DOI:10.16016/j.2097-0927.202406014

慢性心理应激对大鼠睾丸细胞老化的影响及糖皮质激素受体的作用研究

杨彬伟[1,2],孙 磊[1],凌 曦[1],陈 卿[1],王 童[1],杨 桓[1],刘晋祎[1],曹 佳[1],敖 琳[1],邹 鹏[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军事毒理学教研室[1];401520 重庆,重庆市合川区疾病预防控制中心[2]

[**摘要**] **目的** 探讨慢性心理应激对大鼠睾丸细胞老化的影响以及糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)在上述损害中的作用。**方法** 将32只4~6周龄雄性SD大鼠(体质量120~140 g)按随机数字表法平均分为4组:二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)组、米非司酮(mifepristone,RU486)组、慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress,CUMS)组和CUMS+RU486组。DMSO组采用DMSO皮下注射,剂量为0.5 mL/(kg/d);RU486组采用米非司酮皮下注射,剂量为1 mg/(kg/d);CUMS组采用CUMS单独造模处理;CUMS+RU486组在CUMS造模的同时采用RU486皮下注射,剂量为1 mg/(kg/d),以上4组均连续处理42 d。造模结束后采用动物行为学试验评估大鼠心理应激状况。计算机辅助精子分析(computer-aided sperm analysis,CASA)系统检测各组大鼠精子密度。酶联免疫法吸附试验法(enzyme-linked immuno sorbent assay,ELISA)检测血清皮质酮(corticosterone,CORT)、性激素和炎症因子浓度。分别采用丙二醛(malondialdehyde,MDA)、H_2O_2、NAD^+/NADH和ATP试剂盒检测各组动物睾丸组织MDA、H_2O_2、NAD^+/NADH和ATP的含量。Western blot检测睾丸组织β-gal、p16和GR等蛋白表达水平。透射电镜观察精原细胞线粒体结构。**结果** 与DMSO组比较,CUMS组精子密度、血清睾酮(testosterone,T)、黄体生成素(luteinizing hormone,LH)和卵泡刺激素(follicle stimulating hormone,FSH)浓度显著下降而血清CORT和雌二醇(estradiol,E_2)浓度升高(P均<0.001),血清促炎因子IL-6和TNF-α浓度升高而抗炎因子IL-10浓度降低(P均<0.05),睾丸组织ATP含量和NAD^+/NADH比值降低而MDA和H_2O_2含量升高(P均<0.05),睾丸细胞老化标志物β-gal、p16和GR蛋白表达水平显著升高(P均<0.01),精原细胞线粒体呈现肿胀及空泡化改变。与CUMS组比较,CUMS+RU486组精子密度和血清睾酮水平显著升高,β-gal、p16和GR蛋白表达水平显著降低(P均<0.05)。**结论** 慢性心理应激诱导大鼠睾丸损害,表现为精子密度和血清睾酮水平下降,其机制可能与GR介导的细胞老化有关。

[**关键词**] 慢性心理应激;慢性不可预知温和应激;生殖损害;细胞老化;糖皮质激素受体;线粒体
[**中图法分类号**] R322.64; R363.21; R395.2 [**文献标志码**] A

Effects of chronic psychological stress on testicular cell senescence in rats and role of glucocorticoid receptor in the process

YANG Binwei[1,2], SUN Lei[1], LING Xi[1], CHEN Qing[1], WANG Tong[1], YANG Huan[1], LIU Jinyi[1], CAO Jia[1], AO Lin[1], ZOU Peng[1] [1]Department of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Hechuan District Center for Disease Control and Prevention, Chongqing, 401520, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of chronic psychological stress on testicular cell senescence in rats and the role of glucocorticoid receptor (GR) in the process. **Methods** Thirty-two male SD

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年项目(82003429)
[**通信作者**] 邹 鹏,E-mail:julinlaotou@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

rats (4~6 weeks old, weighing 120~140 g) were randomly assigned into dimethyl sulfoxide (DMSO) group, mifepristone (RU486) group, chronic unpredictable mild stress (CUMS) group, and CUMS+RU486 group. DMSO of 0.5 ml/(kg·d) was injected subcutaneously into the rats of DMSO group. After the rats of the CUMS group were exposed to CUMS, mifepristone of 1 mg/(kg·d) was given to the rats of the RU486 group and CUMS+RU486 group. All the above 4 groups were inflicted for 42 consecutive days. After modeling, the psychological stress status of rats was evaluated with animal behavioral experiments. Computer-aided sperm analysis (CASA) system was used to detect sperm density. ELISA was employed to measure the serum levels of corticosterone (CORT), sex hormones and inflammation factors. The contents of malondialdehyde (MDA), H_2O_2, NAD^+/NADH and ATP in the testicular tissues were tested with corresponding reagent kits. Western blotting was utilized to detect protein levels of β-gal, p16, and GR in testicular tissue, and transmission electron microscopy was used to observe mitochondrial structure of spermatogenic cells. **Results** Compared with the DMSO group, the sperm density, serum levels of testosterone (T), luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) were decreased while those of CORT and estradiol (E_2) were increased in the CUMS group (all $P<0.001$). Serum pro-inflammatory factors IL-6 and TNF-α concentrations were increased while anti-inflammatory factor IL-10 concentration was decreased in the CUMS group than the DMSO group (all $P<0.05$). And, ATP content and NAD^+/NADH ratio were decreased while MDA and H_2O_2 levels were elevated in testicular tissues in the CUMS group (all $P<0.05$). Moreover, the protein levels of testicular cell aging markers β-gal, p16 and GR were significantly enhanced in the CUMS group (all $P<0.01$), accompanied by swelling and vacuolization of mitochondrial structures in spermatogenic cells. RU486 treatment effectively improved sperm density and increased CORT level and down-regulated the testicular β-gal, p16 and GR protein level (all $P<0.05$). **Conclusion** Chronic psychological stress induces testicular damage in rats, presenting declines in sperm density and CORT level, which is possibly associated with GR-mediated cell senescence.

[**Key words**] chronic psychological stress; chronic unpredictable mild stress; reproductive damage; cell senescence; glucocorticoid receptor; mitochondria

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82003429). Corresponding author: ZOU Peng, E-mail: julinlaotou@tmmu.edu.cn

过去数十年间,全球范围内的男性精液质量呈现不断下降的趋势,已成为育龄夫妇不孕不育的重要原因之一。近年来流行病学证据表明,除传统的遗传和环境污染因素外,睡眠时长减少、昼夜节律紊乱、体育运动缺乏和慢性心理应激等社会-心理-行为因素与精液质量的下降密切相关[1-4]。进一步阐明慢性心理应激致男(雄)性生殖损害的效应及相关机制,对促进男性生殖健康和保护生育力具有重要公共卫生学意义。

细胞老化是指细胞因发生不可逆的细胞周期阻滞而停止分裂的现象,电离辐射、缺氧和 PM2.5 等多种理化因素均可诱导组织细胞老化和各器官系统疾病的发生[5]。然而,慢性心理应激对动物睾丸细胞老化影响的研究鲜有报道。既往研究还表明,糖皮质激素(glucocorticoid,GC)及糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)可能是慢性心理应激多器官损害效应的主要中介因子[6]。例如,慢性心理应激可导致人或动物血清睾酮水平和精子密度显著下降,GC/GR 信号通路的异常激活可能是上述损害效应的重要机制[7]。然而,GR 是否介导慢性心理应激诱导的睾丸细胞老化尚不明确。因此,本研究采用慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress,CUMS)进行造模,探讨慢性心理应激对大鼠精液质量和睾丸细胞老化的影响,并明确 GR 在上述损害效应中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

32 只 4~6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠(体质量 120~140 g)购自陆军军医大学实验动物中心;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)和米非司酮(mifepristone,RU486)购自美国 Sigma 公司;睾酮(testosterone,T)、

卵泡刺激素(follicle stimulating hormone,FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone,LH)、雌二醇(estradiol,E_2)、IL-6、IL-10、TNF-α 和血清皮质酮(corticosterone,CORT)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒购自美国 MILLIPORE 公司;MAGEA4、PLZF、SOX9 抗体购自中国博奥森公司;GR、p16、β-gal、Tom20、Tim23、β-actin 和 GAPDH 抗体购自美国 CST 公司;ATP、H_2O_2、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和 NAD^+/NADH 检测试剂盒购自中国碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模 将实验动物适应性饲养 1 周后,根据随机数字表法将其分为 4 组($n=8$):DMSO 组、RU486 组、CUMS 组、和 CUMS+RU486 组。DMSO 组采用 DMSO 皮下注射,剂量为 0.5 mL/(kg/d);RU486 组采用 RU486 皮下注射,剂量为 1 mg/(kg/d);CUMS 组采用 CUMS 单独造模处理;CUMS+RU486 组在 CUMS 造模的同时采用 RU486 皮下注射,剂量为 1 mg/(kg/d),以上 4 组均连续处理 42 d。参考已发表文献[8]进行 CUMS 造模,具体方法为:CUMS 组大鼠为孤笼饲养,采用 24 h 潮湿垫料、24 h 鼠笼倾斜 45°、12 h 夜晚光照刺激、24 h 禁水、24 h 禁食、强迫游泳 5 min、束缚应激 4 h、白噪音暴露(95 dB)8 h、天敌声音 30 min 共 9 种不同的刺激因子,采用随机数字表法每天选取 1 种刺激因子,连续处理 42 d。造模结束后采用强迫游泳实验(forced swimming test,FST)、旷场实验(open-field test,OFT)和糖水消耗实验(sucrose preference test,SPT)分别评估各组大鼠心理应激状况。本研究经陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC2020063)。

1.2.2 动物取材及大鼠精子密度检测 采用 20% 乌拉坦麻醉动物,取大鼠睾丸、附睾和全血样本。医用眼科剪剪开附睾,使附睾精液样本充分洗脱并与 400 μL、37 ℃的 F12 培养基充分混匀;吸取 10 μL 悬浊液滴于大鼠专用精子分析玻片上,参考已发表文献方法采用计算机辅助精子分析(computer-aided sperm analysis,CASA)系统分析大鼠精子密度[9]。

1.2.3 血清性激素、炎症因子和 CORT 浓度检测 将采集的大鼠全血样本置于 4 ℃冰箱静止分层,4 ℃、13 000×g 离心 30 min,弃沉淀取上层血清样本;采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清性激素 T、FSH、LH、E_2、炎症因子 IL-6、IL-10、TNF-α 和 CORT 的浓度,各试剂盒批内批间差均小于 15%,具体操作步骤参考说明书。

1.2.4 附睾 HE 染色 将完整的附睾样本在多聚甲醛固定后石蜡包埋、切片;脱蜡后苏木精染液染色约 10 min,洗涤 10 min,盐酸乙醇分化液浸泡 30 s,洗涤 10 min;伊红染液染色 2 min,洗涤 10 min,晾干后,使用显微镜观察,并拍照。

1.2.5 Western blot 实验 取 20 mg 睾丸组织加入 100~200 μL 裂解液,组织研磨机匀浆,4 ℃、12 000×g 离心 5 min,取上清测定蛋白浓度;添加 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×),100 ℃加热 10 min 蛋白变性;120V 电泳 70~90 min;采用半干法转膜,参数设置为 25 V,30 min;5%的 BSA 封闭 2 h;一抗 GR(1∶1 000)、P16(1∶1 000)、β-gal(1∶1 000)、Tom20(1∶500)、Tim23(1∶500)、PLZF(1∶1 000)、MAGEA4(1∶1 000)、SOX9(1∶1 000)、β-actin(1∶2 000)和 GAPDH(1∶2 000)4 ℃孵育过夜;二抗(1∶10 000)室温孵育 1~2 h;TBST 洗涤后曝光,采用 Image J 软件进行灰度分析。

1.2.6 大鼠睾丸组织 MDA、H_2O_2、NAD^+/NADH 和 ATP 含量测定 用眼科剪取小块睾丸组织,置于带有研磨珠的 1.5 mL EP 管,加入 0.5 mL 的裂解液,4 ℃、13 000×g 离心 10 min,收集上清;MDA、H_2O_2、NAD^+/NADH 和 ATP 浓度的检测步骤参照各自说明书进行;MDA 和 H_2O_2 浓度检测采用化学发光法,吸光度测定值为 560 nm;NAD^+/NADH 和 ATP 浓度检测采用荧光酶标仪,于 450 nm 处测光密度值[D(450)];MDA、H_2O_2、NAD^+/NADH 和 ATP 的浓度采用睾丸组织蛋白浓度归一化较正。

1.2.7 透射电镜 取小块睾丸组织置于电镜固定液,4 ℃固定过夜后用 PBS 洗涤 3 次,1%锇酸固定 2 h 后用超纯水洗涤 3 次。将固定好的睾丸组织依次分别在 50%和 70%乙醇溶液中脱水 30 min,而后在 80%、90%和 100%丙酮溶液中依次分别脱水 30、30 和 10 min,以上步骤重复 2 次;将脱水的睾丸组织浸透于环氧树脂中固化后切片,采用醋酸铀和柠檬酸铅染色后于透射电子显微镜下观察大鼠睾丸精原细胞线粒体形态改变。

1.3 统计学分析

组间大鼠体质量变化采用两因素重复测量方差分析(Two-way Repeated Measures ANOVA),其余指标采用单因素方差分析(One-way ANONA)。数据分析和作图采用 GraphPad Prism(8.0),数据以 $\bar{x}\pm s$ 呈现。检验水准 $\alpha=0.05$。

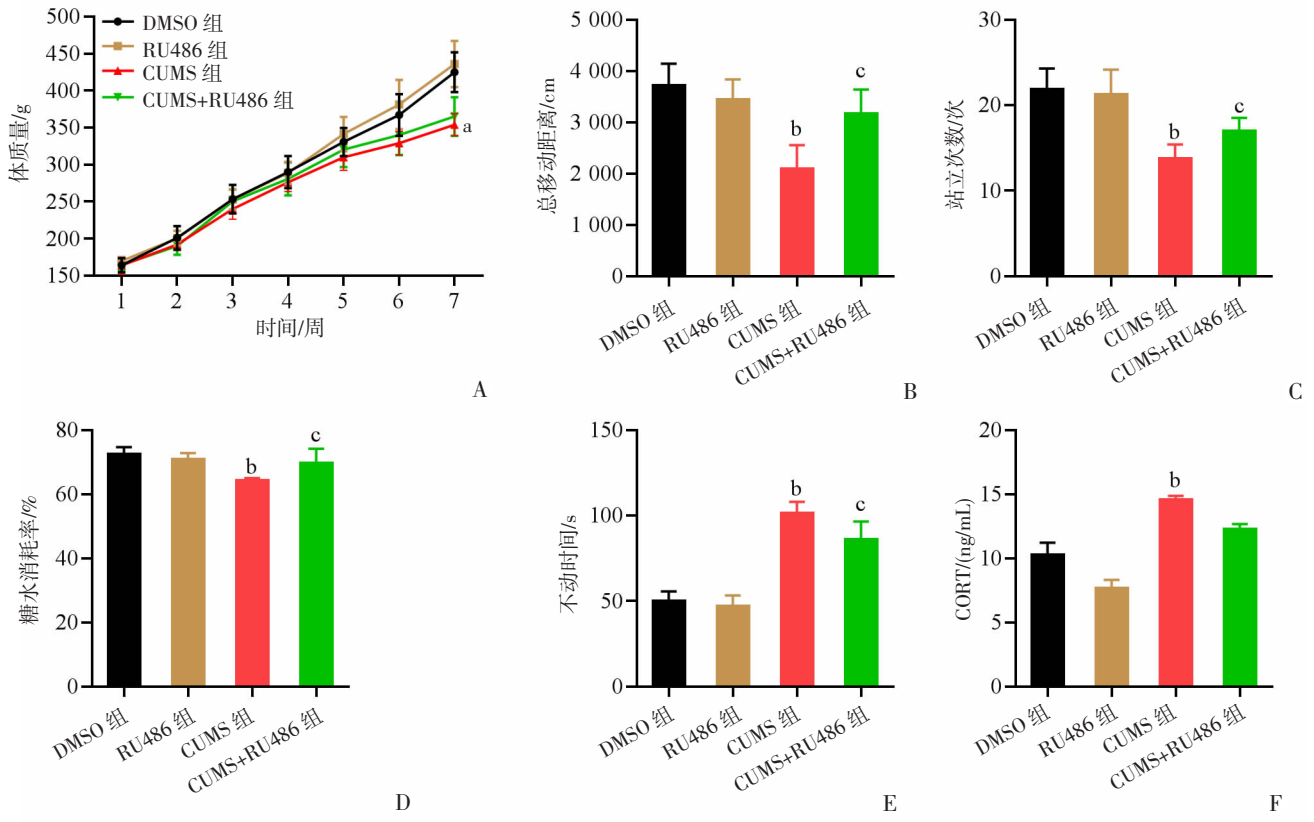
2 结果

2.1 大鼠体质量、行为学指标和血清 CORT 水平的检测

经过 42 d 的造模,CUMS 组体质量低于 DMSO 组(P<0.01,图 1A)。OFT 结果显示,CUMS 组总移动距离(P<0.001,图 1B)和站立次数(P<0.001,图 1C)低于 DMSO 组;SPT 结果显示,CUMS 组蔗糖水的喜好程度明显降低,糖水消耗率低于 DMSO 组(P<0.001,图 1D);FST 结果显示,CUMS 组在 FST 实验过程中表现出明显的不动状态,CUMS 组不动时间显著高于 DMSO 组(P<0.001,图 1E)。与 DMSO 组比较,CUMS 组大鼠 CORT 水平显著升高(P<0.001,图 1F)。上述结果提示,CUMS 组出现抑郁样行为,建模成功。对比 CUMS 组,CUMS+RU486 组上述抑郁样行为学指标均不同程度缓解。

2.2 慢性心理应激对大鼠雄性生殖系统的影响

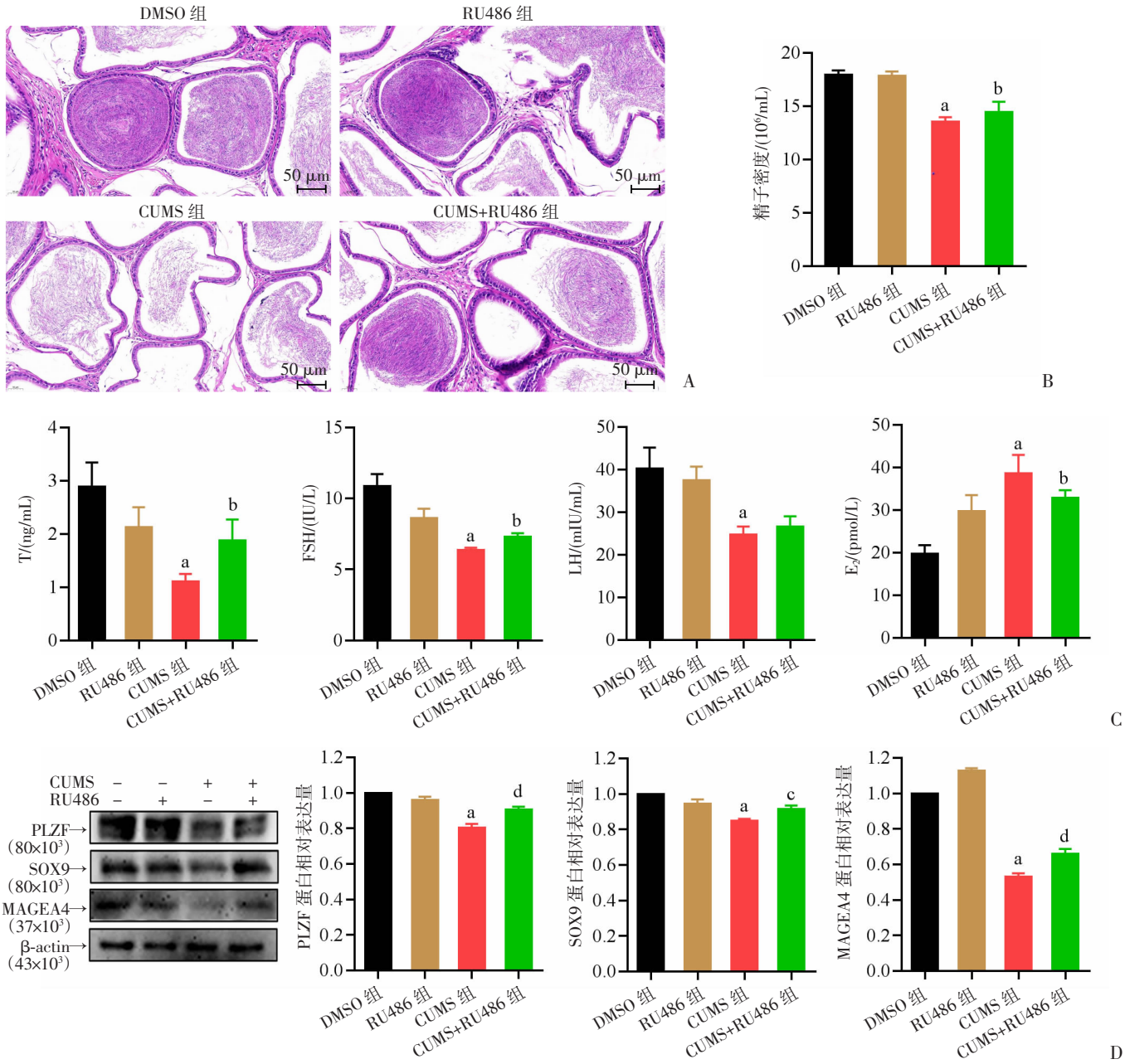
与 DMSO 组比较,HE 切片镜下观察发现 CUMS 组附睾管腔内精子数量减少(图 2A),同时精子密度显著降低(P<0.001,图 2B),血清 T、FSH 和 LH 浓度显著下降,而 E_2 水平显著升高(P 均<0.001,图 2C)。采用 Western blot 检测精原细胞标志物 PLZF、SOX9 和睾丸支持细胞标志物 MAGEA4 的蛋白表达水平,结果显示:与 DMSO 组比较,CUMS 组 PLZF、MAGEA4 和 SOX9 的蛋白水平均显著降低(P 均<0.001,图 2D),提示慢性心理应激可减少睾丸组织精原细胞和支持细胞的数量。与 CUMS 组比较,CUMS+RU486 组附睾管腔内精子数、精子密度、T、FSH 和 LH 水平均得到不同程度回升,异常升高的 E_2 水平下降,PLZF、MAGEA4 和 SOX9 的蛋白水平升高(P<0.05,图 2),提示 GR 参与慢性心理应激诱导的睾丸损害及性激素水平紊乱。



a:P<0.01,b:P<0.001,与 DMSO 组比较;c:P<0.01,与 CUMS 组比较

A:CUMS 造模期间各组大鼠体质量改变趋势图;B:OFT 检测大鼠总移动距离;C:OFT 检测大鼠站立次数;D:SPT 检测大鼠糖水消耗率;E:FST 检测大鼠不动时间;F:ELISA 检测血清 CORT 浓度

图 1 大鼠体质量、行为学指标和血清 CORT 水平的检测 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

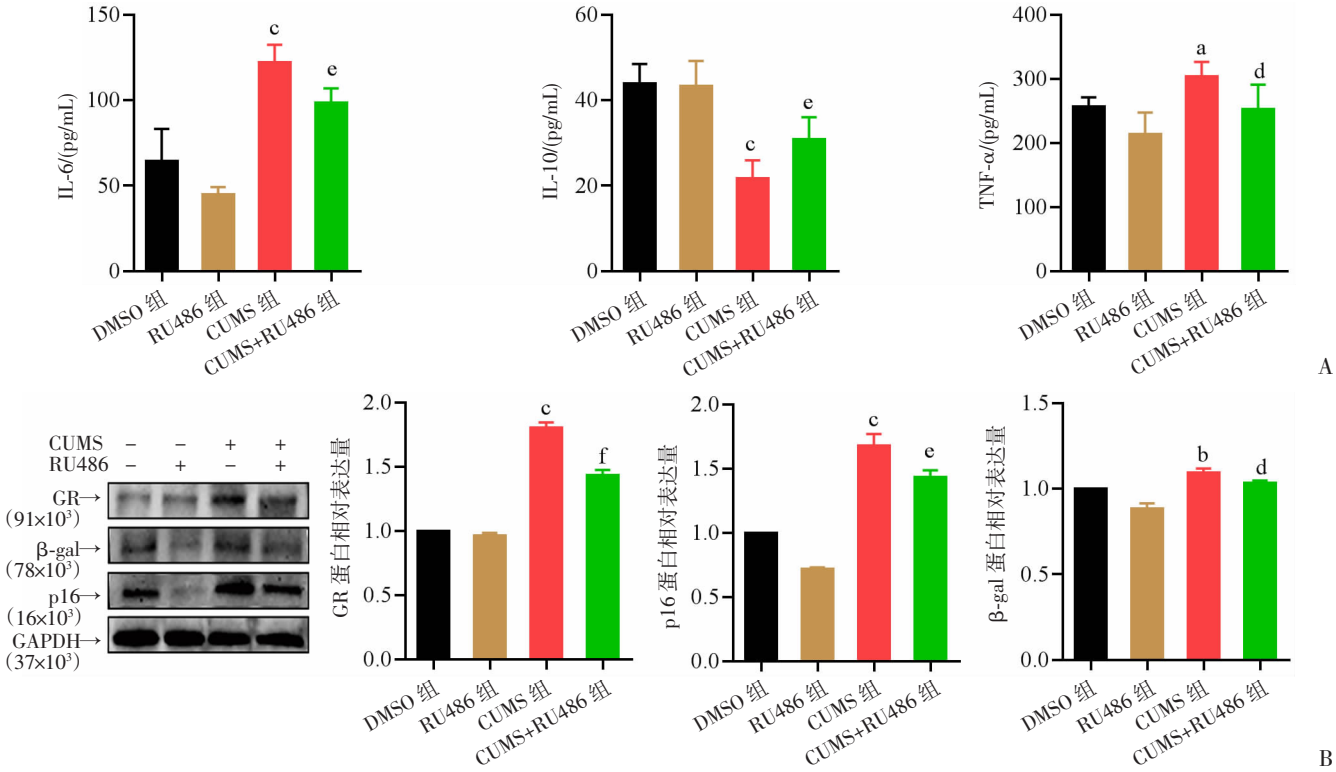


A: HE 染色观察大鼠附睾结构;B: CASA 检测大鼠附睾精子密度;C: ELISA 检测大鼠血清性激素浓度;D: Western blot 检测大鼠睾丸组织 PLZF、MAGEA4 和 SOX9 的蛋白相对表达量;a: $P<0.001$,与 DMSO 组比较;b:$P<0.05$, c:$P<0.01$, d:$P<0.001$,与 CUMS 组比较

图 2 慢性心理应激对大鼠雄性生殖系统的影响 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

2.3 慢性心理应激对大鼠血清和睾丸细胞老化标志物的影响

炎症因子 IL-6、IL-10 和 TNF-α 是 3 个经典的衰老相关分泌表型。与 DMSO 组比较,CUMS 组血清促炎因子 IL-6 和 TNF-α 浓度显著升高,抗炎因子 IL-10 浓度显著降低(P 均<0.05,图 3A),睾丸细胞衰老标志物 β-gal 和 p16 蛋白表达水平显著升高(P 均<0.01,图 3B),提示慢性心理应激可诱导大鼠睾丸细胞老化。与 CUMS 组比较,CUMS+RU486 组血清 IL-6 和 TNF-α 浓度下降,IL-10 浓度上升,睾丸细胞老化标志物 β-gal 和 p16 蛋白表达水平降低(P 均<0.05,图 3)。此外,GR 的蛋白表达水平在 CUMS 组显著升高,而在 GR 拮抗剂 RU486 干预后显著下调(P 均<0.001,图 3B)。提示慢性心理应激通过上调 GR 蛋白表达诱导大鼠睾丸细胞老化。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$,与 DMSO 组比较;d:$P<0.05$, e:$P<0.01$, f:$P<0.001$,与 CUMS 组比较

A: ELISA 检测大鼠血清 IL-6、IL-10 和 TNF-α 的浓度;B:Western blot 检测大鼠睾丸细胞 GR、p16 和 β-gal 的蛋白表达水平

图 3 慢性心理应激对大鼠血清和睾丸衰老标志物的影响 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

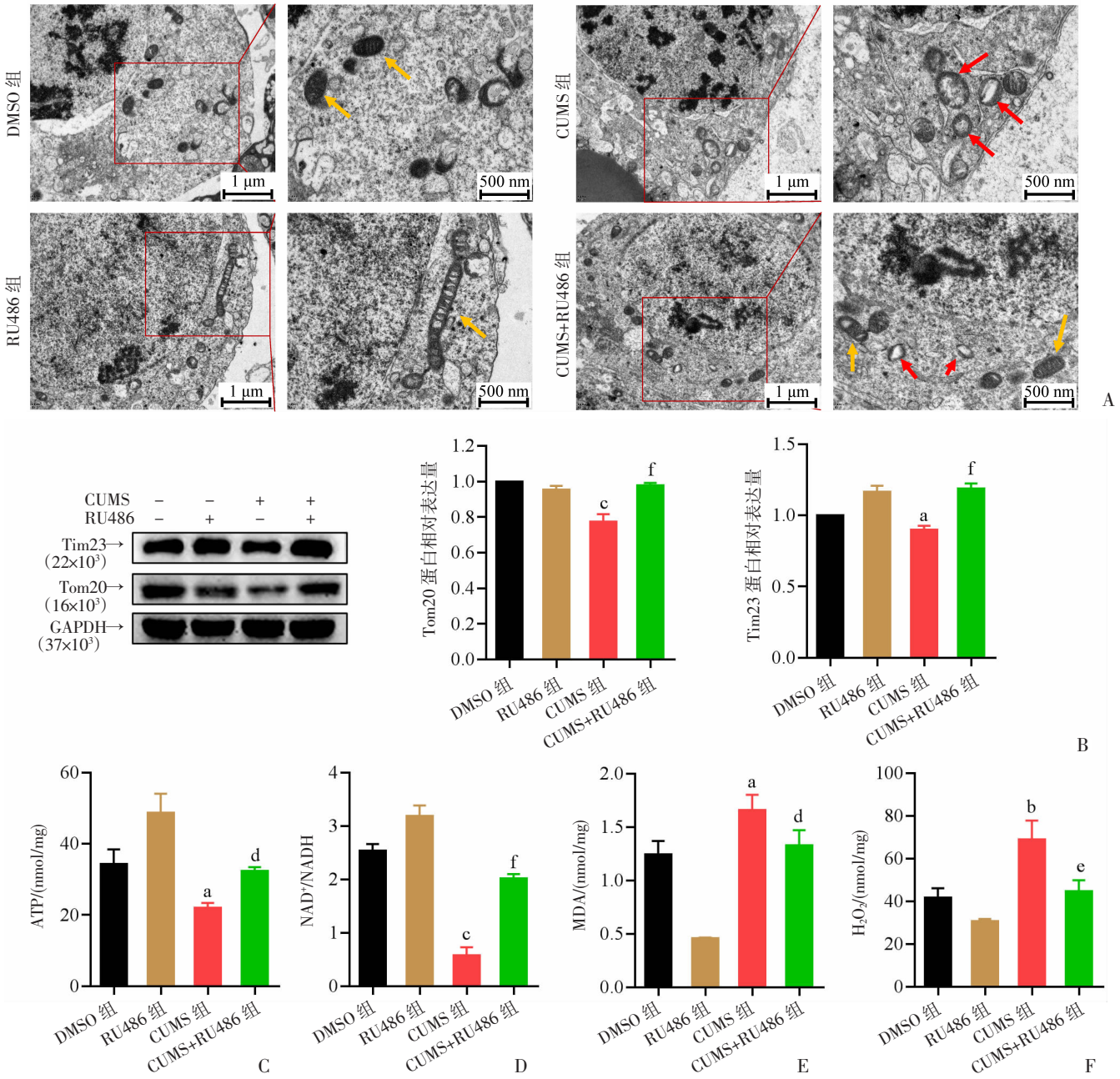
2.4 慢性心理应激对大鼠睾丸细胞线粒体结构和功能的影响

线粒体结构和功能的损害是细胞衰老的重要原因和特征。电镜结果显示,DMSO 组睾丸精原细胞线粒体内外双膜结构清晰,未见明显碎片样,而 CUMS 组睾丸精原细胞线粒体出现不同程度的肿胀,内部呈空泡化,且线粒体嵴区域分布模糊,少数出现断裂情况,膜结构变薄(图 4A)。Western blot 结果显示,与 DMSO 组比较,CUMS 组睾丸细胞线粒体膜蛋白 Tom20 和 Tim23 的表达均明显降低($P<0.05$,图 4B)。ATP 含量和 NAD^+/NADH 比值是反映线粒体氧化磷酸化功能的重要指标,结果显示,与 DMSO 组比较,CUMS 组睾丸组织 ATP 水平($P<0.05$,图 4C)和 NAD^+/NADH 比值显著下降($P<0.001$,图 4D)。与 DMSO 组比较,CUMS 组大鼠睾丸组织 MDA($P<0.05$,图 4E)和 H_2O_2($P<0.01$,图 4F)的水平显著升高,提示慢性心理应激可诱导大鼠睾丸细胞线粒体氧化损伤。进一步分析发现,与 CUMS 组比较,CUMS+ RU486 组睾丸线粒体结构和氧化磷酸化功能部分恢复正常,线粒体氧化损伤减轻($P<0.05$,图 4)。上述结果提示,GR 参与介导慢性心理应激诱导的睾丸细胞线粒体结构和功能损害。

3 讨论

慢性心理应激与男性精液质量下降密切相关,明确相关损害机制对保护男性生育力具有重要意义。本研究发现慢性心理应激可诱导大鼠精子密度下降、血清性激素水平紊乱和睾丸细胞老化,GR 拮抗剂 RU486 通过下调 GR 蛋白表达水平拮抗上述损害效应,相关研究结果为保护慢性心理应激诱导的男性生殖损害或可提供潜在药物干预靶点,对保护男性生育力提供参考依据。

大量人群流行病学证据表明,慢性心理应激是男性精液质量和睾酮水平下降明确的危险因子。早在 1977 年,有研究者就发现长期关押的死刑犯睾丸中仅存支持细胞和精原细胞,提示了心理应激对精子发生的抑制作用[10]。采用各类不同量表,研究者们发现抑郁症状[11]、焦虑症状[4]、工作压力[12]和负性生活事件[13]等与研究对象的精液质量和睾酮水平呈显著负相关。



A:透射电镜检测睾丸精原细胞线粒体 黄色箭头:正常的线粒体,红色箭头:受损的线粒体;B: Western blot 检测大鼠睾丸细胞 Tom20 和 Tim23 的蛋白表达水平;C: ATP 检测试剂盒检测睾丸细胞 ATP 含量;D:NAD^+/NADH 试剂盒检测睾丸细胞 NAD^+/NADH 比值;E:睾丸细胞 MDA 含量;F:睾丸细胞 H_2O_2 水平;a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,c: $P<0.001$,与 DMSO 组比较;d:$P<0.05$,e:$P<0.01$,f:$P<0.001$,与 CUMS 组比较

图 4 慢性心理应激对大鼠睾丸细胞线粒体结构和功能的影响 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

采用束缚应激或糖皮质激素模拟染毒的方式,动物实验亦证实与人群结果一致的慢性心理应激生殖损害效应。例如,不少研究者均发现,束缚应激可诱导精子密度降低,睾丸细胞凋亡,生精上皮空泡化和生殖细胞脱落,以及睾酮合成基因 scarb1、star 和 cyp17a1 蛋白表达下调[14-16]。然而,采用单一的束缚应激和糖皮质激素染毒的方式不能模拟人或动物实际慢性心理应激暴露情况。因此,本研究采用 CUMS 模型进行大鼠慢性心理应激造模,发现慢性心理应激可导致大鼠雄性生殖损害,主要表现为精子密度和睾酮水平下降,睾丸细胞老化。本研究和已有研究结果均表明,慢性心理应激是男(雄)性生殖损害的明确危险因素。

既往研究认为,慢性心理应激状态下高糖皮质激素水平通过 GR 介导的睾丸间质细胞损伤和睾酮合成抑制是慢性心理应激生殖损害效应的核心环节。研究发现,糖皮质激素通过激活 NF-κB 和 p65 诱导睾丸间质细胞凋亡[17]。此外,糖皮质激素还可通过 GR 下调睾丸间质细胞 StAR 和 3βHSD 蛋白表达水平抑制睾酮合成,而 GR 拮抗剂 RU486 预处理可显著恢复应激组大鼠血清睾酮水平[18-19]。与该研究类似,本研究也发现 CUMS 组大鼠血清睾酮出现显著下降,且 RU486 干预可部分回复睾酮水平。GR 除在睾丸间质细胞高表达以外,在支持细胞和早期生精细胞(精原细胞和精母细胞)也有显著表达[9,20],GR 是否介导了慢性心理应激对精子发生的直接损害效应尚不明确。

细胞老化是人体衰老和多种脏器系统疾病的重要原因之一,睾丸细胞老化的主要特点为睾酮合成能力以及生精功能逐渐下降[21]。老化细胞有多种表型,包括细胞周期阻滞、老化相关分泌表型(senescence associated secretory phenotype,SASP)改变、线粒体损害、β-gal 蛋白异常蓄积和细胞形态学改变等[22]。本研究团队已发表数据显示,CUMS 组大鼠精原细胞出现明显的 G_0/G_1 期周期阻滞和精子发生抑制[9],该结果提示,睾丸细胞老化可能是慢性心理应激生殖损害效益的重要机制,值得进一步研究。本研究聚焦细胞老化表型,发现与对照组比较,CUMS 组大鼠睾丸表现出显著的细胞老化,精原细胞线粒体损伤以及血清炎症因子(一种 SASP)IL-6、IL-10 和 TNF-α 水平异常改变。同时,GR 拮抗剂 RU486 可显著缓解慢性心理应激诱导的睾丸细胞老化、精原细胞线粒体损伤和 SASP 异常改变。本研究通过动物模型证实,GR 参与介导慢性心理应激诱导的睾丸细胞老化。需要指出的是,本研究尚未明确慢性心理应激所致睾丸老化的具体细胞类型,需要进一步研究。

综上所述,本研究通过构建 CUMS 大鼠模型,显示慢性心理应激诱导大鼠雄性生殖损伤,表现为精子密度和血清睾酮水平下降,该损害效应可能与 GR 介导的睾丸细胞老化有关。后续将进一步研究慢性心理应激诱导大鼠睾丸细胞老化的上游调控机制、分子起始事件和相关毒性通路,为提高人类精液质量和保护男性生育力提供理论依据。

参考文献:

[1] EMOKPAEM A, BROWN S I. Effects of lifestyle factors on fertility: practical recommendations for modification [J]. Reprod Fertil, 2021, 2(1): R13-R26. DOI: 10.1530/RAF-20-0046.

[2] LI T, BAI Y J, JIANG Y T, *et al*. The potential impacts of circadian rhythm disturbances on male fertility [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 1001316. DOI: 10.3389/fendo.2022.1001316.

[3] 王文钰, 柳松, 仕治达, 等. 1059 名济南市育龄男性体育锻炼情况与精液质量的相关分析[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(10): 1164-1171. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202305069.
WANG W Y, LIU S, SHI Z D, *et al*. Correlation between physical exercise and semen quality in 1 059 men of childbearing age in Jinan City[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(10): 1164-1171. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202305069.

[4] PAN Y, WANG S R, KANG J Q, *et al*. Association between generalized anxiety symptoms and semen quality in infertile men: a multicentre study in North China [J]. Andrologia, 2022, 54(8): e14449. DOI: 10.1111/and.14449.

[5] XU J N, SHAO T, LOU J F, *et al*. Aging, cell senescence, the pathogenesis and targeted therapies of intervertebral disc degeneration [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1172920. DOI: 10.3389/fphar.2023.1172920.

[6] NICOLAIDESN C, KYRATZI E, LAMPROKOSTOPOULOU A, *et al*. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids[J]. Neuroimmunomodulation, 2015, 22(1/2): 6-19. DOI: 10.1159/000362736.

[7] CHEN Y, WANG Q, WANG F F, *et al*. Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells *in vivo* [J]. Stress, 2012, 15(1): 74-84. DOI: 10.3109/10253890.2011.585188.

[8] 施佳仪, 向韵, 周梓洋, 等. 逍遥散加味对青幼期抑郁模型大鼠抑郁行为及小胶质细胞活化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5): 46-56. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231613.
SHI J Y, XIANG Y, ZHOU Z Y, *et al*. Modified Xiaoyaosan alleviates depression-like behaviors by regulating activation of hippocampal microglia cells in rat model of juvenile depression[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(5): 46-56. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231613.

[9] ZOU P, WANG X G, YANG W, *et al*. Mechanisms of stress-induced spermatogenesis impairment in male rats following unpredictable chronic mild stress (uCMS)[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4470. DOI: 10.3390/ijms20184470.

[10] JAFARI H, MIRZAIINAJMABADI K, ROUDSARI R L, *et al*. The factors affecting male infertility: a systematic review

[J]. Int J Reprod Biomed, 2021, 19(8): 681-688. DOI: 10.18502/ijrm.v19i8.9615.

[11] ZOU P, WANG X G, SUN L, *et al*. *Semen* quality in Chinese college students: associations with depression and physical activity in a cross-sectional study[J]. Psychosom Med, 2018, 80(6): 564-572. DOI: 10.1097/PSY.0000000000000595.

[12] ZOU P, SUN L, CHEN Q, *et al*. Social support modifies an association between work stress and semen quality: results from 384 Chinese male workers[J]. J Psychosom Res, 2019, 117: 65-70. DOI: 10.1016/j.jpsychores.2018.10.013.

[13] ZORN B, AUGER J, VELIKONJA V, *et al*. Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage[J]. Int J Androl, 2008, 31(6): 557-564. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00806.x.

[14] YADAV A, YADAV K, RAJPOOT A, *et al*. Sub-chronic restraint stress exposure in adult rats: an insight into possible inhibitory mechanism on testicular function in relation to germ cell dynamics[J]. Andrologia, 2022, 54(11): e14575. DOI: 10.1111/and.14575.

[15] GUO Y, SUN J Y, LI T, *et al*. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells *via* NF-κB/iNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9599. DOI: 10.1038/s41598-017-09943-2.

[16] LIN H, YUAN K M, ZHOU H Y, *et al*. Time-course changes of steroidogenic gene expression and steroidogenesis of rat Leydig cells after acute immobilization stress[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 21028-21044. DOI: 10.3390/ijms151121028.

[17] WANG Q, GAO H B. Involvement of nuclear factor-kappa B on corticosterone-induced rat Leydig cell apoptosis[J]. Asian J Androl, 2006, 8(6): 693-702. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2006.00212.x.

[18] XIAO Y C, HUANG Y D, HARDY D O, *et al*. Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells[J]. J Androl, 2010, 31(4): 365-371. DOI: 10.2164/jandrol.109.009019.

[19] ORR T E, MANN D R. Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats[J]. Horm Behav, 1992, 26(3): 350-363. DOI: 10.1016/0018-506x(92)90005-g.

[20] HAZRA R, UPTON D, JIMENEZ M, *et al*. *In vivo* actions of the Sertoli cell glucocorticoid receptor[J]. Endocrinology, 2014, 155(3): 1120-1130. DOI: 10.1210/en.2013-1940.

[21] 莫嘉辉, 李欣禹, 陈志宏, 等. 干细胞移植治疗睾丸衰老的现状与思考[J]. 器官移植, 2023, 14(3): 319-326. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.03.001.
MO J H, LI X Y, CHEN Z H, *et al*. Current status and reflections on stem cell transplantation in the treatment of testicular aging[J]. Organ Transplant, 2023, 14(3): 319-326. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.03.001.

[22] LUCAS V, CAVADAS C, AVELEIRA C A. Cellular senescence: from mechanisms to current biomarkers and senotherapies[J]. Pharmacol Rev, 2023, 75(4): 675-713. DOI: 10.1124/pharmrev.122.000622.

(**收稿**:2024-06-07;**修回**:2024-07-15)

(编辑 张艺霖)