

# 基于氧化应激及细胞凋亡探讨补气活血益精方 对肾虚血瘀型少弱精子症大鼠的影响

## The effect of Qi - supplementing, blood - activating and essence - benefiting formula on rats with asthenospermia and oligospermia due to kidney deficiency and blood stasis based on oxidative stress and apoptosis

常家庆<sup>1</sup>, 赵威威<sup>1</sup>, 马丽丽<sup>2</sup>,  
鞠海超<sup>1</sup>, 杨佳树<sup>1</sup>, 王新平<sup>3</sup>,  
邢喜平<sup>3</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州市第一人民医院, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730000)

CHANG Jia - qing<sup>1</sup>,  
ZHAO Wei - wei<sup>1</sup>,  
MA Li - li<sup>2</sup>, JU Hai - chao<sup>1</sup>,  
YANG Jia - shu<sup>1</sup>, WANG Xin - ping<sup>3</sup>,  
XING Xi - ping<sup>3</sup>

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; 2. The First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; 3. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

**基金项目:** 甘肃省自然科学基金资助项目(编号: 25JRR969); 甘肃省卫生健康行业骨干人才基金资助项目(编号: 甘卫人函[2023] 398号); 第一批陇原青年英才培养基金资助项目(编号: 甘人社通[2021] 404号); 甘肃省中医药管理局基金资助项目(编号: GZKP - 2023 - 15)

**作者简介:** 常家庆(1996 -), 男, 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治男科疾病研究工作

**通信作者:** 邢喜平, 主任医师, 博士生导师  
MP: 13893139305  
E - mail: xxp214@126.com

**摘要:** **目的** 探究氧化应激及细胞凋亡在肾虚血瘀型少弱精子症(OAS)模型中的作用及补气活血益精方干预的机制。**方法** 用雷公藤多苷(GTW)灌胃的方法建立肾虚血瘀型OAS大鼠模型, 将其随机分为模型组、左卡尼汀组、补气活血益精方低、中、高剂量实验组; 另随机取8只大鼠为正常对照组。左卡尼汀组灌胃 $1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左卡尼汀口服液; 补气活血益精方低、中、高剂量组分别灌胃予以 $7.87$ 、 $15.75$ 、 $31.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 中药汤剂; 空白组和模型组均灌胃等量 $0.9\%$  NaCl, 6组大鼠每天定时给药1次, 连续给药28 d。观察大鼠一般情况, 测定大鼠睾丸及附睾指数; 检测大鼠精子质量, 苏木精-伊红染色法(HE)观察大鼠睾丸组织病理形态学变化, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测睾丸组织活性氧(ROS)强度、过氧化氢酶(CAT)及超氧化物歧化酶(SOD)活力, 实时荧光定量聚合酶链式反应(q-PCR)检测大鼠睾丸组织中Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA表达水平。**结果** 空白组、模型组、补气活血益精方低、中、高剂量组和左卡尼汀组睾丸指数分别为 $(0.83 \pm 0.09)\%$ 、 $(0.55 \pm 0.10)\%$ 、 $(0.55 \pm 0.07)\%$ 、 $(0.71 \pm 0.12)\%$ 、 $(0.81 \pm 0.08)\%$ 和 $(0.67 \pm 0.07)\%$ , 附睾指数分别为 $(0.36 \pm 0.05)\%$ 、 $(0.24 \pm 0.03)\%$ 、 $(0.25 \pm 0.04)\%$ 、 $(0.28 \pm 0.02)\%$ 、 $(0.35 \pm 0.06)\%$ 和 $(0.28 \pm 0.03)\%$ , 精子浓度分别为 $(24.11 \pm 11.64)$ 、 $(4.65 \pm 2.48)$ 、 $(6.75 \pm 3.81)$ 、 $(11.60 \pm 7.78)$ 、 $(21.72 \pm 7.81)$ 和 $(23.22 \pm 8.80) \times 10^6 \text{ sperm} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 精子活力分别为 $(86.93 \pm 12.00)\%$ 、 $(33.46 \pm 16.13)\%$ 、 $(53.01 \pm 21.71)\%$ 、 $(63.15 \pm 24.35)\%$ 、 $(79.97 \pm 10.22)\%$ 和 $(75.83 \pm 25.05)\%$ , ROS强度分别为 $597.926.11 \pm 87.518.20$ 、 $925.239.02 \pm 95.539.79$ 、 $846.676.84 \pm 64.867.76$ 、 $784.277.73 \pm 81.354.32$ 、 $658.228.04 \pm 82.768.68$ 和 $725.740.12 \pm 87.846.36$ , CAT活力分别为 $(1.40 \pm 0.11)$ 、 $(0.56 \pm 0.09)$ 、 $(0.77 \pm 0.11)$ 、 $(0.95 \pm 0.13)$ 、 $(1.15 \pm 0.12)$ 和 $(1.03 \pm 0.11) \text{ U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ , SOD活力分别为 $(2.41 \pm 0.07)$ 、 $(1.65 \pm 0.05)$ 、 $(1.79 \pm 0.33)$ 、 $(1.90 \pm 0.04)$ 、 $(2.21 \pm 0.05)$ 和 $(2.06 \pm 0.04) \text{ U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ , Bcl-2 mRNA相对表达量分别为 $1.00 \pm 0.04$ 、 $0.26 \pm 0.02$ 、 $0.39 \pm 0.04$ 、 $0.49 \pm 0.02$ 、 $0.87 \pm 0.02$ 、 $0.66 \pm 0.05$ , Bax mRNA相对表达量分别为 $1.00 \pm 0.05$ 、 $1.78 \pm 0.07$ 、 $1.50 \pm 0.04$ 、 $1.39 \pm 0.02$ 、 $1.12 \pm 0.04$ 和 $1.27 \pm 0.04$ , Caspase-3 mRNA相对表达量分别为 $1.00 \pm 0.03$ 、 $1.95 \pm 0.06$ 、 $1.81 \pm 0.03$ 、 $1.68 \pm 0.03$ 、 $1.18 \pm 0.07$ 和 $1.49 \pm 0.08$ 。模型组的上述指标与空白组比较, 高剂量组的上述指标与模型组比较, 除附睾指数外左卡尼汀组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 氧化应激及细胞凋亡在OAS大鼠精子质量及睾丸损伤中发挥多重调控作用, 补气活血益精方可能通过抑制氧化应激及细胞凋亡, 改善大鼠精子质量及睾丸功能。

**关键词:** 补气活血益精方; 肾虚血瘀; 少弱精子症; 氧化应激; 细胞凋亡

**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.16.013

**中图分类号:** R28 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-6821(2025)16-2324-06

**Abstract: Objective** To explore the roles of oxidative stress and apoptosis in the renal deficiency and blood stasis type oligoasthenozoospermia (OAS) model, and to investigate the mechanism of the intervention by the Qi-supplementing, Blood-activating and Essence-nourishing formula. **Methods** The rat model of renal deficiency and blood stasis type oligoasthenozoospermia was established by intragastric administration of Gentiana macrophylla polysaccharides (GTW). The rats were randomly divided into the model group, the levocarnitine group, the low, medium and high doses of the Qi-supplementing, Blood-activating and Essence-nourishing formula groups; another 8 rats were randomly selected as the normal control group. The levocarnitine group was intragastrically administered  $1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  levocarnitine oral liquid; the low, medium and high doses of the Qi-supplementing, Blood-activating and Essence-nourishing formula groups were given  $7.87$ ,  $15.75$  and  $31.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectively; the blank group and the model group were intragastrically administered the same amount of  $0.9\%$  NaCl. All 6 groups of rats were administered the drugs once daily and continuously for 28 days. The general conditions of the rats were observed; the testicular and epididymal indices were measured; the sperm quality was detected; the pathological morphology of the testicular tissue was observed by hematoxylin-eosin staining (HE); the activity of reactive oxygen species (ROS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the testicular tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the mRNA expression levels of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in the testicular tissue were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (q-PCR). **Results** The testicular indices of the blank group, model group, low, medium and high doses of the Qi-supplementing, Blood-activating and Essence-nourishing formula group, and the levocarnitine group were  $(0.83 \pm 0.09)\%$ ,  $(0.55 \pm 0.10)\%$ ,  $(0.55 \pm 0.07)\%$ ,  $(0.71 \pm 0.12)\%$ ,  $(0.81 \pm 0.08)\%$ , and  $(0.67 \pm 0.07)\%$ , respectively; the epididymal indices were  $(0.36 \pm 0.05)\%$ ,  $(0.24 \pm 0.03)\%$ ,  $(0.25 \pm 0.04)\%$ ,  $(0.28 \pm 0.02)\%$ ,  $(0.35 \pm 0.06)\%$ , and  $(0.28 \pm 0.03)\%$ , respectively; the sperm concentrations were  $(24.11 \pm 11.64, 4.65 \pm 2.48, 6.75 \pm 3.81, 11.60 \pm 7.78, 21.72 \pm 7.81, 23.22 \pm 8.80) \times 10^6 \text{ sperm} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively; the sperm motility was  $(86.93 \pm 12.00)\%$ ,  $(33.46 \pm 16.13)\%$ ,  $(53.01 \pm 21.71)\%$ ,  $(63.15 \pm 24.35)\%$ ,  $(79.97 \pm 10.22)\%$ , and  $(75.83 \pm 25.05)\%$ , respectively; the ROS intensity was  $597\ 926.11 \pm 87\ 518.20$ ,  $925\ 239.02 \pm 95\ 539.79$ ,  $846\ 676.84 \pm 64\ 867.76$ ,  $784\ 277.73 \pm 81\ 354.32$ ,  $658\ 228.04 \pm 82\ 768.68$ , and  $725\ 740.12 \pm 87\ 846.36$ , respectively; the CAT activity was  $(1.40 \pm 0.11)$ ,  $(0.56 \pm 0.09)$ ,  $(0.77 \pm 0.11)$ ,  $(0.95 \pm 0.13)$ ,  $(1.15 \pm 0.12)$ , and  $(1.03 \pm 0.11) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ , respectively; the SOD activity was  $(2.41 \pm 0.07)$ ,  $(1.65 \pm 0.05)$ ,  $(1.79 \pm 0.33)$ ,  $(1.90 \pm 0.04)$ , and  $(2.21 \pm 0.05)$ , and  $(2.06 \pm 0.04) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ , respectively. the relative expression levels of Bcl-2 mRNA were  $1.00 \pm 0.04$ ,  $0.26 \pm 0.02$ ,  $0.39 \pm 0.04$ ,  $0.49 \pm 0.02$ ,  $0.87 \pm 0.02$ , and  $0.66 \pm 0.05$ , respectively; the relative expression levels of Bax mRNA were  $1.00 \pm 0.05$ ,  $1.78 \pm 0.07$ ,  $1.50 \pm 0.04$ ,  $1.39 \pm 0.02$ ,  $1.12 \pm 0.04$ , and  $1.27 \pm 0.04$ , respectively; the relative expression levels of Caspase-3 mRNA were  $1.00 \pm 0.03$ ,  $1.95 \pm 0.06$ ,  $1.81 \pm 0.03$ ,  $1.68 \pm 0.03$ ,  $1.18 \pm 0.07$ , and  $1.49 \pm 0.08$ , respectively. The above-mentioned indicators of the model group compared with the blank group, the high-dose group compared with the model group, and the L-carnitine group except for the epididymal index compared with the model group, all showed statistically significant differences ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion** Oxidative stress and cell apoptosis play multiple regulatory roles in the sperm quality and testicular damage of OAS rats. The Qi-supplementing, activating blood, and tonifying essence formula may improve the sperm quality and testicular function of rats by inhibiting oxidative stress and cell apoptosis.

**Key words:** Qi-supplementing; blood-activating and essence-enhancing formula; kidney deficiency and blood stasis; oligoasthenospermia; oxidative stress; apoptosis

全球男性精子质量呈下降趋势<sup>[1]</sup>。少弱精子症 (oligoasthenozoospermia, OAS) 是男性不育的主要病因, 约占男性不育的 50%<sup>[2]</sup>。肾虚血瘀证是 OAS 常见的中医证型, 前期临床实践及研究表明, 补气活血

益精方可显著提高肾虚血瘀型 OAS 患者的精子浓度及活力<sup>[3]</sup>。近年研究认为 OAS 与氧化应激、细胞凋亡密切相关<sup>[4]</sup>。氧化应激 (oxidative stress, OS) 是体内氧化和抗氧化平衡的失调状态, 可通过精子细胞膜

脂质过氧化、蛋白质氧化、影响下丘脑-垂体-性腺轴和DNA链断裂损伤精子细胞<sup>[5-9]</sup>。细胞凋亡<sup>[5]</sup>是一种程序性死亡过程,外源性途径或受体凋亡和内源性或线粒体凋亡是凋亡启动的2种不同机制<sup>[10]</sup>。细胞凋亡增加可能会对精子产生不利影响,最终损害男性的生育能力<sup>[11]</sup>。本研究旨在探究氧化应激及细胞凋亡在肾虚血瘀型OAS大鼠精子质量及睾丸组织损伤中的作用及补气活血益精方的药理作用。

## 材料、对象与方法

### 1 材料

**动物** SPF级健康雄性斯普拉格-道利(Sprag-Dawley,SD)大鼠,鼠龄6~8周,体质量180~220g,购自北京斯贝福生物技术有限公司。动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。本实验经甘肃中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:SY2024-316)。

**药品与试剂** 雷公藤多苷片:规格:每片10mg,批号:20231104,批准文号:Z43020138,湖南千金协力药业有限公司生产。左卡尼汀口服液:规格:每支10mL,批号:240219,批准文号:H19990372,东北制药集团沈阳第一制药有限公司生产。补气活血益精方由熟地黄15g:批号:16091307、麸炒山药15g:批号:2402007、酒萸肉15g:批号:YP02-2309013、红花5g:批号:180707、鸡血藤20g:批号:1801137、丹参15g:批号:170301、当归15g:批号:20180101、桑寄生15g:批号:202404002、桑葚15g:批号:24011602、炙淫羊藿15g:批号:202204002、炙黄芪30g:批号:24060602组成,中药饮片均购于甘肃中医药大学附属医院中药房,经甘肃中医药大学附属医院药学部靳子明教授鉴定为正品;反转录试剂盒,批号:11141ES60(H9305270),上海翊圣生物科技有限公司生产;荧光定量试剂盒,上海翊圣生物科技有限公司生产;Trizol-Reagent,ambion生产;活性氧(reactive oxygen species,ROS)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所生产。

**仪器** SAS-DM6精液分析仪,上海朗逸医疗器械有限公司产品;D-315病理切片机、YD-AB3组织摊片机、YD-6L生物组织冷冻包埋机,金华市益迪医疗设备有限公司产品;SN100680221显微拍照系统,山东志盈医学科技有限公司产品;K5800微量核酸测定仪,北京凯奥科技发展有限公司产品;A300聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增仪,杭

州朗基科学仪器有限公司产品;荧光定量PCR仪,ROCGENE产品。

### 2 实验方法

#### 2.1 药物制备

补气活血益精方由熟地黄15g、麸炒山药15g、酒萸肉15g、红花5g、鸡血藤20g、丹参15g、当归15g、桑寄生15g、桑葚15g、炙淫羊藿15g和炙黄芪30g组成,将以上药材浸泡30min,大火煮沸后转为文火继续煎煮40min,滤出药液后再次加水煎煮40min,将2次药液充分混匀,浓缩至含生药量 $2\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,置于4℃冰箱冷藏备用。

#### 2.2 模型建立

将SD大鼠随机分为空白组(10只),肾虚血瘀型OAS组(50只)。根据文献<sup>[12]</sup>的方法,肾虚血瘀型OAS组用雷公藤多苷(glycosides of *Tripterygium Wilfordii*,GTW)灌胃4周,4周后随机抽取空白组2只,造模组6只,通过精子质量检测及大鼠一般情况观察验证肾虚血瘀型OAS大鼠模型。正常对照组给予等量生理盐水灌胃4周。

#### 2.3 动物分组与处置方法

将44只肾虚血瘀型OAS大鼠模型随机分为模型组、补气活血益精方低、中、高剂量组、左卡尼汀组,每组8只,余4只大鼠备用。参照人与实验动物给药剂量的换算方法<sup>[13]</sup>,左卡尼汀组灌胃左卡尼汀口服液( $1.8\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左卡尼汀口服液,qd,连续28d),补气活血益精方低、中、高剂量组分别予以(7.87、15.75、31.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 中药汤剂灌胃,qd,连续28d)。空白组和模型组给予等量0.9%NaCl灌胃。

#### 2.4 大鼠一般情况观察

观察大鼠的一般情况,包括毛发、精神状态、活动度、大小便及睾丸血管脉络等方面。

#### 2.5 睾丸及附睾指数测定

使用精密天平称取大鼠体质量及两侧睾丸及附睾的总质量。按照公式“睾丸/附睾指数=双侧睾丸/附睾质量(mg)/体质量(g)”计算出相应的睾丸/附睾指数。

#### 2.6 精子浓度及活力测定

末次给药24h后,记录大鼠体质量,用1%戊巴比妥麻醉后处死大鼠,迅速分离附睾,将双侧附睾置于含3mL(37℃)温水的离心管充分剪碎,用自动精子分析仪检测精子浓度和活力。

#### 2.7 苏木精-伊红染色观察睾丸组织的病理学变化

将大鼠左侧睾丸组织固定于4%多聚甲醛溶液,用酒精、二甲苯脱水透明后,石蜡包埋,制作3~5 $\mu\text{m}$

厚切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,脱水封片晾干,显微系统拍照并观察睾丸组织的病理形态变化。

## 2.8 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测大鼠睾丸组织 ROS 强度、CAT 及 SOD 活力

用组织研磨机研磨睾丸组织,用于 ROS 强度、CAT 及 SOD 活力测量。所有检测均根据所售试剂盒的说明进行,ROS 强度检测:开盖前短暂离心试剂,荧光探针标记,用 96 孔细胞培养板检测;CAT 及 SOD 活力检测:精准称取组织重量,按组织重量(g)与生理盐水体积(mL)1:9 的比例,加入 9 倍体积生理盐水,以  $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 分钟,取上清液,用试剂盒进行测定。

## 2.9 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative-polymerase chain reaction, q-PCR)检测大鼠睾丸组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cysteine-asspartic acid protease-3, Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤 2 蛋白(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) mRNA 表达水平

用 TRIzol 试剂从大鼠睾丸中提取总 RNA, cDNA 合成通过去除基因组 DNA 后,利用反转录试剂盒在 PCR 仪中完成。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)为内参, qPCR 部分采用 SYBRGreenMix、特定引物及两步法扩增程序进行检测。mRNA 表达水平使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算,见表 1。

## 2.10 统计分析

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,当数据同时满足正态分布及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析;不满足正态分布或方差不齐时,组间比较用非参数检验。

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequences

Gene(R)	Prime	Product length	Login ID
Bax	F: AGACACCTGAGCTGACCTTG	97	NM_017059.2
	R: TTGTGTCCAGTTCATCGCCA		
BCL2	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	85	NM_016993.2
	R: GATGCCGGTTCAGTACTCA		
Caspase-3	F: GCTTGGAAACCGAAGAAA	222	NM_012922.2
	R: CCATTGCGAGCTGACATTCC		
GAPDH	F: CATCTTCTGTGAGTGGC	217	NM_017008.4
	R: ACCAGCTTCCCATTCTCAG		

## 结 果

### 1 补气活血益精方对大鼠一般情况的影响

与空白组大鼠相比,造模组大鼠进食量与饮水量开始逐渐减少,精神状态愈发萎靡,行动迟缓呆滞,对周围环境的刺激反应迟钝;毛发稀疏且失去光泽,色泽晦暗;从排泄系统的表现来看,大鼠的小便量明显减少,大便干结,排泄过程相对困难;可以清晰地发现大鼠睾丸组织外表血管脉络变呈现充盈胀满的态势,颜色也从原本的正常色泽转变为紫黯之色,这些表现与中医理论中肾虚血瘀证型的症状高度吻合。

### 2 补气活血益精方对睾丸及附睾指数的影响

与空白组相比,模型组睾丸指数可见显著减低( $P < 0.01$ );与模型组相比,左卡尼汀组睾丸指数可见显著上升( $P < 0.05$ ),补气活血益精方中、高剂量组大鼠睾丸指数均可见显著上升(均  $P < 0.01$ ),补气活血益精方低剂量组睾丸指数在统计学上差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

与空白组相比,模型组附睾指数可见明显减低( $P < 0.01$ );与模型组相比,补气活血益精方低、中剂量组和左卡尼汀组附睾指数上升不明显( $P > 0.05$ ),补气活血益精方高剂量组大鼠附睾指数可见显著上升( $P < 0.01$ ),见表 2。

### 3 补气活血益精方对大鼠精子质量的影响

与空白组相比,模型组大鼠精子活力显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,左卡尼汀组、补气活血益精方中、高剂量组大鼠精子活力均显著升高(均  $P < 0.01$ )。与空白组相比,模型组大鼠精子浓度均显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,左卡尼汀组、补气活血益精方高剂量组大鼠精子浓度均显著升高(均  $P < 0.01$ ),补气活血益精方低、中剂量组精子浓度在

表 2 补气活血益精方对各组睾丸及附睾指数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of Qi-supplementing, blood-activating and essence-benefiting formula on testicular and epididymal indexes of rats in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Dose	n	Testicular index (%)	Epididymal index (%)
Normal	-	8	0.83 ± 0.09	0.36 ± 0.05
Model	-	8	0.55 ± 0.10 <sup>##</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>##</sup>
Experimental - L	7.87 g · kg <sup>-1</sup>	8	0.55 ± 0.07 <sup>##</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>##</sup>
Experimental - M	15.75 g · kg <sup>-1</sup>	8	0.71 ± 0.12 <sup>##*</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>##</sup>
Experimental - H	31.5 g · kg <sup>-1</sup>	8	0.81 ± 0.08 <sup>**</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>**</sup>
Levocarnitine	1.8 ml · kg <sup>-1</sup>	8	0.67 ± 0.07 <sup>##*</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>##</sup>

Compared with normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表3 补气活血益精方精子浓度及活力测定的影响( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 3** Effects of Qi-supplementing, blood-activating and essence-benefiting formula on sperm concentration and motility measurement of rats in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Sperm concentration $\times 10^6/\text{mL}$	Sperm motility (%)
Normal	24.11 $\pm$ 11.64	86.93 $\pm$ 12.00
Model	4.65 $\pm$ 2.48 <sup>##</sup>	33.46 $\pm$ 16.13 <sup>##</sup>
Experimental - L	6.75 $\pm$ 3.81 <sup>##</sup>	53.01 $\pm$ 21.71 <sup>##*</sup>
Experimental - M	11.60 $\pm$ 7.78 <sup>##</sup>	63.15 $\pm$ 24.35 <sup>##**</sup>
Experimental - H	21.72 $\pm$ 7.81 <sup>**</sup>	79.97 $\pm$ 10.22 <sup>**</sup>
Levocarnitine	23.22 $\pm$ 8.80 <sup>**</sup>	75.83 $\pm$ 25.05 <sup>**</sup>

Dose and *n* refer to table 2; Compared with normal group, <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01; Compared with model group, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01.

统计学上差异无统计学意义(*P* > 0.05), 见表3。

#### 4 补气活血益精方对大鼠睾丸组织病理结构的影响

HE染色结果显示:空白组大鼠曲细精管结构完整,管腔呈圆形或椭圆形,生精细胞排列整齐,可见成熟精子;模型组曲细精管形态不规则,局部曲细精管数量减少,管周膜增生,小血管扩张充血,并血栓形成;与模型组比较,经补气活血益精方组和左卡尼汀组治疗后,睾丸组织病变明显改善,精曲小管结构相

对完整,生精细胞排列比较整齐,腔内正常精子量增多,补气活血益精方高剂量组与正常组结构相近。说明补气活血益精方能够修复肾虚血瘀型OAS大鼠的睾丸组织损伤,见图2。

#### 5 补气活血益精方对大鼠睾丸组织CAT、ROS、SOD的含量的影响

ELISA检测结果显示:模型组大鼠睾丸组织ROS强度相较空白组明显升高,CAT、SOD活力均显著降低(均*P* < 0.01)。与模型组比较补气活血益精方可以降低ROS强度(*P* < 0.05, *P* < 0.01),升高CAT、SOD活力(均*P* < 0.01);在给予左卡尼汀治疗后,大鼠睾丸组织中ROS强度相较模型组显著降低,CAT、SOD活力升高(均*P* < 0.01),见表4。

#### 6 补气活血益精方对睾丸组织Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA相对表达量的影响

模型组大鼠睾丸组织中Bax、Caspase-3 mRNA相对表达量增加,Bcl-2 mRNA相对表达量降低,与空白组比较有显著性差异(均*P* < 0.01);与模型组比较,补气活血益精方各剂量组和左卡尼汀组Bax、Caspase-3 mRNA相对表达量下降(*P* < 0.05, *P* < 0.01),Bcl-2 mRNA相对表达量上升(*P* < 0.01)。

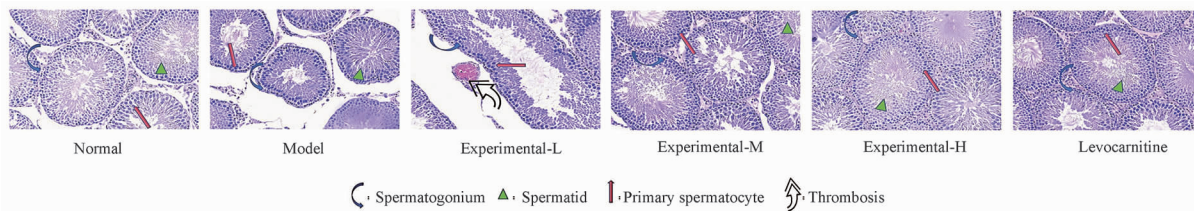


图2 各组大鼠睾丸组织苏木精-伊红(HE)染色结果

**Figure 2** Hematoxylin eosin (HE) staining of testicular tissues from each group of rats

表4 补气活血益精方对大鼠睾丸组织氧化应激指标和凋亡相关指标的影响

**Table 4** Effects of Qi-supplementing, blood-activating and essence-benefiting formula on oxidative stress indexes and apoptosis related indexes in testicular tissues of rats in different groups

Group	ROS	CAT( $\text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ )	SOD( $\text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ )	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase3 mRNA
Normal	597.926.11 $\pm$ 87.518.20	1.40 $\pm$ 0.11	2.41 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.03
Model	925.239.02 $\pm$ 95.539.79 <sup>##</sup>	0.56 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup>	1.65 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	1.78 $\pm$ 0.07 <sup>##</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>	1.95 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup>
Experimental - L	846.676.84 $\pm$ 64.867.76 <sup>##*</sup>	0.77 $\pm$ 0.11 <sup>##**</sup>	1.79 $\pm$ 0.33 <sup>##**</sup>	1.50 $\pm$ 0.04 <sup>##**</sup>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>##**</sup>	1.81 $\pm$ 0.03 <sup>##**</sup>
Experimental - M	784.277.73 $\pm$ 81.354.32 <sup>##**</sup>	0.95 $\pm$ 0.13 <sup>##**</sup>	1.90 $\pm$ 0.04 <sup>##**</sup>	1.39 $\pm$ 0.02 <sup>##**</sup>	0.49 $\pm$ 0.02 <sup>##**</sup>	1.68 $\pm$ 0.03 <sup>##**</sup>
Experimental - H	658.228.04 $\pm$ 82.768.68 <sup>**</sup>	1.15 $\pm$ 0.12 <sup>##**</sup>	2.21 $\pm$ 0.05 <sup>##**</sup>	1.12 $\pm$ 0.04 <sup>##**</sup>	0.87 $\pm$ 0.02 <sup>##**</sup>	1.18 $\pm$ 0.07 <sup>##**</sup>
Levocarnitine	725.740.12 $\pm$ 87.846.36 <sup>##**</sup>	1.03 $\pm$ 0.11 <sup>##**</sup>	2.06 $\pm$ 0.04 <sup>##**</sup>	1.27 $\pm$ 0.04 <sup>##**</sup>	0.66 $\pm$ 0.05 <sup>##**</sup>	1.49 $\pm$ 0.08 <sup>##**</sup>

Dose and *n* refer to table 2; ROS: Reactive oxygen species; CAT: Catalase; SOD: Superoxidized dismutase; Compared with normal group, <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01; Compared with model group, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01

## 讨 论

补气活血益精方由熟地黄、麸炒山药、酒萸肉、炙黄芪、当归、炙淫羊藿、桑葚、桑寄生、红花、丹参、鸡血藤等

11味中药组成,具有益肾填精,化瘀通络之效。补气活血益精方为甘肃中医药大学附属医院邢喜平主任医师自拟方,邢喜平主任医师认为少弱精子症的核心病机为“肾虚血瘀”,主张以“益肾填精,化瘀通络”为其主要治法。方

中熟地黄、麸炒山药、酒萸肉补益肝肾,益髓填精;黄芪、当归补气生血,以血化精;淫羊藿温补肾阳,桑葚、桑寄生益阴敛营,增水盈精,三药相伍,阴阳并补,动静相依。此外,红花合当归、鸡血藤活血化瘀,配伍黄芪则补气行血。全方相伍,肾、肝、脾同养,气、血、精并补。

左卡尼汀是一种天然存在的化合物,被认为是治疗男性不育的潜在方法,可能改善精子参数<sup>[14]</sup>。左卡尼汀可以通过促进脂肪酸氧化为精子运动成熟提供能量,保护精子质膜免受活性氧的损害<sup>[15]</sup>。因此本研究采用左卡尼汀为阳性对照药物。此外本研究使用肾虚血瘀型 OAS 经典造模方法(GTW 灌胃)。造模后,与空白组大鼠比较,肾虚血瘀型 OAS 大鼠出现精神萎靡,行动迟缓,反应迟钝,毛发稀疏,色泽晦暗,小便减少,大便干结,睾丸组织外表血管脉络充盈胀满,颜色紫黯,与以往报告相符<sup>[12]</sup>。表明 GTW 可造模肾虚血瘀型 OAS 大鼠模型,而补气活血益精方对症肾虚血瘀证型,并可有效改善症状。诸多研究表明,补肾活血类药物可改善睾丸组织病理损害<sup>[16]</sup>。补气活血益精方在长期临床及临床研究中取得了良好疗效,证明补气活血益精方可有效改善肾虚血瘀型 OAS 患者精子浓度及活力,但具体机制目前尚不清楚。

为此,我们构建了肾虚血瘀型 OAS 大鼠模型,之后给予补气活血益精方。结果显示,补气活血益精方治疗后,大鼠一般情况改善,睾丸及附睾指数上升,在大鼠精子活力方面,补气活血益精方高剂量组治疗效果更优,在精子浓度改善方面,左卡尼汀组优于补气活血益精方各治疗组。补气活血益精方也改善了大鼠精子的凋亡状况,以及大鼠精原细胞、初级精母细胞、成熟精子等生精细胞数量减少,曲细精管形态不规则等现象。这些结果都充分说明补气活血益精方对少弱精症的治疗作用,为进一步探明机制,进行了 ELISA 和 q-PCR 实验,结果表明,模型组 ROS 强度明显升高,Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量明显增加,CAT、SOD 等活性及 Bcl-2 mRNA 相对表达量明显降低,而补气活血益精方可以回调这些 mRNA 及抗氧化酶的改变。以上一系列结果说明,补气活血益精方发挥治疗作用很可能就是通过氧化应激及细胞凋亡途径实现的。

综上所述,本实验结果显示,补气活血益精方能够有效保护肾虚血瘀型 OAS 大鼠的精子细胞和睾丸组织损伤,其作用机制可能与调控氧化应激及细胞凋亡有关。本研究为少弱精症患者临床治疗提供了一定理论基础。

## 参考文献:

[1] BAHRI H, BEN KHALIFA M, BEN RHOUMA M, et al. Decline in

semen quality of North African men: A retrospective study of 20, 958 sperm analyses of men from different north African countries tested in Tunisia over a period of 6 years (2013–2018) [J]. *Ann Hum Biol*, 2021, 48(4):350–359.

[2] HOLDEN C A, MCLACHLAN R I, PITTS M, et al. Men in Australia Telephone Survey (MATEs): A national survey of the reproductive health and concerns of middle-aged and older Australian men [J]. *Lancet*, 2005, 366(9481):218–224.

[3] 邢喜平,王新平,王虎平,等. 补气活血益精方对少弱精子不育症患者的精子密度及活力的影响 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2016, 33(5):51–53.

[4] AGARWAL A, SAID T M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach [J]. *BJU Int*, 2005, 95(4):503–507.

[5] BDEIR R, ALJABALI S M, BANIHANI S A. Role of pyridoxine and oxidative stress in asthenozoospermia [J/OL]. *Heliyon*, 2024, 10(14):e34799. 2024-07-19 [2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39148988/>.

[6] HUSSAIN T, KANDEEL M, METWALLY E, et al. Unraveling the harmful effect of oxidative stress on male fertility: A mechanistic insight [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14:e1070692. 2023-02-13 [2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36860366/>.

[7] 梁嘉颖,郑毅春,李子涛,等. 男性不育症患者 GST 基因多态性与精子质量、氧化应激、细胞凋亡的相关性研究 [J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(6):719–722, 726.

[8] 刘黎明,张爱平,高永泽,等. 糖尿病性勃起功能障碍与细胞凋亡的研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2023, 15(25):122–127.

[9] AGARWAL A, MULGUND A, SHARMA R, et al. Mechanisms of oligozoospermia: An oxidative stress perspective [J]. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2014, 60(4):206–216.

[10] LOSSI L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis [J]. *Biochem J*, 2022, 479(3):357–384.

[11] LEISEGANG K, SENGUPTA P, AGARWAL A, et al. Obesity and male infertility: Mechanisms and management [J/OL]. *Andrologia*, 2021, 53(1):e13617. 2020-05-12 [2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32399992/>.

[12] 孙自学,邱荃,何鑫,等. 益肾通络方对少弱精子症大鼠睾丸组织 PI3K-AKT-mTOR 通路、CatSper-1、HSPA2 蛋白及 mRNA 表达的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2022, 28(05):437–444.

[13] 郑振辉,周淑佩,彭双清. *实用医学实验动物学* [M]. 北京:北京大学医学出版社,2008.

[14] WU C, ZHU M, LU Z, et al. L-carnitine ameliorates the muscle wasting of cancer cachexia through the AKT/FOXO3a/MaFbx axis [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2021, 18(1):98.

[15] 周昕,孔飞燕,丁豪帅,等. 左卡尼汀在生殖领域中应用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2020, 60(11):106–110.

[16] SANSONE L, BARRECA F, BELLI M, et al. Infertility in Fabry's Disease: role of hypoxia and inflammation in determining testicular damage [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15:e1340188. 2024-02-22 [2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38455658/>.

(收稿日期 2025-03-20)