

基于 TGF- β 1/Smads 信号通路观察强精胶囊对精索静脉曲张大鼠生育力的影响*

尹静¹, 黄太航², 刘双兴², 张蜀武³, 王超¹, 侯兴明¹, 张培海^{3, Δ}

(1. 四川省中西医结合医院, 四川 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137;

3. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072)

摘要: 目的: 观察强精胶囊对精索静脉曲张 (varicocele, VC) 大鼠附睾组织中 TGF- β 1/Smads 信号通路中的关键信号及大鼠生育力的影响, 探讨强精胶囊治疗 VC 性不育的可能作用机制。方法: 从 68 只青春期雄性 SD 大鼠中随机抽取 8 只为空白对照组, 剩余 60 只利用缩窄左肾静脉成功建立 VC 模型后, 随机分为模型对照组、强精胶囊组 (高、中、低剂量)、五子衍宗+少腹逐瘀组。分别给予生理盐水、强精胶囊混悬液 (高、中、低剂量)、五子衍宗胶囊+少腹逐瘀胶囊混悬液灌胃, 每天一次, 连续 4 周。利用 Western blot 和 RT-PCR 检测大鼠附睾组织中的 TGF- β 1 蛋白水平与 mRNA 水平的表达以及 Smad2、Smad7 的蛋白水平表达, 并观察大鼠精子质量的变化以及雌性大鼠与其合笼交配后的受孕情况。结果: 相较于空白对照组, 模型对照组精子密度与活力显著降低 ($P < 0.01$), TGF- β 1 的蛋白、mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$), Smad2 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), Smad7 的蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$)。相较于模型对照组, 强精胶囊 (高、中、低剂量) 及五子衍宗+少腹逐瘀组的精子密度与活力显著提高 ($P < 0.01$), TGF- β 1、Smad2 的蛋白表达均减少 ($P < 0.05$), Smad7 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), TGF- β 1 的 mRNA 表达减弱 ($P < 0.05$)。与动情期雌性大鼠合笼后, 发现高剂量强精胶囊组受孕率最高。结论: 强精胶囊可以通过 TGF- β 1/Smads 信号通路, 下调 VC 大鼠附睾组织中 TGF- β 1 的蛋白、mRNA 表达以及 Smad2 的蛋白表达, 上调 Smad7 的蛋白表达, 提高 VC 大鼠精子质量以及受孕率, 从而改善 VC 大鼠的生育力。

关键词: 强精胶囊; 精索静脉曲张; 不育; TGF- β 1/Smads; 生育力

中图分类号: R 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2023) 04-0053-06

Effect of Qiangjing Capsule on Fertility of Varicocele Rats Based on TGF- β 1/Smads Signaling Pathway/YIN Jing¹, HUANG Taihang², LIU Shuangxing², et al// (1. Sichuan Province Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Chengdu Sichuan 610041, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137; 3. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective: The objective of this study was to investigate the effects of Qiangjing capsules on the key signals in the TGF- β 1/Smads signaling pathway in the epididymis of varicocele (VC) rats, as well as the fertility of rats. The possible mechanism of action of Qiangjing capsules in the treatment of VC infertility was also investigated. Methods: A total of 68 adolescent male SD rats were used in this study. Eight rats were randomly selected as the blank control group, while the remaining 60 rats were randomly divided into the model control group, Qiangjing capsule group (high, medium, and low doses), and Wuzi Yan-zong + Shao Abdominal Expulsion group after the VC model was successfully established by narrowing the left renal vein. Each group was given saline, strong essence capsule suspension (high, medium, and low dose), and Wu Zi Yan Zong capsule + Shao Abdominal Expulsion capsule suspension by gavage once a day for 4 weeks. Western blot and RT-PCR were used to detect the protein level and mRNA level expression of TGF- β 1 and the protein level expression of Smad2 and Smad7 in the epididymal tissues of rats. The changes in sperm quality of rats and the conception of female rats after mating with them in a combined cage were also observed. Results: The model control group showed significantly lower sperm density and viability ($P < 0.01$), significantly higher protein and mRNA expression of TGF- β 1 ($P < 0.01$), significantly higher protein expression of Smad2 ($P < 0.01$), and significantly lower protein expression of Smad7 ($P < 0.01$) compared with the blank control group. Compared with the model control group, sperm density and viability were significantly increased in the Qiangjing Capsules (high, medium, and low doses) and the Wuzi Yan Zong + Shao Abdominal Expulsion group ($P < 0.01$). Protein expression of TGF- β 1 and Smad2 were reduced

* 基金项目: 四川省科技计划项目 (编号: 2017JY0312): 基于低氧环境 TGF- β 1/Smads 信号通路探讨强精胶囊促进精索静脉曲张大鼠附睾精子成熟的机制, 负责人: 尹静; 全国名老中医药专家张蜀武传承工作室建设项目 (编号: 国中医药人教函 [2022] 75 号), 负责人: 张培海。作者简介: 尹静, 医学硕士, 副主任医师, 从事泌尿男科疾病的基础与临床研究, E-mail: 30630679@qq.com; Δ 通讯作者: 张培海, 医学博士, 主任医师, 从事泌尿男科疾病的基础与临床研究, E-mail: zhangpeihai@126.com。

($P < 0.05$), protein expression of Smad7 was significantly increased ($P < 0.01$), and mRNA expression of TGF- β 1 was attenuated ($P < 0.05$). The highest conception rate was found in the high-dose strong semen capsule group after cage combination with female rats in the motility phase. Conclusion: Qiangjing capsules can improve the fertility of VC rats by down-regulating the protein and mRNA expression of TGF- β 1 and Smad2 and up-regulating the protein expression of Smad7 in the epididymis of VC rats through the TGF- β 1/Smads signaling pathway. This finding suggests that Qiangjing capsules can improve the sperm quality and conception rate of VC rats.

Keywords: Qiangjing Capsule, varicocele, infertility, TGF- β 1/Smads, fertility

精索静脉曲张 (varicocele, VC) 是男性泌尿生殖系统的常见病多发病, 左侧较为多见, 是导致男性不育症的首位病因。临床上 VC 的发病率在 15% 左右, 但在男性不育症群体中的发病率却高达 35% ~ 40%^[1,2]。VC 引起男性不育症的确切机制目前还不太明确, 一般认为与高温、缺氧、代谢毒素返流、氧化应激、细胞外基质、免疫等对睾丸附睾的生精功能造成损害有关^[3]。TGF- β 1 是目前发现的多数哺乳动物体内最强的细胞外基质沉积促进剂, 主要通过上皮-间质转化调控细胞外基质, 进而调控胚胎发育、组织重构^[4], TGF- β 1 的生物学效应主要通过其目前所知的主要胞内激酶底物 Smads 蛋白依赖性的经典通路 TGF- β 1/Smads 信号通路来实现^[5]。既往研究发现 TGF- β 1/Smads 信号通路参与睾丸生理功能和精子发生的调控^[6,8], 补肾类复方中药可以通过调控 TGF- β 1/Smads 信号通路来改善睾丸的生精功能^[9], 但有关 TGF- β 1/Smads 信号通路调控 VC 性不育附睾精子成熟的研究, 目前还没有相关报道。补肾活血方强精胶囊是基于 VC 性不育“肾虚血瘀”的基本病机, 由全国名老中医药专家学术经验继承工作指导老师张蜀武教授根据多年临床经验潜心研制的经验方^[10], 前期研究表明强精胶囊在改善精子质量、附睾结构与功能、附睾缺氧与氧化应激等方面效果显著^[11-15], 但强精胶囊治疗 VC 性不育的具体作用机制尚不明确。故本研究拟通过观察强精胶囊对 VC 大鼠附睾组织中 TGF- β 1/Smads 信号通路中关键信号的蛋白、mRNA 水平以及大鼠生育力的影响, 探讨补肾活血方强精胶囊治疗 VC 性不育的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 动物 SPF 级、8~9 周 SD 雄性大鼠 68 只, 质量为 200±20g, 12~13 周 SD 雌性大鼠 61 只, 质量为 200±20g, 购置于成都达硕实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (川) 2017~068。以 4 只/笼饲养于成都医学院实验动物中心, 全程予标准饲料和饮用水喂养, 光/暗时间分别为 14h/10h, 控制室温在 20℃~25℃、湿度在 40%~60%, 定时通风换气和打扫卫生。每天观察记录大鼠的精神状态、活动度、取食饮水等情况。伦理委员会批准号: 2017016。

1.2 药物 强精胶囊 (组成: 淫羊藿、仙茅、菟丝子、枸杞子、熟地、当归、川芎、鸡血藤、丹参、红花、生黄芪、川牛膝。四川省中西医结合医院中药房提供), 规格: 0.4g·粒⁻¹, 批号: 160920。五

子衍宗胶囊 (河北紫薇山制药有限责任公司), 规格: 0.4g·粒⁻¹, 批号: 161209。少腹逐瘀胶囊 (东阿澳东药业有限公司), 规格: 0.45g·粒⁻¹, 批号: 161015。

1.3 试剂 改良 Western 及 IP 细胞裂解液 (上海西唐生物技术有限公司, 批号: WB007), BCA 蛋白定量试剂盒 (上海西唐生物技术有限公司, 批号: WB101), GAPDH (HyTest Ltd, 批号: 5G4), TGF- β 1、Smad2 抗体 (美国 Proteintech 公司, 批号: 21898~1-AP、12570~1-AP), Smad7 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: BA1399), 二抗 (过氧化物酶偶联亲和纯化山羊抗兔 IgG (H+L), JACKSON, 批号: 111~035~003; 过氧化物酶偶联亲和纯化山羊抗小鼠 IgG (H+L), JACKSON, 批号: 115~035~003), Total RNA 提取试剂 (RNAiso Plus # 9109, TAKARA, 批号: AA6901~1), 反转录试剂 (ReverTra Ace qPCR Kit, TOYOBO, 批号: FSQ-101), 定量 PCR 试剂 (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix and Power SYBR[®] Green RT-PCR Reagents Kit, ABI, 批号: 4368708), 引物合成 (上海生工生物工程有限公司), 戊巴比妥钠 (由实验动物中心提供)。

1.4 设备 计算机辅助精液分析精子质量检测系统 (徐州信达医疗电子设备有限公司), 电子分析天平 (厦门雄发仪器仪表有限公司), DY89-II 电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), KUBOTA3740 型高速离心机 (KUBOTA 公司), PYX-DHS 型电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司), DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司), 721-b 型分光光度计 (上海棱光技术有限公司), DYCZ-24DN 型垂直电泳仪 (北京六一生物科技股份有限公司), DYCZ-40D 型转印电泳仪 (北京六一生物科技股份有限公司), Clinx ChemiScope 系列荧光和化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司), ABI-7900 型荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司)。

1.5 造模与分组 68 只 8~9 周 SD 雄性大鼠适应性饲养 1 周, 称重后任意抽取 8 只为空白对照组, 剩余 60 只利用缩窄左肾静脉建立 VC 大鼠模型^[16]。造模后第 4 周, 剖腹观测大鼠左精索内静脉直径宽度, 以左精索内静脉直径宽度>1mm 且左肾未出现萎缩与右肾大小相当为成功造模。将成功造模的大鼠随机

分为模型对照组、强精胶囊组（高、中、低剂量）、五子衍宗+少腹逐瘀组。

1.6 给药方法 空白对照组和模型对照组、强精胶囊组（高、中、低剂量）、五子衍宗+少腹逐瘀组分别灌胃生理盐水、强精胶囊混悬液（高、中、低剂量）、五子衍宗胶囊+少腹逐瘀胶囊混悬液， $10\text{ml} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ ，每日1次，连续4周。其中高中低剂量强精胶囊组混悬液的浓度分别为： $0.216\text{ml} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 、 $0.108\text{ml} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 、 $0.054\text{ml} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ （相当于临床等效剂量的4、2、1倍），五子衍宗+少腹逐瘀组混悬液的浓度为： $0.276\text{ml} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ （相当于临床等效剂量的4倍）。

1.7 标本制备 给药4周后，阴道涂片筛选动情期雌性大鼠^[17]，按雌雄1:1合笼配对，连续合笼3d，每天早上8点观察雌性大鼠阴栓，发现阴栓为妊娠第一天，于妊娠第3周剖腹查看SD雌性大鼠的受孕情况。配对结束后称重并处死SD雄性大鼠，采用无菌操作摘取大鼠左侧附睾组织，并剪开附睾尾部收集精液备检；剩余附睾组织，称重后用手术剪剪碎盛于组织匀浆器中，冰上匀浆，14000rpm，4℃，15min离心后取上清备检。

1.8 指标检测

1.8.1 大鼠生育力检测 使用计算机辅助精液分析技术系统检测精子密度与活力。SD雌雄大鼠单独合笼配对3d，交配成功的雌鼠于第3周剖腹观察子宫，若有胎鼠存在，证实受孕成功。

1.8.2 通过蛋白免疫印迹（Western blot）检测TGF-β1、Smad2及Smad7的蛋白表达水平 利用改良Western及IP细胞裂解液提取蛋白后，用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。配制12%的分离胶和10%的分离胶（GAPDH用12%分离胶，目的蛋白用10%的分离胶），混匀后立即灌胶，进行SDS-PAGE电泳分离蛋白。经转膜、封闭，加入TBST稀释的相应一抗稀释液：GAPDH（1:1000）、TGF-β1（1:500）、SAMD2（1:1000）、SAMD7（1:200），4℃孵育过夜。TBST洗膜3次，加二抗稀释液（1:10000）室温孵育2h，TBST洗膜3次，将膜置于ECL化学发光检测试剂中，于暗室中通过X胶片感光、显影、定影。通过Clix ChemiScope系列荧光和化学发光成像系统采集图像并分析OD值。

1.8.3 利用实时荧光定量-聚合酶链反应（RT-PCR）检测TGF-β1的mRNA水平表达 按TAKARA RNAiso Plus#9109试剂盒说明书提取总RNA，应用ReverTra Ace qPCR RT Kit逆转录反应试剂盒获取cDNA，储存于-20℃。利用Power SYBR® Green PCR Master Mix and Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit试剂盒进行RT-PCR检测，引物序列：见表1。RT-PCR反应条件：50℃孵育2min；95℃变性10min；（95℃，15s；60℃，1min）40cycles，使用ABI-7900型荧光定量PCR仪分析常规溶解曲线并测

定Ct值，mRNA表达水平为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的计算值。

1.9 统计学处理 实验数据的统计与分析均采用SPSS23.0软件进行，所得数据以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。当所得数据满足正态分布且方差齐性时，多组间均数采用单因素方差分析比较，两组间采用LDS法比较；方差不齐时，则用Dunnett's T3法检验。当所得数据不满足正态分布时，则用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 引物序列

引物名称	引物序列(5' to 3')	引物大小(bp)
TGF-β1-F	CCCTGGAAAGGGCTCAACA	103
TGF-β1-R	CTCTGTGGAGCTGAAGCAGTAGTT	103
GAPDH-F	TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA	72
GAPDH-R	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	72

2 结果与分析

2.1 一般情况 实验过程中因术后感染、灌胃不当以及大鼠相互撕咬等原因，导致模型组大鼠死亡2只，强精胶囊（高、低、中剂量组）大鼠分别死亡1只，五子衍宗+少腹逐瘀组死亡2只，共死亡7只。

2.2 对大鼠生育力的影响 相较于空白对照组，模型对照组大鼠附睾精子活力与密度显著降低（ $P < 0.01$ ）；相较于模型对照组，强精胶囊（高、中、低剂量）及五子衍宗+少腹逐瘀组大鼠附睾精子活力与密度均显著提高（ $P < 0.01$ ）。见表2。

表2 强精胶囊对VC大鼠附睾精子活力与密度的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	n	活力(a+b%)	密度($10^6/\text{mL}$)
空白对照	8	45.60±5.08	30.63±4.75
模型对照	10	25.61±6.71♦	14.33±5.15♦
五子衍宗+少腹逐瘀	10	33.15±5.54 [△]	22.98±6.16 [△]
强精胶囊(高剂量)	11	39.98±5.15 [△]	28.69±5.90 [△]
强精胶囊(中剂量)	11	33.22±6.02 [△]	23.18±5.65 [△]
强精胶囊(低剂量)	11	31.88±5.79 [△]	21.95±6.31 [△]

注：相较于空白对照组，♦ $P < 0.01$ ；相较于模型对照组，[△] $P < 0.01$

给药4周后，每只SD雄性大鼠单独与青春发情期SD雌性大鼠配对3d，交配成功后第3周剖腹查看SD雌性大鼠的受孕情况发现：模型对照组0只，低剂量强精胶囊组0只；中剂量强精胶囊组1只，五子衍宗+少腹逐瘀组囊组1只；空白对照组3只，高剂量强精胶囊组3只。结果显示：VC大鼠生育力受损，强精胶囊（高、中、低剂量）及五子衍宗+少腹逐瘀组均可以不同程度地改善VC大鼠的生育力，高剂量强精胶囊组对VC大鼠的生育力改善最为明显。

2.3 对大鼠附睾组织TGF-β1、Smad2、Smad7蛋白水平的影响 相较于空白对照组，模型对照组TGF-β1、Smad2的蛋白表达均显著升高，Smad7的蛋白表达显著减少（ $P < 0.01$ ）。相较于模型对照组，强精胶囊（高、中、低剂量）及五子衍宗+少腹逐瘀组TGF-β1、Smad2的蛋白表达均减少（ $P < 0.05$ ），Smad7的

蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 3、图 1。

表 3 强精胶囊对 VC 大鼠附睾组织 TGF- β 1、Smad2、Smad7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β 1	Smad2	Smad7
空白对照	8	0.29 \pm 0.02	0.30 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01
模型对照	10	0.49 \pm 0.02 \blacklozenge	0.48 \pm 0.01 \blacklozenge	0.10 \pm 0.02 \blacklozenge
五子衍宗+少腹逐瘀	10	0.31 \pm 0.02 \blacktriangle	0.34 \pm 0.02 \blacktriangle	0.24 \pm 0.02 \blacktriangle
强精胶囊(高剂量)	11	0.30 \pm 0.01 \blacktriangle	0.33 \pm 0.02 \blacktriangle	0.22 \pm 0.02 \blacktriangle
强精胶囊(中剂量)	11	0.32 \pm 0.02 \blacktriangle	0.34 \pm 0.01 \blacktriangle	0.23 \pm 0.01 \blacktriangle
强精胶囊(低剂量)	11	0.32 \pm 0.01 \blacktriangle	0.34 \pm 0.02 \blacktriangle	0.24 \pm 0.01 \blacktriangle

注：相较于空白对照组， $\blacklozenge P < 0.01$ ；相较于模型对照组， $\blacktriangle P < 0.05$ ， $\blacktriangle P < 0.01$

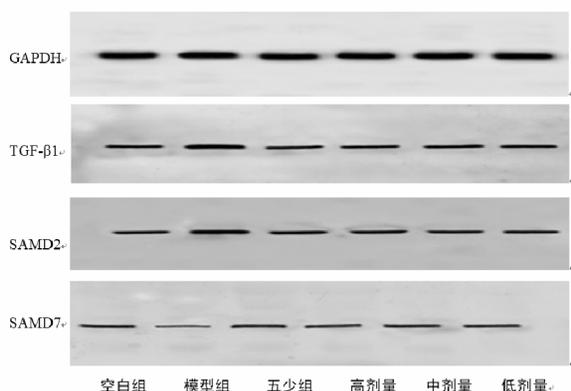


图 1 强精胶囊对 VC 大鼠附睾组织 TGF- β 1、Smad2、Smad7 蛋白表达的影响

结果显示：VC 大鼠附睾组织中的 TGF- β 1 和 Smad2 的蛋白表达较高，Smad7 的蛋白表达较低；强精胶囊（高、中、低剂量）以及五子衍宗+少腹逐瘀组均可以不同程度地下调 VC 大鼠附睾组织中的 TGF- β 1 和 Smad2 的蛋白表达水平，上调 Smad7 的蛋白表达水平。

2.4 对大鼠附睾组织 TGF- β 1mRNA 水平的影响
相较于空白对照组，模型对照组 TGF- β 1 的 mRNA 表达显著增强 ($P < 0.01$)；相较于模型对照组，强精胶囊（高、中、低剂量）及五子衍宗+少腹逐瘀组 TGF- β 1 的 mRNA 表达均减弱 ($P < 0.05$)。见表 4、图 2。

表 4 强精胶囊对 VC 大鼠附睾组织 TGF- β 1mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β 1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值)
空白对照	8	1.20 \pm 0.19
模型对照	10	2.94 \pm 0.14 \blacklozenge
五子衍宗+少腹逐瘀	10	1.48 \pm 0.02 \blacktriangle
强精胶囊(高剂量)	11	1.53 \pm 0.10 \blacktriangle
强精胶囊(中剂量)	11	1.65 \pm 0.14 \blacktriangle
强精胶囊(低剂量)	11	2.01 \pm 0.13 \blacktriangle

注：相较于空白对照组， $\blacklozenge P < 0.01$ ；相较于模型对照组， $\blacktriangle P < 0.05$

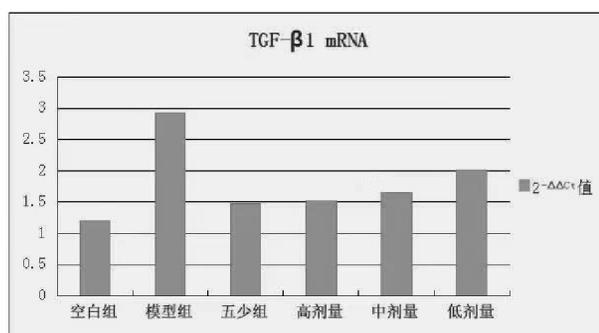


图 2 强精胶囊对 VC 大鼠附睾组织 TGF- β 1mRNA 表达的影响

结果显示：VC 大鼠附睾组织中的 TGF- β 1 的 mRNA 表达较高，强精胶囊（高、中、低剂量）以及五子衍宗+少腹逐瘀组均可以不同程度地下调 VC 大鼠附睾组织中的 TGF- β 1 的 mRNA 表达水平。

3 讨论

精索静脉曲张（VC）是引起男性不育症的首要病因，发病率约为 15%，有近 1/3 的男性不育症患者通过查体和彩超检发现 VC^[3]。目前 VC 引起男性不育症的相关机制尚无明确定论，多数认为与高温、缺氧、代谢毒素物逆流、细胞外基质、活性氧损伤、一氧化氮、免疫、微循环障碍等因素有关，这些因素导致睾丸生精功能异常是一个错综复杂的病理过程，也不排除是多种因素共同作用的结果^[18]。VC 时，附睾静脉血液淤积，造成回流障碍、局部缺血、代谢产物堆积，出现附睾间质水肿、大量淋巴细胞和巨噬细胞浸润、管腔上皮细胞表面刷状缘排列紊乱，导致附睾的组织结构和分泌功能异常，使附睾精子成熟的微环境发生改变，出现大量未成熟生精细胞、精子残余体、畸形精子等^[12,13]。ZhangQY 等也发现 VC 大鼠附睾管的柱状上皮稀疏、附睾管径变小、间质水肿，导致脱落细胞增多，变形精子增多^[19]。手术是目前治疗 VC 的主要手段之一，术后是否有效改善男性生育能力仍存在争议，常出现鞘膜积液、睾丸动脉损伤、VC 持续存在或复发等并发症^[20-22]。

VC 属于中医的“筋瘤”、“无嗣”的范畴，中医治疗 VC 有丰富的临证经验和临床疗效^[23]。全国名老中医药专家张蜀武教授从事男科临床工作 40 余年，诊治经验丰富，认为该病以肾虚为本，血瘀为标，肾气亏虚则血行不畅而致血瘀，瘀阻子络则毒素返流又反致肾虚，肾虚血瘀互相影响，生殖之精乏源而不育^[10]，潜心研制了补肾活血方强精胶囊，取得了较好的临床治疗效果。本方以淫羊藿、仙茅、菟丝子、枸杞子、熟地为君药补肾生精；淫羊藿-仙茅药对和熟地黄均具有抗氧化效应，能清除氧自由基，保护细胞免受损伤，从而提高精子运动功能^[24,25]；菟丝子-枸杞子药对可以通过抑制细胞凋亡和促进精子生成、修复血睾屏障等途径治疗男性不育症^[26]。当归、川芎、鸡血藤为臣药活血通络；当归-川芎

药对具有补血活血双重功效，能够改善血瘀状态下机体的血液流变学^[27]，鸡血藤具有改善造血系统、抗血栓、降血脂、调节免疫系统等作用^[28]。丹参、红花为佐药活血化瘀通经；丹参-红花合用可以通过多通路、多靶点发挥抗水肿、抗氧化、抗炎性反应等作用^[29]。生黄芪、川牛膝为使药补气生血养血活血、引血下行；黄芪多糖可以改善 VC 大鼠睾丸组织缺氧状况，减轻氧化应激损伤，从而起到保护睾丸生精功能的作用^[30]，川牛膝多糖具有提高机体免疫、抗氧化、抗衰老等功能^[31]。全方虚实同治、补泻并举，补肾类中药与活血类中药相互配伍，以达补肾生精、活血化瘀之效，使肾气盛，血瘀除，外肾的生精功能得以恢复，则 VC 性不育能得以治疗。前期的研究表明该复方中药在改善精子质量、附睾结构与功能、附睾缺氧与氧化应激等方面效果显著^[11-15]，但强精胶囊治疗 VC 性不育的具体作用机制尚不太明确。

TGF- β 是一种具备多种生物学性能的多肽类物质，TGF- β 作为体内参与多种信号转导与调控的重要因子，在细胞增殖与分化、发生与发育等方面起着重要调控作用^[32]。TGF- β 家族中表达最为广泛的亚型是 TGF- β 1，它是目前发现的多数哺乳动物体内最强的细胞外基质沉积促进剂，主要通过上皮-间质转化调控细胞外基质，进而调控胚胎发育、组织重构等^[4]。TGF- β 1 发挥生物学效应主要通过 Smads 蛋白依赖性的经典通路 TGF- β 1/Smads 信号转导通路来实现^[5]。Smads 蛋白作为 TGF- β 家族主要的下游信号转导蛋白，是目前所知的主要的 TGF- β 1 受体胞内激活底物，通过 TGF- β 1/Smads 信号通路将细胞外信号传递到细胞内，从而调节下游基因的相关表达，其中受体激活型 Smad2、共同介体型 Smad4、抑制型 Smad7 是参与 TGF- β 1 的信号转导的主要蛋白，Smad2、Smad4 与 Smad7 受活化的 TGF- β 1 受体介导而发生磷酸化后结合，形成三聚体并进入细胞核内以促进相关基因高表达，进而在多方面调节细胞增殖、分化、凋亡等过程，从而发挥生物学效应^[33]。研究发现 TGF- β 1 在雄性生殖系统中具有促进细胞增殖、调节细胞分化，促进细胞外基质合成，调节血睾屏障等多种重要作用^[34]。艾庆燕等通过研究发现大鼠附睾的主细胞分泌大量 TGF- β 1 蛋白，直接作用于生精细胞，影响生精细胞增殖与分化，从而影响附睾的分泌功能和附睾精子成熟的微环境，并参与睾丸后精子成熟过程^[35]。来自人类和动物的研究发现 TGF- β 1/Smads 信号通路参与睾丸生理功能和精子发生的调控^[6-8]，杨欣等通过研究发现，具有补肾益精功效的五子衍宗方能够降低具有生精功能障碍模型大鼠睾丸组织中 TGF- β 1 表达，上调模型大鼠睾丸组织中 Smad2 和 Smad4 表达，同时可以改善棉酚对大鼠睾丸组织结构造成的损伤，并通过调控 TGF- β 1/Smads 信号通路来改善大鼠睾丸的生精功能^[9]。

本研究结果显示，VC 大鼠生育力受损，附睾组织中的 TGF- β 1 的蛋白表达和 mRNA 表达较高、Smad2 的蛋白表达较高、Smad7 的蛋白表达较低；强精胶囊各组以及五子衍宗+少腹逐瘀组均可以不同程度地下调 VC 大鼠附睾组织中的 TGF- β 1 蛋白表达与 mRNA 表达以及 Smad2 的蛋白表达水平，上调 Smad7 的蛋白表达水平，改善 VC 大鼠的生育能力，且高剂量强精胶囊的临床治疗效果最好。

因此，我们推测其可能机制为：VC 可以导致附睾组织中 TGF- β 1/Smad 信号转导通路中关键信号因子出现高表达，激活其下游底物 Smads，诱导 VC 大鼠出现一系列病理生理学改变，致使 VC 大鼠生育力下降。TGF- β 1/Smad 信号通路可能是其中一个调节 VC 性不育的机制，补肾活血方可以通过 TGF- β 1/Smad 信号通路提高 VC 大鼠生育力。

参考文献

- [1] Masson P, Brannigan RE. The varicocele [J]. Urol Clin North Am, 2014, 41: 129-144.
- [2] Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2 [J]. Nat Rev Urol, 2013, 10: 26-37.
- [3] 郭应禄, 胡礼泉. 男科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 1624-1630.
- [4] Yang YC, Zhang N, Van CK, et al. Transforming growth factor- β 1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling [J]. Allergy, 2012, 67 (10): 1193-1202.
- [5] Yang Y, Zhang N, Lan F, et al. Transforming growth factor- β 1 pathways in inflammatory airway diseases [J]. Allergy, 2014, 69 (6): 699-707.
- [6] Zhang YQ, He XZ, Zhang JS, et al. Stage-specific localization of transforming growth factor β 1 and their receptors during spermatogenesis in men [J]. Asian J Androl, 2004, 6 (2): 105-109.
- [7] Wang RA, Zhao GQ. Transforming growth factor β signal transducer Smad2 is expressed in mouse meiotic germ cells, Sertoli cells and Leydig cells during spermatogenesis [J]. Biol Reprod, 1999, 61 (4): 999-1004.
- [8] 董常生, 闫永平, 贺俊平, 等. 转化生长因子- β 1 及其信号转导分 Smad2 与 Smad4 在羊睾丸的表达 [J]. 解剖学报, 2007, 38 (4): 481-485.
- [9] 杨欣, 丁彩飞, 颜志中, 等. 五子衍宗方对生精障碍模型大鼠睾丸 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30 (5): 1011-1013.
- [10] 尹静, 张蜀武, 张培海, 等. 张蜀武教授在男性不育症中应用补肾活血法临床经验 [J]. 四川中医, 2019, 37 (12): 4-6.
- [11] 尹静, 张培海, 王超, 等. 强精胶囊治疗精索静脉曲张少弱精症 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2017, 23 (1): 29-32.
- [12] 尹静, 王超, 张蜀武, 等. 强精胶囊对精索静脉曲张大鼠附睾显微结构的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 19 (4): 401-404.
- [13] 尹静, 王超, 张蜀武, 等. 强精胶囊对精索静脉曲张大鼠附睾功能性指标及精子质量的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 19 (2): 156-159.

● 临床研究 ●

肝硬化患者中医辨证分型与凝血功能及激素水平的相关性分析

苗秀英¹, 张长征², 宋来成¹

(1. 安徽中医药大学附属太和县中医院肝病科, 安徽 太和 236600; 2. 安徽中医药大学附属太和县中医院肿瘤科, 安徽 太和 236600)

摘要: 目的: 分析肝硬化患者中医辨证分型与凝血功能及垂体甲状腺轴激素水平的相关性。方法: 选取我院于 2018 年 4 月~2022 年 2 月收治的肝硬化患者 200 例, 观察中医证候转化规律, 分析凝血功能指标、垂体甲状腺轴激素水平及 Child-pugh 分级的水平。结果: 不同证型肝硬化患者 Child-pugh 分级分布、凝血四项、垂体甲状腺轴激素水平比较, 有统计学意义 ($P < 0.05$); Child-A 级以水湿内停证为主, Child-B 级以脾肾阳虚证为主, 其次为瘀血阻络证和肝气郁结证, 而 Child-C 级则以肝肾阴虚证为主, 其次是湿热内蕴证。肝肾阴虚证和瘀血阻络证患者凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 水平最高, 而水湿内停证纤维蛋白原 (FIB) 水平最高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 肝肾阴虚证、瘀血阻络证、肝气郁结证患者三碘甲状腺原氨酸 (T3) 水平最高, 肝气郁结证甲状腺素 (T4)、游离 T3 (FT3)、游离 T4 (FT4)、促甲状腺激素 (TSH) 水平最高, 而脾肾阳虚证患者垂体甲状腺轴激素水平最低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 凝血功能指标、垂体甲状腺轴激素水平及 Child-pugh 分级与肝硬化患者中医辨证分型有一定相关性, 可作为辨证施治的依据。

关键词: 凝血功能; 垂体甲状腺轴激素; 肝硬化; Child-pugh 分级; 中医辨证分型

中图分类号: R 575.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2023) 04-0058-05

[14] 曲晓伟, 单中杰, 韩前河, 等. 强精胶囊对精索静脉曲张大鼠附睾氧化/抗氧化系统的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2011, 17 (11): 1039-1042.

[15] 尹静, 张培海, 王超, 等. 补肾活血方对精索静脉曲张大鼠附睾组织低氧诱导因子-1 α 及生育力的影响 [J]. 四川中医, 2020, 38 (12): 55-59.

[16] 刘建军, 杨宇如, 董强. 实验性精索静脉曲张模型的建立及其对睾丸的影响 [J]. 华西医学, 2006, 21 (3): 538-539.

[17] 王洁, 吴素慧, 尚海霞. 性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察 [J]. 当代医学, 2013 (28): 25-26.

[18] 邓春华, 商学军. 精索静脉曲张诊断与治疗中国专家共识 [J]. 中华男科学杂志, 2015, 21 (11): 1035-1042.

[19] Zhang QY, Qiu SD, Ma XN, et al. Effect of experimental varicocele on structure and function of epididymis in adolescent rats [J]. Asian J Androl, 2003, 5 (2): 108-112.

[20] Kim HH, Goldstein M. Adult varicocele [J]. Curr Opin Urol, 2008, 18: 608-612.

[21] Cavallini G, Biagiotti G, Ferraretti AP, et al. Medical therapy of oligoasthenospermia associated with left varicocele [J]. BJU Int, 2003, 91 (6): 513-518.

[22] Lurvey R, Durbin-Johnson B, Kurzrock EA. Adolescent varicocele: a large multicenter analysis of complications and recurrence in academic programs [J]. J Pediatr Urol, 2015, 11 (4): 186.e1-186.e6.

[23] 精索静脉曲张性不育症中医临床诊疗指南 [J]. 中华男科学杂志, 2021, 27 (11): 1039-1043.

[24] 廖建春, 刘丽君, 王钱道. 加味五子衍宗合剂及其组分对生精细胞损伤模型大鼠 MDA、SOD、 α -葡萄糖苷酶、果糖的影响 [J]. 江苏中医药, 2018, 50 (4): 81-83.

[25] Luo C, Qin S, Liang P, et al. Advances in Modern Research on Pharmacological Effects of Radix Rehmanniae [C]. Poznan, Poland: 2019.

[26] 赵琦, 王继升, 代恒恒, 等. 基于网络药理学探讨菟丝子-枸杞子药对治疗男性不育症的作用机制 [J]. 海南医学院学报, 2021, 27 (7): 525-532.

[27] 李伟霞, 唐于平, 郭建明, 等. 比较评价当归川芎配伍对急性血瘀大鼠血液流变学及凝血功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32 (6): 807.

[28] 杨冉冉, 刘新, 姬蕾, 等. 鸡血藤质量控制及药理作用研究进展 [J]. 环球中医药, 2018, 11 (11): 1833-1838.

[29] 范吉林, 朱婷婷, 薛振宇, 等. 基于网络药理学探讨丹参-红花药对治疗冠心病的作用机制 [J]. 世界中医药, 2020, 15 (24): 3740-3747.

[30] 蔡剑, 陈海, 张培海. 黄芪多糖对实验性精索静脉曲张大鼠附睾 HO-1 表达影响及意义 [J]. 中华男科学杂志, 2011, 17 (10): 8.

[31] 刘小妹, 程中琴, 施崇精, 等. 川牛膝多糖的研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13 (24): 61-63.

[32] 田晓丽, 杨杰. 转化生长因子- β 研究进展 [J]. 解放军预防医学杂志, 2006, 24 (2): 145-148.

[33] Hu ZC, Shi F, Liu P, et al. TIEG1 represses Smad7-mediated activation of TGF- β 1/Smad signaling in keloid pathogenesis [J]. J Invest Dermatol, 2017, 137 (5): 1051-1059.

[34] 蒋鹏鹏, 张远强. 转化生长因子 β 超家族在雄性生殖细胞发育中的作用 [J]. 中华男科学杂志, 2002, 8 (6): 435-437.

[35] 艾庆燕, 赵豫凤, 杨加周, 等. 转化生长因子- β 1 在大鼠附睾及附睾中的表达研究 [J]. 延安大学学报, 2014, 12 (1): 1-3.

(收稿日期 2022-09-21)