

Nihon Rinsho, 2013, 71(8): 1418-1423.

[2] Shirasaka D. *Helicobacter pylori* VacA and gastric ulcer[J]. *Inter J Hematol*, 2006, 84(4): 316-318.

[3] 虎喜成, 田文荣, 刘敬霞, 等. 中医药治疗胃溃疡的临床研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(1): 208-210.

[4] 刘海燕, 刘禹宏, 齐增艳. 中药甘草中提取物的分析研究[J]. 中外医学研究, 2014, 12(32): 162-164.

[5] 董方圆, 王杰军. 甘草次酸及其衍生物的抗炎机制[J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(2): 195-197.

[6] 张俊杰, 周庚生, 顾伟忠, 等. 芩连合剂对幽门螺杆菌感染性胃溃疡大鼠氧自由基参数的影响[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 157-158.

[7] 张 强. 间质干细胞受幽门螺杆菌影响对胃上皮细胞作用及机制[D]. 镇江: 江苏大学, 2013.

[8] 韩 丽. 正红树提取物抗大鼠实验性胃溃疡作用及抗菌活性研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2006.

[9] GÜCİN Z, ÇAKMAK T, Bayyurt N, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and relationship with gastric epithelial cell proliferation and apoptosis [J]. *Turkish J Med Sci*, 2013, 43 (5): 739-746.

[10] 王立英, 刘雨萌, 金元宝, 等. 甘草次酸对谷氨酸所致PC12细胞损伤的保护作用及其机理[J]. 华西药杂志, 2013, 28(4): 353-356.

[11] 吴晓玲, 庄佩佩, 郝嘉楠, 等. 18 β -甘草次酸通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对 U937 细胞凋亡的调控机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(19): 1710-1715.

[12] Wang D, Wong H K, Feng Y B, *et al.* 18 β -Glycyrrhetic acid induces apoptosis in pituitary adenoma cells via ROS/MAPKs-mediated pathway [J]. *J Neuro oncolo*, 2014, 116 (2): 221-230.

[13] Gunjan S, Susanta K, Shreyasi P, *et al.* 18 β -glycyrrhetic acid induces apoptosis through modulation of Akt/FOXO3a/Bim pathway in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *J Cellr Physiol*, 2012, 227(5): 1923-1931.

[14] Gao C, Liu Y, Jiang Y, *et al.* Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3 β pathway in streptozotocin-induced alzheimer rat model[J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(3): 261-269.

[15] Chou C H, Chou A K, Lin C C, *et al.* GSK3 β regulates Bcl2L12 and Bcl2L12A anti-apoptosis signaling in glioblastoma and is inhibited by LiCl [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11 (3): 532-542.

[16] To C, Guglielmo J M D. Abstract 1548: The effects of synthetic triterpenoids on GSK3 β and focal adhesions[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 1548-1548.

五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤的影响

赵海霞, 黄威峰, 宋来新, 刘 静, 彭 奔, 张长城*
(三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

摘要: **目的** 探讨五子衍宗方(枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子)对环磷酰胺致成年雄性小鼠睾丸细胞DNA损伤的影响。**方法** 将50只成年雄性Balb/C小鼠中40只腹腔注射环磷酰胺后随机均分为模型对照组(生理盐水)以及五子衍宗方低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg), 10只另设正常对照组(生理盐水), 乙醚麻醉小鼠后颈椎脱臼处死。检测小鼠精子数量、精子活率及精子畸形率, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)法检测血清中8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含有量, 单细胞凝胶电泳技术检测睾丸细胞DNA损伤程度, Western blot检测睾丸组织中磷酸化的肿瘤抑制蛋白53(p-P53)、 γ 位磷酸化的组蛋白(γ -H2AX)蛋白表达。**结果** 相较于模型对照组, 五子衍宗方各组可显著升高小鼠精子数量、精子活率, 显著降低精子畸形率、血清8-OHdG水平, 显著降低睾丸组织中p-P53与 γ -H2AX蛋白表达。**结论** 五子衍宗方能通过下调p-P53、 γ -H2AX蛋白表达来显著减轻环磷酰胺致小鼠睾丸细胞DNA损伤。

关键词: 五子衍宗方; 环磷酰胺; 8-OHdG; DNA损伤; γ -H2AX

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0466-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.005

Effects of Wuzi Yanzong Prescription on cyclophosphamide-induced DNA damage of testis cells in mice

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573931, 81373881, 81503334); 三峡大学人才科研启动基金(KJ2014B067)

作者简介: 赵海霞(1986—), 女, 博士, 讲师, 从事中药药理研究。E-mail: zhaohaixia.mm@163.com

***通信作者:** 张长城(1973—), 男, 博士, 教授, 从事中药药理研究。E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn

ZHAO Hai-xia, HUANG Wei-feng, SONG Lai-xin, LIU Jing, PENG Ben, ZHANG Chang-cheng*
(Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Wuzi Yanzong Prescription (*Lycii Fructus*, *Cuscutae Semen*, *Rubi Fructus*, *Plantaginis Semen* and *Schisandrae chinensis Fructus*) on DNA damage of testis cells in adult male mice induced by cyclophosphamide (CTX). **METHODS** Forty out of fifty adult male Balb/C mice were injected intraperitoneally with CTX and then were randomly and equally divided into model control group (normal saline), Wuzi Yanzong Prescription low-, medium- and high-dose groups (100, 200 and 400 mg/kg), and the other ten mice served as normal control group (normal saline). All mice were anesthetized by inhalation of ether, and then were sacrificed by cervical dislocation. The sperm count, sperm motility and malformation rate of sperm were tested. The content of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) in serum was measured using ELISA; the DNA damage degree of cells in testis was detected by single cell gel electrophoresis; the protein expressions of p-P53 and γ -H2AX in testis were examined by Western blot. **RESULTS** Compared with the model control group, Wuzi Yanzong Prescription groups showed significant increase in the sperm count, sperm motility and significantly decreased malformation rate of sperm, the level of 8-OHdG in serum, and the protein expressions of p-P53 and γ -H2AX in testis were also significantly decreased. **CONCLUSION** Wuzi Yanzong Prescription can significantly alleviate the DNA damage of testis cells in mice induced by CTX through down-regulating protein expressions of p-P53 and γ -H2AX.

KEY WORDS: Wuzi Yanzong Prescription; cyclophosphamide; 8-OHdG; DNA damage; γ -H2AX

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 是临床治疗肿瘤和免疫异常广泛使用的细胞毒剂^[1-3], 可引起睾丸 DNA 损伤, 诱导生殖细胞 DNA 畸形、断裂或突变, 导致精子 DNA 断裂, 最终引起雄性不育, 诱发肿瘤, 甚至子代畸形^[4]。因此, 如何预防和减轻 CTX 所致的睾丸细胞 DNA 损伤愈来愈引起人们的关注。

五子衍宗方是补肾益精经典方, 可以减少外周血白细胞 DNA 缺失^[5], 保护老年大鼠骨骼肌 DNA 的损伤^[6]。本课题组最新研究显示, 五子衍宗方可以显著减轻 CTX 所致的小鼠骨髓细胞、肝脏细胞 DNA 损伤^[7-8], 而本实验进一步研究该方对 CTX 致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤的影响。

1 材料

1.1 实验动物 两月龄无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF) 雄性 Balb/C 小鼠 50 只, 体重 20 ~ 22 g, 订购于湖北省预防医学科学院疾病预防控制中心, 动物生产许可证编号 SCXK (鄂) 2014-0004。在三峡大学医学院实验动物中心 SPF 级屏障系统 (实验动物使用许可证号 SYXK [鄂] 2011-0061) 中分笼饲养, 控制湿度 55% ~ 65%, 温度 (20 ± 2)℃, 每天定时给予 12 h 光照, 添加足量饲料与水, 自由进食饮水。

1.2 药品 注射用环磷酰胺 (环磷酰胺粉针剂,

规格 0.2 g, 生产批号 14031325, 江苏恒瑞医药股份有限公司)。五子衍宗方 5 种药材购自宜昌市中医医院, 生产厂家均为亳州市华鑫中药饮片科技有限公司, 生产许可证号皖 20150350, 枸杞子 (批号 15083002)、菟丝子 (批号 15061901)、覆盆子 (批号 15071702)、车前子 (批号 15063002)、五味子 (批号 15080702) 经三峡大学生物与制药学院生药专家汪鋆植教授鉴定均为正品, 准确称取 800 g 枸杞子、800 g 菟丝子、400 g 覆盆子、200 g 车前子、100 g 五味子, 按照传统方法煎取, 充分浓缩, 冷冻干燥, 提取率为 18.8%。

1.3 试剂 三羟甲基氨基甲烷 [tris (hydroxymethyl) methyl aminomethane, TRIS, Amresco, 货号 0497, America]; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Amresco, 货号 0231, America); 乙二胺四乙酸二钠 (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTANa₂, Amresco, 货号 0105, America); 肌氨酸钠 (sodium lauroyl sarcosine, Amresco, 货号 0719, America); 低熔点琼脂糖 (low melting agarose, LMA, Amresco, 货号 0815, America); TritonX-100 (Amresco, 货号 0694, America); 正常熔点琼脂糖 (Standard melting Agarose, SMA, Biowest, 货号 111860, Spain); 溴化乙锭 (EB 购自北京索来宝科技有限公司, 货号 E8060-100);

8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) ELISA 试剂盒 (上海联硕生物技术有限公司, 产品编号 AE90828Mu); β -Actin 抗体 (Santa Cruz, 货号 SC-47778, America); p-P53 抗体 (Cell signaling, 货号 #12571, America); γ -H2AX 抗体 (Abcam, 货号 ab26350, America)。

1.4 仪器 Tecan Safire2 型全波长多功能酶标仪 (瑞士); 电泳仪 (PowerPacTM Basic, Bio-Rad, America); 电泳槽及蛋白电泳技术平台 (Mini PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, America); BX51 型 Olympus 荧光显微镜 (日本); 化学发光凝胶成像自动显影仪 (Bioshine ChemiQ 4800, 上海欧翔科学仪器有限公司, 中国)。

2 方法

2.1 动物分组和给药 随机将 50 只成年雄性 Balb/C 小鼠分为 5 组, 各组均为 10 只。正常对照组、模型对照组每天灌服生理盐水 (normal saline, NS), 五子衍宗方 3 个剂量组分别灌服 100、200、400 mg/kg 五子衍宗方, 各组每天灌胃 1 次。正常对照组灌胃 4 d 后腹腔注射生理盐水, 其余 4 组灌胃 4 d 后腹腔注射 CTX (200 mg/kg), 隔 7 d 注射 1 次, 共 4 次, 各组每天继续灌胃给予生理盐水或相应剂量五子衍宗方。第 4 次注射 CTX 后间隔 12 h 乙醚麻醉小鼠, 颈椎脱臼处死。

2.2 指标检测

2.2.1 血清中 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 水平测定 每只小鼠摘除眼球取血, 放入 1.5 mL EP 管中, 室温静置 30 min 后, 用提前预冷至 4 ℃ 的离心机以 3 500 r/min 的转速离心 15 min, 用移液器小心取出上层血清, ELISA 法检测血清中 8-OHdG 水平。

2.2.2 小鼠附睾中精子数量及精子活率的测定 将 37 ℃ 恒温箱中预热过的生理盐水取 1 mL 加入 EP 管中, 取出小鼠单侧附睾, 剪成 3 段放入 EP 管中, 摇匀后送至宜昌市中心人民医院生殖中心, 参照人类精液分析方法, 检测小鼠附睾内精子数量、精子活率与精子畸形率。

2.2.3 碱性单细胞凝胶电泳技术检测小鼠睾丸细胞 DNA 损伤 碱性单细胞凝胶电泳实验方法参考文献 [8], 在荧光显微镜下观察并拍照, 采用 Casp 专业彗星图像分析软件对彗星图像进行分析。

2.2.4 Western blot 法检测睾丸组织中磷酸化的肿瘤抑制蛋白 53 (p-P53)、 γ 位磷酸化的组蛋白 (γ -H2AX) 的蛋白表达 取单侧睾丸, 去除白膜后剪碎, 蛋白裂解液 RIPA 裂解, 离心, 取上清,

采用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样品加 5 $\times$ SDS 加样缓冲液, 加热蛋白变性后电泳, 在胶上加入标准参照蛋白。电泳完毕后, 根据蛋白分子量切胶转膜, 5% 牛奶封闭, 加入一抗溶液 (p-P53、 γ -H2AX 1 : 500, β -Actin 1 : 3 000)、二抗 (1 : 3 000)。TBST 洗膜 3 次, 进行 ECL 反应。自动显影仪下显影, 图像分析系统扫描其灰度值, 并进行半定量分析。

2.2.5 统计学方法 实验结果经 SPSS 18.0 软件处理, 实验各个数据均用平均值 $\pm$ 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$), 用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行多组间差异的比较, 以 Dunnett-*t* 检验比较 2 组间均数的差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 五子衍宗方对环磷酰胺处理的小鼠附睾中精子数量、精子活率、精子畸形率的影响 结果如表 1 所示。相比于正常对照组, 模型对照组小鼠精子数量、精子活率显著降低, 精子畸形率明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而五子衍宗方能明显改善 CTX 造成的小鼠生精功能损伤 ($P < 0.05$)。

表 1 五子衍宗方对小鼠附睾中精子数量、精子活率、精子畸形率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 1 Effects of Wuzi Yanzong Prescription on the sperm count, sperm motility and malformation rate of sperm in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	精子计数/ ($\times 10^6 \cdot L^{-1}$)	活精率/ %	精子畸形 率/%
正常对照组	-	194 $\pm$ 25	71.0 $\pm$ 2.1	16.0 $\pm$ 1.1
模型对照组	-	71 $\pm$ 21 [#]	11.0 $\pm$ 1.7 ^{##}	54.0 $\pm$ 1.6 ^{##}
五子衍宗方低剂量组	100	74 $\pm$ 10	18.0 $\pm$ 2.2	37.0 $\pm$ 1.9 [*]
五子衍宗方中剂量组	200	128 $\pm$ 16 [*]	42.0 $\pm$ 1.2 [*]	39.0 $\pm$ 1.4 [*]
五子衍宗方高剂量组	400	108 $\pm$ 17 [*]	31.0 $\pm$ 1.4 [*]	33.0 $\pm$ 2.7 [*]

注: 与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^{*} $P < 0.05$

3.2 五子衍宗方对环磷酰胺处理的小鼠血清中 8-OHdG 含有量的影响 结果见表 2。相比于正常对照组, 模型对照组小鼠血清中 8-OHdG 的含有量明显增加 ($P < 0.01$)。五子衍宗方可剂量依赖性地降低血清中 8-OHdG 含有量 ($P < 0.05$)。

3.3 五子衍宗方对环磷酰胺处理的小鼠睾丸细胞 DNA 损伤的影响 相比于正常对照组, 模型对照组小鼠睾丸细胞彗星电泳图像尾长、尾矩、尾部 DNA% 和 Olive 尾矩都有明显增加 ($P < 0.01$), 表明环磷酰胺造成了明显的睾丸细胞 DNA 损伤。而五子衍宗方能明显降低小鼠睾丸细胞的彗星图像的尾长、尾矩、尾部 DNA% 和 Olive 尾矩 ($P < 0.05$,

表 2 五子衍宗方对小鼠血清中 8-OHdG 含有量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 Effect of Wuzi Yanzong Prescription on the content of 8-OHdG in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血清中 8-OHdG/ (ng·L ⁻¹)
正常对照组	—	21. 67 ± 2. 74
模型对照组	—	36. 14 ± 6. 80 ^{##}
五子衍宗方低剂量组	100	30. 23 ± 4. 66
五子衍宗方中剂量组	200	26. 23 ± 4. 36 *
五子衍宗方高剂量组	400	25. 34 ± 5. 39 *

注：与正常对照组比较，^{##} $P < 0. 01$ ；与模型对照组比较， $*P < 0. 05$

$P < 0. 01$)，提示五子衍宗方可减轻 CTX 所致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤。结果见表 3。

3. 4 五子衍宗方对环磷酰胺处理的小鼠睾丸组织中 DNA 损伤相关蛋白 p-P53、 γ -H2AX 蛋白表达水平的影响 相比于正常对照组，模型对照组 p-

表 3 五子衍宗方对小鼠睾丸细胞中尾部 DNA%、Olive 尾矩、尾长和尾矩的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 3 Effects of Wuzi Yanzong Prescription on the tail length, the tail percentage of DNA, the tail moment and the Olive tail moment of testis cells in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尾部 DNA%	Olive 尾矩	尾长/ μ m	尾矩
正常对照组	—	1. 54 ± 0. 56	1. 57 ± 0. 32	5. 84 ± 0. 97	1. 73 ± 0. 13
模型对照组	—	30. 92 ± 4. 97 ^{##}	15. 87 ± 4. 43 ^{##}	71. 78 ± 4. 43 ^{##}	25. 84 ± 3. 51 ^{##}
五子衍宗方低剂量组	100	20. 26 ± 4. 70 ^{**}	8. 56 ± 6. 22 *	49. 87 ± 5. 47 ^{**}	16. 16 ± 3. 06 *
五子衍宗方中剂量组	200	19. 25 ± 5. 58 ^{**}	7. 53 ± 3. 53 ^{**}	46. 17 ± 4. 72 ^{**}	13. 48 ± 2. 63 ^{**}
五子衍宗方高剂量组	400	17. 34 ± 6. 67 ^{**}	6. 20 ± 2. 39 ^{**}	45. 25 ± 2. 39 ^{**}	11. 83 ± 2. 89 ^{**}

注：与正常对照组比较，^{##} $P < 0. 01$ ；与模型对照组比较， $*P < 0. 05$ ， $**P < 0. 01$

表 4 五子衍宗方对小鼠睾丸组织中 p-P53、 γ -H2AX 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 4 Effects of Wuzi Yanzong Prescription on the protein expressions of p-P53 and γ -H2AX in testis of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

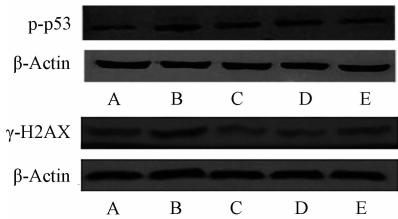
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	p-P53	γ -H2AX
正常对照组	—	0. 43 ± 0. 02	0. 42 ± 0. 03
模型对照组	—	0. 78 ± 0. 07 ^{##}	0. 69 ± 0. 08 ^{##}
五子衍宗方低剂量组	100	0. 69 ± 0. 05 *	0. 52 ± 0. 06 *
五子衍宗方中剂量组	200	0. 62 ± 0. 06 *	0. 51 ± 0. 07 *
五子衍宗方高剂量组	400	0. 52 ± 0. 03 ^{**}	0. 43 ± 0. 05 ^{**}

注：与正常对照组比较，^{##} $P < 0. 01$ ；与模型对照组比较， $*P < 0. 05$ ， $**P < 0. 01$

4 讨论

CTX 在临床上广泛应用于治疗各种肿瘤、自身免疫疾病和器官移植排斥反应等^[9-10]，已知 CTX 造成 DNA 损伤，从而导致肿瘤细胞死亡而发挥抗肿瘤作用^[11]，其在损伤病灶细胞 DNA 的同时也会造成睾丸组织细胞的 DNA 损伤，造成男性患者生精障碍甚至不育。文献报道，五子衍宗方可以减少

P53、 γ -H2AX 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0. 01$)，而五子衍宗方组均明显降低 p-P53、 γ -H2AX 蛋白表达 ($P < 0. 05$, $P < 0. 01$)，结果见图 1 和表 4。



注：A 为正常对照组，B 为模型对照组，C 为五子衍宗方低剂量组，D 为五子衍宗方中剂量组，E 为五子衍宗方高剂量组

图 1 五子衍宗方对小鼠睾丸组织中 p-P53、 γ -H2AX 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of Wuzi Yanzong Prescription on the protein expressions of p-P53 and γ -H2AX in testis of mice

线粒体的 DNA 损伤^[5-6]，本课题组最新研究也显示，五子衍宗方可以显著减轻 CTX 所致的小鼠骨髓细胞 DNA 损伤和肝脏细胞 DNA 损伤^[7-8]。

已知 CTX 可通过诱导生殖细胞 DNA 损伤导致明显的生殖毒性，本实验首先观察了 CTX 对小鼠生精功能的影响，与文献报道和本课题组以往研究结果一致。相比于正常对照组，模型对照组小鼠附睾内精子数量、精子活率显著降低，精子畸形率显著升高；而相比于模型对照组，五子衍宗方各剂量组小鼠附睾内精子数量、精子活率明显升高，精子畸形率明显降低，表明五子衍宗方确实可以减轻 CTX 造成的生殖毒性。

8-OHdG 是 DNA 损伤的代谢终产物，也是 DNA 损伤的标志物，因此血清中 8-OHdG 的水平可以反映出机体 DNA 损伤的程度^[12]。本实验通过检测血清中 8-OHdG 的水平发现，模型对照组 8-OHdG 的水平较正常对照组显著升高，而五子衍宗方可显著降低血清中 8-OHdG 的水平，表明五子衍宗方各组能明显减轻 CTX 造成的 DNA 损伤。单细

胞凝胶电泳技术也称彗星实验，是国内外检测 DNA 损伤程度的经典方法^[13]，DNA 损伤越严重，产生的 DNA 碎片越多片段越小，彗星越多，尾部越长，亮度越亮，通过软件分析后对 DNA 是否损伤及损伤程度进行定量分析。本实验单细胞凝胶电泳结果显示，与正常对照组相比，模型对照组的 Olive 尾矩、尾矩、尾长和尾部 DNA% 都有显著提高，相比于模型对照组，五子衍宗方各剂量组的 Olive 尾矩、尾矩、尾长和尾部 DNA% 都有显著降低。以上结果表明，五子衍宗方可减轻对 CTX 所致的生殖细胞损伤，可能与降低 DNA 损伤有关。

γ -H2AX 是定量检测 DNA 双链断裂损伤程度的重要标志蛋白^[14]，它是 DNA 双链损伤的起始感应蛋白。研究发现， γ -H2AX 焦点数与 DNA 双链断裂点的比例接近 1 : 1^[15]。P53 被称为“基因卫士”，在 DNA 损伤和其他基因异常过程中发挥重大作用，DNA 损伤可导致 P53 蛋白的激活或磷酸化继，引起细胞周期阻滞或凋亡^[16]。文献报道，p-P53 不仅可检测 DNA 双链断裂，也可检测 DNA 单链断裂^[17]。本研究中注射 CTX 后，睾丸组织中 p-P53 和 γ -H2AX 蛋白的表达显著增高，而五子衍宗方能明显降低两者蛋白表达，这些均表明五子衍宗方可减轻 CTX 造成的 DNA 损伤，从而减轻 CTX 导致的生殖毒性。

综上所述，五子衍宗方可明显减轻睾丸细胞 DNA 损伤从而减轻 CTX 导致的生殖毒性。先前研究表明，五子衍宗方在减轻 CTX 毒副作用的同时，可通过增强机体自身抗肿瘤免疫效应改善环磷酰胺化疗效果^[18]。但五子衍宗方减轻 CTX 所致 DNA 损伤的详细分子机制亟待进一步研究，这将有助于明确该方减轻生殖细胞 DNA 损伤的作用和机制，并为临床应用其防治化疗药 CTX 所致生殖细胞 DNA 损伤提供理论与实验依据。

参考文献:

[1] Xu M, He R R, Zhai Y J, *et al.* Effects of carnosine on cyclophosphamide-induced hematopoietic suppression in mice[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(1): 131-142.

[2] Zanchi M M, Manfredini V, Brum D D S, *et al.* Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system[J]. *Toxicol Rep*, 2015, 180(2): 252-260.

[3] Denis W. Does cyclophosphamide still have a role in the treatment of severe inflammatory eye disease? [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2014, 22(4): 306-310.

[4] Adriana A M, Hales B F, Bernard R, *et al.* Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(6): 1297-1304.

[5] 王学美, 富 宏, 刘庚信. 五子衍宗丸对男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及线粒体呼吸链酶复合体活力的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(2): 101-103.

[6] 王学美, 富 宏, 刘庚信. 五子衍宗丸及其拆方对老年大鼠骨骼肌线粒体 DNA 氧化损伤的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21(4): 292-294.

[7] 刘苗苗, 袁 丁, 黄威峰, 等. 五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠 DNA 损伤的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(6): 38-40.

[8] 黄威峰, 刘苗苗, 袁 丁, 等. 五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠肝细胞 DNA 损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2015, 37(5): 1093-1096.

[9] Taha N R, Amin H A, Sultan A A. The protective effect of *Moringa oleifera* leaves against cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats[J]. *Tissue Cell*, 2015, 47(1): 94-104.

[10] Xu X, Zhang X. Effects of cyclophosphamide on immune system and gut microbiota in mice[J]. *Microbiol Res*, 2015, 17(1): 97-106.

[11] Tripathi D N, Jena G B. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(3): 398-406.

[12] Yang S, Wu H, Zhao J, *et al.* Feasibility of 8-OHdG formation and hOGG1 induction in PBMCs for assessing oxidative DNA damage in the lung of COPD patients[J]. *Respirology*, 2014, 19(8): 1183-1190.

[13] Ventura L, Giovannini A, Savio M, *et al.* Single cell gel electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing[J]. *Chemosphere*, 2013, 92(1): 1-9.

[14] Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 920(9): 613-616.

[15] Sedelnikova O A, Rogakou E P, Panyutin I G, *et al.* Quantitative detection of 125 IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody [J]. *Radiat Res*, 2002, 158(4): 486-492.

[16] Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(2): 501-517.

[17] 周学贤, Penny J, Paul C, 等. p53 和 γ -H2AX 作为乙醛引起 DNA 损伤早期生物标记物的实验研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2014, 26(2): 81-87.

[18] 王洪武, 李守超, 王光勇, 等. 五子衍宗方对 H22 荷瘤小鼠环磷酰胺化疗的减毒作用[J]. *中成药*, 2012, 34(11): 2211-2214.