

· 基础研究 ·

电针对睾酮低下老年大鼠 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的影响

曾婷婷¹ 李学智¹ 唐成林¹ 姚太万² 马琳³ 代妮¹

摘要 **目的** 观察电针对中老年男性部分雄激素缺乏综合征 (PADAM) 模型大鼠睾丸间质细胞 (Leydig 细胞) 的作用, 并探讨电针抗雄性生殖衰老的可能作用机制。**方法** 18 只 SD PADAM 大鼠随机分为老年组、药物组、电针组, 每组 6 只, SD 青年大鼠 6 只作为青年组。青年组和老年组给予 0.9% 氯化钠溶液 [7 mg/(kg·3d)] 腹部皮下注射。药物组予丙酸睾酮注射液 [7 mg/(kg·3d)] 腹部皮下注射。电针组取“肾俞”“关元”穴进行干预。治疗时间均为 8 周。观察治疗前后各组大鼠强迫游泳力竭时间, 采用 ELISA 检测各组大鼠血清总睾酮 (TT) 和游离睾酮 (FT) 水平, 采用免疫组化法检测 Leydig 细胞 Keap1 样环氧化丙烷相关蛋白-1 (Keap1) 蛋白表达, Western Blot 检测大鼠睾丸 Keap1、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、醌氧化还原酶 1 (NQO1) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 蛋白表达。**结果** 与青年组比较, 老年组治疗前强迫游泳力竭时间、血清 TT、FT 水平及睾丸 Nrf2、NQO1、SOD1 蛋白表达降低 ($P<0.01$), 睾丸 Keap1 蛋白表达增加 ($P<0.01$)。与老年组比较, 电针组与药物组治疗后强迫游泳力竭时间、血清 TT、FT 及睾丸 Nrf2、NQO1、SOD1 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 睾丸 Keap1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 电针可改善睾酮低下老年大鼠血清 TT、FT 含量, 提高老年大鼠抗疲劳能力, 其作用机制可能与调控 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路, 降低老年大鼠睾丸组织氧化应激损伤有关。

关键词 电针; 睾酮; 氧化应激

Effects of Electroacupuncture on Keap1-Nrf2 /ARE Signaling Pathway in Aged Rats with Low Testosterone ZENG Ting-ting¹, LI Xue-zhi¹, TANG Cheng-lin¹, YAO Tai-wan², MA Lin³, and DAI Ni¹

1 College of Traditional Chinese Medicine of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Cure of Metabolic Diseases, Chongqing (400016); 2 Department of Rehabilitation, Affiliated Rehabilitation Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing (400050); 3 Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Yangzhi Rehabilitation Hospital of Tongji University, Shanghai (201600)

ABSTRACT Objective To observe the antioxidative effect of electroacupuncture (EA) on Leydig cells of rats with partial androgen deficiency in the aging male (PADAM) and explore the underlying mechanism of anti-aging effect of EA. **Methods** Eighteen SD PADAM rats were randomly divided into aged group, medication group and EA group (6 in each group), and young SD rats ($n=6$) were selected as the youth group. The youth group and the aged group were given 0.9% sodium chloride solution [7 mg/(kg·3d)] by abdominal subcutaneous injection. In the medication group, testosterone propionate [7 mg/(kg·3d)] was injected subcutaneously. The EA group was treated by needling acupoints of Shenshu (BL23) and Guanyuan (CV4). The therapeutic course for all was 8 weeks. Before and after treatment, the exhaustive swimming time of rats in the forced swimming test was observed, and the levels of serum total testosterone (TT) and free testosterone

项目来源: 国家自然科学基金项目 (No.81303036); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目 (No.2017-0213); 重庆市渝中区科技计划项目 (No.20160108)

作者单位: 1. 重庆医科大学中医药学院, 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室 (重庆 400016); 2. 重庆医科大学附属康复医院康复治疗科 (重庆 400050); 3. 同济大学附属养志康复医院中医科 (上海 201600)

通讯作者: 李学智, Tel: 023-65712064, E-mail: lix999@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210509.099

(FT) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1) expression in Leydig cells was detected by immunohistochemistry. The expression of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), Keap1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and superoxide dismutase (SOD) in testis were assayed by Western Blot. **Results** Compared with the youth group, the duration of exhaustion swimming, serum TT and FT levels, and the protein expressions of Nrf2, NQO1 and SOD1 in testis decreased in the aged group before treatment ($P < 0.01$), while the protein expression of KEAP1 in testis increased ($P < 0.01$). Compared with the aged group, duration of exhaustion swimming, TT, FT, the protein expressions serum of Nrf2, NQO1 and SOD1 in testis increased in EA group and drug group after treatment ($P < 0.01$), and the protein expression of KEAP1 in testis decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** EA can improve the serum TT and FT contents of the aged rats with low testosterone, and improve the anti-fatigue ability. The mechanism of action may be related to the regulation of Keap1-Nrf2/Arf signaling pathway and the reduction of oxidative stress injury in the testicular tissue of the aged rats.

KEYWORDS electroacupuncture; testosterone; antioxidant capacity

中老年男性部分雄激素缺乏综合征 (partial androgen deficiency in the aging male, PADAM), 也称男性更年期综合征, 是中老年男性随着年龄增加体内雄激素水平下降以精神神经症状、植物神经功能紊乱、心理障碍及性功能减退为主要表现的一种临床症候群^[1,2]。睾酮替代疗法 (testosterone replacement therapy, TRT) 为临床治疗睾酮水平低下的最佳疗法^[3], 然而, 服用外源性睾酮 (testosterone, T) 可能增加中风, 心脏病发作和前列腺癌发生的风险^[4,5]。本课题组前期研究发现, 电针可显著提高 PADAM 模型大鼠体内 T 水平, 并上调睾酮合成酶的表达^[6]。电针还可通过降低睾丸内的慢性炎症反应, 促进 T 的合成^[7]。

PADAM 作为中老年过渡期疾病, 其发病机制与氧化应激密切相关^[8]。研究显示, 针灸能显著增强 PADAM 大鼠超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 降低丙二醛 (malonic dialdehyde, MDA) 含量^[9]。核因子 E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 氧化应激防御中的关键转录因子, 活化后可转入细胞核并调控下游抗氧化酶的表达, 以抵抗氧化应激^[10]。本实验通过观察电针对 PADAM 大鼠血清总睾酮 (total testosterone, TT)、游离睾酮 (free testosterone, FT), 以及 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated Protein-1, Keap1)-Nrf2/抗氧化反应元件 (antioxidant responsive element, ARE) 信号通路的影响, 进一步探讨电针治疗 PADAM 的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 2 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 8 只, 体重 (180~220) g, 20 月龄 SPF 级老年 SD 雄性

大鼠 30 只, 体重 (450~550) g, 购自重庆医科大学实验动物中心, 动物许可证: SYXK (渝) 2012-0001。本实验经重庆医科大学实验伦理委员会的批准 (No.2021.032)。

2 主要试剂和仪器 主要试剂: Nrf2 兔多抗 (美国 Abcam 公司, 批号: ab137550); Keap1、SOD1 兔多抗 (美国 Novus 公司, 批号: MAB30、PAB11339); NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1] 兔多抗 (美国 GeneTex 公司, 批号: GTX32756); GADPH 兔多抗 (重庆奥怡生物公司, C1846); HRP 标记的二抗 (重庆泽恒生物公司, BJ09145062); TT、FT 试剂盒 (上海沪尚生物公司, 批号: KS11473、KS10151); 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂 (北京中杉金桥公司, 批号: WK161518、16111A06); 丙酸睾酮注射液 (25 mg/支, 批号: H12020531, 天津金耀药业股份有限公司); SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (上海碧云天生物有限公司, 批号: P0012A)。

主要仪器: 韩氏电针治疗仪 (HANS-100 型, 南京济生公司)、一次性针灸针 (0.28 mm × 25 mm, 华佗牌)、电子天平 (AL 204 型, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司)、低温高速离心机 (美国 Sigma 公司)、酶标仪、电泳、电转仪 (美国 Bio-rad 公司) 上海 Odyssey FC 成像系统 (上海 GENE 公司)、BX53 普通正置显微镜 (日本 Olympus 公司)、CellSens Standard 图像采集软件 (美国 Media Cybernetics 公司)。

3 造模及分组 参考孙祥宙等^[1]的模型评价方法, 检测 8 只青年大鼠血清 T, 统计得出其 TT 为 (9.94 ± 0.88) ng/mL, FT 为 (10.85 ± 1.03) ng/L。

检测 30 只 SD 老年大鼠血清 TT 和 FT, 同时低于该数值即视为 PADAM 大鼠, 共 24 只, 随机选取 18 只纳入实验, 按体重随机分为老年组、药物组和电针组各 6 只, 8 只青年大鼠随机选 6 只作为青年组^[7]。

4 干预及取材 因性激素的分泌具有节律性, 故治疗时间定为上午 08:00~11:30 之间。前期研究显示, 干预 8 周具有良好效果^[6], 故本研究连续干预 8 周。青年组和老年组大鼠予 0.9% 氯化钠溶液 7mg/(kg·3d) 腹部皮下注射。药物组大鼠腹部皮下注射丙酸睾酮 7mg/(kg·3d), 左右腹部交替注射。根据《实验针灸学》上的方法定位^[11], 电针组选取双侧肾俞穴 (BL23) 与关元穴 (CV4)。BL23 位于大鼠第二腰椎下两旁; CV4 位于大鼠脐下约 25 mm。电针组予电针干预, 持一次性无菌针灸针予双侧“肾俞”“关元”穴直刺 6 mm, 选择电针治疗仪上的疏密波, 设置频率 2 Hz, 强度 1 mA, 每日 1 次, 留针 15 min, 5 日为一个疗程, 休息 2 日, 持续治疗 8 周。于干预前将各组大鼠乙醚麻醉后目内眦取血 1 mL。于干预结束后腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠 (0.3 mL/100 g), 剪开胸腔, 心脏取血 4 mL。手术完整剥离双侧睾丸, 将一侧睾丸固定于 4% 多聚甲醛中, 另一侧睾丸放于液氮中冻存。将采集好的血液予 4℃ 离心机中 3 000 r/min 离心 15 min, 取血清, 无酶 EP 管分装保存, 保存于 -80℃ 冰箱。

5 观察指标及检测方法

5.1 行为学检测 大鼠强迫游泳实验于治疗前和治疗后进行, 采用直径 50 cm、高 80 cm 的塑料桶, 游泳时水深保持为 50 cm, 水温控制在 24~26℃。记录大鼠游泳力竭时间, 以游泳至最后下沉经 10 s 后仍不能返回水面为判断标准。

5.2 血清 TT、FT 检测 严格按照 ELISA 试剂盒说明书要求检测治疗前后大鼠血清 TT、FT 水平。

5.3 形态学检测 左侧睾丸于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后常规脱水、透明、石蜡包埋、制成 4 μm 厚切片。按试剂说明行 HE 染色。置于光镜下观察病理学形态。

5.4 免疫组化检测 Keap1 蛋白表达 石蜡切片常规脱蜡至水, 微波高温修复抗原后冷却至室温, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 滴加正常山羊血清室温封闭 20 min, 滴加一抗 Keap1 (1:500), 4℃ 孵育过夜; 滴加二抗和 SABC 孵育, 滴加 DAB 显色后复染、冲洗、脱水、透明、封片。置于光镜下观察 Keap1 染色阳性的细胞为棕褐色。每张切片随机选取 5 个高倍视野 (×400), 使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析

软件分析平均吸光度。

5.5 Western Blot 法检测睾丸组织 Keap1、Nrf2、NQO1 及 SOD1 蛋白表达水平 取液氮保存的睾丸组织约 50 mg, 加入 RIPA 裂解液及 PMSF, 匀浆后 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, BCA 法检测蛋白浓度。上样量为 30 μg, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白电转膜至 PVDF 膜上, 室温摇床封闭 2h, 加一抗 4℃ 冰箱过夜, TBST 洗膜 5 min×3 次。加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 min×3 次, ECL 化学发光成像仪中显影。以 GAPDH 为内参, Image Studio Ver 5.0 图像分析软件分析结果。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 事后多重比较采用 LSD 法, 各组治疗前后比较采用配对 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠治疗前后强迫游泳力竭时间比较 (表 1) 与青年组同期比较, 老年组治疗前强迫游泳力竭时间缩短 (*P*<0.01)。与本组治疗前比较, 药物组及电针组强迫游泳力竭时间增长 (*P*<0.01)。与老年组同期比较, 药物组及电针组治疗后强迫游泳力竭时间增长 (*P*<0.01); 电针组与药物组比较, 差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

表 1 4 组大鼠治疗前后强迫游泳力竭时间比较 (min, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	强迫游泳力竭时间
青年	6	治疗前	23.83 ± 1.47
		治疗后	24.33 ± 1.37
老年	6	治疗前	10.67 ± 2.25*
		治疗后	10.33 ± 1.86
药物	6	治疗前	10.83 ± 2.56
		治疗后	17.50 ± 2.88 [△]
电针	6	治疗前	10.17 ± 2.32
		治疗后	17.50 ± 2.43 ^{△△}

注: 与青年组同期比较, **P*<0.01; 与老年组同期比较, [△]*P*<0.01; 与本组治疗前比较, ^{△△}*P*<0.01

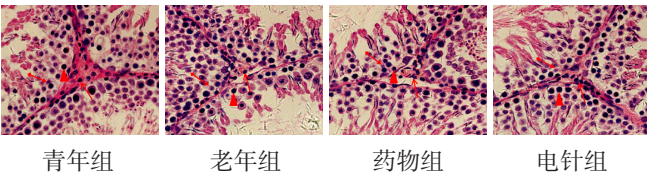
2 各组大鼠治疗前后血清 TT、FT 水平比较 (表 2) 与青年组同期比较, 老年组治疗前血清 TT、FT 水平降低 (*P*<0.01)。与本组治疗前比较, 老年组 TT、FT 水平降低 (*P*<0.05, *P*<0.01), 药物组和电针组 TT、FT 水平升高 (*P*<0.01)。与老年组同期比较, 药物组及电针组治疗后血清 TT、FT 水平升高 (*P*<0.01); 电针组与药物组比较, 差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

表 2 各组大鼠治疗前后血清 TT、FT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	TT (ng/mL)	FT (nmol/L)
青年	6	治疗前	9.94 ± 0.88	10.85 ± 1.03
		治疗后	9.59 ± 1.18	10.44 ± 1.14
老年	6	治疗前	4.49 ± 1.13*	5.32 ± 1.33*
		治疗后	3.35 ± 0.95 ^{△△}	3.57 ± 1.54 [△]
药物	6	治疗前	3.68 ± 1.38*	5.21 ± 1.01*
		治疗后	5.94 ± 1.82 ^{△△△}	6.54 ± 1.72 ^{△△△}
电针	6	治疗前	4.22 ± 1.35*	4.49 ± 1.05*
		治疗后	6.81 ± 1.25 ^{△△△}	6.24 ± 1.01 ^{△△△}

注:与青年组同期比较,* $P<0.01$;与老年组同期比较, $\Delta P<0.01$;与本组治疗前比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

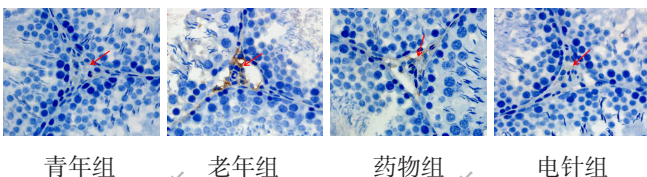
3 各组大鼠睾丸形态学的观察(图 1) 青年组睾丸生精小管基膜完整,可见各级 Sertoli 细胞及支持细胞排列有序,Leydig 细胞呈圆形。老年组与药物组基膜不完整,各级 Sertoli 细胞数目明显减少,排列紊乱,Leydig 细胞形态欠规则。与老年组比较,电针组可见基膜较完整,Sertoli 细胞排列较整齐,Leydig 细胞数量增多且略规则。



注:图中有尾箭头示支持细胞,无尾箭头示 Leydig 细胞,三角示生精细胞

图 1 各组大鼠睾丸病理学比较 (HE, × 400)

4 各组治疗后大鼠 Leydig 细胞 Keap1 表达水平比较(图 2、表 3) 各组大鼠 Leydig 细胞 P-ERK 均呈弱阳性表达,可见粗细不等的棕黄色颗粒主要分布在 Leydig 细胞胞质中。与青年组比较,老年组 Keap1 平均吸光度值升高 ($P<0.01$)。与老年组比较,药物组和电针组 Keap1 平均吸光度值降低 ($P<0.01$)。与药物组比较,电针组 Keap1 平均吸光度值降低 ($P<0.01$)。



注:箭头示阳性细胞

图 2 睾丸组织间质细胞 Keap1 免疫组化图 (IHC 染色, × 400)

5 各组大鼠睾丸组织 Keap1、Nrf2、NQO1、SOD1 的蛋白表达比较(表 4, 图 3) 与青年组比

表 3 各组大鼠睾丸组织间质细胞 Keap1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均吸光度值
青年	6	171.78 ± 25.20
老年	6	1 249.62 ± 23.06*
药物	6	1 082.64 ± 54.45 [△]
电针	6	303.76 ± 57.73 ^{△△}

注:与青年组比较,* $P<0.01$;与老年组比较, $\Delta P<0.01$;与药物组比较, $\Delta P<0.01$

较,老年组 Nrf2、NQO1 及 SOD1 蛋白表达降低,Keap1 蛋白表达量增加 ($P<0.01$)。与老年组比较,药物组和电针组 Nrf2、NQO1 及 SOD1 蛋白表达量升高,Keap1 蛋白表达量降低 ($P<0.01$)。与药物组比较,电针组 Nrf2、NQO1 及 SOD1 蛋白表达量升高,Keap1 蛋白表达量降低 ($P<0.01$)。

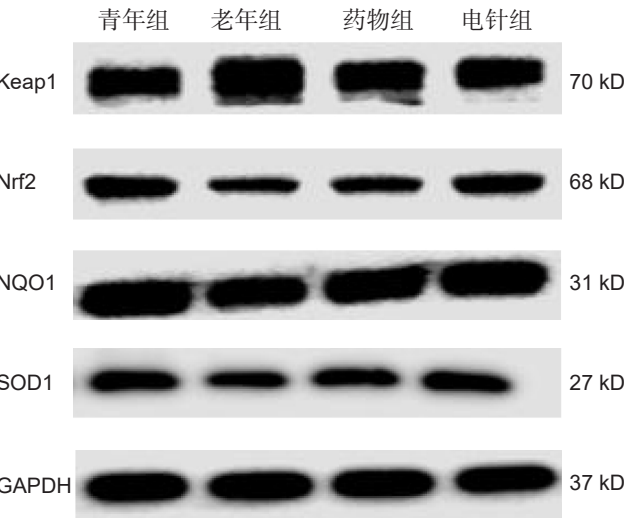


图 3 各组大鼠睾丸组织 Keap1、Nrf2、NQO1 级 SOD1 蛋白表达条带图

讨 论

PADAM 具有很强的性别和年龄特异性,T 水平下降是其最重要的病理变化^[12]。但血清 TT 水平并不完全反映生物活性睾酮的水平,因此本研究同时增加了对 FT 水平的检测。采用孙祥宙等^[13]采用的自然造模法,力图更好地模拟 PADAM 的自然病理变化过程。本实验结果显示老年组大鼠血清 TT、FT 水平下降且低于青年组血清值 95% 可信区间,行为学改变,符合 PADAM 的病理变化,提示运用自然造模法复制 PADAM 大鼠模型是可行的。

男性 95% 的雄激素睾酮是由 Leydig 细胞合成,其合成和分泌受下丘脑—垂体—睾丸轴 (the hypothalamus-pituitary-testicular axis, HPTA) 的严格调控。PADAM 的发生在于年龄老化所致的

表 4 各组大鼠睾丸中 Keap1、Nrf2、NQO1 及 SOD1 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Keap1	Nrf2	NQO1	SOD1
青年	6	0.92 ± 0.02	0.68 ± 0.02	1.41 ± 0.02	0.68 ± 0.02
老年	6	1.05 ± 0.01*	0.43 ± 0.02*	1.07 ± 0.02*	0.46 ± 0.03*
药物	6	1.01 ± 0.03 [△]	0.51 ± 0.03 [△]	1.21 ± 0.03 [△]	0.59 ± 0.03 [△]
电针	6	0.96 ± 0.02 ^{△△}	0.66 ± 0.03 ^{△△}	1.39 ± 0.02 ^{△△}	0.65 ± 0.03 ^{△△}

注:与青年组比较,* $P < 0.01$;与老年组比较,[△] $P < 0.01$;与药物组比较,^{△△} $P < 0.01$

HPTA 的调节功能障碍和睾丸功能衰退引起睾酮水平降低^[14]。尽管血清 T 水平下降与下丘脑—垂体轴功能变化有关,但已有研究表明,棕色挪威大鼠血清睾酮水平随着年龄显著下降,而黄体生成素(luteinizing hormone, LH)水平并无显著地下降^[15,16],这项结果与在人类中相似。这表明,虽然年龄相关的功能改变可能发生在下丘脑—垂体轴内,但初级性腺损害主要导致了年龄相关的睾酮下降。在对年轻和老年大鼠 Leydig 细胞计数中发现损失的 Leydig 细胞并不能够解释年龄有关的睾酮水平降低^[17],因此 Leydig 细胞功能的变化与之关系更密切。

尽管与年龄相关的 Leydig 细胞功能缺陷发生的机制仍然不确定,但有研究表明老化的 Leydig 细胞内的氧化还原平衡发生了变化,细胞内的氧化和抗氧化防御的不平衡可导致 DNA、蛋白质和(或)脂质损伤,从而导致 Leydig 细胞功能改变,产生 T 的能力下降^[18]。Keap1-Nrf2/ARE 信号通路近年发现的最为重要的内源性抗氧化信号通路,其中 Nrf2 是启动氧化应激防御的关键步骤,Nrf2 的活性主要由 Keap1 控制,Keap1 是 Nrf2 的负性调控因子,在基础条件下,Nrf2 被 Keap1-Cul3-Rbx 复合物泛素化降解,在 ROS 的刺激下,Nrf2 与 Keap1 解偶联使 Nrf2 易位至细胞核并通过与其靶基因的启动子区域中 ARE 结合而启动其细胞保护性转录程序^[19]。Nrf2 活化后上调下游 II 期解毒酶 NQO1 和抗氧化酶 SOD1 的表达^[20]。研究发现敲除了 Nrf2 基因的野生型小鼠,其在中年阶段便出现血清睾酮水平和 Leydig 细胞睾酮产生的显著下降,而老年小鼠睾酮水平下降更为显著^[21]。本实验显示老年组睾丸 Nrf2、NQO1、SOD1 表达明显低于青年组,说明睾丸衰老与 Nrf2 相关的抗氧化能力下降密切相关。

本实验研究结果显示,治疗后,药物组与电针组大鼠血清 TT、FT 水平及强迫游泳力竭时间相当。与老年组相比,药物组与电针组睾丸组织中 Nrf2、NQO1、SOD1 表达均明显增加,Keap1 表达均明显下降,说明电针能通过调控睾丸组织内部抗氧化应激通路 Keap1-Nrf2/ARE,改善衰老 Leydig 细胞睾酮生

成的微环境,从而促进睾酮的合成和分泌,延缓生殖衰老。这可能是电针促进睾酮分泌的机制之一。研究也显示针灸通过刺激保健穴位具有调节免疫功能、清除自由基损伤、调节内分泌等功能,具有延缓衰老的作用^[22-24]。目前,电针对于雄激素分泌及 Leydig 细胞功能的调节方面研究甚少,氧化应激是引起 Leydig 细胞衰老及其功能下降的重要原因,本研究从电针抗氧化机制入手,为进一步对 PADAM 的实验研究和临床治疗提供了一定参考。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Huhtaniemi I. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment[J]. Asian J Androl, 2014, 16(2): 192-202.
- [2] Bai J, Xie J, Xing Y, et al. Synthesis and biological evaluation of methylpyrimidine-fused tricyclic diterpene analogs as novel oral anti-late-onset hypogonadism agents[J]. Eur J Med Chem, 2019, 176: 21-40.
- [3] Diemer T, Hauptmann A, Wagenlehner FM. Testosterone therapy[J]. Der Urologe, 2016, 55(4): 539-550.
- [4] Schooling CM, Luo S, Au Yeung SL, et al. Genetic predictors of testosterone and their associations with cardiovascular disease and risk factors: a mendelian randomization investigation[J]. Int J Cardiol, 2018, 267: 171-176.
- [5] Ponce OJ, Spencer-Bonilla G, Alvarez-Villalobos N, et al. The efficacy and adverse events of testosterone replacement therapy in hypogonadal men: a systematic review and meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(5): 1745-1754.
- [6] Yi R, Yang X, Yu Z, et al. Effects and mechanisms

- of acupuncture and moxibustion on reproductive endocrine function in male rats with partial androgen deficiency[J]. *Acupunct Med*, 2016, 34 (2): 136–143.
- [7] 姚太万, 刘嘉, 李学智, 等. 电针对睾酮低下老年大鼠睾丸间质细胞慢性炎症反应的影响[J]. *针刺研究*, 2018, 43 (3): 163–168.
- [8] Huang D, Wei W, Xie F, et al. Steroidogenesis decline accompanied with reduced antioxidation and endoplasmic reticulum stress in mice testes during ageing[J]. *Andrologia*, 2018. doi: 10.1111/and.12816.
- [9] 任毅, 杨晓光, 李学智, 等. 不同灸法对部分雄激素缺乏综合征大鼠性激素 / 促性激素分泌调节及 SOD、MDA 影响的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39 (11): 1546–1551.
- [10] Tang Z, Hu B, Zang F, Wang J, et. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (7): 510.
- [11] Hapangama DK, Kamal A, Saretzki G. Implications of telomeres and telomerase in endometrial pathology[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23 (2): 166.
- [12] Amore M, Innamorati M, Costi S, et al. Partial androgen deficiency, depression, and testosterone supplementation in aging men[J]. *Int J Endocrinol*, 2012, 2012: 280724.
- [13] 孙祥宙, 邓春华, 郭海彬, 等. PADAM 动物模型进行同种异体睾丸间质细胞移植的研究[J]. *中国男科学杂志*, 2005, 19 (3): 9–11.
- [14] Midzak AS, Chen H, Papadopoulos V, et al. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 299 (1): 23–31.
- [15] Surampudi PN, Wang C, Swerdloff R. Hypogonadism in the aging male diagnosis, potential benefits, and risks of testosterone replacement therapy[J]. *Int Jo Endocrinol*, 2012, 2012: 625434.
- [16] Veldhuis JD, Liu PY, Keenan DM, et al. Older men exhibit reduced efficacy of and heightened potency downregulation by intravenous pulses of recombinant human LH: a study in 92 healthy men[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302 (1): 117–122.
- [17] Zirkkin BR, Tenover JL. Aging and declining testosterone: past, present, and hopes for the future[J]. *J Androl*, 2012, 33 (6): 1111–1118.
- [18] Beattie MC, Chen H, Fan J, et al. Aging and luteinizing hormone effects on reactive oxygen species production and DNA damage in rat Leydig cells[J]. *Bio Reprod*, 2013, 88 (4): 100.
- [19] Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Zazueta C, et al. Nrf2: molecular and epigenetic regulation during aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 47: 31–40.
- [20] Li S, Song Z, Liu T, et al. Polysaccharide from *Ostrea rivularis* attenuates reproductive oxidative stress damage via activating Keap1-Nrf2/ARE pathway[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 186: 321–331.
- [21] Chen H, Jin S, Guo J, et al. Knockout of the transcription factor Nrf2: effects on testosterone production by aging mouse Leydig cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 409: 113–120.
- [22] 杨健濠, 卢美静, 赵彩娇, 等. 灵龟八法按时开穴灸对衰老大鼠免疫功能及核因子- κ B 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45 (12): 37–41.
- [23] 王彩霞. 针灸对亚急性衰老模型小鼠皮肤的抗衰老作用研究[J]. *中医基础医学杂志*, 2014, 20 (11): 1544–1546.
- [24] 刘晓艳. 针灸衰老模型小鼠“气海”穴对性腺及性腺激素影响的实验研究[J]. *四川中医*, 2009, 27 (6): 17–19.
- (收稿: 2019–03–19 在线: 2021–11–04)
责任编辑: 邱禹