

doi:10.13361/j.qdyxy.201703014

促育生精方治疗小鼠不育症的效果及其机制

朱莹莹¹, 王麟², 凌勇², 孙立波², 孙向红²

(青岛大学, 山东 青岛 266500; 1 药学院药剂学系; 2 附属医院药剂科)

[摘要] 目的 研究促育生精方治疗小鼠不育症的效果及其机制。方法 雄性清洁级昆明小鼠 50 只, 随机分为空白对照组、模型组和促育生精方干预低剂量组、中剂量组、高剂量组, 采用环磷酰胺(CP)造模方法建立小鼠少弱精症模型, 促育生精方干预各剂量组在造模过程中给予促育生精方干预, 共治疗 35 d。光学显微镜下观察各组精子密度与精子活力, 采用 RT-PCR 法检测各组小鼠睾丸组织中 cAMP 反应元件调节因子(CREM)mRNA、cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)mRNA、睾丸特异性 CREM 激活因子(ACT)mRNA 的表达; 用 Western blotting 方法检测各组 ACT、CREM、CREB 蛋白的表达。结果 模型组精子密度与精子活力较空白对照组显著降低($F=2.83\sim 121.16, P<0.05$), 小鼠少弱精症模型制备成功。促育生精方干预中剂量组、高剂量组精子密度显著高于模型组($F=121.16, P<0.05$), 低剂量组与模型组比较差异无显著性($P>0.05$)。促育生精方干预低剂量组、中剂量组精子活力显著高于模型组($F=2.83, 18.94, P<0.05$), 而高剂量组与模型组比较差异无显著性($P>0.05$)。模型组 ACT、CREM、CREB mRNA 及蛋白表达量较空白对照组均显著降低($F=16.28\sim 154.32, P<0.05$)。与模型组比较, 促育生精方干预中剂量组 ACT mRNA 和蛋白表达显著升高($F=29.04, 64.28, P<0.05$), 而低剂量、高剂量组差异无显著性($P>0.05$); 低、中剂量组 CREM mRNA 和蛋白表达显著升高($F=17.77, 41.83, P<0.05$), 高剂量组差异无显著意义($P>0.05$); 低剂量组 CREB mRNA 及蛋白表达显著升高($F=16.89, 154.32, P<0.05$), 而中、高剂量组比较差异无显著意义($P>0.05$)。结论 促育生精方能有效提高少弱精症模型小鼠睾丸组织中 ACT、CREM、CREB mRNA 及蛋白的表达, 改善小鼠精子质量。

[关键词] 促育生精方; cAMP 应答元件调节器; cAMP 反应元件结合蛋白; 环磷酰胺; 不育

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2017)03-0300-05

EFFECT OF CUYU SHENGJING PRESCRIPTION IN TREATMENT OF INFERTILITY IN MICE AND ITS MECHANISM ZHU Yingying, WANG Lin, LING Yong, SUN Libo, SUN Xianghong (Department of Pharmaceutical, College of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266500, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of Cuyu Shengjing Prescription in the treatment of infertility in mice and its mechanism. **Methods** A total of 50 clean male Kunming mice were randomly divided into blank control group, model group, and low-, medium-, and high-dose Cuyu Shengjing Prescription groups. Cyclophosphamide was used to establish a mouse model of oligoasthenospermia, and the Cuyu Shengjing Prescription groups were given Cuyu Shengjing Prescription for 35 d. An optical microscope was used to observe sperm density and motility, RT-PCR was used to measure the mRNA expression of activator of cAMP-responsive element modulator in testis (ACT), cAMP-responsive element modulator (CREM), and cAMP response element-binding protein (CREB) in testicular tissue, and Western blot was used to measure the protein expression of ACT, CREM, and CREB. **Results** The model group had significantly lower sperm density and motility than the normal group ($F=2.83\sim 121.16, P<0.05$), suggesting that the mouse model of oligoasthenospermia was established successfully. The medium- and high-dose Cuyu Shengjing Prescription groups had significantly higher sperm density than the model group ($F=121.16, P<0.05$), while there was no significant difference between the low-dose Cuyu Shengjing Prescription group and the model group ($P>0.05$). The low- and medium-dose Cuyu Shengjing Prescription groups had significantly higher sperm motility than the model group ($F=2.83, 18.94, P<0.05$), while there was no significant difference between the high-dose Cuyu Shengjing Prescription group and the model group ($P>0.05$). The model group had significantly lower mRNA and protein expression of ACT, CREM, and CREB than the blank control group ($F=16.28\sim 154.32, P<0.05$). The medium-dose Cuyu Shengjing Prescription group had significant increases in the mRNA and protein expression of ACT compared with the model group ($F=29.04, 64.28, P<0.05$), while there were no significant differences between the low- and high-dose Cuyu Shengjing Prescription groups and the model group ($P>0.05$). Compared

with the model group, the low- and medium-dose Cuyu Shengjing Prescription groups had significant increases in the mRNA and protein expression of CREM ($F=17.77, 41.83, P<0.05$), while there were no significant differences between the high-dose Cuyu Shengjing Prescription group and the model group ($P>0.05$). Com-

[收稿日期] 2017-04-14; **[修订日期]** 2017-06-12

[基金项目] 青岛市公共领域科技支撑计划项目(2012-1-3-2-(7)-nsh)

[作者简介] 朱莹莹(1991-), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 孙向红(1961-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师。

pared with the model group, the low-dose Cuyu Shengjing Prescription group had significant increases in the mRNA and protein expression of CREB ($F=16.89, 154.32; P<0.05$), while there were no significant differences between the medium- and high-dose Cuyu Shengjing Prescription groups and the model group ($P>0.05$). **Conclusion** Cuyu Shengjing Prescription can effectively improve the mRNA and protein expression of ACT, CREM, and CREB in testicular tissue in mice with oligoasthenospermia and improve sperm quality.

[KEY WORDS] cuyushengjingfang; cyclic amp response element modulator; cyclic amp response element-binding protein; cyclophosphamide; infertility

cAMP反应元件结合蛋白(CREB)和cAMP反应元件调节因子(CREM)是细胞内与多种基因转录有关的重要核转录因子,在多种生物体细胞中均有表达。而睾丸特异性CREM激活因子(ACT)是睾丸内CREM的激活物,可通过激活CREM蛋白,参与多种基因的转录调控。研究显示,cAMP/ACT-CREM/CREB信号通路是与精子发生密切相关的最重要通路^[1],CREM基因缺失会引起小鼠睾丸生精障碍,多种基因在精细胞减数分裂后表达量减少,甚至没有表达。目前,临幊上以cAMP/ACT-CREM/CREB信号通路的相关蛋白作为靶点治疗男性不育症的药物报道较少。促育生精方为我院临幊应用了十几年治疗男性不育症的药物。临幊研究显示,该方能有效提高男性少弱精症病人的精子活力和精子能动性^[2]。前期药理研究表明,促育生精方能有效缓解性激素卵泡刺激素(FSH)的分泌失调,改善少弱精大鼠睾丸萎缩,增加实验性少弱精大鼠精子数目,提高精子能动性。另有研究显示,促育生精方能提高少弱精症大鼠精子特异钙通道蛋白Catsper1、Catsper2的表达^[3-4],但其作用机制尚不明确。本实验通过观察促育生精方对环磷酰胺(CP)所致少弱精症小鼠睾丸组织中ACT、CREB、CREM表达的影响,探讨促育生精方治疗CP所致不育症的作用机制。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

促育生精方(组方:仙茅、淫羊藿、巴戟天、杜仲、蛇床子、黄柏、枸杞子、牛膝、山萸肉、土茯苓、沙苑子、知母、黄精、何首乌、赤芍,青岛大学附属医院中药房提供),CP(江苏恒瑞医药股份有限公司),逆转录试剂、Trizol、RT-PCR试剂盒(TAKARA公司生产),细胞蛋白裂解液RIPA、磷酸酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司);无水乙醇、氯仿、异丙醇均为生化级;ACT、CREM、CREB蛋白一抗(Abcam公司),GAPDH蛋白一抗以及二抗(Elabscience公司),基因扩增引物由上海

生工生物公司合成。清洁级雄性昆明小鼠50只,4周龄,体质量20 g左右,由青岛派特福德白鼠养殖专业合作社提供。

1.2 实验方法

1.2.1 药物制备 促育生精方4副水煎煮,根据小鼠与人体表面积比换算小鼠用药剂量(小鼠和人的换算系数为0.002 6),制得高、中、低剂量药液浓度分别为570.0、285.0、142.5 g/L。

1.2.2 动物处理 小鼠适应性喂养5 d,随机分为空白对照组(CG组)、模型组(MG组)和促育生精方干预低剂量组(SG组)、中剂量组(MDG组)、高剂量组(HG组),各10只。称小鼠体质量,除空白对照组外,各组小鼠均腹腔注射CP(60 mg/kg)5 d,建立小鼠少弱精症模型。然后分别给促育生精方干预低剂量组、中剂量组、高剂量组小鼠促育生精方灌胃,剂量分别为0.45、0.90、1.80 g/kg;空白对照组和模型组分别应用等量的生理盐水灌胃;各组均持续35 d。末次给药24 h后,处死小鼠。

1.3 精子数目及活力检测

取睾丸组织称质量,记录。取小鼠单侧附睾尾,生理盐水清洗,置于牛血清清蛋白(BSA)培养液中,剪碎,200目筛过滤,制成精子悬液。应用Na₂HPO₄、NaHCO₃、KCl、NaCl、MgCl₂、果糖、HEPES缓冲液、3.5 g/L的BSA混合配置精子孵育液(pH值为7.4)。取10 μL精子悬液,使用精子孵育液稀释100倍,吸取10 μL稀释后的精子悬液至细胞计数板,光学显微镜下进行精子计数,然后计算精子密度。取稀释后的精液10 μL至细胞计数板,取多个视野,高倍镜下观察200个精子的活动情况,整个过程10 min内完成。根据WHO标准,精子活动力分为4级:a,快速向前运动;b,慢或呆滞向前运动;c,非向前运动;d,不动。

1.4 ACT、CREB、CREM mRNA表达检测

1.4.1 总RNA的提取与逆转录 取各组睾丸组织,按Trizol试剂盒说明书提取RNA,酶标仪测定RNA浓度及纯度, RNA纯度A₂₆₀/A₂₈₀为1.8~2.0。逆转录按TAKARA试剂盒说明书要求进行操

作, -20 ℃保存, 待用。

1.4.2 实时荧光定量 PCR PCR 引物序列见表 1, 内参引物 β -actin 购自上海生工生物工程有限公司。PCR 反应体系为 20 μ L, 内含有: SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物(浓度 10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 1 μ L, Nuclease-free H₂O 7 μ L。内参照为 β -actin 为内参。荧光定量 PCR 反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 10 s, 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 共 40 个循环。

表 1 PCR 所用引物种类及其序列

引物种类	位置	序列(5'→3')
ACT	上游	TTGTGAGCAGTGTAAAGAACCAA
	下游	ACCAAAGAGTGATGGCATTTGTT
CREM	上游	CAGAGGAAGAAGGGACACCA
	下游	TTGTATTGCCCGTGCAGTAGT
CREB	上游	GTGGACTGCCCTCCGATTGCG
	下游	GTCTGGCAGCTCTGCTGGA

1.5 Western blotting 法检测 ACT、CREB、CREM 蛋白表达

睾丸组织离体后 -80 ℃保存。取出组织, 裂解, 匀浆, 离心提取组织总蛋白。应用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 并调节各组浓度至平衡, 加入 5×SDS 蛋白变性剂, 95 ℃蛋白变性。取样本于 120 g/L 的 SDS-PAGE 中电泳, 转膜, 加入一抗、二抗孵育, 凝胶成像分析仪上显影。以各组间目的蛋白与内参蛋白灰度值比值的大小表达各组目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 应用 LSD-t 法和 SNK 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠睾丸质量及精子活力的比较

模型组单侧睾丸质量、精子密度、精子活力显著低于空白对照组, 差异有显著性($F = 2.83 \sim 121.16$, $P < 0.05$), 显示造模成功。促育生精方干预中剂量组、高剂量组小鼠精子密度显著高于模型组($F = 121.16$, $P < 0.05$), 低剂量组与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$)。促育生精方干预低剂量组、中剂量组 a 级精子比例、a+b 级精子比例显著高于模型组($F = 2.83$ 、 18.94 , $P < 0.05$), 而高剂量组与模型组

比较差异无显著性($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 各组 ACT、CREM、CREB 基因表达比较

模型组小鼠较空白对照组的 ACT、CREM、CREB mRNA 表达量明显下降, 差异有统计学意义($F = 16.89 \sim 29.04$, $P < 0.05$)。与模型组比较, 中剂量组 ACT mRNA 表达升高($F = 29.04$, $P < 0.05$), 而低、高剂量组的差异无显著性($P > 0.05$); 低、中剂量组 CREM mRNA 表达升高($F = 17.77$, $P < 0.05$), 高剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$); 低剂量组 CREB mRNA 的表达升高($F = 16.89$, $P < 0.05$), 而中、高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。见表 3。

2.3 各组 ACT、CREM、CREB 蛋白表达比较

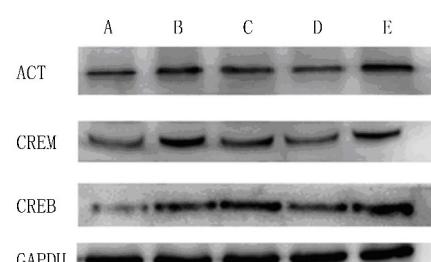
与空白对照组相比较, 模型组 ACT、CREM、CREB 蛋白表达量明显下降($F = 41.83 \sim 154.32$, $P < 0.05$)。与模型组比较, 中剂量组 ACT 蛋白表达显著升高($F = 64.28$, $P < 0.05$), 而低、高剂量组差异无显著性($P > 0.05$); 低、中剂量组 CREM 蛋白表达显著升高($F = 41.83$, $P < 0.05$), 高剂量组差异无显著性($P > 0.05$); 低剂量组 CREB 蛋白表达升高($F = 154.32$, $P < 0.05$), 而中、高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。见表 4、图 1。

表 2 各组小鼠睾丸质量及精子活力比较($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	单侧睾丸质量(m/g)	精子密度($10^9 \cdot L^{-1}$)	a 级精子比例(%)	a+b 级精子比例(%)
CG 组	0.13±0.04	5.28±0.43	24.95±6.09	62.41±4.19
MG 组	0.09±0.04	2.23±0.21	18.15±4.38	33.01±4.33
SG 组	0.10±0.03	2.55±0.17	23.88±4.79	52.56±9.05
MDG 组	0.12±0.01	3.26±0.12	23.76±2.38	48.31±4.96
HG 组	0.13±0.03	3.74±0.15	17.99±4.07	36.10±3.07

表 3 各组小鼠睾丸组织 ACT、CREM、CREB 基因表达比较($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ACT	CREM	CREB
CG 组	1	1	1
MG 组	0.08±0.00	0.12±0.02	0.19±0.06
SG 组	0.27±0.09	0.49±0.19	0.61±0.30
MDG 组	0.67±0.12	0.64±0.09	0.27±0.08
HG 组	0.14±0.00	0.17±0.04	0.05±0.21



A:高剂量组, B:中剂量组, C:低剂量组, D:模型组, E:空白对照组。

图 1 各组 GAPDH、ACT、CREM 和 CREB 蛋白的表达

表4 各组小鼠睾丸组织 ACT、CREM 和 CREB 蛋白相对表达量比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ACT	CREM	CREB
CG 组	0.62±0.04	0.61±0.01	1.01±0.02
MG 组	0.32±0.02	0.40±0.03	0.71±0.02
SG 组	0.36±0.01	0.51±0.02	0.93±0.06
MDG 组	0.45±0.02	0.57±0.03	0.85±0.03
HG 组	0.38±0.02	0.50±0.01	0.41±0.02

3 讨 论

促育生精方是我院协定处方,院内制剂。该处方是在中医理论指导下,综合近年来弱精症发病机制、中药药理以及中药治疗少弱精症的现代研究结果而拟定的。处方中以淫羊藿为主药补肾壮阳,祛风除湿,主治肾虚阳痿、精冷不育;辅以巴戟天、仙茅、蛇床子、杜仲温阳益肾、补益肾气;枸杞子、山萸肉、沙苑子、黄精补肾填精、以生精血;在益肾的同时根据兼症的不同,从肾精亏虚、湿瘀阻滞精道入手,增加土茯苓、黄柏、知母清下焦湿热、滋阴降火;牛膝、赤芍活血化瘀、扩张血管、增加血流量、改善微循环。诸药配伍相得益彰,具有补肾阳、益肾精,养血清热之功。现代药理学研究也证明,淫羊藿能改善下丘脑-垂体-性腺轴的功能,对糖皮质激素所致“阳虚证”以及雄性大鼠性腺的损害也有明显的改善作用^[5]。淫羊藿总黄酮是淫羊藿的重要活性成分,具有雄性激素样作用,能够促进性腺发育、调节体内性激素水平和生殖功能^[6-7]。已有研究证明,淫羊藿对生殖系统的功能与促进生殖细胞内的第二信使 cAMP 的生成有关^[8-9]。因此,通过研究促育生精方对生殖细胞内 cAMP 相关因子的影响,可进一步探讨促育生精方治疗男性不育症的药理机制。本文研究通过腹腔注射 CP 构建少弱精症小鼠模型^[10-11],持续灌胃给予促育生精方 35 d,检测该方剂对少弱精症小鼠 ACT、CREM、CREB mRNA 和蛋白表达的影响。研究结果显示,促育生精方能明显提高少弱精症小鼠精子密度、精子活力以及 ACT、CREM、CREB mRNA 和蛋白的表达,以低、中剂量组更明显,高剂量组差异无显著性。由此推断,促育生精方对少弱精症小鼠的治疗作用可能与提高 cAMP 相关因子 ACT、CREM、CREB mRNA 和蛋白的表达有关,但高剂量对小鼠少弱精症无明显作用,会略微降低 CREB 蛋白的表达,这可能与促育生精方副作用有关。

研究证实,CREB 和 CREM 基因在男性生殖细

胞中高表达,CREM 基因敲除的小鼠精子生成阻碍在精细胞分化的早期阶段,这与减数分裂后多种基因表达受抑制有关^[12]。ACT 是 CREM 的激活子,与 CREM 同期存在,两者具有高度的亲和性,ACT 可以强烈刺激 CREM 进行基因的转录调控。研究显示,小鼠敲除 ACT 基因后仍可以产生成熟的精子,但数量非常少,且精子活力显著下降^[13]。cAMP 作为生殖细胞内的第二信使,可以激活蛋白激酶 A (PKA),后者以磷酸化 CREB 与 CREM 中特定的苏氨酸和丝氨酸残基,pCREB 与 pCREM 结合形成二聚体进而与 CREB 结合蛋白(CBP)结合,共同作用于睾丸中某些与生精细胞有关的基因启动子的 CRE 序列,从而调控基因的转录^[14-16]。Catsper 蛋白为精子细胞中特有的钙离子通道蛋白质,与精子获能、趋化作用、顶体反应以及受精作用均密切相关^[17-19]。前期研究显示,促育生精方也可通过增加少弱精症大鼠 Catsper1 和 Catsper2 的表达,提高胞浆内 Ca^{2+} 浓度,从而改善精子的活力。近期研究在精子特异的 Ca^{2+} 通道蛋白——Catsper1 启动子序列中发现了 CRE 结合位点^[20],因此,我们推测促育生精方有可能通过提高 ACT、CREM、CREB 蛋白的表达,影响睾丸组织中精子特异的 Ca^{2+} 通道蛋白 Catsper1 基因的转录,调节精子能动性,从而治疗男性不育症。

综上所述,促育生精方治疗小鼠少弱精症可能是通过提高 ACT、CREM、CREB mRNA 和蛋白的表达来实现的。本研究通过探讨促育生精方的药理机制,为临床治疗男性不育症提供了新的理论依据以及作用靶点。

[参考文献]

- [1] HOGEVEEN K N, SASSONE-CORSI P. Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility[J]. Human Fertility (Cambridge, England), 2006, 9(2): 73-79.
- [2] 王鸿根,时萍,董加花,等.促育生精颗粒治疗男性少精弱精症 150 例[J].中医杂志,2009,50(2):114-117.
- [3] 宋元美,王麟,孙向红.促育生精方调节少弱精症模型大鼠精子特异性钙通道的机制[J].现代生物医学进展,2015,21(15):4033-4036.
- [4] 孙向红,王麟,孙立波,等.促育生精颗粒对环磷酰胺致少弱精症模型大鼠的影响[J].中国医院药学杂志,2013,33(20):1663-1667.
- [5] 张长城,贾亮亮,李守超,等.淫羊藿总黄酮对环磷酰胺致小鼠生殖障碍保护作用的研究[J].中成药,2010,32(12):2052-2055.

- [6] 刘波,徐彭. 淫羊藿药理作用研究进展[J]. 江西中医药学院学报, 2001,13(1):48-49.
- [7] 刘忠平,李质馨,李守远,等. 淫羊藿对生殖系统影响的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2013,28(1):884-886.
- [8] 徐秀娟,孙耕耘,尤青海,等. cAMP 应答元件结合蛋白与内皮细胞的研究进展[J]. 中华全科医学, 2013,11(12):1937-1939.
- [9] 杨光义,叶方. 仙茅药理作用和临床应用研究概述[J]. 中国药师, 2011,24(7):1039-1040.
- [10] 赵红乐. 环磷酰胺睾丸毒性研究进展[J]. 中国男科学杂志, 2014,28(7):63-66.
- [11] 苏爱,刘金成,王振华,等. 小鼠睾丸生殖细胞减数分裂标本制作方法的改进[J]. 青岛大学医学院学报, 2006,42(4):366-368.
- [12] DON J, STELZER G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. Molecular and cellular endocrinology[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002,187:115-124.
- [13] FIMIA G M, DE CESARE D, SASSONE-CORSI P. CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT[J]. Nature, 1999,398(6723):165-169.
- [14] FOULKES N S, MELLSTROM B, BENUSIGLIO E, et al. Developmental Switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator[J]. Nature, 1992, 355
-
- (上接第 299 页)
- Adenovirus-mediated suicide-gene therapy in an orthotopic murine bladder tumor model [J]. Int J Urol, 2002,9(5):261-267.
- [2] CHOU R, SELPH S S, BUCKLEY D I, et al. Treatment of muscle-invasive bladder cancer: a systematic review[J]. Cancer, 2016,122(12):842-851.
- [3] RATERT N, MEYER H A, JUNG M, et al. miRNA profiling identifies candidate miRNAs for bladder cancer diagnosis and clinical outcome[J]. J Mol Diagn, 2013,15(10):695-705.
- [4] ZHOU X, ZHANG X, YANG Y, et al. Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer[J]. Med Oncol, 2014,31(10):197.
- [5] WATERS W B. Invasive bladder cancer—where do we go from here[J]? J Urol, 1996,155(6):1910-1911.
- [6] 董良超,张桂明,孙立江,等. EORTC 风险评分对非肌层浸润性膀胱癌病人预后评价[J]. 青岛大学医学院学报, 2012,48(3):211-213.
- [7] MAHER R. Genomics and epigenomics of renal cell carcinoma [J]. Semin Cancer Biol, 2013,23(1):10-17.
- [8] 袁嘉敏,毛伟敏,罗君,等. miRNA-106a 表达水平对食管鳞癌患者预后的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2013,35(8):590-594.
- [9] LI F, LIU J, LI S. MicroRNA 106b-25 cluster and gastric cancer[J]. Surg Oncol, 2013,22(2): e7-10.
- [10] DAI F, LIU T, ZHENG S, et al. MiR-106b promotes migration and invasion through enhancing EMT via downregulation of Smad7 in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016,37(11):14595-14604.
- [11] YAU W L, LAM C S, NG L, et al. Over-expression of miR-106b promotes cell migration and metastasis in hepatocellular carcinoma by activating epithelial-mesenchymal transition process[J]. PLoS One, 2013,8(3):e57882.
- [12] ZHANG G J, LI J S, ZHOU H, et al. MicroRNA-106b promotes colorectal cancer cell migration and invasion by directly targeting DLC1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015,34(6):73.
- [13] ZHOU X, ZHANG X, YANG Y, et al. Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer[J]. Med Oncol, 2014 31(10):197.
- [14] ZHAO Z N, BAI J X, ZHOU Q, et al. TSA suppresses miR-106b-93-25 cluster expression through downregulation of MYC and inhibits proliferation and induces apoptosis in human EMC [J]. PLoS One, 2012,7(9):e45133.
- [15] POLISENO L, SALMENA L, RICCARDI L, et al. Identification of the miR-106b-25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation[J]. Sci Signal, 2010,3(117):ra29.
- [16] YANG S, YANG H, CHEN X, et al. MicroRNA-106b in cancer-associated fibroblasts from gastric cancer promotes cell migration and invasion by targeting PTEN[J]. FEBS Lett, 2014,588(13):2162-9.
- [17] SMITH L, IWANAGA R, DRASIN J, et al. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- β signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer[J]. Oncogene, 2012,31(50):5162-5171.
- [18] 戴芳,刘涛,郑树涛,等. MiR-106b 对食管癌 KYSE150 细胞的生长及细胞上皮间质转化的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2015,38(12):1466-1470.

(6355):80-84.

- [15] SASSONE-CORSI P. Regulating the balance between differentiation and apoptosis: role of CREM in the male germ cells[J]. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 1999, 76(12):811-817.
- [16] SMITH L B. Nonclassical testosterone signaling: anew pathway controlling spermatogenesis[J]. Biology of Reproduction, 2016,94(2):43-48.
- [17] CHUNG J J, SHIM S H, EVERLEY R A, et al. Structurally distinct Ca(2+) signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility[J]. Cell, 2014,157(4):808-822.
- [18] SINGH A P, RAJENDER S. CatSper channel, sperm function and male fertility[J]. Reproductive biomedicine online, 2015, 30(1):28-38.
- [19] DAVIS F M, GOULDING E H, D'AGOSTIN D M, et al. Male infertility in mice lacking the store-operated Ca(2+) channel orai1[J]. Cell Calcium, 2016,59(4):189-197.
- [20] MATAROCHA M, ALVARADOCUEVAS E, HERNANDEZ-SANCHEZ J, et al. Molecular cloning and analysis of the Catsper1 gene promoter[J]. Molecular Human Reproduction, 2013,19(5):336-347.

(本文编辑 黄建乡)

- carcinoma by activating epithelial-mesenchymal transition process[J]. PLoS One, 2013,8(3):e57882.
- [12] ZHANG G J, LI J S, ZHOU H, et al. MicroRNA-106b promotes colorectal cancer cell migration and invasion by directly targeting DLC1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015,34(6):73.
- [13] ZHOU X, ZHANG X, YANG Y, et al. Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer[J]. Med Oncol, 2014 31(10):197.
- [14] ZHAO Z N, BAI J X, ZHOU Q, et al. TSA suppresses miR-106b-93-25 cluster expression through downregulation of MYC and inhibits proliferation and induces apoptosis in human EMC [J]. PLoS One, 2012,7(9):e45133.
- [15] POLISENO L, SALMENA L, RICCARDI L, et al. Identification of the miR-106b-25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation[J]. Sci Signal, 2010,3(117):ra29.
- [16] YANG S, YANG H, CHEN X, et al. MicroRNA-106b in cancer-associated fibroblasts from gastric cancer promotes cell migration and invasion by targeting PTEN[J]. FEBS Lett, 2014,588(13):2162-9.
- [17] SMITH L, IWANAGA R, DRASIN J, et al. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- β signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer[J]. Oncogene, 2012,31(50):5162-5171.
- [18] 戴芳,刘涛,郑树涛,等. MiR-106b 对食管癌 KYSE150 细胞的生长及细胞上皮间质转化的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2015,38(12):1466-1470.

(本文编辑 厉建强)