

· 基础研究 ·

强精片对生精功能障碍大鼠模型 Cdy1、G9a、HDAC1 表达的影响

蔡 剑¹ 蔡 涛¹ 黄晓朋¹ 张 磊² 李广森² 常德贵³

摘要 目的 观察强精片对生精功能障碍模型大鼠精子质量及 Cdy1、G9a、HDAC1 表达的影响。**方法** 50 只健康雄性 SD 大鼠随机分为空白组,模型组,强精片低、中、高剂量组,每组 10 只,模型组采用环磷酰胺 50 mg/kg 腹腔注射 5 天,空白组给予等量生理盐水注射。自第 6 天起,强精片低、中、高剂量组分别给予强精片 0.17、0.33、0.67 g/(mL·100 g)灌胃,空白组及模型组给予 1% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃,连续干预 3 周。3 周后,将大鼠取血处死,分离睾丸、附睾。检测精液质量,观察睾丸组织结构,免疫组化检测大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 蛋白表达,RT-PCR 检测大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 mRNA 表达。**结果** 与空白组比较,模型组精子密度、活力、活率以及 Cdy1、G9a 蛋白和 mRNA 表达降低($P < 0.01$),HDAC1 蛋白及 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,强精片低、中、高剂量组精子密度、活力、活率以及 Cdy1 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);强精片中、高剂量组 G9a 蛋白和 Cdy1、G9a mRNA 表达升高($P < 0.05$),HDAC1 蛋白及 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 强精片可通过上调 Cdy1、G9a 表达,下调 HDAC1 表达,改善生精功能障碍大鼠模型的精子质量。

关键词 生精功能障碍;精子质量;强精片

Effect of Qiangjing Tablet on Expression of Cdy1, G9a and HDAC1 in Spermatogenesis Dysfunction Rat Model CAI Jian¹, CAI Tao¹, HUANG Xiao-peng¹, ZHANG Lei², LI Guang-sen², and CHANG De-gui³ 1 College of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075); 2 Department of Andrology, First Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075); 3 Department of Andrology, the Second Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610041)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qiangjing Tablets (QJT) on the semen quality and expression of Cdy1, G9a and HDAC1 in rats with spermatogenic dysfunction. **Methods** Totally 50 healthy male SD rats were randomly assigned to the blank group, model group, QJT low dose group, QJT medium dose group and QJT high dose group, 10 in each group. The model group was given intraperitoneal injection of cyclophosphamide 50 mg/kg for 5 days, the blank group was injected with the same amount of normal saline. From sixth day, QJT were given 0.17, 0.33, 0.67 g/(mL·100 g) by gavage respectively in QJT low, medium and high dose groups. The blank group and the model group were administrated with 1% carboxymethyl cellulose sodium solution by gavage. After 3 weeks, the rats were sacrificed and the testicles and epididymis were separated. The quality of semen and the structure of testicular tissue were observed. Protein and mRNA expression levels of Cdy1, G9a and HDAC1 in the testis tissues of the rats were respectively detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** Compared with the blank group, the density, vitality and survival rate of sperm, the protein and mRNA expressions of Cdy1 and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81673808);四川省教育厅基金资助项目(No. 14ZB0078)

作者单位:1. 成都中医药大学临床医学院(成都 610075); 2. 成都中医药大学附属医院男科(成都 610072); 3. 成都中医药大学第二附属医院男科(成都 610041)

通讯作者:常德贵, Tel: 028-87783913, E-mail: cdg998@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180417.161

G9a in the model group were significantly decreased ($P < 0.01$), meanwhile the protein and mRNA expression of HDAC1 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the sperm density, vitality and survival rate and protein expression of Cdy1 in the QJT low, middle and high dose groups were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the protein and mRNA expression of G9a and the protein expression of Cdy1 in QJT middle and high dose group were significantly increased ($P < 0.05$), whereas the protein and mRNA expression of HDAC1 were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion QJT could increase the expression of Cdy1 and G9a and decrease the expression of HDAC1 to improve the sperm quality of spermatogenic dysfunction rats.

KEYWORDS spermatogenesis dysfunction; sperm quality; Qiangjing Tablets

男性不育是现代社会常见且较为复杂的临床综合征,染色体畸变、基因突变、Y 染色体微缺失等遗传学病因是导致生精功能障碍,进而引发的不育重要因素。其中 Y 染色体微缺失是不育患者出现少精、无精等生精障碍最为常见的遗传学原因^[1]。Y 染色体微缺失易发生于 Y 染色体长臂 Yq11.2 的无精子因子 (azoospermia factor, AZF) 区域, AZF 区通常分为 AZFa、AZFb、AZFc 区, AZFc 区是 Y 染色体微缺失发生的热点区域,占 Y 染色体微缺失的 60%^[2]。人 Cdy (chromo-domain Y) 位于 AZFc 区,人类 Cdy 的大鼠同源物为 Cdy1,有研究显示 Cdy 与男性弱精子症相关^[3]。G9a 是常染色质组蛋白赖氨酸甲基转移酶,在鼠类动物睾丸中广泛分布,主要负责常染色质组蛋白甲基化修饰,动物研究显示,敲除小鼠 G9a 基因后,会导致小鼠出现生精功能障碍症状^[4]。HDAC1 是去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs) 家族成员之一,动物研究也提示 HDAC1 异常与小鼠生精功能障碍相关^[5]。根据相关文献,人体存在 Cdy 与 G9a、HDAC1 形成的蛋白复合体, Cdy、G9a、HDAC1 能参与精子发生过程中表观遗传学机制中的组蛋白甲基化、乙酰化修饰,其表达异常与生精功能障碍相关^[6,7]。中医药治疗生精功能障碍具有多靶点、多途径的优势,但缺少中医药干预伴有 Cdy 与 G9a、HDAC1 表达异常的生精功能障碍的相关研究,本试验观察强精片对生精功能障碍大鼠 Cdy1、G9a、HDAC1 基因蛋白表达的影响,探讨其靶点及机制。

材料与方 法

1 动物 青春期雄性 SD 大鼠 (清洁级) 50 只, 2 月龄, 体重 (200 ± 20) g, 购买并饲养于成都达硕动物实验中心, 许可证号: SYXK (川) 2014 - 189, 本研究通过成都中医药大学附属医院伦理委员会审批, 审批号: 2015-BL002。

2 药物 环磷酰胺 (Cyclophosphamide,

CP): 山西普德药物股份有限公司, 0.2 g/瓶, 批号: 04150605。强精片: 由成都中医药大学附属医院提供, 组成: 菟丝子、枸杞子、熟地黄、人参、当归、淫羊藿、仙茅、山茱萸、五味子、车前子、益母草, 0.3 g/片, 批号: 20150701。强精片悬混液制备: 强精片低、中、高剂量组配置分别取强精片 12、22、47 片, 加入 1% 羧甲基纤维素钠溶液 21 mL, 混匀配置为 0.17、0.33、0.67 g/mL 浓度的强精片悬混液备用。

3 主要试剂及仪器 羧甲基纤维素钠由成都市科龙化工试剂厂提供, 批号: 2014033101; 一抗: 兔多克隆抗体由英国 Abcam (上海) 贸易有限公司提供, 批号: ab5188; 二抗生物素化山羊抗兔 IgG (H + L) 及三抗辣根酶标记链霉素卵蛋白素 (HRP/A-V) 均由北京中山金桥生物有限公司提供, 批号: 13152A11、13152A11。WL-9000 型伟力彩色精子质量检测系统 (北京伟力公司); BA400Digital 数码三目摄像显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); PIKORed 96 型实时荧光定量仪 (美国 ThermoFisher 仪器有限公司)。

4 动物分组与造模 50 只健康雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组, 模型组, 强精片低、中、高剂量组。每组 10 只。模型组及强精片低、中、高剂量组用 CP 50 mg/kg 给予腹腔注射 5 天制备模型^[8]。根据预实验的结果, 选用 CP 50 mg/kg 行大鼠腹腔注射, 连续 5 天的造模方法。造模大鼠出现精神萎靡、活动减少、体毛稀疏、无光泽等症状和体征, 精液分析显示精子密度、活力和活率均较空白组大鼠显著下降 ($P < 0.01$); 睾丸组织病理形态学显示与空白组组比较, 造模的大部分大鼠的睾丸生精小管损伤明显, 说明造模成功。最终模型组和强精片低、中、高剂量组分别有 7、7、9、8 只大鼠造模成功造模成功。空白组用生理盐水等量腹腔注射 5 天。

5 给药及取材方法 第 6 天起, 强精片低、中、高剂量组分别给予 0.17、0.33、0.67 g/(mL · 100 g) 强

精片悬液灌胃,空白组及模型组给予等量 1% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃,连续灌胃 3 周。3 周后,各组大鼠予以 0.3 mL/100 g 水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉抽血处死大鼠,迅速摘取附睾、睾丸,将右侧睾丸分成两半,投入 4% 多聚甲醛保存并制作 ED 片,另一侧睾丸投入液氮中保存。

6 检测指标及方法

6.1 精液质量分析 取一侧附睾尾部放入 3 mL 37 °C 生理盐水中,剪碎,放置 1 min 左右,取约 50 μ L 精子混悬液,37 °C 恒温水浴 5 min,取少量加到预温的计数板上,采用 WLJY-9000 型精子质量检测系统进行精子质量检查,测试温度 37 °C,将经处理的精子混悬液涂于计数载玻片上,选取 4 个视野,2 min 内完成检测。检测指标包括精子密度、精子活力、精子活率。

6.2 大鼠睾丸组织形态学观察 固定睾丸组织经全自动脱水机脱水,包埋,置于载玻片上,进行 HE 染色,再将切片经二甲苯脱透明,加拿大树胶封片供镜检。用光学显微镜进行睾丸病理组织学检查,观察睾丸生精小管内生精细胞的病变情况。

6.3 免疫组化检测大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 蛋白表达 固定睾丸组织经防脱片处理、常规脱蜡、热修复抗原处理后,依次加入一抗、二抗、三抗及各种相关试剂,予以 DBA 显色。采用 BA200Digital 数码三目摄像显微系统对切片进行图像采集,每张切片先于 100 倍下观察全部组织,再根据组织大小及表达情况分别选取 1~3 个区域 400 倍采集图像。采用美国 Media Cybernetics 公司生产的 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的平均光密度,若每张切片采集多张图像,则取平均值。

6.4 RT-PCR 检测大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 mRNA 表达 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中搜索 Cdy1、G9a、HDAC1 基因序列,使用 Primer Premier 引物设计软件设计筛选 Cdy1 特异性引物。将保存在液氮中大鼠组织在液氮中充分研磨或剪碎,进行匀浆处理,在 PCR 仪上从匀浆的大鼠组织总 RNA 的提取,并由 RNA 逆转录合成 cDNA。使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件 (Applied Biosystems 公司) 分析 PCR 过程各检测样本的 CT (Threshold cycle) 值,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因相对 mRNA 表达水平。

7 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-Way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

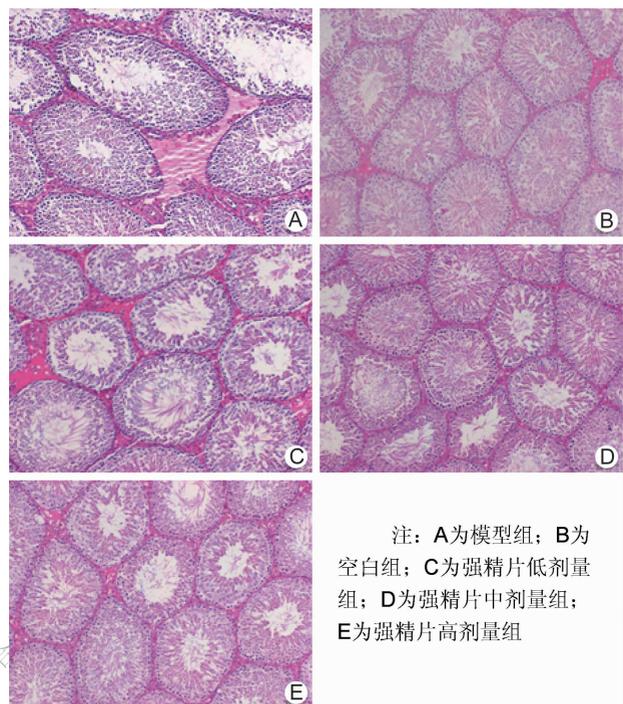
1 各组大鼠精子质量比较 (表 1) 与空白组比较,模型组精子密度、活力、活率降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,强精片低、中、高剂量组精子密度、活力、活率升高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠精子质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精子密度 (10^6 /mL)	精子活力 PR (%)	精子活率 (%)
空白	10	66.65 \pm 11.68 *	55.18 \pm 7.79 *	72.70 \pm 5.60 *
模型	7	9.12 \pm 2.42	6.56 \pm 2.21	20.79 \pm 4.04
强精片低剂量	7	21.36 \pm 4.75 *	17.37 \pm 3.86 *	33.30 \pm 5.63 *
强精片中剂量	9	30.20 \pm 6.12 *	24.56 \pm 4.97 *	47.93 \pm 8.16 *
强精片高剂量	8	46.98 \pm 7.81 *	38.19 \pm 6.35 *	62.04 \pm 7.61 *

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

2 各组大鼠睾丸结构情况 (图 1) 由于标本保存过程中操作不慎,部分标本组别标记有所损坏,空白组 3 组标本,强精片中剂量组 2 组标本,强精片高剂量组 1 组标本不能有效辨识,故各组大鼠 HE 睾丸组织光镜观察,免疫组化,RT-PCR 检测的标本分数均为 7 份。空白组可见睾丸生精小管饱满,生精上皮外的界膜均匀、完整;各级生精细胞排列规则,可见不同发育阶段的生精细胞及成熟的精子,形态和数量正常;睾丸间质细胞排列均匀。模型组可见变形、塌陷的生精小管数量增多;生精小管内生精细胞脱落及排列紊乱,



注: A为模型组; B为空白组; C为强精片低剂量组; D为强精片中剂量组; E为强精片高剂量组

图 1 各组大鼠睾丸组织结构 (HE, $\times 100$)

各级生精细胞数量显著减少,生精上皮变薄;睾丸间质细胞排列稀疏,间质透明样变性。强精片低剂量组可见变形、塌陷的生精小管数量增多;生精小管上皮变薄,各级生精细胞数量减少;睾丸多数生精小管内生精细胞脱落及排列紊乱;睾丸间质细胞排列稀疏,可见间质透明样变性。强精片中剂量组可见个别生精小管内各级生精细胞数量减少,排列较紊乱;生精小管上皮较薄;睾丸间质细胞排列较为稀疏,部分水肿。强精片高剂量组可见生精小管形态完整,间质相对丰富;生精小管上皮没有明显改变;各级生精细胞排较规则,数量较多;睾丸间质较为致密,间质细胞排列较为均匀。

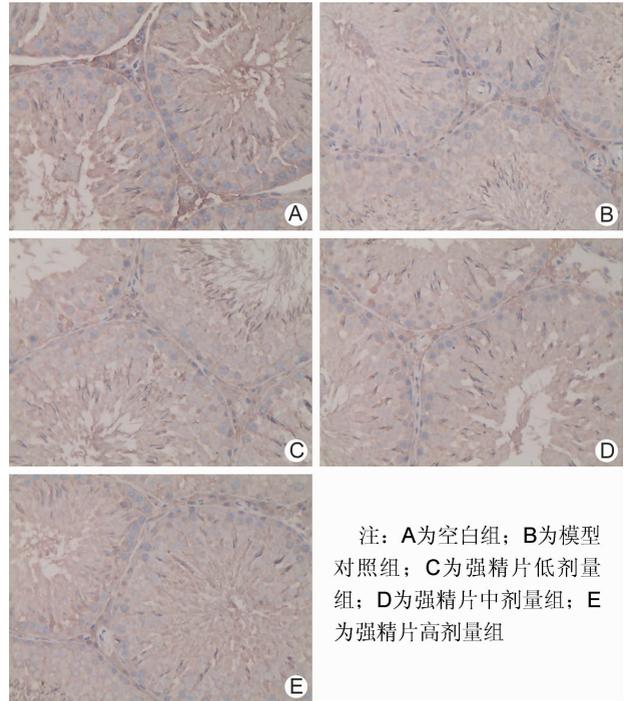
3 各组大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 蛋白表达比较(表 2,图 2-4) 与空白组比较,模型组 Cdy1、G9a 蛋白表达降低($P < 0.01$),HDAC1 蛋白表

表 2 各组大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cdy1	G9a	HDAC1
空白	7	0.154 2 ± 0.004 1**	0.170 2 ± 0.005 0**	0.152 5 ± 0.005 5**
模型	7	0.140 4 ± 0.004 2	0.151 5 ± 0.001 5	0.171 0 ± 0.005 3
强精片低剂量	7	0.143 8 ± 0.003 0*	0.154 8 ± 0.007 3	0.166 6 ± 0.005 5
强精片中剂量	7	0.145 3 ± 0.004 2**	0.160 3 ± 0.009 2*	0.164 7 ± 0.004 0*
强精片高剂量	7	0.147 1 ± 0.004 7**	0.159 7 ± 0.006 5*	0.164 0 ± 0.003 2**

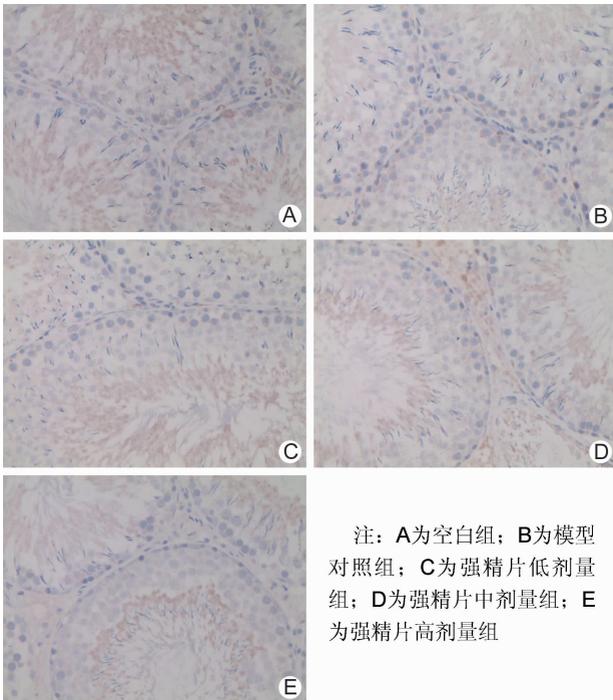
注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,强精片低、中、高剂量组 Cdy1 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);强精片中、高剂量组 G9a 蛋白表达升高($P < 0.05$),HDAC1 蛋白表达降低($P < 0.05$)。



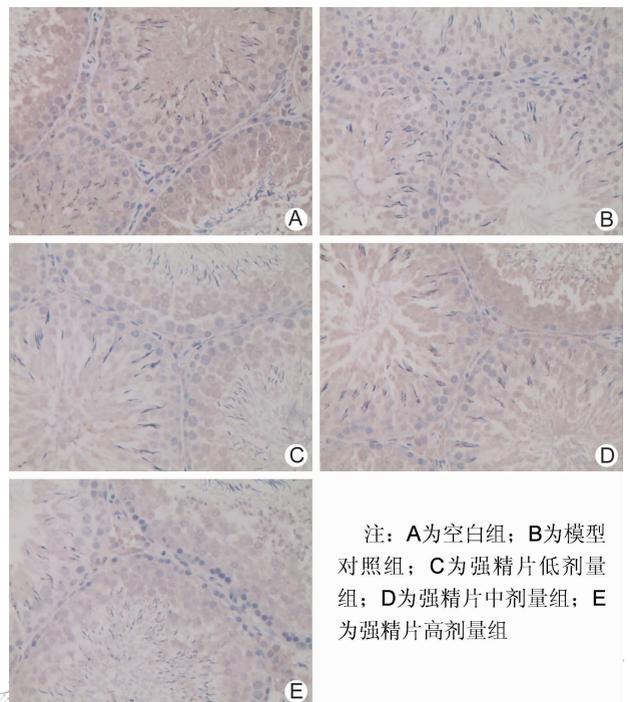
注: A为空白组; B为模型对照组; C为强精片低剂量组; D为强精片中剂量组; E为强精片高剂量组

图 3 各组大鼠睾丸组织中 G9a 蛋白免疫组化显微图片 (DBA, ×400)



注: A为空白组; B为模型对照组; C为强精片低剂量组; D为强精片中剂量组; E为强精片高剂量组

图 2 各组大鼠睾丸组织中 Cdy1 蛋白免疫组化显微图片 (DBA, ×400)



注: A为空白组; B为模型对照组; C为强精片低剂量组; D为强精片中剂量组; E为强精片高剂量组

图 4 各组大鼠睾丸组织中 HDAC1 蛋白免疫组化显微图片 (DBA, ×400)

4 各组大鼠睾丸组织 Cdy1、G9a、HDAC1 mRNA 表达比较(表 3) 与空白组比较,模型组 Cdy1、G9a mRNA 表达降低($P < 0.01$),HDAC1 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,强精片中、高剂量组 Cdy1、G9a mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),HDAC1 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠睾丸组织中 Cdy1、G9a、HDAC1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cdy1	G9a	HDAC1
空白	7	1.00 ± 0.10**	1.00 ± 0.04**	1.01 ± 0.15**
模型	7	0.67 ± 0.11	0.53 ± 0.12	1.26 ± 0.17
强精片低剂量	7	0.69 ± 0.11	0.62 ± 0.14	1.13 ± 0.12
强精片中剂量	7	0.82 ± 0.16*	0.78 ± 0.09**	1.09 ± 0.15*
强精片高剂量	7	0.94 ± 0.17**	0.80 ± 0.06**	1.05 ± 0.14*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

男性不育的发病率逐年增加,日益成为影响家庭及社会稳定的严重问题,生精功能障碍是男性不育的重要病因,中医学虽无生精功能障碍一词,但有诸多如“精少”、“精薄”、“精冷”、“精弱”、“精空”等描述精子生成数量与生成质量降低的记载,与现代精子生成障碍表现相似。中医学在长期实践中,积累了丰富的治疗男性不育相关经验,现代研究显示,中医学治疗男性不育具有多靶点、多途径优势,研究显示中药复方可以通过提高精子线粒体功能^[9]、降低精浆中活性氧含量^[10]、改善 PRM2 基因表达水平^[11]、作用于小鼠睾丸 Bcl-2 及 Bax 蛋白^[12]等多种机制改善生精功能障碍症状,但关于中药调节精子生成过程中组蛋白修饰机制异常,改善生精功能障碍的相关研究偏少。

精子生成受组蛋白修饰等表观遗传机制调控,组蛋白修饰(histone modifications)是指组蛋白发生的多种共价修饰,包括甲基化、去甲基化、乙酰化、去乙酰化等^[13]。人体存在 Cdy 及 G9a、HDAC1 复合蛋白,Cdy 及 G9a、HDAC1 参与精子发生过程中的组蛋白甲基化及(或)乙酰化修饰。Cdy 主要在睾丸中特异性表达,人类 Cdy 的大鼠同源物为 Cdy1,Cdy 可将 G9a 等组蛋白甲基转移酶招募到染色质上,提示 Cdy 参与组蛋白甲基化机制,研究也显示 Cdy1 能与 HDAC1/2 结合,Cdy 家族蛋白在体外表现出组蛋白乙酰基转移酶活性^[2]。G9a 是甲基化转移酶 Suv39 h 亚家族成员之一,能介导催化组蛋白甲基化,在睾丸组织中广泛分布,在成人的睾丸中,G9a 从精原干细胞到精原细胞、精母细胞都有表达,G9a 缺失

会导致成人男性不育^[4]。HDAC1 HDACs 家族成员之一,可介导组蛋白的去乙酰化,动物研究显示 HDAC1 表达异常与生精功能障碍相关^[5]。Cdy、G9a、HDAC1 蛋白均与精子生成相关,并能参与精子发生中的组蛋白甲基化、乙酰化修饰过程,Cdy1 及 G9a、HDAC1 异常表达可能破坏精子生的组蛋白修饰机制稳定,导致生精功能障碍,进而引发不育。

本实验中,采用具有生殖破坏作用的 CP 腹腔注射的方式制作生精功能障碍大鼠模型,根据相关实验报道显示,CP 有明确生殖毒性,对生精干细胞的破坏,可使精子细胞染色体易位,精母细胞 DNA 断裂,诱导生殖细胞遗传物突变或畸形^[14],导致雄性生精功能障碍。CP 腹腔注射造模尚无统一标准,用量从 20~60 mg/kg^[8,15]均有报道,造模时间连续腹腔注射 5 天者较多。

强精片是成都中医药大学附属医院治疗治疗男性不育症的中医药协定方,已有二十余年临床运用历史,临床及动物实验均显示其治疗男性不育症有一定疗效^[16-19]。强精片由菟丝子、枸杞子、熟地黄、人参、当归、淫羊藿、仙茅、山茱萸、五味子、车前子、益母草等多种中药组成。全方在继承传统医学男性不育以补肾为要的基础上,重视肝脾两脏功能失常对男子不育的影响,并关注到肾肝脾失司所导致的湿热、瘀血亦是男子不育的病因病机,全方以补肾为本、调补肝脾、阴阳并调、充精益髓、大补气血,兼清利湿热、活血祛瘀,具有补中有通、补中有清特点,故能起到调补肾肝脾、充益精血、活血化瘀、清利湿热的功效,可治疗多种病因病机导致的生精功能障碍,从而提高男性生殖能力。根据研究显示,益母草提取液^[20]可改善环磷酰胺导致的精子畸形,枸杞多糖^[21]、淫羊藿总黄酮^[22]、五味子多糖^[23]能修复环磷酰胺损伤的睾丸组织,增加睾丸重量,提升环磷酰胺损伤动物的精液质量。

在本实验中,应用强精片对造模大鼠进行干预后发现,强精片各组大鼠睾丸结构得以不同程度修复,精液质量明显提高。强精片可改善模型大鼠受损睾丸结构,上调 Cdy1、G9a 表达,下调 HDAC1 表达,提升精子质量,其机制可能为强精片能够修复 CP 对实验动物睾丸组织损伤,恢复 DNA 结构,降低环磷酰胺引发的应激反应,进而从基因蛋白水平恢复 Cdy1、G9a 的表达,下调 HDAC1 表达,或者强精片修复受损睾丸组织的 DNA 而升高 Cdy1 的表达时,会导致 G9a 表达的升高,HDAC1 表达下降,最终恢复精子发生中 Cdy 与 G9a、HDAC1 组蛋白甲基化及乙酰化修饰机制稳定,确保精子生成过程的

顺利进行,改善造模大鼠的生精功能障碍症状。研究结果也与卞廷松等^[3]用中药复方干预不育患者后 Cdy 表达变化结果相符。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Krausz C, Escamilla AR, Chianese C, et al. Genetics of male infertility: from research to clinic [J]. *Reproduction*, 2015, 150(5): 159-174.
- [2] 杨晓,陈泰中,费城,等.生精障碍相关的 CDYLs 基因家族研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2016, 35(2): 123-127.
- [3] 卞廷松,曾庆琪,谈小林,等.聚精颗粒对弱精子症 CDY 基因表达变化的作用研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(3): 222-224, 241.
- [4] 葛少钦,李建忠,张晓静.精子发生过程中组蛋白甲基化和乙酰化[J]. *遗传*, 2011, 33(9): 939-946.
- [5] Fenic I, Hossain HM, Sonnack V, et al. *In vivo* application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis [J]. *J Androl*, 2008, 29(2): 172-185.
- [6] Shi Y, Sawada J, Sui G, et al. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex [J]. *Nature*, 2003, 422(6933): 735-738.
- [7] Mulligan P, Westbrook TF, Ottinger M, et al. Cdy bridges REST and histone methyltransferases for gene repression and suppression of cellular transformation [J]. *Molecular Cell*, 2008, 32(5): 718-726.
- [8] Wang YN, Wang B, Liang M, et al. Down-regulation of CatSper1 channel in epididymal spermatozoa contributes to the pathogenesis of asthenozoospermia, whereas up-regulation of the channel by Sheng-Jing-San treatment improves the sperm motility of asthenozoospermia in rats [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(2): 579-587.
- [9] 焦拥政,孟令东,马卫国,等.益精方对特发性少弱精子症精子凋亡和线粒体功能影响的研究[J]. *中华男科学杂志*, 2012, 18(11): 1045-1049.
- [10] 周辉,程学军,陈焱,等.畸精症患者黄精赞育胶囊治疗前后精浆中活性氧浓度的变化[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(8): 1514, 1516.
- [11] 卞廷松,王成荣,丁志祥,等.聚精颗粒对少弱精子症及 PRM2 基因 mRNA 表达水平的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(2): 243-246.
- [12] 宾彬,莫秋柏,陈定雄,等.强精煎对实验小鼠睾丸 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达影响研究[J]. *实用中医药杂志*, 2010, 26(8): 524-525.
- [13] Pinney SE, Simmons RA. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(4): 223-229.
- [14] Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B. Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(6): 1297-1304.
- [15] 罗少波,胡海翔,贾金铭,等.益精方对环磷酰胺小鼠少弱精症模型精子凋亡的干预作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(2): 120.
- [16] 常德贵,张培海,胡志萍,等.增精 1 号胶囊对少精子症患者精子动态及形态的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(11): 1029-1030.
- [17] 杜位良,常德贵,张太君,等.增精颗粒对大鼠附睾功能性指标 GPC 及 SA 的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2004, 18(1): 22-25, 28.
- [18] 杜位良,常德贵,张太君,等.增精颗粒对大鼠附睾精子质量的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2004, 10(2): 155-159.
- [19] 张培海,陈帝昂,董良,等.强精片对不育模型 SD 大鼠细胞凋亡通路 Fas/FasL 的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2016, 22(3): 246-251.
- [20] 邢沈阳,乔萍,温得中,等.益母草提取液对小鼠遗传物质损伤的保护作用及对淋巴细胞功能的增强作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2008, 34(5): 799-801.
- [21] 刘心昕,黄益麒,高英英,等.枸杞多糖对少精症大鼠模型生精功能改善的机制研究[J]. *浙江中医杂志*, 2016, 51(3): 225-226.
- [22] 张长城,贾亮亮,李守超,等.淫羊藿总黄酮对环磷酰胺致小鼠生精障碍保护作用的研究[J]. *中成药*, 2010, 32(12): 2052-2055.
- [23] 张艳,沈楠,齐玲,等.五味子多糖对环磷酰胺致生精障碍大鼠的治疗作用及对生殖激素的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(3): 361-364.

(收稿:2017-04-07 在线:2018-05-02)

责任编辑:邱禹