

· 基础研究 ·

精杞胶囊对环磷酰胺诱导大鼠生精细胞凋亡的抑制作用

黄佳妮¹ 马红¹ 吕晔² 韦敏²

摘要 **目的** 探讨精杞胶囊对环磷酰胺诱导大鼠生精细胞凋亡的抑制作用。**方法** 40 只 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分成 5 组:正常组、模型组、精杞低剂量组[500 mg/(kg·d)]、精杞高剂量组[1 000 mg/(kg·d)]和丙酸睾酮组[5 mg/(kg·d)],每组 8 只。给药组用药 14 d 后,除正常组外,其余各组腹腔注射环磷酰胺 25 mg/(kg·d)连续 5 d,造模期间各给药组连续给药,造模结束后次日处死全部大鼠。HE 染色法观察睾丸组织形态;透射电镜观察生精细胞超微结构;ELISA 法检测血清睾酮(T)、卵泡生成素(FSH)和黄体生成素(LH)含量及附睾管腔液中唾液酸(SA)的含量;流式细胞仪分析精子细胞凋亡和细胞周期。**结果** 与正常组比较,模型组睾丸曲精细管内各级生精细胞含量较少,结构杂乱,生精细胞核崩解、坏死,线粒体肿胀空泡化,嵴断裂,高尔基复合体结构紊乱。与模型组比较,各给药组病理减轻。与正常组比较,模型组大鼠 T、FSH、LH、SA 含量及各期细胞存活率、G₁ 期细胞比例降低,凋亡率及 S 期细胞比例增加($P<0.01$)。与模型组比较,给药组 T、FSH、LH、SA 含量及各期细胞存活率、G₂ 期细胞比例增高,凋亡率及 S 期细胞比例降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与丙酸睾酮组比较,精杞低剂量组的大鼠血清 T、FSH、LH 及 SA 含量降低($P<0.01$),精杞低、高剂量组细胞存活率下降,早期凋亡率和总凋亡率增加($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 精杞胶囊对环磷酰胺所诱导的大鼠生精细胞凋亡有抑制作用,其机制可能与调节生殖激素水平有关。

关键词 精杞胶囊;环磷酰胺;生精细胞;细胞凋亡

Inhibitory Effect of Jingqi Capsule for Apoptosis of Spermatogenic Cells Induced by Cyclophosphamide in Rats HUANG Jia-ni¹, MA Hong¹, LU Ye², and WEI Min² 1 School of Traditional Chinese Medicine and Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing(210023); 2 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanjing(210014)

ABSTRACT **Objective** To investigate the inhibitory effect of Jingqi Capsule(JQC) for spermatogenic cell apoptosis induced by cyclophosphamide in rats. **Methods** Totally 40 SPF male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, low-dose JQ group(500 mg·kg⁻¹·d⁻¹), high-dose JQ group(1 000 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and testosterone propionate group(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 8 rats in each group. After 14 days of administration, the groups were intraperitoneally injected with cyclophosphamide 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 5 days except the normal group. During the modeling period, all the rats in each group were given the drug continuously, and all the rats were sacrificed the next day after the end of the modeling. The histological morphology of testis was observed by HE staining. The ultrastructure of spermatogenic cells was observed by transmission electron microscopy. The contents of testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in serum and sialic acid (SA) in epididymal lumen fluid were detected by ELISA. The apoptosis and cell cycle of sperm cells were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with normal group, the content of spermatogenic cells at all levels in the testicular convoluted tubule in the model group decreased, the structure was disorderly, the spermatogenic cells nucleus fragmented and necrotic, mitochondria were swollen and vacuolated, cristae were broken, and Golgi apparatus structure was disordered. Compared with model group, the pathology of each drug group was alleviated. Compared with normal group, the model group rats had lower T, FSH, LH, SA content and survival rate of each stage cells, G₁ phase cell proportion, apoptosis rate and S phase cell proportion increased ($P<0.01$). Compared with model group, the drug group had higher T, FSH, LH, SA content and survival rate of each stage cells, G₂ phase cell proportion increased, apoptosis rate and S phase cell proportion decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with testosterone propionate group, the low-dose JQ group rats had lower T, FSH, LH and SA content ($P<0.01$), and the low-dose and high-dose JQ group cell survival rate decreased, early apoptosis rate and total apoptosis rate increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Jingqi Capsule has an inhibitory effect on the apoptosis of spermatogenic cells induced by cyclophosphamide, and its mechanism may be related to the regulation of reproductive hormone levels.

基金项目:江苏省 2016 年第三批省级地方教育项目(No. 022062004001);江苏高校优势学科建设工程资助项目(No. 苏政办发[2018]87 号)

作者单位:1. 南京中医药大学中医学部·中西医结合学院(南京 210023);2. 中国科学院植物研究所(南京 210014)

通讯作者:马红, Tel: 025-85811932, E-mail: mhome603@sina.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200216. 097

genic nucleus was disintegrated and necrotic, the mitochondria was swelled and vacuolated, the crest was broken, and the golgi complex was disordered. Compared with model group, the pathology of treatment groups was alleviated. Compared with normal group, the contents of T, FSH, LH and SA, the survival rate of cells in each stage and the proportion of cells in G₁ phase decreased, while the apoptosis rate and the proportion of cells in S phase increased in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, the contents of T, FSH, LH and SA, the survival rate of cells in each stage and the proportion of cells in G₂ phase increased, while the apoptosis rate and the proportion of cells in S phase decreased in treatment group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with testosterone propionate group, the contents of serum T, FSH, LH and SA in low dose JQ group decreased ($P < 0.01$), while the cell survival rate decreased, early apoptosis rate and total apoptosis rate increased in low and high dose JQ groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** JQC has inhibitory effect on spermatogenic cell apoptosis induced by cyclophosphamide in rats, the mechanism may be related to regulating the reproductive hormone.

KEYWORDS Jingqi Capsule; cyclophosphamide; spermatogenic cell; apoptosis

研究显示,由男性因素导致的不孕不育高达 30%~50%^[1],男性不育症主要表现为少精子症、弱精子症及无精子症等精子质量异常,但发病机制目前还尚不明确,现代医学缺乏有效的治疗方法^[2]。中医学认为少、弱精子症属“绝嗣”“不育”“无子”的范畴,研究发现,中医药治疗少、弱精子症效果显著,可有效提升精子数量与精子活力^[3]。精杞胶囊由蛹虫草、灵芝、菟丝子、熟地黄、枸杞子、桑椹、红花组成,具有补肾填精、助养生育的功效,课题组前期研究证实精杞胶囊具有保护生精功能的作用^[4]。本研究进一步探讨精杞胶囊对环磷酰胺诱导大鼠生精细胞损伤的作用及其具体机制,现报道如下。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只,12 周龄,体重 280~300 g。购自江宁区青龙山动物繁殖场,许可证号:SCXK(苏)2017-0001。本实验已通过南京中医药大学实验动物伦理委员会审核(No. ACU171203)。

2 药品制备 蛹虫草、熟地、枸杞子、桑椹、菟丝子、灵芝、红花均由南京美福天然药物科技有限公司提供(许可证号:SC12732011300201),购自亳州中药材市场,由江苏省中科院植物研究所王年鹤研究员进行鉴定,均符合中国药典规定。制备方法为将原料药材经精选除杂后,以水煎醇沉法制得植物多糖,与蛹虫草细粉充分混匀,加入适量辅料制成胶囊。

3 试剂及仪器 环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX,百特医疗用品贸易上海有限公司,批号:H20160467);丙酸睾酮(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:L1401028);大鼠促卵泡素(follicle-stimulating hormone,FSH)试剂盒(上海酶联生物

科技有限公司,批号:20180609EA);大鼠黄体生成素(luteinizing hormone,LH)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:20180605EA);大鼠睾酮(testosterone,T)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:20180611EA);大鼠唾液酸(sialic acid,SA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:20180603EB);HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0105);医用酒精(国药集团化学试剂有限公司,批号:64-17-5);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号:1330-20-7);中性树胶(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:SP900);细胞周期检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司);Annexin V-FITC/PI 试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)。微量移液器(EPPENDORF-1 mL, EPPENDORF 公司);离心机(北京时代北利离心机有限公司,DT5-4B);切片机(LEICA, RM2235);病理组织烘漂仪(PHY-III,常州中威电子仪器有限公司);光学显微镜(Olympus, CX41-32C);透射电镜(H-500,日本日立公司);全波长多功能酶标仪(M1000,瑞士 Tecan 公司);BD 流式细胞仪(FACSCanto II,美国 BD 公司)。

4 分组及造模 40 只 SPF 级 SD 雄性大鼠按随机数字表法分成 5 组:正常组、模型组、精杞低剂量组、精杞高剂量组和丙酸睾酮组,每组 8 只。精杞胶囊内容物用生理盐水配成相应浓度,精杞低、高剂量组分别给予精杞胶囊 500、1 000 mg/(kg·d)灌胃给药,相当于成人临床等效剂量 10、20 倍^[5]。丙酸睾酮组给予丙酸睾酮 5 mg/(kg·d)颈部皮下注射。给药组用药 14 天后,参照文献^[6]诱导建立大鼠生精功能障碍模型,除正常组外,其余各组均腹腔注射 CTX 25 mg/(kg·d),连续 5 天,正常组腹腔注射等量生理盐水,

造模期间同时继续给药。

5 检测指标及方法

造模结束次日颈椎脱臼法处死全部大鼠,心脏取血,3 000 r/min 离心 15 min,取上清,于-80℃保存备用。取称重后的一侧睾丸放入 4% 多聚甲醛中固定,用于睾丸组织光镜形态学观察;另一侧睾丸放入 2.5% 戊二醛中保存,用于电镜超微结构观察。采集附睾中精子,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下孵育 20 min,使精子自行散开,低速离心弃去固定液,PBS 清洗两次,打匀,分别收至离心管中,用于精子细胞凋亡检测和细胞周期检测。采集附睾管腔液置于 37℃ 震荡水浴 20 min,3 500 r/min 离心 15 min,取上清附睾管腔液,用于附睾管腔液中 SA 含量检测。

5.1 一般情况 观察大鼠实验过程中活动度、精神状态、体质量、饮食、毛发等一般情况。

5.2 HE 染色观察睾丸组织形态学 取多聚甲醛固定后的睾丸,常规石蜡包埋,6 μm 厚切片,二甲苯和酒精梯度脱蜡,HE 染色,脱水、透明、中性树胶封片,在光学显微镜下对睾丸组织病理学进行观察。

5.3 透射电镜观察睾丸生精细胞超微结构 取多聚甲醛固定后的睾丸,环氧树脂包埋,制作超薄切片,醋酸铀和柠檬铅双重染色,在透射电镜下对睾丸内生精细胞的超微结构进行观察。

5.4 血清 T、FSH、LH 及附睾管腔液 SA 检测 采用 ELISA 试剂盒进行检测,按照说明书操作。

5.5 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期 取离心管中附睾精子,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL PI 染色混匀,室温、避光反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。另取离心管中附睾精子,加入 PI(终浓度 50 μg/mL)染色混匀,4℃避光 30 min,流式细胞仪检测细胞周期,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

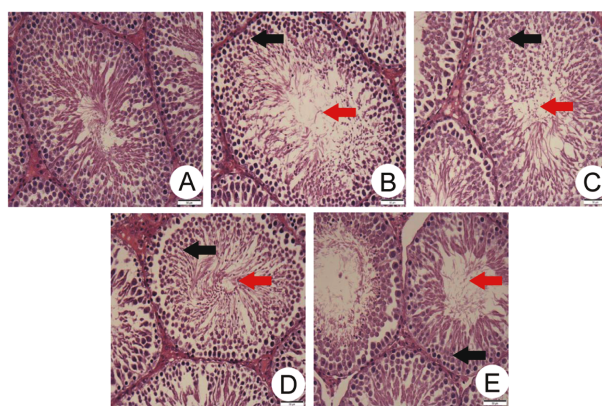
6 统计学方法 用 SPSS 24.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组一般情况比较 造模前,各组大鼠精神状态良好,动作敏捷,饮食正常,毛发有光泽,体重增加。造模后,模型组大鼠出现精神状态萎靡,动作迟缓,喷嚏,饮食量减少,毛发干枯,体重下降等现象。与模型组比较,给药组大鼠精神状态、食量、反应、毛色及体重均有不同程度的改善。

2 各组大鼠睾丸组织形态比较(图 1) HE 染

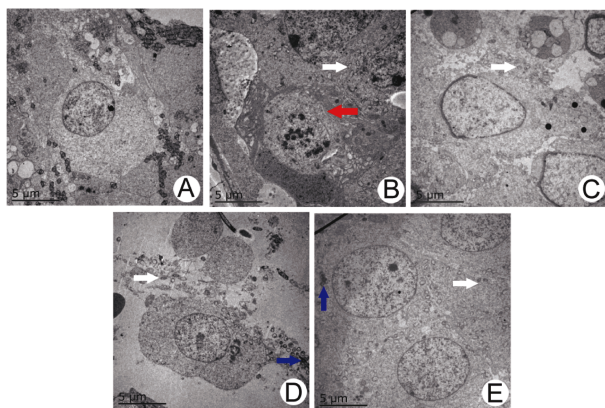
色结果显示,正常组大鼠睾丸曲精细管结构完整,清晰可见各级生精细胞由曲精细管的基膜向管腔按顺序正常排列,支持细胞与各级生精细胞紧密相连,管腔内精子含量较多,生精活跃。模型组睾丸曲精细管内各级生精细胞含量较少,结构杂乱,管腔间隙增大,部分生精细胞发生停滞,脱落于管腔。与模型组比较,精杞低剂量组生精细胞数量增多,但部分生精细胞排列稍杂乱,精杞高剂量组曲精细管的结构比较完整,各级生精细胞排列整齐,数量多,管腔间隙缩小,腔内可见大量精子。丙酸睾酮组曲精细管的各级生精细胞层次较清晰,但生精细胞量较少,管腔间隙稍大,腔内精子数仍稀少,但较精杞高剂量组减少。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为精杞低剂量组;D 为精杞高剂量组;E 为丙酸睾酮组;黑色箭头所指为生精细胞;红色箭头所指为精子

图 1 各组大鼠睾丸组织形态比较 (HE, ×400)

3 各组大鼠睾丸生精细胞超微结构比较(图 2) 电镜显示,正常组生精细胞形态为不规则圆形或卵圆形,核仁核膜边缘清晰,核内以常染色质分布为主,胞质丰富,高倍镜下可见大量细胞器存在,成堆的线粒体聚集于核旁,形成线粒体鞘,管状嵴清晰,线粒体无肿胀;高尔基复合体结构正常、发达。模型组生精细胞核崩解、坏死,核内染色质固缩、边聚,染色深,胞浆空泡化,细胞器数量减少,线粒体肿胀空泡化,嵴断裂,高尔基复合体结构紊乱。精杞低剂量组核仁核膜较完整,常染色质分布较均匀,但细胞器数量仍较少,部分线粒体、高尔基复合体等细胞器结构模糊,少数线粒体肿胀。精杞高剂量组生精细胞核膜完整,核仁清晰,胞质较丰富,细胞器数量增多,线粒体嵴排列正常,高尔基复合体结构清晰,胞浆少见空泡,较模型组有明显恢复。丙酸睾酮组生精细胞核仁较完整,常染色质紧密排列,细胞器数量增加,高尔基复合体和线粒体嵴结构尚清晰。



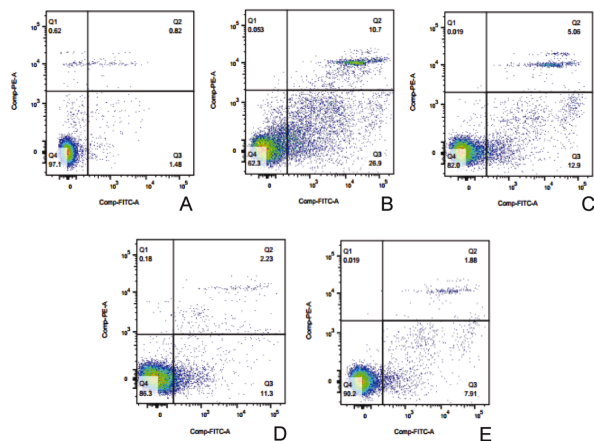
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为精杞低剂量组;D 为精杞高剂量组;E 为丙酸睾酮组;红色箭头所指为细胞核崩解、坏死;白色箭头所指为线粒体;蓝色箭头所指为高尔基复合体

图 2 各组大鼠睾丸生精细胞超微结构比较 (透射电镜, $\times 2850$)

4 各组大鼠血清 T、FSH、LH 和附睾管腔液 SA 比较 (表 1) 与正常组比较,模型组大鼠血清 T、FSH、LH 及 SA 含量降低 ($P<0.01$)。与模型组比较,给药组大鼠血清 T、FSH、LH 及 SA 含量升高 ($P<0.01$)。与丙酸睾酮组比较,精杞低剂量组的大鼠血清 T、FSH、LH 及 SA 含量降低 ($P<0.01$);精杞高剂量组各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

5 各组细胞凋亡及周期比较 (图 3、4、表 2、3) 与正常组比较,模型组细胞存活率、 G_1 期细胞比例下降,早期、晚期及总凋亡率、S 期细胞比例上升 (均 $P<0.01$),且出现显著的亚二倍体凋亡峰。与模型组比较,给药组各期细胞存活率、 G_2 期细胞比例上升,早

期、晚期及总凋亡率、S 期细胞比例下降 ($P<0.05$, $P<0.01$),且伴有减低的亚二倍体凋亡峰,丙酸睾酮组 G 期细胞比例升高 ($P<0.01$)。与丙酸睾酮组比较,精杞低、高剂量组细胞存活率下降,早期凋亡率和总凋亡率增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。给药组间 G_1 期、S 期和 G_2 期的细胞比例比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为精杞低剂量组;D 为精杞高剂量组;E 为丙酸睾酮组;左上 Q1 象限所指为坏死细胞,右上 Q2 象限所指为晚期凋亡细胞,右下 Q3 象限所指为早期凋亡细胞,左下 Q4 象限所指为正常细胞

图 3 各组细胞凋亡及周期比较

讨 论

肾藏先天之精,主生殖。《黄帝内经·素问上古天真论》云:“丈夫八岁,肾气实,发长齿更;二八,肾气盛,天癸至,精气溢泻,阴阳和,故能有子”。可见男性

表 1 各组大鼠血清 T、FSH、LH 及附睾管腔液 SA 比较 ($\bar{x}\pm s$)

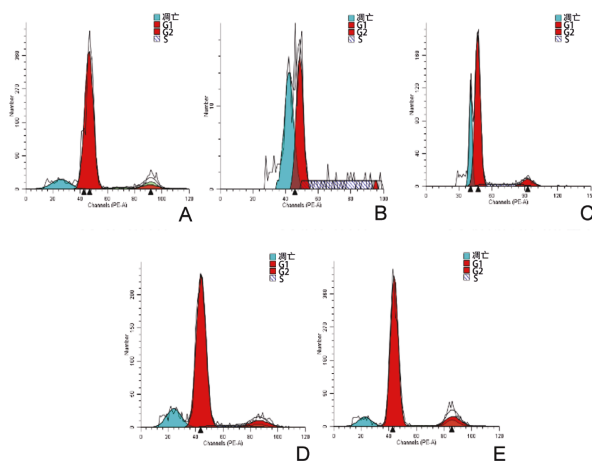
组别	n	T (pg/mL)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	SA (ng/mL)
正常	8	304.97 $\pm$ 30.53	11.86 $\pm$ 1.39	39.86 $\pm$ 5.63	3.22 $\pm$ 0.19
模型	8	183.14 $\pm$ 23.69*	6.40 $\pm$ 1.18*	24.43 $\pm$ 3.42*	2.12 $\pm$ 0.25*
精杞低剂量	8	213.09 $\pm$ 35.79 Δ Δ	7.76 $\pm$ 1.23 Δ Δ	29.11 $\pm$ 5.07 Δ Δ	2.46 $\pm$ 0.23 Δ Δ
精杞高剂量	8	273.46 $\pm$ 24.77 Δ	9.53 $\pm$ 0.86 Δ	32.60 $\pm$ 5.13 Δ	2.93 $\pm$ 0.31 Δ
丙酸睾酮	8	267.34 $\pm$ 28.24 Δ	9.82 $\pm$ 1.12 Δ	35.94 $\pm$ 4.99 Δ	3.03 $\pm$ 0.29 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.01$;与丙酸睾酮组比较, Δ $P<0.01$

表 2 各组大鼠精子细胞凋亡情况比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	n	细胞存活率	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
正常	4	96.20 $\pm$ 2.22	1.74 $\pm$ 0.67	0.72 $\pm$ 0.50	2.46 $\pm$ 1.15
模型	4	64.00 $\pm$ 9.74*	24.92 $\pm$ 6.97*	9.10 $\pm$ 3.23*	34.02 $\pm$ 9.94*
精杞低剂量	4	78.08 $\pm$ 4.54 Δ Δ Δ	16.80 $\pm$ 3.15 Δ Δ Δ	4.59 $\pm$ 2.21 Δ	21.39 $\pm$ 4.14 Δ Δ Δ
精杞高剂量	4	82.78 $\pm$ 2.82 Δ Δ	13.84 $\pm$ 2.21 Δ Δ Δ	2.86 $\pm$ 1.05 Δ	16.70 $\pm$ 2.38 Δ Δ Δ
丙酸睾酮	4	89.80 $\pm$ 1.32 Δ	6.79 $\pm$ 1.29 Δ	2.92 $\pm$ 1.79 Δ	9.71 $\pm$ 1.27 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.01$;与丙酸睾酮组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为精杞低剂量组;D 为精杞高剂量组;E 为丙酸睾酮组

图 4 各组大鼠精子细胞周期比较

表 3 各组大鼠精子细胞周期分布比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	G ₁	S	G ₂
正常	4	93.51±0.84	0.17±0.35	6.32±0.68
模型	4	80.28±9.34*	16.10±9.88*	3.62±1.52
精杞低剂量	4	86.17±4.06	5.54±1.49 ^{△△}	8.30±3.37 [△]
精杞高剂量	4	86.85±1.29	3.42±2.09 ^{△△}	9.73±2.69 ^{△△}
丙酸睾酮	4	89.60±1.31 [△]	1.20±1.46 ^{△△}	9.20±2.77 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

随着肾气充盛,作为生殖之精的“天癸”产生,也就是精子发育、成熟从而具有生殖能力的过程。肾之阴精为精子化生的物质基础,肾之阳气的气化和温煦作用则有助于精子的化生,共同维持正常的精子密度、精子活力及精子活率。因此,中医学认为少、弱精子症以“肾精亏虚”为本,临床上多以补肾益精为主要治疗原则^[7]。精杞胶囊由蛹虫草、灵芝、菟丝子、熟地黄、枸杞子、桑椹、红花组成。方中蛹虫草为君药,具有补益肾精、调和阴阳之功。灵芝健脾补肾以益精,菟丝子温补肾阳化精,熟地黄、枸杞子、桑椹滋补肾阴以生精,共为臣药,助养生殖之精的生成。红花调血以增强养血补精之力为佐药。全方滋温并用、阴阳并补、动静结合,共奏益肾填精、助养生育之功。前期研究也证实精杞胶囊具有保护生精功能的作用^[4]。

CTX 是目前应用较为广泛的烷化剂类抗癌药物,其可严重损害生殖系统,具有生殖毒性,可使睾丸与附睾无法正常产生精子,导致精子数量减少、精子活力缺乏和性激素水平下降等^[8]。研究表明,CTX 能促进生精细胞凋亡,对大鼠睾丸、附睾损害明显^[9, 10]。T 是人的主要雄激素,T 水平降低也是生精细胞凋亡的主

要原因,补给 T 能有效抑制 CTX 诱导生精细胞凋亡^[11]。为此本实验通过 CTX 构建大鼠生精障碍模型,选用丙酸睾酮作为阳性对照药,研究精杞胶囊对 CTX 致大鼠生精细胞凋亡的抑制作用。

刘波等^[12]研究显示,CTX 会导致小鼠睾丸组织呈现曲精细管萎缩变形,管腔内精子含量较少,各级生精细胞排列不紧密,少数生精细胞分离、脱落等病理性形态学变化。本实验亦观察到,光镜下模型大鼠睾丸组织呈现生精上皮变薄,生精细胞的数目及层次减少,管腔间隙增大等病理性形态学变化。电镜下模型大鼠睾丸生精细胞呈现胞核崩解、坏死,核膜起皱,染色质凝集成块,胞浆空泡状,线粒体肿胀,嵴断裂,高尔基复合体结构紊乱等超微结构改变。精杞胶囊预防性用药后能改善生精损伤模型大鼠睾丸组织病变及生精细胞超微结构,表明精杞胶囊对 CTX 诱导的大鼠生精细胞凋亡有拮抗作用。

精子的发生由下丘脑—垂体—性腺轴所调控。研究显示,少、弱精子症患者多见性激素平衡紊乱,或下丘脑—垂体—性腺轴负反馈失调,具体表现为 T、FSH、LH 水平同时下降,或 FSH、LH 水平异常升高而 T 水平无明显变化^[13]。CTX 可诱发下丘脑—垂体—性腺轴负反馈失调,破坏生精内环境,造成精子 DNA 的损伤,影响精子的正常发生与成熟,其机制可能是因为氧化损伤及 CTX 诱导的基因表达模式在睾丸间质细胞内发生变化所致^[14]。本研究观察到,CTX 造模后,模型组大鼠血清内的 T、FSH、LH 水平下降,低于正常水平。给予精杞胶囊后,T、FSH、LH 性激素水平明显升高,提示精杞胶囊可维持大鼠性腺轴的正常调控功能。且高剂量精杞胶囊疗效与丙酸睾酮疗效相当。

附睾上皮细胞能合成和分泌 SA,对附睾内的精子成熟具有重要作用。研究表明,不育男性的精子表面 SA 含量明显低于正常生育男性,SA 可以遮盖精子膜表面的部分抗原决定簇,让精子免遭阴道上皮细胞及白细胞的识别和吞噬,若精子表面 SA 含量不足,则会面临被雌性免疫识别的高风险,进而阻止精子抵达受精位点,从而降低受精率^[15]。当附睾受到炎症或化疗药物损害时,附睾上皮细胞损伤增加,合成并分泌 SA 的功能严重受损,导致附睾液中 SA 含量下降^[16]。本实验结果显示,模型组大鼠的 SA 含量明显低于正常组。给予精杞胶囊后,各给药组大鼠附睾管腔液中 SA 含量显著升高。实验结果表明,精杞胶囊能改善 CTX 诱导的 SA 含量下降,利于精子在附睾中发育和成熟,且高剂量精杞胶囊疗效与丙酸睾酮疗效相当。

细胞周期是细胞经历 G_1 -S- G_2 -M 各期再进行分裂增殖的一个过程,细胞周期不同阶段的细胞分布能够反映出精子细胞的增殖状况。如果细胞的 DNA 合成环节受到损伤,会引起细胞周期发生停滞,细胞随即凋亡^[17]。而细胞周期调控机制中存在 DNA 损伤检查点,DNA 受损后,细胞会及时检测到并阻断细胞周期的进展,以便有时间进行自我修复^[18]。本实验结果显示,CTX 组细胞总凋亡率最高,大量细胞阻滞在 S 期,并出现较高凋亡峰,表明 CTX 用药后,精子细胞的 DNA 合成受到阻滞,进而导致生精抑制,该时细胞立即启动 DNA 损伤检查点,让细胞暂时停留在 S 期。精杞组精子细胞总凋亡率有明显下降,且阻滞均发生在 G_2 期,凋亡峰下降。表明精杞胶囊能让损伤的精子细胞从 G_1 -S- G_2 期逐步转化,并通过 G_2 期细胞受阻的时机,加速修复受损精子细胞的 DNA,促使细胞进行有丝分裂,提高精子细胞抗损伤和修复的能力,从而抑制 CTX 所致的精子细胞凋亡。此外,与丙酸睾酮组比较,精杞低、高剂量组的细胞存活率下降,早期凋亡率和总凋亡率升高,提示在此动物模型下,精杞胶囊抑制精子细胞凋亡的效果不如阳性对照药丙酸睾酮。但精杞胶囊特别是高剂量组在改善睾丸组织形态、生精细胞超微结构以及调节大鼠血清 T、FSH、LH 和附睾管腔液 SA 方面,与丙酸睾酮比较无明显差异。精杞胶囊为多成分复方制剂,尚有机理不明之处,未来可进一步开展相关研究,以期利用多靶点特点提高疗效。

综上所述,精杞胶囊能增加 CTX 诱导大鼠血清 T、FSH、LH 含量及附睾管腔液中 SA 含量,改善睾丸组织病变和生精细胞超微结构,降低精子细胞总凋亡率。本研究的结果为精杞胶囊在男性生殖健康中的应用提供了实验依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Ramalingam M, Kini S, Mahmood T. Male fertility and infertility [J]. *Obst, Gyn and Repro Med*, 2014, 24(11): 326-332.
- [2] 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.
- [3] 李博悌, 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.
- [4] 万芳, 马红, 吕晔, 等. 精杞胶囊对大鼠生精功能损伤的保护作用 [J]. *中成药*, 2017, 39(4): 672-676.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1861.
- [6] 高学勇, 林珊, 韩咪莎. 淫羊藿苷对环磷酰胺诱导生精障碍大鼠下丘脑—垂体—睾丸轴的影响 [J]. *解剖学杂志*, 2018, 41(2): 147-151.
- [7] 海艺贝, 梁沛华. 少弱精子症的中医药治疗思路 [J]. *中国性科学*, 2017, 26(1): 80-83.
- [8] 张曦文, 李乐乐, 江素鑫, 等. 环磷酰胺生殖毒性的研究进展 [J]. *中国研究型医院*, 2018, 5(1): 27-32.
- [9] Li J, Hu Y, Zhang Q, et al. Strontium fructose 1, 6-diphosphate alleviate cyclophosphamide-induced oligozoospermia by improving antioxidant and inhibiting testicular apoptosis via FAS/FASL pathway [J]. *Andrologia*, 2015, 47(9): 995-1003.
- [10] 陈指龙, 张晓春, 薛立群, 等. 环磷酰胺致小鼠生精障碍作用研究 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(5): 34-38.
- [11] 许蓬, 朱伟杰主编. 男性生殖基础与临床研究新进展 [M]. 北京: 科学出版社, 2018: 40-41.
- [12] 刘波, 李叶子, 吴琪, 等. 二仙汤对环磷酰胺致少精子症模型小鼠生殖功能的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2018, 24(6): 547-552.
- [13] 李环, 高久春, 郭航, 等. 血清生殖激素水平与精子密度的关系 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2009, 35(3): 530-533.
- [14] Das UB, Mallick M, Debnath JM, et al. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats [J]. *Asian J Androl*, 2002, 4(3): 201-207.
- [15] 黎娜, 王华锋, 曾旭辉. 唾液酸对精子的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(5): 734-739.
- [16] 官毅, 郑新民, 杨志伟, 等. 大鼠睾丸扭转复位后附睾上皮细胞凋亡及肉碱变化 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(7): 636-638.
- [17] Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1170: 29-40.
- [18] Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, et al. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(4): 607-620.

(收稿: 2019-07-08 在线: 2020-03-03)

责任编辑: 邱禹