

## 实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.01.016

# “秩边透水道”针刺对弱精子症小鼠睾丸内外凋亡途径关键因子的影响

郝健亨<sup>1,2</sup>, 任佳<sup>2</sup>, 常博雅<sup>2</sup>, 王海军<sup>2</sup>✉, 冀来喜<sup>1,2</sup>

1. 成都中医药大学针灸推拿学院, 四川省成都市金牛区十二桥路37号, 610075; 2. 山西中医药大学

**[摘要]** **目的** 观察“秩边透水道”针刺对弱精子症模型小鼠生殖功能的影响, 并探讨可能作用机制。**方法** 将42只C57BL/6雄性小鼠随机分成空白组、模型组和针刺组各14只。模型组和针刺组小鼠给予环磷酰胺30 mg/(kg·d)腹腔注射7天建立弱精子症小鼠模型, 空白组腹腔注射7天0.9%氯化钠溶液10 ml/(kg·d)。造模成功后, 针刺组小鼠给予“秩边透水道”针刺, 每日1次, 每次20 min, 每周6次, 共3周; 其余两组只进行固定而不针刺。日常观察各组小鼠的一般情况, 并记录干预前后体质量变化。干预结束次日每组随机取6只雄鼠检测精子质量以及睾丸、附睾质量并计算相应指数; ELISA法检测血清中睾酮(T)、促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成激素(LH)含量; HE染色和TUNEL染色观察睾丸和附睾病理组织形态和细胞凋亡情况; 荧光定量PCR法和Western blot法分别检测睾丸组织死亡相关因子(Fas)、Fas相关死亡域蛋白(FADD)、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、B淋巴细胞瘤2关联X的蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)mRNA和蛋白表达变化。将每组剩余的8只雄鼠与处于动情周期的同品系雌鼠进行1:1合笼, 检测合笼后每组小鼠的妊娠率和每胎胚胎数量。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠体重减轻, 睾丸质量、睾丸指数、附睾质量和附睾指数下降, 精子总数、精子活力和精子活率下降, 血清T、FSH和LH含量下降, 细胞凋亡率升高, Fas、FADD、Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平提高, Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平降低( $P<0.01$ ), 睾丸组织和附睾组织病理形态异常, 生精小管排列紊乱, 管腔内生精细胞数量减少; 合笼后雌鼠的妊娠率和每胎胚胎数量降低( $P<0.01$ )。与模型组比较, 针刺组小鼠睾丸质量、睾丸指数、附睾质量、附睾指数、精子总数、精子活力和精子活率均提高, 血清T、FSH和LH含量提高, 细胞凋亡量降低, Fas、FADD、Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平降低, Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平提高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 睾丸组织和附睾组织形态改善, 生精小管排列紧密, 管腔内生精细胞数量增加; 合笼后雌鼠的妊娠率和每胎胚胎数量提高( $P<0.01$ )。**结论** “秩边透水道”针刺可以改善弱精子症模型小鼠睾丸组织细胞凋亡, 提高生殖功能, 其机制可能与调节睾丸组织外在膜受体途径(Fas介导的途径)和内在在线粒体途径(Bcl-2/Bax调控的途径)的关键因子有关。

**[关键词]** 弱精子症; 秩边; 水道; 针刺; 细胞凋亡

目前全球范围内约有15%育龄夫妇受不孕不育问题的困扰, 其中男性原因占50%左右<sup>[1]</sup>。男性不育最突出的表现为精子质量下降, 其中精子活力下降尤为突出<sup>[2]</sup>。《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第5版将禁欲2~7天, 经2次及以上精液常规分析, 前向运动精子比率低于32%

或者精子总活率低于40%称为弱精子症<sup>[3]</sup>。目前弱精子症常采用左卡尼汀、维生素E等西药治疗, 但仍有部分患者疗效不明显, 还可能出现胃肠不适、头痛等副作用<sup>[4]</sup>。“秩边透水道”针法来源于《黄帝内经》, 是从秩边向水道方向透刺使针感放射至前阴部的一种针法。本课题组在少弱精症的实验研究中发现, “秩边透水道”针法对于改善精子质量有积极意义<sup>[5-6]</sup>。细胞凋亡是一种重要的细胞死亡机制, 研究发现, 细胞凋亡在精子生成、成熟和生殖细胞健康方面扮演重要角色<sup>[7]</sup>。因此, 本研究

**基金项目:**国家自然科学基金(82074549); 山西省中医药管理局科研课题(2023ZYB048); 山西中医药大学2020年度科技创新能力培育计划(2020PY-LP-03)

✉ 通讯作者: whjdavid@163.com

采用“秩边透水道”针法对弱精子症模型小鼠进行干预,以细胞凋亡为切入点,探讨该针法对弱精子症小鼠生殖功能的影响及可能机制,以期“秩边透水道”的临床推广提供实验室依据。本实验通过山西中医药大学伦理委员会审查(伦理批准号 AWE202303381)。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级健康 C57BL/6 雄性小鼠 42 只和雌性小鼠 40 只,雄鼠体质量为  $(19\pm 1)$  g,雌鼠体质量为  $(17\pm 1)$  g,鼠龄均为 6~7 周,购自北京斯贝福公司,实验动物生产合格证号:SCXK(京)-2019-0010,饲养于山西中医药大学动物实验中心。饲养环境:温度为  $(25\pm 2)$  °C、湿度为  $(55\pm 5)$  %、每日明暗交替为 12 h,饮水饮食自由,适应性喂养 1 周。

### 1.2 主要试剂和仪器

环磷酸胺(货号:MB1315),大连美仑生物技术有限公司;苏木素-伊红(HE)染色液(货号:DH0006),北京雷根生物技术有限公司;睾酮(T)试剂盒(货号:MU30398)、促卵泡生成素(FSH)试剂盒(货号:MU30265)、促黄体生成激素(LH)试剂盒(货号:MU30382),武汉贝茵莱生物科技有限公司;一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号:G1504),动物睾丸组织固定液(货号:G1121)、RNA 提取液(货号:G3013)、Swe-Script All-in-One RT SuperMix(货号:G3337)、2× Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix(货号:G3326)、RIPA 裂解液(货号:G2002)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(货号:G2026)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)抗体(货号:GB124830)、B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 的蛋白(Bax)抗体(货号:GB12690)、半胱氨酸天冬氨酸酶 3(Caspase-3)抗体(货号:GB11767C)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(货号:GB11001)、山羊抗兔二抗-HRP(货号:GB23303),武汉赛维尔生物科技有限公司;死亡相关因子(Fas)抗体(货号:13098-1-AP)、Fas 相关死亡域蛋白(FADD)抗体(货号:14906-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司。

0.25 mm×13 mm 一次性无菌针灸针,苏州华佗医疗器械有限公司;3k15 型高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司;Forma 900 型超低温冷冻储存箱,德国 Thermo Scientific 公司;RM 2145 型石蜡切片机,德国 LEICA 公司;PowerPac Basic 型凝胶电泳

仪、HOOD-II 型凝胶成像分析仪,美国 Bio-Rad 公司;ECLIPSE Ci-S 型荧光显微镜,日本 Nikon 公司;Spectra Max Plus384 型酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;WLJY-9000 型精子质量检测系统,北京伟力医疗公司。

### 1.3 模型制备

适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法将雄鼠分为空白组、模型组和针刺组各 14 只。每日上午对模型组及针刺组雄鼠给予腹腔注射环磷酸胺 30 mg/(kg·d)诱导弱精子症小鼠模型<sup>[8]</sup>,注射体积为 10 ml/kg,空白组注射等体积的 0.9%氯化钠溶液,共 7 天。当小鼠精子总数与活力较空白组下降且具有统计学意义则判定模型制备成功<sup>[7]</sup>。

### 1.4 干预方法

实验第 8 天,针刺组参照文献[9]的小鼠膈穴大致范围并结合前期大鼠取穴经验进行取穴。每日下午将小鼠呈俯卧位固定,先用 75%的乙醇对穴位局部进行消毒,然后选用 0.25 mm×13 mm 一次性针灸针分别从双侧“秩边”穴(小鼠臀部外侧,股骨大转子与第四荐骨连线中点的骨性缝隙处)斜刺向其同侧“水道”穴(剑突至耻骨联合上缘上 2/3 与下 1/3 交界处下约 8 mm,正中线上旁开约 3 mm),进针深度约 5 mm,不行提插捻转手法,每次 20 min,每日 1 次,每周 6 次,共 3 周;空白组和模型组只进行固定,不进行其他干预。

### 1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 一般情况观察 日常记录小鼠精神状态、毛发色泽、活动度变化以及其他行为表现,同时记录干预前后的体质量。

1.5.2 睾丸、附睾质量及指数检测 干预结束次日,各组采用随机数字表法选取 6 只进行取材,小鼠经异氟烷气体麻醉后,通过眼球摘除法采血,静置 30 min 后,4 °C、3000 r/min 条件下离心 15 min(离心半径 8.2 cm),收集上方血清低温保存;然后脱颈处死,剪取小鼠两侧睾丸和附睾组织,无菌剪剪除多余脂肪组织,置于滤纸上吸除多余水分,利用电子天平称得睾丸和附睾质量,计算得出相应的脏器指数(小鼠两侧睾丸或附睾质量/处死前最后一次测得的体质量)×100%。测量后将左侧睾丸和附睾置于固定液中避光保存,右侧睾丸置于 -80 °C 条件下保存。

1.5.3 精子质量检测 取右侧小鼠附睾置于培养皿中,加入适量 0.9%氯化钠溶液,用一次性无菌注射器针头轻轻挑破组织,使精子游离在 0.9%氯

化钠溶液中。37℃条件下孵育 5 min, 使精子充分游离制成悬液, 滴加在精子计数板上, 通过精子质量检测仪配套软件分析精子总数、精子活率(活精子数量/总精子数量×100%)、精子活力(前向运动精子数量/总精子数量×100%)。

1.5.4 ELISA 法检测小鼠血清 T、FSH 和 LH 含量 上述取材的 6 只雄鼠血清样本, 根据 ELISA 试剂盒说明书严格进行操作, 利用酶标仪观察记录各实验孔在 450 nm 波长处的吸光度值, 并绘制标准曲线, 分别计算对应的 T、FSH 和 LH 浓度。

1.5.5 HE 染色法检测睾丸和附睾组织病理形态 取各组小鼠左侧睾丸和附睾组织固定 48 h, 行常规脱水、透明、浸蜡、包埋后, 制备成 5 μm 石蜡切片。对部分切片行常规 HE 染色: 石蜡切片脱蜡至水, 苏木素染色 3~5 min, 切片依次入 85%、95% 的梯度乙醇脱水, 后入伊红中染色 5 min, 最后脱水封片, 在镜下观察各组小鼠睾丸和附睾病理学变化。

1.5.6 TUNEL 染色法检测睾丸组织阳性细胞凋亡率 取上述睾丸石蜡切片进行 TUNEL 染色: 先逐级脱蜡至水, 蛋白酶 K 修复, 破膜, 室温平衡后, 滴加 TUNEL 染色试剂盒内的工作液, 37℃恒温箱孵育 1 h, DAPI 复染细胞核, 抗荧光淬灭封片剂封片, 最后进行镜检拍照, 随机选取 5 个视野, 通过 Image J 软件计算阳性细胞凋亡率(%) = 凋亡细胞面积 / 总细胞面积 × 100%。

1.5.7 荧光定量 PCR 法检测睾丸组织 Fas、FADD、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达 每组采用随机数字表法取 3 只小鼠右侧睾丸组织将其放入离心管中, 按照试剂盒说明书指示提取总 RNA; 然后将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA, 后将反转录得到的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增(设定条件为: 95℃×30 s, 1 次循环; 95℃×15 s, 60℃×30 s, 40 个循环)。反应结束以后, 通过 PCR 仪读取各个反应孔的 Ct 值, 结果以 β-actin 为内参, 通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  公式计算目的基因的 mRNA 相对表达量。引物序列由武汉赛维尔生物公司设计, Fas: 上游 GGC-GGCTTCGTGAAACTGATA, 下游 GCTCAGCCTAG-TTTTCAGGTGG, 产物长度 96 bp; FADD: 上游 CGCGTGAGCAAACGAAAGC, 下游 CACACAATGT-CAAAATGCCACC, 产物长度 227 bp; Bcl-2: 上游 GCTACCGTCGTGACTTCGCA, 下游 CATCCCAGC-CTCCGTTATCC, 产物长度 270 bp; Bax: 上游 TT-GCTACAGGGTTTCATCCAGG, 下游 GCAAAGTAG-AAGAGGGCAACCA, 产物长度 275 bp; Caspase-3:

上游 TGGAATGTCATCTCGCTCTGGT, 下游 GAAG-AGTTTCGGCTTTCCAGTC, 产物长度 298 bp; GAPDH: 上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG, 下游 TGAG-GTCAATGAAGGGGTCGT, 产物长度 133 bp。

1.5.8 Western blot 法检测睾丸组织 Fas、FADD、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达 每组选取剩余 3 只小鼠右侧的睾丸组织, 加入 150 μl RIPA 裂解液后 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8.2 cm), 收集上清总蛋白液, 通过 BCA 法测定蛋白浓度, 配胶后每孔加入 10 μl 蛋白样本进行电泳操作, 湿转法转运 2 h 后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 左右, 洗膜后加入所需一抗放入冰箱 4℃过夜(Fas、FADD、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 稀释比均为 1:1000, β-actin 稀释比为 1:3000)。隔天先用 TBST 洗膜 5×5 min, 然后室温条件下加入二抗孵育 1 h(稀释比为 1:5000), 再次洗膜 3×10 min, 滴加显影液后适当摇匀上机显影, 拍照保存并应用 Image J1.8.0 软件测定条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比作为目的蛋白的相对表达量进行组间比较。

1.5.9 妊娠率和胚胎数量检测 通过阴道涂片法检测雌鼠动情周期, 选取处于动情期的 24 只雌鼠采用随机数字表法分为 3 组, 每组 8 只, 和每组剩余的 8 只雄鼠进行 1:1 同笼。次日通过阴道涂片检查雌鼠阴道中有无精子, 观察到精子则为交配成功, 当作受孕的 0.5 天。受孕第 8 天时, 将雌鼠麻醉后脱颈处死, 剖开腹腔, 观察子宫内有无胚胎并统计胚胎数量, 计算各组每胎胚胎数(各组胚胎总量/各组受孕雌鼠数量)和妊娠率(各组受孕雌鼠数量/各组雌鼠数量×100%)。

## 1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析, 计量资料均符合正态分布, 用均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。方差齐时多组比较运用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐则多组比较运用 Tamhane's 检验, 两两比较使用 Dunnett's *t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠一般情况比较

实验过程中各组小鼠均未出现死亡。空白组小鼠精神状态良好, 饮食正常, 毛发柔顺光泽, 活动规律; 模型组小鼠精神较差, 进食量和饮水量明显减少, 毛色暗淡, 多蜷缩角落; 针刺组小鼠较模型组精神状态和饮食活动均得到不同程度改善。表 1

示, 干预前后, 与空白组相比, 模型组和针刺组小鼠体质量均明显下降 ( $P<0.01$ ), 而模型组和针刺组体质量差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表1 各组小鼠干预前后体质量比较  
Table 1 Comparison of body mass of mice in each group  
(g,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 干预前                      | 干预后                      |
|-----|----|--------------------------|--------------------------|
| 空白组 | 14 | 22.38±0.72               | 26.67±0.60               |
| 模型组 | 14 | 19.89±1.04 <sup>a)</sup> | 22.24±0.89 <sup>a)</sup> |
| 针刺组 | 14 | 19.68±1.06 <sup>a)</sup> | 22.74±0.90 <sup>a)</sup> |

注: a) 与空白组同时间比较,  $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠睾丸和附睾质量、指数比较

表2示, 与空白组相比, 模型组小鼠睾丸质量、睾丸指数、附睾质量和附睾指数明显下降 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 针刺组睾丸质量、睾丸指数、附睾质量和附睾指数均显著提高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

表2 各组小鼠睾丸和附睾指数比较  
Table2 Comparison of testicular and epididymal index of mice  
in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 睾丸质量/mg                   | 睾丸指数/%                  | 附睾质量/mg                  | 附睾指数/%                  |
|-----|----|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 6  | 189.62±4.79               | 7.26±0.17               | 47.80±1.43               | 1.83±0.04               |
| 模型组 | 6  | 115.25±6.10 <sup>a)</sup> | 5.25±0.12 <sup>a)</sup> | 35.03±1.81 <sup>a)</sup> | 1.60±0.03 <sup>a)</sup> |
| 针刺组 | 6  | 128.72±3.78 <sup>b)</sup> | 5.79±0.10 <sup>b)</sup> | 37.90±1.48 <sup>c)</sup> | 1.68±0.03 <sup>b)</sup> |

注: a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.01$ ; c) 与模型组比较,  $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠精子质量比较

表3示, 与空白组相比, 模型组精子总数、精子活力和精子活率下降 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 针刺组精子总数、精子活力和精子活率均提高 ( $P<0.01$ )。

表3 各组小鼠精子质量比较  
Table 3 Comparison of sperm quality of mice in each group  
( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 精子总数/<br>$\times 10^6\cdot\text{ml}^{-1}$ | 精子活力/%                   | 精子活率/%                   |
|-----|----|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组 | 6  | 53.64±4.11                                | 56.96±4.45               | 59.81±2.18               |
| 模型组 | 6  | 13.67±2.78 <sup>a)</sup>                  | 19.57±2.50 <sup>a)</sup> | 34.32±2.39 <sup>a)</sup> |
| 针刺组 | 6  | 22.51±2.56 <sup>b)</sup>                  | 33.79±3.36 <sup>b)</sup> | 44.95±2.69 <sup>b)</sup> |

注: a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠血清T、FSH和LH含量比较

表4示, 与空白组相比, 模型组小鼠血清T、FSH和LH含量均下降 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 针刺组小鼠血清T、FSH和LH含量均提高( $P<0.01$ )。

表4 各组小鼠血清T、FSH和LH含量比较  
Table 4 Comparison of serum T, FSH, and LH levels of  
mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | T/ng·ml <sup>-1</sup>   | FSH/IU·L <sup>-1</sup>  | LH/mIU·ml <sup>-1</sup>  |
|-----|----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 空白组 | 6  | 2.09±0.15               | 11.24±1.05              | 34.85±1.68               |
| 模型组 | 6  | 1.07±0.19 <sup>a)</sup> | 5.63±0.85 <sup>a)</sup> | 18.12±2.80 <sup>a)</sup> |
| 针刺组 | 6  | 1.59±0.15 <sup>b)</sup> | 8.15±0.70 <sup>b)</sup> | 27.63±2.09 <sup>b)</sup> |

注: T, 睾酮; FSH, 促卵泡生成素; LH, 促黄体生成激素。

a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.01$ 。

2.5 各组小鼠睾丸和附睾形态学及病理学比较

与空白组相比, 模型组小鼠睾丸组织体积变小, 颜色变暗或不均匀, 睾丸表面变得粗糙, 部分出现血管的扩张或异常分布; 小鼠附睾组织尤其是附睾头体积变小, 颜色变淡, 质地粗糙, 形态变差; 与模型组相比, 针刺组小鼠睾丸和附睾组织体积、色泽和形态均得到不同程度改善。与空白组相比, 模型组小鼠睾丸组织内曲细精管形态异常、排列松散, 管腔内生精细胞数量减少且排列紊乱, 生精上皮厚薄不均, 管中央精子减少, 附睾组织出现排列松散且层次紊乱的生精小管, 管壁不同程度变薄, 部分出现空泡现象, 腔内少见正常精子; 与模型组相比, 针刺组小鼠睾丸和附睾病理学形态以及管腔内精子数量均得到不同程度改善。详见图1。

2.6 各组小鼠睾丸组织阳性细胞凋亡率比较

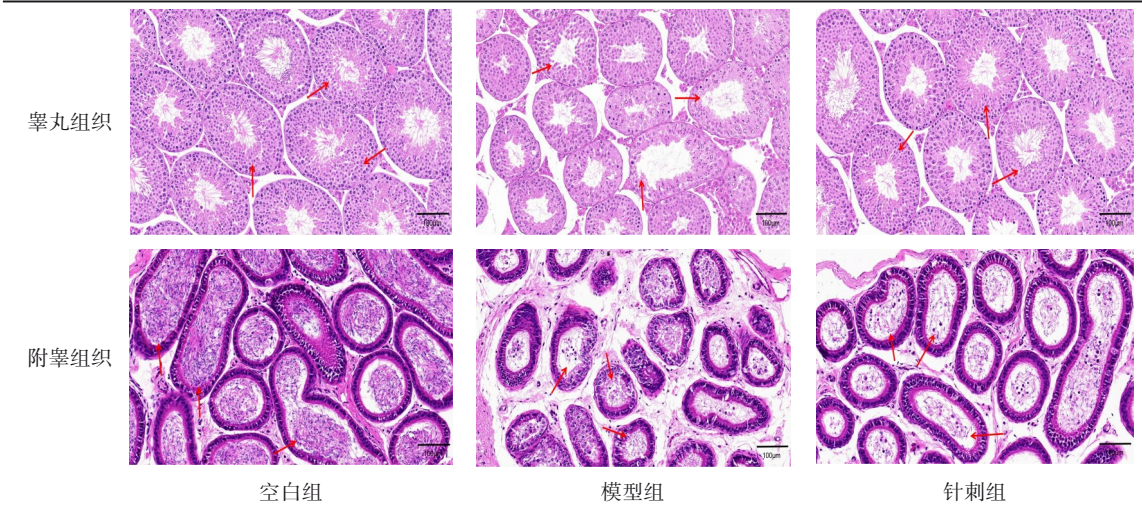
图2示, 绿色荧光代表阳性凋亡细胞, 主要分布在生精小管基底膜附近, 尤其是精原细胞周围。与空白组比较, 模型组小鼠睾丸凋亡细胞增多, 而针刺组小鼠睾丸凋亡细胞较模型组显著减少。空白组小鼠睾丸组织阳性细胞凋亡率为(5.32±1.79)%, 模型组为(30.06±3.93)%, 针刺组为(16.18±2.45)%。与空白组相比, 模型组小鼠睾丸组织中阳性细胞凋亡率明显升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 针刺组小鼠睾丸组织中阳性细胞凋亡率明显降低 ( $P<0.01$ )。

2.7 各组小鼠睾丸组织Fas、FADD、Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA表达比较

表5示, 与空白组相比, 模型组小鼠睾丸组织Fas、FADD、Bax和Caspase-3 mRNA表达水平升高, Bcl-2 mRNA表达水平降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 针刺组小鼠睾丸组织Fas、FADD、Bax和Caspase-3 mRNA表达水平不同程度降低, Bcl-2 mRNA表达水平升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

2.8 各组小鼠睾丸组织Fas、FADD、Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白相对表达量比较

各组小鼠睾丸组织Fas、FADD、Bcl-2、Bax和



注：睾丸组织中红色箭头指示为曲细精管；附睾组织中红色箭头指示为生精小管。

图 1 各组小鼠睾丸和附睾组织病理形态（HE 染色，×200）

Figure 1 Histopathological morphology of testis and epididymisin of mice in each group （HE staining， ×200）

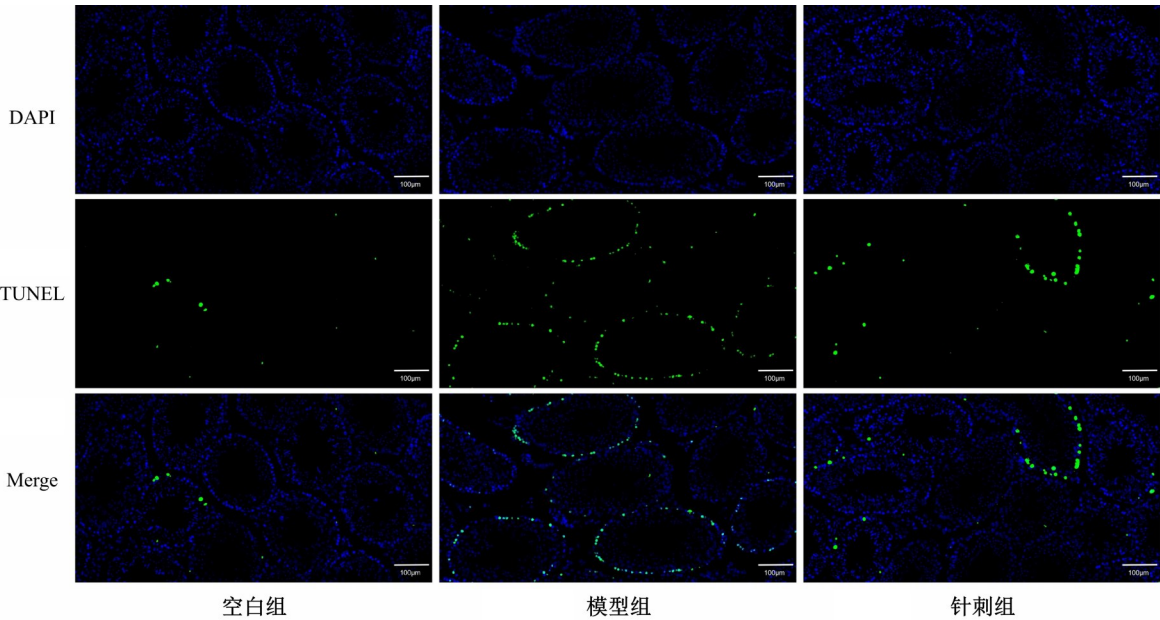


图 2 各组小鼠睾丸组织阳性细胞凋亡情况（TUNEL 染色，×200）

Figure 2 Comparison of positive cell apoptosis rates in testicular tissue of mice in each group （TUNEL staining， ×200）

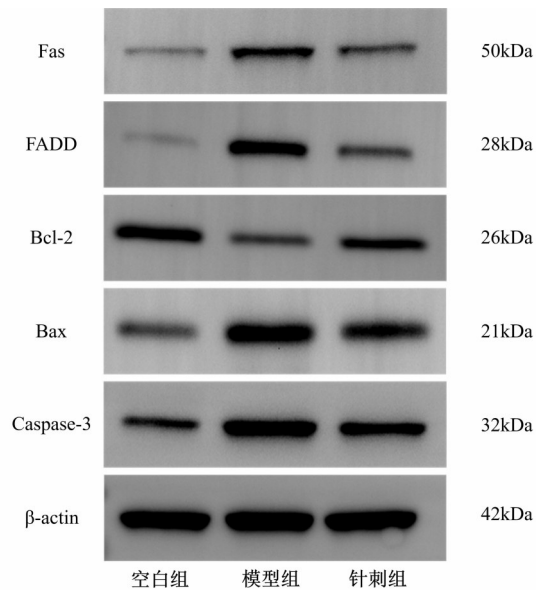
表 5 各组小鼠睾丸组织 Fas、FADD、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达比较

| Table 5 Comparison of Fas、FADD、Bcl-2、Bax and Caspase-3 mRNA expression in testicular tissue of mice in each group |    |                         |                         |                         |                         |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| (2 <sup>-ΔΔCT</sup> , $\bar{x}\pm s$ )                                                                            |    |                         |                         |                         |                         |                         |
| 组别                                                                                                                | 鼠数 | Fas                     | FADD                    | Bcl-2                   | Bax                     | Caspase-3               |
| 空白组                                                                                                               | 3  | 1.00                    | 1.00                    | 1.00                    | 1.00                    | 1.00                    |
| 模型组                                                                                                               | 3  | 1.18±0.04 <sup>a)</sup> | 1.32±0.04 <sup>a)</sup> | 0.62±0.10 <sup>a)</sup> | 1.58±0.05 <sup>a)</sup> | 1.37±0.04 <sup>a)</sup> |
| 针刺组                                                                                                               | 3  | 1.10±0.03 <sup>b)</sup> | 1.16±0.05 <sup>c)</sup> | 0.91±0.04 <sup>c)</sup> | 1.30±0.08 <sup>c)</sup> | 1.26±0.05 <sup>b)</sup> |

注：Fas，死亡相关因子；FADD，Fas 相关死亡域蛋白；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 的蛋白；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸酶 3。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

Caspase-3 蛋白电泳图见图 3。表 6 示，与空白组相比，模型组小鼠睾丸组织 Fas、FADD、Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量升高，Bcl-2 蛋白相对表达量降低 ( $P<0.01$ )；与模型组相比，针刺组小鼠睾丸组织 Fas、FADD、Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量降低，Bcl-2 蛋白相对表达量提高 ( $P<0.01$ )。



注：Fas，死亡相关因子；FADD，Fas 相关死亡域蛋白；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 的蛋白；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸酶 3。

图 3 各组小鼠睾丸组织 Fas、FADD、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of Fas, FADD, Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins in testis tissues of mice in each group

2.9 各组小鼠妊娠率和胚胎数量比较

空白组妊娠雌鼠 8 只，总胚胎数 79 个，妊娠率 100%，每胎胚胎数平均 (9.88±0.83) 个。模型组妊娠雌鼠 4 只，总胚胎数 23 个，妊娠率 50%，每胎胚胎数平均 (5.75±0.96) 个。针刺组妊娠雌鼠 6 只，总胚胎数 50 个，妊娠率 75%，每胎胚胎数平均 (8.33±0.82) 个。与空白组相比，模型组小鼠妊

娠率和每胎胚胎数降低 ( $P<0.01$ )；与模型组相比，针刺组妊娠率和每胎胚胎数提高 ( $P<0.01$ )。

3 讨论

精子活力是评价男性生育力的重要参考指标<sup>[10]</sup>。弱精子症属于中医学中“精少”“精稀”等范畴。中医学认为，弱精子症病位在肾，肾藏精，主生殖，肾气充则肾精足，故生殖之精得以生发，精子数量和活力充盈；肾气虚则肾精亏，故生精乏源，布散无力，精子数量和质量降低，形成弱精子症<sup>[11]</sup>。本实验选用“秩边透水道”进行干预治疗。秩边为足太阳膀胱经腧穴，有活络通经、清利膀胱之效；水道为足阳明胃经腧穴，有通调水道，调经益肾之功。从秩边向水道斜刺，可以刺激盆丛神经，令针感放射至前阴部，对附近的生殖器官发挥近治优势作用；又因膀胱经与肾经相表里，所以此针法也可补肾填精，增强生殖系统活力<sup>[12]</sup>。

环磷酰胺是一种常见的免疫抑制剂，研究发现，环磷酰胺可能通过多重途径对生殖细胞产生负面效应。首先，它可能通过诱导氧化应激和改变精母细胞在不同发育阶段的基因表达导致生殖细胞的损害，从而影响生育能力；其次，环磷酰胺可能通过影响 Fas/FasL 等途径，导致生殖细胞凋亡，进而降低精子活力并影响生殖能力<sup>[13]</sup>。T、FSH 和 LH 是调节生殖系统功能的重要激素，T 主要影响精子生成和性特征，FSH 和 LH 则促进生精细胞的发育成熟并刺激睾丸产生 T<sup>[14]</sup>。环磷酰胺导致的激素水平的异常可能会影响睾丸内生精细胞的正常发育，从而影响精子的生成和生殖功能<sup>[15]</sup>。因此，本研究采用环磷酰胺建立小鼠弱精子症模型，与空白组相比，模型组小鼠睾丸和附睾质量及指数降低，精子活力下降，睾丸和附睾病理形态变差，生精细胞层次和结构疏松紊乱，同时小鼠血清中 FSH、LH 和 T 含量降低，提示弱精子症模型建立成功。与模型组相比，经“秩边透水道”针刺后的弱精子症模

表 6 各组小鼠睾丸组织 Fas、FADD、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量比较

Table 6 Comparison of Fas, FADD, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expression in testicular tissue of mice in each group ( $\beta$ -actin,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | Fas                     | FADD                    | Bcl-2                   | Bax                     | Caspase-3               |
|-----|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 3  | 0.29±0.04               | 0.18±0.05               | 0.85±0.09               | 0.51±0.06               | 0.46±0.07               |
| 模型组 | 3  | 0.72±0.03 <sup>a)</sup> | 0.77±0.05 <sup>a)</sup> | 0.38±0.04 <sup>a)</sup> | 1.06±0.06 <sup>a)</sup> | 0.94±0.07 <sup>a)</sup> |
| 针刺组 | 3  | 0.47±0.04 <sup>b)</sup> | 0.44±0.03 <sup>b)</sup> | 0.65±0.06 <sup>b)</sup> | 0.80±0.04 <sup>b)</sup> | 0.69±0.04 <sup>b)</sup> |

注：Fas，死亡相关因子；FADD，Fas 相关死亡域蛋白；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，B 细胞淋巴瘤 2 关联 X 的蛋白；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸酶 3。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

型小鼠的睾丸和附睾质量及指数提高,病理形态得到改善,精子活力增加,血清中FSH、LH和T含量升高,提示针刺可以有效调节血清性激素水平,提高精子质量,在睾丸和附睾保护方面发挥积极作用。

凋亡是一种自我调控的细胞死亡机制,在精子的形成和发育中扮演着关键的角色。通过正常的凋亡,机体可以消除不正常或受损的精子进而实现对精子数量和质量的精细调控,确保生成的精子具有良好的质量和遗传信息<sup>[7,16]</sup>。然而,当凋亡过度激活时,可能导致精子数量减少、质量下降,从而影响受精和胚胎发育的成功率<sup>[16]</sup>。细胞凋亡主要通过外在膜受体途径(Fas介导的途径)和内在线粒体途径(Bcl-2/Bax调控的途径)来实现。在外在膜受体途径中,Fas受体与其配体结合,形成死亡诱导信号复合物,激活FADD蛋白,并引发级联反应,最终激活Caspase-3,执行细胞凋亡。内在线粒体途径涉及Bcl-2家族蛋白质,其中Bcl-2和Bax可以调控线粒体通透性,Bax的活化促使线粒体内的凋亡调节因子释放,进而激活Caspase-3。Caspase-3作为凋亡的最终执行者,剪切和激活关键蛋白,导致细胞的死亡<sup>[17]</sup>。这些途径共同构成了细胞凋亡的核心机制,在维持组织平衡和响应环境变化中发挥着关键作用。研究<sup>[18-19]</sup>表明,与正常个体相比,弱精子症患者或动物的精子凋亡率显著升高,增殖和迁移能力显著降低。本研究结果显示,与空白组相比,模型组小鼠睾丸组织内生精细胞凋亡增加,Fas、FADD、Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平提高,Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平降低,合笼后妊娠率和胚胎数量降低。经“秩边透水道”针刺后,小鼠睾丸组织内生精细胞凋亡数量降低,Fas、FADD、Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平降低,Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平提高,合笼后妊娠率和胚胎数量提高。以上结果提示“秩边透水道”针刺可能通过调节内、外凋亡途径,抑制弱精子症小鼠生精细胞凋亡,进而改善精液质量,提高精子活力,增加妊娠率和胚胎数量。

综上,“秩边透水道”针刺可以调节弱精子症小鼠性激素水平,提高精子活力,提高妊娠率和胚胎数量,其潜在机制可能与针刺通过内、外双途径调控睾丸组织下游Caspase-3所执行的级联反应,进而抑制生精细胞凋亡有关。由于本研究只对凋亡途径的部分关键蛋白进行检测,还存在局限性,未来还需要从通路的上下游进行进一步验证,以期针刺治疗弱精子症治疗提供更加准确的实验室依据。

## 参考文献

- [1] CARSON SA, KALLEN AN. Diagnosis and management of infertility: a review[J]. JAMA, 2021, 326(1): 65-76.
- [2] GACHET C, PRAT M, BURUCOA C, et al. Spermatic microbiome characteristics in infertile patients: impact on sperm count, mobility, and morphology[J]. J Clin Med, 2022, 11(6): 1505.
- [3] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th Ed. Geneva: WHO Press, 2010: 10-26.
- [4] ZAFAR MI, MILLS KE, BAIRD CD, et al. Effectiveness of nutritional therapies in male factor infertility treatment: a systematic review and network meta-analysis [J]. Drugs, 2023, 83(6): 531-546.
- [5] 曹韵茗, 姜会真, 李佳茹, 等. 秩边透水道针法干预少弱精症大鼠的实验研究[J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(1): 26-28, 32.
- [6] 姜会真. “秩边透水道”针法对少弱精症大鼠精液质量的影响[D]. 晋中: 山西中医药大学, 2020.
- [7] ASADI A, GHAHREMANI R, ABDOLMALEKI A, et al. Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: a narrative review[J]. Int J Reprod Biomed, 2021, 19(6): 493-504.
- [8] 单梦瑶, 王维纲, 董金香, 等. 人参糖蛋白对少弱精症小鼠生精障碍的改善作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(3): 575-583.
- [9] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第3部分: 小鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(5): 445-446.
- [10] CONG S, ZHANG J, PAN F, et al. Research progress on ion channels and their molecular regulatory mechanisms in the human sperm flagellum [J]. FASEB J, 2023, 37(7): e23052.
- [11] 李波. 基于《黄帝内经》探讨精子发生原理及少弱精子症辨证规律[J]. 中国男科学杂志, 2023, 37(1): 108-112.
- [12] 郝重耀, 张天生, 金晓飞, 等. “秩边透水道”针法体系的临床应用与拓展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(11): 1433-1434.
- [13] 朱庆均, 肖丽, 杨军, 等. 基于Fas/FasL途径的金匱肾气丸对肾阳虚模型睾丸细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 272-276.
- [14] WALKER WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis[J]. Spermatogenesis, 2011, 1(2): 116-120.
- [15] SALEH S, GHANAATPISHEH A, HAGHSHEENAS H, et al. The effect of leaf hydroalcoholic extract of Ephedra pachyclada infertility in male rats treated with cyclophosphamide: an experimental study[J]. Int J Reprod Biomed, 2023, 21(4): 285.
- [16] AITKEN RJ, KOPPERS AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa [J]. Asian J Androl,

- 2011, 13(1): 36.
- [17]HUANG X, OU C, SHU Y, et al. A self-sustained nano-platform reverses TRAIL-resistance of pancreatic cancer through coactivating of exogenous and endogenous apoptotic pathway [J]. Biomaterials, 2021, 272: 120795. doi: 10.1016/j.biomaterials.
- [18]LI G, ZHANG P, YOU Y, et al. Qiangjing tablets regulate apoptosis and oxidative stress via Keap/Nrf2 pathway to improve the reproductive function in asthenospermia rats[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 714892. doi: 10.3389/fphar.2021.714892.
- [19]LI F, NIU A, ZHAO K, et al. GRIM-19 in asthenozoospermia regulates GC-2 cell proliferation, apoptosis and migration[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 3106.

## Effect of Acupuncture at “Zhibian (BL 54)-to-Shuidao (ST 28)” on Key Factors of Endogenous Exogenous Apoptotic Pathways in Asthenospermia Model Mice

HAO Jianheng<sup>1,2</sup>, REN Jia<sup>2</sup>, CHANG Boya<sup>2</sup>, WANG Haijun<sup>2</sup>, JI Laixi<sup>1,2</sup>

1. School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075;  
2. Shanxi University of Chinese Medicine

**ABSTRACT Objective** To observe the effect of acupuncture “Zhibian (BL 54)-to-Shuidao (ST 28)” on the reproductive function of asthenospermia model mice and to explore the possible mechanism. **Methods** Forty-two male C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, and acupuncture group, with 14 mice in each group. Cyclophosphamide 30 mg/(kg·d) was injected intraperitoneally for 7 days to establish model of asthenospermia for the model group and the acupuncture group, while 0.9% sodium chloride solution 10 ml/(kg·d) was injected intraperitoneally for 7 days in the blank group. After successful modeling, mice in the acupuncture group received acupuncture at “Zhibian (BL 54)-to-Shuidao (ST 28)” once a day for 20 minutes, 6 times a week for 3 weeks; the remaining two groups were fixed without acupuncture. Daily observations were made on the general conditions of mice in all groups, and changes in body weight after intervention were recorded. On the next day after completing the treatment, 6 male mice selected randomly from each group to test the sperm quality as well as testicular and epididymal weights, and calculate the corresponding indices; ELISA was used to test the levels of testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) in serum; HE staining and TUNEL staining were performed to observe the pathological morphology and apoptosis of testicular and epididymal tissues; fluorescence quantitative PCR and western blot were used to detect changes in the expression of apoptosis-related factors (Fas), Fas-associated death domain protein (FADD), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteine-aspartic acid protease (caspase)-3 mRNA and protein in testicular tissue. The remaining 8 male mice in each group were housed with estrus-cycling mice of the same strain at 1 : 1 ratio, and the pregnancy rate and number of embryos per litter in each group were determined after mating. **Results** In comparison with the blank group, mice in the model group exhibited reduced body weight, decreased testicular mass, testicular index, epididymal mass, and epididymal index. Additionally, there was a decrease in total sperm count, sperm motility, and sperm viability. Serum levels of T, FSH, and LH were reduced. The apoptosis rate increased, and the expression levels of Fas, FADD, Bax, and Caspase-3 mRNA and proteins were elevated, while Bcl-2 mRNA and protein expression levels decreased ( $P < 0.01$ ). Pathological abnormalities were observed in testicular and epididymal tissues, with disrupted arrangement of seminiferous tubules and a decreased number of spermatogenic cells within the tubular lumen. Furthermore, the pregnancy rate and the number of embryos per litter decreased significantly after mating ( $P < 0.01$ ). In comparison with the model group, mice in the acupuncture group showed improvements in testicular mass, testicular index, epididymal mass, epididymal index, total sperm count, sperm motility, and sperm viability. Serum levels of T, FSH, and LH increased. The apoptosis rate decreased, and the expression levels of Fas, FADD, Bax, and Caspase-3 mRNA and proteins decreased, while Bcl-2 mRNA and protein expression levels increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Morphological improvements were observed in testicular and epididymal tissues, with a compact arrangement of seminiferous tubules and an increased number of spermatogenic cells within the tubular lumen. Furthermore, the pregnancy rate and the number of embryos per litter increased significantly after mating ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Acupuncture “Zhibian (BL 54)-to-Shuidao (ST 28)” can improve testicular tissue apoptosis and enhance reproductive function in a mouse model of asthenospermia. Its mechanism may be associated with the modulation of key factors in the extrinsic membrane receptor pathway (Fas-mediated pathway) and the intrinsic mitochondrial pathway (Bcl-2/Bax-regulated pathway) in testicular tissue.

**Keywords** asthenospermia; Zhibian (BL 54); Shuidao (ST 28); acupuncture; apoptosis

(收稿日期: 2023-08-19; 修回日期: 2023-10-20)

[编辑: 邓媛]