

· 实验研究 ·

Cyclin D1 启动子在养精胶囊促进小鼠精原干细胞增殖中的作用[※]

● 蔡 滨 金保方[▲] 孙大林 邓伟民

摘 要 目的:研究养精胶囊促进小鼠精原干细胞(SSCs)增殖的分子机制。方法:将不同浓度的养精胶囊提取物加入 SSCs 中培养 48 h, CCK-8 检测细胞的增殖活性,流式细胞仪检测细胞周期,荧光素酶报告基因检测 Cyclin D1 启动子的活性,qRT-PCR 以及免疫荧光检测 Cyclin D1 的表达。之后进行阻断实验,在加入养精胶囊前预先加入 siRNA-Cyclin D1,同样的方法检测细胞的增殖活性、细胞周期、Cyclin D1 启动子的活性以及 Cyclin D1 的表达情况。结果:低、中、高浓度的养精胶囊可以促进 SSCs 的增殖,提高 S 期细胞的比例,增强 Cyclin D1 启动子的活性,促进 Cyclin D1 的表达。阻断 Cyclin D1 后,SSCs 的增殖活性降低,S 期细胞比例减少,Cyclin D1 启动子的活性降低,Cyclin D1 的表达减少。结论:养精胶囊通过增强 Cyclin D1 启动子的活性提高 Cyclin D1 的转录和翻译水平,进而促进 SSCs 增殖。

关键词 养精胶囊;精原干细胞;细胞周期蛋白 D1;细胞增殖

精原干细胞(spermatogonia stem cells, SSCs)是精子发生的物质基础,它的增殖和分化涉及多条通路、多个基因的精密调控^[1]。细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)由位于人染色体 11q13 的 CCND 1 基因编码,是调控 SSCs 的重要蛋白,它能够参与细胞周期的精确调控,维持 SSCs 自身数目的相对恒定,为精子发生提供源源不断的原料^[2]。Cyclin D1 作为细胞周期的启动因子,作用于 G1 期,促进 G1/S 期的过渡,提高 S 期细胞的比例,进而促进 SSCs 的增殖^[3]。许多生长因子如胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)可以作用于 SSCs 表面相应受体,将信号传递到细胞内,进而上调细胞核内 Cyclin D1 的表达,促进 SSCs 的增殖^[4]。

养精胶囊(Yangjiing Capsule, YC)是笔者团队在

临床上常用的男科方剂,用于治疗由少弱精症导致的男性不育,疗效确切。前期研究发现,养精胶囊作用于小鼠 SSCs 48 h 后,细胞周期中 S 期细胞比例明显增加,说明养精胶囊能够促进小鼠 SSCs 由 G1 期向 S 期的过渡,进而促进细胞增殖^[5]。鉴于 Cyclin D1 在 SSCs 增殖中的重要作用,笔者猜测养精胶囊可能通过 Cyclin D1 发挥作用。因此,本研究的目的是研究养精胶囊是否通过 Cyclin D1 促进 SSCs 的增殖。

1 材料和方法

1.1 细胞分离及培养 取 4~6 d 雄性 BALB/c 小鼠的睾丸,运用改良的两步消化法+差速贴壁分选获得高度纯化的 SSCs,种植到小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上,每 2 d 更换培养液 1 次。具体步骤见参考文献^[6]。

1.2 主要试剂与药品 CCK-8 试剂盒、细胞周期试剂盒、免疫荧光检测相关试剂(碧云天,中国);细胞总 RNA 提取试剂(Trizol 法)、反转录试剂盒、定量 PCR 检测试剂盒(诺唯赞,中国);重组小鼠 GDNF(Pepro Tech,美国);兔抗鼠 Cyclin D1 抗体(ab16663, Abcam, 美国);山羊抗兔二抗(ab150077, Abcam, 美国);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(promega, 美国);养精胶

※基金项目 国家自然科学基金(No.81603623;No.81874472)
▲通讯作者 金保方,男,医学博士,主任医师,副教授,博士研究生导师。主要从事男科疾病的中西医结合临床研究。E-mail:hexiking@126.com

• 作者单位 东南大学附属中大医院中西医结合男科(江苏南京 210009)

囊由中国人民解放军东部战区总医院制剂科生产提供[院临(2004)第01002号]。养精胶囊水提物提取方法见参考文献^[7]。

1.3 细胞增殖检测 在96孔板中以 4×10^3 /孔的密度接种细胞悬液,放在培养箱中预培养24 h,将其随机标记为空白对照组(Control Group)、养精胶囊低剂量组(YC extract 0.01 mg/mL Group)、养精胶囊中剂量组(YC extract 0.1 mg/mL Group)、养精胶囊高剂量组(YC extract 1 mg/mL Group)、阳性对照组(GDNF Group)。空白对照组未作处理,养精胶囊低、中、高剂量组分别加入0.01、0.1、1 mg/mL的养精胶囊,阳性对照组加入20 ng/mL的GDNF。48 h后,向每孔加入10 μ L的CCK-8溶液,然后将培养板置于培养箱内孵育2 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。细胞增殖率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)] $\times 100\%$ 。至少进行三次独立重复实验。

1.4 细胞周期检测 按“1.3”进行分组并加入相应的药物,之后将细胞在冰浴预冷的70%乙醇中重悬,4 $^{\circ}$ C固定过夜。1000 g左右离心3 min沉淀细胞,之后加入冰浴预冷的PBS重悬细胞,每管细胞样品中加入0.5 mL碘化丙啶染色复合液,37 $^{\circ}$ C避光温浴30 min。然后使用FACScan流式细胞仪对样本进行分析,采用ModFit LT 3.0软件评价G0/G1期、S期、G2/M期细胞百分比。至少进行三次独立重复实验。

1.5 荧光素酶报告基因实验 在24孔板中以 5×10^4 /孔的密度接种细胞悬液,细胞培养过夜后,转染体系:每个转染3个孔,每孔加入1 μ L Lipo 3000+1 μ g pRL-TK质粒+1 μ g pGL3-Cyclin D1 promoter-luci质粒(或者pGL3空载质粒)。对其进行分组,阴性对照组(YC extract+pGL3-ctrl Group)为转染pGL3空载质粒24 h后再加入1 mg/mL养精胶囊,养精胶囊组(YC extract+pGL3-Cyclin D1 Group)和阳性对照组(GDNF+pGL3-Cyclin D1 Group)分别为转染pGL3-Cyclin D1 promoter-luci质粒24 h后再加入1 mg/mL的养精胶囊和20 ng/mL的GDNF,轻轻混匀,放入培养箱中培养。48 h后,用PBS轻轻洗2遍,每个孔中加入100 μ L细胞裂解液,放在冰上裂解5 min,将裂解的细胞分别转移至EP管中,12000 rpm离心2 min,分别取40 μ L上清转移至96孔板中,将LARII、stop&glo试剂配制好,和96孔板一起放入GloMax 96微孔板发光检测仪中,检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。pGL3-Cyclin D1 promoter-luci质粒委托上海捷瑞生物

设计并合成。至少进行三次独立重复实验。

1.6 实时荧光定量PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 实验 将接种了细胞悬液的孔板随机分为空白对照组(Control Group)、养精胶囊组(YC extract Group)、阳性对照组(GDNF Group)。空白对照组未作处理,养精胶囊组加入1 mg/mL的养精胶囊,阳性对照组加入20 ng/mL的GDNF,作用48 h之后将细胞用Trizol试剂提取总RNA,之后用反转录试剂盒合成cDNA,以cDNA为模板进行扩增,所用引物由上海捷瑞生物设计并合成。PCR扩增引物序列如下:Cyclin D1上游引物为5'-GATGAAGGAGACCATTCCCTTG-3',下游引物为5'-TCACCAGAAGCAGTTCATTT-3';GAPDH上游引物为5'-GGGTGTGAACCACGAGAAATA-3',下游引物为5'-GTCATGAGCCCTTCCACAAT-3'。

加样体系按照定量PCR检测试剂盒说明进行操作,反应采用标准的两步法:95 $^{\circ}$ C、1 min,1个循环;95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,40个循环,采用溶解曲线判断扩增产物是否单一,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算表达量的相对比值。至少进行三次独立重复实验。

1.7 细胞免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 实验 将2 cm \times 2 cm载玻片灭菌后置于6孔板中,细胞用0.25%胰蛋白酶消化后,接种于6孔板中,培养24 h,按“1.6”对其进行分组,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养48 h后,加入4%多聚甲醛固定10~15 min,加入0.2% Triton X-100透化15 min,每张玻片加入羊血清150 μ L,封闭30 min后,加入兔抗鼠Cyclin D1抗体(1:200),4 $^{\circ}$ C过夜,加入山羊抗兔二抗(1:1000),37 $^{\circ}$ C孵育1 h,加入1 μ g/mL DAPI染色15 min,PBS冲洗后,甘油封片,于荧光显微镜下观察并照相。至少进行三次独立重复实验。

1.8 细胞阻断实验 委托上海捷瑞生物针对Cyclin D1基因设计干扰RNA(siRNA)序列,同时设计一条阴性对照(siRNA-NC)序列,通过BLAST验证该序列对于其他基因无干扰效果。siRNA-Cyclin D1引物序列为CAGGATGATGAAGTGAACACACTCA; siRNA-NC引物序列为GTACCAACAAGACAGTGCTAGTAGA。

转染siRNA-Cyclin D1之前先将SSCs以 1×10^5 /孔接种至六孔板中,待细胞长至60%密度时采用Lipo 3000将siRNA-Cyclin D1/siRNA-NC转染进细胞,37 $^{\circ}$ C孵育24 h后加入1 mg/mL的养精胶囊提取液,根据所转染的基因序列相应地分为养精胶囊+siRNA-Cyclin D1组(YC extract+siRNA-Cyclin D1 Group)与养

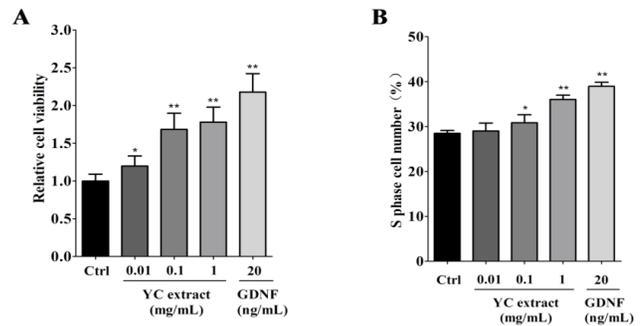
精胶囊+siRNA-NC组(YC extract+siRNA-NC Group), 继续培养 48 h 进行后续检测。至少进行三次独立重复实验。

1.9 数据统计方法 所有数据都采用 SPSS 20.0 统计软件分析。各组计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布的两组定量数据的比较,采用 two-tailed Student's t-test 分析;非正态分布的两组定量数据的比较,采用 Mann-Whitney U 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 养精胶囊对 SSCs 增殖活性、细胞周期的影响

图 1A 表明,在 SSCs 培养液中分别加入 0.01、0.1、1 mg/mL 浓度的养精胶囊 48 h 后,与空白对照组相比,细胞的增殖活性分别提高了 19.8%、68.4%、78.0%,有统计学差异(P<0.05, P<0.01),表明低、中、高剂量的养精胶囊均能促进 SSCs 的增殖;阳性对照组与空白对照组相比,细胞的增殖活性提高了 118.0%,有统计学差异(P<0.01)。图 1B 表明,0.1、1 mg/mL 浓度的养精胶囊作用 48 h 后,S 期细胞的比例比空白对照组分别提高了 8.2%、26.4%,有统计学差异(P<0.05, P<0.01),表明中、高剂量的养精胶囊均能提高 S 期细胞的比例;阳性对照组与空白对照组相比,S 期细胞的比例提高了 36.7%,有统计学差异(P<0.01)。

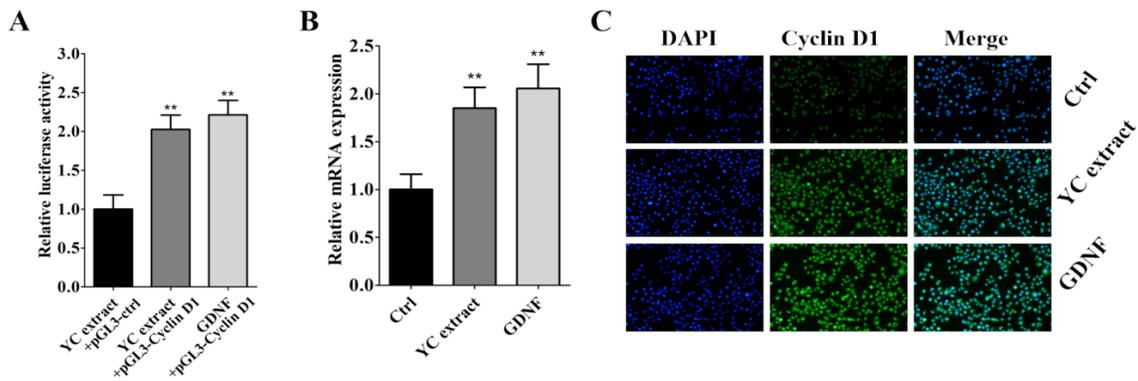


注:图 A 为 CCK-8 实验检测养精胶囊对 SSCs 增殖活性的影响;图 B 为流式细胞仪检测养精胶囊对 SSCs 细胞周期的影响;与空白对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

图 1 养精胶囊对 SSCs 增殖活性、细胞周期的影响

2.2 养精胶囊对 Cyclin D1 启动子、mRNA 和蛋白水平的影响

图 2A 表明,高剂量(1 mg/mL)的养精胶囊和 GDNF 作用 48 h 后,Cyclin D1 启动子的活性比阴性对照组分别增强 103.7%、121.3%,有统计学差异(P<0.01),说明高剂量的养精胶囊和 GDNF 均能增强 Cyclin D1 启动子的活性。图 2B 表明,高剂量的养精胶囊和 GDNF 作用 48 h 后,Cyclin D1 mRNA 的表达比空白对照组分别提高 85.5%、106.4%,有统计学差异(P<0.01),说明高剂量的养精胶囊和 GDNF 均能提高 Cyclin D1 mRNA 的表达。图 2C 表明,高剂量的养精胶囊和 GDNF 作用 48 h 后,Cyclin D1 的蛋白表达提高,并且主要集中在细胞核内。



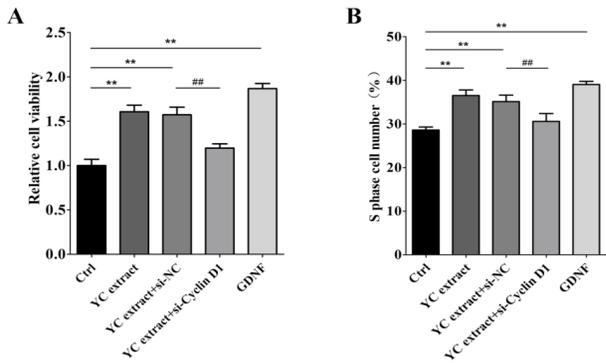
注:图 A 为荧光素酶报告基因实验检测精胶囊对 Cyclin D1 启动子的影响;图 B 为 qRT-PCR 检测养精胶囊对 Cyclin D1 mRNA 水平的影响;图 C 为免疫荧光检测养精胶囊对 Cyclin D1 蛋白水平的影响;与空白对照组比较,**P<0.01

图 2 养精胶囊对 Cyclin D1 启动子、mRNA 和蛋白水平的影响

2.3 阻断 Cyclin D1 后养精胶囊对 SSCs 的影响

图 3A 表明,加入 siRNA-Cyclin D1 预处理后再加入高剂量的养精胶囊培养 48 h,细胞的增殖活性比养精胶囊+siRNA-NC 组降低 23.9%,有统计学差异(P<0.01),表明阻断 Cyclin D1 能够抑制 SSCs 的增殖。图

3B 表明,养精胶囊+siRNA-Cyclin D1 组与养精胶囊+siRNA-NC 组相比,S 期细胞比例减少 12.9%,有统计学差异(P<0.01),表明阻断 Cyclin D1 能够降低 S 期细胞比例。



注:图A为CCK-8实验检测阻断后养精胶囊对SSCs增殖活性的影响;图B为流式细胞仪检测阻断后养精胶囊对SSCs细胞周期的影响;与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与养精胶囊+siRNA-NC组比较,## $P < 0.01$

图3 阻断 Cyclin D1 后养精胶囊对 SSCs 的影响

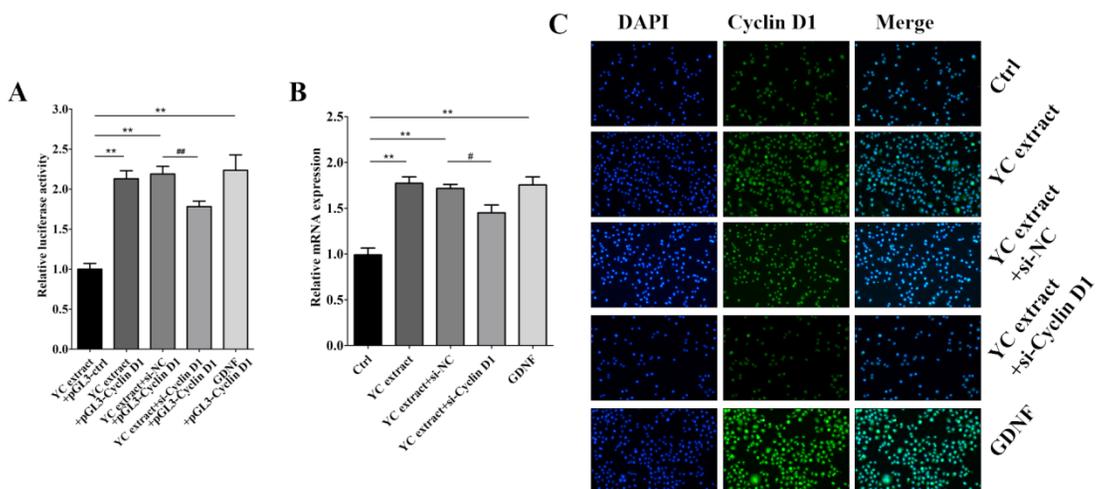
2.4 阻断 Cyclin D1 后养精胶囊对 Cyclin D1 的影响 图4A表明,加入 siRNA-Cyclin D1 预处理后再加高剂量的养精胶囊培养48 h, Cyclin D1 启动子的活性与养精胶囊+siRNA-NC组相比降低18.6%,有统计学差异($P < 0.01$)。图4B表明,养精胶囊+siRNA-Cyclin D1组与养精胶囊+siRNA-NC组相比, Cyclin D1 mRNA 的表达降低15.6%,有统计学差异($P < 0.05$)。图4C表明,养精胶囊+siRNA-Cyclin D1组与养精胶囊+siRNA-NC组相比, Cyclin D1 的蛋白表达降低。

3 讨论

养精胶囊是东南大学附属中大医院金保方教授运用中医学“肾藏精”的理论,以补肾填精、益气活血为法创立的经验方,由淫羊藿、熟地、黄精、紫河车、沙

苑子、煅牡蛎、黄芪、当归、荔枝核、王不留行、炙水蛭共11味中药组成。方中淫羊藿味辛、甘,性温,走肝肾二经,为补命门、益精气之要药;熟地味甘,性微温,亦归肝肾二经,有补血养阴、填精益髓之功,九蒸九晒熟地为补血之首剂,与淫羊藿相伍,阴阳互根互用,增强疗效;紫河车乃血肉有情之品,扶正固本,养血益精;黄芪-黄精为补气养阴固精的常用药对,气阴双补,使得阳有所依;沙苑子、煅牡蛎其性下行,补肾固精,煅牡蛎还含有精子生长所必须的锌、硒等微量元素;荔枝核、当归、炙水蛭、王不留行共奏行气活血之功,使得药物补而不滞,滋而不腻。方中除了传统补肾填精之药,还添加了行气活血之药,既能补肾入精室,又能行气活血以养精生精。这种补肾填精与行气活血药物的配合,可改善睾丸和附属性腺的内环境,促进精子发生,提高临床疗效^[8-11]。

Cyclin D是1991年由Motokura等^[12]在研究甲状腺癌时首先分离,主要包括Cyclin D1、D2、D3三个亚型,三者氨基酸序列上有高度同源性。Ciraolo等^[4]研究发现,GDNF通过激活PI3K中的p110 α 亚基引起下游Akt的磷酸化,而上调Cyclin D1的表达,促进SSCs的自我更新与增殖。本研究发现养精胶囊可以促进SSCs的增殖、提高S期细胞的比例(图1),并且增强Cyclin D1启动子的活性,促进Cyclin D1 mRNA和蛋白的表达(图2)。为了研究养精胶囊是否通过Cyclin D1产生作用,本研究运用siRNA-Cyclin D1阻断Cyclin D1的表达,发现阻断Cyclin D1之后,SSCs的增殖活性降低、S期细胞比例减少(图3),同时伴随着Cyclin D1启动子的活性降低,mRNA和蛋白的表达减



注:图A为荧光素酶报告基因实验检测阻断后养精胶囊对Cyclin D1启动子的影响;图B为qRT-PCR检测阻断后养精胶囊对Cyclin D1 mRNA水平的影响;图C为免疫荧光检测阻断后养精胶囊对Cyclin D1蛋白水平的影响;与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与养精胶囊+siRNA-NC组比较,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$

图4 阻断 Cyclin D1 后养精胶囊对 Cyclin D1 的影响

少(图4)。

综上,养精胶囊可以通过增强 Cyclin D1 启动子的活性提高 Cyclin D1 的转录和翻译水平,进而促进 SSCs 增殖。这对于阐明补肾填精法改善男性生殖功能的作用靶点,揭示“肾藏精”的科学内涵,进而指导临床运用中药治疗少弱精症,具有重要的理论意义和临床价值。当然,基因的转录涉及启动子、转录因子、RNA 聚合酶等的协同作用,养精胶囊如何增强 Cyclin D1 启动子的活性的分子机制有待进一步探索。

参考文献

[1] Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, 29: 163-187.

[2] Rahbar S, Pashaiasl M, Ezzati M, et al. MicroRNA-based regulatory circuit involved in sperm infertility[J]. *Andrologia*, 2020, 52(1): e13453.

[3] Zamir-Nasta T, Razi M, Shapour H, et al. Roles of p21, p53, cyclin D1, CDK-4, estrogen receptor alpha in aflatoxin B1-induced cytotoxicity in testicular tissue of mice[J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(4): 385-395.

[4] Ciruolo E, Morello F, Hobbs R M, et al. Essential role of the p110beta subunit of phosphoinositide 3-OH kinase in male fertility[J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(5): 704-711.

[5] Wang Z, Jin B, Zhang X, et al. Yangjing Capsule Extract Promotes Proliferation of GC-1 Spg Cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,

2014, 2014: 640857.

[6] He B R, Lu F, Zhang L, et al. An alternative long-term culture system for highly-pure mouse spermatogonial stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(6): 1365-1375.

[7] Jin B, Cai B, Sun D, et al. Yangjing Capsule extract promotes proliferation of GC-1 spg cells via up-regulated POU3F1 pathway[J]. *Biosci Trends*, 2017, 11(1): 95-104.

[8] Jin B, Sun D, Dong W, et al. Yangjing Capsule Can Improve the Function of the Testicular Angiogenesis through Activating VEGFA/eNOS Signaling Pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 1957267.

[9] Sun D, Dong W, Jin B, et al. Mechanisms of Yangjing Capsule in Leydig Cell Apoptosis and Testosterone Synthesis via Promoting StAR Expression[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(9): 1401-1405.

[10] Zhao H, Jin B, Zhang X, et al. Yangjing Capsule Ameliorates Spermatogenesis in Male Mice Exposed to Cyclophosphamide[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 980583.

[11] Gu Y, Zhang X, Sun D, et al. The Stimulative Effect of Yangjing Capsule on Testosterone Synthesis through Nur77 Pathway in Leydig Cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 408686.

[12] Motokura T, Bloom T, Kim H G, et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene[J]. *Nature*, 1991, 350(11): 512-515.

(收稿日期: 2020-11-10)

(本文编辑: 蒋艺芬)

(上接第 31 页)

还有以下规律:表证留针时间短,里证留针时间长;阳证留针时间短,阴证留针时间长;儿童留针时间短……贾教授还发现,耳针在采用沿皮透穴刺法的时候,留针时间越长,疗效越好^[4],可留针 30~60min,甚者可留针 2~3h。

3.4 如何选择刺灸法 “观夫九针之法,毫针最微,七星上应,众穴主持”,即是讲九针中毫针最为重要。贾教授在临床中亦以毫针为主,然而,经过多年临床观察发现每种针具都具有其不可替代的独特的性质和治疗作用,故而首次提出“刺灸法效应特异性”的概念^[5],即不同刺灸法因其临床效应各异而有着不同的最佳适应证或病症阶段的对应关系。贾教授从不同刺灸法与病证的效应特异性关系着手,采集所需刺灸法文献,建立刺灸法文献数据库并设计文献数

据应用平台,通过分析、测试数据,揭示在大量模糊、不完全的刺灸法文献数据中潜在的刺灸法应用的知识 and 规律^[6]。目前,已经应用此大数据完成了对火针、穴位注射、穴位贴敷等刺灸法的特异性分析^[7-9]。

4 结语

贾教授通过让学生们学习《标幽赋》,使学生们理清了窦氏的刺灸学术思想,并进一步归纳总结,提炼出刺灸取得良好临床疗效的重要因素,并将其学术思想应用到现代刺灸临床,既传承了窦氏刺灸理论,又创新了刺灸技法,提高了刺灸疗效。

参考文献

[1] 于宏君,蒋海琳,王富春. 试论论穴的生物学特性——敏化性[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(12): 1643-1645.

[2] 林美君,郭长青. 杨甲三取穴经验研究[J]. *山西中医*, 2009, 25(1): 22-23.

[3] 庞博,杜元灏,姜涛,等.“超级安慰剂”之辩[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 2174-2177.

[4] 侯献兵,刘英莉,王美英,等. 耳针沿皮透穴刺法结合排针刺法治疗神经根型颈椎病 61 例[J]. *中国针灸*, 2014, 34(7): 651-652.

[5] 贾春生,徐晶,李晓峰,等. 刺灸法效应特异性概念的提出及研究价值[J]. *中国针灸*, 2011, 31(7): 577-579.

[6] 贾春生,李晓峰,王建岭,等. 基于数据挖掘的刺灸法效应特异性研究的思路[J]. *针刺研究*, 2011, 36(1): 76-79.

[7] 徐晶,贾春生,王建岭,等. 运用数据挖掘探讨火针在神经功能障碍相关疾病中的应用[J]. *针刺研究*, 2013, 38(5): 420-427.

[8] 许晓康,贾春生,王建岭,等. 基于数据挖掘技术的穴位注射疗法效应特点研究[J]. *针刺研究*, 2012, 37(2): 155-160.

[9] 张莘,张选平,贾春生,等. 基于数据挖掘的穴位贴敷疗法运用特点研究[J]. *针刺研究*, 2012, 37(5): 416-421.

(收稿日期: 2020-06-14)

(本文编辑: 蒋艺芬)