

五子衍宗方通过调节 miR-let-7-Imp 轴对老龄大鼠精原干细胞增殖的影响

陈茜¹, 赵海霞¹, 马娜¹, 刘珍财¹, 袁丁², 张长城^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002; 2. 三峡大学仁和医院, 湖北宜昌 443001)

[摘要] **目的:**通过 miR-let-7-Imp 轴探讨五子衍宗方(WZ)对老龄大鼠精原干细胞增殖的作用及其机制。**方法:**将 40 只 18 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为老龄模型组, WZ 低、中、高剂量组, 每组 10 只, 另以 10 只 2 月龄大鼠作为青年组。WZ 低、中、高剂量组分别灌胃给药 0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹, 青年组、老龄模型组分别灌胃给予生理盐水, 每周停药 2 d, 持续给药 4 个月。末次给药后麻醉处死大鼠, 快速取出睾丸组织。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 miR-let-7, Imp mRNA 表达水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫荧光检测睾丸精原干细胞增殖相关信号通路磷酸化(p)-两面神激酶 2(JAK2)/JAK2, p-信号传导及转录激活因子 3(STAT3)/STAT3 蛋白的表达与定位, 免疫荧光检测精原干细胞数量及增殖相关蛋白增殖细胞核抗原(PCNA)的表达, 苏木素-伊红(HE)染色观察睾丸组织形态学变化。**结果:**Real-time PCR 结果显示, 与青年组比较, 老龄模型组 miR-let-7 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$), Imp mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$), 而给予 WZ 干预后, miR-let-7 mRNA 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), Imp mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$); Western blot 和免疫荧光结果显示, 精原干细胞增殖相关信号通路蛋白 p-JAK2, p-STAT3 表达降低($P < 0.01$), WZ 处理后, p-JAK2, p-STAT3 表达明显增多($P < 0.05$, $P < 0.01$); 免疫荧光结果显示, 与青年组比较, 老龄模型组中精原干细胞数量减少, PCNA 表达下降, WZ 处理后, 精原干细胞数量增多, PCNA 表达上调; HE 结果也显示, WZ 能够明显改善自然衰老所致的睾丸组织形态结构变化。**结论:**WZ 能够促进老龄大鼠精原干细胞的增殖, 其作用机制可能与调节睾丸内 miR-let-7-Imp 轴有关。

[关键词] 五子衍宗方; 精原干细胞; 衰老; miR-let-7-Imp

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0045-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190333

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.0943.012.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 17:15

Effect of Wuzi Yanzong Fang in Promoting Spermatogonial Stem Cells Proliferation in Aging Rats by Regulating miR-let-7-Imp Axis

CHEN Qian¹, ZHAO Hai-xia¹, MA Na¹, LIU Zhen-cai¹, YUAN Ding², ZHANG Chang-cheng^{1*}

(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Wuzi Yanzong Fang (WZ) on proliferation of spermatogonial stem cells in aging rats by regulating miR-let-7-Imp axis. **Method:** A total of 40 18-month-old male SD rats were randomly divided into aging model group, and low, middle and high-dose WZ groups, with 10 rats in each group. Ten 2-month old rats were used as young control group. Low, middle and high-dose WZ groups were given by gastric WZ 0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹ respectively. Young control group and aging model group were given normal saline for 4 months, which was suspended for 2 days every week. Rats were put to death after

[收稿日期] 20180706(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573931, 81503334, 81774316, 81373881)

[第一作者] 陈茜, 在读硕士, 从事中药药理研究, E-mail: chenqian2294955497@163.com

[通信作者] *张长城, 教授, 博士生导师, 从事中医药男性生殖不育的理论与临床研究, E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn

the final treatment with WZ, and then the testes were quickly removed from rats. The relative mRNA expression levels of miR-let-7 and Imp were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expressions and localization of p-JAK2/JAK2, phosphate (p)-signal transduction and transcriptional activators3 (STAT3) /STAT3 signaling pathway proteins were detected by Western blot and immunofluorescence. The numbers of spermatogonial stem cells and the expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were detected by immunofluorescence. The testicular tissue morphology was observed using htoxylin eosin (HE) staining. **Result:** Compared with young control group, the expression levels of miR-let-7 mRNA were significantly increased, while the expression levels of Imp mRNA were decreased in the aging model group ($P < 0.01$). Conversely, the expression levels of miR-let-7 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the mRNA expression levels of Imp mRNA were significantly increased after WZ treatment ($P < 0.05$). The results of Western blotting and immunofluorescence showed that the expression levels of p-JAK2, p-STAT3 in aging model group were decreased significantly ($P < 0.01$), while WZ significantly increased the expression levels of p-JAK2, p-STAT3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Immunofluorescence results showed that compared with young control group, the number of spermatogonial stem cells and PCNA expression decreased in aging model group. After WZ treatment, the number of spermatogonial stem cells was increased, whereas PCNA expression was up-regulated. HE showed that WZ significantly improved the testicular tissue structure of aging rats. **Conclusion:** WZ effectively promote the proliferation of spermatogonial stem cells by regulating miR-let-7-imp axis in testis.

[**Key words**] Wuzi Yanzong Fang; spermatogonial stem cells; aging; miR-let-7-imp

随着年龄的不断增长,男性睾丸的生精功能不断衰退,并伴随着生育能力下降与生殖缺陷^[1],而男性生精功能障碍是导致男性不育的主要原因,且多数是因精原干细胞功能受损所致^[2]。精原干细胞不断地自我更新与分化是保持睾丸内精子连续不断产生的基础,因此维持睾丸精原干细胞功能是保证雄性生殖功能的基本条件^[3]。研究显示,因年龄增长而导致精原干细胞增殖与分化平衡失调、从而导致生精障碍与不育^[4]。研究表明,miR-let-7 在调节精原干细胞功能方面发挥重要作用,衰老过程中 miR-let-7-Imp 轴变化进而导致干细胞内两面神激酶 2(JAK2)/信号转导及转录激活因子 3(STAT3)相关信号变化,是衰老导致雄性生殖干细胞自我更新能力下降与数量减少的重要原因^[5]。因此,研究防治因年龄增长而导致的精原干细胞功能变化的措施并阐明其作用机制,将为改善因衰老而致睾丸生殖功能障碍提供新的思路。

五子衍宗方最早记载于道教的《悬解录》中,全方由枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子 5 味中药组成,是补肾生精的经典方剂^[6-7]。现代药理学研究显示,五子衍宗方具有调节体内性激素水平与生殖功能,增强免疫功能、抗氧自由基损伤等药理作用^[8],临床常用于男性不育、肾虚衰老、性功能障碍等疾病。本课题组前期已经证实五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖功能衰退有明显的保护作用^[9],

且对环磷酰胺所致睾丸生殖细胞损伤疗效显著^[10],但五子衍宗方能否通过调节精原干细胞功能进而改善衰老所致睾丸生殖功能衰退有待进一步研究。因此,本实验以自然衰老大鼠为模型,进一步研究五子衍宗方对精原干细胞增殖功能的作用,并探讨其机制是否与调节 miR-let-7-Imp 轴有关。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,其中 2 月龄 10 只,18 月龄 40 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产合格证号 SCXK(京)2012-0001。实验动物饲养于温度(23 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 ± 5)%,12 h 阴暗交替的 SPF 级动物房中,自由饮水和摄食。本次实验研究动物实验部分获得三峡大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物 枸杞子(275 g,批号 15083002),菟丝子(275 g,批号 15061901),覆盆子(135 g,批号 15071702),车前子(68 g,批号 15063002),五味子(35 g,批号 15080702)均由宜昌市中医院提供,经三峡大学生物与制药学院汪璠植教授鉴定为正品。称取 5 味药材,按照传统方法煎取,充分浓缩,冷冻干燥得到五子衍宗方总提取物,提取率 38.07%,提取物用双蒸水配制。

1.3 试剂 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(大连宝生物科技有限公司);PCR 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司合成];RIPA 裂解液、磷酸

蛋白酶抑制剂(武汉谷歌生物有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);ECL 显影液(上海碧云天生物技术研究); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 66009-1-1g);JAK2, p-JAK2, STAT3 抗体(苏州睿瀛生物技术有限公司,批号分别为 RLT2429, RLP0155, RLT4443);p-STAT3 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 #9145);增殖细胞核抗原(PCNA,美国 Immuno Way 公司,批号 YM3031);SRY 相关高迁移率族转录因子 9(SOX9,美国 Millipore 公司,批号 AB5535);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠、山羊抗兔二抗(武汉科瑞有限公司,批号分别为 103069, 126526);荧光二抗驴抗鼠、驴抗兔(美国 Jackson Immuno Research 公司,批号分别为 127820, 127725);苏木素-伊红(HE)染色试剂(百奥生物有限公司,批号 G1004, G1002)。

1.4 仪器 StepOne Plus 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司), PowerPac200 型蛋白免疫印迹法(Western blot)电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), CT15RT 型高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司), A1R + 型共聚焦激光显微镜(日本 Nikon 公司), TYPE1500-458 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司), BioshineChemiQ4800 型化学发光凝胶成像系统(上海欧翔科学仪器有限公司), IX53 型显微镜(日本 Olympus 公司), Gene Genius 型凝胶成像系统(英国 Syngne 公司), LEICA EG 1150C 型超薄切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将 40 只 18 月龄 SD 雄性大鼠随机分为以下 4 组,分别为老龄模型组,五子衍宗方低、中、高剂量组(0.4, 0.8, 1.6 g·kg⁻¹),其中 0.4 g·kg⁻¹根据五子衍宗方临床用量及提取物的提取率换算得到),每组 10 只,另将 10 只 2 月龄大鼠为青年组。五子衍宗方各剂量组分别灌胃给予相应剂量五子衍宗方提取物,每周停药 2 d,连续给药 4 个月;同时青年组、老龄模型组灌胃给予相应体积的生理盐水,连续 4 个月。

2.2 Real-time PCR 检测大鼠睾丸组织 miR-let-7, Imp mRNA 的表达 称取冻存大鼠睾丸组织 50 ~ 100 mg,用试剂盒提取大鼠睾丸组织的总 RNA,电泳检测 RNA 的完整性。用核酸仪测定 RNA 的浓度,按逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。miR-let-7 以 U6 为内参,Imp 以 β -actin 为内参,经 PCR 反应扩

增目的基因。反应体系为 SYBER Green 5 μ L,无酶水 2.4 μ L,Dye 0.2 μ L,引物 0.4 μ L,cDNA 2 μ L;反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 35 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,75 $^{\circ}$ C 1 s;40 个循环;72 $^{\circ}$ C,10 min;溶解曲线从 56 $^{\circ}$ C 到 98 $^{\circ}$ C,每 0.3 $^{\circ}$ C 读取 1 次;引物序列见表 1;PCR 反应结束后读取 C_t 值,利用软件 Opticon Monitor 分析,计算 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 值。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

名称	序列	长度 /bp
β -actin	上游 5'-TGACCGAGCGTGGCTACAG-3'	131
	下游 5'-CAGGGAGGAAGAGGATGCCG-3'	
miR-let-7	上游 5'-GCCCGCTGAGCTAGTAGTTGTA-3'	167
	下游 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	
Imp	上游 5'-CGGAGACTTTGCGGATTGTTCC-3'	192
	下游 5'-CGCCAGCCTCTATGACGATG-3'	
U6	上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	94
	下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	

2.3 Western blot 检测睾丸组织 p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 蛋白的表达 称取睾丸组织 60 ~ 100 mg,加入磷酸盐缓冲液 1 mL,冰上剪碎洗净,12 000 r·min⁻¹离心 10 min 弃上清,加入适量的裂解液(RIPA 裂解液-PMSF-蛋白磷酸酶抑制剂 100:1:1)匀浆,12 000 r·min⁻¹离心 10 min 后取上清。按 BCA 法进行蛋白定量,加入 Loading buffer 煮沸灭活 10 min,再进行电泳和转膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗(p-JAK2 1:1 000, JAK2 1:3 000, p-STAT3 1:500, STAT3 1:3 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(HRP 标记山羊抗小鼠二抗 1:5 000 和 HRP 标记山羊抗兔二抗 1:3 000),室温孵育 1 h,ECL 化学发光凝胶成像显影。Image-Proplus 6.0 软件进行灰度分析处理。

2.4 免疫荧光检测睾丸组织中 p-JAK2, p-STAT3, PCNA, SOX9 的表达 取睾丸石蜡切片置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱烘烤 4 h,二甲苯与梯度乙醇脱蜡,柠檬酸修复液进行抗原修复,5% BSA 室温封闭 1 h,一抗(p-JAK2 1:100, p-STAT3 1:100, PCNA 1:400, SOX9 1:600),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,荧光二抗(1:500)室温避光孵育 1 h,滴加 DAPI 避光染色 10 min,使用抗荧光淬灭封片剂进行封片,共聚焦激光显微镜下观察采集图像。

2.5 HE 染色观察睾丸组织 大鼠麻醉处死后,迅速取出单侧睾丸,扎破两端白膜后 4% 多聚甲醛中

固定 24 h, 常规脱水后石蜡包埋, 切片, 按标准进行 HE 染色, 光镜下观察各组大鼠睾丸组织形态学变化。

2.6 统计学处理 采用 Graph Pad Prism 5 软件进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据差异的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对老龄大鼠睾丸组织中 miR-let-7, Imp mRNA 表达的影响 与青年组比较, 老龄模型组睾丸内 miR-let-7 mRNA 表达水平显著升高, Imp mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与老龄模型组比较, 给予五子衍宗方干预后, miR-let-7 mRNA 水平明显降低, Imp mRNA 水平明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 五子衍宗方对老龄大鼠睾丸组织中 miR-let-7, Imp mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of Wuzi Yangzong Fang on expression of miR-let-7 and Imp mRNA in testis of aged rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

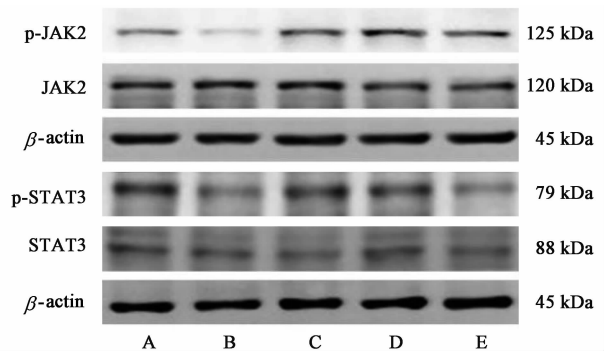
组别	剂量/g·kg ⁻¹	miR-let-7	Imp
青年	-	1.00	1.00
老龄模型	-	2.48 ± 0.25 ¹⁾	0.57 ± 0.07 ¹⁾
五子衍宗方	0.4	1.76 ± 0.25 ²⁾	0.69 ± 0.13 ²⁾
	0.8	1.74 ± 0.50 ²⁾	0.86 ± 0.08 ²⁾
	1.6	1.56 ± 0.37 ³⁾	0.92 ± 0.23 ³⁾

注: 与青年组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与老龄模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 对老龄大鼠睾丸组织中 p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平的影响 与青年组比较, 老龄模型组睾丸内 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达水平显著降低, 且 p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 值显著降低 ($P < 0.01$); 而与老龄模型组比较, 五子衍宗方低、中、高剂量组均能不同程度增加 p-JAK2, p-STAT3 的表达, 并且其比值也明显增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 1 与表 3。

3.3 对老龄大鼠精原干细胞增殖相关信号通路 p-JAK2, p-STAT3 表达的影响 活化状态的 p-JAK2 主要在胞浆表达, 而 p-STAT3 则在精原干细胞核表达。与青年组比较, 老龄模型组睾丸精原干细胞内 p-JAK2, p-STAT3 阳性灶点数表达明显降低; 而与老龄模型组比较, 五子衍宗方各剂量组均能不同程度增强 p-JAK2, p-STAT3 表达。见图 2, 3。

3.4 对老龄大鼠精原干细胞数量和增殖相关蛋白



A. 青年组; B. 老龄模型组; C. 五子衍宗方低剂量组; D. 五子衍宗方中剂量组; E. 五子衍宗方高剂量组 (图 2 ~ 5 同)

图 1 大鼠睾丸组织中 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of expression of p-JAK2 and p-STAT3 protein in testis of aged rats

表 3 五子衍宗方对老龄大鼠睾丸组织中 p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of Wuzi Yangzong Fang on expression of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 protein in testis of aged rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
青年	-	0.38 ± 0.03	1.08 ± 0.22
老龄模型	-	0.12 ± 0.04 ¹⁾	0.46 ± 0.09 ¹⁾
五子衍宗方	0.4	0.29 ± 0.03 ³⁾	0.94 ± 0.12 ³⁾
	0.8	0.39 ± 0.03 ³⁾	0.85 ± 0.06 ²⁾
	1.6	0.22 ± 0.04 ²⁾	0.66 ± 0.09

PCNA 表达的影响 与青年组比较, 老龄模型组中精原干细胞数量明显减少, PCNA 表达明显降低, 提示在增龄过程中, 精原细胞增殖减慢。五子衍宗方干预后, 精原干细胞数量增加, PCNA 表达显著提高。见图 4。

3.5 对老龄大鼠睾丸组织形态学的影响 青年组大鼠睾丸组织生精小管界膜完整, 基膜内可见排列整齐的各级生精细胞。而老龄模型组大鼠睾丸生精小管形态结构发生明显变化, 生精小管基膜部分增厚, 生精细胞层数减少, 细胞稀疏, 细胞间隙增大, 各级生精细胞脱落。五子衍宗方低、中、高剂量组大鼠睾丸生精小管的形态结构与老龄模型组大鼠比较有明显改善, 睾丸生精小管生精细胞层数增多, 精原细胞和精子细胞数目增多, 基膜趋于完整。见图 5。

4 讨论

micro RNA (miRNA) 是一种进化中高度保守的非编码小分子 RNA, 研究证实 miRNA 参与了细胞的增殖、分化及凋亡等过程, 对生物体发育起着重要调节作用^[11]。在目前已发现的 miRNA 中 miR-let-7

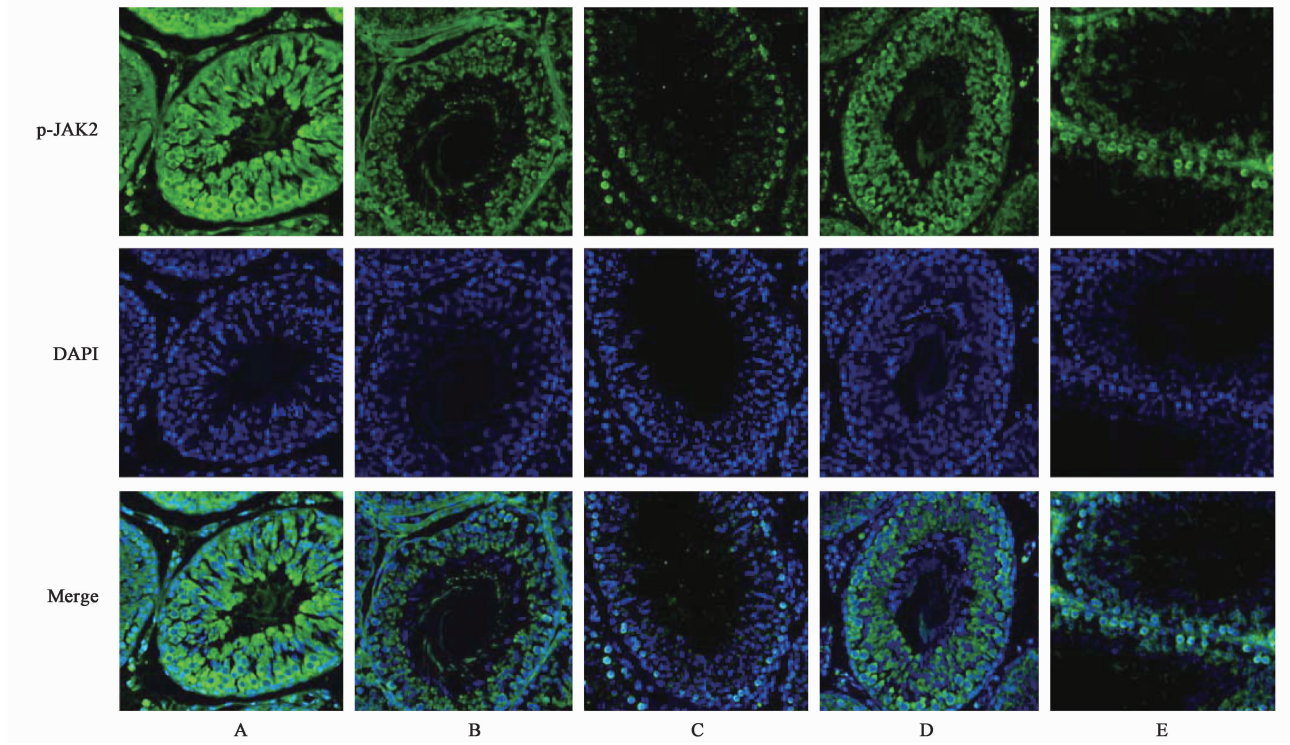


图 2 五子衍宗方对老龄大鼠睾丸组织中 p-JAK2 活性的影响(免疫荧光, ×400)

Fig.2 Effect of Wuzi Yangzong Fang on p-JAK2 activity in testis of aged rats(IF, ×400)

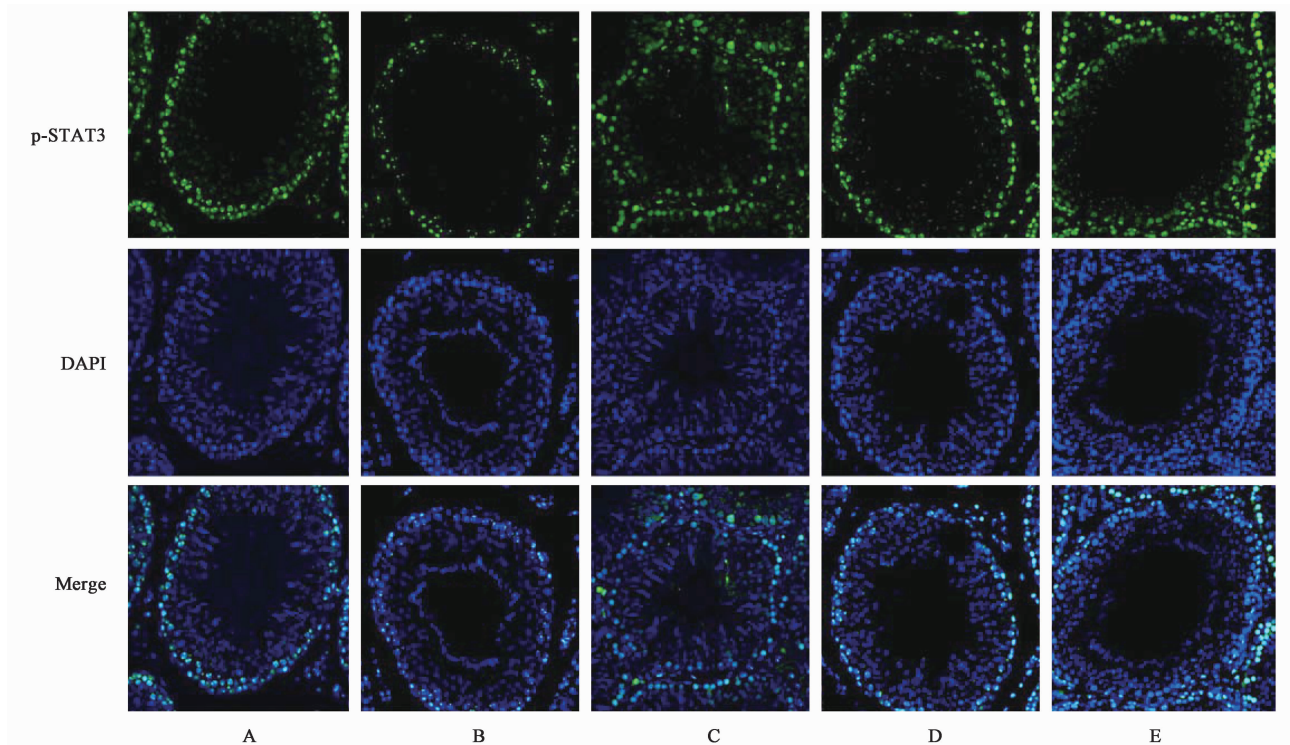


图 3 五子衍宗方对老龄大鼠睾丸组织中 p-SATA3 活性的影响(免疫荧光, ×400)

Fig.3 Effect of Wuzi Yangzong Fang on p-SATA3 activity in testis of aged rats(IF, ×400)

基因编码的小时空 RNA 被认为是 miRNA 的代表。miR-let-7 是最早发现于线虫并确认的 miRNA 之一,

其通过沉默维持干细胞样特征的相关基因进而诱导细胞分化,促进线虫的生长发育^[12]。Toledanol

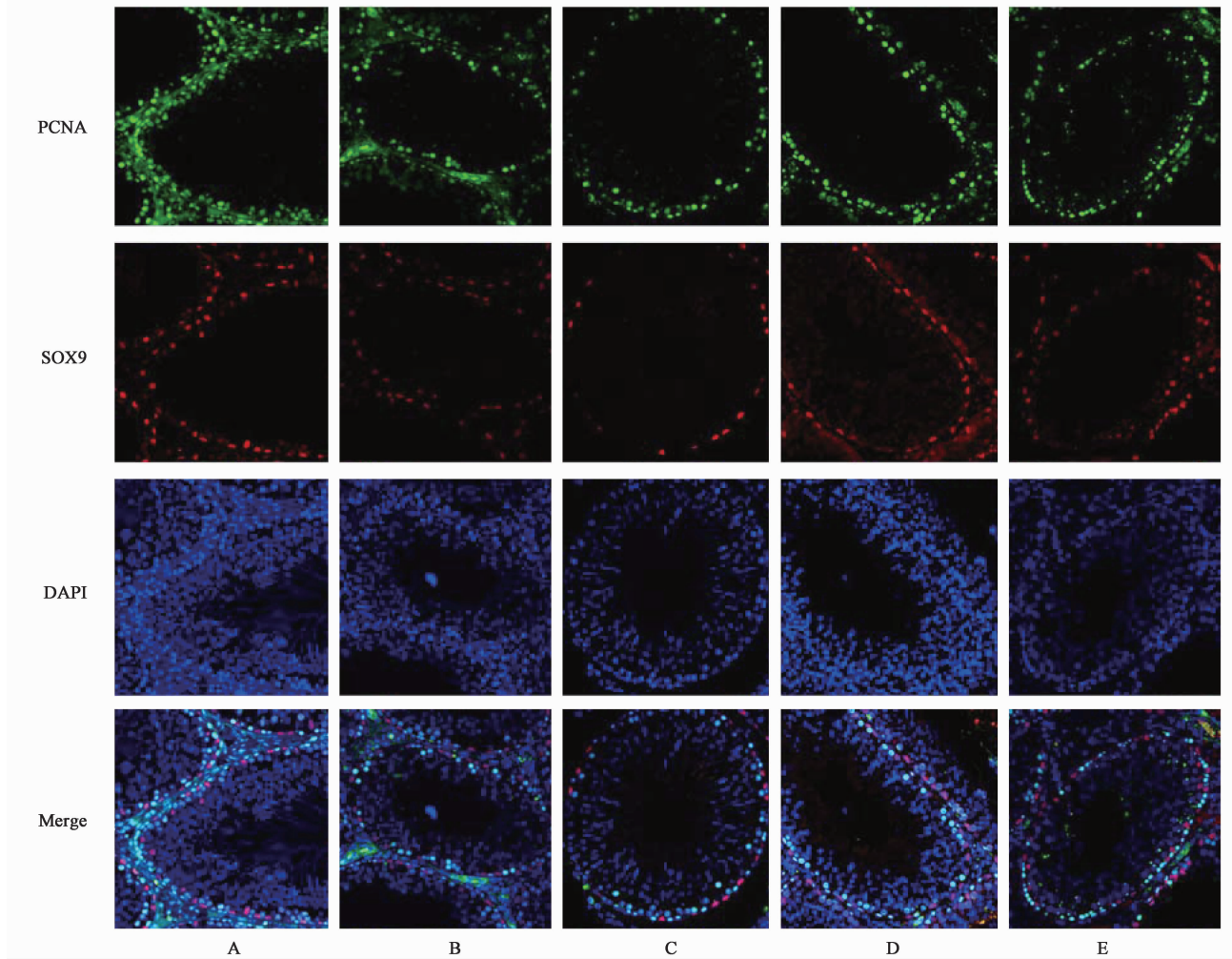


图 4 五子衍宗方对老龄大鼠睾丸精原干细胞数量和增殖的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of Wuzi Yangzong Fang on number and proliferation of testicular spermatogonial stem cells in aged rats(IF, ×400)

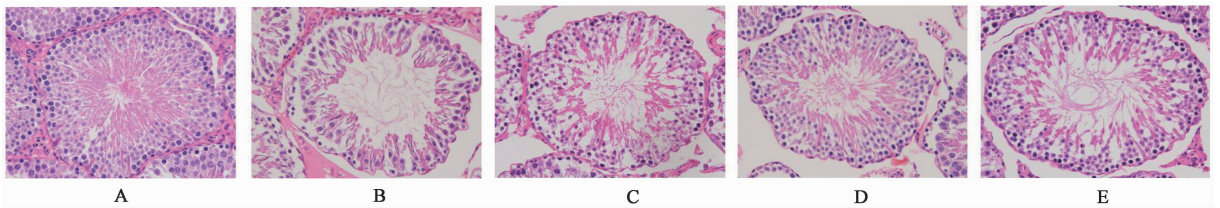


图 5 五子衍宗方对老龄大鼠睾丸组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 5 Effect of Wuzi Yangzong Fang on morphology of testis tissue in aged rats(HE, ×400)

等^[13]研究发现,miR-let-7-Imp 轴在衰老致睾丸生殖干细胞数量减少中起着重要作用。研究显示,miR-let-7在调节干细胞功能方面发挥重要作用,上调 miR-let-7 的表达具有促进干细胞分化与抑制其自增殖作用^[5,14-15],且 miR-let-7 表达增多与衰老导致的精原干细胞数量减少及睾丸生精功能障碍直接相关^[16-17]。在老龄果蝇睾丸内,miR-let-7 表达显著增加,同时伴随精原干细胞数量减少;进一步研究显示,miR-let-7 在衰老过程中对干细胞的调节与其

对 IGF-II 信使 RNA 结合蛋白 Imp 的作用相关。Imp 是一种具有调节 RNA 稳定性及其转录等功能的 RNA 结合蛋白,而 miR-let-7 具有促使 Imp 降解的功能^[18]。研究显示,在果蝇睾丸中,Upd 是保持干细胞的活性、调节干细胞增殖的关键分子,而 Imp 可上调果蝇睾丸内 Hub 细胞表达的 Upd 水平。进一步研究显示,Imp 针对 siRNA 对 Upd mRNA 的降解作用,从而抑制 siRNA 诱导的 Upd mRNA 的降解,提高睾丸内 Upd 表达水平,进而增强 Upd 对其下游

JAK/STAT 信号的激活水平,促进精原干细胞的增殖。笔者的研究也表明,在老龄大鼠睾丸组织组中 miR-let-7 mRNA 表达增加,Imp mRNA 下降,而五子衍宗方可降低 miR-let-7 mRNA 水平,升高 Imp mRNA 水平,提示五子衍宗方可能通过 miR-let-7-Imp 的调节,恢复精原干细胞功能。

随着年龄的增长,在衰老果蝇睾丸内 miR-let-7 表达增加,miR-let-7 靶向导致 Imp 的表达量减少,Upd 表达水平下降,进而导致精原干细胞内 JAK/STAT 信号减弱、干细胞自我更新能力下降,精原干细胞的数量也随之减少^[13]。JAK2/STAT3 信号通路是 JAK/STAT3 信号通路中最为重要的,能介导多种细胞因子的信号传导,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡及炎症等过程。某些细胞因子与炎症因子可使 JAK2 受体发生二聚化,从而磷酸化激活 JAK2,活化的 JAK2 会进一步诱导 STAT3 活化,被活化的 STAT3 形成二聚体并暴露其核定位信号,从而由胞浆转移到胞核,与其他转录调控因子协同调节靶基因的表达^[19]。研究表明,基因敲除和功能抑制实验表明 JAK/STAT 信号通路,特别是 STAT3 信号的维持,对于细胞生长、细胞增殖和转化起到重要影响^[20]。更有研究发现,JAK/STAT 信号通路对于果蝇及小鼠雄性生殖干细胞发育或维持是必不可少的^[21-22]。JAK/STAT 信号调控干细胞自我更新能力,在睾丸中,主要调控精原干细胞的数量。本实验采用自然衰老大鼠为模型,发现与老龄模型组比较,五子衍宗方能够显著提高自然衰老大鼠睾丸中 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达量,提示五子衍宗方改善精原干细胞的增殖可能与 JAK2 /STAT3 通路有关。

PCNA 在细胞内广泛参与 DNA 转录、合成、修复等,是典型的细胞周期相关核蛋白,是细胞增殖状态的理想标志物,其表达增强意味着细胞处于增殖期,是评价细胞增殖的可靠指标^[23]。在睾丸组织中,PCNA 主要在精原细胞和初级精母细胞中表达。研究显示,随着年龄增长,雄性个体睾丸内精原干细胞数量与功能均下降^[24]。本实验以 PCNA 为增殖指标,观察五子衍宗方对精原细胞增殖的影响,结果显示在老龄大鼠睾丸中 PCNA 阳性明显降低,而五子衍宗方中 PCNA 表达量显著升高,提示五子衍宗方可以改善衰老所致增殖能力的下降。

综上所述,五子衍宗方能够促进老龄大鼠睾丸精原干细胞的增殖,其机制可能与衰老导致睾丸内 miR-let-7-Imp 轴, JAK2 /STAT3 信号通路

变化有关。这为进一步研究五子衍宗方对老龄大鼠睾丸损伤保护作用的具体机制提供一定的实验基础,同时也为临床治疗中老年男性生殖功能障碍开辟新途径。

[参考文献]

[1] Zitzmann M. Effects of age on male fertility[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013, 27(4): 617-628.

[2] Matzuk M, Lamb D J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges[J]. Nature Med, 2008, 14(11):1197-1213.

[3] Oatley J M, Brinster R L. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, 24:263-286.

[4] ZHANG X S, Ebata K T, Robaire B, et al. Aging of male germ line stem cells in mice[J]. Biol Reprod, 2006, 74:119-124.

[5] Boyerinas B, Park S M, Hau A, et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1):19-36.

[6] 李婍,王学美. 五子衍宗方的临床运用及现代研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(4):63-67.

[7] 马娜,赵海霞,陈茜,等. 五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤和凋亡的保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(8):1675-1681.

[8] 曾庆琪,孙磊,聂超,等. 五子衍宗丸的药理学研究进展[J]. 中华中医药学刊,2014,32(8):1935-1937.

[9] 刘珍财,赵海霞,马娜,等. 基于 PI3K/Akt 通路观察五子衍宗方对老龄大鼠精原干细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(23):119-125.

[10] 黄威峰,张长城,刘静,等. 五子衍宗方对环磷酸腺苷成年雄性小鼠睾丸生殖细胞凋亡的保护作用[J]. 中药材,2016,39(5):1143-1147.

[11] 王虹滕,鸿琦,施珏平,等. let-7microRNA 调控动物器官发育的研究进展[J]. 生命科学,2011,23(4):364-368.

[12] Pasquinelli A E, Reinhart B J, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA[J]. Nature, 2000, 408(6808):86-89.

[13] Toledano H, D'Alterio C, Czech B, et al. The let-7-Imp axis regulates ageing of the *Drosophila testis* stem-cell niche[J]. Nature, 2012, 485(7400):605-610.

[14] Melton C, Judson R L, Billewicz R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells[J]. Nature, 2010, 463(7281):621-626.

- [15] Ramachandran R, Fausett B V, Goldman D. Ascl1a regulates muller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(11):1101-1107.
- [16] TONG M, Debra M, Ryan E, et al. Expression of Mirlet7 family MicroRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice[J]. *Biol Reprod*, 2011, 85:189-197.
- [17] Yoon H J, Mukesh K G, Ji Y S, et al. MicroRNA signature in testes-derived male germ-line stem cells [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(11):804-810.
- [18] Fabrizio J J, Hickey C A, Stabrawa C, et al. Imp (IGF-II mRNA-binding protein) is expressed during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Fly (Austin)*, 2008, 2(1):47-52.
- [19] Vainchenker W, Constantinescu S N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies[J]. *Oncogene*, 2013, 32(21):2601-2613.
- [20] Levy O, Ruvinov E, Reem T, et al. Highly efficient osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by eradication of STAT3 signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(11):1823-1830.
- [21] Oatley J M, Kaucher A V, Avarbock M R, et al. Regulation of mouse spermatogonial stem cell differentiation by STAT3 signaling [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(3):427-433.
- [22] Oatley J M, Brinster R L. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008, 24(1):263-286.
- [23] Abike F, Tapisiz O L, Zergeroglu S, et al. PCNA and Ki-67 in endometrial hyperplasias and evaluation of the potential of malignancy [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2011, 32(1):77-80.
- [24] Ryu B Y, Orwig K E, Oatley J M, et al. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal[J]. *Stem Cells*, 2006, 24:1505-1511.

[责任编辑 周冰冰]