• 药理与临床 •

基于 Notch1/HES1 通路探讨淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸支持细胞胶质细胞源性神经营养因子表达的影响

段海丽[1,3]，陈豫凤[1,3#]，张长城[1,3]，付国庆[1,3]，卯润敏[1,3]，屈亚男[1,3]，高子惠[1,2]，吴　杰[4]，赵海霞[1,2*]

1. 国家中医药管理局 中药药理科研三级实验室，湖北 宜昌　443002
2. 三峡大学基础医学院，湖北 宜昌　443002
3. 三峡大学健康医学院，湖北 宜昌　443002
4. 三峡大学 分析测试中心，湖北 宜昌　443002

摘　要：目的　研究淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸支持细胞胶质细胞源性神经营养因子（glial cell line-derived neurotrophic factor，GDNF）表达的作用及其机制。**方法**　将小鼠分为对照组、模型组及淫羊藿苷低、中、高剂量（2.5、5.0、10.0 mg/kg）组，给予药物干预后，统计性腺质量及指数，采用伊红染色法检测小鼠精子活率，血球板计数法统计精子数量，苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色评价睾丸组织损伤程度，Western blotting 检测睾丸组织 GDNF、Notch1、Notch1 细胞内结构域（intracellular domain of Notch1，NICD）和 HES1 蛋白表达水平，免疫荧光和免疫组化分别检测睾丸组织 Notch1 和 HES1 表达。采用 TM4 细胞建立 *D*-半乳糖诱导的衰老模型及 HES1 过表达模型，设置对照组、模型组和淫羊藿素低、中、高剂量（0.2、0.4、0.8 μmol/L）组，采用 CCK-8 法检测细胞活性，qRT-PCR 检测 *GDNF* mRNA 表达水平，Western blotting 检测 GDNF、Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达水平。**结果**　体内实验结果显示，与对照组比较，模型组小鼠性腺质量、性腺指数、精子活率和精子数量显著下降（$P<0.01$），睾丸组织形态损伤，GDNF 蛋白表达水平明显降低（$P<0.01$），Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$、0.01）；与模型组比较，淫羊藿苷给药组小鼠性腺质量、性腺指数、精子活率和精子数量显著提高（$P<0.05$、0.01），睾丸组织损伤明显改善，GDNF 蛋白表达上调（$P<0.05$、0.01），Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达下调（$P<0.05$、0.01）。体外实验结果显示，与对照组比较，模型组细胞活性明显下降（$P<0.01$），GDNF mRNA 和蛋白表达显著下降（$P<0.05$、0.01），Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达显著上升（$P<0.05$、0.01）；与模型组比较，淫羊藿素可明显提高细胞活性（$P<0.05$、0.01），促进 GDNF mRNA 和蛋白表达（$P<0.05$、0.01），抑制 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达（$P<0.05$、0.01、0.001）；而 HES1 过表达可拮抗淫羊藿素对 GDNF 表达的促进作用（$P<0.01$）。**结论**　淫羊藿苷能够有效促进衰老小鼠睾丸支持细胞 GDNF 表达，其机制可能与抑制 Notch1/HES1 通路有关。

关键词：淫羊藿苷；衰老；睾丸支持细胞；胶质细胞源性神经营养因子；Notch1/HES1 通路

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2025)18 - 6620 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.012

Effect of icariin on expression of glial cell derived neurotrophic factor in testicular Sertoli cells of aging mice based on Notch1/HES1 pathway

DUAN Haili[1, 3], CHEN Yufeng[1, 3], ZHANG Changcheng[1, 3], FU Guoqing[1, 3], MAO Runmin[1, 3], QU Yanan[1, 3], GAO Zihui[1, 2], WU Jie[4], ZHAO Haixia[1, 2]

1. Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443002, China
2. College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

收稿日期：2025-06-04

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82274191）；国家自然科学基金资助项目（82474321）

作者简介：段海丽，硕士研究生，研究方向为中药生殖药理学。E-mail: 1837034094@qq.com

#共同第一作者：陈豫凤，硕士研究生，研究方向为中药生殖药理学。E-mail: 1270361911@qq.com

***通信作者：**赵海霞，教授，博士生导师，从事衰老相关疾病机制及药物防治机制研究。E-mail: zhaohaixia.mm@163.com

3. College of Medicine and Health Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China
4. Analysis and Testing Center, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of icariin on expression of glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) in testicular Sertoli cells of aging mice. **Methods** Mice were divided into control group, model group, and icariin low-, medium-, and high-dose (2.5, 5.0, 10.0 mg/kg) groups. After drug intervention, the gonadal weight and index were measured. The sperm viability of mice was detected by eosin staining, the number of sperm was measured by hemocytometer counting, and the degree of testicular tissue damage was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression levels of GDNF, Notch1, intracellular domain of Notch1 (NICD) and HES1 protein in testicular tissue were detected by Western blotting. Immunofluorescence and immunohistochemistry were used to detect the expressions of Notch1 and HES1 in testicular tissue, respectively. *D*-galactose-induced aging model and HES1 overexpression model were established using TM4 cells. Control group, model group, and icaritin low-, medium- and high-dose (0.2, 0.4, 0.8 μmol/L) groups were set up. The cell viability was detected using CCK-8 method. GDNF mRNA expression level was detected by qRT-PCR. GDNF, Notch1, NICD and HES1 protein expression levels were detected by Western blotting. **Results** The results of *in vivo* experiments showed that compared with control group, the gonadal weight, gonadal index, sperm motility and sperm count of mice in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), testicular tissue morphology was damaged, GDNF protein expression level was significantly reduced ($P < 0.01$), Notch1, NICD, and HES1 protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with model group, mice in icariin treated group showed significant improvements in gonadal weight, gonadal index, sperm motility and sperm count ($P < 0.05$, 0.01), as well as significant improvement in testicular tissue damage. GDNF protein expression was up-regulated ($P < 0.05$, 0.01), while Notch1, NICD and HES1 protein expressions were down-regulated ($P < 0.05$, 0.01). The *in vitro* experimental results showed that compared with control group, the cell viability of model group was decreased significantly ($P < 0.01$), the expressions of GDNF mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), the expressions of Notch1, NICD, and HES1 proteins were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01); Compared with model group, icaritin significantly increased cell viability ($P < 0.05$, 0.01), promoted GDNF mRNA and protein expressions ($P < 0.05$, 0.01), and inhibited Notch1, NICD and HES1 protein expressions ($P < 0.05$, 0.01, 0.001); Overexpression of HES1 could counteract the promoting effect of icaritin on GDNF expression ($P < 0.01$). **Conclusion** Icariin could effectively promote the expression of GDNF in testicular Sertoli cells of aging mice, and its mechanism may be related to the inhibition of Notch1/HES1 pathway.

Key words: icariin; aging; testicular Sertoli cells; glial cell line-derived neurotrophic factor; Notch1/HES1 pathway

由于生育观念的改变及三胎政策的开放，男性平均生育年龄逐年升高[1]。研究表明，随着年龄增加，由睾丸支持细胞分泌的胶质细胞源性神经营养因子（glial cell line-derived neurotrophic factor，GDNF）表达下降使得精原细胞增殖减少，最终导致生精功能减退[2-3]。因此，促进睾丸支持细胞 GDNF 的表达，是延缓衰老所致睾丸生精功能减退的关键。Notch1/HES1 信号通路是调节 GDNF 表达的关键通路[4-5]。Notch1 与配体结合后，释放出细胞内结构域（intracellular domain of Notch1，NICD），激活其下游靶基因 HES1[6]，后者能够直接结合到 GDNF 基因的启动子区域，抑制其转录活性，进而抑制 GDNF 的表达[7]。研究显示，衰老可导致小鼠睾丸支持细胞中 Notch1/HES1 通路异常激活[8]，提示抑制 Notch1/HES1 通路可能是改善衰老所致睾丸支持细胞 GDNF 表达减少的有效途径。

淫羊藿 *Epimedii Folium* 是小檗科淫羊藿属多年生草本植物，其药用部位为叶，其味辛，性甘、温，归肝、肾经，具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效，淫羊藿苷是其主要有效成分，能够有效地改善生殖系统的损伤[9]。本课题组前期研究表明，淫羊藿苷可抑制 *D*-半乳糖诱导的衰老 TM4 细胞 GDNF 表达减少[10]。同时，研究显示，淫羊藿苷可下调人前列腺癌细胞中的 Notch1/HES1 通路，进而抑制癌细胞增殖[11]。因此，本研究拟采用自然衰老小鼠模型并构建 TM4 细胞模型，探讨淫羊藿苷对衰老所致支持细胞 GDNF 减少的改善作用与 Notch1/HES1 通路的相关性，以期为临床运用淫羊藿苷治疗衰老所致男性生精功能减退提供理论基础及科学依据。

1 材料

1.1 动物

40 只 15 月龄和 10 只 1 月龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠，购买并饲养于湖北宜昌三峡大学实验动物中心，动物许可证号 SCXK（鄂）2022-0012，实验单位使用许可证号 SCXK（鄂）2022-0061，饲养条件为室温（23±3）℃，相对湿度（60±5）%，12 h

明暗交替，自由进食和饮水。动物实验经三峡大学实验动物伦理委员会批准（批准号 2022020Z4）。

1.2 细胞

小鼠睾丸支持细胞株 TM4 细胞购自美国 ATCC，于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中常规培养。

1.3 药品与试剂

淫羊藿苷（批号 160920，质量分数≥98%），购自四川成都植标化纯生物技术有限公司；淫羊藿素（批号 20082003，质量分数≥99%）购自四川成都普菲德生物技术有限公司；*D*-半乳糖（批号 G5388，质量分数≥99%）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，批号 D8418）购自美国 Sigma 公司；性别决定区 Y 框蛋白 9（sex determining region Y box protein 9，SOX9）抗体（批号 MABC277）购自美国 Millipore 公司；增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）抗体（批号 SOB2253）购自杭州斯达特生物科技有限公司；Notch1 抗体（批号 3608）、HES1 抗体（批号 11988）购自美国 CST 公司；GDNF 抗体（批号 WL02826a）、NICD 抗体（批号 WL03097a）购自沈阳万类生物科技有限公司；β-actin 抗体（批号 AC026）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；氯化钠（批号 7647-14-5）购自天津福晨化学试剂有限公司；氯化钾（批号 10016318）、十二水磷酸氢二钠（批号 10020318）、磷酸二氢钾（批号 10017608）、柠檬酸三钠（批号 10019408）、羧甲基纤维素钠（CMC-Na，批号 30036365）购自国药集团化学试剂有限公司；四甲基乙二胺（批号 MB2514-1）购自大连美仑生物技术有限公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，批号 A0050-3010）购自德国 Grogen Biotech 公司；DAPI（批号 S0001）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA，批号 154707）、山羊抗兔二抗（批号 KR0023）购自武汉科瑞生物有限公司；山羊抗鼠二抗（批号 115-035-003）、Alexa Fluor 488 标记的驴抗兔二抗（批号 711-545-152）、Alexa Fluor 594 标记的驴抗兔二抗（批号 711-585-152）购自美国 Jackson Immunoresearch 公司；RIPA 裂解液试剂盒（批号 P1255）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 P1511）、ECL 显影液（批号 P1020）购自北京普利莱基因技术有限公司；伊红 Y 染色液（批号 805C037）购自北京索莱宝科技有限公司；DAB 显色试剂盒（批号 2309180031F）购自福州迈新生物技术开发有限公司；4%多聚甲醛（批号 CR2209049）、抗荧光淬灭封片剂（批号 CR2207103）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；DMEM/F12 培养基（批号 8121045）购自美国 Gibco 公司；0.25%胰蛋白酶（批号 22060701）购自杭州吉诺生物医药技术有限公司；Total RNA 提取试剂 RNAiso（批号 2270A）购自日本 Takara 公司；RNA 逆转录试剂盒（批号 K1691）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；CCK-8 试剂盒（批号 A311-01）、SYBR Green 荧光染料试剂盒（批号 Q221-01）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Lipofectamine™ 2000 脂质体过表达转染试剂（批号 11668019）购自美国 Invitrogen 公司；HES1 过表达质粒（批号 Y20028）购自苏州吉玛基因股份有限公司。

1.4 仪器

TP1020 型全自动脱水机、STARTER3100 型 pH 剂（美国 OHAUS 公司）；HistoCore CHROMAX ST 型全自动 HE 染色机、EG1150H 型包埋机（德国 Lecia 公司）；YD-335 型切片机（金华市益迪医疗设备有限公司）；CS-VI 型烤片烘片机（孝感市宏业医用仪器有限公司）；DG-9240A 型电热鼓风干燥箱（上海森言实验仪器有限公司）；CKX41 型光学倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；SY-BJ10L 型超纯水机（成都渗源科技有限公司）；RX50 型荧光显微镜（北京舜宇光学仪器有限公司）；移液器、Centrifuge 5424 R 型高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；Infinite F50 型全波长酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；PowerPac 200 型 Western blotting 电泳仪（美国 Bio-Rad Laboratories 公司）；TS-200 型定轨摇床（海门市其林贝尔公司）；ChemiScope 化学发光凝胶成像自动显影仪（上海勤翔科学仪器有限公司）；HVA-85 型高压灭菌锅（日本 Hirayama 公司）；CO_2 培养箱、NanoDrop 微量分光光度计仪器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BCM-1300A 型超净工作台（郑州宏朗仪器设备有限公司）。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 0.01 mol/L PBS 溶液配制 依次称取氯化钠粉末 40 g、氯化钾粉末 1 g、十二水磷酸氢二钠粉末 17.9 g 及磷酸二氢钾粉末 1.2 g，加入到 1 L 超纯水中，搅拌至完全溶解后定容至 1.5 L，最后将 pH 调至 7.40，常温存放。

2.1.2 0.5% CMC-Na 溶液配制 称取 0.5 g CMC-Na，加入到 100 mL 生理盐水中，涡旋混匀后，置

于 60 ℃烘箱内助溶，至固体粉末完全溶解即可。

2.1.3 淫羊藿苷溶液配制 称取淫羊藿苷粉末 100 mg，加入到 10 mL 0.5% CMC-Na 溶液中，涡旋混匀后，超声 15 min 助溶，完全溶解后，得到 10 mg/mL 淫羊藿苷溶液，避光放置于 4 ℃冰箱。10 mg/mL 淫羊藿苷溶液以 0.5% CMC-Na 溶液倍比稀释，分别得到 1.00、0.50、0.25 mg/mL 淫羊藿苷溶液。

2.1.4 1.6 mol/L *D*-半乳糖溶液配制 称取 1.44 g *D*-半乳糖粉末，溶于 5 mL 含 10% FBS 的完全培养基中，37 ℃水浴锅中振荡 30 min 助溶后，涡旋至完全溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后，封口膜封口，储存于−20 ℃冰箱中。

2.1.5 淫羊藿素溶液配制 称取 27.07 mg 淫羊藿素粉末，溶解于 4 mL DMSO 溶液中，得到 10 mmol/L 淫羊藿素溶液，封口避光置于−20 ℃冰箱中。按照 10 mmol/L 淫羊藿素溶液∶DMSO＝1∶1 的比例，稀释成 5 mmol/L 淫羊藿素溶液，再按照 5 mmol/L 淫羊藿素溶液∶含 10% FBS 的完全培养基＝1∶99 的比例，稀释成 50 μmol/L 淫羊藿素溶液，现配现用。

2.2 动物分组及给药

将 15 月龄小鼠随机分为模型组[12]和淫羊藿苷低、中、高剂量组，每组 10 只，另将 10 只 1 月龄小鼠作为对照组。1 月龄小鼠相当于人的 13 岁，15 月龄小鼠相当于人的 50 岁[13]。根据《中国药典》2020 年版一部，淫羊藿的用量为 6～10 g/d，其中淫羊藿苷质量分数不得少于 0.5%，按照体表面积转换系数进行等效换算[14]，小鼠体表面积系数为 0.002 6，故小鼠淫羊藿的用量为 0.78～1.3 g/d，淫羊藿苷的给药剂量为 3.9～6.5 mg/kg，将 5 mg/kg 定为本实验的中剂量，低、高剂量分别为中剂量的 0.5、2 倍，即 2.5、10.0 mg/kg。淫羊藿苷给药组小鼠 ig 0.25、0.50、1.00 mg/mL 的淫羊藿苷溶液（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积的 0.5% CMC-Na，1 次/d，连续给药 3 个月。至模型组和淫羊藿苷给药组小鼠 18 月龄（相当于人的 56 岁）、对照组小鼠 4 月龄（相当于人的 23 岁）时，小鼠禁食禁水 12 h 后，称定质量，ip 20%乌拉坦溶液麻醉处死，迅速分离出睾丸和附睾组织。

2.3 小鼠精子活率和精子数量的测定

将双侧附睾放入含 1 mL 生理盐水的 EP 管中剪碎，于 37 ℃恒温箱中孵育 5 min，充分释放精子，得精子悬液。取 10 μL 精子悬液与等体积伊红 Y 染色液混匀，吸取 10 μL 混悬液，滴加于载玻片上，镜下选取多个视野并拍照。基于活精子不会被伊红染色，死精子可被伊红染成红色的原理，计算精子活率。取 20 μL 精子悬液与 480 μL 生理盐水混匀，得精子稀释液，吸取 10 μL 稀释液打入血球计数板，镜下对计数板 4 个象限拍照并计数。

精子活率＝活精子数/总精子数

精子数量＝4 个象限计数平均值×10^4×25/2

2.4 苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色观察小鼠睾丸组织形态变化

小鼠睾丸组织放入 4%多聚甲醛中固定 24 h 后，放入全自动脱水机中脱水，结束后进行组织包埋。设置切片厚度为 4 μm 进行连续切片，将切片黏附于载玻片后，60 ℃烘箱中烤片 4 h，随后置于全自动 HE 染色机中染色，中性树脂封片，阴干。光学显微镜下观察睾丸组织形态和结构变化并采集图像。

2.5 Western blotting 检测睾丸组织 Notch1、NICD、HES1 和 GDNF 蛋白表达

取 50 mg 睾丸组织，加入 1 mL RIPA 裂解液，于匀浆仪中匀浆，再置于冰上每 10 分钟涡旋 1 次，裂解 1 h 后，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，吸取上清液，得小鼠睾丸总蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白浓度，将蛋白与 Loading Buffer 按照 4∶1 的比例充分混合，在 100 ℃金属浴中煮沸 10 min 使蛋白样品充分变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂牛奶封闭液中室温封闭 1 h，加入一抗（β-actin、Notch1、NICD、HES1 和 GDNF），4 ℃摇床孵育过夜；次日，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，加入二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，加入 ECL 显影液浸润条带，通过化学发光成像系统显影，并采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.6 免疫荧光检测睾丸组织 Notch1 蛋白的表达及定位

小鼠睾丸石蜡切片置于 60 ℃烘箱融蜡，经二甲苯、梯度乙醇和双蒸水脱蜡后，浸于修复液中，高压修复 10 min，自然冷却至室温。滴加 5% BSA 溶液室温封闭 1 h，滴加 Notch1 抗体（1∶200），4 ℃孵育 16～20 h，孵育后取出湿盒，室温下复温 30 min，PBS 浸洗 5 次，每次 6 min。滴加荧光二抗，室温避光孵育 1 h，PBS 浸洗 5 次，每次 6 min，洗涤完成后滴加 SOX9 抗体（1∶400），4 ℃孵育 16～20 h。次日，室温下复温 30 min，PBS 洗涤、

滴加荧光二抗室温避光孵育 1 h 后，滴加 DAPI，室温避光孵育 10 min，PBS 浸洗 3 次，每次 10 min，抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下观察 Notch1 蛋白的表达及定位变化，并采集图像。

2.7 免疫组化检测睾丸组织 HES1、PCNA 蛋白的表达及定位

小鼠睾丸石蜡切片经脱蜡、修复和冷却后，滴加 3%过氧化氢灭活 10 min，PBS 浸洗 5 次，每次 6 min，滴加 5% BSA 溶液于室温封闭 1 h，滴加 HES1 抗体（1∶200）、PCNA 抗体（1∶2 000），4 ℃孵育 16～20 h。次日，取出湿盒于室温下复温 30 min，PBS 浸洗 5 次，每次 6 min，滴加二抗，室温孵育 1 h，孵育完成后 PBS 浸洗 5 次，每次 6 min，再滴加 DAB 显色液，显色 30 s，苏木素染色 30 s，分化、返蓝各 2 s，再分别经双蒸水、梯度乙醇和二甲苯透化，每个缸 5 min。最后中性树脂封片，阴干。光学显微镜下观察 HES1、PCNA 蛋白的表达及定位变化并采集图像。

2.8 CCK-8 检测细胞活性

D-半乳糖诱导细胞衰老模型具有高效性，其可通过诱导氧化应激、激活衰老信号通路，使多种细胞出现典型衰老表型[15]。根据本课题组前期研究[16-17]，选择 100 mmol/L *D*-半乳糖处理 TM4 细胞 60 h，构建细胞衰老模型。分别加入不同浓度（0.01、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60、3.20、6.40 μmol/L）的淫羊藿素预处理细胞 12 h，弃去培养基，加入 *D*-半乳糖和不同浓度淫羊藿素处理细胞 60 h，按照 CCK-8 试剂盒说明书进行细胞活性检测。

2.9 细胞分组和处理

2.9.1 淫羊藿素对 *D*-半乳糖诱导的 TM4 细胞的作用 TM4 细胞以 2×10^5 个/mL 接种至小培养皿，常规培养。设置对照组、模型组和淫羊藿素低、中、高剂量（0.2、0.4、0.8 μmol/L）组。除对照组和模型组外，其余各组细胞给予淫羊藿素预保护 12 h，弃去旧培养基。对照组加入含 10% FBS 的完全培养基培养，模型组加入含 *D*-半乳糖（终浓度为 100 mmol/L）的完全培养基培养，淫羊藿素低、中、高剂量组分别用终浓度为 0.2、0.4、0.8 μmol/L 的淫羊藿素和 100 mmol/L *D*-半乳糖共同培养，各组均培养 60 h。

2.9.2 淫羊藿素对 HES1 过表达的 TM4 细胞的作用 TM4 细胞以 2×10^5 个/mL 接种于小培养皿，常规培养。设置对照组、*D*-半乳糖（100 mmol/L）组、pcDNA 组、*D*-半乳糖（100 mmol/L）＋淫羊藿素（0.8 μmol/L）＋pcDNA 组、*D*-半乳糖（100 mmol/L）＋淫羊藿素（0.8 μmol/L）＋HES1 过表达组和 *D*-半乳糖（100 mmol/L）＋淫羊藿素（0.8 μmol/L）组，待细胞融合至 40%时，采用 Lipofectamine™ 2000 作为转染试剂，参照过表达质粒试剂使用说明书进行转染。转染 6 h 后更换培养基，给予淫羊藿素预保护 12 h，弃去旧培养基。对照组和 pcDNA 组加入含 10% FBS 的完全培养基培养，*D*-半乳糖组加入含 *D*-半乳糖（终浓度为 100 mmol/L）的完全培养基培养，其他组加入含淫羊藿素（终浓度为 0.8 μmol/L）和 *D*-半乳糖（终浓度为 100 mmol/L）的完全培养基培养，各组均培养 60 h。

2.10 qRT-PCR 检测细胞 *GDNF* mRNA 表达

按“2.9”项下进行分组和处理后，收集细胞，TRIzol 法提取细胞总 RNA，并使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。按照试剂盒说明书进行逆转录，得到 cDNA。按照 SYBR Green 说明书配制 qRT-PCR 反应体系，使用实时荧光定量 PCR 仪检测 *GDNF* mRNA 表达水平。以 *β-actin* 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *GDNF* 的 mRNA 相对表达量。引物在 NCBI 网站利用 BLAST 工具进行设计及验证后委托武汉生工生物工程有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5’-3’)
GDNF	F: CGAACTCGTGCCCCTAACC
	R: AGACCCCCAGCTGGACATTA
β-actin	F: CCTCACTGTCCACCTTCC
	R: GGGTGTAAAACGCAGCTC

2.11 Western blotting 检测细胞 Notch1、NICD、HES1 和 GDNF 蛋白表达

按“2.9”项下进行分组和处理后，弃去培养基，用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次，吸干残余液体，加入 100 μL RIPA 裂解液，4 ℃摇床裂解 30 min，随后用细胞刮将细胞收集至 1.5 mL EP 管中，冰上继续裂解 30 min，期间每 5 分钟涡旋 1 次，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，吸取上清液，得细胞总蛋白。按“2.5”项下方法测定 Notch1、NICD、HES1 和 GDNF 蛋白表达。

2.12 统计学分析

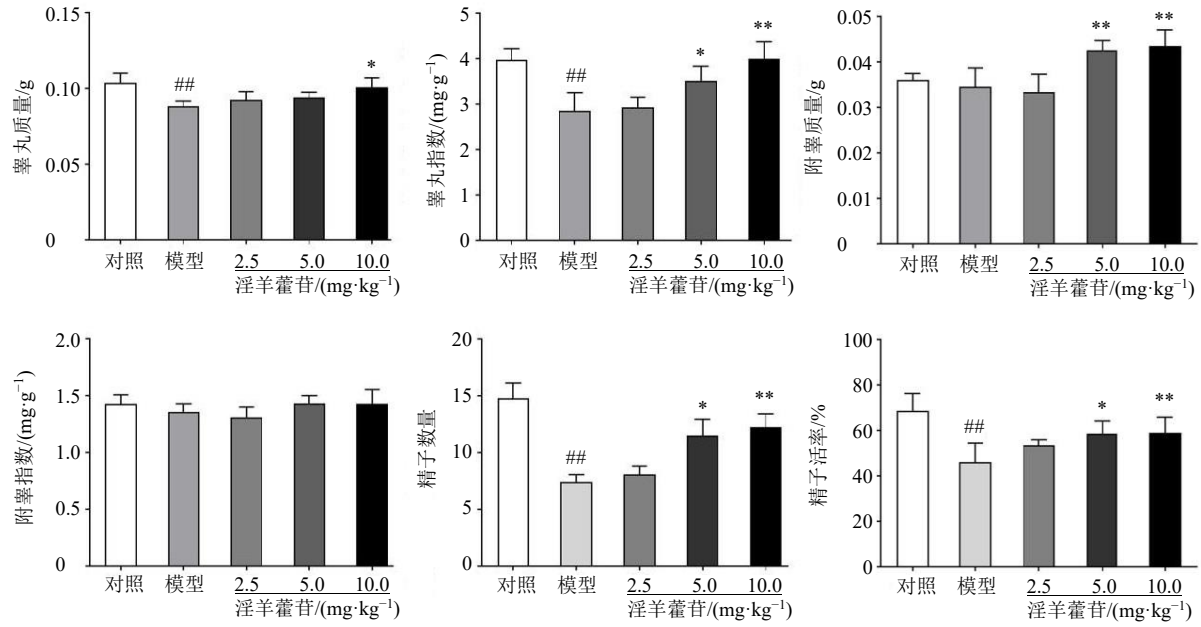
采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计分析，

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组之间差异的显著性采用单因素方差分析进行检验。

3 结果

3.1 淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织生精功能的影响

3.1.1 淫羊藿苷对衰老小鼠性腺质量、性腺指数、精子活率和精子数量的影响 如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸质量、睾丸指数、精子活率和精子数量明显下降（$P<0.01$）；与模型组比较，高剂量的淫羊藿苷能够显著提高小鼠睾丸质量、睾丸指数、附睾质量、精子活率和数量（$P<0.05$、0.01），中剂量的淫羊藿苷能够显著提高小鼠睾丸指数、附睾质量、精子活率和数量（$P<0.05$、0.01）。



与对照组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$，图 2～7 同。

$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* model group, same as Figs. 2—7.

图 1 淫羊藿苷对衰老小鼠性腺质量、性腺指数、精子活率和精子数量的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

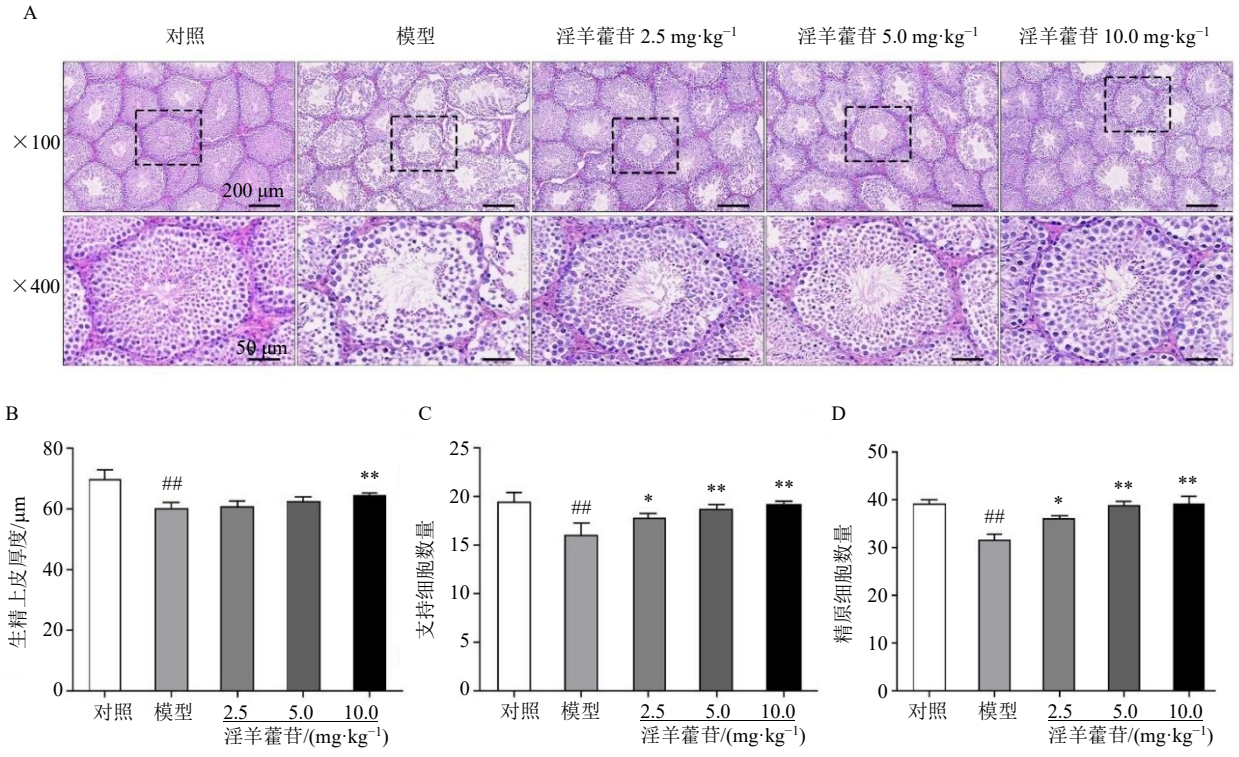
Fig. 1 Effect of icariin on gonad weights, gonad index, sperm viability and sperm counts in aging mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.1.2 淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织形态学的影响 如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织部分生精小管萎缩，管腔内生精细胞层数减少，排列稀疏，且有不同程度脱落，支持细胞数量和精原细胞数量明显减少（$P<0.01$）；与模型组比较，淫羊藿苷各给药组小鼠的生精小管趋于正常，管腔内生精细胞层数增加，排列整齐，支持细胞和精原细胞数量明显增多（$P<0.05$、0.01），淫羊藿苷高剂量组小鼠睾丸组织生精上皮厚度显著增加（$P<0.01$）。

3.1.3 淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织 GDNF 表达和精原细胞增殖的影响 如图 3-A 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织 GDNF 蛋白表达水平明显下降（$P<0.01$）；与模型组比较，淫羊藿苷各给药组小鼠睾丸组织 GDNF 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$、0.01），且呈剂量相关性。GDNF 可直接促进精原细胞增殖，而 PCNA 表达水平是评估细胞增殖活性的重要指标[18]。如图 3-B、C 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织 PCNA 表达显著减少（$P<0.01$）；与模型组比较，淫羊藿苷各给药组睾丸组织 PCNA 表达明显增加（$P<0.05$、0.01）。

3.2 淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织 Notch1/HES1 通路相关蛋白表达的影响

如图 4-A 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织中 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$、0.01）；与模型组比较，淫羊藿苷中、高剂量组小鼠睾丸组织中 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$、0.01），淫羊藿苷低剂量组小鼠睾丸组织中 Notch1 和 HES1 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。免疫荧光（图 4-B）、免疫组化（图 4-C）结果与 Western blotting 结果一致。

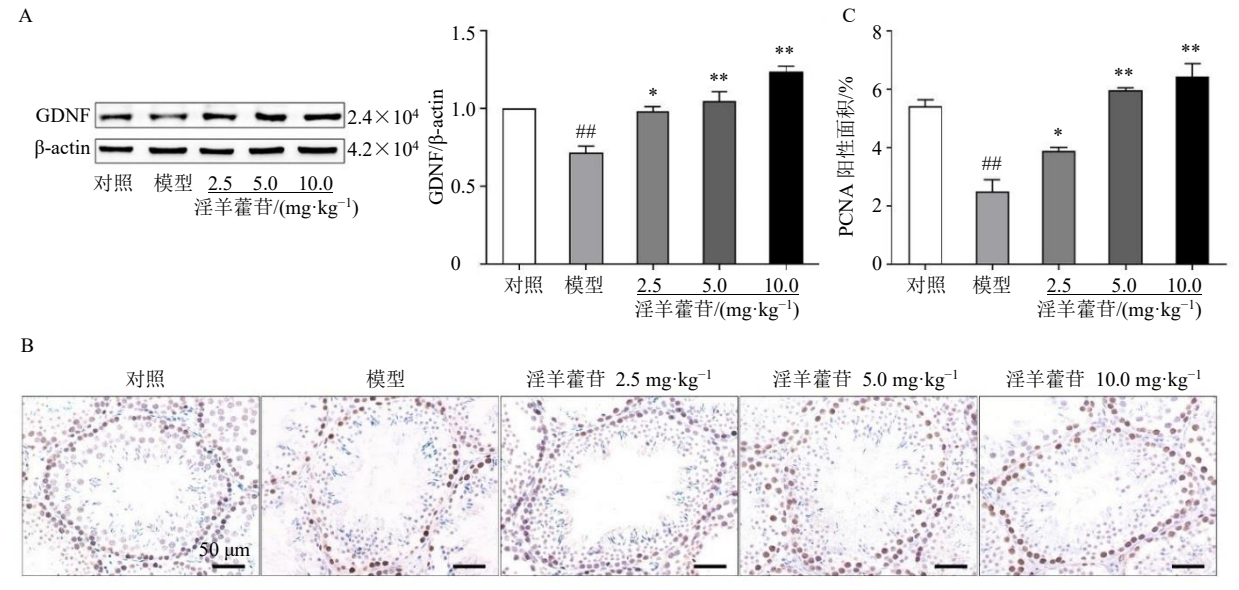


A-HE 染色图片；B-生精上皮厚度；C-支持细胞数量；D-精原细胞数量。

A-HE staining images; B-seminiferous epithelium height; C-numbers of Sertoli cells; D-numbers of spermatogonia cells.

图 2　淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织形态学的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 2　Effect of icariin on morphology of testicular tissue in aging mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

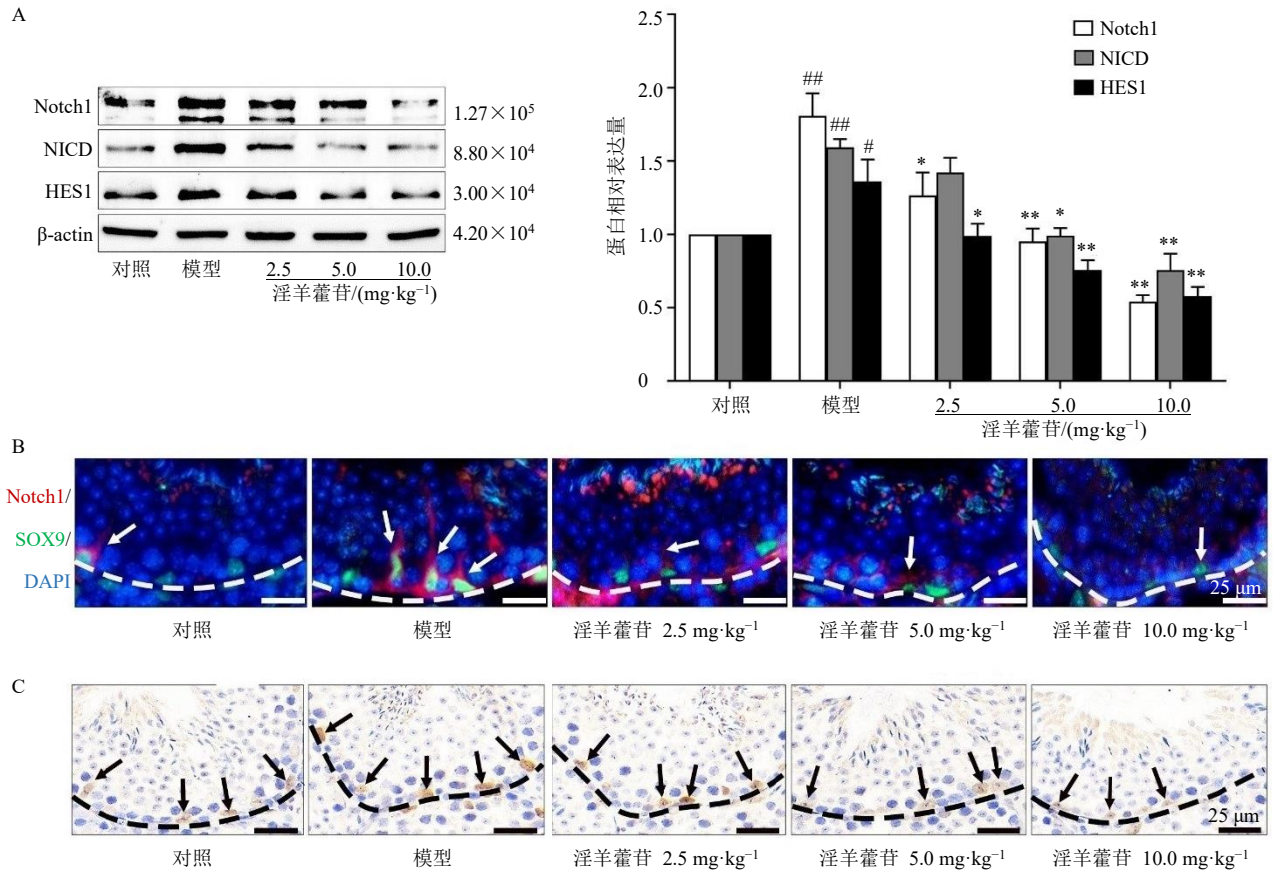


A-Western blotting 检测睾丸组织 GDNF 蛋白表达；B、C-免疫组化检测睾丸组织 PCNA 蛋白表达（×400）。

A-GDNF protein expression in testicular tissue detected by Western blotting; B, C-PCNA protein expression in testicular tissue detected by immunohistochemistry (× 400).

图 3　淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织 GDNF 表达和精原细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 3　Effect of icariin on GDNF expression and spermatogonial proliferation in testicular tissue of aging mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-Western blotting 检测睾丸组织 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达；B-免疫荧光检测睾丸组织 Notch1 表达（×800）；C-免疫组化检测睾丸组织 HES1 表达（×800）。

A-Notch1, NICD and HES1 protein expressions in testicular tissue detected by Western blotting; B-Notch1 expression in testicular tissue detected by immunofluorescence (× 800); C-HES1 expression in testicular tissue detected by immunohistochemistry (× 800).

图 4　淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸组织 Notch1/HES1 通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4　Effect of icariin on Notch1/HES1 pathway related protein expressions in testicular tissue of aging mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3　淫羊藿素对 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞活力的影响

研究表明，淫羊藿苷生物利用度相对较低，经口服给药后，主要在小肠代谢为淫羊藿素后被吸收并在体内发挥作用[19]，基于此，后续细胞实验选用淫羊藿素对细胞进行处理。如图 5 所示，与对照组比较，模型组 TM4 细胞活力明显下降（$P<0.01$）；与模型组比较，淫羊藿素能提高 TM4 细胞活力，当浓度为 0.8 μmol/L 时有显著性差异（$P<0.01$）。因此，后续实验选用浓度为 0.2、0.4、0.8 μmol/L 的淫羊藿素处理 TM4 细胞。

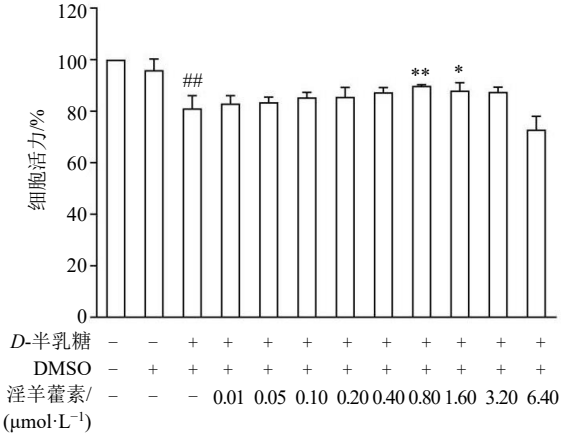


图 5　淫羊藿素对 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞活力的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 5　Effect of icaritin on viability of TM4 cells treated with *D*-galactose ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.4　淫羊藿素对 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞 GDNF 表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组 TM4 细胞 GDNF mRNA 和蛋白表达水平显著降低（$P<$

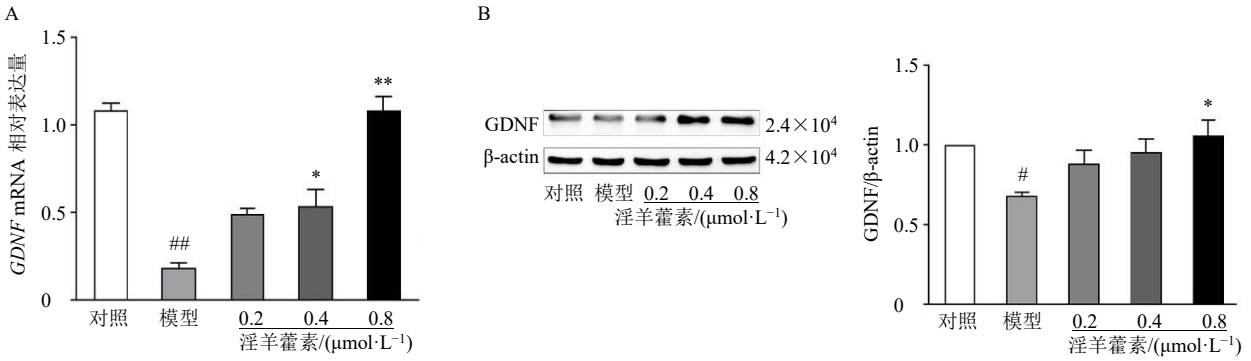


图 6　淫羊藿素对 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞 GDNF mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 6　Effect of icaritin on GDNF mRNA (A) and protein (B) expressions in TM4 cells treated with *D*-galactose ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

0.05、0.01)；与模型组比较，淫羊藿素中、高剂量组 TM4 细胞 *GDNF* mRNA 表达水平显著升高（$P < 0.05$、0.01），淫羊藿素高剂量组 TM4 细胞 GDNF 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$）。

3.5　淫羊藿素对 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞 Notch1/HES1 通路相关蛋白的影响

如图 7 所示，与对照组比较，模型组 TM4 细胞 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达水平明显升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，淫羊藿素各给药组 TM4 细胞 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$、0.01、0.001），且呈剂量相关性。

3.6　淫羊藿素对 HES1 过表达的 TM4 细胞 GDNF 表达的影响

为进一步探究淫羊藿素是否是通过调节 Notch1/HES1 通路进而调控 GDNF 表达，构建了 HES1 过表达的 TM4 细胞模型。如图 8 所示，与对照组比较，*D*-半乳糖组 HES1 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$），GDNF mRNA 和蛋白表达水平明显降低（$P < 0.01$）；与 *D*-半乳糖组比较，*D*-半乳糖＋淫羊藿素＋pcDNA 组和 *D*-半乳糖＋淫羊藿素组 HES1 蛋白表达水平显著降低（$P < 0.01$），GDNF mRNA 和蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$、0.01）；与 *D*-半乳糖＋淫羊藿素组比较，*D*-半乳糖＋淫羊藿素＋HES1 过表达组 HES1 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.001$），GDNF mRNA 和蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$、0.001）。

4　讨论

睾丸支持细胞在哺乳动物精子发生过程中起着关键作用，不仅为生精细胞提供结构支持，还通过分泌多种生长因子调控精子发生的微环境，对精

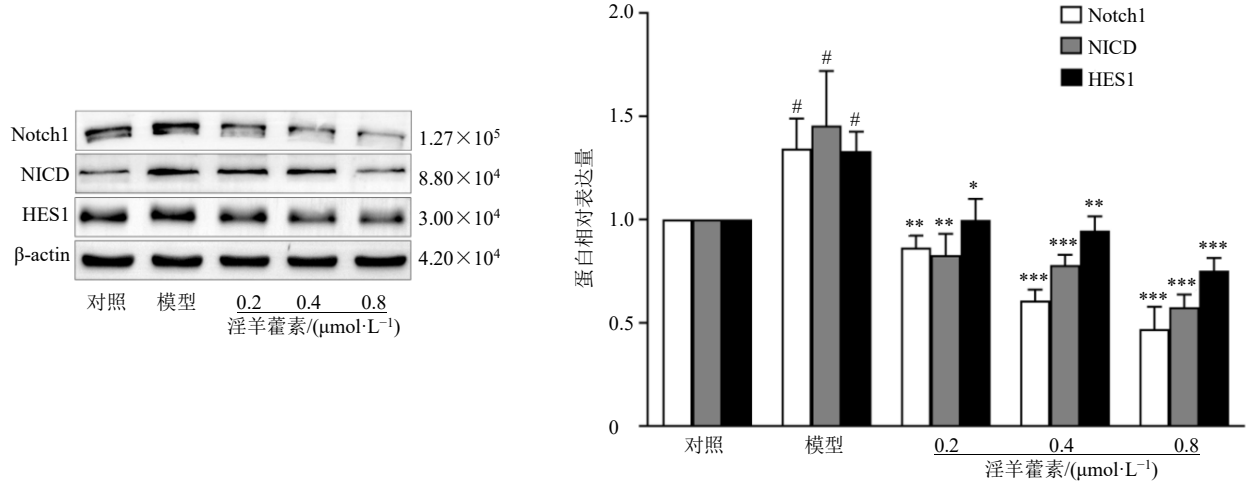
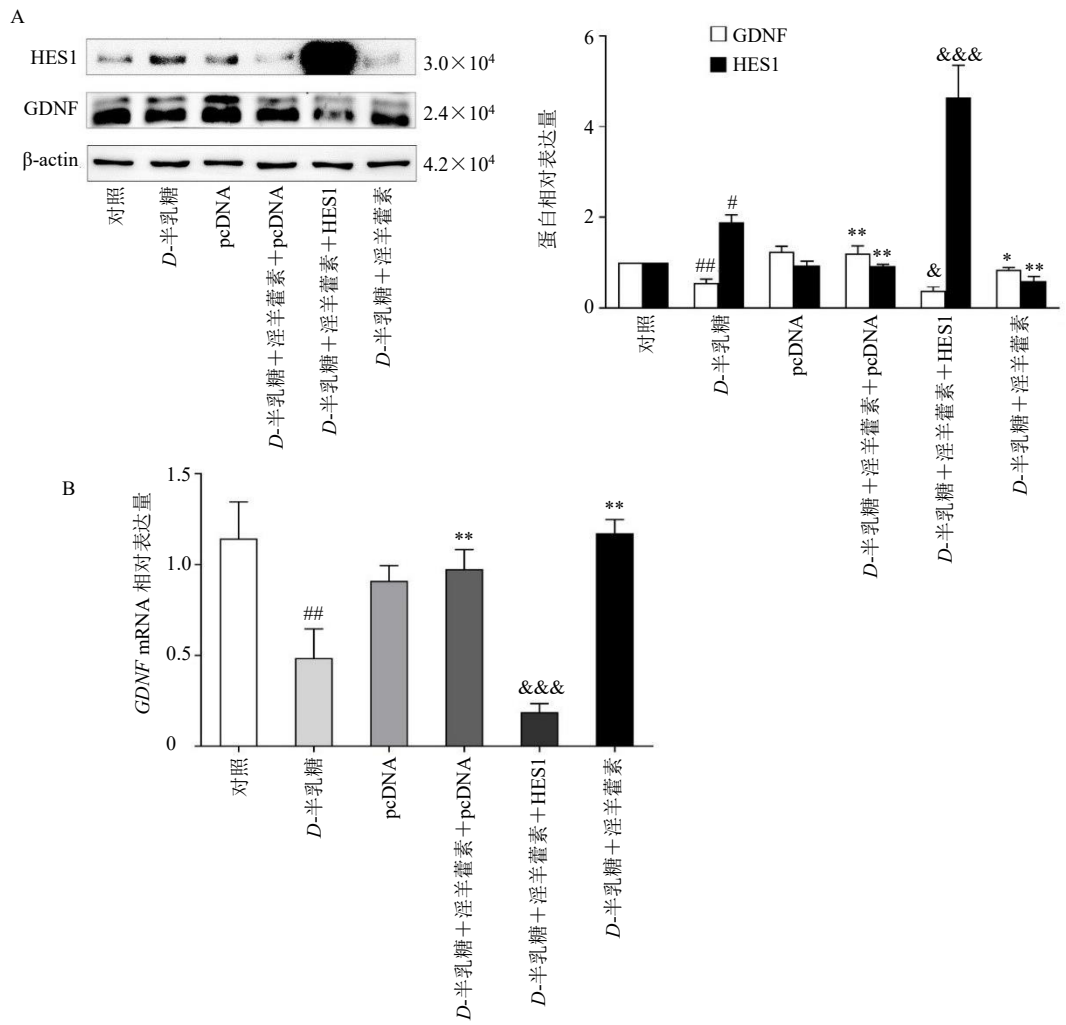


图 7　淫羊藿素对 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞 Notch1/HES1 通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7　Effect of icaritin on Notch1/HES1 pathway related protein expressions in TM4 cells treated with *D*-galactose ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



与对照组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与 *D*-半乳糖组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$；与 *D*-半乳糖＋淫羊藿素组比较：$^{\&}P<0.05$ $^{\&\&\&}P<0.001$。

$^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* *D*-galactose group; $^{\&}P < 0.05$ $^{\&\&\&}P<0.001$ *vs* *D*-galactose + icaritin group.

图 8 淫羊藿素对 HES1 过表达的 TM4 细胞 GDNF 蛋白 (A) 及 mRNA (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Effect of icaritin on GDNF protein (A) and mRNA (B) expressions in TM4 cells overexpressing HES1 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

子形成至关重要[20]。其中，GDNF 是支持细胞分泌的关键因子之一，可促进精原干细胞增殖，维持精原干细胞数量稳定[21-22]。研究表明，衰老可引起支持细胞 GDNF 表达减少，导致睾丸生精功能减退[23-27]。提示促进衰老睾丸支持细胞 GDNF 表达，对减缓衰老所致的睾丸生精功能衰退具有重要意义。

本研究证实，在体内实验中，衰老模型组小鼠出现明显的生精功能减退，如睾丸质量、睾丸指数、精子活率和精子数量显著下降，睾丸组织形态学呈现生精小管萎缩、生精细胞层数减少、支持细胞和精原细胞数量降低等退化性改变，同时睾丸组织中 GDNF 蛋白表达明显下降。这些结果与既往研究中衰老可导致睾丸生精功能减退、GDNF 表达减少的结论一致[2]。而给予淫羊藿苷处理后，能够显著提高衰老小鼠的睾丸、附睾质量及睾丸指数，提升精子活率和精子数量，改善睾丸组织形态学，增加 GDNF 蛋白表达，同时提高精原细胞增殖活性指标 PCNA 的表达。体外实验采用 *D*-半乳糖处理 TM4 细胞构建衰老模型，结果同样显示，模型组细胞活力下降，GDNF mRNA 和蛋白表达降低，而给予淫羊藿素（淫羊藿苷在体内的主要代谢产物）处理后，能显著提高细胞活力，增加 GDNF mRNA 和蛋白表达。以上结果表明，淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸生精功能减退具有显著的改善作用。基于此，本研究继续探讨淫羊藿苷促进衰老小鼠睾丸支持细胞 GDNF 表达的机制。

研究报道，Notch1/HES1 通路是调控 GDNF 表达的重要通路，Notch1/HES1 通路过度激活可导致

支持细胞 GDNF 表达明显下降[4-5]。然而，有研究表明 Notch1/HES1 通路在衰老哺乳动物睾丸中异常激活。这些结果提示，抑制 Notch1/HES1 通路，对改善衰老所致支持细胞 GDNF 表达减少至关重要。本研究证实，在体内实验中，衰老模型组小鼠睾丸组织中 Notch1、NICD 和 HES1 表达明显升高，提示 Notch1/HES1 通路在衰老小鼠体内处于异常激活状态，这与已有研究报道衰老可导致该通路激活相符[8,23]。淫羊藿苷处理后，显著降低了衰老小鼠睾丸组织中 Notch1、NICD 和 HES1 的表达，表明淫羊藿苷能够抑制衰老所致的 Notch1/HES1 通路的激活。在体外实验中，淫羊藿素同样能抑制模型组 TM4 细胞中 Notch1、NICD 和 HES1 蛋白的表达，且呈剂量相关性，进一步验证淫羊藿苷可抑制衰老睾丸支持细胞中 Notch1/HES1 通路的过度激活。

为进一步明确淫羊藿素是否通过抑制 Notch1/HES1 通路，进而促进衰老睾丸支持细胞中 GDNF 的表达，构建了 *D*-半乳糖和 HES1 过表达共处理的 TM4 细胞模型，结果表明，淫羊藿素可以抑制 *D*-半乳糖处理的 TM4 细胞中 Notch1/HES1 通路，并促进 GDNF 的表达，但对 *D*-半乳糖和 HES1 过表达共处理的 TM4 细胞无明显影响，HES1 过表达可拮抗淫羊藿素对 GDNF 的上调作用。以上结果说明，淫羊藿素通过下调 HES1 的表达，从而促进 GDNF 的转录和翻译，这一结果与既往研究中敲低 HES1 可显著促进小鼠原代支持细胞中 GDNF 表达的结果相符[7]。然而，淫羊藿素是否通过下调 Notch1，进而下调 HES1，最终上调 GDNF 表达，仍需对 Notch1 进行过表达从而加以验证。

此外，根据现有文献发现，淫羊藿苷改善睾丸支持细胞 GDNF 表达的机制可能不仅限于其对 Notch1/HES1 通路的直接抑制作用。研究表明，Notch1 信号与衰老相关的氧化应激、炎症和 DNA 损伤等存在密切联系[28-30]，而淫羊藿苷可能通过抑制氧化应激、抗炎和减轻 DNA 损伤等多途径协同调控 Notch1 通路[31-33]。过氧化氢介导的氧化应激可上调间充质干细胞中的 Notch1/HES1 信号通路[28]，而淫羊藿苷已被证实可减轻 *D*-半乳糖诱导的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞氧化损伤[31]。此外，Notch1 还与核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）炎症通路存在一定联系。研究显示，NF-κB 下游的炎症因子白细胞介素-17 能激活少突胶质前体细胞 Notch1 信号通路[29]，而淫羊藿苷可通过抑制 NF-κB 信号通路激活和炎症细胞因子释放发挥抗炎作用[32]。另有研究发现，DNA 损伤可激活人角质形成细胞中的 Notch1/HES1 通路[30]，而淫羊藿苷可通过靶向 p53 等调控 DNA 损伤修复，从而减轻 DNA 损伤[33]。以上结果提示，淫羊藿苷可能通过增强支持细胞抗氧化、抗炎及改善 DNA 损伤的修复能力等，间接抑制 Notch1/HES1 信号通路，从而促进支持细胞 GDNF 表达。

综上，淫羊藿苷能够促进衰老小鼠支持细胞 GDNF 表达，改善衰老所致睾丸生精功能减退，其机制可能与直接或间接抑制 Notch1/HES1 通路有关。本研究为淫羊藿苷在治疗衰老相关男性生殖功能减退疾病中的应用提供了新的理论基础，同时也为后续深入研究其作用机制和临床应用提供了方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 周玉博, 余洪钊, 王爱玲, 等. 2016 至 2020 年中国生育年龄时空分布特征研究 [J]. 中国生育健康杂志, 2024, 35(4): 301-305.

[2] 陈茜, 张长城, 韩贵芳, 等. 淫羊藿总黄酮改善自然衰老大鼠睾丸支持细胞分泌功能衰退的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(3): 208-215.

[3] Singh D, Paduch D A, Schlegel P N, *et al*. The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human Sertoli cells is substantially reduced in Sertoli cell-only testes [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(5): 1108-1117.

[4] Garcia T X, DeFalco T, Capel B, *et al*. Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence [J]. *Dev Biol*, 2013, 377(1): 188-201.

[5] Garcia T X, Parekh P, Gandhi P, *et al*. The NOTCH ligand JAG1 regulates GDNF expression in Sertoli cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(8): 585-598.

[6] 王文娟, 雒向宁, 李凯. 重楼皂苷 I 调控 Notch1/Hes1 通路对前列腺癌 PC-3 细胞迁移和侵袭的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(23): 3225-3229.

[7] Di Persio S, Starace D, Capponi C, *et al*. TNF-α inhibits GDNF levels in Sertoli cells, through a NF-κB-dependent, HES1-dependent mechanism [J]. *Andrology*, 2021, 9(3): 956-964.

[8] Zhang W, Xia S Y, Xiao W, *et al*. A single-cell transcriptomic landscape of mouse testicular aging [J]. *J Adv Res*, 2023, 53: 219-234.

[9] 李莉, 王嘉瑞, 王晶, 等. 淫羊藿的主要化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(11): 143-151.

[10] 陈茜. 从 ERα-Nrf2 信号通路探讨淫羊藿苷对衰老 Sertoli 细胞功能的影响 [D]. 宜昌: 三峡大学, 2019.

[11] 潘绮曼, 詹嫣然, 陈桃芬, 等. 淫羊藿苷通过 Notch1/Jagged1 信号通路抑制人前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(15): 1688-1693.

[12] Ackert-Bicknell C L, Anderson L C, Sheehan S, *et al*. Aging research using mouse models [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2015, 5(2): 95-133.

[13] Schaum N, Lehallier B, Hahn O, *et al*. Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures [J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 596-602.

[14] 章元沛. 药理学实验 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 239.

[15] Azman K F, Zakaria R. *D*-Galactose-induced accelerated aging model: An overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.

[16] 陈茜, 赵海霞, 马娜, 等. *D*-半乳糖刺激小鼠睾丸 TM4 支持细胞分泌功能的衰退及其机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(4): 327-333.

[17] 姚志丽, 赵海霞, 马小玉, 等. *D*-半乳糖对小鼠睾丸 TM4 支持细胞连接功能损伤及淫羊藿素的改善作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(9): 1634-1641.

[18] Lemos I L, Macedo M J, Santos F R, *et al*. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) by-products suppress cell proliferation and induce apoptosis particularly in androgen-dependent prostate cancer cell lines [J]. *Food Res Int*, 2025, 208: 116124.

[19] 廖香莲, 吴涛, 梅菊, 等. 淫羊藿苷及其代谢产物生物活性研究进展 [J]. 中成药, 2025, 47(2): 504-512.

[20] 李玲, 黄家望, 冯芷莹, 等. 基于铁死亡途径探讨龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的作用及机制 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6722-6733.

[21] Parekh P A, Garcia T X, Hofmann M C. Regulation of GDNF expression in Sertoli cells [J]. *Reproduction*, 2019, 157(3): R95-R107.

[22] Oatley J M, Brinster R L. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008, 24: 263-286.

[23] Huang D Y, Zuo Y S, Zhang C, *et al*. A single-nucleus transcriptomic atlas of primate testicular aging reveals exhaustion of the spermatogonial stem cell reservoir and loss of Sertoli cell homeostasis [J]. *Protein Cell*, 2023, 14(12): 888-907.

[24] 史琨, 张晓丽, 张海玉, 等. 脂多糖所致小鼠睾丸支持细胞 GDNF 表达减少对精原干细胞的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2013, 51(3): 32-41.

[25] Parker N, Laychur A, Sukwani M, *et al*. Spermatogonial stem cell numbers are reduced by transient inhibition of GDNF signaling but restored by self-renewing replication when signaling resumes [J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(3): 597-609.

[26] Wright W W. The regulation of spermatogonial stem cells in an adult testis by glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 896390.

[27] Schmidt J A, Abramowitz L K, Kubota H, *et al*. *In vivo* and *in vitro* aging is detrimental to mouse spermatogonial stem cell function [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(4): 698-706.

[28] Boopathy A V, Pendergrass K D, Che P L, *et al*. Oxidative stress-induced Notch1 signaling promotes cardiogenic gene expression in mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(2): 43.

[29] Wang C H, Zhang C J, Martin B N, *et al*. IL-17 induced *NOTCH1* activation in oligodendrocyte progenitor cells enhances proliferation and inflammatory gene expression [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15508.

[30] Zhang H, Xiao X, Wang L P, *et al*. Human adipose and umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles mitigate photoaging via TIMP1/Notch1 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 294.

[31] Hu S S, Wang T Y, Ni L, *et al*. Icariin ameliorates *D*-galactose-induced cell injury in neuron-like PC12 cells by inhibiting MPTP opening [J]. *Curr Med Sci*, 2024, 44(4): 748-758.

[32] 马登磊, 张兰, 李林. 淫羊藿提取物的抗炎作用及其机制 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2020, 47(8): 685-699.

[33] 罗智琼, 汪卓逸, 汪永平, 等. 淫羊藿素靶向 P53 调控 DNA 损伤修复和 FOXO 信号通路抑制胶质瘤细胞生长 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(5): 753-763.

[责任编辑 李亚楠]