

· 基础研究 ·

益脾补肾方改善肥胖 2 型糖尿病小鼠
生精功能障碍作用及机制王强强^{1, 2} 于普光^{1, 3} 彭庆杰¹ 任 帅^{1, 3} 王春红^{1, 2} 苏亚珊¹ 梁晓霞^{1, 2}
孙 苗¹ 陈小江¹ 杜小利² 李广永³ 何 瑞^{1, 2}

摘要 **目的** 观察益脾补肾方改善肥胖 2 型糖尿病小鼠生精功能障碍的作用,并探讨其作用机制。**方法** 将 30 只 4 周龄健康 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、模型组、益脾补肾方低剂量组(低剂量组)、益脾补肾方高剂量组(高剂量组)、二甲双胍组,每组 6 只。对照组给予普通饲料,其余各组给予高脂饲料喂养 16 周,建立肥胖 2 型糖尿病小鼠模型。低、高剂量组给予益脾补肾方 2、4 g/(kg·d),二甲双胍组给予二甲双胍 200 mg/(kg·d)灌胃,模型组和对照组灌胃等量的生理盐水,连续灌胃 30 天。干预前后进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)和胰岛素耐量试验(ITT),计算曲线下面积(AUC);观察睾丸形态,测量小鼠重量并计算睾丸脏体比;HE 染色观察睾丸形态变化;检测精子参数以及空腹血糖(FBG);ELISA 法检测血清中睾酮(T)水平;比色法检测血清中总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的变化;Western Blot 检测脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)表达。**结果** 对照组小鼠睾丸组织结构清晰,生精小管内各级生精细胞排列整齐;模型组小鼠睾丸组织结构混乱,各级生精细胞排列混乱,且数量显著减少,腔内出现大面积空洞;干预组出现不同程度改善。与对照组比较,模型组体重、体重 AUC、FBG、OGTT-AUC、ITT-AUC、精子畸形率、血清 MDA 水平增加($P<0.05$, $P<0.01$),睾丸系数、附睾系数、精囊腺系数、精子数量、精子活力、精子活率、血清 T、血清 T-SOD、GSH-Px 水平、睾丸 PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达降低($P<0.05$)。与模型组同期比较,干预组体重 AUC、体重、OGTT-AUC、ITT-AUC、精子畸形率、血清 MDA 水平下降($P<0.05$, $P<0.01$),睾丸系数、附睾系数、精囊腺系数、精子数量、精子活力、血清 T-SOD、GSH-Px 水平、睾丸 Bcl-2 蛋白表达增加($P<0.05$);二甲双胍组精子活率、血清 T、睾丸 PI3K 表达增加($P<0.05$);低剂量组睾丸 p-Akt 蛋白表达升高($P<0.05$);高剂量组精子活率、血清 T、睾丸 PI3K、p-Akt 蛋白增加($P<0.05$)。与二甲双胍组同期比较,低剂量组干预后体重 AUC、体重增加($P<0.05$);高剂量组干预后体重 AUC、精子活力、血清 T 增加($P<0.05$),ITT-AUC 降低($P<0.05$)。**结论** 益脾补肾方可能通过调节 PI3K/Akt/Bcl-2 通路调节糖代谢来改善肥胖 2 型糖尿病小鼠生精功能。

关键词 2 型糖尿病;生精功能障碍;精液参数;睾丸功能;益脾补肾方;中药

Effect and Mechanism of Yipi Bushen Formula in Improving Spermatogenesis Dysfunction in Obese Type 2 Diabetes Mice

WANG Qiang-qiang^{1, 2}, YU Pu-guang^{1, 3}, PENG Qing-jie¹, REN Shuai^{1, 3}, WANG Chun-hong^{1, 2}, SU Ya-shan¹, LIANG Xiao-xia^{1, 2}, SUN Miao¹, CHEN Xiao-jiang¹, DU Xiao-li², LI Guang-yong³, and HE Rui^{1, 2} 1 Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan (750004); 2 Key Laboratory of Ningxia Minority Medicine Modernization Ministry of Education, Yinchuan (750004); 3 Department of Urology, General

基金项目:宁夏重点研发计划项目(No.2020BFG02010);宁夏自然科学基金资助项目(No.2022AAC02033);国家自然科学基金资助项目(No.82201000);宁夏科技创新领军人才培养项目(No.2020GKLRX11);宁夏医科大学校级科研项目(No.XT2019017)

作者单位:1.宁夏医科大学基础医学院生育力保持教育部重点实验室(银川 750004);2.宁夏医科大学中医学院宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室(银川 750004);3.宁夏医科大学总医院泌尿外科(银川 750004)

通讯作者:何 瑞, Tel: 0951-6980172, E-mail: ruihe515@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20230227.102

Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan (750004)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Yipi Bushen Formula (YBF) on improving the spermatogenic dysfunction in obese type 2 diabetic mice, and explore its mechanism. **Methods** Totally 30 healthy 4-week-old C57BL/6J male mice were randomly divided into 5 groups, control group, model group, low-dose YBF group, high-dose YBF group, and metformin group, 6 mice in each group. The control group was given normal feed, and the other groups were fed high-fat feed for 16 weeks to establish obese type 2 diabetic mouse model. The low-dose and high-dose YBF group were given YBF 2 and 4 g · kg⁻¹ · d⁻¹, respectively, the metformin group was given metformin 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ by gavage, the model and control group were given the same amount of normal saline by gavage for 30 consecutive days. Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed before and after intervention, and the area under the curve (AUC) was calculated. Testicular morphology was observed, mouse weight and testis visceral ratio were measured. Testicular morphology was observed by HE staining. Sperm parameters and fasting blood glucose (FBG) were detected. ELISA was used to detect serum testosterone (T) level. Colorimetry was used to detect serum total superoxide dismutase (T-SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-Px) level. Western Blot was used to detect the expression of phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K), protein kinase B (Akt), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). **Results** The testicular tissue structure of the control group mice was clear, with orderly arranged germ cells at all levels in the seminiferous tubules, while the testicular tissue structure of the model group mice was chaotic, with disordered arrangement of germ cells at all levels with significantly reduced in number, and large areas of cavities appearing in the tubules. The intervention group showed varying degrees of improvement. Compared with the control group, body weight, body weight AUC, FBG, OGTT-AUC, ITT-AUC, sperm deformity rate, and serum MDA level increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the testicular coefficient, epididymal coefficient, seminal vesicle coefficient, sperm count, sperm motility, sperm viability, serum T, T-SOD, GSH-Px level, and testicular PI3K, p-Akt, and Bcl-2 protein expression decreased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group at the same time, body weight AUC, body weight, OGTT-AUC, ITT-AUC, sperm deformity rate, and serum MDA level decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), testicular coefficient, epididymal coefficient, seminal vesicle coefficient, sperm count, sperm motility, serum T-SOD, GSH-Px level, and testicular Bcl-2 protein expression increased in intervention groups after intervention ($P < 0.05$). Sperm viability, serum T, and testicular PI3K expression increased in metformin group ($P < 0.05$). Testicular p-Akt protein expression increased in low-dose YBF group ($P < 0.05$). Sperm viability, serum T, testicular PI3K, and p-Akt protein expression increased in high-dose YBF group ($P < 0.05$). Compared with the metformin group at the same time, body weight AUC and body weight increased in low-dose YBF group after intervention ($P < 0.05$). Body weight AUC, sperm motility, and serum T increased ($P < 0.05$), ITT-AUC decreased in high-dose YBF group after intervention ($P < 0.05$). **Conclusion** YBF may improve the reproductive function of obese type 2 diabetic mice by regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 pathway to adjust glucose metabolism.

KEYWORDS type 2 diabetes; spermatogenic dysfunction; semen parameters; testicular function; Yipi Bushen Formula; Chinese herbal medicine

糖尿病是常见慢性疾病之一^[1], 据国际糖尿病联盟统计结果显示 2021 年全球糖尿病患者约为 5.37 亿, 我国是世界上糖尿病患者最多的国家, 其中 90% 为 2 型糖尿病^[2, 3]。生精功能障碍主要表现为精子数量、精子活力和精子形态异常^[4]。研究表明肥胖 2 型糖尿病可导致精子质量异常^[5], 有 50% 以上的糖尿病患者有不同程度的不育^[6], 少弱精症患者约占男性不育人群的 75%^[7]。目前肥胖 2 型糖尿病的干预目标是以患者为中心, 在优化安全性和预防并发症的同时实现个性化诊疗^[8]。肥胖 2 型糖尿病生精功能障碍尚缺乏有效的干预手段, 研究证实中医药具有一定疗效^[9]。益

脾补肾方是根据于清莲教授临床经验方, 由党参、黄芪为君, 山药、白术、芡实为臣, 佐以当归、肉桂组成, 临床应用干预肥胖 2 型糖尿病生精功能障碍患者疗效显著, 但具体作用机制尚不明确。本文观察益脾补肾方对肥胖 2 型糖尿病小鼠血糖、睾丸形态、精液常规的作用, 为临床应用提供理论依据和参考。

材料与方法

1 动物 4 周龄 SPF 级 C57 BL/6J 雄性小鼠 30 只, 体重 (20 ± 2) g, 由宁夏医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号 (No.10752309202100163),

饲养于宁夏医科大学实验动物中心 SPF 实验室, 温度 22~23℃, 湿度 50%~60%, 12 h 昼夜交替, 自由摄食饮水, 环境安静, 实验室环境符合清洁级动物饲养条件。本研究方案通过宁夏医科大学实验动物福利伦理委员会审批 (No.IACUC-NYLAC-2021-040)。

2 药物 益脾补肾方由党参 (批号: 2009008C)、黄芪 (批号: 2106020C)、山药 (批号: 2011001S)、白术 (批号: 2011002C)、芡实 (批号: 2008002S)、当归 (批号: 2008013S)、肉桂 (批号: 2010001S) 等以 4: 3: 4: 2: 1: 6: 3 比例组成, 采用免煎颗粒剂均购自宁夏医科大学总医院。高脂饲料购于美国 Research Diets 公司, 批号: D12492。盐酸二甲双胍片 (中美上海施贵宝制药有限公司, 规格 0.5 g/片, 批号: ACC8550)。

3 试剂与仪器 磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K, 批号: #4249)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt, 批号: #4685)、磷酸化蛋白激酶 (phosphorylated Akt protein, p-Akt, 批号: #4060) 抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; β -肌动蛋白 (β -actin, 批号: sc-47778) 购于美国 SANTA CRUZ 公司; B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 购于中国万类生物公司; 睾酮 (testosterone, T, 批号: qXdjVg8HJH)、总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD, 批号: 6LWUIDU944)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA, 批号: 58X7HGT8L9)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px, 批号: IP95ZH-VZ22) 试剂盒均购自于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。涡旋振荡器 (华利达实验设备有限公司, WH-861); 冷冻型小型高速离心机 (Eppendorf 中国有限公司, 5417R); 超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司, UPR-II-5/10T); ChemiDoc XRS+ 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司, XRS+ 1708265)。

4 动物分组、造模及干预 30 只小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、益脾补肾方高剂量组 (高剂量组)、益脾补肾方低剂量组 (低剂量组)、二甲双胍组, 每组 6 只。适应性饲养 1 周后, 对照组给予普通饲料; 其余各组给予 60% 高脂饲料喂养 16 周, 期间每 7 天记录 1 次体重, 建立肥胖 2 型糖尿病小鼠生精功能障碍模型^[4, 10]。模型组小鼠体重显著增加, 随机血糖 >11.1 mmol/L, OGTT 和 ITT 检测血糖显著高于对照组, 精子数量、精子活力、精子活率显著的低于对照组, 精子畸形率显著高于对照组, 确定模型构建成功^[4, 10], 模型组及干预组小鼠

均造模成功, 死亡 0 只。造模后, 各组给予相应干预。根据人和小鼠按体表面积折算的等效剂量^[11]比值计算: 益脾补肾方等效剂量为 2 g/(kg·d), 结合预实验结果将益脾补肾方等效剂量 2 g/(kg·d) 设为低剂量, 将 4 g/(kg·d) 作为高剂量。益脾补肾方按照含药量将其制成浓度为 1 g/mL 混悬液, 低剂量组每只小鼠灌胃 100 μ L 混悬液, 高剂量组每只灌胃 200 μ L 混悬液, 现用现配。二甲双胍每片 0.5 g, 充分研磨后, 溶解在 5 mL 0.9% NaCl 溶液, 制成混悬液, 每只小鼠灌胃 100 μ L, 现用现配, 二甲双胍组给予二甲双胍 200 mg/(kg·d)。对照组和模型组给予等量的生理盐水。连续干预 30 天。

5 测量体重 分别于干预前、后测量各组小鼠体重, 并计算曲线下面积 (area under the curve, AUC)。

6 口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 和胰岛素抵抗试验 (insulin tolerance test, ITT) 参考文献 [12]。干预前后检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)。在干预第 27 天 18:00 禁食 (不禁水), 第 28 天称量体重后计算每只小鼠所需葡萄糖灌胃量 (3 g/kg), 9:00 开始进行 OGTT 实验, 测完初始血糖后, 分别给小鼠灌胃葡萄糖后, 检测 15、30、60、120 min 时血糖, 使用 10 cm 眼科剪刀截取小鼠尾静脉末梢 (约 0.5 mm 长度) 取血, 每次一滴, 35 μ L 左右, 用进口罗氏卓越金彩血糖仪和罗氏血糖试纸进行血糖检测, 并做记录。干预第 29 天 6:00 禁食, 称量体重后分别计算每只小鼠所需胰岛素注射量。5 h 后进行 ITT 实验, 测完初始血糖后, 将所需胰岛素 (1 IU/kg) 腹腔注射, 分别检测注射胰岛素后 15、30、60、120 min 时血糖, 余实验方法同 OGTT。计算 AUC。

7 精子参数分析、脏器指数计算及血清 T 测量^[4, 13, 14] 干预第 30 天, 腹腔注射戊巴比妥麻醉小鼠, 打开胸腔, 进行心脏取血, 而后立即开腹剥离脂肪组织, 依次迅速取出睾丸、附睾、精囊腺, 快速将一侧附睾尾称重后置于装有 500 μ L 灭菌生理盐水 (37℃ 预热) 的 12 孔板中, 将组织充分剪碎, 摇匀, 放入 37℃ 恒温箱孵育 10 min 后, 用 200 目筛过滤, 1.5 mL 离心管收集滤液, 勿冲洗。取 20 μ L 滤液于细胞计数板上, 在 $\times 400$ 光镜下统计细胞计数板四大格精子数量, 计算单位重量附睾尾精子数, 再根据附睾重量, 计算附睾平均精子数量。采用半定量法评价精子活力, 每个样本取 20 μ L 滤液, 分别在 $\times 400$ 光镜视野下观察 200 个精子的游动状态, 计算精子活力比例。取 20 μ L 滤液和等体积尹红苯胺黑染液

(1.67% 伊红, 10% 苯胺黑) 混匀, 室温孵育 2 min, 在 $\times 400$ 光镜下观察约 200 个精子 (死精子被染成粉色, 活精子不能着色), 计算精子活率 (%) = 活精子数 / 观察精子数目 $\times 100\%$ 。精子畸形可分为双头、香蕉、无钩等。在滤液中加入适量 Diff-Quick 溶液, 在 $\times 400$ 光镜下观察约 200 个精子, 统计畸形率, 精子畸形率 (%) = 畸形精子数 / 观察精子数 $\times 100\%$ 。脏器比: 睾丸 / 附睾 / 精囊腺系数 = (睾丸 / 附睾 / 精囊腺重量) / 体重 $\times 100\%$ 。ELISA 法检测血清中 T 的水平, 根据说明书操作。

8 血清 T-SOD、MDA、GSH-Px、T 水平检测 比色法检测血清中 T-SOD、MDA、GSH-Px、T 的水平, 根据说明书操作。

9 Western Blot 检测睾丸中 PI3K、p-Akt、Bcl-2 表达 取睾丸组织 30 mg, 根据试剂盒说明书提取睾丸组织蛋白, 测定蛋白含量后, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (120 V, 28 mA) 1.5 h, 转膜 70 min, 5% BSA 封闭 1.5 h, 分别加入 PI3K、Akt、p-Akt、 β -actin、Bcl-2 一抗 (浓度均为 1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 次日, 用 0.5% TBST 洗膜, 滴加二抗 (鼠抗 1:4 000, 兔抗: 1:2 000) 后室温孵育 1.5 h, 洗膜, X 片机显影, 用 Image J 软件统计分析目的蛋白灰度值。

10 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.4 统计软件进行分析, 实验结果计数资料以率 / 百分比 (%) 表示, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若满足正态分布和方差齐性的多组间两两比较采用单因素方差分析, 不满足, 则采用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠干预前后体重 AUC 和体重比较 (表 1) 与对照组比较, 模型组体重、体重 AUC 增加 ($P < 0.01$)。与模型组同期比较, 干预组干预后体重 AUC 及体重下降 ($P < 0.01$)。与二甲双胍组同期比较, 高剂量组干预后体重 AUC 增加 ($P < 0.05$), 低剂量组干预后体重 AUC 及体重增加 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠体重 AUC 和体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

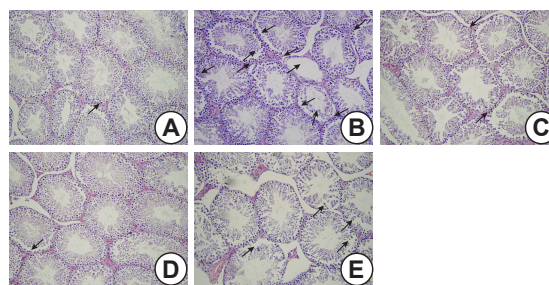
组别	n	干预前体重 AUC	干预后体重 AUC	干预后体重 (g)
对照	6	31.5 $\pm$ 2.2	1 027.0 $\pm$ 13.4	31.3 $\pm$ 1.5
模型	6	51.7 $\pm$ 2.0*	1 629.0 $\pm$ 9.2*	57.4 $\pm$ 2.5*
二甲双胍	6	50.2 $\pm$ 4.1	1 243.0 $\pm$ 12.0 $^{\Delta}$	37.9 $\pm$ 2.2 $^{\Delta}$
高剂量	6	53.7 $\pm$ 2.3	1 335.0 $\pm$ 11.5 $^{\Delta\Delta}$	41.5 $\pm$ 1.4 $^{\Delta}$
低剂量	6	50.7 $\pm$ 2.7	1 343.0 $\pm$ 21.9 $^{\Delta\Delta}$	42.4 $\pm$ 1.5 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

2 各组小鼠干预前、后血糖比较 (表 2) 与对照比较, 模型组干预前、后 FBG 及 OGTT-AUC、ITT-AUC 增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 干预组 OGTT-AUC、ITT-AUC 降低 ($P < 0.05$), 二甲双胍和高剂量组干预后 FBG 下降。与二甲双胍组比较, 高剂量组 ITT-AUC 降低 ($P < 0.05$)。

3 各组小鼠性腺脏器指数、精液常规和血清 T 比较 (表 3) 与对照组比较, 模型组睾丸系数、附睾系数、精囊腺系数、精子数量、精子活力、精子活率、血清 T 降低 ($P < 0.05$), 精子畸形率增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 干预组睾丸系数、附睾系数、精囊腺系数、精子数量、精子活力增加 ($P < 0.05$), 精子畸形率降低 ($P < 0.05$); 二甲双胍组和高剂量组精子活率、血清 T 增加 ($P < 0.05$)。与二甲双胍组比较, 高剂量组精子活力、血清 T 增加 ($P < 0.05$)。

4 各组小鼠睾丸组织病理比较 (图 1) 对照组小鼠睾丸组织结构清晰, 生精小管内各级生精细胞排



注: A 为对照组, B 为模型组, C 为二甲双胍组, D 为高剂量组, E 为低剂量组; 图中箭头所指为典型病变处

图 1 各组小鼠睾丸形态比较 (HE, $\times 200$)

表 2 各组小鼠 OGTT-AUC、ITT-AUC、FBG 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前 FBG (mmol/L)	OGTT-AUC	ITT-AUC	干预后 FBG (mmol/L)
对照	6	4.8 $\pm$ 0.2	1 828.0 $\pm$ 103.3	607.7 $\pm$ 42.2	5.5 $\pm$ 0.6
模型	6	9.6 $\pm$ 2.1*	2 416.0 $\pm$ 147.8*	1 172.0 $\pm$ 103.6*	8.0 $\pm$ 0.6*
二甲双胍	6	10.0 $\pm$ 1.1	1 660.0 $\pm$ 70.3 $^{\Delta}$	760.7 $\pm$ 49.5 $^{\Delta}$	5.5 $\pm$ 0.9 $^{\Delta}$
高剂量	6	10.2 $\pm$ 0.8	1 847.0 $\pm$ 75.8 $^{\Delta}$	689.8 $\pm$ 55.9 $^{\Delta\Delta}$	5.4 $\pm$ 1.0 $^{\Delta}$
低剂量	6	9.8 $\pm$ 0.5	2 156.0 $\pm$ 303.2 $^{\Delta}$	787.9 $\pm$ 52.7 $^{\Delta}$	6.0 $\pm$ 1.0

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与二甲双胍组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

表 3 各组小鼠性腺脏器指数、精液常规和血清 T 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	睾丸系数 (%)	附睾系数 (%)	精囊腺系数 (%)	精子数量 ($10^6/L$)	精子活力 (%)	精子活率 (%)	精子畸形率 (%)	T (ng/mL)
对照	6	0.71 ± 0.05	0.32 ± 0.03	1.26 ± 0.09	86.17 ± 10.02	52.26 ± 3.30	63.44 ± 8.59	39.44 ± 2.61	5.79 ± 1.11
模型	6	0.49 ± 0.07*	0.20 ± 0.03*	0.85 ± 0.14*	58.60 ± 6.16*	21.01 ± 1.59*	27.49 ± 4.28*	82.01 ± 8.68*	1.39 ± 0.37*
二甲双胍	6	0.65 ± 0.04 [△]	0.33 ± 0.03 [△]	1.21 ± 0.06 [△]	85.02 ± 10.55 [△]	34.55 ± 0.37 [△]	43.84 ± 3.59 [△]	68.18 ± 4.12 [△]	5.06 ± 1.42 [△]
高剂量	6	0.64 ± 0.03 [△]	0.33 ± 0.02 [△]	1.13 ± 0.14 [△]	83.53 ± 4.44 [△]	40.29 ± 3.20 ^{△▲}	48.71 ± 1.96 [△]	66.22 ± 2.14 [△]	10.33 ± 0.86 ^{△▲}
低剂量	6	0.64 ± 0.09 [△]	0.31 ± 0.04 [△]	1.09 ± 0.06 [△]	80.43 ± 2.66 [△]	32.95 ± 1.81 [△]	38.87 ± 5.72	68.06 ± 6.12 [△]	2.08 ± 1.27

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与二甲双胍组比较,[▲] $P < 0.05$

列整齐,基底面可见精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞等,腔内可见成熟精子。模型组小鼠睾丸组织结构混乱,各级生精细胞排列混乱,且数量显著减少,腔内出现大面积空洞。与模型组相比,二甲双胍组、高剂量组和低剂量组小鼠睾丸形态明显改善,各级生精细胞数量明显增加,生精小管空腔结构明显改善。

5 各组小鼠血清中 T-SOD、MDA、GSH-Px 比较(表 4) 与对照组比较,模型组血清 T-SOD、GSH-Px 水平下降($P < 0.05$),血清 MDA 水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,干预组血清 T-SOD、GSH-Px 水平升高($P < 0.05$),血清 MDA 水平下降($P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠血清中 T-SOD、MDA、GSH-Px 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T-SOD (U/mgprot)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	GSH-Px ($\mu\text{mol/L}$)
对照	6	186.0 ± 19.8	5.0 ± 1.5	4 196.0 ± 265.8
模型	6	124.0 ± 11.5*	9.5 ± 1.4*	1 309.0 ± 121.3*
二甲双胍	6	168.4 ± 34.7 [△]	5.6 ± 1.5 [△]	2 206.0 ± 535.6 [△]
高剂量	6	179.0 ± 26.6 [△]	6.8 ± 1.2 [△]	2 706.0 ± 583.6 [△]
低剂量	6	170.0 ± 11.6 [△]	6.4 ± 2.0 [△]	2 287.0 ± 154.2 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

6 各组小鼠睾丸中 PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达的比较(图 2,表 5) 与对照组比较,模型组睾丸 PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,低剂量组睾丸 p-Akt 蛋白表达升高($P < 0.05$),高剂量组睾丸 PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达升高($P < 0.05$),二甲双胍组睾丸 PI3K、Bcl-2 蛋白表达升高($P < 0.05$)。

表 5 各组小鼠睾丸中 PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白

表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	p-Akt	Bcl-2
对照	6	0.880 ± 0.061	0.924 ± 0.143	0.926 ± 0.037
模型	6	0.598 ± 0.107*	0.581 ± 0.177*	0.687 ± 0.019*
二甲双胍	6	0.945 ± 0.056 [△]	0.635 ± 0.141	1.020 ± 0.076 [△]
高剂量	6	0.899 ± 0.088 [△]	0.924 ± 0.237 [△]	0.862 ± 0.108 [△]
低剂量	6	0.827 ± 0.046	0.836 ± 0.196 [△]	0.623 ± 0.064

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

肥胖 2 型糖尿病生精功能障碍结合其临床表现属于中医学“肥胖”“消渴”并“精冷”等范畴,该疾病常证见虚实夹杂,以脾肾两虚为本,兼有痰浊、瘀血等。《素问·奇病论》曰:“夫五味入口…脾为之行其精气,津液在脾…转为消渴。”《素问·上古天真论》曰:“丈夫…精气溢泻…故能有子…无子耳”。《医方考·广嗣门》云:“凡人艱嗣者…胃中之湿襲之…精寒而不嗣也”^[15]。饮食不节损伤脾阳,失于运化,精微输布异常,则生痰饮等浊阴之邪,产生肥胖^[16];久必伤津耗液,肾气、肾精渐亏,转为消渴^[17];日久血脉瘀滞,导致生精功能受损^[17, 18],最终导致肥胖 2 型糖尿病生精功能障碍。应根据其寒热虚实之盈损,坚持辨证与辨病相结合,以补脾肾为主,佐以温阳、活血化瘀,重在以后天资先天,以缓解糖尿病并发症进展。益脾补肾方中党参、黄芪补气生津养血^[19];山药补肺脾肾之气阴,生津涩精;白术化脾胃湿浊;芡实补脾除湿固精;当归行血活血,改善微循环,恢复生精功能^[20];少许肉桂温肾助阳,蒸腾肾精,鼓动气血^[16]。诸药相合,益气养阴生津,固肾涩精活血,温润相济,脏腑气机升降得复,气血充盛,则生殖精化生有源^[21]。

肥胖 2 型糖尿病是以血糖显著升高,胰岛素抵抗为主要特征的代谢性疾病。本研究采用高脂饲料诱导肥胖 2 型糖尿病生精功能障碍模型,符合人类糖尿病生理病理状态。模型鼠出现糖摄取障碍和胰岛素抵抗,经益脾补肾方干预后,葡萄糖摄取显著

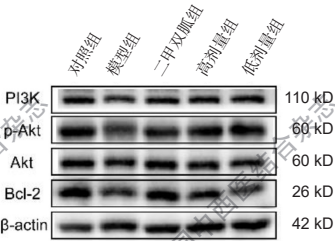


图 2 各组小鼠睾丸中 PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达

增加;胰岛敏感性增强,且效果与二甲双胍相近。提示益脾补肾方可以增加葡萄糖摄取,提高胰岛功能敏感性。

糖尿病会对女性和男性的生育能力产生负面影响。在男性生殖器官中,睾丸功能障碍是育龄糖尿病患者的主要并发症。研究表明,在糖尿病患者和动物中均发现其精子数量、活率和精子活力下降^[22, 23],睾丸细胞死亡增加^[24],从而损害生殖功能^[25]。在本研究中,模型组小鼠睾丸出现严重组织学损伤,给予益脾补肾方干预的模型小鼠睾丸组织生精小管排列整齐,各级生精细胞排列规则,管腔内出现的大量精子,精子数量和活力明显升高,畸形率降低,提示其能有效改善糖尿病小鼠雄性生殖功能损害,高剂量组效果尤其显著。研究表明糖尿病可降低血清中 T 的水平^[26],本研究模型组小鼠 T 显著下降,经益脾补肾方干预后, T 水平显著升高,表明益脾补肾方可以升高肥胖 2 型糖尿病小鼠 T 水平,改善精液参数。

PI3K/Akt 在胰岛素信号、细胞凋亡、增殖、分化和中介代谢等多种生物学过程的调控中发挥关键作用。PI3K/Akt 作为经典的胰岛素信号通路,也是糖尿病干预的重要靶点^[27]。在糖尿病中 PI3K/Akt 通路受损被认为是活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高导致胰岛素抵抗的主要原因^[28],长期高血糖会导致过量 ROS 产生,也可能导致睾丸氧化应激,促进生殖细胞死亡,干扰精子发生过程。此外,氧化应激也是精子功能障碍最重要的发病机制之一^[22]。T-SOD、MDA、GSH-Px 可以作为氧化应激发生的标志^[29],本研究证实糖尿病会诱发小鼠睾丸出现氧化应激,从而损伤睾丸生精功能,而益脾补肾方可以显著改善睾丸氧化应激水平,恢复睾丸生精功能。亦有研究表明 PI3K/Akt 与少弱精症有关^[30]。PI3K 被认为是获能诱导精子活力、过度活化和顶体反应的关键调节因子^[31]。PI3K/Akt 参与了雄性生殖的多个阶段,包括调控精子发生过程中的下丘脑-垂体-性腺轴,调控精原细胞和体细胞的增殖和分化^[32]。Bcl-2 作为 Akt 的下游基因,其调控细胞周期促进细胞增殖^[33],抑制凋亡,它还可以维持精子活力的状态^[34]。本研究发现 PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路参与益脾补肾方改善肥胖 2 型糖尿病小鼠生精障碍的改善过程,并证实提示益脾补肾方可以抑制生精细胞的凋亡。

综上所述,益脾补肾方通过促进葡萄糖摄取,增加胰岛功能敏感性来改善小鼠睾丸形态和精液参数的功能,PI3K/Akt/Bcl-2 通路在其中发挥重要作用。

致谢: 本文章所研究复方来自宁夏老中医于清连,衷心感谢他对本研究提供的支持与帮助!

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 叶妙勇,赵凡,王军卫,等.补阳还五汤对糖尿病性勃起功能障碍大鼠阴茎海绵体纤维化及 RhoA、ROCK2 蛋白表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2022,42(11):1369-1375.
- [2] Wang T, Zhao Z, Wang G, et al. Age-related disparities in diabetes risk attributable to modifiable risk factor profiles in Chinese adults: a nation-wide, population-based, cohort study[J]. Lancet Healthy Longev, 2021, 10(2): e618-e628.
- [3] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.
- [4] 苏亚珊,王强强,王春红,等.肥胖 2 型糖尿病导致小鼠睾丸生精功能障碍的研究[J].宁夏医科大学学报,2022,44(5):499-504.
- [5] Kong ZL, Sudirman S, Hsu YC, et al. Fucoxanthin-rich brown algae extract improves male reproductive function on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rat model[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4485.
- [6] 李文梅.糖尿病男性血清生殖激素与精液质量的临床研究[J].糖尿病新世界,2020,23(5):23-25.
- [7] 李新阳,孙自学.基于网络药理学和分子对接探讨益肾通络补气方对少弱精症大鼠雌激素受体的影响[J].中成药,2021,43(11):3216-3221.
- [8] Perreault L, Skyler J S, Rosenstock J. Novel therapies with precision mechanisms for type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(6): 364-377.
- [9] Yu N, Fang X, Zhao D, et al. Anti-diabetic effects of Jiang Tang Xiao Ke Granule via PI3-K/Akt signalling pathway in type 2 diabetes KKAY mice[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e168980.
- [10] Ding N, Zhang X, Zhang XD, et al. Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut micro-bes[J]. Gut,

- 2021, 69 (9): 1608–1619.
- [11] 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, 1982: 1681.
- [12] He R, Yin Y, Li Y, et al. Esophagus-duodenum gastric bypass surgery improves glucose and lipid metabolism in mice[J]. Ebiomedicine, 2018, 28: 241–250.
- [13] Shi G, Zheng J, Wu J, et al. Beneficial effects of lycium barbarum polysaccharide on sperm-atogenesis by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in streptozotocin-induced diabetic male mice[J]. Food Funct, 2017, 8 (3): 1215–1226.
- [14] 崔天薇, 刘保兴, 张秀平, 等. 补肺益肾方对肾精亏虚证大鼠睾丸支持细胞和生精功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40 (3): 342–346.
- [15] 吴崑主编. 医方考 (附《脉语》) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 437–439.
- [16] 马春玲, 阮永队, 陈红梅. 温中运脾补肾法治疗 2 型糖尿病临床研究 [J]. 云南中医学院学报, 2015, 38 (2): 65–68.
- [17] 贾海骅, 李玉波, 张治国, 等. 基于“痰瘀互结, 毒损入络”之男性不育的病机探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25 (9): 1200–1202.
- [18] 田丽凡, 王清泉. 基于数据挖掘的从痰论治消渴病用药分析 [J]. 江西中医药, 2019, 50 (1): 48–50.
- [19] 崔天薇, 刘保兴, 张秀平, 等. 补肺益肾方对肾精亏虚证大鼠睾丸支持细胞和生精功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40 (3): 342–346.
- [20] 李红霞, 魏田静, 刘晓宇, 等. 温脾补肾泄浊汤联合厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的疗效 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2022, 30 (8): 91–95.
- [21] 韩斌. 益肾健脾法治疗男性不育少弱精症的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [22] Abd El-Hakim YM, Abdel-Rahman Mohamed A, Khater SI, et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles and metformin synergistically rescue testicular oxidative damage and steroidogenesis-related genes dysregulation in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10 (1): 17.
- [23] Condorelli RA, La Vignera S, Mongioi LM, et al. Diabetes mellitus and infertility: different pathophysiological effects in type 1 and type 2 on sperm function[J]. Front Endocrinol, 2018, 9: 268.
- [24] Zhao Y, Kong C, Chen X, et al. Repetitive exposure to low-dose X-irradiation attenuates testicular apoptosis in type 2 diabetic rats, likely via Akt-mediated Nrf2 activation[J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 422: 203–210.
- [25] Tian Y, Song W, Xu D, et al. Autophagy Induced by ROS aggravates testis oxidative damage in diabetes via breaking the feed-forward loop linking p62 and Nrf2[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020: 1–9.
- [26] Nasiry D, Khalatbary AR, Ahmadvand H, et al. Effects of *Juglans regia* L. leaf extract supplementation on testicular functions in diabetic rats[J]. Biotech Histochem, 2021, 96 (1): 41–47.
- [27] 刘培, 王鹏飞, 王科, 等. 基于 PI3K/Akt 通路的中药治疗糖尿病研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (5): 220–228.
- [28] Lee H, Lee J. Anti-diabetic effect of hydroxybenzoic acid derivatives in free fatty acid-induced HepG2 cells via miR-1271/IRS1/PI3K/AKT/FOXO1 pathway[J]. J Food Biochem, 2021, 45 (12): e13993.
- [29] 陆包伟, 刘露梅, 王能, 等. 龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠生殖损伤的保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (19): 1–8.
- [30] Liang G, Wang Q, Zhang G, et al. Differentially expressed miRNAs and potential therapeutic targets for asthenospermia[J]. Andrologia, 2022, 54 (1): e14265.
- [31] Sagare-Patil V, Vernekar M, Galvankar M, et al. Progesterone utilizes the PI3K-AKT pathway in human spermatozoa to regulate motility and hyperactivation but not acrosome reaction[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 374 (1–2): 82–91.
- [32] Deng C, Lv M, Luo B, et al. The Role of the PI-3K/AKT/mTOR signalling pathway in male reproduction[J]. Curr Mol Med, 2021, 21 (7): 539.
- [33] Wang H, Shan B, Duan Y, et al. Effects of Heshouwuyin on gene expression of the insulin/IGF signalling pathway in rat testis and spermatogenic cells[J]. Pharm Biol, 2020, 58 (1): 1208–1219.
- [34] Aitken RJ, Curry BJ, Shokri S, et al. Evidence that extrapancreatic insulin production is involved in the mediation of sperm survival[J]. Mol Cell Endocrinol, 2021, 526: 111193.

(收稿: 2022–11–30 在线: 2023–04–07)

责任编辑: 邱 禹