

蚕蛾公补合剂对少弱精子症患者精液 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

赵珂¹, 赵玉², 陈少峰², 李重², 孙远², 王福³, 耿强^{2*}

1. 天津市中医药研究院附属医院 妇科, 天津 300091

2. 天津中医药大学第一附属医院 男科, 天津 300193

3. 中国中医科学院西苑医院 男科, 北京 100091

摘要: **目的** 探讨蚕蛾公补合剂调控 Wnt/ β -catenin 信号通路改善精子活力和数量的机制。**方法** 研究分析天津市中医药研究院附属医院、天津中医药大学第一附属医院和中国中医科学院西苑医院门诊就诊的少弱精子症患者 60 例, 其中治疗组 30 例 (服用蚕蛾公补合剂治疗), 对照组 30 例 (服用五子衍宗丸治疗), 2 组治疗周期均为 12 周, 检测患者精液常规指标, RT-PCR 检测精液 Wnt/ β -catenin mRNA 表达以及 Western blotting 检测 Wnt/ β -catenin 蛋白表达。**结果** 治疗组较对照组患者精液质量明显提高, Wnt/ β -catenin mRNA 及蛋白表达也明显增加。**结论** 蚕蛾公补合剂能够改善精子质量与活力, 作用机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关。

关键词: 蚕蛾公补合剂; 少弱精子症; Wnt/ β -catenin; 精子质量; 精子活力

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)05-1419-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.023

Effect of Can'egongbu Mixture on Wnt/ β -catenin signaling pathway in patients with oligozoospermia

ZHAO Ke¹, ZHAO Yu², CHEN Shao-feng², LI Zhong², SUN Yuan², WANG Fu³, GENG Qiang²

1. Department of Gynaecology, Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300091, China

2. Department of Andrology, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Department of Andrology, Xiyuan Hospital CACMS, Beijing 100091, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Wnt/ β -catenin signaling pathway regulating by Can'egongbu Mixture (蚕蛾公补合剂) to improve sperm motility and quantity. **Method** The study analyzed 60 patients with oligozoospermia attending the outpatient clinics of the Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine and Xiyuan Hospital CACMS, including 30 cases in the treatment group (treated with Can'egongbu Mixture) and 30 cases in the control group (treated with Wuzi Yanzong Pills, 五子衍宗丸). The treatment cycle of each group was 12 weeks, and the patients were tested for routine semen indicators, expression of Wnt/ β -catenin mRNA in semen was detected by RT-PCR, and Western blotting was used to detect Wnt/ β -catenin protein expression. **Result** Compared with the control group, the quality of semen in the treatment group was significantly improved, and the expressions of Wnt/ β -catenin mRNA and protein were also significantly increased. **Conclusion** Can'egongbu Mixture can improve sperm quality and sperm motility, its mechanism of action is related to the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Can'egongbu Mixture; oligozoospermia; Wnt/ β -catenin; sperm quality; sperm motility

男性不育症是影响社会稳定及家庭和谐的全
球性问题^[1], 世界范围内有 7000 万对夫妻存在生育力
低下或不育的状况^[2], 其中接近 40%由男方因素引

起^[3]。少弱精子症是引起男性不育症的重要因素之
一, 目前现代医学针对少弱精子症的治疗无特效药
物^[4], 亦或选择辅助生殖技术孕育子代, 但仍存在

收稿日期: 2020-10-11

基金项目: 天津市卫生和计划生育委员会中西医结合课题 (2017129)

作者简介: 赵珂 (1977—), 女, 副主任医师, 研究方向为妇科生殖内分泌与不孕不育。Tel: 13212268018 E-mail: zhaoke4635@sina.com

*通信作者: 耿强, 硕士生导师, 主要从事中西医结合男科研究。E-mail: gengni@126.com

高成本、患者接受度低以及后续子代健康风险等诸多问题。中医药治疗男性不育症历史悠久,积累了大量的临床经验并取得了较好的疗效,如以补肾益精为主要功效的中成药五子衍宗丸可改善精子质量,治疗少弱精子症^[5]。蚕蛾公补合剂是一种以名贵药材雄蚕蛾提取物为君药配伍制成的现代中药制剂,具有补肾助阳、养血填精之功效,同时现代研究发现 Wnt (一类分泌性糖蛋白) / β -链蛋白(β -catenin) 信号通路参与睾丸的生精过程^[6]。本研究拟通过运用蚕蛾公补合剂治疗少弱精子症患者,评价其临床疗效并探讨其作用机制,为中医药治疗少弱精子症提供临床参考和试验依据。

1 研究对象

1.1 病例选择

选取 2018 年 1 月—2019 年 12 月就诊于天津市中医药研究院附属医院、天津中医药大学第一附属医院和中国中医科学院西苑医院门诊患者 60 例,入组前均签署知情同意书,将纳入患者按照随机数字表法随机分为治疗组及对照组,每组 30 例,平均年龄(29.50 ± 3.26)岁,平均病史(16.10 ± 3.34)月。两组基线资料间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验通过中国中医科学院西苑医院实验伦理审查委员会审批(批准号 2018XLA084-2)。

1.2 纳入标准

(1) 符合西医诊断标准,包括男性不育症和少弱精子症的诊断。诊断标准参考《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版。男性不育症:在未采取避孕措施情况下,同居 1 年或 1 年以上,配偶未怀孕,并排除女方因素。少精症:精子浓度低于下限值即 $1.5 \times 10^7/\text{mL}$;弱精子症:表现为精子活力降低,前向运动精子活动率 $> 10\%$,且 $< 32\%$ 。(2) 符合中医肾阳虚的诊断标准。参照《中药新药临床研究指导原则》^[7],主症:腰膝酸软,性欲减退,畏寒肢冷;次症:精神萎靡,夜尿频多,下肢浮肿,动则气促,发髻齿摇,舌质淡苔白,脉沉迟,尺无力。具备以上主症 2 项,次症 2 项,即可诊断肾阳虚证。(3) 20 岁 $<$ 年龄 < 40 岁。(4) 患者存在 2 次及以上精液异常。(5) 所有患者均在本研究治疗前 2 周内未服用任何避孕药。

1.3 排除标准

(1) 近期服用过肿瘤化疗药、柳氮磺胺吡啶、呋喃妥英等对精子生成、活力具有影响的药物;(2) 存在严重肝、心等系统性疾病;(3) 存在药物过敏

史;(4) 存在中、重度附属性腺或生殖道感染。

2 方法

2.1 给药方案

治疗组给予蚕蛾公补合剂(批号 2017011,太极集团四川南充制药有限公司),口服 3 次/d,每次 10 mL。对照组给予口服五子衍宗丸(60 g/瓶,水丸制剂,北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,批号 Z11020241),每次 6 g,2 次/d,两组均以 12 周为 1 个疗程,治疗 1 个疗程。

2.2 疗效标准

显效:精子数量及精子活力增加 2/3;有效:精子数量及精子活力增加 1/3;无效:精子数量及精子活力增加不明显或降低;总有效率=(显效例数+有效例数)/总例数。

2.3 精液常规指标检测

嘱受试者禁欲 2~7 d,采用手淫取精液,液化后做精液常规分析,采用精液全自动分析系统(北京伟力科技有限公司生产)进行精子密度和精子活力的分析。剩余标本在低速水平离心机(北京白洋医疗器械有限公司)中以 $3000 \times g$ 离心 15 min,用一次性吸管进行精浆及精液沉淀物分离,分别放置在洁净 EP 管内,冰箱 -4°C 冷冻层内保存待用。

2.4 RT-PCR 检测 Wnt/ β -catenin mRNA 表达

液氮保存组织解冻,移入研钵中,加入 1 mL TRIzol,反复研磨,将匀浆样品在室温放置 5 min;于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,取上清;每使用 1 mL TRIzol 加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min; $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 10 000 r/min 离心 15 min。样品分为黄色有机相、无色水相和中间层。将水相转移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA。移去上清,用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀。 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 不超过 7500 r/min 离心 5 min,弃上清;室温放置干燥或真空抽干 RNA 沉淀,晾 5~10 min。加入 25~200 μL 无 RNase 的水或 0.5% SDS,用枪头吸打几次, $55 \sim 60^\circ\text{C}$ 放置 10 min 防止 RNA 溶解, -70°C 保存。以 U6 作为内参对照,使用 SYBR 荧光染料试剂盒进行荧光定量 PCR 检测,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法对 Wnt/ β -catenin mRNA 的相对表达量进行分析。

2.5 Western blotting 检测 Wnt/ β -catenin 蛋白表达

取液氮保存的组织解冻,与裂解液一起加入研磨器中,冰上研磨裂解 10 min,移入离心管中,在超速冷冻离心机中 4°C 、14 000 r/min 离心 15 min,收集上清于 Eppendorf 管中,BCA 法测定总蛋白浓度,将

蛋白样品与蛋白电泳上样缓冲液混合，沸水煮 10 min，备用。采用 Western blotting 法检测：10% SDS-PAGE 凝胶电泳，使用多功能电泳仪将蛋白转移至 PVDF 膜，将该膜在室温下封闭 2 h，PBST 液漂洗 3 次，每次 10 min，与一抗（1：500）4℃孵育过夜，PBST 漂洗 3 次，辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（1：1000）孵育 2 h，PBST 液洗膜 3 次，每次 10 min，ECL 化学发光显影。用 Image 分析软件扫描杂交条带灰度值。结果用目的蛋白条带与肌动蛋白（Actin）条带灰度值的比值表示，并且使用 Actin 进行校正。

2.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析，计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据符合正态分布，*t* 检验两组间差异。

3 结果

3.1 病例脱落情况

本研究纳入 60 例患者，试验完成时，两组均没

有病例脱落，患者依从性好。

3.2 两组疗效比较

治疗组总有效率高于对照组，但无统计学差异，即蚕蛾公补合剂与五子衍宗丸治疗总有效率无明显差异。结果见表 1。

3.3 精子质量情况变化

对照组和治疗组较服药前，精子密度和精子活力均显著增加（ $P < 0.01$ ）；治疗后，与对照组比较，治疗组精子密度和精子活力显著增加（ $P < 0.01$ ）。见表 2。

表 1 两组患者疗效比较

Table 1 Comparison of efficacy between two groups

组别	n/例	显效/例	有效/例	无效/例	总有效率/%
对照	30	16	10	4	86.67
治疗	30	18	9	3	90.00

表 2 精子质量变化

Table 2 Change of sperm quality

组别	精子密度/（ $\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ）		精子活力/%	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照	13.71 $\pm$ 0.45	19.83 $\pm$ 0.64 ^{###}	23.71 $\pm$ 0.45	44.83 $\pm$ 4.99 ^{##}
治疗	13.55 $\pm$ 0.73	24.34 $\pm$ 0.45 ^{####}	23.05 $\pm$ 1.16	54.34 $\pm$ 0.45 ^{####}

与同组治疗前比较：^{###} $P < 0.01$ ；与对照组治疗后比较：^{##} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.01$ vs before treatment with same group；^{####} $P < 0.01$ vs control group after treatment

3.4 精液中 Wnt/ β -catenin mRNA 和蛋白表达情况

与对照组相比，治疗组精液中 Wnt/ β -catenin mRNA 和蛋白表达增加，差异显著（ $P < 0.01$ ）。见图 1、2。

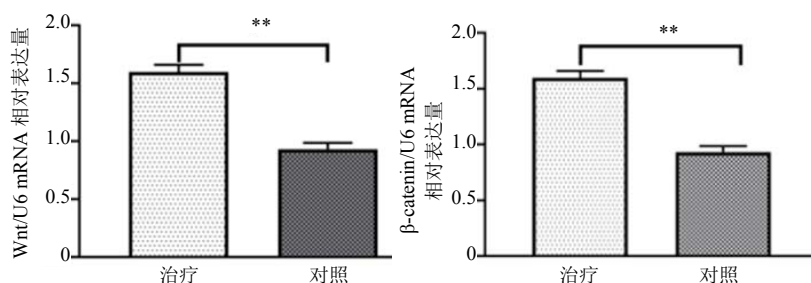
3.5 不良反应

治疗组患者中出现 1 例恶心、胃脘不适症状，经抑酸护胃等对症治疗后消失。对照组未出现严重

不良反应，两组均无因不良反应退出本次临床观察的情况。

4 讨论

中医学对男性不育症的认识已有数千年历史，属“精冷”“无子”范畴。《黄帝内经》中就记载了以天癸为媒介，以肾为中心的经典生殖学说，并沿用至今。肾为先天之本，主生殖，肾中阳气不足，



与对照组比较：^{##} $P < 0.01$ ，下同

^{##} $P < 0.01$ vs control group, same as below figure

图 1 精液中 Wnt/ β -catenin mRNA 表达情况

Fig. 1 Expression of Wnt/ β -catenin mRNA in sperm

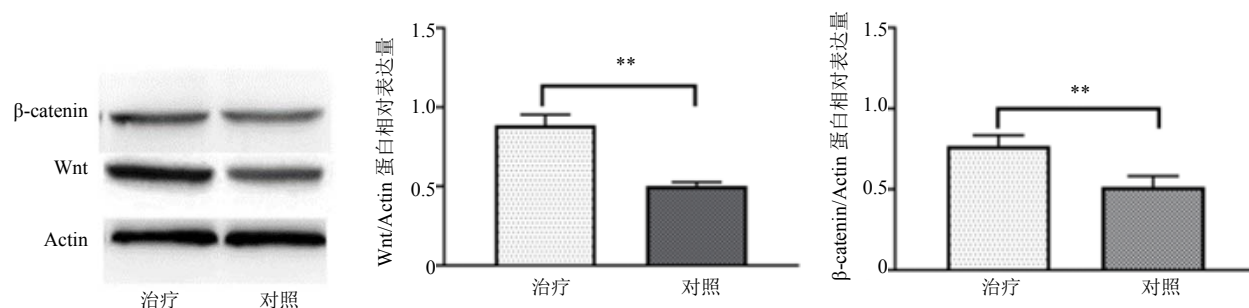


图2 精液中 Wnt/β-catenin 蛋白表达情况

Fig. 2 Expression of Wnt/β-catenin protein in sperm

命门火衰以致无力生发肾中阳气以生精，可引起男子精冷、精少而不嗣，故在治疗时以补肾作为治疗少弱精子症的基本法则^[8]。另有报道显示，现代男性不育症的主要证型以肾阳虚证为主^[9]。蚕蛾公补合剂由雄蚕蛾、人参、熟地黄、当归、补骨脂、枸杞子、菟丝子、仙茅、肉苁蓉、淫羊藿、蛇床子组成，具有补肾壮阳、养血填精之功效。蚕蛾由蚕蛹蜕皮羽化而成，成虫期的雄性蚕蛾生殖器官十分发达^[10]，同时亦可药用，《本草述钩元》中记载：“雄蛾，味咸，气温热，主益精气，止泄精尿血，治遗精赤白浊”，故本方以雄蚕蛾固精壮阳为君药，人参、熟地黄、补骨脂益气补肾助阳，共为臣药；佐以当归活血补血，枸杞子滋阴填精，仙茅、菟丝子、肉苁蓉、淫羊藿、蛇床子益肾助阳。

Wnt/β-catenin 信号通路作为最为经典的 Wnt 信号通路，参与众多体细胞的生命活动及进程^[11-12]。有研究发现，Wnt/β-catenin 信号通路能够在肾阳虚的患者体内表达^[13]；另有研究发现，成年男性睾丸支持细胞中存在 Wnt/β-catenin 信号通路的表达，并且激活 Wnt/β-catenin 信号通路能够促进睾丸支持细胞的增殖，从而改善生精功能^[6]。本研究表明，具有补肾助阳填精功效的蚕蛾公补合剂能够显著改善少弱精子症患者的精子质量和活力 ($P < 0.01$)；激活少弱精子症患者睾丸中 Wnt/β-catenin 信号通路，通过调控此通路进而改善睾丸生精功能，提升精子质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 欧阳斌, 赵玉, 耿强. 《欧洲泌尿外科学会男性不育症诊疗指南(2013 年版)》解读 [J]. 生殖与避孕, 2015, 35(1): 9-14.

[2] L gar  C, Droit A, Fournier F, *et al*. Investigation of male infertility using quantitative comparative proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(12): 5403-5414.

[3] Salas-Huetos A, Bull  M, Salas-Salvad  J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: A systematic review of observational studies [J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(4): 371-389.

[4] Cissen M, Bensdorp A, Cohlen B J, *et al*. Assisted reproductive technologies for male subfertility [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, doi: 10.1002/14651858.CD000360.pub5.

[5] 谢剑锋, 肖高小, 王志平. 五子衍宗丸联合脐疗治疗男性弱精症的临床效果研究 [J]. 中国实用医药, 2019, 14(15): 118-120.

[6] 李毅, 张帅, 殷钢, 等. Wnt/β-catenin 信号通路在成人睾丸支持细胞增殖中的作用及其机制 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2012, 50(3): 55-61.

[7] 中药新药临床研究指导原则: 试行 [S]. 2002: 385-388.

[8] 赵玉, 耿强, 欧阳斌. 欧阳斌治疗少弱精子症经验 [J]. 江西中医药, 2014, 45(10): 15-16.

[9] 戴继灿, 李兰群, 裴晓华, 等. 基于现代文献报道分析男性不育症的常见中医证候及证候要素 [J]. 天津中医药, 2013, 30(10): 626-628.

[10] 徐俊良. 养蚕手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 154-162.

[11] 何丽玲, 龙清华, 胡慧, 等. 基于 Wnt/β-catenin 信号通路探讨大补元煎促进 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠海马神经发生的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 8-14.

[12] Wu D M, Han X R, Wen X, *et al*. Salidroside protection against oxidative stress injury through the wnt/β-catenin signaling pathway in rats with Parkinson's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1793-1806.

[13] 章建华, 邢婧, 范连霞, 等. 骨质疏松肾阳虚、肾阴虚证型下右归丸含药血清对大鼠成骨细胞 ERK1/2、Wnt/β-catenin 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 3018-3022.

[责任编辑 潘明佳]