

淫羊藿苷激活 Nrf2 信号通路保护 D-半乳糖诱导 损伤小鼠睾丸支持细胞 15P-1 作用初探

杨思琪, 张长城, 马琼艳, 尤旭, 杨圆, 张艳, 袁丁, 赵海霞*

三峡大学医学院, 宜昌 443002

摘要:从 Nrf2 信号通路探讨淫羊藿苷 (icariin, ICA) 对 D-半乳糖 (D-galactose, D-Gal) 诱导的小鼠睾丸支持细胞株 15P-1 细胞损伤的保护作用。将 15P-1 细胞分为对照组 (control)、150 mM D-Gal 处理组、D-Gal + ICA (0.5 μ M) 组和 D-Gal + ICA (1.0 μ M) 组。RT-PCR 法和 Western blot 法检测 15P-1 细胞分泌的相关因子 GDNF、BMP4 和 SCF mRNA 和蛋白的表达水平。Western blot 法检测 15P-1 细胞紧密连接相关蛋白 Occludin 和 Claudin-1、Nrf2 信号通路相关蛋白 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的蛋白表达水平。免疫荧光法检测 Nrf2 表达及定位。与对照组相比, D-Gal 处理组 15P-1 细胞分泌的相关因子 GDNF、BMP4 和 SCF 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降, 而给予 ICA 后均显著升高。此外, 与对照组相比, D-Gal 处理组 15P-1 细胞 Occludin、Claudin-1、Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的蛋白表达水平均显著下降, 而 ICA 可显著上调上述相关蛋白的表达。免疫荧光结果进一步显示, ICA 可上调 15P-1 细胞核内 Nrf2 蛋白表达。ICA 可减轻 D-Gal 诱导的 15P-1 细胞损伤, 并改善其功能, 其机制可能与上调 Nrf2 信号通路相关蛋白有关。

关键词:淫羊藿苷; 15P-1 细胞; Nrf2 信号通路

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)4-0577-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.4.006

Protective effect of icariin on D-galactose induced 15P-1 cells injury via Nrf2 signaling pathway

YANG Si-qi, ZHANG Chang-cheng, MA Qiong-yan,
YOU Xu, YANG Yuan, ZHANG Yan, YUAN Ding, ZHAO Hai-xia*

Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: To study the protective effect of icariin (ICA) on D-galactose (D-Gal) induced 15P-1 Sertoli cells injury via the Nrf2 signaling pathway. 15P-1 cells were divided into control group, 150 mM D-Gal group, D-Gal + ICA (0.5 μ M) group and D-Gal + ICA (1.0 μ M) group. The mRNA and protein expression levels of GDNF, BMP4 and SCF in 15P-1 cells were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. The expression levels of tight junction related proteins Occludin and Claudin-1, Nrf2 signaling pathway proteins including Nrf2, HO-1 and NQO-1 in 15P-1 cells were detected by Western blot. The expression and localization of Nrf2 were detected by immunofluorescence. The mRNA and protein expression levels of GDNF, BMP4 and SCF in 15P-1 cells in D-Gal stimulated group were significantly decreased compared with the control group. On the contrary, ICA significantly increased the mRNA and protein expression levels of GDNF, BMP4 and SCF. In addition, the protein expression levels of Occludin, Claudin-1, Nrf2, HO-1, and NQO-1 in 15P-1 cells in D-Gal group were significantly decreased compared with the control group, while icariin significantly up-regulated the above related protein expression. The results of immunofluorescence further showed that ICA up-regulated the expression of Nrf2 in the nucleus of 15P-1 cells. ICA can alleviate the injury of 15P-1 Sertoli cells induced by D-Gal and improve its function, and its mechanism may be related to upregulation of Nrf2 signaling pathway proteins.

Key words: icariin; 15P-1 cells; Nrf2 signaling pathway

收稿日期: 2020-05-06 接受日期: 2021-02-01

基金项目: 国家自然科学基金 (81873077, 81774316, 81573931, 815 03334)

* 通信作者 E-mail: zhaohaixia.mm@163.com

随着经济社会的不断发展及人们生存压力的不断提高,不孕不育已成为一个全球性问题。研究发现,全世界约有 15% 的夫妇患有不育症,其中男性因素约占 50%,而其机制尚不十分清楚^[1]。睾丸支持细胞作为唯一与生精细胞相连的体细胞,在结构上包绕精原干细胞、精原细胞及各级生精细胞,通过多种紧密连接蛋白如闭合蛋白(Occludin)和密封蛋白-1(Claudin-1)等形成血睾屏障^[2]。研究显示,睾丸支持细胞分泌各种生长因子如胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、骨形成蛋白 4(bone morphogenetic protein-4, BMP4)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)等,调控精原干细胞增殖分化,促进精子形成^[3]。另有研究发现,妊娠期暴露于六价铬的雄性大鼠成年后支持细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 表达下调,导致生精细胞凋亡增多,精子生成障碍^[4]。在热应激刺激下,牛睾丸支持细胞发生损伤, GDNF、SCF mRNA 水平下调,致使精子发生障碍。因此,改善支持细胞结构和功能可能是治疗男性不育症的新方向。

淫羊藿是我国传统补益中药,始载于《神农本草经》,具有补肾阳,强筋骨,祛风湿的功效。现代药理研究显示淫羊藿具有显著的延缓衰老和增强雄性生殖功能的作用,其主要活性成分为淫羊藿苷(icariin, ICA)。研究发现,ICA 可促进大鼠原代 Sertoli 细胞的增殖,增强雄性大鼠 Sertoli 细胞的功能^[5]。研究显示,ICA 可通过升高支持细胞卵泡刺激素受体和紧密连接蛋白 Claudin-11 mRNA 表达水平,提高睾丸组织的抗氧化应激能力,从而增强大鼠生殖功能^[6]。核因子红细胞相关因子 2(nuclear factor erythroid like 2, Nrf2)作为机体细胞防御系统的主要管理者,通过与抗氧化反应原件(antioxidant response element, ARE)的基因启动子调控区域中的增强子序列结合,调节一系列编码抗氧化蛋白和氧化应激反应蛋白等基因的表达,协调对各种应激条件和有害攻击的微调反应,实现细胞微环境稳态^[7,8]。研究发现,淫羊藿可通过激活 Nrf2 减轻氧化应激介导的肝损伤^[9]。本课题组前期研究发现,ICA 可通过上调 Nrf2 减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤。ICA 可上调 D-Gal 诱导小鼠睾丸支持细胞株 TM4 细胞紧密连接相关蛋白 Occludin 和 Claudin-1 的蛋白表达。然而,ICA 能否通过 Nrf2 信号通路改善 D-Gal 导致的 15P-1 细胞损伤,目前

尚未见研究报道。前期研究显示, D-Gal 可以诱导的小鼠睾丸支持细胞株 TM4 细胞紧密连接损伤。因此,本实验以 D-半乳糖(D-galactose, D-Gal)诱导的 15P-1 细胞为损伤模型,从 Nrf2 信号通路探讨 ICA 对支持细胞损伤的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞株

小鼠睾丸支持细胞株 15P-1 细胞购自上海通派生物细胞库。

1.1.2 药物及试剂

DMEM、0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);胎牛血清(Science Cell 公司);D-Gal(Sigma 公司);ICA 单体(成都植标化纯生物技术有限公司),纯度 98.61%。总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(大连宝生物科技有限公司);PCR 扩增试剂(Thermo Scientific 公司);PCR 相关引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;ECL 显影液(碧云天生物技术研究); β -actin(4970L,美国 Cell Signaling Technology 公司);醌氧化还原酶-1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase-1, NQO-1](GB11282)、血红素氧化酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)(10701-1-AP)(武汉谷歌生物科技有限公司);GDNF(ab18956)、BMP4(ab39973)、Nrf2(ab31163)(美国 Abcam 公司);SCF(sc-13126)、Occludin(sc-5562)、Claudin-1(sc-166338)(美国 Santa Cruze 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔二抗(武汉科瑞有限公司)。

1.1.3 主要仪器

CKX41 型光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司);FORMA series II 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);SW-4T-2F 型超净工作台(上海博讯实业公司医疗设备厂);TD25-WS 型台式低速离心机(湖南省湘仪仪器有限公司);Centrifuge 5424 R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);HVA-85 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司);NANODROP 200 型核酸蛋白检测仪(美国 Thermo Scientific 公司);StepOne Plus 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司);Gellogic 212 型凝胶成像分析系统(美国 Kodak 公司);Power Pac TM Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Bioshine Chemic Q 4800 化学发光凝胶成像自动显影仪(上海欧翔科学仪器有限公司);A1R + 激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 15P-1 细胞培养

复苏 15P-1 细胞,用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养,取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 15P-1 细胞分组及处理

前期我们采用 100 和 150 mM D-Gal 刺激 15P-1 细胞,Western blot 及半定量 PCR 检测相关指标,进行模型条件的摸索,根据前期预实验结果,我们选择 150 mM D-Gal 进行后续实验。15P-1 细胞按每孔 5 × 10⁴ 个/mL 接种至六孔板中,分为对照组、D-Gal 处理组、D-Gal + ICA (0.5 μM) 组和 D-Gal + ICA (1.0 μM) 组。待细胞完全贴壁后,弃去培养基。Control 组更换新鲜培养基,D-Gal 处理组加入 150 mM 的含 D-Gal 的培养基,D-Gal + ICA (0.5 μM) 组加入含 150 mM 的 D-Gal 及 0.5 μM ICA 的培养基,D-Gal + ICA (1.0 μM) 组加入含 150 mM 的 D-Gal 及 1.0 μM ICA 的培养基刺激 48 h。

1.2.3 MTT 法筛选 ICA 适用浓度

将 15P-1 细胞按 5 × 10⁴ 个/mL 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL。待细胞长出形态后,设置调零组、正常对照组(细胞 + 培养基)、D-Gal 组、D-Gal + DMSO 对照组、D-Gal + ICA 组,每组 5 个复孔,给予不同浓度(0.125、0.25、0.5、1、2、4 和 8 μM) ICA

预保护 20 h 后,吸去原培养基,正常对照组加入新配制的培养基,D-Gal 处理组加入终浓度为 150 mM D-Gal 的新配制的培养基,D-Gal + ICA 组加入终浓度为 150 mM D-Gal 及 ICA 终浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2、4 和 8 μM 的新配制的培养基,刺激 48 h 后在每孔中加入终浓度为 0.5 g/L MTT(5 g/L,PBS 配制) 20 μL,继续避光培养 4 h 后去掉上清液,每孔加入 150 μL DMSO 后放在摇床上摇 10 min 后于酶标仪 570 nm 处测出 OD 值。最后通过细胞活力的计算公式:细胞活力 = $[A_{\text{加药组}} - A_{\text{调零组}}] / [A_{\text{正常对照组}} - A_{\text{调零组}}] \times 100\%$,计算出各组的细胞的活力。

1.2.4 RT-PCR 检测 15P-1 细胞相关因子 GDNF、BMP4 和 SCF mRNA 表达水平

将六孔板从培养箱中取出,吸除上清,每孔加入 1 mL PBS 洗涤细胞后,每组加入 1 mL Trizol 裂解液,提取总 RNA。检测其完整性,核酸仪测定其浓度,按逆转录试剂盒说明进行逆转录得 cDNA,PCR 反应体系为:12.5 μL 2 × PCR Master mix,10.5 μL ddH₂O,分别加入 0.5 μL GDNF、BMP4 和 SCF 上下游引物,最后加入 1 μL cDNA 模板,引物序列见表 1。RT-PCR 反应条件:①变性:94 °C 30 s;②退火:57 °C 30 s;③延伸:72 °C 30 s;共 30 个循环。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,利用凝胶成像仪拍照,用 Image J 软件扫描条带的吸光度(A)。

表 1 引物序列表

Table 1 Sequences of primers

基因 Gene	上游引物 Forward primer(5'→3')	下游引物 Reverse primer(5'→3')
BMP4	ATTCCTGGTAACCGAATGCTG	ATTCCTGGTAACCGAATGCTG
GDNF	CGAACTCGTGCCCTAACC	AGACCCCGAGCTGGACATTA
SCF	GTCCCGAGAAAGATTCCAGAGTC	TTACAAGCGAAATGAGAGCCG
β-actin	TGACCGACCGTGCTTCTG	CAGGGAGGAAGAGGATGCG

1.2.5 Western blot 法检测 15P-1 细胞功能相关蛋白 GDNF、BMP4、SCF、Occludin 和 Claudin-1 及 Nrf2 信号通路相关蛋白 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平

将六孔板从培养箱中取出,吸除上清,每孔加入 1 mL PBS 洗涤细胞后,收集细胞。在收集好的各组细胞中加入 100 μL 裂解液,涡旋仪上剧烈振荡 30 s,冰盒中静置 15 min,共震荡 3 次,使细胞充分裂解。经 4 °C、12 000 rpm 离心 10 min 后取上清,采用

BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,定量后的蛋白样品加入上样缓冲液,于 100 °C 水浴变性 10 min。将蛋白样品进行电泳并转印至 PVDF 膜,PVDF 膜放置于 50 g/L 脱脂牛奶封闭液中室温封闭 1 h,分别加入鼠抗 Claudin-1 (1:1 000)、兔抗 Occludin (1:2 000)、兔抗 GDNF 抗体 (1:1 000)、兔抗 BMP4 抗体 (1:1 000)、鼠抗 SCF 抗体 (1:1 000)、兔抗 Nrf2 抗体 (1:1 000)、鼠抗 NQO-1 抗体 (1:500)、兔抗 HO-1 抗体 (1:1 000)、兔抗 β-actin 抗体 (1:5 000),4 °C

冰箱摇床孵育过夜;次日,TBST洗膜,加HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:5 000)或HRP标记的山羊抗兔二抗(1:3 000),室温孵育1 h;TBST洗膜。ECL化学发光于凝胶成像系统中显影成像,用Image J软件对结果进行灰度扫描分析。

1.2.6 免疫荧光检测 Nr2 表达及定位

将无菌圆形盖玻片放入24孔板中,无菌PBS洗净玻片上残留的酒精,将GC-1细胞悬液接种到无菌玻片上。待GC-1细胞长出形态后,按照“1.2.3”处理细胞后弃掉上清,PBS洗涤细胞,每5 min更换一次PBS,共洗涤20 min。洗涤完成后,4%的多聚甲醛固定细胞30 min后PBS洗涤细胞,每5 min更换一次PBS,共洗涤20 min。后经0.1% Triton X-100打孔15 min,PBS洗涤细胞,每5 min更换一次PBS,共洗涤20 min。1% BSA于温度为25℃下封闭1 h,弃掉封闭液后,置于4℃冰箱孵育一抗。一抗孵育完成后,25℃复温30 min以上,PBS洗涤细胞,期间每5 min更换一次PBS。于37℃的温度下避光孵育荧光二抗1 h,用PBS洗涤细胞后,避光孵育DAPI(0.5 μg/mL)5 min,PBS洗涤后封片,共聚焦荧光显微镜下观察取图。

1.2.7 数据处理及统计分析

实验数据均采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数之间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA对15P-1细胞活力的影响

用不同浓度ICA处理15P-1细胞后,MTT法检测细胞活力,结果如图1所示,当ICA浓度在2.5

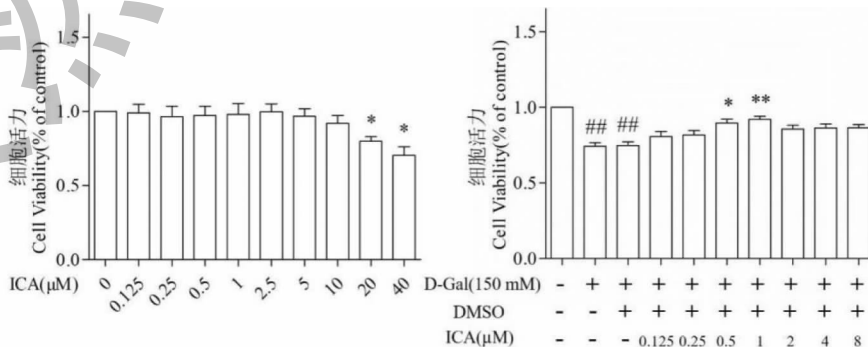


图1 ICA对15P-1细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of ICA on the viability of 15P-1 cells

注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与D-Gal处理组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with control group,## $P < 0.01$;Compared with D-Gal treatment group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

μM以下时,对正常细胞无明显影响;将15P-1细胞分为对照组、150 mM D-Gal处理组、150 mM D-Gal + DMSO处理组、150 mM D-Gal加不同浓度ICA(0.125、0.25、0.5、1、2、4和8 μM)处理组,用MTT法检测细胞活力。与D-Gal处理组相比,ICA浓度为0.5和1 μM时,对15P-1细胞活力有明显的保护作用,因此后续我们选择ICA用药浓度为0.5和1 μM研究D-Gal诱导15P-1细胞损伤的保护作用。

2.2 ICA对15P-1细胞形态的影响

光镜结果显示,与对照组相比,D-Gal处理组中,15P-1细胞数量明显减少,部分细胞形态不规则,而ICA干预后明显改善(见图2)。

2.3 ICA对15P-1细胞相关因子GDNF、BMP4和SCF mRNA水平的影响

RT-PCR结果显示,与对照组相比,D-Gal处理组GDNF、BMP4和SCF mRNA水平均显著下调,提示D-Gal处理后,15P-1细胞功能下降,而给予ICA干预后,GDNF、BMP4和SCF的mRNA水平均显著上升(见图3)。

2.4 ICA对15P-1细胞相关因子GDNF、BMP4和SCF蛋白表达水平的影响

结果如图4所示,与对照组相比,D-Gal处理组15P-1细胞因子GDNF、BMP4和SCF蛋白水平均显著下调,而ICA干预后可显著升高GDNF、BMP4和SCF蛋白水平,提示ICA可以改善D-gal所致15P-1细胞功能下降。

2.5 ICA对15P-1细胞紧密连接相关蛋白Occludin和Claudin-1蛋白表达水平的影响

与Control组比较,D-Gal可诱导15P-1细胞Occludin和Claudin-1蛋白水平的显著下调,而ICA则

可显著上调 Occludin 和 Claudin-1 蛋白水平,提示 ICA 对 D-Gal 所致 15P-1 细胞紧密连接损伤有明显的改善作用,结果见图 5。

2.6 ICA 对 15P-1 细胞 Nrf2 信号通路相关蛋白 Nrf2、NQO-1 和 HO-1 蛋白表达水平的影响

Western blot 结果显示,与正常对照组相比,D-Gal 处理组 15P-1 细胞 Nrf2 信号通路相关蛋白 Nrf2、NQO-1 和 HO-1 蛋白表达水平显著降低,而

ICA 干预后,15P-1 细胞 Nrf2 信号通路相关蛋白 Nrf2、NQO-1 和 HO-1 蛋白表达水平均显著上升(见图 6)。

2.7 ICA 对 15P-1 细胞中 Nrf2 表达及定位的影响

结果如图 7 所示,与对照组相比,D-Gal 处理组细胞核内 Nrf2 蛋白表达水平明显降低,而给予 ICA 干预后,胞核内 Nrf2 蛋白表达水平明显上升。

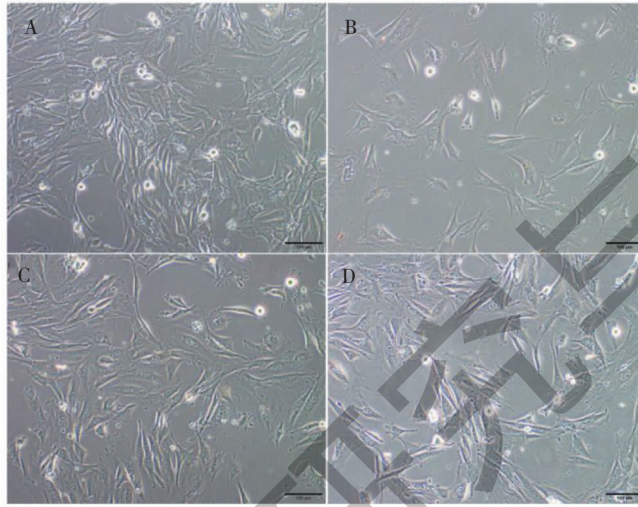


图 2 ICA 对 15P-1 细胞形态的影响(400 ×)

Fig. 2 Effect of ICA on the morphology of 15P-1 cells (400 ×)

注:A:正常对照组;B:150 mM D-Gal 处理组;C:150 mM D-Gal + 0.5 μM ICA 处理组;D:150 mM D-Gal + 1 μM ICA 处理组。Note:A:Normal control group;B:150 mM D-Gal treatment group;C:150 mM D-Gal + 0.5 μM ICA treatment group;D:150 mM D-Gal + 1 μM ICA treatment group.

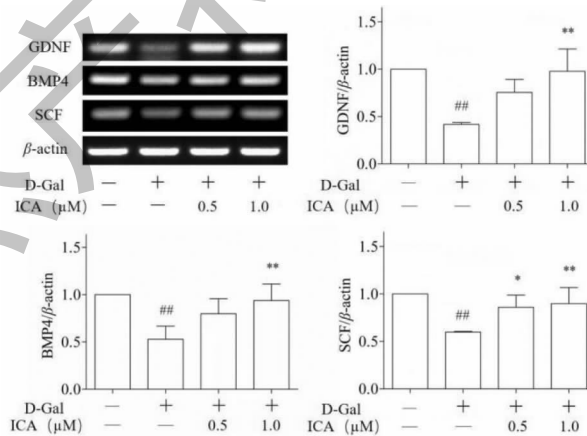


图 3 ICA 对 15P-1 细胞相关因子 GDNF、BMP4 和 SCF mRNA 水平的影响

Fig. 3 Effect of ICA on the levels of 15P-1 cell-related factors GDNF, BMP4 and SCF mRNA

注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与 D-Gal 处理组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。Note:Compared with control group,^{##} $P < 0.01$;Compared with D-Gal treatment group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3 讨论

近年来,不育已被 WHO 确认为一个公共卫生

问题,在普通人群中发病率逐年增高,影响了全球约 15% 的育龄期夫妇^[1]。调查研究显示,在美国以及

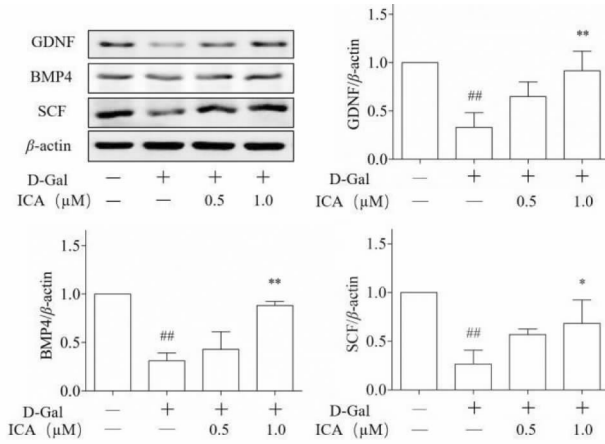


图4 ICA对15P-1细胞相关因子GDNF、BMP4和SCF蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of ICA on protein expression of GDNF, BMP4 and SCF in 15P-1 cells

注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与D-Gal处理组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group,^{##} $P < 0.01$; Compared with D-Gal treatment group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

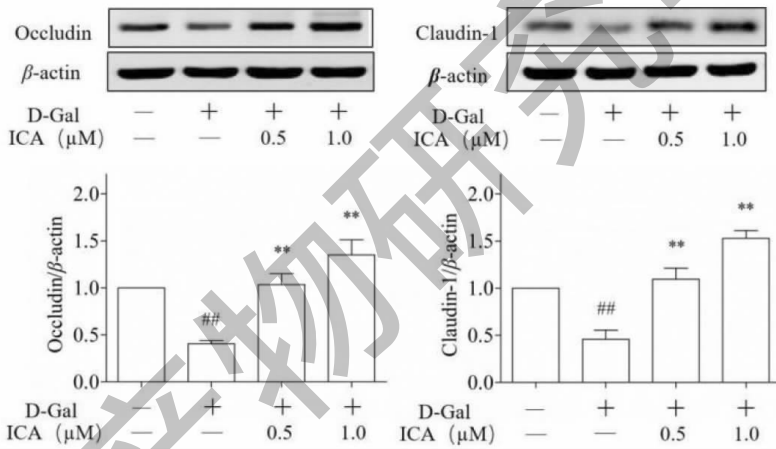


图5 ICA对15P-1细胞紧密连接相关蛋白Occludin和Claudin-1蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effect of ICA on the expression of tight junction associated proteins Occludin and Claudin-1 in 15P-1 cells

注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与D-Gal处理组比较,^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group,^{##} $P < 0.01$; Compared with D-Gal treatment group,^{**} $P < 0.01$ 。

其他西方国家中,精子数量每年减少1.5%,据估计,全球近7000万对夫妇已成为不育症或不育症的受害者^[10]。在WHO进行的一项大型流行病学调查发现,约有一半的夫妇不育是由男性因素造成的,而其机制尚不十分清楚^[11]。

研究发现,D-Gal可使小鼠支持细胞系TM4细胞数量减少,细胞功能下降^[12]。因此,我们选择D-Gal模型来评估ICA是否能减轻15P-1细胞损伤。有文献报道,35、70、140 μM ICA处理血管内皮细胞ECV-304后,细胞抑制率为1.2%,无明显细胞毒性。本实验MTT结果显示,与对照组相比,ICA单

独处理15P-1细胞时,浓度为40 μM时IC₅₀大于50%,提示ICA无明显细胞毒性。本课题组前期研究发现,ICA对D-Gal处理TM4细胞损伤有保护作用,且在0.5和1 μM浓度下有明显促增殖作用^[13]。而本实验MTT结果也显示,与D-Gal处理组相比,ICA在0.125~1 μM以浓度依赖方式增加细胞存活率,在0.5和1 μM浓度下有明显促细胞增殖作用,ICA浓度大于1 μM时促增殖作用较前减弱,可能是由于本实验中D-Gal刺激15P-1细胞时间较长,细胞损伤较重,损伤的细胞对药物刺激的敏感性大大增加,从而表现出低浓度促进,高浓度抑制的现象。

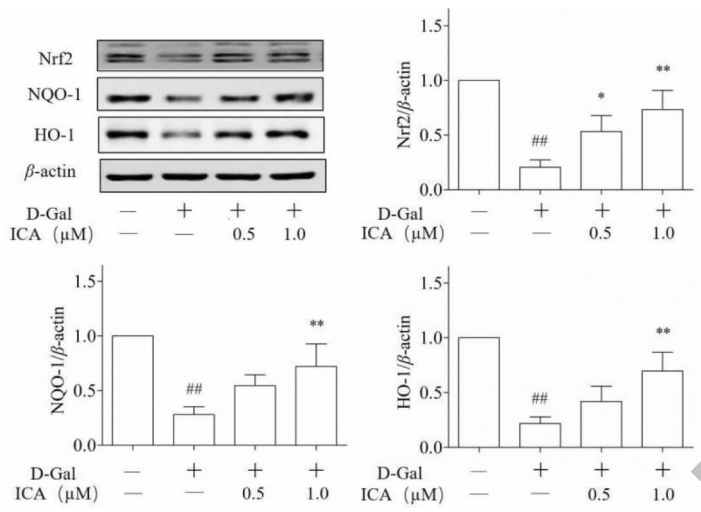


图6 ICA对Nrf2信号通路相关蛋白Nrf2、HO-1和NQO-1的蛋白表达水平的影响

Fig. 6 Effect of ICA on protein expression of Nrf2 signaling pathway related proteins Nrf2, HO-1 and NQO-1

注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与D-Gal处理组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group,## $P < 0.01$; Compared with D-Gal treatment group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

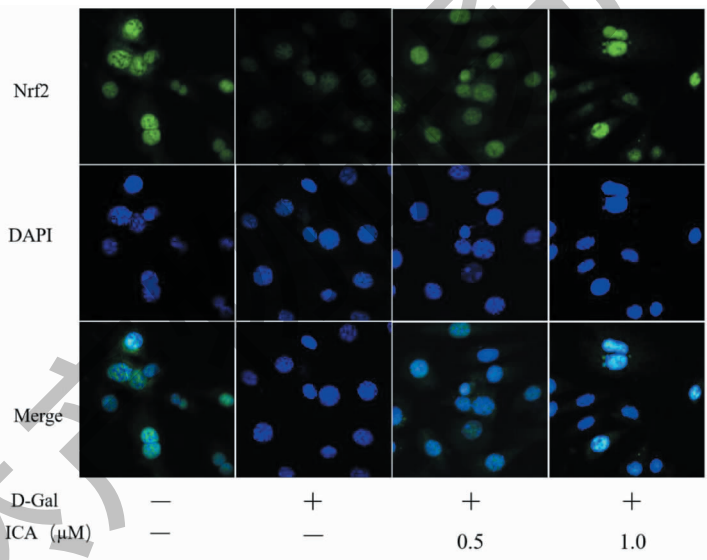


图7 ICA对15P-1细胞中Nrf2表达及定位的影响

Fig. 7 Effect of ICA on the expression and localization of Nrf2 in 15P-1 cells

睾丸支持细胞是定位于睾丸生精小管内与生精细胞直接相连的体细胞,通过分泌多种细胞因子如GDNF、BMP4及SCF等,调节精原干细胞的增殖分化,促进精子形成。GDNF是转化生长因子β超家族的一员,是调节精原干细胞增殖的重要因子,在雄性动物生殖细胞发育和睾丸早期发育中发挥重要作用。BMP4和SCF是促进精原干细胞分化的重要因子^[14]。本课题组前期研究显示,淫羊藿总黄酮可上调自然衰老大鼠睾丸支持细胞分泌因子GDNF、

BMP4及SCF mRNA和蛋白水平,改善支持细胞分泌功能^[15]。结果显示,与对照组相比,D-Gal处理后支持细胞分泌因子mRNA及蛋白表达水平均显著下降,而给予ICA后15P-1支持细胞分泌因子mRNA及蛋白表达水平均显著上调。提示ICA能改善15P-1睾丸支持细胞的分泌功能。

支持细胞间紧密连接是血睾屏障最重要的组成部分,主要包括Occludin、Claudin、黏附蛋白三个跨膜蛋白家族及闭锁连接胞浆蛋白家族^[16],细胞间紧

密连接不仅可以保护生殖细胞不受免疫系统的侵害,给精子发生提供一个良好的生理环境,而且还允许前细线期精母细胞和后细线期精母细胞规律的通过血睾屏障,以便进一步发育^[17]。研究发现,Occludin 和 Claudin 是最早被鉴定的紧密连接整膜蛋白^[18],而紧密连接能力和上皮屏障功能主要由 Claudins 介导。另有研究显示,在大鼠睾丸内注射合成的 Occludin 肽,可在 27 天后可逆的消融大部分精原细胞,而在体外敲除 Occludin 也会导致支持细胞紧密连接功能下降^[19]。本实验结果显示,与对照组相比,D-Gal 处理后 15P-1 细胞的紧密连接蛋白表达下降,而给予 ICA 后 15P-1 支持细胞紧密连接蛋白表达显著上调。提示 ICA 对 15P-1 支持细胞紧密连接蛋白损伤有保护作用。

机体处于正常状态下,Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)募集 Nrf2,在细胞质中形成一种复合物经泛素蛋白酶降解;当发生氧化应激时 Nrf2 与 Keap1 解离,Nrf2 由胞质转移至胞核结合 ARE,激活下游 HO-1 和 NQO1 等大量保护性基因的转录,进而抵抗各种刺激对机体产生的氧化应激损伤^[20]。本课题组前期研究显示,ICA 可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,减轻自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤,改善衰老所致的生殖功能衰退,提示 ICA 改善生精功能障碍可能与 Nrf2 信号通路有关。前期研究显示,ICA 可改善 D-Gal 诱导的睾丸支持细胞株 TM4 细胞损伤。因此,本研究采用 Western blot 法检测 Nrf2 通路蛋白,研究结果显示,与对照组相比,D-Gal 刺激后 15P-1 细胞内 Nrf2 通路重要蛋白 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的表达水平均显著下调,而给予 ICA 后均显著上升。随后我们采用免疫荧光技术进一步检测了 Nrf2 的表达及定位,与正常对照组相比,D-Gal 处理组 15P-1 细胞中胞核内 Nrf2 荧光表达减弱,而给予 ICA 后有所改善。以上结果提示,15P-1 细胞功能和结构损伤与 Nrf2 信号通路下调进而导致细胞抗氧化能力下降有关,而 ICA 可能通过提高 15P-1 细胞抗氧化能力进而改善其损伤。

综上所述,ICA 可以通过激活 Nrf2 信号通路,上调 15P-1 细胞分泌相关蛋白 GDNF、BMP4 和 SCF 及紧密连接相关蛋白 Occludin 和 Claudin-1 的表达水平,进而改善 D-Gal 诱导的 15P-1 细胞损伤。本实验为我们后续研究 ICA 对生殖细胞的保护作用及其机制奠定了一定的理论基础,以期更好的发掘

中草药淫羊藿在生殖系统中的应用价值,同时为临床上治疗男性不育症提供了新的方向。

参考文献

- Dutta S, Biswas A, Sengupta P. Obesity, endocrine disruption and male infertility [J]. Asian Pac J Reprod, 2019, 8 (5): 195.
- Li M, Mruk D, Lee W, et al. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation [J]. Cytokine Growth F R, 2009, 20:329-338.
- Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013, 29(1):163-187.
- Kumar K, Aruldas M, Banu S, et al. Male reproductive toxicity of CrVI: in-utero exposure to CrVI at the critical window of testis differentiation represses the expression of Sertoli cell tight junction proteins and hormone receptors in adult F1 progeny rats [J]. Reprod Toxicol, 2017, 69:84-98.
- Nan Y, Zhang X, Yang G, et al. Icariin stimulates the proliferation of rat Sertoli cells in an ERK1/2-dependent manner *in vitro* [J]. Andrologia, 2014, 46(1):9-16.
- Boivin J, Bunting L, Collins J, et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care [J]. Hum Reprod, 2007, 22:1506-1512.
- Keleku-Lukwete N, Suzuki M, Yamamoto M. An overview of the advantages of KEAP1-NRF2 system activation during inflammatory disease treatment [J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29:1746-1755.
- Tonelli C, Chio I, Tuveson D. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29:1727-1745.
- Jung J, Park S, Ko H, et al. *Epimedium koreanum* ameliorates oxidative stress-mediated liver injury by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2 [J]. Am J Chin Med, 2018, 46:469-488.
- Sengupta P, Dutta S, Krajewska-Kulak E. The disappearing sperms: analysis of reports published between 1980 and 2015 [J]. Am J Mens Health, 2017, 11:1279-1304.
- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology [J]. Clin Biochem, 2018, 62:2-10.
- Chen, Q, Zhao H, Ma N, et al. Decline of secretory function of TM4 Sertoli cells stimulated by D-galactose in mice and its mechanism [J]. Chin J Cell Mol Immunol (细胞分子与免疫学), 2018, 34:327-333.