

麒麟丸调控 CYP11A1/testosterone/CYP19A1/E₂/ESR1 通路治疗雷公藤多苷诱导的大鼠少弱精子症

刘 嘉¹, 王春玲², 陈栢皓², 徐玉蓉², 贾亚旭², 林翠萍^{3*}, 黄丽丽^{4*}

1. 江苏卫生健康职业学院, 江苏 南京 211800

2. 东南大学附属中大医院, 江苏 南京 210029

3. 南京市中西医结合医院, 江苏 南京 210014

4. 国家卫生健康委计划生育药具不良反应检测中心, 江苏 南京 210036

摘 要: **目的** 探究麒麟丸治疗少弱精子症(AS)的作用机制。**方法** SD大鼠随机分为对照组、模型组、左卡尼汀(阳性药, 100 mg·kg⁻¹)和麒麟丸低、高剂量(0.5、1.5 mg·kg⁻¹)组, 除对照组外, 其余4组ig给予雷公藤多苷35 mg·kg⁻¹ 7 d诱导AS模型, 从造模开始即给药, 每天1次, 共ig给药21 d。称量睾丸和附睾组织质量, 计算大鼠生殖器官指数; 通过精子参数检测系统检测各组动物的精子质量和精子形态; ELISA测定大鼠血清中性激素含量; HE染色观察给药后各组大鼠睾丸组织病理学改变, 并统计生精细胞和间质细胞数量; 通过免疫荧光染色检测大鼠睾丸组织中支持细胞数量; Western blotting和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测细胞色素P450家族19亚家族A成员1(CYP19A1)、细胞色素P450家族11亚家族A成员1(CYP11A1)和雌激素受体α(ESR1)的蛋白和基因表达水平。**结果** 与对照组相比, 模型组精子质量和血清睾酮(T)、雌二醇(E₂)含量显著降低($P<0.01$), 血清黄体生成素(LH)含量显著升高($P<0.01$), 生殖器官指数和睾丸生精细胞、间质细胞和支持细胞数量显著降低($P<0.01$), 睾丸组织性激素合成限速酶CYP11A1和CYP19A1、ESR1的基因和蛋白显著下调($P<0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸高剂量组精子质量和血清T、E₂含量显著增加($P<0.01$), 血清LH含量显著降低($P<0.01$), 生殖器官指数、睾丸生精细胞、间质细胞和支持细胞数量显著升高($P<0.01$), CYP11A1和CYP19A1、ESR1基因和蛋白显著上调($P<0.01$)。**结论** 麒麟丸可通过上调性激素合成限速酶CYP11A1和CYP19A1, 上调体内性激素表达治疗AS。

关键词: 麒麟丸; 少弱精子症; CYP11A1; CYP19A1; 雌激素受体α; 性激素; 睾酮; 雌二醇; 黄体生成素; 精子质量
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)02-0439-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.017

Treatment of asthenospermia induced by tripterygium glycosides utilizing Qilin Pill through CYP11A1/testosterone/CYP19A1/E₂/ESR1

LIU Jia¹, WANG Chunling², CHEN Baihao², XU Yurong², JIA Yaxu², LIN Cuiping³, HUANG Lili⁴

1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China

2. Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210029, China

3. Nanjing Integrated Chinese and Western Medicine Hospital, Nanjing 210014, China

4. National Health Commission Family Planning Drug Adverse Reaction Testing Center, Nanjing 210036, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Qilin Pills in the treatment of Asthenospermia (AS). **Methods** SD rats were randomly divided into a control group, a model group, levocarnitine (positive drug, 100 mg·kg⁻¹), and low and high dose (0.5, 1.5 mg·kg⁻¹) groups of Qilin Pills. Except for the control group, the other four groups were induced with tripterygium glycosides at a dose of 35 mg·kg⁻¹ for 17 days, starting from the modeling stage and administered once a day for a total of 21 days. The reproductive organ index of rats was calculated by weighing testes and epididymis. The sperm quality and morphology of each group were detected by the sperm parameter detection system. The content of sex hormone in serum was determined by ELISA. The histopathological

收稿日期: 2024-09-19

基金项目: 江苏省高校青蓝工程优秀教学团队项目(2021年度); 国家卫生健康委计划生育药具不良反应监测中心开放课题(JSHD202323)

作者简介: 刘 嘉, 男, 副教授, 从事中医复方基础研究。E-mail: liujia402@163.com

*通信作者: 林翠萍, 女, 副主任医师, 从事中医复方基础研究。E-mail: chunlingwang2024@163.com

黄丽丽, 女, 副主任技师, 主要从事生殖免疫方面的研究。E-mail: 15380900545@163.com

changes of testis were observed by H&E staining, and the number of spermatogenic cells and interstitial cells were counted. The number of sertoli cells in testicular tissue was detected by immunofluorescence staining. Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) were used to detect the protein and gene expression levels of cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1(CYP19A1), cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1(CYP11A1) and estrogen receptor α (ESR1). **Results** Compared with control group, the sperm quality and serum testosterone and estradiol contents of AS rats were significantly decreased ($P < 0.01$), the serum luteinizing hormone content was significantly increased ($P < 0.01$), and the number of reproductive organ index, testicular spermatogenic cells, interstitial cells and sertoli cells were significantly decreased ($P < 0.01$). The genes and proteins of the rate-limiting enzymes CYP11A1 and CYP19A1 and estrogen receptor ESR1 in testicular tissue were significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, the sperm quality and serum testosterone and estradiol contents in high dose of Qilin Pills group were significantly increased ($P < 0.01$), the serum luteinogen content was significantly decreased ($P < 0.01$), and the number of reproductive organ index, testicular spermatogenic cells, interstitial cells and sertoli cells were significantly increased ($P < 0.01$). The genes and proteins of the ring-limiting enzymes CYP11A1 and CYP19A1 and estrogen receptor ESR1 in testicular tissue were significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** Qilin Pills can be used to treat asthenospermia by up-regulating sex hormone expression of the rate-limiting enzymes CYP11A1 and CYP19A1.

Key words: Qilin Pills; asthenospermia; CYP11A1; CYP19A1; estrogen receptor α ; sex hormone; testosterone; estradiol; luteinizing hormone; semen quality

最新流行病学统计结果表明, 不孕不育是一项关系社会民生的重大问题, 持续影响着全球 14% 以上的夫妻^[1], 据统计结果显示, 全球范围内 30% 的不孕不育是由男性因素引发^[2], 少弱精子症 (AS) 是男性不育的主要因素之一^[3]。AS 的发病机制多种多样, 包括代谢紊乱、药物诱导和生殖器官炎症等, 其中特发性 AS 约占总比例的 30%, 而其中 15% 无法找到确切的病因^[4-5]。根据世界卫生组织《人类精液手册》第五版的标准, AS 是指精子数量减少, 运动能力下降以至于无法完成受精的病症^[4]。目前西医临床上主要是通过给予左卡尼汀等抗氧化药物治疗, 并无针对性的治疗方案, 治疗效果仍不理想^[6]。

麒麟丸为广州太安堂药业在经典名方五子衍宗丸的基础上进行改良配制的新生代中药制剂^[7], 由何首乌、菟丝子、覆盆子、郁金、山药、淫羊藿、青皮、党参、枸杞等 15 味中药组成的浓缩丸制剂, 主治补肾填精、益气养血^[8-9]。虽然目前麒麟丸已应用于中医临床治疗特发性 AS 并取得良好的临床治疗效果^[10-12], 但由于其成分复杂, 目前多局限于临床应用研究, 仅有 5 项相应的基础研究^[13], 且多局限于表层药效, 对麒麟丸治疗特发性 AS 的作用机制尚不十分明确。本研究通过雷公藤多苷诱导的特发性 AS 大鼠模型, 评价麒麟丸在特发性 AS 治疗上的效果, 并探究其作用机制, 为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

75 只体质量 (220 ± 15) g、6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠购买于上海必凯科翼生物科技有限公司, 动

物生产许可证 SCXK (沪) 2018-0006, 合格证号 20180006051392, 饲养于江苏卫生健康职业学院中心实验室动物房, 在 12 h 光照/12 h 黑暗循环下自由饮水和饮食, 饲养温度为 (20 ± 2) °C、相对湿度为 (60 ± 10) %。经江苏卫生健康职业学院动物伦理委员会批准, 伦理合格证号为 JHVC-IACUC-2023-B019。

1.2 药物及主要试剂

麒麟丸 (广东太安堂药业股份有限公司, 批号 Z11020188, 每瓶装 90 g); 雷公藤多苷 (CAS 号 38748-32-2, 货号 HY-32735, MCE 科技有限公司); 大鼠睾酮 (T)、雌二醇 (E_2)、促黄体生成激素 (LH) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司); 左卡尼汀 (CAS 号 541-15-1, 货号 8.40092, 美国 Sigma 公司); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号 C0105S, 碧云天生物科技有限公司); 通用荧光定量 PCR 试剂盒 (货号 Q412-02)、RNA 提取试剂盒 (货号 R701-01)、SuperMix (货号 R423-01) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 兔源细胞色素 P450 19A1 (CYP19A1) 抗体 (货号 16554-1-AP)、细胞色素 P450 11A1 (CYP11A1) 抗体 (货号 13363-1-AP)、雌激素受体 α (ESR1) 抗体 (货号 21244-1-AP) 均购自武汉三鹰科技有限公司; 兔源性别决定区 Y 框蛋白 9 (SOX9) 抗体 (货号 AF6330)、 β -actin 抗体 (货号 AF7018) 均购自上海亲科生物有限公司。

1.3 主要仪器

SpectraMax iD5 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Amersham Imager600 凝胶成像分析

系统(美国 GE 集团); QuantStudio™ 7 Flex 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 系统(美国 applied biosystems 公司); HistoCore Arcadia 全自动组织包埋仪、HistoCore AUTOCUT 全自动石蜡切片机、HistoCore SPECTRA 染色和封片工作站、DM2000 正置光学显微镜、DMi8 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); Hariomed GSA-810 全自动精液常规分析系统(广州华粤行医疗科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及干预

SPF 级雄性 SD 大鼠 75 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分对照组、模型组、左卡尼汀(阳性药, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和麒麟丸低、高剂量(0.5 、 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组, 每组 15 只。麒麟丸和左卡尼汀溶于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 羧甲基纤维素钠(CMCC-Na)溶液中用于 ig 给药。给药过程中, 除对照组外, 其余 4 组 ig 给予雷公藤多苷 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)诱导 AS 模型^[14], 于 7 d 后眼内眦取血, 检测对照组、模型组血清 T 含量, 出现显著差异时表明模型成功。实验期间, 所有大鼠自由饮水和饮食, 每天固定时间 ig 给药。于干预 21 d 后结束实验。

2.2 生殖器官指数评价

大鼠取血后, 取出双侧睾丸和双侧附睾, 并使用 0.9%氯化钠溶液清洗至无血色, 置于滤纸上吸干多余液体后称质量, 评估脏器指数。

脏器指数 = 所取组织质量 / 大鼠体质量

2.3 精子参数检测

实验结束后, 将左侧睾丸取出, 并清洗至无血色, 使用无菌注射器和 0.9%氯化钠溶液冲出精子, 放入水浴箱中获能 30 min。采用 GSA-810 附带的精子质量检测系统检测精子形态, 并统计精子参数。

2.4 酶联免疫法检测血清性激素水平

实验结束后, 使用异氟烷和气体麻醉机麻醉大鼠, 使用一次性采血管进行腹主动脉取血, 大鼠血液样本经室温静置 2~4 h 后于 4°C 高速离心机 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上层血清作为样本进行血清性激素(T、 E_2 和 LH)检测, 测定方法均按照市售试剂盒说明书进行, 并在 SpectraMax iD5 系统中进行检测。

2.5 HE 染色观察睾丸组织病理变化

每组随机选取的 6 只大鼠, 取右侧睾丸置于 4%的多聚甲醛固定液中固定 72 h, 用石蜡进行包埋, 制作 $5 \mu\text{m}$ 的切片, 用 HE 染色法进行染色, 在正置

光学显微镜下, 用 $20\times$ 倍率成像, 使各视野大小一致。肉眼计数该视野内细胞的细胞核完成细胞计数。在同一视野下采集生精细胞和间质细胞的图像, 用于后续分析。

2.6 免疫荧光法检测 SOX-9 表达

将石蜡切片使用乙醇梯度洗脱脱蜡, 经抗原修复和 DNA 变性后使用 3%过氧化氢溶液避光孵育 30 min, 阻断内源性过氧化物酶, 并以 3%的牛血清白蛋白(BSA)溶液作为封闭液室温孵育 30 min。石蜡切片与配制好的兔源 SOX-9 混合一级抗体置于湿盒中 4°C 孵育过夜。使用 FITC 标记的驴抗兔 IgG 配制混合二抗, 将孵育完成一级抗体的切片置于湿盒中, 在切片圈里滴加混合二抗室温孵育 1 h 后进行 DAPI 染色。使用甘油封片后立即在荧光显微镜下观察染色情况, 并于激光共聚焦显微镜进行扫描。

2.7 Western blotting 检测 CYP19A1、CYP11A1 和 ESR1 蛋白表达

睾丸组织使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍后, 加入含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞(每 10 mg 组织加入 $100 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液), 组织研磨仪研磨 5 min 后, 于冰上裂解 30 min, BCA 定量后加入缓冲溶液并于 100°C 恒温水浴变性 10 min 后进行蛋白检测。每孔上样量控制在 30 mg, 80 V、30 min 电泳至浓缩胶后继续电泳 120 V、55 min 完成电泳。300 mA 恒温冰水浴条件下转膜 120 min 后于摇床使用 5%脱脂牛奶封闭蛋白 2 h。 4°C 冰箱中摇床振摇过夜进行一级抗体孵育, 隔日进行抗体清洗后, 于常温摇床振摇, 孵育二级抗体 2 h, 清洗后于凝胶成像系统进行显色, 成像结果使用 Image J 进行灰度积分并分析。

2.8 qRT-PCR 法检测 CYP19A1、CYP11A1 和 ESR1 基因表达

用总 RNA 提取液分离睾丸组织总 mRNA, 加入 SuperMix 逆转录合成 cDNA。使用 SYBR qPCR Master Mix 于 qRT-PCR 仪进行基因扩增, 在 95°C 预变性 10 min, 然后在 95°C 变性 15 s、 55°C 退火 20 s 和 72°C 延伸 20 s 进行 40 个循环。将各基因的 mRNA 水平归一化至 GAPDH 水平, 其他基因的相对表达丰度通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。引物设计见表 1。

2.9 数据处理

使用 Graphpad prism 8.3.0 进行统计学和可视化分析, 2 组和多组间使用单因素方差分析和 t 检验进行差异性分析, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 呈现。

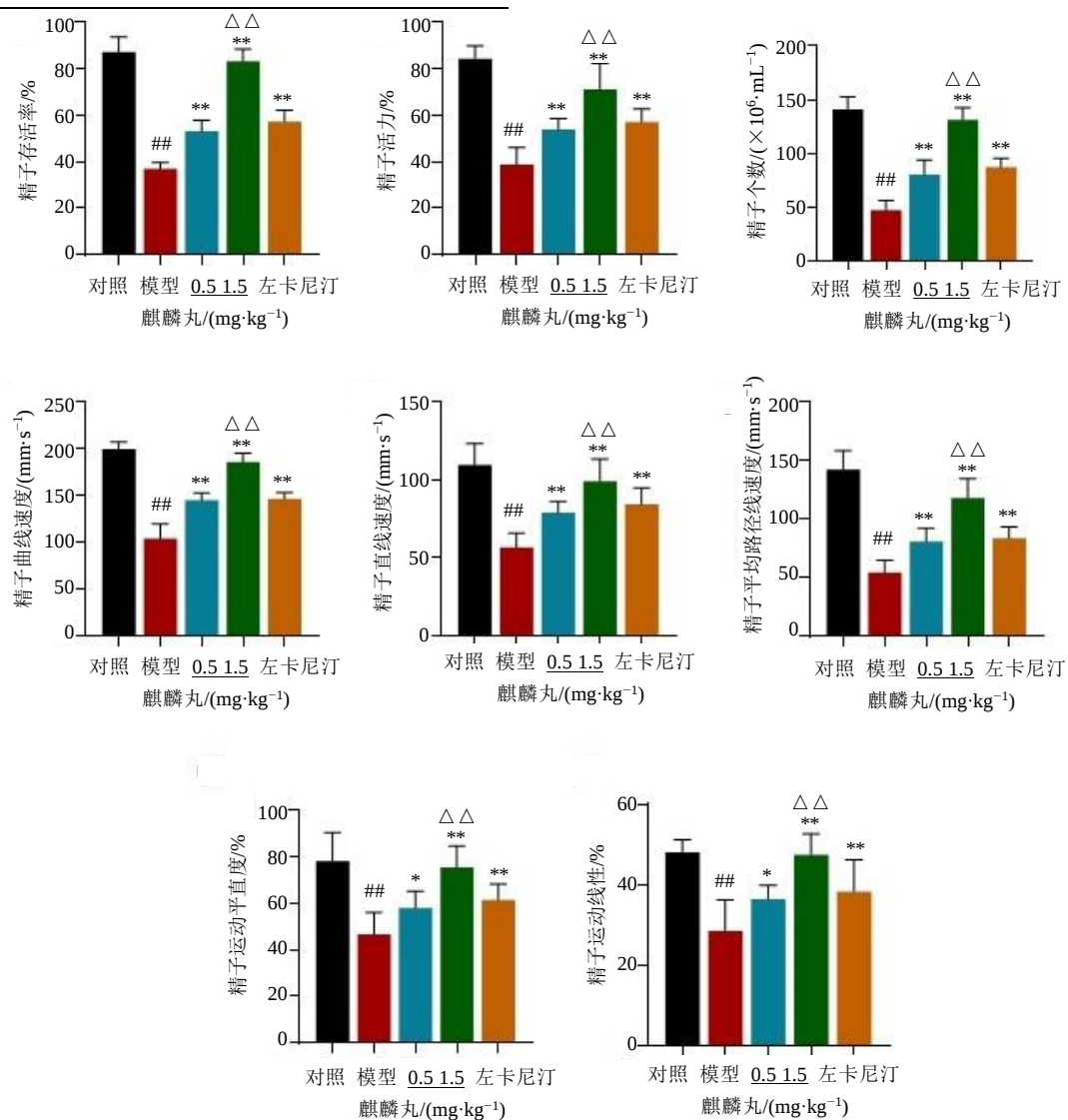
表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'→3')
<i>CYP19A1</i>	F: TCCTCCTGATTCGGAATTGTG R: GGCCCGATTCCCAGACA
<i>CYP11A1</i>	F: GCTGGAAGGTGTAGCTCAGG R: TCACTGGTGTGGAACATCTGG
<i>ESR1</i>	F: TCCAAGGGAACGAGCTGGAG R: TACGAAAAGACCGCCGAGGA
<i>GAPDH</i>	F: GCCAAGTATGATGACATCAAGAAG R: AGCCCAAGGATGCCCTTTAGT

3 结果

3.1 麒麟丸对大鼠精子质量的影响

大鼠精液参数检测结果如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠精子存活率、精子活力、精子数量和精子运动参数均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸低、高剂量组大鼠精子存活率、精子活力、精子数量和精子运动参数有显著恢复 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且高剂量组较左卡尼汀组有明显优势 ($P < 0.01$)。精子形态结果如图 2 所示, 对照组大鼠精子多而密集, 精子形态正常, 鞭毛直或成弹跳运



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与左卡尼汀组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs levocarnitine group.

图 1 各组大鼠精子存活率、精子活力、精子数量、精子曲线速度、精子直线速度、精子平均路径速度、精子运动平直度、精子运动线性结果($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 1 Sperm viability, sperm motility, sperm concentration, sperm velocity curved line, sperm velocity straight line, sperm velocity average path, straightness, linearity of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

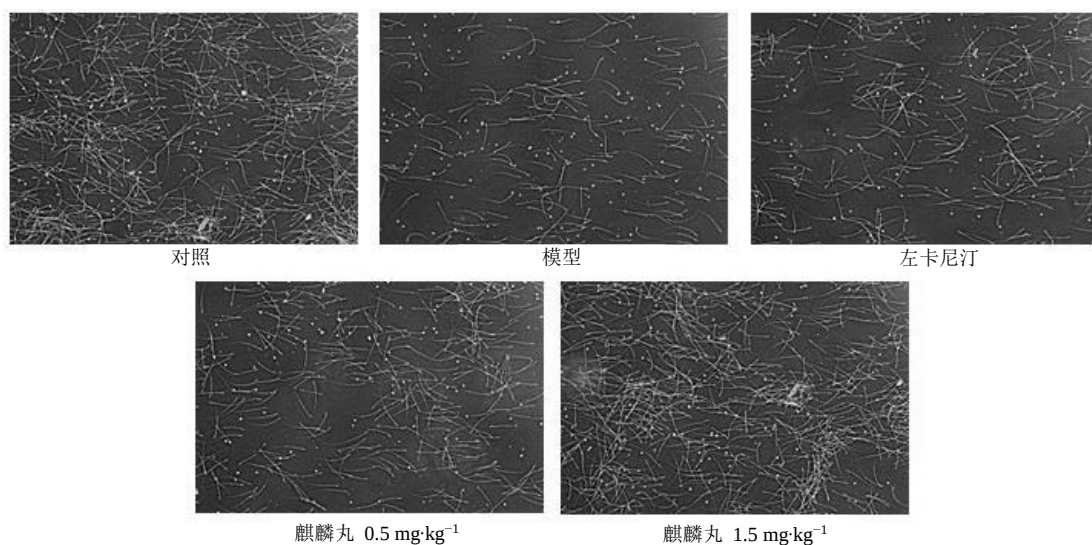


图 2 各组大鼠精子形态 (×400)

Fig. 2 Sperm morphology of rats in each group (×400)

动状;与对照组相比,模型组大鼠精子数量明显减少,精子存在尾折、颈折、体折等畸形状态;与模型组相比,麒麟丸高剂量组大鼠精子数量得到明显恢复,精子形态大多数正常,但存在个别颈折、尾折样畸形精子。

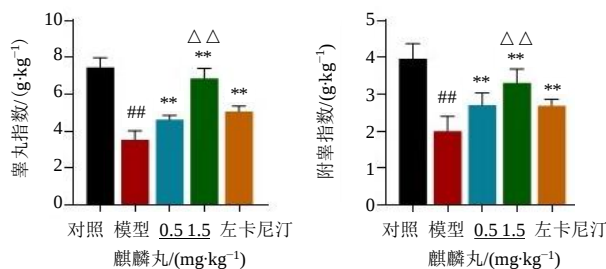
3.2 大鼠性器官指数评估

脏器指数评估结果如图 3 所示,与对照组相比,模型组大鼠睾丸指数和附睾指数均有显著降低 ($P<0.01$);给药麒麟丸后这种降低较模型组得到明显逆转 ($P<0.01$),且麒麟丸高剂量组的性器官指数均优于左卡尼汀组 ($P<0.01$)。

3.3 大鼠血清性激素水平

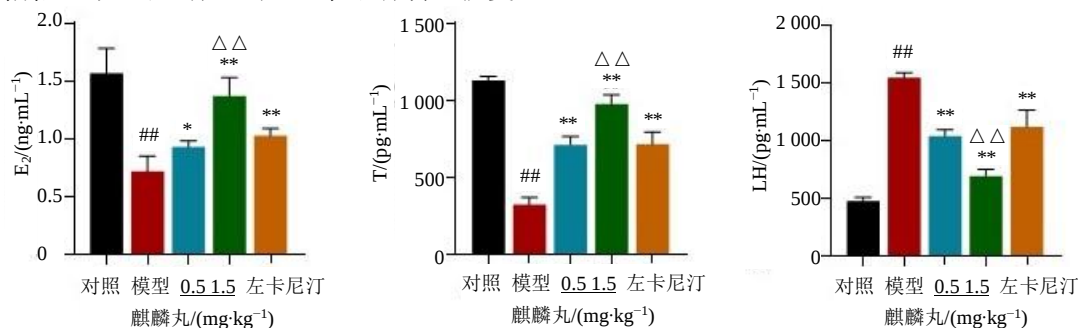
ELISA 测定结果如图 4 所示,与对照组相比,模型组大鼠血清 E_2 、T 水平显著降低 ($P<0.01$), LH 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组相比,麒麟丸低、高剂量组大鼠血清 E_2 和 T 水平有明显恢复

($P<0.05$ 、 0.01), LH 水平明显降低 ($P<0.01$);与左卡尼汀组相比,麒麟丸高剂量组血清性激素水平表现出明显的治疗优势 ($P<0.01$)。



与对照组比较: $##P<0.01$;与模型组比较: $**P<0.01$;与左卡尼汀组比较: $\Delta\Delta P<0.01$ 。

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

图 3 各组大鼠睾丸指数和附睾指数 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)Fig. 3 Testicular index and epididymal index of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

与对照组比较: $##P<0.01$;与模型组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$;与左卡尼汀组比较: $\Delta\Delta P<0.01$ 。

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

图 4 各组大鼠血清 E_2 、T、LH 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)Fig. 4 Levels of E_2 , T, and LH in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

3.4 各组大鼠睾丸病理损伤情况比较

HE 染色结果表明 (图 5), 模型诱导的 AS 大鼠睾丸生精小管萎缩严重, 生精细胞明显脱落且存在裂隙, 间质细胞较对照组明显减少且呈萎缩状; 麒麟丸高剂量组睾丸组织形态学得到明显恢复, 生精细胞排列紧密且细胞脱落减少, 生精小管面积有明显恢复, 间质细胞饱满, 数量较模型组明显恢复, 且较左卡尼汀组药效更优。

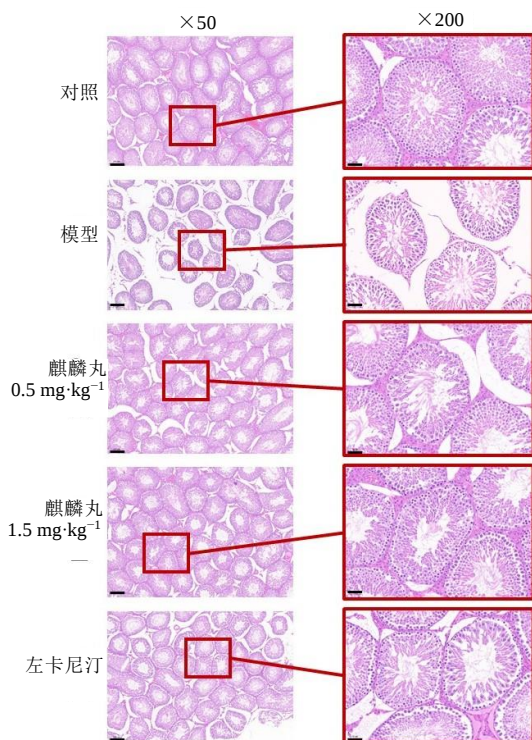


图 5 各组大鼠睾丸组织 HE 染色

Fig. 5 HE staining of testicular tissue of rats in each group

3.5 大鼠生精细胞和间质细胞数量

HE 统计结果显示 (图 6), 与对照组相比, 模型组大鼠同一视野内生精细胞和间质细胞个数显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸低、高剂量组大鼠睾丸组织中生精细胞和间质细胞个数有明显恢复 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与左卡尼汀组相比, 麒麟丸高剂量组生精细胞和间质细胞个数表现出明显的恢复优势 ($P < 0.05$)。

3.6 免疫荧光法检测 SOX-9 表达

免疫荧光结果显示 (图 7、图 8), 与对照组相比, 模型组大鼠同一视野内支持细胞生物标志物 SOX-9 表达明显降低, 支持细胞数量显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸低、高剂量组大鼠睾丸组织中支持细胞数量有明显恢复 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与左卡尼汀组相比, 麒麟丸高剂量组的支持

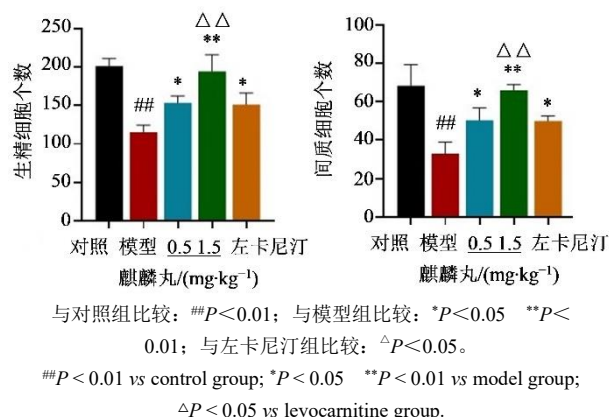


图 6 各组大鼠同一视野内的生精细胞数量和间质细胞数量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Number of spermatogenic cells and number of interstitial cells in same visual field of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

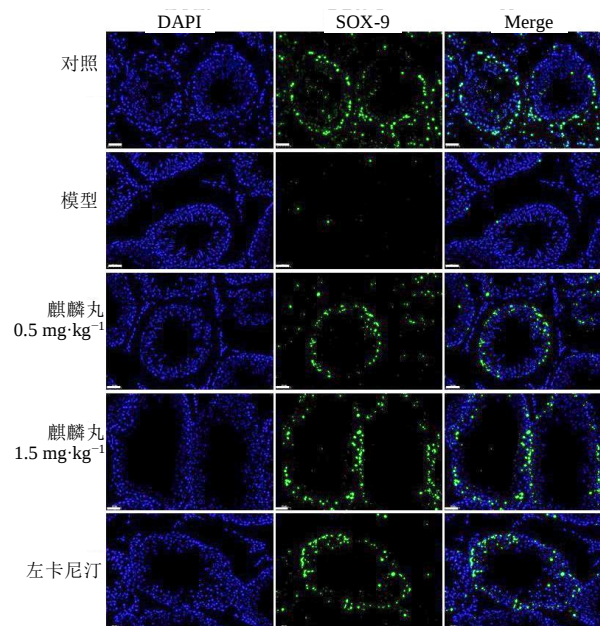


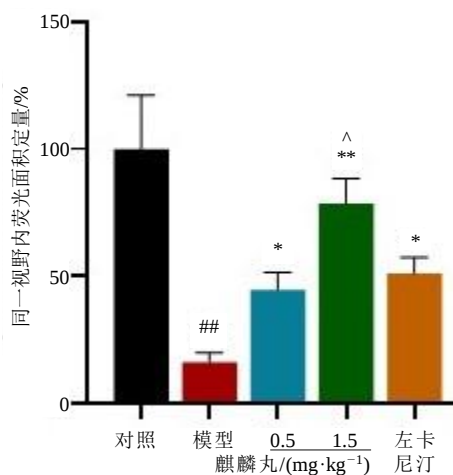
图 7 大鼠支持细胞标志物 SOX-9 表达免疫荧光图 ($\times 200$)

Fig. 7 Immunofluorescence images of sertoli cell marker SOX-9 expression in each group of rats ($\times 200$)

细胞数量恢复更加显著 ($P < 0.05$)。

3.7 大鼠 CYP19A1、CYP11A1、ESR1 基因及蛋白的表达

如图 9 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠睾丸组织 CYP19A1、CYP11A1 和 ESR1 基因表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸高剂量组大鼠睾丸组织 CYP19A1、CYP11A1 和 ESR1 基因表达上调显著 ($P < 0.01$); 与左卡尼汀组相比, 麒麟丸

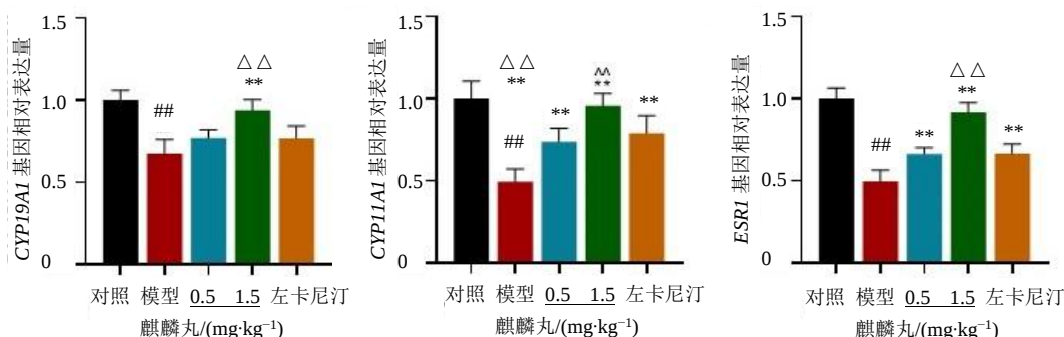


与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与左卡尼汀组比较: ^ $P < 0.05$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ^ $P < 0.05$ vs levocarnitine group.

图 8 免疫荧光图同一视野内荧光面积定量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Quantification of fluorescent area in same field of view in immunofluorescence images ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与左卡尼汀组比较: ΔΔ $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group; ΔΔ $P < 0.01$ vs levocarnitine group.

图 9 各组大鼠睾丸组织 *CYP19A1*、*CYP11A1* 和 *ESR1* 基因表达($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 9 Gene expression of *CYP19A1*, *CYP11A1* and *ESR1* in testicular tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

保护睾丸组织支持细胞和间质细胞, 促进性激素分泌和结合, 治疗特发性 AS。

精子的生成十分复杂, 是由 T 和 E_2 诱导的精子持续产生的协调过程, 并且依赖于完整且平衡的下丘脑-垂体-睾丸体系^[16]。下丘脑分泌的 LH 刺激睾丸细胞产生 T, 这是精子发生所必需的^[17]。*CYP11A1* 是类固醇激素合成第一步反应由胆固醇生成孕烯醇酮的限速酶, 其表达量直接与所有类固醇性激素的含量呈正相关^[18-20]。*CYP19A1* 芳香化酶可催化部分体内 T 产生 E_2 , E_2 和 T 共同促进精子的生成和正常发育^[21-22]。已有研究表明, 芳香化酶 P450 抑制剂可阻断 T 诱导的半去势大鼠的性行

高剂量组的 *CYP19A1*、*CYP11A1* 和 *ESR1* 基因表达水平上调更加明显 ($P < 0.01$)。

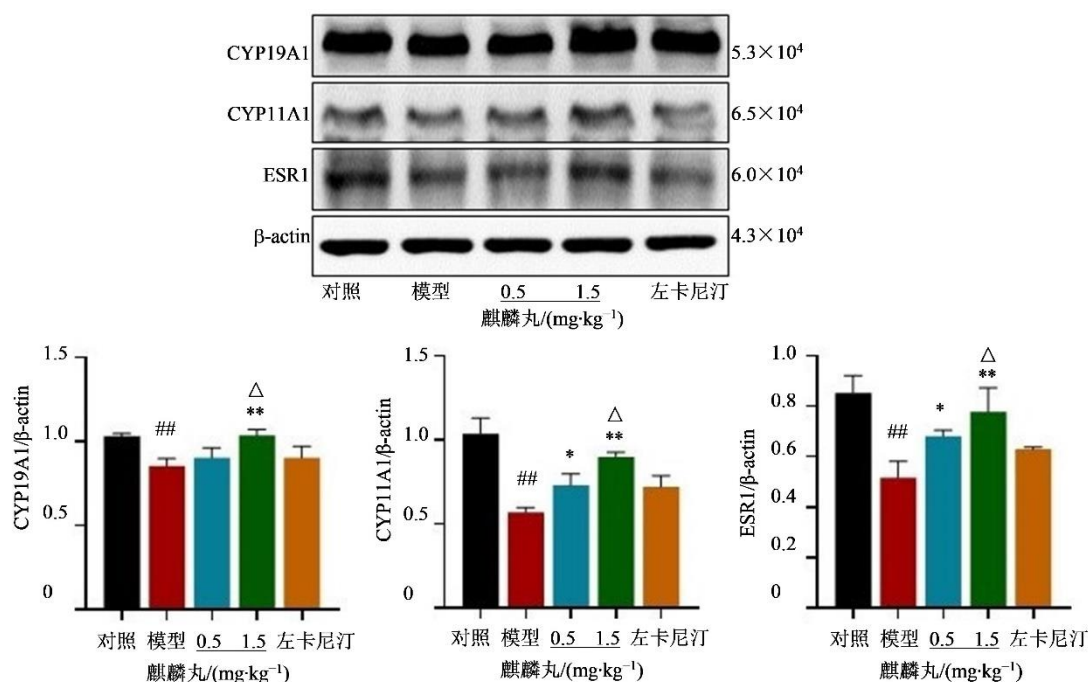
如图 10 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠睾丸组织 *CYP19A1*、*CYP11A1* 和 *ESR1* 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸高剂量组大鼠睾丸组织 *CYP19A1*、*CYP11A1* 和 *ESR1* 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$); 与左卡尼汀组相比, 麒麟丸高剂量组的 *CYP19A1*、*CYP11A1* 和 *ESR1* 蛋白表达水平上调更加明显 ($P < 0.01$)。

4 讨论

麒麟丸是取得明显临床疗效和广泛认知的“新生代”中药制剂, 已成为中医临床治疗特发性 AS 的一线用药之一^[15]。但由于其成分复杂, 治疗 AS 的作用机制尚不十分明确。本研究采用雷公藤多苷诱导的 AS 大鼠为动物模型, 从药效-表型-细胞-分子的角度逐一探索, 讨论麒麟丸治疗特发性 AS 的作用机制。研究结果发现, 麒麟丸可通过恢复 *CYP19A1*、*CYP11A1* 和 *ESR1* 的基因和蛋白表达,

为^[23]。本研究结果发现, 麒麟丸可显著上调 *CYP19A1* 和 *CYP11A1* 的基因和蛋白表达, 恢复体内的激素平衡。而实验结果中发现给药麒麟丸后 LH 的表达降低, 这可能是垂体-睾丸轴的负反馈调节导致, 麒麟丸恢复了 T 的正向合成, T 水平负反馈调节垂体导致了 LH 分泌减少^[24]。

雌激素受体广泛分布于睾丸组织的支持细胞、间质细胞和生精细胞中, 可在细胞内部与 E_2 结合作为转录因子入核, 从而调控其他性激素相关基因如芳香化酶 P450 家族成员和精子发生相关基因表达, *ESR1* 是编码雌激素受体 α 的基因^[25-26]。有研究发现, *ESR1* 缺陷可导致男性不育症的发生^[27]。麒麟



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与左卡尼汀组比较: ^Δ $P < 0.05$ 。

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

图 10 各组大鼠睾丸组织 CYP19A1、CYP11A1 和 ESR1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Protein expression of CYP19A1, CYP11A1 and ESR1 in testicular tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

丸中活性成分淫羊藿苷可通过调控 ESR1/Src/Akt/Creb/Sf-1 通路促进小鼠间质细胞 T 合成, 这与本研究结果高度吻合^[28]。

本研究发现麒麟丸可通过恢复 CYP19A1、CYP11A1 和 ESR1 基因和蛋白的表达促进 T 和 E₂ 合成治疗特发性 AS, 为麒麟丸的临床应用建立了一定的研究基础, 也为提高麒麟丸的国际认知提供了基础研究支撑。但同时本研究仍存在一定的不足: (1) 研究未探索麒麟丸对睾丸几种固有细胞单独的调控效果, 仅停留于睾丸组织层面探讨; (2) 并未在体外实验或体内实验进行反向验证, 探索的证据链条存在一定程度的缺失。本课题组会在后续的研究中逐一探明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kimmins S, Anderson R A, Barratt C L R, et al. Frequency, morbidity and equity: The case for increased research on male fertility [J]. Nat Rev Urol, 2024, 21: 102-124.
- [2] WHO. Infecundity, infertility, and childlessness in Developing Countries - DHS Comparative reports no. 9. (2004).
- [3] Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia [J]. Asian J Androl, 2006, 8(2): 143-157.

- [4] Björndahl L, Barratt C L R, Mortimer D, et al. Standards in Semen examination: Publishing reproducible and reliable data based on high-quality methodology [J]. Hum Reprod, 2022, 37(11): 2497-2502.
- [5] Forti G, Krausz C. Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(12): 4177-4188.
- [6] Bracke A, Peeters K, Punjabi U, et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility [J]. Reprod Biomed Online, 2018, 36(3): 327-339.
- [7] 谢成松. 现代中药麒麟丸生殖药理毒理研究进展 [A] // 中国毒理学会生殖毒理专业委员会. 2017 年生殖毒理药理学理论与技术及科技产品研发学术交流论文集 [C]. 遵义: 广东太安堂药业股份有限公司, 2017. Xie C S. Progress in Reproductive Pharmacology and Toxicology Research of Modern Chinese Medicine Qilin Pill [A] // Reproductive Toxicology Professional Committee of the Chinese Society of Toxicology Proceedings of the 2017 Academic Exchange Conference on Reproductive Toxicology Pharmacology Theory and Technology, and Technological Product Development [C]. Zunyi: Guangdong Tai'antang Pharmaceutical Co., Ltd. 2017.
- [8] 刘胜京, 郭博达, 郭军, 等. 麒麟丸对弱精子症大鼠生殖系统的保护作用及调控机制探讨 [J]. 中国男科学杂志, 2019, 33(6): 23-27.

- Liu S J, Guo B D, Guo J, et al. The protective effect of QiLin Pill on sperm motility of asthenospermia rats and its related molecular mechanism [J]. *Chin J Androl*, 2019, 33(6): 23-27.
- [9] 马瑞红, 李萌, 夏天. 麒麟丸治疗女性不孕症的临床研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(6): 1173-1180.
- Ma R H, Li M, Xia T. Clinical research progress of Qilin Pill in treatment of female infertility [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(6): 1173-1180.
- [10] 石洪波, 孙晓松, 门晓伟, 等. 麒麟丸治疗脾肾阳虚少弱精症的临床疗效观察 [A] // 中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会第十四次全国学术会议暨2016年广东省中西医结合学会泌尿外科专业委员会学术年会论文集 [C]. 广州: 中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会, 2016.
- Shi H b, Sun X s, Men X w, et al. Observation of the Clinical Efficacy of Qilin Pill in the Treatment of Spleen Kidney Yang Deficiency and Oligozoospermia [A]//Proceedings of the 14th National Academic Conference of the Urology Professional Committee of the Chinese Association of Traditional Chinese and Western Medicine and the 2016 Annual Conference of the Urology Professional Committee of the Guangdong Association of Traditional Chinese and Western Medicine [C]. Guangzhou, 2016.
- [11] 黄鹏, 刘小良, 冷远景, 等. 麒麟丸对少弱精子症治疗效果的临床观察 [J]. *中华男科学杂志*, 2019, 25(7): 647-650.
- Huang P, Liu X L, Leng Y J, et al. Qilin Pills improve sperm quality in patients with oligozoospermia [J]. *Natl J Androl*, 2019, 25(7): 647-650.
- [12] 晏斌, 郭军, 高庆和, 等. 从“异病同治”谈麒麟丸在男科中的应用进展 [J]. *中国性科学*, 2020, 29(4): 108-111.
- Yan B, Guo J, Gao Q H, et al. Discussion on the application of Qilin pills in andrology from the perspective of “treating different diseases with the same method” [J]. *Chin J Hum Sex*, 2020, 29(4): 108-111.
- [13] 刘纳川, 王一洲, 姚晨成, 等. 麒麟丸对无精子症模型小鼠睾丸生精功能的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2018, 24(9): 811-818.
- Liu N C, Wang Y Z, Yao C C, et al. Qilin Pills promote testicular spermatogenesis in azoospermia mice [J]. *Natl J Androl*, 2018, 24(9): 811-818.
- [14] 孙天松, 李波男, 何清湖. 少弱精子症动物模型建立方法及模型评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 179-185.
- Chen T S, Li B N, He Q H. Establishment and evaluation of animal models of oligoasthenospermia [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(14): 179-185.
- [15] 陈敏, 宾彬, 陆海旺. 少弱精子症的中医药治疗进展 [J]. *西部中医药*, 2023, 36(10): 158-161.
- Chen M, Bin B, Lu H W. Advance in TCM therapy of oligoasthenospermia [J]. *West J Tradit Chin Med*, 2023, 36(10): 158-161.
- [16] Neto F T L, Bach P V, Najari B B, et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 10-26.
- [17] Skorupskaite K, George J T, Anderson R A. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(4): 485-500.
- [18] Moon J Y, Choi M H, Kim J. Metabolic profiling of cholesterol and sex steroid hormones to monitor urological diseases [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(10): R455-R467.
- [19] Witchel S F, Pinto B, Burghard A C, et al. Update on adrenarche [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2020, 32(4): 574-581.
- [20] Weigel N L, Moore N L. Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action [J]. *Nucl Recept Signal*, 2007, 5: e005.
- [21] Cooke P S, Nanjappa M K, Ko C, et al. Estrogens in male physiology [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(3): 995-1043.
- [22] Thirumalai A, Page S T. Male hormonal contraception [J]. *Annu Rev Med*, 2020, 71: 17-31.
- [23] Morali G, Larsson K, Beyer C. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers [J]. *Horm Behav*, 1977, 9(3): 203-213.
- [24] Allan C M, Couse J F, Simanainen U, et al. Estradiol induction of spermatogenesis is mediated via an estrogen receptor- α mechanism involving neuroendocrine activation of follicle-stimulating hormone secretion [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2800-2810.
- [25] Zalata A, Abdalla H A, El-Bayoumy Y, et al. Oestrogen receptor α gene polymorphisms relationship with Semen variables in infertile men [J]. *Andrologia*, 2014, 46(6): 618-624.
- [26] Carreau S, Hess R A. Oestrogens and spermatogenesis [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2010, 365(1546): 1517-1535.
- [27] Cooke P S, Walker W H. Nonclassical androgen and estrogen signaling is essential for normal spermatogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 121: 71-81.
- [28] Sun J D, Xu W W, Zheng S Y, et al. Icaritin promotes mouse Leydig cell testosterone synthesis via the *Esr1/Src/Akt/Creb/Sf-1* pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 441: 115969.