

二仙汤及其拆方对肾阳虚证小鼠附睾 P34H、Prdx6 的影响*

刘朝圣¹, 龚 坚¹, 何清湖^{1△}, 周 兴², 赵建业¹, 陈虹历¹

(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** 探讨补肾中药复方二仙汤及其拆方对肾阳虚证小鼠附睾精子成熟微环境的影响。**方法** 60 只成熟雄性 ICR 小鼠随机挑选 10 只作为正常对照组, 其余 50 只小鼠腹腔注射地塞米松磷酸钠 25mg/(kg·d), 连续 2 周, 造模肾阳虚证。造模成功后, 随机分成 5 组: 模型组、二仙汤全方组、温肾益精组、滋阴降火组、调理冲任组, 每组 10 只, 模型组、正常组予蒸馏水, 其余各组予相应中药汤药灌胃, 按体质量给予相应剂量, 每天 2 次, 连续 21d。停药 24h 后处死动物, 免疫组化法检测各组附睾抗人精子表面蛋白 34H (P34H) 表达, Western Blot 法检测过氧化物酶 6 (Prdx6) 的表达。**结果** 肾阳虚证小鼠附睾 P34H、Prdx6 表达量明显低于正常对照组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 二仙汤全方组、温肾益精组表达量明显高于模型组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 调理冲任组、滋阴降火组与模型组表达组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 二仙汤及其拆方可影响肾阳虚证小鼠附睾 P34H、Prdx6 表达, 进而影响精子成熟, 其中以二仙汤全方及温肾益精组作用最为明显。

关键词: 二仙汤; 肾阳虚证; 抗人精子表面蛋白 34H; 过氧化物酶 6; 精子成熟

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)02-0006-05

当前男性生殖健康的形势十分严峻。国内外的流行病学调查均表明, 代表男性生殖能力的关键指标——精液质量在不断下降。研究报道, 人类精子数量可能平均每年以 2% 的速度下降, 精子的质量也在降低, 男性不育症的发病率已从 8%~10% 上升到了 12%~16%^[1]。男性生殖健康问题及其保健日益成为医学领域的研究热点。

近几十年来研究表明, 精子成熟障碍是男性不育的重要原因之一, 是严重影响精子质量的关键环节。随着现代细胞与分子生物学研究的深化, 已证实附睾与精子成熟密切相关。附睾是精子成熟的管内环境, 附睾内的微环境及相关因子的表达直接影响精子成熟、活力, 如: 中性 α -糖苷酶、果糖、前列腺特异性抗原、精浆锌等^[2-3]。因此, 从分子及基因水平研究附睾微环境对精子成熟的影响具有重要

意义。本文通过观测二仙汤及其拆方对肾阳虚证雄性小鼠附睾精子成熟相关抗人精子表面蛋白 34H (P34H)、过氧化物酶 6 (Prdx6) 等表达含量变化, 探讨温补肾阳法对雄性小鼠附睾精子成熟微环境的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 ICR 小鼠 60 只, 体质量 (20 $\pm$ 3)g, 鼠龄 7~8 周, 符合国家二级动物标准 (批号: YD35708)。室温 16~20℃, 湿度 65%~70%, 自由饮食进食 (以上均由湖南中医药大学实验动物中心提供)。

1.2 药物及其制备

二仙汤全方由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母 6 味中药组成 (从我校附属第一医院药剂

* 基金项目: 湖南省科技计划项目 (2012SK3138); 国家自然科学基金 (81373641); 重庆市人社局博士后特别资助; 湖南省教育厅科学研究一般项目 (13C679); 长沙市科技计划项目 (K1301014-31)

收稿日期: 2015-01-31

作者简介: 刘朝圣 (1977-), 男, 湖南浏阳人, 医学博士, 副教授, 重庆市中医院 (重庆医科大学) 在站博士后, 主要研究方向: 中西医结合男性病、皮肤性病。

△通信作者: 何清湖, E-mail: hqh1111@tom.com

科购买)。分组方法:①全方组(含生药 1.2g/mL);②温肾益精组(含生药 0.6g/mL):仙茅、淫羊藿、巴戟天。③滋阴泻火组(含生药 0.4g/mL):知母、黄柏。④调理冲任组(含生药 0.2g/mL):当归。各组中药按组浸泡 12h,武火煮沸,文火煮 0.5h,取药液;再加入双蒸水,武火煮沸,文火煮 0.5h,取药液,将 2 次药液合并,浓缩至所需生药含量(按生药计算)。再按生药与无水乙醇 2:3 的体积比加入适量的无水乙醇,4℃静置 24h,以 2 000r/min 的转速离心 15min,取上清,浓缩药物至所需含量,4℃冰箱中保存备用。每次制备 1 周用量。

1.3 主要试剂及仪器

地塞米松磷酸钠注射液,批号:20130127;规格:5mg/mL;国药集团容生制药有限公司;P34H 组化试剂盒(NO.K5007)、DAB 显色剂购自上海拜力生物科技有限公司(DAKO);ACTIN (NO.SC-1616R)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(NO.G2003)、蛋白抽提试剂盒(NO.G2001、G2002)、丽春红染液(NO.G2011)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(NO.P0006)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(NO.G2014)等均购自武汉谷歌生物科技有限公司;DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂);752-P 紫外可见光分光光度计(上海现科仪器有限公司);Epson Perfection V300 Photo 扫描仪(Epson);JJ-12J 型号脱水机(武汉俊杰电子有限公司生产);KD-BM 型号包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司生产);JB-L5 型号冻台(武汉俊杰电子有限公司生产);RM2016 型切片机(上海徠卡仪器有限公司生产);KD-P 型摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司生产);DGX-9003B 型烘箱(上海福玛实验设备有限公司生产);NIKON ECLIPSE TI-SR 型倒置荧光显微镜(日本尼康生产);NIKON DS-U3 型成像系统(日本尼康生产)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组

从 60 只小鼠中随机挑选 10 只编成正常对照组,将剩余 50 只小鼠造模成功后,按随机原则编号,称重记录;并按随机排列表法将 50 只小鼠分成 5 组:模型组、二仙汤全方组、温肾益精组、滋阴降火组、调理冲任组,每组 10 只。

1.4.2 造模方法及结果

50 只小鼠每日腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液 25mg/(kg·d)。连续 2 周^[4]。造模组动物在给药 14d 内相继出现体质量增长缓慢,畏寒肢冷,精神萎靡,多尿,体毛干枯不齐、稀疏、脱落、竖毛,反应迟钝,少动闭眼,尾部苍白等现象。14d 后随机抽取空白组及造模动物各 5 只,剪尾取血测睾酮(T)水平、促卵泡生成激素(FSH),促黄体生成激素(LH),结果显示造模组小鼠 T、FSH、LH 水平均较空白组降低(见表 1),两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),结合动物一般情况,判断造模成功。

表 1 地塞米松对小鼠的影响($\bar{x}\pm s$) (mIU/mL)

组别	n	T	FSH	LH
正常对照组	5	241.14±9.45*	1.63±0.21*	3.10±0.15*
造模组	5	149.17±18.67	1.38±0.22	2.54±0.19

注:与造模组比较,* $P<0.05$

1.4.3 给药方法与药量

50 只造模小鼠均造模成功后开始给药,二仙汤全方组、温肾益精组、滋阴降火组、调理冲任组给予相应中药灌胃,正常对照组、模型组给予蒸馏水灌胃,根据各鼠体质量给予相应剂量,分别以成人 25g/(70kg·d)的标准折算;每天 2 次,连续 21d;于停药后的第 2 天,处死动物,取附睾组织固定并进行以下指标检测。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 P34H 表达

取未染色右侧附睾组织切片用 DAKO 的组化试剂盒 DAB 显色剂作免疫组织化学染色。4μm 厚石蜡切片按常规脱蜡至水,按 SP 法免疫组化染色常规检测附睾标本中 P34 表达。兔抗小鼠 P34 多克隆抗体(一抗)的工作浓度为 1:50。实验设 PBS 替代一抗作为空白阴性对照。

阳性细胞图像分析:所有标本均在 Motic Mes6.0 数码医学图像分析系统内在相同的放大倍数下,每个时间段取 3 只大鼠的睾丸组织切片,计数 13 个视野,P34H 均以阳性细胞染色的积分光密度值(OD)值来表示抗原表达量。P34H 蛋白染色均为棕黄色,呈颗粒状、团块状、弥漫状分布于阳性细胞的胞核中。

1.5.2 过氧化物酶 6(Prdx6)测定

以β-肌动蛋白(β-Actin)作为内标,采用 West-

ern Blot 法测取 Prdx6 蛋白上样量及其灰度值,并显影。剪碎左侧附睾,冰上匀浆,匀浆液在离心管中反复震荡,促使细胞破裂,后以 12 000g 离心 5min,收集上清,即为总蛋白溶液;采用 Bradford 方法测定蛋白浓度,制作标准曲线;在样品上样量均为 40 μ g 的蛋白样品中加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液使其终浓度为 1 $\times$,95~100 $^{\circ}$ C 处理 5min;然后按浓缩胶 75V、分离胶 120V 进行恒压电泳,至溴酚蓝刚出胶;按照 200mA、1h 条件的进行转膜至活化的 PVDF 膜;将转好的膜于室温下脱色摇床上用 5%的脱脂牛奶(0.05%TBST 配),封闭 1h;稀释一抗(TBST 溶解的 5%脱脂牛奶),4 $^{\circ}$ C 过夜;用 TBST 洗 5min $\times$ 3 次;稀释二抗室温下孵育 30min,用 TBST 洗 5min $\times$ 3 次;等体积混匀 A 和 B 两种试剂,均匀滴加到膜的蛋白面侧,保持 1~2min,去尽残液,保鲜膜塑封,放入 X-光片夹中曝光,调整曝光条件,显影、定影;Alpha 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.6 统计

用 SPSS17.0 统计软件作数据分析。本研究的资料类型为计量资料,对资料进行正态性、方差齐性检验,若满足正态性和方差齐性则采用方差分析进行统计,否则采用非参数检验。

2 结果

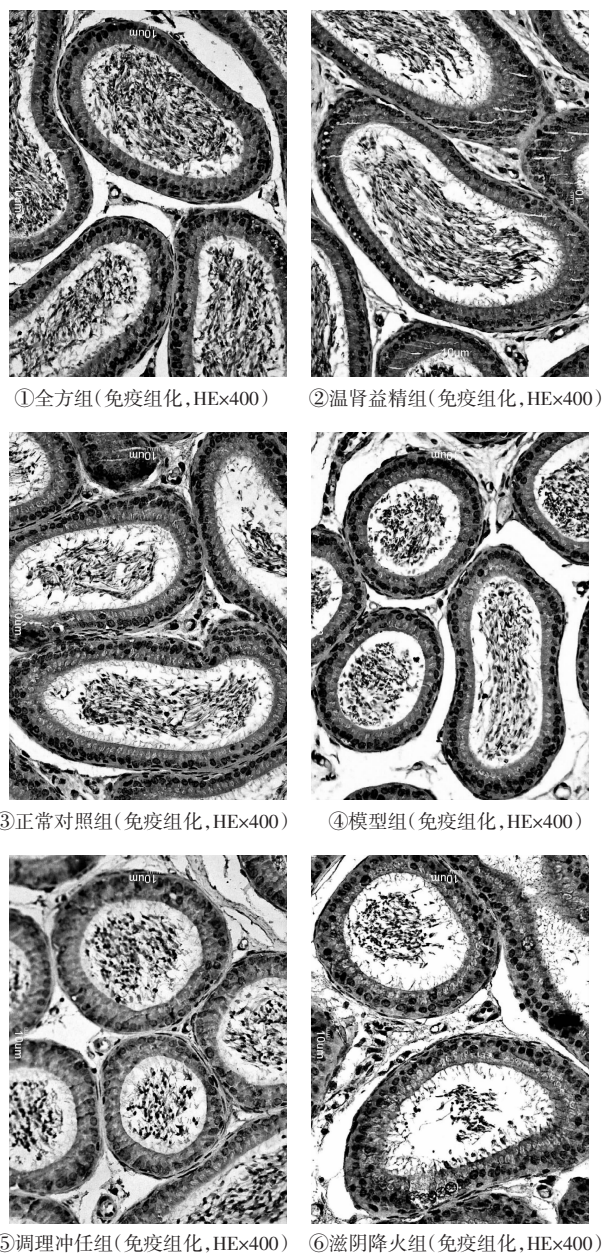
2.1 附睾中 P34H 表达比较

肾阳虚证模型组小鼠附睾 P34H 表达量明显低于正常对照组,组间差异有统计学意义($P<0.05$),二仙汤全方组、温肾益精组表达量明显高于模型组,组间差异有统计学意义($P<0.05$),调理冲任组、滋阴降火组与模型组表达组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 各组附睾中 P34H 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	P34H 表达
正常对照组	10	2574.05 $\pm$ 450.04
模型组	10	1893.18 $\pm$ 472.92*
全方组	10	4611.38 $\pm$ 1106.97 $^{\Delta}$
温肾益精组	10	3423.61 $\pm$ 539.56 $^{\Delta}$
调理冲任组	10	2286.68 $\pm$ 325.0
滋阴降火组	10	1422.58 $\pm$ 477.78

注: $F=35.033$, $P=0.000$;与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$



①全方组 P34H 密集、均匀分布在管腔内,有较高表达;②温肾益精组 P34H 密集分布在管腔中部,有较好表达;③正常对照组 P34H 表达密度适中;④模型组 P34H 大多分布在中央,表达密度不及正常对照组;⑤调理冲任组 P34H 凌乱的分布在管腔中,密度较低;⑥滋阴降火组管腔中 P34H 表达较少。

图 1 各组附睾 P34H 表达情况

2.2 过氧化物酶 6(Prdx6)表达比较

Western blotting 检测 6 组雄性附睾蛋白过氧化物酶 6 的表达,结果表明 6 组内参 Actin 的亮度比较一致,过氧化物酶 6 在全方组、温肾益精组的亮度高于调理冲任组、正常对照组、模型组、滋阴降火组,6 组亮度差异依次为:全方组>温肾益精组>调理

冲任组、正常对照组>模型组、滋阴降火组,见图2。测量吸光度值并取过氧化物酶6/Actin比值,与正常对照组、模型组吸光度比值相比,全方组、温肾益精组明显升高($P<0.05$),6组吸光度比值符合上述Western blotting亮度差异的比较,见表3、图2。

表3 各组附睾中 Prdx6 的表达(Prdx6/Actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Prdx6/Actin
正常对照组	10	0.341±0.062
模型组	10	0.251±0.061*
全方组	10	0.628±0.121* [△]
温肾益精组	10	0.547±0.100* [△]
调理冲任组	10	0.433±0.080
滋阴降火组	10	0.244±0.068

注: $F=30.988$, $P=0.000$;与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$

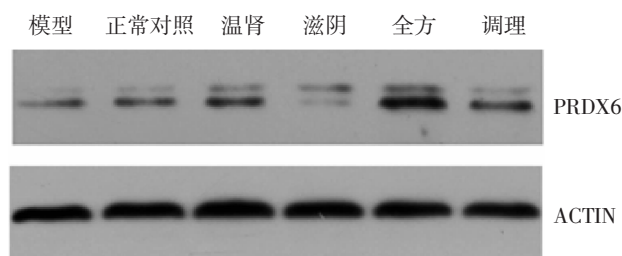


图2 各组附睾 Prdx6 表达

3 讨论

随着近年来学界对于附睾精子成熟的研究,越来越多的附睾精子成熟相关蛋白被发现与证明。P34H是由人附睾尾部上皮主细胞分泌并定位于精子顶体部位的精子表面蛋白,是短链脱氢酶还原酶(SDR)超家族成员,能够介导精子和透明带的结合,可作为附睾精子成熟的标志物,而且低水平的附睾精子蛋白P34H与原发性男性不育相关^[9];过氧化物酶6(peroxiredoxin6, Prdx6)已经被证明存在于睾丸Leydig细胞中,并在细胞中发挥重要的抗氧化作用^[6],而新的研究表明附睾头段及尾段管腔液中存在Prdx6^[7]。本实验分别通过免疫组化研究P34H, Western印迹研究Prdx6蛋白在小鼠附睾中的表达,实验表明,Prdx6与精子的成熟、贮存及保护有一定关系,其具体机制值得进一步深入研究。

中医药对男性不育、补肾中药及对附睾精子成熟的影响研究近年也取得较多进展^[8-9],付慧明等^[10]

的研究表明,补肾中药能够增加雄性大鼠附睾中乳酸脱氢酶和Na⁺-钾⁺-ATP酶的含量,从而调节附睾精子成熟。李轩等^[11]观察补肾中药五子衍宗丸对不育患者附睾功能和精子活力的影响,结果显示治疗组精子活力、α-糖苷酶较对照组均显著提高,证实补肾中药可以通过调整附睾功能,促进α-糖苷酶分泌,提高精子活力及精子活率,有效治疗不育症。而我们团队研究也表明,温阳补肾中药复方可以明显改善肾阳虚证小鼠症状,提高精液质量,调节血清相关性激素水平^[12],并且对小鼠附睾精子膜甘油-3-磷酸胆碱(GPC)有明显抑制作用^[13]。基于此类研究,本实验采用二仙汤研究其对附睾精子成熟相关蛋白的影响。

二仙汤由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母6味中药组成,方中仙茅、淫羊藿、巴戟天温肾阳,补肾精;黄柏、知母泻肾火、滋肾阴;当归温润养血,调理冲任。全方配伍特点是壮阳药与滋阴泻火药同用,以适应阴阳俱虚于下,而又有虚火上炎的复杂证候。由于方用仙茅、淫羊藿二药为主,故名“二仙汤”。以温肾阳、补肾精、泻相火、滋肾阴、调理冲任、平衡阴阳见长,临床应用广泛^[14]。本实验研究表明,二仙汤可促进附睾精子成熟相关蛋白P34H、过氧化物酶6(Prdx6)的表达,其中的温肾益精中药有相近效果,验证了补肾中药复方通过对附睾功能蛋白的影响,进而影响附睾精子成熟,为中医药防治男性不育的研究开辟一条新的途径。但二仙汤及温肾益精法如何影响附睾精子成熟相关蛋白的以及其对下丘脑—垂体—肾上腺——性腺轴系的结构和功能的影响有待深入,同时对其他相关蛋白的研究有待验证。

参考文献:

- [1] Irvine DS. Male reproductive health: cause for concern [J]. Andrologia, 2000, 32(4-5): 195-208.
- [2] 王瑞雪,刘睿智,袁宝明,等. 精浆果糖含量、中性α-糖苷酶和酸性磷酸酶活性与精液参数关系研究 [J]. 中国计划生育学杂志, 2006, 6: 353-355.
- [3] 高元奇,郑贤红,唐宇哲,等. 附睾及附属性腺对精子运动能力的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(2): 296-299.
- [4] 刘福春,李菊仙,丁光霞,等. 羟基脲所致小鼠“阳虚”及补肾药作用的初步研究 [J]. 中医杂志, 1985, 146(2): 67-69.

- [5] Legare C, Thabet M, Heard S, et al. Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis[J]. Biol Reprod, 2001, 64(2): 720-727.
- [6] 沈百欣, 卫中庆, 居小兵, 等. 邻苯二甲酸二丁酯诱导孕鼠尿道下裂模型后仔鼠睾丸细胞过氧化物酶 6 的表达[J]. 中国组织工程研究及临床康复, 2011, 15 (50): 9445-9448.
- [7] 王小强, 齐晓伟, 程露阳, 等. 过氧化物酶 6 在大鼠附睾中的表达及分布 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(3): 260-267.
- [8] 焦招柱, 郑燕飞, 王停, 等. 从“毒”、“虫”论治少弱精子症 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(4): 70-73.
- [9] 罗俊华, 巴元明. “肝肾同源”理论的研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(1): 91-93.
- [10] 付慧明, 关慧波. 补肾丹对雄性大鼠附睾相关酶的调节作用[J]. 中国医药指南, 2008, 6(15): 89-90.
- [11] 李轩, 白勇, 钟树怀, 等. 五子衍宗丸对不育患者附睾功能和精子活力的影响[J]. 光明中医, 2009, 24(7): 1222-1223.
- [12] 刘朝圣, 何清湖, 黄建松, 等. 天蚕壮阳散对肾虚证小鼠生殖能力影响的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(3): 26-28.
- [13] 刘朝圣, 曾顺. 天蚕壮阳散对肾阳证小鼠附睾精子膜 GPC 含量的影响[J]. 中国民间疗法, 2010, 18(9): 58-59.
- [14] 李荣群, 郑小爱, 庄爱文. 浅析二仙汤与肾虚证[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(4): 12-13.
- (编辑: 杨阳)

Effects of Erxian Decoction and its Disassembled on Expression of P34H, Prdx6 in the Epididymises of Mice with Kidney Yang Deficiency

LIU Chao-sheng¹, GONG Jian², HE Qing-hu^{1△}, ZHOU Xing³, ZHAO Jian-ye¹, CHEN Hong-li²

(1. College of integrated traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the effects of Erxian Decoction and its disassembled on microenvironment in which sperm become mature of mice with kidney yang deficiency. **Methods** 60 male ICR mice were randomly selected 10 as the blank control group, the other 50 mice by intraperitoneal injection of dexamethasone sodium phosphate 25mg/(kg·d), continued for 2 weeks, making model of kidney yang deficiency. After the success of modeling, the mice were randomly divided into 5 groups: model group, Erxian decoction side group, warm the kidney and nourish essence of life group, nourishing Yin group, regulating Chong and Ren group, 10 rats in each group, the model group, the control group were given with distilled water, while other groups were given corresponding Chinese medicine decoction gavage, to give the corresponding dose according to body weight, 2 times a day, for 21 consecutive days. Animals were sacrificed 24h after withdrawal, P34H epididymis protein expression in each group were detected by immunohisto chemistry, peroxidase 6 (Prdx6) expression was detected by Western Blot peroxidase. **Results** The syndrome of kidney yang deficiency mice epididymis P34H, the expression level of Prdx6 was significantly lower than the control group, there was significant difference between the groups ($P < 0.05$), the expression of Er Xian Decoction of whole group, warm the kidney and nourish essence of life group was significantly higher than that in model group, there was significant difference between the groups ($P < 0.05$), regulating Chong and Ren group, Yin group and model group, the expression of the differences between groups had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Erxian Decoction and its disassembled prescriptions can affect the kidney yang deficiency mice epididymis P34H, Prdx6 expression, thereby affecting the sperm maturation, in which Erxian Decoction and warm the kidney and nourish essence of life group are most obvious fine groups.

KEY WORDS: Erxian decoction; kidney yang deficiency; P34H; Prdx6; sperm maturation