

复方甘草酸苷调节肥胖大鼠睾丸组织凋亡和类固醇合成相关因子表达的作用

刘 畅¹, 马文欣², 虎 娜¹, 刘自钰², 穆 胜³, 刘永杰⁴, 马会明^{1,2*}

1. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏 银川 750004

2. 宁夏医科大学 生育力保持教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

3. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏 银川 750004

4. 银川市妇幼保健院, 宁夏 银川 750004

摘要: **目的** 研究复方甘草酸苷对高脂饮食诱导的肥胖大鼠睾丸的凋亡和类固醇合成功能的影响。**方法** 高脂饲喂 50 只 8 周龄雄性 SD 大鼠 10 周建立肥胖模型, 造模结束后剔除不成功的 10 只后, 将其随机分为模型组和复方甘草酸苷低、中、高剂量 (20、40、80 mg/kg) 组, 以相同周龄的雄性 SD 大鼠作为对照组, 给予普通饲料饲养。给药 4 周后, 观察大鼠一般情况, 统计大鼠体质量和体长计算 Lee's 指数及睾丸指数。采用 ELISA 法检测血清性激素睾酮 (testosterone, T) 和雌二醇 (estradiol, E₂) 水平; 全自动生化分析仪检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察和 Johnsen 评分评估大鼠睾丸组织形态; TUNEL 法评估睾丸细胞凋亡; 免疫荧光染色 (immunofluorescence, IF) 和免疫印迹 (Western blotting, WB) 检测睾丸组织中 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、类固醇急性生成调节蛋白 (steroidogenesis acute regulatory protein, StAR) 及细胞色素 P450 家族 11 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 11 subfamily A polypeptide 1, CYP11A1) 的表达。**结果** 不同剂量复方甘草酸苷治疗均可降低大鼠体质量和 Lee's 指数, 显著提高睾丸指数; 提高血清性激素 T 水平, 降低 E₂ 水平 ($P < 0.01$); 降低血清生化指标 TC、TG、FFA 和 LDL-C 水平, 提高 HDL-C 水平 ($P < 0.01$); 保护睾丸组织形态; 抑制睾丸组织凋亡, 下调 Bax 蛋白表达, 上调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 上调类固醇合成相关蛋白 StAR 和 CYP11A1 的表达 ($P < 0.01$)。**结论** 复方甘草酸苷可以改善肥胖相关睾丸损伤, 调节血清激素和血脂水平, 抑制睾丸凋亡的发生, 提高睾丸类固醇合成相关蛋白的表达。

关键词: 复方甘草酸苷; 睾丸; 凋亡; 类固醇合成; 肥胖模型大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)06-2025-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.016

Role of compound glycyrrhizin in regulating apoptosis and expression of steroid synthesis-related factors in testicular tissues of obese rats

LIU Chang¹, MA Wenxin², HU Na¹, LIU Ziyu², MU Sheng³, LIU Yongjie⁴, MA Huiming^{1,2}

1. School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. Key Laboratory of Fertility Maintenance, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

3. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

4. Yinchuan Maternal and Child Health Hospital, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To investigate the impact of compound glycyrrhizin (CG) on testicular cell apoptosis and steroid hormone synthesis in rats with obesity induced by a high-fat diet (HFD). **Methods** A total of 50 male SD rats, aged eight weeks, were HFD fed for 10 weeks to establish an obesity model. Excluding 10 unsuccessful models, the remaining rats were randomly assigned to either a model group or groups receiving low-, medium- and high-doses (20, 40, 80 mg/kg) of CG. The control group of SD rats of the same

收稿日期: 2024-11-11

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (2022AAC03744); 宁夏重点研发计划项目 (2022BEG03083); 国家自然科学基金资助项目 (82274624)

作者简介: 刘 畅, 硕士研究生, 研究方向为男性生殖损伤与修复。E-mail: 1733307894@qq.com

*通信作者: 马会明, 教授, 硕士生导师, 从事中西药和干细胞改善生殖障碍疾病研究及其创新药物研发工作。E-mail: mhm289@nxmu.edu.cn

age was fed a regular diet. After four weeks of treatment, the rats' general health was assessed, and their body weight and length were measured to calculate Lee's index and testicular index. Serum levels of testosterone (T) and estradiol (E₂) were measured using ELISA. Levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), free fatty acids (FFA), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined using an automatic biochemical analyzer. Testicular morphology was observed using hematoxylin-eosin (HE) staining, and Johnsen scores were evaluated. Apoptosis of testicular cells was assessed using the TUNEL method. The expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and cytochrome P450 family 11 subfamily A polypeptide 1 (CYP11A1) in testicular tissue was detected by immunofluorescence staining (IF) and Western blotting (WB). **Results** CG treatment at all doses led to a reduction in body weight and Lee's index in rats, while significantly increasing the testicular index and serum T levels, and decreasing E₂ levels ($P < 0.01$). Additionally, CG treatment notably lowered TC, TG, FFA, and LDL-C, while increasing HDL-C levels ($P < 0.01$). Histological analysis revealed that CG preserved the normal architecture of testicular tissue morphology. Moreover, CG effectively inhibited apoptosis of testicular germ cells, reduced the expression of Bax protein, and increased the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.01$). It also significantly upregulated the expression of StAR and CYP11A1 ($P < 0.01$). **Conclusion** CG can mitigate testicular damage associated with obesity, normalize serum hormone and lipid levels, prevent testicular apoptosis, and enhance the expression of proteins involved in testicular steroid synthesis.

Key words: compound glycyrrhizin; testis; apoptosis; steroid synthesis; obesity model rat

随着膳食结构及生活方式的重大改变,超重和肥胖的患病率呈急剧上升的趋势,肥胖已成为全世界关注的重要公共卫生问题^[1]。肥胖对男性生殖的负面影响已成为生殖医学领域的研究热点^[2]。临床研究表明,与身体质量指数(body mass index, BMI)正常的男性相比,超重男性或肥胖男性的精子质量较低,精子DNA受损较多^[3]。动物实验研究发现,长期高脂饮食诱导的肥胖可导致的大鼠生殖细胞过度凋亡,进而导致睾丸组织结构损伤,最终导致大鼠生育能力低下甚至不育^[4]。

中医药可通过多途径、多靶点、整体调节和调节肠道菌群比例和结构的优势来干预肥胖所致的多种睾丸生殖损伤疾病^[5-6]。甘草酸苷具有免疫调节、抗氧化、抗炎、抗病毒、抗菌和抗癌活性等多种药理特性^[7-9]。临床上复方甘草酸苷用于治疗炎症和病毒性疾病^[10],也缓解了肝脏炎症^[11],改善了糖尿病肾病中高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)、Toll样受体4(Toll-like receptors 4, TLR4)、核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)等炎症表达^[12]。复方甘草酸苷通过抑制HMGB1和减少氧化应激对肾损伤和功能障碍具有保护作用^[13]。本研究探究复方甘草酸苷是否可以恢复高脂饮食所致肥胖造成的睾丸损伤,并观察复方甘草酸苷对肥胖模型大鼠生理生化、睾丸组织凋亡及睾酮分泌的改善作用,这将为复方甘草酸苷临床治疗肥胖相关睾丸功能减退症提供一定的理论基础。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠60只,8周龄,体质量(200±20)g,由宁夏医科大学实验动物中心提供,动物许可证号SYXK(宁)2020-0001,动物于温度20~22℃,相对湿度45%,保持动物房内昼夜节律环境中饲养,期间自由进食饮水。本研究动物实验经宁夏医科大学动物保护委员会批准(伦理批准号2022-G189)。

1.2 药品与试剂

复方甘草酸苷片(美能复方制剂,批号21177,每片含甘草酸苷25mg、甘氨酸25mg、DL-蛋氨酸25mg)购自日本米诺发源制药株式会社;大鼠45%高脂饲料(批号MD12032)购自江苏美迪森生物医药有限公司;大鼠T ELISA试剂盒(批号BY-JZF0008)和大鼠E₂ ELISA试剂盒(批号BY-JZF0003)购自南京博研生物科技有限公司;全蛋白提取试剂盒(批号KGB5303-100)、BCA蛋白含量检测试剂盒(批号KGB2101-1000)和ECL超敏化学显影液(批号KGC4602-200)均购自江苏凯基生物科技股份有限公司;TUNEL试剂盒(批号A112-02)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Bax抗体(批号60267-1-1g)购自美国Proteintech公司;Bcl-2抗体(批号T40056F)购自中国Abmart公司;StAR抗体(批号#8449)和CYP11A1抗体(批号#14217)购自美国Cell signaling technology公司; β -actin抗体(批号A0101)、HRP标记的羊抗小鼠

二抗(批号 S0100)、羊抗兔二抗(批号 S0101)购自北京兰博利德生物技术有限公司。

1.3 仪器

5417R 型超速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); KD-BM II 型电脑生物组织包埋机(浙江科迪公司); RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); DM2000/DFC450C 型双相正置荧光显微镜(德国 Leica 公司); Nikon ECLIPSE Ti 型扫描激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司); JXFST-PRP-CL 型全自动样品冷冻研磨仪(上海净信公司); Epoch 型全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); PowerPac Basic 型电泳装置(美国 Bio-Rad 公司), Touch Imager 接触式化学发光成像仪(上海 e-BLOT 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周开展实验。10 只大鼠持续以普通饲料喂养作为对照组。50 只大鼠以 45% 高脂饲料喂养 10 周诱导肥胖大鼠模型^[14]。造模结束后, 给予高脂饲料的 50 只大鼠按体质量增重排序, 剔除体质量较低的肥胖抵抗大鼠 10 只^[15], 将剩余 40 只大鼠随机分模型组及复方甘草酸苷低、中、高剂量(20、40、80 mg/kg)组, 每组 10 只, 继续高脂喂养。依据复方甘草酸苷成人临床剂量与“实验动物与人的体表面积换算关系”进行剂量确定, 计算得到的剂量作为低剂量组, 即按照 1:2:4 比例设置低、中、高剂量组。对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 其余各组分别 ig 1 mL 相应质量浓度的复方甘草酸苷, 1 次/d, 连续给药 4 周。

麻醉前禁食不禁水 12 h, 吸入式异氟烷麻醉大鼠后心脏取血, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清。一侧睾丸置于固定液中用于病理检测, 另一侧睾丸液氮速冻后置于-80 ℃冻存用于提取蛋白。

2.2 体质量、Lee's 指数和睾丸指数测定

于造模开始前、造模结束及给药结束后, 分别称量并记录大鼠体质量。使用软尺测量并记录大鼠体长(即测量从大鼠鼻尖到肛门的长度), 计算各组大鼠 Lee's 指数。给药结束后, 剖取双侧睾丸并称定质量, 计算睾丸指数。

$$\text{Lee's 指数} = \sqrt[3]{a \times b / 10}$$

$$\text{睾丸指数} = c/a$$

a 为体质量, b 为体长, c 为睾丸质量

2.3 性激素含量检测

ELISA 法检测各组大鼠血清性激素 T 和 E₂ 的

含量。所有操作均按照试剂盒说明书进行, 用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光度(A)值, 通过绘制标准曲线计算大鼠血清性激素 T 和 E₂ 的含量。

2.4 血清生化指标检测

使用全自动生化仪检测各组大鼠血清中 TC、TG、FFA、LDL-C 和 HDL-C 的水平。

2.5 睾丸组织病理学观察

大鼠睾丸组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后经脱水、包埋, 制成石蜡切片(4 μm), 进行 HE 染色, 使用光学显微镜下观察睾丸组织病理变化, 采集图像。并且根据 Johnsen 评分^[16]标准进行睾丸生精功能的评估, 采用 10 分制来量化生精功能的健康状况, 分数越高则表示睾丸生精功能越好。10 分: 生精功能正常; 9 分: 生精功能轻度改变, 总体功能尚属正常; 8 分: 每生精小管精子数量减少至小于 5 条; 7 分: 无精子和后期精子细胞, 仅见早期精子细胞; 6 分: 仅有支持细胞, 生精上皮稀少; 5 分: 生精小管内生精上皮变薄, 管腔直径减小; 4 分: 生精上皮更薄, 生精细胞少见; 3 分: 生精小管管腔塌陷, 仅见支持细胞; 2 分: 生精小管完全透明样变, 生精上皮缺失; 1 分: 生精小管完全萎缩。

2.6 TUNEL 染色检测睾丸组织细胞凋亡情况

取各组大鼠睾丸组织的石蜡切片, 进行脱蜡、水化、通透、洗涤、平衡、含有 BrightGreen 的标记液标记、终止、DAPI 复染、洗涤, 样品分析操作参照试剂盒说明书进行。样品切片在 Leica 双相正置荧光显微镜下观察拍照, 460 nm 荧光下观察蓝色荧光, (520±20) nm 荧光下观察绿色荧光。DAPI 能将所有细胞都染成蓝色, 只有凋亡的细胞核中才有 BrightGreen 掺入而产生绿色荧光。

2.7 IF 法检测睾丸组织凋亡及类固醇合称相关蛋白表达

睾丸组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水、1 mmol/L 柠檬酸盐中进行高压抗原修复、内源性过氧化物酶阻断处理、0.3% Triton X-100 室温通透 30 min 和山羊血清 37 ℃恒温箱封闭 30 min, 分别与抗体 Bax、Bcl-2、StAR 及 CYP11A1 (1:100) 4 ℃孵育过夜。将切片组织上覆盖适量荧光二抗(1:100), 避光 37 ℃恒温箱孵育 20 min, DAPI 染液避光染色 5 min, 抗荧光淬灭封片剂封片, Nikon 扫描激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2.8 Western blotting 法检测相关蛋白表达

分别取 3 mg 各组大鼠睾丸组织, 使用全蛋白

提取试剂盒提取总蛋白, BCA 蛋白含量检测试剂盒测定总蛋白含量, 蛋白定量后煮蛋白使其变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别滴加 Bax (1:12 000)、Bcl-2 (1:1 000)、StAR (1:1 000)、CYP11A1 (1:1 000) 和 β -actin (1:5 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜后, 加对应二抗 (1:20 000) 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后加 ECL 化学发光剂中显影。Image-J 软件测定目的条带的灰度值, 计算目的蛋白的相对表达量。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析, 所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对数据进行正态分布检验, 方差齐性的资料组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对肥胖大鼠基础指标的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠体质量及 Lee's 指数显著增加 ($P < 0.01$), 睾丸指数显著减小 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方甘草酸苷各剂量大鼠体质量及 Lee's 指数下降 ($P < 0.01$), 睾丸指数升高 ($P < 0.01$), 说明复方甘草酸苷可改

善高脂饮食诱导肥胖大鼠的基础指标。

3.2 对肥胖大鼠血清性激素 T 和 E₂ 的影响

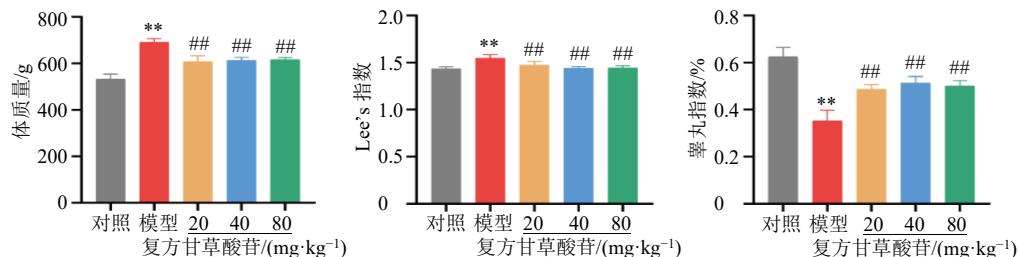
如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 T 水平下调、E₂ 水平上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方甘草酸苷各剂量组大鼠血清 T 水平上调、E₂ 水平下调 ($P < 0.01$), 说明复方甘草酸苷可改善高脂饮食诱导肥胖大鼠的性激素水平。

3.3 对肥胖大鼠血清生化指标的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TC、TG、FFA 和 LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方甘草酸苷各剂量组大鼠血清中 TC、TG、FFA 和 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$), 说明复方甘草酸苷能改善 HFD 导致的大鼠血脂代谢的异常。

3.4 对肥胖大鼠睾丸组织病理变化的影响

如图 4 所示, 通过观察睾丸 HE 染色和 Johnsen 评分结果发现, 与对照组比较, 模型组大鼠睾丸组织各级生精细胞排列混乱, 生精细胞层数和精原细胞数量降低, 支持细胞和精子细胞数量有所减少,



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 figures.

图 1 复方甘草酸苷对肥胖大鼠基础指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effects of compound glycyrrhizin on basic indexes of obese rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

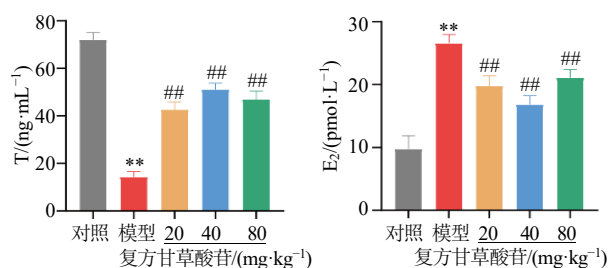


图 2 复方甘草酸苷对肥胖大鼠血清性激素 T、E₂ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of compound glycyrrhizin on serum sex hormones T and E₂ in obese rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Johnsen 评分显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方甘草酸苷各剂量组大鼠睾丸组织各级生精细胞排列相对整齐, 生精细胞层数、精子细胞和支持细胞数量有所增加, Johnsen 评分显著增加 ($P < 0.01$)。说明复方甘草酸苷对高脂饮食诱导的睾丸组织形态损伤具有保护作用。

3.5 对肥胖大鼠睾丸组织凋亡的改善

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠的睾丸组织中 TUNEL 阳性表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方甘草酸苷治疗后睾丸组织的 TUNEL 阳性表达显著减少 ($P < 0.01$)。

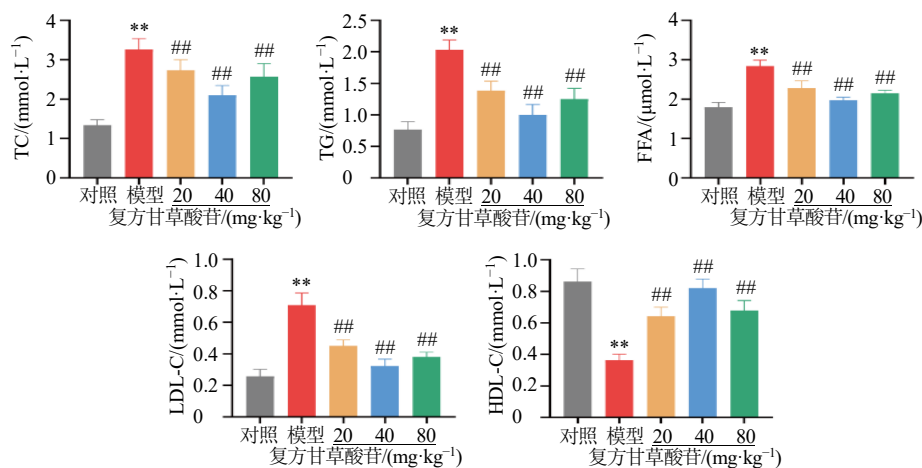
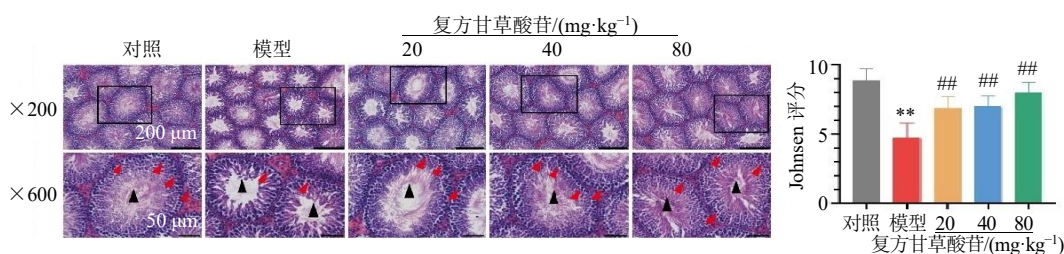


图 3 复方甘草酸苷对肥胖大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of compound glycyrrhizin on serum biochemical indexes in obese rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



红色代表精原细胞，黑色代表精子细胞。

Red arrows represent spermatogonia, and black arrows represent sperm cells.

图 4 复方甘草酸苷对肥胖大鼠睾丸组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effects of compound glycyrrhizin on testicular histopathological changes in obese rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

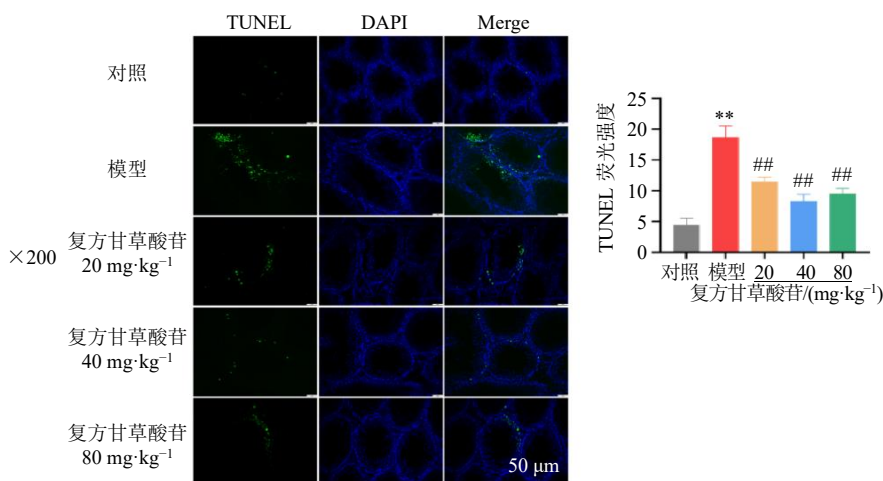


图 5 TUNEL 染色 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 TUNEL staining ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 对肥胖大鼠睾丸组织凋亡和类固醇合成相关因子表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠 Bax 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)，Bcl-2、StAR

和 CYP11A1 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，复方甘草酸苷各剂量组大鼠 Bax 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)，Bcl-2、StAR 和 CYP11A1 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)，说

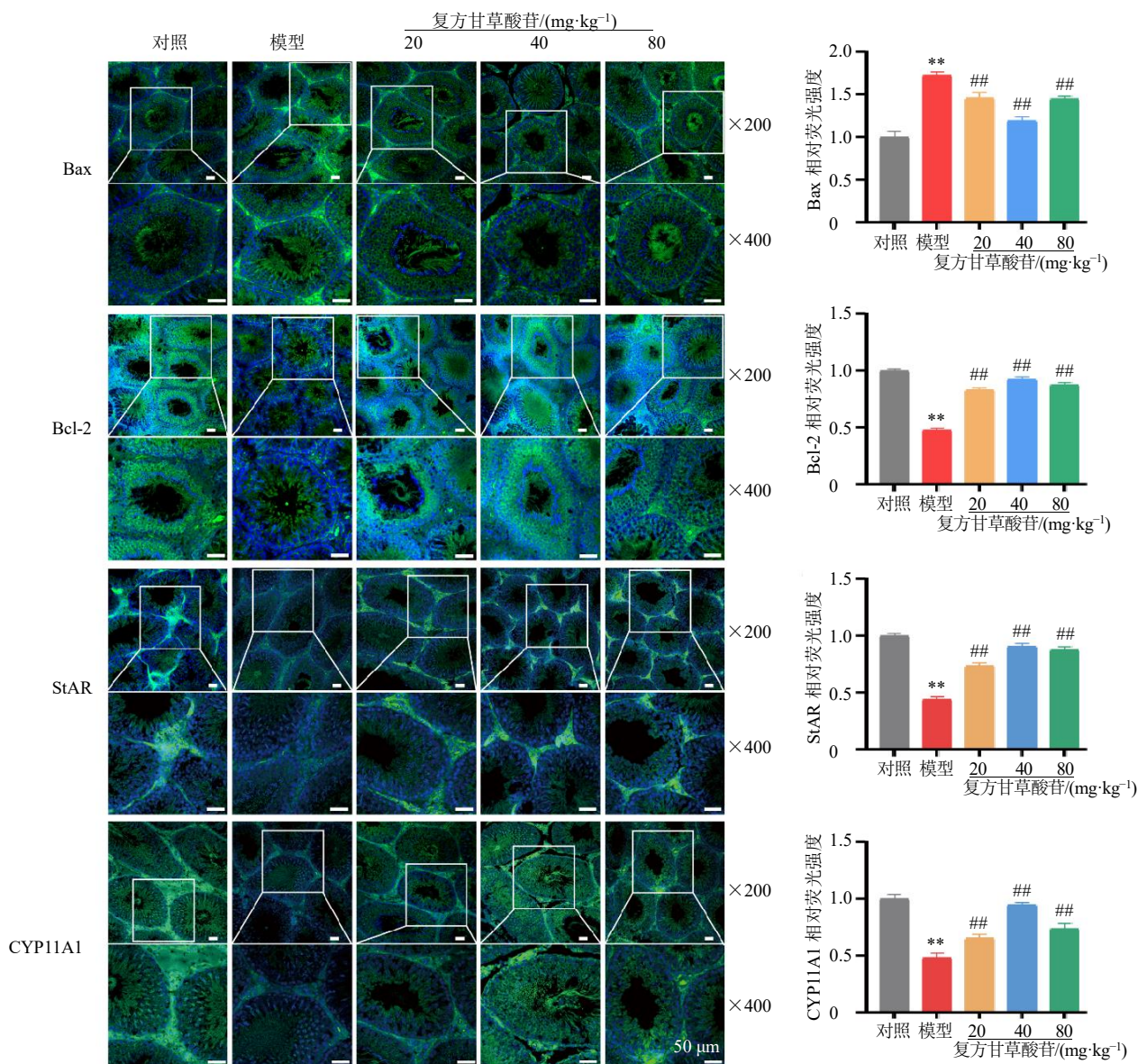


图 6 复方甘草酸苷改善肥胖所致大鼠睾丸组织 Bax、Bcl-2、StAR 和 CYP11A1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effects of compound glycyrrhizin on expression of Bax, Bcl-2, StAR and CYP11A1 in testis of obese rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

明复方甘草酸苷能够改善肥胖大鼠睾丸凋亡及类固醇合成功能异常情况。

3.7 对肥胖大鼠睾丸组织凋亡和类固醇合成相关蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组 Bcl-2/Bax 的值、StAR 和 CYP11A1 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,复方甘草酸苷各剂量组 Bcl-2/Bax 的值、StAR 和 CYP11A1 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),说明复方甘草酸苷能够抑制肥胖大鼠睾丸组织凋亡,改善类固醇合成功能异常情况。

4 讨论

据统计,男性因素占不孕症病例的 50%,其中肥胖是导致男性不育的重要危险因素^[17-18]。研究表明,超重和肥胖可以通过内分泌失调^[19]、慢性低度炎症^[20]、氧化应激^[21]和遗传因素^[22]等多种方式影响男性生殖功能。肥胖可通过影响中枢和外周机制破坏下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)轴的生理平衡,导致血清促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、T 和 E₂ 水平的改变^[23]。本研究发现复方甘草酸苷治疗后大鼠血清

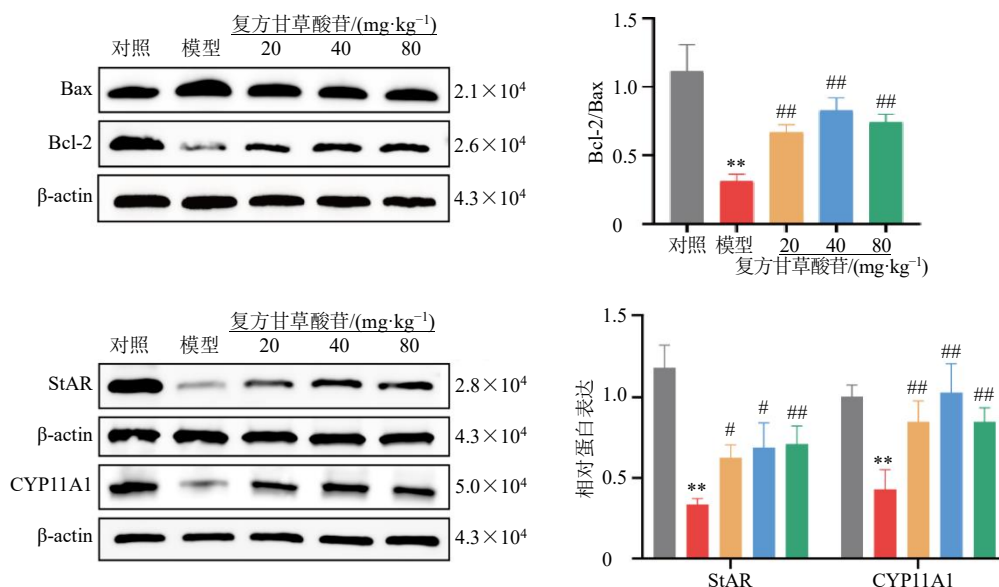


图 7 复方甘草酸苷改善肥胖所致大鼠睾丸组织 Bcl-2/Bax、StAR 和 CYP11A1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Compound glycyrrhizin improved expression of Bcl-2/Bax, StAR and CYP11A1 in rat testicular tissue induced by obesity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

T 水平上调、E₂ 水平下调，这是因为肥胖大鼠胰岛素水平升高导致性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 结合活性降低，导致游离 T 的相对增加，并通过芳香化反应放大 E₂ 负反馈的影响。而且异常的 T 水平可通过雄激素受体直接作用于睾丸组织及其细胞，同时也影响精液浓度和精子活力，降低精液质量^[24-25]。本研究发现复方甘草酸苷治疗后大鼠精子活率和活力显著性升高，这可能是因为利用复方甘草酸苷治疗可增加 SHBG 在肝脏合成，可特异性结合循环性激素 (包括 T 和 E₂)，调节血清性激素的生物利用度，从而调节体内激素水平，最终改善大鼠的精液质量。

甘草酸苷具有免疫调节活性^[26]、抗炎^[27]、抗氧化^[28]、抗肥胖^[29]及保肝^[30]的作用。研究表明，复方甘草酸苷可以调节脂质代谢，降低血糖，提高胰岛素敏感性等作用，本研究中复方甘草酸苷治疗后，大鼠体重和 Lee's 指数显著下降，这是因为复方甘草酸苷治疗后减少内脏和皮下脂肪组织中的脂质沉积，使得 Lee's 指数和体质量显著下降，同时这种高脂饮食诱导的脂质沉积会导致大鼠睾丸支持细胞内质网明显扩张肿胀，部分网膜会断裂，进而影响内质网的结构和功能，使大鼠睾丸处于内质网应激状态，进而引起大鼠睾丸及其支持细胞、间质细胞等的损伤，出现睾丸组织凋亡^[31]。本研究 HE

结果发现，模型组大鼠的睾丸出现生精细胞排列稀疏，细胞层数减少，呈“空泡样”改变，支持细胞变性，相邻细胞间隔增宽等形态结构异常。模型组睾丸组织中 TUNEL 阳性细胞数显著增加，复方甘草酸苷治疗后睾丸组织的 TUNEL 阳性表达减少。

肥胖导致性激素水平紊乱，引起睾丸间质细胞及支持细胞功能降低，影响睾丸的精子发生和附睾的精子成熟^[32-33]。肥胖男性瘦素分泌的增加会抑制睾丸间质细胞产生睾酮^[34]，过多的脂肪组织通过增加芳香化酶活性促进 T 转化为 E₂^[35]。BMI、体脂百分比和腹腔内脂肪等参数与男性的 T 水平呈负相关，与 E₂ 水平呈正相关^[36]。本实验结果表明，复方甘草酸苷治疗后血清性激素 T 水平升高，E₂ 水平下降；TUNEL 结果显示睾丸生殖细胞凋亡数目明显减少，生精细胞层增厚。

睾丸类固醇激素合成由 CYP11A1 催化和 StAR 蛋白的转运，CYP11A1 主要作用是分解胆固醇的侧链以产生孕烯醇酮，孕烯醇酮再进一步转化为 T、E₂、孕酮等多种类固醇激素，是维持体内分泌平衡和多种生理功能的关键物质^[37]。本研究发现复方甘草酸苷治疗后类固醇合成相关因子 CYP11A1 和 StAR 的表达量明显升高，表明复方甘草酸苷能够改善肥胖大鼠睾丸类固醇合成功能障碍，复方甘草酸苷通过诱导脂肪组织凋亡来抑制肥胖。据报道，高

脂饮食可通过黑色素瘤细胞中的活性氧-线粒体凋亡通路诱导细胞凋亡^[38], 此外, 高脂饮食通过激活线粒体的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) /c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cystein-aspartate protease, Caspase) 通路和抑制肝细胞癌中的 NF- κ B 活性诱导细胞凋亡^[39]。高脂饮食通过增加促凋亡活化形式的 Caspase-3/9 和 Bcl-2 相互作用细胞死亡介导因子 (Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim) 的蛋白水平导致细胞凋亡^[40]。肥胖通过影响类固醇生成, 促进血睾屏障的破坏, 增加生殖细胞凋亡^[41]。本实验研究结果表明, 复方甘草酸苷显著降低凋亡相关因子 Bcl-2/Bax 的表达, 抑制细胞凋亡; 说明复方甘草酸苷可以通过减轻高脂饮食肥胖雄性大鼠睾丸的凋亡来缓解肥胖所致睾丸内分泌紊乱。

综上, 本研究高脂饮食诱导 SD 大鼠成功建立了肥胖大鼠模型, 并发现复方甘草酸苷调节肥胖模型大鼠睾丸类固醇合成相关蛋白的表达, 改善了肥胖模型大鼠的凋亡, 进而改善肥胖模型大鼠内分泌功能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Huang W J, Wang J Y, Kuang M, *et al.* Exploring global research status and trends in anti-obesity effects of traditional Chinese medicine through intestinal microbiota: A bibliometric study [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1271473.
- [2] Wei Y H, Liao M H, Lu Y M, *et al.* Mapping the landscape of obesity effects on male reproductive function: A bibliometric study [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2024, 24(13): 1546-1557.
- [3] Cannarella R, Crafa A, Curto R, *et al.* Obesity and male fertility disorders [J]. *Mol Aspects Med*, 2024, 97: 101273.
- [4] Luo M, Zhuge X H, Ji L, *et al.* Icariin ameliorates spermatogenesis disorder in obese mice induced by high-fat diet through regulating the glycolytic pathway [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2023, 67(13): e2200524.
- [5] 邹和德, 赵家有, 陈文康, 等. “脑-肠-睾丸”轴的内涵及其在男性生殖疾病中的运用展望 [J]. *中国男科学杂志*, 2024, 38(4): 112-119.
- [6] Li D H, Tang W W, Wang Y Y, *et al.* An overview of traditional Chinese medicine affecting gut microbiota in obesity [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1149751.
- [7] Zhu K Y, Fan R, Cao Y C, *et al.* Glycyrrhizin attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by suppressing Inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via the HMGB1-TLR4-GPX4 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2024, 435(1): 113912.
- [8] Alamer A A, Alshehri A A, Aodah A H, *et al.* Development and evaluation of sildenafil/glycyrrhizin-loaded nanofibers as a potential novel buccal delivery system for erectile dysfunction [J]. *Saudi Pharm J*, 2024, 32(5): 102038.
- [9] Wang G F, Hiramoto K, Ma N, *et al.* Immunohistochemical analyses reveal FoxP3 expressions in spleen and colorectal cancer in mice treated with AOM/DSS, and their suppression by glycyrrhizin [J]. *PLoS One*, 2024, 19(8): e0307038.
- [10] Wang J M, Ren C X, Bi W H, *et al.* Glycyrrhizin mitigates acute lung injury by inhibiting the NLRP3 inflammasome *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115948.
- [11] 王素茹. 复方甘草酸苷联合恩替卡韦治疗对乙肝肝硬化外周免疫功能 and 血清炎症介质的影响 [J]. *中国医学创新*, 2024, 21(12): 56-61.
- [12] Thakur V, Nargis S, Gonzalez M, *et al.* Role of glycyrrhizin in the reduction of inflammation in diabetic kidney disease [J]. *Nephron*, 2017, 137(2): 137-147.
- [13] Oh H, Choi A, Seo N, *et al.* Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on post-contrast acute kidney injury [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15625.
- [14] 王启航. 不同减肥方法对高脂饮食肥胖大鼠炎症水平的影响研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [15] 任爽, 朱敬生, 许迎迎, 等. 游泳运动对高脂膳食诱导肥胖抵抗大鼠肝脏 OX-1R 的影响 [J]. *营养学报*, 2024, 46(6): 622-624.
- [16] Fu W, Cui J, Tang S S. The relationship of testicular stiffness with Johnsen score and sperm retrieval outcome in men with non-obstructive azoospermia [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2024, 14(4): 3033-3043.
- [17] Rasouli M A, Dumesic D A, Singhal V. Male infertility and obesity [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2024, 31(6): 203-209.
- [18] Liu Y, Ding Z D. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society [J]. *Reproduction*, 2017, 154(4): R123-R131.
- [19] Abildgaard J, Bang A K, Nordkap L, *et al.* The influence of body composition on the response to dynamic stimulation of the endocrine pituitary-testis axis [J]. *Int J Obes*, 2024, 48(9): 1216-1222.
- [20] Shende P, Vadivel S, Sanghani D, *et al.* Association of obesity, inflammation, and hypogonadism: A cross-sectional study in males under 60 years of age [J]. *Cureus*,

- 2024, 16(9): e70439.
- [21] Rotimi D E, Acho M A, Falana B M, *et al.* Oxidative stress-induced hormonal disruption in male reproduction [J]. *Reprod Sci*, 2024, 31(10): 2943-2956.
- [22] Tomar A, Gomez-Velazquez M, Gerlini R, *et al.* Epigenetic inheritance of diet-induced and sperm-borne mitochondrial RNAs [J]. *Nature*, 2024, 630(8017): 720-727.
- [23] Mazza E, Troiano E, Ferro Y, *et al.* Obesity, dietary patterns, and hormonal balance modulation: Gender-specific impacts [J]. *Nutrients*, 2024, 16(11): 1629.
- [24] 王生玉, 谢宜昌, 马婧, 等. 不育男性精液质量和生殖激素与脂肪因子的相关性分析 [J]. 中国计划生育学杂志, 2024, 32(7): 1613-1617.
- [25] 张倩, 杜琛, 孙祺, 等. 1310 例男性精液质量与性激素水平相关性分析 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2024, 46(2): 180-183.
- [26] Buder F, Selejan S R, Hohl M, *et al.* Glycyrrhizin through liquorice intake modulates ACE2 and HMGB1 levels-a pilot study in healthy individuals with implications for COVID-19 and ARDS [J]. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0275181.
- [27] Fatima I, Sahar A, Tariq A, *et al.* Exploring the role of licorice and its derivatives in cell signaling pathway NF- κ B and MAPK [J]. *J Nutr Metab*, 2024, 2024: 9988167.
- [28] Wang X M, Gao X Z, Xu F, *et al.* Diammonium glycyrrhizinate ameliorates alcohol-induced liver injury by reducing oxidative stress, steatosis, and inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143(Pt 2): 113374.
- [29] Liu F, Tang X, Mao B Y, *et al.* Ethanol extract of licorice alleviates HFD-induced liver fat accumulation in association with modulation of gut microbiota and intestinal metabolites in obesity mice [J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 4180.
- [30] Gonfa Y H, Bachheti A, Semwal P, *et al.* Hepatoprotective activity of medicinal plants, their phytochemistry, and safety concerns: A systematic review [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2024.
- [31] 刘伟伟, 李锡晶, 刘大卫, 等. 高脂饮食诱导肥胖大鼠生精障碍及睾丸支持细胞线粒体和内质网结构功能的改变 [J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(18): 25-32.
- [32] Gao D D, Ding N, Deng W J, *et al.* Aerobic exercises regulate the epididymal anion homeostasis of high-fat diet-induced obese rats through TRPA1-mediated Cl⁻ and HCO₃⁻ secretion [J]. *Biol Reprod*, 2023, 109(1): 53-64.
- [33] 李欢欢, 特力格尔, 马婧, 等. 补锌对高脂饮食大鼠睾丸组织 circRNA-miRNA-mRNA 网络的影响 [J]. 中国计划生育学杂志, 2023, 31(7): 1506-1511.
- [34] Uddand Rao V V S, Brahma Naidu P, Chandrasekaran P, *et al.* Pathophysiology of obesity-related infertility and its prevention and treatment by potential phytotherapeutics [J]. *Int J Obes*, 2024, 48(2): 147-165.
- [35] Di Vincenzo A, Granzotto M, Crescenzi M, *et al.* Non-aromatizable androgens modulate the lipopolysaccharide induced expression of the P2X7 receptor in human adipocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1251035.
- [36] Chen J H, Wang Z L, Zhou Y, *et al.* Association between body mass index and sex hormones among men: Evidence from cross-sectional and Mendelian randomization studies [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2024, 18(4): 293-300.
- [37] Izichkis L S, Basque A, Martin L J. High concentrations of progesterone inhibit the expression of genes related to steroid metabolism in MA-10 Leydig cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2024, 594: 112375.
- [38] Yang S P, Zhang Y G, Luo Y, *et al.* Hinokiflavone induces apoptosis in melanoma cells through the ROS-mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 101-110.
- [39] Mu W, Cheng X F, Zhang X, *et al.* Hinokiflavone induces apoptosis via activating mitochondrial ROS/JNK/caspase pathway and inhibiting NF- κ B activity in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14): 8151-8165.
- [40] Bock F J, Riley J S. When cell death goes wrong: Inflammatory outcomes of failed apoptosis and mitotic cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(2): 293-303.
- [41] Falvo S, Minucci S, Santillo A, *et al.* A short-term high-fat diet alters rat testicular activity and blood-testis barrier integrity through the SIRT1/Nrf2/MAPKs signaling pathways [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1274035.

[责任编辑 罗 曦]