

人参皂苷Rg1拮抗D-半乳糖致睾丸间质细胞雄激素分泌障碍的机制研究

向叶舟^{1,2} 汪子铃¹ 肖含先¹ 侯吉颖¹ 向玥¹ 姜蓉¹ 王璐¹ 黄国宁² 王亚平^{1*}

(¹重庆医科大学, 干细胞与组织工程研究室, 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016;

²重庆市妇幼保健院生殖与遗传研究所, 重庆 400013)

摘要 该文重点探讨人参皂苷Rg1拮抗D-半乳糖(D-gal)致小鼠睾丸间质细胞分泌雄激素障碍的机制。采用D-gal构建小鼠衰老模型, 体内注射Rg1干预衰老过程, 观察睾丸组织细胞衰老的病理学改变; 体外构建D-gal致睾丸间质细胞(TM3细胞株)衰老模型, 在培养体系加入Rg1拮抗D-gal的致衰老作用。衰老相关半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色观察小鼠睾丸组织细胞和体外培养TM3细胞的衰老情况; ELISA法检测TM3细胞分泌睾酮水平和细胞氧化应激损伤水平; 荧光探针DCFH-DA检测细胞活性氧(ROS)水平; Western blot检测TM3细胞合成睾酮的关键酶和Nrf2/ARE抗氧化通路相关蛋白表达; qRT-PCR法检测相关炎症因子及睾酮合成关键酶基因的mRNA表达。结果显示, 注射Rg1拮抗D-gal致小鼠衰老过程, 衰老的睾丸间质细胞数量明显减少。Rg1体外拮抗D-gal致TM3细胞衰老作用后, 细胞分泌睾酮水平无显著降低; *IL-1*、*IL-6*、*IL-8*等炎症因子的基因表达受到抑制; 细胞内GSH-Px和CAT表达活性提高同时细胞产生丙二醛(MDA)与活性氧(ROS)能力受到抑制; StAR、 β -HSD及P450scc等睾酮合成关键酶基因及蛋白表达上调; Nrf2、HO-1等抗氧化蛋白表达上调, Keap1蛋白表达下调。研究提示, Rg1可能通过激活Nrf2/ARE抗氧化信号通路, 拮抗D-gal对睾丸间质细胞的氧化应激损伤, 进而调控睾丸雄激素的分泌功能。

关键词 人参皂苷Rg1; 睾丸间质细胞; Nrf2/ARE信号通路; D-半乳糖

Mechanism of Ginsenoside Rg1 Antagonizing the Secretion Disorder in Leydig Cells Induced by D-galactose

XIANG Yezhou^{1,2}, WANG Ziling¹, XIAO Hanxianzhi¹, HOU Jiying¹, XIANG Yue¹,

JIANG Rong¹, WANG Lu¹, HUANG Guoning², WANG Yaping^{1*}

(¹Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Reproductive and Genetic Institute, Chongqing Health Center for Women and Children, Chongqing 400013, China)

Abstract This article aims to explore the mechanism of ginsenoside Rg1 antagonizing D-gal (D-galactose) on androgen secretion disorders in mouse Leydig cells. A mouse aging model was constructed by D-gal, with Rg1 injected *in vivo* to interfere with the aging process for observing the pathological changes of testicular tissues. According to the aging model of testicular stromal cells (TM3 cell line) induced by D-gal *in vitro*, Rg1 was added into the culture system to antagonize the aging effect of D-gal. The aging of mice testicular cells and TM3 cells cultured

收稿日期: 2021-02-24 接受日期: 2021-05-10

国家自然科学基金(批准号: 81873103)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13101206763, E-mail: ypwangcq@aliyun.com

Received: February 24, 2021 Accepted: May 10, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81873103)

*Corresponding author. Tel: +86-13101206763, E-mail: ypwangcq@aliyun.com

in vitro was observed by SA- β -Gal staining. The levels of testosterone secreted by TM3 cells and oxidative stress injury factors were detected by ELISA. Fluorescent probe DCFH-DA was used to detect the level of the ROS (reactive oxygen species). The expression of the key enzymes of testosterone synthesis and Nrf2/ARE pathway related proteins was detected by Western blot. mRNA expression of the key enzymes of testosterone synthesis and inflammatory factors was evaluated by qRT-PCR. The results showed that Rg1 injection could interfere with the aging process caused by *D*-gal, the senescent cells in the interstitium of the testes were significantly reduced. The addition of Rg1 *in vitro* could antagonize the aging effect of *D*-gal, and the secretion of testosterone in TM3 cells was not significantly reduced. The expression of *IL-1*, *IL-6*, *IL-8* and other inflammatory factors was inhibited; the activity of GSH-Px and CAT in TM3 cells were increased, while the capability of cells producing MDA (malondialdehyde) and ROS was inhibited. The expression of genes and proteins of the key enzymes in testosterone synthesis, such as StAR, 3 β -HSD and P450_{scc}, was up-regulated. The antioxidant proteins such as Nrf2, HO-1 were up-regulated, while Keap1 was down-regulated. The results suggested that Rg1 might antagonize the oxidative stress injury to Leydig cells induced by *D*-gal through activating the Nrf2/ARE antioxidant signaling pathway, thus regulating the secretory function of the testis.

Keywords ginsenoside Rg1; Leydig cells; Nrf2/ARE pathway; *D*-gal (*D*-galactose)

衰老生物学与延缓衰老是当今生命科学与社会科学高度关注的研究领域^[1]。睾丸是男性生殖腺,是精子发生和雄性激素产生的器官,也是较早发生衰老的器官之一。人参是中医临床的“补气”要药,人参皂苷Rg1是其重要的抗衰老有效成分,它有清除自由基、抗炎、抗衰老的作用^[2-4]。*D*-半乳糖(*D*-gal)是公认的氧化致衰剂,常用于构建动物衰老模型及细胞体外衰老模型^[5]。我们既往研究证明,人参皂苷Rg1能拮抗*D*-gal对小鼠的致衰老过程,对睾丸损伤具有明确的保护作用,且能阻止衰老小鼠雄性激素分泌量下降,但机制尚不明确^[6]。睾丸间质细胞(Leydig)是合成与分泌雄激素的细胞,它对促进精子发生和维系男性生殖功能至关重要。人参皂苷Rg1能否拮抗*D*-gal减轻Leydig细胞损伤和致衰老的作用尚不清楚,本文以实验小鼠及Leydig细胞株(TM3细胞)为研究对象,探讨了Rg1拮抗*D*-gal致睾丸间质细胞产生雄激素障碍的机制。

1 材料和方法

1.1 抗体和试剂

人参皂苷 Rg1(CAS号: 22472-39-0; 纯度为 98.3%)购自成都曼斯特生物科技有限公司。*D*-gal(纯度>99%)购自上海生物工程有限公司。过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和衰老相关的 β -半乳糖苷酶(senescence-associ-

ated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司。 β -actin抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,其余抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 小鼠衰老模型的建立与分组

6~8周雄性 C57BL/6J 小鼠购自重庆医科大学动物实验中心,动物合格证号: SYXK(渝)2018-0003。动物实验经重庆医科大学伦理委员会审查批准。动物饲养在 SPF 级实验室,自然光照,自由饮水和摄食。40 只小鼠随机分为 4 组,每组 10 只。*D*-gal 衰老模型组: 给小鼠腹腔注射 *D*-gal(200 mg/kg), 连续注射 42 天; Rg1 干预衰老模型组: 按 *D*-gal 衰老模型组处理小鼠, 从建模第 16 天起腹腔注射 Rg1(40 mg/kg), 连续注射 26 天; 对照组: 腹腔注射等量生理盐水 42 天; Rg1 对照组: 按对照组处理小鼠 16 天, 再腹腔注射 Rg1(剂量同 Rg1 干预衰老模型组)。衰老建模过程中每天观察记录各组小鼠生物学表现(包括小鼠精神状态, 活动能力, 毛色, 饮食与饮水量, 大便情况等, 并测定体质量)。建模与药物干预完成后第 2 天检测相关指标。

1.3 睾丸指数计算与组织病理学观察

建模与给药完成后第 2 天, 称体质量(g), 颈椎脱臼处死小鼠, 快速取出睾丸称湿重(g), 睾丸指数=睾丸重量(g)/体质量(g)。4%多聚甲醛固定睾丸 24 h, 梯度酒精脱水后, 石蜡包埋, 制备 5~8 μ m 组织切片, 苏木素和伊红染色(HE 染色), 中性树脂封片, 光镜采集

图像分析。用SA- β -Gal染色组织切片, 光镜观察切片, Image-ProPlus图像分析软件分析结果。

1.4 睾丸Leydig细胞培养与分组

睾丸Leydig细胞系(TM3)由重庆金麦生物技术有限公司提供。在含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基和5% CO₂、37 °C条件下培养传代。培养细胞分为: 对照组, 常规培养基培养; Rg1组, 常规培养基中加入Rg1(50 μ mol/L); D-gal组, 常规培养基中加入D-gal(166 mmol/L); Rg1+D-gal组, 在D-gal处理24 h后再加入Rg1干预24 h。

1.5 细胞培养上清液中睾酮的测定

按1.4分别处理各组细胞48 h, 换用无血清无酚红培养基培养24 h, 收集培养上清液。按照ELISA试剂盒说明书检测各组细胞分泌的睾酮(testosterone, T)浓度。

1.6 氧化与抗氧化指标检测

收集各组细胞, 制备细胞匀浆, 离心(10 000 \times g、4 °C、20 min)后取上清液, 根据GSH-Px、CAT及MDA检测试剂盒说明书, 通过化学比色法分析评估了GSH-Px活性、CAT活性和MDA含量。以每孔 1×10^6 个细胞密度制备6孔板细胞爬片。使用氧化敏感型荧光探针DCFH-DA作为细胞装载探针, 探针进入细胞后被细胞内的酯酶水解为DCFH, 进而被细胞内的活性氧化成为产生荧光的DCF。检测荧光强度从而确定细胞内活性氧的水平。

1.7 SA- β -Gal染色检测细胞衰老

制备细胞爬片, 4%多聚甲醛室温固定细胞15 min, PBS清洗爬片3次, 置37 °C、pH6的SA- β -Gal染色液中孵育过夜, 在光学显微镜下观察染成蓝色的衰老细胞。

1.8 Western blot检测细胞相关蛋白水平

采用8%~10%的Tris-HCL SDS-PAGE凝胶分离40 μ g

各组细胞的蛋白质, 并将其转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h后, 将膜用稀释(1:1 000)后的一抗孵育过夜。然后与二抗(1:10 000)室温孵育1 h。通过蛋白质化学发光检测系统进行可视化分析。

1.9 qRT-PCR法检测相关mRNA水平

在TRIzol试剂中裂解各组TM3细胞, 提取RNA, 离心(12 000 \times g、4 °C、5 min)后使用70%乙醇洗涤。将RNA沉淀溶解于DEPC水中, 浓度和纯度使用紫外分光光度计(Eppendorf Bio Photometer plus, 德国)进行测定。根据说明书使用TaKaRa反转录试剂盒从1 μ g RNA中合成cDNA。使用GAPDH作为对照基因。使用SYBR Green(日本TaKaRa, 货号RR420A)和Taqman化学试剂(日本TaKaRa, 货号RR390A)的PCR体系。扩增条件如下: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共进行40个循环; 最后在72 °C下延伸7 min。以GAPDH作为内参基因, 根据公式: $\Delta Cq = Cq(\text{目的基因}) - Cq(\text{内参基因})$, 计算目的基因的相对mRNA表达水平。

1.10 统计分析

数据使用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用GraphPad 3.0软件进行统计, 当数据服从正态分布时, 使用单因素方差分析进行统计, 然后进行t检验; 当数据不服从正态分布时, 进行Kruskal-Wallis检验。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠衰老生物学动态情况

随着D-gal注射时间和累计剂量增加, 衰老模型组小鼠毛发逐渐粗糙, 毛色晦暗, 精神萎靡, 活动能力下降, 进食较少, 大便稀溏, 体质量增加缓慢(图1), 表

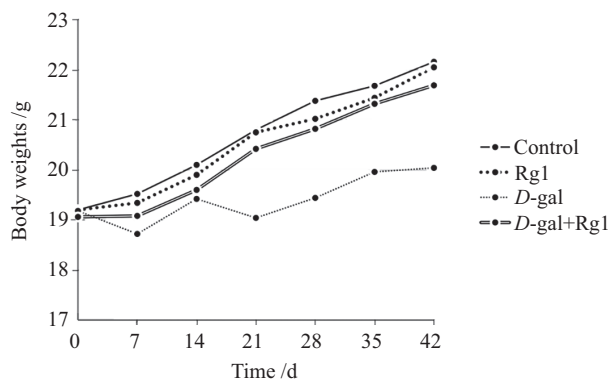


图1 造模期间各组小鼠体质量变化

Fig.1 Body weights of mice in each group during the process of modeling

现出典型的自然衰老体征, 其余3组无明显衰老体征。

2.2 Rg1拮抗D-gal对睾丸组织病理学的影响

各组睾丸大体形态或器官指数无显著差异(*D-gal*衰老模型组: 0.0064 ± 0.00029 ; Rg1干预衰老模型组: 0.0061 ± 0.0017 ; Rg1对照组: 0.0060 ± 0.0005 ; 对照组: 0.0066 ± 0.00014)(图2)。组织病理学检查显示, 各组睾丸生精小管上皮完整, 生精细胞排列规则, 各级生精细胞未见明显变化(图3)。

2.3 Rg1拮抗D-gal对睾丸组织细胞衰老的影响

衰老细胞SA- β -Gal染色呈蓝色。SA- β -Gal染色阳性细胞的相对光密度(ROD)值分析结果表明, 与对照组相比较, *D-gal*衰老模型组SA- β -Gal染色的ROD值明显增加; 与*D-gal*衰老模型组相比较, Rg1干预衰老模型组SA- β -Gal染色的ROD值显著降低(图4A和图4B)。这提示, Rg1可以拮抗*D-gal*对睾丸组织

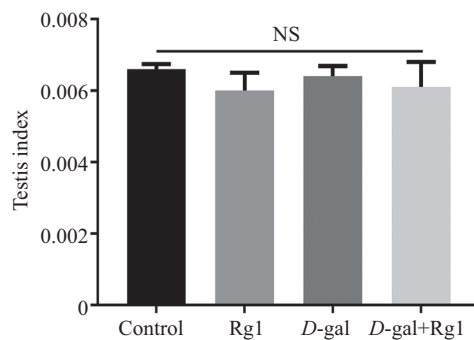
细胞致衰老的作用。

2.4 Rg1拮抗D-gal对致衰TM3细胞分泌睾酮的影响

结果表明, *D-gal*组TM3细胞培养上清液中睾酮的水平显著降低。经Rg1干预后, TM3细胞培养上清中睾酮水平的降低得到抑制(图5)。

2.5 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞的致衰作用及其相关炎症因子基因表达的影响

结果表明, *D-gal*可诱导TM3细胞衰老(SA- β -Gal染色阳性细胞数明显升高), Rg1干预衰老过程后, 衰老TM3细胞数明显下降(图6A)。*D-gal*诱导TM3细胞衰老, 其*IL-1*、*IL-6*、*IL-8*、*MMP3*和*MMP12*基因表达明显升高, 提示在*D-gal*诱导TM3细胞衰老过程中炎症反应的因子明显活化。Rg1干预后炎症因子表达显著下降, 提示经Rg1干预后, *D-gal*诱导TM3细胞炎症反应受到抑制(图6B)。

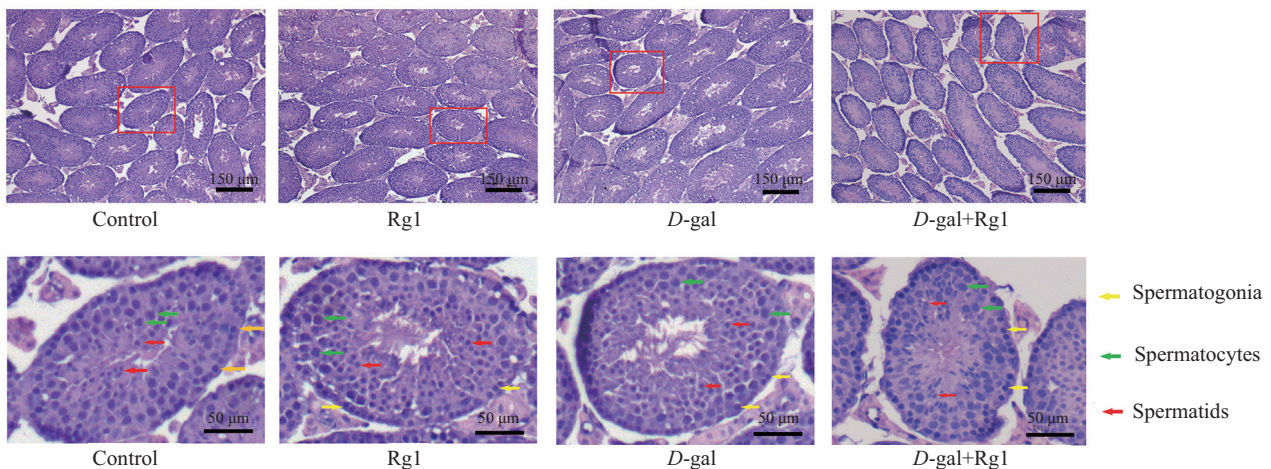


NS: 无显著差异。

NS means no significant.

图2 各组小鼠睾丸指数统计图

Fig.2 Testis index of different groups of mice

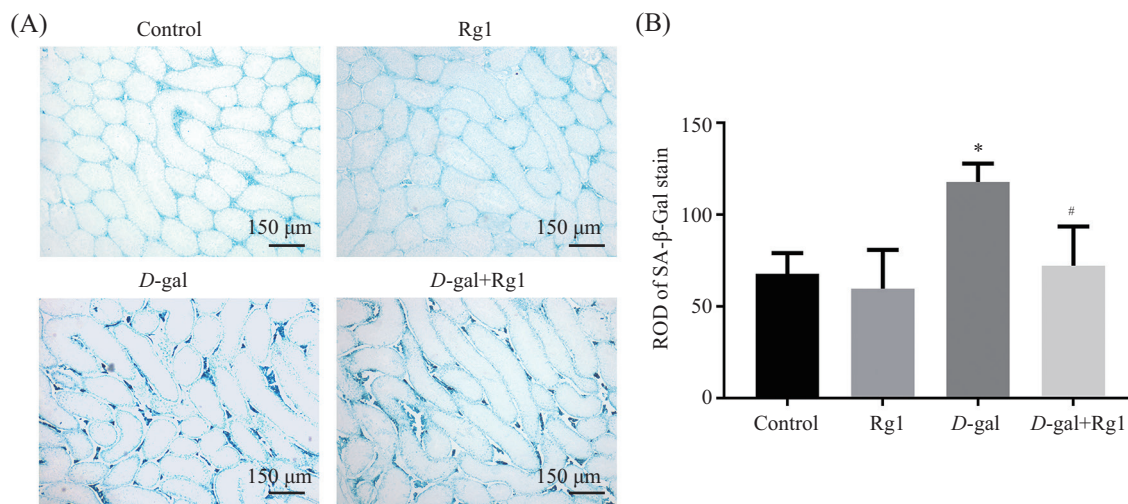


红色方框表示生精小管在下图放大显示。

Red boxes indicate the seminiferous tubules are enlarged to show in the figures below.

图3 各组睾丸组织形态学

Fig.3 Histologic structures of different groups of testes

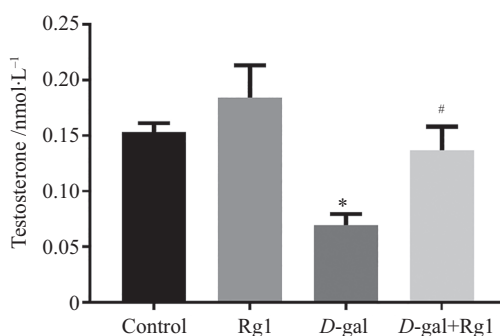


A: 各组睾丸细胞衰老SA-β-Gal染色; B: 衰老染色统计图。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与D-gal组比较。

A: cell aging SA-β-Gal staining of different groups of testes; B: statistics graph of aging staining. * $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the D-gal group.

图4 Rg1对D-gal诱导睾丸细胞衰老的影响

Fig.4 Effect of Rg1 on cell aging of testes induced by D-gal



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与D-gal组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the D-gal group.

图5 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞分泌睾酮的影响

Fig.5 Effect of Rg1 on testosterone secretion in TM3 cells induced by D-gal

2.6 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞氧化应激损伤的影响

结果表明, D-gal组TM3细胞的ROS生成明显增加, CAT与GSH-Px活性明显降低, MDA水平明显升高, 提示细胞抗氧化能力明显下降, 而氧化应激的产物显著增加。Rg1干预TM3细胞衰老过程后, ROS生成减少(图7A和图7B), CAT和GSH-Px活性显著恢复(图7C和图7E), MDA水平显著下降(图7D), 提示Rg1能够拮抗D-gal造成的氧化损伤, 增强CAT和GSH-Px的抗氧化作用, 减少氧化应激产物的生成。

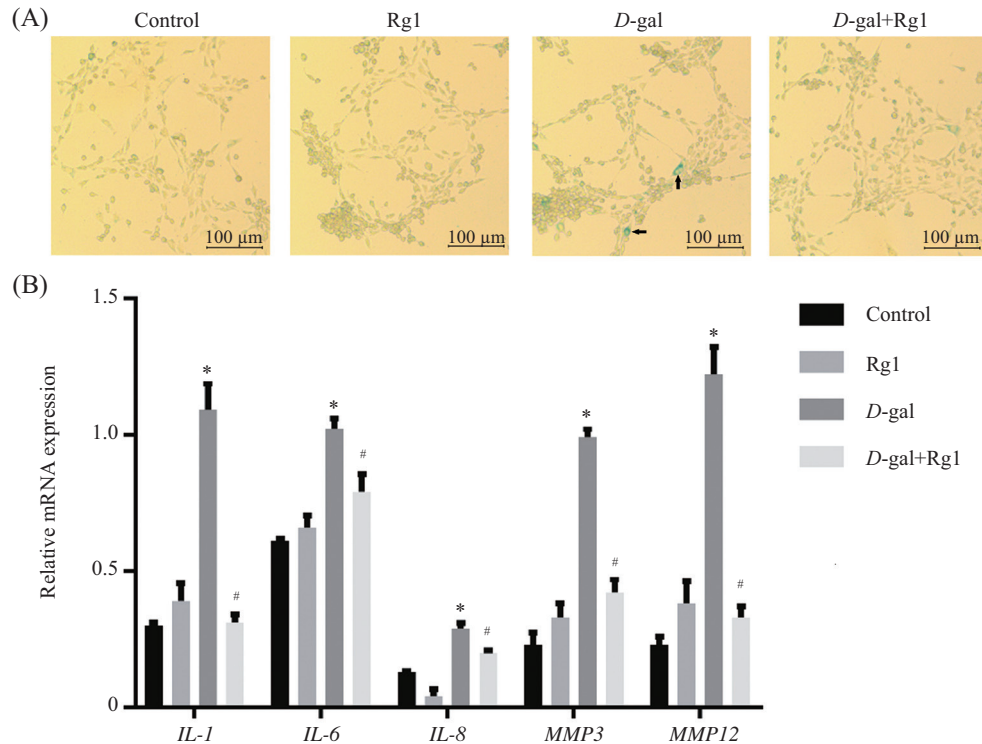
2.7 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞中睾酮合成关键酶基因与蛋白表达的影响

结果表明, D-gal诱导TM3细胞衰老后, StAR、 3β -HSD及P450scc基因和蛋白表达水平下降, 提示

D-gal能够使TM3细胞睾酮合成途径中的关键酶的表达下调, 从而影响睾酮的合成。Rg1干预后TM3细胞StAR、 3β -HSD及P450scc基因和蛋白表达水平均上调(图8和图9), 提示D-gal能够拮抗Rg1的作用, 促进睾酮合成途径中的关键酶的表达以及正常的生理功能发挥。

2.8 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞中Nrf2通路蛋白表达的影响

结果表明, D-gal诱导TM3细胞衰老后, Nrf2和HO-1蛋白质表达下调, Keap1蛋白表达上调; Rg1干预TM3细胞后, Nrf2、HO-1的表达上调, 而Keap1蛋白表达下调(图10)。提示D-gal诱导的TM3细胞Nrf2通路中的负性调节因子Keap1表达增高, 抑制了Nrf2



A: 各组TM3细胞衰老SA-β-Gal染色, 箭头表示SA-β-Gal染色阳性细胞; B: 相关炎症因子基因表达。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与D-gal组比较。

A: cell aging SA-β-Gal staining of different groups of TM3 cells, arrows indicate the positive cells stained by SA-β-Gal; B: related inflammatory factors gene expression. * $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the D-gal group.

图6 Rg1拮抗D-gal诱导TM3衰老及炎症因子表达的影响

Fig.6 Effects of Rg1 on cell aging and expression of related inflammatory factors of TM3 cell induced by D-gal

通路的活化, 导致Nrf2蛋白以及通路下游的HO-1蛋白表达减少, 抗氧化能力显著下降。而Rg1能够拮抗D-gal的作用, 抑制Keap1的表达, 增强通路中关键蛋白Nrf2及HO-1的抗氧化作用。

3 讨论

随着人口老龄化进程提速和人群寿命普遍延长, 衰老生物学与延缓衰老的研究已经成为生命科学与社会科学高度关注的研究领域。男性生殖器官是较早发生衰老器官之一, 因此备受人们关注。近年来研究证明, 氧化应激损伤是导致组织细胞衰老或损伤的关键因素^[7], 也是造成男性生殖器官衰老和男性不孕不育的启动因素。我们前期研究证明, 氧化致衰老剂D-gal可以诱导睾丸衰老和雄性激素分泌水平下降, 但其机制有待深入探讨^[6]。Leydig细胞分布在睾丸生精小管之间的结缔组织中, 具有合成与分泌雄激素的能力^[8]。它是调控精子发生和影响男性生殖功能的主要细胞, 改善睾丸Leydig细胞对延缓男性衰老有重要意义。

我们研究证明, 人参皂苷Rg1是“补气”药人参的抗衰老成分, 有拮抗氧化致衰老剂保护组织细胞免受氧化应激损伤的作用^[9]。课题组前期工作证明, 人参皂苷Rg1可以改善氧化损伤所致睾丸分泌功能减退, 但其作用机制尚不明确^[6]。本文探讨了Rg1拮抗D-gal对Leydig细胞(TM3)致衰的作用及其机制, 旨在为防治男性不育提供理论与实验依据。

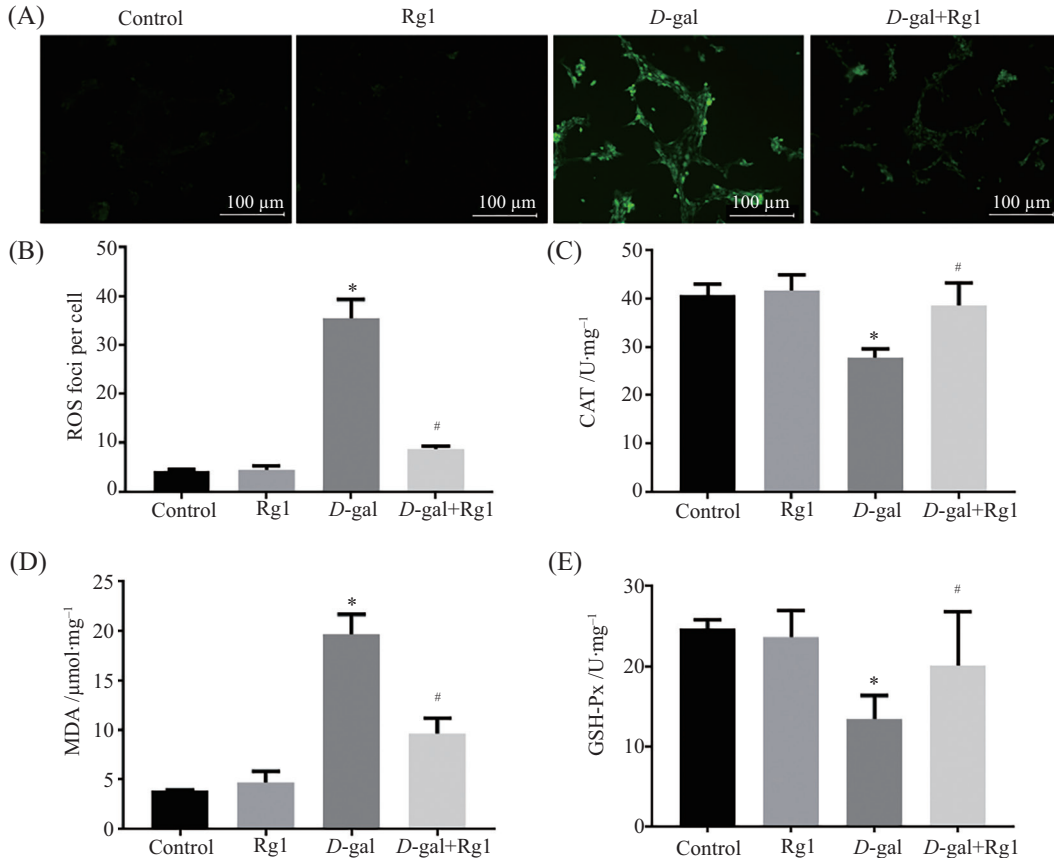
本研究表明, 随着D-gal注射时间和累计剂量增加, 衰老模型组小鼠毛发逐渐粗糙, 毛色晦暗, 精神萎靡, 活动能力下降, 进食较少, 大便稀溏, 体质量增加缓慢, 符合自然衰老的生物学体征。通过SA-β-Gal染色发现, D-gal能明确诱导睾丸组织细胞衰老, 尤其是睾丸间质细胞衰老, 用人参皂苷Rg1干预衰老过程能减轻D-gal对睾丸的致衰作用, 这与我们既往研究的结果高度吻合。

氧化应激损伤是导致细胞衰老或损伤的主流学说^[10]。本文研究发现, D-gal可致TM3细胞氧化应激损伤, 表现为氧化损伤指标ROS生成与MDA水平明显增加, 而抗氧化能力指标CAT与GSH-Px明显降

低。而在培养体系中加入人参皂苷Rg1干预衰老过程可以降低细胞氧化应激损伤, 同时增强细胞抗氧化能力。研究结果进一步阐释了Rg1抗衰老机制与拮抗氧化致衰剂与细胞的氧化应激损伤密切相关。

研究表明, *D-gal*能显著降低TM3细胞合成睾酮

的能力。人参皂苷Rg1干预衰老过程能拮抗*D-gal*对TM3细胞合成睾酮能力的抑制作用。StAR蛋白可将胆固醇转移到线粒体中, 而3β-HSD复合物催化线粒体中的脱氢表雄酮转化为雄烯二酮, 两者对Leydig细胞合成睾酮至关重要^[11]。为进一步阐释其机

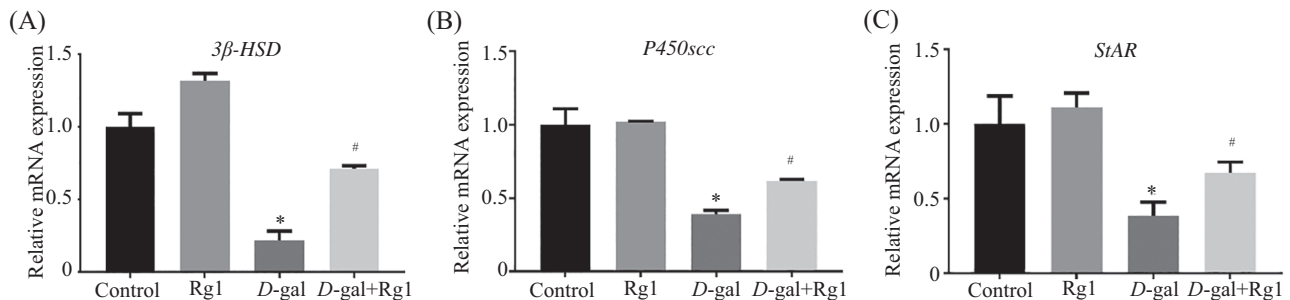


A: 各组TM3细胞内源性ROS; B: ROS平均荧光强度分析; C: CAT活性; D: MDA含量; E: GSH-Px活性。**P*<0.05, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与*D-gal*组比较。

A: intercellular ROS of different groups of TM3 cells; B: the mean fluorescence intensity of ROS; C: CAT activity; D: MDA content; E: GSH-Px activity. **P*<0.05 compared with the control group; #*P*<0.05 compared with the *D-gal* group.

图7 Rg1拮抗*D-gal*对TM3细胞氧化应激损伤的影响

Fig.7 Effect of Rg1 on TM3 cell oxidative stress injury induced by *D-gal*

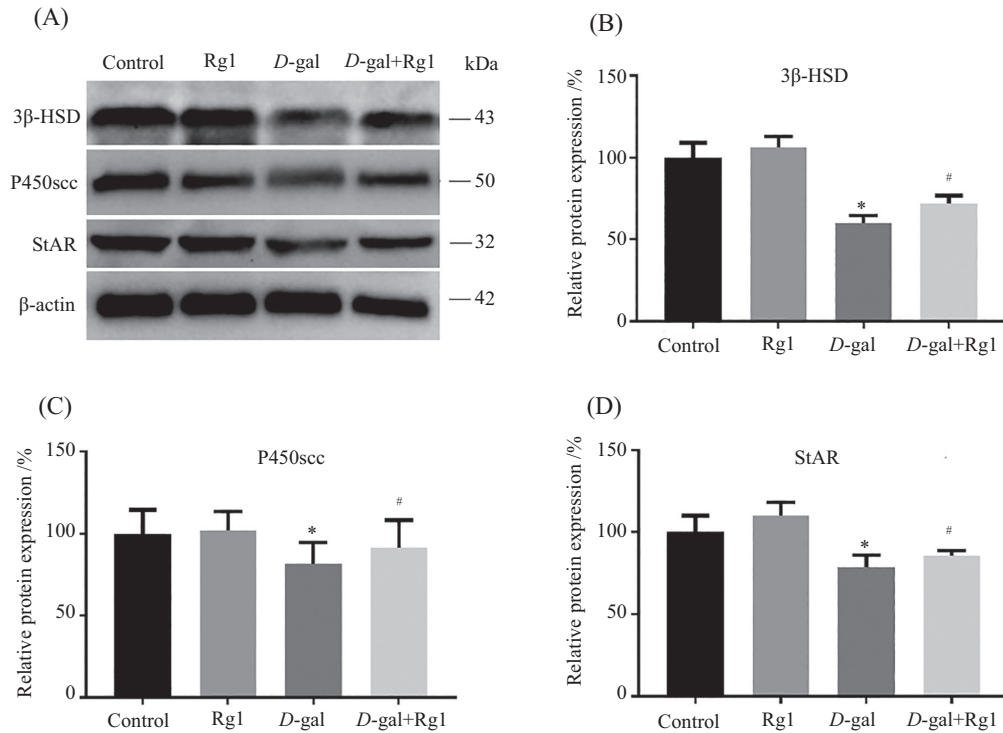


**P*<0.05, 与对照组比较; #*P*<0.05, 与*D-gal*组比较。

**P*<0.05 compared with the control group; #*P*<0.05 compared with the *D-gal* group.

图8 Rg1拮抗*D-gal*对TM3细胞睾酮合成关键酶相关基因表达的影响

Fig.8 Effect of Rg1 on the expression of testosterone synthesis-related genes in TM3 cells induced by *D-gal*

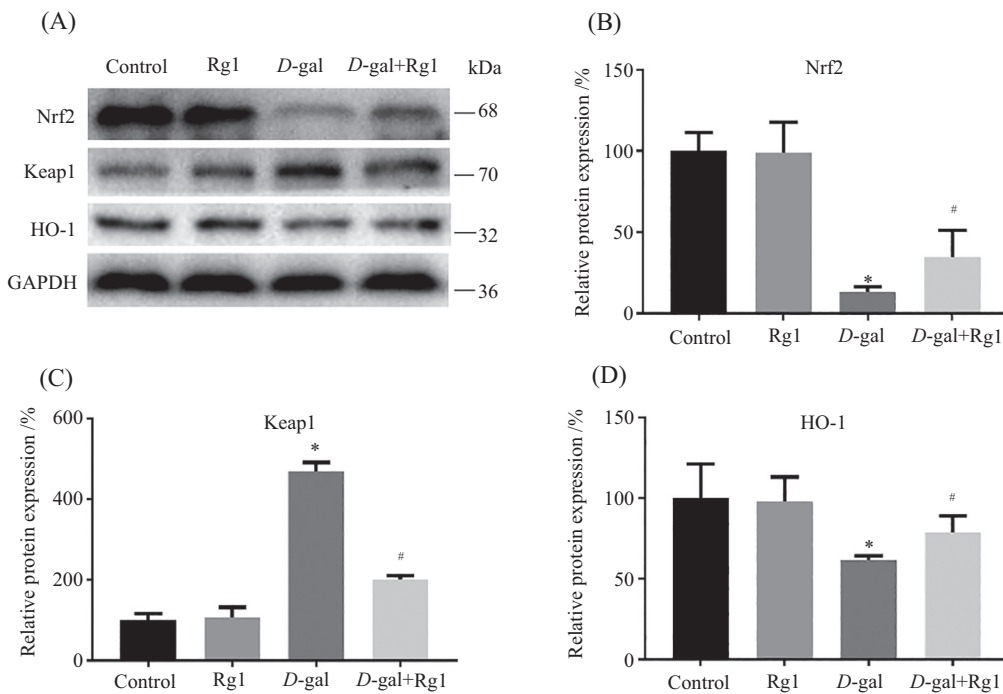


A: 睾酮合成相关蛋白(Western blot); B~D: 蛋白半定量分析。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与D-gal组比较。

A: testosterone synthesis-related proteins (Western blot); B-D: semi-quantitative analysis of proteins. * $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the D-gal group.

图9 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞睾酮合成关键酶表达的影响

Fig.9 Effect of Rg1 on the expression of testosterone synthesis-related key enzymes in TM3 cells induced by D-gal



A: Nrf2通路相关蛋白(Western blot); B~D: 蛋白半定量分析。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与D-gal组比较。

A: Nrf2 pathway-related proteins (Western blot); B-D: semi-quantitative analysis of proteins. * $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the D-gal group.

图10 Rg1拮抗D-gal对TM3细胞Nrf2通路相关蛋白表达影响

Fig.10 Effect of Rg1 on the expression of related proteins of Nrf2 signal pathway in TM3 cells induced by D-gal

制, 我们检测了参与睾酮合成的基因与蛋白的表达。结果表明, *D-gal*对TM3细胞合成睾酮的抑制作用可能与下调StAR、 β -HSD蛋白表达和降低线粒体活性有关; Rg1拮抗*D-gal*的致衰作用, 使TM3细胞睾酮水平下降得到抑制可能与上调StAR、 β -HSD蛋白表达和提高线粒体活性有关。Nrf2/ARE是最重要的抗氧化通路之一, 其中Nrf2为通路的关键因子^[12]。一般情况下, 胞质中的Keap1与Nrf2结合, 触发其蛋白酶体降解, 保持Nrf2的低转录水平。在氧化应激的存在下, Nrf2与Keap1解离并易位至细胞核, 结合ARE并上调各种下游抗氧化基因的表达^[13-14]。Nrf2/ARE轴的激活诱导抗氧化效应, 能较好地保护细胞免受氧化应激损伤^[13,15]。研究表明, *D-gal*+Rg1组的Nrf2和HO-1蛋白水平高于*D-gal*组。提示了Rg1可以激活Nrf2-ARE信号通路并提高下游抗氧化酶的表达, 从而抑制*D-gal*诱导的氧化应激并防止细胞损伤。但人参皂苷Rg1是否直接通过刺激Nrf2蛋白核转位, 促进类固醇合成酶表达, 从而使得睾丸TM3细胞分泌睾酮增多则需要进一步研究确定。

本研究提示, 人参皂苷Rg1可以通过改善睾丸间质细胞中的抗氧化系统, 激活Nrf2/ARE信号通路拮抗*D-gal*诱导的睾酮分泌障碍。

参考文献 (References)

- [1] MCLEAN A J, LE COUTEUR D G. Aging biology and geriatric clinical pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(2): 163-84.
- [2] XU M, MA Q, FAN C, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 protect primary cultured astrocytes against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury via improving mitochondrial function [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6086.
- [3] FAN X, ZHANG C, NIU S, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates hepatic insulin resistance induced by high-fat and high-sugar by inhibiting inflammation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854: 247-55.
- [4] CHENG Y, SHEN L H, ZHANG J T. Anti-amnesic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(2): 143-9.
- [5] KONG S Z, LI J C, LI S D, et al. Anti-aging effect of chitosan oligosaccharide on d-galactose-induced subacute aging in mice [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(6): 181.
- [6] WANG Z L, CHEN L B, QIU Z, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates testicular senescence changes in D-gal-induced aging mice via anti-inflammatory and antioxidative mechanisms [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6269-76.
- [7] ZHANG H, DAVIES K J A, FORMAN H J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88(Pt B): 314-36.
- [8] NEAVES W B. Leydig cells [J]. *Contraception*, 1975, 11(5): 571-606.
- [9] WEI X, CHEN Y, HUANG W. Ginsenoside Rg1 ameliorates liver fibrosis via suppressing epithelial to mesenchymal transition and reactive oxygen species production *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biofactors*, 2018, doi: 10.1002/biof.1432.
- [10] BARNES R P, FOUQUEREL E, OPRESKO P L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis [J]. *Mech Ageing Dev*, 2019, 177: 37-45.
- [11] LU M, ZHANG R, YU T, et al. CREBZF regulates testosterone production in mouse Leydig cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22819-32.
- [12] TONELLI C, CHIO I I C, TUVESON D A. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1727-45.
- [13] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-33.
- [14] CANNING P, SORRELL F J, BULLOCK A N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88(Pt B): 101-7.
- [15] ABED D A, GOLDSTEIN M, ALBANYAN H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 285-99.