

## 五子衍宗丸对少弱精子症小鼠生精功能、IP6K1 表达及线粒体 DNA 甲基化影响

高瑞芳<sup>1</sup>, 孙丽丽<sup>1</sup>, 张桂贤<sup>1</sup>, 李霞<sup>1</sup>, 王曼雪<sup>1</sup>, 于晓猛<sup>1</sup>, 纪爱玲<sup>1</sup>, 杨洁<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 胡思科<sup>1</sup>, 李文畅<sup>1</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 刘洪斌<sup>1,2\*</sup>

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020
2. 天津市和平区卫生健康委员会, 天津 300041

**摘要:** 目的 探讨五子衍宗丸对少弱精子症小鼠生精功能、六磷酸肌醇激酶 1 (IP6K1) 表达及线粒体 DNA (mtDNA) 甲基化的影响。方法 将雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组及五子衍宗丸 (1、2、4 g/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其他各组单次 ip 40 mg/kg 白消安。从造模第 2 天开始, 各组按剂量 ig 给药, 给药 4 周后计算睾丸和附睾脏器系数, 检测精子数量和活力, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察小鼠睾丸病理组织学改变, TUNEL 染色观察睾丸细胞凋亡情况, RT-qPCR、Western blotting 和免疫组化 (IHC) 染色检测 IP6K1 表达, Western blotting 检测 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 表达, 焦磷酸测序检测 mtDNA D-loop 甲基化, RT-qPCR 检测线粒体基因表达。结果 五子衍宗丸可恢复少弱精子症小鼠的睾丸和附睾系数, 显著提高精子数量和活力, 明显改善睾丸组织病理学损伤和生精细胞的凋亡, 显著促进 IP6K1 的表达, 显著抑制 DNMT1 表达和线粒体 D-loop 甲基化水平, 显著上调线粒体编码基因的表达 ( $P < 0.5$ 、 $0.1$ 、 $0.001$ )。结论 五子衍宗丸可改善少弱精子症小鼠的生精功能, 其机制可能与促进 IP6K1 表达, 抑制 DNMT1/mtDNA D-loop 甲基化, 进而促进线粒体编码基因的表达有关。

**关键词:** 五子衍宗丸; 白消安; 少弱精子症; 六磷酸肌醇激酶 1; 线粒体 DNA 甲基化; 甲基转移酶 1

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)08-1944-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.08.002

## Effects of Wuzi Yanzong Pills on spermatogenesis, IP6K1 expression and mitochondrial DNA methylation in oligoasthenospermia mice

GAO Ruifang<sup>1</sup>, SUN Lili<sup>1</sup>, ZHANG Guixian<sup>1</sup>, LI Xia<sup>1</sup>, WANG Manxue<sup>1</sup>, YU Xiaomeng<sup>1</sup>, JI Ailing<sup>1</sup>, Yang Jie<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, HU Sike<sup>1</sup>, LI Wenchang<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, LIU Hongbin<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China
2. Health Commission of Tianjin Heping District, Tianjin 300041, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Wuzi Yanzong Pills on spermatogenesis, expression of inositol hexaphosphate kinase 1 (IP6K1) and methylation of mitochondrial DNA (mtDNA) in oligoasthenospermia mice. **Methods** Male BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, and Wuzi Yanzong Pills (1, 2, and 4 g/kg) group, with 10 mice in each group. Except the control group, the other groups were given 40 mg/kg intraperitoneal injection. Starting from the second day of model making, each group was given the drug by intragathly according to dose. After 4 weeks of administration, the coefficients of testis and epididymis organs were calculated, the sperm number and vitality were detected, the histopathological changes of testis were observed by HE staining, and the apoptosis of testicle cells was observed by TUNEL staining. The expression of IP6K1 was detected by RT-qPCR, Western blotting and immunohistochemistry (IHC). The expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) was detected by Western blot, the D-loop methylation of mtDNA was detected by pyrosequencing, and the mitochondrial gene expression was detected by RT-qPCR. **Results** Wuzi Yanzong Pills could partially restore the testicular and epididymal coefficients of oligoasthenospermia mice, significantly increase sperm count and motility, significantly improve testicular histopathological injury and spermatogenic cell

收稿日期: 2024-06-20

基金项目: 天津市卫健委、天津市中医药管理局中医中西医结合科研项目 (2021071, 2021072)

作者简介: 高瑞芳, 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为中医药治疗精子生成障碍。E-mail: gaoruifang2012@163.com

\*通信作者: 刘洪斌 E-mail: jtss@sina.com

apoptosis, and significantly promote the expression of IP6K1. DNMT1 expression and mitochondrial D-loop methylation levels were significantly inhibited, and the expression of mitochondrial coding genes was significantly up-regulated ( $P < 0.5, 0.1, 0.001$ ). **Conclusion** Wuzi Yanzong Pills can improve the spermatogenic function of oligoasthenospermia mice, and its mechanism may be related to promoting the expression of IP6K1, inhibiting DNMT1/mtDNA D-loop methylation, and promoting the expression of mitochondrial coding genes.

**Key words:** Wuzi Yanzong Pills; busulfan; oligoasthenospermia; IP6K1; mtDNA methylation; DNMT1

不孕不育是一个全球性问题。据世界卫生组织(WHO)统计, 10%~15%的育龄夫妇不孕, 其中50%的不孕病例是由男性不育引起的<sup>[1]</sup>。少弱精子症在男性不育中最为多见, 发病率约占75%<sup>[2]</sup>。因此, 积极治疗少弱精子症对于解决不孕不育问题具有非常重要的意义。中医学中无“少弱精子症”的病名, 多归属于“精少、精薄、精冷、精清”等范畴, 其病机以肾精亏虚为主, 夹杂血瘀、湿热、痰浊、气滞等, 病位多在肾、肝、脾, 补肾填精法是治疗少弱精子症的根本大法<sup>[3-4]</sup>。由五味子、菟丝子、枸杞子、覆盆子和车前子5味中药组成的五子衍宗丸具有补肾填精的功效, 现已成为临床治疗少弱精子症的常用方和基本方<sup>[5-8]</sup>, 但其作用机制有待进一步深入探讨。

六磷酸肌醇激酶1(IP6K1)被发现是唯一一种参与哺乳动物配子发生的肌醇多磷酸代谢酶<sup>[9]</sup>。它可通过调控小分子信使5-焦磷酸-五磷酸肌醇(5-IP7)的产生及其在细胞内的含量来影响各种细胞过程和功能<sup>[10-12]</sup>。研究发现, IP6K1在精子发生中发挥关键作用, 敲除IP6K1可导致雄性小鼠生育力急剧下降<sup>[12-14]</sup>, 但IP6K1在少弱精子症中的作用尚未报道。研究表明, IP6K1可调控DNA甲基化水平<sup>[15]</sup>。IP6K1的产物IP7可抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B1(PI3K/Akt)通路中Akt的活化<sup>[16]</sup>, 而PI3K/Akt通路可通过促进DNA甲基转移酶1(DNMT1)的表达增加下游基因的甲基化<sup>[17]</sup>。线粒体DNA(mtDNA)甲基化是近年研究的一个新领域<sup>[18-20]</sup>。最新研究显示, 线粒体中DNMT1的增多, 可引起mtDNA的唯一非编码区—D环区(D-loop区)高甲基化、mtDNA基因转录抑制以及线粒体氧化磷酸化功能损伤<sup>[21]</sup>, 而线粒体对生殖细胞分裂、凋亡和分化, 以及精子活力至关重要, 其功能异常会严重影响男性生育力<sup>[22-24]</sup>。

基于此, 本研究通过建立白消安诱导的少弱精子症小鼠模型, 观察五子衍宗丸对少弱精子症小鼠生精功能的改善情况, 并进一步探究五子衍宗丸对IP6K1表达和mtDNA甲基化的影响, 以期治疗

少弱精症提供新的治疗靶点与策略, 并为五子衍宗丸的临床推广应用提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF级雄性BALB/c小鼠50只8~9周龄, 体质量22~25g, 从北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]购得, 饲养于天津市医药科学研究所SPF级动物房[SYXK(津)2021-0005]。实验动物饲养条件为: 23~25℃, 相对湿度40%~70%, 光照和黑暗各12h交替, 饮用水进行高温高压灭菌处理, 饲料进行辐照处理, 动物摄食和饮水自由。动物实验通过天津市医药科学研究所实验动物伦理委员会批准(IMPS-EAEP-Z-2021071), 实验过程遵循3R原则。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 五子衍宗丸(北京同仁堂股份有限公司, 批号CQP-TB235, 规格10g/100粒); 白消安(上海麦克林生化科技有限公司, 货号55-98-1); TUNEL试剂盒(美国Promega公司, 货号CQP-TB235); TRIzol试剂盒(美国Invitrogen公司, 货号15596018CN); TransScript第一链cDNA Synthesis SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术有限公司, 货号AT301-02); TransStart Top Green qPCR SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术有限公司, 货号AQ131-02); 血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 货号DP304); 焦磷酸测序上机试剂盒PyroMark Q48 Advanced Reagents(美国凯杰公司, 货号974002); EZ DNA Methylation-Gold™试剂盒(美国Zymo Research公司, 货号D5006); 组织线粒体分离试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 货号C3606); BCA试剂盒(美国Thermo公司, 货号23227); IP6K1抗体(美国Invitrogen公司, 货号PA5-21531); DNMT1抗体(美国CST公司, 货号5032);  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)抗体(美国CST公司, 货号2144); 电压依赖性阴离子通道蛋白(VDAC)抗体(美国CST公司, 货号4866)。

ML-608JZ III精子分析仪(南宁松景天伦生物

科技有限公司), qtower3G touch 实时荧光定量 PCR 仪(德国 analytikjena 公司), PyroMark Q48 Autoprep 焦磷酸测序仪(德国 Qiagen 公司), FC5515R 小型台式高速冷冻离心机(美国 OHAUS 公司), 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳系统(美国 Bio-rad 公司), Tanon-5200 化学发光成像系统(上海天能生命科技有限公司), Nikon Eclipse E100 正置荧光显微镜(日本 Nikon 尼康株式会社), Spark 多功能微孔板检测仪(瑞士 Tecan 公司), TEC5 组织包埋机(日本樱花检验仪器株式会社), RM2235 组织切片机(德国 Leica 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 造模、分组及给药** 雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、五子衍宗丸(1、2、4 g/kg)组, 每组 10 只。根据已报道的方法进行造模<sup>[25]</sup>, 模型组每只小鼠单次 ip 40 mg/kg 白消安。各给药组小鼠于制模后第 2 天起 ig 五子衍宗丸, 给药剂量按照小鼠与人的等效剂量折算, 即小鼠剂量(mg/kg) = 9.1 × 人的剂量(mg/kg), 五子衍宗丸各剂量组的用药量分别为 1、2、4 g/kg, 1 次/d, 持续至制模后第 4 周。模型组和对照组 ig 等量的水。在第 4 周, 分别取材小鼠睾丸和附睾组织用于指标检测。

**1.2.2 睾丸、附睾质量及其脏器系数** 小鼠称质量, 麻醉后处死, 立即取出双侧睾丸和附睾, 称质量, 计算脏器系数。

脏器系数 = 脏器质量/体质量

**1.2.3 精子浓度和活力分析** 取小鼠左侧附睾尾部放入 100 μL 37 °C 预热的生理盐水中, 用眼科剪从中间剪一刀, 使附睾尾部精子上游, 在 37 °C 培养箱中孵育 10 min 后, 利用计算机辅助精液分析系统检测精子密度和活力等参数。按照载玻片上、中、下、左、右连续采集 5 个视野图像, 取平均值作为检测结果。图像采集完成后, 调节灰度值, 通过自动跟踪, 完成对精子密度和活力等参数的检测。每只小鼠检测 2 个样品, 如果 2 个样品检测的精子密度和活力等参数相差 5% 以上, 说明检测的样本不均匀, 则重新检测。

**1.2.4 苏木精 - 伊红(HE)染色分析** 石蜡包埋后, 连续切片至 5 μm 厚, 用 HE 染色评价睾丸组织病理学特征。动物分组情况对阅片人员保密, 并由 2 位高级职称的病理专业技术人员各自独立阅片, 若 2 者评估结果差距较大则交由第 3 人进行评阅。

**1.2.5 TUNEL 染色分析** 石蜡包埋的睾丸组织, 依

次经脱蜡、水化、固定、穿透, 再固定和平衡后, 滴加 TdT 酶反应液进行荧光标记, 37 °C 孵育 60 min 终止反应后进行 DAPI 染核, 染色完成后用荧光淬灭剂进行封片, 最后利用荧光显微镜观察和拍照。每张片子随机选取 6 个视野, 采用 Image-J 8.0 软件统计每个视野中绿色阳性细胞数, 以阳性细胞数计算 TUNEL 阳性细胞率。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析** 使用 TRIzol 提取总 RNA, 并根据制造商的建议使用 TransScript 第一链 cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒进行反转录。RT-qPCR 采用 qtower3G touch PCR 仪和 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒进行。GAPDH 作为标准化对照, 引物序列见表 1。

**1.2.7 Western blotting 分析** 睾丸组织用组织匀浆器研磨之后用 PBS 洗涤, 并在 RIPA 缓冲液中冰浴 30 min。裂解液在 4 °C 下 13 000 r/min 离心 15 min。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因	引物	序列 (5'-3')
IP6K1	上游	GGGAACAGCGCTTCTACGAG
	下游	ACAGACAGAAACCACGCCTTT
ND1	上游	TCCGAGCATCTTATCCACGC
	下游	GTATGGTGGTACTCCCGCTG
ND2	上游	ATCCTCCTGGCCATCGTACT
	下游	ATCAGAAGTGGAAATGGGGCG
ND3	上游	GTTGCATTCTGACTCCCCCA
	下游	GGTAGACGTGCAGAGCTTGT
ND4	上游	TAATCGCACATGGCCTCACA
	下游	GCTGTGGATCCGTTTCGTAGT
ND4L	上游	ACCTCACCATAGCCTTCTCAC
	下游	GCAGGCTGCGAAAATAAGA
ND5	上游	TAACCGCATCGGAGACATCG
	下游	GTGGAGGCCAAATTGTGCTG
ND6	上游	CCCGCAAACAAAGATCACCC
	下游	GTTGGAAGGAGGGATTGGGG
CYTB	上游	ACGCAAACGGAGCCTCAATA
	下游	CCTCATGGAAGGACGTAGCC
COX1	上游	CAAAAGCCCACTTCGCCATC
	下游	AGGCCAGGAAATGTTGAGG
COX2	上游	AACCGAGTCGTTCTGCCAAT
	下游	CTAGGGAGGGGACTGCTCAT
COX3	上游	GCCTTTTCAGCCCTCCTTCT
	下游	GAGTGTGGTGGCCTTGGTAG
ATP6	上游	TCACTTGCCCACTTCCTTCC
	下游	TTAGCTGTAAGCCGGACTGC
ATP8	上游	AACATTCCCCTGGCACCTT
	下游	TGTTGGGGTAATGAATGAGGCA
GAPDH	上游	AGAGGGAAATCGTGCCTGAC
	下游	AAGAAGGAAGGCTGGAAAA

线粒体蛋白的提取则先将新鲜的睾丸组织剪碎，用线粒体分离试剂进行低温匀浆，通过低温差速离心法筛选获得完整的线粒体（粗提），然后再使用线粒体分离试剂盒以进一步提纯获得的线粒体，最后提取蛋白。裂解液的蛋白浓度通过 BCA 法测定。样品经 10% SDS-PAGE 分离后转移到硝化纤维素膜上。在室温下，用 5% 的脱脂牛奶封闭膜 1 h，然后用相应的抗体在 4 °C 下孵育过夜。用对应的辣根过氧化物酶偶联二抗孵育后，使用化学发光检测系统采集图像。使用的一抗包括 IP6K1 (1:1 000)，DNMT1 (1:1 000)，VDAC (1:1 000) 和  $\alpha$ -Tubulin 抗体 (1:5 000)。

**1.2.8 免疫组化(IHC)分析** 石蜡包埋的睾丸组织切片，依次经过脱蜡、抗原修复、去除内源性过氧化物酶后，用 5% 的山羊血清封闭 1 h 后，4 °C 条件下与 IP6K1 抗体孵育过夜，然后用过氧化物酶 HRP 偶联的二抗在 37 °C 条件下孵育 30 min，用 DAB 进行显色后，再依次进行苏木染核、脱水透明后进行封片，显微镜观察并采集图像。按照已报道的方法进行 IHC 染色评分<sup>[26]</sup>，根据细胞染色强度（阴性、淡黄色、棕黄色、棕褐色）评为 4 级，分别计 0 分、1 分、2 分和 3 分；根据阳性细胞百分比评为 4 级，阳性细胞百分比  $\leq 25\%$  计 1 分，26%~50% 计 2 分，51%~75% 计 3 分， $>75\%$  计 4 分，将 2 项评分相乘得出最终评分结果。

**1.2.9 焦磷酸测序检测 mtDNA 甲基化** 取睾丸组织约 30 mg，使用基因组 DNA 试剂盒提取 DNA。使用 EZ DNA 甲基化试剂盒将 200~500 ng 基因组 DNA 进行亚硫酸转化。PCR 扩增 mtDNA 目的片段，PCR 引物用 PyroMark Assay Design 2.0 软件设计，通过对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测目的 DNA 片段的存。应用 PyroMark Q48 Autoprep 焦磷酸测序仪检测 mtDNA 的甲基化水平，用 PyroMark Q48 Autoprep 4.2.1 软件定量 DNA 甲基化水平，计算各个 CpG 位点的甲基化水平的平均值作为结果。所用引物序列为：D-Loop 前引物 5' - GTTTATTAAATTTGGGGGTAGTTAAATTGA-3'；D-Loop 后引物 5' -ATACCAAATACATAACACCA CAAT-3'；D-Loop 测序引物 5' -ATTTGGTTTTTA TTTTAGGGT-3'。

### 1.3 统计学分析

所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示，并使用 GraphPad Prism 8 软件进行分析。多样本之间的组间比较采用

单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 2 结果

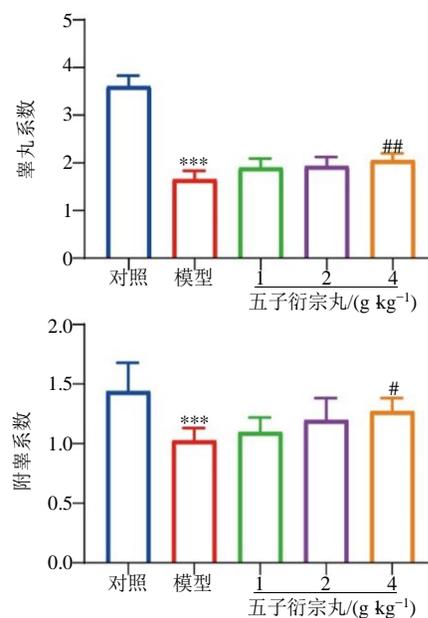
### 2.1 五子衍宗丸对小鼠睾丸及附睾的影响

与对照组相比，模型组小鼠睾丸体积明显减小，且睾丸和附睾系数显著降低 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比，五子衍宗丸各剂量组睾丸体积均有所恢复，其中五子衍宗丸 4 g/kg 组睾丸和附睾系数均显著提高 ( $P < 0.01$ 、0.05)，见图 1、2。



图 1 各组小鼠睾丸情况

Fig. 1 Testicular condition of mice in each group

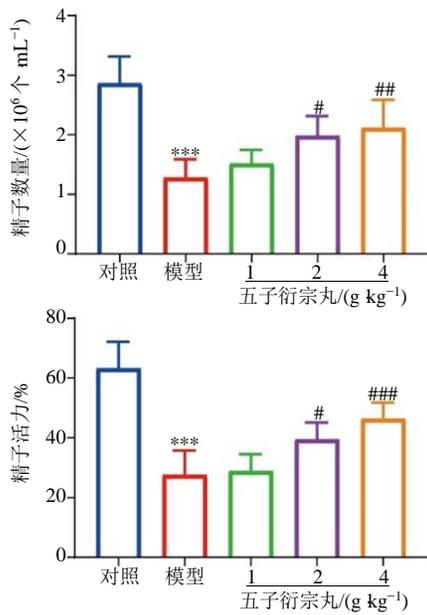


与对照组比较：\*\*\* $P < 0.001$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

图 2 各组小鼠睾丸和附睾系数 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )  
Fig. 2 Testicular and epididymal coefficients of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

### 2.2 五子衍宗丸对小鼠精子数量和活力的影响

精子参数分析结果显示，与对照组相比，模型组小鼠精子数量和活力均显著降低 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比，五子衍宗丸 2、4 g/kg 组精子数量和活力均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)，见图 3。



与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ 。  
<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs model group.

图 3 各组小鼠精子数量及活力 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
 Fig. 3 Sperm count and motility of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

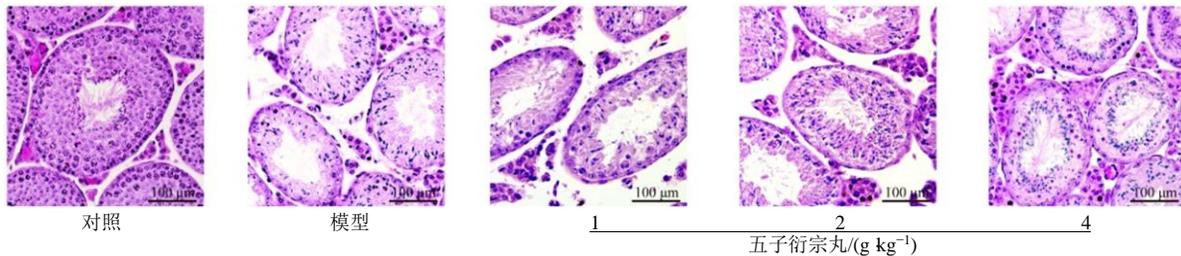
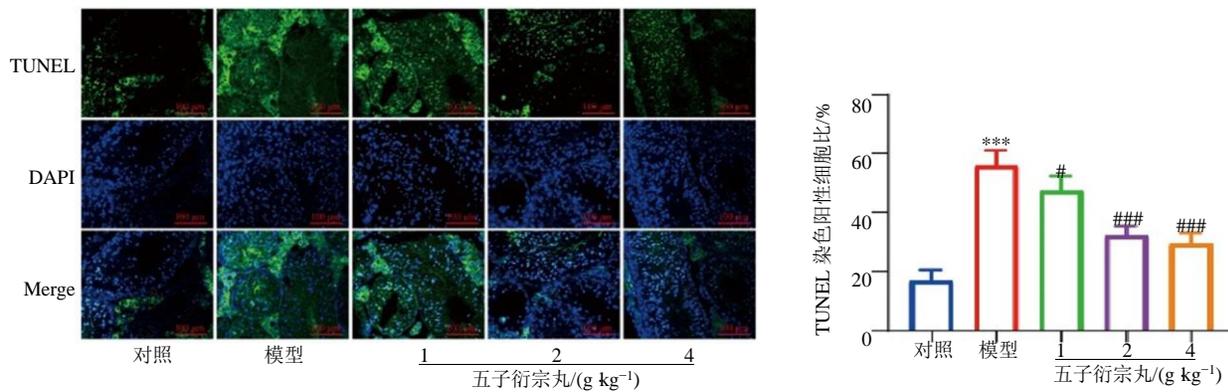


图 4 各组小鼠睾丸组织病理学检测 (HE,  $\times 200$ )  
 Fig. 4 Histopathological examination of testis in each group (HE,  $\times 200$ )



与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ 。  
<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs model group.

图 5 TUNEL 染色检测各组小鼠睾丸组织细胞凋亡情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
 Fig. 5 Apoptosis of testicular tissue was detected by TUNEL staining ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 2.3 五子衍宗丸对小鼠睾丸组织病理学的影响

HE 染色结果显示, 对照组小鼠睾丸组织内生精小管管径较大, 连接较紧密, 各级生精细胞排列整齐, 分化正常, 管腔内可见致密精子。与对照组相比, 模型组小鼠生精小管明显皱缩, 生精细胞的数量显著减少, 排列紊乱, 层次不清, 分化异常, 管腔内精子数量明显减少。与模型组相比, 五子衍宗丸各剂量组小鼠睾丸生精上皮细胞的损伤程度明显减轻, 生精上皮明显增厚, 精子分化过程明显改善, 生成的精子数量明显增加, 且与五子衍宗丸的剂量呈现一定的相关性, 见图 4。

### 2.4 五子衍宗丸对小鼠 TUNEL 阳性细胞的影响

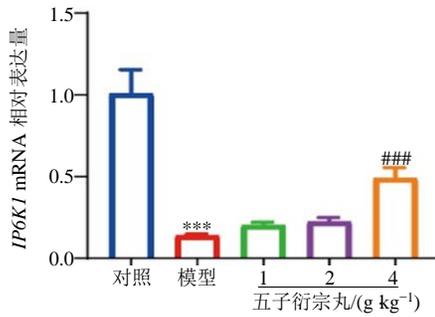
TUNEL 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠睾丸组织 TUNEL 阳性细胞比例显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比, 五子衍宗丸各剂量组睾丸组织 TUNEL 阳性细胞比例显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 且呈剂量相关性, 见图 5。

### 2.5 五子衍宗丸对小鼠睾丸组织 IP6K1 相对表达的影响

RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠睾丸组织中 IP6K1 mRNA 水平显著降低 ( $P <$

0.001)。与模型组相比,五子衍宗丸 4 g/kg 组睾丸组织 *IP6K1* mRNA 水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 见图 6。

Western blotting 及 IHC 染色结果显示,与对照组相比,模型组小鼠睾丸组织中 *IP6K1* 的蛋白水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比,五子衍宗丸 2、4 g/kg 组睾丸组织 *IP6K1* 的蛋白水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 见图 7~9。



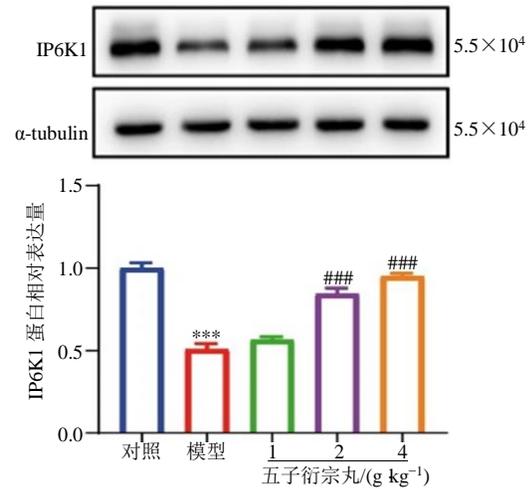
与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs model group.

图 6 各组小鼠睾丸组织 *IP6K1* mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 6 Relative expression of *IP6K1* mRNA in testicular tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

## 2.6 五子衍宗丸对小鼠睾丸组织 DNMT1 表达和 mtDNA 甲基化的影响

Western blotting 结果显示,与对照组相比,模



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs model group.

图 7 各组小鼠睾丸组织 *IP6K1* 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 7 Relative expression of *IP6K1* protein in testicular tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

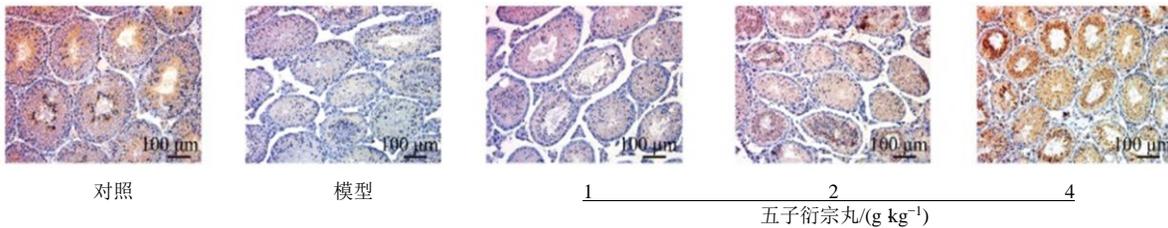
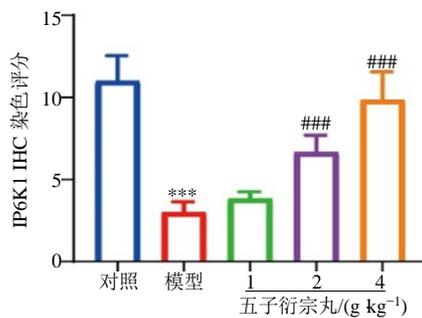


图 8 IHC 染色检测各组小鼠睾丸组织 ( $\times 200$ )

Fig. 8 IHC staining was used to detect testicular tissue of mice in each group ( $\times 200$ )



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs model group.

图 9 各组小鼠睾丸组织 *IP6K1* IHC 染色检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

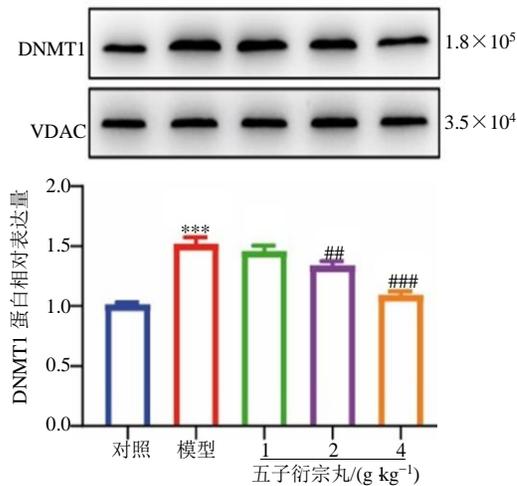
Fig. 9 Results of *IP6K1* IHC staining in testicular tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

型组小鼠睾丸组织中线粒体 DNMT1 的蛋白表达显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比,五子衍宗丸 2、4 g/kg 组睾丸组织线粒体 DNMT1 的蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.01, 0.001$ ), 见图 10。

焦磷酸测序结果显示,与对照组相比,模型组小鼠睾丸组织 mtDNA 的 D-loop 区甲基化水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,五子衍宗丸 2、4 g/kg 组睾丸组织 mtDNA 的 D-loop 区甲基化水平均显著降低 ( $P < 0.05, 0.001$ ), 见图 11。

## 2.7 五子衍宗丸对各组小鼠睾丸组织线粒体基因表达的影响

RT-qPCR 结果显示,与对照组相比,模型组小鼠睾丸组织中线粒体编码基因 *ND1*、*ND2*、*ND3*、



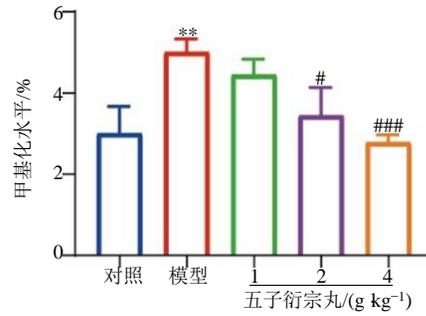
与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 10 Western blotting 检测各组小鼠睾丸组织线粒体 DNMT1 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 10 Relative protein expression of mitochondrial DNMT1 in testicular tissue of mice in each group was detected by Western blotting ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

ND4、ND4L、ND5、ND6、CYTB、COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8 的转录水平显著降低 ( $P <$



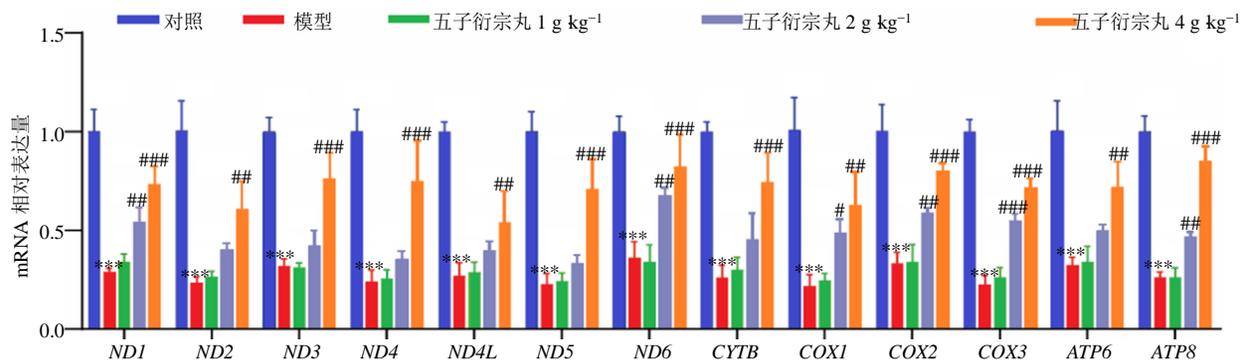
与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ### $P < 0.001$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 11 焦磷酸测序检测各组小鼠睾丸组织 mtDNA 的 D-loop 区甲基化水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 11 The methylation level of D-loop region of mtDNA in testicular tissue of mice in each group was detected by pyrosequencing ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

0.001)。与模型组相比,五子衍宗丸 2 g/kg 组睾丸组织中线粒体编码基因 ND1、ND6、COX1、COX2、COX3、ATP8 的转录水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ); 五子衍宗丸 4 g/kg 组睾丸组织中线粒体编码基因 ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6、CYTB、COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8 的转录水平均显著升高 ( $P < 0.01, 0.001$ ), 见图 12。



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 12 各组小鼠睾丸组织线粒体基因表达结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 12 Results of mitochondrial gene expression in testicular tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 3 讨论

近年来,中国男性不育症的发病率呈上升趋势,少弱精症是导致男性不育症的最常见原因。本研究发现五子衍宗丸能改善少弱精子症小鼠症状,部分恢复睾丸和附睾系数,提高精子数量和活力,改善睾丸组织病理学损伤和生精细胞的凋亡。发现五子

衍宗丸可上调 IP6K1 表达,抑制 DNMT1 表达及 mtDNA D-loop 甲基化水平,促进线粒体编码基因的表达。

少弱精子症属于中医“精少”“精清”的范畴,《内经》中指出“肾藏精,主生殖”,“肾气盛,精气溢泻,阴阳和,故能有子”,表明精子发生与肾精、

肾气关系密切。因此在中医临床中益肾填精法是治疗男性不育症的核心。五子衍宗丸具有补肾益精之功效,方中的菟丝子和枸杞子为君药,能补肾益精,补阴助阳;固肾涩精的覆盆子、五味子等为臣药;车前子利尿泻热为佐药,诸药合用,具有补中有泻、涩中有利、补阴扶阳的配伍特点,车前子以利尿泻热为佐药。临床上对男性不育症多以此方为基础进行加减治疗,能使精子密度和活动力得到改善,同时使女性的受孕率得到改善。研究表明,五子衍宗丸可促进雷公藤多苷诱导的生精障碍大鼠的生精功能,改善睾丸组织,提高精子数量和活率等<sup>[26]</sup>。以肾精亏虚的大鼠为模型研究显示,五子衍宗丸能够减少模型动物睾丸生精细胞的凋亡<sup>[27]</sup>。与以往研究相一致,在本研究中白消安诱导的少弱精子症小鼠经五子衍宗丸治疗后,睾丸组织得到了改善,精子数量和活力均得到了提高,睾丸组织细胞凋亡明显减少。

IP6K 是进化上高度保守的磷酸肌醇激酶,可催化六磷酸肌醇 (IP6) 生成小分子信使 5-焦磷酸 - 五磷酸肌醇 (PP-IP5 或 IP7)。IP7 在哺乳动物细胞中含量非常丰富,IP6K 可通过控制 IP7 的产生来调控细胞功能。哺乳动物的 IP6K 有 3 种亚型,即 IP6K1、IP6K2、IP6K3。研究表明,在雄性小鼠中敲除 IP6K1 会导致其生育力的急剧下降<sup>[13]</sup>,而敲除 IP6K2 和 IP6K3 的雄性小鼠可以正常繁殖<sup>[28-29]</sup>,表明在精子发生过程中 IP6K1 发挥独特作用。近期研究显示,IP6K1 在圆形精子细胞中高表达。IP6K1 缺失会造成精子细胞核伸长和浓缩缺陷,从而导致精子细胞分化失败<sup>[9]</sup>。除了在生殖细胞分化中的作用,近来研究发现 IP6K1 在雄性生殖细胞发育的多个方面都是必需的。IP6K1 敲除小鼠的顶端外质特化和管球复合体形成不良或破坏。敲除 IP6K1 会造成多种异常,包括圆形生殖细胞的脱落、长型精子细胞的畸形、顶体退化、生殖细胞与支持细胞相互作用缺陷、排精失败。最终造成精子细胞无法释放,而被支持细胞吞噬,导致附睾中没有精子<sup>[30]</sup>。本研究显示,在白消安诱导的少弱精子症小鼠模型的睾丸组织中 IP6K1 表达显著下调,而用五子衍宗丸进行治疗后,IP6K1 表达显著上调,且对五子衍宗丸的用药剂量存在一定的相关性。表明五子衍宗丸改善少弱精子症小鼠生精功能作用可能与调控 IP6K1 表达相关。

mtDNA 编码 13 个与氧化磷酸化相关的蛋白 (ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6、CYTB、

COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8),这些蛋白在线粒体氧化磷酸化和能量代谢过程中起关键作用。D-loop 区是 mtDNA 中的唯一非编码区,含有 mtDNA 复制起始点和转录启动子,是 mtDNA 复制和转录的主要调控区<sup>[31]</sup>。有研究发现在线粒体中存在 DNMT1,其含有 1 个线粒体靶向序列,可以易位到线粒体中,与 mtDNA 的 D-loop 区结合,在胞嘧啶甲基化(5mC)中发挥关键作用,这使得 mtDNA 甲基化成为越来越多学者关注的焦点。研究表明,mtDNA 甲基化水平与线粒体拷贝数和线粒体编码基因的表达相关,mtDNA 甲基化水平异常可导致线粒体的氧化磷酸化功能损伤,并与多种疾病密切相关<sup>[32]</sup>,但 mtDNA 甲基化在少弱精子症中的作用尚未报道。本研究发现,与对照组相比,少弱精子症小鼠模型组睾丸组织的线粒体 DNMT1 表达及 mtDNA D-loop 甲基化水平显著升高,mtDNA 编码的呼吸链基因表达显著降低。与模型组相比,随着五子衍宗丸剂量的升高,睾丸组织的线粒体 DNMT1 表达及 mtDNA D-loop 甲基化水平逐渐降低,呼吸链基因表达逐渐升高。这些结果提示,在小鼠少弱精子症中 DNMT1 可促进 mtDNA 的 D-loop 区甲基化,并抑制 mtDNA 编码的呼吸链基因的表达;五子衍宗丸可能通过抑制线粒体中 DNMT1 的表达而降低睾丸组织的 mtDNA D-loop 区的甲基化水平,进而促进线粒体呼吸链基因的表达,从而起到改善少弱精子症生精功能的作用。

IP6K1 可通过调控基因启动子的甲基化水平改变下游基因的表达水平。研究表明,IP6K1 可通过其产物 IP7 抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B1 (PI3K/Akt) 信号通路中 Akt 的活化<sup>[16]</sup>,而 PI3K/Akt 信号通路则可通过促进 DNMT1 的表达增加下游基因的甲基化<sup>[17]</sup>。在本研究中,相比对照组,模型组小鼠睾丸组织的 IP6K1 表达显著降低,而线粒体 DNMT1 表达及 mtDNA D-loop 区甲基化水平显著升高。与模型组相比,随着五子衍宗丸剂量的升高,IP6K1 表达水平逐渐升高,而线粒体 DNMT1 表达及 mtDNA D-loop 区甲基化水平逐渐降低。这提示,在少弱精子症小鼠中五子衍宗对 mtDNA 甲基化的抑制作用可能与调控 IP6K1 的表达相关。

综上所述,本研究通过构建白消安诱导的少弱精子症小鼠模型,探讨了五子衍宗丸对少弱精子症小鼠生精功能、IP6K1 表达及线粒体 DNA 甲基化的影响。本研究证明五子衍宗丸能够改善少弱精子

症小鼠的生精功能, 恢复睾丸和附睾系数, 提高精子数量和活力, 抑制睾丸组织病理学损伤和生精细胞凋亡。进一步发现, 五子衍宗丸改善少弱精子症生精功能的作用可能与调控 IP6K1 表达、DNMT1/mtDNA D-loop 甲基化, 以及线粒体编码基因的表达相关, 为治疗少弱精子症提供了新的潜在治疗靶点与策略, 并为五子衍宗丸的临床推广应用提供新的理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Kashanian J A, Brannigan R E. JAMA patient page. Male infertility [J]. *JAMA*, 2015, 313(17): 1770.
- [2] Khatun A, Rahman M S, Pang M G. Clinical assessment of the male fertility [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2018, 61(2): 179-191.
- [3] 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.
- [4] 钟小冬, 俞旭君, 安劬. 少、弱精子症治疗进展 [J]. 中国性科学, 2016, 25(2): 98-101.
- [5] 王子濠, 王满元. 五子衍宗丸治疗男性不育症的研究进展 [J]. 中国计划生育学杂志, 2016, 24(2): 136-138.
- [6] 俞保柱, 曹莉, 王健, 等. 五子衍宗丸加味治疗精索静脉曲张性不育肾虚血瘀证的临床研究 [J]. 中国性科学, 2019, 28(6): 23-26.
- [7] 李俊君, 李浩, 贾清树, 等. 五子衍宗丸治疗男性不育症研究进展 [J]. 江西中医药, 2019, 50(9): 67-70.
- [8] 马娜, 赵海霞, 陈茜, 等. 基于 P53/P21 和碱基切除修复通路的五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤的保护作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1379-1384.
- [9] Malla A B, Bhandari R. IP6K1 is essential for chromatoid body formation and temporal regulation of *Tnp2* and *Prm2* expression in mouse spermatids [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(17): 2854-2866.
- [10] Illies C, Gromada J, Fiume R, et al. Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic beta cells [J]. *Science*, 2007, 318(5854): 1299-1302.
- [11] Ghosh S, Shukla D, Suman K, et al. Inositol hexakisphosphate kinase 1 maintains hemostasis in mice by regulating platelet polyphosphate levels [J]. *Blood*, 2013, 122(8): 1478-1486.
- [12] Zhu Q Z, Ghoshal S, Rodrigues A, et al. Adipocyte-specific deletion of Ip6k1 reduces diet-induced obesity by enhancing AMPK-mediated thermogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(11): 4273-4288.
- [13] Bhandari R, Juluri K R, Resnick A C, et al. Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7): 2349-2353.
- [14] Bhat S A, Malla A B, Oddi V, et al. Inositol hexakisphosphate kinase 1 is essential for cell junction integrity in the mouse seminiferous epithelium [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2024, 1871(1): 119596.
- [15] Yu W X, Ye C Q, Greenberg M L. Inositol hexakisphosphate kinase 1 (IP6K1) regulates inositol synthesis in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(20): 10437-10444.
- [16] Chakraborty A, Koldobskiy M A, Bello N T, et al. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain [J]. *Cell*, 2010, 143(6): 897-910.
- [17] Li X B, Pan J H, Liu T Z, et al. Novel TCF21<sup>high</sup> pericyte subpopulation promotes colorectal cancer metastasis by remodelling perivascular matrix [J]. *Gut*, 2023, 72(4): 710-721.
- [18] Stocco A, Smith A R, Mosca L, et al. Reduced mitochondrial D-loop methylation levels in sporadic amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 137.
- [19] Kowluru R A. Retinopathy in a diet-induced type 2 diabetic rat model and role of epigenetic modifications [J]. *Diabetes*, 2020, 69(4): 689-698.
- [20] Stocco A, Coppedè F. Mitochondrial DNA methylation and human diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4594.
- [21] Liu H, Liu Y f, Wang H, et al. Geometric constraints regulate energy metabolism and cellular contractility in vascular smooth muscle cells by coordinating mitochondrial DNA methylation [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(32): e2203995.
- [22] Vertika S, Singh K K, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - An update [J]. *Mitochondrion*, 2020, 54: 26-40.
- [23] Zhao S J, Heng N, Wang H, et al. Mitofusins: from mitochondria to fertility [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(7): 370.
- [24] Zhang Z R, Miao J R, Wang Y. Mitochondrial regulation in spermatogenesis [J]. *Reproduction*, 2022, 163(4): R55-R69.
- [25] 李慧赟, 王慧芳, 孟晓丽, 等. 利用白消安致 BALB/c 小鼠生殖毒性建立 NOA 疾病模型 [J]. 中国生育健康杂志, 2021, 32(3): 247-251.
- [26] Huang C B, Li N, Li Z X, et al. Tumour-derived Interleukin 35 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell

- extravasation and metastasis by inducing ICAM1 expression [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14035.
- [27] 陈望强, 马健雄, 江雪娟, 等. 五子衍宗丸对生精障碍大鼠生精功能的保护作用研究 [J]. *中药材*, 2020, 43(12): 3010-3016.
- [28] Morrison B H, Haney R, Lamarre E, *et al.* Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 2 predisposes to aerodigestive tract carcinoma [J]. *Oncogene*, 2009, 28(25): 2383-2392.
- [29] Fu C L, Xu J, Li R J, *et al.* Inositol hexakisphosphate kinase-3 regulates the morphology and synapse formation of cerebellar purkinje cells via spectrin/adducin [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(31): 11056-11067.
- [30] Fu C L, Rojas T, Chin A C, *et al.* Multiple aspects of male germ cell development and interactions with Sertoli cells require inositol hexakisphosphate kinase-1 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7039.
- [31] Kopinski P, Singh L N, Zhang S P, *et al.* Mitochondrial DNA variation and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(7): 431-445.
- [32] Shock L S, Thakkar P V, Peterson E J, *et al.* DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(9): 3630-3635.

[责任编辑 高源]