



河北大学  
HEBEI UNIVERSITY

密 级:

分 类 号:

学校代码: 10075

学 号: 20161903

# 硕士学位论文

何首乌饮抑制生精细胞凋亡的

Cytc/Apaf-1/Caspase9/Caspase3

通路作用机制

学位申请人: 单博颖

指 导 教 师: 牛嗣云 教授

学 位 类 别: 医学硕士

学 科 专 业: 药理学

院 系 名 称: 医学院

答 辩 日 期: 二〇一九年六月



**Classified Index:**

**CODE: 10075**

**U.D.C:**

**NO: 20161903**

# **Dissertation for the Degree of Master**

**Research on the mechanism of  
Cytc/Apaf-1/Caspase9/Caspase3  
pathway in inhibiting apoptosis of  
spermatogenic cells by Heshouwuyin**

**Candidate: Shan Bo ying**

**Supervisor: Prof. Niu Siyun**

**Academic Degree Applied for: Master of Science**

**Specialty: Pharmacology**

**University: Hebei University**

**Date of Oral Examination: June, 2019**

# 河北大学

## 学位论文独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得河北大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

作者签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 学位论文使用授权声明

本人完全了解河北大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构递交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

本学位论文属于

1、保密 ，在\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日解密后适用本授权声明。

2、不保密 。

（请在以上相应方格内打“√”）

作者签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

导师签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 保护知识产权声明

本人为申请河北大学学位所提交的题目为（何首乌饮抑制生精细胞凋亡的 Cytc/Apaf-1/Caspase9/Caspase3 通路作用机制）的学位论文，是我在导师（牛嗣云教授）指导下取得的研究成果，研究工作及取得的研究成果是在河北大学所提供的研究经费及导师的研究经费资助下完成的。本人完全了解并严格遵守中华人民共和国为保护知识产权所制定的各项法律、行政法规以及河北大学的相关规定。

本人声明如下：本论文的成果归河北大学所有，未经征得指导教师和河北大学的书面同意和授权，本人保证不以任何形式公开和传播科研成果和科研工作内容。如果违反本声明，本人愿意承担相应法律责任。

声明人： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

作者签名： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

导师签名： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日



## 摘要

目的：探讨何首乌饮延缓生精细胞凋亡的 Cytc/Apaf-1/Caspase9/Caspase3 通路作用机制。

方法：

1. 运用组合酶法以及差异贴壁法分离、纯化培养细胞，采用苏丹 IV 染色法鉴定支持细胞，通过检测  $\alpha_6$ -integrin 和  $\beta_1$ -integrin 鉴定精原干细胞，运用 HE 染色法和碱性磷酸酶染色法对生精细胞进行鉴定。
2. 运用自由基氧化损伤方法建立生精细胞衰老模型，检测 SA- $\beta$ -gal 活性来鉴定生精细胞衰老模型是否成功建立，采用流式技术检测各组生精细胞的凋亡情况。
3. 运用免疫荧光技术检测 Cy3 表达，筛选 siRNA 最佳转染时间。运用 Western blot 技术和 RT-qPCR 技术检测 3 段不同序列 siRNA 干扰后生精细胞中 Apaf-1 表达水平，从中筛选最佳干扰序列。依据实验目的分为正常对照组、衰老组、NC-siRNA 转染组、何首乌饮组、Apaf-1-siRNA 干扰组、共孵育组（何首乌饮+Apaf-1-siRNA）。
4. 运用 Western blot 技术、免疫荧光技术、RT-qPCR 技术分别检测线粒体信号传导通路关键基因 Cytc、Caspase9、Caspase3 的表达。
5. 检测各实验组生精细胞的线粒体膜电位。

结果：

1. 苏丹 IV 染色结果显示支持细胞纯度达到 90%。
2. 衰老组 SA- $\beta$ -gal 活性高于正常组，何首乌饮干预后现象逆转，表明生精细胞衰老模型成功建立。生精细胞凋亡检测结果与其一致。
3. Apaf-1-siRNA 筛选

Western blot 技术和 RT-qPCR 检测结果显示 siRNA3 干扰组 Apaf-1 mRNA 和蛋白表达量低于其余干扰组 ( $P < 0.05$ )，因此确认 siRNA3 为最佳干扰序列。

4. 何首乌饮对 Cytc 、Caspase9、Caspase3 调控作用

各组细胞 Cyt-c 表达水平：

Western blot 检测蛋白表达水平：衰老组蛋白表达高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )，何首乌饮组和共孵育组蛋白表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组、Apaf-1-siRNA

干扰组与衰老组比较均没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，何首乌饮组和共孵育组蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与共孵育组相比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，其表达趋势与免疫荧光技术检测趋势一致。

RT-qPCR 技术检测 mRNA 表达水平：衰老组 mRNA 表达高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组和共孵育组 mRNA 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组、Apaf-1-siRNA 干扰组与衰老组相比较均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，何首乌饮组和共孵育组表达降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与共孵育组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

#### 各组细胞 Caspase9、Caspase3 表达水平

Western blot 检测蛋白表达水平：衰老组 Caspase9、Caspase3 蛋白表达高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组 Caspase9、Caspase3 蛋白表达无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。何首乌饮组，Apaf-1-siRNA 干扰组及共孵育组 Caspase9、Caspase3 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，共孵育组 Caspase9、Caspase3 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )，何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组 Caspase9、Caspase3 蛋白表达无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，免疫荧光技术检测所得结果与其一致。

RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平：衰老组 Caspase9、Caspase3 mRNA 表达高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组 Caspase9、Caspase3 表达水平比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。何首乌饮组，Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组 Caspase9、Caspase3 mRNA 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，共孵育组 Caspase9、Caspase3 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组 Caspase9、Caspase3 mRNA 表达量无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

#### 5. 线粒体膜电位检测结果

与正常对照组比较，衰老组线粒体膜电位降低 ( $P < 0.05$ )。与衰老组比较，何首乌饮组和共孵育组膜电位升高 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组、Apaf-1-siRNA 干扰组与衰老组比较均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，共孵育组和何首乌饮组线粒体膜电位上调 ( $P < 0.05$ )。

结论：何首乌饮可通过 Cytc/Apaf-1/Caspase9/Caspase3 途径抑制生精细胞凋亡。

**关键词** 凋亡 何首乌饮 生精细胞 Apaf-1

## Abstract

### Objection:

To investigate the mechanism of Cytc/Apaf-1/Caspase9/Caspase3 pathway in inhibiting apoptosis of spermatogenic cells by Heshouwuyin.

### Method:

1. The cultured cells were separated by combinatorial enzymatic methods and differential adherence methods. Sertoli cells were identified by Sudan IV staining. Spermatogonial stem cells were identified by detection of  $\alpha_6$ -integrin and  $\beta_1$ -integrin. Spermatogenic cells were identified by alkaline phosphatase staining and HE staining.

2. The aging model of spermatogenic cells was established by the method of free radical oxidative damage and was identified by  $\beta$ -galactosidase staining. Flow cytometry was used to detect apoptosis of spermatogenic cells.

3. To screen an optimal siRNA transfection time, we use immunofluorescence technique to detect Cy3 expression. In order to screen the dominant interference sequence, Western blot and RT-qPCR were used to detect the expression level of Apaf-1 in spermatogenic cells among three different siRNA interferences. According to the purpose of the experiment, Spermatogenic cells are mainly divided into NCG , AG, NC-siRNA (Normal control siRNA group), SWYG (Heshouwuyin group), Apaf-1-siRNA group, and Apaf-1-siRNA + SWYG (Apaf-1-siRNA + Heshouwuyin group).

4. The expression of mitochondrial apoptosis pathway genes Cytc, Caspase9 and Caspase3 were detected by immunofluorescence technique, Western blot and RT-qPCR.

5. The changes of spermatogenic cells mitochondrial membrane potential were detected in each group.

### Results:

1. The result of Sudan IV staining showed that the purity of the Sertoli cells was 90%.
2. The activity of SA- $\beta$ -gal in aging group was higher than that in the normal control group, and the phenomenon was reversed after the intervention of Heshouwuyin. It indicates

that the spermatogenic cells aging model was successfully established. The trend of spermatogenic cell apoptosis detection is consistent with it.

### 3. Apaf-1-siRNA screening

After detecting by Western blot and RT-qPCR, it proves that the expression levels of Apaf-1 mRNA and protein in the siRNA3 interference group were lower than those in other interference groups ( $P < 0.05$ ). So it was confirmed that siRNA3 is the optimal sequence.

### 4. The regulation effect of Heshouwuyin on Cytc、Caspase9、Caspase3

#### The expression level of Cytc in each group

Detecting protein expression levels by Western blot, and the conclusions were as follows: The protein expression level of Cytc in AG was higher than that in NCG ( $P < 0.05$ ). The Cytc protein expression levels in SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG were lower than that in AG ( $P < 0.05$ ). The Cytc protein expression levels was no difference between NC-siRNA, Apaf-1-siRNA group and AG ( $P > 0.05$ ). Compared with the Apaf-1-siRNA group, the Cytc protein expression levels of the SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG were decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG ( $P > 0.05$ ) in Cytc protein expression level, and the expression trend was consistent with the immunofluorescence.

Detecting the mRNA expression levels by RT-qPCR, and the conclusions were as follows: The mRNA expression level of Cytc in AG was higher than that in NCG ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of Cytc in SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG were lower than that in AG ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of Cytc was no significant difference between NC-siRNA, Apaf-1-siRNA group and AG ( $P > 0.05$ ). Compared with the Apaf-1-siRNA group, the mRNA expression levels of Cytc of the SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG were decreased ( $P < 0.05$ ). There was no difference between SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG ( $P > 0.05$ ) in Cytc mRNA expression ( $P > 0.05$ ).

#### The expression level of Caspase9 and Caspase3 in each group

The protein expression levels of Caspase9 and Caspase3 in AG were higher than that in NCG ( $P < 0.05$ ). The Caspase9 and Caspase3 protein expression levels were no difference

## Abstract

---

between NC-siRNA and AG ( $P > 0.05$ ). The Caspase9 and Caspase3 protein expression levels in SWYG, Apaf-1-siRNA group and Apaf-1-siRNA+SWYG were lower than that in AG ( $P < 0.05$ ). Compared with the Apaf-1-siRNA group, the Caspase9 and Caspase3 protein expression levels of Apaf-1-siRNA+SWYG were decreased ( $P < 0.05$ ). There was no difference between SWYG and Apaf-1-siRNA group in Caspase9 protein expression, so did Caspase3 ( $P > 0.05$ ). The expression trend was consistent with the immunofluorescence.

Detecting the mRNA expression by RT-qPCR, and the conclusions were as follows: The mRNA expression levels of Caspase9, Caspase3 in AG were higher than that in NCG ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between NC-siRNA and AG ( $P > 0.05$ ) in Caspase9, Caspase3 mRNA expression levels ( $P > 0.05$ ). The Caspase9 and Caspase3 mRNA expression levels in SWYG, Apaf-1-siRNA group and Apaf-1-siRNA+SWYG were lower than that in AG ( $P < 0.05$ ). Compared with the Apaf-1-siRNA group, the Caspase9 and Caspase3 mRNA expression levels of Apaf-1-siRNA+SWYG were decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between SWYG and Apaf-1-siRNA group in Caspase9 and Caspase3 mRNA expression levels ( $P > 0.05$ ).

### 5. Mitochondrial membrane potential detection results

The mitochondrial membrane potential in AG was lower than that in NCG ( $P < 0.05$ ). The mitochondrial membrane potential in SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG were higher than that in AG ( $P < 0.05$ ). The mitochondrial membrane potential was no difference between NC-siRNA, Apaf-1-siRNA group and AG ( $P > 0.05$ ). Compared with the Apaf-1-siRNA group, the mitochondrial membrane potential of the SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG were decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between SWYG and Apaf-1-siRNA+SWYG in mitochondrial membrane potential ( $P > 0.05$ ).

### Conclusion:

Heshouwuyin can inhibit the apoptosis of spermatogenic cells through the Cytc /Apaf-1/Caspase9/Caspase3 pathway.

**Keywords** Apoptosis Heshouwuyin Spermatogenic cells Apaf-1

## 英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
AG	Aging group	衰老组
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1	凋亡蛋白酶激活因子 1
Apaf-1-siRNA	Apaf-1-siRNA group	Apaf-1-siRNA 干扰组
Apaf-1-siRNA +SWYG	Apaf-1-siRNA + Heshouwuyin group	共孵育组
Cytc	Cytochrome c	细胞色素 c
Caspase9	Cysteinyl aspartate specific proteinas 9	半胱氨酸蛋白酶 9
Caspase3	Cysteinyl aspartate specific proteinas 3	半胱氨酸蛋白酶 3
D-hanks	CMF-HBSS	平衡盐溶液
MMP	Mitochondrial membrance potential	线粒体膜电位
NCG	Normal control group	正常对照组
NC-siRNA	Normal control siRNA group	NC-siRNA 转染组
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PI	Propidiumiodile	碘化丙啶
PBS	Phosphate buffered saLine	磷酸盐缓冲液
qRT-PCR	Real-time PCR	实时荧光定量 PCR
SA-β-gal	senescence-associated β-galactosidase	β-半乳糖苷酶
SWYG	Heshouwuyin group	何首乌饮组

## 目 录

<b>第一章 绪 论.....</b>	<b>1</b>
1.1 研究问题 .....	1
1.2 研究目的与意义 .....	1
1.3 国内外研究现状 .....	2
1.3.1 基因调控生精细胞凋亡 .....	2
1.3.2 激素调节生精细胞凋亡 .....	5
1.4 研究思路与方法.....	6
1.5 主要研究内容 .....	6
1.6 研究创新点 .....	7
<b>第二章 实验研究.....</b>	<b>8</b>
2.1 实验材料 .....	8
2.1.1 实验动物 .....	8
2.1.2 药物制备 .....	8
2.1.3 主要试剂 .....	8
2.1.4 主要仪器 .....	9
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 含药血清的制备 .....	10
2.2.2 细胞的分离与培养 .....	10
2.2.3 细胞的鉴定 .....	11
2.2.4 细胞衰老模型的建立及鉴定 .....	12
2.2.5 Apaf-1-siRNA 及 Apaf-1 引物的合成与转染 .....	13
2.2.6 细胞分组 .....	14
2.2.7 实时荧光定量 PCR .....	15
2.2.8 Western Blot .....	17
2.2.9 流式细胞仪检测凋亡 .....	18
2.2.10 免疫荧光技术 .....	19

2.2.11 检测线粒体膜电位 .....	19
2.2.12 统计分析 .....	20
<b>第三章 实验结果 .....</b>	<b>21</b>
3.1 细胞鉴定结果 .....	21
3.2 生精细胞衰老模型的建立 .....	21
3.2.1 细胞衰老模型 SA- $\beta$ -gal 染色结果 .....	22
3.2.2 生精细胞凋亡检测结果 .....	22
3.3 Apaf-1 最佳干扰序列和最适作用时间的确定 .....	24
3.3.1 筛选 Apaf-1-siRNA 转染生精细胞时间 .....	24
3.3.2 筛选 Apaf-1 干扰序列 .....	25
3.4 何首乌饮对生精细胞 Cytc、Casase9、Caspase3 表达的影响 .....	28
3.4.1 各组细胞 Cyt-c 的表达水平 .....	28
3.4.2 各组细胞 Caspase9 的表达水平 .....	33
3.4.3 各组细胞 Caspase3 的表达水平 .....	38
3.5 检测生精细胞 MMP 的变化情况 .....	43
<b>第四章 小 结 .....</b>	<b>46</b>
4.1 讨论 .....	46
4.2 结论 .....	48
<b>参考文献 .....</b>	<b>49</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>58</b>
<b>攻读硕士期间取得的学术成果 .....</b>	<b>59</b>

## 第一章 绪 论

### 1.1 研究问题

细胞凋亡是细胞选择性缺失的遗传控制过程<sup>[1]</sup>，与个体生长、发育及衰老密切相关。在睾丸细胞的分化以及精子的成熟、存活中，细胞凋亡发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。中药的特点是滋养生命，最近几十年中，中药复方由于在临床方面疗效显著，受到人们广泛关注<sup>[3-4]</sup>。中药复方何首乌饮是中国古代名医刘河间经典临床验方何首乌丸加味制成。前期研究结果表明，何首乌饮显著提高衰老大鼠血清睾酮含量，对睾丸组织细胞衰老通路 p53/pRb 相关蛋白具有调控作用<sup>[5]</sup>。何首乌饮使 Leydig 细胞中睾酮合成酶活性增强，促进睾酮分泌，改善衰老大鼠精子质量，并且疗效明显好于何首乌丸<sup>[6]</sup>。何首乌饮能够下调自然衰老大鼠睾丸细胞凋亡率，促进细胞增殖，这证实何首乌饮具有抑制衰老大鼠生精细胞凋亡的作用，但其具体机制尚不明确<sup>[7]</sup>。何首乌饮抑制生精细胞凋亡可能与线粒体途径相关<sup>[8-9]</sup>，为了进一步明确何首乌饮在线粒体凋亡通路中作用机制，我们以凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 为靶标，研究何首乌饮抑制生精细胞凋亡的 Cytc/Apaf-1/Caspase 9/Caspase3 通路作用机制。

### 1.2 研究目的与意义

众所周知，细胞凋亡在男性不育等相关疾病中起重要作用。在精子发生过程中，任何一个步骤的缺陷都可能导致男性生殖功能异常如精子活力下降、精子 DNA 断裂、睾丸扭转、精索静脉曲张和免疫性不育<sup>[10]</sup>。这一过程受到质量控制系统的严格监控，而凋亡是睾丸中最常见的质量控制。

近期研究表明已经开发出由多蛋白复合物作为信号传导装置，通过控制和介导信号传导途径进而对细胞实施调节<sup>[11-13]</sup>。凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1) 是凋亡复合体的主要成分，是线粒体内源性凋亡途径的关键要素。本研究以 Apaf-1 为研究靶点，特异性敲低 Apaf-1 在生精细胞的表达，分析何首乌饮对生精细胞线粒体凋亡信号途径中 Apaf-1 上游基因细胞色素 C (Cytc)、Apaf-1 下游基因 Caspase9、Caspase3 表达的影响，目的是研究何首乌饮是否通过 Cytc /Apaf-1/Caspase9/Caspase3 这一信号传导途径来调节睾丸生精细胞凋亡。进一步明确何首乌饮延缓大鼠生精细胞凋亡的调控机制，促

进中医药的发展，为传统医学“肾主生殖”藏象理论的科学内涵提供可靠实验数据，对男性生殖疾病机理及治疗具有重大的意义。

### 1.3 国内外研究现状

哺乳动物精子发生过程十分复杂，在一些因素作用下（如睾酮和促性腺激素分泌减少，化学治疗剂 GnRH 拮抗剂等）睾丸细胞的反应能力以及细胞之间相互作用均不相同，因此阐明雄性生殖细胞的凋亡机制是十分必要的<sup>[14]</sup>。

精子形成是从精原细胞开始经有丝分裂发育为精母细胞，而后形成精子细胞和成熟精子的全过程。睾丸中生精细胞数量由细胞增殖与细胞凋亡之间的动态平衡决定<sup>[15]</sup>，打破平衡会影响精子的发育、成熟。研究表明睾丸细胞凋亡紊乱影响正常精子的生成，例如在隐睾症患者中，凋亡生殖细胞的比例明显高于正常组，而生精细胞异常凋亡会引发男性不育症如低精症等<sup>[16-17]</sup>。

#### 1.3.1 基因调控生精细胞凋亡

细胞凋亡分为外源性途径与内源性途径<sup>[18]</sup>。外源性途径通过外部应激信号激活死亡受体如 Fas 和 TNFR1，它们分别与对应配体 FasL 和 TNF- $\alpha$  结合，激活启动子 Caspase 8 和 10，其裂解并激活下游效应子 procaspase<sup>[18]</sup>。内源性途径是线粒体介导的 Caspases 激活途径，其特征在于线粒体外膜透化（MOMP）和 Cytc 释放到细胞质中进而激活 Caspases，是细胞凋亡的主要途径<sup>[19-21]</sup>。

##### 1.3.1.1 Bcl-2 家族

依据蛋白的功能和同源性，Bcl-2 蛋白家族分为以下三个亚族：①以 Bcl-2 为代表的亚家族，具有抗细胞凋亡活性，结构上拥有保守的 BH1 ~ BH4 的结构域或跨膜区。其中 BH1 和 BH2 结构域为抗凋亡蛋白所必需；②由 BAX 和 Bak 代表的亚家族，发挥促细胞凋亡活性，结构上包含 BH1~BH3 处结构域，但不具有序列同源性 BH4 结构域<sup>[22]</sup>；③包含 Bik 和 Bid 的亚家族，促进细胞凋亡并且结构上仅有 BH3 结构域<sup>[23]</sup>。

Bcl-2 主要以同源二聚体的形式存在，近期研究显示，Bcl-2 能够抑制由 p53 介导的体细胞 DNA 损伤和衰老所致的细胞凋亡<sup>[24]</sup>。凋亡抑制剂 Bcl-2 基因表达降低能够促使凋亡因子 Cytc 从线粒体释放到细胞浆，保护细胞不受核酸酶损害，抑制 DNA 的断裂，减少细胞凋亡<sup>[23, 25]</sup>。BAX 是可溶性的蛋白质分子，在接收凋亡信号后，BAX 转位至线粒体外膜上，促进线粒体释放 Cytc 进入细胞质<sup>[26]</sup>，并激活 Caspase 信号传导途

径<sup>[27]</sup>。有研究报道 BAX / Bcl-2 比例能够调控生殖细胞凋亡<sup>[28]</sup>。Bcl-2 过表达能够抑制细胞凋亡，延长细胞存活期；BAX 过表达时，促使细胞增强对死亡信号的反应性，提高细胞凋亡率<sup>[27,29]</sup>。

Karaliotas 等研究<sup>[30]</sup>发现 OA 组大鼠软骨细胞中 Bax 转录水平显著高于对照组，而 OA 组中 Bcl-2 / Bax 表达降低，细胞凋亡水平升高。近期研究进一步证实 IL-1 $\beta$  诱导软骨细胞通过调节 Bcl-2 / Bax 的表达来实现细胞凋亡<sup>[31]</sup>。Kalia S<sup>[32]</sup>等发现用马来酸二乙脂处理小鼠后 BAX 基因被激活，BAX / Bcl-2 比例明显增加，能够促进小鼠睾丸生精细胞的凋亡。Zhao<sup>[33]</sup>等在研究中发现 STZ 诱导的糖尿病大鼠 BAX 表达上调，睾丸组织中 Bcl-2 表达下降，BAX / Bcl-2 比值升高。

### 1.3.1.2 细胞色素 c (Cytc)

Cytc 是一种携带动约 100 个氨基酸残基的阳离子血红蛋白，位于线粒体外膜和内膜间的空隙中，在线粒体呼吸和细胞凋亡中起重要作用<sup>[34]</sup>。Cytc 参与线粒体电子传递，具有抗氧化活性，其功能是将电子从复合物 III (UQH<sub>2</sub>-Cytc 还原酶) 转移到呼吸链的复合物 IV (Cytc 氧化酶)，减少分子氧形成水，最终形成 ATP<sup>[34]</sup>。

Cytc 不仅参与细胞生存发育中 ATP 生产以及自由基的清除，在细胞凋亡中也发挥关键作用。于 1996 年首次研究发现 Cytc 在细胞凋亡中起重要作用<sup>[35]</sup>。经过多项研究拓展，目前普遍认为细胞发生凋亡时 Cytc 释放到胞质中并与凋亡蛋白酶激活因子 1 结合，Cytc 的结合使复合物对 dATP 的亲和力增强，其结合对于寡聚化和凋亡体的形成十分重要<sup>[36]</sup>。

细胞内源性凋亡途径主要受 Bcl-2 家族蛋白调控<sup>[37]</sup>，Bcl-2 家族包括促凋亡因子和抗凋亡因子，它们的相互作用能够调节细胞死亡和存活之间的平衡<sup>[38]</sup>，线粒体外膜中促凋亡的蛋白 BAX 和 BAK 的寡聚化会导致线粒体外膜透化，使其生物功能恶化，过量活性氧产生，促进各种凋亡因子（如 Cytc）释放到细胞质，这是内源性凋亡途径的关键，定义了细胞的生存或死亡<sup>[39]</sup>。

最近的光谱研究表明，当 Cytc 在凋亡期间释放到还原性细胞溶质环境中时，可以基于其氧化还原状态的变化实时观测细胞中 Cytc 的分布<sup>[40]</sup>。研究显示，Cytc 通过结合内质网中肌醇-1,4,5-三磷酸受体启动细胞凋亡，线粒体和细胞质中的钙超载，形成正反馈，促使更多的 Cytc 释放，进一步激活细胞凋亡<sup>[41-43]</sup>。研究报道，Cytc 从线粒体中

释放后立即与 Apaf-1 抑制剂 14-3-3e 竞争结合 Apaf-1，能够进一步促进 Caspase 激活<sup>[44]</sup>。降低 Cytc 在胞质中表达水平能够抑制细胞凋亡<sup>[36]</sup>。对于 Cytc 缺陷型细胞在凋亡诱导剂刺激下，Caspase3 活化水平很低<sup>[45]</sup>。以上研究表明 Cytc 是 Caspase 活化的必备条件。

#### 1.3.1.3 凋亡蛋白酶激活因子-1 (Apaf-1)

凋亡蛋白酶激活因子 1 是一种分子量为 130kD 的蛋白质，由三部分组成：① N-末端为 85 个氨基酸残基，包含 Caspase 募集结构域 (CARD); ② 秀丽隐杆线虫的 CED-4 同源的核苷酸结合和寡聚结构域 (NOD，也称为 NB-ARC); ③ 由 12 个 WD-40 重复片段组成的结构域<sup>[46-47]</sup>。研究表明 NOD 的结构包含一个 AAA+ ATPase 结构域和翼状螺旋结构域，有助于核苷酸和超螺旋结构域结合<sup>[48]</sup>。

Apaf-1 是在触发线粒体凋亡途径中形成的，在细胞诱导凋亡后，Cytc 在 ATP 存在下进入细胞质，进而激活 Apaf-1 并诱导其蛋白质发生构象变化，募集并激活 procaspase9 形成凋亡复合体<sup>[49]</sup>。Apaf-1 是凋亡小体的主要成分，是线粒体凋亡途径关键要素。

凋亡体的形成是线粒体途径上游事件，能够启动下游基因细胞死亡执行者 Caspase3。研究表明 Apaf-1 缺陷型细胞组未观察到 Caspase3 活化或核浓缩，显著抑制 Caspase3 的活性<sup>[50-51]</sup>。Apaf-1 抑制剂 SVT016426 在凋亡体水平上抑制细胞凋亡，维持细胞功能，为未来不需要的病理性细胞凋亡治疗的发展提供了希望<sup>[52]</sup>。Apaf-1 作为衔接蛋白可能是一种调节屏障，通过调节 Apaf-1，降低下游基因 Caspase 家族的活性，进而调控细胞死亡。

#### 1.3.1.4 Caspase9/3

半胱天冬酶作为程序化细胞死亡信号网络的核心部分，在凋亡的启动和执行发挥重要作用<sup>[53]</sup>。Caspase3 是细胞凋亡的主要执行者，在大多数凋亡事件中高表达<sup>[54-55]</sup>。

Caspase3 能够通过外源性凋亡途径和内源性凋亡途径激活，是启动细胞凋亡降解阶段的标志，伴随着凋亡特征（如 DNA 片段化，细胞皱缩和膜起泡）的出现<sup>[56]</sup>。Caspase3 表达水平用于评估细胞凋亡水平<sup>[57-58]</sup>。

正常条件下，Caspase3 以酶原（Caspase3 p32）形式存在于胞浆中，在凋亡早期，procaspase3 被激活，切割为活化形式 Caspase3 p20 和 Caspase-3 p17<sup>[59]</sup>，使胞浆胞核底物发生裂解进而引发细胞凋亡反应。

研究发现 Caspase3 缺陷型细胞没有出现膜起泡和核碎裂这些典型细胞凋亡特征，这表明 Caspase3 对凋亡细胞形态形成发挥一定作用<sup>[60]</sup>。

在另一项研究中发现 Espino<sup>[61]</sup>等人用 1 mM 褪黑素预处理射出的人类精子，能够显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的 Caspase9 和 Caspase3 的活化，从而抑制半胱天冬酶介导的凋亡级联反应的激活。

Caspase9 称为细胞凋亡的启动子，是线粒体途径中产生凋亡复合体的重要因素<sup>[62]</sup>。在生理条件下，由细胞色素 c / dATP 触发形成的凋亡小体对 Caspase9 的激活至关重要，凋亡小体募集多个 procaspase9 并促进其裂解成活性形式，研究也证实局部积累 procaspase9 可促进其二聚化<sup>[63]</sup>。与其他启动子 Caspase 一样，procaspase9 以非活性单体形式存在，其离解常数 (Kd) 处于高微摩尔范围<sup>[64]</sup>。

核苷酸交换后，Apaf-1 构象发生变化，CARD 区域暴露，Apaf-1 寡聚化与 procaspase9 募集耦合形成最终的凋亡体。成熟的 Caspase9 二聚体在结构上是不对称的，只暴露一个催化位点，由于大多数重组表达的 Caspase9 纯化为无活性的 p35 / p12 单体，该二聚体在溶液中无法稳定存在<sup>[64]</sup>。

研究显示，天然 Caspase9 抑制剂、合成的半胱天冬酶抑制剂以及凋亡抑制蛋白 (XIAP) 均能够显著降低凋亡体中 Caspase9 (p35 / p12) 的解离率<sup>[65-66]</sup>。由于已知与不可逆的半胱天冬酶抑制剂或 XIAP 的相互作用在结构上稳定了 Caspase9<sup>[67]</sup>，这表明 Caspase9 (p35 / p12) 的构象不稳定可能是解离 Caspase9 的重要因素。虽然凋亡小体的 Apaf-1 七聚体结构会表明多达 7 个分子的 Caspase9 可以与 Apaf-1 CARDs 区域结合<sup>[68]</sup>，近期对于全酶组分的化学计量的质谱分析研究表明 CARDs 区域结合 5-6 个的 Caspase9 就达到饱和状态<sup>[69]</sup>。从 Caspase9 缺陷型小鼠分离的胸腺细胞表现出对各种促凋亡刺激（基因毒性应激诱导的抗癌药物和 γ 辐射）的耐受性增加<sup>[70]</sup>。研究结果证明 OVA 处理后的小鼠睾丸中 Caspases 凋亡途径被显著激活。由于程序性细胞死亡过程失调可能导致精子数量或运动性显著下降，从而导致男性不育等疾病<sup>[71]</sup>。

### 1.3.2 激素调节生精细胞凋亡

男性下丘脑-垂体-性腺（HPG）轴用于控制性激素的分泌以及生精细胞的形成与成熟。轴由三个基本部分组成，包括下丘脑，垂体前叶和睾丸。在这个轴上，从下丘脑分泌的促性腺激素释放激素（GnRH）通过垂体门脉系统到达垂体前叶，加速分泌卵泡刺激素（FSH）和黄体生成素（LH）<sup>[72]</sup>。

激素调节生殖细胞能够改善男性生殖疾病<sup>[73]</sup>。哺乳动物的睾丸中，睾酮（T）、卵泡刺激素（FSH）和促黄体激素（LH）共同作用于曲细精管及 Sertoli 细胞，对于生殖细胞的增殖和凋亡以及精子形成发挥重要调节作用<sup>[74]</sup>。

FSH 和睾酮受体是精子发生中主要激素调节剂，激素分泌减少会诱导生殖细胞发生凋亡<sup>[75]</sup>。由于睾丸缺陷引起的睾酮缺乏被称为原发性性腺机能减退，而促性腺激素缺乏被称为继发性性腺机能减退<sup>[76]</sup>。也有研究证实，FSH 和睾酮水平降低后，外源性和内源性凋亡途径在生殖细胞中起作用，影响精子输出和生育能力，因此，FSH 和睾酮通过抑制生殖细胞的死亡信号来维持生精稳态<sup>[77]</sup>。在曲细精管成熟期间，睾酮、雌二醇以及卵泡刺激素协同作用支持生殖细胞存活。Ruwani<sup>[79-80]</sup>等人研究发现 FSH 和睾酮主要作为生存因子来调节通路特异性凋亡基因和蛋白质。

## 1.4 研究思路与方法

本研究以自由基氧化损伤方法建立生精细胞衰老模型，特异性干扰凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1) 后，运用 RT-qPCR、Western Blot、免疫荧光技术，分析生精细胞线粒体凋亡通路中关键基因细胞色素 c、Caspase9、Caspase3 表达，研究何首乌饮对生精细胞凋亡的 Cytc/Apaf-1/Caspase 9/Caspase3 通路的调控机制。

## 1.5 主要研究内容

1、生精细胞和支持细胞共培养。采用苏丹 IV 染色法鉴定支持细胞，运用碱性磷酸酶染色和 HE 染色法鉴定生精细胞，流式检测精原干细胞特异性受体 ( $\alpha_6$ -integrin  $\beta_1$ -integrin) 鉴定精原干细胞。

2、运用自由基氧化损伤的方法建立生精细胞衰老模型。通过检测生精细胞中 SA- $\beta$ -gal 表达来鉴定生精细胞的衰老模型。

3、设计 3 条特异性敲低 Apaf-1 基因的 siRNA。免疫荧光技术检测生精细胞 Cy3 表达，检测不同时间下 siRNA 转染效率，筛选最佳转染时间；RT-qPCR、Western Blot 技术检测敲低 Apaf-1 后生精细胞中 Apaf-1 mRNA 和蛋白表达水平，筛选最佳干扰序列。

4、运用 RT-qPCR、Western Blot、免疫荧光技术检测生精细胞线粒体通路中关键基因 Cyt c、Caspase9、Caspase3 的表达。

5、检测各实验组生精细胞的 MMP 的变化。

## 1.6 研究创新点

本实验以大鼠生精细胞为研究对象，首次运用自由基氧化损伤的方法建立生精细胞衰老模型，采用分子生物学技术方法，探讨何首乌饮抑制生精细胞凋亡的线粒体通路作用机制，为揭示“肾藏精，肾主生殖”这一中医理论的科学内涵提供有价值的科学依据。

## 第二章 实验研究

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠（购自河北医科大学动物实验中心），体重 320~360 g，动物许可证号：1510063。

#### 2.1.2 药物制备

何首乌饮组成：取何首乌、肉苁蓉、怀牛膝、淫羊藿、丹参、茯苓，其质量比为 3:2:3:2:5:3 混合。配方颗粒选用北京康仁堂药业有限公司生产的配方颗粒，饮片与颗粒的当量比，制何首乌当量 1:10，肉苁蓉 1:10，怀牛膝 1:5，淫羊藿 1:20，丹参 1:10，茯苓 1:5。

何首乌饮给药量：根据大鼠和人给药的换算系数，成人用药量相当于含生药 2.4 g/100 g，结合前期研究结果，选用人的 2 倍量效果最佳，即给药量为含生药 4.8 g/100 g。根据北京康仁堂药业有限公司生产的配方颗粒的颗粒与饮片当量比换算，大鼠给药量 0.56 g/100 g（将 0.56 g 溶于 0.8 mL 生理盐水中灌胃，即为 0.7 g/mL）。

#### 2.1.3 主要试剂

试剂名称	公司
DMEM/F12 培养基	美国 Gibcos 公司
特级胎牛血清	以色列 Biological 公司
IV 型胶原酶	美国 Sigma 公司
何首乌饮复方中药颗粒	河北省保定市第一中医院药剂科
细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶试剂盒	上海碧云天生物有限公司
Annexin V-FITC & PI 细胞凋亡检测试剂盒	生工生物工程（上海）股份有限公司
脱脂奶粉	黑龙江省完达山乳业股份有限公司
高效 RIPA 细胞裂解液	北京索莱宝科技有限公司
PMSF	北京索莱宝科技有限公司

BSA	美国 Sigma 公司
TRIzoL Reagent	美国 Ambion 公司
PrimeScript RT reagent Kit with Gdna Eraser	日本 TaKaRa 公司
TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)	日本 TaKaRa 公司
线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)	上海碧云天生物有限公司
荧光二抗	中国 Proteintech 公司
Tritonx-100	美国 Sigma 公司
DAPI 溶液 (即用型)	北京索莱宝科技有限公司
无水乙醇, 分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
甲醇, 分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
氯仿	天津市科密欧化学试剂有限公司
DEPC 处理水	北京庄盟国际生物基因科技有限公司
异丙醇, 分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司

#### 2.1.4 主要仪器

仪器名称	公司
鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司
海尔生物安全柜	青岛海尔股份有限公司
数显式电热恒温水浴锅	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
TD3 低速自动平衡离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,
二氧化碳培养箱	美国 Thermo Scientific 公司
脱色摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
全波长酶标仪	美国 Bio-tek EPOCH 公司
生化培养箱	上海沪沁仪器设备有限公司
荧光正置显微镜	日本 OLYMPUS 公司
荧光倒置显微镜	日本 Nikon 公司
高速冷冻离心机	美国 Thermo Scientific 公司
安捷伦 Mx 3000P 荧光定量 PCR 仪	美国 Agilent technologies 公司

2720型 PCR 仪	美国 AppLied Biosystems 公司
荧光酶标仪	美国 Thermo Scientific 公司
FACSCalibur 流式细胞仪	美国 BD FACSCalibur 公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 含药血清的制备

取 Wistar 雄性大鼠, 体重 320~360 g, 将制备好的何首乌饮 (4.8 g/100 g) 连续 1 周灌胃给药, 每天 2 次。第 8 d 给药 2 h 后, 用 6% 水合氯醛麻醉大鼠进行内眦取血, 静置后, 3000 r/min, 离心 30 min, 分离血清, 过滤后将其无菌分装, 存放于 -80°C 备用。

### 2.2.2 细胞的分离与培养

雄性大鼠出生后第 6 d, 生精上皮仅含有少量支持细胞和原始的 A 型精原细胞, 第 8 d 出现 B 型精原细胞, 10~14 d 是减数分裂前期, 支持细胞及 A, B 型精原细胞大量增殖<sup>[81]</sup>, 支持细胞在 14~20 d 含量较多<sup>[82]</sup>, 生殖细胞分别在第 14 d 和第 18 d 达到早期和晚期粗线期阶段, 18~20 d 出现大量的次级精母细胞和单倍体精子细胞<sup>[83]</sup>。因此, 选用取 7~9 d 的 Wistar 大鼠, 分离培养精原干细胞, 15~20 d 的 Wistar 大鼠分离培养支持细胞。

#### 2.2.2.1 支持细胞的培养

取 15~20 d Wistar 大鼠, 脱颈致死, 浸泡于 75% 酒精中体表消毒, 在超净台无菌操作快速取出雄鼠双侧睾丸浸于预冷的 D-hanks, 分离睾丸表面的脂肪垫及筋膜, 剔去血管; 使用吸管充分吹打, 以便使曲细精管充分散开, 静置 3 min 后吸掉上清; 加入二倍体积的胶原酶 IV (DMEM/F12 培养基配制), 放于 37°C 恒温水浴消化 15 min, 在这期间每隔 5 min 震荡混匀 1 次; 待曲细精管完全分散呈小片段时, 收集至 15 mL 离心管中, 用 D-hanks 重复洗涤 2 次, 每次 5 min; 加入等比例的胰蛋白酶和透明质酸酶, 吸管充分吹打混匀, 置于 37°C 水浴锅中消化 5 min; 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 的培养液至 6 mL 停止消化, 300 目细胞筛过滤, 收集过筛后的全部上清液, 转速 1500 rpm 离心 5 min, 弃掉上清液, 吸取适量体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 的培养液, 充分吹打重悬细胞。使用 Countstar 软件计算细胞密度, 移液

枪吸取 10  $\mu\text{L}$  的细胞悬液和 10  $\mu\text{L}$  台盼蓝染色液，两者混匀后加到细胞计数板中上机检测细胞活率与密度，得出细胞数量。调整好细胞密度后，将细胞接种在一次性培养皿中，在 34°C 细胞培养箱培养 4 h 后（基本去除间质细胞），将未贴壁的细胞悬液转移到新的细胞培养皿中，继续培养 3 d，采用苏丹 IV 染色鉴定。

#### 2.2.2.2 精原干细胞的培养

选取 7~9 d Wistar 大鼠，颈椎脱臼致死，置于 75% 酒精中进行体表消毒。在超净台中将双侧睾丸轻柔快速取出后放入预冷的 D-hanks 中，使用镊子分离睾丸表面的筋膜和脂肪垫，剔除小血管；用一次性吸管反复吹打，使曲细精管充分散开。静置 3~4 min，将生精小管沉淀转移至装有二倍体积胶原酶 IV 的无菌 EP 管中，37°C 水浴消化 15 min，期间每 5 min 混匀 1 次。待曲细精管消化呈棉絮状时，转移到 15 mL 离心管中，加入适量体积 D-hanks 平衡盐溶液重复清洗 2 次，以便去除结缔组织和间质细胞。等比例加入透明质酸酶和 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶，吹打混匀后放于恒温水浴锅中 37°C 消化 5 min，生精小管片段解离成大量游离的单细胞和细胞团，加入含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 的培养液停止消化。经 300 目细胞筛过滤到无菌培养皿中，收集滤后所有细胞悬液，1500 r/min 离心 5 min，弃去上清。再次加入新鲜培养液重悬细胞，采用差异贴壁法分离纯化精原干细胞，将精原干细胞培养在含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中，置于 35°C 培养箱中培养 3 h（去除大部分间质细胞及成纤维细胞），转移未贴壁细胞悬液并调整细胞密度，以  $5 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$  个/mL 密度接种于支持细胞上，继续培养 3 d 用于鉴定<sup>[84]</sup>。

#### 2.2.2.3 生精细胞的培养

将分离培养的精原干细胞，在含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养 7 d 后，用 HE 染色法和碱性磷酸酶染色法对生精细胞进行鉴定。

### 2.2.3 细胞的鉴定

#### 2.2.3.1 苏丹 IV 染色鉴定支持细胞

将培养 3 d 支持细胞放入 4% 的多聚甲醛中，固定 15 min；使用 70% 乙醇洗涤 3 min 后加入适量苏丹 IV 染色液，在室温下孵育 10 min，用 70% 乙醇重复清洗 2 min，自来水清洗后自然晾干，苏木精复染 5 min，蒸馏水洗涤 5 min，酒精梯度脱水，使用二甲苯透明，滴加适量中性树胶封片，观察拍照。

### 2.2.3.2 HE 染色鉴定生精细胞

吸除细胞培养板中培养液，PBS 洗涤 3 次，用 4% 多聚甲醛固定生精细胞 30 min，加入 PBS 缓冲溶液放于摇床上重复清洗 3 次。苏木精染色 5 min 后用自来水浸洗 2 min，1% 盐酸乙醇分色 20 s，自来水浸洗 1 min，重复 3 次。用 1% 氨水反复漂洗直至返蓝，伊红染液染色 30 s，自来水浸洗 1 min，重复 4 次。酒精梯度脱水顺序为：60% 乙醇 30 s→70% 乙醇 30 s→75% 乙醇 45 s→85% 乙醇 1 min→95% 乙醇 1 min ×2 次→无水乙醇 1 min×2 次，放入二甲苯透明 5 min，取出载玻片，滴加适量中性树胶封片，显微镜下观察拍照。

### 2.2.3.3 碱性磷酸酶染色鉴定精原细胞

提前将试剂从 -20℃ 取出，室温融化，用 PBS 洗涤细胞爬片 3 次，最后一次用一蒸水洗净。BCIP 工作液是由 40 μL 25×NBT 和 1 mL 1×AP 充分混匀后，加入 40 μL BCIP 配制而成。细胞中加入染色工作液，室温避光放置 30 min，直至显色到预期后停止。小心吸去 BCIP/NBT 染色工作液，三蒸水重复洗涤 2 次，停止显色。光学显微镜下观察拍片。精原细胞中碱性磷酸酯酶的活性很高，阳性细胞被特异性染成蓝紫色。

### 2.2.3.4 精原干细胞的鉴定

将培养至 3 d 的精原干细胞取出，弃去培养液，PBS 清洗后，胰酶消化细胞，加入培养液终止消化，收集细胞悬液至 15 mL 离心管中，室温条件下 1000 rpm 离心 5 min，沉淀细胞，吸去上清，吸取 1 mL PBS 重悬细胞，1000 rpm，5 min，重复洗涤 2 次，离心沉淀细胞。用手轻弹离心管底，避免细胞成团，在每个流式管中加入稀释好的抗体，约 50 μL (Staining Buffer 稀释抗体)，再加入 50 μL 细胞悬液，轻柔吹打混匀，室温避光孵育 1.5 h。完成后，每个流式检测管中加入 2 mL Staining Buffer。4°C 1000 rpm，离心 5 min，吸除上清液，重复洗涤过程 3 次。弃去上清后用 400 μL PBS 重悬细胞后，流式上机检测。 $\alpha_6$ -integrin， $\beta_1$ -integrin 是精原干细胞的特异性表面受体，用流式仪检测 FITC 标记的  $\alpha_6$ -integrin， $\beta_1$ -integrin 抗体对精原干细胞进行鉴定。

## 2.2.4 细胞衰老模型的建立及鉴定

### 2.2.4.1 建立生精细胞衰老模型

自由基氧化性损伤方法建立生精细胞衰老模型：将分离培养的精原干细胞，在含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液中与支持细胞共培养 7 d 后，在培养液中加入 50

$\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $100 \mu\text{mol/L}$   $\text{FeSO}_4$ ，体积均为  $2 \mu\text{L}$ ，作用  $8 \text{ h}$  后吸除培养液，PBS 缓冲液清洗后更换新鲜培养液，继续培养至  $72 \text{ h}$ ，使用  $\beta$ -半乳糖苷酶衰老染色试剂盒，鉴定是否成功建立细胞衰老模型。

#### 2.2.4.2 $\beta$ -半乳糖苷酶特异性染色

通过检测细胞中与衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶 (SA- $\beta$ -gal) 活性，鉴定细胞衰老模型。对于培养在六孔板中生精细胞，弃去培养液，PBS 洗涤 3 次。用试剂盒中固定液固定生精细胞，每孔加  $1 \text{ mL}$  固定液，室温孵育  $15 \text{ min}$ 。完成后 PBS 重复洗涤 3 次，每次  $5 \text{ min}$ 。弃去 PBS，每个孔中加入  $1000 \mu\text{L}$  的染色工作液（按照试剂盒说明书配制）。 $37^\circ\text{C}$  避光孵育过夜，注意不能在二氧化碳培养箱中进行。吸除载玻片上的染色工作液，每孔加入  $2 \text{ mL}$  PBS。显微镜观察拍照，检测衰老特异性  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的表达，阳性细胞染成蓝色。实验重复 3 次，每组选取 5 张爬片，每张爬片选取 10 个视野 ( $\times 200$ )，使用软件 ImageJ 计算其蓝染率并进行统计学分析。

#### 2.2.5 Apaf-1-siRNA 及 Apaf-1 引物的合成与转染

由广州锐博生物技术有限公司设计及合成 3 条特异性干扰 Apaf-1 的 siRNA 序列，阴性对照组和荧光标记转染对照组也由该公司提供。后续实验所需待选 siRNA 模板序列见下：

表 2-1 Apaf-1-siRNA 干扰序列

	正义链	反义链
siRNA1	5'ACAACUUCUGGCCUAUCAdTdT 3'	3'dTdTUGUUGAAGGACCGGAUAGU5'
siRNA2	5'ACAGCCAUUUCCUAACAUUdTdT 3'	3'dTdTUGUCGGAAAGGAUUGUAA5'
siRNA3	5'GAGCCAUAAGAUUAUAGAdTdT 3'	3'dTdTCUCGGUAUUCUAAUAUCU5'

(1) 选取分离培养至第  $7 \text{ d}$  的生精细胞进行 siRNA 转染，吸除原有的培养液，用 PBS 清洗 2 次并更换新鲜无血清的培养基。

##### (2) 转染工作液的配制

a. 分别吸取 NC-siRNA、Cy3 荧光标记 siRNA 和待选 3 条 Apaf-1-siRNA  $50 \text{ nmol}$ （说明书推荐浓度）加到  $250 \mu\text{L}$  不含血清培养基 DMEM/F12 中，混匀后室温孵育  $5 \text{ min}$ 。b. 取  $5 \mu\text{L}$  Lipohigh Transfection Reagent 溶于  $250 \mu\text{L}$  不含血清培养基

DMEM/F12 中，并轻轻混匀，室温静置 5 min。c. 计时结束后将第二步骤所得液体转移至第一步骤液体中，并轻柔吹打混匀，室温孵育 20 min。

(3) 转染时，移液枪吸取准备好的复合物（总体积 500  $\mu$ L），缓缓加入对应的细胞培养基中，前后轻柔晃动细胞培养板使其均匀分布。

(4) 将细胞置于 35°C 培养箱中培养 6~8 h 后，弃去复合物，更换新鲜培养液。

(5) 转染后第 24、48 和 72 h，用荧光倒置显微镜采集图像，生精细胞呈现 Cy3 红色荧光即为转染成功，通过红色荧光表达情况筛选最佳的 siRNA 转染时间。

确定最佳转染时间后，运用 RT-qPCR 和 Western Blot 检测 Apaf-1-siRNA 干扰生精细胞的 mRNA 表达水平和蛋白表达情况，确定特异性干扰率最高的 siRNA 序列。

## 2.2.6 细胞分组

正常组：生精细胞在含 15% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液中培养 7 d 后，加入含 15% 血清（5% 胎牛血清+10% 空白血清）的培养液继续培养至 3d。

衰老组：将终浓度分别为 50  $\mu$ mol/L 的  $H_2O_2$  和 100  $\mu$ mol/L  $FeSO_4$  加至培养 7 d 的生精细胞内，细胞培养箱内作用 8 h，去除  $H_2O_2$  和  $FeSO_4$ ，再置于含 15% 血清（5% 胎牛血清+10% 空白血清）的培养液继续培养至 3d。

NC-siRNA 转染组：将 50  $\mu$ mol/L 的  $H_2O_2$  和 100  $\mu$ mol/L  $FeSO_4$  以及 NC-siRNA 转染复合物加入培养 7 d 的生精细胞中，细胞培养箱中孵育 8 h，移去  $H_2O_2$  和  $FeSO_4$  及 NC-siRNA 转染复合物，再加入含 15% 血清（5% 胎牛血清+10% 空白血清）的培养液继续培养至 3d。

何首乌饮组：加入终浓度分别为 50  $\mu$ mol/L 的  $H_2O_2$  和 100  $\mu$ mol/L  $FeSO_4$  于培养 7 d 的生精细胞内，培养箱作用 8 h，吸除  $H_2O_2$  和  $FeSO_4$ ，加入含 15% 血清（5% 胎牛血清+10% 何首乌饮含药血清）培养液，继续培养至 3d。

Apaf-1-siRNA 干扰组：将终浓度为 50  $\mu$ mol/L 的  $H_2O_2$  和 100  $\mu$ mol/L  $FeSO_4$ ，以及 Apaf-1-siRNA 转染复合物加至培养 7 d 的生精细胞中，持续作用 8 h 后移去  $H_2O_2$  和  $FeSO_4$  及 Apaf-1-siRNA 转染复合物，再置于含 15% 血清（5% 胎牛血清+10% 空白血清）的培养液继续培养至 3d。

Apaf-1-siRNA+SWYG 共孵育组：将终浓度为 50  $\mu$ mol/L 的  $H_2O_2$  和 100  $\mu$ mol/L  $FeSO_4$  以及 Apaf-1-siRNA 转染复合物加入培养 7 d 的生精细胞中，持续处理 8 h，移

去 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 FeSO<sub>4</sub> 及 Apaf-1-siRNA 转染复合物，加入含 15% 血清（5% 胎牛血清 +10% 何首乌饮含药血清）培养液，继续培养至 3d。

## 2.2.7 实时荧光定量 PCR

### 2.2.7.1 各基因引物的设计与合成

本实验所需基因引物是由英潍捷基（上海）贸易有限公司设计与合成，见表 2-2。

表 2-2 引物序列及各个基因的退火温度

Gene	Primer sequences	Product size (bp)
Apaf-1	F:CGGCCCTGCGCATCTGATTCA	288
	R:GGCGAACGACTAAGCGGGACAG	
Cyt c	F:GCTAACACCAGGACGGAAC	293
	R:CCACTCCAATCAGGCATGAAC	
Caspase9	F:CTGAGCCAGATGCTGTCCCATA	176
	R:GACACCATCCAAGGTCTCGATGTA	
Caspase3	F:GACTGCGGTATTGAGACAGA	209
	R:CGAGTGAGGATGTGCATGAA	
$\beta$ -actin	F:CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	R:TTTAATGTCACGCACGATTTC	

### 2.2.7.2 细胞总 RNA 的提取

使用 TRIpure Reagent 从睾丸生精细胞中提取总 RNA，具体操作如下。

(1) 取出培养在六孔板中的生精细胞，吸取 1 mL TRIpure 至每孔中，移液枪反复吹打使细胞裂解。将匀浆样品转移至无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中。室温静置 5 min 使核蛋白解离。

(2) 吸取 200  $\mu$ L 的氯仿至步骤 (1) 中的 EP 管，剧烈振荡混匀 15 s，室温静置 2 ~ 3 min。在 4°C, 12000 rpm, 高速离心 15 min。吸取上层无色水相(细胞总 RNA)，将其转移至新的 1.5 mL EP 管中。

(3) 移液枪吸取相同体积的异丙醇，将其上下颠倒数次混匀后于室温放置 10 min。

(4) 高速离心机 12000 rpm, 4℃ 离心 10 min。完成后弃去上清。加入 1 mL 75% 酒精洗涤 RNA 沉淀。4℃, 12000 rpm 高速离心 2 min, 弃去上清液后室温放置干燥, 但时间不能过长, 以免 RNA 完全干燥后难以溶解。

(5) 溶解: 加 30 μL DEPC 水充分溶解 RNA 沉淀。

### 2.2.7.3 RNA 浓度和纯度的测定

从溶解的 RNA 溶液中吸取 2 μL, 每组样品重复 2 个复孔, 用 DEPC 水做对照孔, 酶标仪检测各组样品在 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值, 对 RNA 进行定量。

### 2.2.7.4 逆转录为 cDNA

去除基因组 DNA 反应, 取 900 ng RNA 样品, 按照如下成分冰上配制反应工作液。

试剂	10 μL 反应体系
5×gDNA Eraser Buffer	2.0
gDNA Eraser	1.0
TotaL RNA + Rnase Free ddH <sub>2</sub> O	7.0

42℃ 反应 2 min, 4℃ 反应 2 min 后进行后续操作

试剂	20 μL 反应体系
上一步所得反应液	10.0
Rnase Free ddH <sub>2</sub> O	4.0
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0
PrimeScript RT Enzyme Mix 1	1.0
RT Primer Mix	1.0

37℃ 反应 15 min, 85℃ 反应 5 s, 4℃ 反应 5 min。将合成的 cDNA 分装, -80℃ 保存。

### 2.2.7.5 Real time PCR

以各组生精细胞 cDNA 为扩增模板, 选用荧光染料 SYBR 进行 qRT-PCR 扩增, β-actin 设为内参。所有待测样品均做 3 个平行复孔以减少操作误差, 实验重复 3 次, 运用 2<sup>-ΔΔct</sup> 法分析实验结果后进行统计分析。

试剂	20 μL 反应体系
SYBR Premix Ex Taq II	10.0
ROX Reference Dye	0.4
Rnase Free ddH <sub>2</sub> O	6.0
PCR Forward Primer	1.0
PCR Reverse Primer	1.0
RT 反应液 ( cDNA 溶液)	1.0

采用两步法：预变性，95°C 30 s；PCR 反应，95°C 5 s，60°C 31 s，扩增 40 个循环。

## 2.2.8 Western Blot

### 2.2.8.1 提取细胞总蛋白

将 6 孔板中培养液吸尽，用 PBS 清洗各组睾丸生精细胞 2 次，用枪吸尽残液。每孔加入 200 μL 细胞蛋白裂解液 (PMSF : RIPA = 1: 99)，静置 3 min，为了使细胞和裂解液充分接触，用枪轻柔吹打直至细胞滑落。将细胞悬液收集到 1.5 mL EP 管中。14000 rpm 离心 10 ~ 15 min，吸取上清转移至另一洁净的 1.5 mL EP 管中，存放于 -20°C。

### 2.2.8.2 蛋白浓度的测定

用 PBS 倍比稀释 BSA 标准品 (2 mg/mL)，使其浓度稀释为：80 μg/μL, 40 μg/μL, 20 μg/μL, 10 μg/μL, 5 μg/μL, 2.5 μg/μL, 1.25 μg/μL, 0.625 μg/μL, 0 μg/μL。每次稀释后充分混匀。将每组的蛋白样品各取 5 μL，再分别加入 495 μL PBS，充分混匀。取适量酶标条，每个样品重复 3 个复孔，每孔依次加入稀释后的 BSA 标准品和待测样品，最后加入考马斯亮蓝 (125 μL/孔)。用酶标仪测定样品蛋白浓度，样品上样量为 100 μg 蛋白，计算出上样量。将上样蛋白转移到新的 EP 管中，加入上样缓冲液，煮沸 5 min，冰浴 5 min，保存于 -20°C。

### 2.2.8.3 电泳

组装垂直电泳槽，检验是否漏水。静置 5 min 后，倒掉水并用滤纸吸净残余的水分，确保玻璃板干燥。

配制分离胶与浓缩胶目的蛋白的分子量越大，对应的分离胶的浓度应该越小，根据目的蛋白的分子量和 Marker 选取对应浓度的分离胶。在配置分离胶最后，快速加入 TEMED 和 AP，每完成一步，应将试剂充分混匀。分离胶配好后，用移液枪均匀注入两个玻璃板内，在分离胶上层缓慢加入 1 mL 75% 酒精，尽量保持液面平整。室温静置 30 min，待出现胶与水的分界面后弃掉上层酒精，用滤纸将剩余液体吸干。加入浓缩胶，浓缩胶量为注满玻璃板空隙为准，小心插上梳子，静置 30 min 后，将玻璃板放入电泳槽中，加入电泳液，缓慢垂直拔出梳子。加入蛋白样品后开始电泳，电压 90 V，30 min 后，电压调至 120 V，继续跑 1.5 h~2 h。

#### 2.2.8.4 转膜

按照黑色板，一层海绵，三层滤纸，三层滤纸，一层滤纸，白色板顺序安装转膜夹，提前将转膜夹装在转膜槽中，放入 1X 转膜缓冲液浸泡 15 min；裁剪 PVDF 膜，将膜置于甲醇浸泡 15 s 后，将膜转移膜一蒸水中，待 PVDF 膜停止转动后放入 1X 转膜缓冲液中，平衡 10 min 左右；根据 Marker 位置切胶，将切下的胶放在已经浸湿的滤纸上，并将已平衡好的膜覆盖在分离胶上面，滤纸、PVDF 膜、胶、滤纸的顺序放好后，装好转膜装置，连接电源 280 mA 恒流转膜 1.5~2.5 h。

#### 2.2.8.5 封闭、抗体孵育

转膜结束，将 PVDF 膜取出放入塑料盒内，加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液（现配现用），37°C 封闭 1.5 h；将 PVDF 膜取出用 PBST 清洗，浸入稀释好的一抗中，4°C 孵育过夜。次日取出，置摇床上用 PBST 洗涤 6 次，每次 5 min；加入二抗（1:5000）37°C 孵育 1.5 h；PBST 清洗 6 次，每次 5 min。

#### 2.2.8.6 ECL 显影

使用增强化学发光 (ECL) 系统 (Pierce) 显影。吸取 ECL 试剂盒中等体积的 A 液和 B 液，Vortex 涡旋混匀，将膜的表面与发光液充分接触，放入全自动凝胶成像分析仪中显影，实验重复 3 次。

#### 2.2.8.7 图像处理与分析

Image J 软件分析实验结果图像中各个条带的灰度值，以 GADPH 或  $\beta$ -actin 为内参，目的蛋白的灰度值与 GADPH (或  $\beta$ -actin) 灰度值的比值为目的蛋白相对表达量。

#### 2.2.9 流式细胞仪检测凋亡

- (1) 取干扰结束后的不同组细胞，用胰酶消化细胞，显微镜下观察到支持细胞表层的生精细胞大部分悬浮后，终止消化，收集细胞于 15 mL 离心管中。
- (2) 室温条件下 1000 rpm，离心 5 min，小心吸除上清，底部可以残余约 50  $\mu$ L 培养液，用预冷 PBS 缓冲液重悬细胞，室温 1000 rpm，5 min，重复洗涤 2 次。
- (3) 在离心管中加入预先配好的 100  $\mu$ L Binding Buffer，调整细胞悬液密度为  $1 \times 10^6$  个/mL，吹打混匀后，细胞过筛，将细胞悬液转移至流式管中。
- (4) 每个流式管内加入 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 各 5  $\mu$ L，混匀，室温条件下避光孵育 15 min。
- (5) 每管中再加入 400  $\mu$ L Binding Buffer 吹打混匀后，上流式仪检测。

## 2.2.10 免疫荧光技术

将培养在六孔板中的生精细胞取出，吸除旧的培养液，每孔加入 1 mL PBS 溶液反复洗涤 3 次，每次 2 min。用 4% 多聚甲醛固定生精细胞 30 min。完成后 PBS 洗涤 3 次，每次 2 min。每孔加 0.5% 的 Tritonx-100 1 mL 室温通透 20 min，PBS 清洗 3 次，每次 2~3 min。吸取 200  $\mu$ L 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加至每孔，室温孵育 15 min 后用 PBS 重复洗涤 3 次。配制 10% 山羊血清（PBS 稀释 40  $\mu$ L 原液至 400  $\mu$ L）进行封闭，室温静置 20 min，倾倒掉山羊血清无需清洗。每个载玻片上滴加适量体积稀释好的一抗（Cyt c、Caspase9、Caspase3）放入湿盒中，4°C 孵育过夜。第二日，PBS 重复清洗 3 次，每次 5 min，末次吸尽残液。余下步骤须避光操作，加入荧光二抗工作液（1:500，PBS 配制），37°C 孵育 30 min。加入 DAPI 复染细胞核，室温孵育 10 min，完成后 PBS 重复清洗载玻片 3 次，每次 5 min。加入适量抗荧光衰减封片剂进行封片，操作过程中避免产生气泡。荧光正置显微镜观察样品拍照，实验重复 3 次进行，每组选取 5 张爬片，每张爬片选取 10 个视野，使用 Image J 计算平均光密度进行统计学分析。

## 2.2.11 检测线粒体膜电位

### 2.2.11.1 荧光显微镜检测线粒体膜电位

JC-1 染色工作液：200×JC-1 50  $\mu$ L 与 8 mL 超纯水用 Vortex 涡旋使其充分溶解混匀，再加 5×JC-1 染色缓冲液 2 mL 混匀。

- (1) 吸六孔板中培养液，PBS 缓冲液洗涤 2 次，每孔加入 500  $\mu$ L 细胞培养液。

(2) 每孔加入 500  $\mu\text{L}$  JC-1 染色工作液, 充分混匀后, 放于细胞培养箱中 37°C 孵育 20 min, 孵育期间配制 1×JC-1 染色缓冲液 (1 mL 5×染色缓冲液+4 mL 蒸馏水), 冰浴备用。完成后, 弃去上清, 用 1×JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 每次 5 min。加入 2 mL 含有血清的培养液, 荧光显微镜下观察拍照。通过 JC-1 聚合物和 JC-1 单体所发出的红/绿荧光强度的比例来衡量线粒体的去极化程度。实验重复 3 次进行, 每组选取 5 张爬片, 每张爬片选取 10 个视野 ( $\times 200$ )。

### 2.2.11.2 荧光酶标仪检测线粒体膜电位

- (1) 按照试剂盒方法, 配制 JC-1 染色工作液。
- (2) 胰酶消化离心, 用 500  $\mu\text{L}$  细胞培养液充分重悬细胞, 调整其密度为  $2 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$  个/ $\text{mL}$ 。
- (3) 加入 500  $\mu\text{L}$  JC-1 染色工作液, 吹打混匀, 置 37°C 细胞培养箱培养 20 min。
- (4) 在孵育期间, 稀释适量 5X 的 JC-1 染色缓冲液为 1×JC-1 染色缓冲液, 并放于冰浴中。
- (5) 待孵育结束后, 4°C, 600 g 离心 4 min, 弃去上清。
- (6) 吸取 1 mL 1X 的 JC-1 染色缓冲液反复吹打混匀, 对细胞沉淀进行洗涤, 4°C, 600 g 离心 4 min, 弃上清, 此步骤重复两次进行。
- (7) 加入适量 1X 的 JC-1 染色工作液后, 将孔板放入用荧光酶标仪中, 检测 JC-1 单体时, 将设置激发光和发射光分别为 490 nm 和 530 nm, 检测 JC-1 聚合物, 将激发光和发射光分别设置成 525 nm 和 590 nm。实验重复 3 次进行, 每组样品重复三个复孔。

### 2.2.12 统计分析

实验数据采用 SPSS 19.0 软件统计分析, 用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  代表差异有统计学意义。首先将实验所得数据进行正态性检验, 若符合正态分布, 数据均数比较用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。若符合方差齐性, 采用 Student-Newman-Keuls 法进行两两比较, 若方差不齐使用 Dunnett's T3 法。

## 第三章 实验结果

### 3.1 细胞鉴定结果

睾丸支持细胞培养 3 d 后，采用苏丹 IV 染色鉴定，支持细胞胞质中富含橘红色脂滴，分散在细胞核的周围或聚集在支持细胞质的两端，见图 3-1 (a)。通过计算阳性细胞率，支持细胞纯度达到 90% 以上。 $\alpha_6$ -integrin 和  $\beta_1$ -integrin 是精原干细胞特异性表面受体，用于鉴定精原干细胞，流式结果显示，阴性对照组， $\alpha_6$ -integrin<sup>+</sup>和  $\beta_1$ -integrin<sup>+</sup>细胞表达率分别为 10.71%，26.76%，99.13%。与阴性对照相比， $\alpha_6$ -integrin<sup>+</sup> 和  $\beta_1$ -integrin<sup>+</sup> 细胞的荧光强度增强，峰向右移，见图 3-1 (d)。精原细胞用碱性磷酸酶染色鉴定，碱性磷酸酶将精原细胞染成蓝黑色，支持细胞为阴性，精母细胞、精子细胞和精子一般为阴性或弱阳性，见图 3-1 (b)。生精细胞 HE 染色结果显示紫红色成簇存在的圆形细胞是各级生精细胞，不规则形状呈淡紫色的为支持细胞，见图 3-1 (c)。

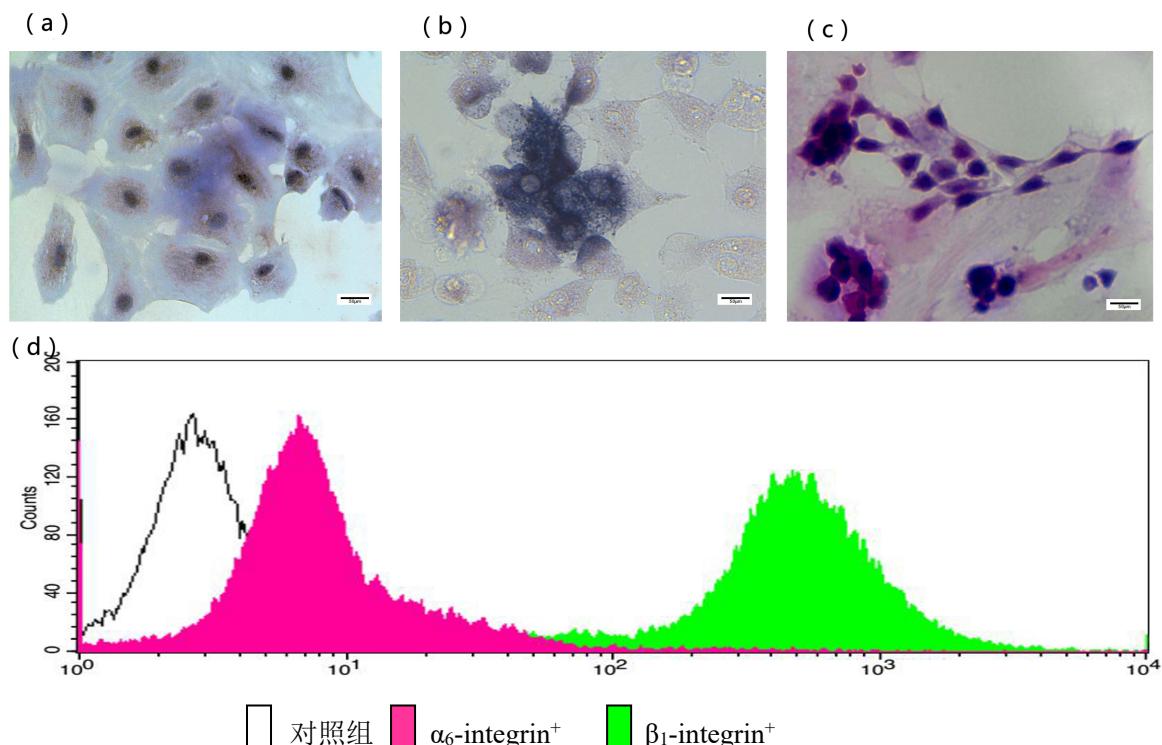


图 3-1 支持细胞、间质细胞、生精细胞和精原干细胞的鉴定结果 (标尺=50  $\mu\text{m}$ )

(a) 苏丹 IV 染色; (b) 碱性磷酸酶染色; (c) HE 染色; (d) 流式鉴定结果

### 3.2 生精细胞衰老模型的建立

### 3.2.1 细胞衰老模型 SA- $\beta$ -gal 染色结果

阳性细胞中 SA- $\beta$ -gal 活性较高，呈蓝色，定位于胞质中。衰老组 SA- $\beta$ -gal 阳性率高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )；与衰老组比较，何首乌饮组 SA- $\beta$ -gal 阳性率下降，具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见图 3-2。

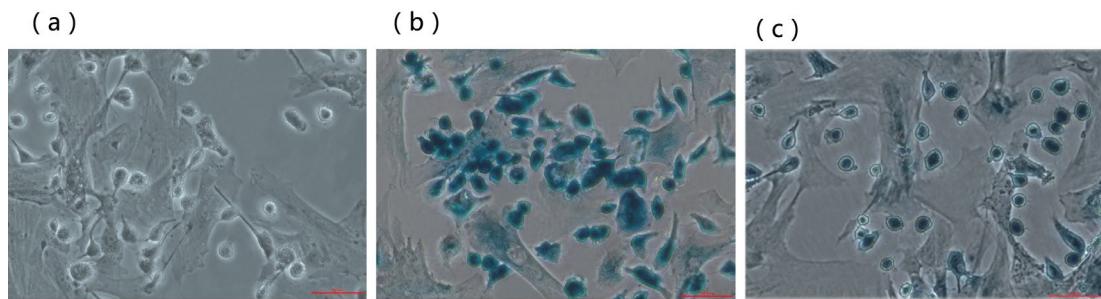


图 3-2 生精细胞 SA- $\beta$ -gal 衰老染色 (标尺 =50  $\mu$ m)

(a) 正常对照组；(b) 衰老组；(c) 何首乌饮组

表 3-1 各实验组生精细胞 SA- $\beta$ -gal 阳性细胞率统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SA- $\beta$ -gal 阳性率 (%)
正常对照组	$23.265 \pm 4.032^{\text{ab}}$
衰老组	$85.298 \pm 7.140^{\text{b}}$
何首乌饮组	$43.091 \pm 7.134^{\text{a}}$
<i>F</i>	76.482
<i>P</i>	0.000

注：a 代表和衰老组比较， $P < 0.05$ ；b 代表和何首乌饮组比较， $P < 0.05$ 。

### 3.2.2 生精细胞凋亡检测结果

流式检测细胞凋亡结果如下：

与正常对照组比较，衰老组生精细胞凋亡率显著上调 ( $P < 0.05$ )。与衰老组比较，何首乌饮组凋亡率低于衰老组，有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

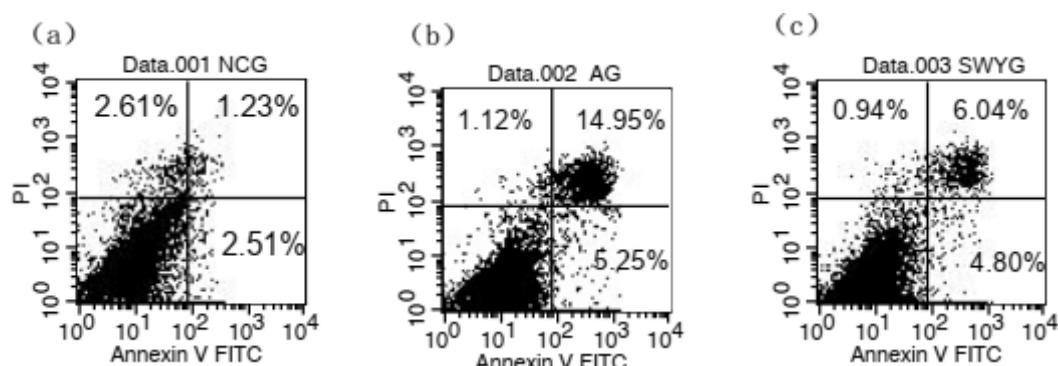


图 3-3 AnnexinV-FITC 染色流式仪检测生精细胞凋亡

(a) NCG: 正常对照组; (b) AG: 衰老组; (c) SWYG: 何首乌饮组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和何首乌饮组比较,  $P < 0.05$ 。表 3-2 各实验组生精细胞凋亡率统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	生精细胞凋亡率 (%)
正常对照组	$4.457 \pm 0.640^{\text{ab}}$
衰老组	$20.593 \pm 1.981^{\text{b}}$
何首乌饮组	$12.40 \pm 1.272^{\text{a}}$
F	98.546
P	0.000

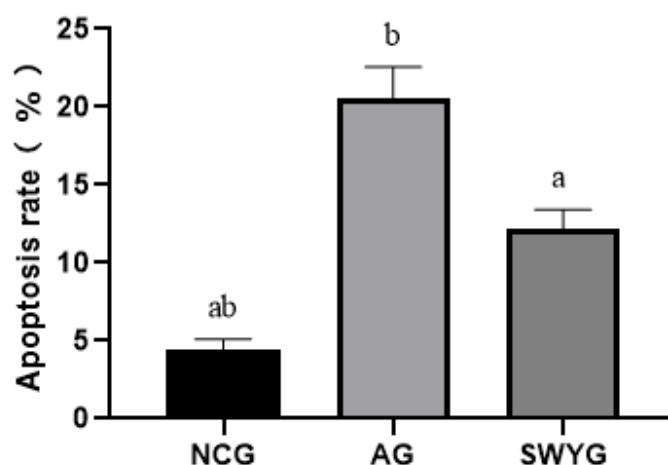
注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和何首乌饮组比较,  $P < 0.05$ 。

图 3-4 各组生精细胞的凋亡率统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; SWYG: 何首乌饮组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表与何首乌饮组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.3 Apaf-1 最佳干扰序列和最适作用时间的确定

#### 3.3.1 筛选 Apaf-1-siRNA 转染生精细胞时间

将荧光标记 siRNA 转染到生精细胞中作用 24 h, 48 h, 72 h, 检测各时间点生精细胞中 Cy3 荧光表达情况, 转染成功的生精细胞发红色荧光。与转染 24 h 比较, 作用 48 h 和 72 h 的生精细胞 Cy3 表达升高 ( $P < 0.05$ ) ; 与转染 48 h 比较, 干预 24 h, 72 h 的细胞 Cy3 表达下调 ( $P < 0.05$ ) 。

故我们选取 siRNA 转染生精细胞作用 48 h, 作为后续干扰实验条件。

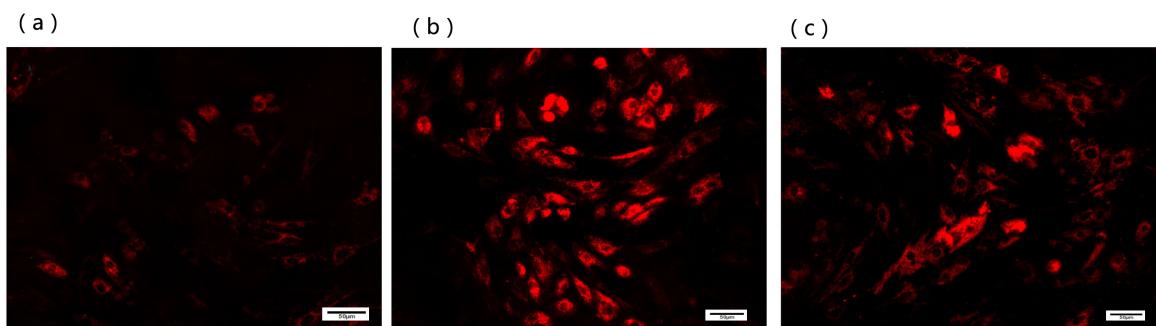


图 3-5 Cy3 阳性对照转染生精细胞 (标尺 = $50 \mu\text{m}$ )

(a) 生精细胞转染 24 h; (b) 生精细胞转染 48 h; (c) 生精细胞转染 72 h

表 3-3 不同转染时间生精细胞平均光密度统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	平均光密度
转染 24 h	$0.025 \pm 0.005^b$
转染 48 h	$0.082 \pm 0.008^a$
转染 72 h	$0.050 \pm 0.009^{ab}$
<i>F</i>	49.173
<i>P</i>	0.000

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 转染 24 h 组, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 转染 48 h 组。

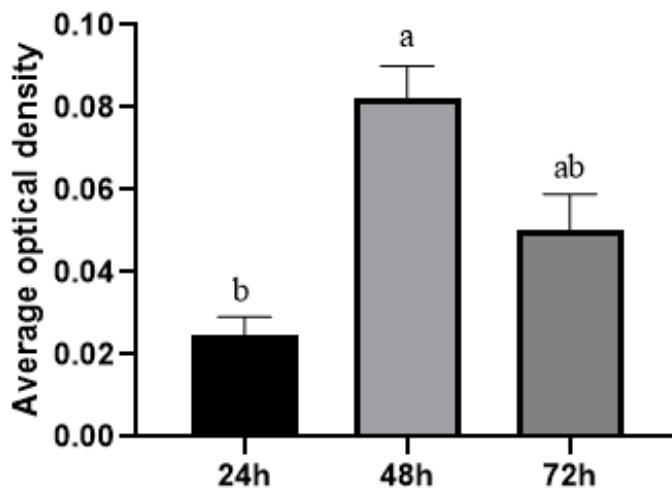


图 3-6 不同转染时间下生精细胞 Cy3 平均光密度统计结果

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 转染 24 h, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 转染 48 h。

### 3.3.2 筛选 Apaf-1 干扰序列

分别检测 3 条 Apaf-1-siRNA 序列干扰后, 生精细胞中 Apaf-1 蛋白和 mRNA 表达水平。

RT-qPCR 结果显示: 与正常对照组比较, 衰老组 Apaf-1 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。siRNA3 干扰组 mRNA 表达水平低于其余实验组 ( $P < 0.05$ )。

表 3-4 RT-qPCR 检测生精细胞中 Apaf-1 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	mRNA 表达水平
正常对照组	$0.457 \pm 0.116^{bc}$
衰老组	$1.003 \pm 0.008^{ac}$
NC-siRNA 转染组	$1.013 \pm 0.033^{ac}$
siRNA1 干扰组	$0.633 \pm 0.058^{abc}$
siRNA2 干扰组	$0.503 \pm 0.097^{bc}$
siRNA3 干扰组	$0.162 \pm 0.033^{ab}$
F	69.722
P	0.000

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs NC-siRNA 转染组, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs siRNA3 干扰组。

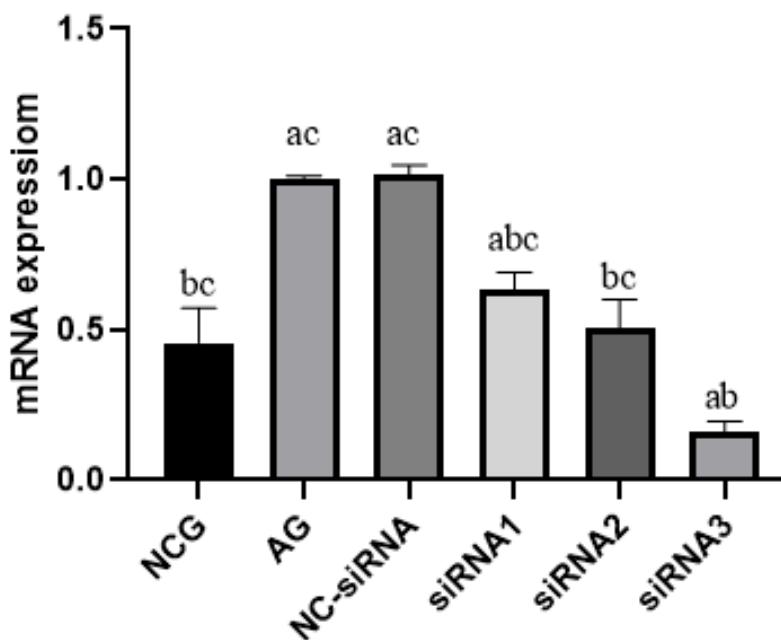


图 3-7 RT-qPCR 检测各组生精细胞中 Apaf-1 mRNA 表达水平

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

siRNA1: siRNA1 干扰组; siRNA2: siRNA2 干扰组; siRNA3: siRNA3 干扰组

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NCG, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs NC-siRNA, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs siRNA3。

Western blot 检测结果显示:

与正常对照组比较, 衰老组 Apaf-1 蛋白表达水平上调 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间无差异 ( $P > 0.05$ )。siRNA3 干扰组的蛋白表达水平低于其余各实验组 ( $P < 0.05$ )。

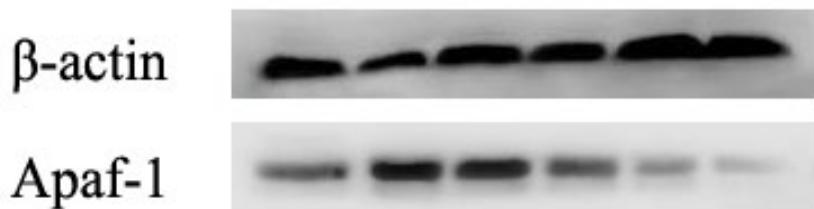


图 3-8 Western blot 检测各实验组生精细胞中 Apaf-1 蛋白表达

表3-5 各实验组生精细胞中 Apaf-1 蛋白表达水平统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	蛋白相对表达水平
正常对照组	0.307±0.043 <sup>bc</sup>
衰老组	0.655±0.030 <sup>ac</sup>
NC-siRNA 转染组	0.675±0.039 <sup>ac</sup>
siRNA1 干扰组	0.432±0.072 <sup>abc</sup>
siRNA2 干扰组	0.220±0.034 <sup>abc</sup>
siRNA3 干扰组	0.117±0.011 <sup>ab</sup>
F	87.807
P	0.000

注: <sup>a</sup>P<0.05 vs 正常对照组, <sup>b</sup>P<0.05 vs NC-siRNA转染组, <sup>c</sup>P<0.05 vs siRNA3干扰组

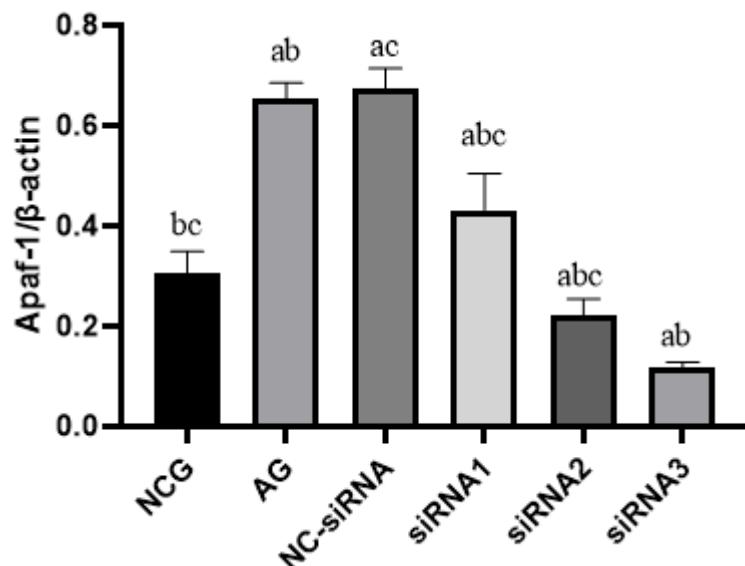


图 3-9 Western blot 检测生精细胞中 Apaf-1 蛋白水平统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

siRNA1: siRNA1 干扰组; siRNA2: siRNA2 干扰组; siRNA3: siRNA3 干扰组

注: <sup>a</sup>P<0.05 vs NCG, <sup>b</sup>P<0.05 vs NC-siRNA, <sup>c</sup>P<0.05 vs siRNA3。

以上结果表明 Apaf-1-siRNA 可明显抑制生精细胞中 Apaf-1 mRNA 和蛋白表达水平, 我们选取抑制率最高的 siRNA3 进行后续实验。

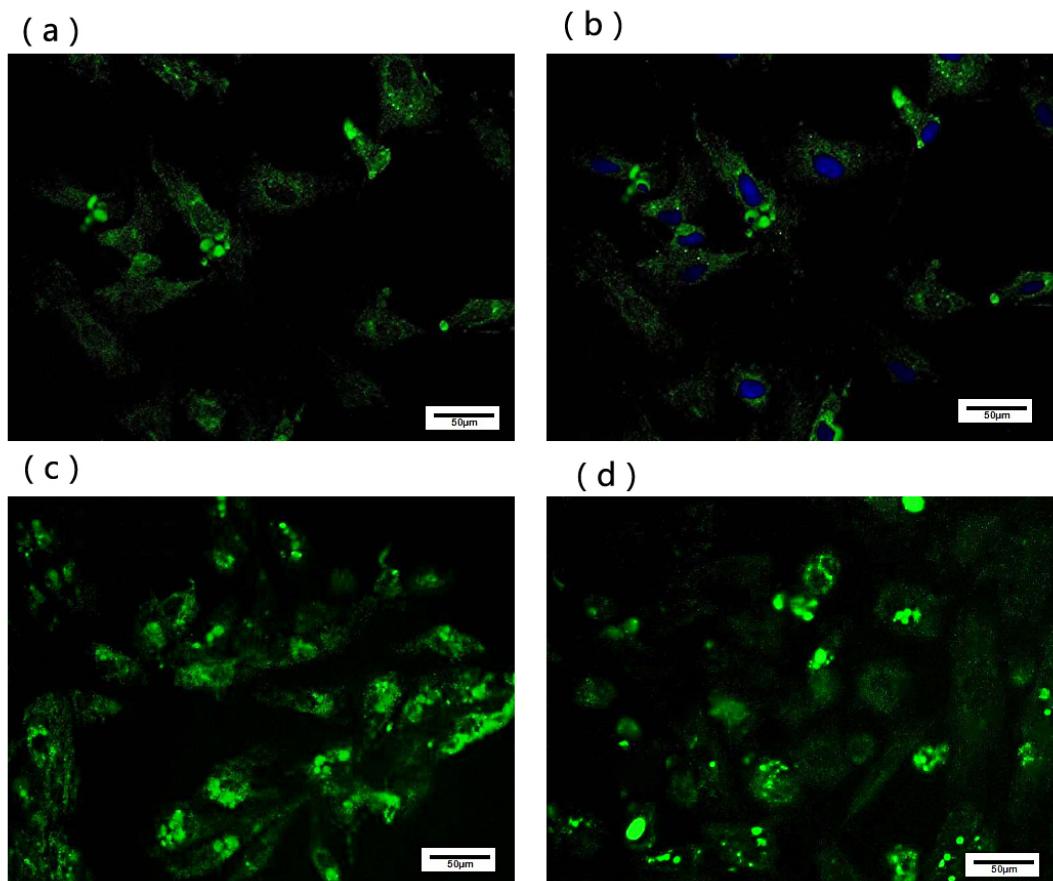
### 3.4 何首乌饮对生精细胞 Cytc、Casase9、Caspase3 表达的影响

#### 3.4.1 各组细胞 Cyt-c 的表达水平

我们运用荧光免疫染色法对 Cytc 进行定位分析。DAPI 法染色细胞核，呈蓝色，Cytc 阳性细胞发绿色荧光。免疫荧光染色结果显示：

与正常对照组比较，衰老组 Cytc 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组和共孵育组 Cytc 表达量低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组、Apaf-1-siRNA 干扰组与衰老组比较没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，何首乌饮组和共孵育组 Cytc 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与共孵育组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



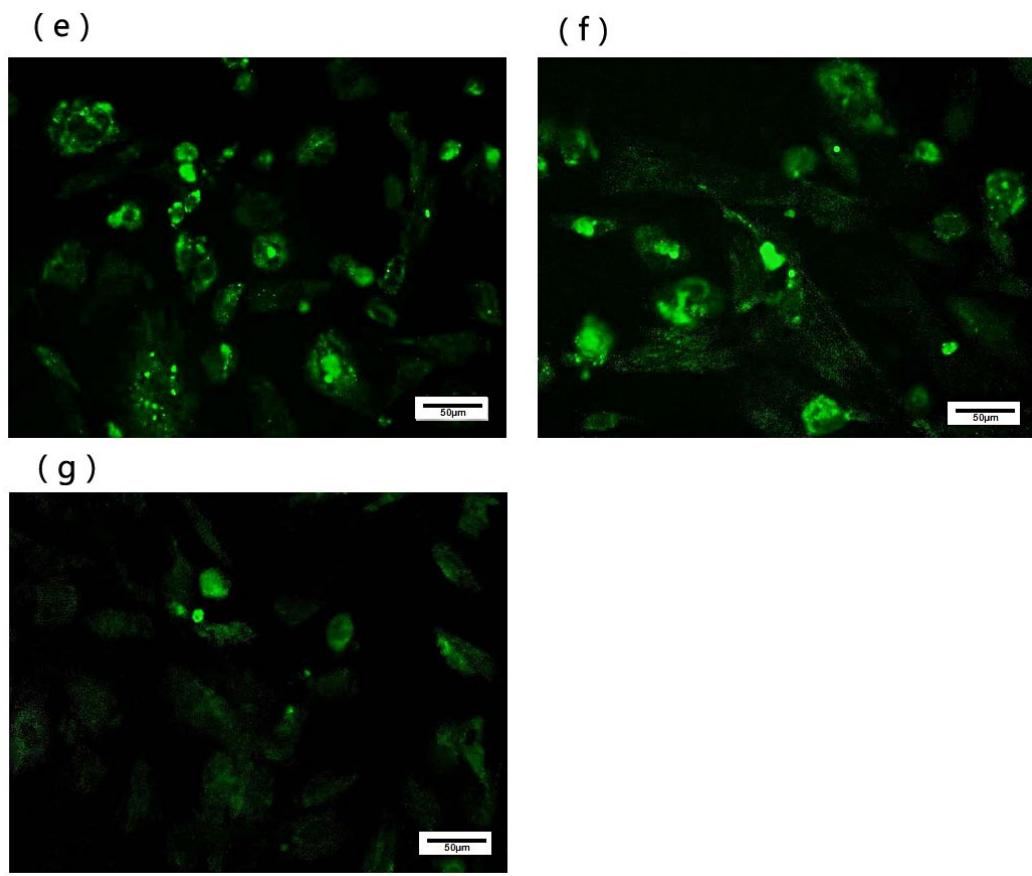


图 3-10 生精细胞 Cytc 免疫荧光染色（标尺=50  $\mu\text{m}$ ）

(a) 正常对照组; (b) 正常对照组 Merge; (c) 衰老组;  
 (d) NC-siRNA 转染组; (e) 何首乌饮组; (f) Apaf-1-siRNA 干扰组; (g) 共孵育组

表3-6 各实验组生精细胞平均光密度统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Cytc 平均光密度
正常对照组	$0.021 \pm 0.001^{\text{ab}}$
衰老组	$0.105 \pm 0.007$
NC-siRNA 转染组	$0.114 \pm 0.013$
何首乌饮组	$0.046 \pm 0.004^{\text{ab}}$
Apaf-1-siRNA 干扰组	$0.099 \pm 0.010$
共孵育组	$0.047 \pm 0.001^{\text{ab}}$
<i>F</i>	76.718
<i>P</i>	0.000

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

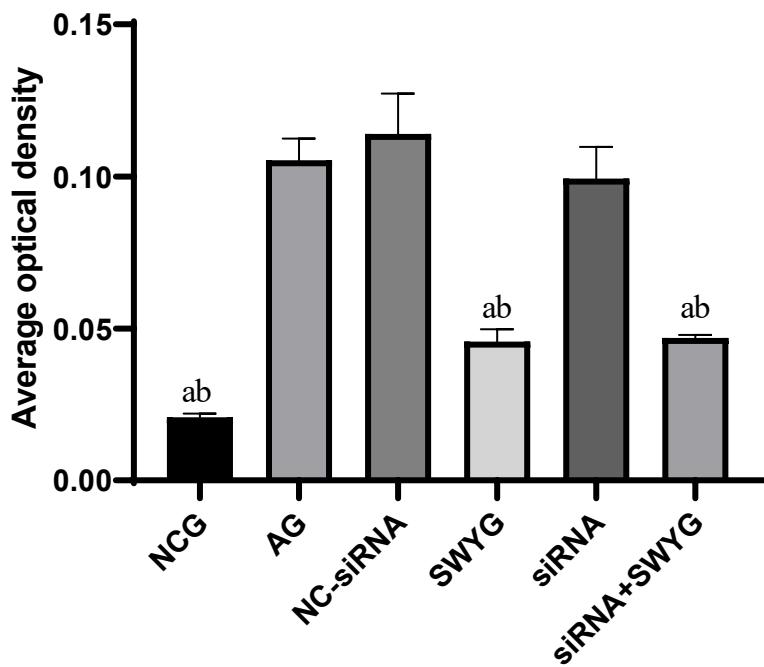


图 3-11 生精细胞 Cyt c 平均光密度统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

Western Blot 检测结果如下:

与正常对照组比较, 衰老组生精细胞 Cyt c 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组和共孵育组中 Cyt c 表达水平低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组、Apaf-1-siRNA 干扰组与衰老组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, 何首乌饮组和共孵育组 Cyt c 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与共孵育组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

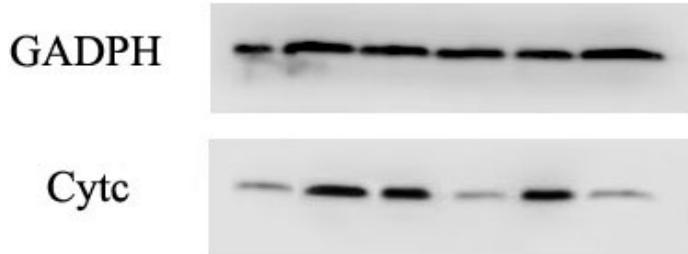


图 3-12 Western blot 检测各实验组生精细胞中 Cyt c 蛋白水平

表3-7 各实验组生精细胞 Cyt c 蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	Cyt c 蛋白表达量
正常对照组	0.206±0.071 <sup>ab</sup>
衰老组	0.733±0.052
NC-siRNA 转染组	0.713±0.036
何首乌饮组	0.347±0.037 <sup>ab</sup>
Apaf-1-siRNA 干扰组	0.729±0.052
共孵育组	0.343±0.024 <sup>ab</sup>
F	75.360
P	0.000

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

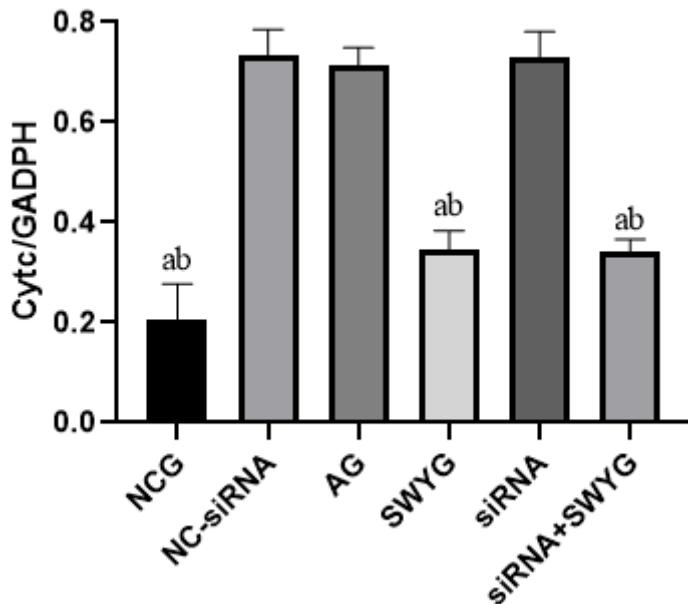


图 3-13 各组生精细胞 Cyt c 蛋白表达水平统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

RT-qPCR 检测结果显示:

与正常对照组比较，衰老组生精细胞 Cytc 的 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组和共孵育组中 Cytc 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组、Apaf-1-siRNA 干扰组与衰老组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，何首乌饮组和共孵育组 Cytc mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与共孵育组没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3-8 RT-qPCR 检测各组生精细胞 Cytc mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	Cytc mRNA 表达水平
正常对照组	0.230±0.078 <sup>ab</sup>
衰老组	1.012±0.020
NC-siRNA 转染组	0.999±0.118
何首乌饮组	0.491±0.140 <sup>ab</sup>
Apaf-1-siRNA 干扰组	0.999±0.123
共孵育组	0.444±0.065 <sup>ab</sup>
F	36.907
P	0.000

注： a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

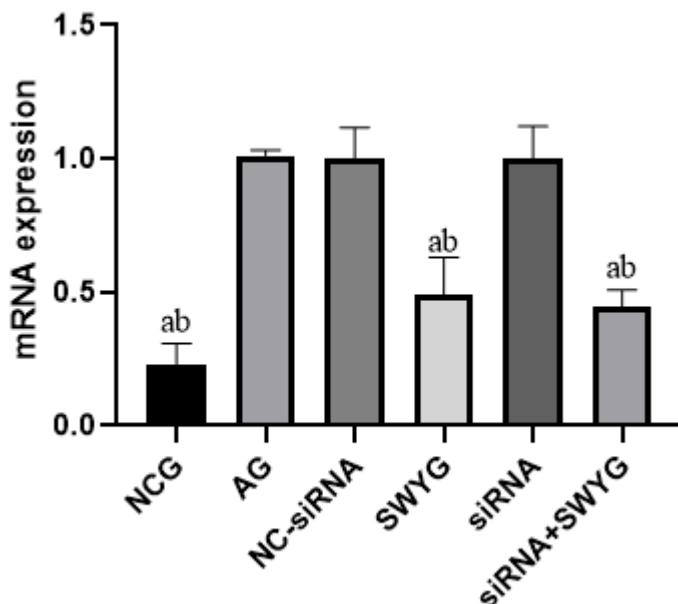


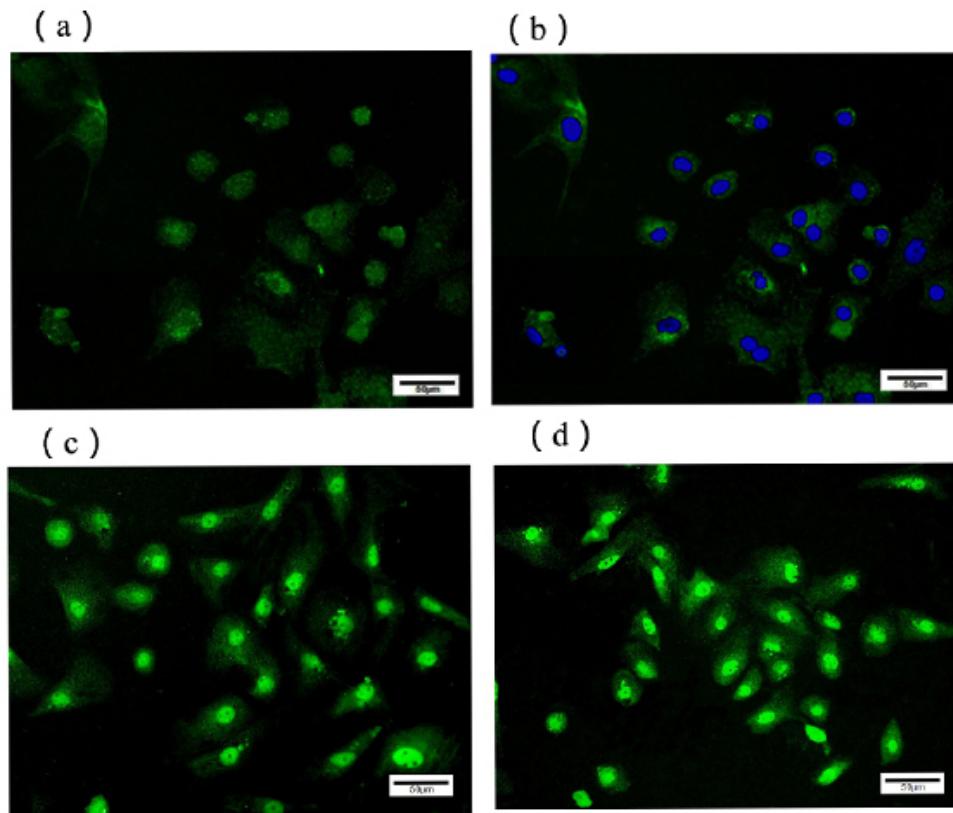
图 3-14 生精细胞中 Cyt-c mRNA 表达水平

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;  
SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组  
注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.4.2 各组细胞 Caspase9 的表达水平

荧光免疫染色对 Caspase9 进行定位分析。细胞核 DAPI 染色呈蓝色, Caspase9 阳性产物发绿色荧光。结果显示:

与正常对照组比较, 衰老组 Caspase9 表达上调 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组, Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组 Caspase9 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, 共孵育组 Caspase9 平均光密度降低 ( $P < 0.05$ ), 何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较 Caspase9 表达无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



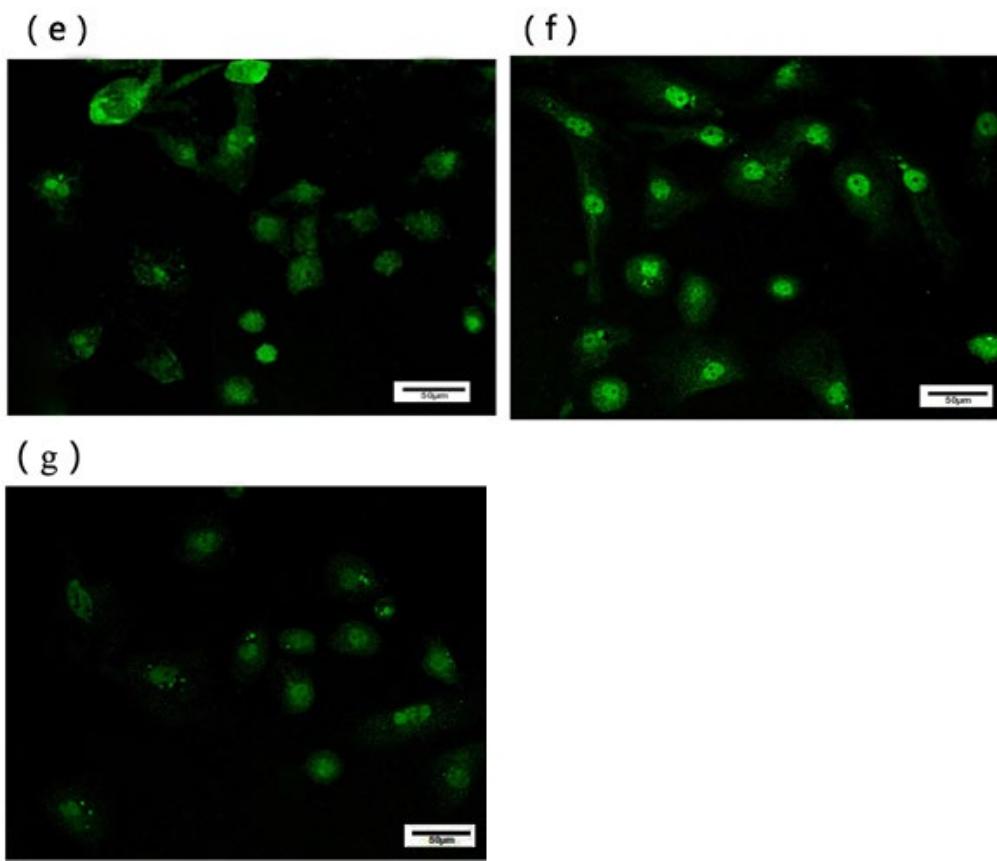


图 3-15 生精细胞 Caspase9 免疫荧光染色 (标尺=50 μm)

(a)正常对照组; (b) 正常对照组 Merge; (c) 衰老组; (d) NC-siRNA 转染组;  
 (e) 何首乌饮组; (f) Apaf-1-siRNA 干扰组; (g) 共孵育组

表3-9 各实验组生精细胞平均光密度统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase9 平均光密度
正常对照组	0.023±0.003 <sup>ab</sup>
衰老组	0.100±0.010 <sup>b</sup>
NC-siRNA 转染组	0.105±0.017 <sup>b</sup>
何首乌饮组	0.048±0.010 <sup>a</sup>
Apaf-1-siRNA 干扰组	0.050±0.005 <sup>a</sup>
共孵育组	0.030±0.008 <sup>ab</sup>
<i>F</i>	36.654
<i>P</i>	0.000

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

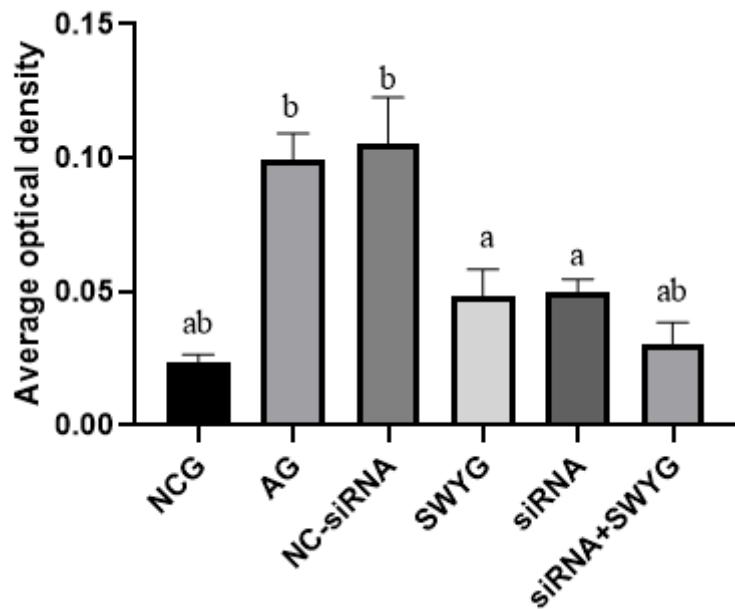


图 3-16 各组生精细胞 Caspase9 平均光密度统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

凋亡小体募集多个 procaspase9 并促进其裂解成活性形式。Western Blot 检测 Caspase9 在生精细胞中蛋白水平上的变化结果如下:

与正常对照组比较, 衰老组 Cleaved caspase9 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组, Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组中 Cleaved caspase9 表达水平低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, 共孵育组 Cleaved caspase9 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组蛋白表达量没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

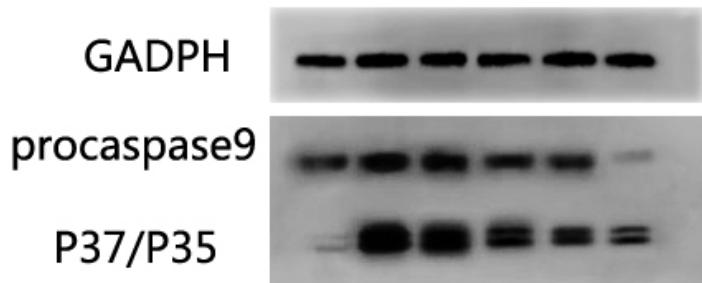


图3-17 Western Blot 检测各实验组生精细胞中 Cleaved caspase 9 蛋白表达量

表3-10 各组生精细胞 Cleaved caspase9 蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	Cleaved caspase9 蛋白表达量
正常对照组	0.583±0.092 <sup>ab</sup>
衰老组	2.480±0.089 <sup>b</sup>
NC-siRNA 转染组	2.415±0.357 <sup>b</sup>
何首乌饮组	1.182±0.095 <sup>a</sup>
Apaf-1-siRNA 干扰组	1.127±0.152 <sup>a</sup>
共孵育组	0.860±0.058 <sup>ab</sup>
F	65.772
P	0.000

注: a代表和衰老组比较, P<0.05; b代表和 Apaf-1-siRNA干扰组比较, P<0.05。

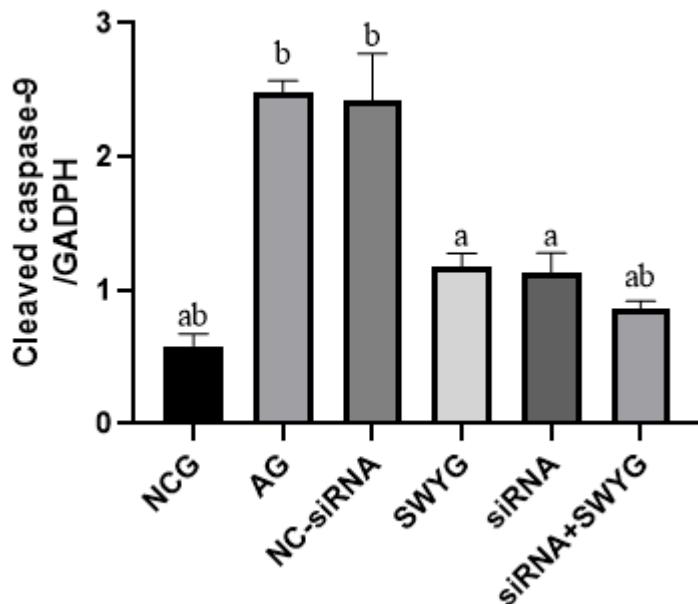


图3-18 生精细胞中 Cleaved caspase 9 相对蛋白表达量统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较, P<0.05; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, P<0.05。

RT-qPCR 结果显示:

与正常对照组比较，衰老组生精细胞 Caspase9 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。何首鸟饮组，Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组中 mRNA 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，共孵育组 Caspase9 mRNA 下调 ( $P < 0.05$ )。何首鸟饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组之间没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表3-11 各组 Caspase9 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	Caspase9 mRNA 表达水平
正常对照组	$0.219 \pm 0.103^{\text{ab}}$
衰老组	$1.012 \pm 0.011^{\text{b}}$
NC-siRNA 转染组	$0.942 \pm 0.050^{\text{b}}$
何首鸟饮组	$0.579 \pm 0.091^{\text{a}}$
Apaf-1-siRNA 干扰组	$0.524 \pm 0.137^{\text{a}}$
共孵育组	$0.407 \pm 0.107^{\text{ab}}$
<i>F</i>	33.091
<i>P</i>	0.000

注：a 代表和衰老组比较， $P < 0.05$ ；b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较， $P < 0.05$ 。

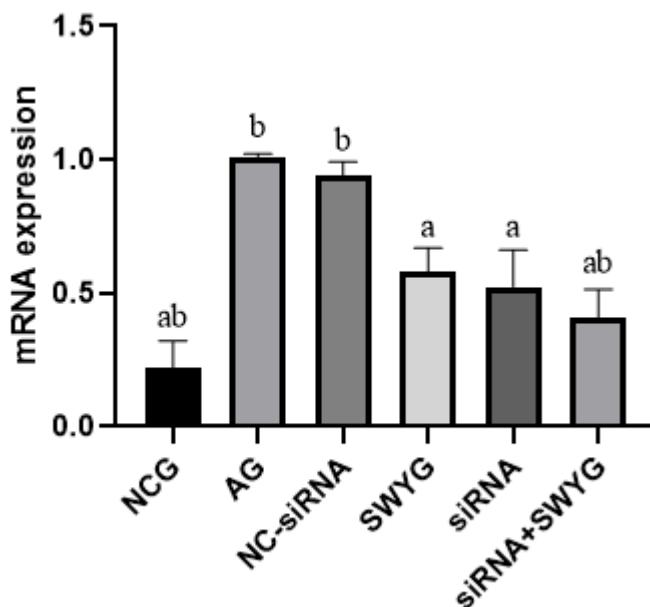


图3-19 生精细胞中 Caspase9 mRNA表达水平统计结果

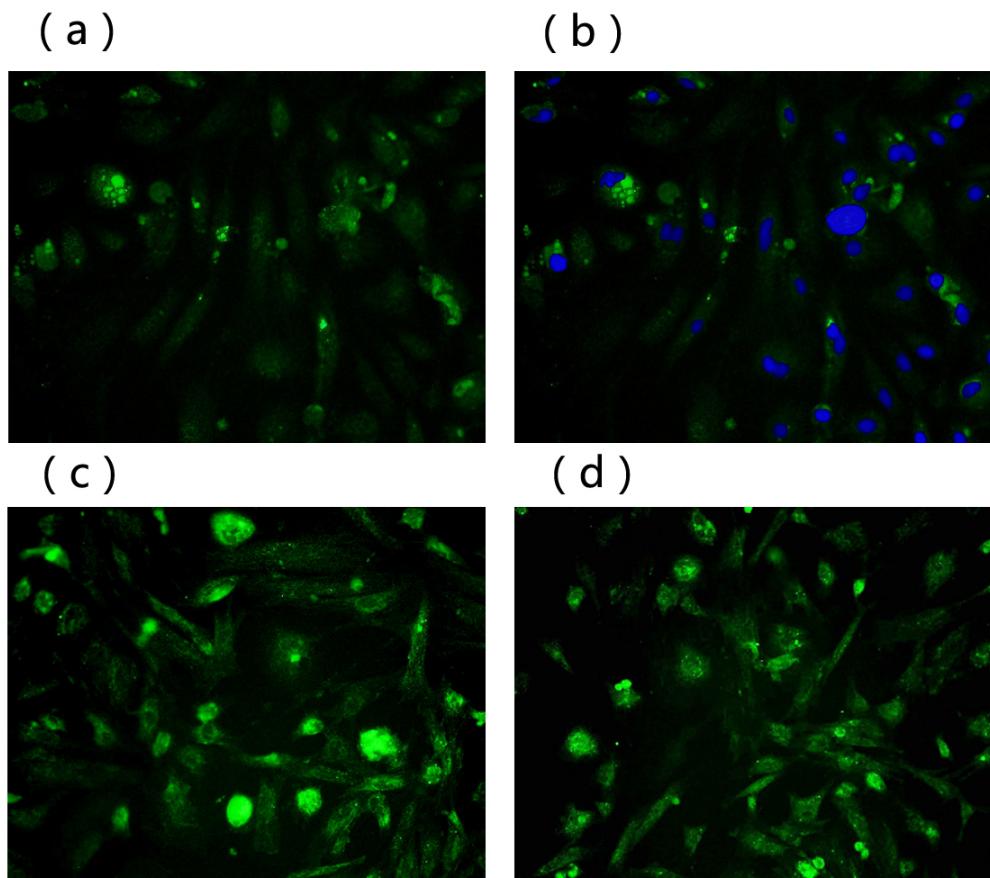
NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;  
SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组  
注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.4.3 各组细胞 Caspase3 的表达水平

采用荧光免疫染色对 Caspase3 进行定位分析。细胞核用 DAPI 复染呈蓝色, 阳性细胞发绿色荧光。结果显示:

与正常对照组比较, 衰老组生精细胞 Caspase3 表达水平上调 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组, Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组中 Caspase3 表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。

NC-siRNA 转染组与衰老组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, 共孵育组 Caspase3 表达量降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组之间没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



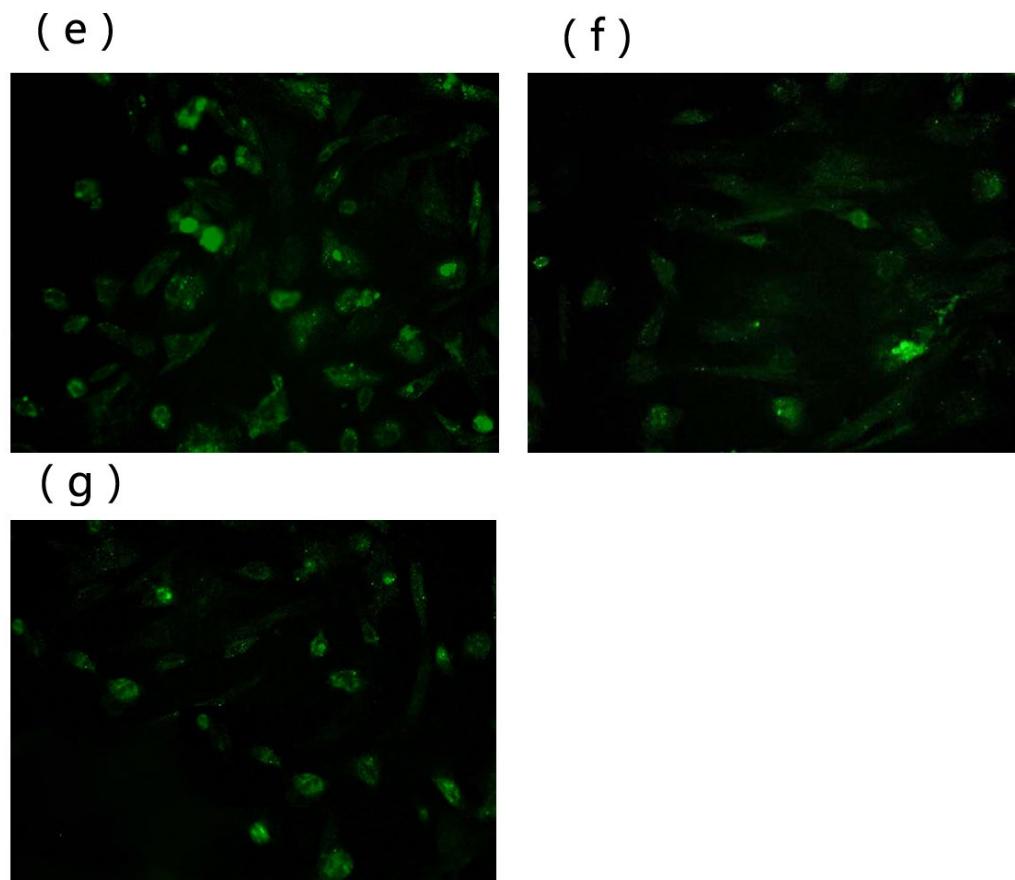


图 3-20 生精细胞 Caspase3 免疫荧光染色 (标尺=50 μm)

(a) 正常对照组; (b) 正常对照组 Merge; (c) 衰老组; (d) NC-siRNA 转染组;  
 (e) 何首乌饮组; (f) Apaf-1-siRNA 干扰组; (g) 共孵育组

表3-12 各实验组生精细胞平均光密度统计学分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase3 平均光密度
正常对照组	$0.026 \pm 0.011^{ab}$
衰老组	$0.100 \pm 0.005^b$
NC-siRNA 转染组	$0.098 \pm 0.009^b$
何首乌饮组	$0.049 \pm 0.010^a$
Apaf-1-siRNA 干扰组	$0.046 \pm 0.014^a$
共孵育组	$0.027 \pm 0.007^{ab}$
<i>F</i>	33.563
<i>P</i>	0.000

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

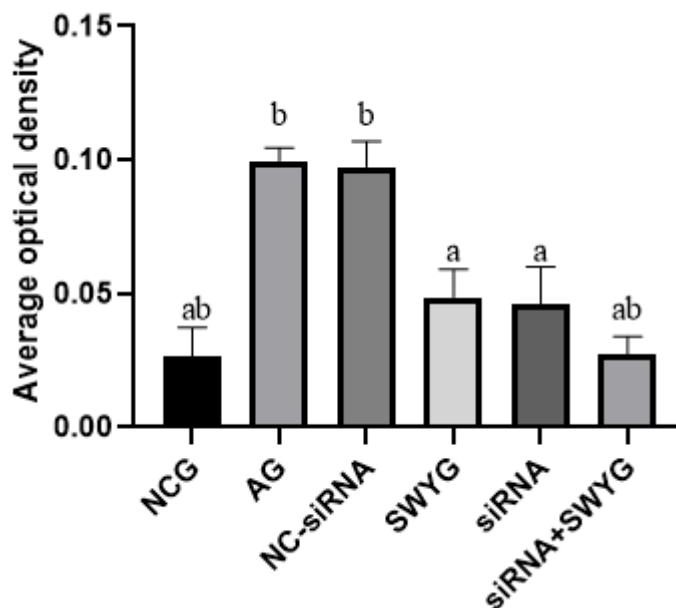


图 3-21 生精细胞 Caspase3 平均光密度统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

在凋亡过程中, procaspase3 裂解为 Caspase3 p20 和 Caspase-3 p17 亚基, Western Blot 检测 Cleaved caspase3 在蛋白水平上的变化, 结果显示:

与正常对照组比较, 衰老组 Cleaved caspase3 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组, Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组中 Cleaved caspase3 蛋白表达低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, 共孵育组 Cleaved caspase3 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组 Cleaved caspase3 蛋白表达无统计学差别 ( $P > 0.05$ )。

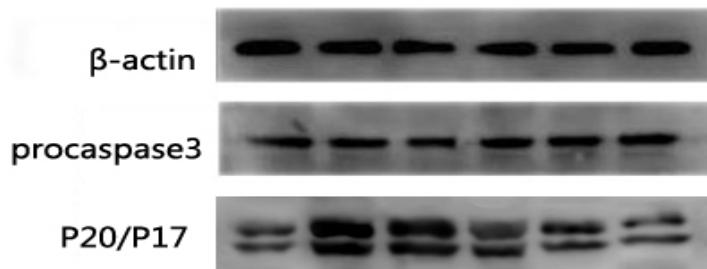


图 3-22 Western Blot 检测各实验组生精细胞中 Cleaved caspase3 蛋白表达

表3-13 各实验组生精细胞 Cleaved caspase3相对蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	Cleaved caspase3 蛋白表达量
正常对照组	0.896±0.067 <sup>ab</sup>
衰老组	1.712±0.085 <sup>b</sup>
NC-siRNA 转染组	1.749±0.036 <sup>b</sup>
何首乌饮组	1.143±0.146 <sup>a</sup>
Apaf-1-siRNA 干扰组	1.120±0.013 <sup>a</sup>
共孵育组	0.963±0.029 <sup>ab</sup>
F	71.864
P	0.000

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

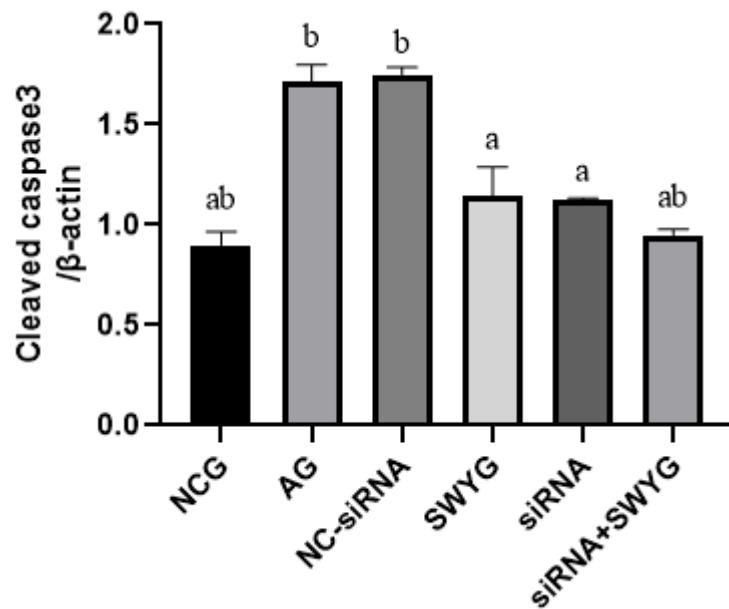


图 3-23 生精细胞中 Cleaved caspase3 蛋白水平统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

RT-qPCR 结果显示:

与正常对照组比较，衰老组生精细胞 Caspase3 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组，Apaf-1-siRNA 干扰组和共孵育组中 mRNA 表达量低于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较，共孵育组 Caspase3 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。何首乌饮组与 Apaf-1-siRNA 干扰组之间没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3-14 各实验组生精细胞 Caspase3 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	mRNA 表达水平
正常对照组	0.366±0.130 <sup>ab</sup>
衰老组	1.012±0.021 <sup>b</sup>
NC-siRNA 转染组	0.997±0.102 <sup>b</sup>
何首乌饮组	0.576±0.129 <sup>a</sup>
Apaf-1-siRNA 干扰组	0.582±0.129 <sup>a</sup>
共孵育组	0.389±0.068 <sup>ab</sup>
F	22.941
P	0.000

注：a 代表和衰老组比较， $P < 0.05$ ；b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较， $P < 0.05$ 。

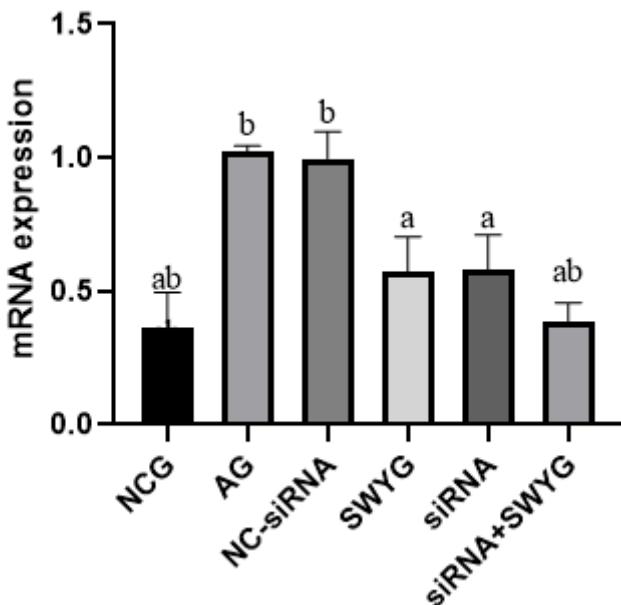


图 3-24 各实验组生精细胞中 Caspase3 mRNA 表达水平统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;  
SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组  
注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

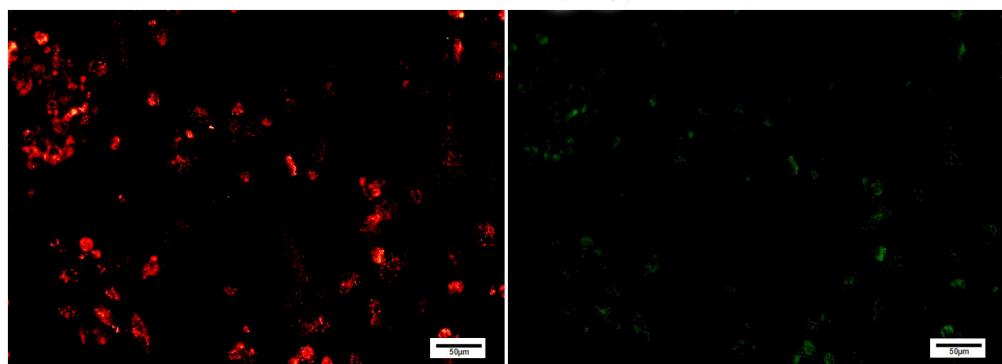
### 3.5 检测生精细胞 MMP 的变化情况

荧光酶标仪检测线粒体膜电位, 结果显示:

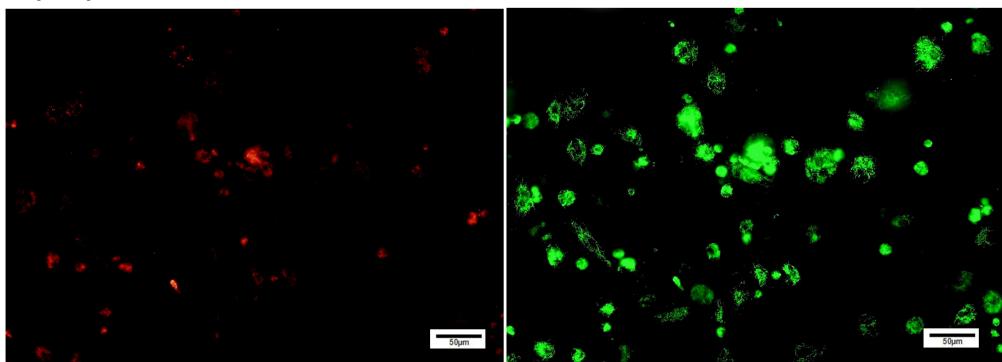
与正常对照组比较, 衰老组线粒体膜电位下调 ( $P < 0.05$ ), 表明衰老组线粒体损伤程度较大。何首乌饮组和共孵育组线粒体膜电位高于衰老组 ( $P < 0.05$ )。NC-siRNA 转染组与衰老组的线粒体膜电位没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 Apaf-1-siRNA 干扰组比较, 共孵育组线粒体膜电位上调 ( $P > 0.05$ )。何首乌饮组与共孵育组线粒体膜电位比较没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

( a )



( b )



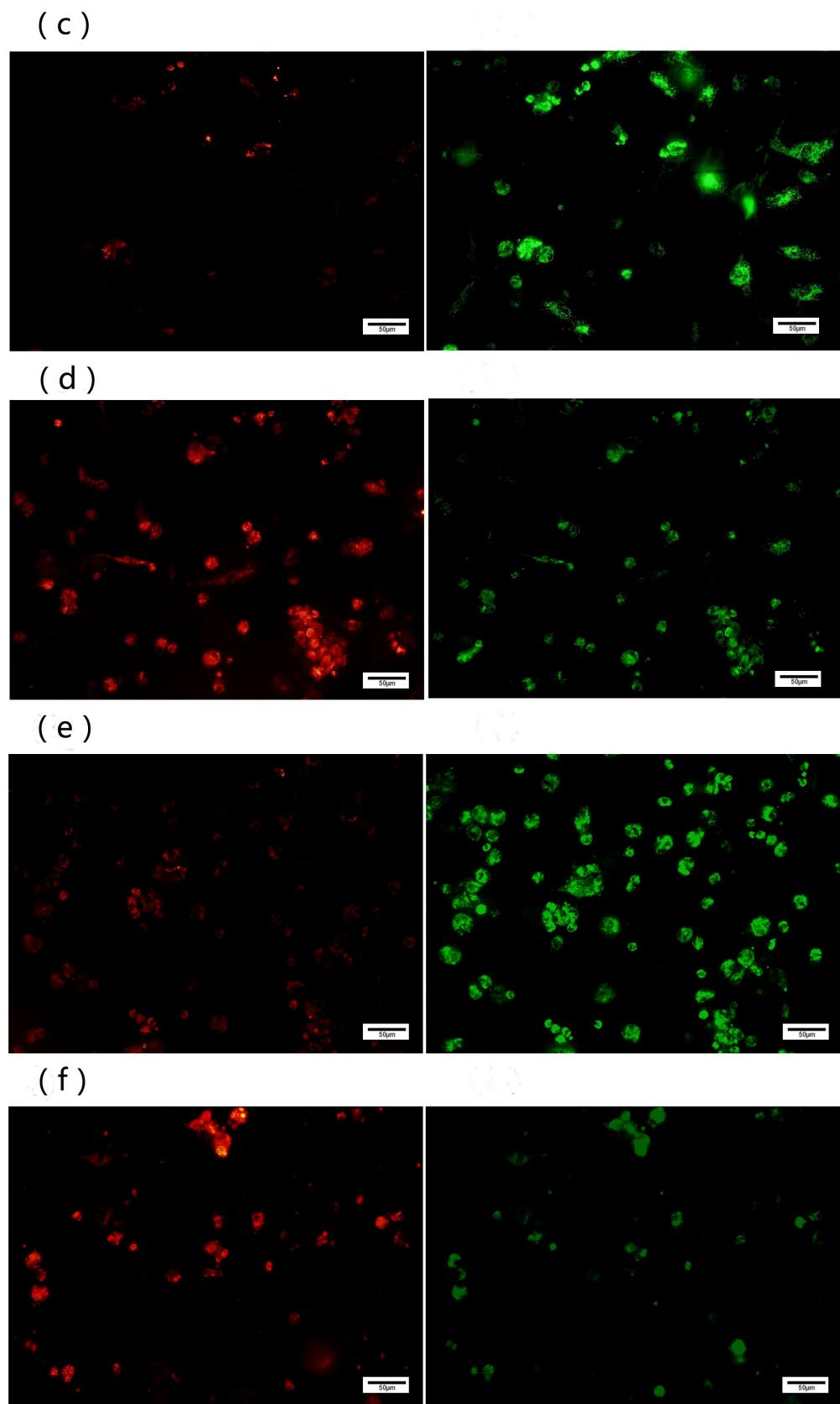


图 3-25 荧光显微镜观察不同处理组的生精细胞

- (a) 正常对照组; (b) 衰老组; (c) NC-siRNA 转染组;  
 (d) 何首乌饮组; (e) Apaf-1-siRNA 干扰组; (f) 共孵育组

表 3-15 荧光酶标仪检测生精细胞线粒体膜电位显著性分析 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	线粒体膜电位
正常对照组	$3.548 \pm 0.458^{ab}$
衰老组	$1.438 \pm 0.221^b$
NC-siRNA 转染组	$1.491 \pm 0.385^b$
何首乌饮组	$2.231 \pm 0.182^{ab}$
Apaf-1-siRNA 干扰组	$1.478 \pm 0.048^a$
共孵育组	$2.417 \pm 0.351^{ab}$
F	21.695
P	0.000

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

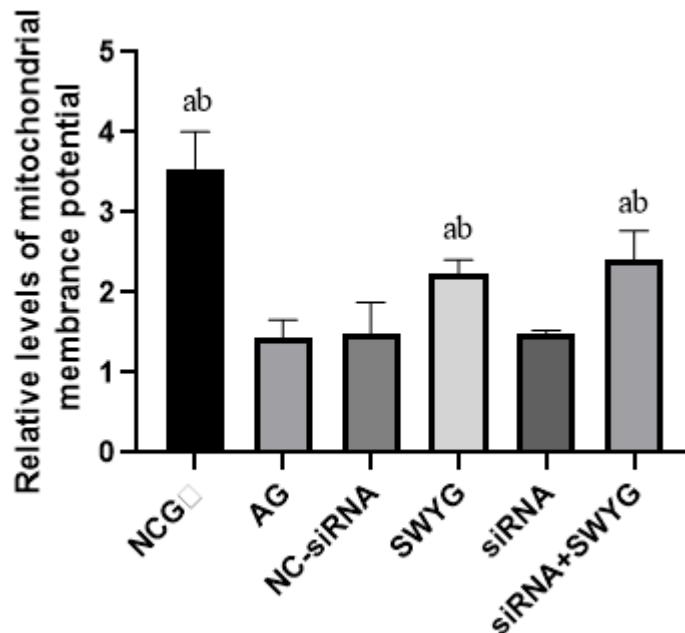


图 3-26 各组生精细胞线粒体膜电位比值统计结果

NCG: 正常对照组; AG: 衰老组; NC-siRNA: NC-siRNA 转染组;

SWYG: 何首乌饮组; siRNA: Apaf-1-siRNA 干扰组; siRNA+SWYG: 共孵育组

注: a 代表和衰老组比较,  $P < 0.05$ ; b 代表和 Apaf-1-siRNA 干扰组比较,  $P < 0.05$ 。

## 第四章 小 结

### 4.1 讨论

现代生活中，由于社会经济等原因，更多人们选择推迟生育后代，老龄化对生殖系统的影响变得日益重要。男性生殖能力与年龄呈负相关，在老化过程中生殖细胞和支持细胞数量减少<sup>[85]</sup>，精子生成能力降低，生精细胞凋亡增加，引发男性不育（如少精症、弱精症和无精子症等）<sup>[86]</sup>。

正常情况下，细胞凋亡对精子发生至关重要，但衰老往往打破精原细胞增殖与凋亡之间的平衡<sup>[87]</sup>。研究表明，老年男性的精原干细胞中 Ki-67（细胞增殖活性的标志物）和细胞凋亡率表达水平均低于青年对照组<sup>[88]</sup>。与精原细胞相反，TUNEL 检测结果表明初级精母细胞的凋亡率与正常对照组比较显著升高，这部分解释了老年男性生殖细胞丧失的机制<sup>[88]</sup>。这种差异可能是由于与年龄相关的精原干细胞生态位的恶化伴随着凋亡精原细胞的代偿性减少<sup>[88]</sup>。最近的一项组织学和超微结构研究结果也显示，细胞凋亡增加，衰老睾丸的生殖细胞增殖减少<sup>[89]</sup>，影响睾丸精子的发生过程，从而影响男性生殖问题<sup>[90]</sup>。

现代技术研究证实，中药在延缓衰老及治疗不孕不育过程中发挥重要作用<sup>[91-93]</sup>，补肾方剂（如促精汤、肾气丸、益精方等）具有抑制生精细胞凋亡的功效<sup>[94-96]</sup>。补肾良药何首乌饮是中国古代名医刘河间经典临床验方何首乌丸优化而成。何首乌丸以何首乌为主药，配以肉苁蓉和怀牛膝，具有乌发延年等抗衰老临床作用。何首乌饮在此基础上，增加了茯苓、淫羊藿和丹参。

我们前期研究已经证明，何首乌饮增强 Leydig 细胞中睾酮合成酶活性，促进睾酮分泌，改善衰老大鼠精子质量<sup>[5]</sup>。何首乌饮能够降低自然衰老大鼠睾丸细胞凋亡率，促进细胞增殖，证实何首乌饮具有抑制衰老大鼠生精细胞凋亡的作用，其作用机制尚不明确<sup>[6]</sup>。

SA- $\beta$ -Gal 是验证组织或细胞是否发生衰老的可靠指标，在衰老细胞中 SA- $\beta$ -Gal 高表达。本研究采用氧化自由基损伤的方法建立了生精细胞衰老模型。近期研究表明，运用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 FeSO<sub>4</sub> 氧化损伤处理 HepG2 细胞，处理组细胞凋亡率和 ROS 水平显著高于对照组。RPP 提取物干预后，能够改善细胞氧化应激损伤并抑制细胞凋亡<sup>[97]</sup>。与其

研究结果一致，衰老组生精细胞 SA- $\beta$ -gal 阳性率高于正常组，这表明成功建立生精细胞衰老模型。与衰老组比较，何首乌饮组 SA- $\beta$ -gal 阳性率下降，这表明何首乌饮在一定程度上延缓生精细胞衰老。

细胞凋亡是衰老导致线粒体功能障碍的重要原因，能够引发线粒体畸变以及细胞死亡途径的激活<sup>[98]</sup>。细胞凋亡可以通过内源性途径和外源性途径诱导<sup>[99]</sup>，内源性细胞凋亡途径是线粒体介导的半胱天冬酶激活途径，而我们前期研究表明何首乌饮抑制生精细胞凋亡可能与线粒体途径相关<sup>[7]</sup>。为了进一步了解何首乌饮抑制衰老大鼠生精细胞凋亡的具体作用机制，我们开展以下研究。

RNA 干扰技术广泛应用于功能分析实验，siRNA 能够高效阻断特异性基因的表达，降解 mRNA 使细胞表现特定基因缺失的表型<sup>[100]</sup>。凋亡复合体的主要成分—凋亡蛋白酶激活因子1（Apoptotic protease activating factor-1，Apaf-1）是线粒体依赖性凋亡途径的关键因素。本实验运用 Apaf-1-siRNA 转染共培养的支持细胞-生精细胞以沉默生精细胞中 Apaf-1 的表达，Apaf-1 的缺失能够阻断线粒体凋亡途径的作用机制。

我们使用荧光标记 Cy3-siRNA 转染共培养的支持细胞-生精细胞，在转染第 48 h 时，Cy3 荧光在生精细胞中表达最强，即当前转染条件下生精细胞的转染效率最高。通过 RT-qPCR 和 Western Blot 检测结果筛选出 siRNA3 序列干扰效率最高。因此，我们选用 siRNA3 序列作为后续实验处理条件。

内源性凋亡途径在人或鼠细胞中被激活时，凋亡刺激因素可通过 Bcl-2 蛋白家族导致其外膜透化（MOMP），促进 Cytc 从线粒体中释放，这一步被认为是引发细胞凋亡的不可逆事件的关键信号<sup>[101-102]</sup>。在 Cytc 和脱氧腺苷三磷酸（dATP）存在的情况下，ATP 结合 Apaf-1 使其寡聚化成 Apaf-1 七聚体<sup>[103]</sup>。Apaf-1 七聚体中暴露的 CARD 结构域与引发剂 procaspase9 相互作用，形成凋亡体全酶<sup>[48]</sup>。一旦形成凋亡体，procaspase9 就会被切割激活，进一步激活刽子手 Caspase，如 Caspase3。半胱天冬酶 3 的活化导致 DNA 片段化和 PARP 裂解，进而触发 Caspase 依赖的凋亡信号级联反应<sup>[104]</sup>。

我们的研究发现，何首乌饮能够降低衰老的生精细胞 Cytc、Caspase3 和 Caspase9 的蛋白和 mRNA 的表达水平。Apaf-1-siRNA 干扰后，生精细胞 Caspase3 和 Caspase9 的蛋白和 mRNA 的表达量显著低于衰老组，而 Cytc 蛋白和 mRNA 在生精细胞中表达水平与衰老组无统计学意义，该结果证明敲低 Apaf-1，抑制凋亡复合体的形成，其下

游促凋亡基因 Caspase9 和 Caspase3 蛋白和 mRNA 的表达水平降低，抑制生精细胞的凋亡；而 Cytc 是 Apaf-1 的上游基因，Apaf-1 敲低对 Cytc 表达无明显作用。但我们的研究结果证实何首乌饮能够降低 Cytc 表达。同时，我们在生精细胞特异性的敲低 Apaf-1 基础上，加入何首乌饮含药血清处理细胞，结果发现共孵育后促凋亡因子 Caspase9, Caspase3 表达水平低于何首乌饮组以及 Apaf-1-siRNA 干扰组，这表明何首乌饮抑制生精细胞凋亡作用与 Cytc/Apaf-1/Caspase 9/Caspase3 传导途径密切相关。但何首乌饮抑制凋亡作用明显强于 Apaf-1-siRNA 干扰组，表明何首乌饮抑制生精细胞凋亡还受其他信号传导通路调节，我们检测了生精细胞凋亡以及线粒体膜电位变化情况，结果也有力的证明了这一点。

## 4.2 结论

何首乌饮可通过 Cytc/Apaf-1/Caspase 9/Caspase3 途径抑制生精细胞凋亡。

## 参考文献

- [1] Kiraz Y, Adan A, Yandim M K, et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 8471-8486.
- [2] 姚重界, 赵琛, 刘世敏. 睾丸中生殖细胞凋亡通路的调节机制研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2018, 24(09):78-84.
- [3] Zhang A, Sun H, Wang X. Potentiating therapeutic effects by enhancing synergism based on active constituents from traditional medicine[J]. Phytother Res, 2014, 28(4): 526-533.
- [4] Yin Q, Lu H, Bai Y, et al. A metabolite of Danshen formulae attenuates cardiac fibrosis induced by isoprenaline, via a NOX2/ROS/p38 pathway[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(23): 5573-5585.
- [5] 郭凯华, 高福禄, 牛嗣云, 等. 何首乌饮对衰老大鼠睾丸组织细胞 Rb/p53 信号转导通路的影响 [J]. 解剖学报, 2010, 41(03): 440-445.
- [6] Niu S, Chen J, Duan F, et al. Possible mechanism underlying the effect of Heshouwuyin, a tonifying kidney herb, on sperm quality in aging rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 250.
- [7] 王建明, 回陈红, 刘昊坤, 等. 何首乌饮对衰老大鼠生精细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 266-268.
- [8] 安福丽, 王玉娟, 刘昊坤, 等. 何首乌饮对衰老大鼠生精细胞线粒体凋亡通路关键基因表达的影响[J]. 解剖学报, 2017 (2017 年 03): 287-295.
- [9] Chen J, Wang Y, Hui C, et al. Mechanisms of Heshouwuyin in regulating apoptosis of testicular cells in aging rats through mitochondrial pathway[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1): 337.
- [10] Bejarano I, Rodríguez A B, Pariente J A. Apoptosis is a demanding selective tool during the development of foetal male germ cells[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 65.
- [11] Kyriakis J M. The integration of signaling by multiprotein complexes containing Raf kinases[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1238-1247.
- [12] Wei N, Serino G, Deng X W. The COP9 signalosome: more than a protease[J]. Trends Biochem Sci, 2008, 33(12): 592-600.
- [13] Morell M, Aviles F X, Ventura S. Detecting and interfering protein interactions: towards the control of biochemical pathways[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(3): 362-379.

## 参考文献

---

- [14] Hikim A P S, Lue Y, Yamamoto C M, et al. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis[J]. Endocrinology, 2003, 144(7): 3167-3175.
- [15] Russell L D, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer S J, et al. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis[J]. Biol Reprod, 2002, 66(4): 950-958.
- [16] Liu T, Wang L, Chen H, et al. Molecular and cellular mechanisms of apoptosis during dissociated spermatogenesis[J]. Front Physiol, 2017, 8: 188.
- [17] Weikert S, Schrader M, Müller M, et al. Expression levels of the inhibitor of apoptosis survivin in testes of patients with normal spermatogenesis and spermatogenic failure[J]. Fertil Steril, 2005, 83(4): 1100-1105.
- [18] Theas M S. Germ cell apoptosis and survival in testicular inflammation[J]. Andrologia, 2018, 50(11): e13083.
- [19] Zeren T, Inan S, Vatansever H S, et al. Significance of apoptosis related proteins on malignant transformation of ovarian tumors: A comparison between Bcl-2/Bax ratio and p53 immunoreactivity[J]. Acta Histochem, 2014, 116(8): 1251-1258.
- [20] Xiong S, Mu T, Wang G, et al. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals[J]. Protein Cell, 2014, 5(10): 737-749.
- [21] Siddiqui W A, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(3): 289-317.
- [22] Kvansakul M, Yang H, Fairlie W D, et al. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(10): 1564.
- [23] Hamamah S, AitAhmed O, et al. Developmental Regulated Expression of Anti- and Pro-Apoptotic BCL-2 Family Genes During Human Early Embryonic Development.[J]. Curr Med Chem, 2014, 21(11): 1361-1369.
- [24] Stegh A H, Brennan C, Mahoney J A, et al. Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor[J]. Genes Dev, 2010, 24(19): 2194-2204.
- [25] Güçlü, Hande, Doganlar Z B , Gürlü, Vuslat Pelitli, et al. Effects of Cisplatin-5-Fluorouracil Combination Therapy on Oxidative Stress, DNA Damage, Mitochondrial Apoptosis, and Death

## 参考文献

---

- Receptor Signalling in Retinal Pigment Epithelium Cells[J]. Cutaneous and Ocular Toxicology, 2018, 37(3): 291-304.
- [26] 王雪维,李燕. Bcl-2、Bax 在青光眼神经节细胞凋亡中的研究进展[J]. 医学综述,2015,21(22):4077-4079.
- [27] Sukhotnik I, Nativ O, Roitbut A, et al. Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat[J]. Pediatr Surg Int, 2013,29(2):179-184.
- [28] Yamamoto C M, Sinha Hikim A P, Huynh P N, et al. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia[J]. Biol Reprod, 2000, 63(6): 1683-1690.
- [29] Yao K , Xing H C , Wu B , et al. Effect of TIEG1 on apoptosis and expression of Bcl-2/Bax and Pten in leukemic cell lines.[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1):1968-74.
- [30] Karaliotas G , Mavridis K , Scorilas A , et al. Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression[J]. Mol Med Rep, 2015.
- [31] Wang L , Gai P , Xu R , et al. Shikonin protects chondrocytes from interleukin-1beta-induced apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling pathway.[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1):298-308.
- [32] Kalia S, Bansal M P. Diethyl maleate-induced oxidative stress leads to testicular germ cell apoptosis involving Bax and Bcl-2[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2008, 22(6): 371-381.
- [33] Zhao L, Gu Q, Xiang L, et al. Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Ther Clin Risk Manag, 2017, 13: 1099-1105.
- [34] Hannibal L, Tomasina F, Capdevila D A, et al. Alternative conformations of cytochrome c: structure, function, and detection[J]. Biochemistry, 2016, 55(3): 407-428.
- [35] Liu X, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c[J]. Cell, 1996, 86(1): 147-157.
- [36] Alvarez-Paggi D, Hannibal L, Castro M A, et al. Multifunctional cytochrome c: learning new tricks from an old dog[J]. Chem Rev, 2017, 117(21): 13382-13460.

## 参考文献

---

---

- [37] Walensky, D L . BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2006, 13(8):1339-1350.
- [38] Repnik U , Cesen M H , Turk B . The Endolysosomal System in Cell Death and Survival[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(1):a008755-a008755.
- [39] Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(3): 369-381.
- [40] Ripple M O, Abajian M, Springett R. Cytochrome c is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(5): 563-573.
- [41] Boehning D, Patterson R L, Sedaghat L, et al. Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(12): 1051-1061.
- [42] Boehning D, Patterson R L, Snyder S H. Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1, 4, 5-trisphosphate[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(3): 250-252.
- [43] Kalpage H A, Bazylanska V, Recanati M A, et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis[J]. *FASEB J*, 2018, 33(2): 1540-1553.
- [44] Elena-Real C A, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, et al. Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3 $\epsilon$ -dependent Apaf-1 inhibition[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 365.
- [45] Li K, Li Y, Shelton J M, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis[J]. *Cell*, 2000, 101(4): 389-399.
- [46] Riedl S J, Li W, Chao Y, et al. Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP[J]. *Nature*, 2005, 434(7035): 926-933.
- [47] Yu X, Acehan D, Ménétret J F, et al. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform[J]. *Structure*, 2005, 13(11): 1725-1735.
- [48] Bratton S B, Salvesen G S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(19): 3209-3214.
- [49] Ferraro E, Pesaresi M G, De Zio D, et al. Apaf1 plays a pro-survival role by regulating centrosome morphology and function[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(20): 3450-3463.

## 参考文献

---

---

- [50] Gogada R, Amadori M, Zhang H, et al. Curcumin induces Apaf-1-dependent, p21-mediated caspase activation and apoptosis[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(23): 4128-4137.
- [51] Miyazaki K, Yoshida H, Sasaki M, et al. Caspase-independent cell death and mitochondrial disruptions observed in the Apaf1-deficient cells[J]. *J Biochem*, 2001, 129(6): 963-969.
- [52] Gortat A, Sancho M, Mondragón L, et al. Apaf1 inhibition promotes cell recovery from apoptosis[J]. *Protein cell*, 2015, 6(11): 833-843.
- [53] Pérez-Payá E, Orzaez M, Mondragon L, et al. Molecules that modulate Apaf-1 activity[J]. *Med Res Rev*, 2011, 31(4): 649-675.
- [54] Hou L, Zhang Y, Yu B, et al. Oocyte-G1 promotes male germ cell apoptosis through activation of Caspase-3[J]. *Gene*, 2018, 670: 22-30.
- [55] Larsen B D, Sørensen C S. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond[J]. *FEBS J*, 2017, 284(8): 1160-1170.
- [56] Kutscher L M, Shaham S. Non-apoptotic cell death in animal development[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(8): 1326..
- [57] Khalil H, Bertrand M J M, Vandenabeele P, et al. Caspase-3 and RasGAP: a stress-sensing survival/demise switch[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(2): 83-89.
- [58] Mirzayans R, Andrais B, Kumar P, et al. The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: caspase 3 mediates cell death or survival?[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 708.
- [59] Alam S A, Oshima T, Suzuki M, et al. The expression of apoptosis-related proteins in the aged cochlea of Mongolian gerbils[J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(3): 528-534.
- [60] Ranger A M, Malynn B A, Korsmeyer S J. Mouse models of cell death[J]. *Nature genetics*, 2001, 28(2): 113.
- [61] MukherjeeA, HalderC, VishwasDK. Melatonin prevents dexamethasone-induced testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in golden hamster, *M esocricetus auratus*[J]. *Andrologia*, 2015, 47(8): 920-931.
- [62] Pu H, Su L, Miao N, et al. Involvement of Bax and caspase-9 in heroin-induced apoptosis in cerebellar granule neurons via C-Jun pathway activation[J]. *IntJ Clin Exp Pathol*, 2016, 9(2): 773-788.

## 参考文献

---

---

- [63] Pop C, Timmer J, Sperandio S, et al. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization[J]. Mol Cell, 2006, 22(2): 269-275.
- [64] Renatus M, Stennicke H R, Scott F L, et al. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25): 14250-14255.
- [65] Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead H O, et al. The Apaf-1• procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer[J]. EMBO J, 2009, 28(13): 1916-1925.P.
- [66] Saikumar P, Mikhailova M, Pandeswara S L. Regulation of caspase-9 activity by differential binding to the apoptosome complex[J]. Front Bio sci, 2007, 12: 3343.
- [67] Shiozaki E N, Chai J, Rigotti D J, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9[J]. Mol Cell, 2003, 11(2): 519-527.
- [68] Acehan D, Jiang X, Morgan D G, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation[J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 423-432.
- [69] Würstle M L, Laussmann M A, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(11): 1213-1220.
- [70] Kuida K, Haydar T F, Kuan C Y, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9[J]. Cell, 1998, 94(3): 325-337.
- [71] Suominen JS, Yan W, Toppari J, Kaipia A (2001) The expression and regulation of Bcl-2-related ovarian killer (Bok) mRNA in the developing and adult rat testis. Eur J Endocrinol 145: 771-778.
- [72] Araujo A B, Wittert G A. Endocrinology of the aging male[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011, 25(2): 303-319.
- [73] Ruwanpura S M, McLachlan R I, Meachem S J. Hormonal regulation of male germ cell development[J]. Endocrinology, 2010, 205(2): 117-131.
- [74] Shah C. Modulators of spermatogenic cell survival[J]. Soc Reprod Fertil Suppl , 2007, 63: 173-186.
- [75] Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 109(3-5): 323-330.
- [76] Hermann M, Untergasser G, Rumpold H, et al. Aging of the male reproductive system[J]. Exp Gerontol, 2000, 35(9-10): 1267-1279.

## 参考文献

---

---

- [77] Pareek T K, Joshi A R, Sanyal A, et al. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(6): 1085-1100.
- [78] Tesarik J , Martinez F , Rienzi L , et al. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(7):1811-1819.
- [79] Chausiaux O E, Abel M H, Baxter F O, et al. Hypogonadal mouse, a model to study the effects of the endogenous lack of gonadotropins on apoptosis[J]. *Biol Reprod*, 2008, 78(1): 77-90.
- [80] Ruwanpura S M, McLachlan R I, Stanton P G, et al. Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats[J]. *Biol Reprod*, 2008, 78(4): 705-713.
- [81] Bellvé A R, Millette C F, Bhatnagar Y M, et al. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells[J]. *J Histochem Cytochem*, 1977, 25(7): 480-494.
- [82] He Y, Chen X, Zhu H, et al. Developments in techniques for the isolation, enrichment, main culture conditions and identification of spermatogonial stem cells[J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(6): 921-930.
- [83] Pariante P, Dotolo R, Venditti M, et al. First Evidence of DAAM1 Localization During the Post-Natal Development of Rat Testis and in Mammalian Sperm[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(10): 2172-2184.
- [84] Pramod R K , Mitra A . In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (*Capra hircus*)[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2014, 31(8):993-1001.
- [85] Gunes S, Hekim G N T, Arslan M A, et al. Effects of aging on the male reproductive system[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(4): 441-454.
- [86] Murphy L O, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time[J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(5): 268-275.
- [87] Schmid T E, Eskenazi B, Baumgartner A, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers[J]. *Hum Reprod*, 2006, 22(1): 180-187.
- [88] Kimura M et al. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men[J]. *J Androl*. 2003;24(2):185-91.

## 参考文献

---

---

- [89] Jiang H, Zhu W J, Li J, et al. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis[J]. Int Urol Nephrol, 2014, 46(5): 879-885.
- [90] 张长城, 贾亮亮, 李守超, 等. 淫羊藿总黄酮对环磷酰胺致小鼠生精障碍保护作用的研究[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2052-2055.
- [91] 董竞成, 吴金峰, 张红英, 等. 从补肾益气法的理论研究及临床应用浅释中医“异病同治”, 中国中西医结合杂志[J]. 2013, 33(5): 695-700.
- [92] Zhu Z , Feng H , Feng W , et al. Morinda Officinalis\, Polysaccharides Stimulate Hypothalamic GnRH Secretion in Varicocele Progression[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:1-12.
- [93] Wen W, Chen J, Ding L, et al. Astragaloside exerts anti-photoaging effects in UVB-induced premature senescence of rat dermal fibroblasts through enhanced autophagy[J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 657: 31-40.
- [94] 王力, 陈东, 闵泽, 等. 益精方对不育症大鼠睾丸生精细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(5): 602-605.
- [95] 喻国华, 赵智英, 项豪华, 等. 促精汤对小鼠生精细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 162-165.
- [96] 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, v.34(04): 994-995.
- [97] Zhuang Y , Ma Q , Guo Y , et al. Protective effects of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peel phenolics on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damages in HepG2 cells and d-galactose-induced aging mice[J]. Food Chem Toxicol, 2017:S0278691517300303.
- [98] Vajapey R, Rini D, Walston J, et al. The impact of age-related dysregulation of the angiotensin system on mitochondrial redox balance[J]. Front Physiol, 2014, 5: 439.
- [99] Ashkenazi A, Fairbrother W J, Leverton J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(4): 273.
- [100] Schwartz E I. Potential application of RNAi for understanding and therapy of neurodegenerative diseases[J]. Front Bio sci, 2009, 14: 297-320.

## 参考文献

---

---

- [101] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(12): 2977-2992.
- [102] Mohan C, Sikka S C. Chapter 20-Role of Environmental Toxicants in Sperm Autophagy, Mitophagy, and Apoptosis[J]. *Bioenvironmental Issues Affecting Mens Reproductive & Sexual Health*, 2018:323-333.
- [103] Riedl S J, Salvesen G S. The apoptosome: signalling platform of cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2007, 8(5): 405.
- [104] Yuan S, Yu X, Asara J M, et al. The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3[J]. *Structure*, 2011, 19(8): 1084-1096.

## 致 谢

回顾这三年的研究生生活，心中思绪万千，倍感充实。首先应该感谢的是我的研究生导师牛嗣云教授，师者所以传道授业解惑也，从最初选题，开题，实验思路，研究过程以及最后的答辩，牛教授总是能够清晰的给我指明方向，帮我理清思路，寻找突破，给予我指导性意见和灵感，引导我沿着正确的方向前进，少走弯路。在与您短短三年时间的相处中，您让我收获了太多，必将终身受益，在此向您致以诚挚的感谢。

感谢河北大学 16 级药理学的所有同学。我们来自五湖四海，为了学业聚集到河北大学，一起学习，一起生活，一起进步，一起成长。是你们给我枯燥单调的学习生活带来乐趣，更谢谢你们使我获得了最珍贵的友谊。有你们的陪伴，让我的研究生生活并不感到孤单。感谢我的舍友金同同、陈兰玉、徐凯悦、江芮还有同一课题组的小伙伴庞云瑞、段豫磊、朱娟以及已经毕业参加工作的师姐孙静。在研究过程中遇到疑惑，实验过程中遇到难题时，和你们一起探讨，一起交流。在你们的帮助和支持下，我才能克服各种疑惑和困难，顺利完成实验。还要感谢我的家人，感谢你们对我精神和物质上的支持与帮助，体谅和理解我不能每天陪伴在你们身边，你们的默默支持和无私奉献成为我前进的动力，你们是我最坚实的后盾，浓浓的亲情让我可以没有后顾之忧的全身心投入到学习中，顺利完成学业，今后的日子中，我会更加努力奋斗来回报你们。

## 攻读硕士期间取得的学术成果

- [1] 单博颖, 薛亚然等. 何首乌饮对生精细胞 p53 Bcl2 和 BAX mRNA 表达的影响[J]. 承德医学院学报 .
- [2] 孙静, 庞云瑞, 单博颖等. 松果菊苷对大鼠 Leydig 细胞衰老模型 AXL 和 wnt2b 基因的影响[J]. 中国老年学杂志.