

· 基础研究 ·

基于 Toll 样信号通路探讨强精片改善少弱精子症大鼠的作用机制

俞旭君^{1,2} 李俊君² 申毅锋¹ 黄晓朋¹ 李广森¹ 张培海¹ 尤耀东¹ 常德贵¹

摘要 目的 探讨中药强精片(QJP)通过调控睾丸 Toll 样信号通路改善解脲支原体感染及环磷酰胺诱导两种少弱精子症大鼠模型生精功能的作用机制。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,正常对照组(NC 组)、解脲支原体感染少弱精子症组(UU 组)、环磷酰胺少弱精子症组(CTX 组)、强精片干预解脲支原体感染少弱精子症组(UU+QJP 组)、强精片干预环磷酰胺少弱精子症组(CTX+QJP 组),每组 8 只。造模后 NC、UU、CTX 组给予生理盐水灌胃,UU+QJP 组、CTX+QJP 组给予强精片 0.45 g/(kg·d)灌胃,均给药 4 周。记录大鼠一般状态、睾丸附睾湿重,测定精子数量;HE 染色观察睾丸及附睾结构变化;测量血清性激素水平;免疫组织化学染色分析睾丸 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子(MYD88)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TRAF6) 蛋白表达;RT-PCR 测定 TLR4、MYD88、TRAF6 mRNA 表达。结果 与 NC 组比较,CTX、UU 组的大鼠一般状态较差,HE 染色显示生精细胞不同程度减少,免疫组化显示 TLR4、MYD88 表达增多,TRAF6 表达减少,CTX+QJP 组及 UU+QJP 组有所改善。与 NC 组比较,UU 组、CTX 组精子总数、A + B 级精子、A + B + C 级精子、促黄体激素(LH)、睾酮(T)水平、TRAF6 mRNA 表达下降($P < 0.05$),卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E_2)水平、TLR4、MyD88 mRNA 表达增加($P < 0.05$)。与 UU 组和 CTX 组比较,UU+QJP 组和 CTX+QJP 组精子密度、A + B 级精子、A + B + C 级精子、LH、T 水平、TRAF6 mRNA 表达增加($P < 0.05$),FSH、 E_2 水平、TLR4、MyD88 mRNA 表达下降($P < 0.05$)。结论 强精片可改善解脲支原体感染以及环磷酰胺所致少弱精子症大鼠的精子水平,其机制可能与调控睾丸中 Toll 样信号通路的关键靶点 TLR4、MYD88、TRAF6 有关。

关键词 强精片;不育症;生殖功能;Toll 样信号通路;中医药

Qiangjing Tablets Improves Reproductive Function in Oligospermia Rats through Toll-like Signaling Pathway YU Xu-jun^{1,2}, LI Jun-jun², SHEN Yi-feng¹, HUANG Xiao-peng¹, LI Guang-sen¹, ZHANG Pei-hai¹, YOU Yao-dong¹, and CHANG De-gui¹ 1 Key Laboratory of TCM Regulation of Metabolic Diseases of Sichuan Province, Affiliated Hospital of Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu (610075); 2 Department of Chinese Medicine Surgery Reproductive Maternal and Child Hospital, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610041);

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of Qiangjing Tablet (QJT) on improving the spermatogenesis function by regulating the Toll-like signal pathway of the testis in two oligoasthenospermia rat models induced by ureaplasma urealyticum infection or cyclophosphamide. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into 5 groups, normal control group (NC group), ureaplasma urealyticum infection oligoasthenospermia group (UU group), cyclophosphamide oligoasthenospermia group (CTX group), QJT intervention for ureaplasma urealyticum infection oligoasthenozoospermia group (UU+QJT group), QJT

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No.81673808, No.81973647); 四川省教育厅重点项目(No.18ZDA0183); 四川省科技厅重点项目(No.2019YJ0327); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划部门专项(No.2020yky06)

作者单位: 1. 成都中医药大学附属医院代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室(成都 610075); 2. 成都中医药大学附属生殖妇产医院中医外科(成都 610041);

通讯作者: 常德贵, Tel: 028-87783684, E-mail: 624440310@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210915.117

intervention for cyclophosphamide oligoasthenospermia group (CTX+QJT group), 8 in each group. After modeling, the NC, UU, and CTX groups were given saline intragastrically, and the UU+QJT and CTX+QJT groups were given QJT $0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 4 weeks. The general state of the rat, the wet weight of the testis and epididymis were recorded, and the number of sperm was measured; HE staining was used to observe the structural changes of the testis and epididymis; the serum sex hormone level was measured; immunohistochemical staining was used to analyze the testis toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MYD88), TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) protein expression; RT-PCR was used to determine TLR4, MYD88, TRAF6 mRNA expression.

Results Compared with the NC group, the rats in the CTX and UU groups were in poor condition. HE staining showed that the spermatogenic cells decreased. Immunohistochemistry showed that the expression of TLR4 and MYD88 increased, and the expression of TRAF6 decreased, the CTX+QJT group and UU+QJT group recovered. Compared with the NC group, sperm density, A+B grade sperm, A+B+C grade sperm, luteinizing hormone (LH), testosterone (T) level, TRAF6 mRNA expression decreased in UU group and CTX group ($P < 0.05$), follicle stimulating hormone (FSH), estradiol (E_2) level, TLR4, MYD88 mRNA expression increased ($P < 0.05$). Compared with UU group or CTX group, sperm density, A+B grade sperm, A+B+C grade sperm, LH, T level, TRAF6 mRNA expression increased ($P < 0.05$), FSH, E_2 level, TLR4, UU+QJP group or CTX+QJP group MYD88 mRNA expression decreased ($P < 0.05$).

Conclusions QJT can improve the sperm level of Ureaplasma urealyticum infection and cyclophosphamide-induced oligoasthenospermia rats. The mechanism may be related to the regulation of the key targets TLR4, MYD88, and TRAF6 of the Toll-like signaling pathway in the testis.

KEYWORDS Qiangjing Tablets; infertility; reproductive function; toll-like signal pathway; Chinese medicine

男性不育症为男性生殖系统常见疾病之一, 环境污染、不健康生活方式等因素导致男性不育症发病率呈明显上升趋势, 已达育龄期夫妇的 10%~36%, 严重威胁人类生殖健康^[1]。目前 60%~75% 的男性不育症患者为特发性精液异常, 临床治疗效果不佳^[2]。强精片(原名:增精 1 号)由人参、当归、枸杞子、大菟丝子、车前子、淫羊藿、仙茅、益母草组成, 以补肾活血为治疗原则, 前期临床观察显示能改善少弱精子症患者精子数量及活动力, 并能增强大鼠附睾功能^[3,4]。Toll 样信号通路参与男性不育症的免疫炎症反应及病原体抵抗, 与男性不育症密切相关^[5]。本研究基于 Toll 样信号通路观察强精片干预解脲支原体感染以及环磷酰胺所致少弱精子症大鼠模型的疗效, 并探讨具体作用机制。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 4~7 周龄, 体重 180~220 g, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(川)2015-030。严格按照动物实验规定饲养动物, 将动物饲养于屏障系统内, 环境温度 20~24 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h/12 h 昼夜明暗交替。采用鼠全价饲料和灭菌水饲养, 实验大鼠自由饮水饮食。实验经成都中医药大学伦理委员会批准 (No.2021DL-013)。

2 试剂与药物 注射用环磷酰胺(江苏盛

迪, 批号: 16091325); 解脲支原体 (urea plasma urealyticum, UU) 培养基 (长沙迈克生物, 批号: P0701); UU 标准株 T960 (冻干品, 长沙迈克生物, 批号: H160212); 水合氯醛 (成都科龙, 批号: 2015050501); 4% 戊二醛 (源叶生物, 批号: R20516); 睾酮 (testosterone, T) 试剂盒 (北京百奥思科, 批号: 170226); 雌二醇 (estradiol, E_2) 试剂盒 (北京百奥思科, 批号: 170224); 卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 试剂盒 (北京百奥思科, 批号: 170228); 促黄体激素 (luteinizing hormone, LH) 试剂盒 (北京百奥思科, 批号: 170222); 促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 试剂盒 (北京百奥思科, 批号: 170225); Trizol (Invitrogen, 批号: 15596026); iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-rad, 批号: 1725035); SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad, 批号: 1725272); Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 2 兔抗大鼠多克隆抗体 (BeacomBio, 克隆号: B1011487); NF-KBp65 兔抗大鼠多克隆抗体 (BeacomBio, 克隆号: B1014429); TLR4 兔抗大鼠多克隆抗体 (武汉博士德, 克隆号: 11CM248); 髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MYD88) 兔抗大鼠多克隆抗体 (武汉博士德, 克隆号: 11P102); 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TNF

receptor associated factor 6, TRAF6) 兔抗大鼠多克隆抗体(武汉博士德, 克隆号: 13H144); 二抗羊抗兔(福州迈新生物, 批号: KIT-5006)。强精片(批号: 20160718), 由成都中医药大学附属医院提供, 规格: 100 片/瓶, 含生药 0.3 g/片, 其人用生药量为 4.5 g/天。0.9% 氯化钠注射液(批号: D150426021), 250 mL/瓶, 山东科伦药业有限公司。

3 仪器 电子天平, 型号 BSA124S 型, 德国赛多利斯公司; 高速冷冻离心机, 型号 H1850R, 长沙湘仪; 漩涡混匀器, 型号 XW-80A, 海门市其林贝尔公司; 组织破碎仪, 型号 Bioprep-6, 北京奥盛公司; 超声波细胞粉碎机, 型号 SCIENTZ-IIID, 宁波新芝公司; 荧光定量 PCR, 型号 CFX Connect, 美国 Bio-Rad; 摊片机, 型号 HI1210, 德国徕卡公司; 切片机, 型号 RM2245, 德国徕卡公司; 包埋机, 型号 EG1160, 德国徕卡公司; 光学显微镜, 型号 BX41TF, 日本 OLYMPUS; 透射电镜, 型号 JEM-100SX, 日本电子株式会社; 数码彩色精子质量检测系统, 型号 WLJY-9000, 北京韦力公司。

4 动物分组与给药 将 40 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为 5 组, 每组 8 只, 即空白对照组(NC 组)、UU 感染模型组(UU 组)、环磷酰胺模型组(CTX 组)、UU 感染模型+强精片治疗组(UU+QJT 组)、环磷酰胺模型+强精片治疗组(CTX+QJT 组)。参考文献[6], 解脲支原体感染诱导的大鼠少弱精子症模型制备取适应性饲养 3 天后的大鼠, 用 7% 的水合氯醛麻醉, 仰卧, 四肢固定于操作台之上。无菌打开腹腔, 充分暴露膀胱。向膀胱内注射 UU 培养液 1 mL, 从手术第 2 天开始, 采用 1 mL 无菌生理盐水腹腔注射, 每天 1 次, 连续 5 天。参考文献[7], 环磷酰胺诱导的大鼠少弱精子症模型制备手术方法同解脲支原体诱导的大鼠少弱精子症模型, 向膀胱内注射 1 mL 无菌生理盐水, 从手术第 2 天开始, 采用 1% 环磷酰胺 30 mg/kg 腹腔注射, 每天 1 次, 连续 5 天。NC 组采用手术向膀胱内注射 1 mL 无菌生理盐水, 第 2 天开始采用 1 mL 无菌生理盐水腹腔注射, 每天 1 次, 连续 5 天。造模后 NC 组、UU 组、CTX 组给予生理盐水(每天 10 mL/kg)灌胃, UU+QJT 组、CTX+QJT 组大鼠按照人用生药量 4.5 g/天, 按照表面积换算给予成人临床等效剂量的强精片 0.45 g/(kg·d)灌胃干预^[8], 连续给药 4 周。

5 检测指标及方法

5.1 一般状态观察 每日观察动物的一般状态、行为和体征。

5.2 精液分析 用取大鼠右侧附睾, 置于水浴箱中预温的 Hams F10 培养液中剪碎, 37 °C 温育 30 min, 待附睾精子充分游离后, 使用数码彩色精子质量检测系统检测精子活力以及精子数量。

5.3 血清性激素测定 大鼠腹主动脉采血后, 离心分离血清, 采用 ELISA 法检测。首先用一株单抗包被微孔板, 制备成固相抗体, 然后加入待测标本及辣根过氧化物酶标记的另一株单抗, 使之形成包被抗体-检测的激素-酶标记抗体的复合物。经显色后在酶标仪测定吸光值(OD 值), 通过计算机拟合浓度-吸光度曲线, 反算出待测标本中 T、E₂、FSH、LH 激素水平。

5.4 HE 染色观察附睾及睾丸结构 采用 10% 中性甲醛固定的左侧附睾及睾丸按常规方法脱水、包埋、石蜡切片机连续切片, 片厚 4 μm, 42 °C 水浴裱片, HE 常规染色, 光镜下观察比较附睾及睾丸组织结构。

5.5 免疫组化检测睾丸组织 TLR4、MYD88、TRAF6 蛋白表达 取下 SD 大鼠睾丸, 放入 10% 甲醛溶液固定 48 h 后, 取相同部位的睾丸组织逐级酒精脱水、浸蜡、石蜡包埋, 切片 4 μm, 行 TLR4、MYD88、TRAF6 免疫组化 SP 法染色。

5.6 RT-PCR 检测睾丸组织 TLR4、MYD88、TRAF6 mRNA 表达 将 100 mg 睾丸组织加入 1 mL TRIzol 置匀浆器中, 氯仿-异丙醇法提取总 RNA。经紫外分光光度计定量后, 取 1 μg RNA, 20 μL 逆转录体系合成 cDNA, 然后用 SYBR Green I 荧光染料行实时定量 PCR 反应。引物设计: 内参 GAPDH: 5'-CAAGTTC AACGGC ACAGTCAAG-3' (上游), 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3' (下游), 92 bp; TLR4: 5'-TACAGTTCGTCATGCTTTCTC-3' (上游), 5'-ATTAGGAAGTACCTCTATGCAG-3' (下游), 145 bp; MYD88: 5'-AACAGACAGACTATCGGCTTA-3' (上游), 5'-GTTGGACACCTGGAGACA-3' (下游), 158 bp; TRAF6: 5'-CCTGTGGTCATTCATAGC-3' (上游), 5'-ATCGTGAGGCGTATTGTA-3' (下游), 160 bp。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计分析软件, 定量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般状态观察 与 NC 组比较,

CTX、UU 组的大鼠均出现体重减少、精神萎靡、活动减少、恶寒、体毛稀疏、无光泽、小便量增多等症状和体征。CTX+QJT 组及 UU+QJT 组亦出现上述体征，但随着治疗进程较 CTX 组及 UU 组逐渐减轻。

2 各组大鼠精液质量比较 (表 1) 与 NC 组比较, UU 组、CTX 组精子密度、A+B 级精子活动率、A+B+C 级精子活动率降低 ($P<0.05$)。分别与 UU 组和 CTX 组比较, UU+QJT 组和 CTX+QJT 组精子密度、A+B 级精子活动率、A+B+C 级精子活动率升高 ($P<0.05$)。

3 各组大鼠血清性激素水平比较 (表 2) 与 NC 组比较, UU、CTX 组大鼠 FSH、 E_2 水平升高 ($P<0.05$), LH、T 水平降低 ($P<0.05$)。与 UU 组和 CTX 组比较, UU+QJT 组和 CTX+QJT 组 LH、T 水平升高, FSH、 E_2 水平降低 ($P<0.05$)。

4 各组大鼠附睾及睾丸形态比较 (图 1、2) 各组大鼠睾丸从外观形态无明显区别。睾丸 HE 染色显示 UU 组、CTX 组大鼠睾丸管壁可见生精细胞不同程度减少, 管壁有不同程度凹陷伴厚薄不均, 管腔内精子减少, 睾丸间质内间质细胞减少、呈小团状分布, 胞浆内可见明显小圆形或大圆形脂质空泡。UU+QJT 组和 CTX+QJT 组大鼠睾丸组织形态优于 UU 组、CTX 组大鼠, 管腔恢复, 精子数量增多, 但与 NC 组的大鼠比较, 它们的结构尚未完全恢复。附睾 HE 染色显示 UU 组、CTX 组大鼠管壁不同程度变薄, 细胞呈柱状, 部分呈立方状, 管腔内有精子数量不同程度减少, 有较多非精子细胞成分。UU+QJT 组和 CTX+QJT 组大鼠附睾组织形态优于 UU 组、CTX

组大鼠, 精子数量更高。

5 各组睾丸组织 TLR4、MYD88、TRAF6 蛋白表达比较 (图 3、4) NC 组大鼠睾丸 TLR4、MYD88 表达较少, 阳性染色浅, TRAF6 表达较多, 阳性染色较深; 与 NC 组比较, UU 组、CTX 组大鼠睾丸 TLR4、MYD88 表达增多, TRAF6 表达减少; 与 UU 组和 CTX 组比较, UU+QJT 组和 CTX+QJT 组睾丸组织 TLR4、MYD88 表达减少, TRAF6 表达增多。

6 各组大鼠睾丸组织 TLR4、MYD88、TRAF6 mRNA 表达比较 (表 3) 与 NC 比较, UU 组、CTX 组 TLR4、MYD88 mRNA 表达增加, TRAF6 mRNA 表达下降 ($P<0.05$); 与 UU 组和 CTX 组比较, UU+QJT 组和 CTX+QJT 组 TLR4、MYD88 mRNA 表达下降, TRAF6 mRNA 表达增加 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠 TLR4、MYD88、TRAF6 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4	MYD88	TRAF6
NC	8	0.44 ± 0.02	0.65 ± 0.03	1.23 ± 0.02
UU	8	0.91 ± 0.03*	1.12 ± 0.05*	0.41 ± 0.04*
CTX	8	0.95 ± 0.04*	1.05 ± 0.04	0.51 ± 0.02*
UU+QJT	8	0.61 ± 0.04 [△]	0.76 ± 0.07 [△]	0.91 ± 0.07 [△]
CTX+QJT	8	0.58 ± 0.06 [▲]	0.83 ± 0.06 [▲]	1.43 ± 0.11 [▲]

注: 与 NC 组比较, * $P<0.05$; 与 UU 组比较, [△] $P<0.05$; 与 CTX 比较, [▲] $P<0.05$

讨 论

男性不育患者一般病程较长, 其疾病特点符合中医的“久病入络”机制, 以肾虚血瘀为病机, 又

表 1 各组精液质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

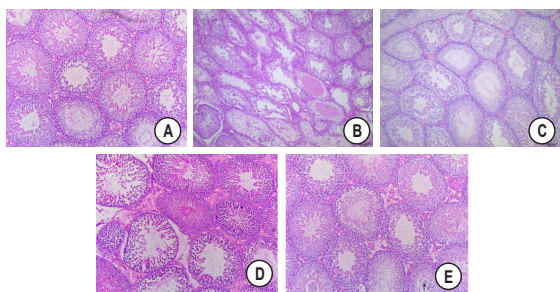
组别	n	精子密度 ($\times 10^6/mL$)	A+B 级精子 (%)	A+B+C 级精子 (%)
NC	8	80.00 ± 38.83	32.14 ± 9.57	55.26 ± 8.32
UU	8	57.00 ± 64.63*	25.98 ± 18.31*	44.18 ± 24.65*
CTX	8	59.86 ± 36.43*	26.27 ± 12.79*	48.66 ± 17.82*
UU+QJT	8	141.88 ± 34.53 [△]	34.62 ± 7.66 [△]	55.26 ± 11.10 [△]
CTX+QJT	8	160.86 ± 59.43 [▲]	33.14 ± 7.98 [▲]	55.84 ± 11.56 [▲]

注: 与 NC 组比较, * $P<0.05$; 与 UU 组比较, [△] $P<0.05$; 与 CTX 比较, [▲] $P<0.05$

表 2 各组大鼠血清激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

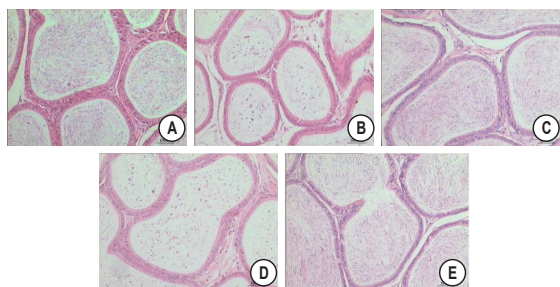
组别	n	E_2 (pg/mL)	T (ng/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)
NC	8	19.50 ± 3.34	31.31 ± 0.40	16.66 ± 3.69	30.68 ± 0.087
UU	8	33.15 ± 2.28*	21.02 ± 0.21*	30.18 ± 2.14*	21.89 ± 0.12*
CTX	8	34.16 ± 3.89*	21.41 ± 0.40*	33.18 ± 3.25*	20.76 ± 0.18*
UU+QJT	8	18.31 ± 2.27 [△]	29.97 ± 0.20 [△]	15.90 ± 1.11 [△]	26.87 ± 0.15 [△]
CTX+QJT	8	19.94 ± 2.68 [▲]	28.05 ± 0.28 [▲]	13.07 ± 2.88 [▲]	27.91 ± 0.10 [▲]

注: 与 NC 组比较, * $P<0.05$; 与 UU 组比较, [△] $P<0.05$; 与 CTX 组比较, [▲] $P<0.05$



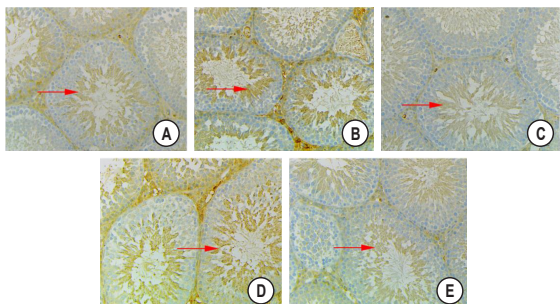
注: A 为 NC 组; B 为 UU 组; C 为 CTX 组; D 为 UU+QJP 组; E 为 CTX+QJP 组

图 1 各组大鼠睾丸 HE 染色结果比较 (HE, $\times 100$)



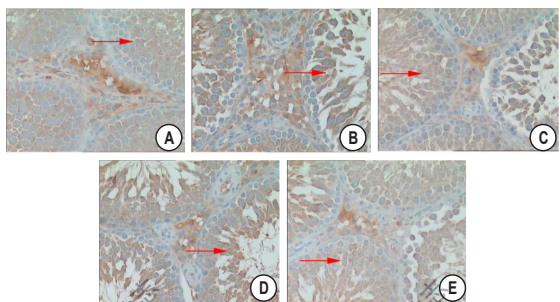
注: A 为 NC 组; B 为 UU 组; C 为 CTX 组; D 为 UU+QJT 组; E 为 CTX+QJT 组

图 2 各组大鼠附睾 HE 染色结果比较 (HE, $\times 100$)



注: A 为 NC 组; B 为 UU 组; C 为 CTX 组; D 为 UU+QJT 组; E 为 CTX+QJT 组; 红色箭头所指为 TLR4 在组织中阳性表达

图 3 强精片对少弱精子症大鼠睾丸组织 TLR4 表达的影响 (SP, $\times 400$)



注: A 为 NC 组; B 为 UU 组; C 为 CTX 组; D 为 UU+QJT 组; E 为 CTX+QJT 组; 红色箭头所指为 MYD88 在组织中阳性表达

图 4 强精片对少弱精子症大鼠睾丸组织 MYD88 表达的影响 (SP, $\times 400$)

因“精血同源”，血瘀则精涩^[9]。现代研究也发现由于各因素炎症因子堆积于睾丸局部会形成炎症微环境，从而破坏血睾屏障，影响生精细胞的新陈代谢，导致“精道络脉受损、气血流通障碍”的现象^[10]。强精片（由人参、当归、枸杞子、大菟丝子、车前子、淫羊藿、仙茅、益母草组成）具有补肾强精、活血化瘀的功效，作为院内制剂已应用 15 年余。方中人参、当归气血双补，“精血同源”，气血旺盛则肾精得充，共为君药。枸杞子、菟丝子补肝肾，滋阴助阳益精，乃平补之品，与甘温补阳之仙茅、淫羊藿配伍，有补肾益精而无助热之虞。以上诸药合而为臣。益母草活血化瘀，与车前子配伍更具利水渗湿、泄肾中虚火之功，且可制约方中温热之患为佐。前期临床研究显示强精片可提高精子密度、活力及活率，降低精子畸形率和精子头部畸形率的百分比^[4]。基础研究表明强精片可抑制凋亡基因 FasL 的过度表达^[11]，降低睾丸内 FasL、雄激素结合蛋白（androgen binding protein, ABP）表达量，提高 Occludin 蛋白表达^[12]，也能提高大鼠动力蛋白重链 7、血清微管蛋白表达^[13]，增加精液中转化生长因子- $\beta 1$ （transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$ ）的表达量、降低睾丸中波形蛋白的表达量^[14]，增加血清 T 水平^[15]，进而改善精液质量。

解脲支原体属于条件致病微生物，可黏附在泌尿生殖道的黏膜及上皮细胞上，引起泌尿生殖道感染，并可从多方面影响男性生育能力，如通过干扰精子发生、影响精子代谢、影响精卵结合及生殖道局部免疫等机制，是临床常见的少弱精子症的诱因^[16-18]。环磷酰胺是一种细胞毒烷化剂药物，它可以导致血清中睾酮水平降低、精子参数劣化、诱导氧化应激等一系列病理变化^[19, 20]，常用于少弱精子症动物的造模。本实验通过对精子质量的分析可知：UU 组及 CTX 组大鼠附睾中的精子密度、A 级精子数目及 A + B 级精子数目均低于 NC 组。这说明解脲支原体及环磷酰胺诱导的两种少弱精子症大鼠均造模成功。强精片干预后，大鼠的精子密度、A 级精子数目及 A + B 级精子数目均高于 UU 组及 CTX 组。由此证实了在两种不同的少弱精子症模型中，强精片对少弱精子症的生精功能均具有保护作用。

性腺及性器官的发育维持着雄性第二性征，也是性功能正常的表现。睾丸、附睾是重要的性器官，如果其萎缩或重量减轻，内部结构破坏，那么它们所分泌的激素则相应减少，从而可导致性功能的异常^[21, 22]。本研究表明，与 NC 组比较，用解脲支原

体及环磷酸腺苷造模的大鼠睾丸、附睾的脏器系数下降明显, 内部结构明显破坏。与 UU 及 CTX 组比较, 强精片干预后附睾、睾丸脏器系数上升, 内部结构得到恢复, 说明强精片对模型大鼠生殖系统的脏器组织有一定的保护作用。FSH、E₂ 的升高通常提示睾丸生精功能的受损^[23], 因此两个模型组均表现出这一改变, 而强精片干预组生精功能有所恢复, 其 FSH、E₂ 水平也有所下降, 间接反映出其对生精损伤的保护作用。本实验中两个模型组均出现 LH、T 水平同时下降的情况, 无法单从睾丸组织损伤进行解释, 推测可能是 E₂ 水平升高后抑制了 LH 的分泌, 加上睾丸间质受损, 最终导致 T 水平的低下。强精片干预组中, E₂ 水平下降, 睾丸间质形态也有所恢复, 因此 LH、T 两者均有所恢复。

本研究显示, UU 组及 CTX 组发生了 TLRs 通路相关指标的变化, 炎性相关因子参与了生精微环境的调节, 能够促进精子的形成并维持生精细胞的存活, 睾丸支持细胞表达 TLRs 可能是炎症反应直接调节精子发生的机制^[9]。而与此同时炎症反应还参与了睾丸性不育的发病过程, 破损的生精细胞能够通过支持细胞相关 TLRs 通路诱发炎症反应, 使得生精细胞二次损伤, 加重睾丸生精障碍。TLR4 是引起一系列免疫反应的关键, 限制细胞对 TLR4 的表达是限制过度免疫反应的最直接的有效方法^[24, 25]。MYD88 是 TLR4 通路中下游主要的接头蛋白, 在体内其他炎症通路中, 也起着重要作用^[26, 27]。TRAF 的活化会促进 NF- κ B 转录因子的激活和炎症细胞因子的产生^[28]。TLR 通过 TRAF6 所介导的免疫炎症反应的正确调控对机体抵抗病原体入侵以及自身稳态的维持具有重要的意义^[29, 30]。免疫组化及 RT-PCR 的结果显示强精片可下调因解脲支原体及环磷酸腺苷造模升高的大鼠睾丸中 TLR4、MYD88 表达, 并上调因造模降低的 TRAF6 表达, 说明强精片能通过调节 Toll 样信号通路上的关键靶点 TLR4、MYD88、TRAF6 减轻睾丸炎症反应, 保护大鼠生殖功能。

本研究的结果表明, Toll 样信号通路的异常可引起睾丸生精功能的损伤, 从而导致少弱精子症的发生, 中药强精片干预后可减轻这种损伤并恢复生精功能。

利益冲突: 作者申明该研究无利益冲突。

参 考 文 献

[1] 路兴军, 李晓东, 孙立宁, 等. 男性不育症病因研究

进展[J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29(4): 399-401.

[2] Bracke A, Peeters K, Punjabi U, et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2018, 36(3): 327-339.

[3] 张太君. 增精颗粒防治大鼠睾丸生精障碍的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2001.

[4] 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.

[5] 魏明, 甘露, 肖小敏. Toll 样受体与不孕不育的相关性研究进展[J]. 西部医学, 2012, 24(8): 1641-1642, 1644.

[6] 王喆, 陆承荣, 罗渊, 等. 解脲支原体大鼠感染模型的建立[J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 74-75.

[7] 孙向红, 王麟, 孙立波, 等. 促育生精颗粒对环磷酸腺苷致少弱精症模型大鼠的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(20): 1663-1667.

[8] 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.

[9] 阮金玉. 从络论治男科病[J]. 四川中医, 2011, 29(11): 64-66.

[10] 玉丽丽, 李翠玲, 章慧平. 睾丸免疫调控机制的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(5): 456-459.

[11] 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.

[12] 尤耀东, 陈帝昂, 张培海, 等. 强精片对不育大鼠睾丸内 FasL、ABP 及 Occludin 蛋白表达影响的实验研究[J]. 中国男科学杂志, 2015, 29(11): 13-18.

[13] 张培海, 李广森, 常德贵, 等. 强精片对弱精子症大鼠精子鞭毛结构蛋白的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(7): 924-926.

[14] 李广森, 张培海, 蔡剑, 等. 强精片对弱精子症 SD 大鼠 MAPK 通路的影响研究[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(5): 436-441.

[15] 曲晓伟, 陈帝昂, 李广森, 等. 强精片对雷公藤所致不育症大鼠精液质量的影响及机制[J]. 山东医药, 2017, 57(20): 28-31.

[16] Stojanov M, Baud D, Greub G, et al. Male infertility: the intracellular bacterial hypothesis[J]. New Microbes New Infect, 2018, 26: 37-41.

- [17] Huang C, Long X, Jing S, et al. *Ureaplasma urealyticum* and *mycoplasma hominis* infections and semen quality in 19, 098 infertile men in China[J]. *World J Urol*, 2016, 34 (7): 1039-1044.
- [18] 刘伯龙, 王娟花, 唐正, 等. 解脲支原体感染对不育男性精液质量及生育能力的影响 [J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44 (4): 421-424.
- [19] Ghobadi E, Moloudizargari M, Asghari MH, et al. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, 13 (5): 525-536.
- [20] 罗文海. 环磷酰胺对大鼠生殖功能影响 [J]. 医学理论与实践, 2011, 24 (6): 621-623.
- [21] 王琳. Ghrelin 对大鼠下丘脑—垂体—性腺的影响及其机理研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [22] 孙小娜, 李晓彩, 马爱团, 等. 双酚 A 对雄性小鼠睾丸发育和生殖激素分泌水平的影响 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40 (9): 949-952.
- [23] 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.
- [24] 张晓艳. Toll 样受体在小鼠受损生精细胞诱导睾丸炎症反应中的功能 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [25] 闫克芹, 韩代书. TOLL 样受体在睾丸炎症反应与精子发生中的功能 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21 (1): 101-106.
- [26] Bhushan S, Tchatalbachev S, Klug J, et al. *Uropathogenic escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells[J]. *J Immunol*, 2008, 180 (8): 5537-5547.
- [27] Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, et al. High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: immunohistochemical and genetic analyses[J]. *Pathol Int*, 2015, 65 (10): 528-535.
- [28] Bhushan S, Meinhardt A. The macrophages in testis function[J]. *J Reprod Immunol*, 2017, 119: 107-112.
- [29] Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity[J]. *Trends Immunol*, 2006, 27 (8): 352-357.
- [30] Hedger MP. Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation--a perspective[J]. *J Reprod Immunol*, 2011, 88 (2): 130-141.

(收稿: 2020-07-01 在线: 2021-10-09)

责任编辑: 邱 禹

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》及 *Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

