

# 益肾健脾方对少弱精子症小鼠模型睾丸生精功能和血清性激素水平的影响

丁劲 张耀圣 商建伟 李曰庆 柴立民 李宪瑞 盛文 韦翊 马健雄

**【摘要】 目的** 观察益肾健脾方对雷公藤多苷诱导少弱精子症小鼠模型睾丸组织、精液质量和血清性激素水平的影响,探讨益肾健脾方治疗少弱精子症可能的作用机制。**方法** 以雷公藤多苷诱导少弱精子症小鼠模型,随机平均分为正常组、模型组、左卡尼汀组、中药组(益肾健脾方低、高剂量组),每组 10 只,中药及左卡尼汀干预,睾丸组织病理切片、HE 染色,观察小鼠睾丸组织病理学,应用伟力精子测试仪检测小鼠精液质量,应用酶联免疫夹心法检测小鼠血清性激素水平。**结果** 左卡尼汀组、中药组的 A 级精子活力、总活力高于模型组( $P<0.05$ );左卡尼汀组低于中药低剂量组( $P<0.05$ );中药高剂量组与左卡尼汀组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。左卡尼汀组、中药组的精子总数高于模型组( $P<0.05$ );左卡尼汀组、中药低、高剂量组之间相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。模型组小鼠血清卵泡刺激素、黄体生成素水平高于正常组及各药物干预组( $P<0.05$ );各药物干预组高于模型组( $P<0.05$ );各药物干预组之间相比差异无统计学意义( $P>0.05$ );模型组及各干预组血清睾酮低于正常组( $P<0.05$ );模型组与各干预组之间相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 益肾健脾方可能通过调节小鼠血清性激素水平从而改善精液质量达到治疗少弱精子症的目的。

**【关键词】** 益肾健脾方; 少弱精子症; 雷公藤多苷; 精液质量; 血清性激素

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.11.007

**Influences of Yishen Jianpi recipe on spermatogenesis function and serum sex hormone level of the mice model of oligoasthenospermia** DING Jin, ZHANG Yao-sheng, SHANG Jian-wei, et al. Male Department of Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: SHANG Jian-wei, E-mail: sjw313@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the changes of the testis tissue, semen quality and serum sex hormone level in mice model of oligoasthenospermia induced by tripterygium glycosides, and discuss the possible intervention mechanism of Yishen Jianpi recipe to oligoasthenospermia. **Methods** Mice model of oligoasthenospermia was induced by tripterygium glycosides and the mice were randomly divided into normal group, model group, L-carnitine group, Chinese medicine group (Yishen Jianpi recipe low-dose and high-dose group) each group included 120 mice. Chinese medicine and L-carnitine were used for intervention, Pathological section HE staining and electron microscope were used to observe the pathological changes of tissue, Weili sperm tester were used to observe the semen quality, serum sex hormone levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** A level and total sperm motility in the

基金项目: 国家自然科学基金(81273756);北京中医药大学青年教师资助项目(2015-JYB-JBMS062)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院男科[丁劲(硕士研究生)、张耀圣、商建伟、李曰庆、李宪锐(硕士研究生)、盛文(硕士研究生)、马健雄(硕士研究生)], 中医内科教育部和北京市重点实验室[柴立民、韦翊(硕士研究生)]

作者简介: 丁劲(1988-), 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中西医结合防治男性疾病。E-mail: djdoctor203@163.com

通讯作者: 商建伟(1983-), 2015 级在读博士研究生, 主治医师。研究方向: 中西医结合治疗男性疾病。E-mail: sjw313@163.com

L-carnitine group and Chinese medicine group were higher than those in the model group ( $P < 0.05$ ); the L-carnitine group were lower than the low-dose group ( $P < 0.05$ ); compared with the L-carnitine group, the high-dose group was not significant difference ( $P > 0.05$ ). Sperm total in the L-carnitine group and Chinese medicine group were higher than that in the model group ( $P < 0.05$ ); among the L-carnitine group, low-dose and high-dose group, there were no statistical significance ( $P > 0.05$ ). Serum follicle stimulating hormone and lutein level in other group were higher than that in the normal group ( $P < 0.05$ ); intervention groups were higher than model group ( $P < 0.05$ ); there was no significance difference between model group and intervention groups ( $P > 0.05$ ). There was no significance difference in serum T level between the model group and intervention groups ( $P > 0.05$ ); the model group and intervention group were lower than that in the normal group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Yishen Jianpi recipe can regulate the level of serum sex hormone in mice model of oligoasthenospermia and affect the occurrence of sperm to achieve the goal of improving the quality of semen in the treatment of oligoasthenospermia.

**【Key words】** Yishen Jianpi recipe; Oligoasthenospermia; Tripterygium glycosides; Semen quality; Serum sex hormone level

据 WHO 最新统计<sup>[1]</sup>, 不孕不育问题中男性因素占到 40% ~ 50%, 其中高达 60% ~ 75% 为特发性, 少弱精子症是引起男性不育症的常见原因。雷公藤多苷(tripterygium glycosides, GTW) 为制备少弱精子症动物模型常用的造模药物<sup>[2]</sup>, 本研究采用 GTW 制备少弱精子症小鼠模型, 观察益肾健脾方对少弱精子症小鼠模型睾丸组织、精液质量和血清性激素水平的影响, 探讨益肾健脾方治疗少弱精子症可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

BALB/c 小鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 18 ~ 20 g, 共 60 只。由北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2012-0001。

### 1.2 药品和试剂

雷公藤多苷片, 10 mg/片, 安徽新陇海药业有限公司生产, 生产批号: 国药准字 Z34021048。左卡尼汀组给予东维力口服液(东北制药集团沈阳第一制药有限公司生产, 10 mL/瓶, 国药准字: H19990372, 生产批号: 0904031)。益肾健脾方: 菟丝子 30 g、枸杞子 30 g、五味子 10 g、党参 20 g、生黄芪 10 g、陈皮 10 g、柴胡 6 g、升麻 6 g、红花 6 g、川芎 6 g, 北京中医药大学东直门医院提供, 由北京康仁堂有限公司生产统一编号的免煎颗粒。FSH 试剂盒(德国 DRG: 1288), LH 试剂盒(德国 DRG: 1289), T 试剂盒(德国 IBL RE52041)。

### 1.3 仪器

Olympus BX60 光学显微镜, Olympus 公司生产; LKB-NOVA 型超薄切片机, 瑞士 DAKO 公司生产;

伟力精子测试仪 WLJU-9000。Multiskan MK3 酶标仪, Thermo Fisher Scientific 公司生产。

### 1.4 实验动物分组、造模及药物干预

取雄性 BALB/c 小鼠 60 只, 将其随机分为正常组、模型组、左卡尼汀组、中药组(益肾健脾方低、高剂量组), 每组 12 只; 除正常组外各组小鼠给予连续每天灌胃 GTW 4 周(40 mg/kg), 制备少弱精子症模型; 造模结束后, 左卡尼汀组、中药组每天分别给予灌胃东维力口服液(10 mL/kg)、益肾健脾方低、高剂量(分别为 1.35 mg/kg、2.70 mg/kg)共 4 周, 正常组、模型组给予连续每天灌胃等量蒸馏水(10 mL/kg); 末次给药后 30 分钟, 处理小鼠, 摘取睾丸、附睾组织后进行相关指标检测。在实验过程中, 造模 4 周后, 于正常组和模型组中分别随机选取 2 只小鼠检测造模; 因小鼠相互打斗, 正常组死亡两只小鼠, 中药低剂量组死亡一只小鼠, 剩余 53 只小鼠。

### 1.5 血清性激素水平检测

于末次给药后 30 分钟颈椎脱臼法处死小鼠, 眼球采血, 3000 rpm 离心 15 分钟, 收集小鼠血清, 按照试剂盒说明书操作采用酶联免疫夹心法检测小鼠血清中卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)水平。

### 1.6 睾丸组织病理、HE 染色

剥离小鼠睾丸, 每组随机选取睾丸 3 个, 经 4% 多聚甲醛固定过夜, 常规石蜡包埋, 切取 3 μm 石蜡组织切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 苏木素染色, 流动水冲洗后, 伊红染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下分析睾丸组

织病理,并拍照分析。

1.7 附睾精液质量检测

将摘取的左侧附睾放入盛有 1.0 mL 培养液的 EP 管中(提前已预热至 37 ℃),剪碎附睾,充分摇匀,使精子充分游离,于 37 ℃ 孵育 15 分钟。小心吸取上层液体,1 500 rpm 离心 5 分钟,沉淀物加入 1 mL BWB 高蛋白获能液,置于 3 ℃ 恒温孵育箱中获能 2 小时,采用 CASA 技术应用伟力彩色精子质量检测系统测定精子活力、总数等指标。

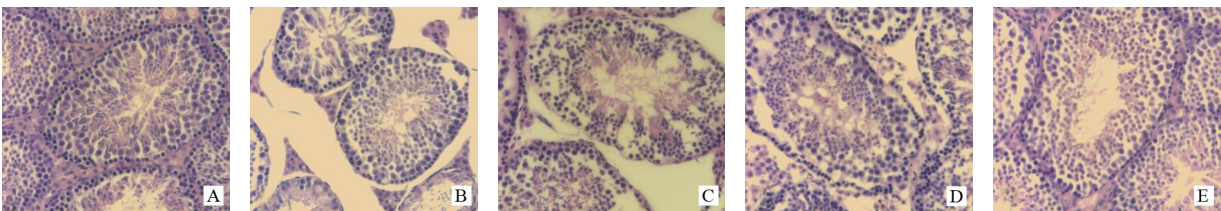
1.8 统计学处理

采用 SAS 8.2 统计学软件。计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,并经正态性检验和方差齐性检验。精子总数、血清性激素 FSH、LH、T 水平组间比较采用  $t$  检验;A 级精子活力、总活力组间采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾健脾方对少弱精子症小鼠睾丸组织病理学的影响

正常组小鼠睾丸曲细精管排列规则、整齐、紧密,其内可见各级生精细胞,包括大量精子及精子细胞。模型组小鼠睾丸曲细精管萎缩,排列不规则,官腔间隙较大,其内各级生精细胞排列紊乱、疏松,数量明显减少。药物干预后少数曲细精管内生精细胞减少,病变程度及范围较模型组显著减轻,中药高剂量组接近正常组。见图 1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 左卡尼汀组;D. 中药低剂量组;E. 中药高剂量组

图 1 各组小鼠睾丸组织病理切片(HE×400)

表 1 GTW 对少弱精子症小鼠模型精液质量的影响及益肾健脾方的干预作用( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量	A 级(%)	总活力(%)	总数( $\times 10^6$ )
正常组	等量蒸馏水	20.94±6.27	58.75±16.42	10.28±4.19
模型组	等量蒸馏水	3.31±3.25 <sup>ab</sup>	8.89±8.08 <sup>ab</sup>	2.27±0.89
左卡尼汀组	10 mL/kg	8.83±5.54 <sup>cd</sup>	23.76±15.91 <sup>cd</sup>	4.79±1.48 <sup>fg</sup>
中药低剂量组	1.35 mg/kg	20.03±7.0 <sup>e</sup>	53.93±20.80 <sup>e</sup>	6.51±0.93
中药高剂量组	2.70 mg/kg	10.88±1.96	28.92±9.12	5.28±2.36

注:与正常组比较<sup>a</sup> $P<0.001$ ;与药物干预组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与中药高剂量组比较<sup>c</sup> $P>0.05$ ;与中药低剂量组比较<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与中药高剂量组比较<sup>e</sup> $P<0.05$ ;与正常组比较<sup>f</sup> $P<0.05$ ;与药物干预组比较<sup>g</sup> $P<0.05$ 。

2.2 GTW 对少弱精子症小鼠模型精液质量的影响及益肾健脾方的干预作用

实验结果组间比较经卡方检验分析统计提示,模型组 A 级精子活力、总活力低于正常组( $P<0.001$ );药物干预 4 周后显示左卡尼汀组、中药低、高剂量组高于模型组( $P<0.05$ );左卡尼汀组与中药高剂量组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ );左卡尼汀组、中药高剂量组低于中药低剂量组( $P<0.05$ )。实验结果组间比较经配对  $t$  检验分析统计提示,模型组精子数量低于正常组( $P<0.05$ );药物干预 4 周后显示左卡尼汀组、中药低、高剂量组高于模型组( $P<0.05$ )。左卡尼汀组、中药低、高剂量组之间相比无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

2.3 益肾健脾方对少弱精子症小鼠模型血清性激素水平的调节作用

实验结果组间比较经配对  $t$  检验分析统计提示,模型组血清 FSH、LH 水平高于正常组( $P<0.05$ );药物干预 4 周后左卡尼汀组、中药低、高剂量组与正常组相比无统计学意义( $P>0.05$ );左卡尼汀组、中药低、高剂量组低于模型组( $P<0.05$ );左卡尼汀组、中药低、高剂量组之间相比无统计学意义( $P>0.05$ )。模型组血清 T 水平低于正常组( $P<0.01$ )。药物干预后左卡尼汀组、中药低、高剂量组与模型组相比无统计学意义( $P>0.05$ );左卡尼汀组、中药低、高剂量组之间相比无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。



表 2 益肾健脾方对少弱精子症小鼠模型血清性激素水平的调节作用( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量	FSH( $\mu\text{g/L}$ )	LH(IU/L)	T( $\text{ng/L}$ )
正常组	等量蒸馏水	6.593 $\pm$ 1.414 <sup>b</sup>	14.896 $\pm$ 1.730 <sup>b</sup>	1.793 $\pm$ 0.503
模型组	等量蒸馏水	11.893 $\pm$ 1.584 <sup>a</sup>	16.726 $\pm$ 1.980 <sup>a</sup>	1.066 $\pm$ 0.247 <sup>ac</sup>
左卡尼汀组	10 mL/kg	8.303 $\pm$ 1.900 <sup>c</sup>	13.155 $\pm$ 0.572 <sup>c</sup>	0.930 $\pm$ 0.150 <sup>c</sup>
中药低剂量组	1.35 mg/kg	6.775 $\pm$ 0.386 <sup>d</sup>	14.109 $\pm$ 0.800 <sup>d</sup>	1.016 $\pm$ 0.244 <sup>d</sup>
中药高剂量组	2.70mg/kg	6.834 $\pm$ 1.047	13.090 $\pm$ 1.370	1.132 $\pm$ 0.130

注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与各干预组相比,<sup>b</sup> $P>0.05$ ;与中药组相比,<sup>c</sup> $P>0.05$ ;与中药高剂量组相比,<sup>d</sup> $P>0.05$ ;T与正常组相比,<sup>e</sup> $P<0.05$ ;与各干预组相比,<sup>f</sup> $P>0.05$ 。

### 3 讨论

目前少弱精子症模型造模方法有 GTW、甲硝唑、腺嘌呤、环磷酰胺等制备的悬液灌胃<sup>[2]</sup>,其中较为常用的为 GTW。大量实验及临床研究表明雷公藤制剂及其多种成分具有生殖系统毒性,男性若长期服用会出现少精子症、弱精子症,甚至无精子症的现象<sup>[3]</sup>。精子超显微结构出现线粒体鞘受损、胞浆膜缺损和染色质解聚等<sup>[4]</sup>。前期实验研究发现,采用 40 mg/(kg·d)的 GTW 连续灌胃 4 周,可以得到比较理想的少弱精子症大鼠模型<sup>[5]</sup>。本研究发现模型组精子活力、总数明显低于正常组( $P<0.05$ ),制备少弱精子症模型较为理想。

男性精子的发生成熟受到下丘脑-垂体-性腺轴的调节作用<sup>[6]</sup>。FSH 作用靶点主要为生精上皮中的支持细胞,精子发生与其密切相关。但当血清 FSH 水平异常升高时,生精上皮同样会受到损伤;LH 作用靶点主要为间质细胞,与间质细胞膜受体结合可促使其持续产生 T,高浓度的雄激素环境是精子发生所必需的<sup>[7]</sup>。相关研究表明血清性激素水平与精液质量之间存在着一定关联<sup>[8-10]</sup>,FSH 水平较低时发生弱精子症的比例也较低,LH 水平较高时精子活力低下的比例较高。实验结果显示:模型组小鼠血清 FSH、LH 水平较正常组显著升高( $P<0.05$ ),说明生精上皮受到损害。血清 T 较正常组显著下降相一致( $P<0.05$ );药物干预后小鼠血清 FSH、LH 低于正常组平均水平,这也说明 GTW 对小鼠睾丸生精功能产出不可逆的损伤。左卡尼汀口服液其主要成分为左旋肉毒碱<sup>[11-14]</sup>,左旋肉毒碱能够促进  $\beta$  氧化过程,参与精子的能量代谢、降低精浆中的活性氧物质、抗精子凋亡等、稳定精子细胞膜等。与精子的发生、运动及成熟关系密切。相比较选择经典方剂或者中成药作为对照组的其它研究,本研究选择有效治疗少弱精子症的西药左卡尼汀口服液使得实验设计更为合理。

中医学认为精是构成人体的基本物质,先天之精禀受于父母,后天之精来源于水谷精微,由脾胃化生。先后天之精相互依存、相互促进。肾藏精,主生殖,为先天之本。肾气不足则肾不藏精,少精、弱精而致男子不育;脾主运化水谷精微,转输津液,为后天之本。脾失健运,化生乏源,肾精无以充养,少精、弱精而致男子不育。由此,笔者认为“脾肾亏虚,精失所养”是少弱精症形成的基本病机,病位在肾、在脾,治疗上应以“益肾健脾填精”为主,相比较单纯应用补肾填精法治疗更具有优势<sup>[15]</sup>,前期临床运用益肾健脾法治疗精索静脉曲张所致少弱精子症取疗效显著。综合以上讨论和分析发现,益肾健脾方对 GTW 的生殖系统毒性具有一定的拮抗作用,可能通过调节小鼠血清性激素水平来提高睾丸精子发生、成熟,改善精液质量达到治疗少弱精子症的目的。

### 参 考 文 献

- [1] A. Jungwirth, T. Diemer, G. R. Dohle, et al. Guidelines on Male Infertility[J]. European Association of Urology, 2013;7.
- [2] 张盼盼,刘凤霞,阿地力江·伊明.少弱精症动物模型建立的研究进展[J].新疆医科大学学报,2014,37(8):974-980.
- [3] 马成功,纪伟,李蓝刚,等.雷公藤多苷片生殖系统毒性及增效减毒研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(12):88-90.
- [4] 张才田,王雪松,胡雪玲,等.雷公藤多甙抑制大鼠精子发生的研究[J].生殖医学杂志,2008,17(2):118-122.
- [5] 马凤富,李海松,王彬,等. GTW 诱导生精障碍大鼠模型的建立[J].中华男科学杂志,2015,22(1):179-184.
- [6] 郭睿.男性生殖基础与实验室研究[J].北京:军事医学科学出版社,2009:25.
- [7] 熊承良,吴明章,刘继红,等.人类精子学[M].武汉:湖北科技出版社,2001:150-151.
- [8] 闫蓓,高尔生,崔元起.成年男性血清生殖激素水平与精液量以及精子密度的关系[J].生殖与避孕,2006,26(11):679.
- [9] 崔元起,高尔生,周维谨,等.普通人群精液质量与血清生殖激素水平的典型相关分析[J].中国卫生统计,2009,26(1):55.

- [10] 崔元起,高尔生.精液质量与生殖健康[M].上海:复旦大学出版社,2013:175-176.
- [11] de Rosa M, Boggia B, Amalfi B, et al. Correlation between seminal camitine and functional spermatozalcharacteristics in men with semen dysfunction of carious origins[J]. Drugs R D, 2005,6(1):1-9.
- [12] Garolla A, Maiorino M, Rovemiceo A, et al. Oralcarnitine supplementation increases spermmotility in esthinozoosperimic men with normal sperm phoshpolipidhydroperoxide glutathione peroxidase levels[J]. Fertil Strtill,2005,83(2):355-619.
- [13] Abad C, Amengual MJ, Gosalvez J, et al. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA[J]. Andrologia,2001,7(1):211-216.
- [14] Robouche C, bosch E, Chenard C, et al, Utilization of dietary precursors for carnitinebiosynthesis in human adults[J]. J Nutr, 1989,19(12):1907.
- [15] 丁劲,张耀圣,商建伟.益气扶元颗粒治疗 III 度以下精索静脉曲张不育症 45 例临床观察[J]. 中国性科学,2015,(24)1:3-6.

(收稿日期: 2016-03-07)

(本文编辑: 禹佳)