



基于AMPK介导的线粒体自噬研究黄精赞育胶囊 治疗少弱精子症的分子机制*

高源¹, 郭怡阳¹, 武默涵¹, 郑燕飞^{2△}

1. 北京中医药大学中医学学院(北京 100029); 2. 北京中医药大学国家中医体质与治未病研究院(北京 100029)

【摘要】 目的 基于AMPK介导的线粒体自噬方面探究国医大师王琦院士研发的治疗男性不育的国家中药三类新药黄精赞育胶囊治疗少弱精子症细胞层面的分子机制。**方法** 选择丙烯醛(acrolein, ACR)作用于GC-2spd(ts)小鼠精母细胞制作少弱精子症细胞模型,通过CCK8细胞活性检测确定后续造模用ACR浓度和造模时间。造模成功后加入不同浓度含黄精赞育胶囊的完全培养基进行细胞培养,于24 h后CCK8细胞活性检测,根据细胞活力确定后续给药浓度。GC-2spd细胞贴壁后分为NC组、造模组和ACR+HJZY给药组,通过共聚焦荧光显微镜观测黄精赞育胶囊对线粒体自噬的影响;将上述3组细胞分别转染siRNA-NC和siRNA-AMPK,分为siRNA-NC+control、siRNA-NC+ACR、siRNA-NC+ACR+HJZY、siRNA-AMPK+control、siRNA-AMPK+ACR、siRNA-AMPK+ACR+HJZY 6组,通过Western blot验证黄精赞育胶囊对AMPK介导的p-AMPK、LC3B、P62、PINK1、Parkin、TBK1、ULK1等线粒体自噬相关蛋白的调控作用。**结果** 通过细胞活性检测实验确定ACR的造模浓度为34 $\mu\text{mol/L}$,造模时间为20 min, HJZY给药浓度为160 $\mu\text{mol/L}$ 。共聚焦荧光显微镜显示黄精赞育胶囊对受损生精细胞线粒体膜电位具有一定正向调节作用,造模组线粒体膜电位较NC组大幅降低,ACR+HJZY给药组给药后细胞膜电位较造模组有所升高,差异有统计学意义($P<0.05$); Western blot检测结果显示siRNA-NC+ACR组p-AMPK/AMPK和PINK1蛋白表达水平较siRNA-NC+control组下降($P<0.001$), siRNA-NC+ACR组Parkin蛋白水平较siRNA-NC+control组有所下降,但差异无统计学意义, HJZY给药后这3种蛋白表达水平均较siRNA-NC+ACR组上升($P<0.001$); siRNA-NC+ACR组LC3B、P62、TBK1和ULK1蛋白表达水平均较siRNA-NC+control组上升($P<0.01$), siRNA-NC+ACR+HJZY组上述蛋白表达水平均较siRNA-NC+ACR组有所下降($P<0.05$)。转染敲减基因siRNA-AMPK后, siRNA-AMPK+ACR组p-AMPK/AMPK、PINK1和Parkin蛋白表达水平较siRNA-AMPK+control组有所下降($P<0.01$); HJZY给药后上述3种蛋白表达水平与siRNA-AMPK+ACR组比较差异均无统计学意义; siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-AMPK+ACR组相比, LC3B蛋白表达水平仍降低($P<0.01$),但P62、TBK1和ULK1蛋白表达水平差异均无统计学意义; siRNA-AMPK+control组与siRNA-NC+control组相比, p-AMPK/AMPK、ULK1和TBK1蛋白表达水平下降($P<0.001$), PINK1蛋白表达水平亦下降($P<0.05$), P62蛋白表达水平上升($P<0.001$); siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组相比, TBK1蛋白表达水平下降($P<0.001$), LC3B蛋白表达水平下降($P<0.01$), ULK1蛋白表达水平亦下降($P<0.05$), PINK1和Parkin蛋白表达水平有所下降但差异无统计学意义; siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比, p-AMPK/AMPK、PINK1和Parkin蛋白表达水平下降($P<0.05$), LC3B蛋白表达水平亦下降($P<0.01$), P62蛋白表达水平上升($P<0.001$), TBK1和ULK1蛋白表达水平差异无统计学意义。**结论** 黄精赞育胶囊可能通过调节AMPK介导的线粒体自噬达到治疗男性少弱精子症的效果。

【关键词】 男性不育 少弱精子症 AMPK 线粒体自噬 蛋白免疫印迹

Molecular Mechanisms of Huangjing Zanyu Capsule in Treating Oligoasthenospermia: A Study Based on AMPK-Mediated Mitophagy GAO Yuan¹, GUO Yiyang¹, WU Mohan¹, ZHENG Yanfei^{2△}. 1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. National Institute of Traditional Chinese Medicine Constitution and Preventive Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

△ Corresponding author, E-mail: yanfei_z@163.com

[Abstract] Objective To investigate the molecular mechanism of Huangjing Zanyu Capsule (HJZY), a new class-III traditional Chinese medicine for the treatment of male infertility developed by Wang Qi, an academican of the Chinese Academy of Engineering, based on AMPK-mediated mitophagy in the treatment of oligoasthenospermia. **Methods** Acrolein (ACR) was used to treat GC-2spd(ts) mouse spermatocytes to establish a cell model of oligoasthenospermia. The optimal ACR concentration and exposure time for subsequent modeling were determined by CCK8 cell viability assay. After successful modeling, the cells were cultured in complete medium containing different concentrations of HJZY. Then, cell viability was assessed by CCK8 assay after 24 hours, and the subsequent treatment

* 国家自然科学基金面上项目(No. 82174389)资助

△ 通信作者, E-mail: yanfei_z@163.com

出版日期: 2025-01-20

concentration was determined based on the cell viability. After the GC-2spd cells adhered to the wall, they were divided into a normal control (NC) group, a modeling group, and an ACR + HJZY treatment group. The effect of HJZY on mitophagy was observed by confocal fluorescence microscopy. The three groups of cells were transfected with siRNA-NC and siRNA-AMPK, respectively, and divided into six groups, including siRNA-NC + control, siRNA-NC + ACR, siRNA-NC + ACR + HJZY, siRNA-AMPK + control, siRNA-AMPK + ACR, and siRNA-AMPK + ACR + HJZY groups. Western blot was performed to validate the regulatory effect of HJZY on mitophagy-related proteins, such as p-AMPK, LC3B, P62, PINK1, Parkin, TBK1, and ULK1, which were all proteins mediated by AMPK. **Results** Through the cell viability assay, 34 $\mu\text{mol/L}$ was selected as the modeling concentration of ACR, and 20 minutes was selected as the modeling time. The treatment concentration of HJZY was 160 $\mu\text{mol/L}$. Confocal fluorescence microscopy showed that HJZY had, to a certain degree, a positive regulatory effect on the mitochondrial membrane potential of damaged spermatogenic cells. The mitochondrial membrane potential of the model group decreased significantly compared with that of the NC group. After exposure to treatment, the cell membrane potential of the ACR + HJZY treatment group increased compared with that of the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression levels of p-AMPK/AMPK and PINK1 proteins in the siRNA-NC + ACR group were significantly lower than those in the siRNA-NC + control group ($P < 0.001$). The level of Parkin protein in the siRNA-NC + ACR group was lower than that in the siRNA-NC + control group, but the difference was not statistically significant. After the administration of HJZY, the levels of these 3 proteins increased, and those in the siRNA-NC + ACR + HJZY group were higher than those in the siRNA-NC + ACR group ($P < 0.001$). The expression levels of LC3B, P62, TBK1, and ULK1 proteins in the siRNA-NC + ACR group were higher than those in the siRNA-NC + control group ($P < 0.01$), and those in the siRNA-NC + ACR + HJZY group were lower than those in the siRNA-NC + ACR group ($P < 0.05$). After transfection with the gene-silencing siRNA-AMPK, the expression levels of p-AMPK/AMPK, PINK1, and Parkin proteins in the siRNA-AMPK + ACR group were lower than those in the siRNA-AMPK + control group ($P < 0.01$). After the administration of HJZY, there was no significant difference in the levels of these three proteins between the siRNA-AMPK + ACR + HJZY group and the siRNA-AMPK + ACR group. The expression level of LC3B protein in the siRNA-AMPK + ACR + HJZY group was still lower than that in the siRNA-AMPK + ACR group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the levels of P62, TBK1, and ULK1 proteins between the siRNA-AMPK + ACR + HJZY group and the siRNA-AMPK + ACR group. Compared with the siRNA-NC + control group, the siRNA-AMPK + control group showed significantly decreased expression levels of p-AMPK/AMPK, ULK1, and TBK1 proteins ($P < 0.001$), decreased expression of PINK1 protein ($P < 0.05$), and increased expression of P62 protein ($P < 0.001$). Compared with the siRNA-NC + ACR group, the siRNA-AMPK + ACR group showed decreased expression of TBK1 protein ($P < 0.001$), decreased expression of LC3B protein ($P < 0.01$), and decreased expression of ULK1 protein ($P < 0.05$). The expression levels of PINK1 and Parkin proteins in the siRNA-AMPK + ACR group were lower than those in the siRNA-NC + ACR group, but the difference was not statistically significant. Compared with the siRNA-NC + ACR + HJZY group, the siRNA-AMPK + ACR + HJZY group showed decreased expression of p-AMPK/AMPK, PINK1, and Parkin proteins ($P < 0.05$), decreased expression of LC3B protein ($P < 0.01$), and increased expression of P62 protein ($P < 0.001$). There was no significant difference in the levels of TBK1 and ULK1 proteins between the siRNA-AMPK + ACR + HJZY group and the siRNA-NC + ACR + HJZY group. **Conclusion** HJZY may exert its therapeutic effect on oligoasthenospermia by regulating AMPK-mediated mitophagy.

[Key words] Male infertility Oligoasthenospermia AMPK Mitophagy Western blot

人口出生率的下降严重影响我国人口年龄结构及未来劳动力储备, 不孕不育夫妇中男性因素所致不育占比约为40%~50%^[1]。少、弱精子症是男性不育最常见的疾病构成因素, 约占58%~64%^[2]。尽管现代医学针对少、弱精子症的发病机制进行了大量研究, 但目前尚缺乏疗效确切的治疗药物。虽然辅助生殖技术为少、弱精子症的患者带来了生育的希望, 但辅助生殖技术的成功率仍较低, 如IVF-ET妊娠率仅为4%~40%^[3]。中医药治疗男性不育历史悠久, 疗效确切, 中药复方根据辨证论治, 从

整体着手, 具有多途径、多靶点的特点^[4]。本课题组通过一项基于4 779例大样本人群的Meta分析发现, 中医药可有效提升精子数量与精子活力^[5]。

黄精赞育胶囊是王琦院士针对男性不育“肾虚夹湿热瘀毒虫”病机研发的国家中药三类新药, 自2005年上市以来, 已在全国18个省市1 000多家医院临床应用。黄精赞育胶囊从整体调节出发, 通过补肾益气、温阳行气、祛瘀行滞治疗少、弱精子症, 取得了良好的临床疗效。经实验研究及临床应用表明, 黄精赞育胶囊能增加精子数量,

提高精子活力,有效治疗少、弱精子症引起的男性不育^[6-9]。

线粒体自噬是一类针对线粒体的靶物特异性自噬,一方面用于清除功能障碍或严重损伤的线粒体,从而实现线粒体质量控制^[10];一方面在能力匮乏的情况下通过自噬为细胞提供能量来源,作为营养储备的补充^[11]。尽管自噬调控机制复杂,多种信号级联和调控机制均可调节自噬活性,但AMPK可能是生物进化过程中最保守的自噬诱导因子,参与了绝大多数自噬途径^[12]。有学者发现,AMPK同其他线粒体自噬相关蛋白广泛存在于人类精子中,并保持高活性,提示线粒体自噬机制参与了精子功能调节及生存保障^[13]。新近研究发现,能量代谢传感器AMPK可通过调节线粒体发生、线粒体动力学、线粒体自噬等对线粒体的稳态进行整体调控,保证ATP合成与能量供应,是线粒体稳态调节的关键因子^[14]。在前期动物实验中,本课题组发现黄精赞育胶囊可有效恢复少、弱精子症大鼠生精细胞的减数分裂,促进生精细胞增殖,提升精细胞及精子数量。为进一步探究黄精赞育胶囊是否通过影响AMPK介导的线粒体自噬机制达到对少、弱精子症的治疗效果,本研究采用体外细胞实验的方法,探究黄精赞育胶囊治疗少、弱精子症的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养

GC-2spd(ts)小鼠精母细胞,购买于中国科学院昆明细胞库。GC-2spd细胞贴壁培养于DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清),在37℃、体积分数为5%CO₂培养箱内培养,每2~3d传代一次。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白质常规分子量标记(10~180 kDa): Proteintech, 货号: PL00001; 超宽分子量预染蛋白质标记(10~310 kDa): Proteintech, 货号: PL00003; RIPA Lysis Buffer(Medium): 江苏康为世纪, 货号: CW2334; Protease Inhibitor Cocktail: 江苏康为世纪, 货号: CW2200; Phosphatase Inhibitor Cocktail: 江苏康为世纪, 货号: CW2383; BCA Protein Assay Kit: 江苏康为世纪, 货号: CW0014; SDS-PAGE Loading Buffer(Reducing): 江苏康为世纪, 货号: CW0027; 30% Acrylamide : Bis Solution: 江苏康为世纪, 货号: CW0024; SDS-PAGE Stacking Gel Buffer: 江苏康为世纪, 货号: CW0025; SDS-PAGE Separating Gel Buffer: 江苏康为世纪, 货号: CW0026; 过硫酸铵: 上海阿拉丁, 货号: A112450; PAGE胶促凝剂: 北京索莱宝, 货号: T8090; Tris-Glycine SDS Buffer: 江苏康为世纪, 货号: CW0045; Tris-Glycine Transfer Buffer: 江苏康为世纪, 货

号: CW0044; 甲醇: Innochem, 货号: A84469; TBST: 江苏康为世纪, 货号: CW0043; siRNA购自吉玛基因, Negative control组序列(5' to 3'): sense: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT; antisense: ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT; 1115l组序列(5' to 3'): sense: GCCUCACCCUGA AAGAGUATT; antisense: UACUCUUUCAGGGUG AGGCTT; Lipo 8000转染试剂, 碧云天, 货号: C0533FT。抗体: LC3B(ESQ2K) Mouse mAb: CST.3t5: 83506S; SOSTM1/p62 Antibody: CST.#9: 5114S; AMPK α (D5A2) Rabbit mAb: CST, 货号: 5831S; Phospho-AMPK α (Thr172)(40H9) Rabbit mAb: CST, 货号: 2535S; PINK1: santacruz, 货号: sc-517353; Parkin: santacruz, 货号: sc-32282; TBK1: abcam, 货号: ab40676; ULK1、(D8H5) Rabbit mAb: CST, 货号: 8054S; GAPDH、Monoclonal antibody: Proteintech, #3: 60004-1-Ig; Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP Conjugated: 北京柏奥易杰, 货号: BE0102; Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugated: 北京柏奥易杰, 货号: BE0101; JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay试剂盒(Microplate)(ab112134); 黄精赞育胶囊(Huang Jing Zan Yu Capsule, HJZY): 国药准字 Z20050267, 生产厂家: 上海新亚药业邗江有限公司, 规格: 0.31 g 24粒/瓶, 主要成分为何首乌(制)、黄精(酒制)、枸杞子、菟丝子、五味子、熟地黄、肉苁蓉、淫羊藿、紫河车、续断、党参、当归、丹参、蒲公英、败酱草、蛇床子、蜂房(炒)、水蛭、牡蛎、车前子(盐炒)。共聚焦荧光显微镜(奥林巴斯, fv3000)。

1.3 丙烯醛诱导少弱精子症细胞模型的构建

有研究发现,丙烯醛(acrolein, ACR)可抑制Akt、mTOR的磷酸化,继而引起过度自噬,与环磷酸胺引起的大鼠少、弱精子症结果相似,因此本研究选择ACR作为少弱精子症细胞模型的造模药^[15]。在通风橱内配制含10、20、30、40、50、60 μ mol/L ACR的完全培养基,由于ACR具有强挥发性,实验中现配现用。将GC-2spd细胞种于96孔板,每孔约 1×10^4 个细胞,每组3个复孔,摇匀细胞,然后加入上述配制的含ACR完全培养基进行细胞培养。分别于培养5、10、15、20、25、30 min时取出部分细胞进行CCK8细胞活性检测,根据细胞活力确定后续造模用ACR浓度和造模时间。

1.4 黄精赞育胶囊保护作用浓度的选择

在超净台中分别配置用DMSO提取的含0、10、20、40、80、160、320、640 μ mol/L黄精赞育胶囊的完全培养基。李博悻等^[16]证明HJZY给药24 h后GC-2spd细胞活力明显升高,因此本实验以24 h为HJZY给药时间。将GC-

2spd(ts)以 1×10^4 个/孔接种到96孔板,细胞长到80%左右时,构建少弱精子症细胞模型,造模成功后加入不同浓度上述含黄精赞育胶囊的完全培养基进行细胞培养,于24 h后CCK8细胞活性检测,根据细胞活力确定后续给药浓度。

1.5 CCK-8检测细胞活力

上述实验进行结束后,弃去上清液,加入含有CCK-8的DMEM继续孵育2 h,然后置于酶标仪450 nm处检测OD值,将正常细胞组的细胞活力视为100%,其他组的OD值进行相比,得到细胞存活率。

1.6 共聚焦荧光显微镜检测线粒体膜电位改变

GC-2spd(ts)小鼠精母细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板,细胞贴壁后分为NC对照组,造模组,ACR+HJZY给药组,每组3个复孔。造模组加入34 $\mu\text{mol/L}$ ACR造模20 min后弃去含药培养基, PBS清洗两遍后加入完全培养基。ACR+HJZY给药组加入34 $\mu\text{mol/L}$ ACR造模20 min后弃去含药培养基, PBS清洗两遍加入160 $\mu\text{mol/L}$ 含黄精赞育胶囊的完全培养基孵育24 h。给药结束后,使用JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay试剂盒进行线粒体膜电位染色。具体操作如下:向5 mL Assay Buffer A(Component B)中加入50 μL 100 $\times$ JC-10(Component A),混合均匀。在96孔板中加入50 μL /孔的JC-10上染液。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中避光孵育1 h。孵育结束后,在上述孔中加入50 μL /孔的Assay Buffer B(Component C)。结束后使用荧光显微镜下观察荧光情况并拍照。

1.7 基因敲减AMPK

将细胞以 3×10^6 个/皿的密度接种于六个6 cm培养皿中,分为siRNA-NC+control、siRNA-NC+ACR、siRNA-NC+ACR+HJZY、siRNA-AMPK+control、siRNA-AMPK+ACR、siRNA-AMPK+ACR+HJZY六组,细胞长到60%左右时,进行siRNA-NC或siRNA-AMPK转染。根据分组每组细胞分别配制含100 pmol的siRNA-NC或siRNA-AMPK转染体系,加入4 μL 的Lipo8000转染试剂,轻轻混匀,室温静置20 min。用移液枪吸取125 μL 转染混合物加入细胞中并轻轻晃动混匀,然后放入培养箱继续培养6 h后,弃去含转染试剂的培养基,更换新鲜培养基。转染48 h后检测蛋白的表达情况。

1.8 Western blot

细胞实验结束后,弃去培养基,用冰冷PBS洗涤细胞2次。RIPA裂解液分别提取各组细胞蛋白,后采用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。采用10%的SDS-PAGE凝胶,20 μg 上样量,进行电泳,80 V恒压至样品进入分离胶

后改120 V恒压至电泳结束。后采用350 mA恒流60 min进行电转。电转结束后, PVDF膜用5%脱脂奶粉常温封闭90 min。封闭结束后,用TBST把PVDF膜上的牛奶洗干净。一抗孵育PVDF膜并4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床封闭过夜,孵育结束回收一抗。第二天TBST洗膜3次后,选择合适的二抗,室温孵育1 h后, TBST洗3次,加入ECL化学发光试剂,曝光,显影。用ImageJ软件进行灰度值分析,以目的蛋白和GAPDH条带灰度值的比值代表各个目的蛋白表达的相对水平。

1.9 统计学方法

实验结果运用SPSS20.0统计软件进行分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。当各组数据分别服从正态分布,且方差齐性时,使用单因素方差分析,看LSD的检验结果;若各组数据分别服从正态分布,但方差不齐时,看Dunnett's T3的检验结果。若各组数据不服从正态分布,则使用非参数检验法进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞造模给药条件

分别以不同浓度的ACR(10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$)孵育细胞30 min,细胞存活率随ACR浓度的增加而呈现下降趋势(图1)。结果显示,15 min、20 min与30 min细胞抑制率曲线基本重合,提示该造模时间范围细胞活性稳定,后续以20 min作为造模时间。

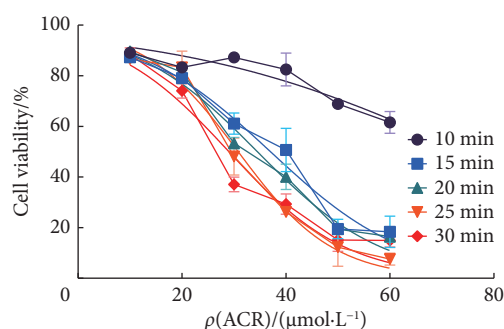


图1 ACR造模细胞存活率 ($n=3$)

Fig 1 Survival rate of the ACR modeling cells ($n=3$)

取造模20 min后更换完全培养基培养细胞24 h后各浓度细胞, CCK8检测OD值, 计算细胞抑制率。发现含10~20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的ACR完全培养基对细胞抑制作用不明显, 30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的ACR完全培养基对GC-2spd细胞有明显抑制作用($P < 0.001$)(图2)。通过SPSS 20.0计算 IC_{50} 为33.99, 因此后续实验以34 $\mu\text{mol/L}$ 作为造模浓度。

根据上述实验获得的干预条件进行造模给药, 即34 $\mu\text{mol/L}$ ACR造模20 min之后分别以10、20、40、80、

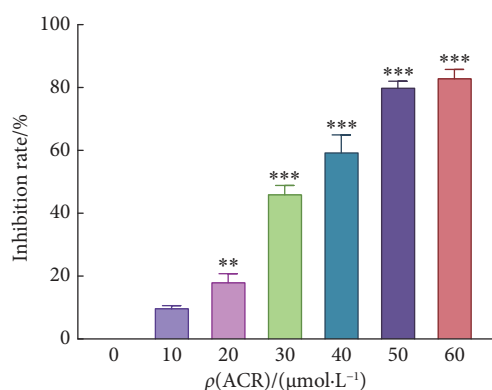


图 2 ACR造模后20 min 细胞的抑制率

Fig 2 Cell inhibition rate at 20 minutes of ACR modeling time

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. 0 μmol/L. $n = 3$.

160、320、640 μmol/L HJZY给药24 h。结果(图3)显示, 给药24 h后, ACR 组细胞活力低于NC组, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。40、80、160 μmol/L HJZY组的细胞活力相较于 ACR 组均有差异, 其中160 μmol/L HJZY组与ACR组相比活力提升最明显($P < 0.001$), 后续实验以含160 μmol/L 为HJZY给药浓度。

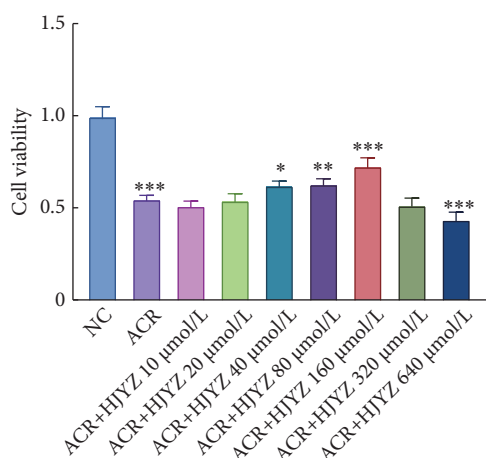


图 3 ACR造模后不同浓度HJZY给药24 h细胞活力

Fig 3 Cell viability of the ACR cells treated with different concentrations of HJZY for 24 hours

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. NC group. $n = 3$.

2.2 共聚焦荧光显微镜检测结果

根据JC-10染色结果(图4)可见, NC组红绿光比值为 1.69 ± 0.041 , 造模组红绿光比值为 0.184 ± 0.024 , ACR+HJZY组红绿光比值为 0.350 ± 0.031 , 造模组线粒体膜电位较NC组大幅降低($P < 0.05$), HJZY给药后ACR+HJZY组细胞膜电位较造模组有所升高($P < 0.05$), 但仍低于NC组($P < 0.05$)。

2.3 黄精赞育胶囊对AMPK介导的线粒体自噬相关蛋白的调控作用

Western blot结果(图5、图6)显示siRNA-NC+ACR组

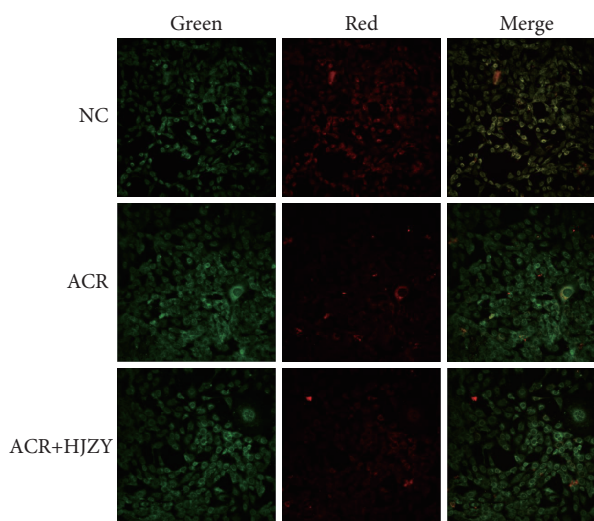


图 4 JC-10染色后共聚焦荧光显微镜检测荧光表达情况 (×400)

Fig 4 Fluorescence expression by confocal fluorescence microscopy after JC-10 staining (original magnification × 400)

p-AMPK/AMPK蛋白表达水平较siRNA-NC+control组下降($P < 0.001$), siRNA-NC+ACR+HJZY给药后水平上升($P < 0.001$)。基因敲减后siRNA-AMPK+ACR与siRNA-AMPK+control组相比蛋白表达水平下降($P < 0.05$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组较siRNA-AMPK+ACR组差异无统计学意义。siRNA-AMPK+control组与siRNA-NC+control组相比蛋白表达水平下降($P < 0.001$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比蛋白表达水平下降($P < 0.05$), siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组差异无统计学意义。

LC3B蛋白表达水平siRNA-NC+ACR组较siRNA-NC+control组上升($P < 0.01$), siRNA-NC+ACR+HJZY组较siRNA-NC+ACR组有所下降($P < 0.05$)。基因敲减后siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-AMPK+control组相比蛋白表达水平有所升高但差异无统计学意义, siRNA-AMPK+ACR+HJZY组较siRNA-AMPK+ACR蛋白表达水平下降($P < 0.01$); siRNA-AMPK+control与siRNA-NC+control组相比蛋白表达水平下降但差异无统计学意义, siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比蛋白表达水平下降($P < 0.01$), siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组相比蛋白表达水平下降($P < 0.01$)。

P62蛋白表达水平siRNA-NC+ACR组较siRNA-NC+control组上升($P < 0.001$), siRNA-NC+ACR+HJZY组较siRNA-NC+ACR组有所下降($P < 0.001$)。基因敲减后siRNA-AMPK三组蛋白间差异无统计学意义; siRNA-AMPK+control组与siRNA-NC+control组相比蛋白表达水

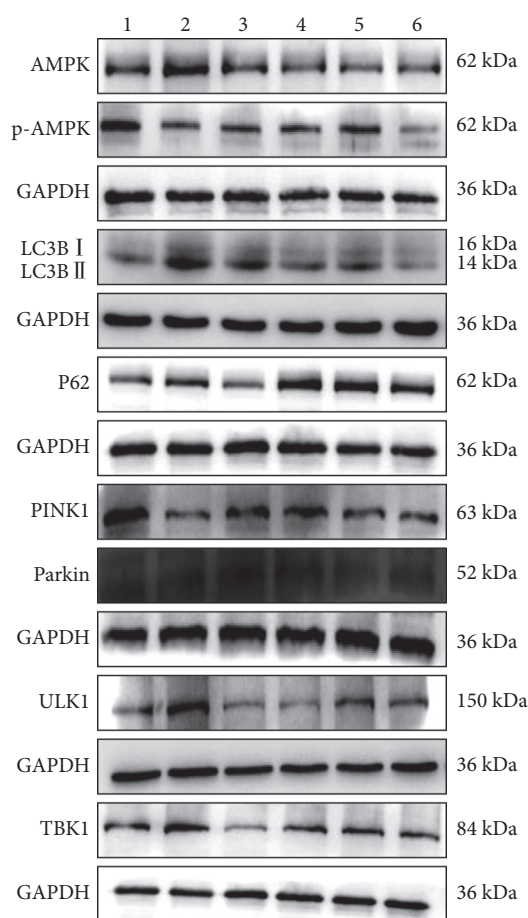


图5 各蛋白表达

Fig 5 Expression of various indicator proteins

1: siRNA-NC + control group; 2: siRNA-NC + ACR group; 3: siRNA-NC + ACR + HJZY group; 4: siRNA-AMPK + control group; 5: siRNA-AMPK + ACR group; 6: siRNA-AMPK + ACR + HJZY group.

平上升 ($P < 0.001$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比蛋白表达水平上升 ($P < 0.001$), siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组相比蛋白表达水平上升 ($P < 0.001$)。

PINK1蛋白表达水平siRNA-NC+ACR组较siRNA-NC+control组下降 ($P < 0.001$), siRNA-NC+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR组比较水平上升 ($P < 0.01$)。基因敲减后siRNA-AMPK+ACR与siRNA-AMPK+control组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组较siRNA-AMPK+ACR组有所上升但差异无统计学意义; siRNA-AMPK+control与siRNA-NC+control组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$), siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组间的差异无统计学意义。

Parkin蛋白表达水平siRNA-NC+ACR组较siRNA-NC+control组有所下降, 但差异无统计学意义, siRNA-NC+

ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR组比较水平上升 ($P < 0.01$)。基因敲减后siRNA-AMPK+ACR与siRNA-AMPK+control组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.01$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-AMPK+ACR组相比差异无统计学意义; siRNA-AMPK+control组与siRNA-NC+control组相比蛋白表达水平升高, siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR相比略微降低, 但差异均无统计学意义, siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)。

TBK1蛋白表达水平siRNA-NC+ACR组较siRNA-NC+control组上升 ($P < 0.05$), siRNA-NC+ACR+HJZY组较siRNA-NC+ACR组大幅下降 ($P < 0.001$)。基因敲减后siRNA-AMPK+control组与siRNA-NC+control组相比蛋白表达水平大幅下降 ($P < 0.001$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比差异无统计学意义, siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.001$)。

ULK1蛋白表达水平siRNA-NC+ACR组较siRNA-NC+control组上升 ($P < 0.01$), siRNA-NC+ACR+HJZY组较siRNA-NC+ACR组大幅下降 ($P < 0.001$)。基因敲减后siRNA-AMPK+control和siRNA-NC+control组相比蛋白表达水平大幅下降 ($P < 0.001$), siRNA-AMPK+ACR组与siRNA-NC+ACR组相比蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$), siRNA-AMPK+ACR+HJZY组与siRNA-NC+ACR+HJZY组相比差异无统计学意义。

3 讨论

线粒体是细胞内能量转换和控制细胞凋亡的重要细胞器, 研究表明不育男性精子运动能力的下降的同时可检测到精子线粒体膜电位下降^[17]。本研究中, 通过JC-10线粒体膜电位检测结果发现ACR造模后的GC-2spd(ts)小鼠精母细胞中线粒体膜电位大幅下降, 而黄精赞育胶囊组对比模型组线粒体膜电位有所上升, 提示黄精赞育胶囊治疗少、弱精子症的分子机制可能是通过调节线粒体膜电位发挥作用。

p-AMPK是指磷酸化的AMPK, AMPK的激活主要是通过磷酸化来实现的, 故可通过p-AMPK/AMPK的比值反映AMPK的激活程度^[18]。蛋白免疫印迹实验发现siRNA-NC组中与对照组相比, ACR组p-AMPK/AMPK比值明显下降 ($P < 0.001$), AMPK激活受抑制; 与ACR组相比, HJZY组有效提高了p-AMPK/AMPK的蛋白的表达水平 ($P < 0.001$), 推测黄精赞育胶囊可通过促进AMPK磷酸化调控线粒体自噬, 从而达到治疗少弱精子症的目的。

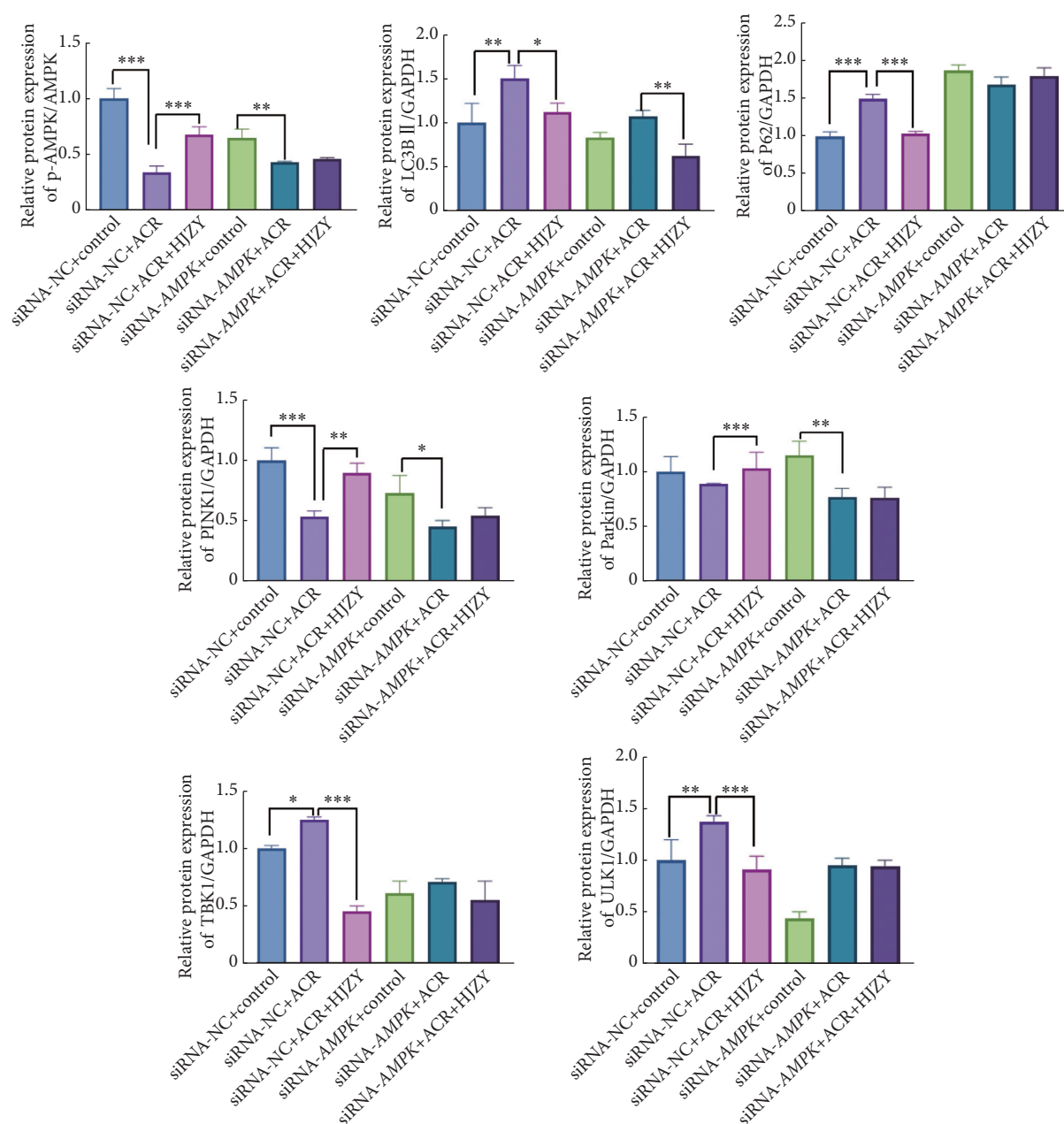


图 6 p-AMPK/AMPK、p62、LC3B、PINK1、Parkin、ULK1和TBK1蛋白表达水平

Fig 6 Expression levels of p-AMPK/AMPK, p62, LC3B, PINK1, Parkin, ULK1, and TBK1 proteins

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 3$.

siRNA-AMPK三组p-AMPK/AMPK值相较siRNA-NC组均明显降低, ACR组较对照组比值下降($P < 0.01$), AMPK敲减成功。

LC3B II 是自噬体的标志性蛋白, 其含量的变化一定程度上可以反映自噬体的数量变化^[19]。在细胞自噬过程中, 当自噬被激活时, 会有更多的LC3 I 转化为LC3 II, 导致LC3B II 的水平升高。siRNA-NC组结果显示, 与对照组相比, ACR组的LC3B II 蛋白水平升高($P < 0.01$), 细胞内自噬水平异常增加; 与ACR组比较, ACR+HJZY组的LC3B II 蛋白水平有所下降($P < 0.05$), HJZY的干预使细胞

内自噬水平降低到正常范围。siRNA-AMPK三组较siRNA-NC三组LC3B II 蛋白水平降低, 提示AMPK敲减后细胞内整体自噬水平降低。

P62是一种多功能的泛素-蛋白酶体系统和自噬途径的衔接蛋白, 在细胞内的蛋白质降解和自噬过程中发挥关键作用^[20]。通过检测P62的水平变化, 结合LC3B II 等其他指标, 可以更全面地了解自噬过程的状态, 评估药物对自噬的影响。本实验中siRNA-NC组中较对照组, ACR组P62水平升高($P < 0.001$), 可能是ACR造模后细胞自噬体形成受阻导致P62蛋白在细胞内积累。相比于ACR组,

HJZY组降低P62蛋白的表达($P < 0.001$)至与对照组相近,改善了细胞内P62异常增多的情况。siRNA-AMPK三组P62蛋白表达均明显升高,分析原因可能是因为AMPK敲减可能使细胞处于一种能量应激或代谢紊乱的状态,在应激条件下细胞可能通过增加P62的表达来增强其对受损蛋白质和细胞器的清除能力。

为进一步证明黄精赞育胶囊对线粒体自噬机制的调控作用,选择线粒体自噬经典通路PINK1/Parkin上的关键蛋白进行Western blot检测,目的是观察黄精赞育胶囊对线粒体自噬关键蛋白表达水平的影响。siRNA-NC组结果显示,与对照组比较,ACR组的PINK1蛋白表达水平降低($P < 0.001$);与ACR组相比,ACR+HJZY组的PINK1蛋白水平有升高的趋势($P < 0.01$);siRNA-AMPK三组较siRNA-NC三组整体蛋白表达水平下降但趋势相同,与对照组比较,ACR组的PINK1蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。Parkin蛋白水平方面,siRNA-NC组中与ACR组相比,ACR+HJZY组的水平有升高的趋势($P < 0.001$),siRNA-AMPK组中ACR组较对照组蛋白表达趋势与siRNA-NC组相同,有所降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

AMPK/ULK1/TBK1通路是由AMPK介导的经典自噬通路,TBK1是线粒体自噬过程中十分重要的一个蛋白,它通过与PINK1相互作用促进Parkin的定位和激活,从而促进线粒体自噬过程的进行^[14]。但一些研究表明,在氧化损伤条件下TBK1的会抑制线粒体自噬的启动和执行,从而阻碍Parkin介导的线粒体自噬^[21]。在本实验中,siRNA-NC组黄精赞育胶囊能够大幅下调ACR引起的TBK1异常升高($P < 0.001$),说明其对线粒体自噬的启动和执行具有正向调节作用。siRNA-AMPK三组蛋白表达较siRNA-NC组降低,但组间差异无统计学意义,可能是因为AMPK和TBK1在细胞内的功能有一定的交叉和相互作用,在细胞能量应激状态下,AMPK的激活可能会影响TBK1对免疫信号的传导。通过对ULK1 siRNA-NC三组蛋白的免疫印迹发现,HJZY组可降低ACR组ULK1过激表达引起的细胞自噬($P < 0.001$)。而siRNA-AMPK组中ACR+HJZY组较ACR组蛋白表达水平无明显变化。

SALIMI等^[22]发现,环磷酸胺会导致溶酶体膜损伤,干扰自噬体与溶酶体的融合,从而导致自噬体无法正常降解。在本实验中,鉴于ACR是环磷酸胺的体内代谢产物,其对PINK1和Parkin表达水平呈现出抑制作用,同时过度激活了TBK1。由此推测,ACR或许干扰了线粒体自噬流进程,致使细胞难以将包裹线粒体的自噬小体及时清除,从而造成LC3B II无法被充分降解,最终导致LC3B II蛋白表达水平上升,使得整个线粒体自噬环节出现功能障

碍。这种功能障碍可能和ACR对溶酶体功能的损害存在关联。而黄精赞育胶囊能够推动AMPK活化,提升PINK1与Parkin的表达量,并降低过度激活的TBK1水平,以此有效修复ACR引发的线粒体自噬流受阻状况,让LC3B II得以正常降解,使其蛋白水平回归正常。据推测,其作用原理可能是借助激活AMPK的磷酸化进程,恢复线粒体自噬功能异常,清除受损线粒体的堆积,重新开启并推动线粒体自噬流程。

综上所述,黄精赞育胶囊治疗少弱精子症的机制可以从AMPK及细胞自噬层面得到一定验证,并且还有很大继续深入研究的空间。希望通过之后的实验继续为传统中医药理论赋予现代化、科学化的阐释。

* * *

作者贡献声明 高源负责论文构思、正式分析、调查研究和审读与编辑写作,郭怡阳负责验证,武默涵负责初稿写作,郑燕飞负责经费获取、研究方法、研究项目管理、提供资源和监督指导。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution GAO Yuan is responsible for conceptualization, formal analysis, investigation, and writing--review and editing. GUO Yiyang is responsible for validation. WU Mohan is responsible for writing--original draft. ZHENG Yanfei is responsible for funding acquisition, methodology, project administration, resources, and supervision. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] KATZ D J, TELOKEN P, SHOSHANY O. Male infertility-the other side of the equation. *Aust Fam Physician*, 2017, 46(9): 641-646.
- [2] TVRDA E, AGARWAL A, ALKUHAIMI N. Male reproductive cancers and infertility: a mutual relationship. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 7230-7260. doi: 10.3390/ijms16047230.
- [3] AJDUK A, ZERNICKA-GOETZ M. Quality control of embryo development. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(5): 903-908. doi: 10.1016/j.mam.2013.03.001.
- [4] 杨洪军, 李贤煜, 陈鹏, 等. 中药复方的现代基础研究进展述评. *中国科学基金*, 2024, 38(3): 387-395. doi: 10.16262/j.cnki.1000-8217.20240416.001. YANG H J, LI X Y, CHEN P, *et al.* Review on the progress of modern basic research on traditional Chinese medicine compound prescriptions. *Bulletin of the National Natural Science Foundation of China*, 2024, 38(3): 387-395. doi: 10.16262/j.cnki.1000-8217.20240416.001.
- [5] 李博桦, 王琦, 朱斌, 等. 中医药治疗男性少弱精子症疗效的Meta分析. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(10): 863-872. doi: 10.3969/j.issn.1006-

- 2157.2018.10.013.
- LI B Y, WANG Q, ZHU B, *et al.* Meta-analysis of the efficacy of traditional Chinese medicine in the treatment of male oligoasthenospermia. *Journal of Beijing University of Chinese Medicine*, 2018, 41(10): 863-872. doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2018.10.013.
- [6] LI B Y, ZHENG C L, ZHOU K L, *et al.* Effects of Huang Jing Zan Yu Capsule on oligoasthenozoospermia rats sperm motility and genetic expression profiles. *Oxidation Communications*, 2016, 39: 3955-3964.
- [7] 李向红, 哈灵侠, 陈庆, 等. 黄精赞育胶囊联合针挑疗法对弱精子症患者精液质量及性激素水平的影响. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(27): 2965-2967, 2971.
- LI X H, HA L X, CHEN Q, *et al.* Influence of Huangjing Zanyu Capsules combined with needle-pricking therapy on semen quality and sex hormone levels in patients with asthenospermia. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2017, 26(27): 2965-2967.
- [8] 瞿虎, 张靖, 江春强, 等. 黄精赞育胶囊治疗男性不育症患者的有效性和安全性分析. *现代诊断与治疗*, 2015, 26(21): 4806-4809.
- QU H, ZHANG J, JIANG C Q, *et al.* Analysis of the efficacy and safety of Huangjing Zanyu Capsule in the treatment of male infertility. *Modern Diagnosis Treatment*, 2015, 26(21): 4806-4809.
- [9] 邓广鹏. 黄精赞育胶囊治疗少弱精子症的临床观察. *内蒙古中医药*, 2017, 36(2): 14. doi: 10.3969/j.issn.1006-0979.2017.02.014.
- DENG G P. Clinical observation of Huangjing Zanyu Capsules in the treatment of oligoasthenospermia. *Inner Mongolia Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 36(2): 14. doi: 10.3969/j.issn.1006-0979.2017.02.014.
- [10] ASHRAFI G, SCHWARZ T L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42. doi: 10.1038/cdd.2012.81.
- [11] PALIKARAS K, LIONAKI E, TAVERNARAKIS N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(9): 1013-1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
- [12] TAMARGO-GÓMEZ I, MARIÑO G. AMPK: regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3812. doi: 10.3390/ijms19123812.
- [13] APARICIO I M, ESPINO J, BEJARANO I, *et al.* Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Sci Rep*, 2016, 6: 33647. doi: 10.1038/srep33647.
- [14] HERZIG S, SHAW R J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95.
- [15] WANG C C, CHEN H J, CHAN D C, *et al.* Low-dose acrolein, an endogenous and exogenous toxic molecule, inhibits glucose transport via an inhibition of Akt-regulated GLUT4 signaling in skeletal muscle cells. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 7228. doi: 10.3390/ijms22137228.
- [16] 李博泽. 基于自噬-凋亡交互作用探讨黄精赞育胶囊治疗少、弱精子症的分子机制. 北京: 北京中医药大学, 2022. doi:10.26973/d.cnki.gbjzu.2022.000115.
- LI B Y. Exploration of the molecular mechanism of Huangjing Zanyu Capsules in the treatment of oligoasthenospermia based on the interaction between autophagy and apoptosis. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2022. doi: 10.26973/d.cnki.gbjzu.2022.000115.
- [17] 李红林, 傅广波, 吕述彦. 精子线粒体功能检测与男性不育相关性的研究进展. *临床检验杂志*, 2021, 39(4): 287-290. doi: 10.13602/j.cnki.jcls.2021.04.12.
- LI H L, FU G B, LYU S Y. Research progress on the correlation between sperm mitochondrial function detection and male infertility. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2021, 39(4): 287-290. doi: 10.13602/j.cnki.jcls.2021.04.12.
- [18] HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1895-908. doi: 10.1101/gad.17420111.
- [19] WU J, DANG Y, SU W, *et al.* Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B-two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(1): 437-442. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.211.
- [20] MOSCAT J, DIAZ-MECO M T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, 2009, 137(6): 1001-1004. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.023.
- [21] 王娜娜. 氧化应激通过调节ALS相关蛋白TBK1和OPTN影响线粒体自噬的机制. 苏州: 苏州大学, 2019. doi:10.27351/d.cnki.gszzhu.2019.002059.
- WANG N N. Mechanism of oxidative stress affecting mitophagy by regulating ALS-related proteins TBK1 and OPTN. Suzhou: Soochow University, 2019. doi: 10.27351/d.cnki.gszzhu.2019.002059.
- [22] SALIMI A, PIRHADI R, JAMALI Z, *et al.* Mitochondrial and lysosomal protective agents ameliorate cytotoxicity and oxidative stress induced by cyclophosphamide and methotrexate in human blood lymphocytes. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38(11): 1266-1274. doi: 10.1177/0960327119871096.

(2024-12-21 收稿, 2025-01-15 修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0 国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Sciences)