

肾气丸对自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接功能损伤的保护作用及其机制研究

张艳¹, 张长城^{1,2}, 杨圆¹, 吴杰³, 袁丁¹, 赵海霞^{1,2}[1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学国家中医药管理局中药药理(肿瘤)科研三级实验室, 湖北 宜昌 443002; 3. 三峡大学分析测试中心, 湖北 宜昌 443002]

摘要: **目的** 研究肾气丸对衰老所致雄性大鼠睾丸支持细胞紧密连接功能损伤的保护作用及其可能的分子机制。**方法** 将 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组, 分别为青年对照组(2 月龄)、衰老模型组(17 月龄)及肾气丸低、高剂量组(0.1、0.4 g·kg⁻¹, 17 月龄), 每组 8 只, 分别给予普通饲料或含药饲料持续喂养 4 个月。HE 染色法观察睾丸组织形态变化并测量生精上皮厚度和生精小管直径; 透射电镜观察睾丸组织紧密连接超微结构; Western Blot 法检测睾丸组织中波形蛋白(Vimentin)、闭合蛋白(Occludin)、闭锁连接蛋白-1(Zonula occludens-1, ZO-1)和 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平; 双标免疫荧光法检测睾丸支持细胞中 Vimentin、 β -catenin、ZO-1 和磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(Phosphorylated p38 Mitogen-activated protein kinase, p-p38MAPK)的表达和定位。**结果** HE 结果显示, 肾气丸能明显改善自然衰老大鼠睾丸组织形态学变化, 提高生精上皮厚度($P < 0.05$)和生精小管直径($P < 0.05$, $P < 0.01$); 透射电镜结果显示, 肾气丸能明显改善自然衰老大鼠支持细胞紧密连接超微结构; Western Blot 结果显示, 肾气丸能明显上调自然衰老大鼠睾丸组织中 Vimentin、Occludin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); 免疫荧光结果显示, 肾气丸能明显上调衰老大鼠睾丸支持细胞 Vimentin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达水平, 下调支持细胞 p-p38MAPK 蛋白表达水平。**结论** 肾气丸可减轻自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接损伤, 其机制可能与下调支持细胞 p38MAPK 信号通路有关。

关键词: 肾气丸; 衰老; 睾丸; 支持细胞; 紧密连接; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0783-08

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.06.006

Protective Effects on Shenqi Pills Against Injury of Tight Junction Function of Sertoli Cells in the Testis of Aging Rats and Its Mechanism

ZHANG Yan¹, ZHANG Changcheng^{1,2}, YANG Yuan¹, WU Jie³, YUAN Ding¹, ZHAO Haixia^{1,2}(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002 Hubei, China; 2. Third Level Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology (tumor) Research, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002 Hubei, China; 3. Analysis and Testing Center of China Three Gorges University, Yichang 443002 Hubei, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects on Shenqi pills against injury of tight junction function of sertoli cells in the testis of aging rats and explore the possible mechanism. **Methods** The male SD rats were randomly divided into 4 groups, with 8 rats in each group: adult control group(2 months old), aging model group(17 months old), low and high dose of Shenqi pills-treated groups(0.1 g·kg⁻¹, 0.4 g·kg⁻¹, 17 months old). Rats in the adult control group and the aging model group were fed with normal diet for 4 months. Simultaneously, rats in Shenqi pills-treated groups were given medicated feed for 4 months. The morphological changes of testis were

收稿日期: 2020-10-06

作者简介: 张艳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理。Email: 745502028@qq.com。通信作者: 赵海霞, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药治疗男性生殖系统疾病相关的药理研究。Email: zhaohaixia.mm@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774316, 81873077)。

observed by HE staining, the thickness of seminiferous epithelium and the diameter of seminiferous tubules were detected. Tight junction ultrastructure of Sertoli cells changes were observed by transmission electron microscope. In addition, the expression levels of Vimentin, Occludin, Zonula occludens-1(ZO-1) and β -catenin in testis were detected by Western Blot. The expression and localization of Vimentin, ZO-1, β -catenin and phosphorylated p38 Mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) in testis were detected by double-labeling immunofluorescence.

Results HE staining results showed that *Shenqi* pills significantly improved the structure of testicular tissue of aging rats, increased the thickness of seminiferous epithelium ($P < 0.05$) and the diameter of seminiferous tubule ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Transmission electron microscopy results showed that *Shenqi* pills also improved the ultrastructure of testicular sertoli cells tight junction in aging rats. In addition, Western Blot results showed that *Shenqi* pills significantly increased the relative protein expression levels of Vimentin, Occludin, ZO-1 and β -catenin ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$) in testis. Moreover, immunofluorescence results showed that *Shenqi* pills remarkably upregulated the protein expression levels of Vimentin, ZO-1 and β -catenin in Sertoli cells and downregulated the protein expression of p-p38MAPK in sertoli cells of aging rats. **Conclusion** *Shenqi* pills can alleviate sertoli cell tight junction injury in aging rats, and the mechanism may be related to the down-regulation of p38MAPK signaling pathway in sertoli cells.

Keywords: *Shenqi* pills; aging; testis; sertoli cells; tight junction; rats

当今社会,人口老龄化问题受到越来越多的关注,如何延缓衰老成为了困扰世界的难题。研究^[1]显示,随着年龄的增长,男性睾丸生精功能逐渐减退,精子数量与质量均明显下降,同时伴随着生殖缺陷与男性不育症的发生率明显上升。因此,因育龄年龄增高而导致的睾丸生精障碍与男性不育已成为当前急需解决的生殖健康问题,但目前仍缺乏有效的防治措施。已知睾丸支持细胞是唯一与生精细胞直接接触的体细胞,支持细胞通过紧密连接形成血-睾屏障,为生精细胞的生长、发育、成熟提供了适宜的微环境^[2]。研究^[3-4]显示,衰老可导致支持细胞功能减退和紧密连接结构损伤,造成睾丸生精功能障碍。另有研究^[5]发现,紧密连接蛋白 Occludin 基因缺失的雄性小鼠与正常对照小鼠比较,生精小管严重萎缩,无法生育后代。因此,改善睾丸支持细胞紧密连接功能对防治衰老所致男性睾丸生精功能障碍至关重要。

肾气丸源自东汉著名医家张仲景所著的《金匱要略》,为古代传统的补肾壮阳药。临床上现多将肾气丸组方中的干地黄、桂枝分别改为熟地黄、肉桂。熟地黄由干地黄炮制而成;肉桂取自桂树皮,桂枝取自桂树嫩枝,改进后的方称桂附地黄丸,如此更显药效。现代药理研究^[6]发现,肾气丸可明显降低衰老大鼠睾丸组织生精细胞凋亡指数,发挥延缓性腺衰老的作用。本课题组前期研究^[7]显示,肾气丸可减

轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞凋亡,改善衰老所致生殖功能衰退。但肾气丸能否改善衰老过程中睾丸支持细胞紧密连接损伤,目前尚不明确。因此,本实验通过检测肾气丸(桂附地黄丸)对自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接功能的影响,探讨肾气丸对衰老大鼠睾丸生精功能障碍的保护作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠购于三峡大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(鄂)2017-0061,动物质量合格证号:42010200003508。饲养于三峡大学实验动物中心,实验单位使用许可证号:SCXK(鄂)2017-0012。饲养环境为室温(23 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 ± 5)%,12 h 明暗交替。其中 2 个月龄大鼠 8 只,17 个月龄大鼠 24 只,体质量分别为(200 ± 20)g 和(450 ± 20)g,自由摄食和饮水。

1.2 药物及试剂 肾气丸(桂附地黄丸浓缩丸),批号:140907,河南省宛西制药股份有限公司,国药准字:Z41021898; β -actin,货号:GB11001,武汉谷歌生物科技有限公司;闭锁连接蛋白-1(ZO-1),货号:21773-1-AP,美国 Proteintech 公司;波形蛋白(Vimentin),货号:ab92547,美国 Abcam 公司;SOX9,货号:AB5535,美国 EMD Millipore 公司; β -连环蛋白(β -catenin,货号:sc-5562)、闭合蛋白

(Occludin, 货号: sc-5563), 美国 Santa Cruz 公司; p-p38MAPK (货号: 530056), 成都正能生物(ZEN BIO)技术有限责任公司; 羊抗鼠和羊抗兔二抗及牛血清白蛋白(BSA), 武汉科瑞有限公司, 批号分别为: 125435、125510、KR0002; Alexa Fluor 488 驴抗兔 IgG(H+L)和 Alexa Fluor 594 驴抗兔 IgG(H+L)抗体, 美国 Jackson Immuno Research 公司, 批号分别为: 711-545-152、711-585-152; DAPI, 美国 Life Technologies 公司, 批号: D1306; BCA 蛋白定量试剂盒, 北京普利莱基因技术有限公司, 批号: P1511; BeyoECL Plus 超敏 ECL 化学发光试剂盒, 碧云天生物技术研究, 批号: P0018S。

1.3 仪器 TP 1020 全自动脱水机、EG1150 H 石蜡包埋机、H-7500 型透射式电子显微镜, 德国 Leica 公司; CT15RT 高速冷冻离心机, 上海天美生化仪器设备有限公司; BX53 显微镜, 日本 Olympus 公司; A1R+激光共聚焦显微镜, 日本 Nikon 公司; Ultracut-S 型超薄切片机, 奥地利莱卡公司; PowerPac 200 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; Bioshine ChemiQ4800 mini 化学发光凝胶成像显影仪, 上海欧翔科学仪器有限公司。

1.4 分组及给药 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只, 即青年对照组(2 个月龄)、自然衰老模型组(17 个月龄)、肾气丸低剂量组($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 17 个月龄)和肾气丸高剂量组($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 17 个月龄)。其中青年对照组和自然衰老模型组给予普通饲料喂养, 肾气丸各剂量组给予相应的含药饲料喂养, 自由饮水。肾气丸剂量根据药物说明书上成人每天推荐剂量和人与大鼠体表面积比值进行换算。持续饲养 4 个月后, 按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射 20%乌拉坦麻醉并处死大鼠, 迅速取出睾丸组织, 部分组织浸泡于 4%多聚甲醛, 用于病理检查; 部分组织迅速放于液氮中, 保存于 -80°C 冰箱。处死前 12 h 禁食不禁水。

1.5 HE 染色检测睾丸组织形态学变化 大鼠处死后迅速取出睾丸组织, 4%多聚甲醛溶液浸泡 24 h 后, 常规脱水、石蜡包埋、切片, HE 染色, 于光学显微镜下观察睾丸组织形态和结构变化。每张切片按不同倍数随机选取 5~6 个视野拍照取图。

1.6 透射电镜检测睾丸支持细胞紧密连接超微结构

大鼠睾丸组织经 4%多聚甲醛灌注固定 24 h, 用刀片将睾丸组织切成薄片状, 2.5%戊二醛和 1%锇酸固定液固定, 将组织进行梯度脱水, 环氧树脂包埋, 于超薄切片机上切片。经醋酸铀和枸橼酸铝的双重染

色后, 置于透射电镜下观察并取图, 分析睾丸支持细胞紧密连接超微结构变化。

1.7 Western Blot 法检测睾丸组织 Vimentin、Occludin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达 取 25~35 mg 睾丸组织, 加入含磷酸化蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 匀浆器匀浆, 于冰上裂解 1 h 后离心取上清。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 按 4:1 比例加入上样缓冲液后于 95°C 水浴 10 min 使蛋白变性。等量蛋白上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳并恒流转模, 5%牛奶封闭 1 h, 加入相应一抗后 4°C 摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加二抗室温孵育 1 h, 置于 ECL 显影液中于自动显影仪内显影。

1.8 双标免疫荧光法检测睾丸支持细胞 Vimentin、 β -catenin、ZO-1 和 p-p38MAPK 蛋白的表达和定位 取睾丸切片于 60°C 烘箱烤片至蜡熔, 二甲苯与梯度乙醇脱蜡, 柠檬酸修复液高压修复抗原 10 min, 5% BSA 封闭 1 h 后滴加 SOX9 一抗于 4°C 冰箱孵育过夜, 滴加红光二抗常温孵育 1 h 后再分别滴加 Vimentin、 β -catenin、ZO-1 和 p-p38MAPK 蛋白一抗于 4°C 冰箱再次孵育过夜, 滴加绿光二抗常温孵育 1 h。经 DAPI 染色、抗荧光淬灭剂封片后在激光共聚焦显微镜下随机观察 5~6 个视野, 拍照取图。

1.9 统计学处理方法 用 Image-Pro Plus 6.0 软件对 Western Blot 条带灰度扫描, 用 ImageJ 软件根据 HE 染色图片结果测量生精上皮厚度和生精小管直径长度。以 Graph Pad Prism 5.0 软件进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组均数满足正态分布及方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 否则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织形态学的影响

见图 1。HE 染色结果显示, 与青年对照组比较, 自然衰老模型组大鼠睾丸生精小管形态发生明显变化, 部分生精小管萎缩, 各级生精细胞有不同程度脱落, 生精层数减少, 基膜缺损。与自然衰老模型组比较, 肾气丸低、高剂量组睾丸组织生精小管形态结构明显改善, 生精细胞数目明显增加, 排列整齐紧密。

2.2 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸生精上皮厚度和生精小管直径的影响 见图 2。实验基于 HE 染色结果, 根据相关研究^[8]描述的统计学方法, 进一步检测了生精上皮厚度和生精小管直径。实验结果显示, 与青

年对照组比较,自然衰老模型组大鼠睾丸组织生精上皮厚度和生精小管直径明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);肾气丸干预后可明显增加自然衰老大鼠睾丸生精上皮厚度和生精小管直径($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接超微结构的影响

见图3。透射电镜结果显示,与青

年对照组比较,自然衰老模型组大鼠睾丸支持细胞间紧密连接缝隙增大,连接松散,紧密连接断裂,边界不清晰。与自然衰老模型组比较,肾气丸可缩小紧密连接间的缝隙,减少紧密连接的断裂,改善自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接超微结构。

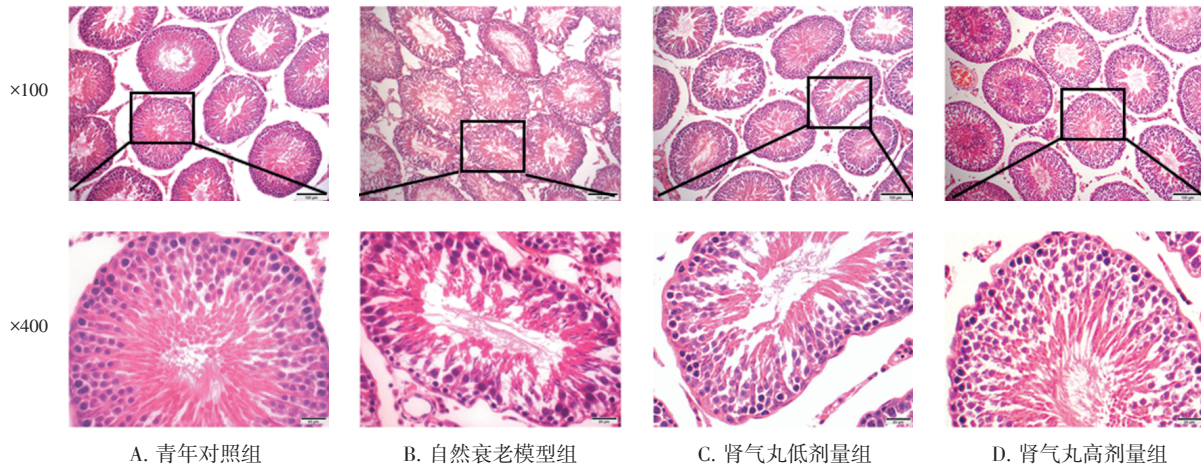
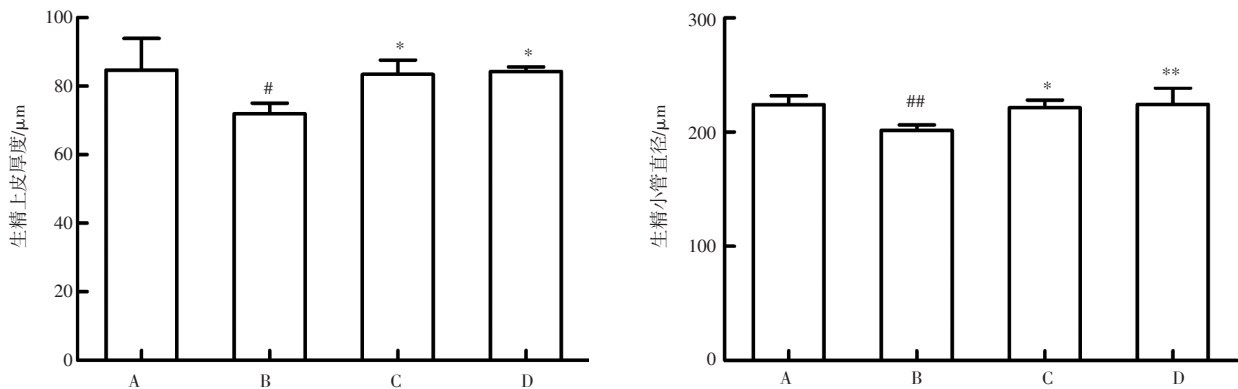


图1 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织形态学的影响(HE染色)

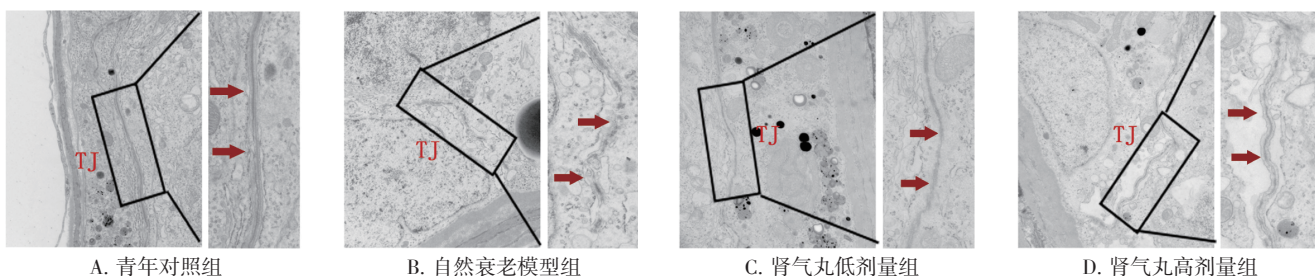
Figure 1 Effect of *Shenqi* pills on testis morphology in natural aging rats(HE staining)



注: A. 青年对照组; B. 自然衰老模型组; C. 肾气丸低剂量组; D. 肾气丸高剂量组。与青年对照组比较; $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与自然衰老模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

图2 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸生精上皮厚度和生精小管直径的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effect of *Shenqi* pills on the thickness of seminiferous epithelium and the diameter of seminiferous tubules in natural aging rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



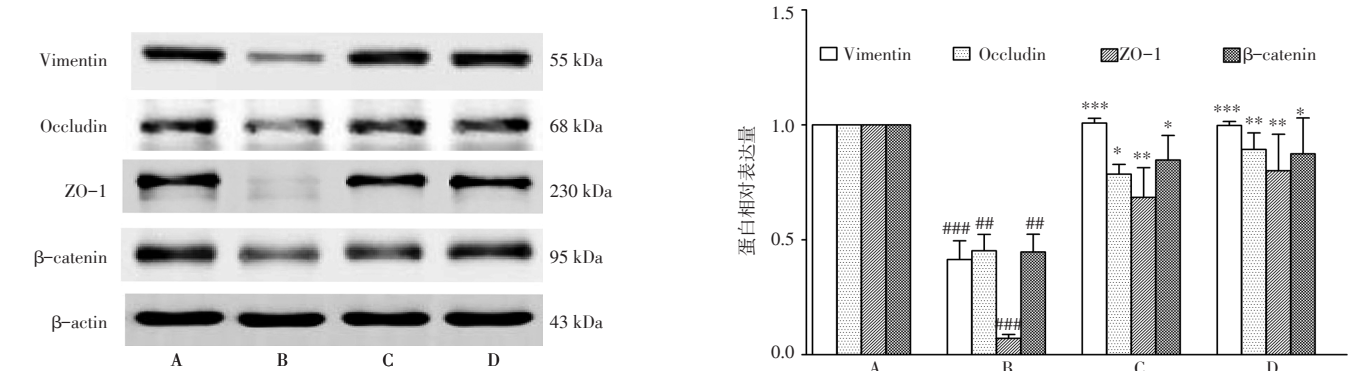
注: TJ 为紧密连接

图3 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接超微结构的影响($\times 15\ 000$)

Figure 3 Effect of *Shenqi* pills on ultrastructure of Sertoli cell tight junction in natural aging rats($\times 15\ 000$)

2.4 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 Vimentin、Occludin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达水平的影响 见图 4。Western Blot 实验结果显示，与青年对照组比较，自然衰老模型组大鼠睾丸组织中 Vimentin、Occludin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达水

平明显降低($P<0.01$, $P<0.001$)。而肾气丸干预后可明显提高自然衰老大鼠睾丸组织 Vimentin、Occludin、 β -catenin 和 ZO-1 蛋白的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。



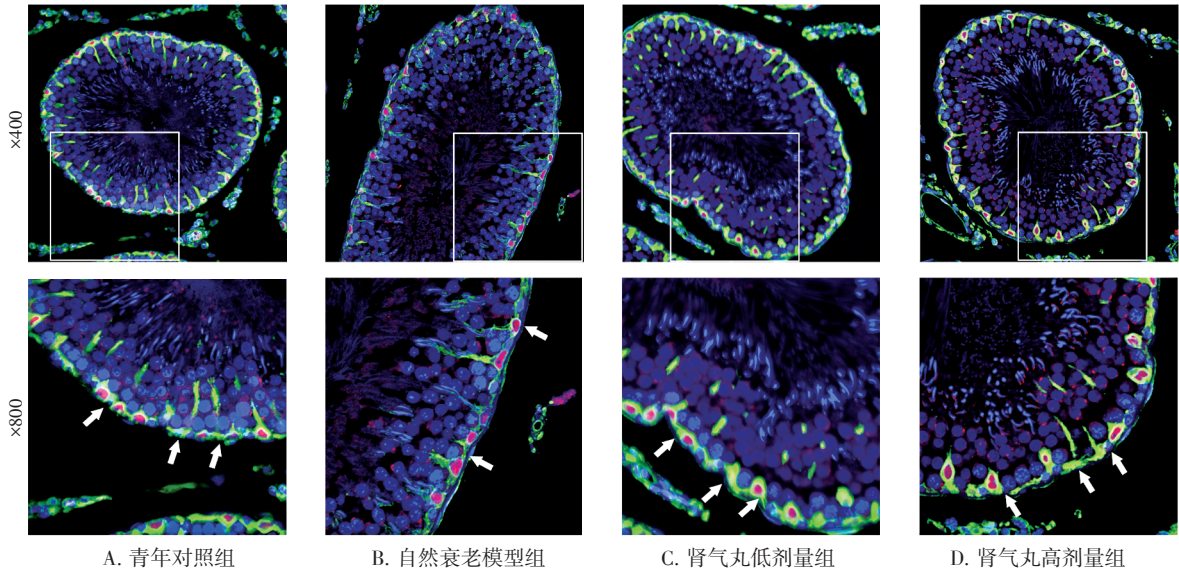
注：A. 青年对照组；B. 自然衰老模型组；C. 肾气丸低剂量组；D. 肾气丸高剂量组。与青年对照组比较，### $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与自然衰老模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$

图 4 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 Vimentin、Occludin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effect of Shenqi pills on protein expression of Vimentin, Occludin, ZO-1 and β -catenin in testicular tissue of natural aging rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.5 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸支持细胞 Vimentin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达水平和定位的影响 为进一步研究肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 Vimentin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达和定位的影响，本实验进行了支持细胞特异性标志物 SOX9 与 Vimentin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白的共定位检测。

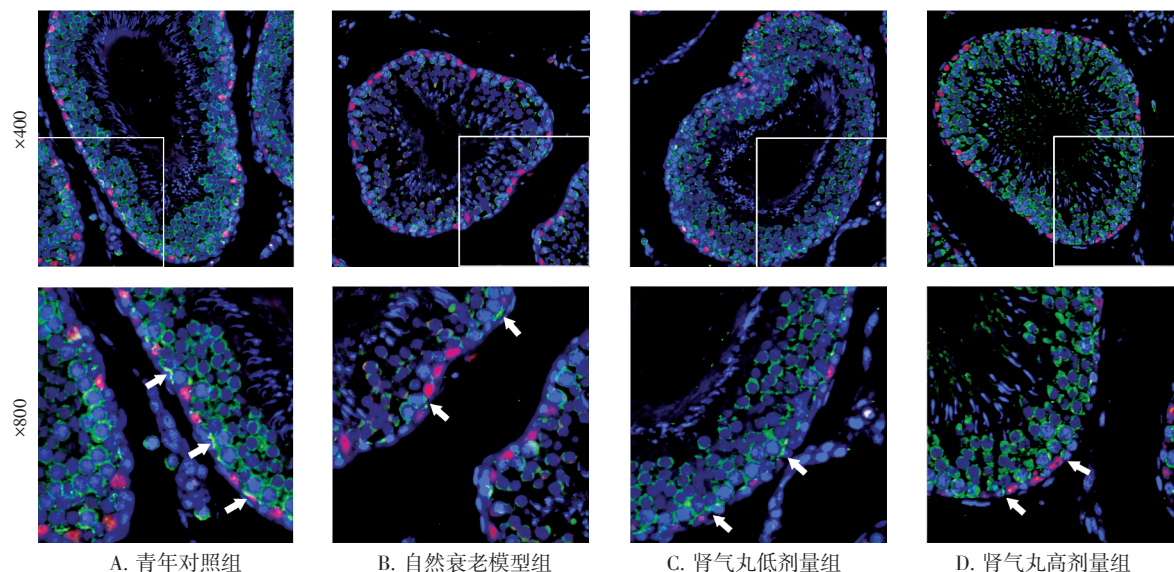
免疫荧光结果(见图 5~7)显示，Vimentin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白呈点状或线条状在支持细胞周围分布。与青年对照组大鼠比较，自然衰老模型组大鼠睾丸 Vimentin、ZO-1 和 β -catenin 蛋白表达量明显下降，而肾气丸可明显上调上述蛋白的表达。



注：红色代表 SOX9，为支持细胞标记物；绿色代表 Vimentin；蓝色代表 DAPI，标记细胞核

图 5 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 Vimentin 表达和定位的影响

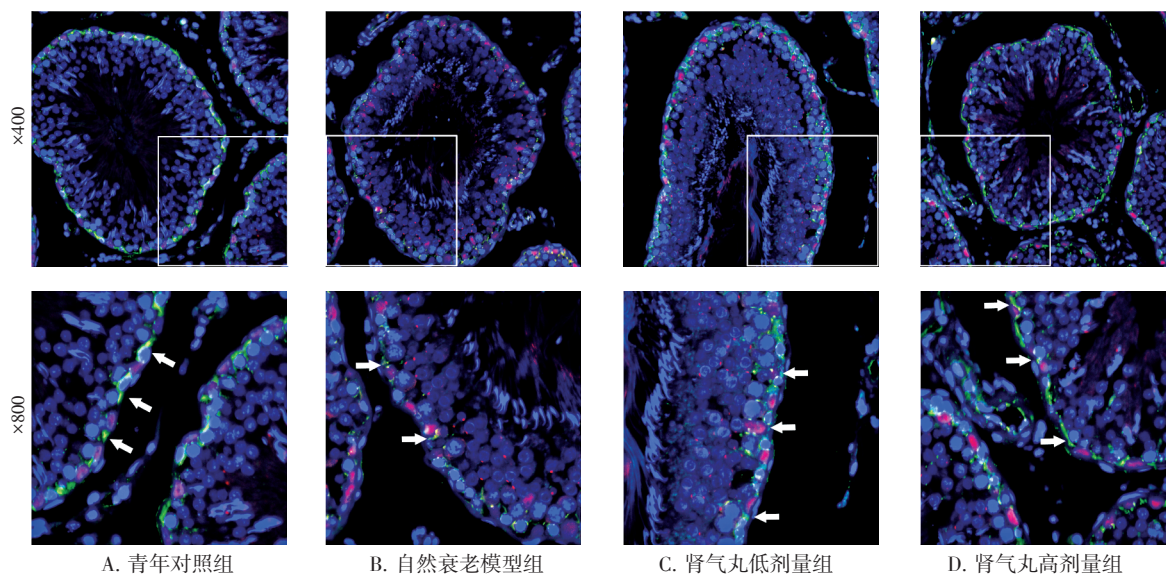
Figure 5 Effect of Shenqi pills on expression and localization of vimentin in testicular tissue of natural aging rats



注：红色代表 ZO-1，为支持细胞标记物；绿色代表 ZO-1；蓝色代表 DAPI，标记细胞核

图 6 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 ZO-1 表达和定位的影响

Figure 6 Effect of *Shenqi* pills on expression and localization of ZO-1 in testicular tissue of natural aging rats



注：红色代表 β-catenin，为支持细胞标记物；绿色代表 β-catenin；蓝色代表 DAPI，标记细胞核

图 7 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 β-catenin 表达和定位的影响

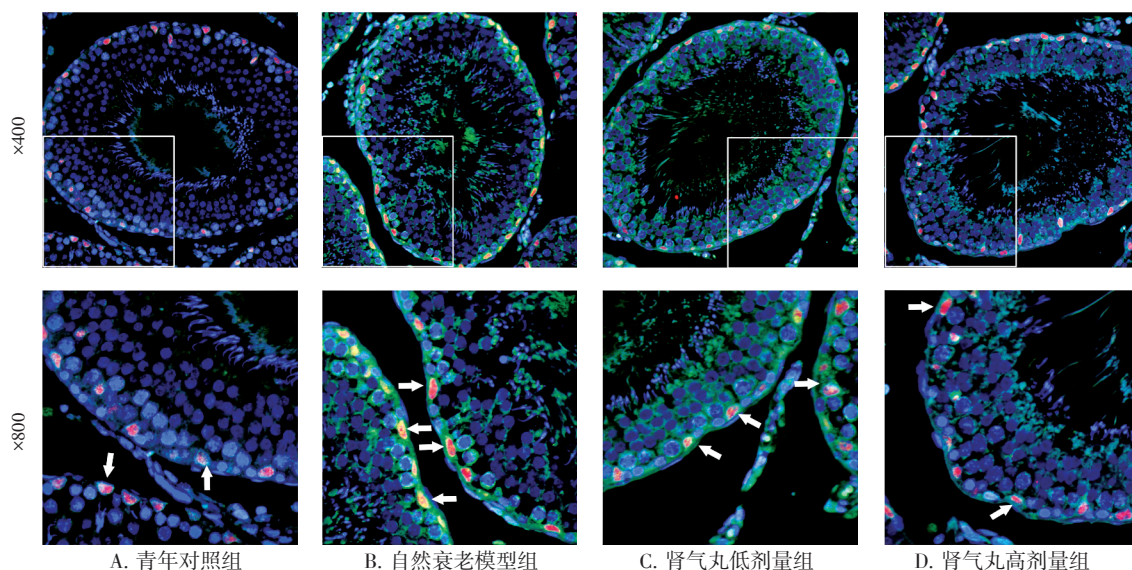
Figure 7 Effect of *Shenqi* pills on expression and localization of β-catenin in testicular tissue of natural aging rats

2.6 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸支持细胞 p-p38 MAPK 蛋白表达水平和定位的影响 为了进一步探究肾气丸改善自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接损伤的机制，本实验采用免疫荧光法观察了肾气丸对自然衰老大鼠支持细胞 p-p38MAPK 蛋白表达和定位的影响，并将 p-p38MAPK 蛋白与支持细胞特异性标志物 SOX9 共定位，结果见图 8。p-p38MAPK 蛋白与支持细胞呈现共定位状态，与青年对照组比较，自然衰老模型组大鼠支持细胞 p-p38MAPK 蛋白表达

增加，而肾气丸可下调衰老大鼠支持细胞 p-p38MAPK 蛋白表达。

3 讨论

研究^[1]发现，随着年龄增加，男性睾丸组织形态和生殖功能呈现退行性变化。本实验以自然衰老大鼠为模型，发现肾气丸能明显改善衰老所致的生精小管形态结构改变，增加生精细胞层数和数目，增加生精上皮厚度和生精小管直径。但肾气丸的改善



注：红色代表 SOX9，为支持细胞标记物；绿色代表 p-p38MAPK；蓝色代表 DAPI，标记细胞核

图 8 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸组织 p-p38MAPK 蛋白表达和定位的影响

Figure 8 Effect of *Shenqi* pills on expression and localization of p-p38MAPK in testicular tissue of natural aging rats

作用并未呈现明显的剂量依赖性，后续可对肾气丸的干预剂量进行进一步的探究。

支持细胞作为生精小管内各级生精细胞的保姆细胞，对各级生精细胞的发育成熟起着重要的支持和营养作用^[9]。另有研究^[10]发现，支持细胞功能受损与年龄增长所致的睾丸生殖功能退化直接相关。支持细胞与支持细胞间通过紧密连接形成血睾屏障的重要组成部分，在给生精细胞提供营养和支撑的同时，于曲细精管内形成特定的免疫豁免区，为精子发生提供了合适的微环境。而支持细胞紧密连接功能异常可使生精细胞在生精小管内的移行受限从而成为少精子症、弱精子症等生殖功能障碍的重要诱因^[11]。因此改善支持细胞紧密连接功能或许是调节自然衰老所致睾丸生精功能障碍的有效途径。

睾丸支持细胞紧密连接的构成有多种蛋白家族的参与，其中，闭锁蛋白(Occludins)、紧密连接蛋白(Claudins)和连接黏附分子(junctional adhesion molecules, JAMs)3 大家族是构成紧密连接的主要基本成分。而闭锁连接蛋白-1(ZO-1)可直接与 Occludin 连接形成连接复合物，在细胞周边区紧密连接的固定中起着至关重要的作用^[12]。另有研究^[13-14]显示，波形蛋白(Vimentin)环绕支持细胞核周，起着“锚定”支持细胞的作用，可直接或间接参与对细胞连接、跨膜转运和血睾屏障的调节。在瘦素诱导小鼠生殖功能障碍模型中，Occludin 和 ZO-1 的蛋白表达水平明显降低，血睾屏障完整性遭到破坏，导致生精细胞凋亡增加，精子数量减少、存活率降低^[15]。本课题

组近期研究^[16]进一步发现，大鼠增龄过程中睾丸组织内紧密连接蛋白 Occludin 和血睾屏障特异性标志蛋白 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平均明显下调，生精功能受损。本实验进一步发现，肾气丸能明显改善衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接超微结构，且高剂量肾气丸的改善作用更为明显。肾气丸能明显提高衰老大鼠睾丸组织 Occludin、ZO-1 和 β -catenin 的蛋白表达水平并呈现剂量依赖趋势。提示肾气丸对衰老所致的睾丸支持细胞紧密连接功能具有一定的改善作用，但其具体调节机制有待进一步探索。然而，肾气丸虽能明显提高自然衰老大鼠睾丸组织 Vimentin 的表达水平却无明显的剂量依赖趋势，甚至与青年对照组的 Vimentin 表达持平或稍高，推测肾气丸可能通过其它途径影响了 Vimentin 的表达。

p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)是 MAPKs 家族中的一员，p38MAPK 信号通路参与了对细胞黏附^[17]和精子迁移^[18]的调节。另有研究^[19-20]发现，p38MAPK 通过磷酸化将细胞外信号转移至细胞内，与其靶基因 MMP-9 启动子结合最终作用于 Occludin 导致支持细胞紧密连接损伤。在噻乙醇诱导的支持细胞紧密连接损伤模型中，p-p38MAPK 的蛋白表达水平明显上调，支持细胞 ZO-1 和 Occludin 的蛋白表达水平明显降低^[21]。而中药方剂脱敏煎可通过调节 p38MAPK 信号途径影响睾丸支持细胞 Occludin 的表达^[22]。因此，本实验通过免疫荧光检测了 p-p38MAPK 与支持细胞标记物 SOX9 的蛋白表达水平和共定位。结果显示，与青年对照组比较，自然衰老模型组大

鼠睾丸 p-p38MAPK 明显上升且与支持细胞核共染, 而肾气丸可明显降低自然衰老大鼠睾丸 p-p38MAPK 表达水平。提示肾气丸可能通过 p38MAPK 信号通路参与了对自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接的调节。

综上所述, 肾气丸可减轻自然衰老大鼠睾丸支持细胞紧密连接损伤, 改善衰老所致的生殖功能减退, 其机制可能与下调 p38MAPK 信号通路有关。本实验从改善睾丸支持细胞紧密连接的角度, 为进一步研究肾气丸对自然衰老大鼠睾丸损伤保护作用的具体调节机制, 提供了一定的实验基础, 同时也为肾气丸临床治疗衰老相关男性生殖功能疾病提供了新思路。

参考文献:

- [1] SHARMA R, AGARWAL A, ROHRA V K, et al. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13(1): 35.
- [2] KATO T, MIZUNO K, NISHIO H, et al. Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model[J]. *Andrology*, 2020, 8(5): 1398-1408.
- [3] ANDERSON R A. Sertoli cell function in the ageing male[J]. *Clinical endocrinology*, 2000, 53(2): 139-140.
- [4] SANTIAGO J, SILVA J V, ALVES M G, et al. Testicular aging: an overview of ultrastructural, cellular, and molecular alterations[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2019, 74(6): 860-871.
- [5] SAITOU M, FURUSE M, SASAKI H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands[J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12): 4131-4142.
- [6] 吴正平. 肾气丸对衰老大鼠睾丸抗氧化能力和生精细胞凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(4): 994-995.
- [7] 韩泽宇, 王芳, 王超, 等. 肾气丸对自然衰老大鼠睾丸生殖功能衰退的保护作用及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 27(24): 2933-2938.
- [8] MATTA A P L F, LEITE J P V, GOMES M L M, et al. Deleterious effects of Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen hydroalcoholic extract on the seminiferous epithelium of adult Balb/c mice[J]. *International journal of experimental pathology*, 2020, 101(5): 183-191.
- [9] QIU L, ZHANG X, ZHANG X, et al. Sertoli cell is a potential target for perfluorooctane sulfonate-induced reproductive dysfunction in male mice[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 135(1): 229-240.
- [10] ZHAO H X, YOU X, CHEN Q, et al. Icaritin improves age-related testicular dysfunction by alleviating sertoli cell injury via upregulation of the ERalpha/Nrf2-signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 677.
- [11] AYDIN S, BILLUR D, KIZIL S, et al. Evaluation of blood-testis barrier integrity in terms of adhesion molecules in nonobstructive azoospermia[J]. *Andrologia*, 2020, 52(7): e13636.
- [12] FINK C, WEIGEL R, HEMBES T, et al. Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(12): 1019-1027.
- [13] WANG R, YEH S, CHEN L, et al. Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes[J]. *Endocrinology (Philadelphia)*, 2006, 147(12): 5624-5633.
- [14] NIEMINEN M, HENTTINEN T, MERINEN M, et al. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration[J]. *Nature cell biology*, 2006, 8(2): 156-162.
- [15] WANG X T, ZHANG X K, HU L, et al. Exogenous leptin affects sperm parameters and impairs blood testis barrier integrity in adult male mice[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 11-55.
- [16] 尤旭, 赵海霞, 马琼艳, 等. 增龄对大鼠睾丸自噬水平和血睾屏障完整性的影响[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(1): 64-69.
- [17] ZHU M, SUN W J, WANG Y L, et al. P38 participates in spermatogenesis and acrosome reaction prior to fertilization in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Gene*, 2015, 559(2): 103-111.
- [18] LU Y, LUO B, LI J, et al. Perfluorooctanoic acid disrupts the blood-testis barrier and activates the TNF α /p38MAPK signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *Arch toxicol*, 2015, 90(4): 971-983.
- [19] QIU L, QIAN Y, LIU Z, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts blood-testis barrier by down-regulating junction proteins via p38MAPK/ATF2/MMP9 signaling pathway[J]. *Toxicology*, 2016, 373: 1-12.
- [20] LI X F, ZHANG X J, ZHANG C, et al. Ulinastatin protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin proteins in mice[J]. *Experimental Neurology*, 2018, 302: 68-74.
- [21] WU D, HUANG C J, JIAO X F, et al. Olaquinox disrupts tight junction integrity and cytoskeleton architecture in mouse Sertoli cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88630-88644.
- [22] 翁碧霞, 姜江涛, 周俊, 等. 脱敏煎通过TGF- β 1介导的p38MAPK信号途径对大鼠睾丸支持细胞紧密连接的调节作用[J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(7): 634-639.

(编辑: 修春)