

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research基于代谢组学的五子衍宗丸干预亚急性衰老
大鼠睾丸功能损伤的作用研究Research on the effects of Wuzi Yanzong pill intervention on testicular function
injury in subacute aging rats based on metabolomics穆 胜^{1a,1b}, 马会明^{1c}, 惠 宏^{1a},
蒲 静^{1c}, 马文欣^{1c}, 刘 畅^{1c},
刘自钰^{1c}, 朱向东^{1a}

(1. 宁夏医科大学, a. 中医学院; b. 宁夏少数民族医药现代化重点实验室; c. 生育力保持教育部重点实验室, 宁夏回族自治区 银川 750000)

MU Sheng^{1a,1b}, MA Hui-ming^{1c},
HUI Hong^{1a}, PU Jing^{1c},
MA Wen-xin^{1c}, LIU Chang^{1c},
LIU Zi-yu^{1c}, ZHU Xiang-dong^{1a}(1. a. School of Traditional Chinese
Medicine; b. Key Laboratory of
Modernization of Ethnic Minority
Medicine in Ningxia; c. Key Laboratory
of Fertility Preservation, Ministry of
Education, Ningxia Medical University,
Yinchuan 750000, Ningxia Hui
Autonomous Region, China)基金项目: 国家自然科学基金资助项目
(82274624); 宁夏自然科学基金资
助项目(2023AAC03211)作者简介: 穆胜(1996-), 男, 硕士研究生, 主要
从事中医药治疗男性生殖疾病研究

通信作者: 蒲静, 高级实验师

MP: 13469502745

E-mail: aijing313@163.com

摘要:目的 基于代谢组学探究五子衍宗丸干预亚急性衰老大鼠睾丸功能损伤的作用研究。**方法** 42只大鼠颈部皮下注射 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-半乳糖(D-Gal)诱导建立亚急性衰老模型大鼠,待造模成功后,随机分为模型组、对照组和低、高剂量实验组,每组9只,外取8只未造模的正常大鼠作为正常组。低、高剂量实验组分别按照 0.54 和 $2.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予五子衍宗丸,对照组按照 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予二甲双胍。正常组和模型组均灌胃给予等量蒸馏水,5组大鼠每天给药1次,连续4周;且在此期间除正常组外,其余各组均继续颈部皮下注射 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-Gal。用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中睾酮(T)、促卵泡激素(FSH)和黄体生成素(LH)的表达水平,用蛋白质印迹法检测睾丸组织中睾丸分泌功能相关蛋白[17β -羟基类固醇脱氢酶3型(HSD17B3)、细胞色素 P450 11A1(CYP11A1)和类固醇急性调节蛋白(STAR)]的蛋白相对表达水平,用代谢组学研究睾丸组织中代谢成分。**结果** 正常组、模型组、对照组和低、高剂量实验组的T水平分别为(8.67 ± 1.71)、(1.95 ± 0.46)、(6.50 ± 1.15)、(2.45 ± 0.49)和(5.81 ± 0.96) $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,FSH水平分别为(28.53 ± 4.16)、(46.73 ± 3.72)、(30.18 ± 5.17)、(35.35 ± 1.90)和(30.31 ± 4.35) $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$,LH水平分别为(22.66 ± 3.97)、(37.89 ± 4.16)、(24.28 ± 3.75)、(37.09 ± 3.98)和(28.35 ± 4.38) $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$,HSD17B3蛋白相对表达水平分别为 1.04 ± 0.05 、 0.29 ± 0.14 、 0.78 ± 0.18 、 0.71 ± 0.13 和 0.85 ± 0.18 ,CYP11A1蛋白相对表达水平分别为 1.23 ± 0.15 、 0.62 ± 0.08 、 1.01 ± 0.05 、 0.77 ± 0.15 和 1.24 ± 0.09 ,STAR蛋白相对表达水平分别为 0.97 ± 0.12 、 0.21 ± 0.05 、 0.79 ± 0.19 、 0.62 ± 0.23 和 0.96 ± 0.25 。模型组的上述指标与对照组和高剂量实验组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。代谢组学结果显示,高剂量实验组与模型组相比,共有6个差异代谢物,主要通过类固醇激素生物合成、卵巢类固醇生成、脂质和类脂质分子和生物素代谢等代谢途径发挥作用。**结论** 通过体内实验和代谢组学研究表明,五子衍宗丸能够提高睾丸抗氧化能力,降低其氧化应激损伤,延缓衰老,对睾丸功能损伤具有治疗作用,从而改善睾丸功能。

关键词: 五子衍宗丸;亚急性衰老大鼠;睾丸功能损伤;代谢组学;氧化应激

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.016

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)09-1292-07

Abstract: Objective To explore the effect of Wuzi Yanzong pill on testicular dysfunction in subacute aging rats through metabolomics.**Methods** Forty-two rats were subcutaneously injected with $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-galactose (D-Gal) to induce a subacute aging model. After successful modeling, the rats were randomly divided into four

groups: model group, control group, experimental - L group, experimental - H group, each with 9 rats. Eight normal rats without *D*-Gal treatment were used as the normal group. The experimental - L, - H groups were administered Wuzi Yanzong pill at doses of 0.54 and 2.16 g · kg⁻¹ by gavage, respectively, while the control group was given 300 mg · kg⁻¹ metformin by gavage. The normal and model groups were treated with an equal volume of distilled water by gavage. All rats were dosed once daily for 4 weeks. During this period, the each group (except for the normal group) was continued injected 200 mg · kg⁻¹ *D*-Gal injections. The levels of testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) in serum were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The relative expression of proteins involved in testicular secretory function [hydroxysteroid 17-β dehydrogenase 3 (HSD17B3), cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (CYP11A1), steroidogenic acute regulatory protein (STAR)] was determined by Western blot. Metabolomics analysis was performed to study metabolic changes in the testicular tissue. **Results** The serum T levels in the normal, model, control, experimental - L, and experimental - H groups were (8.67 ± 1.71), (1.95 ± 0.46), (6.50 ± 1.15), (2.45 ± 0.49) and (5.81 ± 0.96) pg · mL⁻¹, respectively; the FSH levels were (28.53 ± 4.16), (46.73 ± 3.72), (30.18 ± 5.17), (35.35 ± 1.90) and (30.31 ± 4.35) mU · mL⁻¹, respectively; the LH levels were (22.66 ± 3.97), (37.89 ± 4.16), (24.28 ± 3.75), (37.09 ± 3.98) and (28.35 ± 4.38) mU · mL⁻¹, respectively; the relative protein expression levels of HSD17B3 were 1.04 ± 0.05, 0.29 ± 0.14, 0.78 ± 0.18, 0.71 ± 0.13 and 0.85 ± 0.18; the relative protein expression levels of CYP11A1 were 1.23 ± 0.15, 0.62 ± 0.08, 1.01 ± 0.05, 0.77 ± 0.15 and 1.24 ± 0.09; the relative protein expression levels of STAR were 0.97 ± 0.12, 0.21 ± 0.05, 0.79 ± 0.19, 0.62 ± 0.23 and 0.96 ± 0.25, respectively. The model group showed significant differences in these indicators when compared with the control and experimental - H groups (all *P* < 0.05). Metabolomics analysis identified six differential metabolites in the experimental - H group compared to the model group. These metabolites were mainly involved in steroid hormone biosynthesis, ovarian steroidogenesis, lipid metabolism, and biotin metabolism. **Conclusion** *In vivo* and metabolomics studies show that Wuzi Yanzong pill improves antioxidant capacity in the testes, reduces oxidative stress damage, delays aging, and effectively treats testicular dysfunction, thereby improving testicular function.

Key words: Wuzi Yanzong pill; subacute aging rats; testicular dysfunction; metabolomics; oxidative stress

睾丸功能损伤是男性生殖常见疾病,随着全球生育偏于大龄化,衰老导致男性睾丸功能损伤,性腺功能减退症的频率高发,可能最终导致男性不育^[1]。目前,本病主要治疗手段还是以西医的激素类和微取精辅助生殖技术为主,均存在一定的局限性。随着中国传统医药的不断发展和经验积累,疗效确切,中医在诊疗男性疾病优势不断凸显。五子衍宗丸是我国传统医药被广泛用于治疗男性生殖疾病^[2],例如睾丸功能损伤等疾病。研究表明,五子衍宗丸具有抗衰老及抗氧化作用^[3],但五子衍宗丸对治疗衰老相关男性睾丸功能减退的作用机制仍有待挖掘。本研究对衰老大鼠睾丸进行体内实验和代谢组学研究,探讨五子衍宗丸抗衰老作用的相关代谢物和通路,揭示其抗衰老的可能机制。

材料与方法

1 材料

动物 雄性无特定病原体级 SD 大鼠,鼠龄 8 ~ 9

周,体质量 220 ~ 250 g,购自宁夏医科大学实验动物中心。动物生产许可证号:SCXK(宁)2020-0001;动物使用许可证号:SYXK(宁)2020-0001。本实验经宁夏回族自治区动物护理委员会批准(伦理批号:IACUC-NYLAC-2021-0721)和宁夏医科大学伦理审查委员会批准(伦理批号:2022-G189号)。

药品与试剂 盐酸二甲双胍片,规格:每片 0.5 g,批号:ACA5418,批准文号:国药准字 H20023371,中美上海施贵宝制药有限公司生产;五子衍宗丸,规格:每粒 10 g,批号:CQP-TB235,批准文号:国药准字 Z11020188,北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂生产;*D*-半乳糖(*D*-galactose, *D*-Gal),规格:每瓶 500 g,纯度: > 99%,批号:1002243351,美国 Sigma-Aldrich 公司生产。p16 和 p53 抗体,沈阳万类公司生产;17β-羟基类固醇脱氢酶 3 型(hydroxysteroid 17-β dehydrogenase 3, HSD17B3)、细胞色素 P450 11A1 (cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1, CYP11A1) 和类固醇急性调节蛋白 (steroidogenic

acute regulatory protein, STAR) 抗体, 北京博奥森公司生产; 睾酮(testosterone, T)、促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素(luteinizing hormone, LH) 及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、8-羟基脱氧鸟(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 酶联免疫吸附试验盒(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 均由南京博研生物科技有限公司生产; β -半乳糖苷酶(senescence associated- β -galactosidase, SA- β -gal) 染色试剂盒, 上海碧云天生物技术公司生产。

仪器 Universal Hood II 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司产品; RM2235 切片机, 德国 Leica 公司产品; SQS40P-212300CJ 玻片扫描影像系统, 深圳市生强科技有限公司产品; EPoch 酶标仪, 美国 BioTek 公司产品; AGX2346Y09 电子压片成像仪, 易亨特生命科学(上海)有限公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建

参考文献[4-7]的方法, 通过颈部皮下注射 $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ D-Gal 8 周, 建立亚急性衰老模型; 检测衰老大鼠睾丸组织衰老相关蛋白 p16、p21、p53 在模型组的表达明显上调; β -糖苷酶染色, 模型组大鼠睾丸的 SA- β -gal 沉积显著增多; 模型组大鼠睾丸组织曲细精管间隙较大, 支持细胞和间质细胞数量明显减少, 中心精子稀少, 视为造模成功。

2.2 动物分组与给药方法

将 50 只 SD 雄性大鼠取 8 只作为正常组, 将剩下 42 只通过颈部皮下注射 D-gal ($200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 4 周时, 筛选出 36 只造模成功的亚急性衰老模型大鼠随机分为 4 组, 模型组、对照组和低、高剂量实验组, 每组 9 只。五子衍宗丸成人日常用量为每日 2 次, 一次 6 g, $12\text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。将 12 g 作为中剂量, 等比选取低、高剂量分为 6、24 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。根据《中药药理学实验方法》, 以体表面积换算, 大鼠低、高剂量实验组分别按照为 0.54 和 2.16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予五子衍宗丸, 同时给予大鼠颈部皮下注射 $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ D-gal; 对照组按照 $300\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予二甲双胍, 同时给予大鼠颈部皮下注射 $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ D-gal; 正常组给予等量蒸馏水。模型组给予等量蒸馏水, 同时给予大鼠颈部皮下注射 $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ D-gal; 各组大鼠每天给药 1 次, 连续给药和注射 D-gal, 到第 8 周注射 D-gal 和灌胃同时结束。

2.3 样品收集

所有大鼠禁食 24 h, 异氟烷吸入麻醉, 心脏取血,

离心, 收集血清放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测; 取睾丸组织, 一侧新鲜睾丸置于 4% 多聚甲醛固定, 制成石蜡切片, 部分将新鲜睾丸制成冰冻切片; 剩余组织放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.4 ELISA 法测定血清氧化相关因子水平以及血清激素水平

用采血针, 采血管进行心尖取血, 每只大鼠取血 8~10 mL, 室温静置 30 min 后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, $3\text{ }600\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心取上清液备用。取出大鼠血清, 按试剂盒说明书中的步骤进行标准品制备、加样、抗体孵育等操作, 用 ELISA 法检测血清样品中 SOD、MDA、T、FSH、LH 和 8-OHdG 的水平, 加入终止液后, 用酶标仪在 450 nm 波长下检测每孔光密度值。

2.5 苏木精-伊红(hemotoxylin-eosin, HE)染色法观察睾丸组织病理学改变

按照田瑞莹等^[7]方法将一侧新鲜睾丸置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 对睾丸表膜进行扎孔, 之后更换放有睾丸的多聚甲醛, 以确保睾丸组织能够充分固定, 固定充分后进行脱水和包埋, 制成石蜡切片备用。HE 染色方法, 将包埋好的睾丸蜡块制备成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 石蜡切片后, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘烤 3 h, 切片脱蜡复水后, 乙醇脱水, 二甲苯透明后中性树胶封片。在光学显微镜下, 观察睾丸组织的形态和结构的变化。

2.6 β -糖苷酶染色检测细胞衰老情况

将新鲜的睾丸组织放入盛满 15% 的蔗糖溶液的 50 mL 离心管中, 待睾丸组织沉底后换入 30% 的蔗糖溶液, 待睾丸组织再次沉底后将睾丸组织放入适当容器中加入 OCT 包埋剂, 迅速放进液氮中冷却, 随后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储藏。将制好的冰冻切片根据说明书的步骤进行实验操作, 封片后, 在光学显微镜下观察。

2.7 蛋白质印迹法检测睾丸组织蛋白的表达水平

根据田瑞莹等^[7]实验方法, 提取的组织总蛋白, 用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。将睾丸组织中加入裂解液进行研磨, 随后进行离心取上清液, 并储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。用 10% 或 8% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel, SDS-PAGE) 胶处理后的样品, 并转移到 PVDF 膜上, 随后用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h, 然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用一抗处理过夜。接下来, 将膜与 HRP 偶联的二抗孵育 1 h; 随后用化学发光试剂进行曝光处理。用 Image J 软件对结果进行灰度值分析。

2.8 差异性代谢物筛选及代谢通路分析^[8]

用 MSDIAL 软件对样品数据进行峰剔除, 用单位方差法对不同的正、负离子进行总峰面积归一化, 用

R 软件进行总体样本主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPS-DA)。从 OPLS-DA 分析结果中筛选 VIP(投影中可变重要性) >1.5 的离子,并对这些离子进行 t 检验、变异倍数分析(fold change analysis, FC)的单变量统计检验,选取 $FC > 1$, $P < 0.05$ 的差异代谢物,将其输入京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/compound/>)分析代谢通路,并导 Metabo Analyst 4.0,进行代谢通路的显著性分析。

3 统计学处理

用 GraphPad Prism 9 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析和可视化。符合正态分布和方差齐性标准的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用单因素方差分析(ANOVA)。不符合正态分布和方差齐性的数据比较用秩和检验。

结 果

1 亚急性衰老大鼠模型建立

低、高剂量实验组分别按照 0.54 和 $2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予五子衍宗丸,对照组按照 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予二甲双胍。正常组和模型组均灌胃给予等量蒸馏水,5 组大鼠每天给药 1 次,连续 4 周;且在此期间除正常组外,其余各组均继续颈部皮下注射 D-Gal。

正常组和模型组衰老相关蛋白 p16 蛋白表达水平分别为 0.58 ± 0.02 和 0.90 ± 0.12 , P21 蛋白表达水

平分别为 0.28 ± 0.2 和 1.06 ± 0.17 , p53 蛋白表达水平分别为 0.51 ± 0.05 和 0.92 ± 0.08 ;模型组与正常组比较,大鼠睾丸组织中 p16、p21 和 p53 蛋白表达水平均显著上调(均 $P < 0.05$);SA- β -gal 的检测结果显示,正常组和模型组大鼠睾丸中 SA- β -gal 的累积光密度值分别为 0.18 ± 0.05 和 0.52 ± 0.11 ,模型组与正常组比较,大鼠睾丸的 SA- β -gal 沉积显著增多($P < 0.05$),表明亚急性衰老大鼠模型建立成功。

2 五子衍宗丸对衰老大鼠睾丸的影响

正常组、模型组、对照组与低、高剂量实验组中 SA- β -gal 累积光密度值分别为 0.14 ± 0.02 、 0.50 ± 0.04 、 0.20 ± 0.04 、 0.25 ± 0.04 和 0.16 ± 0.02 ;模型组与正常组比较,睾丸中 SA- β -gal 表达水平显著升高($P < 0.05$)。对照组和低、高剂量组与模型组比较,大鼠睾丸组织中 SA- β -gal 累积光密度均显著降低(均 $P < 0.05$);对照组和低高剂量组比较,大鼠睾丸组织中 SA- β -gal 累积光密度显著降低($P > 0.05$),见图 1。表明五子衍宗丸能够延缓睾丸衰老。

HE 结果显示,正常组大鼠睾丸组织中,相邻曲细精管紧密相连,管壁完整,内部各级生精细胞排列整齐有序,曲细精管中心明显可见精子;模型组大鼠睾丸组织中,相邻曲细精管间隙较大,支持细胞和间质细胞数量明显减少,中心精子稀少,二者差异显著。高剂量实验组和二甲双胍组大鼠睾丸的生精小管和生精上皮几乎恢复了其组织形态学外观,与相邻曲细精管紧密相连,管壁相对完整,内部各级生精细胞排列整齐有序,曲细精管中心可见精子(见图 1)。

3 五子衍宗丸对血清氧化还原稳态的影响

模型组与正常组比较,血清 8-OHdG 和 MDA 均

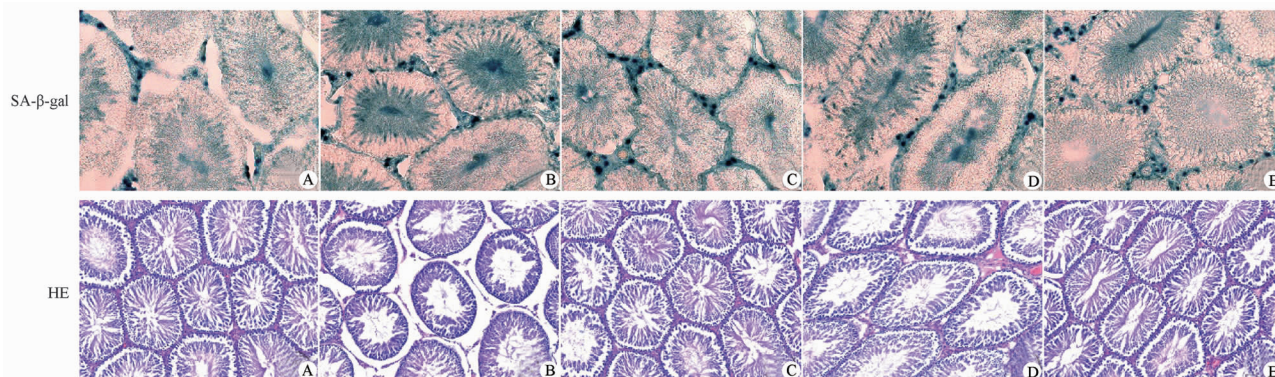


图 1 各组大鼠睾丸组织 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)沉积($\times 40$)和病理组织变化($\times 20$)

Figure 1 Deposition of senescence associated- β -galactosidase (SA- β -gal) in testicular tissue of rats in each group ($\times 40$) and pathological tissue changes ($\times 20$)

A: Normal group, rats were given an equal amount of distilled water by gavage; B: Model group, rats were given an equal amount of distilled water by gavage; C: Control group, rats were given metformin by gavage at a dose of $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: Experimental-L group, rats were orally administered with Wuzi Yanzong pill at doses of $0.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; E: Experimental-H group, rats were orally administered with Wuzi Yanzong pill at doses of $2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

表1 各组大鼠血清氧化因子的比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of serum oxidative factors among different groups of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose (g · kg ⁻¹)	n	8-OHdG (ng · mL ⁻¹)	MDA (nmol · mL ⁻¹)	SOD (ng · mL ⁻¹)
Normal	0	8	14.49 ± 1.61	1.23 ± 0.21	7.77 ± 1.08
Model	0	8	25.98 ± 2.42 ^{**}	2.98 ± 0.26 ^{**}	4.72 ± 0.97 ^{**}
Control	0.3	8	16.58 ± 1.62 ^{##}	1.44 ± 0.32 ^{##}	7.39 ± 1.028 ^{##}
Experimental - L	0.45	8	22.74 ± 1.68 ^{##}	2.19 ± 0.29 ^{##}	4.67 ± 0.72
Experimental - H	2.16	8	16.75 ± 0.98 ^{##}	1.63 ± 0.15 ^{##}	6.93 ± 0.87 ^{##}

8-OHdG; 8-hydroxydeoxyguanosine; MDA; Malondialdehyde; SOD; Superoxide dismutase; Compared with normal group, ^{**} $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$.

显著升高, SOD 显著降低(均 $P < 0.01$); 治疗后, 高剂量实验组与模型组相比, 血清中 SOD 显著升高, 8-OHdG 和 MDA 均显著降低(均 $P < 0.01$); 低剂量实验组与模型组相比, 8-OHdG 和 MDA 均显著降低(均 $P < 0.01$)。结果见表1。

4 五子衍宗丸对各血清中激素水平的影响

模型组与正常组相比, T 显著降低, FSH 和 LH 均显著升高, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 高剂量实验组和对照组干预后的血清 T 显著升高, FSH 和 LH 均显著降低, 在统计学上差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); 但低剂量实验组中 T、LH 未见明显变化($P > 0.05$); 这表明五子衍宗丸可以改善衰老睾丸激素水平。结果见表2。

5 各组大鼠睾丸组织中 HSD17B3、CYP11A1 和 STAR 蛋白表达水平的比较

正常组、模型组、对照组与低、高剂量实验组的睾丸酮合成关键酶 HSD17B3 蛋白相对表达水平分别为 1.04 ± 0.05 、 0.29 ± 0.14 、 0.78 ± 0.18 、 0.71 ± 0.13 和 0.85 ± 0.18 , CYP11A1 蛋白相对表达水平分别为 1.23 ± 0.15 、 0.62 ± 0.08 、 1.01 ± 0.05 、 0.77 ± 0.15 和 1.24 ± 0.09 , STAR 蛋白相对表达水平分别为 0.97 ± 0.12 、 0.21 ± 0.05 、 0.79 ± 0.19 、 0.62 ± 0.23 和

0.96 ± 0.25 。模型组与正常组比较, 睾丸中 HSD17B3、CYP11A1 和 STAR 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。对照组和低、高剂量实验组与模型组比较, 大鼠睾丸中 HSD17B3 蛋白相对表达均显著升高(均 $P < 0.05$), 对照组和高剂量实验组的大鼠睾丸组织中 CYP11A1 和 STAR 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$); 对照组和低、高剂量实验组之间的 HSD17B3、CYP11A1 和 STAR 蛋白相对表达水平比较, 在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

6 睾丸代谢组学分析

6.1 PCA 主成分分析

对睾丸组织代谢轮廓进行自动建模 PCA 分析, 见图2。与模型组(绿色)正常组(蓝色)和高剂量实验组(橙色)在 PCA 正、负离子图上表现出显著聚类特征, 与模型组相比, 正常组和高剂量实验组形成明显分离, 这表明这些组别在代谢轮廓上有明显差异, 提示五子衍宗丸高剂量干预亚急性衰老大鼠后能够引起体内代谢物发生改变, 从而发挥其抗衰老作用, 见图2。

6.2 正交偏最小二乘判别分析

用正交偏最小二乘判别分析模型来识别差异代谢物并验证模型, 一般来说 $Q^2Y > 0.5$ 时可认为是有效的模型^[9]。3 组大鼠睾丸组织代谢 OPLS-DA 模型评分, 负、正离子模式 R^2Y 和 Q^2 的参数均在 95% 的可信区间内, Q^2Y 均大于 0.5, 正常组与模型组比较下负、正离子置换检验 R^2Y 、 Q^2Y 分别为 ($R^2Y = 0.996$; $Q^2Y = 0.597$)、($R^2Y = 0.99$; $Q^2Y = 0.632$), 表明所构建的模型无过拟合现象, 其预测力和可靠性良好; 高剂量实验组与模型组比较下负、正离子置换检验 R^2Y 、 Q^2Y 分别为 ($R^2Y = 0.998$; $Q^2Y = 0.827$)、($R^2Y = 0.985$; $Q^2Y = 0.589$), 表明高剂量实验组与模型组无拟合现象, 其预测和分析五子衍宗丸能够治疗睾丸功能损伤的可靠性良好。

6.3 代谢差异物的筛选

正常组与模型组大鼠相比, 共有 110 个差异代谢

表2 各组大鼠血清激素的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of serum hormones among different groups of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	T	FSH	LH
	(pg · mL ⁻¹)	(mU · mL ⁻¹)	(mU · mL ⁻¹)
Normal	8.67 ± 1.71	28.53 ± 4.16	22.66 ± 3.97
Model	1.95 ± 0.46 ^{**}	46.73 ± 3.72 ^{**}	37.89 ± 4.16 ^{**}
Control	6.50 ± 1.15 ^{##}	30.18 ± 5.17 ^{##}	24.28 ± 3.75 ^{##}
Experimental - L	2.45 ± 0.49	35.35 ± 1.90 ^{##}	37.09 ± 3.98
Experimental - H	5.81 ± 0.96 ^{##}	30.31 ± 4.35 ^{##}	28.35 ± 4.38 ^{##}

Dose and n refer to table1; T; Testosterone; FSH; Follicle stimulating hormone; LH; Luteinizing hormone; Compared with normal group,

^{**} $P < 0.01$; Compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$.

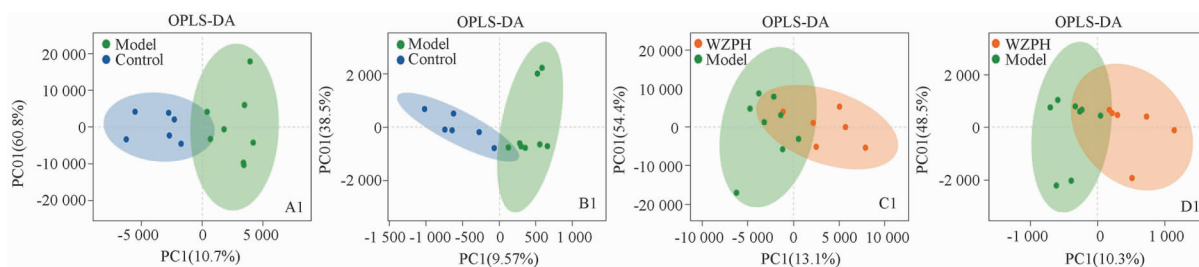


图2 大鼠睾丸组织样本的PCA主成分分析

Figure 2 PCA principal component analysis of rat testicular tissue samples

Positive: A1, C1; Negative: B1, D1; A1, B1: Normal group vs Model group; C1, D1: Experimental - L group vs model group.

物;高剂量实验组与模型组大鼠相比,有108个差异代谢物,2组共同的差异代谢物6个,2,5-二氨基-6-嘧啶-4(3H)-酮[2,5-Diamino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)pyrimidin-4(3H)-one]、脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone)、S-腺苷甲硫氨酸[(S)-5'-Deoxy-5'-(methylsulfinyl)adenosine]在正常组和高剂量实验组中上调,磷代乙醛(phosphonoacetaldehyde)和生物素磺(biotin sulfone)下调。实验组与模型组相比,代谢途径主要涉及类固醇激素生物合成、生物素代谢、脂质和类脂质分子信号通路等。对上下调的代谢物和通路之间数据分析,五子衍宗丸可以通过调节雄激素类固醇代谢通路和脂质代谢干预睾丸功能损伤。

讨论

睾丸功能不全是引起男性不育的重要病因,睾丸功能不全在中医中没有明确病名,根据其临床表现可归属于中医“精少”“精薄”“精寒”“无子”等病理范畴^[10],睾丸功能损伤主要与肾气和肾精不足相关,五子衍宗丸以温肾补精,填精益髓为主。氧化应激是体内ROS过度累积,氧化和抗氧化平衡失调,引起机体氧化损伤反应,普遍认为氧化应激是导致睾丸功能损伤的关键因素^[11]。MDA、SOD和8-OHdG三者最能反映氧化损伤反应程度^[12],SOD是机体自身产生的可以起到抗氧化作用的自由基清除酶,8-OHdG是ROS基团致DNA氧化损失所产生的物质,在实验中常用作检测氧化程度、DNA损伤程度的标志物;MDA是机体受到氧化应激损伤最为明显的标志物。在本研究中五子衍宗丸组中SOD升高,8-OHdG和MDA降低,氧化检测指标证明五子衍宗丸能够减少氧化应激,延缓睾丸功能损伤。T、FSH和LH等生化指标能够准确反映睾丸结构的变化^[13-15],五子衍宗丸中血清T升高,FSH和LH降低,五子衍宗丸中睾酮合成关

键酶STAR、CYP11A1、HSD17B3蛋白表达上升,表明五子衍宗丸能够改善睾丸功能,提高生育能力。体内实验结果表明,五子衍宗丸能够降低大鼠睾丸衰老相关蛋白表达,减少氧化应激,改善睾丸分泌功能。

结合代谢组学研究表明衰老大鼠体内代谢异常,进一步发现,五子衍宗丸可通过调控多个代谢物和多条代谢通路来干预睾丸功能损伤,对正常组、模型组和高剂量实验组睾丸组织代谢物质的变化进行分析,得到多个差异代谢物及其代谢通路,在本研究中发现,脱氢表雄酮和S-腺苷甲硫氨酸等代谢失调与睾丸功能损伤关联密切。其中脱氢表雄酮具有是一种重要的类固醇激素前体,在睾丸中参与雄激素的合成过程^[16];2,5-二氨基-6-嘧啶-4(3H)-酮是核黄素生物合成途径中的一个重要中间体,核黄素有抗炎和抗氧化作用,可以保护细胞免受氧化损伤^[17]。S-腺苷甲硫氨酸可以改善老年小鼠的精子质量和炎症与氧化应激水平^[18]。通过体内实验和代谢组学研究证明,五子衍宗丸能抗衰老,减少氧化应激,改善睾丸功能。

致谢:感谢上海欧易医学科技有限公司穆志国对本文代谢组学分析和作图提供的帮助!

参考文献:

- [1] KILCOYNE K R, MITCHELL R T. Effect of environmental and pharmaceutical exposures on fetal testis development and function: A systematic review of human experimental data[J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(4): 397-421.
- [2] 王真, 张丽娟, 周梓洋. 口服补肾类中成药联合左卡尼汀治疗少弱精子症的网状meta分析[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(6): 812-823.
- [3] XU Y H, LI Y, HU S Q, et al. Effect of Wuzi Yanzong pills on sertoli cells and blood-testis barrier in heat-stressed rats based on Akt signalling pathway[J/OL]. *Andrologia*, 2021, 53(9): e14169. 2021-10-01 [2024-03-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34197007/>.
- [4] HOYE A T, DAVOREN J E, WIPF P, et al. Targeting mitochondria

- [J]. *Accounts Chem Res*, 2008, 41(1): 87—97.
- [5] GAN Y, LU J, YEUNG B Z, *et al.* Pharmacodynamics of telomerase inhibition and telomere shortening by noncytotoxic suramin [J]. *Aaps J*, 2015, 17(1): 268—276.
- [6] LU W, REN S, DONG W, *et al.* Albumin - induced premature senescence in human renal proximal tubular cells and its relationship with intercellular fibrosis [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2022, 54(7): 893—903.
- [7] 田瑞莹, 邢莎莎, 虎娜. 枸杞籽油对亚急性衰老大鼠睾丸 Nrf2/ARE 通路和氧化损伤的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(3): 490—498.
- [8] THEVENOT E A, ROUX A, XU Y, *et al.* Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and opls statistical analyses [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3322—3335.
- [9] LEE S, OH D G, LEE S, *et al.* Chemotaxonomic metabolite profiling of 62 indigenous plant species and its correlation with bioactivities [J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 19719—19734.
- [10] 邓超. 基于 TRPV4 通路探讨补肾活血毓麟汤对 VC 少弱精症的临床及实验研究 [D]. 湖北 武汉: 湖北中医药大学, 2023.
- [11] CHEN K, WU L, LIU Q, *et al.* Glutathione improves testicular spermatogenesis through inhibiting oxidative stress, mitochondrial damage, and apoptosis induced by copper deposition in mice with Wilson disease [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: e114107. 2023 - 02 - 01 [2024 - 03 - 26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36502753/>.
- [12] 李盼, 兰永利, 韦芳. 基于 Nrf2/HO-1 通路探讨针灸预处理对急性胃黏膜损伤大鼠的影响及机制 [J]. *山东中医药大学学报*, 2024, 48(4): 453—458.
- [13] VAN DER HORST G, KOTZE S H, O'RIAIN M J, *et al.* Testicular structure and spermatogenesis in the naked mole - rat is unique (degenerate) and atypical compared to other mammals [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: e234. 2019 - 01 - 20 [2024 - 03 - 26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31681767/>.
- [14] GONCALVES M, LACERDA S, LARA N, *et al.* GATA - 1 mutation alters the spermatogonial phase and steroidogenesis in adult mouse testis [J/OL]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 542: e111519. 2022 - 02 - 15 [2024 - 03 - 26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34843900/>.
- [15] CAI H, QIN D, PENG S. Responses and coping methods of different testicular cell types to heat stress: Overview and perspectives [J]. *Bioscience Rep*, 2021, 41(6): 43.
- [16] TANG J, CHEN L R, CHEN K H. The utilization of dehydroepiandrosterone as a sexual hormone precursor in premenopausal and postmenopausal women: An overview [J]. *Pharmaceuticals - Base*, 2021, 15(1): 46.
- [17] 李想, 杨婕, 程陈凯. 氟对睾丸组织及间质细胞铁死亡的影响及核黄素的干预研究 [C]// 中国毒理学会. 中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集. 珠海: 中国毒理学会 2023: 2.
- [18] WU Y, LI H, MIAO Y, *et al.* Effects of methionine restriction from different sources on sperm quality in aging mice [J]. *Nutrients*, 2023, 15(22): 4782.

(收稿日期 2024 - 12 - 16)

· 科学文摘 ·

Obicetrapib 治疗高危心血管患者的临床研究

引自: NICHOLLS S J, *et al.* Safety and efficacy of obicetrapib in patients at high cardiovascular risk [J/OL]. *N Engl J Med*, 2025. 2025 - 05 - 07 [2025 - 05 - 08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40337982/>.

澳大利亚莫纳什大学 NICHOLLS 团队研究了 Obicetrapib 在高危心血管患者中的安全性和有效性。该研究团队开展了一项多国、随机、安慰剂对照试验, 纳入了杂合子家族性高胆固醇血症或有动脉粥样硬化性心血管病史的患者, 这些患者接受了最大耐受剂量的降脂治疗。低密度脂蛋白 (low - density lipoprotein, LDL) 胆固醇水平为 $100 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或更高, 非高密度脂蛋白 (high - density lipoprotein, HDL) 胆固醇水平为 $130 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或更高, 以及 LDL 胆固醇水平为 $55 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或非高密度脂蛋白胆固醇水平为 $85 \sim 130 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 且至少有 1 个额外心血管危险因素的患者符合纳入条件。患者以 2:1 的比例随机分配, 接受 obicetrapib 10 mg, 每日 1 次或匹配安慰剂, 共治疗 365 d。主要终点是 LDL 胆固醇水平从基线到第 84 天的百分比变化。

该研究共纳入 2 530 例患者, 其中, 试验组 1 686 例 (接受 obicetrapib 治疗) 和安慰剂组 (844 例)。患者的平均年龄为 65 岁, 34% 为女性, 平均基线 LDL 胆固醇水平为 $98 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 。试验组 LDL 胆固醇水平从基线到第 84 天的最小二乘平均百分比变化为 29.9% (95% 置信区间为 32.1 ~ 27.8), 安慰剂组为 2.7% (95% 置信区间为 0.4 ~ 5.8), 组间差异为 32.6 个百分点 (95% 置信区间为 35.8 ~ 29.5, $P < 0.001$)。2 组的不良事件发生率相似。

该研究表明, 在接受最大耐受剂量降脂治疗且心血管事件高风险的动脉粥样硬化性心血管疾病或杂合性家族性高胆固醇血症患者中, obicetrapib 降低了 29.9% 的 LDL 胆固醇水平。