

脉络舒通丸对精索静脉曲张模型大鼠线粒体介导内源性细胞凋亡的影响

贾志超¹, 李啸林¹, 吕东方¹, 杨恩华¹, 巩文娇¹, 高兆旺², 仲崇副^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学附属医院 男科, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 探讨脉络舒通丸对精索静脉曲张模型大鼠线粒体介导的内源性细胞凋亡的影响。**方法** 36只雄性SD大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组和脉络舒通丸低、中、高剂量(0.162、0.324、0.648 g/kg)组,精索静脉曲张模型制备成功7d后,连续ig给药4周。苏木素-伊红(HE)染色法检测各组大鼠睾丸及附睾组织病理变化;透射电镜观察各组大鼠生精细胞线粒体超微结构;免疫荧光检测各组大鼠睾丸组织中线粒体动力相关蛋白1(dynamamin-related protein 1, Drp1)、B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)和细胞色素C氧化酶IV(cytochrome C oxidase IV, COX IV)的表达;免疫组化检测各组大鼠睾丸组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(cystein-aspartate protease-9, Caspase-9)和Caspase-3的表达。**结果** 假手术组与空白组大鼠睾丸及附睾组织病理染色结果相似,睾丸及附睾组织结构完整;与假手术组比较,模型组大鼠睾丸及附睾组织出现明显的病理性损伤;药物治疗后大鼠睾丸及附睾的病理性损伤得到不同程度的改善。假手术组与空白组大鼠睾丸线粒体形态结构相似,均可见大量线粒体广泛分布;与假手术组比较,模型组睾丸组织线粒体结构遭到严重破坏;药物治疗后线粒体仍可见不同程度的损伤,但较模型组明显改善。免疫荧光结果显示,Drp1与Bax在假手术组与空白组中荧光表达微弱,模型组较假手术组二者的荧光表达水平显著升高;Drp1与Bax在各治疗组的荧光表达趋势相似,经药物治疗后二者的荧光强度较模型组均降低。免疫组化结果显示,Caspase-9与Caspase-3在细胞间质及生精小管管壁周围分别呈褐色及棕色表达;假手术组与空白组二者均零星分布;与假手术组比较,模型组Caspase-9、Caspase-3表达增加($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组中Caspase-9、Caspase-3的表达水平明显降低($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 精索静脉曲张模型大鼠睾丸及附睾组织结构损伤明显,线粒体结构遭到明显破坏,睾丸中Drp1、Bax、Caspase-9及Caspase-3表达显著升高。脉络舒通丸可能是通过对睾丸中线粒体结构的保护作用,抑制生精细胞中Caspase级联反应,从而调控线粒体介导的内源性细胞凋亡。

关键词: 脉络舒通丸;精索静脉曲张;生精功能;细胞凋亡;线粒体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)02-0499-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.015

Effect of Mailuo Shutong Pills on mitochondria-mediated endogenous cell apoptosis in rats with varicocele

JIA Zhichao¹, LI Xiaolin¹, LYU Dongfang¹, YANG Enhua¹, GONG Wenjiao¹, GAO Zhaowang², ZHONG Chongfu²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. Department of Andrology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Mailuo Shutong Pills (脉络舒通丸) on mitochondria-mediated endogenous cell apoptosis in rats with varicocele. **Methods** A total of 36 male SD rats were randomly divided into blank group, sham group, model group, Mailuo Shutong Pills low-, medium- and high-dose (0.162, 0.324, 0.648 g/kg) groups. After 7 d of successful preparation of the varicocele model, drugs were continuous ig for four weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the histopathological changes of testicle and epididymis tissue in each group. Transmission electron microscopy was used to observe the changes in mitochondrial ultra microstructure of spermatogenic cells in each group. Immunofluorescence was used to detect dynamamin-related

收稿日期: 2023-08-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82374455); 山东中医药大学附属医院横向课题(H20210201-01)

作者简介: 贾志超, 男, 硕士研究生, 研究方向为中医治疗男科疾病。E-mail: jiazhichao2022@163.com

*通信作者: 仲崇副, 男, 副主任医师, 研究方向为中医治疗男科疾病。E-mail: zhongcf212@163.com

protein 1 (Drp1), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) and cytochrome C oxidase IV (COX IV) expressions in mitochondrial testicular tissue of rats in each group; Immunohistochemistry was used to detect the expressions of cystein-aspartate protease-9 (Caspase-9) and Caspase-3 in testicular tissue of rats in each group. **Results** The pathological staining results of testis and epididymis of rats in sham group and blank group were similar, and the structure of the testis and epididymis was intact. Compared with sham group, the testis and epididymis in model group showed obvious pathological damage. After drug treatment, the pathological damage of testis and epididymis in each group was improved to varying degrees. The morphological structure of testicular mitochondria was similar between sham group and blank group, and a large number of mitochondria were widely distributed. Compared with sham group, the mitochondrial structure of testicular tissue in model group was severely damaged. After drug treatment, the mitochondria still showed varying degrees of damage, but it was significantly improved compared with model group. Immunofluorescence results showed that the fluorescence expression levels of Drp1 and Bax in sham group and blank group were weak, and the fluorescence expression levels of Drp1 and Bax in model group were significantly higher than those in sham group. The fluorescence expressions of Drp1 and Bax in each treatment group had a similar trend, and the fluorescence intensity of Drp1 and Bax after drug treatment were lower than that of the model group. The results of immunohistochemistry showed that Caspase-9 and Caspase-3 were expressed in brownness and brown in the mesenchyme and around the wall of seminiferous tubules, respectively. Both in the sham group and blank group were scattered. Compared with sham group, the expressions of Caspase-9 and Caspase-3 in model group were increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the levels of Caspase-9 and Caspase-3 in each treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** In rats with varicocele model, the tissue structure of testis and epididymis was significantly damaged, mitochondrial structure was significantly damaged, and the expressions of Drp1, Bax, Caspase-9 and Caspase-3 in the testis were significantly increased. Mailuo Shutong Pills may inhibit the Caspase cascade in spermatogenic cells through its protective effect on mitochondrial structure in testis, thereby regulating mitochondria-mediated endogenous cell apoptosis.

Key words: Mailuo Shutong Pills; varicocele; spermatogenic function; cell apoptosis; mitochondria

精索静脉曲张 (varicocele, VC) 作为一种男性常见的生殖系统疾病, 是导致男性不育症的重要原因^[1], 可引起睾丸生精功能的进行性减退、睾酮分泌逐渐减少、精液质量下降等病理性改变^[2]。临床上 VC 多见于青壮年男性, 其发病率在正常男性中约为 20%, 而在不育症男性中发病率可达 40%。目前, 国内外针对 VC 性不育症的治疗包括手术和抗氧化治疗, 且以手术治疗为主, 但仍存在近 50% 的患者术后未能实现自然生育^[3-4]。VC 在中医学中多归属于“筋疝”的范畴, 中医学者认为本病与血瘀、气虚以及肾虚等因素有关, 病机主要为虚实夹杂, 兼有湿、热、瘀等邪气为患, 治疗上多在“活血化瘀”的同时, 兼以“清热”“补虚”“解郁”“通络”等^[5-6]。脉络舒通丸具有化瘀通络、清热解毒等功效, 在 VC 的治疗中能明显提高患者的精液质量^[7]。中医药在 VC 所致男性不育症的治疗中具有显著的优势, 但目前缺乏相关机制的研究^[8-9]。

细胞凋亡在维持生物体内的自稳态中具有重要的生理意义^[10]。生理条件下, 睾丸的生精功能以生精细胞增殖与凋亡的平衡为基础。生精细胞过度凋亡能够减少正常精子的生成, 进而影响男性的生育能力^[11]。线粒体作为细胞凋亡的重要途径, 能够参与并调控睾丸中正常精子的生成及发育^[12], 既往研

究显示, VC 模型大鼠睾丸组织中线粒体形态结构损伤明显, 可能是 VC 导致男性不育症的关键病理环节^[13]。为进一步探讨脉络舒通丸治疗 VC 性不育症的作用机制, 本研究以线粒体损伤导致细胞凋亡为切入点, 探讨脉络舒通丸对 VC 所致生精细胞凋亡的影响, 为 VC 所致男性不育症的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 8 周龄, 体质量 (240 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2021-0011, 饲养于山东中医药大学附属医院动物实验中心。大鼠每笼 6 只, 分笼喂养, 室温 (22 ± 1) °C、相对湿度 (60 ± 2) %, 12 h/12 h 光暗周期。大鼠全天自由摄食饮水, 常规饲料饲养, 实验前适应性饲养 1 周。所有涉及动物的实验程序均获得山东中医药大学附属医院动物伦理委员会的批准 (批准号 2021-40)。

1.2 药品与试剂

脉络疏通丸 (国药准字 Z20090636, 批号 131421120) 由山东鲁南药业集团提供, 每丸质量约 0.056 g, 由金银花、玄参、水蛭、黄芪、苍术、蜈蚣等药物组成, 使用时取适量脉络舒通丸粉末溶解

于 0.5%羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose-Na, CMC-Na) 溶液中, 制备悬浊液备用; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 66470-2-Ig)、Caspase-9 抗体 (批号 66169-1-Ig) 购自美国 Proteintech 公司; 线粒体动力相关蛋白 1 (dynammin-related protein 1, Drp1) 抗体 (批号 ab184247)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 ab32503)、免疫组化二抗 (批号 ab150115)、细胞色素 C 氧化酶 IV (cytochrome C oxidase IV, COX IV) 抗体 (批号 ab131177) 购自英国 Abcam 公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液 (批号 C1002) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 仪器

EMUC7 型超薄切片机 (德国 Leica 公司); HT7800 型透射电镜 (TEM, 日本日立公司); Eclipse Ti-SR 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、脉络舒通丸低、中、高剂量 (0.162、0.324、0.648 g/kg)^[14]组, 每组 6 只。采用 Turner 创建的狭窄左肾静脉法^[15]建立 VC 大鼠模型, 采用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 脱毛后以仰卧位固定大鼠。打开腹腔, 将左侧腹部内容物轻推并固定至右上腹, 使左肾静脉充分显露于视野。在左肾静脉下横置一直径 0.85 mm 的金属探针, 用 4-0 丝线结扎后抽出探针, 造成大鼠左肾静脉局部狭窄。观察左肾约 2 min 以确定该器官无明显缺血。最后腹腔内应用青霉素防止感染, 逐层缝合伤口。假手术组仅游离左肾静脉, 不予结扎。模型成功的标准为左精索静脉与右精索静脉相比明显迂回扩张, 且左肾无萎缩。既往研究显示, 该方法诱导的 VC 模型大鼠在造模成功后 7~28 d 出现睾丸组织损害, 并引起生精细胞过度凋亡, 严重影响了睾丸的生精功能^[16-17]。造模成功 7 d 后, 各给药组 ig 相应药物, 空白组、假手术组和模型组 ig 等体积的 CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 4 周。

2.2 苏木素-伊红 (HE) 染色观察睾丸及附睾组织病理学改变

给药结束后, 处死大鼠, 取睾丸及附睾组织, 于 4%多聚甲醛缓冲液中固定, 经梯度乙醇脱水后,

依次置于二甲苯中透明处理, 石蜡包埋, 制备 4 μm 切片, 随后进行 HE 常规染色, 于显微镜下观察睾丸及附睾组织的病理学改变。对睾丸组织显微镜下视野内随机 10 处生精小管区域应用 Johnsen 评分评估模型大鼠睾丸的生精功能。

2.3 TEM 观察睾丸组织线粒体结构

切取米粒大小睾丸组织迅速置于提前预冷的戊二醛中固定, 经磷酸盐缓冲液漂洗后, 再次置于磷酸固定液中固定并冲洗, 依次经脱水, 包埋, 聚合处理后, 做成 60~80 nm 超薄切片, 铀铅双染色后于 TEM 下观察生精细胞中线粒体超微结构的改变。

2.4 免疫荧光检测睾丸组织 Drp1、Bax 和 COX IV 表达

取米粒样大小睾丸组织于 4%多聚甲醛中固定, 脱水处理后, 制备 4 μm 切片。预冷 PBS 清洗 3 遍, 0.1% TritonX-100 室温下通透 20 min; 预冷 PBS 清洗 3 遍, 10%山羊血清室温封闭 30 min, 弃去封闭血清后, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 预冷 PBS 清洗 3 遍, 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h; 预冷 PBS 清洗 3 遍, 滴加 DAPI, 于荧光显微镜下观察。

2.5 免疫组化检测睾丸组织 Caspase-9 和 Caspase-3 表达

使用 4%多聚甲醛缓冲液中固定切取的睾丸组织, 经脱水、包埋处理后, 进行石蜡切片, 厚度 4 μm 。切片经脱蜡、冲洗后, 依次加入一抗、二抗, 随后滴加 DAPI 染液, 染色后再次冲洗并用抗荧光淬灭封片剂封片, 于显微镜下观察并拍照, 检测睾丸组织 Caspase-9、Caspase-3 表达, 评估睾丸中生精细胞凋亡水平。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若符合正态分布, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较组间差异; 若非正态分布, 采用非参数检验。使用 GraphPad Prism 9.0 软件可视化处理分析结果。

3 结果

3.1 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织病理变化的影响

如图 1 所示, 空白组与假手术组大鼠睾丸病理染色结果相似, 可见生精上皮细胞形态饱满, 排列齐整, 管腔结构完备, 其中精原细胞、精母细胞等各级生精细胞排列紧密, 层次清晰, 并有大量精子细胞存在于管腔; 与假手术组比较, 模型组大鼠生

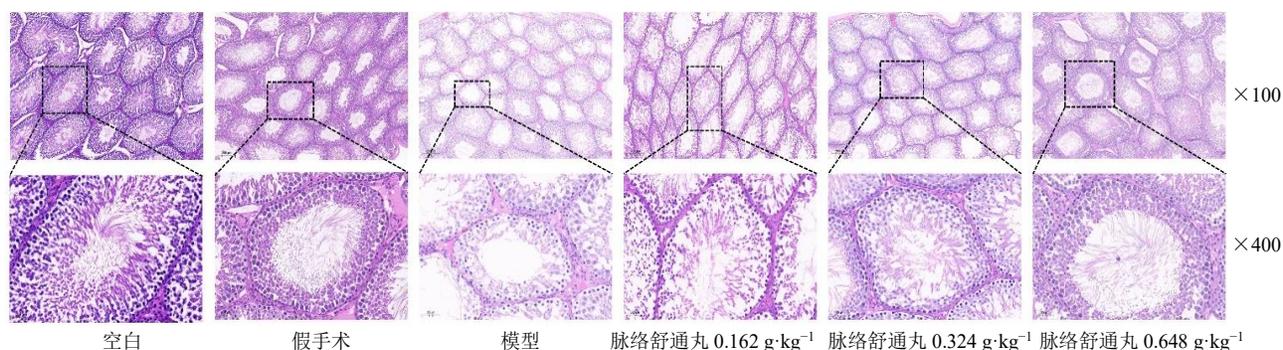


图1 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织病理变化的影响 (HE)

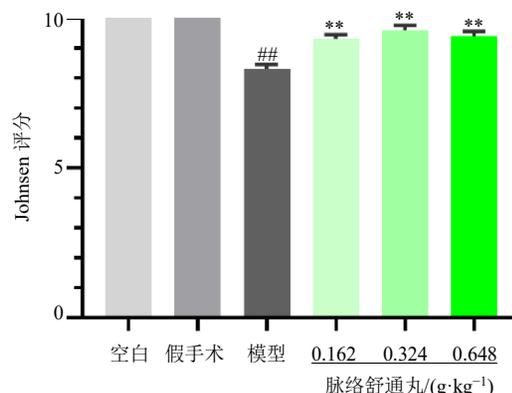
Fig. 1 Effect of Mailuo Shutong Pills on pathological changes of testicular tissue in VC model rats (HE)

精细胞形态萎缩, 层次混乱, 生精小管管壁变薄, 甚则发生萎缩、塌陷, 各级生精细胞数量明显下降, 管腔内精子细胞数量稀少; 药物治疗 4 周后, 各给药组大鼠睾丸组织结构较模型组大鼠均得到明显改善, 生精小管管腔结构接近正常水平, 仍存在少量上皮细胞脱落, 但各级生精细胞数量明显增加且排列逐渐规整, 管腔内精子细胞数量显著增加。其中, 脉络舒通丸中、高剂量组大鼠睾丸组织结构和生精细胞数量的改善效果最为显著。

如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠睾丸组织 Johnsen 评分明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 脉络舒通丸各剂量组睾丸组织 Johnsen 评分显著升高 ($P < 0.01$)。

3.2 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠附睾组织病理变化的影响

如图 3 所示, 空白组与假手术组大鼠均可见附睾上皮细胞边界清晰, 排列紧密有序, 管腔结构规



与假手术组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 6、7 同。
$P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as figs. 6 and 7.

图2 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Johnsen 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Mailuo Shutong Pills on Johnson score of testicular tissue in VC model rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

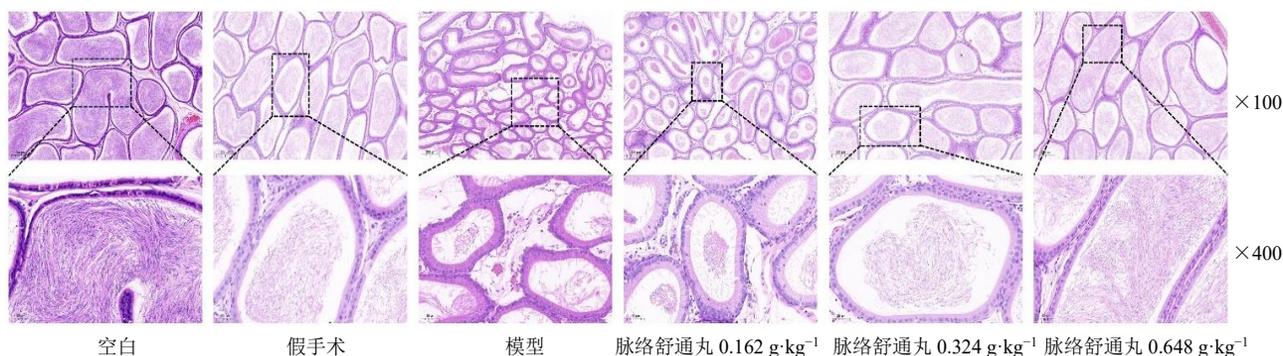


图3 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠附睾组织病理变化的影响 (HE)

Fig. 3 Effect of Mailuo Shutong Pills on pathological changes of epididymal tissue in VC model rats (HE)

则, 可见其中存在大量正常精子; 模型组可见附睾上皮细胞排列混乱, 并伴有部分上皮细胞脱落, 管腔排列松散无序且存在不同程度的萎缩, 管腔内精子数量显著下降; 药物治疗 4 周后, 各给药组大鼠

附睾上皮细胞排列逐渐整齐, 管腔结构饱满, 排列有序, 管腔内精子浓度明显增加; 其中, 脉络舒通丸中、高剂量组附睾组织形态结构及精子数量接近, 明显优于脉络舒通丸低剂量组。

3.3 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织线粒体超微结构的影响

如图 4 所示, 空白组生精细胞形态基本规则, 细胞核呈椭圆形, 其胞质内线粒体含量丰富, 分布广泛, 多数呈椭圆形或短杆状, 线粒体内嵴结构饱满, 层次基本清晰, 存在少数线粒体内嵴减少, 膜电子密度稍高; 假手术组生精细胞形态结构与空白组相近, 线粒体数量丰富, 但线粒体内嵴数量减少,

线粒体体积缩小, 膜电子密度偏高; 与假手术组比较, 模型组线粒体内嵴数量下降, 多数线粒体体积缩小, 部分线粒体出现肿胀变形, 内嵴断裂甚至消失, 呈现空泡样改变; 药物治疗后, 线粒体结构损伤较模型组有所减轻, 线粒体内嵴数量得到不同程度的增加。其中, 脉络舒通丸中、高剂量组较低剂量组线粒体形态结构明显改善, 体积大小接近空白组, 线粒体内嵴数量显著增加且形态更为饱满。

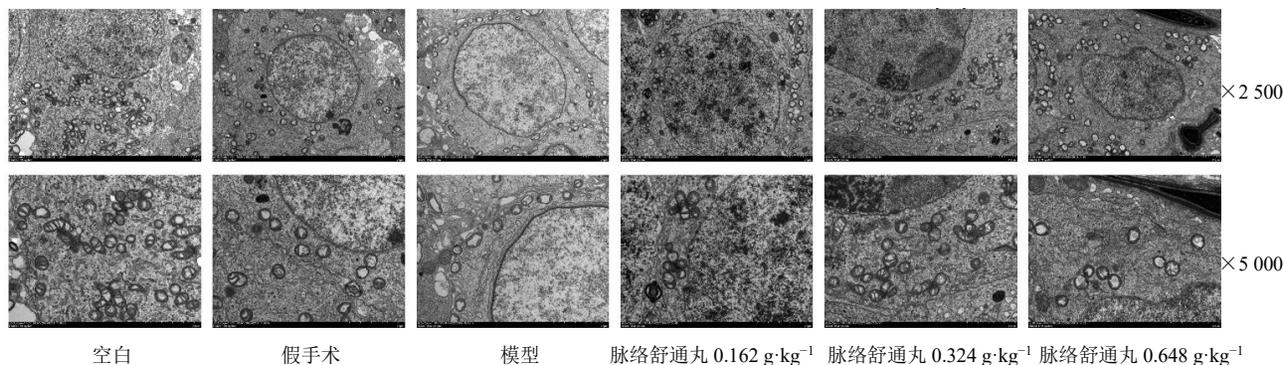


图 4 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织线粒体超微结构的影响

Fig. 4 Effect of Mailuo Shutong Pills on mitochondrial ultra microstructure of testicular tissue in VC model rats

3.4 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Drp1、Bax 和 COX IV 表达的影响

COX IV 定位于线粒体内膜, 蛋白表达稳定, 且荧光标记明亮, 便于定位, 故选取 COX IV 作为线粒体内参。如图 5 所示, 空白组、假手术组以及脉络舒通丸各给药组 COX IV 荧光表达强度未见显著差异, 但模型组的荧光表达数量有所下降且分布混乱, 提示线粒体结构遭到破坏。Drp1 在空白组和假手术组中绿色荧光强度暗淡, 在模型组可见高强度的荧光表达; 与模型组比较, 各给药组 Drp1 荧光表达均有不同程度的下降, 中、高剂量给药组荧光强度接近。Bax 在空白组和假手术组中粉色荧光表达微弱, 在模型组荧光强度明亮, 药物治疗后, 各治疗组的粉色荧光表达较模型组减弱, 且中、高剂量组荧光强度相似。为检测 Drp1 和 Bax 表达水平的变化及其与线粒体的位置关系, 本研究检测了 Drp1、Bax 及 COX IV 三者的共定位关系, 结果显示, Drp1 与 Bax 在各组的荧光表达趋势相似, 且随着二者表达水平的升高, Merge 图上亮白色荧光团块表达数量增多, 以模型组表达水平最高, 中、高剂量给药组较模型组荧光表达水平明显降低, 且二者亮白色荧光表达水平相近。

3.5 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Caspase-9 表达的影响

如图 6 所示, Caspase-9 蛋白在荧光显微镜下被标记为褐色, 空白组及假手术组大鼠睾丸组织中可见 Caspase-9 零星表达; 与假手术组比较, Caspase-9 在模型组睾丸组织中大量分布 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 Caspase-9 表达量呈现不同程度降低 ($P < 0.05, 0.01$), 且脉络舒通丸中、高剂量组 Caspase-9 表达水平相近。

3.6 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Caspase-3 表达的影响

如图 7 所示, Caspase-3 蛋白在荧光显微镜下被标记为棕色, 主要分布于细胞质及生精小管管壁周围。空白组及假手术组大鼠睾丸组织中 Caspase-3 仅在生精小管底部零星表达; 与假手术组比较, 模型组 Caspase-3 的表达水平在睾丸组织中显著增加 ($P < 0.01$), 可见棕色标记广泛分布于各级生精细胞; 与模型组比较, 各给药组 Caspase-3 表达量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 且脉络舒通丸中、高剂量组 Caspase-3 表达水平相近, 明显低于低剂量组。

4 讨论

VC 是由于精索静脉发生血液回流障碍所引起

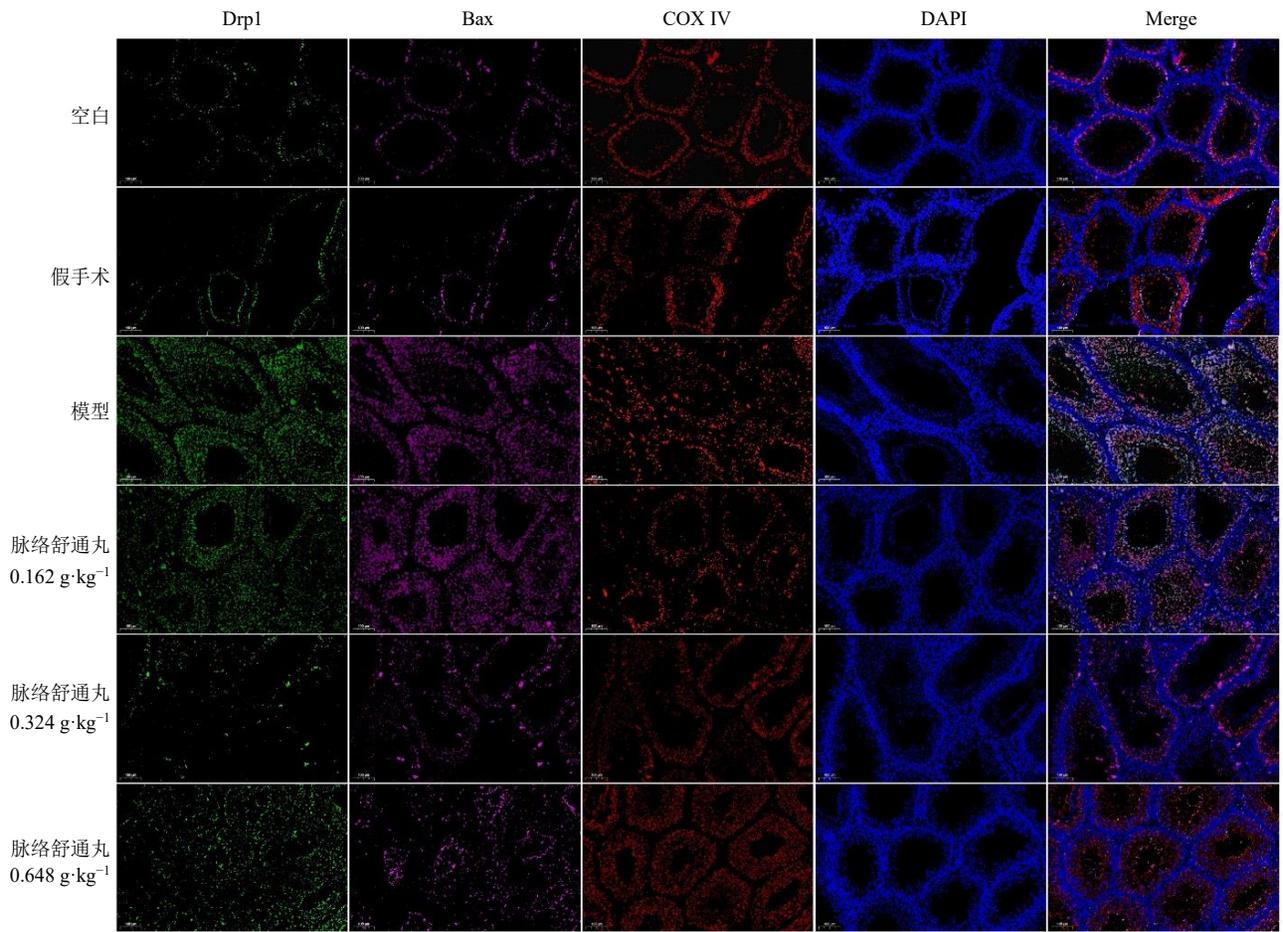


图 5 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Drp1、Bax 及 COX IV 表达的影响

Fig. 5 Effect of Mailuo Shutong Pills on Drp1, Bax and COX IV expressions of testicular tissue in VC model rats

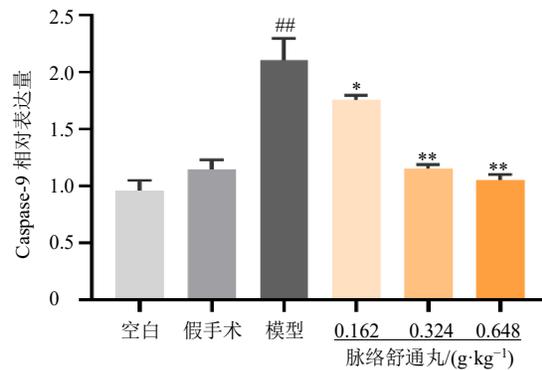
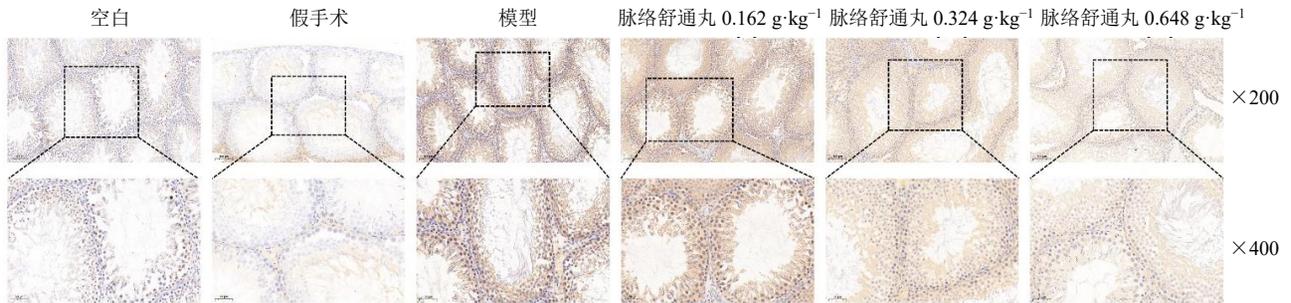


图 6 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Caspase-9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of Mailuo Shutong Pills on Caspase-9 expression of testicular tissue in VC model rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

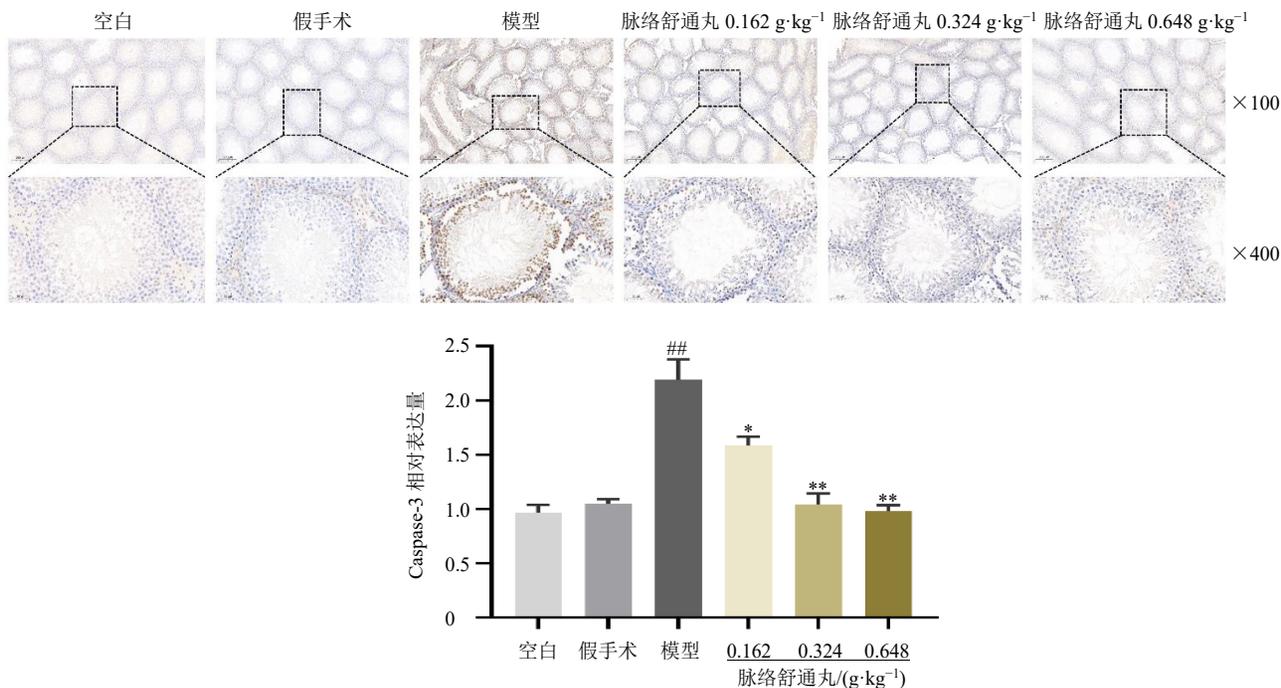


图 7 脉络舒通丸对 VC 模型大鼠睾丸组织 Caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Mailuo Shutong Pills on Caspase-3 expression of testicular tissue in VC model rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

的一种男性生殖系统疾病，主要表现为睾丸局部静脉丛出现病理性的迂曲扩张^[18]。作为导致男性不育最主要的病理性因素，VC 所引起的睾丸生精能力减退是一个复杂的病理学过程，其具体机制当前并不明确。现代研究多认为其可能与生殖细胞损伤/凋亡、线粒体损伤、氧化应激、缺氧、睾丸内温度升高等病理因素有关^[19-21]。细胞凋亡是一种受调节且主动的程序性死亡过程，是机体控制细胞增殖和维持组织内稳态的重要机制^[22]。生理性的细胞凋亡能调控睾丸中生精细胞与支持细胞的比例，以保证正常精子的生成^[13,23]，若生精细胞过度凋亡，可能导致睾丸生精功能的下降，进而影响男性的生育能力。

VC 在中医学中多归属于“筋疝”的范畴，中医学者认为本病多与血瘀、气虚以及肾虚等多种因素有关，病机主要为虚实夹杂，兼有湿、热、瘀等邪气为患^[24]。脉络舒通丸由金银花、玄参、水蛭、黄芪、苍术、蜈蚣、薏苡仁、黄柏、白芍、全蝎、当归、甘草组成，具有祛湿消肿、补气养血、化瘀通络、清热解毒的功效，在血栓性浅静脉炎或非急性期深静脉血栓形成等辨证为湿热瘀阻的血流障碍性疾病中得到广泛应用^[25-26]。方中以黄芪、金银花为君，黄芪与当归相伍，重以甘温补气生血，兼有“甘温除热”之意，解除瘀热互结之弊；金银花配以玄参、当归、甘草，取四妙勇安汤中清热解毒之意，

兼以顾护阴液；当归、白芍共用为臣药，活血止痛，养血柔筋；黄柏、苍术相伍，清热燥湿，以解下焦湿热；佐药为水蛭、全蝎、蜈蚣，攻毒散结，活血止痛。综上可知，脉络舒通丸“活血化瘀、通络止痛、清热利湿”等功效与 VC 的基本病机相契合。

现代药理学研究显示，脉络舒通丸中的多种生物活性成分对氧化应激、细胞凋亡具有重要的干预作用^[27-28]。水蛭素能够增强超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性，并下调细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C)、Caspase-9、Caspase-3 的表达，抑制细胞凋亡发挥细胞保护作用^[29]；蜈蚣酸性蛋白 (centipede acidic protein, CAP) 能够明显降低 Caspase-3 的活性进而改善细胞凋亡^[28]；黄芪甲能够降低 Caspase-3 和 Bax 的表达，发挥抑制细胞凋亡的作用^[30-31]。因此，脉络舒通丸能够通过多种途径对机体产生整体的调节作用，是临床 VC 治疗的不错选择，但其治疗 VC 的具体机制并不明确。

本研究通过狭窄左肾静脉的方法模拟 VC 对模型大鼠睾丸及附睾组织的持续性损害，并通过连续性给药的方式，探究脉络舒通丸通过干预线粒体途径的内源性凋亡，对 VC 模型大鼠睾丸生精功能的保护机制。大鼠睾丸及附睾组织的病理染色结果显示，模型组大鼠较假手术组，睾丸内的生精小管及附睾管腔出现不同程度的萎缩，并伴有上皮细胞的

脱落,各管腔内精子数量明显减少,且 Johnsen 评分降低,证明通过缩窄左侧肾静脉制备 VC 模型大鼠,其睾丸生精功能明显受损;与模型组比较,脉络舒通丸治疗后大鼠睾丸及附睾组织的形态结构得到明显改善,Johnsen 评分升高,精子数量显著增加,且中、高剂量组睾丸及附睾组织的形态结构与假手术组基本一致,提示脉络舒通丸能明显改善 VC 导致大鼠睾丸及附睾组织的损害。

线粒体途径、内质网途径以及死亡受体途径是细胞凋亡的 3 条主要途径^[10]。线粒体作为一种多功能的细胞器,不仅精子生成的主要能量来源,还能够参与调控活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、Cyt-C 释放、Caspase 激活等多种生物学过程,在细胞凋亡过程中发挥着关键性的枢纽作用^[23]。同时,线粒体自身也是 ROS 重要的靶向细胞器^[32-33]。既往研究证明,由于热应激、缺氧等因素的影响,VC 时睾丸内氧化还原平衡遭到破坏,氧化应激水平升高,导致睾丸生精功能障碍^[20,34]。过量的 ROS 能够引起 mtDNA 及线粒体结构的改变,造成线粒体相关功能障碍,最终诱导线粒体途径内源性凋亡的发生^[13]。通过 TEM 观察各组大鼠睾丸组织线粒体结构,与假手术组比较,模型组大鼠生精细胞线粒体数量减少,且线粒体形态结构存在明显损伤,多数线粒体表现为体积缩小,部分线粒体出现肿胀,甚至发生破裂,呈现空泡样改变,提示 VC 可导致大鼠睾丸组织线粒体形态结构发生改变,线粒体内嵴数量减少,造成线粒体不同程度的损伤。脉络舒通丸各治疗组睾丸组织线粒体形态结构相对正常,可见数量较多的正常形态线粒体,证明脉络舒通丸能够有效缓解 VC 所致大鼠睾丸组织中线粒体超微结构的损伤。

磷酸甘油酸变位酶 5 (phosphoglycerate mutase 5, Pgam5) 作为一种线粒体丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,主要定位于线粒体内膜,在线粒体氧化应激的条件下,可大量释放到细胞质中^[35]。既往研究证明,Pgam5 能够与 Drp1 以及 Bax 相互作用,促进 Drp1 去磷酸化、Bax 向线粒体易位,并形成执行内源性线粒体凋亡的必需复合物 Bax-Pgam5-Drp1^[36-37]。Drp1 是一种调控线粒体分裂的核心蛋白,以二聚体和四聚体的存在于细胞质中,可被招募至线粒体,催化细胞内线粒体的分裂^[38]。Drp1 可与 Bax 相互作用,二者结合并共定位于线粒体,是 Bax 向线粒体易位的关键^[36]。本研究中模型组大鼠睾丸组织中

Drp1 及 Bax 的荧光表达水平较假手术组显著升高,且 Merge 图像显示亮白色标记增加,证明二者均向线粒体易位,且可能在线粒体上形成二聚体结构,这可能是调节线粒体凋亡途径的结构基础。脉络舒通丸治疗后大鼠睾丸组织中 Drp1 及 Bax 的表达水平明显降低,说明脉络舒通丸在一定程度上能够抑制 Drp1 的激活,并抑制 Drp1 及 Bax 向线粒体的募集作用,干预线粒体途径的细胞凋亡的进程。Bax 向线粒体易位可引起线粒体膜电位降低以及结构发生变化,导致线粒体膜通透性增加,使得大量的 Cyt-C 通过膜间隙排出,进入细胞质并与凋亡酶激活因子相结合^[39]。

线粒体内促凋亡因子 Cyt-C 释放进入细胞质后,与凋亡蛋白激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合使之寡聚化,激活 Caspase-9 并介导 Caspase 级联反应^[12]。Caspase-9 作为 Caspase 级联反应的起始酶,能够切割并活化下游效应酶 Caspase-3 的前体,释放大量凋亡诱导因子,降解细胞内的相关蛋白,最终导致细胞凋亡的发生^[40]。Caspase-9、Caspase-3 是线粒体途径内源性细胞凋亡的关键酶,可以直观反映组织细胞中的凋亡水平^[41]。本研究免疫组化结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠睾丸组织中 Caspase-9、Caspase-3 在生精小管基底部分各级生精细胞中的表达水平显著升高,而脉络舒通丸各治疗组较模型组睾丸中 Caspase-9、Caspase-3 表达均存在不同程度的减少,提示脉络舒通丸能够明显降低睾丸生精细胞中 Caspase 蛋白酶的表达水平,抑制睾丸组织中 Caspase 级联反应,减轻生精细胞的凋亡水平。

综上,脉络舒通丸能有效改善睾丸、附睾及生精细胞中线粒体的损伤情况,通过抑制线粒体途径细胞凋亡必须复合物 Bax-Pgam5-Drp1 的表达,保护线粒体结构的完整性,降低睾丸中 Caspase-3 表达水平,干预 Caspase 相关级联反应,阻断凋亡信号的生成及进一步传导,抑制生精细胞过度凋亡,以保护睾丸正常的生精功能。本研究中脉络舒通丸对 VC 所致男性不育症更深层次的作用机制研究尚未完全阐明,仍需进一步的实验验证。脉络舒通丸具有活血化瘀、通络止痛等功效,其可能通过对睾丸中线粒体结构的保护作用,干预 Caspase 级联反应,抑制线粒体途径的细胞凋亡,改善 VC 患者睾丸的生精功能,提高其自然生育机率。既往研究证明,VC 患者睾丸中存在氧化还原失衡状态,而过量

的 ROS 可损害线粒体结构, 影响睾丸生精功能^[42]。本研究基于线粒体对细胞凋亡的调控作用, 通过对睾丸组织中线粒体途径细胞凋亡必须复合物 Bax-Pgam5-Drp1 的检测, 证实 VC 模型大鼠睾丸组织中 Drp1 及 Bax 的荧光表达水平较假手术组显著升高, 且二者共表达位点呈现向线粒体易位趋势, 进一步明确了 VC 中线粒体介导细胞凋亡的可能发生机制。同时, 脉络舒通丸对睾丸中线粒体结构的保护作用, 可能是其治疗 VC 所致男性不育症的关键机制, 为治疗 VC 性不育症的临床研究提供了可靠的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁少英. 运用王琦教授“三辨”诊疗模式诊治精索静脉曲张性不育症的实践 [J]. 现代中医临床, 2023, 30(3): 37-42.
- [2] Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, et al. European association of urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility [J]. *Eur Urol*, 2021, 80(5): 603-620.
- [3] Jensen C F S, Østergren P, Dupree J M, et al. Varicocele and male infertility [J]. *Nat Rev Urol*, 2017, 14(9): 523-533.
- [4] Fang Y W, Su Y F, Xu J, et al. Varicocele-mediated male infertility: From the perspective of testicular immunity and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 729539.
- [5] 王浩, 郭军, 杜冠潮, 等. 基于“脑-心-肾-精室”轴用药观辨治精索静脉曲张 [J]. 中国性科学, 2022, 31(6): 115-118.
- [6] 王彪, 杨扬, 冯恩敏, 等. 周青教授从“虚、滞、瘀”辨治精索静脉曲张性不育经验 [J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(8): 1445-1449.
- [7] 刘天元, 侯四川. 脉络舒通丸治疗精索静脉曲张的临床疗效与安全性分析 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 252-255.
- [8] 代波, 蒋越, 林思伟, 等. 精索静脉曲张性不育症的发病机制研究进展 [J]. 广西医学, 2021, 43(10): 1235-1237.
- [9] 高榕, 刘建国, 郭斌, 等. 基于数据挖掘探析中医药治疗男性不育症的用药规律 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(5): 142-145.
- [10] 陈露, 黄子彦, 陈六, 等. 加味大黄蛰虫颗粒对精索静脉曲张模型大鼠附睾上皮细胞凋亡的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(12): 2825-2828.
- [11] 王祖龙, 赵盼盼, 孙自学, 等. 益肾通络方对精索静脉曲张模型大鼠生精细胞凋亡、Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中医学报, 2018, 33(8): 1499-1503.
- [12] Green D R. The mitochondrial pathway of apoptosis: Part I: MOMP and beyond [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14(5): a041038.
- [13] 杜宝昕, 崔云, 郑军状, 等. 通精灵对精索静脉曲张模型大鼠生精细胞凋亡及线粒体超微结构的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2): 365-368.
- [14] Blanchard O L, Smoliga J M. Translating dosages from animal models to human clinical trials: Revisiting body surface area scaling [J]. *FASEB J*, 2015, 29(5): 1629-1634.
- [15] Turner T T. The study of varicocele through the use of animal models [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(1): 78-84.
- [16] Antonuccio P, Micali A, Puzzolo D, et al. Nutraceutical effects of lycopene in experimental varicocele: An “in vivo” model to study male infertility [J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1536.
- [17] Naughton C K, Nangia A K, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II: Pathophysiology of varicoceles in male infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(5): 473-481.
- [18] 王普泽, 曹德宏, 陈泽昱, 等. 精索静脉曲张对睾丸生精功能影响的研究进展 [J]. 华西医学, 2023, 38(2): 311-315.
- [19] 郝高利, 孙自学. 中医药治疗精索静脉曲张性不育研究现状与存在问题 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2728-2730.
- [20] Razi M, Tavalae M, Sarrafzadeh-Rezaei F, et al. Varicocele and oxidative stress: New perspectives from animal and human studies [J]. *Andrology*, 2021, 9(2): 546-558.
- [21] 李刚琴, 何映. 精索静脉曲张对精子线粒体功能影响的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(10): 941-944.
- [22] Li K M, van Delft M F, Dewson G. Too much death can kill You: Inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease [J]. *EMBO J*, 2021, 40(14): e107341.
- [23] Wang H J, Zhang C W, Li M N, et al. Antimicrobial peptides mediate apoptosis by changing mitochondrial membrane permeability [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12732.
- [24] 张超, 仲崇副, 史卓卓, 等. 基于蓄血证论治精索静脉曲张性不育思路 [J]. 江苏中医药, 2022, 54(11): 19-21.
- [25] 仲崇副, 韩斌, 纪云, 等. 从蓄血证论治男科疾病的研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(4): 647-651.
- [26] 曹宁宁, 李市荣, 王清果, 等. 基于网络药理学整合体内实验探究脉络舒通丸抗血栓性浅静脉曲张的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1860-1869.
- [27] Lv D F, Ji Y, Zhang Q, et al. Mailuoshutong Pill for

- varicocele-associated male infertility-phytochemical characterisation and multitarget mechanism [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 961011.
- [28] 仲崇副, 刘丰瑞, 史卓卓, 等. 脉络舒通丸治疗精索静脉曲张的组方机制 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(18): 2794-2797.
- [29] 徐明杰, 赵迪, 李龙宇, 等. 水蛭素的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(4): 747-754.
- [30] 吕东方, 仲崇副, 史卓卓, 等. 黄芪治疗精索静脉曲张与男性不育症作用机制的网络药理学分析 [J]. *中国性科学*, 2021, 30(10): 116-120.
- [31] 李沅洋, 杨书凤, 周湘忠. 黄芪甲苷减轻 5-氟尿嘧啶诱导大鼠心肌细胞凋亡的实验研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2021, 48(1): 183-186.
- [32] Santini S J, Cordone V, Falone S, et al. Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields: Focus on reproductive systems [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 5076271.
- [33] 吴林秀, 何华梅, 赵应学, 等. 水蛭素对尿酸诱导的大鼠肾 NRK-52E 细胞氧化应激及凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(15): 3735-3739.
- [34] Wang K X, Gao Y Y, Wang C, et al. Role of oxidative stress in varicocele [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 850114.
- [35] Wang M X, Xu J Y, Zhao Z B, et al. Triphenyl phosphate induced apoptosis of mice testicular Leydig cells and TM3 cells through ROS-mediated mitochondrial fusion inhibition [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 256: 114876.
- [36] Xu W J, Jing L L, Wang Q S, et al. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 30017-30034.
- [37] 封宝红, 伍军, 张艳霞, 等. 尿酸对大鼠肾细胞线粒体损伤及 Pgam5/Drp1 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1110-1114.
- [38] Chen W, Chen X J, Wang L X, et al. TIPE3 represses head and neck squamous cell carcinoma progression via triggering PGAM5 mediated mitochondria dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(4): 251.
- [39] Li J Y, Sun X A, Yang N H, et al. Phosphoglycerate mutase 5 initiates inflammation in acute kidney injury by triggering mitochondrial DNA release by dephosphorylating the pro-apoptotic protein Bax [J]. *Kidney Int*, 2023, 103(1): 115-133.
- [40] Dadsena S, Zollo C, García-Sáez A J. Mechanisms of mitochondrial cell death [J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49(2): 663-674.
- [41] Wang Y N, Hu S M, Tuerdi M, et al. Initiator and executioner caspases in salivary gland apoptosis of *Rhipicephalus haemaphysaloides* [J]. *Parasit Vectors*, 2020, 13(1): 288.
- [42] Kang C, Punjani N, Lee R K, et al. Effect of varicoceles on spermatogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 121: 114-124.

[责任编辑 李亚楠]