

知柏地黄汤对解脲支原体感染大鼠生精细胞 TRPV1、TRPV5 表达的影响

何清湖¹ 郭炫佐² 郭军华² 李迎秋³ 刘朝圣¹

摘要 **目的** 观察知柏地黄汤对解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)感染大鼠精液及生精细胞瞬时受体电位香草酸亚型(transient receptor potential family vanilloid subtype, TRPV)1、TRPV5 表达的影响,探讨 UU 感染导致不育症的病理机制及知柏地黄汤的干预作用。**方法** 4~5 月龄 SD 大鼠 60 只,随机抽取 45 只,经膀胱接种 UU 悬液,建立 UU 睾丸感染动物模型。剩余 15 只同步注射生理盐水作为正常对照组, UU 感染模型大鼠再随机分成模型对照组、阿奇霉素组、知柏地黄汤组,每组 15 只。知柏地黄汤组给予知柏地黄汤 1 g/(kg·d)灌胃,阿奇霉素组给阿奇霉素混悬液 0.105 g/(kg·d)灌胃,正常对照组、模型对照组给予等剂量生理盐水灌胃。各组给药均每日 1 次,连续给药 21 天。处死大鼠后取睾丸、附睾组织,比较各组 UU 阳性率;采用机械分离法分离精子细胞,应用彩色精子动态检测系统进行精子活力运动参数测定;采用实时定量 PCR 法测定生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 表达;采用 Western blot 法检测生精细胞 TRPV1、TRPV5 蛋白表达。**结果** 模型对照组 UU 阳性率[86.7(13/15)]明显高于正常对照组(0.0%)($P < 0.05$),而知柏地黄汤组[33.3%(5/15)]及阿奇霉素组[26.7%(4/15)]均较模型对照组降低($P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型对照组大鼠 a 及 b 级精子减少,直线速度、平均速度降低,生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,知柏地黄汤组和阿奇霉素组 a 及 b 级精子增多,直线速度、曲线速度及平均速度提高,TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与阿奇霉素组比较,知柏地黄汤组 a 及 b 级精子增多,曲线速度、平均速度提高,TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 知柏地黄汤具有抗 UU 感染、提高大鼠精液质量作用,可能与其上调大鼠生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 及蛋白表达相关。

关键词 知柏地黄汤;解脲支原体;生精细胞;瞬时受体电位香草酸亚型 1;瞬时受体电位香草酸亚型 5

Effect of Zhibai Dihuang Decoction on Expressions of TRPV1 and TRPV5 in Spermatogenic Cells of UU-infected Rats HE Qing-hu¹, GUO Xuan-zuo², GUO Jun-hua², LI Ying-qiu³, and LIU Chao-sheng¹ 1 Key Discipline of Integrative Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha (410007); 2 Graduate School, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha (410007); 3 College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha (410007)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Zhibai Dihuang Decoction (ZDD) on mRNA and protein expressions of transient receptor potential family vanilloid subtype 1 (TRPV1) and transient receptor potential family vanilloid subtype 5 (TRPV5) in *Ureaplasma urealyticum* (UU)-infected rat semens and spermatogenic cells, and to explore the pathomechanism of UU-infected infertility and the intervention of ZDD. **Methods** Totally 45 were randomly selected from 60 4–5 months old SD rats. UU testicular infected animal models were set up after bladder inoculation of UU suspension. The remaining 15 rats were simultaneously injected with normal saline as a normal control group. After a successful modeling,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81373641);湖南省科技厅课题资助项目(No. 2011sk3104);长沙市科技局课题资助项目(No. K1301014-31);湖南省科技计划项目(No. 2012SK3138)

作者单位:1.湖南中医药大学中西医结合临床重点学科(长沙 410007);2.湖南中医药大学研究生学院(长沙 410007);3.湖南中医药大学中医学院(长沙 410007)

通讯作者:何清湖, Tel:13787105021, E-mail: Hqh1111@tom.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.10.1218

UU infected model rats were randomly divided into the model group, the azithromycin group, and the ZDD group, 15 in each group. Rats in the ZDD group were administered with ZDD at the daily dose of 1 g/kg by gastrogavage. Rats in the azithromycin group were administered with azithromycin suspension at the daily dose of 0.105 mg/kg by gastrogavage. Equal volume of normal saline was administered to rats in the normal control group and the model group. All medication was performed once daily for 21 successive days. Testes and epididymis were extracted after rats were killed and UU positive rates were compared among all groups. Sperm cells were separated using a mechanical separation technique. Sperm motility parameters were detected using color sperm motion detection system. mRNA and protein expressions of TRPV1 and TRPV5 in spermatogenic cells were determined by real-time quantitative PCR and Western blot. Results The UU positive rate was obviously higher in the model group than in the normal control group [(86.7% (13/15 cases) vs. 0] ($P < 0.05$). It was lower in the ZDD group [33.3% (5/15 cases)] and the azithromycin group [26.7% (4/15 cases)] than in the model group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, class A and B sperms were reduced, the linear velocity and the average velocity were significantly lowered, mRNA and protein expressions of TRPV1 and TRPV5 in spermatogenic cells significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, class A and B sperms were increased, linear and curve velocities and the average velocity were significantly elevated, mRNA and protein expressions of TRPV1 and TRPV5 significantly increased in the ZDD group and the azithromycin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with azithromycin group, class A and B sperms were increased, the linear velocity and the average velocity were significantly elevated, mRNA and protein expressions of TRPV1 and TRPV5 significantly increased in the ZDD group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion ZDD could fight against UU infection and elevate semen quality, which might be associated with up-regulating mRNA and protein expressions of TRPV1 and TRPV5 in spermatogenic cells.

KEYWORDS Zhibai Dihuang Decotion; *Ureaplasma urealyticum*; spermatogenic cell; transient receptor potential family vanilloid subtype 1; transient receptor potential family vanilloid subtype 5

瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道在人体遍布多种组织和细胞,并参与人体几乎所有的生理功能和许多病理变化。瞬时受体电位香草酸亚型 (transient receptor potential family vanilloid subtype, TRPV) 1、TRPV5 是近年来研究较多、机制较为清楚的 TRPV 亚家族成员之一,但是,关于 TRPV 基因家族及其相关的 TRPV 蛋白在生精细胞中的表达、与生精细胞的关系及其病理、生理机制在国内外的相关研究都比较少。解脲支原体 (*Ureaplasma urealyticum*, UU) 感染是男性不育、特别是继发性不育重要的原因之一^[1],有关其发病机制和防治方法的研究目前已成为各国学者关注的热点问题之一。本研究通过观察知柏地黄汤对 UU 感染大鼠模型精子活力及生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达的影响,为该中药名方治疗 UU 感染所致的精子活力低下症提供新的依据。

材料与方

1 动物 采用 SPF 级 4~5 月龄 SD 雄性大鼠 60 只,体重 (200 ± 20) g,购自湖南斯莱克景达实验动

物有限公司,实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2011-0003,湖南中医药大学病原微生物专用动物实验室饲养,许可证号: SYXK (湘) 2009-0001,实验室室温 (25 ± 2) °C,湿度 40% ~ 55%,环境通风良好。备黑色窗帘。分笼饲养。光照 12 h,黑暗 12 h。自由饮食与饮水。定期投予饲料、饮水瓶及垫料。

2 药物 知柏地黄汤药物组成、炮制及用量按《医宗金鉴》记载执行。熟地黄、山萸肉、淮山药、泽泻、牡丹皮、茯苓 (不去皮)、盐知母、盐黄柏的用量比为 24:12:12:9:9:9:6:6。药材经中药师鉴定后,严格按照古法炮制,按以上比例由湖南中医药大学附属医林药号提供 950 g 药材。先加蒸馏水浸泡 30 min,第 1 次煎加水 7 600 mL,沸腾后再煮 30 min,第 2 次煎加水 5 700 mL,沸腾后再煮 30 min,过滤,2 次所得滤液混合后用刻度烧杯浓缩至 1:1 (即 1 mL 药液相当 1 g 生药),分装入 500 mL 广口试剂瓶中于 4 °C 冰箱中保存备用。阿奇霉素片,0.25 g/片,石药集团欧意药业有限公司生产,产品批号:001120941。临用时用注射用水配成含阿奇霉素 25 mg/mL 浓度的混悬液。

3 试剂与仪器 UU 标准株由南华大学微生物

学教研室提供, UU 培养基购自南华大学微生物学教研室。TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 美国), TRPV1、TRPV5 引物(基尔顿生物科技上海有限公司, 中国), SYBRGreen PCR 试剂盒(F-415XL, Thermo 公司, 美国), 逆转录试剂盒(promega A3500, 美国), DNA Marker(fermentas 公司, 美国), BCA 蛋白定量检测试剂盒(PICPI23223, Thermo 公司, 美国)羊抗 TRPV1、TRPV5 多克隆抗体(碧云天生物技术公司, 中国), 碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG(碧云天生物技术公司, 中国)等。37 ℃显微镜、显微摄像机和记录机由湖南中医药大学第一附属医院提供, Chemi Imager5500 凝胶电泳成像分析系统(Alphainnotech chemi Imager, 美国), 核酸蛋白分析仪(德国, ep-endorf), 紫外分光光度计(UV-visible spectrometer, UV300, 英国), 电泳仪(PS-9, 大连竞迈科技有限公司), 手握式电动匀浆机 购自德国 FLUKO (F6 - 10), ABI-7300 型 PCR 扩增仪(美国, ABI 公司)。

4 UU 的体外培养及效价测定 将 UU 标准菌株(冻干品)复苏, 于无菌条件下将 UU 标准菌接种于 UU 液体培养基中, 37 ℃培养 16 ~ 24 h, 取对数生期菌体, 培养基出现橙红色清亮菌液时进行倍比稀释, 接种。体外实验用效价为 5×10^6 ccu/mL 的菌液颜色变化单位。

5 造模及分组 参照李楠等^[2]造模方法。选择 SD 雄性大鼠 60 只, 随机数字表法选出 45 只为实验组, 剩余 15 只为正常对照组。动物于造模前禁食不禁水 12 h, 实验当天禁水。造模时给予 25% 乌拉坦 7 mL/kg, 腹腔注射麻醉, 于大鼠外尿道上 2 cm 处, 碘伏消毒, 开腹查找膀胱, 将其游离后先抽出膀胱内液体, 实验组注射 UU 标准菌株液 0.5 mL/只, 将膀胱放回原位, 缝合腹腔。正常对照组在同样条件下向膀胱内注入生理盐水, 每只注射 0.5 mL。接种 1 周后, 随机抽取 5 只实验组大鼠, 分别收取睾丸穿刺液进行培养工作, 5 只大鼠培养均显示出现 UU, 证明实验模型构建成功。将实验组的 45 只大鼠模型采用随机数字表法分为知柏地黄汤组、阿奇霉素组、模型对照组, 每组 15 只动物。

6 给药方法 接种第 10 天开始给药, 给药剂量根据动物每公斤体重占人体表面积的比例计算, 知柏地黄汤组给予知柏地黄汤 1 g/(kg · d)灌胃, 每天 1 次; 阿奇霉素组给予阿奇霉素混悬液 0.105 g/(kg · d)灌胃, 每天 1 次。正常对照组、模型对照组给予生理盐水灌胃, 每天 1 次。各组均连续灌胃 21 天^[3]。

7 取材方法 于停药后的第 2 天, 采用颈椎脱臼法处死大鼠, 取睾丸、附睾组织, 对生精细胞进行相

关指标检测。

8 观察指标及检验方法

8.1 UU 阳性率检测 以无菌操作取右侧部分睾丸组织置于 UU 培养基中, 置 37 ℃温箱中孵育 24 h 后观察结果。培养 24 h 培养基变为红色且液体无明显浑浊为阳性, 培养 48 h 培养基颜色仍未变成红色为阴性。比较各组 UU 阳性率。

8.2 精子悬液的制备及活力的检测 以无菌操作取附睾组织, 用 37 ℃预温的 PBS 冲洗 1 遍, 然后将附睾尾放入盛有 3 mL 37 ℃预温的 PBS 液培养皿中。用无菌手术刀从附睾尾近侧端至输精管深切 4 ~ 5 次, 避免切口暴露在空气中以避免精子暴露于空气中而死亡。将含精子的培养皿置 37 ℃ CO₂ 培养箱中, 扩散 5 min, 用镊子去除残余组织及未充分扩散的精子块, 得到精子悬液。用 PBS 液采用 1:9 稀释, 轻轻摇晃混匀后置于 37 ℃显微镜载物台上, 显微镜采用 X4 反相物镜, 用显微摄像机和录像机记录精子运动图像, 并用彩色精子动态检测系统进行精子运动参数测定。

8.3 生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 表达测定 采用 Real-time PCR 方法检测。采用 TRIzol 法提取生精细胞中的总 RNA, 用核酸蛋白分析仪测得 RNA 的纯度和浓度, 取 1 μg 总 RNA 进行逆转录合成 cDNA, 逆转录操作步骤和反应体系参照逆转录试剂盒, 实验所得 cDNA - 20 ℃保存。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 按 Keygen 一步法试剂盒说明进行。扩增体系: SYBRGreen Mix 32.5 μL; 上游引物 F 0.5 μL; 下游引物 R 0.5 μL; ddH₂O 水 14.5 μL; cDNA 模板 2 μL; 总体积 50 μL, 扩增条件: 95 ℃ 10 min; 95 ℃变性 30 s; 60 ℃退火 45 s; 72 ℃延伸, 1 min; 40 个循环; 采用仪器自带软件 ABI PRISM 7300 SDS 软件分析数据, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	引物序列	长度
TRPV1	上游: 5'ACACCAATGTGGGTATCATC3'	116 bp
	下游: 5'GGCAAAGTCTTCCAGTTTC3'	
TRPV5	上游: 5'TGTCTTTGCTGCTGTG3'	225 bp
	下游: 5'GGGTGAGTCCTTGTTGTTG3'	
GAPDH	上游: 5'GTCGGTGTGAACGGATTG3'	181 bp
	下游: 5'TCCCATCTCTCAGCCTTGAC3'	

8.4 生精细胞 TRPV1、TRPV5 蛋白表达测定 采用 Western blot 法。细胞裂解法提取总蛋白, 酚试剂法测定蛋白浓度, 100 μL 蛋白加入等体积上样缓冲液, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, NC 膜印迹。加入一抗(1:400)和二抗(1:2 000), 室温下分别孕育

2 h, DAB 显色。采用全自动数码凝胶成像系统成像。以 GAPDH 为内参照,运用 scion Image 软件对蛋白电泳带进行灰度值检测,以目标蛋白灰度值 GAPDH 条带值来表示目标蛋白的相对含量,然后再对比值进行比较。

9 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态性和方差齐性的数据,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 法。不符合正态性和方差齐性的数据,采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 UU 阳性率比较 正常对照组并未发现 UU 阳性,模型对照组 UU 阳性率为 86.7% (13/15),阿奇霉素组 UU 阳性率为 26.7% (4/15),知柏地黄汤组检测阳性率为 33.3% (5/15)。与正常对照组比较,模型对照组 UU 阳性率高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,知柏地黄汤组、阿奇霉素组 UU 阳性率明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);知柏地黄汤组与阿奇霉素组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 各组大鼠精子活力运动参数比较(表 2) 与正常对照组比较,模型对照组大鼠 a 及 b 级精子减少,直线速度、平均速度降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较,知柏地黄汤组和阿奇霉素组 a 及 b 级精子增多,直线速度、曲线速度及平均速度提高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。知柏地黄汤组 a 及 b 级精子增多,曲线速度、平均速度提高均优于阿奇霉素组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各组大鼠生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 及蛋白表达结果比较(表 3、4) 与正常对照组比较,模型对照组大鼠生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达下降 ($P < 0.01$);与模型对照组比较,知柏地黄汤组及阿奇霉素组 TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$),且知柏地黄汤组 TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达水平升高优于阿奇霉素组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠生精细胞 TRPV1、TRPV5 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TRPV1 mRNA	TRPV5 mRNA
正常对照	15	1.764 ± 0.438	1.597 ± 0.545
模型对照	15	0.622 ± 0.051 *	0.41 ± 0.037 *
知柏地黄汤	15	1.705 ± 0.447 Δ Δ	1.584 ± 0.393 Δ Δ
阿奇霉素	15	1.250 ± 0.201 Δ	1.064 ± 0.192 Δ

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型对照组比较, Δ $P < 0.01$;与阿奇霉素组比较, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.01$;下表同

表 4 各组大鼠生精细胞 TRPV1、TRPV5 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TRPV1 蛋白	TRPV5 蛋白
正常对照	15	1.379 ± 0.218	0.590 ± 0.060
模型对照	15	0.562 ± 0.082 *	0.250 ± 0.031 *
知柏地黄汤	15	1.331 ± 0.204 Δ Δ Δ	0.545 ± 0.070 Δ Δ Δ
阿奇霉素	15	0.895 ± 0.159 Δ	0.368 ± 0.071 Δ

讨 论

UU 感染所致的生精细胞线粒体结构、功能异常是引起精子活力下降的关键机制,线粒体是精子呼吸的主要场所,通过氧化磷酸化作用合成 ATP,为精子的运动提供能量,而 ATP 的合成过程与线粒体内的电子传递有关,电子传递所形成的线粒体膜电位的维持对线粒体正常功能的实现极其重要,膜电位的下降会导致 ATP 合成不足,影响细胞正常的生命活动,膜电位的丧失可导致精子细胞凋亡与坏死^[4]。TRPV1 属于 TRP 离子通道家族,是一种非选择性阳离子配体门控通道。近有实验研究表明,TRPV 配体(无论激动剂还是拮抗剂)均可通过降低线粒体膜电位,影响线粒体功能及能量代谢,最终导致精子运动功能障碍^[5]。此作用过程可能通过调节 TRPV1 离子通道开放,增加胞内 Ca^{2+} ,导致线粒体膜电位下降;或者通过非 TRPV1 依赖的途径直接影响线粒体功能,甚至能够产生形态变化的特性细胞凋亡和(或)坏死^[6]。而另一种 TRP 的亚族成员 TRPV5,是新发现的高选择性的 Ca^{2+} 跨膜转运通道,其主要负责 Ca^{2+} 由细胞外向细胞内的主动跨膜运输,在机体内参与多项生理活动的调节,在雄性生殖细胞,胞内 Ca^{2+} 浓度是调节精子及生精细胞不同水平生理活动的重要转导因素之一^[7,8],

表 2 各组大鼠精子活力运动参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	a 级精子 (%)	b 级精子 (%)	直线速度 ($\mu\text{m/s}$)	曲线速度 ($\mu\text{m/s}$)	平均速度 ($\mu\text{m/s}$)
正常对照	15	1.03 ± 0.09	2.07 ± 0.52	10.95 ± 0.98	42.03 ± 1.35	16.22 ± 1.52
模型对照	15	0.07 ± 0.03 *	0.35 ± 0.13 *	6.78 ± 1.05 *	38.10 ± 7.65	10.05 ± 1.80 *
知柏地黄汤	15	1.11 ± 0.30 Δ	2.40 ± 0.59 Δ	12.11 ± 1.62 Δ Δ	54.30 ± 2.35 Δ	18.40 ± 1.27 Δ
阿奇霉素	15	0.60 ± 0.19 Δ Δ Δ	1.32 ± 0.27 Δ Δ	11.47 ± 1.21 Δ	45.75 ± 1.64 Δ Δ Δ	16.69 ± 1.02 Δ Δ Δ

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型对照组比较, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.01$;与知柏地黄汤组比较, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.01$

由于 TRPV5 是调节细胞 Ca^{2+} 平衡的重要因素,其功能异常引起 Ca^{2+} 代谢紊乱及细胞因子网络调控失调在炎症过程中发挥作用,也会导致精子活力运动降低^[9,10]。因此,从 TRPV1、TRPV5 介导的膜电位改变及 Ca^{2+} 跨膜运转过程来探讨 UU 感染性不育症的病理机制可能成为当今男性不育症研究新的切入点,其病理机制过程也必将成为药物治疗的新靶点。因此,本实验以知柏地黄汤为干预因素,对 TRPV1、TRPV5 在生精细胞中的表达改变进行探讨。

六味地黄汤滋阴补肾,主治肾阴不足,虚火上炎之证,《医方论》说:“此方非但治肝肾不足,实三阴并治之剂,有熟地之滋补肾水,即有泽泻之宣泄肾浊以济之;有萸肉之温涩肝经,即有丹皮之清泻肝火以佐之;有山药之收敛脾经,即有茯苓淡渗脾湿以和之。药只六味,而有开有合,三阴并治,洵补方之正部也。”再加之黄柏、知母相须为用,不仅能长于清相火,退虚热,且有泻火解毒之功,综观全方,滋阴补肾、清热利湿、活血化瘀,颇合 UU 感染性不育肾虚为本,湿热为标之病机。同时,临床以知柏地黄汤为主加减治疗因 UU 感染型男性不育,收到了较好的效果^[11]。现代分子医学认为西药在抗微生物的治疗效果上普遍优于中药,而本实验结果知柏地黄汤在抗 UU 水平与阿奇霉素相当,其机制可能与黄柏的药理活性有关,近年来有关文献记载黄柏在抗炎、抗菌、抗病毒、抗溃疡、抗氧化对保护肝脏、胃肠道、前列腺、免疫系统等多方面疾病具有广泛作用^[12]。

实验结果得知 UU 感染模型对照组大鼠的精子活力与正常对照组相比显著降低($P < 0.01$),表明 UU 感染导致大鼠精液质量降低,此方法可以复制比较理想的 UU 感染性不育症大鼠模型,而模型对照组大鼠生精细胞中 TRPV1、TRPV5 的表达也较正常对照组明显下降($P < 0.01$),表明 UU 感染对 TRPV1、TRPV5 表达产生了明显的抑制作用,说明瞬时受体电位蛋白家族 TRPV1、TRPV5 的表达降低,可能是 UU 感染导致生精细胞异常,精液质量低下最终导致不育症的关键机制之一。与模型对照组相比,知柏地黄汤组可明显上调 TRPV1、TRPV5 mRNA 和蛋白表达量($P < 0.01$)、明显提高大鼠精子质量($P < 0.01$),且与阿奇霉素组相比,提高 TRPV1、TRPV5 的幅度与精液质量更加明显($P < 0.01$, $P < 0.05$),进一步说明了知柏地黄汤具有防治 UU 感染性不育症的作用,且知柏地黄汤在抗 UU 感染方面与阿奇霉素的作用基本相当。

综上,大鼠生精细胞中 TRPV1、TRPV5 表达量的降低可能是 UU 感染后精子质量低下的机制之一,知

柏地黄汤通过上调生精细胞中的 TRPV1、TRPV5 基因和蛋白的表达起到治疗 UU 感染不育症的作用,也提示 TRPV1、TRPV5 可能是 UU 感染导致精子质量下降治疗药物的作用靶点之一。然而, UU 感染导致精子质量低下发生的机制是多途径的,且 TRPV1 与 TRPV5 的改变对生精细胞的功能具体分子机制也尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Miron ND, Socolov D, Mare M, et al. Bacteriological agents which play a role in the development of infertility [J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2013, 60(1): 41-53.
- [2] 李楠,林鸿春,聂晶,等.解脲支原体感染动物模型的研究进展[J].中国性科学,2015,24(1):64-66.
- [3] 刘朝圣,卢芳国,何清湖,等.知柏地黄汤对解脲支原体感染大鼠生精细胞凋亡及 Caspase-3、Caspase-9 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(9):1254-1258.
- [4] Gao J, Sana R, Calder V, et al. Mitochondrial permeability transition pore in inflammatory apoptosis of human conjunctival epithelial cells and T cells: effect of cyclosporin A [J]. Invest Ophthalmol Visl Sci, 2013, 54(7): 4717-4733.
- [5] 李世林,王怀鹏,蔡伟山. TRPV1 离子通道对精子线粒体膜电位的影响[J].临床医学工程,2011,18(8):1161-1163.
- [6] Andriani A, Paul AS, Sara V, et al. Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause nonvanilloid receptor mediated cell death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(1): 50-55.
- [7] Geraci F, Giudice G. Mechanisms of Ca^{2+} liberation at fertilization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(2): 265-269.
- [8] Chen CF, Hess P. Mechanism of gating of T-type calcium channels [J]. J Gen Physiol, 1990, 96(3): 603-630.
- [9] Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular basis of epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport: insights from the TRP channel family [J]. Physiology, 2011, 589(Pt 7): 1535-1542.
- [10] 樊松,梁朝朝,郝宗耀,等.新型钙通道 TRPV5 在慢性前列腺炎患者前列腺上皮细胞中的表达及其意义[J].中国男科学杂志,2007,21(10):12-15.
- [11] 郭军华,何清湖.滋阴补肾方治疗解脲支原体感染性不育的临床疗效观察[J].中华中医药杂志,2014,29(6):2053-2056.
- [12] 都日娜,乌日娜.黄柏的研究进展[J].中国民族医药杂志,2008,14(3):75.

(收稿:2014-09-10 修回:2015-07-10)