

强精片调控CDK4/E2F信号通路延缓大鼠Leydig细胞及 睾丸组织衰老的机制

兰秀成¹, 王梅静¹, 张静益¹, 李俊君², 董良¹, 俞旭君¹, 阳方^{1*}, 常德贵^{3*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 成都市第五人民医院, 成都 6111301;

3. 成都中医药大学附属医院代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 成都 610075)

[摘要] 目的:揭示中药复方强精片经细胞周期蛋白依赖性激酶4/E2F转录因子(CDK4/E2F)信号通路调控大鼠睾丸组织及睾丸间质细胞(Leydig)细胞衰老的分子机制。方法:细胞实验选取2月龄SPF级SD雄性大鼠,按体质量随机均分为空白组(给予等体积0.9%氯化钠注射液)和强精片组(每组20只)。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导TM3细胞衰老建立Leydig细胞衰老模型,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测p16、p21水平验证模型有效性。以抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)作为清除活性氧(ROS)的阳性对照。采用含强精片的低(2.5%)、中(5%)、高(10%)浓度血清干预细胞。通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定细胞上清液睾酮水平,Western blot检测CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达。动物实验以19月龄自然衰老大鼠为模型组,2月龄大鼠作为青年组,阳性对照采用5.21 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 丙酸睾酮皮下注射,强精片低、中、高剂量组分别以0.72、1.44、2.88 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量灌胃。观察大鼠一般状况,Western blot检测睾丸组织中CDK4、E2F1、E2F2蛋白含量。结果:细胞实验中,与正常组比较,模型组CDK4、E2F1表达明显升高($P<0.05$),E2F2略降低;与模型组比较,N-乙酰半胱氨酸组及强精片低剂量组CDK4明显升高($P<0.05$),强精片中剂量组略升高,强精片高剂量组CDK4明显降低($P<0.05$),N-乙酰半胱氨酸组E2F1明显降低($P<0.05$)、E2F2略减少,强精片低、中、高剂量组E2F1、E2F2均明显下降($P<0.05$);与N-乙酰半胱氨酸组比较,强精片低剂量组CDK4略升高,强精片高剂量组明显下降($P<0.05$),强精片高剂量组E2F1明显减少($P<0.05$),强精片各剂量组E2F2均明显下降($P<0.05$)。动物实验中,较青年组,模型组CDK4明显降低($P<0.05$),E2F1、E2F2略升高;与模型组比较,丙酸睾酮组及强精片低剂量组CDK4明显下降($P<0.05$),强精片中、高剂量组CDK4明显升高,强精片中剂量组差异有统计学意义($P<0.05$),E2F1均明显减少($P<0.05$),E2F2略升高;与N-乙酰半胱氨酸组比较,强精片中、高剂量组CDK4表达均明显升高($P<0.05$),强精片中剂量组E2F1蛋白明显增加($P<0.05$),强精片组E2F2均下降。结论:强精片通过上调CDK4表达并抑制E2F1、E2F2水平,改善Leydig细胞及睾丸组织的衰老进程。

[关键词] 强精片自然衰老; 睾丸间质细胞; 细胞周期蛋白依赖性激酶4/E2F转录因子(CDK4/E2F)信号通路

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0328-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252502

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251229.0919.001>

[网络出版日期] 2025-12-29 11:42:29 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Qiangjing Tablets Regulate CDK4-E2F Signaling Pathway to Delay Aging of Leydig Cells and Testicular Tissue in Rats

LAN Xiucheng¹, WANG Meijing¹, ZHANG Jingyi¹, LI Junjun², DONG Liang¹,

YU Xujun¹, YANG Fang^{1*}, CHANG Degui^{3*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China;

[收稿日期] 2025-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82274534);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划-青年创新团队项目(QNTD2024004);国家卫生健康委男性生殖健康重点实验室开放课题面上项目(2021GJP03)

[第一作者] 兰秀成,在读博士,医师,从事泌尿及生殖系统疾病研究,E-mail:811376755@qq.com

[通信作者] * 阳方,博士,主治医师,从事泌尿及生殖系统疾病研究,E-mail:252142600@qq.com;

* 常德贵,博士,主任医师,从事泌尿及生殖系统疾病研究,E-mail:624440310@qq.com

3. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu
University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal the molecular mechanism by which the traditional Chinese medicine compound prescription Qiangjing tablets regulate the aging of the testicular tissue and Leydig cells in rats through the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)-early 2 factor (E2F) signaling pathway. **Methods:** For the cell experiment, 2-month-old SPF-grade SD male rats were selected and randomly assigned into a blank control group (administrated with an equal volume of 0.9% sodium chloride injection) and a Qiangjing tablets group (20 rats in each group) according to body weight. The Leydig cell model of aging was established by treatment of TM3 cells with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, and the modeling performance was evaluated based on the levels of p16 and p21 determined by Western blot. The antioxidant NAC ($1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) was used as the positive control for eliminating reactive oxygen species (ROS). Cells were intervened with Qiangjing tablets-containing serum at low (2.5%), medium (5%), and high (10%) concentrations. The testosterone level in the cell supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein levels of CDK4, E2F1, and E2F2 were analyzed by Western blot. In the animal experiment, 19-month-old naturally aging rats were used as the model group, and 2-month-old rats as the young control group. The positive control group was subcutaneously injected with $5.21 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ testosterone propionate. Qiangjing tablets were administered by gavage at low, medium, and high doses of 0.72, 1.44, $2.88 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. The general conditions of rats were observed, and the protein levels of CDK4, E2F1, and E2F2 in the testicular tissue were determined by Western blot. **Results:** In the cell experiment, compared with the blank control group, the model group showed upregulated expression of CDK4 and E2F1 ($P<0.05$) and slightly downregulated expression of E2F2. Compared with that in the model group, the expression of CDK4 was upregulated in the NAC group and the low-dose Qiangjing tablets group ($P<0.05$), slightly upregulated in the medium-dose Qiangjing tablets group, and downregulated in the high-dose Qiangjing tablets group ($P<0.05$). The NAC group showed downregulated expression of E2F1 ($P<0.05$) and E2F2, and the low-, medium-, and high-dose Qiangjing tablets groups showed downregulated expression of both E2F1 and E2F2 ($P<0.05$). Compared with that in the NAC group, the expression of CDK4 was upregulated in the low-dose Qiangjing tablets group and downregulated in the medium-dose and high dose ($P<0.05$) groups. The expression of E2F1 was down-regulated in all the three dose groups, with statistically significance in the high dose group ($P<0.05$), and that of E2F2 were downregulated in all the three dose groups ($P<0.05$). In the animal experiment, compared with the young control group, the model group exhibited downregulated expression of CDK4 ($P<0.05$) and slightly upregulated expression of E2F1 and E2F2. Compared with that in the model group, the expression of CDK4 decreased in the testosterone propionate group and the low-dose Qiangjing tablets group ($P<0.05$) but increased in the medium-dose ($P<0.05$) and high-dose groups. In addition, the expression of E2F1 decreased ($P<0.05$), and that of E2F2 was slightly elevated. Compared with that in the NAC group, CDK4 expression was elevated in the Qiangjing tablets groups, with statistical significance in the medium- and high-dose groups ($P<0.05$). Similarly, the E2F1 expression was also upregulated in the Qiangjing tablets groups, with statistical significance in the medium-dose group ($P<0.05$). The expression of E2F2 was downregulated in all the Qiangjing tablets groups. **Conclusion:** Qiangjing tablets delay the aging process of Leydig cells and testicular tissue by up-regulating the expression of CDK4 and lowering the levels of E2F1 and E2F2.

[Keywords] Qiangjing tablets; natural aging; Leydig cells; cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)/early 2 factor (E2F) signaling pathway

全球老龄化趋势日益剧增,老年性疾病的防治成为公共卫生难题。男性迟发性性腺功能减退症(LOH)是男性常见衰老疾病之一,其临床表现多样且症状常不典型^[1],常表现为功能减弱^[2]、体能衰减、潮热盗汗^[3]、代谢失衡与情绪紊乱等^[4]。研究表明,睾酮(T)下降是LOH发生的主要原因^[5],T主要由睾丸间质细胞(LC)生成,且LC合成T的能力亦随年龄增长呈现下降趋势。

四川省名中医常德贵教授深耕男科三十余载,结合蜀地易致湿热瘀的地理特点,率先提出“肾虚血瘀兼湿热”的衰老病机理论,并据此研发中药复方强精片,展现川派中医“因地制宜、扶阳通瘀”的用药特色。前期实验表明,强精片可增加T合

成^[6-7],其机制主要与调控类固醇合成关键酶的表达及上调雄激素受体(AR)表达等有关^[8]。进一步研究发现,强精片可通过叉头框蛋白O4/抑癌基因p53(FoxO4/p53)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)等信号通路延缓睾丸组织衰老^[9-10]。因此,推测强精片对T缺乏引发的系列临床症状具有治疗优势。后续网络药理学分析进一步显示,该药物可能通过细胞周期蛋白依赖性激酶4/E2F转录因子(CDK4/E2F)信号通路调控睾丸组织T水平^[10]。本研究在前期基础上,拟作用于衰老LC及大鼠睾丸模型,明确强精片调控CDK4与E2F改善T合成,为衰老相关疾病的防治开拓新途径。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF级SD雄性大鼠,购置于成都达硕实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(川)2020-030,包括19月龄30只、2月龄46只;TM3细胞(小鼠睾丸间质细胞,湖南丰晖生物科技有限公司,批号CL0319)。所有大鼠适应性饲养3~7 d,饲养于温度20~25℃、相对湿度40%~70%、12 h昼夜交替的屏障系统,自由饮食饮水。

1.2 伦理 研究通过成都中医药大学附属医院动物伦理审批(2020SDL-002)。

1.3 药物与试剂 强精片由人参、当归、枸杞子、菟丝子、车前子、淫羊藿、仙茅、益母草以1:1:1.5:1:1:3:3:3配比组成,100片/瓶,含生药0.3 g/片,人用生药量 $4.5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ (四川省中医院,川药制字Z20070621,批号20191008)。丙酸睾酮注射液(宁波第二激素厂有限公司,兽药字<2016>110251054,1 mL:25 mg/支);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,国药准字H51021156,批号G219110306);麻醉剂戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号P3761);N-乙酰半胱氨酸(NAC,美国Sigma-Aldrich公司,货号A9165);异丙醇(四川西陇科学有限公司,批号181226);pH 7.2磷酸盐缓冲液(PBS,上海源培生物科技股份有限公司,批号B310KJ);放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液(强)、苯甲基磺酰氟(PMSF, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、蛋白酶抑制剂混合物(50 \times)、聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B、ST506、P1050、P0010); β -肌动蛋白(β -actin)抗体[AC-15]、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G H&L、ARPC5/p16 ARC抗体[EP1551Y]、p21抗体[EPR3993]、E2F1抗体、E2F2抗体[EPR8622]、CDK4抗体[EPR17525](英国Abcam公司,批号分别为ab49900、ab205718、ab51243、ab109199、ab137415、ab138515、ab199728);Clarity™ Western ECL Substrate(美国Bio-Rad公司,批号1705060);苏木素染液(武汉塞维尔生物公司,批号ZH193907);伊红染液(珠海贝索生物公司,批号C200403)。

1.4 仪器 G50型组织研磨器(卡尤迪生物科技宜兴有限公司);SCIENTZ-II D型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);H1850R型冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);K30型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);

MULTISKAN GO型全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司);PHS-320型酸度计(成都世纪方舟科技有限公司);IMS-30型全自动雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司);MINI-P4/MT-BLOT MOD/PP BAS型垂直电泳转印系统(美国Bio-Rad公司);LC-MSH-2L型磁力搅拌器(上海力辰邦西仪器科技有限公司);TS-2型定轨摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);NYC-80型转移脱色摇床(泰州诺米医疗科技有限公司);Champ Chemi 610型全自动化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司);UPR-I-15T型纯水制造系统、UPHW-IV-90T型超纯水制造系统(四川优普超纯科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 含药血清制备 取40只2月龄SD雄性大鼠按体质量随机均分为2组(每组20只):空白组、强精片组。空白组予等体积0.9%氯化钠溶液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,强精片组予 $7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃(基于临床等效剂量10倍换算)^[10]。每日2次,连续3 d。末次给药1 h后,腹主动脉穿刺取血,4℃条件下 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径5 cm),分离血清。合并同组血清,混匀备用,56℃水浴加热30 min灭活补体,0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤,分装后-80℃冻存。

2.1.2 细胞培养 小鼠睾丸间质细胞(TM3)复苏后,接种于含89%DMEM/F12培养基、1%双抗(青霉素-链霉素)及10%胎牛血清(FBS)的25 cm^2 培养瓶中,置于37℃、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。细胞贴壁生长24 h后更换新鲜培养基(消除冻存剂DMSO残留),当细胞融合度达80%且形态正常(透亮无空泡)时进行传代。

2.1.3 细胞分组及给药 实验共分为6组:正常组、衰老模型组、NAC组($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、强精片低剂量组(2.5%)、中剂量组(5%)、高剂量组(10%)

2.1.4 细胞造模及衰老鉴定 细胞接种于6孔板后,用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理细胞,诱导衰老48 h,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测衰老标记蛋白p21和p16的表达,以鉴定细胞衰老。

2.1.5 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测培养上清液中T的含量 全血经 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(4℃条件)分离血清,分装后-80℃冻存备用。待检血清室温解冻,匀速摇匀3 min。严格按试剂盒说明书操作,酶标仪双波长检测(主波长450 nm,参比波长540/570 nm),通过四参数逻辑曲线(4-PL)换算

T浓度。

2.1.6 Western blot检测CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达 RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解样本提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度,调整至 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 加热5 min变性蛋白,分装后 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存备用。10 μL /孔上样,100 V恒压电泳70~90 min,100 V恒压湿转至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温摇床封闭2 h; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床孵育一抗过夜(12~16 h),稀释比例:CDK4(1:1 000)、E2F1(1:2 000)、E2F2(1:500);室温摇床孵育二抗1 h,稀释比例:CDK4(1:10 000)、E2F1(1:5 000)、E2F2(1:15 000)。滴加0.75 mL等体积混合的ECL工作液,暗处反应30 s后,化学发光成像仪采集图片,Lane 1D软件分析条带灰度值。以 β -actin为内参校正,目标蛋白相对表达量=目标蛋白灰度值/ β -actin灰度值。

2.2 动物实验

2.2.1 分组 2月龄青年组,6只。剩余30只19月龄大鼠按体质量随机分为5组,每组6只。具体分组方式为:自然衰老模型组,丙酸睾酮组,强精片低、中、高剂量组。

2.2.2 给药 青年组和衰老模型组予等体积生理盐水灌胃。强精片低、中、高剂量组分别给予0.72、1.44、2.88 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [8],每日1次,连续干预4周。丙酸睾酮组予兽用丙酸睾酮注射液($5.21\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)皮下注射,每周3次,连续干预4周。

2.2.3 取材 腹腔注射2%戊巴比妥钠($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)诱导麻醉,急性失血法(腹主动脉离断)处死动物,分离睾丸,分装保存血清($-80\text{ }^\circ\text{C}$)及组织样本(部分冻存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,部分固定于4%多聚甲醛)。

2.2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察各组睾丸组织形态变化 将样本用4%多聚甲醛固定24 h,经脱水、包埋后切取4 μm 厚连续切片;贴片后 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘烤4 h,经HE染色,中性树胶封片晾干。最终在光学显微镜下获取像并分析结构改变。

2.2.5 睾丸组织样本制备与Western blot检测CDK4、E2F1、E2F2蛋白含量 睾丸组织经RIPA强效裂解液(含1%蛋白酶抑制剂)冰上匀浆, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心($12\ 000\times\text{g}$,15 min)获取上清,BCA法测定蛋白浓度(酶标仪 $A_{570\text{ nm}}$),确保上样量一致。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,恒压电转至PVDF膜,后于5%脱脂奶粉室温摇床封闭1 h。一抗孵育 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜,稀释比例:CDK4(1:250)、E2F1(1:500)、E2F2(1:1 000)。TBST洗

涤3次,每次15 min。室温二抗孵育1 h,稀释比例CDK4(1:5 000)、E2F1(1:20 000)、E2F2(1:15 000)。最后ECL化学发光法显影。

2.3 统计学方法 采用SPSS 26.0统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,均值两两多重比较采用最小显著性差异法(LSD),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

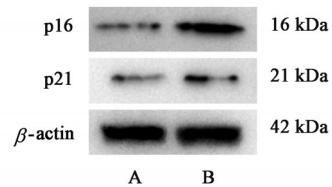
3 结果

3.1 细胞衰老模型鉴定 Western blot结果显示,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 组的TM3 Leydig细胞中,衰老相关蛋白p21和p16的表达明显高于0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 组($P<0.05$)。证实该实验成功构建了TM3 Leydig细胞衰老模型,这也与前期实验相符[10]。见表1、图1。

表1 H_2O_2 诱导Leydig细胞衰老模型p21、p16蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Expression of p21 and p16 proteins in H_2O_2 -induced aging model of Leydig cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p21/ β -actin	p16/ β -actin
H_2O_2	0	0.90 \pm 0.10	0.90 \pm 0.10
	100	1.26 \pm 0.16 ¹⁾	1.42 \pm 0.11 ¹⁾

注:与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 比较¹⁾ $P<0.05$



注:A.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 组;B.100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 组

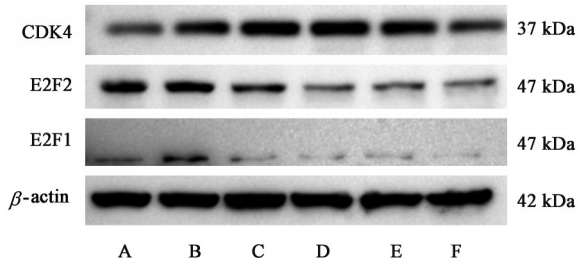
图1 H_2O_2 诱导Leydig细胞衰老模型p21、p16蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of p21 and p16 protein expression in Leydig cell senescence model induced by H_2O_2

3.2 强精片含药血清对衰老Leydig细胞T的影响 与正常组比较,模型组血清T蛋白表达呈下降趋势。与模型组比较,N-乙酰半胱氨酸组T较模型组明显上升($P<0.05$);强精片低、中剂量组T值明显降低($P<0.05$),高剂量T水平明显升高($P<0.05$)。见表2。

3.3 强精片含药血清对衰老Leydig细胞CDK4、E2F1、E2F2蛋白的影响 与正常组比较,模型组细胞中CDK4含量明显增加($P<0.05$);E2F1蛋白含量明显升高($P<0.05$),E2F2略降低。与模型组比较,NAC组及强精片低剂量组CDK4表达均明显上升($P<0.05$);NAC组E2F1表达明显下降, ($P<0.05$);强精片低、中、高剂量组细胞中E2F1、E2F2蛋白表达均明显下降($P<0.05$),以高剂量浓度下降最明显。

与NAC组比较,强精片高剂量组CDK4明显上升($P<0.05$);强精片高剂量组E2F1明显下降($P<0.05$);强精片各剂量组E2F2均明显降低($P<0.05$)。见图2、表2。



注:A.正常组;B.衰老模型组;C.NAC组;D.强精片低剂量组;E.强精片中剂量组;F.强精片高剂量组

图2 各组细胞中CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of CDK4, E2F1 and E2F2 in each group of cells

3.4 强精片对自然衰老大鼠睾丸组织形态学的影响 与青年组比较,模型组小鼠睾丸组织部分生精

小管生精小管萎缩、排列松散、间距增大,管腔碎裂,管壁完整性破坏,细胞排列紊乱,组织结构破坏严重;与模型组比较,治疗组生精细胞数量增加,排列趋于有序,形态规则,管腔边界清晰,无明显萎缩或扩张。见图3。

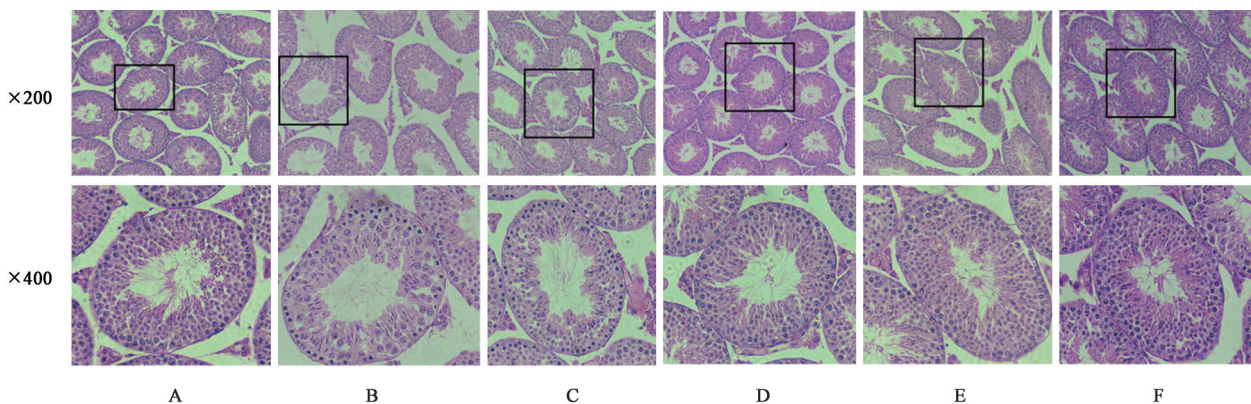
3.5 强精片对自然衰老大鼠睾丸组织CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达的影响 与青年组比较,模型组睾丸组织呈现CDK4蛋白降低趋势,而E2F1/E2F2蛋白轻度升高。与模型组比较,丙酸睾酮组与强精片低剂量组CDK4水平明显降低($P<0.05$),中、高剂量组呈上升趋势,中剂量组明显升高($P<0.05$);丙酸睾酮组及强精片低、中、高剂量组均明显抑制E2F1($P<0.05$),但E2F2变化差异无统计学意义。与丙酸睾酮组比较,强精片中、高剂量组CDK4明显上升($P<0.05$),且中剂量组明显;强精片低、高剂量组E2F1略增加,中剂量组明显上升,差异具有统计学意义($P<0.05$);E2F2各中药组均下降,但差异无统计学意义。见表3、图4。

表2 强精片含药血清对衰老Leydig细胞T、CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of drug-containing serum in Qiangjing tablets on expression of T, CDK4, E2F1, and E2F2 proteins in senescent Leydig cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	T/ $\mu g\cdot L^{-1}$	CDK4/ β -actin	E2F1/ β -actin	E2F2/ β -actin
正常组		5.43 \pm 0.54	1.22 \pm 0.19	1.18 \pm 0.16	1.16 \pm 0.14
衰老模型组		4.93 \pm 0.48	1.71 \pm 0.13 ¹⁾	1.54 \pm 0.22 ¹⁾	1.01 \pm 0.13
NAC组	0.163	5.97 \pm 0.49 ²⁾	2.10 \pm 0.20 ^{1,2)}	0.83 \pm 0.13 ^{1,2)}	0.88 \pm 0.11 ¹⁾
强精片低剂量组	1.8	4.70 \pm 0.75 ^{1,2,3)}	2.18 \pm 0.31 ^{1,2)}	0.60 \pm 0.07 ^{1,2)}	0.52 \pm 0.04 ^{1,2,3)}
强精片中剂量组	3.6	4.79 \pm 0.69 ^{2,3)}	1.91 \pm 0.21 ¹⁾	0.60 \pm 0.06 ^{1,2)}	0.51 \pm 0.05 ^{1,2,3)}
强精片高剂量组	7.2	5.20 \pm 0.38 ^{2,3)}	1.29 \pm 0.15 ^{2,3)}	0.46 \pm 0.05 ^{1,2,3)}	0.55 \pm 0.08 ^{1,2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与衰老模型组比较²⁾ $P<0.05$;与NAC组比较³⁾ $P<0.05$



注:A.青年组;B.自然衰老模型组;C.丙酸睾酮组;D.强精片低剂量组;E.强精片中剂量组;F.强精片高剂量组

图3 强精片对自然衰老大鼠睾丸组织形态学的影响(HE)

Fig. 3 Effect of Qiangjing tablets on morphological changes of testicular tissues in naturally aging rats (HE)

4 讨论

中医认为衰老核心病机为五脏虚损、阴阳失

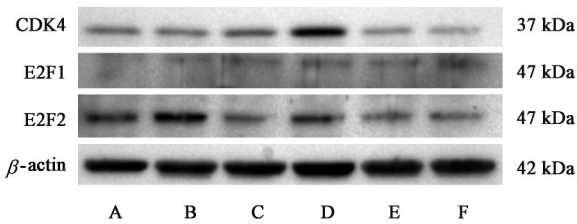
和、气血失调^[11]。《医学正传》云:“肾元盛则寿延,肾元衰则寿失”^[12],男子以肾为先天,故肾虚为男性衰

表3 强精片对自然衰老大鼠睾丸组织CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Qiangjing tablets on protein expression of CDK4, E2F1 and E2F2 in the testicular tissues of naturally aging rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CDK4/ β -actin	E2F1/ β -actin	E2F2/ β -actin
正常组		0.91±0.10	0.89±0.12	0.89±0.1
衰老模型组		0.78±0.08	0.94±0.07	0.91±0.13
丙酸睾酮组	5.21×10 ⁻³	0.53±0.05 ^{1,2)}	0.50±0.06 ^{1,2)}	1.08±0.16
强精片低剂量组	0.72	0.54±0.05 ^{1,2)}	0.52±0.05 ^{1,2)}	1.03±0.15
强精片中剂量组	1.44	1.25±0.14 ^{1,2,3)}	0.74±0.08 ^{1,2,3)}	1.04±0.14
强精片高剂量组	2.88	0.93±0.13 ³⁾	0.51±0.04 ^{1,2)}	0.98±0.14

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与衰老模型组比较²⁾P<0.05;与丙酸睾酮组比较³⁾P<0.05



注:A.青年组;B.自然衰老模型组;C.强精片高剂量组;D.强精片中剂量组;E.强精片低剂量组;F.丙酸睾酮组

图4 各组睾丸组织中CDK4、E2F1、E2F2蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoretic analysis of protein expression of CDK4, E2F1 and E2F2 in each group of testicular tissues

老之本。四川气候湿润阴冷、饮食多辛辣肥厚,易致外湿侵袭、内湿滋生,湿热阻滞气机酿生血瘀,形成“肾虚为本,血瘀湿热为标”的地域特色病机^[13]。基于此,川派男科常德贵教授团队化裁经典方剂五子衍宗丸,创制强精片,以“补肾活血、清热利湿”为法,经20余年临床验证疗效确切。方中人参、枸杞子、菟丝子补肾填精;当归、益母草活血化瘀;车前子利湿通淋;淫羊藿、仙茅温补肾阳,与枸杞子、菟丝子相伍,平补肝肾、阴中求阳,防温燥伤阴,诸药共奏“补中有通、补中有清”之功。四川为火神派发源地,重视阳气在抗衰老中的作用^[14],淫羊藿、仙茅契合火神派“补益真阳”的学术思想,与川派中医重视阳气、善用温补的特色一脉相承。车前子、益母草作为四川道地药材^[15-16],针对湿热病理产物,彰显“因地制宜”的川派用药理念。

现代医学认为,衰老分子机制主要与氧化应激、免疫调节、神经内分泌干预及衰老相关蛋白调控等有关^[17-18]。团队前期研究证实,强精片可改善睾丸组织氧化应激、调控衰老相关蛋白表达^[10]。现代药理学表明,人参皂苷、枸杞多糖可清除自由基,延缓组织衰老^[19-20],且人参皂苷能激活烟酰胺磷酸核糖转移酶-沉默信息调节因子1-端粒酶逆转录酶(NAMPT-SIRT1-TERT)、沉默信息调节因子3/叉头

框转录因子O3(SIRT3/FoxO3)信号轴,抑制活性氧生成与DNA损伤^[21-22]。车前子多糖通过增强抗氧化及羰基清除能力抗衰老^[23];仙茅苷与淫羊藿苷可激活下丘脑-垂体-性腺轴,维持衰老期性激素动态平衡^[24-25]。益母草碱抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)活性,阻断磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路磷酸化发挥抗炎作用^[26]。研究表明,菟丝子黄酮可保护LC,激活细胞外调节蛋白激酶/核因子E₂相关因子2/抗氧化反应元件(ERK/Nrf2/ARE)信号通路,促进LC增殖并抑制凋亡,减缓氧化损伤^[27-28]。此外,当归多糖成分在抗氧化应激、细胞凋亡及抗炎方面功效明确^[29]。综上,强精片复方成分协同增效,通过抗氧化、抗炎及组织保护功能,靶向调节睾丸衰老。

CDK4是调控G₁/S期转换的关键因子^[30],其活性降低可增加Rb蛋白去磷酸化,诱导细胞周期阻滞并促进衰老^[31]。CROZIER等^[32]发现,CDK4抑制剂下调CDK4/细胞周期蛋白D(Cyclin D)表达,引发细胞异常增殖及渗透压失衡;CDK4基因敲除小鼠表现出衰老相关表型^[33]。在内皮细胞中,CDK4过表达可逆转miR-24-3p的抑制作用,并激活Rb磷酸化延缓衰老进程^[34]。在衰老睾丸组织中,CDK4表达显著下调,且生精细胞凋亡加剧^[35]。研究表明,E2F转录因子同时调控细胞增殖与凋亡^[36-38],E2F1表达异常可导致精母细胞凋亡,诱使生精功能障碍^[39]。但E2F家族单基因缺陷并未引起大鼠睾丸结构损伤^[40-41],提示其家族成员间可能存在功能代偿效应。

在细胞实验中,模型组T水平较对照组略降低,但差异无统计学意义。推测与LH负反馈刺激性腺轴,激发LC代偿,维持基础T分泌能力有关,这与前期结果相一致^[8]。100 μ mol·L⁻¹ H₂O₂诱导急性衰老后,模型组CDK4与E2F1表达明显上升,可能与细胞及E2F家族的代偿调节相关。强精片含药血清干预

后,低、中剂量组激活CDK4,低剂量组更佳,且低、中、高剂量组均明显抑制E2F1及E2F2,以高剂量组明显,证明强精片通过CDK4-E2F信号轴呈剂量依赖性双向调节,抑制LC衰老。自然衰老动物实验中,模型组睾丸组织CDK4表达较青年组下降,E2F1及E2F2升高,但差异无统计学意义。可能与E2F1、E2F2蛋白对强精片的敏感性较其余E2F家族蛋白略低及CDK4/E2F信号通路处于代偿性波动状态有关。在强精片干预后,低剂量组CDK4表达明显下降,中、高剂量组CDK4激活,以中剂量组明显,且低、中、高剂量组均明显抑制E2F1表达。这与细胞实验结果一致,进一步验证强精片具有剂量依赖性双向调节趋势。见强精片通过CDK4/E2F信号通路调控LC和睾丸组织衰老机制见增强出版附加材料。

综合上述实验结果,认为蛋白表达差异可能与以下因素有关:①体外H₂O₂造模衰老,氧化应激急性触发,CDK4适应性上调以抵御损伤;而自然衰老过程中,增殖能力衰退,导致CDK4响应减弱。②细胞实验中低剂量激活CDK4,而动物实验需中剂量浓度激活,这可能与衰老方式不同、微环境复杂(如动物血睾屏障对药物渗透的限制)及剂量窗等有关。基于此,提出阶梯给药方案,即急性衰老期低剂量缓解代偿负荷,慢性衰老期中剂量协同治疗。③E2F2的表达存在体内外差异,细胞实验显著抑制,而动物实验趋于稳定,可能与体内微环境通过旁分泌作用保护E2F2有关。

综上,强精片基于四川地区“湿热夹瘀”的地理特征,以“补肾活血、清热利湿”为治疗原则,形成“补泻兼施、寒温并用”的组方特色,体现了川派中医因地制宜的学术思想。本次实验证实,强精片可通过靶向调节CDK4/E2F信号通路,改善LC及睾丸组织衰老,并呈现剂量依赖的双向调节效应。同时,由于CDK4、E2F1/2相关蛋白在急、慢性衰老阶段的差异表达,本研究提出“急性期低剂量干预、慢性期中剂量协同”的动态方案。既阐明“剂量窗口效应”在抗衰老治疗中的作用,也为CDK4/E2F交互调控提供了新视角,构建融合地域特色与现代机制研究的中医药创新策略。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 吴梅,宁港,李波男,等. 基于“天癸失于时序”论治男性迟发性性腺功能减退症[J]. 北京中医药大学学报,2024,47(11):1501-1505.
WU H, NING G, LI B N, et al. Discussion and treatment of late

onset hypogonadism in male based on "tian gui out of time sequence"[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(11): 1501-1505.

[2] 单意,陈少康,史振溢,等. 加味十宝汤对肾精亏虚型男性迟发性性腺功能减退症合并糖尿病患者血清性激素水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2025,31(1):227-233.
SHAN Y, CHEN S K, SHI Z F, et al. Effect of modified Shibaotang on serum sex hormone levels in patients with male late-onset hypogonadism of kidney essence deficiency syndrome complicated with diabetes mellitus[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(1):227-233.

[3] 胡瑞,吴梅,李波男,等. 基于网络药理学方法探讨佳蓉片治疗男性迟发性性腺功能减退症的可能机制[J]. 中华男科学杂志, 2022,28(10):915-925.
HU R, WU H, LI B N, et al. Potential mechanisms of Jiarong tablets in the treatment of late-onset hypogonadism in men: An exploration based on network pharmacology[J]. Natl J Androl, 2022,28(10):915-925.

[4] 苏亮,曹葵,朱健,等. 从男性迟发性性腺功能减退症探析男性“天癸”内涵[J]. 中国中医基础医学杂志,2022,28(11):1791-1793.
SU L, CAO G, ZHU J, et al. Analysis of "Tian Gui" connotation in male from male late-onset hypogonadism[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2022,28(10):915-925.

[5] SNYDER P. Testosterone treatment of late-onset hypogonadism-benefits and risks[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2022,23(6): 1151-1157.

[6] 曲晓伟,陈帝昂,李广森,等. 强精片对雷公藤所致不育症大鼠精液质量的影响及机制[J]. 山东医药,2017,57(20):28-31.
QU X W, CHEN D A, LI G S, et al. The effect and mechanism of Qiangjing tablets on semen quality in infertile rats caused by *Tripterygium wilfordii*[J]. Shandong Med J, 2017,57(20):28-31.

[7] 张太君. 增精颗粒防治大鼠睾丸生精障碍的实验研究[D]. 成都:成都中医药大学,2002.
ZHANG T J. Experimental study on the prevention and treatment of testicular spermatogenic disorders in rats with Zengjing granules [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2022.

[8] 严旭洪,陈帝昂,尤耀东,等. 强精片对初老雄性大鼠精子质量及雄激素生成、利用的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2024, 44(12):1482-1487.
YAN X H, CHEN D A, YOU Y D, et al. Effects of Qiangjing tablets on sperm quality, androgen production and utilization in pre-ageing male rats[J]. Chin J Integr Med, 2024,44(12):1482-1487.

[9] 贺小军. 基于PI3K/Akt/mTOR信号通路探讨强精片治疗代偿型迟发性性腺功能减退症的分子作用机制[D]. 成都:成都中医药大学,2025.
HE X J. To explore the molecular mechanism of Qiangjing tablets in the treatment of compensated late-onset hypogonadism based on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2025.

- [10] 严旭洪. 强精片对代偿型LOH模型大鼠及衰老Leydig细胞雄激素与ROS/FoxO4-p53信号的干预作用研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2022.
YAN X H. Study on the intervention effect of Qiangjing pill on androgen and ROS/FoxO4-p53 signal in compensated LOH model rats and senile Leydig cells [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [11] 石玉清, 刘雅洁, 贺晶, 等. 艾灸对衰老过程中下丘脑-垂体-性腺轴的调节作用研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(16): 2402-2406.
SHI Y Q, LIU Y J, HE J, et al. Regulatory effect of moxibustion on hypothalamic-pituitary-gonadal axis during aging [J]. World J Tradit Chin Med, 2023, 18(16): 2402-2406.
- [12] 朱敏敏, 王华, 曹正同, 等. 邵念方基于“命门论”防治老年衰弱经验[J]. 河南中医, 2023, 43(4): 531-534.
ZHU M M, WANG H, CAO Z T, et al. SHAO Nian-fang's experience of preventing and treating senile weakness based on "the theory of life gate" [J]. Henan Tradit Chin Med, 2023, 43(4): 531-534.
- [13] 蒋海南, 张怡. 基于老年体质特点及环境影响从脾虚湿热论治四川地区老年汗证[J]. 中国民间疗法, 2024, 32(5): 92-95.
JIANG H N, ZHANG Y. Based on the physical characteristics of the elderly and environmental influences, the treatment of sweat syndrome in the elderly in Sichuan region is based on the theory of spleen deficiency and damp-heat [J]. China's Naturopathy, 2024, 32(5): 92-95.
- [14] 邓澳林, 王连奉, 徐晓琴, 等. 基于火神派思想结合三因制宜学说的中医扶阳理论研究[J]. 中国民间疗法, 2024, 32(21): 11-14.
DENG A L, WANG L F, XU X Q, et al. Research on the theory of nourishing Yang in traditional Chinese medicine based on the thought of the fire god school and combined with the theory of adapting to the three causes [J]. China's Naturopathy, 2024, 32(21): 11-14.
- [15] 姚闽, 熊江红, 李超, 等. 车前子资源调查及外观品质评价研究[J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(7): 177-179.
YAO M, XIONG J H, LI C, et al. Investigation of *Plantago asiatica* resources and evaluation of appearance quality [J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med, 2018, 18(7): 177-179.
- [16] 彭成, 裴瑾, 谢晓芳, 等. 川产道地药材品质控制与产业化关键技术应用的研究思路与实践[J]. 中药与临床, 2022, 13(3): 1-6.
PENG C, PEI J, XIE X F, et al. Research ideas and practice on the application of key technologies for quality control and industrialization of genuine medicinal materials produced in Sichuan [J]. Pharm Clin Chin Mat Med, 2022, 13(3): 1-6.
- [17] 曾婷婷, 李学智. 衰老机制及针灸抗衰老机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1457-1459.
ZENF T T, LI X Z. Research progress on aging mechanisms and anti-aging mechanisms of acupuncture [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(6): 1457-1459.
- [18] 李洋, 胡光风, 陈可, 等. 中医药延缓细胞衰老研究进展[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(5): 251-255.
LI Y, HU G F, CHEN K, et al. Research progress of delaying cell senescence with traditional Chinese medicine [J]. Asia-Pac Tradit Med, 2023, 19(5): 251-255.
- [19] 李毛毛, 李洁华. 枸杞多糖抗衰老的研究进展[J]. 实用老年医学, 2024, 38(3): 223-227.
LI M M, LI J H. Research progress on anti-aging effects of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. Pract Geriatr, 2024, 38(3): 223-227.
- [20] 张亚楠, 张代碧. 人参活性成分防治卵巢早衰药理作用的研究进展[J]. 环球中医药, 2025, 18(3): 629-634.
ZHANG Y N, ZHANG D B. Research progress on the pharmacological effects of ginseng active ingredients in preventing and treating premature ovarian failure [J]. Glob Tradit Chin Med, 2025, 18(3): 629-634.
- [21] 夏慧, 余舒杰, 邹小娟, 等. 人参皂苷Rb₁通过Namt-Sirt1-Tert通路和抗氧化应激延缓人脐静脉内皮细胞的衰老[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 850-854.
XIA H, YU S J, ZOU X J, et al. Ginsenoside Rb₁ delays the senescence of human umbilical vein endothelial cells through the Nampt-Sirt1-Tert pathway and antioxidant stress [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 850-854.
- [22] 鄂明尧. 人参皂苷调控SIRT3/FoxO3通路延缓血管衰老的作用及机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2025.
E M Y. The role and mechanism of ginsenosides in regulating the SIRT3/FoxO3 pathway to alleviate vascular aging [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2025.
- [23] 刘秀娟, 欧芹, 朱贵明, 等. 车前子多糖对衰老模型大鼠脑氧化-非酶糖基化影响的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(4): 424-426.
LIU X J, OU Q, ZHU G M, et al. Experimental study on the effect of *Plantago asiatica* polysaccharides on brain oxidation-non-enzymatic glycosylation in aging model rats [J]. Chin J Gerontol, 2009, 29(4): 424-426.
- [24] 鞠成国, 李媛媛, 王巍, 等. 仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 101-107.
JU C G, LI Y Y, WANG W, et al. Analysis on mechanism of adenine-induced kidney-Yang deficiency rats treated with different processed products of *Curculiginis Rhizoma* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(16): 101-107.
- [25] 徐磊, 张培海, 徐子龙, 等. 基于下丘脑-垂体-性腺轴分析淫羊藿苷对男性不育症的调控[J]. 中国性科学, 2024, 33(8): 1-4.
XU L, ZHANG P H, XU Z L, et al. Analysis of the regulation of icariin on male infertility based on hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. Chin J Hum Sex, 2024, 33(8): 1-4.
- [26] 熊佳伟, 马睿琦, 于华鹏, 等. 益母草碱在炎症相关性疾病中作用的研究进展[J]. 复旦学报: 医学版, 2024, 51(4): 614-619.
XIONG J W, MA R Q, YU H P, et al. Research progress on the role of leonurine in inflammation-related diseases [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2024, 51(4): 614-619.
- [27] 李利娟. 菟丝子黄酮通过ERK/Nrf2-ARE信号通路缓解睾丸氧化损伤的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2023.
LI L J. The study of total flavonoids from Semen Cuscutae alleviating testicular oxidative damage through ERK/Nrf2-ARE

- signaling pathway[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2023.
- [28] 谢淑武, 曲立娟, 李国停, 等. 中药提取物治疗男性不育研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(10): 1080-1081.
- XIE S W, QU L J, LI G T, et al. Research progress on the treatment of male infertility with Chinese herbal extracts[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2016, 30(10): 1080-1081.
- [29] 王丽平, 彭雯. 当归多糖抗衰老的研究进展[J]. 实用老年医学, 2024, 38(3): 232-235.
- WANG L P, PENG W. Research progress on anti-aging effects of *Angelica sinensis* polysaccharides[J]. Pract Geriatr, 2024, 38(3): 232-235.
- [30] WANG H, YUAN S, ZHENG Q, et al. Dual inhibition of CDK4/6 and XPO1 induces senescence with acquired vulnerability to CRBN-based PROTAC drugs[J]. Gastroenterology, 2024, 166(6): 1130-1144.
- [31] RUAS M, GREGORY F, JONES R, et al. CDK4 and CDK6 delay senescence by kinase-dependent and p16INK4a-independent mechanisms[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(12): 4273-4282.
- [32] CROZIER L, FOY R, ADIB R, et al. CDK4/6 inhibitor-mediated cell overgrowth triggers osmotic and replication stress to promote senescence[J]. Mol Cell, 2023, 83(22): 4062-4077.
- [33] METTUS R V, RANE S G. Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice[J]. Oncogene, 2003, 22(52): 8413-8421.
- [34] MIN X, CAI M Y, SHAO T, et al. A circular intronic RNA ciPVT1 delays endothelial cell senescence by regulating the miR-24-3p/CDK4/pRb axis[J]. Aging Cell, 2022, 21(1): e13529.
- [35] PALMER N, TALIB S Z A, KALDIS P. Diverse roles for CDK-associated activity during spermatogenesis[J]. FEBS Lett, 2019, 593(20): 2925-2949.
- [36] ESPADA L, MEO-EVOLI N, SANCHO P, et al. ROS production is essential for the apoptotic function of E2F1 in pheochromocytoma and neuroblastoma cell lines[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51544.
- [37] TO B, ANDRECHEK E R. Transcription factor compensation during mammary gland development in E2F knockout mice[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0194937.
- [38] WOLFRAM J A, LINER A, RICHARDSON S L, et al. The role of E2F1 in the development of hypertrophic cardiomyopathy[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4(5): 521-525.
- [39] JA M, J T. Retinoblastoma-E2F transcription factor interplay is essential for testicular development and male fertility[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 903684.
- [40] TSAI S Y, OPAVSKY R, SHARMA N, et al. Mouse development with a single E2F activator[J]. Nature, 2008, 454(7208): 1137-1141.
- [41] EL-DARWISH K S, PARVINEN M, TOPPARI J. Differential expression of members of the E2F family of transcription factors in rodent testes[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4: 63.

[责任编辑 周冰冰]