

基于蛋白质组学探讨人参固本口服液联合荆防颗粒对少弱精子症的影响及作用机制

张萌迪¹, 巩立媛¹, 赵文歆¹, 郑成成², 王恩力^{2*}, 姚景春^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276005

摘要: **目的** 探讨人参固本口服液联合荆防颗粒对少弱精子症小鼠的生殖保护作用, 并运用蛋白质组学探究其作用机制。**方法** 将小鼠随机分为对照组, 模型组, 人参固本口服液低、中、高剂量 (0.1、0.2、0.4 mL/只) 组, 荆防颗粒 (4 g/kg) 组和人参固本口服液 (0.4 mL/只) 联合荆防颗粒 (4 g/kg) 组, 每组 10 只。采用奥硝唑诱导建立少弱精子症小鼠模型, 连续造模同时给药 56 d 后麻醉处死。采用全自动精子分析仪检测精子数量及精子活动指标; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠睾丸、附睾组织病理变化; ELISA 检测小鼠血清中性激素水平; 微量法检测小鼠睾丸组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 应用蛋白质组学技术分析小鼠睾丸组织中蛋白种类和表达情况, 筛选差异表达蛋白及其相关蛋白信号通路; 采用 Western blotting 检测差异表达蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 各给药组可明显提高精子数量和精子活动指标 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著增强睾丸组织中 GSH-Px 活性 ($P < 0.01$ 、 0.001)。其中, 人参固本口服液联合荆防颗粒组可显著增加睾丸和附睾指数 ($P < 0.001$), 显著增加精子数量 ($P < 0.01$), 显著改善睾丸、附睾组织病理状态, 显著回调血清中促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E₂)、睾酮 (testosterone, T) 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。蛋白质组学结果表明, 人参固本口服液联合荆防颗粒治疗少弱精子症主要与氨基酸代谢、碳代谢、脂肪酸代谢、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路有关。Western blotting 结果显示, 人参固本口服液联合荆防颗粒组可显著提高睾丸组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 人参固本口服液联合荆防颗粒可协同治疗少弱精子症, 能够提高精子数量及精子活动指标, 改善性激素紊乱、氧化应激, 减轻睾丸、附睾病理状态, 其作用机制可能与激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

关键词: 人参固本口服液; 荆防颗粒; 少弱精子症; 性激素紊乱; 蛋白质组学; PI3K/Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)22-8245-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.016

Effect and mechanism of Renshen Guben Oral Liquid combined with Jingfang Granules on oligoasthenospermia based on proteomics

ZHANG Mengdi¹, GONG Liyuan¹, ZHAO Wenxin¹, ZHENG Chengcheng², WANG Enli², YAO Jingchun^{1,2}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China

Abstract: Objective To explore the reproductive protection effect of Renshen Guben Oral Liquid (人参固本口服液) combined with Jingfang Granules (荆防颗粒) on oligoasthenospermia mice and explore its mechanism by proteomics. **Methods** The mice were randomly divided into control group, model group, low, medium- and high-dose (0.1, 0.2, 0.4 mL/mice) groups of Renshen Guben Oral Liquid, Jingfang Granules (4 g/kg) group, Renshen Guben Oral Liquid (0.4 mL/mice) combined with Jingfang Granules (4 g/kg)

收稿日期: 2025-08-22

基金项目: 山东省泰山产业领军人才工程 (tsxc202312104)

作者简介: 张萌迪, 硕士研究生, 研究方向为中药药理及安全性评价。E-mail: 976280958@qq.com

*通信作者: 王恩力, 研究员, 从事新药药理与毒理研究。E-mail: weli51@163.com

姚景春, 研究员, 硕士生导师, 从事新药药理与毒理研究。E-mail: yaojingchun@yeah.net

group, with 10 mice in each group. The mouse model of oligoasthenospermia was induced by ornidazole, and the mice were sacrificed by anesthesia after 56 d of continuous modeling and administration. The number of sperm and its activity index were detected by fully automatic sperm analyzer. The pathological changes of testis and epididymis were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum sex hormone levels in mice were detected by ELISA. The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in mouse testis were detected by micro method. Proteomics technology was used to analyze the types and expression of proteins in mouse testis, screen differentially expressed proteins and their related protein signaling pathways. The expressions of differentially expressed proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, each administration group could significantly increase the number of sperm and sperm activity indexes ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly enhance the activity of GSH-Px in testicular tissue ($P < 0.01, 0.001$). Among them, Renshen Guben Oral Liquid combined with Jingfang Granules group could significantly increase the testis and epididymis indexes ($P < 0.001$), significantly increase the number of sperm ($P < 0.01$), significantly improve the pathological state of testis and epididymis, significantly callback the levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E_2) and testosterone (T) in serum ($P < 0.01, 0.001$). Proteomics results showed that the therapeutic effect of Renshen Guben Oral Liquid combined with Jingfang Granules on oligoasthenospermia was mainly related to amino acid metabolism, carbon metabolism, fatty acid metabolism, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. Western blotting results showed that Renshen Guben Oral Liquid combined with Jingfang Granules could significantly increase the expression levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and p-mTOR/ mTOR proteins in testicular tissue ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Renshen Guben Oral Liquid combined with Jingfang Granules could synergistically treat oligoasthenospermia, increase sperm count and activity indexes, improve sex hormone disorder, oxidative stress, and reduce the pathological state of testis and epididymis. The mechanism may be related to the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: Renshen Guben Oral Liquid; Jingfang Granules; oligoasthenospermia; sex hormone disorder; proteomics; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

少弱精子症 (oligoasthenozoospermia, OAS) 是精子密度降低及活动时间缩短的疾病, 75% 男性不育与 OAS 相关^[1]。中医将 OAS 归属于“精少”“精寒”“精冷”“精薄”等范畴, 临床多表现为精清稀少、阳痿、早泄、腰膝酸困、疲乏无力、舌淡苔白或少、脉沉细或弱等^[2-3]。目前一般通过调控激素水平、降低精子氧化程度、手术治疗梗阻性不育症、改善生活方式等手段治疗 OAS, 虽有一定成效, 但 OAS 发病机制尚不明确, 且具有难治性与易复发性特征, 是男性生殖系统疾病的热点和难点^[4-5]。研究表明, 中医药防治 OAS 具有综合性、平衡性的优势, 可通过调节下丘脑-垂体-睾丸轴、增强支持细胞和间质细胞功能、改善睾丸微循环, 发挥中医药多靶点、多系统、多途径治疗 OAS 的优势, 以提高精子质量和妊娠率^[6]。人参固本口服液具有益气滋阴、固本培元、填精养血、补虚扶弱的功效, 可改善阴虚气弱、心悸气短、腰酸耳鸣、遗精盗汗等症状, 临床治疗 OAS 取得了一定效果^[7]。荆防颗粒传承荆防败毒散, 由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗和甘草组成, 具有调节细胞免疫、提高机体免疫系统、调节性激素及抗氧化等作用^[8-11]。两药联用, 可以在祛邪的同时固护

正气, 表里兼顾, 进一步调节人体免疫功能, 有助于改善精子的生成环境, 提高精子质量。因此, 本研究通过建立 OAS 模型, 探讨人参固本口服液联合荆防颗粒治疗 OAS 的作用, 并进一步探讨两药协同作用的潜在机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 8~10 周龄, 体重 (22±2) g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0013, 使用许可证号 SYXK (鲁) 2023-0023, 实验动物操作均经过鲁南制药集团股份有限公司动物管理和使用委员会批准, 审批号 AN-IACUC-2024-115。

1.2 药品与试剂

人参固本口服液 (国药准字 Z10940013, 批号 329240192) 购自鲁南厚普制药有限公司; 荆防颗粒 (国药准字 Z37020357, 批号 0012301078) 购自山东新时代药业有限公司; 奥硝唑片 (国药准字 H20030148, 批号 B250510K12) 购自四川科伦药业股份有限公司; 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na, 批号 211210) 购自安徽山河药用辅料股份有限公司; 促卵泡生成素

(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E₂) ELISA 试剂盒(批号分别为 abx154038、abx154345、abx051548) 购自英国 Abbexa 公司; 睾酮(testosterone, T) ELISA 试剂盒(批号 CEA458Ge) 购自武汉云克隆科技股份有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色液(批号分别为 BC1195、BC0175、G1120) 购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒(批号 P0012AC)、BeyoECL Moon 极超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 P0018FS)、 β -actin 抗体(批号 AF2811)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 A0216)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 A0208) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体(批号 ab191606) 购自英国 Abcam 公司; 磷酸化 PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化 mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR) 抗体(批号分别为 17366、4691S、4060S、2983S、5536S) 购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

SCA-V-M-01 型全自动精子分析仪(西班牙 Microptic S. L 公司); Z326K 型高速冷冻离心机(德国 Hermle 公司); IM-5FLD 型倒置荧光显微镜(意大利 Optika 公司); Chemi Scope6200 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); Multiskan GO 型酶标仪、VanquishNeo 型高效液相色谱仪、Orbitrap Astral 型质谱仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将小鼠按体质量随机分为对照组, 模型组, 人参固本口服液低、中、高剂量(0.1、0.2、0.4 mL/只^[12], 分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍) 组, 荆防颗粒(4 g/kg) 组和人参固本口服液(0.4 mL/只) 联合荆防颗粒(4 g/kg) 组, 每组 10 只。依据文献方法^[13]及预实验结果建立 OAS 模型, 除对照组外,

其余各组 ig 奥硝唑(500 mg/kg, 溶于 1% CMC-Na 溶液), 连续造模 56 d 建立 OAS 小鼠模型。造模同时, 除对照组和模型组 ig 纯化水外, 其余各组小鼠 ig 给予相应剂量的药物(人参固本口服液或荆防颗粒), 1 次/d, 连续给药 56 d。

2.2 样本的取材及处理

末次给药后, 小鼠禁食、自由饮水 12 h 后, im 舒泰 50 和盐酸塞拉嗪注射液麻醉后腹主动脉取血, 全血静置 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用于性激素水平检测。摘取小鼠睾丸、附睾, 一部分存于 Davidson 溶液中固定, 用于病理观察; 另一部分保存在-80 °C, 用于氧化应激水平检测及蛋白信号通路验证。

2.3 体质量、摄食量及脏器指数分析

实验期间, 每周记录小鼠体质量及摄食量, 分析小鼠体质量与摄食量的变化情况。小鼠处死后, 取出睾丸、附睾组织, 分别称取质量后, 计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

2.4 精子的收集及分析

小鼠解剖附睾并分离附睾尾, 称取附睾尾质量后, 放入 37 °C 预温的生理盐水中, 将附睾尾剪碎并置于 37 °C 恒温箱中孵育, 使精子在生理盐水中充分游离。取 20 μ L 稀释样本置于科学计数板上, 并使用全自动精子分析仪在显微镜下进行评估。

2.5 睾丸、附睾组织病理学观察

取经改良的 Davidson 溶液固定的睾丸、附睾组织后, 脱水、常规石蜡包埋、切片(厚 5 μ m), 进行 HE 染色, 通过光学显微镜观察各组小鼠睾丸、附睾组织的结构变化情况, 并拍照分析。睾丸 Johnsen 评分是依据生精小管中精子发生程度进行定量判断的 10 级评分表^[14]。10 分: 精子发生完全, 精子数量多; 9 分: 存在许多精子, 但排列紊乱; 8 分: 只有少数精子(<5~10 个); 7 分: 无精子, 但存在许多精子细胞; 6 分: 无精子, 只有少数精子细胞(<5~10 个); 5 分: 无精子、精子细胞, 但存在数个精母细胞; 4 分: 只有少数精母细胞(<5 个), 无精子细胞或精子; 3 分: 精母细胞是唯一存在的生殖细胞; 2 分: 无生殖细胞, 仅有支持细胞; 1 分: 无细胞可见。

2.6 血清中性激素水平检测

取冻存后的血清, 解冻后参照相应 ELISA 试剂盒操作说明测定小鼠血清中 FSH、LH、E₂、T 水平。

2.7 睾丸组织匀浆中 GSH-Px、SOD 活性检测

取冻存后的睾丸组织，室温解冻后，取适量睾丸组织，剪碎，在冰水浴中研磨制备睾丸组织匀浆，离心后取上清，按照相应试剂盒说明书检测各组小鼠睾丸组织中 GSH-Px、SOD 的活性。

2.8 睾丸蛋白质组学分析

选取对照组、模型组、人参固本口服液高剂量组、荆防颗粒组、人参固本口服液联合荆防颗粒组睾丸组织进行蛋白定量分析，每组 3 个样本。每个样本中加入适量的蛋白裂解液并测定蛋白含量。蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳。取适量蛋白样品进行蛋白酶解，将酶解抽干后的肽段复溶，用 HLB 进行肽段脱盐后，采用紫外分光光度法定量肽段。用质谱上样缓冲液溶解等量的肽段进行 DIA 检测分析。将 DIA 原始数据导入 Spectronaut™ 19 软件系统进行搜库分析。采用 R 语言中的 *t* 检验函数计算组间差异显著性 *P* 值和差异倍数 (fold change, FC)，筛选差异表达蛋白，导入 KOBAS 数据库对所有差异蛋白从生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 方面进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析，同时对差异表达蛋白涉及的代谢通路进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.9 Western blotting 检测睾丸组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达

采用 Western blotting 验证蛋白质组学分析结果。取冻存后的睾丸组织，室温解冻后称取适量辜

丸组织，用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液制备睾丸组织匀浆，取上清用 BCA 法测定蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液，100 °C 煮沸 10 min 使蛋白变性。取等量样品进行凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5% 脱脂牛奶，室温封闭 1 h，加入一抗，4 °C 孵育 12~16 h；加入二抗，室温孵育 2 h，PBST 洗膜后上机显影，采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析，计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间数据比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组小鼠体质量、摄食量变化

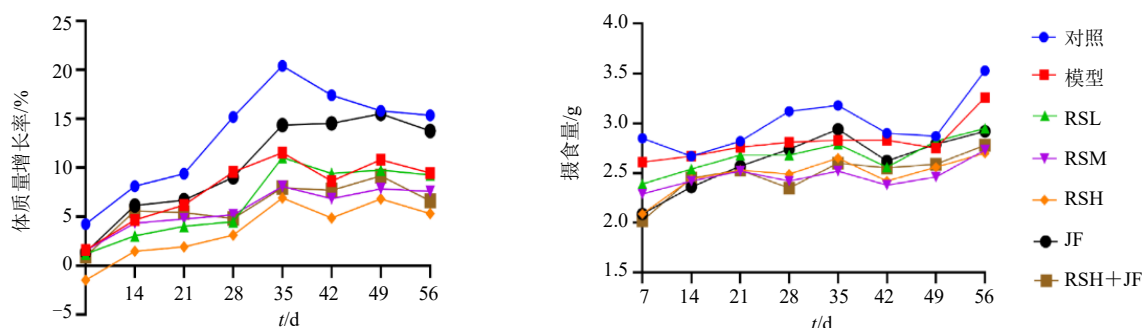
如图 1 所示，对照组小鼠体质量增长率在 35 d 时达到最大，随后体质量增长放缓；模型组与各给药组小鼠体质量整体呈现缓慢增长趋势。各组小鼠摄食量整体呈现缓慢增长趋势，在 56 d 时达到最高。

3.2 各组小鼠脏器指数变化

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸指数、附睾指数均显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，各给药组小鼠睾丸指数、附睾指数均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.3 各组小鼠精子数量及精子活动指标变化

如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠精子数量、精子活动度、曲线速度、平均路径速度、直线度指数、线性度、摆动指数、精子头部侧向摆动平均值和鞭打频率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；与模型组比较，人参固本口服液低剂量组小鼠精子

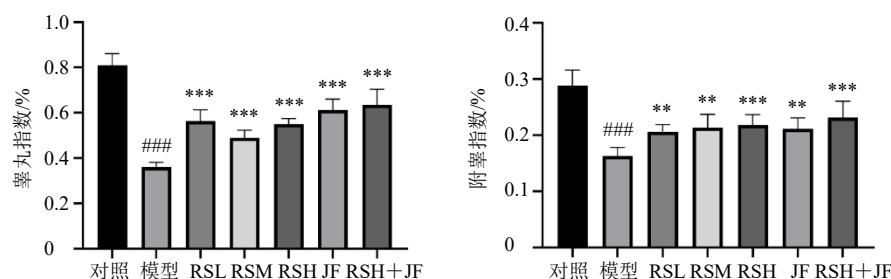


RSL-人参固本口服液低剂量组；RSM-人参固本口服液中剂量组；RSH-人参固本口服液高剂量组；JF-荆防颗粒组；RSH+JF-高剂量人参固本口服液联合荆防颗粒组，下同。

RSL-Ginseng Guben Oral Liquid low-dose group; RSM-Ginseng Guben Oral Liquid medium-dose group; RSH-Ginseng Guben Oral Liquid high-dose group; JF-Jingfang Granules group; RSH+JF-high-dose Ginseng Guben Oral Liquid combined with Jingfang Granules group, same as below figures.

图 1 各组小鼠体质量、摄食量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Changes of body weight and food intake of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 2 各组小鼠睾丸、附睾指数变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Changes of testis and epididymis indexes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

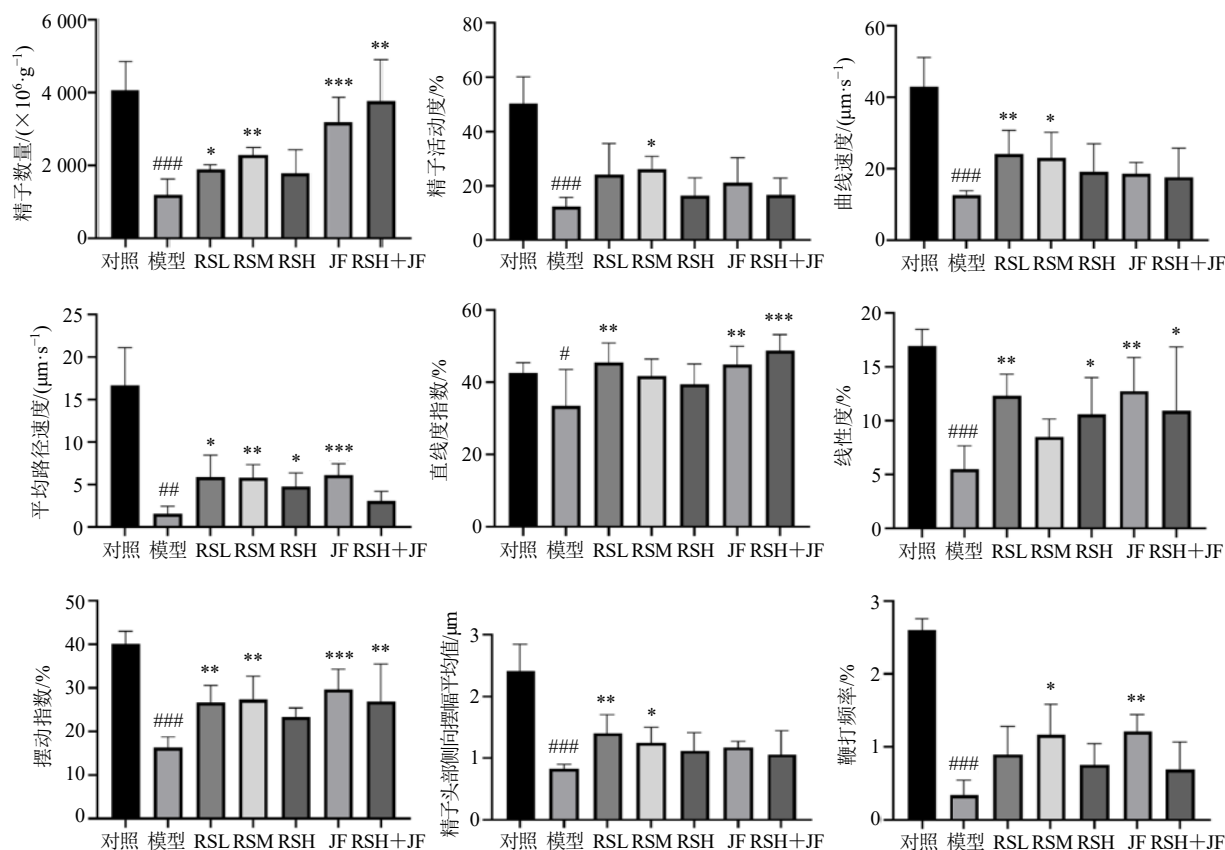


图 3 各组小鼠精子数量及精子活动指标变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

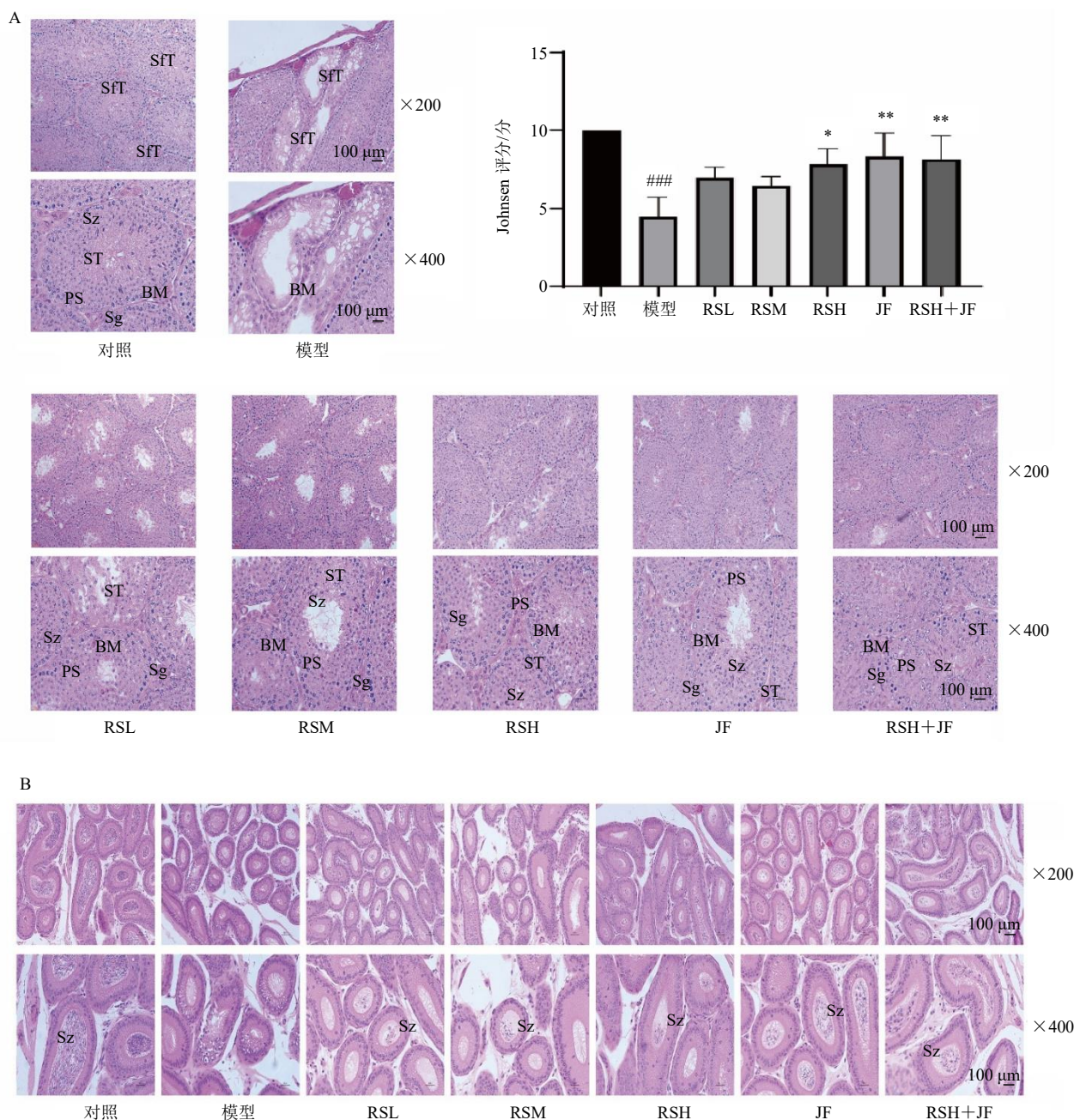
Fig. 3 Changes of sperm count and sperm activity indexes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

数量、曲线速度、平均路径速度、直线度指数、线性度、摆动指数和精子头部侧向摆幅平均值显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 人参固本口服液剂量组小鼠精子数量、精子活动率、曲线速度、平均路径速度、摆动指数、精子头部侧向摆幅平均值和鞭打频率显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 人参固本口服液高剂量组小鼠精子平均路径速度和线性度显著升高 ($P < 0.05$), 荆防颗粒组小鼠精子数量、平均路径速度、直线度指数、线性度、摆动指数和鞭打频率显著升

高 ($P < 0.01, 0.001$), 人参固本口服液联合荆防颗粒组小鼠精子数量、直线度指数、线性度和摆动指数显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

3.4 各组小鼠睾丸、附睾病理组织形态及睾丸 Johnsen 评分

如图 4-A 所示, 对照组小鼠睾丸实质由大量排列紧密的生精小管及间质构成, 生精小管外轮廓呈现圆形或椭圆形, 基底膜完整, 无增厚或褶皱, 不同发育阶段的生精细胞从基底至管腔分层排列。与



A-睾丸 HE 染色及 Johnsen 评分; B-附睾 HE 染色; Sft-曲精细管; BM-基底膜; Sg-精原细胞; PS-初级精母细胞; ST-精子细胞; Sz-精子。

A-testicular HE staining and Johnsen score; B-epididymis HE staining; Sft-seminiferous tubules; BM-basement membrane; Sg-spermatogonia; PS-primary spermatocytes; ST-sperm cells; Sz-sperm.

图 4 各组小鼠睾丸、附睾组织 HE 染色及睾丸 Johnsen 评分

Fig. 4 HE staining of testis and epididymis tissues and Johnsen score of testis of mice in each group

对照组比较, 模型组基底膜破损, 曲精细管空虚, 各级生精细胞数量、层次减少; 与模型组比较, 各给药组可维持基底膜完整性, 不同程度的恢复各级生精细胞正常排列形态。与对照组比较, 模型组小鼠睾丸 Johnsen 评分显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 人参固本口服液高剂量组、荆防颗粒组、

人参固本口服液联合荆防颗粒组小鼠睾丸 Johnsen 评分显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 4-B 所示, 对照组小鼠附睾管多呈圆形或类圆形, 上层细胞排列整齐, 腔内含有大量成熟精子。与对照组比较, 模型组上皮细胞空泡变性, 管腔内成熟精子减少甚至消失; 与模型组比较, 各给药组可恢复上皮细胞完

整结构，管腔内可见成熟精子。

3.5 各组小鼠血清中性激素水平

如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 FSH、LH 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)， E_2 、T 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)；与模型组比较，人参固本口服液低剂量组 LH 水平显著降低 ($P < 0.001$)， E_2 和 T 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)；人参固本口服液低剂量组 LH 水平显著降低 ($P < 0.05$)， E_2 水平显著升高 ($P < 0.01$)；人参固本口服液高剂量组 LH 水平显著降低 ($P < 0.001$)， E_2 和 T 水平显著升高 ($P < 0.01$)；荆防颗粒组 LH 水平显

著降低 ($P < 0.001$)， E_2 和 T 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；人参固本口服液联合荆防颗粒组 FSH 和 LH 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)， E_2 和 T 水平显著升高 ($P < 0.001$)。

3.6 各组小鼠睾丸组织中 GSH-Px、SOD 活性

如图 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织中 GSH-Px 活性降低但无统计学意义；与模型组比较，人参固本口服液中、高剂量组及荆防颗粒组、人参固本口服液联合荆防颗粒组 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。各组 SOD 活性差异无统计学意义。

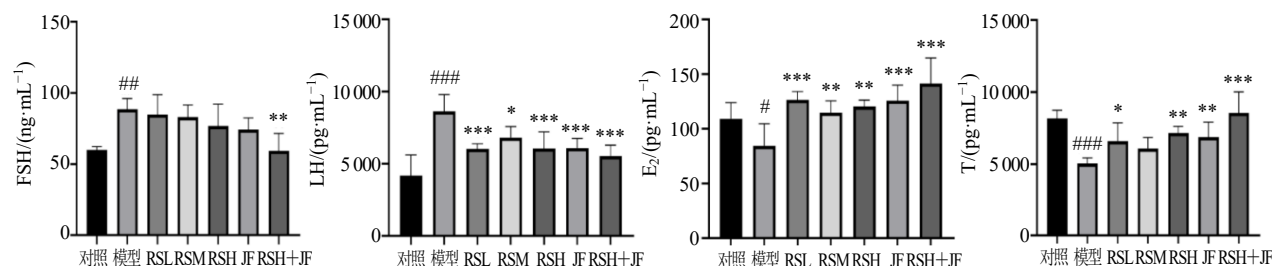


图 5 各组小鼠血清中性激素水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Levels of sex hormone in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

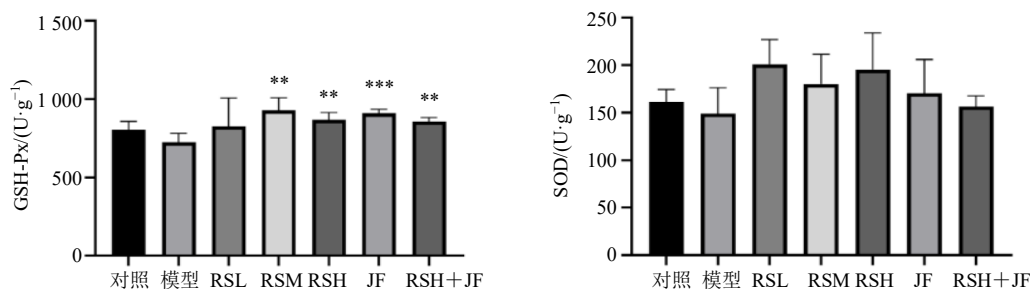


图 6 各组小鼠睾丸组织中 GSH-Px、SOD 活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Activities of GSH-Px and SOD in testicular tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.7 各组小鼠睾丸组织蛋白质组学分析结果

3.7.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 如图 7 所示，各组内样本点距离相近，均放在同一置信圈内，说明同一组内样本蛋白表达量接近；对照组与模型组分离明显，说明实验设计合理、表型差异显著；各给药组分布趋向于对照组，说明给药后可逆转 OAS 引起的蛋白质表达变化，使机体蛋白表达谱回归对照组的生理状态。

3.7.2 各组小鼠睾丸差异表达蛋白分析 如图 8 所示，以 $FC > 1.2$ 或 < 0.83 、 $P < 0.01$ 为两两组间差异蛋白的筛选条件，将差异表达蛋白的结果以火山图的形式呈现 (图 8-C)。与对照组比较，模型组有 681 个蛋白上调、1158 个蛋白下调；与模型组比较，人

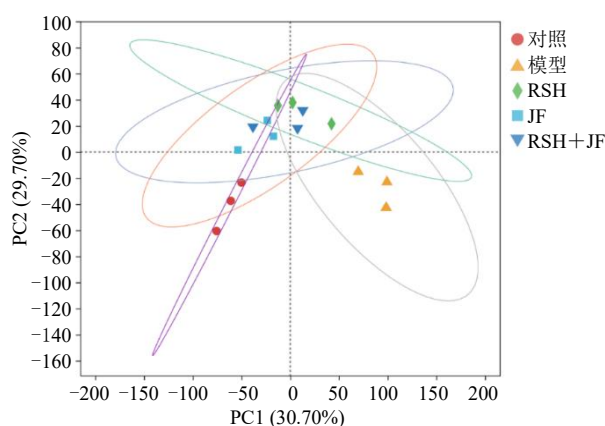
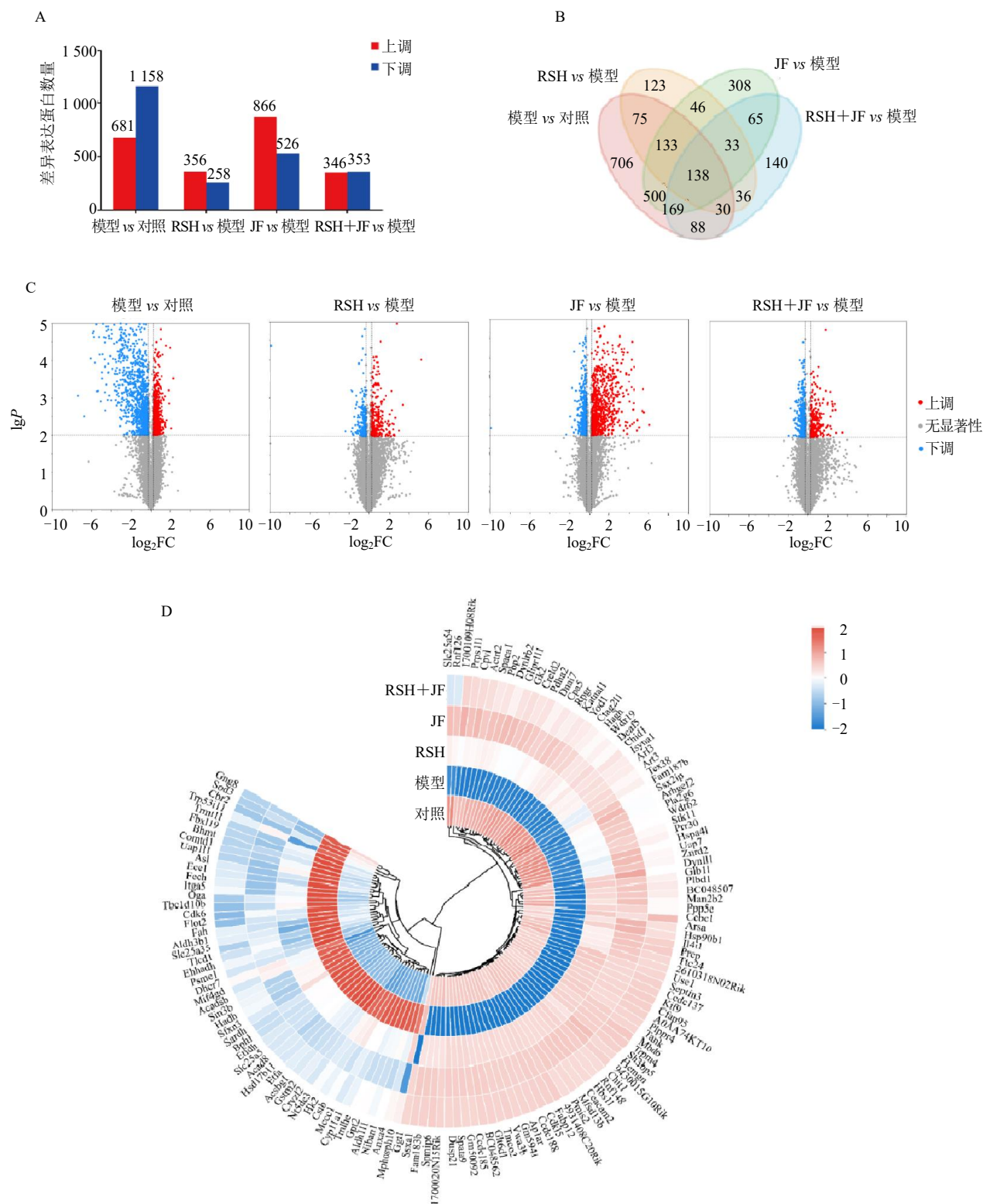


图 7 各组小鼠睾丸组织 PCA 图 ($n = 3$)

Fig. 7 PCA of testicular tissue of mice in each group ($n = 3$)



A-两组间差异表达蛋白筛选; B-蛋白 Venn 图; C-差异表达蛋白火山图; D-差异表达蛋白聚类热图。

A-screening of differentially expressed proteins between two groups; B-protein Venn diagram; C-differentially expressed protein volcano plot; D-differentially expressed protein clustering heat map.

图 8 差异表达蛋白分析 ($n = 3$)

Fig. 8 Differentially expressed protein analysis ($n = 3$)

参固本口服液高剂量组有 356 个蛋白上调、258 个蛋白下调，荆防颗粒组有 866 个蛋白上调、526 个蛋白下调，人参固本口服液联合荆防颗粒组有 346 个蛋白上调、353 个蛋白下调（图 8-A）。其中，对照组、模型组、人参固本口服液高剂量组、荆防颗粒组和人参固本口服液联合荆防颗粒组之间共鉴定出 138 个交集差异表达蛋白（图 8-B）。将 138 个交集差异表达蛋白进行表达聚类热图分析（图 8-D），可直观看到各组间差异表达蛋白的回调情况。

3.7.3 各组小鼠睾丸差异表达蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络分析 利用 STRING 数据库构建 138 个差异表达蛋白的 PPI 网络关系图（图 9），该网络由 134 个节点数和 70 条边数构成，平均节点度为 1.04。其中互作连接度最强的蛋白分别为羟酰辅酶 A 脱氢酶（hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, Hadh）、酰基辅酶 A 脱氢酶家族成员 8（acyl-coenzyme A

dehydrogenase family member 8, Acad8）、短/支链特异性酰基辅酶 A 脱氢酶（short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, Acadsb）、电子转移黄素蛋白-泛醌氧化还原酶（electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, Etfhd）、过氧化物酶体双功能酶（peroxisomal bifunctional enzyme, Ehhadh）、电子转移黄素蛋白 α 亚基（electron transfer flavoprotein subunit alpha, Etf α ）、甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶 α 亚基（methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha, Mccc1）、含卷曲螺旋结构域 185（coiled-coil domain containing 185, Ccdc185）、动力蛋白轻链障碍型 2（dynein light chain roadblock-type 2, Dynlrb2）、己糖激酶 2（hexokinase-2, Hk2）、肌氨酸脱氢酶（sarcosine dehydrogenase, Sardh），提示上述蛋白可能是人参固本口服液、荆防颗粒及两药协同作用治疗 OAS 在蛋白层面进行干预的关键节点。

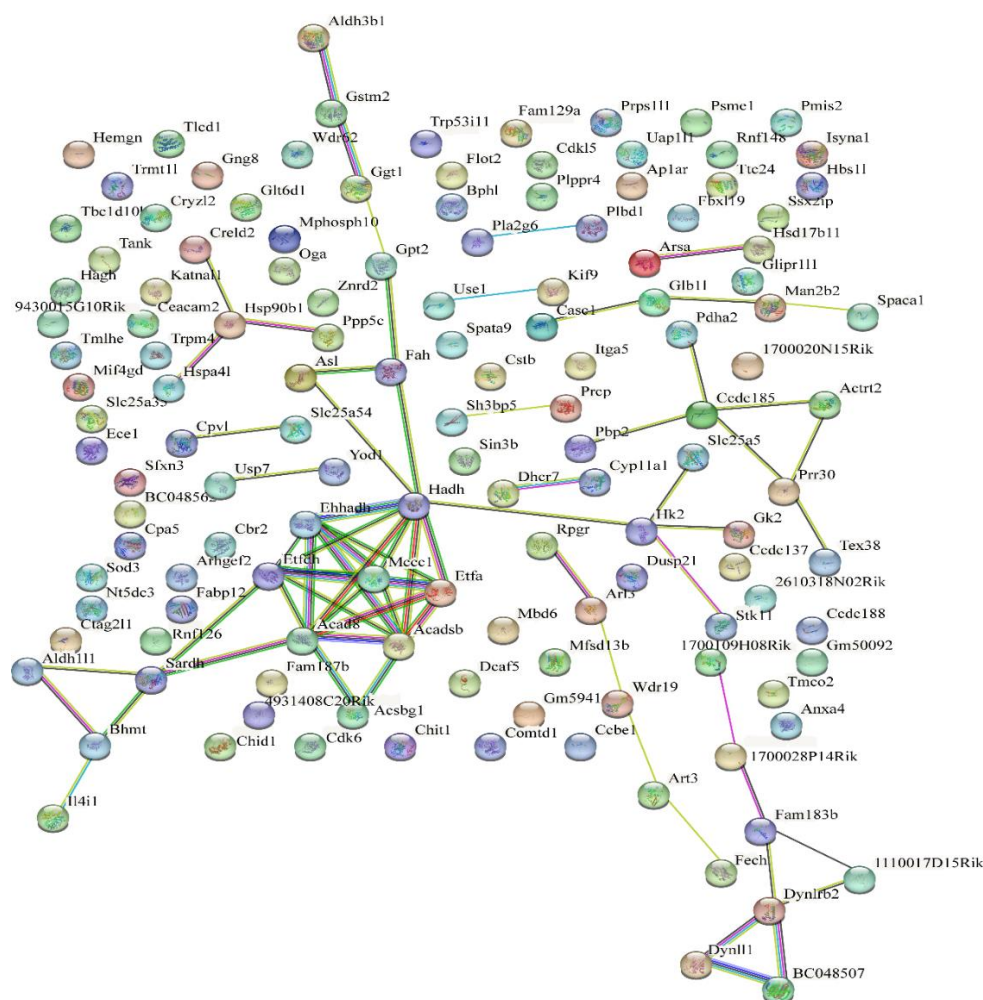


图 9 PPI 网络

Fig. 9 PPI network

3.7.4 各组小鼠睾丸差异表达蛋白 GO 和 KEGG 富集分析 如图 10 所示, 使用 KOBAS 数据库对 138 个鉴定出的组间差异蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析, 依据 $P < 0.05$ 分别筛选前 10 个条目绘制 GO 分析图, 并将高度富集的前 20 个途径呈现为富集桑基图。GO 富集分析结果表明, 人参固本口服液、荆防颗粒及两药协同作用治疗 OAS 主要与氧化-还原过程、睫状体内的转运参与纤毛组装、支链氨基酸分解代谢过程等 BP 有关, 与线粒体基质、细胞外分泌体、细胞溶质等 CC 有关, 与蛋白质结合、黄素腺嘌呤二核苷酸结合、丝氨酸型羧肽酶活性等

MF 有关。KEGG 富集分析结果表明, 人参固本口服液、荆防颗粒及两药协同作用治疗 OAS 主要与氨基酸代谢、碳代谢、脂肪酸代谢、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等相关。

3.8 各组小鼠睾丸组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠睾丸组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比

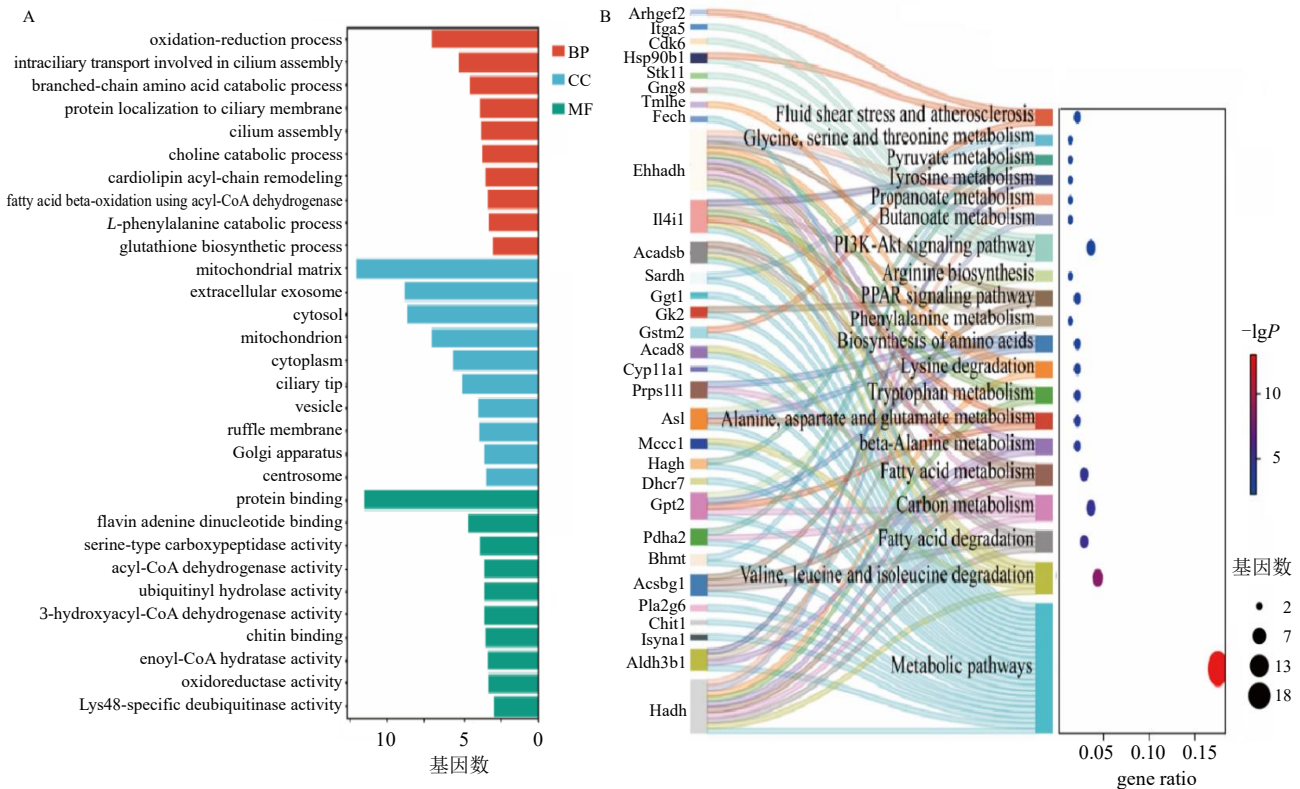


图 10 GO (A) 和 KEGG (B) 富集分析

Fig. 10 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis

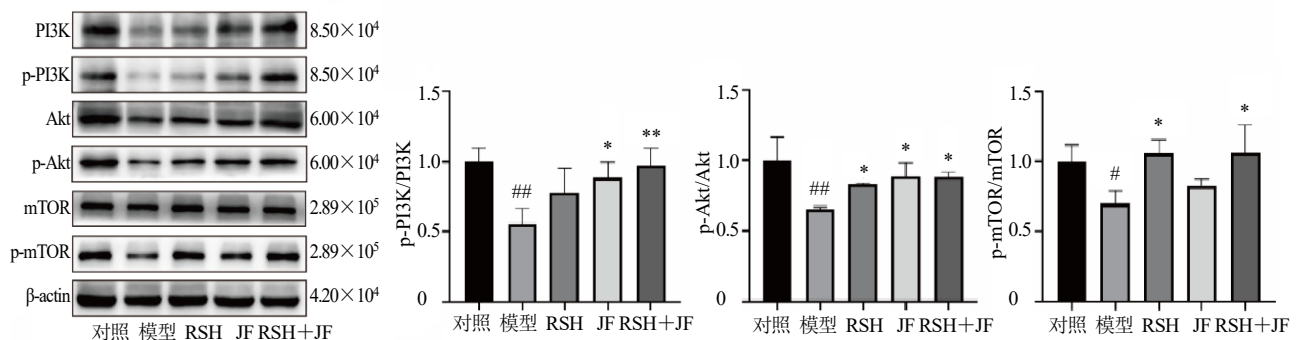


图 11 各组小鼠睾丸组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Expressions of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related proteins in testicular tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

较, 人参固本口服液高剂量组 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), 荆防颗粒组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), 人参固本口服液联合荆防颗粒组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

男性不育症是一种多因素综合征, 通常表现为畸形精子症、少精症和/或弱精子症、无精子症, 但其发病原因尚不明确, 多与精子发生障碍、内分泌失调、精索静脉曲张和梗阻、熬夜吸烟酗酒等因素相关^[15-18]。本研究采用奥硝唑建立 OAS 小鼠模型, OAS 可以抑制附睾尾精子增殖, 并使睾丸、附睾组织受损, 性激素水平紊乱, 最终建立相似的“病证结合”动物模型^[19-20]。结果显示, 人参固本口服液、荆防颗粒以及两药协同作用可显著改善奥硝唑所致睾丸、附睾脏器指数降低, 提高精子数量及精子活动指标, 回调血清中性激素 FSH、LH、 E_2 和 T 水平, 改善睾丸、附睾组织病理损伤状态等。

睾丸组织主要由支持细胞和间充质细胞组成^[21], 前者为睾丸分化的组织中心, 调控生殖细胞的分化和存活, 促进精子生成; 后者是雄激素的主要来源, 驱动与维持第二性征。二者协同创造精子生成与发育的有利微环境^[22]。睾丸组织的损伤会直接造成精子生成障碍^[23]。本研究观察到奥硝唑可对小鼠睾丸、附睾组织造成细胞结构改变, 各级生精细胞排列紊乱甚至消失, 给药治疗后显著减轻了睾丸、附睾组织的病理性改变, 改善 OAS 模型小鼠中精子数量和活动指标, 促进睾丸精子在附睾内运输过程中达到成熟, 有利于精子的储存与保护^[24]。

下丘脑-垂体-睾丸轴通过 LH 刺激睾丸间质细胞分泌 T, 与 FSH 协同作用于生精小管, 共同调控精子的发生过程^[25]。而当精子发生障碍时, 造成生殖内分泌水平紊乱, 使得 T、雌激素水平降低, 下丘脑/垂体负反馈减弱, 通过增加 LH、FSH 的分泌刺激 T 的生成, 维持体内激素水平的平衡^[26-27]。本研究中人参固本口服液联合荆防颗粒可显著通过降低 FSH 和 LH 水平、升高 T 和 E_2 水平, 改善生殖激素分泌失衡, 维持生精细胞正常分化。精子细胞膜富含多不饱和脂肪酸, 极易受到脂质过氧化 (lipid peroxidation, LPO) 损伤, 随后细胞内三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的快速丢失使得精子活力降低、精子形态缺陷增加^[28]。GSH-Px、SOD

等酶因子是最重要的保护性抗氧化系统之一^[29]。GSH-Px 的活性位点由硒代半胱氨酸组成, 负责还原过氧化氢和有机过氧化物^[30]。SOD 是催化超氧阴离子歧化反应的金属酶, 主要起保护质膜成分多不饱和脂肪酸和 DNA 片段化作用^[31]。结果表明, 给药干预后 GSH-Px 活性增强, SOD 虽无显著差异, 但与模型组相比 SOD 活性呈现轻微上升趋势, 提示给药后对氧化应激状态具有一定的改善潜力, 可能通过清除过量的活性氧, 保护精子细胞膜免受氧化损伤, 维持精子活力和形态完整性。

在此基础上, 本研究进一步采用蛋白质组学分析人参固本口服液联合荆防颗粒减轻奥硝唑所致 OAS 的分子机制。根据文献研究^[12]表明, 单独给予高剂量人参固本口服液 (20 mL/kg, 2 次/d, 连续给药 30 d), 各项指标均在正常范围, 无毒性反应, 证实了人参固本口服液的安全性。同时基于睾丸 HE 病理结果, 与模型组比较, 人参固本口服液高剂量组睾丸 Johnsen 评分显著升高, 而人参固本口服液低剂量组、人参固本口服液中剂量组虽呈现恢复趋势, 但无统计学意义, 提示人参固本口服液高剂量组对睾丸组织损伤修复和精子发生恢复具有更显著的保护作用, 因此将人参固本口服液高剂量组作为后续机制研究的干预剂量, 以深入探讨人参固本口服液促进睾丸生精作用的分子机制。对各组间 138 个差异表达蛋白进行富集分析, 显著回调的差异表达蛋白主要集中在氨基酸代谢、碳代谢、脂肪酸代谢、PPAR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等通路。代谢组学显示, 氨基酸代谢失衡与 OAS 的发生密切相关, 可造成能量受阻、氧化应激与激素失衡。其中与精子获能、顶体反应、数量下降及 ATP 生成不足导致精子运动能力下降的相关代谢物包括精氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等; 与保护精子细胞免受病理水平的活性氧影响的相关代谢物包括半胱氨酸、谷氨酰胺和蛋氨酸等; 与调控下丘脑-垂体-性腺轴功能的相关代谢物包括苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等^[32-33]。碳代谢和脂肪酸代谢在精子能量供给、维持精子膜结构完整性和流动性等方面发挥重要作用。当糖酵解与三羧酸循环受阻时, 会导致 ATP 供能不足、精子运动能力下降; 当多不饱和脂肪酸显著减少、饱和脂肪酸水平显著增加时, 会干扰精子膜内磷脂代谢, 从而影响精子膜流动性, 导致精子活力下降^[34]。PPAR 属于核激素受体超级家族的配体激活转录因子, 包括 PPAR α 、PPAR β 和

PPAR γ 3 种亚型。研究表明, PPAR α 可能通过促进脂质储存动员和改变磷脂结构来影响精子质量, PPAR β 可调控脂肪酸分解代谢和能量稳态, PPAR γ 可调节葡萄糖、脂质驱动的精子能量产生^[35]。

睾丸中的精原细胞增殖受 PI3K/Akt/mTOR 通路介导^[36]。Western blotting 结果证实, 人参固本口服液联合荆防颗粒可能通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路发挥作用。PI3K 是一种脂质激酶, PI3K 激活后, 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP3) 募集到细胞膜, 从而激活 Akt, 而 Akt 是调节生精小管中各个阶段外质特化结构动态的关键分子, 其活性的增加可促进精原细胞分化, 当其进入细胞质并磷酸化各种下游底物时, 可调节不同细胞功能^[37-38]。mTOR 可通过 mTORC1 和 mTORC2 2 种蛋白质复合物来调节多种细胞过程, 参与精原细胞的能量和蛋白质的合成, 其中 mTORC1 维持男性生殖健康, mTORC2 维持血睾屏障完整性, 当 mTOR 功能受损则会影响精子的发生, 从而导致 OAS^[39]。Li 等^[40]发现强精片干预 OAS 可通过逆转奥硝唑降低 PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的相对表达来发挥作用。本研究结果表明, 人参固本口服液联合荆防颗粒可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 回调性激素水平, 改善睾丸、附睾组织的病理变化, 从而改善精子生成环境及精子质量。

综上, 人参固本口服液联合荆防颗粒可改善奥硝唑诱导的 OAS 模型, 结合蛋白质组学, 其机制可能为通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 调节下丘脑-垂体-睾丸轴功能, 维持精子生成微环境稳态。然而, 本研究未进行代谢组学分析, 限制了将蛋白富集通路代谢物水平动态调控相结合, 未来应通过整合代谢组学深入探讨, 以期明确蛋白质组学富集出的代谢通路在功能及代谢物水平上的真实性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁尚杰, 李红晓, 陈霞, 等. 基于文献数据挖掘针药结合治疗少弱精症临床规律 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2797-2800.
- [2] 王莉, 姜珊珊, 王亚玲, 等. 少弱精子症中医研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(2): 296-298.
- [3] 王红全, 裴鲜玲, 张爱英, 等. 少弱精症中医辨治思路浅析 [J]. 新中医, 2011, 43(7): 159.
- [4] Shepherd A, Brunckhorst O, Ahmed K, et al. Botanicals in health and disease of the testis and male fertility: A scoping review [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154398.
- [5] 王永超, 赵慧玲, 宋蕾, 等. 基于肠道菌群探讨五子衍宗丸对少弱精子症的作用 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(3): 219-222.
- [6] Zhou S H, Deng Y F, Weng Z W, et al. Traditional Chinese medicine as a remedy for male infertility: A review [J]. *World J Mens Health*, 2019, 37(2): 175-185.
- [7] 倪良玉, 杨朝旭. 人参固本口服液治疗男性弱精子症效果分析 [J]. 中外医学研究, 2022, 20(29): 128-131.
- [8] 吕婧, 高燕, 赵渤年, 等. 荆防颗粒增强免疫作用机制研究 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5541-5550.
- [9] 杨云博, 陈玉民, 李小鹏, 等. 荆防颗粒对雌性小鼠性激素的影响 [J]. 世界中医药, 2024, 19(6): 788-792.
- [10] 张乐乐, 高子强, 汪菲菲, 等. 荆芥提取物的抗氧化活性及成分研究 [J]. 淮北师范大学学报: 自然科学版, 2022, 43(2): 49-55.
- [11] 毛明江, 李秋颖, 郑燕飞, 等. 川芎-防风药对通过抗氧化改善大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 中成药, 2021, 43(6): 1632-1635.
- [12] Feng Q, Li G Y, Xia W K, et al. The anti-aging effects of Renshen Guben on thyrotoxicosis mice: Improving immunosenescence, hypoproteinemia, lipotoxicity, and intestinal flora [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 983501.
- [13] 陈娜娜, 刘怡, 张迪, 等. 白及多糖对生殖氧化损伤模型小鼠的保护作用 [J]. 遵义医科大学学报, 2024, 47(10): 964-970.
- [14] Johnsen S G. Testicular biopsy score count: A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males [J]. *Hormones*, 1970, 1(1): 2-25.
- [15] Zhang X Y, Zhu T Y, Zhang Q R, et al. Progress in the genetic studies of spermatogenesis abnormalities [J]. *Yi Chuan*, 2021, 43(5): 473-486.
- [16] Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S. Genetics of human male infertility [J]. *Singapore Med J*, 2009, 50(4): 336-347.
- [17] Bachir B G, Jarvi K. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility [J]. *Urol Clin North Am*, 2014, 41(1): 67-81.
- [18] Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, et al. Some of the factors involved in male infertility: A prospective review [J]. *Int J Gen Med*, 2020, 13: 29-41.
- [19] Bone W, Yeung C H, Skupin R, et al. Toxicity of ornidazole and its analogues to rat spermatozoa as reflected in motility parameters [J]. *Int J Androl*, 1997, 20(6): 347-355.
- [20] 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.
- [21] Huang N W, Li H S, Sun L J, *et al.* Guijiajiao-Lujiaojiao synergistically promote spermatogenesis in *Tripterygium wilfordii* polyglycoside-induced oligoasthenozoospermia rats via PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Am J Mens Health*, 2024, 18(6): 15579883241293941.
- [22] Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: Origins, differentiation, and assembly of the component cell populations [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(22): 2409-2426.
- [23] Calvel P, Rolland A D, Jégou B, *et al.* Testicular postgenomics: Targeting the regulation of spermatogenesis [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2010, 365(1546): 1481-1500.
- [24] Cosentino M J, Cockett A T. Structure and function of the epididymis [J]. *Urol Res*, 1986, 14(5): 229-240.
- [25] O'Shaughnessy P J, Verhoeven G, De Gendt K, *et al.* Direct action through the Sertoli cells is essential for androgen stimulation of spermatogenesis [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(5): 2343-2348.
- [26] Bhasin S, Brito J P, Cunningham G R, *et al.* Testosterone therapy in men with hypogonadism: An endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(5): 1715-1744.
- [27] 张国巍. 硫辛酸通过调控能量代谢和氧化应激改善少弱精子症大鼠生殖功能的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [28] Bansal A K, Bilaspuri G S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions [J]. *Vet Med Int*, 2010, 2010: 686137.
- [29] Fallah F, Colagar A H, Saleh H A, *et al.* Variation of the genes encoding antioxidant enzymes SOD2 (rs4880), GPX1 (rs1050450), and CAT (rs1001179) and susceptibility to male infertility: A genetic association study and in silico analysis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(36): 86412-86424.
- [30] Gałęcka E, Jacewicz R, Mrowicka M, *et al.* Antioxidative enzymes: Structure, properties, functions [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2008, 25(147): 266-268.
- [31] De Luca M N, Colone M, Gambioli R, *et al.* Oxidative stress and male fertility: Role of antioxidants and inositols [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1283.
- [32] Chen B X, Ma Q, Ma H F, *et al.* Effect and mechanism of modified Yougui Power on Simmental bulls with oligoasthenozoospermia based on targeted amino acid metabolism [J]. *Front Vet Sci*, 2025, 12: 1595145.
- [33] Hosseini E, Amirjannati N, Henkel R, *et al.* Targeted amino acids profiling of human seminal plasma from teratozoospermia patients using LC-MS/MS [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(11): 3285-3295.
- [34] 吴雅茹, 张洁. 男性精浆代谢组学的研究现状与进展 [J]. *生命科学*, 2023, 35(11): 1434-1441.
- [35] Mousavi M S, Shahverdi A, Drevet J, *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) levels in spermatozoa of normozoospermic and asthenozoospermic men [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2019, 65(6): 409-419.
- [36] Song X, Li X X, Zhang Y X, *et al.* Leptin promotes proliferation of human undifferentiated spermatogonia by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2024, 91(1): e13811.
- [37] Chang J H, Chou C H, Wu J C, *et al.* LCRMP-1 is required for spermatogenesis and stabilises spermatid F-actin organization via the PI3K-Akt pathway [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 389.
- [38] Zhang Y J, Qian J C, Jiang M M, *et al.* LTe2 induces cell apoptosis in multiple myeloma by suppressing AKT phosphorylation at Thr308 and Ser473 [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1269670.
- [39] Cao J, Lin Z B, Tong M H, *et al.* Mechanistic target of rapamycin kinase (mTOR) is required for spermatogonial proliferation and differentiation in mice [J]. *Asian J Androl*, 2020, 22(2): 169-176.
- [40] Li G S, Gao D W, Chang D G, *et al.* Qiangjing Tablets modulate oxidative stress and endoplasmic reticulum stress through the PI3K/Akt/NRF-2 signaling axis and regulate gut microbiota in ornidazole-induced asthenozoospermia rats [J]. *J Tradit Complementary Med*, (2025-03-10) [2025-8-20] <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2025.03.003>.

[责任编辑 李亚楠]