

· 基础研究 ·

基于氧化及 Caspase-3 凋亡探讨益肾种子方
防治大鼠睾丸损伤机制研究

韩 强 曾 银 王任远 刘殿池 王和天

摘要 **目的** 探讨益肾种子方通过抗氧化及其诱导的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白水解酶 (Caspase) -3 凋亡途径防治奥硝唑所致的大鼠睾丸损伤的作用机制。**方法** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 空白组、模型组、益肾种子方低、中、高剂量组, 每组 6 只。除空白组外, 均采用奥硝唑 800 mg/(kg·d) 灌胃制造睾丸损伤模型。中药组在造模的同时, 分别予益肾种子方低、中、高剂量灌胃 [3.37、6.93、13.86 g/(kg·d), 每天 1 次], 连续灌胃 28 天。干预后取材 HE 染色观察睾丸及附睾结构变化、测量睾丸组织中活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 含量; 免疫组织化学染色分析睾丸组织 Caspase-3 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组睾丸组织生精细胞不同程度损伤、减少, 附睾组织有不同程度破坏和精子的减少, 睾丸组织中 ROS、MDA 含量升高, SOD、CAT 含量降低 ($P<0.01$), 免疫组化显示 Caspase-3 表达增多。与模型组比较, 益肾种子方干预后睾丸生精细胞完整性有所恢复, Caspase-3 明显减少; 益肾种子方中剂量组 ROS、MDA 含量降低 ($P<0.05$); 益肾种子方高剂量组 ROS、MDA 含量降低 ($P<0.01$), SOD、CAT 含量增加 ($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 益肾种子方可改善奥硝唑所致大鼠的睾丸及附睾损伤, 其机制可能与调控氧化应激系统中 ROS、MDA、SOD、CAT 等含量, 以及氧化应激诱导的 Caspase-3 凋亡途径有关。

关键词 益肾种子方; 睾丸损伤, 抗氧化; Caspase-3 凋亡途径; 男性不育症

Study on the Mechanism of Yishen Zhongzi Formula in Preventing and Treating the Testicular Injury of Rats Based on Antioxidation and Caspase-3 Apoptosis HAN Qiang, ZENG Yin, WANG Ren-yuan, LIU Dian-chi, and WANG He-tian *Department of Andrology, Beijing Chinese Medicine Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing (100010)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of Yishen Zhongzi Formula (YZF) in preventing and treating ornidazole-induced testicular injury in rats via anti-oxidation and cysteine-containing aspartatespecific protease (Caspase) -3 apoptosis pathway induced by anti-oxidation. **Methods** A total of 30 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups, blank group, model group, low-, medium- and high-dose YZF group, with 6 rats in each group. The models of testicular injury were established by gavage with 800 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ornidazole for all groups except for blank group. In YZF groups, YZF at low, medium and high doses (3.37, 6.93 and 13.86 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively, once daily) were administered by gavage for 28 consecutive days during modeling. After intervention, samples were collected for hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the structural changes of testis and epididymis, the content of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) in testicular tissues were detected. Moreover, immunohistochemical staining was conducted to analyze the expression of Caspase-3 in testicular tissues. **Results** Compared with blank group, the spermatogenic cells in testicular tissues were injured and decreased in different degrees, epididymal

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81973848)

作者单位: 首都医科大学附属北京中医医院男科 (北京 100010)

通讯作者: 曾 银, Tel: 010-81976045, E-mail: 512153827@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230605.241

tissues were damaged in varying degree, sperms were reduced, raised ROS and MDA content but lowered SOD and CAT levels in testicular tissues ($P<0.01$), and increased Caspase-3 expression was revealed by immunohistochemistry in model group. Compared with model group, the integrity of spermatogenic cells in testicular tissues was restored, and Caspase-3 expression declined significantly following the intervention with YZF. In addition, ROS and MDA content decreased in medium-dose YZF group ($P<0.05$), reduced ROS and MDA content ($P<0.01$) and raised SOD and CAT content ($P<0.01$, $P<0.05$) were observed in high-dose YZF.

Conclusion YZF can ameliorate the ornidazole-induced injury of testis and epididymis in rats, the mechanism may be related to the regulation of ROS, MDA, SOD and CAT content in the oxidative stress system, as well as the Caspase-3 apoptosis pathway induced by oxidative stress.

KEYWORDS Yishen Zhongzi Formula; testis injury; anti-oxidation; Caspase-3 apoptosis pathway; male infertility

少、弱、畸形精子症以及精子 DNA 碎片率 (DNA fragmentation index, DFI) 异常升高是导致男性不育症最常见的原因^[1]。多项研究报道睾丸功损伤是其重要的病理机制^[2-4], 并且中医药治疗该病具有一定优势^[5-7]。益肾种子方是首都医科大学附属北京中医医院的经验方, 前期临床观察证实能显著改善少、弱精子症并降低精子 DFI^[8]。益肾种子方的网络药理学研究发现该方能调控睾丸组织内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的含量以及其引起的细胞凋亡途径, 从而保护睾丸损伤^[9]。因此本次研究探讨益肾种子方通过抗氧化及其诱导的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白水解酶 (cysteine-containing aspartate-specific protease, Caspase) -3 凋亡途径改善奥硝唑所致的大鼠睾丸损伤。

材料与方法

1 动物 健康 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 体重 230~270 g, 动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 批号: SCXK (京) 2021-0006。大鼠饲养于 SPF 级环境中, 采用鼠全价饲料和灭菌水饲养, 均自由采食、饮水, 室温 (25 ± 2) °C, 12 h/12 h 光暗周期。本研究经首都医科大学附属北京中医医院医学伦理委员会批准 (审批号: 2018BL-067-02)。

2 药物 益肾种子方颗粒, 组成: 肉苁蓉 20 g (批号: 22042451) 党参 10 g (批号: 22042451) 红景天 6 g (批号: 23018391) 桑叶 15 g (批号: 23003411) 石菖蒲 10 g (批号: 22037041) 车前子 10 g (批号: 23006161) 枳实 6 g (批号: 22049201), 购自北京康仁堂药业有限公司; 奥硝唑 (货号: E120437) 购自安耐吉化学。

3 主要试剂和仪器: 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 分型测试盒 (货号: E-BC-K022-M)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测试盒 (货号: E-BC-K025-M) 均购自武汉伊莱瑞特

生物科技股份有限公司; ROS 试剂盒 [北京华英生物技术有限公司, 货号: ROS (HY-M0087) KIT]; 过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (Abcam, 货号: Ab118184); 苏木素伊红染色液试剂盒 (碧云天生物, 货号: C0105S); 油红 O 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1262); 抗荧光衰减封片剂 (含 DAPI, 北京索莱宝科技有限公司, 货号: S2110); BSA (美国 Amresco 公司, 货号: A7030); 二抗羊抗鼠 (Abcam, 货号: ab150115) 二抗羊抗兔 (Abcam, 货号: Ab6717); 兔抗羊抗体 (CWBIO, 货号: CW0105S); Caspase-3 (Abcam, 货号: ab49822)。

全自动脱水机, 沈阳誉德电子仪器有限公司, 型号: SYD-T2070; 石蜡包埋机, 沈阳誉德电子仪器有限公司, 型号: SYD-B-F; 石蜡切片机, 上海莱卡仪器有限公司, 型号: RM2016; 病理取材台, 沈阳誉德电子仪器有限公司, 型号: SYD-9804; 烘烤漂片机, 沈阳誉德电子仪器有限公司, 型号: SYD-PK; 载玻片及盖玻片, 江苏世泰实验器材有限公司型号: 10127105P-G; 温控摇床, 其林贝尔, 型号: TS-2000A; 组化笔, Vectort, 型号: H-4000; 倒置荧光显微镜, 日本尼康, 型号: Nikon Eclipse Ti-SR。

4 动物分组及干预 适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法将 30 只雄性 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 即空白、模型、益肾种子方低、中、高剂量组, 每组 6 只, 除空白组外均建立大鼠睾丸损伤模型^[10], 模型组采用奥硝唑 800 mg/(kg·d) 灌胃, 奥硝唑用 0.5% 的羧甲基纤维素钠配置。空白组予羧甲基纤维素钠每日灌胃 1 次, 直至实验结束。中药组在造模的同时, 分别予益肾种子方低、中、高剂量灌胃, 益肾种子方每剂每日生药重量 77 g, 成年男性以 70 kg 计算, 人与大鼠等效剂量折算关系按《药理实验方法学》^[11]记载的 6.3 计算, 大鼠的等效剂量为 $77/70 \times 6.3 = 6.93$ g/(kg·d), 将等效剂量设为中

剂量,低剂量为中剂量的一半,即 $3.37 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,高剂量为中剂量的 2 倍,即 $13.86 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。每天 1 次,连续灌胃 28 天。

5 检测指标及方法

5.1 睾丸及附睾组织病理观察 采用 10% 中性福尔马林固定液固定附睾及睾丸组织 30~50 min,按常规方法脱水、包埋、石蜡切片机连续切片,厚度 $4 \mu\text{m}$,HE 常规染色,光镜下观察比较附睾及睾丸组织结构。

5.2 睾丸组织中氧化应激指标 ROS、SOD、MDA、CAT 含量检测 取睾丸组织进行匀浆,测定 ROS、SOD、MDA、CAT 含量,具体方法按照试剂盒说明进行。

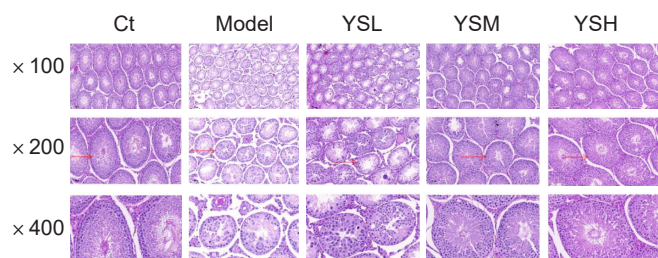
5.3 睾丸组织 Caspase-3 观察 采用 4% 多聚甲醛液固定的附睾及睾丸组织,按常规方法脱水、包埋、石蜡切片机连续切片,厚度 $4 \mu\text{m}$,常规染色,切片经过梯度酒精(70%~100%)1 min 一个梯度,脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,光镜下观察比较睾丸组织 Caspase 3 变化。

6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件,符合正态分布与方差齐性的两组间计量资料的比较采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计描述采用方差分析,如果组间差异有统计学意义,进一步采用 Bonferroni 法进行两两比较;不符合正态分布的计量资料采用非参数检验,使用中位数(四分位数间距)[median(interquartile), $M(IQR)$]表示,统计描述采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠睾丸及附睾形态比较(图 1、2) 睾丸 HE 染色结果显示空白组睾丸曲细精管内可见各级生精细胞及精子,排列规则。正常睾丸网,由互相吻合的不规则的小腔组成。与空白组比较,模型组精细胞不发育,各级生精细胞减少或消失。睾丸曲细精管基底膜增厚,伴透明变性,管腔内未见细胞成分,曲细精管空虚呈网格状。使用益肾种子方的干预后,大鼠睾丸组织与模型组比较,生精细胞形态基本正常,

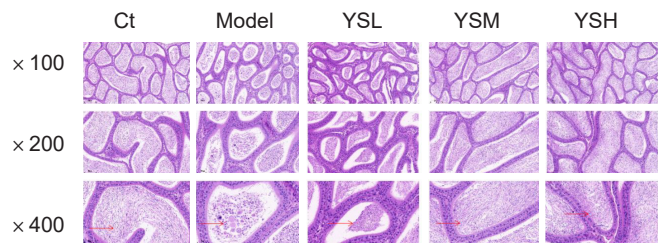
益肾种子方中高剂量组生精小管结构基本完整,管腔内生精细胞和精子细胞数量显著增多,排列紧密、均匀,生精上皮细胞可见较为明显恢复,尤其是益肾种子方高剂量组在生精小管形态、排列方式、生精细胞的活跃程度上与空白组非常接近。



注: Ct 为空白组; Model 为模型组; YSL 为益肾种子方低剂量组; YSM 为益肾种子方中剂量组; YSH 为益肾种子方高剂量组; 下同; 图中箭头所指为各组生精细胞

图 1 各组大鼠睾丸组织形态比较(HE)

附睾 HE 染色结果显示正常附睾(空白组)管壁被覆假复层柱状上皮,部分高柱状纤毛上皮,部分为低柱状上皮。基底膜外有一层环形平滑肌包绕,附睾管腔内可见大量正常精子。与空白组比较,模型组大鼠管壁不同程度变薄,细胞间空隙变大,细胞多呈柱状,管腔内可见少量精子。使用中药干预后与模型组比较,形态明显改善,精子数量有所增加,尤其益肾种子方高剂量组与正常附睾形态基本一致。



注: 图中箭头所指深褐色点状物为各组附睾管腔内精子情况

图 2 各组大鼠附睾形态比较(HE)

2 各组 ROS、SOD、MDA、CAT 含量比较(表 1) 与空白组比较,模型组 ROS、MDA 的含量升高,SOD、CAT 含量降低($P < 0.01$)。与模型组比较,益肾种子方中剂量组 ROS、MDA 含量降低($P < 0.05$);

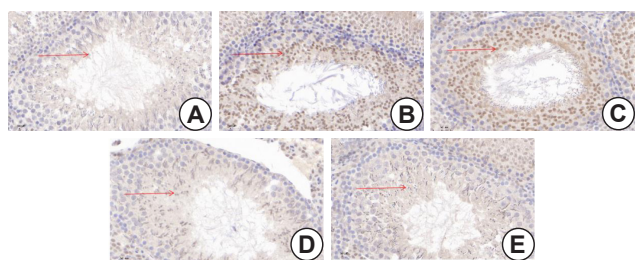
表 1 各组 ROS、SOD、MDA、CAT 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROS (荧光强度/mg)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
空白	6	37.74 ± 3.81	0.22 ± 0.02	3.46 ± 0.17	2.83 ± 0.19
模型	6	$111.74 \pm 14.02^*$	$0.82 \pm 0.12^*$	$2.12 \pm 0.31^*$	$1.79 \pm 0.32^*$
益肾种子方低剂量	6	65.64 ± 11.41	0.63 ± 0.05	2.27 ± 0.13	1.98 ± 0.15
益肾种子方中剂量	6	$65.02 \pm 2.28^\Delta$	$0.40 \pm 0.06^\Delta$	2.76 ± 0.28	2.16 ± 0.19
益肾种子方高剂量	6	$50.02 \pm 12.62^{\Delta\Delta}$	$0.34 \pm 0.09^{\Delta\Delta}$	$3.04 \pm 0.42^{\Delta\Delta}$	$2.34 \pm 0.22^\Delta$

注: 与空白组比较, $^*P < 0.01$; 与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

益肾种子方高剂量组 ROS、MDA 含量降低 ($P<0.01$), SOD、CAT 含量增加 ($P<0.01$, $P<0.05$)。不同剂量组间各指标比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 各组睾丸组织 Caspase-3 表达比较 (图 3) 与空白组比较, 模型组精母细胞可见大量 Caspase-3 表达, 见图 3B 箭头所示的棕色斑点, 服用益肾种子方后, 中、高剂量组 Caspase-3 明显减少, 与空白组接近。



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为益肾种子方低剂量组; D 为益肾种子方中剂量组; E 为益肾种子方高剂量组; 箭头棕色斑点所指为 Caspase-3

图 3 各组睾丸组织 Caspase-3 表达比较 (HE, $\times 400$)

讨 论

益肾种子方由肉苁蓉、党参、红景天、桑叶、石菖蒲、枳实、车前子组成; 肉苁蓉补肾益精, 《神农本草经》曰: “养五脏, 强阴, 益精气” 党参可益气健脾, 意在实后天而补先天; 二者合用补肾健脾, 益气填精为君。红景天益气活血, 桑叶在《本草新编》^[12]云: “最善补骨中之髓, 添肾中之精, ……活血生津, 种子安胎”; 因此二药益气活血, 养阴生精为臣。石菖蒲善于化痰浊, 开心窍, 使心肾相得; 枳实能行气祛痰; 因此二药合用行气祛浊, 疏畅精道为佐。车前子利水不耗气, 引药入下焦, 兼祛湿热为使。全方既补肾益气填精, 又能行气化浊祛湿而不滞。前期临床试验已经表明, 益肾种子方可显著提升少、弱精子症患者精子数量、活力, 并改善 DFI^[8]。本研究模型组中奥硝唑对大鼠睾丸生精细胞、曲细精管及附睾上皮细胞病理形态学损伤表明造模成功。

ROS 可使精子获能, 但过多将引起精子 DNA 损伤, 包括 DFI 过高、线粒体 DNA 损伤引起端粒磨损、表观遗传异常和 Y 染色体微缺失^[13]。本研究中模型组 ROS 较空白组明显升高 ($P<0.01$), 使用益肾种子方干预后, 中、高剂量组较模型组 ROS 含量下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表明益肾种子方对 ROS 有抵抗作用。

MDA 水平过高会导致线粒体功能以及信号转导异常, 破坏睾丸中精子及精浆的抗氧化系统, 通过攻击富含不饱和脂肪酸的精子膜、破坏精子 DNA 单双链、损伤线粒体及线粒体 DNA 等途径破坏生殖细胞完整性以及线粒体 DNA 结构^[14, 15]。模型组 MDA 较

空白组明显升高 ($P<0.01$), 益肾种子方中、高剂量组较模型组降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。表明益肾种子方有抗 MDA 氧化的作用。ROS、MDA 也提示益肾种子方在临床试验中改善 DFI 的实验基础可能是其抗氧化作用。

SOD 是一种抗氧化酶, 在人类精液中大量表达, 多项研究表明少、弱精子症精浆内 SOD 的活性和密度都是下调的^[16, 17], 并且精子中的 SOD 同工酶 SOD2 下调将直接影响精子活力^[18]。模型组 SOD 明显低于空白组 ($P<0.01$), 而益肾种子方高剂量组较模型组 SOD 含量提高 ($P<0.01$)。表明奥硝唑可降低精液中 SOD 水平, 但可被益肾种子方改善。

目前研究证实 CAT 可以逆转 ROS 导致的精子运动能力丧失^[19], 防止人类精子冻融过程中产生的过量 ROS, 进而减轻后者对精子核 DNA 的氧化应激性损伤^[20]。本次研究中模型组 CAT 低于空白组 ($P<0.01$), 使用高剂量益肾种子方后含量较模型组升高 ($P<0.05$), 这可能与 CAT 是在拮抗 ROS 到一定程度后才能有所升高相关。

ROS、MDA 这一类氧化物能损伤精液中抗氧化系统, 破坏线粒体呼吸功能, 降低精子线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP), 妨碍能量产生, 同时诱导生殖细胞通过线粒体凋亡途径损伤生殖细胞, 使得精子数量、浓度以及活动力进一步下降^[21-23]。其引发促凋亡信号的刺激使线粒体跨膜电位消失, 线粒体膜通透性改变, 渗透转运膜开放, 细胞色素 C 被释放到细胞质基质中, 与凋亡酶激活因子 -1 (apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1) 的 WD-40 区域结合形成多聚复合体 (凋亡体), 凋亡体氨基端具有 CARD 序列, 可与 Caspase-9 的 CARD 序列特异性结合, 活化 Caspase-9, 再激活下游的 Caspase-3, 从而引发凋亡^[24]。而 Caspase-3 是最重要的凋亡蛋白酶之一, 通常位于哺乳动物细胞凋亡通路下游, 其表达量直接反映细胞凋亡程度^[25]。本次实验结果可以发现模型组存在大量 Caspase-3 表达, 与上述描述是一致的。

但并非 ROS 含量越低对睾丸损功能、精子活力、数量改善越好, 本研究中空白组和中药高剂量组依旧有一定量 ROS, 这说明 ROS 本身应该具有一定生理功能。研究表明 ROS 能上调精子抗氧化蛋白 SOD2 及过氧化物酶 6, 从而提高精子活力^[18]。因此 ROS 和 SOD 这两类物质如同中医里的阳和阴一样, 如果说正常生理量的 ROS 同阳一样, 会促使体内能量的产生、转换, 那么过多表达与阳亢相似, 阳亢之时,

会激发阴的产生,同时会受到阴的制约。

目前虽然用于改善睾丸损伤和治疗少弱精子症的药物较多,但除明确病因的治疗以外,其他多为经验性治疗,存在一定争议,因此并无明确阳性对照药物^[26],因此本研究没有设置阳性对照组。本研究结果表明益肾种子方通过增加 SOD、CAT 等表达,降低 ROS、MDA 等氧化物质的表达及对抗其诱导的 Caspase-3 凋亡途径防治奥硝唑所致的大鼠睾丸损伤。

利益冲突: 作者申明该研究无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 中国医师协会生殖医学专业委员会生殖男科学组弱精子症诊疗中国专家共识编写组. 弱精子症诊疗中国专家共识 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41 (7): 593-599.
- [2] 蒋平, 陈存武, 孙桃桃, 等. 黄精多糖对环磷酰胺所致睾丸损伤小鼠睾丸组织 Nrf2 信号通路基因表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (2): 60-64.
- [3] 安雨, 刘雅洁, 邢国刚, 等. 艾烟对弱精子症模型大鼠精子参数和血清性激素的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22 (5): 1704-1709.
- [4] 蒋平, 徐青洪, 陈存武, 等. 金匱肾气丸对环磷酰胺所致睾丸损伤小鼠睾丸组织 Nrf2 信号通路基因表达的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2020, 26 (2): 160-166.
- [5] 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, 140.
- [6] 吴艳婷, 刘敏, 金志春. 中医药治疗少弱精子症研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2017, 9 (4): 213-216, 218.
- [7] 罗娟娟, 马惠昇, 许建峰. 中医药治疗少弱精子症研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13 (23): 67-68.
- [8] 韩强, 王任远, 王和天, 等. 益肾种子方治疗肾虚精亏型弱精子症疗效观察 [J]. 北京中医药, 2022, 41 (9): 1049-1052.
- [9] 韩强, 王任远, 刘殿池, 等. 基于网络药理学探讨益肾种子方治疗弱精子症的作用机制 [J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16 (8): 1469-1475.
- [10] 骆永伟, 姜娟, 许丽, 等. 奥硝唑诱导大鼠慢性少弱精子症模型的建立 [J]. 中华男科学杂志, 2018, 24 (7): 651-654.
- [11] 魏伟主编. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京, 人民卫生出版社, 2010: 70.
- [12] 清·陈士铎著. 本草新编 [M]. 第 2 版. 北京, 中国中医药出版社, 2018: 209.
- [13] Faja F, Carlini T, Coltrinari G, et al. Human sperm motility: a molecular study of mitochondrial DNA, mitochondrial transcription factor A gene and DNA fragmentation [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46 (4): 4113-4121.
- [14] Hamilton TRDS, Assumpção MEOD. Sperm DNA fragmentation: causes and identification [J]. Zygote, 2020, 28 (1): 1-8.
- [15] Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, et al. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction [J]. Andrologia, 2021, 53 (1): e13666.
- [16] Tomar G, Joshi T, Varghes A, et al. Relationship of antioxidant system and reactive oxygen species with clinical semen parameters in infertile men [J]. J Family Med Prim Care, 2017, 6 (3): 574-577.
- [17] 毛静, 郭润发, 朱文凯, 等. 男性精浆超氧化物歧化酶活性与各项精子参数间的关系 [J]. 海南医学, 2019, 30 (4): 451-454.
- [18] 杨梓涵, 郝小玲, 王虹, 等. 弱精症精子 SOD2 和 PRDX6 的表达变化及其与精子运动能力的相关性分析 [J]. 第三军医大学学报, 2021, 43 (20): 2199-2207.
- [19] 王晓琛, 刘强. 精子活性氧与运动及受精的关系 [J]. 中国男科学杂志, 2021, 35 (4): 65-68.
- [20] 李志凌, 林琼林, 刘容菊, 等. 抗氧化剂改善冻融人精子氧化应激性 DNA 损伤的研究 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87 (45): 3174-3177.
- [21] 杨颖, 凡永, 匡延平, 等. 精子线粒体膜电位与男性精液参数和体质量指数的相关性研究 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37 (4): 268-271.
- [22] Gavrilouk D, Aitken RJ. Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 868: 23-47.
- [23] Opuwari CS, Henkel RR. An update on oxidative damage to spermatozoa and oocy-tes [J]. Biomed Res Int, 2016, 9540142.
- [24] Wen Q, Zhang X, Cai J, et al. A novel strategy for real-time and in situ detection of cytochrome c and caspase-9 in Hela cells during apoptosis [J]. Analyst, 2014, 139 (10): 2499-2506.
- [25] 于丰铭, 徐扬. Caspase-3 的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42 (11): 2072-2078.
- [26] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗特发性少、弱精子男性不育临床应用指南 (2021 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42 (6): 645-652.

(收稿: 2023-01-09 在线: 2023-08-29)

责任编辑: 邱 禹