

杜仲补天素胶囊改善环磷酰胺诱导的小鼠生精障碍研究

王梦梦, 克迎迎, 李亚格, 杨翠兰, 赵晨旭, 司文雅, 袁培培, 冯卫生, 郑晓珂*

河南中医药大学, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 采用环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)诱导的小鼠生精障碍模型, 探究杜仲补天素胶囊(Duzhong Butiansu Capsule, DBC)的生殖保护作用及其机制。方法 采用昆明种小鼠 ip CP (60 mg/kg) 制备生精障碍模型, 连续 5 d, 第 8 天起 ig 给予 DBC 高、低剂量 (1.388、0.694 g/kg) 干预 4 周, 给药结束后检测各组小鼠体质量、脏器指数变化, HE 染色检测睾丸病理结构变化, ELISA 法测定血清睾酮 (T)、促卵泡激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平; Western blotting 及免疫组化法分析睾丸组织中转录因子 Nrf2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NQO1)、组蛋白脱乙酰基酶 2 (HDAC2) 与磷酸化蛋白激酶 C (p-PKC) 表达。结果 与模型组比较, DBC 对小鼠体质量下降有极显著干预作用, 能够增加睾丸、附睾及肾脏指数, 改善睾丸病理形态损伤, 增加精子数、提高精子活力、降低精子畸形率, 提高 T 水平, 降低 LH、FSH 水平, 降低 MDA 含量, 提高 SOD、GSH-Px 活性, 提高 Nrf2、HO-1、NQO1、HDAC2 与 p-PKC 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 DBC 能够改善 CP 诱导的小鼠生精障碍, 其机制可能与调节氧化应激相关的 Nrf2/抗氧化作用元件 (ARE) 信号通路有关。

关键词: 杜仲补天素胶囊; 环磷酰胺; 生精障碍; 生殖保护; Nrf2/ARE 信号通路; 血红素氧合酶-1; 醌氧化还原酶 1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)11-2625-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.018

Effect of Duzhong Butiansu Capsule on improving spermatogenesis obstacle in mice induced by cyclophosphamide

WANG Meng-meng, KE Ying-ying, LI Ya-ge, YANG Cui-lan, ZHAO Chen-xu, SI Wen-ya, YUAN Pei-pei, FENG Wei-sheng, ZHENG Xiao-ke

Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: **Objective** To investigate the reproductive protective effect of Duzhong Butiansu Capsule (DBC) by using cyclophosphamide induced spermatogenic disorder model, and explore its mechanism. **Methods** The model of spermatogenic disorder was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (60 mg/kg) for 5 d. Drug intervention at high and low doses (1.388 g/kg and 0.694 g/kg) was given for 4 weeks from the 8th day. The body weight and organ index of each group were measured. The pathological structure of testis was detected by HE staining. ELISA method was used to detect the levels of T, FSH, LH, MDA, SOD, GSH-Px. Western blotting and immunohistochemistry were used to analyze the expression of Nrf2/ARE signaling pathway related factors Nrf2, HO-1, NQO1, HDAC2, and p-PKC in testicular tissue. **Results** Compared with the model group, DBC significantly reduced the weight of mice, increased the index of testis, epididymis and kidney, improved the pathological morphology of testis, increased the number of spermatozoa, increased the motility of sperm, decreased the rate of abnormal sperm, increased the level of T and decreased the level of LH and FSH, increased the content of MDA, decreased the content of SOD and GSH-Px, increased the expression of Nrf2, HO-1, NQO1, HDAC2, and p-PKC protein, and increased the area of positive expression of Nrf2, HO-1 protein ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** DBC can obviously improve the spermatogenic disorder induced by cyclophosphamide, and the mechanism may be related to the regulation of Nrf2/ARE signal pathway associated with oxidative stress. **Key words:** Duzhong Butiansu Capsule; cyclophosphamide; dyszoospermia; reproductive protection; Nrf2/ARE signal pathway; HO-1; NQO1

收稿日期: 2019-03-09

基金项目: 中央引导地方科技发展专项 (14204349)

作者简介: 王梦梦, 女, 硕士研究生。Tel: 15938973071 E-mail: 2810548778@qq.com

*通信作者 郑晓珂, 女, 教授。Tel: (0371)60190296 E-mail: zhengxk.2006@163.com

当今社会, 心血管疾病、肿瘤和不孕不育症并称为威胁人类健康的 3 大疾病^[1]。据世界卫生组织(WHO)统计, 约有 20% 的育龄夫妇受到不孕不育的困扰, 我国不育症的发病率在 10% 左右, 并有增加的趋势, 其中 40%~60% 为男性因素。导致男性不育的因素很多, 如遗传因素、内分泌因素、感染因素、精索静脉曲张、性功能障碍等, 但超过 60%~75% 的患者病因不明^[2-3]。生精细胞的数量、精液的射出量和浓度、精子的正常形态和顶体完整性、精子活力和活动率、精子的畸形率等指标出现问题都可能造成男性生育能力低下或者不育, 而生精障碍无疑是造成男性不育的重要因素。环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是一类广泛用于癌症治疗的双功能烷化剂。在 CP 的临床抗癌治疗中发现, 患者出现了不同程度的精子数减少、精子活力降低等生精障碍, 进而出现男性不育, 提示 CP 具有显著的生殖毒性^[4]。采用 CP 制备生精障碍动物模型, 具有作用快、周期短、较稳定的优势, 为男性不育症的临床前研究提供动物实验基础^[5-7]。

中医认为, 此类病症是元阳虚弱、肾阳不足所引起的, 临床表现为腰膝酸软、性欲淡漠、阳痿早泄、筋骨痿软、精弱不育诸证。在临床上, 中药及其复方制剂具有治疗靶点丰富的优势, 常结合中医辨证论治和整体观念来治疗生精障碍, 疗效显著。杜仲补天素胶囊(Duzhong Butiansu Capsule, DBC)是中药复方制剂, 含有盐杜仲、制菟丝子、肉苁蓉、制远志、酒当归等 20 多种中药, 具有温肾养心、壮腰安神的功效, 临床上常用于治疗腰膝酸软、夜多小便、神经衰弱、男性不育症等症^[8]。本实验选择 CP 制备生精障碍模型, 探究 DBC 的生殖保护及其作用机制, 以期 DBC 对生精障碍的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2016-0011, 在 IVC 独立送风隔离笼具中分笼饲养, 温度控制在(20±2)℃, 喂养标准全价饲料, 每日定食定水。

1.2 试剂

DBC(批号 2558002, 贵州汉方药业有限公司); 注射用 CP(批号 18062625, 江苏恒瑞盛迪医药有限公司); 全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio 公司); 预染蛋白 Marker(Thermo

公司); Nrf2 抗体(Abcam 公司); β -actin 抗体(ABclonal 公司); 山羊抗兔 IgG 二抗(Licor 公司); 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所); 睾酮(T)、促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)、转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶(NQO1)、组蛋白脱乙酰基酶 2(HDAC2)、磷酸化蛋白激酶 C(p-PKC)试剂盒(江苏卡尔文生物技术有限公司)。

1.3 仪器

Aria 电脑工作站(BD 公司); Trans-Blot® Plus 转印槽、电泳仪(Bio-Rad 公司); Odyssey CLx 双色红外激光成像系统(Li-Cor 公司); Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Fisher 公司); 5840R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司); AdvantageA10 超纯水器、BT25S 十万分之一精密分析天平(Sartorius 公司); TS-2 水平摇床(Kylin-bell Lab Instruments 公司); 自动洗板机(Thermo 公司); TMC 恒温孵育器(合肥艾本森科学仪器有限公司); JFX-B 精子质量分析仪(石家庄市华众医疗用品有限公司); VC 独立送风隔离笼具(苏州冯氏实验动物设备有限公司); BCD-206TAS 低温冰箱(海尔公司); 微量移液器(Gilson 公司); DZF-6050B 型真空干燥箱(北京恒泰丰科实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

小鼠适应性饲养 5 d 后根据体质量均衡原则随机分为对照组和造模组。根据文献报道^[9-10]和预试验结果, 造模组小鼠连续 5 d ip CP(60 mg/kg)制备生精障碍模型, 造模组和对照组小鼠体质量、血清中性激素 T、FSH、LH 水平出现显著性差异即为造模成功。随后将造模成功的小鼠随机分为模型组及 DBC 高、低剂量(1.388、0.694 g/kg)组。第 8 天起每组小鼠分别 ig 给药, 连续 4 周, 对照组和模型组小鼠给予同体积的蒸馏水。每天记录小鼠体质量、饮食饮水量和外观变化。末次给药后, 眼眶静脉丛取血后脱颈椎处死小鼠, 3 000 r/min 离心 10 min 取上层血清, 置于-80℃备用。

2.2 生殖器官指数检测

眼眶静脉丛取血后脱颈椎处死小鼠, 迅速摘取各组小鼠的睾丸、附睾、肾等组织, 并清除周围脂肪及结缔组织, 称质量并计算脏器指数。

脏器指数=脏器质量/体质量

2.3 精子参数检测

取小鼠右侧附睾，加 500 μ L PBS 剪碎，放到恒温孵育器上孵育 15 min，使精子充分游出，用 70 μ m 滤膜滤过得上清液，加 500 μ L PBS，取 500 μ L 混合液加入等体积 NaHCO_3 固定，放在显微镜下观察，计算精子数；另取 20 μ L 混合液做玻片，在精子质量分析仪上检测精子活力、精子畸形率^[11]。

2.4 睾丸组织病理学检测

取小鼠新鲜右侧睾丸组织，用 10% 的甲醛溶液固定，用梯度乙醇脱水，石蜡包埋，5 μ m 切片，HE 染色，观察显微镜下睾丸组织结构的变化。

2.5 性激素水平、氧化应激水平检测

根据试剂盒说明书检测血清中 T、FSH、LH、MDA、SOD、GSH-Px 水平。

2.6 ELISA 法检测 Nrf2/ARE 信号通路相关因子

ELISA 试剂盒检测睾丸匀浆中的 Nrf2、p-PKC、HDAC2、HO-1、NQO1 水平。

2.7 Western blotting 法测定 Nrf2/ARE 信号通路蛋白表达

取小鼠睾丸组织，按试剂盒说明书操作步骤提取各组睾丸总蛋白，用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，通过 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜，用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，加入一抗 Nrf2 (1:500)、 β -actin (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，分别加入兔源二抗 (1:2 000) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，采用超灵敏多功能成像仪采集蛋白条带，并用 Quantity One 软件对蛋白条带进行分析。

2.8 免疫组化法测定 Nrf2/ARE 信号通路蛋白表达

小鼠睾丸组织切片常规脱蜡入水，高压修复，3% 双氧水浸泡 20 min，每次 PBS 洗 3 次，每次 15 min；加入兔抗 Nrf2 (1:500)、 β -actin (1:1 000)，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，PBST 洗 5 次，加入兔源二抗 (1/2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，PBST 洗 5 次；DAB 工作液显色 10 min，用苏木精复染，常规封片，在显微镜下观察。阳性部位呈棕色，与 DAB 显色形成的褐色沉淀对比^[12]。每组内每张切片随机挑选至少 3 个同倍视野进行拍照。拍照时尽量让组织充满整个视野，保证每张照片的背景光一致。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准，把测量区域转化为灰度图片，再对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累积吸光度 (A) 值以及组织的像素面积 (Area)。并求出平均 A 值，平均 A 值 = A/Area ，平均 A 值越大表明阳性表达水平越高。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对实验结果进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，组间采用 LSD 检验，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 DBC 对生精障碍小鼠一般情况的影响

造模前，小鼠状态良好，活泼有力，反应敏捷，饮食正常，体毛有光泽。造模后，与对照组比较，造模组小鼠出现精神萎靡、嗜睡、活动减少、畏寒、体毛无光泽、体质量降低、睾丸萎缩、饮食饮水减少等现象。与模型组比较，DBC 给药组小鼠状态萎靡现象好转、活动增加、体毛恢复带有光泽状态、食量增加，睾丸萎缩状态有所恢复，其中 DBC 高剂量效果最为明显。

3.2 DBC 对生精障碍小鼠体质量的影响

由表 1 可以看出，与对照组比较，模型组小鼠的体质量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，DBC 能够显著改善小鼠体质量的降低 ($P < 0.01$)。

表 1 DBC 对生精障碍小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of DBC on body weight in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	体质量/g
对照	—	43.11 $\pm$ 3.50
模型	—	34.91 $\pm$ 6.23**
DBC	0.694	40.50 $\pm$ 2.76 ^{##}
	1.388	40.70 $\pm$ 2.22 ^{##}

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

** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.3 DBC 对生精障碍小鼠脏器指数的影响

与对照组比较，模型组小鼠睾丸、附睾、肾等脏器指数显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，DBC 能够显著提高小鼠附睾、肾脏指数 ($P < 0.05, 0.01$)，见表 2。

3.4 DBC 对生精障碍小鼠精子指标的影响

与对照组比较，模型组小鼠的精子数、精子活力、总精子活力显著降低 ($P < 0.01$)，精子畸形率显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，DBC 能够显著改善造模后小鼠精子数减少、活力下降、畸形率升高的现象 ($P < 0.01$)，见表 3。

3.5 DBC 对生精障碍小鼠性激素水平的影响

与对照组比较，模型组小鼠性激素 LH、FSH 水平显著升高 ($P < 0.01$)，T 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，DBC 能显著提高小鼠 T 水平，降低 LH、FSH 水平 ($P < 0.05, 0.01$)，见表 4。

表 2 DBC 对生精障碍小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of DBC on organ indexes in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	睾丸指数/%	附睾指数/%	肾脏指数/%
对照	—	0.94±0.32	0.21±0.04	1.42±0.13
模型	—	0.55±0.13**	0.13±0.04**	1.23±0.11**
DBC	0.694	0.95±0.18 ^{##}	0.20±0.02 ^{##}	1.46±0.13 ^{##}
	1.388	0.85±0.22 [#]	0.19±0.04 ^{##}	1.41±0.15 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below表 3 DBC 对生精障碍小鼠精子指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effect of DBC on sperm parameters in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	精子数/($\times 10^6$ ·mL ⁻¹)	活跃精子活力/%	总精子活力/%	精子畸形率/%
对照	—	1.55±0.16	0.37±0.02	0.58±0.05	0.05±0.04
模型	—	1.16±0.08**	0.12±0.05**	0.27±0.07**	0.18±0.04**
DBC	0.694	1.57±0.09 ^{##}	0.36±0.05 ^{##}	0.56±0.10 ^{##}	0.02±0.02 ^{##}
	1.388	1.72±0.25 ^{##}	0.38±0.05 ^{##}	0.60±0.06 ^{##}	0.05±0.02 ^{##}

表 4 DBC 对生精障碍小鼠性激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effect of DBC on serum sex hormone in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	T/(pg·mL ⁻¹)	FSH/(U·mL ⁻¹)	LH/(U·mL ⁻¹)
对照	—	693.84±77.70	33.59±0.52	4.47±0.24
模型	—	586.09±23.43**	42.91±4.80**	5.10±0.19**
DBC	0.694	697.69±61.38 ^{##}	39.16±2.47	5.01±0.33
	1.388	744.10±93.27 ^{##}	38.69±0.76 [#]	4.50±0.14 ^{##}

3.6 DBC 对生精障碍小鼠氧化水平的影响

与对照组比较, 模型组小鼠 SOD、GSH-Px 等抗氧化指标水平显著降低 ($P < 0.01$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DBC 低剂量组小鼠 MDA 水平显著降低, DBC 高剂量组小鼠 SOD 水平显著升高, DBC 高、低剂量组小鼠 GSH-Px 均显著升高 ($P < 0.01$), 见表 5。

3.7 DBC 对生精障碍小鼠睾丸组织病理学的影响

图 1 结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠睾丸组织严重损伤, 生精细胞数量明显减少, 曲细精管呈现空泡化, 间质细胞严重破坏, 细胞中变态精

子细胞减少, 细胞间距增大。与模型组比较, DBC 干预后, 小鼠睾丸生精细胞排列整齐、紧密、规则, 管腔内可见精子, 间质细胞发育良好, 曲细精管之间排列紧密, 生精上皮层数明显增多, 细胞内变态精子细胞增加, 细胞间距增大。DBC 高、低剂量均有效, 以低剂量效果最明显。

3.8 DBC 对生精障碍小鼠 Nrf2/ARE 信号通路相关因子的影响

3.8.1 ELISA 检测结果 由表 6 可以看出, 与对照组比较, 模型组小鼠 Nrf2、HO-1、NQO1、p-PKC、HDAC2 等 Nrf2/ARE 信号通路相关因子表达水平显

表 5 DBC 对生精障碍小鼠氧化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effect of DBC on serum oxidation reaction in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(ng·mL ⁻¹)	GSH-Px/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	5.83±1.67	70.72±3.59	1 948.9±117.78
模型	—	13.46±2.50**	62.41±0.89**	1 432.6±139.98**
DBC	0.694	5.83±1.59 ^{##}	64.79±1.33	1 951.9±160.51 ^{##}
	1.388	11.94±2.31	70.44±2.57 ^{##}	2 091.0±182.31 ^{##}

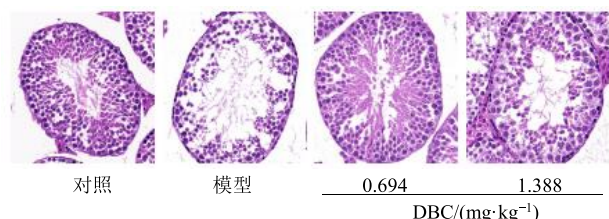


图 1 DBC 对生精障碍小鼠睾丸形态结构的影响 (HE, × 400)

Fig. 1 Effect of DBC on testicular morphology in model mice (HE, × 400)

表 6 DBC 对生精障碍小鼠 Nrf2/ARE 信号通路相关因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Effect of DBC on Nrf2/ARE signaling pathway in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Nrf2/ (pg·mL ⁻¹)	HO-1/ (U·L ⁻¹)	NQO1/ (ng·mL ⁻¹)	p-PKC/ (pg·mL ⁻¹)	HDAC2/ (pmol·mL ⁻¹)
对照	—	610.67 ± 18.15	42.81 ± 1.63	9.49 ± 0.45	1569.07 ± 168.26	3.88 ± 0.27
模型	—	536.20 ± 37.90**	38.85 ± 2.60**	8.45 ± 0.38**	1100.55 ± 70.92**	3.23 ± 0.10**
DBC	0.694	643.32 ± 47.85##	45.46 ± 3.16##	9.70 ± 0.42##	1662.77 ± 75.09##	3.38 ± 0.20##
	1.388	648.15 ± 54.09##	43.37 ± 2.44##	9.27 ± 0.59##	1632.50 ± 107.76##	3.61 ± 0.20##

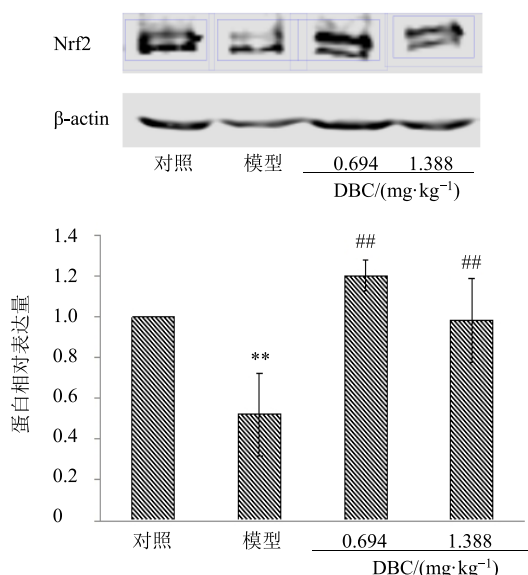


图 2 DBC 对生精障碍小鼠 Nrf2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effect of DBC on Nrf2 expression in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.8.3 免疫组化法检测结果 由图 3 可以看出, 在正常小鼠睾丸中, Nrf2、HO-1 蛋白在各级生精细胞中均有表达 (阳性部位呈棕色)。与对照组比较, 模型组小鼠睾丸中 Nrf2、HO-1 蛋白表达减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DBC 高、低剂量组小鼠睾丸中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著提高 ($P < 0.01$)。

著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DBC 高、低剂量均能极显著回调小鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、NQO1、p-PKC、HDAC2 蛋白因子表达水平 ($P < 0.01$)。

3.8.2 Western blotting 法检测结果 由图 2 可以看出, 与对照组比较, 模型组小鼠 Nrf2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DBC 高、低剂量组小鼠睾丸组织中 Nrf2 蛋白表达水平显著提高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

CP 进入体内在肝脏中转化成醛磷酰胺, 醛磷酰胺不稳定, 在肿瘤细胞内易分解成磷酰胺氮芥、丙烯醛, 磷酰胺氮芥干扰 DNA 及 RNA 功能, 尤其与 DNA 发生交叉联结, 可抑制 DNA 合成。药理研究发现, CP 的代谢产物丙烯醛具有强氧化性, 对未成熟睾丸细胞具有明显的氧化应激损伤作用, 导致 MDA 水平增加, SOD、GSH-Px 水平下降。CP 也可直接导致生精损伤, 损害精子本身, 导致精子畸形率增高; 破坏正常精子头部功能, 导致精子活力下降; 破坏生精微环境, 并减少曲细精管直径, 造成生精小管内精子形成减少; 破坏生精细胞, 致使各级精母细胞发生凋亡, 减少精子的产生, 使精子数下降。此外, CP 影响激素水平, 导致血清中 T 水平下降, FSH、LH 水平升高, 从而阻碍精子合成。在 CP 的造模研究中发现, 无论是 ig 还是 ip 给药, CP 对机体的损伤在一定范围内, 与时间和剂量呈正相关^[13]。因此, 在本实验中, 结合前期预试验结果, 选择给予小鼠 ip CP 60 mg/(g·d) 连续 5 d, 制备生精障碍模型。

脏器指数可以直接反映药物对器官作用的综合情况。与对照组比较, 模型组小鼠的体质量和睾丸、附睾、肾等生殖系统相关的脏器指数均极显著降低。与模型组比较, DBC 对小鼠体质量和睾丸、附睾、

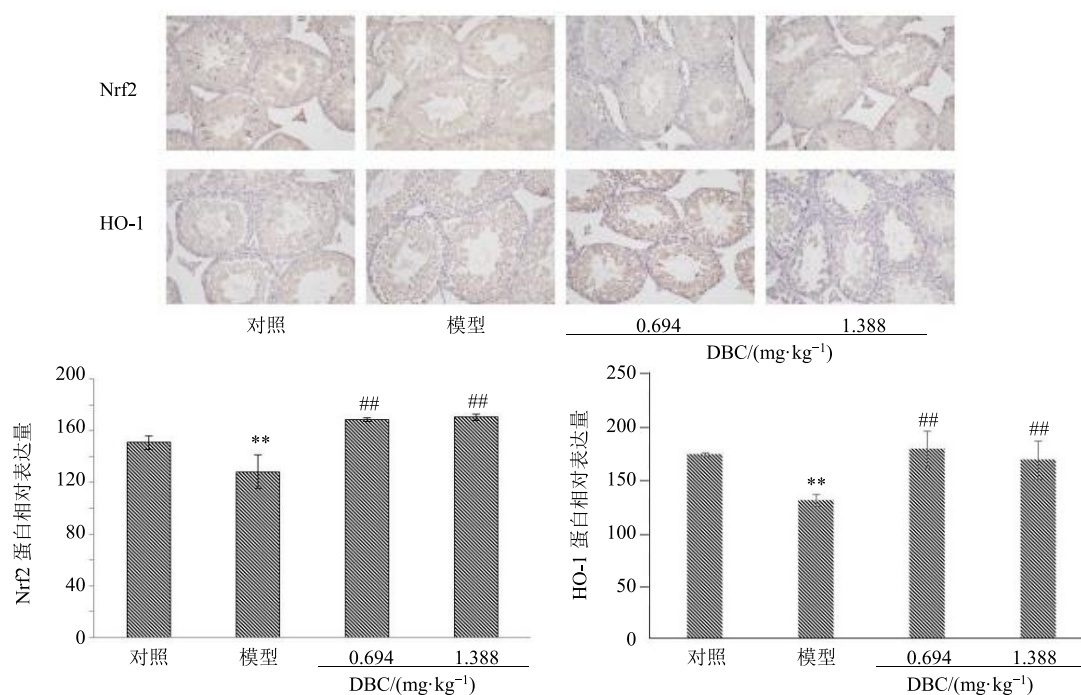


图 3 DBC 对生精障碍小鼠 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of DBC on protein expression of Nrf2 and HO-1 in spermatogenic dysfunction mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

肾具有保护作用。

CP 引起的生精损伤可通过精子指标体现,包括精子数、精子活力、精子畸形率等。CP 能影响生精细胞膜上不饱和脂肪酸的过氧化,导致细胞膜的流动性和完整性降低^[14],影响精子形成细胞的活力和功能,引起各级精母细胞发生脱落,导致精子数与精子质量下降。实验结果显示,CP 导致小鼠精子数、精子活力显著降低,精子畸形率显著升高。与模型组比较,DBC 对小鼠精子数、精子活力和畸形率有显著改善作用,说明 DBC 能有效缓解 CP 导致的生精障碍。

正常情况下,生殖功能受下丘脑-垂体系统调节。神经肽信号作用于下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)神经元,下丘脑 GnRH 神经元合成并分泌 GnRH; GnRH 促进垂体前叶通过下丘脑-垂体门脉系统释放 LH、FSH,其中 LH 与睾丸 Leyding 细胞的受体结合并促进 StAR 表达; StAR 将胆固醇提供给位于线粒体内的 P450scc,而 P450scc 将胆固醇转化为孕烯醇酮;将合成的孕烯醇酮被转移至滑面内质网,转化为雄烯二酮,最终转化成 T。临床上, T 缺少患者可能表现出原发性无精或精子发生完全停止等症状^[15]。实验结果显示,与对照组比较,CP 会导致小鼠血清中 T 水平显著降低,FSH、LH 水

平显著升高。与模型组比较,DBC 可显著回调小鼠血清 T 水平,DBC 高剂量可显著降低血清中 FSH 与 LH 水平,说明 DBC 能有效改善 CP 导致的血清及睾丸中性激素异常变化,维持血清激素的正常生理功能。

CP 代谢产物丙烯醛能导致机体产生过量的活性氧(ROS)等自由基,诱导机体组织氧化应激损伤等。为了应对氧化应激损伤,机体细胞形成复杂的信号调控机制以维持细胞氧化还原平衡。Nrf2/ARE 就是其中一条重要的调控通路。正常情况下, Nrf2 与 Keap1 结合,快速降解,在胞浆中维持较低水平;当药物作用或氧化应激时, Nrf2 从 Keap1 上释放并进入细胞核,与启动子 ARE 结合,提高下游相关二相解毒酶 NQO1、抗氧化酶 HO-1 等蛋白激酶等表达,达到及时解毒及维持细胞内环境稳态^[16-18]。实验结果显示,与模型组比较,DBC 能极显著提高小鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达水平。说明 DBC 可作为诱导剂激活 Nrf2/ARE 信号通路,激活 NQO1 及 HO-1 等蛋白的表达,提高 Nrf2 表达水平,提高机体抵抗能力,减轻氧化应激损伤,减轻小鼠生精障碍。

研究发现,当 HADC2 抑制剂存在时, Nrf2 乙酰化程度增加,稳定性减弱^[19],说明 HADC2 通过

对 Nrf2 去乙酰化作用维持 Nrf2 稳定性。实验结果显示, DBC 可回调 HDAC2 表达水平, 说明 DBC 可以通过提高小鼠睾丸组织中 HDAC2 表达水平, 促进 Nrf2 的去乙酰化, 增强 Nrf2 稳定性, 有利于发挥 Nrf2 功能。

抗氧化剂引起 Nrf2 与 Nrf2 抑制剂 (INrf2) 的解离, Nrf2 易位到细胞核后, 与 ARE 结合并激活防御基因表达, 从而保护细胞。抗氧化剂 PKC 可介导 Nrf2 磷酸化, 促进 Nrf2 与 INrf2 的解离, 调控 Nrf2 稳定性, 使 Nrf2 相对稳定地进入细胞核内发挥生物学功能^[20]。实验结果显示, 与对照组比较, CP 使模型组小鼠 p-PKC 表达水平降低。与模型组比较, DBC 能显著提高小鼠 p-PKC 表达水平, 说明 DBC 能通过激活 p-PKC, 刺激 Nrf2 磷酸化, 使其从 Keap1 上释放出来, 稳定进入细胞核, 与 ARE 结合, 启动下游靶基因的表达。

综上, DBC 具有生殖保护作用, 其对生精障碍的改善可能与抗氧化应激和调控 Nrf2/ARE 信号通路有关, 且对 Nrf2 的调控可能是通过提高 HDAC2、p-PKC 表达水平来起作用的。

参考文献

- [1] Bokmin K Y, Min J Y. Exposure to environmental noise and risk for male infertility: A population-based cohort study [J]. *Environ Pollut*, 2017, 226(7): 118-124.
- [2] Camargo M, Intasqui P, Lima C B, et al. MALDI-TOF Fingerprinting of seminal plasma lipids in the study of human male infertility [J]. *Lipids*, 2014, 49(9): 943-956.
- [3] Rana K P, Thaper D L, Prabha V J. Is there a role for *Serratia marcescens* in male infertility: An experimental study [J]. *Microb Pathog*, 2017, 105(4): 13-18.
- [4] 韦凤华. 环磷酰胺临床应用研究进展 [J]. 中国药事, 2013, 27(3): 324-326.
- [5] 董良. 环磷酰胺在男性不育动物模型中的应用 [A] // 中国中西医结合学会男科专业委员会. 第十二次全国中西医结合男科学术大会暨全国中西医结合男科诊疗技术研修班暨 2017 上海市中西医结合学会上海市中医药学会泌尿男科专业委员会学术年会讲义论文资料汇编 [C]. 北京: 中国中西医结合学会, 2017.
- [6] 张曦文, 李乐乐, 江素鑫, 等. 环磷酰胺生殖毒性的研究进展 [J]. 中国研究型医院, 2018, 5(1): 27-32.
- [7] 杨群芳. 环磷酰胺对雄性生殖系统毒性损伤的研究进展 [J]. 儿科药学杂志, 2013, 19(3): 62-65.
- [8] 赵罗娜, 刘明, 张永萍, 等. 杜仲补天素片对雄性动物促生育作用的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3419-3424.
- [9] 陈指龙, 张晓春, 薛立群, 等. 环磷酰胺致小鼠生精障碍作用研究 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(5): 34-38.
- [10] 罗少波, 胡海翔, 贾金铭. 腹腔注射环磷酰胺对小鼠精子凋亡的影响 [J]. 空军总医院学报, 2010, 26(1): 32-34.
- [11] 陈振文, 谷龙杰. 精液分析标准化和精液质量评估——WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第5版) 出版 [J]. 中国计划生育学杂志, 2012, 20(1): 58-62.
- [12] 李文洁. 影响免疫组化染色的因素及相关注意事项 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(93): 125.
- [13] 刘秋梅. 白消安与环磷酰胺在家兔体内药动学及相互作用研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
- [14] 乐小炎. 乌贼墨多糖干预环磷酰胺介导睾丸氧化应激损伤的 Nrf2/ARE 调控机制研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
- [15] 侯晓鸿, 郝卫东. 下丘脑-垂体-性腺轴调节睾酮合成的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(6): 483-485.
- [16] Jin Y, Miao W, Lin X, et al. Acute exposure to 3-methylcholanthrene induces hepatic oxidative stress via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway in mice [J]. *Envir Toxicol*, 2014, 29(12): 1399-1408.
- [17] 李延森, 李照见, 贾潇潇, 等. 环境高温诱导巴马香猪睾丸细胞凋亡并激活 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路 [J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(6): 1154-1162.
- [18] 路阳. Nrf2 蛋白的 O-GlcNAcylation 修饰在抗氧化应激中的作用和机制研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2017.
- [19] Mercado N, Thimmulappa R, Thomas C M R, et al. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(2): 292-298.
- [20] Murphy K, Llewellyn K, Wakser S, et al. Mini-GAGR, an intranasally applied polysaccharide, activates the neuronal Nrf2-mediated antioxidant defense system [J]. *Biol Chem*, 2018, 293(47): 18242-18269.