·论著·

加味补阳还五汤调节TLR4/MyD88/NF-κB信号通路对少弱精子症大鼠锌稳态和生殖功能的影响

张岳阳[1],刘绍明[2],焦拥政[3],邹迪新[4],赵明[1],郭海溢[5]
(1. 中国中医科学院望京医院男科,北京 100102;2. 北京中医药大学附属东方医院男科,北京 100078;3. 中国中医科学院广安门医院男科,北京 100053;4. 中国中医科学院中药研究所/道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室,北京 100700;5. 中国中医科学院望京医院检验科,北京 100102)

摘要 目的 探讨加味补阳还五汤(BYHWD)对少弱精子症(OAS)大鼠锌稳态和生殖功能的影响及其作用机制。**方法** 将60只雄性SD大鼠随机分为对照(control)组、OAS组、左卡尼汀(L-carnitine,0.323 g/kg)组、BYHWD低剂量(BYHWD-L,19.5 g/kg)组、BYHWD中剂量(BYHWD-M,39 g/kg)组、BYHWD高剂量(BYHWD-H,78 g/kg)组,每组10只。除control组外,其余各组大鼠均采取腺嘌呤灌胃给药构建OAS模型。模型构建成功后,各组大鼠均灌胃处理,给予对应剂量药物或生理盐水,1次/d,持续4周。记录各组大鼠一般情况,检测精子计数及活力;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定各组血清睾酮(T)、雌二醇(E2)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成激素(LH)、催乳素(PRL)水平,睾丸组织白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平和含锌酶醇脱氢酶(ADH)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)水平;测定睾丸组织锌含量;HE染色观察各组睾丸组织病理改变;免疫组织化学检测各组睾丸组织Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、核转录因子-κB(NF-κB)蛋白的表达。**结果** 与control组相比,OAS组大鼠精子活力、精子计数、血清T和E2水平均明显降低,FSH、LH、PRL水平均明显升高,睾丸组织锌含量以及含锌酶ADH、ALP、LDH水平均显著降低,IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著升高,TLR4、MyD88、NF-κB蛋白表达均显著升高(均$P<0.05$);睾丸组织出现明显的病理损伤。与OAS组相比,各药物干预组大鼠精子活力、精子计数增加,血清T和E2水平升高,FSH、LH、PRL水平降低,睾丸组织锌含量以及含锌酶ADH、ALP、LDH水平升高,IL-1β、IL-6、TNF-α水平降低,TLR4/MyD88/NF-κB信号通路蛋白表达减少(均$P<0.05$);睾丸组织损伤程度减轻。**结论** BYHWD能够改善OAS大鼠的生殖功能,其作用机制可能与调节锌稳态和TLR4/MyD88/NF-κB信号通路,降低炎症反应有关。

关键词 加味补阳还五汤;少弱精子症;锌稳态;生殖功能;TLR4/MyD88/NF-κB信号通路
中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)06-0510-07
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250606.1519.026
DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2025.06.006

Effect of supplemented Buyang Huanwu decoction on zinc homeostasis and reproductive function through TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in oligoasthenozoospermia rats

ZHANG Yueyang[1],LIU Shaoming[2],JIAO Yongzheng[3],ZOU Dixin[4],ZHAO Ming[1],GUO Haiyi[5]
(1. Department of Andrology,Wang Jing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100102,China;2. Department of Andrology,Dongfang Hospital,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100078,China;3. Department of Andrology,Guang'anmen Hospital,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100053,China;4. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs,Institute of Chinese Materia Medica,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100700,China;5. Clinical Laboratory,Wang Jing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100102,China)

Abstract Objective To investigate the effects and mechanisms of supplemented Buyang Huanwu decoction (BYHWD) on zinc homeostasis and reproductive function in oligoasthenozoospermia (OAS) rats. **Methods** As many as 60 male SD rats were randomly divided into control,OAS,L-carnitine (0.323 g/kg),BYHWD low-dose (BYHWD-L,19.5 g/kg),BYHWD medium-dose (BYHWD-M,39 g/kg),and BYHWD high-dose (BYHWD-H,78 g/kg) groups,with 10 rats in each group. Except for the control group,all other groups were administered adenine by gavage to establish an OAS model. After successful construction of the model,each group was treated by gavage with the corresponding drug doses or physiological saline once daily for 4 weeks. The general condition of the rats was recorded,testicular and

基金项目:中国中医科学院科技创新工程课题(CI2021A02208);中国中医药信息学会科研课题项目(CACMS-KY-2024031-2024040)
作者简介:张岳阳(1980-),男,副主任医师,硕士.
通信作者:郭海溢,E-mail:ghyqilin@163.com
收稿日期:2024-09-29
网络出版时间:2025-06-09 14:34:11

epididymal coefficients were calculated, and sperm water volume and vitality were measured. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of serum testosterone (T), estradiol (E2), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin (PRL), as well as the levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α) and zinc containing enzymes alcohol dehydrogenase (ADH), alkaline phosphatase (ALP), and lactate dehydrogenase (LDH) in testicular tissue. The zinc content in testicular tissue were also measured. Pathological changes in testicular tissue were observed using hematoxylin eosin (HE) staining. Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and nuclear factor kappa-B (NF-κB) protein expression in testicular tissue were identified using immunohistochemistry. **Results** Compared to the control group, the OAS group exhibited significantly lower testicular and epididymal coefficients, sperm motility, sperm count, serum T and E2 levels ($P < 0.05$) and significantly higher FSH, LH, and PRL levels ($P < 0.05$). Furthermore, the OAS group showed significantly lower testicular tissue zinc content and levels of zinc containing enzymes ADH, ALP, and LDH ($P < 0.05$) than the control group. Conversely, IL-1β, IL-6, and TNF-α levels, along with protein expressions of TLR4, MyD88, and NF-κB were significantly higher in the OAS group than in the control group ($P < 0.05$). Compared to the OAS group, each drug intervention group showed improvements in testicular and epididymal coefficients, sperm motility, sperm count, T and E2 levels, testicular zinc content and zinc containing enzymes (ADH, ALP, and LDH) levels. Furthermore, the intervention groups demonstrated reduced FSH, LH, PRL, IL-1β, IL-6, and TNF-α levels, and TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** BYHWD improves the reproductive function of OAS rats, potentially by regulating zinc homeostasis and TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway, consequently reducing the inflammatory response.

Keywords supplemented Buyang Huanwu decoction; oligoasthenozoospermia; zinc steady state; reproductive function; TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway

少弱精子症（oligoasthenozoospermia，OAS）主要表现为精子数量及活力降低，约占男性不育发病率的75%，是导致男性不育的主要原因之一[1]。因此，积极治疗OAS对于改善不孕不育问题具有重要的临床意义。目前，OAS主要应用促性腺激素、雌激素受体调节剂、芳香酶抑制剂等药物进行治疗，多以经验治疗为主，在治疗上存在疗效不确切及不良反应较多等劣势，具有一定的局限性[2]。研究[3-4]显示，中医药在治疗OAS上显示出独特的优势，其能够通过调节全身代谢，改善内分泌及生殖功能来获得有效治疗，已经成为国内外学者研究的热点。中医学无OAS这一病名，多归属于“精少、精冷、精薄”等范畴，其主要病机多以肾精亏虚为主，夹杂血瘀、湿热、痰浊等，病变以肾、肝、脾部位为主。因此，针对OAS的中医药治疗多为补肾填精法。加味补阳还五汤（supplemented Buyang Huanwu decoction，BYHWD）由黄芪、桃仁、红花、川芎、当归、赤芍、地龙干、蒲黄、菟丝子组成，主要治则与补阳还五汤相同，具有补气活血，化瘀通络，补益肝肾等功效，是中医治疗气血虚血瘀之中风的经典方剂，后被推广使用异病同治用于多种疾病治疗[5-6]。最新研究[7]显示，BYHWD能够改善气虚血瘀型精索静脉曲张术后患者睾丸微循环及精液质量，提示其具有改善OAS的潜在治疗作用。但是，有关BYHWD治疗OAS的作用机制尚不清楚。既往研究[8]显示，锌水平的高低与男性生殖功能密切相关，锌水平降低是导致生殖功能障碍的重要原因之一。此外，研究[9]也证实，炎症反应与男性不育密切相关，炎症相关细胞因子参与了生精微环境的调节，能够直接影响精子的形成以及生精细胞的存活。Toll样受体（Toll-like receptor，TLR）4/髓样分化因子88（myeloid differentiation factor 88，MyD88）/核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）信号通路与免疫炎症反应密切相关，激活该信号通路能够显著促进炎性细胞因子的合成与释放，触发机体炎症反应[10]。既往研究[11]证实，TLR信号通路的活化与OAS睾丸组织病理损伤密切相关。因此，调控TLR4/MyD88/NF-κB信号通路介导的免疫炎症反应可能是改善OAS的重要途径。本研究构建OAS大鼠模型，从TLR4/MyD88/NF-κB信号通路角度探讨BYHWD对OAS大鼠生殖功能的影响及其作用机制，旨在为BYHWD治疗OAS提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物、主要试剂和仪器

SPF级雄性SD大鼠60只，体重180~200 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK（沪）2023-0008]。SD大鼠均放置于导科医药实验动物中心饲养，饲养条件：环境温度（22 ± 2）℃，相对湿度

50%~60%，光照/黑暗各12 h，自由饮食饮水。本研究获得北京中医药大学医学研究伦理委员会批准（批准号：LLSC2023080347）。

主要试剂包括腺嘌呤（上海麦克林生化科技股份公司，批号C10233004）；睾酮（testosterone，T）、雌二醇（estradiol，E2）、催乳素（prolactin，PRL）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司，批号H090-1-1、H102-1-2、H095-1-1）；促卵泡激素（follicle-stimulating hormone，FSH）、促黄体生成激素（luteinizing hormone，LH）（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号NM0784604866、NM06TFBN3282）；锌离子荧光探针[范德（北京）生物科技有限责任公司，批号151606-29-0]；醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase，ADH）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司，批号A083-2-1、A059-2-2、A020-2-2）；免疫组织化学检测试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号SP-9001）；TLR4抗体、MyD88抗体、NF-κB抗体（美国Cell Signaling Technology公司，批号14358、4283、8242）。

主要仪器包括ML-608JZ Ⅲ精子分析仪（南宁市松景天伦生物科技有限公司）、IX73倒置相差显微镜（北京瑞科中仪科技有限公司）、GH17-DR3506型酶标仪（北京海富达科技有限公司）、H-2050R-1型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）、KZ-IH-F型低温组织研磨仪（武汉塞维尔生物科技有限公司）、JY-SCZ8型垂直电泳槽及组件（北京君意东方电泳设备有限公司）、Gel dox XR+型凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司）。

1.2　方法

1.2.1　BYHWD药物制备：黄芪 15 g，桃仁 15 g，红花 10 g，川芎 10 g，当归10 g，赤芍 15 g，地龙干 10 g，蒲黄 10 g，菟丝子15g，均购自北京同仁堂药业有限公司，经中国中医科学院中药研究所/道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室邹迪新副研究员鉴定为正品，均符合2020版《中国药典》要求。煎煮2次，药液混合后蒸馏浓缩至2 g/mL，每包60 mL，并置于4 ℃冰箱存放备用。

1.2.2　OAS大鼠模型构建、分组及给药：将大鼠随机分为对照组（n = 10，control组）和造模组（n = 50）。依据文献[12]对造模组大鼠灌胃处理，给予腺嘌呤（300 mg/kg），1次/d，持续4周。分离睾丸组织进行组织病理学染色，若睾丸组织出现明显的病理结构损伤则表明OAS模型构建成功。将造模成功大鼠随机分为OAS组，左卡尼汀（L-carnitine，0.323 g/kg）组，BYHWD低剂量（BYHWD-L）组、中剂量（BYHWD-M）组、高剂量（BYHWD-H）组，每组10只。BYHWD-L、-M、-H组大鼠按照文献[13]及人体与动物给药剂量换算得出BYHWD灌胃处理给药剂量分别为19.5 g/kg、39 g/kg、78 g/kg；control组和OAS组大鼠给予等量生理盐水灌胃处理。各组大鼠持续干预4周。

1.2.3　精子活力及浓度测定：取各组大鼠一侧附睾，置于离心管内，加入3 mL生理盐水（37 ℃），剪碎，使用扩散法收集精子。经CASA系统检测各组大鼠精子数量及精子活力。

1.2.4　大鼠血清激素水平测定：干预结束后麻醉大鼠，腹主动脉采血5 mL置于离心管内，3 000 r/min，离心10 min，收集上清液血清，按照ELISA检测试剂盒说明书测定T、E2、FSH、LH、PRL水平。

1.2.5　HE染色观察睾丸组织病理学变化：各组大鼠干预结束后取睾丸组织，经4%多聚甲醛固定24 h，梯度乙醇脱水，常规制备切片，HE染色，光学显微镜下观察睾丸组织病理学变化。

1.2.6　睾丸组织锌总量和含锌酶水平检测：分别取50 mg睾丸组织，加入1 mL 65%硝酸，然后微波消解到溶液澄清透明，加入超纯水定容至10 mL，质谱仪检测锌含量。含锌酶水平检测按照检测试剂盒说明书操作完成。

1.2.7　睾丸组织炎性细胞因子测定：分别取50 mg睾丸组织，加入9 mL生理盐水（含有RAPA组织裂解液）充分碾磨组织，3 000 r/min，离心10 min，吸取上清液，按照ELISA检测试剂盒说明书检测白细胞介素（interleukin，IL）-1β、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor，TNF-α）水平。

1.2.8　免疫组织化学检测TLR4/MyD88/NF-κB信号通路蛋白表达：各组大鼠睾丸组织切片经3% H_2O_2 溶液孵育、抗原修复、10% BSA溶液封闭非特异性位点；孵育TLR4、MyD88、NF-κB一抗抗体（1 ∶ 200），4 ℃孵育16 h；滴加HRP标记的二抗，室温孵育40 min；滴加DAB显色液，显微镜下观察睾丸组织TLR4、MyD88、NF-κB蛋白表达。每组选取6张切片，每张切片选取3个不同视野观察，通过ImageJ软件分析蛋白

相对表达，并计算视野下的平均光密度值。

1.3　统计学分析

采取GraphPad Prim 6.0对数据进行统计分析。计量资料采用$\bar{x} \pm s$表示，2组间比较使用独立样本t检验，多组间比较使用单因素方差分析，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　BYHWD对OAS大鼠一般指标的影响

与control组相比，OAS组大鼠体重及睾丸重量略有降低，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与OAS组相比，各干预组大鼠体重及睾丸重量略有增加，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与control组相比，OAS组大鼠精子活力、精子计数均显著降低（$P < 0.05$）。与OAS组相比，各BYHWD干预组大鼠精子活力、精子计数均显著升高（$P < 0.05$），见表1。

2.2　BYHWD对OAS大鼠血清激素水平的影响

与control组相比，OAS组大鼠血清T和E2水平明显降低，FSH、LH、PRL水平明显升高（$P < 0.05$）。与OAS组相比，各BYHWD干预组大鼠血清T和E2水平明显升高，FSH、LH、PRL水平明显降低（$P < 0.05$），见表2。

表1　BYHWD对OAS大鼠一般指标的影响

Tab.1　Effects of BYHWD on general data in OAS rats

Group	n	Body weight (g)	Weight of testis (g)	Sperm motility (%)	Sperm count ($\times 10^6$)
Control	10	462.23 ± 32.22	1.75 ± 0.15	55.24 ± 6.10	8.20 ± 0.88
OAS	10	435.82 ± 41.34	1.65 ± 0.17	39.10 ± 2.10[1)]	3.18 ± 0.60[1)]
L-carnitine	10	453.66 ± 39.88	1.74 ± 0.18	54.29 ± 2.78[2)]	6.29 ± 0.82[2)]
BYHWD-H	10	451.39 ± 40.07	1.73 ± 0.11	55.02 ± 6.71[2)]	6.88 ± 0.74[2)]
BYHWD-M	10	446.07 ± 31.49	1.71 ± 0.19	53.22 ± 4.19[2)]	5.10 ± 0.60[2)]
BYHWD-L	10	441.23 ± 41.17	1.70 ± 0.16	51.19 ± 6.22[2)]	4.81 ± 0.81[2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. OAS group.

表2　BYHWD对OAS大鼠血清激素水平的影响

Tab.2　Effects of BYHWD on serum hormone levels in OAS rats

Group	n	T (pg/mL)	E2 (pg/mL)	FSH (pg/mL)	LH (pg/mL)	PRL (pg/mL)
Control	10	22.17 ± 2.19	140.66 ± 12.88	6.10 ± 0.72	9.26 ± 1.20	4.21 ± 0.52
OAS	10	8.19 ± 1.08[1)]	80.34 ± 8.16[1)]	14.69 ± 1.13[1)]	21.44 ± 2.12[1)]	15.66 ± 1.89[1)]
L-carnitine	10	18.92 ± 2.19[2)]	129.98 ± 10.18[2)]	7.81 ± 0.69[2)]	12.77 ± 1.86[2)]	6.46 ± 0.78[2)]
BYHWD-H	10	17.88 ± 1.97[2)]	126.33 ± 11.45[2)]	8.12 ± 0.85[2)]	14.55 ± 1.65[2)]	7.39 ± 0.91[2)]
BYHWD-M	10	15.39 ± 2.01[2)]	110.28 ± 12.05[2)]	8.92 ± 1.00[2)]	15.22 ± 2.00[2)]	8.44 ± 1.00[2)]
BYHWD-L	10	12.97 ± 1.38[2)]	102.00 ± 11.05[2)]	9.88 ± 1.12[2)]	16.33 ± 1.59[2)]	9.16 ± 1.02[2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. OAS group.

2.3　BYHWD对OAS大鼠睾丸组织病理形态的影响

HE染色显示，control组大鼠睾丸组织内曲细精管形态，结构正常，各级生精细胞排列整齐，无明显病理学改变。与contol组相比，OAS组大鼠睾丸组织曲细精管明显皱缩、变形，生精小管上皮变薄，生精细胞数量明显减少，排列紊乱，层次不清，且管腔内精子量明显减少。与OAS组相比，各BYHWD干预组大鼠上述病理学改变均明显改善，其中以BYHWD-H组大鼠睾丸组织病理损伤改善最为显著，见图1。

2.4　BYHWD对OAS大鼠睾丸组织锌含量和含锌酶表达的影响

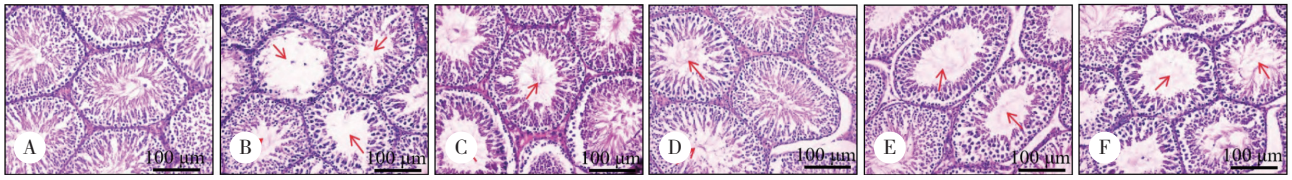
与control组相比，OAS组大鼠睾丸组织锌含量以及含锌酶ADH、ALP、LDH水平均显著降低（$P < 0.05$）。与OAS组相比，各药物干预组大鼠睾丸组织锌含量以及含锌酶ADH、ALP、LDH水平均显著升高（$P < 0.05$），见表3。

2.5　BYHWD对OAS大鼠睾丸组织炎性细胞因子水平的影响

与control组相比，OAS组大鼠睾丸组织IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P < 0.05$）。与OAS组相比，各BYHWD干预组大鼠睾丸IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著降低（$P < 0.05$），见表4。

2.6　BYHWD对OAS大鼠睾丸组织TLR4/MyD88/NF-κB信号通路的影响

与control组相比，OAS组大鼠睾丸组织TLR4、MyD88、NF-κB蛋白表达均显著升高（$P < 0.05$）。与OAS组相比，各BYHWD干预组大鼠睾丸组织TLR4、MyD88、NF-κB蛋白表达均显著降低（$P < 0.05$），见图2。



A，control group；B，OAS group；C，L-carnitine group；D，BYHWD-H group；E，BYHWD-M group；F，BYHWD-L group. The red arrows point to typical seminiferous tubule lesions.

图1　各组大鼠睾丸组织病理形态学变化　HE×100

Fig.1　Pathological and morphological changes in testicular tissue of rats in each group　HE×100

表3　BYHWD对OAS大鼠睾丸组织锌总量和含锌酶水平的影响

Tab.3　Effects of BYHWD on total zinc content and zinc containing enzyme levels in testicular tissue of OAS rats

Group	n	Zinc (μg/mL)	ADH (U/mg)	ALP (U/mg)	LDH (U/mg)
Control	10	19.88 ± 1.22	3.11 ± 0.81	85.66 ± 7.41	22.55 ± 2.10
OAS	10	15.21 ± 1.14[1)]	1.75 ± 0.21[1)]	39.87 ± 6.25[1)]	14.10 ± 0.60[1)]
L-carnitine	10	18.98 ± 2.01[2)]	2.79 ± 0.71[2)]	70.11 ± 8.03[2)]	20.44 ± 1.18[2)]
BYHWD-H	10	19.55 ± 1.77[2)]	2.89 ± 0.31[2)]	78.44 ± 6.24[2)]	22.11 ± 0.89[2)]
BYHWD-M	10	18.44 ± 1.06[2)]	2.67 ± 0.29[2)]	69.22 ± 6.33[2)]	19.37 ± 1.10[2)]
BYHWD-L	10	18.10 ± 1.73[2)]	2.45 ± 0.32[2)]	59.36 ± 6.61[2)]	18.29 ± 0.69[2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group；2) $P < 0.05$ vs. OAS group.

表4　各组大鼠睾丸组织炎性细胞因子水平比较 (pg/mg)

Tab.4　Comparison of inflammatory cytokine levels in testicular tissue of rats in different groups (pg/mg)

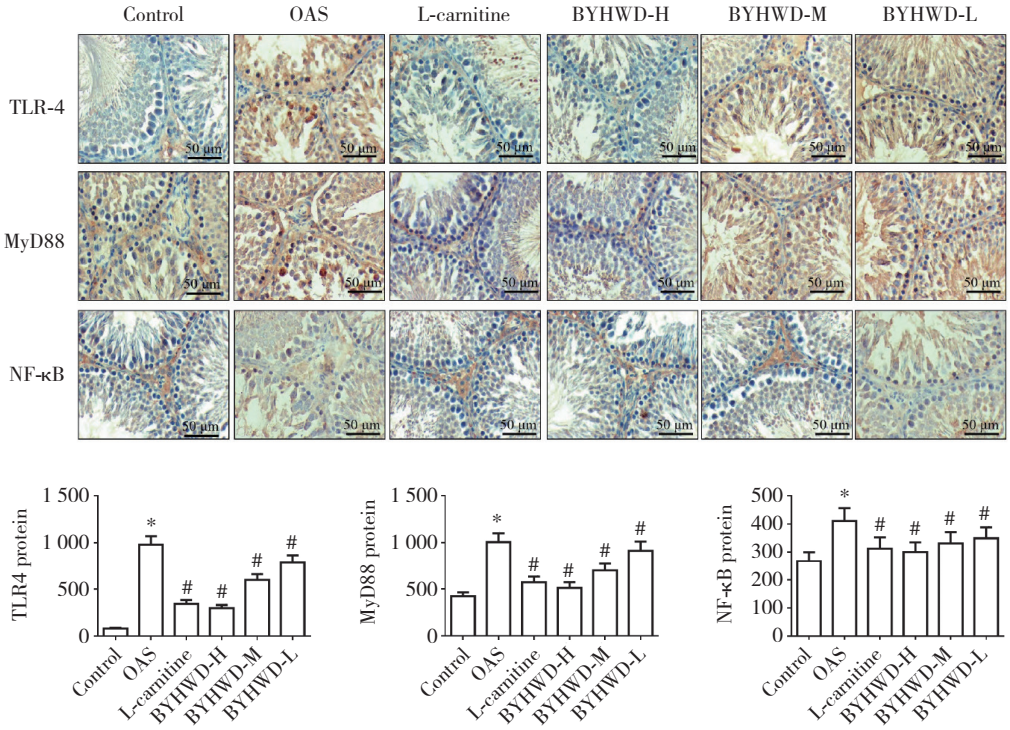
Group	n	IL-1β	IL-6	TNF-α
Control	10	10.66 ± 1.22	8.33 ± 1.18	18.77 ± 2.10
OAS	10	39.88 ± 4.51[1)]	22.60 ± 3.02[1)]	40.22 ± 4.05[1)]
L-carnitine	10	21.33 ± 3.39[2)]	14.77 ± 1.65[2)]	25.72 ± 3.37[2)]
BYHWD-H	10	18.55 ± 2.88[2)]	12.29 ± 1.05[2)]	22.66 ± 2.89[2)]
BYHWD-M	10	25.88 ± 3.15[2)]	15.88 ± 1.29[2)]	26.98 ± 3.01[2)]
BYHWD-L	10	27.61 ± 3.10[2)]	17.10 ± 1.14[2)]	28.85 ± 2.29[2)]

1) $P < 0.05$ vs. control group；2) $P < 0.05$ vs. OAS group.

3　讨论

流行病学调查[14]显示，我国男性不育的发病率呈逐年上升趋势；OAS是导致男性不育的重要原因之一，已经严重损害了患者的生活质量。目前，OAS病因及发病机制尚不完全清楚。中医学认为OAS与中医古籍中记载的“精少、精冷、精薄”类似，符合中医“久病入络”，主要病机以肾虚血瘀、肾脏阴阳失衡及精气受损为特征[3]。中药治疗OAS疗效显著，且具有不良反应小、用药成本低及不易耐药等优势；同时，中药治疗时具有多成分、多通路、多靶点等优势。BYHWD为清朝名医家王清任创制，载于《医林

改错》,能够益气养肾、活血通络,改善气虚血瘀型精索静脉曲张术后患者睾丸微循环及精液质量[7]。本研究通过腺嘌呤灌胃法构建OAS大鼠模型,探究BYHWD对OAS大鼠生殖功能的影响。结果显示,BYHWD能够提高OAS大鼠精子计数和活力。性腺和性器官正常发育是维持男性第二性特征的关键,同时也是性功能正常的表现[15]。研究[16]显示,生殖器官(睾丸、附睾等)出现萎缩或是结构出现损伤时会导致性激素分泌异常,诱发性功能障碍。本研究结果显示,与control组相比,OAS组大鼠睾丸组织出现明显的病理性损伤,血清T和E2水平明显降低,FSH、LH、PRL水平明显升高。与OAS组相比,各BYHWD干预组大鼠睾丸组织病理性损伤明显减轻,血清T和E2水平明显升高,FSH、LH、PRL水平明显降低,表明BYHWD具有改善OAS大鼠生精功能和睾丸损伤作用。



*P < 0.05 vs. control group; #P < 0.05 vs. OAS group.

图2　各组大鼠睾丸组织TLR4/MyD88/NF-κB信号通路蛋白表达 (n = 10)

Fig.2　Protein expression of TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in testicular tissue of rats in each group (n = 10)

锌是体内的微量元素,可以作为辅助因子维持机体的氧化还原平衡[17]。研究[18]显示,缺锌能够抑制机体抗氧化蛋白表达,诱发氧化应激反应;而补锌能够明显抑制氧化应激水平,改善生殖功能损伤。此外,锌还可以与相关蛋白结合参与睾酮合成的调节,缺锌喂养的小鼠睾丸间质细胞中锌水平降低,进而导致睾酮合成相关酶活性降低,从而降低了血清睾酮水平[19]。多项研究[20-22]表明,锌对多种含锌酶结构功能具有重要的调控作用。ALP是反应睾丸功能的标志酶,参与生精细胞分裂增殖。ADH是一种含锌金属蛋白酶,其活性水平与体内锌浓度密切相关。LDH位于睾丸生精细胞的线粒体上,参与生精细胞的能量代谢。这3种含锌酶活性对于维持生精细胞功能具有重要作用。因此,通过调控锌水平对于改善OAS生殖功能具有重要意义。本研究结果显示,与OAS组相比,BYHWD能够提高锌含量,增强含锌酶ADH、ALP、LDH活性。炎症反应与男性不育密切相关,炎性细胞因子参与了生精微环境的调节,能够直接影响精子的形成以及生精细胞的存活[9]。此外,炎症反应还参与了睾丸性不育的发病过程,受损的生精细胞能够进一步诱发细胞相关TLR通路,促进炎症反应,进而加重生精细胞损伤,导致睾丸生精功能障碍[23]。TLR4是诱发一系列免疫炎症反应的关键,MyD88是该信号通路中下

游主要接头蛋白，是介导下游炎症反应的关键[24]。MyD88与TLR4受体结合后可以通过IRAK和TRAF6向下游传递信号，最终活化NF-κB通路，促进炎症反应的发生[25]。因此，调控TLR4/MyD88/NF-κB信号通路介导的炎症反应可能对于改善OAS具有重要作用。本研究结果显示，与control组相比，OAS组大鼠睾丸组织炎性细胞因子水平及TLR4/MyD88/NF-κB信号通路蛋白表达均显著升高。与OAS组相比，BYHWD降低了睾丸组织炎性细胞因子水平，抑制了TLR4/MyD88/NF-κB信号通路蛋白的表达。

综上所述，BYHWD能够改善OAS大鼠的生殖功能，其作用机制可能与调节锌稳态和TLR4/MyD88/NF-κB信号通路，降低炎症反应有关。本研究初步揭示了BYHWD在治疗OAS中可能的分子机制。但是，本研究还存在一定的局限性，未设置TLR4抑制剂TAK-242（干预对照）对OAS大鼠生殖功能的影响。因此，今后将通过对OAS大鼠腹腔注射TAK-242来进一步验证TLR4/MyD88/NF-κB信号通路在BYHWD改善OAS大鼠生殖功能中的作用。

参考文献：

[1] 高瑞芳，孙丽丽，张桂贤，等. 五子衍宗丸对少弱精子症小鼠生精功能、IP6K1表达及线粒体DNA甲基化影响[J]. 现代药物与临床，2024，39（8）：1944-1953.

[2] 陈敏，宾彬，陆海旺. 少弱精子症的中医药治疗进展[J]. 西部中医药，2023，36（10）：158-161.

[3] 陈豪特，王权胜，包烨华，等. 中医药治疗特发性少弱精子症的研究进展[J]. 中国性科学，2023，32（10）：120-124.

[4] 黄念文，李海松，王彬，等. 基于“肾主生殖”理论探讨少弱精子症的病机及龟鹿育麟汤组方思路[J]. 天津中医药大学学报，2024，43（3）：285-288. DOI：10.11656/j.issn.1673-9043.2024.03.16.

[5] 郑敏麟，范文江，王亚楠，等. 加味补阳还五汤抑制腹膜间皮细胞上皮-间充质转换防治术后腹腔粘连的实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2024，26（6）：1458-1470. DOI：10.11842/wst.20230509015.

[6] 桂平，程小凤. 加味补阳还五汤治疗缺血性中风（气虚血瘀证）的疗效观察及安全性评估[J]. 中国中医急症，2023，32（10）：1798-1801.

[7] 兰强. 加味补阳还五汤改善气虚血瘀型精索静脉曲张术后患者睾丸微循环及精液质量的临床研究[D]. 成都：成都中医药大学，2023.

[8] 毕佳杰，马婧，李波，等. 百合育子方对少弱精子症大鼠睾丸锌稳态、CFTR和Keap1/Nrf2/HO-1信号通路影响[J]. 中国中西医结合杂志，2024，44（2）：193-201. DOI：10.7661/j.cjim.20231211.257.

[9] DONG Y，ZHENG YF，ZHU LH，et al. Hua-Tan-Sheng-Jing decoction treats obesity with oligoasthenozoospermia by up-regulating the PI3K-AKT and down-regulating the JNK MAPK signaling pathways：at the crossroad of obesity and oligoasthenozoospermia [J]. Front Pharmacol，2022，13：896434. DOI：10.3389/fphar.2022.896434.

[10] DAI YX，LU QL，LI PY，et al. Xianglian Pill attenuates ulcerative colitis through TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2023，300：115690. DOI：10.1016/j.jep.2022.115690.

[11] 俞旭君，李俊君，申毅锋，等. 基于Toll样信号通路探讨强精片改善少弱精子症大鼠的作用机制[J]. 中国中西医结合杂志，2021，41（11）：1365-1371. DOI：10.7661/j.cjim.20210915.117.

[12] YU ZZ，CHEN J，SHOU PQ，et al. Effects of micronutrients on the reproduction of infertility rat model induced by adenine [J]. Int J Clin Exp Med，2014，7（9）：2754-2762.

[13] 郑敏麟，范文江，王亚楠，等. 加味补阳还五汤对术后腹腔粘连TGF-β1/Smad3通路和腹膜间皮细胞上皮-间充质转化的影响[J]. 中华中医药学刊，2024，42（5）：20-27，265-271. DOI：10.13193/j.issn.1673-7717.2024.05.005.

[14] 管鹏飞，徐新宇，应志康，等. 中医药治疗弱精子症研究现状概述[J]. 山东中医药大学学报，2022，46（4）：544-548. DOI：10.16294/j.cnki.1007-659x.2022.04.022.

[15] NEF S，STÉVANT I，GREENFIELD A. Characterizing the bipotential mammalian gonad [J]. Curr Top Dev Biol，2019，134：167-194. DOI：10.1016/bs.ctdb.2019.01.002.

[16] OYEDOKUN PA，AKHIGBE RE，AJAYI LO，et al. Impact of hypoxia on male reproductive functions [J]. Mol Cell Biochem，2023，478（4）：875-885. DOI：10.1007/s11010-022-04559-1.

[17] HÜBNER C，HAASE H. Interactions of zinc- and redox-signaling pathways [J]. Redox Biol，2021，41：101916. DOI：10.1016/j.redox.2021.101916.

[18] PUPPA MA，JAKOBS J，RINK L. Zinc stabilized Nrf2 by inhibition of HDAC3 in human peripheral blood mononuclear cells [J]. J Trace Elem Med Biol，2023，78：127166. DOI：10.1016/j.jtemb.2023.127166.

[19] ZHANG XL，GUAN TW，YANG BX，et al. A novel role for zinc transporter 8 in the facilitation of zinc accumulation and regulation of testosterone synthesis in Leydig cells of human and mouse testicles [J]. Metabolism，2018，88：40-50. DOI：10.1016/j.metabol.2018.09.002.

[20] UGBOGU EA，UDE VC，ELEKWA I，et al. Toxicological profile of the aqueous-fermented extract of Musa paradisiaca in rats [J]. Avicenna J Phytomed，2018，8（6）：478-487.

[21] TVRDÝ V，HRUBŠA M，JIRKOVSKÝ E，et al. Silymarin dehydroflavonolignans chelate zinc and partially inhibit alcohol dehydrogenase [J]. Nutrients，2021，13（12）：4238. DOI：10.3390/nu13124238.

[22] SUN ZB，WEN YQ，ZHANG F，et al. Exposure to nanoplastics induces mitochondrial impairment and cytomembrane destruction in Leydig cells [J]. Ecotoxicol Environ Saf，2023，255：114796. DOI：10.1016/j.ecoenv.2023.114796.

[23] ÖZBEK M，HITIT M，ERGÜN E，et al. Expression profile of Toll-like receptor 4 in rat testis and epididymis throughout postnatal development [J]. Andrologia，2020，52（3）：e13518. DOI：10.1111/and.13518.

[24] LE Y，ZHANG JW，LIN Y，et al. S100A9 exacerbates the inflammation in Rosacea through toll-like receptor 4/MyD88/NF-κB signaling pathway [J]. J Invest Dermatol，2024，144（9）：1985-1993.e1. DOI：10.1016/j.jid.2024.02.012.

[25] HUANG LX，LI YJ，CHENG Z，et al. PCSK9 promotes endothelial dysfunction during sepsis via the TLR4/MyD88/NF-κB and NLRP3 pathways [J]. Inflammation，2023，46（1）：115-128. DOI：10.1007/s10753-022-01715-z.

（编辑　武玉欣）