

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.19.006
文章编号: 1005-8982 (2023) 19-0039-07

实验研究·论著

参杞强精颗粒对H₂O₂诱导小鼠睾丸间质细胞氧化应激损伤的作用*

唐爱存¹, 马家宝¹, 赖克道², 刘金花¹, 卢秋玉³

(1.广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023; 2.广西壮族自治区中医药研究院, 广西南宁 530022; 3.广西壮族自治区人民医院 药学部, 广西南宁 530021)

摘要: 目的 探讨参杞强精颗粒对过氧化氢H₂O₂诱导的小鼠睾丸间质细胞TM3氧化应激损伤的作用。
方法 以小鼠睾丸间质细胞为细胞模型, 用MTT法检测参杞强精颗粒对正常TM3的细胞毒性作用; 以500 μmol/L H₂O₂诱导损伤TM3细胞4 h后复制氧化应激损伤模型, 采用CCK-8法检测不同浓度参杞强精颗粒对H₂O₂损伤TM3细胞增殖活力的影响; 分别给予参杞强精颗粒(0.4、0.8和1.6 mg/mL)干预处理24 h后, 用酶联免疫吸附试验检测细胞上清液中睾酮分泌水平、一氧化氮(NO)、乳酸脱氢酶(LDH)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量及谷胱甘肽-S转移酶(GST)的活性; 同时检测细胞内活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)及总抗氧化能力(TAOC)的含量; 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测睾酮合成酶类固醇合成快速调节蛋白(StAR)、胆固醇侧链裂解酶(P450_{scc})、17β-羟基固醇脱氢酶(17β-HSD) mRNA表达。**结果** 参杞强精颗粒在浓度为0.05~2.50 mg/mL时对正常TM3细胞无毒性作用。与H₂O₂损伤模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组能提高TM3细胞增殖活率(P<0.05)。与H₂O₂模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组提高细胞上清液中睾酮水平和NO含量, 增加GST活性, 降低LDH和8-OHdG含量(P<0.05)。与H₂O₂损伤模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组降低细胞内ROS、MDA含量, 同时增强CAT、SOD和TAOC的活性(P<0.05)。与H₂O₂模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组能提高睾酮合成酶StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA相对表达量(P<0.05)。**结论** 参杞强精颗粒对H₂O₂诱导睾丸间质细胞氧化应激损伤具有保护作用, 其机制可能通过清除氧自由基、抗氧化应激损伤及促进睾酮合成有关。

关键词: 氧化应激损伤; 参杞强精颗粒; 过氧化氢; 睾丸间质细胞; 睾酮合成酶

中图分类号: R697.2

文献标识码: A

Effects of Shenqi Qiangjing granules against oxidative stress injury by H₂O₂ in TM3 cells*

Tang Ai-cun¹, Ma Jia-bao¹, Lai Ke-dao², Liu Jin-hua¹, Lu Qiu-yu³

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi 530023, China; 2. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi 530022, China; 3. Department of Pharmacy, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects and possible mechanism of Shenqi Qiangjing Granules (SQJG) on oxidative stress injury of mouse leydig cells (TM3) induced by hydrogen peroxide (H₂O₂).

收稿日期: 2023-02-11

* 基金项目: 广西重点研发计划项目(No. 桂科 AB22035073); 广西中医药适宜技术开发与推广项目(No. GZSY22-18); 广西中医药管理局科研课题(No. GXZY20210209, GXZYA20220180); 广西中医药大学校级科研项目(No. 2021MS015)

[通信作者] 卢秋玉, E-mail: lqyxb@163.com

Methods Using mouse leydig cells as cell model, determination of the cytotoxicity of SQJG on normal TM3 cells by MTT method. Establishment of oxidative stress injury model by H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/L}$) induced injury of TM3 cells for 4 h, CCK-8 method was used to detect the proliferation activity of TM3 cells injured by H_2O_2 with different concentrations of SQJG. And then they were treated with different concentrations of SQJG (0.4, 0.8 and 1.6 mg/mL) for 24 h, the content of nitric oxide (NO), lactate dehydrogenase (LDH), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), glutathione-S transferase (GST) and testosterone secretion in the cell supernatant were detected by ELISA, similarly, the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (TAOC) in cells were measured by ELISA. The mRNA expression of StAR, P450scc and 17 β -HSD were detected by real time fluorescent quantitative PCR. **Results** Within the concentration range of 0.05 to 2.5 mg/mL, non toxic effect of SQJG on normal TM3 cells. Compared with the H_2O_2 model group, the survival rate of TM3 cells can be significantly improved in each dose group of SQJG, SQJG at 0.4, 0.8 and 1.6 mg/mL concentration could obviously increase the levels of NO, GST and testosterone, and reduce the content of LDH and 8-OHdG. Meanwhile, SQJG could also enhance levels of CAT, SOD, TAOC, and reduce the expression of ROS and MDA in the cell, and the mRNA expression levels of testosterone synthetase StAR, P450scc, 17 β -HSD were increased significantly. The results showed significant difference ($P < 0.05$ or < 0.01). **Conclusion** SQJG has significant protective effect on H_2O_2 induced oxidative stress injury of TM3 cells, the mechanism may be related to scavenging oxygen free radicals, anti oxidative stress injury and promoting testosterone synthesis.

Keywords: oxidative stress; shenqi qiangjing granules; hydrogen peroxide; leydig cells; testosterone synthetase

目前,随着我国生育政策的变化,越来越多的家庭选择二胎或三胎,但受环境污染、工作压力、生活方式改变等因素的影响,男性的生育能力逐渐下降,这一矛盾严重影响了社会稳定和家庭和睦,同时也影响国家人口政策的实施。其中少弱精子症是男性不育最常见的原因之一,目前其机制尚未完全阐明。睾丸间质细胞是维持雄性动物正常生殖生理的重要生殖细胞之一,具有营养和支持生殖细胞、合成分泌雄性激素、促进精子的发生和男性生殖器官发育等作用。研究表明,氧化应激损伤是导致睾丸间质细胞受损的重要原因之一,因此,抑制损伤细胞的氧化应激作用,保护氧化损伤睾丸间质细胞的功能,对提高生育率具有重要的临床意义^[1]。睾丸间质细胞是分泌和产生睾酮的主要细胞。研究表明,氧化应激能引起睾丸间质细胞损伤,从而引起睾酮等雄性激素分泌减少,影响精子发育^[2]。另外,睾酮合成受睾酮合成酶的调控。研究表明,类固醇合成快速调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、P450胆固醇侧链裂解酶(cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc)、17 β -羟基固醇脱氢酶(17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD)是睾酮合成与分泌的关键酶^[3]。参杞强精颗粒由党参、枸杞子、黄芪、菟丝子、五味子、当归等组成,具有补肾健脾、活血养血、清

热利湿、增强免疫作用,其传统汤剂已在临床应用10年以上,是治疗少弱精症的有效方剂。前期研究发现,参杞强精传统汤剂对少弱精子症有较好的疗效,能显著提高少弱精子症患者的精子密度、活力及活率^[4-5]。能够降低环磷酰胺所致脾肾两虚型睾丸生精障碍模型小鼠的生精细胞凋亡率,修复睾丸的病理损伤,恢复其生精功能^[6]。但其在 H_2O_2 诱导睾丸间质细胞氧化应激损伤保护作用方面未见报道,因此,本研究采用 H_2O_2 诱导损伤睾丸间质细胞构建氧化应激损伤模型,探讨参杞强精颗粒对 H_2O_2 诱导睾丸间质细胞氧化应激损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株与药物

小鼠睾丸间质细胞 TM3 购自中国科学院细胞库,本研究室自行传代培养,维生素 E 软胶囊由浙江医药股份有限公司新昌制药厂生产(批号: H33020187),参杞强精颗粒由广西中医药大学第一附属医院制剂中心提供(批号: 20210915, 中药民族药制剂备案号: 桂药制备字 Z20200023000, 每 1 g 颗粒相当于原生药 2 g),实验时采用纯化蒸馏水超声溶解,经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌,再用细胞培养液稀释成所需浓度,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 试剂

DMEM 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自美国 Amersco 公司, CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂购自德国 Thermo 公司, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自福州迈新生物技术开发有限公司, SYBR 荧光定量聚合酶链反应试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, RIPA 裂解液 (含 1% 蛋白酶抑制剂) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 过氧化氢 H_2O_2 购于广东南国药业有限公司, 睾酮、一氧化氮 NO、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽-S 转移酶 (glutathione-S-transferase, GST)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 及总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAOC) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

Model 311 型二氧化碳孵箱 (美国 Thermo Forma 公司), XD-101 型倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司), SW-CJ-1F 型超净工作台 (苏净安泰生物科技有限公司), 722S 型可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司), ABI 9700 型聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪, Model 450 型自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), Tanon 5200 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司), TGL-16G-A 型高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.4 方法

1.4.1 TM3 细胞培养 用含 10% FBS 的 DMEM 作为培养液, 将 TM3 细胞置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% 二氧化碳培养箱中静置培养, 每天观察细胞生长情况, 每两天更换 1 次细胞培养液, 采用 0.25% 胰酶对长满细胞进行消化传代, 取对数生长期的细胞进行后续试验。

1.4.2 MTT 法检测参杞强精颗粒对 TM3 细胞的毒性作用 采用 0.25% 胰酶将对数生长期 TM3 细胞消化制成浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 并接种到 96 孔培养板中, 每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% 二氧化

碳孵箱中继续培养 24 h 贴壁后, 丢弃培养液, 加入含参杞强精颗粒的给药组, 终浓度分别为 0.05、0.50、2.50、5.00 和 10.00 mg/mL , 继续培养 24 h, 然后每孔加入 MTT $20\text{ }\mu\text{L}$, 继续在 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% 二氧化碳孵箱中培养 4 h, 吸弃全部上清液, 再在每孔加入二甲亚砜 (Dimethylsulphoxide, DMSO) $200\text{ }\mu\text{L}$, 在微量振荡器上振荡 5 min, 最后在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值, 测定各组细胞活力。

1.4.3 H_2O_2 损伤模型的构建及药物浓度筛选 参照参考文献 [7] 和前期预实验, 采用 0.25% 胰酶将对数生长期 TM3 细胞消化制成浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 并接种到 96 孔培养板中, 每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$, 分为 8 组, 每组 6 个复孔, 分别为正常组、 H_2O_2 损伤模型组、阳性对照组 ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 维生素 E)、参杞强精颗粒组 (0.05、0.40、0.80、1.60、 5.00 mg/mL), 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% 二氧化碳孵箱中继续培养 24 h 贴壁后, 丢弃培养液, 正常组换用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 其余各组加入终浓度为 $500\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 完全培养液诱导建立氧化应激损伤模型, 继续培养 4 h 后, 吸弃全部上清液, 正常组和模型组加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 完全培养液, 阳性对照组加入终浓度 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 维生素 E 的培养液, 其余给药组加入等体积终浓度分别为 0.05、0.40、0.80、1.60 和 5.00 mg/mL 的参杞强精颗粒药液, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8, 混匀后置 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% 二氧化碳培养箱中孵育 2 h, 最后采用自动酶标仪 (检测波长为 450 nm) 检测各组 OD 值, 筛选最佳给药浓度。

1.4.4 分组给药 采用 0.25% 胰酶将对数生长期 TM3 细胞消化制成浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 并接种到 96 孔培养板中, 每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$, 分为 5 组, 分别为正常组、 H_2O_2 损伤模型组、参杞强精颗粒低中高剂量组 (0.4、0.8 和 1.6 mg/mL), 每组 6 个复孔, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% 二氧化碳孵箱中继续培养 24 h 贴壁后, 丢弃培养液, 正常组换用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 模型组和参杞强精颗粒给药组加入终浓度为 $500\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 完全培养液诱导建立氧化应激损伤模型, 继续培养 4 h 后, 吸弃全部上清液, 正常组和模型组加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 完全培养液, 其余给药组加入等体积终浓度分别为 0.4、0.8 和 1.6 mg/mL 的参杞强精颗粒药液, 继续培养 24 h 后, 收集各组细胞上清液和细胞, 待后续进一步检测。

1.4.5 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞上清液中睾酮、NO、LDH、8-OHdG、GST 的活性 按照 1.4.4 复制 H₂O₂ 损伤模型并分组给药, 收集各组细胞上清液, 同时根据睾酮、NO、LDH、8-OHdG、GST 试剂盒说明书配置好相关工作液, 向稀释后的标准品中加入各组细胞上清液 50 μ L, 混匀后于恒温水浴锅中温育 0.5 h, 分别加入 50 μ L 酶标志物、显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μ L, 混匀后, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min, 最后加入 50 μ L 终止液, 用酶标仪检测各孔 450 nm 波长处吸光度值。

1.4.6 ELISA 检测细胞内 ROS、MDA、CAT、SOD、TAOC 的含量 按照 1.4.4 复制 H₂O₂ 损伤模型并分组给药, 连续培养 24 h 后, 去上清液, 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 4 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 采用超声破碎法收集各组细胞裂解液, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 严格按 ELISA 试剂盒说明书方法 (同 1.4.5 ELISA 操作方法), 分别检测细胞内 ROS、MDA、CAT、SOD、TAOC 的含量。

1.4.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测睾酮合成酶 StAR、P450_{sc}、17 β -HSD mRNA 表达 按照 1.4.4 复制 H₂O₂ 损伤模型并分组给药, 连续培养 24 h 后, 去上清液, 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 4 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 严格按照 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 测定总 RNA 纯度及浓度, 并将 RNA 逆转录成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应, 反应体系: SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.2 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ROX reference dye (50 \times) 0.4 μ L, ddH₂O 补足体系至 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。本实验中 StAR、P450_{sc}、17 β -HSD 基因的引物设计合成及验证均由大连宝生生物工程有限公司完成。以 β -actin 为内参基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法分析各基因在细胞中的相对表达量。各引物序列见表 1。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
StAR	正向: 5'-TGTCAAGGAGATCAAGGTCCTG-3'	122
	反向: 5'-CGATAGGACCTGGTTGATGAT-3'	
P450 _{sc}	正向: 5'-TTGGTTCCACTCCTCAAAGC-3'	137
	反向: 5'-CCAAAGTCTTGGCTGGAATC-3'	
17 β -HSD	正向: 5'-ATTTTACCAGAGAAGACATCT-3'	67
	反向: 5'-GGGGTCAGCACCTGAATAATG-3'	
β -actin	正向: 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCC-3'	171
	反向: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	

2 结果

2.1 参杞强精颗粒对正常 TM3 细胞毒性作用

MTT 结果显示, 各组细胞存活率的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。与正常组比较, 参杞强精颗粒在浓度为 0.05 ~ 2.50 mg/mL 时对正常 TM3 细胞增殖活性无明显毒性作用 (P > 0.05); 当参杞强精颗粒浓度为 5.00 ~ 10.00 mg/mL 时对正常 TM3 细胞增殖活性有一定的毒性作用 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 不同浓度参杞强精颗粒对正常 TM3 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
正常组	0.98 \pm 0.08
参杞强精颗粒 0.05 mg/mL	1.02 \pm 0.12
参杞强精颗粒 0.50 mg/mL	0.94 \pm 0.09
参杞强精颗粒 2.50 mg/mL	0.92 \pm 0.08
参杞强精颗粒 5.00 mg/mL	0.79 \pm 0.06 [†]
参杞强精颗粒 10.00 mg/mL	0.68 \pm 0.07 [†]
F 值	108.655
P 值	0.000

注: [†]与正常组比较, P < 0.05。

2.2 参杞强精颗粒对 H₂O₂ 损伤的 TM3 细胞增殖活力的影响

MTT 实验结果显示, 各组细胞存活率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。与正常组比较, H₂O₂ 损伤模型组中 TM3 细胞增殖活力下降 (P < 0.05), 与 H₂O₂ 损伤模型组比较, 参杞强精颗粒在浓度为 0.05 ~ 5.00 mg/mL 时能提高 TM3 细胞的增

殖活力 ($P < 0.05$), 且在 0.05 ~ 1.60 mg/mL 范围内, TM3 细胞的增殖活力随药物浓度的升高而增强 (见表 3)。后续药效试验选择 0.40、0.80 和 1.60 mg/mL 作为参杞强精颗粒低剂量组、中剂量组和高剂量组。

2.3 参杞强精颗粒对细胞上清液中睾酮、NO、LDH、8-OHdG、GST 活性影响

ELISA 结果显示, 各组细胞上清液中睾酮、NO、LDH、8-OHdG、GST 活性比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常组比较, H₂O₂ 损伤模型组睾酮水平、NO 含量、GST 活性降低 ($P < 0.05$), LDH 和 8-OHdG 含量升高 ($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 损伤模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组均能提高睾酮水平、NO 含量 ($P < 0.05$), 增加 GST 活性 ($P < 0.05$), 同时降低 LDH 和 8-OHdG 含量 ($P < 0.05$); 参杞强精颗粒低、中、高剂量组 (0.40、0.80 和 1.60 mg/mL) 两两比

表 3 参杞强精颗粒对 H₂O₂ 损伤的 TM3 细胞增殖活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
正常组	0.92 ± 0.08
H ₂ O ₂ 损伤模型组	0.40 ± 0.03 ^①
维生素 E 10 μg/mL	0.86 ± 0.07 ^②
参杞强精颗粒 0.05 mg/mL	0.61 ± 0.06 ^②
参杞强精颗粒 0.40 mg/mL	0.65 ± 0.05 ^②
参杞强精颗粒 0.80 mg/mL	0.76 ± 0.08 ^②
参杞强精颗粒 1.60 mg/mL	0.85 ± 0.09 ^②
参杞强精颗粒 5.00 mg/mL	0.77 ± 0.07 ^②
F 值	125.227
P 值	0.000

注: ①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与 H₂O₂ 损伤模型组比较, $P < 0.05$ 。

较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 参杞强精颗粒对上清液中睾酮、NO、LDH、8-OHdG、GST 活性影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	睾酮/(ng/mL)	NO/(μmol/mL)	LDH/(u/mL)	8-OHdG/(ng/mL)	GST/(u/mL)
正常组	4.85 ± 0.54	8.22 ± 0.79	50.13 ± 5.07	5.25 ± 0.49	45.66 ± 4.73
H ₂ O ₂ 损伤模型组	2.06 ± 0.16 ^①	4.79 ± 0.50 ^①	136.77 ± 15.01 ^①	12.17 ± 1.63 ^①	20.71 ± 2.11 ^①
参杞强精颗粒 0.40 mg/mL	2.99 ± 0.31 ^{①②}	5.26 ± 0.46 ^{①②}	91.09 ± 9.38 ^{①②}	9.01 ± 0.88 ^{①②}	29.56 ± 3.06 ^{①②}
参杞强精颗粒 0.80 mg/mL	3.81 ± 0.35 ^{①②③}	6.63 ± 0.61 ^{①②③}	80.04 ± 9.05 ^{①②③}	7.83 ± 0.74 ^{①②③}	35.88 ± 4.13 ^{①②③}
参杞强精颗粒 1.60 mg/mL	4.07 ± 0.39 ^{①②③④}	7.94 ± 0.80 ^{①②③④}	65.33 ± 5.82 ^{①②③④}	6.14 ± 0.65 ^{①②③④}	40.05 ± 4.46 ^{①②③④}
F 值	91.006	104.854	174.338	115.960	155.219
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与 H₂O₂ 损伤模型组比较, $P < 0.05$; ③与参杞强精颗粒 0.40 mg/mL 组比较, $P < 0.05$; ④与参杞强精颗粒 0.80 mg/mL 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 参杞强精颗粒对细胞内 ROS、MDA、CAT、SOD、TAOC 含量的影响

ELISA 结果显示, 各组细胞内 ROS、MDA、CAT、SOD、TAOC 含量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常组比较, H₂O₂ 损伤模型组细胞内 ROS、MDA 含量均升高 ($P < 0.05$), CAT、SOD 和总抗 TAOC 的活性均下降 ($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 损伤模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组均降低细胞内 ROS 和 MDA 含量 ($P < 0.05$), 均增强 CAT、SOD 和 TAOC 的活性 ($P < 0.05$); 参杞强精颗粒低剂量组、中剂量组、高剂量组 (0.40、0.80 和 1.60 mg/mL) 两两比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 参杞强精颗粒对睾酮合成酶 StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 各组细胞内睾酮合成酶 StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与正常组比较, H₂O₂ 损伤模型组中睾酮合成酶 StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA 相对表达量下降 ($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 损伤模型组比较, 参杞强精颗粒各剂量组能提高睾酮合成酶 StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$); 参杞强精颗粒低、中、高剂量组 (0.40、0.80 和 1.60 mg/mL) 两两比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 5 参杞强精颗粒对细胞内 ROS、MDA、CAT、SOD、TAOC 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS 荧光强度/%	MDA/(u/mg)	CAT/(u/mg)	SOD/(u/mg)	TAOC/(u/mg)
正常组	0.82 ± 0.06	2.47 ± 0.14	15.06 ± 1.66	7.25 ± 0.71	18.55 ± 2.00
H ₂ O ₂ 损伤模型组	2.57 ± 0.21 ^①	6.05 ± 0.58 ^①	6.46 ± 0.59 ^①	2.76 ± 0.30 ^①	9.94 ± 1.04 ^①
参杞强精颗粒 0.40 mg/mL	2.09 ± 0.17 ^{①②}	5.12 ± 0.42 ^{①②}	7.90 ± 0.73 ^{①②}	4.09 ± 0.39 ^{①②}	11.86 ± 1.25 ^{①②}
参杞强精颗粒 0.80 mg/mL	1.84 ± 0.18 ^{①②③}	4.27 ± 0.39 ^{①②③}	9.58 ± 0.85 ^{①②③}	5.71 ± 0.55 ^{①②③}	13.45 ± 1.47 ^{①②③}
参杞强精颗粒 1.60 mg/mL	1.05 ± 0.11 ^{①②③④}	3.03 ± 0.35 ^{①②③④}	11.87 ± 1.22 ^{①②③④}	6.33 ± 0.58 ^{①②③④}	15.01 ± 1.39 ^{①②③④}
F 值	73.227	85.911	90.424	80.632	103.553
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与正常组比较， $P < 0.05$ ；②与 H₂O₂ 损伤模型组比较， $P < 0.05$ ；③与参杞强精颗粒 0.40 mg/mL 组比较， $P < 0.05$ ；④与参杞强精颗粒 0.80 mg/mL 组比较， $P < 0.05$ 。

表 6 参杞强精颗粒对睾酮合成酶 StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	StAR mRNA	P450 _{scc} mRNA	17β-HSD mRNA
正常组	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.06
H ₂ O ₂ 损伤模型组	0.50 ± 0.07 ^①	0.42 ± 0.05 ^①	0.61 ± 0.06 ^①
参杞强精颗粒 0.4 mg/mL	0.70 ± 0.06 ^{①②}	0.64 ± 0.07 ^{①②}	0.69 ± 0.07 ^①
参杞强精颗粒 0.8 mg/mL	0.83 ± 0.08 ^{①②③}	0.77 ± 0.09 ^{①②③}	0.82 ± 0.06 ^{①②③}
参杞强精颗粒 1.6 mg/mL	0.91 ± 0.08 ^{①②③④}	0.89 ± 0.07 ^{①②③④}	0.93 ± 0.08 ^{②③④}
F 值	90.153	115.866	98.611
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与正常组比较， $P < 0.05$ ；②与 H₂O₂ 损伤模型组比较， $P < 0.05$ ；③与参杞强精颗粒 0.40 mg/mL 组比较， $P < 0.05$ ；④与参杞强精颗粒 0.80 mg/mL 组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

睾丸间质细胞是睾丸中一种能特异性产生男性雄激素的细胞，受垂体前叶嗜碱性细胞分泌的间质细胞刺激素的作用，可促进精子的发生和男性生殖器官发育，并维持第二性征和性功能^[8]。氧化应激是细胞暴露于高浓度氧分子或氧的化学衍生物而引起的细胞损伤，导致炎症细胞浸润，蛋白酶分泌增加，产生大量氧化中间产物。研究表明，睾丸间质细胞氧化应激损伤是导致男性不育的重要原因之一^[9]。因此，通过抑制氧化应激损伤及清除睾丸间质细胞内活性氧，对保护睾丸间质细胞具有重要意义。

H₂O₂ 是机体内代谢产生的一种 ROS，是机体自由基产生的重要环节，在正常的生理条件下，机体内 ROS 的产生和清除维持正常生理平衡，当在病理条件下，这种正常平衡被打破，导致大量 ROS 的产生，引发细胞膜中不饱和脂肪酸发生过氧化，使机体长期处于氧化应激状态，进而氧化细胞 DNA、脂

类、蛋白质等，诱导细胞凋亡，导致某些酶失活，从而导致细胞功能损伤^[10]。目前 TM3 细胞氧化应激损伤的模型主要有 H₂O₂ 诱导、重金属诱导、偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH) 诱导等，其中，H₂O₂ 诱导是最为常见且成熟的模型，其作为一种 ROS，能抑制细胞增殖，造成细胞内大分子氧化损伤，最终导致细胞衰老、死亡、突变等严重后果。因此，H₂O₂ 诱导的氧化应激细胞模型普遍用于探究自由基介导的细胞损伤机制及抗氧化剂对氧化损伤的保护和修复机制。因此，本实验研究表明在给予 500 μmol/L H₂O₂ 诱导损伤睾丸间质细胞 4 h 后，TM3 细胞分泌睾酮的功能逐渐下降，细胞内 ROS 增加，引起氧化应激和过氧化损伤。

睾酮又称睾丸素，是男性最重要的雄激素，男性睾酮全部在睾丸间质细胞线粒体内合成，具有促进生殖器官发育和生长，维持男性第二性征发育，同时维持前列腺和精囊生精功能的作用，能促进蛋白质合成和骨骼生长。研究表明，睾丸

间质细胞合成睾酮是一系列酶促反应的结果^[11]。睾酮合成酶主要包括 StAR、P450_{scc}、17β-HSD, 其中 P450_{scc} 在线粒体是睾酮合成的关键限速酶, 而 StAR 主要将睾酮的前体胆固醇从线粒体膜外转运至膜内^[12], 17β-HSD 在靶组织中起着甾体类激素受体前调节的分子开关作用, 其能催化睾酮的类固醇激素生物合成, 促进睾酮合成。本研究结果表明, 参杞强精颗粒能明显提高 TM3 细胞存活率, 提高细胞上清液睾酮水平, 且能提高睾酮合成酶 StAR、P450_{scc}、17β-HSD mRNA 相对表达量。8-OHdG 是 ROS 自由基如羟自由基、单线态氧等攻击 DNA 分子中的鸟嘌呤碱基第 8 位碳原子而产生的一种氧化性加合物, 其作为内源性及外源性因素对 DNA 氧化损伤作用的生物标志物, 其含量的高低是评估体内氧化损伤程度, 以及氧化应激与 DNA 损伤相互关系的重要指标之一^[13]。本研究结果显示参杞强精颗粒能显著降低 8-OHdG 含量, 表明其能改善 TM3 细胞氧化应激及过氧化损伤。

以上研究结果表明, 参杞强精颗粒对正常 TM3 细胞无毒性作用, 参杞强精颗粒对 H₂O₂ 诱导睾丸间质细胞氧化应激损伤具有保护作用, 其机制可能与清除氧自由基、抗氧化应激损伤及促进睾酮合成有关。本研究为睾丸间质细胞氧化应激损伤导致男性不育的临床治疗提供了新思路, 为参杞强精颗粒在临床的开发应用提供可靠的科学依据, 但其作用机制仍需进一步深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] 周兴, 唐雪, 李波男, 等. AAPH 体外诱导小鼠睾丸间质细胞氧化应激模型建立与评价[J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(1): 3-10.
- [2] GAO L, GAO D K, ZHANG J, et al. Age-related endoplasmic reticulum stress represses testosterone synthesis via attenuation of the circadian clock in Leydig cells[J]. Theriogenology, 2022, 189: 137-149.
- [3] HAN A J, ZOU L Y, GAN X Q, et al. ROS generation and

MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells[J]. Toxicol Lett, 2018, 290: 36-45.

- [4] 宾彬, 姚重华. 强精煎治疗少弱精子症 62 例疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(11): 1586-1587.
- [5] 宾彬, 王杰, 陈定雄, 等. 强精煎治疗少弱精子症临床疗效及安全性研究[J]. 西部中医药, 2012, 25(4): 5-7.
- [6] 宾彬, 姚重华, 王杰, 等. 强精煎对模型小鼠睾丸生精细胞凋亡影响的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 91-92.
- [7] 赵剑, 任时, 翟玲玲, 等. 过氧化氢诱导 TM3 细胞氧化应激模型建立[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 312-314.
- [8] LI X H, ZHU Q Q, WEN Z N, et al. Androgen and luteinizing hormone stimulate the function of rat immature Leydig cells through different transcription signals[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 599149.
- [9] 钟量, 琚官群, 刘国华, 等. 干细胞微囊对大鼠 Leydig 细胞急性氧化应激损伤的保护机制研究[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(1): 14-18.
- [10] KOPALLI S R, CHA K M, CHO J Y, et al. Cordycepin mitigates spermatogenic and redox related expression in H₂O₂-exposed Leydig cells and regulates testicular oxidative apoptotic signalling in aged rats[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 404-416.
- [11] CHOI Y, LEE E G, LEE G, et al. Amodiaquine promotes testosterone production and *de novo* synthesis of cholesterol and triglycerides in Leydig cells[J]. J Lipid Res, 2021, 62: 100152.
- [12] GALANO M, LI Y C, LI L, et al. Role of constitutive STAR in Leydig cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 2021.
- [13] MUKHEEF M A, ALI R A, ALHEIDERY H H A. Follicular fluid 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) as biomarker for oxidative stress in intracytoplasmic sperm injection[J]. J Med Invest, 2022, 69(1.2): 112-116.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 唐爱存, 马家宝, 赖克道, 等. 参杞强精颗粒对 H₂O₂ 诱导小鼠睾丸间质细胞氧化应激损伤的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(19): 39-45.

Cite this article as: TANG A C, MA J B, LAI K D, et al. Effects of Shenqi Qiangjing granules against oxidative stress injury by H₂O₂ in TM3 cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(19): 39-45.