

# 基于 miR-34a-5p/SIRT1 信号通路探究 SD 大鼠高龄父代对子代学习能力的影响及五子衍宗丸的干预作用

刘子豪<sup>1,2</sup>, 萧闵<sup>2,3\*</sup>, 江晓翠<sup>2,3</sup>, 潘琴<sup>5</sup>, 邓朝阳<sup>2,4</sup>, 祝中意<sup>1,2</sup>, 曹继刚<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖北中医药大学 中医学院, 湖北 武汉 430065;

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065;

3. 湖北中医药大学 实验中心, 湖北 武汉 430065;

4. 湖北中医药大学 基础医学院, 湖北 武汉 430065;

5. 湖北省妇幼保健院, 湖北 武汉 430070)

**[摘要]** 为探究高龄父代基于微小 RNA-34a-5p(miR-34a-5p)/沉默信息调节因子 1(SIRT1) 信号通路对子代学习能力的影响及五子衍宗丸的干预作用。因此使用 32 只 15 月龄 SD 雄鼠, 随机分为高龄模型组、高龄模型+五子衍宗丸高剂量组、高龄模型+五子衍宗丸低剂量组、高龄模型+维生素 C 组, 每组 8 只, 另设 8 只 3 月龄 SD 雄鼠为低龄对照组, 五子衍宗丸低、高剂量组分别给予五子衍宗丸 2、8 g·kg<sup>-1</sup> 饲料喂养, 维生素 C 组给予维生素 C(100 mg·kg<sup>-1</sup>) 饲料, 低龄对照组和高龄模型组给予普通饮食, 连续饲养 12 周后, 与 3 月龄雌鼠 1:1 合笼 5 d, 完成后统计受精率, 全自动精子分析仪检测高龄大鼠精子活力及数量, 苏木素-伊红(HE)染色评估睾丸生精功能;β-半乳糖苷酶染色检测大鼠睾丸附睾组织衰老细胞;荧光定量 PCR(qPCR)检测大鼠睾丸组织 miR-34a-5p 表达;仔鼠出生 1、30 d 检测胎产数、体质量、身长, 评估子代一般发育情况。将仔鼠喂养至 30 日龄, 水迷宫评估子代学习能力;尼氏染色评估仔鼠海马神经元数量;qPCR 检测仔鼠海马组织 miR-34a-5p 表达;Western blot 检测子代海马组织脑源性神经营养因子(BDNF)/SIRT1 蛋白。结果显示与低龄对照组比较, 高龄模型组受精率、胎产数、精子活力、精子数量及睾丸生精功能, 均显著降低或减少( $P<0.01$ ), 睾丸附睾组织衰老细胞增加, 精子中 miR-34a-5p 表达水平显著上升;30 日龄子代生长发育减慢、海马神经元数量显著减少、海马 miR-34a-5p 表达量显著上升、海马 SIRT1、BDNF 蛋白含量显著下降( $P<0.01$ ), 子代学习记忆能力显著降低( $P<0.01$ );与高龄模型组比较, 五子衍宗丸高剂量组、维生素 C 组, 受精率、胎产数、精子活力、精子数量及睾丸生精功能, 均显著升高( $P<0.05$ ), 30 日龄子代生长发育加快、海马神经元数量显著增多、海马 BDNF 蛋白含量显著升高( $P<0.05$ ), 子代学习记忆能力显著升高( $P<0.05$ );与维生素 C 组比较, 五子衍宗丸高剂量组子代生长发育显著加快( $P<0.05$ ), 受精率、胎产数均显著升高( $P<0.05$ ), 学习记忆能力显著增加( $P<0.05$ )。由此表明五子衍宗丸能够改善大鼠高龄模型的睾丸生精功能障碍及精子质量, 进而改善子代的学习记忆能力, 其内在机制可能是通过调控 miR-34a-5p 的表达延缓睾丸生精细胞衰老, 并通过 miR-34a-5p 介导的代际传递机制改善子代的学习记忆能力。

**[关键词]** 高龄父代; 五子衍宗丸; miR-34a-5p/SIRT1

## Influences of aged male parents on learning ability of offspring in SD rats and intervention effect of Wuzi Yanzong Pills based on miR-34a-5p/SIRT1 signaling pathway

LIU Zi-hao<sup>1,2</sup>, XIAO Min<sup>2,3\*</sup>, JIANG Xiao-cui<sup>2,3</sup>, PAN Qin<sup>5</sup>, DENG Chao-yang<sup>2,4</sup>, ZHU Zhong-yi<sup>1,2</sup>, CAO Ji-gang<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

**[收稿日期]** 2025-08-09

**[基金项目]** 湖北省自然科学基金项目(2023AFB990)

**[通信作者]** \* 曹继刚, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事中医藏象理论及其应用、中医泌尿生殖系统理论及其临床研究, E-mail: 774941339@qq.com; \* 萧闵, 博士, 副研究员, 主要从事动物模型及中西医结合防治不孕不育研究, E-mail: 531637551@qq.com

**[作者简介]** 刘子豪, 硕士研究生, E-mail: 1152710629@qq.com

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China;
3. Experimental Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
4. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
5. Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

**[Abstract]** This study aims to investigate the effects of aged male parents on the learning ability of offspring and the intervention effect of Wuzi Yanzong Pills based on the microRNA-34a-5p (miR-34a-5p) /silent information regulator 1 (SIRT1) signaling pathway. Thirty-two SD male rats of 15 months old were randomized into aged model, model+high-dose ( $8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Wuzi Yanzong Pills, model+low-dose ( $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Wuzi Yanzong Pills, and model+vitamin C ( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) groups ( $n=8$ ). In addition, 8 SD male rats of 3 months old were selected as the control group. Rats in treatment groups were fed the diets containing different doses of Wuzi Yanzong Pills or vitamin C, and the control and model groups received a regular diet for 12 weeks. After 5 days of co-caging with 3-month-old female mice, the fertilization rate was recorded. An automated sperm analyzer was used to examine the sperm motility and count, and the testicular spermatogenesis was assessed by hematoxylin-eosin staining. The senescence cells in the testicular tissue was detected by  $\beta$ -galactosidase staining, and miR-34a-5p expression was quantified via qPCR. The litter size was counted, and the body mass and body length were measured on days 1 and 30 to assess offspring development. For the offspring of 30 days old, their learning ability was examined via Morris water maze, and Nissl staining was employed to count hippocampal neurons. The miR-34a-5p expression in the hippocampal tissue of the offspring was determined by qPCR, and the protein levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and SIRT1 were determined by Western blot. Compared with the control group, the model group exhibited reductions in fertility rate, litter size, and sperm motility and count, as well as impaired testicular spermatogenesis ( $P<0.01$ ). In addition, the model group showed increased senescence cells in testicular and epididymal tissue, accompanied by elevated miR-34a-5p expression in sperms. The 30-day-old offspring showed slow growth, reduced hippocampal neurons, up-regulated miR-34a-5p expression, and down-regulated protein levels of SIRT1 and BDNF in the hippocampus ( $P<0.01$ ), along with impaired learning and memory performance ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, both high-dose Wuzi Yanzong Pills and vitamin C improved the fertilization rate, litter size, sperm motility, sperm count, and testicular spermatogenesis ( $P<0.05$ ). The 30-day-old offspring in the two groups showed accelerated growth and development, increased hippocampal neurons, and elevated BDNF protein level in the hippocampus ( $P<0.05$ ), along with enhanced learning and memory capabilities ( $P<0.05$ ). Compared with the vitamin C group, the high-dose Wuzi Yanzong Pills group exhibited accelerated offspring growth ( $P<0.05$ ), increases in fertilization rate and litter size ( $P<0.05$ ), and improved learning and memory abilities ( $P<0.05$ ). These findings indicate that Wuzi Yanzong Pills can improve testicular spermatogenesis and sperm quality in aged rats, thereby enhancing offspring's learning and memory performance. Specifically, Wuzi Yanzong Pills regulate miR-34a-5p expression to delay spermatogenic cell senescence in the testicular tissue and improve the offspring's cognitive function by miR-34a-5p mediated intergenerational transmission.

**[Key words]** aged male parent; Wuzi Yanzong Pills; miR-34a-5p/SIRT1

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250916.801

世界卫生组织将男性生育高龄定义为 40 岁及以上。2014 年的大样本研究表明 40 岁以上的男性其精子质量下降的风险显著上升<sup>[1]</sup>。而由于预期寿命延长、避孕措施普及、辅助生殖技术发展,以及社会经济地位的提升和工作压力增加等因素,大多数发达国家和地区的生育年龄显著推迟<sup>[2]</sup>。在过去 10 年中,流行病学的数据表明,随着父亲年龄的增加,精子中新发突变的风险也随之增加,这将大大增加后代的患病风险<sup>[3]</sup>。而衰老的病因复杂,又缺少特效药物,临床多以维生素 C、维生素 E、抗氧化药物单用或联用治疗,疗效一般,推广受限<sup>[4]</sup>。而

中药抗衰具有显著优势,其多组分、多靶点的作用特点更契合衰老这一复杂病理过程的治疗需求<sup>[5]</sup>。

在中医学中,对于高龄父代影响子代认知能力的问题,有着深刻而独到的见解。中医认为,人体的生长发育、认知功能以及生殖能力都与“肾”的功能密切相关。五子衍宗丸是传承千年的中药方剂,被誉为“种子第一方”,并在临床广泛使用,其有补肾填髓、生精种子之效<sup>[6]</sup>。对父代肾精亏虚而引发的子代脑发育不良有良好的治疗作用,但其具体机制有待深入探究。随着年龄的不断增高,衰老这一过程持续发生,而表观遗传学是父代影响子代的重要

机制,其中 miRNA 又是其重要组成部分。微小 RNA-34a-5p (miR-34a-5p) 是一种与长寿相关的 miRNA,在许多衰老细胞中异常表达,被认为是衰老、长寿和年龄相关疾病的生物标志物和效应物的一部分<sup>[7]</sup>。而 miR-34a-5p 还可通过精子遗传至子代,通过结合 SIRT1 mRNA 的 3'UTR 导致 SIRT1 蛋白水平降低。进而引起脑源性神经营养因子(BDNF)下调,影响子代的脑发育。因此,本研究探讨五子衍宗丸通过延缓衰老调控 miR-34a-5p 的表达进而改善 miR-34a-5p/沉默信息调节因子 1(SIRT1)/BDNF 信号通路影响子代脑发育,为五子衍宗丸改善高龄大鼠对后代学习能力的影响提供新思路。

## 1 材料

**1.1 动物** 32 只 SD 大鼠,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)雄性,体质量为 180~220 g,6~8 周龄,购自湖北省实验动物研究中心[SYXK(鄂)2020-0018]。8 只无特定病原体 SD 大鼠,雄性,12 周龄。40 只 SD 大鼠,无特定病原体,12 周龄,雌性,购自湖北省实验动物研究中心[SYXK(鄂)2020-0018]。饲养于湖北中医药大学实验动物中心[SYXK(鄂)2017-0067]SPF 级屏障系统,相对湿度为 50%~70%,环境温度为(22±2)℃。早 7:30—晚 7:30 昼夜间断照明。全程自由饮食、进水。动物实验获湖北中医药大学动物伦理委员会批准,批号为 HUCM43618771。动物实验参与人员均持证上岗,通过湖北省实验动物从业人员专业技术考试,并取得合格证书。实验过程中遵循 3R 原则及动物福利的法律法规,对动物给予人道关怀。

**1.2 药物与试剂** 五子衍宗丸由菟丝子(炒)、枸杞子、覆盆子、五味子(蒸)、车前子(盐炒)组成,饮片购自广东一方药业有限公司(货号分别为 2309005、2310004、2310012、2309002、2310005),所有中药均从湖北中医药大学黄家湖医院中药房采购,经湖北中医药大学喻小明副教授鉴定符合 2020 年版《中国药典》规定,并按照其制备工艺,以上述药材按照 8:8:4:1:2 的比例配伍,粉碎成细粉,过筛,混匀,低剂量组每 100 g 饲料中添加 2.4 g 药物细粉,高剂量组每 100 g 饲料中添加 9.6 g 药物细粉;维生素 C(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号 H19990372)。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G1001);兔多抗 SIRT1(武汉 ABclonal 公司,批号 A17307);兔多抗

BDNF(武汉 ABclonal 公司,批号 A16299)。

**1.3 仪器** WLJY-9000 型伟力彩色精子质量检测系统(北京伟力新世纪科技发展有限公司);KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);CR21G 型冷冻高速离心机(日本日立公司);Leica RM2245 石蜡切片机[徕卡显微系统(上海)贸易有限公司];DYCZ-40 型电转仪(北京六一仪器厂);E100 型显微镜(日本尼康公司);Nikon DS-U3 成像系统(日本尼康公司);WMT-100S 型 Morris 水迷宫视频分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药方法** 将 15 月龄 SPF 级 32 只 SD 雄性大鼠<sup>[8]</sup> 随机数字法分为高龄模型组、五子衍宗丸高剂量组、五子衍宗丸低剂量组、维生素 C 组,每组 8 只,另将 3 月龄 SPF 级 8 只设为低龄对照组。维生素 C 组给予维生素 C(100 mg·kg<sup>-1</sup>);五子衍宗丸高、低剂量组(8、2 g·kg<sup>-1</sup>)按每鼠每天 30 g 饲料给药,连续 12 周。五子衍宗丸给大鼠药剂量根据临床给药剂量,按照体表面积换算,低剂量为临床等效剂量;低龄对照组、高龄模型组给予自由饮食<sup>[9]</sup>。以 15 月龄 SD 雄性大鼠为衰老模型,通过 β-半乳糖苷酶染色检测睾丸及附睾中的衰老细胞,是评估模型成功建立的标准。

**2.2 SD 大鼠附睾与睾丸指数** 各组大鼠于合笼完成后 24 h 称体质量,麻醉大鼠,3% 戊巴比妥钠(50 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射,取血,立即打开腹腔,分离两侧睾丸、附睾组织,用滤纸吸干表面液体,称量两侧睾丸、附睾湿重,计算睾丸、附睾湿重指数。计算公式:睾丸指数=睾丸湿重(mg)/体质量(g)×100%。

**2.3 HE 染色法评估 SD 大鼠睾丸、附睾情况** 采用 HE 染色法评估睾丸生精功能,睾丸组织石蜡切片(厚度 5 μm),按照 HE 染色试剂盒操作说明,进行 HE 染色<sup>[10]</sup>。

**2.4 精子分析仪检测大鼠精子密度和活动率** 采用动物精子分析仪检测大鼠精子质量,取附睾尾,眼科剪剪 7~8 下,37℃ 磷酸盐缓冲液中孵育 15 min,分离精子,按照动物精子分析仪操作流程,测定精子密度和活动率<sup>[11]</sup>。

**2.5 β-半乳糖苷酶染色检测大鼠睾丸附睾组织衰老细胞** 根据产品说明书,使用 β-半乳糖苷酶染色试剂盒检测衰老相关的 β-半乳糖苷酶含量<sup>[12]</sup>。睾丸与附睾组织的冰冻切片在室温条件下固定

15 min, 随后转移至染色液(如 X-Gal 工作液)中,于 37 ℃ 环境下孵育过夜。孵育结束后,在光学显微镜下观察,细胞质内出现蓝色颗粒的细胞即为衰老细胞。最后,使用 ImageJ 软件对切片中蓝色阳性信号区域进行定量分析,计算衰老细胞的阳性率。

## 2.6 RT-PCR 检测大鼠精子组织 miR-34a-5p 表达

委托武汉赛维尔生物科技有限公司合成了所需的引物,其序列见表 1。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测精子组织 miR-34a-5p 表达水平,提取组织总 RNA,按照试剂盒操作说明,将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模版进行扩增,循环 40 次。采集荧光信号,结果用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因             | 引物序列(5'-3')                        | 长度<br>/bp |
|----------------|------------------------------------|-----------|
| $\beta$ -actin | 上游: TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG         | 240       |
|                | 下游: GTTGGCATAGAGGTCCTTACGG         |           |
| miR-34a-5p     | 上游: ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGCT | 66        |
|                | 下游: TGCTGTCGTGGAGTCG               |           |

**2.7 父代雄鼠生育力观察** 各组大鼠均立即按照 1:1 比例与正常发情雌鼠配对饲养 5 d(5 d 为雌鼠发情周期)。评估雄鼠受精率。

受精率 = 受孕率只数 / 总只数  $\times 100\%$

分娩后统计各组雌鼠的窝产仔数(即仔鼠总数/妊娠并分娩的雌鼠只数),作为父代大鼠生育力的评价指标之一。

**2.8 子代生长发育评估** 仔鼠于出生 1、30 d 检测体重、身长,评估子代一般发育情况。

**2.9 Morris 水迷宫评估子代学习能力** 仔鼠 30 日龄,进行 Morris 水迷宫实验,评估子代学习能力: Morris 水迷宫水池直径 150 cm,高 60 cm,将水池壁的 4 个等距离点定义为东(E)、南(S)、西(W)、北(N),并贴上不同形状的标记物。池内有一可移动站台,直径 10 cm,高 59 cm,将该平台放于 SW 象限,低于水面 1~2 cm。正式实验开始前 24 h,将仔鼠转移至水迷宫实验室内进行饲养,并让其在水池中自由游泳 2 min,以适应实验环境及水温。首先进行隐蔽站台试验:整个训练周期持续 5 d。记录仔鼠在 60 s 内寻找到隐藏水下平台所需的时间(即逃避潜伏期),若超过 60 s 未能找到平台,则潜伏期记为

60 s,并由实验人员引导其登上平台。空间探索实验:实验 1 d,撤去平台,仔鼠从平台对侧象限点面壁下水,记录 60 s 内游泳轨迹、穿越平台次数、平台象限活动时间<sup>[13]</sup>。

**2.10 尼氏染色检测子代海马神经元形态** 仔鼠完成学习能力评估后,各组随机选取 5 只仔鼠,取海马:2%戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉仔鼠,中性固定液,取脑组织,4%多聚甲醛固定液固定 48 h 后;梯度乙醇脱水;二甲苯 1 h 进行透明;浸蜡 1 h,包埋;矢状面 4  $\mu$ m 切片,脱蜡后,行尼氏染色,脱水,透明,中性树胶封片,光镜观察海马组织神经元,并拍照,对成熟神经元进行计数,计算平均值<sup>[14]</sup>。

**2.11 WB 检测子代海马组织 BDNF/SIRT1 蛋白** 取海马组织, RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂,高速组织研磨仪匀浆,冰上反应 30 min,12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃离心 20 min,取上清液,提取蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。经上样、转膜、封闭后,分别加入内参  $\beta$ -actin(1:10 000 稀释)、兔单抗 BDNF(1:1 000 稀释)、兔单抗 SIRT1(1:2 000 稀释)将膜置于 4 ℃环境下与一抗孵育过夜。经 TBST 充分洗涤后,滴加按 1:5 000 稀释的兔抗羊 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h,再次洗膜后,采用超敏 ECL 发光液进行化学发光显影,并通过化学发光成像系统采集信号。最后,采用 ImageJ 图像分析软件计算条带积分灰度值,以目标蛋白条带的灰度值代表 BDNF 和 SIRT1 蛋白的相对表达水平。

**2.12 统计学分析** 图片分析使用 ImagePro Plus 5 软件,数据分析采用 SPSS 22.0 软件。数据首先进行正态性及方差齐性检验;若 2 项条件均满足,则选用单因素方差分析(One-way ANOVA);若数据非正态或方差不齐,则采用非参数检验。结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  视为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 SD 大鼠睾丸及附睾指数** 与低龄对照组比较,高龄模型组附睾、睾丸脏器指数显著下降( $P < 0.01$ );与高龄模型组比较,五子衍宗丸治疗高低剂量组睾丸脏器指数显著上升( $P < 0.05$ ),维生素 C 组无明显改变,见表 2。

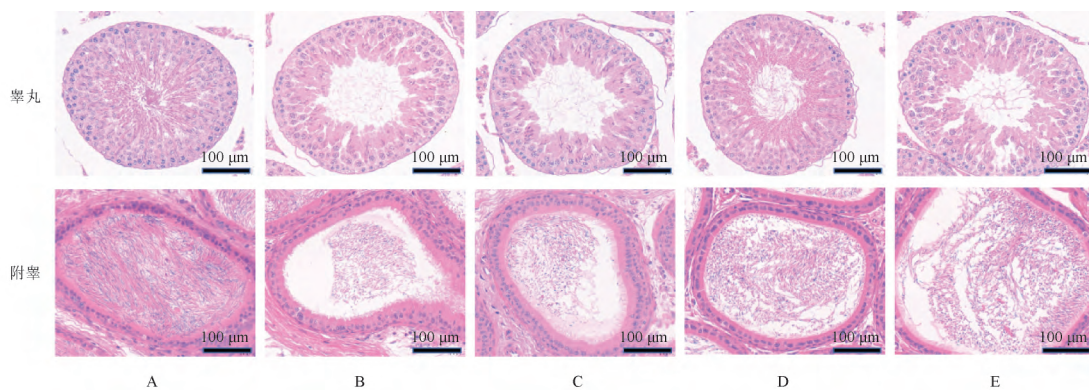
**3.2 HE 染色法评估 SD 大鼠睾丸各级生精细胞情况** 低龄对照组大鼠的睾丸组织学结构完整,生精小管形态规则(圆形或椭圆形),管腔内可见支持细

表 2 五子衍宗丸对大鼠睾丸、附睾指数的影响( $\bar{x}\pm s$   $n=8$ )  
Table 2 Effects of Wuzi Yanzong Pills on testicular and epididymal indexes in rats ( $\bar{x}\pm s$   $n=8$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 睾丸指数<br>/%              | 附睾指数<br>/%              |
|-------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 低龄对照  | —                         | 1.13±0.11               | 0.44±0.06               |
| 高龄模型  | —                         | 0.49±0.15 <sup>2)</sup> | 0.16±0.02 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                         | 0.63±0.02 <sup>3)</sup> | 0.20±0.02               |
|       | 8                         | 0.66±0.03 <sup>3)</sup> | 0.22±0.03 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                       | 0.57±0.07               | 0.18±0.03               |

注:与低龄对照组比较<sup>1)</sup>  $P<0.05$  <sup>2)</sup>  $P<0.01$ ;与高龄模型组比较<sup>3)</sup>  $P<0.05$ (表 3~11 同)。

胞、精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞及精子细胞有序排列,并可见大量成熟精子聚集于管腔中央,管周间隙紧凑,睾丸间质细胞分布清晰。高龄模型组大鼠生精小管间质疏松,生精细胞排列紊乱,精原细胞数量减少,成熟精子罕见,睾丸生精功能显著衰退。而五子衍宗丸干预组大鼠的睾丸病理形态与生精功能均呈现明显改善,见图 1。低龄对照组大鼠附睾成熟精子数量较多,精子密度均匀;高龄模型组精子数量明显减少,分布不均;五子衍宗丸 2 组有明显改善,见图 1。



A.低龄对照组; B.高龄模型组; C.五子衍宗丸低剂量组; D.五子衍宗丸高剂量组; E.维生素 C 组(图 2~5 同)。

图 1 五子衍宗丸对高龄大鼠睾丸、附睾组织形态的影响(HE 染色,×400)

Fig. 1 Effects of Wuzi Yanzong Pills on testicular and epididymal tissue morphology in aged rats (HE staining, ×400)

**3.3 对大鼠精子密度和精子活动率的影响** 与低龄对照组比较,高龄模型组精子密度和活动率明显下降( $P<0.01$ );与高龄模型组比较,五子衍宗丸 2 组精子密度和活动率显著上升( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 五子衍宗丸对高龄大鼠精子密度和精子活动率的影响( $\bar{x}\pm s$   $n=8$ )

Table 3 Effects of Wuzi Yanzong Pills on sperm density and sperm motility in aged rats ( $\bar{x}\pm s$   $n=8$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 精子密度<br>/10 <sup>6</sup> ·mL <sup>-1</sup> | 精子活动率<br>/%              |
|-------|---------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| 低龄对照  | —                         | 56.08±4.01                                 | 42.09±4.75               |
| 高龄模型  | —                         | 49.34±3.23 <sup>2)</sup>                   | 32.69±3.35 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                         | 52.17±2.94 <sup>3)</sup>                   | 38.24±2.77 <sup>3)</sup> |
|       | 8                         | 54.98±1.31 <sup>3)</sup>                   | 42.19±4.53 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                       | 45.01±2.21                                 | 39.06±4.30               |

**3.4  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测大鼠睾丸附睾组织衰老细胞** 在睾丸组织的 SA- $\beta$ -Gal 染色中,胞质呈现蓝色的细胞判定为 SA- $\beta$ -Gal 阳性,其染色深度与面

积及睾丸组织的衰老程度呈正相关。染色结果显示,正常组睾丸组织中阳性细胞数量较少,染色较浅,吸光度值较低;而高龄大鼠睾丸组织内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性显著升高,表现为 SA- $\beta$ -Gal 阳性细胞数量增多、染色加深、颗粒粗大,其吸光度较对照组显著升高( $P<0.01$ ),见图 2、表 4。五子衍宗丸高剂量组附睾 SA- $\beta$ -Gal 阳性细胞着色显著变浅( $P<0.05$ ),见图 2、表 4。

**3.5 大鼠睾丸组织 miR-34a-5p mRNA 表达** 与低龄对照组比较,高龄模型组大鼠睾丸 miR-34a-5p mRNA 表达量显著下调( $P<0.01$ )。与高龄模型组比较,五子衍宗丸 2 组及维生素 C 组 miR-34a-5p mRNA 表达量显著上升( $P<0.05$ ),见表 5。

**3.6 大鼠受孕率及胎产数** 与低龄对照组比较,高龄模型大鼠受孕率及胎产数明显下降( $P<0.01$ ),与高龄模型组比较,五子衍宗丸高剂量组及维生素 C 组胎产数及受孕率明显上升( $P<0.05$ ),见表 6。

**3.7 子代生长发育评估** 与低龄对照组比较,高龄

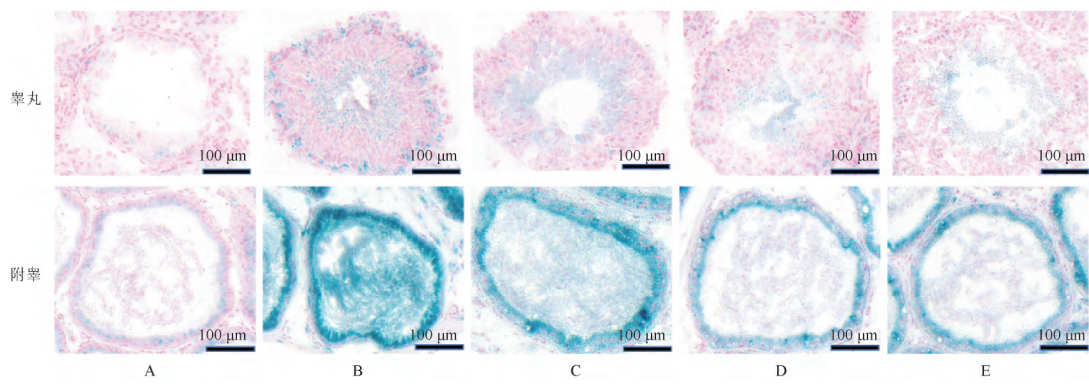


图 2 五子衍宗丸对衰老大鼠睾丸、附睾组织中 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影响( SA- $\beta$ -Gal 染色  $\times 400$ )  
Fig. 2 Effects of Wuzi Yanzong Pills on  $\beta$ -galactosidase activity in the testicular tissue of aged rats ( SA- $\beta$ -Gal staining ,  $\times 400$ )

表 4 五子衍宗丸对大鼠睾丸组织  $\beta$ -半乳糖苷酶占比的影响(  $\bar{x}\pm s$   $n=3$ )

Table 4 Effects of Wuzi Yanzong Pills on the proportion of  $\beta$ -galactosidase in the testicular tissue of rats (  $\bar{x}\pm s$   $n=3$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 睾丸 SA- $\beta$ -Gal<br>占比/%   | 附睾 SA- $\beta$ -Gal<br>占比/%    |
|-------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 低龄对照  | —                         | 0.36 $\pm$ 0.06               | 3.74 $\pm$ 3.63                |
| 高龄模型  | —                         | 5.30 $\pm$ 0.79 <sup>2)</sup> | 23.88 $\pm$ 2.57 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                         | 1.26 $\pm$ 0.23 <sup>3)</sup> | 19.26 $\pm$ 1.48               |
|       | 8                         | 0.64 $\pm$ 0.05 <sup>3)</sup> | 11.61 $\pm$ 0.93 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                       | 1.64 $\pm$ 0.05 <sup>3)</sup> | 18.62 $\pm$ 1.11               |

表 5 五子衍宗丸对大鼠睾丸组织 miR-34a-5p mRNA 的影响(  $\bar{x}\pm s$   $n=3$ )

Table 5 Effect of Wuzi Yanzong Pills on miR-34a-5p expression in the testicular tissue of rats (  $\bar{x}\pm s$   $n=3$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | miR-34a-5p                    |
|-------|-----------------------|-------------------------------|
| 低龄对照  | —                     | 1.00 $\pm$ 0                  |
| 高龄模型  | —                     | 1.31 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                     | 1.13 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup> |
|       | 8                     | 1.09 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                   | 1.12 $\pm$ 0.09               |

表 7 五子衍宗丸对高龄大鼠子代生长发育的影响(  $\bar{x}\pm s$   $n=10$ )

Table 7 Effects of Wuzi Yanzong Pills on the growth and development of offspring from age male rats (  $\bar{x}\pm s$   $n=10$ )

| 组别    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 0 d 体质量/g                     | 0 d 体长/cm                     | 30 d 体质量/g                     | 30 d 体长/cm                     |
|-------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 低龄对照  | —                     | 5.64 $\pm$ 0.46               | 5.99 $\pm$ 0.44               | 89.48 $\pm$ 10.41              | 19.16 $\pm$ 1.85               |
| 高龄模型  | —                     | 5.05 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup> | 5.41 $\pm$ 0.38 <sup>2)</sup> | 80.92 $\pm$ 3.23 <sup>2)</sup> | 15.32 $\pm$ 2.29 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                     | 5.45 $\pm$ 0.23               | 5.35 $\pm$ 0.44               | 80.20 $\pm$ 1.68               | 16.03 $\pm$ 0.90               |
|       | 8                     | 5.73 $\pm$ 0.32 <sup>3)</sup> | 5.97 $\pm$ 0.43 <sup>3)</sup> | 89.40 $\pm$ 5.04 <sup>3)</sup> | 17.86 $\pm$ 2.18 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                   | 5.64 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup> | 5.39 $\pm$ 0.21               | 81.28 $\pm$ 0.79               | 16.44 $\pm$ 0.99               |

表 6 五子衍宗丸对大鼠受精率及胎产数的影响(  $\bar{x}\pm s$  ,  $n=8$ )

Table 6 Effects of Wuzi Yanzong Pills on the fertilization rate and litter size in rats (  $\bar{x}\pm s$   $n=8$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 受精率<br>/%        | 胎产数<br>/只                      |
|-------|---------------------------|------------------|--------------------------------|
| 低龄对照  | —                         | 100              | 13.60 $\pm$ 2.07               |
| 高龄模型  | —                         | 50 <sup>2)</sup> | 8.00 $\pm$ 1.58 <sup>2)</sup>  |
| 五子衍宗丸 | 2                         | 60               | 9.20 $\pm$ 1.92                |
|       | 8                         | 90 <sup>3)</sup> | 12.00 $\pm$ 1.58 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                       | 70 <sup>3)</sup> | 11.40 $\pm$ 1.14 <sup>3)</sup> |

模型大鼠子代 0 d 及 30 d 体质量、体长明显下降 ( $P<0.01$ ) ,与高龄模型组比较 ,五子衍宗丸 2 组及维生素 C 组受精率及胎产数明显上升 ( $P<0.05$ ) ,见表 7。

3.8 Morris 水迷宫评估子代学习能力 定位航行实验结果显示 ,低龄对照组、五子衍宗丸 2 组、维生素 C 组 随着训练时间递增 ,上平台逃避潜伏期逐渐缩短;与低龄对照组比较 ,高龄模型组前 4 d 定位巡航实验逃避潜伏期差异无统计学意义 ,第 5 天逃

避潜伏期显著增加 ( $P<0.05$ ) ; 与高龄模型组比较 , 五子衍宗丸组第 5 天逃避潜伏期显著缩短 ( $P<0.05$ ) , 见图 3、表 8。空间探索实验结果显示 , 与低龄对照组比较 , 高龄模型组穿越平台次数显著

减少 ( $P<0.05$ ) , 目标象限活动路程显著减少 ( $P<0.05$ ) ; 与高龄模型组比较 , 五子衍宗丸 2 组和维生素 C 组穿越平台次数和目标象限活动路程均显著增加 ( $P<0.05$ ) , 见图 3、表 8。

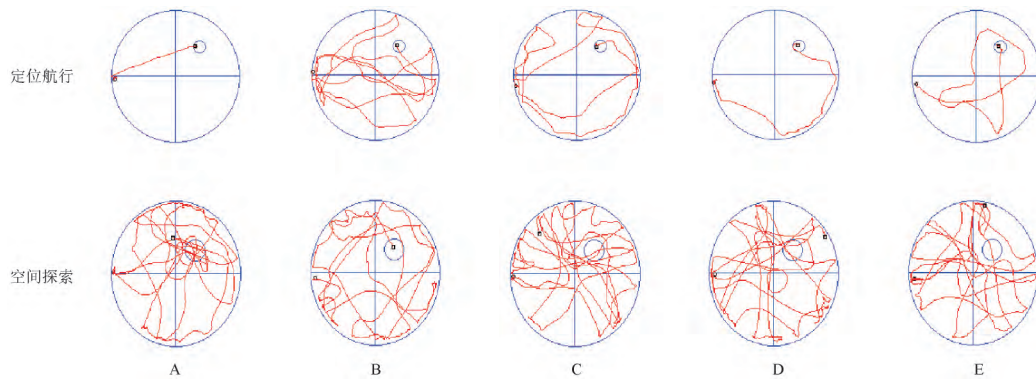


图 3 五子衍宗丸对高龄大鼠子代 Morris 水迷宫定位航行和空间探索的影响

Fig. 3 Effects of Wuzi Yanzong Pills on the localization and spatial navigation of offspring from aged male rats in the Morris water maze

表 8 五子衍宗丸对高龄大鼠子代水迷宫逃避潜伏期、穿越平台次数及目标象限活动路程的影响 ( $\bar{x}\pm s$   $n=10$ )

Table 8 Effects of Wuzi Yanzong Pills on the escape latency , platform crossings , and distance traveled in the target quadrant of the offspring from aged male rats in the Morris water maze ( $\bar{x}\pm s$   $n=10$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 逃避潜伏期/s     |             |             |             |                           | 穿越平台<br>次数/次            | 目标象限<br>活动路程/cm             |
|-------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|       |                           | 第 1 天       | 第 2 天       | 第 3 天       | 第 4 天       | 第 5 天                     |                         |                             |
| 低龄对照  | -                         | 51.84±10.35 | 42.90±15.64 | 37.31±17.67 | 35.67±17.87 | 22.63±10.74               | 3.80±1.55               | 819.82±207.92               |
| 高龄模型  | -                         | 50.36±7.50  | 52.32±7.40  | 46.17±12.48 | 44.77±16.16 | 44.57±8.79 <sup>1)</sup>  | 0.90±0.99 <sup>1)</sup> | 303.04±180.76 <sup>1)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                         | 48.74±14.55 | 43.87±15.92 | 46.21±10.87 | 35.68±18.56 | 35.43±9.19                | 2.70±1.42 <sup>3)</sup> | 673.64±237.41 <sup>3)</sup> |
|       | 8                         | 45.84±15.13 | 45.05±14.62 | 40.04±18.07 | 36.28±11.53 | 29.59±13.87 <sup>3)</sup> | 3.10±1.91 <sup>3)</sup> | 803.67±355.07 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                       | 45.60±14.86 | 34.02±17.89 | 46.10±12.61 | 37.60±19.10 | 39.00±10.10               | 2.40±1.26               | 617.66±154.86 <sup>3)</sup> |

3.9 尼氏染色检测子代海马神经元形态 各组大鼠海马 CA1 区尼氏染色可见 , 低龄对照组海马尼氏小体数量较多、体积较大 , 少有丢失情况 , 神经元形态正常、各细胞排列整齐 ; 与低龄对照组比较 , 高龄模型组海马神经元细胞形态不规则 , 排列紊乱 , 核仁

深染固缩 , 损伤较重 , 尼氏小体趋近消失 , 神经元细胞丢失情况严重 ( $P<0.01$ ) ; 与高龄模型组比较 , 五子衍宗丸 2 组和维生素 C 组损伤程度较轻 , 海马尼氏小体丰富 , 神经元细胞形态较为正常 , 排列相对整齐 , 数目显著增加 ( $P<0.05$ ) , 见图 4、表 9。

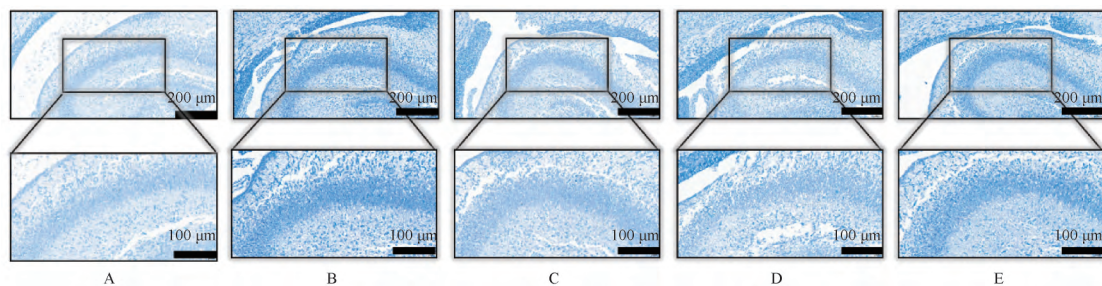


图 4 五子衍宗丸对高龄大鼠子代海马尼氏染色的影响

Fig. 4 Effect of Wuzi Yanzong Pills on the Nissl staining of the hippocampus in the offspring from aged male rats

表 9 五子衍宗丸对衰老大鼠子代海马 CA1 区神经元细胞数目的影响( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

Table 9 Effect of Wuzi Yanzong Pills on the number of neurons in the CA1 region of hippocampus in the offspring from aged male rats ( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

| 组别    | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 神经元数/个                         |
|-------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 低龄对照  | —                                   | 62.67 $\pm$ 3.21               |
| 高龄模型  | —                                   | 42.33 $\pm$ 4.93 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                                   | 48.00 $\pm$ 2.00               |
|       | 8                                   | 54.00 $\pm$ 5.00 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                                 | 48.67 $\pm$ 1.53               |

**3.10 大鼠子代海马组织 miR-34a-5p mRNA 表达**  
与低龄对照组比较,高龄模型组大鼠子代海马中 miR-34a-5p mRNA 表达量显著上调( $P<0.05$ )。与高龄模型组比较,五子衍宗丸 2 组及维生素 C 组 miR-34a-5p mRNA 表达量显著下降( $P<0.05$ ) 见表 10。

表 10 五子衍宗丸对高龄大鼠子代海马组织 miR-34a-5p mRNA 的影响( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

Table 10 Effects of Wuzi Yanzong Pills on miR-34a-5p expression in the hippocampal tissue of offspring from aged male rats ( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

| 组别    | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | miR-34a-5p                    |
|-------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 低龄对照  | —                                   | 1.00 $\pm$ 0                  |
| 高龄模型  | —                                   | 1.18 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                                   | 1.07 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup> |
|       | 8                                   | 1.03 $\pm$ 0.02 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                                 | 1.08 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup> |

**3.11 WB 检测子代海马组织 BDNF、SIRT1 蛋白**  
与低龄对照组比较,高龄模型组衰老大鼠子代海马 BDNF/SIRT1 蛋白表达显著下调( $P<0.01$ )。与高龄模型组比较,五子衍宗丸 2 组及维生素 C 组 BDNF/SIRT1 蛋白表达显著上调( $P<0.05$ ) 见图 5、表 11。

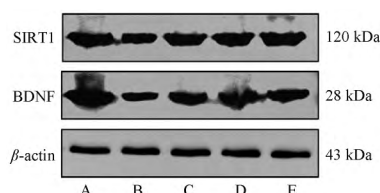


图 5 五子衍宗丸对衰老大鼠海马组织 SIRT1、BDNF 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of SIRT1 and BDNF expression in the hippocampal tissue of aged rats treated with Wuzi Yanzong Pills

表 11 五子衍宗丸对高龄大鼠子代海马组织 SIRT1、BDNF 蛋白的影响( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

Table 11 Effects of Wuzi Yanzong Pills on protein levels of SIRT1 and BDNF in the hippocampal tissue of offspring from aged male rats ( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

| 组别    | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | SIRT1                         | BDNF                          |
|-------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 低龄对照  | —                                   | 1.00 $\pm$ 0                  | 1.00 $\pm$ 0                  |
| 高龄模型  | —                                   | 0.53 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup> | 0.33 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup> |
| 五子衍宗丸 | 2                                   | 0.69 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup> | 0.47 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup> |
|       | 8                                   | 0.82 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup> | 0.75 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup> |
| 维生素 C | 0.1                                 | 0.78 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup> | 0.50 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup> |

#### 4 讨论

随着人口政策调整,高龄父亲数量显著增加,而随着年龄的增长,衰老作为不可逆的生理进程也在持续发展<sup>[15]</sup>。衰老是指生物体随着时间的推移,而逐渐出现结构退化和生理功能衰退的过程。而表观遗传失调是衰老的重要标志之一<sup>[16]</sup>。同时表观遗传失调会影响受精和胚胎的发育,导致流产、出生缺陷或遗传疾病<sup>[3]</sup>。

miRNA 作为表观遗传学中的重要组成部分,可在转录后水平上调控基因的表达。它们通过与靶 mRNA 的特异性互补配对,调控靶基因的表达,影响多种生物学过程,包括细胞分化、增殖、凋亡以及对应激的响应<sup>[17]</sup>。同时 miRNA 可以通过父代精子遗传给子代,从而影响子代的健康<sup>[18]</sup>。而 miR-34a-5p 作为精子中表达最高的几种 miRNA<sup>[19]</sup>,在调控精子发生、衰老、神经发育和凋亡中起关键作用<sup>[20]</sup>,并具有高度保守和仅从父代遗传的特性<sup>[21]</sup>。已有实验研究证明,细胞衰老的过程中 miR-34a-5p 持续升高<sup>[22]</sup>。本研究发现,高龄父代大鼠睾丸组织中 miR-34a-5p 表达显著升高,高龄 SD 雄鼠附睾、睾丸指数显著下降;HE 染色显示其曲细精管萎缩且各级生精上皮排列紊乱; $\beta$ -Gal 染色阳性率增加证实了生殖系统加速衰老的特征。提示 miR-34a-5p 异常表达可能是高龄父代大鼠精子质量下降的重要原因之一。

SIRT1 是哺乳动物中发现的与酵母染色质沉默因子(silent information regulator 2, Sir2) 同源性最高的同系物,是  $\text{NAD}^+$  依赖的 III 类组蛋白去乙酰化酶。它的生理功能是除去乙酰基,使 DNA 链能够紧密缠绕在一起,达到基因沉默的功能<sup>[23]</sup>。BDNF 是调控突触可塑性、神经元存活和学习记忆的关键分子<sup>[24]</sup>。在高龄雄性大鼠的子代中,高龄父代大鼠的精子可能携带异常升高的 miR-34a-5p,这种异常修

饰可通过受精过程传递给子代,进而干扰胚胎的正常发育程序<sup>[20]</sup>,并对子代神经系统的功能产生潜在影响<sup>[25]</sup>。子代海马中 miR-34a-5p 异常上调将抑制 SIRT1 的表达,当 SIRT1 表达下调时,其下游靶点如 BDNF 的表达受到抑制。而使子代海马中的神经细胞发育受损<sup>[26]</sup>。本研究发现,高龄父代的子代大鼠海马的 miR-34a-5p 表达显著升高,SIRT1、BDNF 表达显著降低,水迷宫结果显示学习记忆能力下降。尼氏染色显示神经元细胞丢失情况严重。这可能由于父代精子中的 miR-34a-5p 异常升高并通过影响 SIRT1 的表达,导致子代海马神经元 BDNF 合成减少。

五子衍宗丸由菟丝子、五味子、枸杞子、覆盆子、车前子 5 种名称带“子”的中药材组成。在传统中医理论中,男性不育常被归为“无子”或“无嗣”的范畴,方名巧妙运用了这层双关含义。5 味药物配伍协同,既能温助肾阳,又可滋养肾阴,从而实现阴阳双补、协调平衡的功效。方中君药菟丝子与枸杞子共同滋补肝肾、填补下元,针对肝肾亏虚、下元不固所致的遗精滑泄;臣药五味子及覆盆子能益气生津、安神宁心,兼可暖肾固精、收敛小便;佐以车前子渗湿浊、泄相火,既制约其他药物的滋腻之性,又使全方补中有泻、涩中寓通,避免滋腻停滞,该方对男性不育症有较好的疗效,又被誉为“古今种子第一方”,其治疗男性不育症的有效率,已形成专家共识<sup>[27]</sup>。现代药理学研究表明,五子衍宗丸可改善睾丸生精功能,调控下丘脑-垂体-性腺轴,并具有延缓衰老、调节血糖、抗氧化及增强免疫力等作用,进而通过减缓细胞衰老,调控表观遗传修饰,减少子代出生缺陷和遗传疾病<sup>[28]</sup>。本研究发现,在高龄父代大鼠方面五子衍宗丸 2 组较高龄模型组睾丸指数、附睾指数、精子活力、精子数量及睾丸生精功能、受精率、胎产数均升高,父代精子中的 miR-34a-5p 表达较高龄模型组下降,附睾 SA- $\beta$ -Gal 阳性细胞着色变浅。都表明五子衍宗丸通过抑制 miR-34a-5p 表达和细胞衰老改善高龄父代大鼠生殖功能。在子代方面五子衍宗丸 2 组较高龄模型组 miR-34a-5p 表达显著下降,SIRT1、BDNF 表达显著上升,30 日龄子代生长发育加快、海马神经元数量增多、子代学习记忆能力升高。这表明五子衍宗丸通过延缓衰老和调控 miR-34a-5p 的表达进而调控 miR-34a-5p/SIRT1/BDNF 信号通路增强高龄大鼠子代学习记忆能力。

本研究在探究高龄父代大鼠对子代学习能力的

影响机制及中药干预方面取得重要进展。既往研究多聚焦于母系年龄效应,对父系跨代遗传机制探索不足,且缺乏针对生殖衰老的有效干预策略。本研究创新性地揭示了 miR-34a-5p/SIRT1/BDNF 信号通路在跨代遗传中的作用,证实高龄父代大鼠可通过精子将异常表达的 miR-34a-5p 传递给子代,进而影响海马神经元发育和认知功能。这一发现为理解父系年龄效应提供了新的分子生物学视角。在干预策略方面,首次系统评价了五子衍宗丸的多种功效。该复方不仅能改善睾丸生精功能,还能通过调控 miR-34a-5p 表达,增强子代学习能力,体现了中医药“多靶点”优势。本研究为中医药在生殖医学领域的应用提供了科学依据。然而,研究仍存在部分局限性:样本局限于 SD 大鼠模型,未阐明复方具体活性成分的作用机制。未来需结合多组学技术深入解析中药作用网络,并通过临床研究验证转化价值。

#### [参考文献]

- [1] FEUZ M B, NELSON D C, MILLER L B, et al. Reproductive ageing: current insights and a potential role of NAD in the reproductive health of aging fathers and their children [J]. *Reproduction*, 2024, 167(6): e230486.
- [2] HANEVIK H I, HESSEN D O. IVF and human evolution [J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(4): 457.
- [3] KHANDWALA Y S, BAKER V L, SHAW G M, et al. Association of paternal age with perinatal outcomes between 2007 and 2016 in the United States: population based cohort study [J]. *Brit Med J*, 2018, 363: k4372.
- [4] GUO J, HUANG X, DOU L, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 391.
- [5] DING X, MA X, MENG P, et al. Potential effects of traditional Chinese medicine in anti-aging and aging-related diseases: current evidence and perspectives [J]. *Clin Interv Aging*, 2024, 19: 681.
- [6] 邵杨,陶方泽,田朝晖,等. 五子衍宗丸的临床应用进展 [J]. *中国男科学杂志*, 2024, 38(5): 130.
- [7] GERASYMCHUK M, CHERKASOVA V, KOVALCHUK O, et al. The role of microRNAs in organismal and skin aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5281.
- [8] 王婧莹,郭学莉,郭婷婷,等. 不同周龄和性别的 SPF 级 SD 大鼠血液生理生化指标的测定与比较分析 [J]. *实验室检测*, 2024, 2(1): 23.
- [9] 常言语. 五子衍宗丸对自然衰老小鼠血睾屏障功能损伤的改善作用及机制探讨 [D]. 宜昌: 三峡大学, 2023.
- [10] 李泽辉,徐盼瑜,李佳珊,等. 基于代谢组学研究肉苁蓉提取物对肾虚证大鼠生殖功能损伤的疗效与作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(7): 1850.

- [11] 萧闵,曹继刚,江晓翠,等. 基于 Cx43 研究产前应激对子代大鼠睾丸发育的影响及左归丸干预作用[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(1): 197.
- [12] 刘点,向紫萍,段泽森,等. 基于网络药理学和实验验证探讨苦参碱抗人脐静脉内皮细胞衰老的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(8): 2260.
- [13] 闫旻昊,蔡晗,丁海霞,等. 基于转录组学与代谢组学对当归芍药散改善阿尔茨海默病多重作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(8): 2229.
- [14] 蔡元钦,向阳,龙清华,等. 苡蓉散减轻阿尔茨海默病模型大鼠认知障碍和神经炎症: 内质网应激与 NLRP3 炎症小体机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(7): 1881.
- [15] GONZALEZ D C, ORY J, BLACHMAN-BRAUN R, et al. Advanced paternal age and sperm DNA fragmentation: a systematic review[J]. World J Mens Health, 2022, 40(1): 104.
- [16] LOPEZ-OTIN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. Hallmarks of aging: an expanding universe[J]. Cell, 2023, 186(2): 243.
- [17] IBRAGIMOVA M, KUSSAINOVA A, ARIPOVA A, et al. The molecular mechanisms in senescent cells induced by natural aging and ionizing radiation[J]. Cells, 2024, 13(6): 550.
- [18] WANG Y, CHEN Z, HU H, et al. Sperm microRNAs confer depression susceptibility to offspring[J]. Sci Adv, 2021, 7(7): eabd7605.
- [19] WANG C, JIA Q, GUO X, et al. MicroRNA-34 family: from mechanism to potential applications[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2022, 144: 106168.
- [20] JAUHARI A, YADAV S. MiR-34 and miR-200: regulator of cell fate plasticity and neural development[J]. Neuromol Med, 2019, 21(2): 97.
- [21] SHI S, SHI Q, SUN Y. The effect of sperm miR-34c on human embryonic development kinetics and clinical outcomes[J]. Life Sci, 2020, 256: 117895.
- [22] SINGH T, YADAV S. Role of microRNAs in neurodegeneration induced by environmental neurotoxicants and aging[J]. Ageing Res Rev, 2020, 60: 101068.
- [23] 苏娜,陈日玲. Sirt1 功能的研究进展[J]. 中国医学创新, 2021, 18(25): 185.
- [24] IBRAHIM A M, CHAUHAN L, BHARDWAJ A, et al. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative disorders[J]. Biomedicine, 2022, 10(5): 1143.
- [25] LIANG G, ZHU X, ZHANG Z, et al. MicroRNAs in aged sperm confer psychiatric symptoms to offspring through causing the dysfunction of estradiol signaling in early embryos[J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 63.
- [26] WU W, CHEN C, LIN J, et al. Impaired synaptic plasticity and decreased glutamatergic neuron excitability induced by SIRT1/BDNF downregulation in the hippocampal CA1 region are involved in postoperative cognitive dysfunction[J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 79.
- [27] 李海松,王继升. 少弱精子症中西医融合药物治疗共识[J]. 中国男科学杂志, 2021, 35(5): 80.
- [28] 黄峰,吴德玲,李莉,等. 五子衍宗丸的药理作用及临床应用研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(5): 89.

[责任编辑 杨驰]