

·方药研究·

本文引用:周海亮,周兴,李波男,周青,何清湖.雄蚕益肾方对肾阳虚大鼠睾丸抗氧化作用及睾丸 Bcl-2、Cyt-c 蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(12):1435-1439.

## 雄蚕益肾方对肾阳虚大鼠睾丸抗氧化作用及睾丸 Bcl-2、Cyt-c 蛋白表达的影响

周海亮<sup>1</sup>,周兴<sup>1\*</sup>,李波男<sup>1</sup>,周青<sup>2</sup>,何清湖<sup>2</sup>

(1.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

**[摘要]** **目的** 研究雄蚕益肾方对肾阳虚大鼠抗氧化作用及睾丸 Bcl-2、Cyt-c 蛋白表达的影响。**方法** 取雄性 SD 大鼠 40 只,随机分成正常组 10 只、造模组 30 只。造模组予 200 mg/kg 腺嘌呤混悬液造肾阳虚模型成功后,随机分为模型组、左卡尼汀组、雄蚕益肾组,正常组与模型组给予生理盐水灌胃,其他组分别给予相应药物连续灌胃,4 mL/d。4 周后检测睾丸组织 SOD、MDA、GSH-Px 及血清性激素相关指标,免疫组化法测定睾丸 Bcl-2、Cyt-c 蛋白表达情况,取两侧睾丸做常规病理切片分析。**结果** 与模型组相比,雄蚕益肾方组睾丸 GSH-Px、SOD、血清 T、E<sub>2</sub> 浓度显著升高( $P<0.01$ ),睾丸 MDA 浓度明显降低( $P<0.05$ ),雄蚕益肾方组睾丸 Bcl-2 蛋白阳性表达率明显升高( $P<0.01$ ),Cyt-c 蛋白阳性表达率明显降低( $P<0.01$ );与模型组相比,雄蚕益肾方组睾丸生精上皮尚比较完整,组织内生精小管内可见精母细胞,生精小管内仍有大量精子生成,管腔可见大量精子。**结论** 雄蚕益肾方能提高肾阳虚大鼠睾丸组织抗氧化作用,调节生精细胞凋亡,这可能是其调节生精功能的机制之一。

**[关键词]** 雄蚕益肾方;肾阳虚;抗氧化作用;生精功能

**[中图分类号]** R285.5;R698

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.12.003

### Effects of Xiongcan Yishen Formula on Testicular Antioxidant Activity and Expression of Testicular Bcl-2 and Cyt-c Protein in Rats with Kidney-Yang Deficiency

ZHOU Hailiang<sup>1</sup>, ZHOU Xing<sup>1\*</sup>, LI Bonan<sup>1</sup>, ZHOU Qing<sup>2</sup>, HE Qinghu<sup>2</sup>

(1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of Xiongcan Yishen formula on antioxidant effect and expression of testicular bcl-2 and Cyt-c protein in rats with kidney-Yang deficiency. **Methods** A total of 40 male SD rats were randomly divided into a normal group ( $n=10$ ) and a model group ( $n=30$ ). After successful modeling of kidney-Yang deficiency model by giving 200 mg/kg adenine suspension to the model group, and they were randomly divided into the model group, levocarnitine group and Xiongcan Yishen formula group. The normal group and the model group were given normal saline by gavage, and the other groups were given continuous gavage with corresponding drugs, 4 mL/d. After 4 weeks, SOD, MDA, gsh-px and serum sex hormone related indicators in testicular tissue were detected, and the expressions of Bcl-2 and Cyt-c proteins in testicle were determined by immunohistochemistry. Routine pathological sections of both sides of testicle were taken for analysis. **Results** Compared with the model group, GSH-Px, SOD, serum T and E<sub>2</sub> concentrations were significantly increased in the Xiongcan Yishen formula group ( $P<0.01$ ), and MDA concentrations were significantly decreased ( $P<0.05$ ). The positive expressions

**[收稿日期]** 2019-05-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81673984,81774324);湖南省自然科学基金资助(2018JJ3402);湖南省教育厅优秀青年项目(16B200);长沙市杰出创新青年人才项目(kq1802015);湖南省高层次卫生人才 225 工程医学学科骨干人才培养对象(湘卫函[2019]196 号);湖南创新型省份建设专项经费资助“湖湘青年英才”支持计划(2019RS2041)。

**[作者简介]** 周海亮,男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合男科学。

**[通讯作者]** \*周兴,男,教授,E-mail:27752770@qq.com。

of Bcl-2 proteins were significantly increased ( $P<0.01$ ), and the positive expression rate of Cyt-c protein was significantly reduced in the Xiongcan Yishen formula group ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the spermatogenic epithelium of the testis in the Xiongcan Yishen formula group was relatively complete. Spermatogonial cells could be seen in the spermatogonial tubules in the tissue, and there were still a lot of spermatogenesis in the spermatogonial tubules, and a lot of spermatozoa could be seen in the lumen. **Conclusion** Xiongcan Yishen formula can improve the antioxidant effect of the testicular tissue and regulate the apoptosis of spermatogenic cells in rats with kidney-Yang deficiency, which may be one of the mechanisms of regulating spermatogenic function.

[**Keywords**] Xiongcan Yishen Formula; Kidney-Yang deficiency; antioxidation; sperm production function

活性氧(ROS)是有氧代谢的活性副产物,在急性或慢性炎症的情况下,抗氧化系统平衡失衡导致ROS生成增加,最终导致氧化应激<sup>[1]</sup>。当机体发生氧化应激反应时,过量的ROS就会影响精子DNA结构,使抗氧化酶基因表达减少,抗氧化作用减弱,并产生细胞脂质过氧化物丙二醛,从而诱导睾丸组织超微结构损伤。越来越多实验研究证明,线粒体是细胞凋亡的调控中心<sup>[2]</sup>,即生精细胞线粒体膜脂质和蛋白受到破坏,促使生精细胞凋亡,影响男性生精功能。雄蚕益肾方为湖南中医药大学第一附属医院男科验方,能温肾填精,为阴阳双补之剂。本课题前期研究已证明,雄蚕益肾方可促进大鼠雄性激素的分泌,且效果优于常规的睾酮补充治疗,在一定程度上有类似睾酮的功能,能作用于下丘脑-垂体-性腺轴(HPG),对雄性激素的分泌产生良性影响,并且通过降低睾丸间质细胞(Leydig)线粒体水肿及细胞自噬,改善其睾丸组织病理变化和睾丸间质细胞超微结构而发挥作用<sup>[3-4]</sup>。本研究采用经典肾阳虚造模法腺嘌呤溶液灌胃大鼠诱导肾阳虚模型,以雄蚕益肾方为研究对象,系统研究该方对肾阳虚模型大鼠睾丸抗氧化作用及调节生精功能分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及材料

选取SPF级雄性SD大鼠,8周龄,体质量( $220\pm 20$ )g,共50只,(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物使用许可证号:SCXK(湘)2016-0002,质量合格证编号:43004700052345。雄蚕益肾方(雄蚕蛾30g,淫羊藿15g,熟地黄15g,枸杞子15g,白芍10g,刺蒺藜15g),由湖南中医药大学第一附属医院天江颗粒药房购买颗粒配方,加蒸馏水溶解,浓缩成生药浓度为1g/mL药液。左卡尼汀口服溶液,规格10mL/g,(批号:180912),东北制药总厂;腺嘌呤(批号:131203),上海伯奥生物技术有限公司。

### 1.2 主要仪器及试剂

352型Elisa酶标仪,芬兰;AC8洗板机,芬兰;TG16W微量高速离心机,湖南迈达仪器有限公司;GNP-9080隔水式恒温培养箱,上海恒勤仪器设备有限公司。JJ12-J脱水机,JB-P5包埋机,JB-L5冻台,均来自武汉俊杰电子有限公司;RM2016病理切片仪,上海徕卡仪器有限公司;KD-P组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设;Nikon EclipseE100正置光学显微镜,日本尼康;Nikon DS-U3成像系统,日本尼康。

睾酮(Testosterone,T)ELISA试剂盒(货号:MM-0577R2)、雌二醇(Estradiol,E<sub>2</sub>)ELISA试剂盒(货号:MM-0575R2)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)ELISA试剂盒(货号:MM-0386R2)、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)ELISA试剂盒(货号:MM-0385R2)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-PX)ELISA试剂盒(货号:MM-20251R2)、17-羟皮质类固醇(17-OHCS)ELISA试剂盒(批号:14020812),以上试剂盒均来自江苏晶美生物科技有限公司。Bcl-2抗体(货号:OM123485),上海斯信生物科技有限公司,Cyt-c抗体(货号:OM241170),上海斯信生物科技有限公司。苏木素染液套装(货号:G1004),武汉谷歌生物科技有限公司;二甲苯(批号:10023418),国药集团化学试剂有限公司;中性树胶(货号:G1403),国药集团化学试剂有限公司;EDTA(pH 8.0)抗原修复液(货号:G1206);EDTA(pH 9.0)抗原修复液(货号:G1203);牛血清白蛋白(BSA)(货号:G5001),均来自谷歌生物;正常兔血清(货号:AR1010),博士德公司;组化试剂盒DAB显色剂(货号:K5007),DAKO公司。

### 1.3 动物造模、分组及干预

予200mg/kg腺嘌呤混悬液灌胃,每天1次,连续灌胃21d造模肾阳虚模型<sup>[5]</sup>。造模完成后,收集24h尿液,控制温度在4℃左右,以2000r/min离心5min,取上清液;采用ELISA法检测尿17-羟皮

质类固醇(17-OHCS)含量可作为肾阳虚证模型大鼠的客观指标<sup>[6]</sup>。参考文献[5]统计正常组 10 只大鼠尿 17-OHCS 含量为 45.58  $\mu\text{g/L}$ , 以此为切点值,再结合大鼠的症状体征:畏寒、四肢发凉、小便清长量多、大便稀溏、活动减少、体毛疏松等肾阳虚证症状;检测模型组大鼠 24 h 尿 17-OHCS 含量低于切点值 45.58  $\mu\text{g/L}$ ,合并有肾阳虚证症状则可认为造模成功。

按随机数字表法,从 40 只大鼠随机抽取 10 只为正常对照组大鼠,其余大鼠按上述造模方法造模成功后,按体质量不同,根据随机数字表将 30 只模型大鼠分为 3 组:左卡尼汀组、雄蚕益肾方组及模型组。于造模成功后的第 2 天开始分别给予相应药物连续灌胃 28 d,大鼠给药量按人与大鼠体表面积等效换算以确定灌胃剂量<sup>[7]</sup>,以成人(70 kg)和大鼠(200 g)等效系数(6.17)计算各组动物相应每日给药剂量,雄蚕益肾方组 8.8 g/kg、左卡尼汀组 0.2 g/kg,灌胃 1 次/d。模型组、正常组予以 0.9%氯化钠溶液连续灌胃,灌胃量为 4 mL/d。各组大鼠每周测量体质量以调整给药剂量,连续给药 4 周。在给药第 28 天后,以 10%的水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠,腹主动脉采血,采血后摘取大鼠双侧睾丸组织。

#### 1.4 血清性激素 T、E<sub>2</sub> 及一侧睾丸组织均浆 SOD、MDA、GSH-Px 含量测定

取全血标本于室温下静置 2 h,1 000 r/min 离心 20 min,取上清待测。取单侧睾丸组织剪碎,用 4  $^{\circ}\text{C}$ 、0.9%的生理盐水在冰水浴中制成 10%的组织匀浆,将匀浆 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。严格按各标本试剂盒说明书进行检测(各试剂盒 Elisa 酶标仪检测单波长为 450 nm)。

#### 1.5 免疫组化法检测睾丸组织 Bcl-2 和 CytC 蛋白表达水平

取睾丸组织,将固定的标本石蜡切片脱蜡,蒸馏水洗,然后将组织切片置于柠檬酸抗原修复缓冲液(pH 6.0)中进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶后在组化圈内滴加 3%BSA 室温封闭 30 min。然后甩掉封闭液,滴加 PBS 按一定比例配好的一抗(一抗是山羊来源的用兔血清封闭,其他来源的用 BSA 封闭),切片稍甩干后继续滴加与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)覆盖组织;随即滴加 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,终止显色后用苏木素复染 3 min 左右,最后脱水封片,用显微镜镜检,图像采集分析。免疫组化平均光密度值(Mean-

Density)分析方法:应用 Image-ProPlus 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,对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累积光密度值(IOD)以及组织的像素面积(AREA)。并求出平均光密度值 IOD/AREA(Mean Density)。

#### 1.6 统计学分析

计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 SPSS 21.0 软件进行数据整理、筛选与统计分析,经正态性检验及方差齐性检验后,若符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析;若不符合正态分布,则采用非参数检验。其中  $P<0.05$  具有统计学意义, $P<0.01$  则具有显著的统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠症状体征观察

除正常组外,其它各组大鼠均于造模后逐渐活动减少,反应迟钝神情困顿,胡须下垂畏寒倦卧,体毛疏松泛黄失去光泽,饮水量减少,便溏多尿等肾精亏虚表现。造模完成后,干预 2 周左右实验组大鼠上述症状体征开始恢复,雄蚕益肾方组最明显,模型组无明显变化。

### 2.2 各组大鼠睾丸组织 MDA、SOD、GSH-Px 浓度比较

与正常组相比,模型组 MDA 浓度显著升高,而 SOD、GSH-Px 浓度明显降低,差异性有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组相比,雄蚕益肾方组 SOD、GSH-Px 浓度显著升高( $P<0.01$ ),MDA 浓度明显降低( $P<0.01$ ),左卡尼汀组与模型组相比 SOD 浓度升高( $P<0.05$ ),GSH-Px 浓度明显升高,MDA 浓度降低( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠睾丸 MDA、SOD、GSH-Px 浓度的比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	SOD/( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	GSH-PX/( $\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	MDA/( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
正常组	53.62 $\pm$ 4.87	52.52 $\pm$ 3.08	8.07 $\pm$ 0.68
模型组	47.10 $\pm$ 3.18**	45.36 $\pm$ 3.05**	9.48 $\pm$ 0.99**
左卡尼汀组	51.60 $\pm$ 4.83 <sup>#</sup>	51.68 $\pm$ 3.89 <sup>#</sup>	8.55 $\pm$ 0.63 <sup>#</sup>
雄蚕益肾方组	53.21 $\pm$ 3.16 <sup>##</sup>	51.62 $\pm$ 3.58 <sup>##</sup>	8.30 $\pm$ 0.81 <sup>##</sup>
F 值	5.082	9.044	4.976
P 值	0.005	0.000	0.005

注:与正常组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,## $P<0.05$ ,### $P<0.01$

### 2.3 各实验组大鼠血清 T、E<sub>2</sub> 浓度水平比较

与正常组相比,模型组血清 T、E<sub>2</sub> 浓度显著降低( $P<0.01$ ),T/E<sub>2</sub> 值明显下降( $P<0.05$ );与模型组相比,雄蚕益肾方组 T 浓度显著升高( $P<0.01$ ),左卡尼

汀组 T 浓度明显升高 ( $P<0.05$ ), 差异均有统计学意义。与模型组相比, 左卡尼汀组、雄蚕益肾方组  $E_2$  浓度升高 ( $P<0.01$ ), 差异性均有统计学意义。与模型组相比, 雄蚕益肾方组、左卡尼汀组  $T/E_2$  值明显上升 ( $P<0.01$ ), 如表 2 所示。

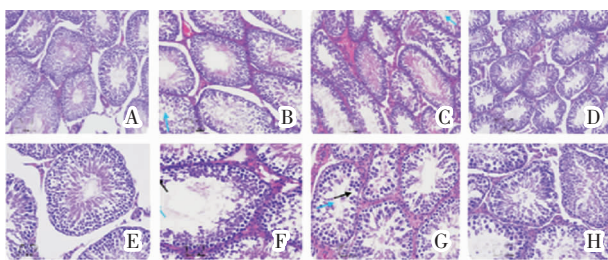
表 2 各组大鼠血清 T、 $E_2$  浓度水平的比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	T/(nmol·L <sup>-1</sup> )	$E_2$ /(ng·L <sup>-1</sup> )	T/ $E_2$
正常组	177.95±16.90	98.25±9.26	1.81±0.12
模型组	137.40±18.15**	84.36±8.75**	1.62±0.15*
左卡尼汀组	172.53±26.59 <sup>#</sup>	94.42±11.57 <sup>##</sup>	1.84±0.27 <sup>##</sup>
雄蚕益肾方组	176.63±22.07 <sup>##</sup>	96.10±13.18 <sup>##</sup>	1.85±0.22 <sup>##</sup>
F 值	8.231	3.239	2.972
P 值	0.000	0.033	0.045

注: 与正常组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

## 2.4 睾丸常规病理切片

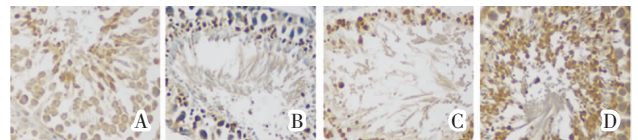
正常组睾丸组织切片结果, 睾丸组织中丸生精上皮完整, 生精小管内可见精原细胞有序排列在小管边缘; 各级精母细胞逐层排列, 管腔内可见大量精细胞; 组织形态结构正常, 未见明显病理变化, 见图 1A; 模型组睾丸组织切片结果, 睾丸组织内可见生精上皮层次明显减少, 结构紊乱, 部分生精小管间隙增大, 管腔内精母细胞数量减少, 细胞排列疏松, 如黑色箭头所示; 组织内生精小管生精障碍, 生成精细胞数量显著减少, 如蓝色箭头所示, 见图 1B; 左卡尼汀组睾丸组织切片结果, 睾丸组织内部分生精小管内可见有精母细胞数量, 但细胞排列疏松; 组织内部分生精小管生精障碍, 生成精细胞数量减少, 如蓝色箭头所示, 见图 1C; 雄蚕益肾方组睾丸组织切片结果与正常组相似, 生精上皮尚比较完整, 虽然各级生精细胞排列稍为紊乱, 组织内生精小管内可见精母细胞, 生精小管内仍有大量精子生成, 管腔可见大量精子, 而绝对数量均少于正常组, 见图 1D。



注: A、E 正常组; B、F 模型组; C、G 左卡尼汀组; D、H 雄蚕益肾方组  
图 1 各组大鼠睾丸组织光镜图 (HE, 上一排×100, 下一排×200)

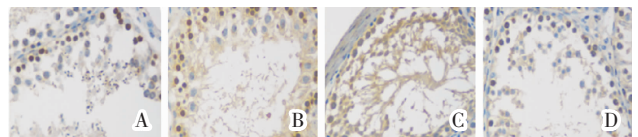
## 2.5 各组大鼠睾丸组织 Bcl-2、Cyt-c 蛋白表达水平比较

与正常组相比, 模型组睾丸 Bcl-2 蛋白阳性表达显著降低 ( $P<0.01$ ), Cyt-c 蛋白阳性表达显著升高 ( $P<0.01$ ); 雄蚕益肾方组、左卡尼汀组与模型组相比 Bcl-2 蛋白阳性表达显著升高 ( $P<0.01$ ), Cyt-c 蛋白阳性表达明显降低 ( $P<0.01$ ), 如表 3 所示。与模型组相比, 雄蚕益肾组大鼠精母细胞、精子细胞及精子中有大量 Bcl-2 阳性细胞, 如图 2, Cyt-c 蛋白阳性表达减少, 如图 3。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 左卡尼汀组; D. 雄蚕益肾方组

图 2 各组大鼠睾丸 Bcl-2 蛋白表达水平 (免疫组化, ×400)



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 左卡尼汀组; D. 雄蚕益肾方组

图 3 各组大鼠睾丸 Cyt-c 蛋白表达水平 (免疫组化, ×400)

表 3 各组大鼠睾丸 Bcl-2、Cyt-c 表达情况 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	Bcl-2(IOD/AREA)	Cyt-c(IOD/AREA)
正常组	0.0514±0.0099	0.0190±0.0042
模型组	0.0242±0.0060**	0.0462±0.0132**
左卡尼汀组	0.0446±0.0073 <sup>##</sup>	0.0196±0.0029 <sup>##</sup>
雄蚕益肾方组	0.0511±0.0083 <sup>##</sup>	0.0205±0.0068 <sup>##</sup>
F 值	25.702	28.645
P 值	0.000	0.000

注: 与正常组相比, \*\* $P<0.01$ ; 与模型组相比, ## $P<0.01$

## 3 讨论

目前研究表明, 选用腺嘌呤造模肾阳虚模雄性大鼠型, 可以诱导睾丸超微结构发生氧化损伤<sup>[5]</sup>, 同时出现神情困顿, 胡须下垂畏寒倦卧, 体毛疏松泛黄失去光泽, 食量减少, 便溏多尿, 尾巴湿冷等中医学中的肾阳虚表现, 与人类肾阳虚证表现相似, 故选用腺嘌呤造模肾阳虚证大鼠。

睾丸组织内适量自由基的产生对其生理活动起着积极作用, 但若 ROS 生成过量不能及时清除, 抗氧化系统失衡, 继而发生氧化应激反应, 作为自由基连锁反应的最终产物 MDA, 其含量直接反映了机体的脂质过氧化程度及自由基的代谢状况<sup>[8]</sup>。在生殖

系统中存在抗氧化系统抑制氧化应激,减少氧化损伤,主要有超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化(GSH-Px)等。其中 SOD 将超氧化物阴离子转化为  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,是维持机体抗氧化系统内最重要的抗氧化酶,GSH-Px 对活性氧和组织产生的  $H_2O_2$  有较强的清除能力,对保护生物膜结构和功能完整有重要作用<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,与模型组相比,雄蚕益肾方组 SOD、GSH-PX 浓度显著升高( $P<0.01$ ),MDA 浓度显著降低( $P<0.01$ ),表明雄蚕益肾方对睾丸组织具有抗氧化作用。

已有研究证实,氧化应激反应可诱导线粒体肿胀,从而使线粒体膜的通透性和完整性受到破坏,当线粒体接收到凋亡刺激信号,会通过释放内外膜间隙里的一些促凋亡因子,如 Cyt-c 等,进一步激活下游凋亡通路;Bcl-2 属于 Bcl-2 家族里面的抑凋亡蛋白,位于线粒体外膜上,可以通过抑制 Bax 孔道的形成抑制凋亡。实验表明,Cyt-c 从线粒体内、外膜间隙释放到胞浆是细胞凋亡的关键步骤,而在 Cyt-c 释放的过程中,线粒体外膜的 Bcl-2 家族蛋白和线粒体通透性转换起决定作用<sup>[10]</sup>。本研究发现,模型组睾丸生精细胞线粒体受到氧化损伤后 Bcl-2 蛋白阳性表达显著降低( $P<0.01$ ),Cyt-c 蛋白阳性表达显著升高( $P<0.01$ ),与上述研究结果一致;雄蚕益肾方组与模型组相比睾丸 Bcl-2 蛋白阳性表达显著升高( $P<0.01$ ),Cyt-c 蛋白阳性表达明显降低( $P<0.01$ ),说明雄蚕益肾方具有调节生精细胞凋亡的功效。本实验前期研究证明,T 合成过程中,睾丸间质细胞(Leydig)线粒体是最关键细胞器之一,雄蚕益肾方能提高大鼠血清 T 水平,显著降低 Leydig 细胞线粒体水肿发生<sup>[4]</sup>。有研究发现,一定量  $E_2$  可以抑制体外生精细胞的凋亡调节男性正常生殖功能,又被称为生精细胞的存活因子<sup>[11-12]</sup>。若血循环中的雌激素水平过高, $E_2$  可促进中枢神经系统阿片类物质合成,进而抑制放促性腺激素释放激素(GnRH)脉冲的幅度来抑制垂体促性腺激素的释放,减少 FSH 和 LH 合成<sup>[13-14]</sup>,影响 Leydig 合成 T,不利于精子的生成。本实验研究表明,与正常组相比,模型组血清 T、 $E_2$  浓度明显降低( $P<0.01$ ),T/ $E_2$  值下降( $P<0.05$ ),雄蚕益肾方组与模型组相比血清 T、 $E_2$  浓度明显升高( $P<0.01$ ),T/ $E_2$  值上升( $P<0.05$ ),说明雄蚕益肾方能提高血清 T 水平,并维持相对稳定高浓度的雌激素环境,有利于生精细胞成熟。

本实验研究表明,雄蚕益肾方能够通过提高睾丸组织的抗氧化作用,降低 Leydig 线粒体氧化损伤,调节生精细胞凋亡,提高睾酮水平,维持良好的生精环境,改善模型大鼠生精功能。

## 参考文献

- [1] LSAVRANO G, BALLA M, TZORTZOPOULOU A, et al. Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways[J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 34(3):298-307.
- [2] 朱玉山,陈 俭.线粒体与细胞凋亡调控[J].*生命科学*,2008,20(4):506-513.
- [3] 王孙亚,李望辉,宾东华,等.雄蚕益肾方联合小剂量睾酮补充治疗男性迟发性性腺功能减退症临床观察[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(8):903-907.
- [4] 周 兴,周 青,何清湖.雄蚕益肾方对迟发性性腺功能低下症大鼠睾丸组织病理变化与超微结构的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(6):586-590.
- [5] 童骏峰,徐志伟,杨元宵,等.腺嘌呤与氢化可的松所致大鼠肾阳虚证模型比较研究[J].*中华中医药杂志*,2015,30(11):3901-3904.
- [6] 曾庆成.交泰丸治疗心肾不交病症浅识[J].*湖北中医杂志*,1999,21(7):325.
- [7] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].*中国临床药理学与治疗学*,2004(9):1069-1072.
- [8] 高亚萍,李荣秀,高 羽,等.男性不育患者精浆和血清中锌铅镉丙二醛含量及超氧化物歧化酶活力的研究[J].*生殖医学杂志*,2012,21(1):43-46.
- [9] 宾 彬,陆海旺,王德胜,等.强精煎对实验大鼠附睾精子抗氧化作用的研究[J].*时珍国医国药*,2013,24(5):1056-1058.
- [10] 马 淇,刘 奎,陈 俭.活性氧、线粒体通透性转换与细胞凋亡[J].*生物物理学报*,2012,28(7):523-536.
- [11] SEREBROVSKA Z A, SEREBROVSKAYA T V, PYLE R L, et al. Transmission of male infertility and intracytoplasmic sperm injection(mini-review)[J]. *Fiziologichny Zhurnal*, 2006, 52(3):110-118.
- [12] BOUKARI K, CIAMOI M L, GUIOCHON-MANTEL A, et al. Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action[J]. *Human Reproduction*, 2007,22(7):1885-1892.
- [13] ULLOA-AGUIRRE A, MENDEZ J P, GONZALEZ-CASTILLO A, et al. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion to infusion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation[J]. *Clinical Endocrinology*, 2010, 29(1):17-28.
- [14] SPIJKSTRA J J, SPINDER T, GOOREN L J, et al. Effects of opiate receptor blockade on gonadotrophin secretion before and after administration of the oestrogen receptor blocker tamoxifen in eugonadal men[J]. *Clinical Endocrinology*, 2010, 29(2):179-188.