

# 何首乌饮对运动疲劳大鼠睾丸组织 Cox7a2 表达的影响\*

赵秀军<sup>1</sup>, 郭 银<sup>2</sup>, 宋庆亮<sup>3</sup>, 李 莉<sup>1</sup>, 蒋 彦<sup>4</sup>, 孙一翀<sup>2</sup>, 曲银娥<sup>5</sup>, 高福禄<sup>1△</sup>

1. 河北医科大学 组织与胚胎学教研室(石家庄 050017); 2. 承德医学院基础医学部(承德 067000);

3. 河北大学医学部(保定 071000); 4. 石家庄市第四医院 生殖中心(石家庄 050011);

5. 河北联合大学医学部 组织学与胚胎学教研室(唐山 060000)

**【摘要】 目的** 探讨中药何首乌饮对运动疲劳大鼠睾丸组织细胞色素 C 氧化酶 7a2(Cox7a2)表达的影响。**方法** 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组:A 组为安静对照组,B 组为安静何首乌饮组,C 组为运动疲劳模型组,D 组为何首乌饮治疗组,E 组为何首乌饮预防组,每组 10 只。C、D 和 E 组大鼠复制运动疲劳动物模型,其中 D 组于造模期间(42 d)每天训练后灌胃何首乌饮 20 g/(kg·d)(含生药 9.6 g/mL),造模成功后继续灌胃 18 d(剂量同前),共 60 d;E 组于造模前 18 d 每天灌胃及造模期间(42 d)每天训练前灌胃何首乌饮 20 g/(kg·d)(含生药 9.6 g/mL),共 60 d。采用美国 Beckmancoulter Unicel Dxl 800 测定大鼠血清睾酮水平,严格按照说明书操作。分别采用 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学法检测各组大鼠睾丸组织 Cox7a2 的表达变化。**结果** C 组大鼠血清睾酮浓度较 A 组下降( $P<0.05$ ),确认模型成功;B、D、E 组大鼠血清睾酮浓度则高于 A 组( $P<0.05$ )。Cox7a2 免疫组化阳性颗粒主要表达于间质细胞和精原细胞的胞质、胞核,C 组阳性信号较强,A、B 组最弱。Cox7a2 蛋白和 mRNA 表达变化为:C 组高于其余 4 组( $P<0.05$ ),A、B 组之间和 D、E 组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 何首乌饮可以降低运动疲劳大鼠睾丸组织 Cox7a2 的表达。

**【关键词】** 何首乌饮 运动疲劳 睾酮 细胞色素 C 氧化酶 7a2

**Effect of Heshouwuyin on the Expression of Cox7a2 Protein in Testis Tissue of Exercised-induced Fatigue Rat** ZHAO Xiu-jun<sup>1</sup>, GUO Yin<sup>2</sup>, SONG Qing-liang<sup>3</sup>, LI Li<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>4</sup>, SUN Yi-chong<sup>2</sup>, QU Yin-e<sup>5</sup>, GAO Fu-lu<sup>1△</sup>.

1. Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Basic Medical Science, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 3. Medical Faculty, Hebei University, Baoding 071000, China; 4. Center for Reproductive, the No. 4 Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China; 5. Department of Histology and Embryology, Medical Faculty, Hebei Union University, Tangshan 063000, China

△ Corresponding author, E-mail: gaofulu@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of Heshouwuyin on the expression of cytochrome C oxidase 7a2 (Cox7a2) in testis tissue of rats with exercised-induced fatigue. **Methods** Fifty SD rats were divided into normal control group (A group), Heshouwuyin administered normal group (B group), model control group (C group), Heshouwuyin treated group (D group) and Heshouwuyin prevented group (E group) randomly with 10 rats for each. The exercise-induced fatigue models in rats of C, D, E groups were established. The rats in D group were treated with Heshouwuyin [20 g/(kg·d), contained crude drug 9.6 g/mL] for 60 days (during the 42 days of modeling and after the 18 days of modeling). The rats in E group were also treated with Heshouwuyin for 60 days (but before the 18 days of modeling and during the 42 days of modeling). Beckmancoulter Unicel Dxl 800 was used to detect the level of serum testosterone, according to the manufacture's instructions. Western blot and RT-PCR were used to observe the differential expression of Cox7a2. **Results** The level of serum testosterone in C group was decreased compared with A group ( $P<0.05$ ), which implied the success of modeling. Compared with group A, the level of serum testosterone in B, D, E groups were increased ( $P<0.05$ ). Cox7a2 protein was expressed mainly in leydig cell and spermatocyte. Compared with A, B, D, E groups, the expression of Cox7a2 protein and mRNA in C group increased ( $P<0.05$ ), and there no significant difference was observed between group A and B, as well as group D and E. **Conclusion** The expression of Cox7a2 was down-regulated by Heshouwuyin.

**【Key words】** Heshouwuyin Exercise-induced fatigue Testosterone Cytochrome C oxidase 7a2

细胞色素 C 氧化酶 7a2(Cox7a2)是线粒体呼吸

链第 4 个复合体的核编码亚基<sup>[1]</sup>。Cox7a2 在老年人睾丸组织显著上调,推测可能与老年雄激素合成功能减退及老年男性雄激素部分缺乏综合征有关<sup>[2]</sup>,故我们以此为基础研究 Cox7a2 与运动性低

\* 河北省自然科学基金(No. C2009000269)资助

△ 通讯作者, E-mail: gaofulu@yahoo.com.cn

血睾酮的关系。长期大运动量训练会导致运动疲劳,进而睾酮下降,目前已经得到广泛认同。近 20 年来运动医学界一直把中药能否提高血睾酮水平、消除运动疲劳和促进体力恢复等作为研究热点。钱风雷等<sup>[3]</sup>报道的以仙灵脾、肉苁蓉为主,配以黄芪、枸杞等的补肾中药能防止大鼠运动性低血睾酮症状出现。本课题组多年从事何首乌饮抗生殖衰老研究,发现何首乌饮能够提高衰老模型大鼠血清睾酮含量,提高睾丸组织的抗氧化活性、恢复下丘脑单胺类神经递质的平衡、降低生精细胞凋亡指数等<sup>[4-6]</sup>。本实验复制大鼠运动疲劳性低血睾酮模型,探讨 Cox7a2 在大鼠睾丸组织的表达变化,进而研究何首乌饮是否可以通过调节 Cox7a2 改善运动性低血睾酮症状。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物制备

何首乌饮组成:何首乌(炙)、肉苁蓉、怀牛膝、淫羊藿、丹参、茯苓,各药用量比例为 3:2:3:2:5:3,加 5 倍蒸馏水浸泡 2 h,文火煮沸 30 min,滤过。药渣再加 3 倍量水继续煎煮 20 min,滤过,两次滤液混和,浓缩至含生药 4.8 kg/L,4℃低温保存备用,每次灌胃前复温至室温。

### 1.2 动物分组及建立运动性疲劳动物模型

选用 8 周龄清洁级 SD 雄性大鼠(由河北医科大学动物实验中心提供,动物合格证编号 1005050)50 只,每只体质量为 180~200 g,自由进食,饮水,室温 20~25℃,相对湿度 45%~55%,每天光照 12 h,随机分为 5 组:安静对照组(A 组)、安静何首乌饮组(B 组)、运动疲劳模型组(C 组)、何首乌饮治疗组(D 组)和何首乌饮预防组(E 组),每组 10 只。

制作大鼠运动疲劳模型<sup>[7]</sup>:游泳池呈圆形,内壁光滑,直径 50 cm,水深 70 cm,水温 30℃±2℃,第 1 周进行适应性游泳训练,1 次/d,第 1 次下水游泳 30 min,此后逐日按 40%幅度增加至第 1 周末游泳 2 h。第 2 周开始适应性负重游泳训练,第 1 次负体质量的 0.5%,此后逐日递增,负 1%、2%、3%、4%,每次游 2 h,当第 6 次负重增加到 5%时,游泳时间明显缩短,所以选择 4%作为最终的负重再游泳 4 周。此后 4 周每天 1 次至力竭(在水下 10 s 内不能上浮,且放在平面时无法完成翻正反射)。

A 组大鼠不进行游泳训练,每天灌胃等量生理盐水,持续 60 d。B 组大鼠不进行游泳训练,每天灌胃何首乌饮 20 g/(kg·d),持续 60 d。D 组大鼠在

造模过程中每次疲劳训练后灌胃何首乌饮 20 g/(kg·d),造模成功后继续灌胃 18 d(剂量同前),连续 60 d;E 组大鼠造模前 18 d 每天灌胃以及造模期间上午灌胃何首乌饮 20 g/(kg·d)进行预防治疗,下午进行疲劳训练,停训即停药,共 60 d。

### 1.3 标本采集与处理

5 组均待 D 组治疗后同时取材。将各组大鼠经眼内眦眶后静脉取血 2 mL,1000 r/min 离心 20 min,吸取上清液置-80℃保存。经左心室快速灌注焦炭酸二乙酯(DEPC)处理的生理盐水约 250 mL,迅速取睾丸组织液氮 30 min 后,-80℃保存,以备 Western blot、RT-PCR 测定。右侧睾丸组织经多聚甲醛固定、石蜡包埋,以备免疫组织化学染色。

### 1.4 血清睾酮测定

采用美国 Beckmancoulter UniCel Dxl 800 智能化免疫化学发光系统测定血清总睾酮水平,按操作说明进行,批内和批间变异系数分别为 2.2%~2.4%和 3.4%~4.7%。

### 1.5 免疫组化染色观察大鼠睾丸组织 Cox7a2 的表达

按照免疫组织化学常规方法操作(鼠抗人 Cox7a2 抗体,Abnova Co.,多克隆抗体,羊抗鼠二抗和 DAB 试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品)。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,阳性染色表现为棕黄色颗粒。

### 1.6 Western blot 检测大鼠睾丸组织 Cox7a2 蛋白的表达

取-80℃保存的大鼠睾丸约 100 mg,加入 1 mL 冷蛋白裂解液,玻璃匀浆器匀浆,超声破碎机超声 10 s×4 次,间隔 15 s,所有操作均在冰上进行。4℃,12 000×g 离心 20 min,取上清,-80℃备用。取 50 μg 蛋白 100℃变性 5 min,经聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,转至 PVDF 膜,以标准蛋白为参照,取相应条带经封闭后,加入抗 Cox7a2 (1:2000 稀释)、β-actin 的一抗(1:5000 稀释),4℃过夜,TBST 冲洗,加入二抗(1:5000 稀释),室温震荡孵育 90 min,TBST 洗涤后,Pierce 化学发光底物 A 液与 B 液 1:1 等体积混合室温反应 5 min,吸干反应液,FUJI Mini-4000 扫描图像,Cox7a2 蛋白在相对分子质量 34×10<sup>3</sup> 处显示出特异性条带,检测灰度,结果与相对分子质量为 43×10<sup>3</sup> 的 β-actin 相比较,进行半定量分析。

### 1.7 RT-PCR 检测大鼠睾丸组织 Cox7a2 mRNA 的

表达

按 Trizol 试剂(Invitrogen com, USA)说明书要求,采用一步法提取总 RNA。PCR 过程:以总 RNA 为模板,Oligo(dT)为引物,按 Superscript II 逆转录试剂盒(TaKaRa Bio INC, China) 要求操作合成 cDNA。以 cDNA 为模板,加入 Cox7a2 cDNA 上、下游引物,以  $\beta$ -actin 为内参照,进行 PCR。PCR 扩增反应体系:取 2  $\mu$ L 反转录产物作为 PCR 反应模板,依次加入 1.6  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP 混合物,上、下游引物各 0.6  $\mu$ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 0.1  $\mu$ L,加无菌去离子水至总体积 20  $\mu$ L,置 PCR 仪(Eppendorf)上进行扩增。设定反应条件 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,62  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 26 个循环数后,72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。最后取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物在 1 $\times$ TAE 体系中进行琼脂糖凝胶电泳,结果经凝胶成像系统结合 Multi Gauge V3.1 进行吸光度分析,用  $\beta$ -actin 作为内参,以 Cox7a2/ $\beta$ -actin 平均吸光度比值表示 Cox7a2 mRNA 水平,进行半定量分析。引物序列(上海生工生物工程):Cox7a2,F5'-GAAGATCTATGCTGCGGAATGTGCTGGCC-3',R5'-CCGGAATTCGGTTCTTGCTTCTTGGGGAATGC-3',扩增产物片段长度 272 bp; $\beta$ -actin,F5'-GGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3', R5'-GACCGTCAGGCAGCTCACATAGCTCT-3',扩增产物片

段长度 263 bp。

**1.8 统计学方法**

所有数据以  $\bar{x}\pm s$  表示。多组间比较应用多因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,相关性分析采用 Pearson 相关分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

**2.1 一般情况观察**

安静对照组及安静何首乌饮组大鼠活动自如,皮毛光洁整齐,精神状态良好。其余 4 组大鼠在造模后普遍精神倦怠,反应淡漠,皮毛脱落,体型瘦弱,饮食减退,表明运动疲劳模型已建立。

**2.2 血清睾酮浓度测定**

模型组与安静对照组相比血清睾酮浓度下降( $P<0.05$ ),确定模型成功。安静何首乌饮组、何首乌饮治疗组和何首乌饮预防组血清睾酮浓度则高于安静对照组( $P<0.05$ )。见附表。

**2.3 大鼠睾丸组织中 Cox7a2 的表达变化**

Cox7a2 免疫组化阳性颗粒主要表达于间质细胞胞质和胞核,也可见于精原细胞胞核。C 组阳性信号较强,A、B 组最弱,D、E 组介于两者之间,见图 1。半定量分析结果示:Cox7a2 蛋白及 mRNA 水平均表现为:A、B、D 和 E 组低于 C 组( $P<0.05$ ),A、B 组和 D、E 组之间差异无统计学意义。见图 2、图 3 和附表。

附表 血清睾酮浓度、Cox7a2 蛋白和 Cox7a2 mRNA 半定量分析结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

| Table                           | Determination of serum testosterone concentration and the semiquantitative analysis of Cox7a2 protein and mRNA ( $\bar{x}\pm s$ ) |                                   |                                    |                                    |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Group                           | n                                                                                                                                 | Testosterone ( $\mu$ g/L)         | Cox7a2 protein                     | Cox7a2 mRNA                        |
| Normal control                  | 10                                                                                                                                | 15.5570 $\pm$ 0.3139              | 0.58194 $\pm$ 0.01167 <sup>#</sup> | 0.46566 $\pm$ 0.01267 <sup>#</sup> |
| Heshouwuyin administered normal | 10                                                                                                                                | 25.8960 $\pm$ 0.5528 <sup>*</sup> | 0.57348 $\pm$ 0.00992 <sup>#</sup> | 0.45629 $\pm$ 0.01121 <sup>#</sup> |
| Model control                   | 10                                                                                                                                | 3.0740 $\pm$ 0.3781 <sup>*</sup>  | 0.77598 $\pm$ 0.00773              | 0.64475 $\pm$ 0.01065              |
| Heshouwuyin treated             | 10                                                                                                                                | 25.8850 $\pm$ 0.5898 <sup>*</sup> | 0.68351 $\pm$ 0.01042 <sup>#</sup> | 0.55962 $\pm$ 0.00967 <sup>#</sup> |
| Heshouwuyin prevented           | 10                                                                                                                                | 26.0830 $\pm$ 0.5542 <sup>*</sup> | 0.68004 $\pm$ 0.00973 <sup>#</sup> | 0.55280 $\pm$ 0.01059 <sup>#</sup> |

\*  $P<0.05$ , vs. normol control group; <sup>#</sup>  $P<0.05$ , vs. model control group

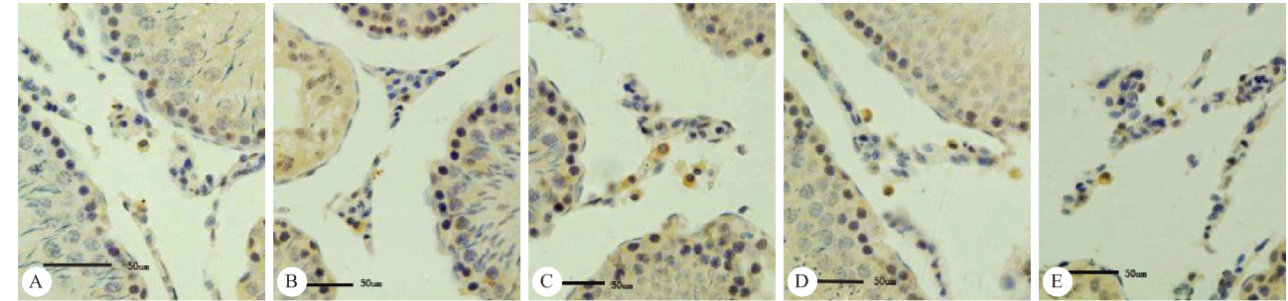


图 1 大鼠睾丸组织 Cox7a2 蛋白的表达 (SP 法)

Fig 1 Expression of Cox7a2 protein in rat testicular tissues (SP method)

A: Normal control group; B: Heshouwuyin administered normal group; C: Model control group; D: Heshouwuyin treated group; E: Heshouwuyin prevented group

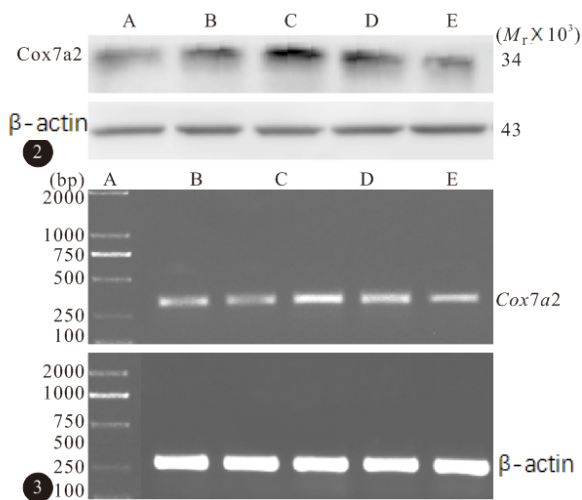


图 2 大鼠睾丸组织 Cox7a2 蛋白的表达 图 3 大鼠睾丸组织 Cox7a2 mRNA 表达

Fig 2 Expression of Cox7a2 protein in rat testicular tissues Fig 3 Expression of Cox7a2 mRNA in rat testicular tissues

A-E: Denotes the same as those in Fig 1; M: Marker

## 2.4 Cox7a2 表达与血睾酮水平的相关性

相关性结果表明,大鼠睾丸组织中 Cox7a2 蛋白及 mRNA 水平与血睾酮水平呈负相关关系( $r$  分别为  $-0.768$ 、 $-0.746$ ,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

Cox7a2 参与氧化呼吸链上第 4 个复合体——细胞色素 C 氧化酶的构成,是维持细胞色素 C 氧化酶正常功能所必须的。细胞色素 C 氧化酶为氧化呼吸链上最后一个复合体,位于线粒体内膜,功能是传递电子,把氧分子转变成  $H_2O$ ,完成能量生成,该酶也是电子传递链最后的限速步骤。有研究发现 Cox7a2 可以通过抑制睾酮合成限速酶(StAR)的表达来抑制黄体生成素(LH)诱导的 TM3 小鼠睾丸 Leydig 细胞睾酮合成<sup>[8]</sup>。与上述结果一致,我们的实验结果也显示运动疲劳模型组表现为 Cox7a2 表达明显升高而血睾酮却明显降低,何首乌饮治疗和预防组明显降低了 Cox7a2 表达而升高了血睾酮水平,两者呈现负相关关系。

运动训练过程是体能消耗的过程,超过一定程度、一定强度就会导致疲劳的发生,长期运动疲劳可导致血睾酮下降<sup>[9]</sup>。究其原因,认为睾丸本身的功能障碍是导致血睾酮合成和分泌减少的主要原因之一。中医认为运动疲劳与中医一些虚证相类似,“久虚及肾”,导致肾阳虚。肾为先天之本,肾藏精,主骨生髓,是体力产生的原动力和源泉。何首乌饮由《宣明论方》何首乌丸加味而成,在何首乌、肉从蓉、怀牛

膝基础上增加淫羊藿补肾助阳以强筋骨,丹参活血化瘀以通心脉,茯苓健脾利湿以宁心神。本研究结果显示运动疲劳后 Cox7a2 表达明显增强,血睾酮明显下降。究其原因可能是:运动疲劳后 Cox7a2 基因表达的明显增强破坏了氧化呼吸链的电子传递过程,使 ATP 生成减少,进而抑制睾酮合成。但具体机制尚不明确。何首乌饮能够降低 Cox7a2 表达,改善运动疲劳后血睾酮下降。以往研究发现何首乌饮能够明显升高衰老大鼠血睾酮水平<sup>[10]</sup>。何首乌饮还可以增加运动疲劳大鼠  $3\beta$ -羟基类固醇脱氢酶(HSD)和  $17\beta$ -HSD 蛋白和 mRNA 表达,提高血睾酮水平<sup>[11,12]</sup>。推测何首乌饮可能是通过降低 Cox7a2 表达和升高睾酮合成酶的表达来升高血睾酮水平。进一步说明给大鼠灌胃何首乌饮有利于进一步纠正因运动疲劳造成的睾丸组织中 Cox7a2 增高对睾酮合成的抑制作用,对维持训练中睾酮的合成和血睾酮水平的稳定有益。

## 参 考 文 献

- Segade F, Hurlé B, Claudio E, *et al.* Identification of an additional member of the cytochrome c oxidase subunit VII a family of proteins. *Biol Chem*, 1996; 271(21): 12343-12349.
- 辛钟成, 刘武江, 田 龙等. 老年人睾丸组织退化的基因表达谱研究. *北京大学学报(医学版)*, 2003; 35(4): 364-368.
- 钱风雷, 曾凡辉. 补肾中药对大鼠运动性低血睾酮的调整作用. *中国运动医学杂志*, 1998; 17(4): 320-322.
- 陈志宏, 齐聪儒, 高福禄等. 天年饮对亚急性衰老大鼠睾丸组织 SOD 活性及生精细胞凋亡的影响. *四川中医*, 2004; 22(8): 11-12.
- 郭凯华, 高福禄, 牛嗣云等. 何首乌饮对衰老大鼠睾丸生殖功能的影响. *承德医学院学报*, 2010; 27(2): 133-136.
- 李雅丽, 张 娜, 高福禄等. 何首乌饮对亚急性衰老大鼠的抗氧化和调脂作用. *中国新药杂志*, 2008; 17(4): 289-291.
- 李宁川, 金其贯, 孙新荣. 力竭性游泳训练对过度训练动物模型的作用. *体育与科学*, 2000; 21(1): 53-55.
- Chen L, Xin ZC, Li X, *et al.* Cox7a2 mediates steroidogenesis in TM3 mouse Leydig cells. *Asian J Androl*, 2006; 8(5): 589-594.
- 衣雪洁, 常 波, 张庆荣. 运动性低血睾酮发生机理的研究. *北京体育大学学报*, 2006; 29(4): 477-481.
- 曲银娥. COX VII a 在中老年男子部分雄激素缺乏综合征中的作用及机理研究. 石家庄: 河北医科大学基础医学院, 2010.
- 郭 银, 牛嗣云, 高福禄等. 何首乌饮对运动疲劳大鼠睾丸组织  $17\beta$ -类固醇脱氢酶表达的影响. *解剖学报*, 2011; 42(4): 543-548.
- 王凤威, 曲银娥, 赵秀军等. 何首乌饮对过度训练大鼠睾丸组织  $3\beta$ -HSD 的影响. *解剖学报*, 2011; 42(3): 452-456.

(2012-09-04 收稿, 2012-12-25 修回)

编辑 余 琳