

五子衍宗丸调控睾丸线粒体融合蛋白2减轻内质网应激改善肥胖大鼠生精功能

刘伟伟¹, 李锡晶¹, 刘大卫¹, 崔晓雪¹, 高瑞芳¹, 王 莲¹, 顾 娜¹, 裴天仙^{2*}

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津中医药大学 药物安全评价中心, 天津 301617

摘要: 目的 观察五子衍宗丸对高脂饮食诱导肥胖大鼠生精功能的影响, 并从睾丸内质网应激角度探讨可能机制。方法 30只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组和五子衍宗丸低、中、高剂量(0.5、1.0、2.0 g·kg⁻¹)组。对照组给予普通饮食, 其余组给予高脂饲料喂养, 16周后各组ig给予相应剂量药物, 连续4周; 取附睾进行精子功能分析; 血清ELISA分析性激素水平变化; 苏木素-伊红染色观察睾丸组织病理改变; 透射电镜观察睾丸支持细胞线粒体和内质网结构改变; 免疫荧光染色检测睾丸线粒体融合蛋白2(Mfn2)及内质网应激标识蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)的定位及表达; Western blotting检测睾丸组织Mfn2和蛋白酶R样内质网激酶(PERK)通路相关蛋白相对表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠体质量明显增加($P<0.01$), 血清雌二醇水平明显升高($P<0.01$), 睾酮水平明显降低($P<0.01$); 睾丸生精细胞排列稀疏, 细胞变性; 精子活力明显降低($P<0.05$), 精子畸形率明显升高($P<0.01$); 睾丸支持细胞内质网和线粒体肿胀, 呈空泡状, 部分网膜断裂, Mfn2表达明显降低, GRP78荧光表达明显增加; PERK、活化转录因子-4(ATF4)和CHOP蛋白量明显升高($P<0.01$)。与模型组比较, 五子衍宗丸高剂量组体质量减轻明显($P<0.05$); 中、高剂量组血清雌二醇水平明显降低($P<0.05$ 、 0.01), 睾酮水平明显升高($P<0.05$ 、 0.01); 高剂量组精子活力明显升高($P<0.05$), 精子畸形率明显降低($P<0.05$); 睾丸病变减轻, 排列较致密, 支持细胞内质网和线粒体肿胀改善; Mfn2荧光表达逐渐增强, 蛋白相对表达明显增加($P<0.05$ 、 0.01), GRP78荧光表达逐渐减弱; 低剂量组ATF4蛋白量明显降低($P<0.01$), 中剂量组PERK、ATF4蛋白量明显降低($P<0.05$ 、 0.01), 高剂量组PERK、ATF4和CHOP蛋白量均明显降低($P<0.01$)。结论 五子衍宗丸可改善高脂饮食诱导肥胖引起的大鼠生精障碍, 其机制可能与调控睾丸支持细胞Mfn2表达, 减轻内质网应激有关。

关键词: 五子衍宗丸; 肥胖; 精子发生; 睾丸; 支持细胞; 线粒体融合蛋白2; 内质网应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)06-1240-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.008

Wuzi Yanzong Pill improves spermatogenic function in obese rats by regulating mitochondrial fusion protein 2 and reducing endoplasmic reticulum stress in testis

LIU Weiwei¹, LI Xijing¹, LIU Dawei¹, CUI Xiaoxue¹, GAO Ruifang¹, WANG Lian¹, GU Na¹, PEI Tianxian²

1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

2. Center of Drug Safety Evaluation, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To observe the effect of Wuzi Yanzong Pill (WYP) on spermatogenic function in obese rats induced by high fat diet, and to explore the possible mechanism from ERS in testis. **Methods** Totally 30 male SD rats were divided into control group, model group, low, middle and high dose (0.5, 1.0, and 2.0 g·kg⁻¹) groups of WYP randomly. The control group was fed with normal diet, the rest were fed with high-fat diet. After 16 weeks, the corresponding doses of drugs in each group were gavaged for four weeks continuously. the rats were dissected, and sperms in comepididymis were collected for the function analysis. Serum ELISA was used to analyze the changes of sex hormone levels. The pathological changes of testis were observed by hematoxylin-eosin staining. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the structural changes of the mitochondria and endoplasmic reticulum in sertoli cells. The localization and expression of Mfn2 and GRP78 in testis were detected by immunofluorescence

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 天津市卫生健康科技项目(TJWJ2022MS048)

第一作者: 刘伟伟(1985—), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事实验病理学研究。E-mail: vivid1227@163.com

*通信作者: 裴天仙(1980—), 硕士研究生, 研究员, 主要从事毒理、药理、病理学研究。E-mail: 554237340@qq.com

staining. The expression of Mfn2 and PERK pathway related proteins in testis were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the model group rats showed a significant increase in body weight ($P < 0.01$), a marked increase in serum estradiol level ($P < 0.01$), and a marked decrease in serum testosterone level ($P < 0.01$); the arrangement of spermatogenic cells in the testes was sparse, and the cells were degenerated; the sperm motility was significantly lower ($P < 0.05$), and the sperm malformation rate was markedly increased ($P < 0.01$); the rough endoplasmic reticulum and mitochondria in the Leydig cells were swollen and hollow, some of the network was broken, the expression of Mfn2 was markedly reduced, and the GRP78 fluorescence expression was markedly increased; the protein levels of PERK, activated transcription factor-4 (ATF4), and CHOP were markedly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the high-dose group of Wuzi Yanzong Pill showed a significant reduction in body weight ($P < 0.05$); the serum estradiol level was markedly lower in the middle and high-dose groups ($P < 0.05, 0.01$), and the serum testosterone level was markedly higher ($P < 0.05, 0.01$); the sperm motility was significantly improved in the high-dose group ($P < 0.05$), and the sperm malformation rate was markedly reduced ($P < 0.05$); the pathological changes in the testes were alleviated, the arrangement was denser, and the rough endoplasmic reticulum and mitochondria in the Leydig cells were improved; the fluorescence expression of Mfn2 gradually increased, and the relative protein expression was markedly increased ($P < 0.05, 0.01$), while the GRP78 fluorescence expression gradually decreased; the ATF4 protein level was markedly reduced in the low-dose group ($P < 0.01$), the PERK and ATF4 protein levels were markedly reduced in the middle-dose group ($P < 0.05, 0.01$), and the PERK, ATF4, and CHOP protein levels were all markedly. **Conclusion** Wuzi Yanzong Pill can ameliorate spermatogenesis disorder induced by high fat diet in rats, which may be related to the regulation the expression of Mfn2 and alleviate the endoplasmic reticulum stress in sertoli cells.

Key words: Wuzi Yanzong Pill; obesity; spermatogenesis; testis; sertoli cells; mitochondrial fusion protein 2; endoplasmic reticulum stress

目前全球范围内约13%成年人肥胖,并且肥胖率呈明显上升趋势^[1],肥胖可引发心血管、代谢相关、恶性肿瘤等多种疾病^[2-3],对男性的生殖功能也产生严重影响^[4]。研究发现肥胖男性无精子症和少精子症更为普遍^[5],是男性不育症的主要原因之一。新近研究表明高脂饮食诱导的肥胖可导致睾丸生精细胞内质网应激,致使睾丸生殖功能受损,减缓内质网应激可能是改善高脂饮食诱导的雄性生殖功能障碍的关键^[6]。五子衍宗丸是中医治疗男性不育的经典方,被誉为“古今种子第一方”。药理学研究证实,五子衍宗丸可减轻生精细胞氧化应激程度,抑制凋亡,调控睾丸间质细胞性激素合成,调节支持细胞分泌功能,减轻环磷酸胺、雷公藤等诱导的生精障碍^[7-9]。另有研究表明五子衍宗丸具有明显抗内质网应激作用,可通过减轻内质网应激缓解小鼠多发性硬化^[10]。而五子衍宗丸能否通过抗内质网应激改善肥胖所致的生精障碍,未见相关报道。本研究拟观察五子衍宗丸对高脂饮食诱导肥胖大鼠生精功能的影响,并从线粒体融合蛋白2(Mfn2)及内质网应激角度探讨可能机制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠30只,体质量100~120 g,4~5周龄,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,

生产许可证号SCXK(京)2019-0008。购入后自由饮水,饲养环境温度(25±2)℃。动物实验经天津市医药科学研究所实验动物福利伦理委员会批准同意,编号IMPS-EAEP-ZKTSB-202216。

1.2 药物及试剂

五子衍宗丸(北京同仁堂股份有限公司生产,国药准字Z11020188,购于京东大药房,产品批号:22035137,规格10 g:100粒)。高脂饲料(70%基础饲料+15%猪油+15%蔗糖)购于北京科澳协力饲料有限公司,许可证号SCXK(京)2019-0003。兔抗葡萄糖调节蛋白78(GRP78)(Proteintech, 11587-1-AP)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)(Immunoway, YP1055)、活化转录因子-4(ATF4)(Absin, abs145695)、CHOP(Absin, abs135545)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)多克隆抗体(CST, #9482), Dylight488羊抗兔IgG(Immunoway, RS23220), 抗体稀释液(博士德, AR1016), 含DAPI封片剂(Solarbio, S2110), 苏木素-伊红(HE)染液(贝索生物技术有限公司, BA4025);其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 主要仪器

ASP200S全自动组织脱水机、Leica EG1150H组织包埋机、Leica RM2255全自动切片机(德国徕卡公司);尼康Ci-L图像采集显微镜、NIS-BRML图像分析系统(日本尼康公司);JEM1200EX透射电子

显微镜(日本JEOL公司);迈朗全自动精子分析仪(南宁松景天伦生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及干预

30只大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组和五子衍宗丸低、中、高剂量(0.5、1.0、2.0 g·kg⁻¹)组,每组6只。对照组给予普通饮食,模型组和各给药组给予高脂饲料喂养,自由进食饮水,除饮食外其他饲养条件均一致。每周称质量,当模型组动物体质量超过对照组体质量10%~25%即达中度肥胖^[1],肥胖模型成功后,五子衍宗丸低、中、高剂量组ig给药,对照组和模型组用纯净水替代,每天1次,持续4周。

2.2 标本采集

大鼠禁食24 h后,麻醉,仰卧位固定开腹,腹主动脉采血,室温静置2 h后3 000 r·min⁻¹离心10 min收集血清;取睾丸部分新鲜组织冰冻,部分10%福尔马林溶液固定;部分睾丸组织2.5%戊二醛固定;取附睾尾于0.9%氯化钠溶液中,用于检测精子活力。

2.3 精子功能分析

附睾尾经37℃、0.9%氯化钠溶液洗涤,置于2 mL冻存管中剪碎再加入精子洗涤液中,37℃水浴箱中轻微震荡孵育30 min。取10 μL精子悬液加到精子计数板上,采用迈朗精子分析系统观察精子形态并检测精子参数。主要检测指标:精子密度、精子活力、畸形率以及直/曲线速率等。

2.4 性激素指标测定

酶联免疫法测定血清雌二醇、孕酮、睾酮、泌乳素、促黄体生成素、卵泡刺激素,具体方法过程根据试剂盒中说明书操作。

2.5 HE染色观察睾丸组织病理改变

睾丸组织固定48 h后取材,切取5 mm厚的组织块,进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,切片厚度为3 μm。切片依次经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,苏木素染液4 min,盐酸乙醇分化,氨水返蓝,伊红染色1 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察组织病理改变。

2.6 免疫荧光染色检测睾丸Mfn2及GRP78的定位及表达

常规石蜡切片脱蜡至水,滴加体积分数为3%的H₂O₂,室温孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶;枸橼酸缓冲液微波加热修复抗原,用质量浓度为50 g·L⁻¹的牛血清白蛋白封闭20 min;滴加兔抗Mfn2或GRP78抗体工作液(1:100),4℃过夜;磷酸

盐缓冲液(PBS)冲洗后加入荧光生物素化山羊抗兔IgG抗体,避光室温孵育1 h;PBS冲洗后加入含DAPI的防淬灭封片剂封片。于暗室条件下荧光显微镜下观察。

2.7 Western blotting检测睾丸组织Mfn2、PERK、ATF4和CHOP蛋白表达

各组随机取3只大鼠,将睾丸组织切成小块,加入RIPA裂解液匀浆,裂解30 min,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min,提取样品中总蛋白,蛋白变性,转膜,封闭2 h,分别加入一抗Mfn2、PERK、ATF4、CHOP(1:1 000),置于4℃条件下孵育过夜。加入二抗(1:50 000),孵育2 h后洗膜。添加ECL工作液,待荧光带明显后,吸去多余的底物液,覆上保鲜膜,X线片压片后依次放入显影液显影、定影液定影,冲洗晾干后扫描胶片。计算灰度值,以Mfn2、PERK、ATF4、CHOP与β-actin的灰度值比值反映其蛋白表达水平。

2.8 透射电镜观察睾丸支持细胞紧密连接及线粒体和内质网结构改变

新鲜睾丸组织2.5%戊二醛4℃固定6 h后漂洗,置于1%锇酸固定2 h,丙酮梯度脱水、浸透、包埋、聚合、切片、染色后透射电镜观察。

2.9 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用LSD-*t*法。

3 结果

3.1 五子衍宗丸对肥胖大鼠体质量及睾丸组织形态学改变的影响

高脂饮食喂养16周,造模成功,可达中度肥胖[体质量:对照组(521.4±17.00)g,模型组(647.27±51.31)g]。给药结束后模型组平均体质量与对照组比较显著增加($P<0.01$);五子衍宗丸各剂量组平均体质量较模型组均有减轻,其中高剂量组减轻明显($P<0.05$)。见表1。

睾丸组织病理形态学观察:对照组各曲细精管结构完整,细胞排列紧密有序,生精上皮未见明显改变;模型组睾丸生精小管萎缩,细胞排列稀疏,细胞层数减少,支持细胞呈“空泡样”改变,相邻细胞间隔增宽;五子衍宗丸各剂量组与模型组比较,生精小管内细胞排列较有序,细胞层数增多,随着剂量增加,形态结构改善趋势较明显(图1)。

表 1 各组大鼠体重及性激素水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of body weight and sex hormone levels in rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g	雌二醇/ (pg·mL ⁻¹)	孕酮/ (ng·mL ⁻¹)	睾酮/ (ng·mL ⁻¹)	泌乳素/ (ng·mL ⁻¹)	促黄体生成素/ (mU·mL ⁻¹)	卵泡刺激素/ (mU·mL ⁻¹)
对照	—	541.27±16.70	2.76±0.37	5.23±1.05	3.18±0.51	0.05±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
模型	—	668.45±56.78**	5.04±0.63**	5.90±0.21	1.78±0.32**	0.05±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00
五子衍宗丸	0.5	642.52±28.91	4.42±0.53	5.38±0.50	2.18±0.64	0.05±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00
	1.0	623.23±38.72	4.29±0.46 [#]	5.53±0.53	2.41±0.43 [#]	0.05±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00
	2.0	609.47±30.22 [#]	3.53±0.40 ^{##}	5.40±0.69	2.52±0.43 ^{##}	0.05±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group.

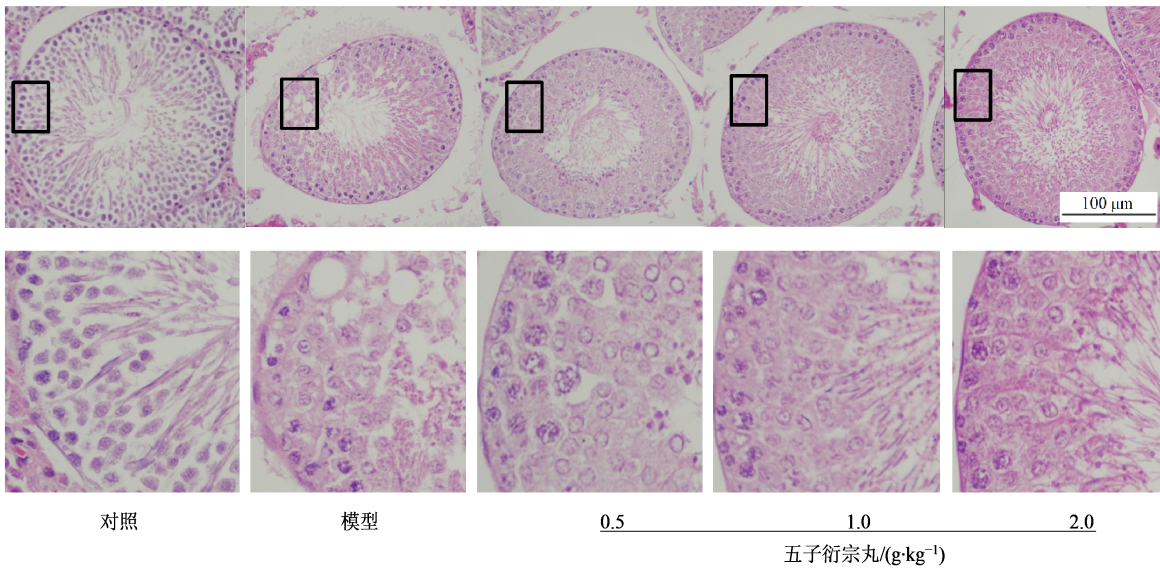


图 1 各组大鼠睾丸组织形态学改变(HE 染色)

Fig. 1 Changes of histomorphology of testis in rats in each group (HE staining)

3.2 五子衍宗丸对肥胖大鼠性激素水平变化的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清雌二醇水平明显升高($P<0.01$),睾酮水平明显降低($P<0.01$);五子衍宗丸中、高剂量组血清雌二醇水平较模型组明显降低($P<0.05, 0.01$),睾酮水平明显升高($P<0.05, 0.01$),余未见明显差异(表 1)。

3.3 五子衍宗丸对肥胖大鼠精子功能改变的影响

与对照组比较,模型组大鼠精子活力明显降

低($P<0.05$),精子畸形率明显升高($P<0.05$),精子密度、直线速率和曲线速率虽有降低,但差异不明显。五子衍宗丸各剂量组的精子密度、精子活力及畸形率均有改善,其中高剂量组与模型组比较,精子活力率增加明显($P<0.05$),畸形率降低明显($P<0.05$),见表 2。

3.4 五子衍宗丸对肥胖大鼠睾丸支持细胞线粒体及内质网结构的影响

如图 2 所示,对照组睾丸支持细胞内线粒体(Mi)呈圆形,内外膜结构完整,线粒体嵴密集,排

表 2 大鼠精子功能比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of sperm function in rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	精子密度/($\times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$)	精子活力率/%	畸形率/%	直线速率/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	曲线速率/($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
对照	—	0.291±0.091	60.457±6.957	8.538±2.996	23.298±7.171	56.022±11.336
模型	—	0.238±0.080	43.130±11.006*	13.613±2.705*	22.747±4.663	50.193±12.920
五子衍宗丸	0.5	0.264±0.067	51.158±6.639	11.137±1.297	22.678±3.863	53.317±1.874
	1.0	0.271±0.042	52.277±2.039	10.472±2.251	22.583±3.476	52.087±6.879
	2.0	0.274±0.069	56.423±6.111 [#]	9.755±1.573 [#]	22.950±4.541	55.253±5.989

与对照组比较:* $P<0.05$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group.

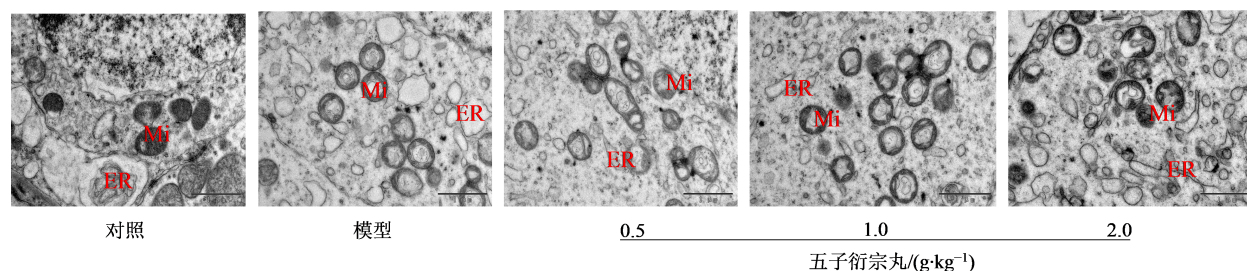


图2 支持细胞线粒体和内质网超微结构改变(TEM, ×4 000)

Fig. 2 Ultrastructural changes of mitochondria and endoplasmic reticulum in sertoli cell (TEM, ×4 000)

列整齐、清晰;内质网(ER)结构正常,排列成扁囊状。模型组线粒体嵴断裂,缺失,呈空泡状;内质网扩张,显著肿胀,部分网膜断裂。五子衍宗丸各剂量组线粒体空泡状改变和内质网肿胀逐渐减轻,其中高剂量组减轻较明显。

3.5 五子衍宗丸对肥胖大鼠睾丸支持细胞 Mfn2 和 GRP78 蛋白定位及荧光表达的影响

如图3所示,Mfn2在对照组睾丸生精小管支持细胞中高表达,模型组表达较对照组明显降低,荧

光强度明显减弱;五子衍宗丸各剂量组睾丸 Mfn2 表达逐渐增加,荧光强度逐渐增强。如图4所示,GRP78 蛋白在对照组睾丸中低表达,模型组表达较对照组较明显升高,荧光强度明显增强;五子衍宗丸各剂量组睾丸 GRP78 表达逐渐降低,荧光强度逐渐减弱。

3.6 五子衍宗丸对肥胖大鼠睾丸 Mfn2 及 PERK 信号通路蛋白相对表达量的影响

如图5、表3所示,与对照组比较,模型组 Mfn2

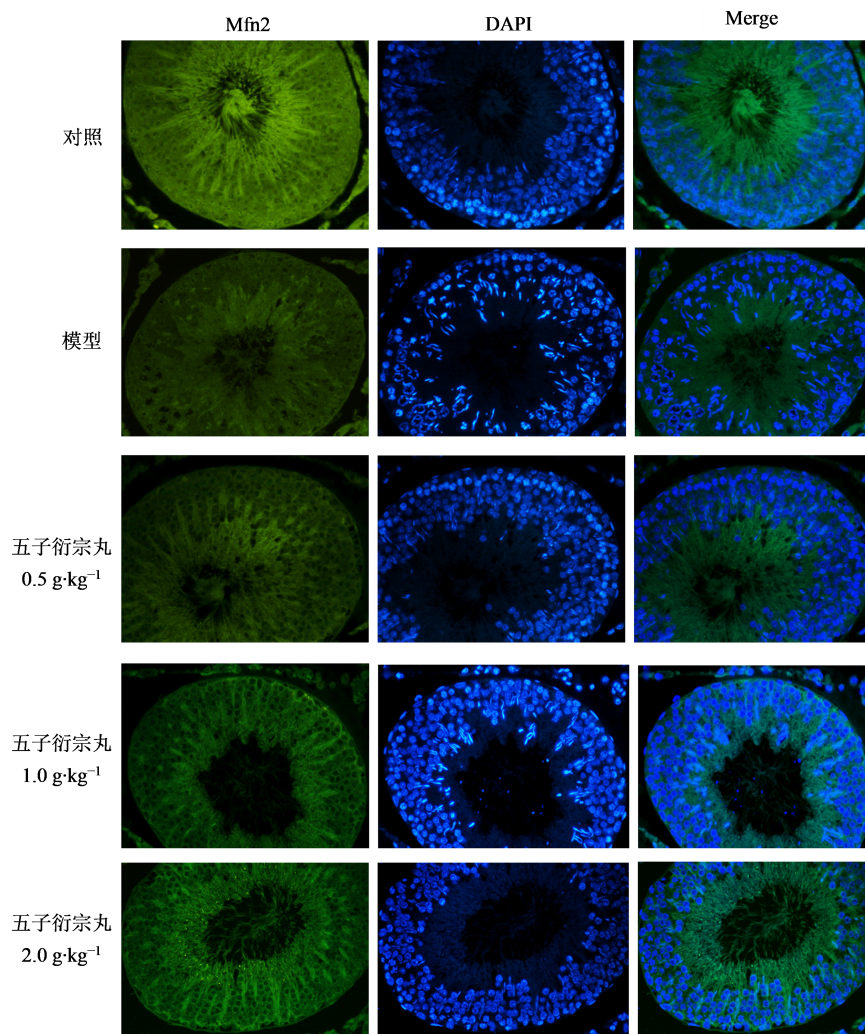


图3 睾丸 Mfn2 表达(免疫荧光染色, ×400)

Fig. 3 Expression of Mfn2 in testis (immunofluorescence staining, ×400)

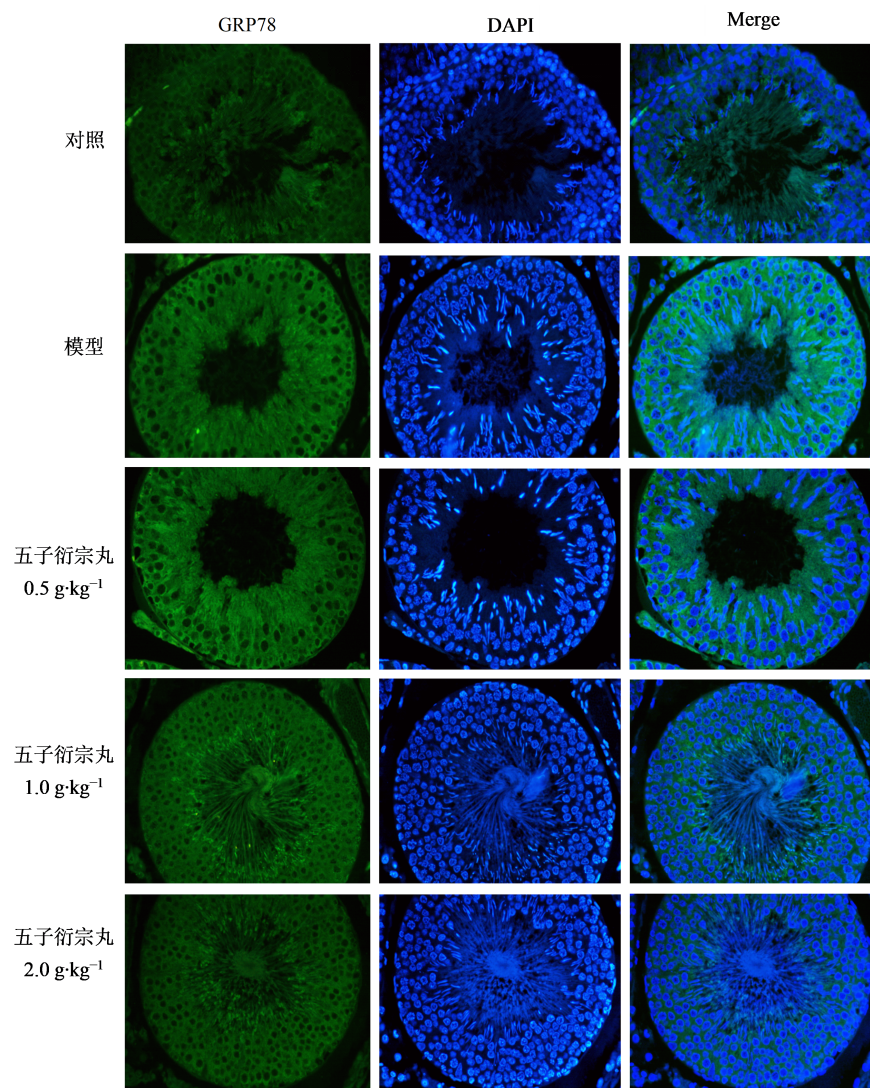


图 4 睾丸 GRP78 表达 (免疫荧光染色, $\times 400$)

Fig. 4 Expression of GRP78 in testis (immunofluorescence staining, $\times 400$)

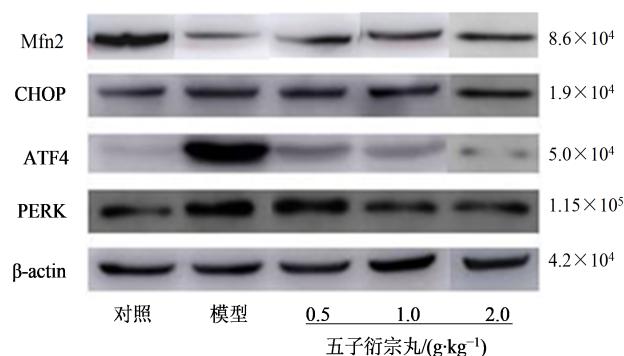


图 5 睾丸 Mfn2 及内质网应激 PERK 通路相关蛋白表达

Fig. 5 Expression of Mfn2 and proteins related to endoplasmic reticulum stress PERK pathway in testis

蛋白相对表达量明显降低, PERK、ATF4、CHOP 蛋白相对表达量均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 五子衍宗丸各剂量组 Mfn2 蛋白相对表达量均

增加 ($P < 0.05, 0.01$), 五子衍宗丸低剂量组 ATF4 蛋白量明显降低 ($P < 0.01$), 中剂量组 PERK、ATF4 蛋白相对表达量明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 高剂量组 PERK、ATF4 和 CHOP 蛋白相对表达量均明显降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

随着社会发展和人们生活习惯、饮食结构的变化, 肥胖率也随之急剧升高。肥胖对睾丸精子发生的功能影响深远, 流行病学研究证明肥胖可以引起男性不育率上升^[12]。实验研究表明, 肥胖不仅改变性激素的分泌, 也影响睾丸的组织结构, 破坏血睾屏障, 造成精子发生受损^[13-14]。本研究发现高脂饮食喂养后大鼠体质量较对照组明显增加, 血清雌二醇水平明显升高, 睾酮水平明显降低, 且精子活力明显降低, 精子畸形率明显升高。睾丸生精细胞排

表3 大鼠睾丸 Mfn2 及内质网应激 PERK 通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Expression of Mfn2 proteins and related to endoplasmic reticulum stress PERK pathway in testis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PERK/ β -actin	ATF4/ β -actin	CHOP/ β -actin	Mfn2/ β -actin
对照	—	0.466±0.112	0.163±0.010	0.452±0.053	0.913±0.043
模型	—	0.898±0.551**	0.912±0.019**	0.736±0.033**	0.394±0.024**
五子衍宗丸	0.5	0.739±0.161	0.320±0.020 [#]	0.687±0.106	0.500±0.013 [#]
	1.0	0.649±0.167 [#]	0.259±0.008 [#]	0.683±0.080	0.634±0.093 [#]
	2.0	0.490±0.085 [#]	0.248±0.015 [#]	0.518±0.035 [#]	0.765±0.041 [#]

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

列稀疏紊乱,细胞变性,支持细胞线粒体和内质网结构受损,线粒体显著肿胀,嵴断裂、缺失,呈空泡状,内质网网膜断裂,表明长期高脂饮食诱导的肥胖可引起睾丸组织功能和器质性改变。

五子衍宗丸由枸杞子、菟丝子、五味子、覆盆子、车前子5味中药组成,起源于唐代,是临床用于治疗男性不育症的常用复方,被誉为“古今种子第一方”。实验研究显示五子衍宗丸可通过减轻睾丸组织病理损伤、改善精子结构及功能,调节生精细胞线粒体能量代谢^[8]。支持细胞作为生精小管内唯一与生精细胞直接接触的体细胞,为精子发生提供营养、骨架和免疫屏障,发挥重要作用,其紧密连接异常是导致少弱精子症的原因之一^[15]。五子衍宗丸能调节支持细胞紧密连接结构,修复支持细胞骨架,从而改善生精功能^[9]。本研究发现,五子衍宗丸延缓高脂饮食诱导的肥胖大鼠的体质量增加,降低血清雌二醇水平明显,同时升高血清睾酮水平;提高精子活力,并降低精子畸形率等精子功能;减轻睾丸细胞变性,支持细胞内质网和线粒体肿胀得到较明显改善,与既往研究结果一致。

内质网作为真核细胞内动态的膜系统,可与细胞骨架、质膜和其他细胞器相互作用,并参与细胞内蛋白质合成、钙离子平衡和磷脂等合成^[16]。当机体在缺氧、损伤等刺激下,内质网错误折叠蛋白过度累积,诱发内质网应激,发生未折叠蛋白反应(UPR)^[17]。GRP78作为一种内质网应激的关键伴侣蛋白,主要参与蛋白质的合成、转运、折叠,维持蛋白质的正确构象,在内质网应激反应中发挥重要作用^[18-19]。PERK是参与UPR反应信号之一,是内质网应激早期的重要标志物,其下游ATF4可调节细胞代谢,营养吸收和抗氧化的众多基因的表达,在剧烈且持续的内质网应激下,PERK激活并通过ATF4定向活化CHOP驱动凋亡程序^[20-21]。细胞内线粒体和内质网之间不是孤立存在的细胞器,两

者之间形成动态膜耦联结构,线粒体相关内质网膜(MAM),又称线粒体内质网结构耦联,控制细胞内脂质交换、钙信号传导、细胞存活和细胞代谢的稳态^[22-23]。Mfn2为定位于线粒体外膜上的跨膜动力蛋白,不仅能调控线粒体融合,还在细胞能量代谢、细胞凋亡、细胞增殖、线粒体内质网连接、内质网应激等过程中发挥重要作用^[24-25]。Mfn2作为MAM束缚蛋白是MAM结构和功能维持的关键,一旦Mfn2耗竭,会引起MAM发生变化,导致内质网应激和细胞损伤^[26-27]。

本研究中,模型组大鼠支持细胞GRP78和PERK/ATF4/CHOP信号通路蛋白表达均明显增加,说明高脂饮食诱导的肥胖导致大鼠睾丸支持细胞处于内质网应激状态,同时Mfn2表达降低,表明肥胖大鼠睾丸线粒体内质网结构耦联发生变化。给予五子衍宗丸治疗能增强肥胖模型大鼠支持细胞Mfn2表达逐渐增加,GRP78表达减少,同时降低PERK、ATF4和CHOP蛋白表达,且以高剂量组效果最明显。

五子衍宗丸可改善高脂饮食诱导肥胖引起的大鼠生精障碍,其机制可能与调控睾丸支持细胞Mfn2表达,减轻内质网应激有关。但五子衍宗丸调控Mfn2的内在机制及其对睾丸支持细胞线粒体内质网结构耦联和内质网应激的具体影响未来将进一步进行实验验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Blüher M. Obesity: Global epidemiology and pathogenesis [J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(5): 288-298.
- [2] Chooi Y C, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity [J]. Metabolism, 2019, 92: 6-10.
- [3] Lam B C C, Lim A Y L, Chan S L, et al. The impact of obesity: A narrative review [J]. Singapore Med J, 2023, 64

- (3): 163-171.
- [4] Leisegang K, Sengupta P, Agarwal A, et al. Obesity and male infertility: Mechanisms and management [J]. *Andrologia*, 2021, 53(1): e13617.
 - [5] 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.
Su Y S, Wang Q Q, Wang C H, et al. Study on testicular spermatogenic dysfunction induced by obese type 2 diabetes mellitus in mice [J]. *J Ningxia Med Univ*, 2022, 44(5): 499-504.
 - [6] 周本文, 张长城, 邓何, 等. 从内质网应激研究高脂饮食对小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(12): 2346-2353.
Zhou B W, Zhang C C, Deng H, et al. Effects of high-fat diet on testicular germ cell apoptosis in mice through endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2023, 39(12): 2346-2353.
 - [7] 廖宇娇, 敖明月, 彭颖, 等. 基于指纹图谱及化学模式识别研究盐制对五子衍宗丸化学成分的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3224-3233.
Zou D X, Zhang Y Y, Meng X D, et al. Based on fingerprint and chemical pattern recognition to study the effect of salt-water processing on the chemical components of Wuzi Yanzong Pills [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(11): 3224-3233.
 - [8] 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.
Chen W Q, Ma J X, Jiang X J, et al. Protective effect of Wuzi Yanzong pills on spermatogenic function in rats with spermatogenic disorder [J]. *J Chin Med Mater*, 2020, 43(12): 3010-3016.
 - [9] 秦茂, 柯明辉, 刘保兴, 等. 五子衍宗丸对肾精亏虚证大鼠睾丸支持细胞骨架蛋白表达及生精功能的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(6): 490-495.
Qin M, Ke M H, Liu B X, et al. Effects of Wuzi Yanzong Pill on spermatogenesis by modulating expression of cytoskeleton protein in Sertoli cells in rats with kidney essence deficiency pattern [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2019, 42(6): 490-495.
 - [10] 肖午帅, 樊慧杰, 李艳荣, 等. 五子衍宗丸通过抑制GRP78减轻EAE小鼠持续的内质网应激 [J]. *中成药*, 2021, 43(6): 1594-1598.
Xiao W S, Fan H J, Li Y R, et al. Wuzi Yanzong Pill alleviates persistent endoplasmic reticulum stress in EAE mice by inhibiting GRP78 [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(6): 1594-1598.
 - [11] Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models [J]. *Nutr Res Rev*, 2010, 23(2): 270-299.
 - [12] Zhang Y R, Qi J, Zhao J, et al. Effect of dietetic obesity on testicular transcriptome in *Cynomolgus* monkeys [J]. *Genes*, 2023, 14(3): 557.
 - [13] Pepin A S, Lafleur C, Lambrot R, et al. Sperm histone H3 lysine 4 tri-methylation serves as a metabolic sensor of paternal obesity and is associated with the inheritance of metabolic dysfunction [J]. *Mol Metab*, 2022, 59: 101463.
 - [14] Ribeiro L M, Sasaki L M P, Silva A A, et al. Overweight, obesity and assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2022, 271: 117-127.
 - [15] Petersen C, Soder O. The Sertoli cell: A hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size [J]. *Horm Res*, 2006, 66(4): 153-161.
 - [16] Chen G F, Wei T Y, Ju F R, et al. Protein quality control and aggregation in the endoplasmic reticulum: From basic to bedside [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1156152.
 - [17] Chen Z, Zhang S L. Endoplasmic reticulum stress: A key regulator of cardiovascular disease [J]. *DNA Cell Biol*, 2023, 42(6): 322-335.
 - [18] Tsai Y L, Ha D P, Zhao H, et al. Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78 /CD109 blocks TGF-beta signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(18): E4245-E4254.
 - [19] Li J Y, Yang K Y, Dai S S, et al. ERS mediated by GRP-78/PERK/CHOP signaling is involved in fluoride-induced ameloblast apoptosis [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2024, 202(3): 1103-1114.
 - [20] Tian G, Li J, Zhou L N. Ginsenoside Rg1 regulates autophagy and endoplasmic reticulum stress via the AMPK/mTOR and PERK/ATF4/CHOP pathways to alleviate alcohol-induced myocardial injury [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(1): 56.
 - [21] Li J Y, Yang K Y, Dai S S, et al. ERS mediated by GRP-78/PERK/CHOP signaling is involved in fluoride-induced ameloblast apoptosis [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2024, 202(3): 1103-1114.
 - [22] Townsend L K, Brunetta H S, Mori M A S. Mitochondria-associated ER membranes in glucose homeostasis and insulin resistance [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 319(6): E1053-E1060.
 - [23] Yang M, Li C R, Yang S K, et al. Mitochondria-associated ER membranes - the origin site of autophagy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 595.
 - [24] Zacharioudakis E, Agianian B, Kumar Mv V, et al.

- Modulating mitofusins to control mitochondrial function and signaling [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3775.
- [25] Zhou H Y, Sun Y Y, Chang P, et al. Curcumin inhibits cell damage and apoptosis caused by thapsigargin-induced endoplasmic reticulum stress involving the recovery of mitochondrial function mediated by mitofusin-2 [J]. Neurotox Res, 2022, 40(2): 449-460.
- [26] Adelmann C H, Rachmin I, Fisher D E. MFN2 stabilization: A bridge for endoplasmic reticulum stress sensitivity in melanoma [J]. J Invest Dermatol, 2021, 141 (12): 2782-2784.
- [27] Muñoz J P, Ivanova S, Sánchez-Wandelmer J, et al. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK [J]. EMBO J, 2013, 32(17): 2348-2361.

[责任编辑 兰新新]

•公益广告•

