

· 实验研究 ·

养精胶囊通过 LncRNA H19 调控 StAR 促进睾酮合成的实验研究^{*}

王丹丹¹ 金保方² 邢 栋¹ 刘媛媛¹ 蔡 滨² 邓伟民² 崔毓桂³ 孙大林^{2,4}

摘 要 目的:研究养精胶囊对 LncRNA H19 调控 StAR 作用及促进睾酮合成机制。方法:以体外 MLTC-1 细胞培养为模型,分别加入 2 mL 的培养基以及终浓度为 0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL 的养精胶囊水提物,并将其分别作为对照组和养精胶囊低、中、高剂量组,作用 24 h。通过 ELISA 测定细胞上清睾酮和游离睾酮浓度,通过 qRT-PCR、Western Blot 分别检测养精胶囊对 MLTC-1 中 LncRNA H19 mRNA、StAR mRNA 以及 StAR 蛋白表达的影响。结果:养精胶囊水提物可以显著提高 MLTC-1 细胞上清睾酮和游离睾酮浓度,同时还可以明显促进 LncRNA H19 mRNA 以及 StAR mRNA 和蛋白的表达水平,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:养精胶囊可以通过 LncRNA H19 调控 StAR,进而增加睾酮合成。

关键词 养精胶囊;LncRNA H19;StAR;睾酮

睾酮(Testosterone, T)是由睾丸和肾上腺产生的雄激素,对肌肉、骨骼、毛发以及性功能都有影响。睾酮水平降低会产生乏力、注意力不集中、抑郁、性欲低下和勃起功能障碍等症状。外源性补充睾酮是目前临床常用的治疗方法,但其不良反应多,且会降低男性精子生成和生育能力^[1]。其中,游离睾酮(Free testosterone, FT)代表雄激素的活性形式^[2]。

长链非编码 RNA (Long noncoding RNAs, LncRNAs)是一类不具备蛋白翻译功能、长度超过 200 个核苷酸的转录本。LncRNA H19 位于人类第 11 号染色体,全长 2.3 kb。研究^[3-4]发现,H19 可以促进类固醇急性调节蛋白(Steroidogenic Acute Regulatory Protein, StAR)表达和睾酮的生成。StAR 是类固醇激素生成的关键酶,可以将胆固醇从线粒体外膜转运至线粒体内膜^[5],随后经过线粒体、内质网中相关酶的催化进而转化为睾酮。

养精胶囊是用于睾酮低下引起性功能障碍及男性不育的医院制剂。笔者团队前期研究^[6-7]发现,养精

胶囊能够提高 StAR 启动子活性从而增加睾酮合成,但关于其上游的调控机制仍不明确。由于 H19 在睾酮合成中具有重要作用,养精胶囊可能是通过 LncRNA H19 调控 StAR 进而发挥作用,但目前尚无相关报道。本研究旨在进一步探索养精胶囊对 LncRNA H19 表达的影响,探讨其促进睾酮合成的机制,具有重要意义。

1 资料及方法

1.1 细胞株与细胞培养 小鼠间质细胞(Leydig 细胞)系 MLTC-1,购于上海中国科学院细胞库,用 RPMI-1640 培养基(凯基生物, KGM31800-500),加入 10% 胎牛血清(ScienCell, 0500)配成完全培养基,培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱。

1.2 实验药物 养精胶囊(由淫羊藿、熟地黄、紫河车、沙苑子、黄精、牡蛎、当归、黄芪、王不留行、水蛭、荔枝核按 1:1:1:1:2:2:1:2:2:1:1 组成)来自南京军区总医院制剂科[院临(2004)第 01002 号],其水提物提取方法见参考文献^[7]。实验时用 RPMI-1640 培养基按比例稀释为低、中、高 3 种浓度梯度,分别相当于生药量 0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL。

1.3 主要试剂 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Gibco, 2186976);磷酸盐缓冲液(Servicebio, G4202-500ML);RNA 快速提取试剂盒(ES Science, RN001);焦碳酸二

^{*}基金项目 国家自然科学基金项目(No.81874472)
▲通讯作者 孙大林,男,副主任医师。研究方向:中、西医男科。E-mail:daling11@126.com
•作者单位 1.东南大学医学院(江苏 南京 210009);2.东南大学附属中大医院(江苏 南京 210009);3.南京医科大学第一附属医院(江苏 南京 210029)

乙酯水 (Beytime, R0021); PrimeScript™ RT Master Mix (Takara, RR036A); TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara, RR420A); RIPA 裂解液 (Thermo, #89900); 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物 (Thermo, VB298680); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Beytime, P0010); Laemmli 样品缓冲液 (Bio-rad, #161037); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (Beytime, P0012A); PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo, 26616); StAR Polyclonal antibody (Proteintech, 12225-1-AP); β-actin 抗体 (Proteintech, 20536-1-AP); 山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶标记 (Abcam, ab7090); 通用型抗体稀释液 (新赛美, WB500D); 超敏化学发光检测试剂盒 (US EVERBRIGHT INC, S6009); 小鼠睾酮 ELISA 试剂盒 (上海纪宁, A00550); 小鼠游离睾酮 ELISA 试剂盒 (上海纪宁, JN17549-S)。

1.4 实验仪器 超净台; 培养箱; 台式冷冻离心机 (Eppendorf AG, 5404); 核酸蛋白测定仪 (Eppendorf AG, 6132); PCR 仪 (applied biosystems, 9902); StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 系统 (applied biosystems); 酶标仪 (Thermo, 1510); 垂直电泳系统 (Bio-rad, PowerPac™ Basic); 曝光机 (Tanon, 5200)。

1.5 药物干预及分组 6 孔板内接种 2×10^5 个/孔细胞数, 待细胞生长至对数期, 分别加入 2 mL 的培养基以及终浓度为 0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL 的养精胶囊水提物, 并将其分别作为对照组和养精胶囊低、中、高剂量组。

1.6 观察指标

1.6.1 细胞上清 T 和 FT 浓度 上药处理 24 h 后, 胰酶消化细胞 2 min, 完全培养基中和, 再 1000 g 离心 20 min, 取上清。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 最后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值, 计算细胞上清中 T 和 FT 浓度。

1.6.2 mRNA 相对表达量 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测。用试剂盒提取细胞总 RNA, 之后用核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度, 随后用逆转录试剂盒合成 cDNA, 最后以 cDNA 为模板进行扩增。所用引物由南京锐真生物技术有限公司设计并合成, 详见表 1。根据试剂盒说明书进行加样操作, 反应采用标准两步法, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 的相对表达量^[8]。

1.6.3 StAR 蛋白水平 采用蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 进行检测。胰酶消化细胞离心去上清

表 1 H19、StAR、β-actin 引物序列

基因名称	引物名称	引物序列
H19	上游引物	ACAGAAGGGCAGTCATCCA
	下游引物	GAGCTGGGTAGCACCATTTC
StAR	上游引物	CGGTGGATGGTCAAGTTC
	下游引物	GCACTTCGTCCCGTTTCTC
β-actin	上游引物	GCTACAGCTCACCACCACAG
	下游引物	GGCTTTACGGATGTCACCGT

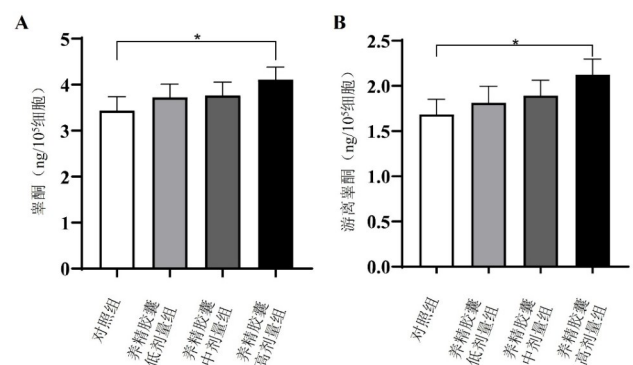
后, 加入 RIPA Buffer 裂解细胞, 选择 BCA 法测定细胞蛋白浓度, 确定上样量 30 μg, 加入 2× 上样缓冲液, 煮蛋白制样; 制备 10% SDS-PAGE 凝胶, 上样后电泳 (压缩胶 80 V、分离胶 120 V), 随后用 PVDF 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 StAR 抗体 (1:1000)、β-actin 抗体 (1:2000) 后于 4 °C 冰箱过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的兔二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 最后加显影液曝光。

1.7 数据统计 所有数据采用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计分析。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, 采用双尾 t 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

研究结果均为至少进行三次独立重复实验所得。

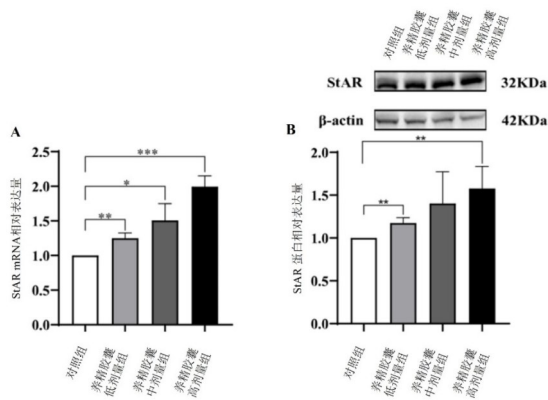
2.1 养精胶囊处理 MLTC-1 后细胞上清 T 和 FT 水平的变化 ELISA 检测结果表明, 养精胶囊高剂量组可提高 MLTC-1 细胞上清睾酮浓度 (见图 1A) 和游离睾酮浓度 (见图 1B), 与对照组比较差异有统计学意义 (P<0.05)。



注: A 为 MLTC-1 上清 T 水平; B 为 MLTC-1 上清 FT 水平; 与对照组比较, *P<0.05

图 1 养精胶囊对 MLTC-1 细胞上清 T 和 FT 水平的影响

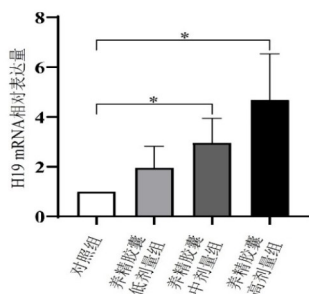
2.2 养精胶囊处理 MLTC-1 细胞后 StAR mRNA 和蛋白水平的变化 qRT-PCR 检测结果表明,养精胶囊各剂量组均能明显提高 StAR 的转录水平,增加 StAR mRNA 的表达 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$), 见图 2A。Western Blot 检测结果表明,随着养精胶囊剂量的增加,StAR 蛋白的表达增加,且低、高剂量组与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 2B。



注:A为StAR mRNA水平;B为StAR蛋白水平;与对照组比较, $P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$

图2 养精胶囊对 MLTC-1 细胞中 StAR mRNA 和蛋白的影响

2.3 养精胶囊处理 MLTC-1 细胞后 LncRNA H19 mRNA 水平的变化 qRT-PCR 检测结果表明,随着养精胶囊剂量的增加,H19 mRNA 的表达上调,且养精胶囊中、高剂量组能够显著提高 H19 的转录水平,增加 H19 mRNA 的表达,与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 3。



注:与对照组比较, $P<0.05$

图3 养精胶囊对 MLTC-1 细胞中 LncRNA H19 mRNA 的影响

3 讨论

睾酮大部分由睾丸 Leydig 细胞分泌,并受下丘脑-垂体-性腺轴的负反馈调节。Leydig 细胞位于生精小管之间的间质内,在垂体分泌的黄体生成素刺激

下产生睾酮,进而维持男性第二性征并调节男性生殖功能。总睾酮包括游离睾酮和与蛋白质结合的睾酮,后者可与性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 高亲和力结合,与白蛋白、皮质类固醇结合球蛋白及类黏蛋白 (orosomuroid, ORM) 低亲和力结合。其中,与白蛋白低亲和力结合的睾酮容易发生解离,与游离睾酮共同构成生物可利用睾酮,在雄激素依赖性靶组织中具有生物活性。未与任何血浆蛋白结合的循环睾酮部分称为游离睾酮。由于 SHBG 水平随着年龄的增长而增加,因此与年龄相关的游离睾酮水平下降幅度大于总睾酮水平下降幅度。研究^[9]显示,游离睾酮与迟发性性腺功能减退症的相关性强于总睾酮。然而,游离睾酮目前的测定方法缺乏标准化,通过 SHBG、白蛋白和总睾酮计算游离睾酮是相对准确的^[10]。采用 ELISA 测定游离睾酮,虽缺乏一定的准确性,但亦能在一定程度上说明问题^[11]。

LncRNA H19 是目前已报道的少数印迹基因之一,在进化上高度保守。胚胎发育期, H19 在内胚层和中胚层组织中高度表达,出生后主要在骨骼肌、心肌、乳腺、卵巢、子宫和睾丸中表达。H19 在肿瘤进展、能量代谢和机体生长发育等方面发挥重要作用^[12]。近年来,多项研究报道了 H19 在类固醇激素合成方面的作用,发现 H19 内含 4 个 microRNA Let-7 的结合位点,可以像“分子海绵”一样通过结合“吸附” Let-7,抑制其功能^[13],进而解除翻译抑制和 mRNA 激活,从而促进靶基因 StAR 的表达和孕酮的生成^[14]。Chen 等^[4]通过敲除雌性小鼠卵巢组织内 H19 基因,导致类固醇合成酶 CYP17 和睾酮的合成均显著下调,证实了 H19 在调控睾酮合成方面具有重要作用。

养精胶囊是基于中医“肾藏精,主生殖”理论,结合肝肾同源、精血互生的思路而设,具有益肾养精、补血活血的功效。养精胶囊由淫羊藿、熟地黄、紫河车、沙苑子、黄精、牡蛎、当归、黄芪、王不留行、水蛭、荔枝核组成。其中,淫羊藿性温,味辛、甘,可补肾温阳、强筋散湿;熟地黄性温,味甘,可益精填髓、滋阴补血,两者均入肝肾经,阴阳双补,互生互化,共为君药。紫河车补肾填精、益气养血;黄精健脾补肾、气阴双补;沙苑子益肾养肝、固精明目;牡蛎潜阳补阴,重镇安神;黄芪、当归补气养血,以充化肾精,有养血生精之功,共为臣药。王不留行、水蛭和荔枝核共用以疏肝行气、活血化瘀,为佐药。全方有益肾养血活血之效,临床可用于治疗睾酮低下引起的男性不育症和勃起功

能障碍。

前期临床研究^[15-17]表明,养精胶囊可以显著提高人体的血清睾酮水平,改善少、弱精子症和无精子症患者的精子数量和质量。动物实验^[18,19]表明,养精胶囊可促进老年鼠睾酮的分泌,提高睾丸的脏器指数,以及精囊的分泌功能,增加精液量。体外细胞实验^[6,7,20]结果表明,养精胶囊水提液可以通过提高 Leydig 细胞中 StAR 的启动子活性,上调其转录和蛋白质水平的表达,提高细胞上清睾酮含量。基于前期的研究基础以及 H19 调控类固醇合成酶和睾酮生成的作用,笔者团队进一步研究养精胶囊对 H19 表达的影响,进而探索其促进睾酮合成的机制,具有一定的延续性和创新性。本研究表明,养精胶囊水提物可以显著提高 Leydig 细胞上清中睾酮和游离睾酮的浓度,同时还可以明显促进 LncRNA H19 mRNA 以及 StAR mRNA 和蛋白的表达。基于 H19 在睾酮合成中的作用^[4],笔者团队初步认为养精胶囊是通过 H19 调控 StAR 来促进睾酮合成的,后期还需通过 H19 的干扰实验进一步证实。

本结果表明,补肾填精类中药复方养精胶囊可以通过调控 LncRNA H19 以促进 Leydig 细胞合成睾酮,这对于阐明补肾填精法多通路改善男性生殖功能的机制,揭示“肾藏精”的科学实质,指导临床治疗睾酮降低引起的生殖疾病,提高男性的生殖健康具有重要意义。

参考文献

[1] HALPERN JA, BRANNIGAN RE. Testosterone deficiency[J]. JAMA, 2019,322(11):1116.
 [2] FACONDO P, DI LODOVICO E, PEZZAIOLI LC, et al. Usefulness of routine assessment of free testosterone for the diagnosis of functional male hypogonadism[J]. Aging Male, 2022,25(1):65-71.
 [3] CHEN Y, WANG J, FAN Y, et al. Absence of the long noncoding RNA H19 results in aberrant ovarian STAR and progesterone production[J]. Mol Cell Endocrinol, 2019,490:15-20.
 [4] CHEN Z, LIU L, XI X, et al. Aberrant H19 expression disrupts ovarian Cyp17 and testosterone production and is associated with polycystic ovary syndrome in women[J]. Reprod Sci, 2022,29(4):1357-1367.
 [5] TUGAEVA KV, SLUCHANKO NN. Steroidogenic acute regulatory pro-

tein: structure, functioning, and regulation[J]. Biochemistry(Moscow), 2019,84 (Suppl 1):233-253.
 [6] 孙大林,陈广辉,金保方,等.养精胶囊通过调控 StAR 启动子促进睾酮合成的研究[J]. 中国男科学杂志,2016,30(11):25-28.
 [7] SUN D, DONG W, JIN B, et al. Mechanisms of Yangjing capsule in Leydig cell apoptosis and testosterone synthesis via promoting StAR expression[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2018,41(9):1401-1405.
 [8] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
 [9] LI H, GU Y, SHANG X, et al. Decreased testosterone secretion index and free testosterone level with multiple symptoms for late-onset hypogonadism identification: a nationwide multicenter study with 5980 aging males in China[J]. Aging(Albany NY), 2020,12(24):26012-26028.
 [10] GOLDMAN AL, BHASIN S, WU FCW, et al. A reappraisal of testosterone's binding in circulation: physiological and clinical implications[J]. Endocr Rev, 2017,38(4):302-324.
 [11] 王力翔,黄丽莎,邱爽,等.雄激素替代对兔混合性干眼的治疗效果[J]. 中华医学杂志,2021,101(32):2525-2530.
 [12] YOSHIMURA H, MATSUDA Y, YAMAMOTO M, et al. Expression and role of long non-coding RNA H19 in carcinogenesis[J]. Front Biosci, 2018, 23(4):614-625.
 [13] KALLEN AN, ZHOU XB, XU J, et al. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs[J]. Mol Cell, 2013,52(1):101-112.
 [14] MEN Y, FAN Y, SHEN Y, et al. The steroidogenic acute regulatory protein(StAR) is regulated by the H19/let-7 axis[J]. Endocrinology, 2017, 158(2):402-409.
 [15] 张华俊. 养精胶囊治疗 DAZ 基因缺失所致无精子症的临床价值[D]. 南京:南京中医药大学,2010.
 [16] 金保方,黄宇烽,杨晓玉,等.养精胶囊治疗弱精子症的临床研究[J]. 南京中医药大学学报,2006,22(5):286-288.
 [17] 金保方,黄宇烽,夏欣一,等.养精胶囊联合锌硒宝对不育患者精子 DNA 完整性的影响[J]. 中国男科学杂志,2006,20(12):45-49.
 [18] 薛宇阳,金保方,叶佳,等.养精胶囊对大鼠精囊分泌功能的影响研究[J]. 吉林中医药,2011,31(4):375-376.
 [19] 金保方,薛宇阳,张新东,等.养精胶囊对老年大鼠精囊超微结构的影响[J]. 中华男科学杂志,2014,20(1):68-72.
 [20] SUN D, CUI Y, JIN B, et al. Effects of the Yangjing capsule extract on steroidogenesis and apoptosis in mouse Leydig cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012,2012:985457.

(收稿日期:2022-08-05)

(本文编辑:金冠羽)