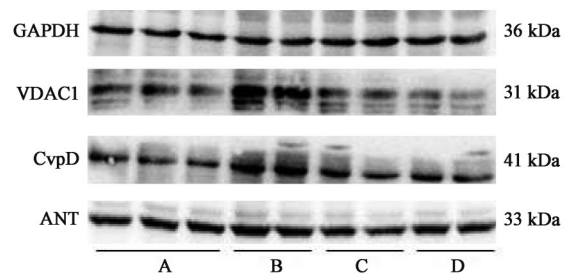
下定位,用超薄切片机进行 $50 \sim 70 \text{ nm}$ 超薄切片,醋酸铀和柠檬铅双染色,日本JEM-1400型透射电镜下观察附睾精子线粒体超微结构改变。

**2.4 TUNEL法检测睾丸组织生精细胞凋亡** 摘取睾丸组织,4%多聚甲醛固定,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片机切片(切片厚度 $5 \text{ } \mu\text{m}$ )。切片 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干2 h,常规脱蜡,用不含DNase的蛋白酶K在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下作用30 min,PBS洗涤,TUNEL检测液 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育60 min,PBS清洗,滴加标记反应终止液0.2 mL,室温孵育10 min。PBS清洗,滴加Streptavidin-HRP工作液 $50 \text{ } \mu\text{L}$ ,室温孵育30 min。PBS清洗,DAB显色液室温避光孵育20 min,PBS洗涤,苏木素染色,盐酸乙醇分化数秒,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察生精细胞凋亡情况,并拍照。每组取3例,选取5个视野( $\times 400$ )观察阳性细胞(棕黄色或棕褐色)所占百分率为凋亡率。

**2.5 统计学处理** 采用SPSS 22.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本之间的组间比较采用单因素方差分析,进行SNK-Q检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对少弱精症模型大鼠睾丸组织VDAC1, CypD, ANT蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠睾丸组织VDAC1和CypD蛋白表达显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,生精胶囊组和五子衍宗丸组VDAC1和CypD蛋白表达量显著下降( $P < 0.01$ ),各组ANT蛋白表达无明显差异。见图1,表1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 生精胶囊组;D. 五子衍宗丸组(图2~4同)

图1 少弱精症模型大鼠睾丸组织VDAC1, CypD, ANT蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of VDAC1, CypD and ANT protein expression in testis of rats with oligozoospermia

**3.2 对少弱精症模型大鼠睾丸组织Bax, Bcl-2蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组Bax蛋白表达量,Bax/Bcl-2明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组

表1 五子衍宗丸对少弱精症模型大鼠睾丸组织VDAC1, CypD, ANT蛋白表达影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of Wuzi Yanzong Wan on expression of VDAC1, CypD, ANT proteins in testis of rats with oligospermia ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	VDAC1 /GAPDH	CypD /GAPDH	ANT /GAPDH
正常	-	1.09±0.064	0.73±0.04	0.89±0.066
模型	-	1.89±0.087 <sup>2)</sup>	1.65±0.105 <sup>2)</sup>	0.92±0.040
生精胶囊	1.6	0.94±0.028 <sup>4)</sup>	0.81±0.111 <sup>4)</sup>	0.76±0.046
五子衍宗丸	4.0	0.65±0.120 <sup>4)</sup>	0.76±0.055 <sup>4)</sup>	0.84±0.030

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表2~4同)。

比较,五子衍宗丸组、五子衍宗丸组Bax蛋白表达量,Bax/Bcl-2显著降低(P<0.01)。见图2,表2。

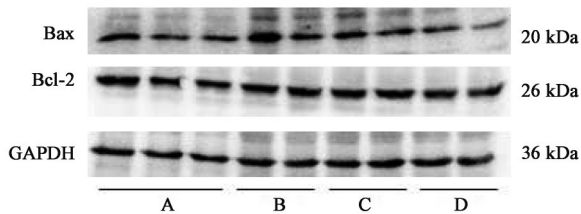


图2 少弱精症模型大鼠睾丸组织Bcl-2, Bax蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Bcl-2 and Bax protein expression in testes of rats with oligozoospermia

表2 五子衍宗丸对少弱精子症模型大鼠睾丸组织Bcl-2, Bax蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Wuzi Yanzong Pills on expression of Bcl-2, Bax and Bax proteins in testis of rats with oligozoospermia ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH	Bax /Bcl-2
正常	-	0.76±0.050	1.40±0.081	0.52±0.020
模型	-	1.27±0.045 <sup>1)</sup>	1.43±0.101	1.02±0.128 <sup>2)</sup>
生精胶囊	1.6	0.72±0.098 <sup>3)</sup>	1.40±0.052	0.51±0.051 <sup>4)</sup>
五子衍宗丸	4.0	0.53±0.122 <sup>4)</sup>	1.28±0.060	0.42±0.116 <sup>4)</sup>

**3.3 对少弱精症模型大鼠精子线粒体超微结构影响** 正常组精子线粒体大小均一、结构清晰、排列整齐;模型组线粒体大小不一、排列紊乱、间隙扩大,出现大量肿胀和空泡。生精胶囊组和五子衍宗丸组精子线粒体排列较整齐,形态结构较完整,空泡、肿胀明显减少。见图3。

**3.4 对少弱精症模型大鼠生精细胞凋亡影响** 正常组存在极少的生精细胞凋亡,模型组细胞凋亡显著增多(P<0.01);与模型组比五子衍宗丸组和生精胶囊对照组细胞凋亡显著减少(P<0.01)。见图4,表3。

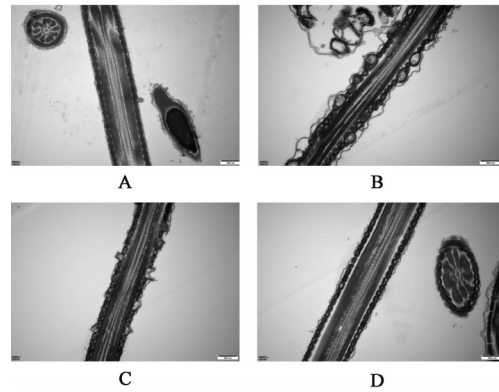


图3 五子衍宗丸对少弱精症模型大鼠精子线粒体超微结构影响(电镜扫描,×3000)

Fig. 3 Effect of Wuzi Yanzong Wan on mitochondrial ultrastructure of rats with oligospermia (SEM, ×3000)

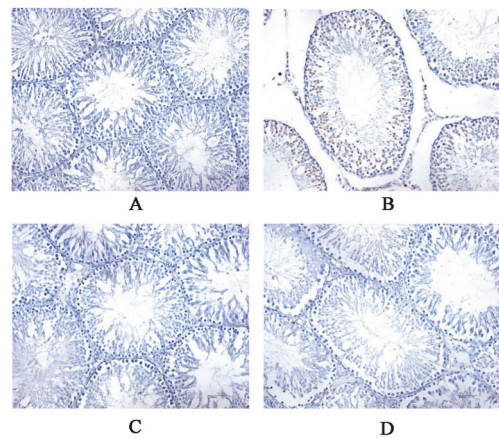


图4 五子衍宗丸对少弱精症模型大鼠生精细胞凋亡影响(TUNEL,×200)

Fig. 4 Effect of Wuzi Yanzong Wan on apoptosis of spermatogenic cells in rats with oligospermia (TUNEL, ×200)

表3 五子衍宗丸对少弱精症模型大鼠生精细胞凋亡影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Wuzi Yanzong Wan on apoptosis of spermatogenic cells in rats with oligospermia ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	阳性率/%
正常	-	1.12±0.57
模型	-	34.60±4.01 <sup>2)</sup>
生精胶囊	1.6	1.32±0.54 <sup>4)</sup>
五子衍宗丸	4.0	2.48±0.38 <sup>4)</sup>

**3.5 对少弱精症模型大鼠睾丸组织Caspase-3, Caspase-9蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠睾丸组织Caspase-3和Caspase-9蛋白表达明显增加(P<0.01);与模型组比较,生精胶囊组、五子衍宗丸组Caspase-3和Caspase-9蛋白表达明显降低(P<0.01)。见图5,表4。

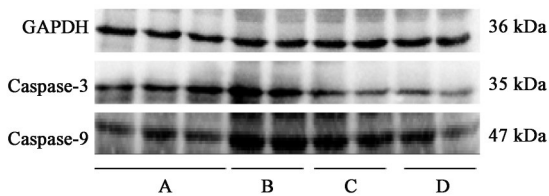


图5 少弱精症模型大鼠睾丸组织 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Caspase-3 and Caspase-9 protein expression in testis of rats with oligozoospermia

表4 五子衍宗丸大鼠睾丸组织 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Wuzi Yanzong Wan on expression of Caspase-3 and Caspase-9 proteins in testis of rats with oligozoospermia ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Caspase-3 /GAPDH	Caspase-9 /GAPDH
正常	-	0.89±0.188	0.71±0.094
模型	-	1.72±0.054 <sup>2)</sup>	1.46±0.077 <sup>2)</sup>
生精胶囊	1.6	0.60±0.041 <sup>4)</sup>	0.81±0.011 <sup>4)</sup>
五子衍宗丸	4.0	0.45±0.062 <sup>4)</sup>	0.55±0.074 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

不孕不育是全球公共卫生问题,影响10%~15%的育龄夫妇,其中男方因素约占50%,男性不育已经成为影响国内外人口健康与安全的重大疾病、常见疾病和难治性疾病。少弱精症是男性不育的重要病因,约占男性不育因素的75%<sup>[7-8]</sup>,生精细胞的过度凋亡是少弱精症发生的重要病理基础<sup>[9-10]</sup>。

mPTP是由位于线粒体外膜的VDAC, ANT和CypD等组成的多蛋白复合体,是内膜实现通透性转换的主要机制, mPTP不可逆的高水平开放是线粒体凋亡途径中的关键步骤<sup>[11-12]</sup>。研究表明精子mPTP的开放与线粒体膜孔蛋白和Bcl-2蛋白家族表达密切相关<sup>[13-14]</sup>,VDAC1蛋白过表达产生寡聚,寡聚的VDAC1在线粒体膜上形成孔道,介导线粒体膜内外物质的流通<sup>[15-17]</sup>;过表达的CypD可直接促进线粒体mPTP的开放,或CypD与ANT形成复合体,VDAC1与CypD-ANT复合体结合,最终触发mPTP开放<sup>[18-20]</sup>。Bcl-2家族蛋白成员在线粒体膜上的平衡状态调控mPTP的通透性, Bax/Bcl-2升高时, Bax形成(Bax-Bax)同源二聚体,通过与VDAC1的物理作用,破坏线粒体膜完整性引发mPTP过度开放<sup>[21-22]</sup>。mPTP过度开放使线粒体膜电位下降,导致线粒体通透性进一步增加,线粒体内的细胞色素C(CytC)和凋亡诱导因子(AIF)等转运到线粒体膜

外, CytC与其细胞质伴侣Apaf-1形成凋亡小体,活化Caspase-9裂解并激活其下游的Caspase-3,最终引发细胞凋亡<sup>[23]</sup>。

mPTP存在于线粒体内外膜之间,作为线粒体内外物质传递的桥梁在线粒体介导的细胞凋亡中起重要的作用<sup>[24]</sup>。AMIR等<sup>[25]</sup>认为少精症可能是通过诱导Bax和VDAC1蛋白表达、减少Bcl-2表达,影响mPTP的开放,导致细胞凋亡过度而发生;盛文等<sup>[26]</sup>研究发现雷公藤多苷片可致小鼠精子MMP降低, mPTP开放增加,益肾健脾方可上调MMP水平,减少mPTP病理性开放,有效改善小鼠睾丸精子的发生及成熟;ZHANG等<sup>[27]</sup>研究发现麒麟丸主要通过下调Bax, CytC, Caspase-9和Caspase-3蛋白表达以及Bax/Bcl-2水平,同时上调Bcl-2蛋白表达来抑制睾丸线粒体凋亡,改善少弱精症模型大鼠的精子质量和睾丸损伤。

本研究结果显示,连续给予雷公藤多苷8周,模型组大鼠睾丸组织中生精细胞凋亡显著增加,VDAC1, CypD, Bax, Caspase-3, Caspase-9蛋白表达明显上调, ANT, Bcl-2蛋白表达无明显改变,提示雷公藤多苷可能通过上调VDAC1, CypD表达,改变Bax/Bcl-2的比例关系,导致mPTP通透性增加,激活线粒体途径的生精细胞凋亡,从而造成少弱精症,与文献报道基本一致。五子衍宗丸连续给药4周后,模型动物睾丸组织中VDAC1, CypD蛋白表达及Bax/Bcl-2显著下降, Caspase-3, Caspase-9蛋白表达明显下调,各级生精细胞凋亡显著减少,提示五子衍宗丸通过下调大鼠睾丸组织Bax, VDAC1, CypD蛋白表达,抑制mPTP过度开放,阻止Caspase蛋白家族激活引起的生殖细胞凋亡,发挥治疗少弱精子症作用,其对Bcl-2蛋白表达无明显影响,与麒麟丸的作用机制有部分不同,可能与两首复方的药物组成存在差异有关。

#### [参考文献]

- [1] EMAD B, MAJID N, SINA G, et al. Some of the factors involved in male infertility: a prospective review[J]. Int J Gen Med, 2020, 13: 29-41.
- [2] 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.
- [3] 钟小冬, 俞旭君, 安劼. 少、弱精子症治疗进展[J]. 中国性科学, 2016, 25(2): 98-101.
- [4] 俞保柱, 曹莉, 王健, 等. 五子衍宗丸加味治疗精索静脉曲张性不育肾虚血瘀证的临床研究[J]. 中国性科

- 学, 2019, 28(6): 23-26.
- [ 5 ] 李俊君, 李浩, 贾清树, 等. 五子衍宗丸治疗男性不育症研究进展[J]. 江西中医药, 2019, 50(9): 67-70.
- [ 6 ] 李莉, 戴宁, 那莎, 等. 五子衍宗丸对实验性少弱精子症大鼠的保护作用与机制研究[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(9): 827-833.
- [ 7 ] 刘媛, 葛平玉. 中医药治疗少、弱精子症的现状[J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(6): 79-83.
- [ 8 ] KHATUN A, RAHMA M S, PANG M G. Clinical assessment of the male fertility [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2018, 61(2): 179-191.
- [ 9 ] ZHAO Y, ZHANG S. PGAM1 knockdown is associated with busulfan-induced hypospermatogenesis and spermatogenic cell apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2497-2502.
- [ 10 ] ABOUL FOTOUH G L, ABDEL-DAYEM M M, ISMAIL D L, et al. Histological study on the protective effect of endogenous stem cell mobilization in busulfan-induced testicular injury in albino rats [J]. *J Microsc Ultrastuct*, 2018, 6(4): 197-204.
- [ 11 ] 安福丽, 王玉娟, 刘昊坤, 等. 何首乌饮对衰老大鼠生精细胞线粒体凋亡通路关键基因表达的影响[J]. 解剖学报, 2017, 48(3): 287-295.
- [ 12 ] HUANG J, ZHONG Y, FANG X, et al. Hepatitis B virus s protein enhances sperm apoptosis and reduces sperm fertilizing capacity in vitro [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68688.
- [ 13 ] GUAN S, ZHU Y, WANG J, et al. A combination of Semen Cuscutae and Fructus Lycii improves testicular cell proliferation and inhibits their apoptosis in rats with spermatogenic dysfunction by regulating the SCF/c-kit-PI3K-Bcl-2 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, doi:10.1016/j.jep.2019.112525.
- [ 14 ] 宾东华, 王孙亚, 周青, 等. 知柏地黄丸对解脲脲原体感染模型大鼠精子线粒体通透性转化的影响[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(6): 540-546.
- [ 15 ] SHOSHAN-BARMATZ V, DE PINTO V, ZWECKSTETTERM, et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death [J]. *Mol Aspects Med*, 2010, 31(3): 227-285.
- [ 16 ] KEINAN N, TYOMKIN D, SHOSHAN-BARMATZ V. Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(24): 5698-5709.
- [ 17 ] HUANG L, HAN J, BEN-HAIL D, et al. A new fungal diterpene induces VDAC1-dependent apoptosis in Bax/Bak-deficient cells [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 23563-23578.
- [ 18 ] FAYAZ S M, RAJ Y V, KRISHNAMURTHY R G. CypD: the key to the death door [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2015, 14(5): 654-663.
- [ 19 ] 胡威, 祝恒成, 李浩勇, 等. 蛋白亲环素D基因功能研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(2): 224-228.
- [ 20 ] LINDBLOM R S J, HIGGINS G C, NGUYEN T V, et al. Delineating a role for the mitochondrial permeability transition pore in diabetic kidney disease by targeting cyclophilinD [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(2): 239-259.
- [ 21 ] ZHANG W D, ZHANG Z, JIA L T, et al. Oxygen free radicals and mitochondrial signaling in oligospermia and asthenospermia [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 1875-1880.
- [ 22 ] KIM J, GUPTA R, BLANCO L P, et al. VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease [J]. *Science*, 2019, 366(6472): 1531-1536.
- [ 23 ] YAO B, YI N, ZHOU S, et al. The effect of induced anti-follicle-stimulating hormone autoantibody on serum hormone level and apoptosis in rat testis [J]. *Life Sci*, 2012, 91(3/4): 83-88.
- [ 24 ] 元辉雄, 庞艳芳, 王俊利, 等. 铅对大鼠精子质量及精子线粒体的影响[J]. 中华男科学杂志, 2019, 25(7): 579-585.
- [ 25 ] AMIR A, YANWIRASTI, ASMARINAH A, et al. Alteration expression of Bax, Bcl-2 and VDAC1 genes in oligozoospermic and fertile subjects [J]. *Pak J Biol Sci*, 2016, 19(2): 71-76.
- [ 26 ] 盛文, 何清湖, 商建伟. 基于线粒体通透性转换孔探讨益肾健脾方对少弱精子症小鼠的作用机制[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1076-1078.
- [ 27 ] ZHANG K, GE Z, FU L, et al. Qilin pills alleviate oligoasthenospermia by inhibiting Bax-caspase-9 apoptosis pathway in the testes of model rats [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(31): 21770-21782.

[责任编辑 周冰冰]