

# 梓醇调控糖酵解改善 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸病变的作用及机制<sup>△</sup>

陈玉萍<sup>1\*</sup>, 束安梅<sup>1</sup>, 许惠琴<sup>2</sup>, 蒋 鸣<sup>1</sup>, 朱逸晖<sup>2</sup>(1. 江苏医药职业学院基础医学部, 江苏 盐城 224005; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)07-0784-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.07.04



**摘要** 目的 基于晚期糖基化终末产物(AGEs)及其受体(RAGE)介导的糖酵解过程,研究梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸病变的改善作用及机制。方法 以高脂饲料喂养的KK-Ay自发性糖尿病小鼠作为糖尿病模型,随机分为模型组、梓醇组(100 mg/kg)、氨基胍组(AGEs抑制剂,100 mg/kg)和FPS-ZM1组(RAGE抑制剂,1 mg/kg),并将同期饲养的C57BL/6J小鼠作为正常组,每组6只。梓醇组和氨基胍组小鼠灌胃相应药物,正常组和模型组小鼠灌胃等量生理盐水,FPS-ZM1组小鼠以1 mL/g腹腔注射相应药物,连续8周。末次给药后,检测小鼠体质量、空腹血糖和24 h摄食量、饮水量、尿量以及睾丸脏器系数、精子活力;观察小鼠睾丸组织病理形态学和超微结构;检测小鼠睾丸组织中还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)和糖代谢产物水平,并进行通路的富集分析;检测小鼠血清和睾丸组织中AGEs水平,睾丸组织中RAGE、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平以及糖酵解关键限速酶[己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、丙酮酸激酶(PK)、LDH]相应mRNA表达水平。结果 经梓醇干预后, KK-Ay自发性糖尿病小鼠的一般体征、睾丸脏器系数及精子活力均显著改善( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );生精小管中各层生精细胞的形态以及超微结构均有所改善;睾丸组织中GSH、SOD、LDH水平,糖代谢产物果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油酸、3-磷酸甘油醛、乳酸、丙酮酸水平,以及HK、PFK、PK、LDH mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );血清和睾丸组织中AGEs水平、睾丸组织中RAGE蛋白表达水平和Bax/Bcl-2均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。经氨基胍和FPS-ZM1干预后,小鼠上述大部分指标均显著改善( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸病变有明显的改善作用,其作用机制可能与上调AGEs/RAGE信号通路介导的糖酵解有关。

**关键词** 梓醇;糖酵解;糖尿病;睾丸病变;晚期糖基化终末产物;晚期糖基化终末产物受体

## Improvement effects and its mechanism of catalpol on testicular lesions in KK-Ay spontaneous diabetic mice by regulating glycolysis

CHEN Yuping<sup>1</sup>, SHU Anmei<sup>1</sup>, XU Huiqin<sup>2</sup>, JIANG Ming<sup>1</sup>, ZHU Yihui<sup>2</sup>(1. Center of Basic Medicine, Jiangsu Vocational College of Medicine, Jiangsu Yancheng 224005, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the improvement effects and its mechanism of catalpol on testicular lesions in KK-Ay spontaneous diabetic mice on the basis of glycolysis process mediated by advanced glycation end products (AGEs) and their receptors (RAGE). **METHODS** KK-Ay spontaneous diabetic mice fed with high-fat diet were used as diabetic model, and then randomly divided into model group, catalpol group (100 mg/kg), aminoguanidine group (AGEs inhibitor, 100 mg/kg) and FPS-ZM1 group (RAGE inhibitor, 1 mg/kg), and C57BL/6J mice fed in the same period were set as normal group, with 6 mice in each group. The catalpol group and aminoguanidine group mice were given relevant medicine intragastrically, normal group and model group mice were given constant volume of normal saline intragastrically, and FPS-ZM1 group mice were given relevant medicine 1 mL/g intraperitoneally, for consecutive 8 weeks. After the last administration, the body mass, fasting blood glucose, 24-hour food intake, water consumption, urine volume, testicular organ coefficient, and sperm motility of the mice were measured; pathological morphology and ultrastructural structure of testicular tissue were observed; the levels of reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH) and sugar metabolites in testicular tissue of mice were detected; pathway enrichment analysis was performed; the level of AGEs in serum and testicular tissue, protein expressions of RAGE, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax), and mRNA expressions of key rate-limiting enzymes [hexokinase (HK), phosphofructose kinase (PFK), pyruvate kinase (PK), LDH] in testicular tissue were all detected. **RESULTS** Catalpol could significantly improve the general symptoms, testicular organ coefficients and motility of

<sup>△</sup> 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81903879);江苏高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目(No.苏教师函2021[11]号);江苏医药职业学院教育科学研究立项课题(No.Y202101)

\* 第一作者 副教授,博士。研究方向:中药内分泌药理学。E-mail:chenyuping1985@126.com

sperm in KK-Ay spontaneous diabetic mice ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The morphology and ultrastructure of spermatogenic cells in each layer of the seminiferous tubules were all improved. The levels of GSH, SOD and LDH in testicular tissue, the levels of the metabolic product glucose fructose-1,6-diphosphate, 3-phosphate glycerate, 3-phosphate glyceraldehyde, lactic acid and pyruvate, the expressions of HK, PFK, PK and LDH mRNA were all significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); the levels of AGEs in serum and testicular tissue, the expression of RAGE protein and the ratio of Bax to Bcl-2 in testicular tissue were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Aminoguanidine and FPS-ZM1 could significantly improve the levels of most of above indicators in mice ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** Catalpol shows significant improvement effects on testicular lesions of KK-Ay spontaneous diabetic mice, and its mechanism of action was associated with upregulation of AGEs/RAGE signaling pathway-mediated glycolysis.

**KEYWORDS** catalpol; glycolysis; diabetes; testicular lesions; advanced glycation end products; the receptor of advanced glycation end products

长期的高血糖会导致男性生殖器官受损、生殖细胞发育不良、生殖激素异常等现象<sup>[1]</sup>。糖尿病患者中患有生殖障碍的男性高达50%，其生殖障碍发病率为非糖尿病人群的2~5倍<sup>[2]</sup>，因此，研究糖尿病对生殖的影响具有重要的现实意义。

正常状态下睾丸是一个氧含量较低的器官，睾丸的糖代谢对精子的发生和成熟至关重要，生精细胞尤其是精母细胞主要利用支持细胞葡萄糖酵解产生的乳酸作为能量底物<sup>[3-4]</sup>。晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是长期高血糖状态下葡萄糖分子与体内蛋白质发生非酶糖基化反应所形成的不可逆强活性物质。本课题组前期研究认为，AGEs是糖尿病“肾阴亏虚、内热伤阴津”的重要物质基础<sup>[5]</sup>，AGEs及其受体(the receptor of advanced glycation end products, RAGE)在男性糖尿病患者的睾丸、附睾、精子、生精上皮、精原细胞和精母细胞中均有表达，并显著高于非糖尿病患者，且精子DNA断裂与RAGE高表达密切相关<sup>[6]</sup>。

中医药在防治糖尿病及其并发症方面有着悠久的历史 and 显著的疗效，肾阴亏虚是糖尿病雄性生殖损伤的核心中医病机<sup>[7]</sup>。有研究报道，生地黄性味甘寒，具有清热凉血、养阴生津的功效<sup>[8]</sup>，可有效改善糖尿病模型小鼠尿多、尿浊的现象，减轻肾组织损伤和病变<sup>[9]</sup>。梓醇为生地黄质量控制的活性成分<sup>[8]</sup>，但其是否可改善糖尿病睾丸病变尚不明确。故本研究拟在“肾主生殖”的中医理论指导下，通过KK-Ay自发性糖尿病小鼠考察梓醇对糖尿病睾丸病变的改善作用及机制，并采用AGEs、RAGE的抑制剂作为阳性对照药来探讨AGEs/RAGE信号通路对睾丸糖酵解的调控作用，以期梓醇在糖尿病生殖并发症中的应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Infinite M200Pro型酶标仪购自瑞士Tecan公司；Series 3型CO<sub>2</sub>培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司；qTower型实时定量聚合酶链式反应(PCR)仪购自德国AJ公司；Tanon-5200Multi型化学发光凝胶成像系统购自上海天能生命科学有限公司；Nexera X2 LC-

30AD型超高效液相色谱系统购自日本Shimadzu公司；QTRAP 5500型质谱仪购自美国SCIEX公司。

### 1.2 主要药品与试剂

梓醇(批号Z-005-160502,纯度大于98%)购自成都瑞芬思生物科技有限公司；血糖试纸(批号201807)购自拜耳医药保健有限公司；RAGE抑制剂FPS-ZM1(批号2908726,纯度100%)购自德国Merck Millipore公司；AGEs抑制剂氨基胍(批号079K1734V,纯度100%)购自美国Sigma公司；兔源RAGE单克隆抗体(批号ab3611)购自美国Abcam公司；小鼠源B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)单克隆抗体、小鼠源Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)单克隆抗体(批号分别为sc-7382、sc-7480)购自美国Santa Cruz公司；谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒、AGEs测定试剂盒(批号分别为A006-2-1、A001-3-2、A020-2-2、H250-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司；Trizol试剂、RNA逆转录试剂盒、SYBR荧光探针(批号分别为10606ES60、11123ES60、11203ES08)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司；免疫组化试剂盒(批号SA1028)购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 实验动物与饲料

本研究所用动物有SPF级14~15周龄C57BL/6J小鼠6只、KK-Ay自发性糖尿病小鼠24只，雄性，均购自北京华阜康生物科技公司，动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008。高脂饲料(碳水化合物比例为48.5%，脂肪比例为17.9%，蛋白质比例为17.5%)购自北京华阜康生物科技公司；普通饲料购自南京江宁青龙山动物繁殖场。本研究动物实验遵循南京中医药大学伦理委员会的规定进行，伦理批号为201903A019。

## 2 方法

### 2.1 动物分组与给药

将KK-Ay自发性糖尿病小鼠适应性喂养2周后，测量其空腹血糖，将血糖值 $\geq 10$  mmol/L的动物作为糖尿病模型小鼠，然后随机分为模型组、梓醇组(100 mg/kg)、

氨基胍组(100 mg/kg)以及FPS-ZM1组(1 mg/kg),上述各组给药剂量根据本课题组前期研究结果设置<sup>[10]</sup>。另外将同期饲养的C57BL/6J小鼠作为正常组,每组6只。梓醇组和氨基胍组小鼠灌胃相应药物,正常组和模型组小鼠灌胃等量生理盐水,FPS-ZM1组小鼠以1 mL/g腹腔注射相应药物,连续8周。

## 2.2 小鼠一般体征、睾丸脏器系数、精子活力的检测

末次给药后,检测各组小鼠的体质量、空腹血糖以及24 h摄食量、饮水量和尿量。实验结束后,取小鼠睾丸称定质量并计算睾丸脏器系数(睾丸脏器系数=睾丸质量/体质量)。取一侧睾丸组织剪成组织块(另一侧组织置于冰箱中保存备用),置于培养皿中,加1 mL生理盐水,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养30 min,使精子自行散开,通过血球计数板统计精子总数。吸取部分小鼠精子悬液滴在载玻片上,置于显微镜下观察并记录5个固定视野中精子数量,并计算精子活力[精子活力=(前向运动精子数+非前向运动精子数)/精子总数×100%]。

## 2.3 小鼠睾丸组织病理形态学和超微结构的观察

取各组小鼠睾丸组织适量,置于4%的多聚甲醛溶液中,经常规脱水、石蜡包埋、切片后,取部分切片(剩余部分进行免疫组化染色)进行HE病理形态学染色,中性树胶封片,采用显微镜观察,并根据生精细胞排列、结构坏死病变、间质增生和炎症细胞增生情况进行睾丸病理形态学病变程度评分<sup>[11]</sup>。另取部分睾丸组织切成小块(1 mm<sup>3</sup>),置于2.5%戊二醛固定液中固定24 h,以50%、70%、80%、90%、100%丙酮梯度脱水,经环氧树脂包埋、切片后,用醋酸铀和枸橼酸铅进行双染色,然后采用透射电镜观察小鼠睾丸组织的超微结构。

## 2.4 小鼠睾丸组织中GSH、SOD和LDH水平的检测

取各组小鼠睾丸组织适量,加入9倍量(g/mL)生理盐水进行匀浆,于4 °C条件下以2 500 r/min离心10 min;取上清液,按照试剂盒说明书方法操作,测定睾丸组织中GSH、SOD和LDH水平。

## 2.5 小鼠睾丸组织中糖代谢产物及通路分析

采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法进行分析<sup>[12]</sup>。取各组小鼠睾丸组织适量,称质量,并在液氮中研磨;每个样品加入1 mL预冷的甲醇-乙腈-水溶液(2:2:1, V/V/V)和等体积的内标琥珀酸盐和丙氨酸,置于-20 °C条件下孵育1 h,于4 °C条件下以14 000 r/min离心20 min,取上清液进行LC-MS/MS分析。采用MultiQuant软件提取色谱峰面积和保留时间,采用能量代谢物标准品进行校准,并对代谢物进行鉴定,使用MetaboAnalyst数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>)定位差异代谢物影响的关键糖代谢通路。

## 2.6 小鼠血清和睾丸组织中AGEs水平的检测

采用ELISA法进行检测。各组分别取4只小鼠的血清和睾丸组织匀浆液适量,稀释10倍后,根据试剂盒说明书方法操作,采用酶标仪于450 nm波长处测定血清

和睾丸组织中AGEs水平。

## 2.7 小鼠睾丸组织中RAGE蛋白和凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。各组分别取3只小鼠的睾丸组织适量,以1:9的比例(g/mL)加入含有1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂的RIPA进行匀浆裂解,离心收集上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经变性后,取50 μg进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,用5%脱脂奶粉封闭2 h,加入RAGE、Bax、Bcl-2、β-actin一抗(稀释度为1:1 000),4 °C过夜;次日以PBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗室温孵育2 h;PBST洗膜3次,每次10 min,洗膜后显影;利用Image J软件分析目的蛋白的灰度值,以目的蛋白与内参β-actin的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

## 2.8 小鼠睾丸组织中糖酵解关键限速酶相应mRNA表达水平的检测

采用实时定量PCR法进行检测。各组分别取3只小鼠的睾丸组织适量,采用Trizol法提取总RNA,再根据逆转录试剂盒说明书方法操作,逆转录为cDNA。以cDNA为模板进行PCR,以β-actin为内参,根据2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因的表达水平,每个样本重复3次。本研究所用己糖激酶(hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶(phosphofructose kinase, PFK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、LDH的引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司设计合成。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
β-actin	上游:GCGTGACATCAAAGAGAAGC	188
	下游:AGGATCCATACCCAAGAAGG	
HK	上游:CCGAGCTGAAGGATGACCAA	200
	下游:CCCCTTTTCTGAGCCGTCC	
PK	上游:AGTCCTGGATGGAGCAGACT	136
	下游:TTC AACACAGCAGACGGTGGA	
PFK	上游:CTGCCCTGAATGTGATGTCG	195
	下游:CGTTGGACTGCAATCTCCG	
LDH	上游:GGTGGACAGGGAATGTACGG	118
	下游:GAGCGACCTCATCGTCCTC	

## 2.9 统计学方法

采用SPSS22.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠一般体征、睾丸脏器系数及精子活力的影响

与正常组比较,模型组小鼠24 h摄食量、饮水量、尿量和空腹血糖均显著升高( $P<0.01$ ),体质量、睾丸脏器系数、精子活力、精子总数均显著降低或减少( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠上述指标(FPS-ZM1组24 h饮水量除外)均显著逆转( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表2。

表2 各组小鼠一般体征、睾丸脏器系数和精子活力的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	24 h摄食量/g	24 h饮水量/mL	24 h尿量/mL	空腹血糖/(mmol/L)	体质量/g	睾丸脏器系数/%	精子活力/%	精子总数/个
正常组	3.47±0.48	6.80±1.29	2.07±0.32	7.77±2.18	30.88±0.98	0.77±0.10	77.23±4.62	20.56±2.34
模型组	7.87±0.54 <sup>a</sup>	22.32±4.08 <sup>a</sup>	2.90±0.25 <sup>a</sup>	19.97±8.39 <sup>a</sup>	26.87±3.78 <sup>a</sup>	0.48±0.04 <sup>a</sup>	40.00±4.08 <sup>a</sup>	6.57±1.42 <sup>a</sup>
梓醇组	5.15±0.56 <sup>b</sup>	13.35±1.26 <sup>b</sup>	2.25±0.29 <sup>b</sup>	8.00±1.58 <sup>b</sup>	32.30±2.48 <sup>b</sup>	0.63±0.04 <sup>b</sup>	61.57±3.51 <sup>b</sup>	12.82±1.76 <sup>b</sup>
氨基胍组	5.87±0.46 <sup>b</sup>	13.25±3.52 <sup>b</sup>	2.40±0.17 <sup>b</sup>	13.30±5.15 <sup>b</sup>	35.28±2.52 <sup>b</sup>	0.59±0.05 <sup>b</sup>	55.90±3.49 <sup>b</sup>	9.62±1.73 <sup>b</sup>
FPS-ZMI组	6.45±0.60 <sup>b</sup>	20.18±1.44	2.40±0.18 <sup>b</sup>	10.10±3.70 <sup>b</sup>	36.20±2.99 <sup>b</sup>	0.57±0.03 <sup>b</sup>	51.95±4.76 <sup>b</sup>	8.87±1.55 <sup>b</sup>

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.01$ ;c:与模型组比较, $P<0.05$

### 3.2 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸组织病理形态学的影响

正常组小鼠各发育阶段的生精细胞在生精小管中紧密排列,层次分明,未见间质细胞增殖和周围血管充血。与正常组比较,模型组小鼠生精小管基底膜明显变薄,各个阶段的生精细胞都出现坏死和脱落的现象,少量生精小管中没有精子细胞,生精小管之间间隙增大,睾丸病理损伤评分显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠生精小管中各层生精细胞的形态均得到改善,且数量接近正常组小鼠,只有少数精原细胞退化、间质细胞增生,睾丸病理损伤评分均显著降低( $P<0.01$ )。结果见表3、图1。

### 3.3 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸组织超微结构的影响

正常组小鼠睾丸组织中细胞分布规律,形态完整,细胞核染色质分布均匀,细胞间连接完整。模型组小鼠睾丸组织中细胞核边界不清,染色质分布不匀,部分染

表3 各组小鼠睾丸病理损伤评分和GSH、SOD、LDH水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

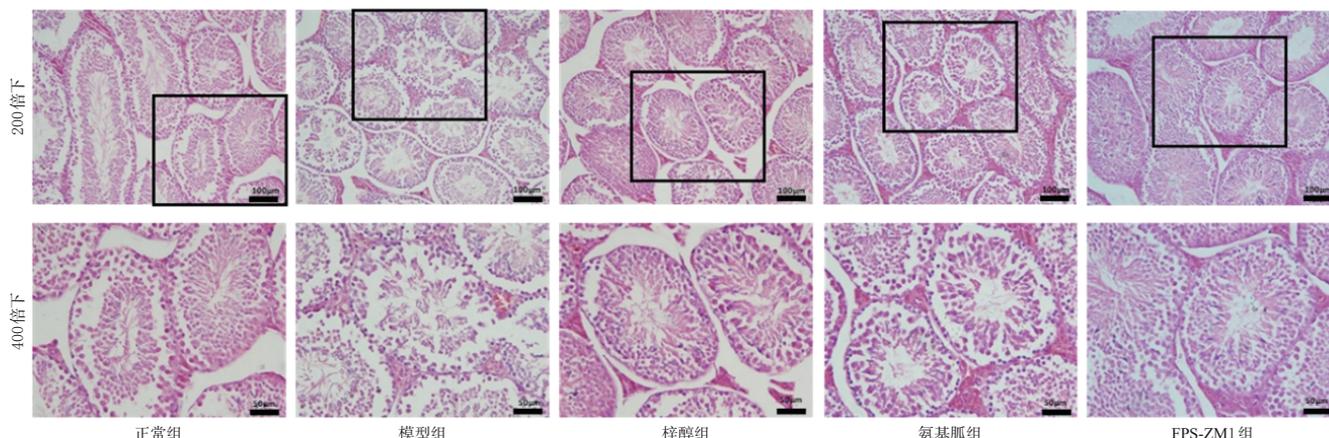
组别	睾丸病理损伤评分	GSH水平/( $\mu\text{mol/g}$ )	SOD水平/(U/mg)	LDH水平/(U/g)
正常组	0	60.66±3.52	457.20±25.11	2 020.59±17.43
模型组	4.60±0.55 <sup>a</sup>	23.64±2.54 <sup>a</sup>	306.96±21.44 <sup>a</sup>	1 561.28±125.33 <sup>a</sup>
梓醇组	2.00±0.71 <sup>b</sup>	39.60±3.30 <sup>b</sup>	453.89±27.37 <sup>b</sup>	2 135.79±157.10 <sup>b</sup>
氨基胍组	2.00±0.71 <sup>b</sup>	31.06±3.30 <sup>b</sup>	388.67±33.55 <sup>b</sup>	2 245.00±31.62 <sup>b</sup>
FPS-ZMI组	2.20±0.84 <sup>b</sup>	37.60±3.30 <sup>b</sup>	437.07±22.57 <sup>b</sup>	1 903.62±79.40 <sup>b</sup>

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.01$ ;c:与模型组比较, $P<0.05$

色质浓缩,细胞间连接不完整。各给药组与模型组相比,小鼠睾丸组织超微结构均有不同程度的改善。结果见图2。

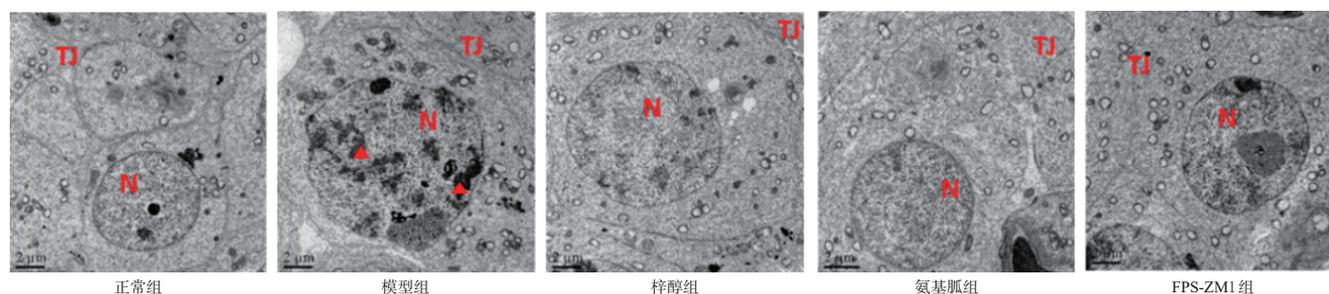
### 3.4 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸组织中GSH、SOD和LDH水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠睾丸组织中GSH、SOD和LDH水平均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠睾丸组织中GSH、SOD和LDH水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表3。



图中□表示400倍放大处

图1 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸组织病理形态学影响的显微图



TJ:细胞间紧密连接;N:细胞核核仁;▲:染色质浓缩

图2 梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸组织超微结构影响的显微图

### 3.5 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸组织中糖代谢产物和通路的影响

本研究所有样本中共检测到 36 种糖代谢产物。与正常组比较,模型组小鼠睾丸组织中果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油酸、3-磷酸甘油醛、乳酸、丙酮酸 5 种糖代谢产物水平均显著降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );与模型组比较,梓醇组小鼠睾丸组织中上述几种糖代谢产物水平均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),氨基胍组睾丸组织中 3-磷酸甘油醛、乳酸、丙酮酸水平均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),FPS-ZM1 组小鼠睾丸组织中果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油醛、乳酸、丙酮酸水平均显著升高( $P < 0.01$ )。进一步采用 MetaboAnalyst 数据库分析后发现,梓醇对糖尿病小鼠睾丸组织的糖酵解通路影响最大。结果见图 3、图 4。

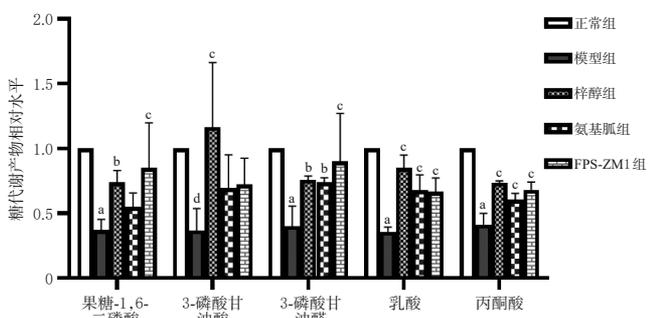
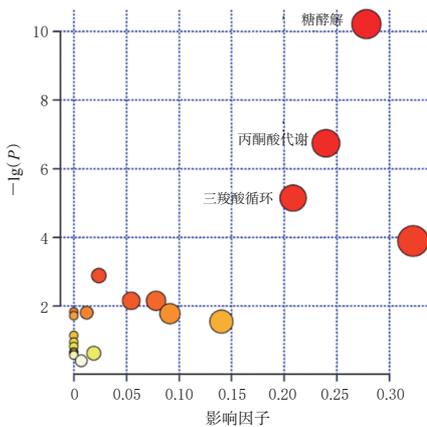


图 3 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸组织中糖代谢产物水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

图 4 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸组织中糖代谢通路的影响



注:图中每个气泡代表一个代谢通路,气泡越大表示影响因子越大;气泡颜色越深,表示P值越小,富集程度越显著

图 4 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸组织中糖代谢通路的影响

### 3.6 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠血清和睾丸组织中 AGEs 水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清和睾丸组织中 AGEs 水平均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组小鼠血清和睾丸组织中 AGEs 水平均显著降低( $P < 0.01$ )。结果见表 4。

表 4 各组小鼠血清和睾丸组织中 AGEs 水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	血清 AGEs/(pg/mL)	睾丸组织 AGEs/(pg/g)
正常组	126.10 ± 7.45	1 389.51 ± 116.14
模型组	159.71 ± 24.27 <sup>a</sup>	2 078.70 ± 315.49 <sup>a</sup>
梓醇组	101.29 ± 18.77 <sup>b</sup>	1 425.55 ± 229.19 <sup>b</sup>
氨基胍组	117.58 ± 20.14 <sup>c</sup>	1 338.40 ± 173.06 <sup>c</sup>
FPS-ZM1 组	107.22 ± 21.02 <sup>d</sup>	1 299.87 ± 237.43 <sup>d</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.01$

### 3.7 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸组织中 RAGE 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 的影响

与正常组比较,模型组小鼠睾丸组织中 RAGE 蛋白表达水平、Bax/Bcl-2 均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠睾丸组织中 RAGE 蛋白表达水平、Bax/Bcl-2 均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见图 5、表 5。

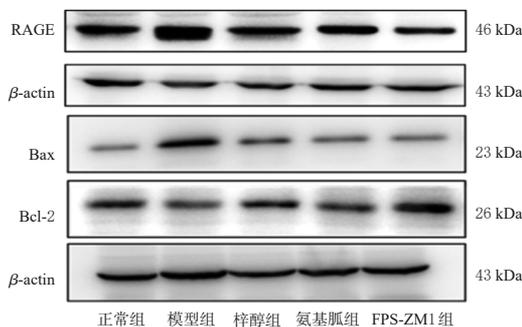


图 5 各组小鼠睾丸组织中 RAGE、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的电泳图

表 5 各组小鼠睾丸组织中 RAGE 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	RAGE 蛋白表达水平	Bax/Bcl-2
正常组	1.90 ± 0.54	0.34 ± 0.10
模型组	3.98 ± 1.64 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.59 <sup>a</sup>
梓醇组	2.11 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.14 <sup>b</sup>
氨基胍组	2.38 ± 0.30 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.62 <sup>d</sup>
FPS-ZM1 组	2.40 ± 0.73 <sup>d</sup>	0.49 ± 0.51 <sup>d</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; d: 与模型组比较,  $P < 0.01$

### 3.8 梓醇对 KK-Ay 自发性糖尿病小鼠睾丸组织中糖酵解关键限速酶 mRNA 表达水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠睾丸组织中 HK、PFK、PK、LDH mRNA 表达水平均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,梓醇组、氨基胍组小鼠睾丸组织中 HK、PFK、PK、LDH mRNA 表达水平均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),FPS-ZM1 组小鼠睾丸组织中 HK mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.01$ )。结果见表 6。

## 4 讨论

糖尿病引起的持续高血糖会引起氧化应激和炎症反应等,从而对肾功能造成损伤。在中医传统理论中,肾主生殖,一旦肾功能出现障碍,也会对生殖系统造成

表6 各组小鼠睾丸组织中糖酵解关键限速酶相应mRNA表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	HK mRNA	PFK mRNA	PK mRNA	LDH mRNA
正常组	1.00	1.00	1.00	1.00
模型组	0.48 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>b</sup>
梓醇组	3.10 ± 0.11 <sup>c</sup>	2.65 ± 0.52 <sup>c</sup>	4.71 ± 0.25 <sup>c</sup>	1.90 ± 0.52 <sup>c</sup>
氨基胍组	1.93 ± 0.85 <sup>d</sup>	0.82 ± 0.15 <sup>d</sup>	1.82 ± 0.37 <sup>d</sup>	1.77 ± 0.43 <sup>d</sup>
FPS-ZM1组	2.38 ± 0.16 <sup>d</sup>	0.18 ± 0.04	0.37 ± 0.12	0.65 ± 0.70

a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; d: 与模型组比较,  $P < 0.05$

一定的损伤<sup>[13]</sup>。男性生殖损伤最明显的部位就是性腺器官睾丸,可影响精子的发育,最终导致男性生殖功能障碍。

生地黄具有清热凉血、滋阴补肾等作用,许多含地黄的经典方剂如“金匱肾气丸”“六味地黄丸”“养精汤”均被报道可改善少精、弱精、遗精、早泄等症状,且临床疗效确切<sup>[14-15]</sup>。本课题组前期研究发现,生地黄-山茱萸药对的代表效应单体成分梓醇和马钱苷可有效改善雄性糖尿病模型小鼠的生殖损伤和睾丸的氧化应激等<sup>[10]</sup>,但具体机制有待阐明。相关文献报道,睾丸支持细胞糖酵解过程中可生成生精细胞发育所需的能量底物乳酸,但当糖脂代谢紊乱时,则会影响糖酵解过程,从而导致生精细胞发育受阻<sup>[4]</sup>。基于此,本研究基于糖酵解重点观察生地黄活性成分梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸的改善作用及机制。

AGEs/RAGE信号通路是介导糖尿病及其并发症的关键通路<sup>[16]</sup>,本课题组前期研究证实了梓醇可通过调控该信号通路提高酸性磷酸酶、LDH、谷氨酰基转移酶的活性,改善睾丸的病理形态学损伤<sup>[17]</sup>。本研究进一步发现,梓醇可显著降低KK-Ay自发性糖尿病小鼠血糖,改善糖尿病症状,减轻睾丸超微结构损伤,增加睾丸脏器指数,提高精子活力和抗氧化酶活性,抑制睾丸组织的凋亡和AGEs/RAGE信号通路相关蛋白活性。这提示梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠生殖损伤的改善作用与抑制AGEs/RAGE信号通路活性有关。代谢是机体生命活动的基本特征,睾丸的代谢对精子的发生和成熟至关重要。相关研究发现,糖尿病男性患者精子质量下降的同时伴有糖酵解相关转运体及限速酶的表达降低<sup>[18]</sup>。基于此,本研究测定了小鼠睾丸中糖代谢产物水平,结果显示,与模型组比较,梓醇组小鼠睾丸组织中果糖-1,6-二磷酸、3-磷酸甘油酸、3-磷酸甘油醛、乳酸、丙酮酸水平均显著升高;进一步采用MetaboAnalyst数据库分析后发现,梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸组织的糖酵解通路影响最大。

为了进一步确定梓醇对糖尿病环境下睾丸糖酵解的干预作用,笔者对糖酵解关键限速酶LDH、PK、HK、PFK mRNA表达水平进行了检测,结果显示,梓醇可显著升高上述限速酶的mRNA表达水平,上调LDH活性。这提示梓醇改善糖尿病睾丸损伤的作用与上调睾丸糖酵解水平有关。文献报道AGEs、RAGE也参与了糖尿

病并发症糖酵解通路的调控<sup>[11]</sup>,在本研究中发现,AGEs、RAGE的抑制剂氨基胍、FPS-ZM1也呈现出一定改善睾丸损伤和升高糖酵解水平的作用。这提示梓醇有可能通过AGEs/RAGE信号通路调控KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸的糖酵解。

综上所述,梓醇对KK-Ay自发性糖尿病小鼠睾丸病变有明显的改善作用,其作用机制可能与上调AGEs/RAGE信号通路介导的糖酵解有关。

## 参考文献

- [1] ALI B R, ALAMERI A N, AL RUMAIDH S, et al. Correlation between reproductive hormones levels and semen quality in patients with diabetes[J]. J Med Life, 2022, 15(12):1507-1510.
- [2] 朱怡睿,张莹. 糖尿病对生殖功能的影响[J]. 医学综述, 2021, 27(4):771-777.
- [3] 易晓东,张怡宁,肖帅,等. 支持细胞糖代谢在精子发生中的作用及调控机制的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2019, 25(10):923-927.
- [4] 罗丹丹. 高脂摄入增加大鼠睾丸支持细胞糖酵解和乳酸合成[D]. 济南:山东大学,2018.
- [5] CHEN J, CHEN Y P, SHU A M, et al. Radix Rehmanniae and Corni Fructus against diabetic nephropathy via AGE-RAGE signaling pathway[J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 8358102.
- [6] OMOLAOYE T S, DU PLESSIS S S. The effect of streptozotocin induced diabetes on sperm function: a closer look at AGEs, RAGEs, MAPKs and activation of the apoptotic pathway[J]. Toxicol Res, 2021, 37(1):35-46.
- [7] 吕仁和. 糖尿病及其并发症中西医结合诊疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:397-399.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:129.
- [9] 吕兴. 生地、山茱萸有效部位及其配伍干预糖尿病肾病的作用机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2017.
- [10] 陈玉萍,焦妮,朱逸辉,等. 梓醇、马钱苷及其配伍干预AGEs-RAGE通路对糖尿病睾丸病变的保护作用研究[J]. 中国药理学通报,2020,36(7):998-1005.
- [11] CHEN Y P, CHEN J, SHU A M, et al. Combination of the herbs Radix Rehmanniae and Cornus officinalis mitigated testicular damage from diabetes mellitus by enhancing glycolysis via the AGEs/RAGE/HIF-1 $\alpha$  axis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:678300.
- [12] HUI S, GHERGUROVICH J M, MORSCHER R J, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate[J]. Nature, 2017, 551(7678):115-118.
- [13] 石中玉,陈晓莹,何昶昊,等. 基于肾主生殖理论探讨男子生殖之精和胎孕的关系[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(2):108-113.
- [14] 高翔. 养精汤治疗肾阴亏虚型畸形精子症患者的临床研究[D]. 成都:成都中医药大学,2020.

(下转第795页)