

白藜芦醇介导 AMPK/mTOR 信号通路调控线粒体自噬缓解小鼠精原细胞氧化应激损伤和凋亡

石拴霞^{1,2}, 王纪田², 宋诚², 魏璐晓³, 甄雪蓉³, 黄冰雪³, 阎一鑫^{1*}, 王玲^{1*} (1. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院生殖医学中心, 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000; 3. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院, 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 兰州 730050)

摘要:目的 观察白藜芦醇(resveratrol, RES)是否通过腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(amp-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin, AMPK/mTOR)信号通路调控线粒体自噬缓解小鼠精原细胞(Gc-1 spg)氧化应激损伤。**方法** 设置空白对照组(Control)、过氧化氢组(H₂O₂)、H₂O₂ + RES组、H₂O₂ + RES + AMPK抑制剂(Compound C, CC)组,各组给予相应处理后。CCK-8检测细胞活力,试剂盒检测过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物(glutathione peroxidase, GSH-PX)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP) SOD、MDA、GSH-PX、LDH和ATP水平,JC-1检测线粒体膜电位,MitoTracker[®] Green FM检测活细胞线粒体形态,Hoechst 33342染色检测细胞核凋亡率,透射电镜观察细胞超微结构及线粒体自噬变化,Western blot检测凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-2关联X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、B细胞淋巴瘤-2蛋白(B-cell lymphoma 2 protein, Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cysteine-specific proteinase, Caspase-3),自噬蛋白微管相关蛋白轻链3(light chain 3, LC3)、P62,通路相关蛋白AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR表达水平。**结果** H₂O₂促进Gc-1 spg细胞氧化应激损伤,激活AMPK/mTOR信号通路和线粒体自噬,提高p-AMPK/AMPK和LC3表达并降低p-mTOR/mTOR和P62表达;RES能缓解Gc-1 spg细胞氧化应激损伤,进一步提高p-AMPK/AMPK和LC3表达,降低p-mTOR/mTOR和P62表达,促进Gc-1 spg细胞线粒体自噬;AMPK抑制剂能逆转RES对Gc-1 spg细胞氧化应激损伤的保护作用,抑制SOD和GSH-PX活性并增加MDA和LDH水平,降低细胞线粒体膜电位,增加线粒体损伤,破坏细胞核,增加Bax、Caspase-3和P62表达水平并降低Bcl-2和LC3表达水平,增加细胞凋亡率,降低线粒体自噬。**结论** RES可能通过AMPK/mTOR信号通路促进Gc-1 spg细胞线粒体自噬缓解线粒体氧化应激损伤和细胞凋亡。

关键词: 白藜芦醇;过氧化氢;小鼠精原细胞;腺苷酸活化蛋白激酶;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;线粒体自噬;凋亡

doi:10.11669/cpj.2024.05.006 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)05-0416-09

Investigation on Resveratrol Regulating Mitophagy to Alleviate Oxidative Stress Injury and Apoptosis of Gc-1 spg Cells via AMPK/mTOR Signaling Pathway

SHI Shuanxia^{1,2}, WANG Jitian², SONG Cheng², WEI Luxiao³, ZHEN Xuerong³, HUANG Bingxue³, YAN Yixin^{1*}, WANG Ling^{1*} (1. Reproductive Medicine Centre, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China; 2. School of Clinical Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drugs, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe whether resveratrol can alleviate oxidative stress injury of mouse spermatogonium by regulating mitochondrial autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway. **METHODS** Control group, H₂O₂ group, H₂O₂ + RES group, and H₂O₂ + RES + Compound C (AMPK inhibitor) group were set up, and each group was given the appropriate treatment. Cell viability was detected by CCK-8, SOD, MDA, GSH-PX, LDH and ATP levels were determined by kits, mitochondrial membrane potential was measured by JC-1, MitoTracker[®] Green FM was used to detect the morphology of live cell mitochondria, Hoechst 33342 staining was used to detect the rate of nuclear apoptosis, cell ultrastructure and mitochondrial autophagy changes were observed by transmission electron microscopy, and Western blotting was used to detect the expression levels of apoptotic proteins Bax, Bcl-2, Caspase-3, autophagy proteins LC3, P62, and pathway-related proteins AMPK, p-AMPK, mTOR, and p-mTOR. **RESULTS** H₂O₂ promoted oxidative stress damage in Gc-1 spg cells, activated the AMPK/mTOR signaling pathway and mitochondrial autophagy,

基金项目: 甘肃省青年科技基金计划资助(21JR1RA188);甘肃省青年科技基金计划资助(21JR11RA013)

作者简介: 石拴霞,女,硕士研究生 研究方向:生殖医学 *通讯作者:王玲,女,博士,副教授,主任医师 研究方向:生殖医学;阎一鑫,男,硕士,主管技师 研究方向:男性不育研究 Tel:(0931)995191

increased the expressions of p-AMPK/AMPK and LC3, and decreased the expressions of p-mTOR/mTOR and P62. RES could alleviate oxidative stress damage in Gc-1 spg cells, further increase the expressions of p-AMPK/AMPK and LC3, reduce the expressions of p-mTOR/mTOR and P62, and promote mitochondrial autophagy in Gc-1 spg cells. AMPK inhibitor can reverse the protective effect of RES on oxidative stress injury of Gc-1 spg cells, inhibit the activities of SOD and GSH-PX and increase the levels of MDA and LDH, reduce the mitochondrial membrane potential, increase mitochondrial damage, destroy the nucleus, increase the expression levels of Bax, Caspase-3 and P62, and reduce the expression levels of Bcl-2 and LC3, increase cell apoptosis rate and reduce mitophagy.

CONCLUSION RES may promote mitochondrial autophagy and alleviate mitochondrial oxidative stress damage and apoptosis in Gc-1 spg cells through AMPK/mTOR signaling pathway.

KEY WORDS: resveratrol; hydrogen peroxide; Gc-1 spg cell; AMPK/mTOR; mitophagy; apoptosis

随着社会发展,生活压力大及外界不利环境等因素的出现,男性不育发病率逐年上升,给患者及家庭造成极大心理和生活困扰。据统计,由男性因素造成夫妻双方不育的占20%,而由男女共同因素造成的占30%^[1],由此可见,男性不育症在全球呈高发趋势。精子活力是衡量精子质量的重要标志,因此,提高精子细胞活力并改善精子质量是治疗男性不育的关键。精原细胞是精子的前体细胞,通过有丝分裂增殖分化形成前精母细胞,精母细胞进一步减数分裂形成圆形精子细胞,圆形精子细胞向成体精子细胞转化后释放进入附睾储存^[2]。由于精原细胞在精子形成中存在重要作用,因此,提高精原细胞活力、保护精原细胞免受损伤是形成良好精子的第一步,对治疗男性不育意义重大。

氧化应激(oxidative stress, OS)是过多活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积的结果,线粒体作为生殖细胞中一种重要的细胞器,也是OS反应的首要攻击目标。生殖细胞中线粒体损伤导致其结构和功能异常,影响生育率^[3]。在ROS等因素的刺激下,损伤的线粒体被特异性包裹进自噬体并与溶酶体融合,从而完成损伤线粒体的降解称为线粒体自噬^[4]。白藜芦醇(resveratrol, RES)作为一种多酚类化合物,具有显著抗炎、抗氧化、抗凋亡及改善微循环等作用^[5-6]。研究表明,RES可激活腺苷酸活化蛋白激酶(amp-activated protein kinase, AMPK)而影响哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)活性,调控线粒体自噬^[7-9],在OS导致的生殖细胞损伤中可能存在一定的保护作用。目前,RES的保护作用已在多数体内外实验中得到验证,但在男性生殖细胞中研究较少,且作用机制尚不明确。本研究采用小鼠精原细胞系(Gc-1 spg)作为研究对象,通过体外细胞实验,探索RES对过氧化氢(H₂O₂)损伤后小鼠Gc-1 spg的保护作用以及调控Gc-1 spg细胞线粒体自噬的作用机制,为临床治疗生殖细胞OS损伤和线粒体

自噬相关疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠Gc-1 spg原代细胞株(货号:CM0074)、DMEM(货号:L110KJ)(上海语纯和源培生物科技有限公司);体积分数10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 货号:FBS500-S, AusGeneX公司);RES(纯度>98%,用二甲基亚砷溶解配成1 mg·mL⁻¹母液,过滤后备用,使用前用完全高糖培养基稀释到所需浓度)(陕西嘉果肽生物工程有限公司);体积分数3% H₂O₂(上海信裕生物科技有限公司);Dorsomorphin(Compound C, CC, 货号:HY-13418A, 美国MCE生物科技公司);CCK-8细胞活性检测试剂盒(货号:C0037)、ATP检测试剂盒(货号:S0026)、线粒体膜电位(JC-1, 货号:C2006)检测试剂盒、Hoechst 33342染色试剂盒(货号:C1026)(上海碧云天生物技术有限公司);MitoTracker® Green FM线粒体绿色荧光探针试剂盒(货号:9074S)、一抗兔抗LC3(货号:12741T)(美国Cell Signaling Technology公司);超氧化物歧化酶(SOD, 货号:A001-1-2)、丙二醛(MDA, 货号:A003-1-2)、乳酸脱氢酶(LDH, 货号:A020-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, 货号:A005)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液(货号:T1300)、1%青链霉素(货号:P1400)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:PC0020)、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(货号:P1200)、蛋白酶磷酸酶抑制剂(货号:P1261)、5%BSA封闭液(货号:SW3015)(北京索莱宝生物科技有限公司);一抗兔抗Bcl-2(货号:A00040-1)、Bax(货号:A00183)、Caspase-3(货号:PB9188)多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(货号:BA1005)(博士德生物工程有限公司);内参β-tubulin(货号:A01857-1)、β-actin(货号:BA2305)和脱脂牛奶(货号:GC310001)(武汉塞维尔生物有限公

司);一抗兔抗 AMPK(货号:AF6423)、p-AMPK(货号:AF3423)、mTOR(货号:AF6308)、p-mTOR(货号:AF3308)、P62(货号:AF5384)、内参 VDAC1(货号:DF6140)多克隆抗体均(Affinity 生物有限公司);电镜固定液(货号:G1102)(武汉谷歌生物)。

1.2 仪器

CO₂细胞培养箱(美国 Thermo 公司);超净工作台(江苏苏州净化设备公司);细胞计数器(上海艾力特生物科技公司);荧光倒置相差显微镜(IX3-SVR,日本 Olympus);免疫印迹分析仪(美国 Bio-Rad 公司,1703930);全波长多功能微孔板分析系统 infinite 200 pro(瑞士 tecan 公司);超薄切片机(德国 Leica 公司,Leica UC7);钻石切片刀(瑞士 Daitome 公司,Ultra 45°);透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司,HT7700)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 Gc-1 spg 细胞培养在含体积分数 10% 胎牛血清(血红蛋白含量 < 20 mg · 100 mL⁻¹;内毒素含量 < 5 EU · mL⁻¹;总蛋白 30 ~ 50 g · L⁻¹;免疫球蛋白 G < 250 μg · mL⁻¹;无微生物存在)和质量分数 1% 青链霉素(青霉素的含量为 10 ku · mL⁻¹,链霉素的含量为 10 mg · mL⁻¹)溶液的高糖 DMEM 完全培养基中,并置于 37 °C、5% 二氧化碳的培养箱中常规培养、传代。

1.3.2 实验分组 试验时将细胞分为 4 组,空白对照组(Control 组)、H₂O₂组、H₂O₂ + RES 组、H₂O₂ + RES + CC(AMPK 抑制剂)组。H₂O₂组加入浓度为 800 μmol · L⁻¹的 H₂O₂(前期课题组确定的最佳 H₂O₂造模浓度)处理 6 h,H₂O₂ + RES 组先加入浓度为 15 μmol · L⁻¹的 RES(前期课题组确定的最佳 RES 保护浓度)预处理 24 h,再加入 H₂O₂处理 6 h,H₂O₂ + RES + CC(AMPK 抑制剂)组加入对细胞活力没有明显影响的浓度为 10 μmol · L⁻¹的 CC 提前预处理 1 h,再加 RES 处理 24 h,最后加 H₂O₂处理 6 h。关于具体 H₂O₂和 RES 浓度筛选试验参考课题组前期试验结果^[10]。

1.3.3 细胞活力检测 取对数生长期的 Gc-1 spg 细胞,质量分数 0.25% 胰酶消化 2 min,培养基终止消化后反复吹打,制成细胞悬液,使细胞数达 5 × 10³,将细胞均匀接种于 96 孔板,每孔 100 μL,细胞周边的孔加 PBS,待细胞贴壁后按照实验设计处理细胞,每组 3 个复孔,置于 37 °C 5% 二氧化碳培养箱培养 24 h 后弃液,加入 800 μmol · L⁻¹的 H₂O₂继续培养 6 h 后弃液,所有组均加入含有体积分数 10% CCK-8

的完全培养基 100 μL,继续孵育 30 ~ 60 min,酶标仪检测 450 nm 波长处细胞活力见公式 1。空白组只加 CCK-8 的完全培养基,对照组为培养基和细胞,实验组给予相应处理。

$$\text{细胞活力}(\%) = (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

1.3.4 细胞氧化应激指标测定 取对数生长期的 Gc-1 spg 细胞,制成细胞悬液,使细胞数达 2 × 10⁵,将细胞均匀接种于 6 孔板,每孔 2 mL,待细胞贴壁后各组同“1.3.2”方法处理,后弃液,冰冷 PBS 洗涤 3 次,细胞刮收集细胞不少于每毫升 1 × 10⁶ 个,1 000 r · min⁻¹离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 预冷的 PBS 匀浆器匀浆,按照试剂盒测定 SOD、MDA、GSH-PX、LDH 水平并计算。

1.3.5 细胞 ATP 测定 前期试验处理同“1.3.4”,细胞处理完成后弃液,冰冷 PBS 洗涤 3 次,6 孔板每孔加入 200 μL ATP 裂解液,冰上充分裂解细胞,4 °C 12 000 r · min⁻¹离心 5 min,取上清,按照试剂盒检测 ATP 水平并计算。

1.3.6 细胞线粒体测定 前期试验处理同“1.3.4”,根据样本按照 Mito Tracker[®] Green FM 试剂盒配制染色工作液,配好后放入 37 °C 温箱预温备用,后弃液,PBS 洗涤 3 次,加入配好的 Mito Tracker[®] Green FM 染色工作液 1 mL,细胞培养箱孵育 30 min,结束后弃去工作液,加入预温的完全培养基 1 mL,荧光显微镜下观察并拍照,Image J 软件进行荧光定量并分析。

1.3.7 细胞线粒体膜电位(JC-1)测定 前期试验处理同“1.3.4”,根据样本按照 JC-1 试剂盒配制染色工作液和缓冲液,配好的缓冲液放于 -20 °C 冰箱备用,后弃液,PBS 洗涤 3 次,加入配好的 JC-1 染色工作液和完全培养基各 1 mL,充分混匀,细胞培养箱孵育 30 min,结束后弃去培养液,JC-1 染色缓冲液(1 ×)洗涤 1 次,加入 2 mL PBS,荧光显微镜下观察并拍照,Image J 软件进行荧光定量并计算红/绿荧光比值。

1.3.8 细胞凋亡率检测 前期试验处理同“1.3.4”,后弃液,PBS 洗涤 3 次,加入 Hoechst 33342 染色工作液 1 mL,细胞培养箱孵育 30 min,结束后弃去工作液,PBS 洗涤 3 次,荧光显微镜下观察并拍照,手动计数(不少于 1 × 10³ 个细胞),按公式 2 计算细胞凋亡率:

$$\text{凋亡率}(\%) = (\text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}) \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

1.3.9 透射电镜检测细胞线粒体损伤及自噬情况

前期试验处理同“1.3.4”，细胞收集后，固定液（体积分数2.5%的戊二醛）固定后离心弃上清，体积分数1%琼脂糖包裹， $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液（PB, pH 7.4）漂洗3次，每次15 min，然后质量分数2%锇酸中固定2 h，丙酮梯度脱水后，丙酮-812包埋剂=2:1渗透过夜，纯812包埋剂5~8 h，37℃烤箱过夜，60℃烤箱聚合48 h，超薄切片机切片60~80 nm超薄切片，质量分数2%醋酸铀饱和酒精溶液和枸橼酸铅各染色15 min，切片室温干燥过夜，最后在透射电镜下拍照分析。

1.3.10 Western blot 检测凋亡、线粒体自噬及 AMPK/mTOR 通路蛋白表达 前期试验处理同“1.3.4”，后弃液，冰冷 PBS 洗3次，吸水纸吸干残余 PBS，加入配好的蛋白裂解液（RIPA 裂解液-蛋白酶/蛋白酶磷酸酶抑制剂=100:1）冰上裂解40 min，4℃ $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 10 min，取上清，按照 BCA 蛋白浓度检测试剂盒提取总蛋白，按照线粒体总蛋白和粒体总蛋白提取试剂盒提取总细胞蛋白和线粒体蛋白，计算上样量，按照样本总体积加入4×蛋白上样缓冲液（样本总体积/4），100℃沸水煮样15 min，-80℃冰箱备用。按照目标蛋白相对分子质量制胶，加样（按之前算好的上样量），经过 SDS-PAGE 电泳，免疫印迹转膜，牛奶封闭，洗膜，一抗孵育（1:1 000），洗膜，二抗孵育（1:5 000），洗膜，化学发光成像，Image J 软件分析各组 Bax、Caspase-3、Bcl-2、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR 蛋白和 P62、LC3 线粒体蛋白相对表达量， β -tubulin 为细胞内参蛋白，电压依赖性阴离子通道蛋白1（VDAC1）为线粒体内参蛋白。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 21 和 GraphPad Prism 8 统计软件，计量资料以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，比较采用单因素方差分析，进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验至少重复3次。

表 1 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 中氧化应激指标影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Comparison of oxidative stress indicators. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	GSH-PX/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
Control	92.77 ± 2.54	80.69 ± 2.41	1.59 ± 0.53	45.27 ± 0.80
H ₂ O ₂	16.83 ± 1.49 ¹⁾	39.47 ± 2.05 ¹⁾	7.89 ± 0.60 ¹⁾	89.97 ± 1.24 ¹⁾
H ₂ O ₂ + RES	114.26 ± 4.92 ²⁾	80.75 ± 0.94 ²⁾	2.85 ± 0.54 ²⁾	61.40 ± 1.01 ²⁾
H ₂ O ₂ + RES + CC	84.09 ± 14.80 ³⁾	41.31 ± 1.49 ³⁾	5.88 ± 0.57 ³⁾	87.16 ± 0.31 ³⁾

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ；与 H₂O₂ 组比较，²⁾ $P < 0.05$ ；与 H₂O₂ + RES 组比较，³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ group; ³⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ + RES group.

2 结果

2.1 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞活力和 ATP 中的影响

与 Control 组比较，H₂O₂ 组细胞活力和 ATP 明显降低，经 RES 预处理后细胞活力和 ATP 部分恢复，与 H₂O₂ + RES 组比较，AMPK 抑制剂组细胞活力和 ATP 降低，这说明 RES 可能通过该信号通路发挥细胞保护作用。见图 1。

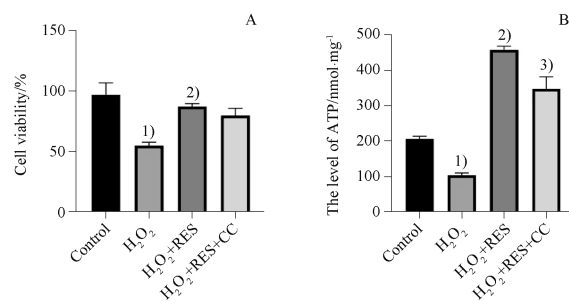


图 1 腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）抑制剂对白藜芦醇（RES）在小鼠精原细胞（Gc-1 spg）细胞活力和三磷酸腺苷（ATP）中的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

A - the cell viability of different groups; B - the level of ATP in different groups; ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ group; ³⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ + RES group.

Fig. 1 The influence of AMPK inhibitors on effects of RES in the viability and ATP of Gc-1 spg cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

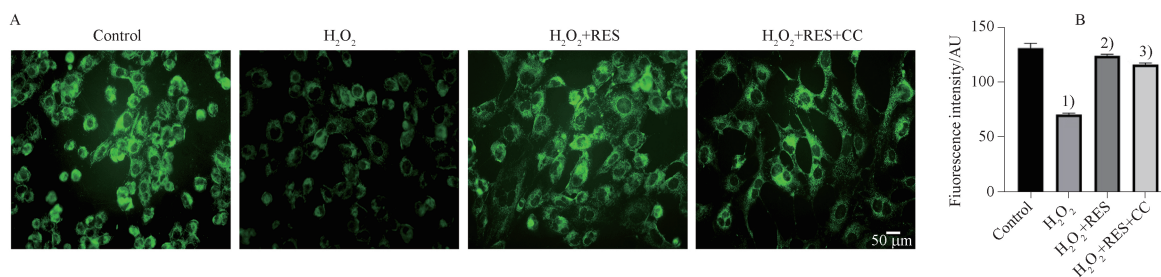
2.2 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞氧化应激损伤中的影响

与 Control 组比较，H₂O₂ 组 GSH-PX、SOD 水平降低，MDA、LDH 水平升高，经 RES 预处理后 GSH-PX、SOD 水平升高，MDA、LDH 水平降低，与 H₂O₂ + RES 组比较，AMPK 抑制剂组脂质过氧化物增多，抗氧化酶活性降低。这说明 RES 通过该信号通路发挥对 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤后的保护作用。见表 1。

2.3 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞线粒体损伤中的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组线粒体严重损伤, 荧光染色弱, 经 RES 预处理后线粒体损伤较轻, 荧光染色

着色强, 与 H₂O₂ + RES 组比较, AMPK 抑制剂组线粒体荧光强度减弱, 线粒体数也相对减少。这与 ATP 结果一致, 说明 RES 通过该信号通路发挥对 Gc-1 spg 细胞线粒体损伤的保护作用。见图 2。



A - 不同组细胞线粒体染色结果(20×); B - 不同组细胞线粒体荧光强度; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与 H₂O₂ + RES 组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

A - mitochondrial staining results of different groups of cells; B - mitochondrial fluorescence intensity in different groups of cells; ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ group; ³⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ + RES group.

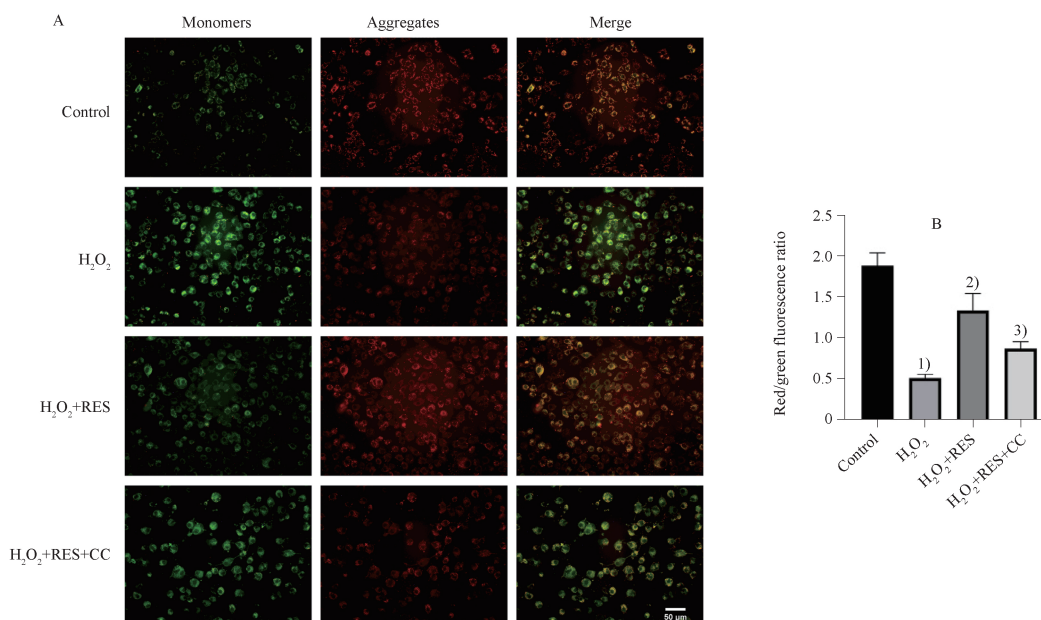
图 2 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞线粒体损伤中的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 The influence of AMPK inhibitors on effect of RES on mitochondrion injure of Gc-1 spg cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞线粒体膜电位损伤中的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组细胞的 JC-1 不能聚集在线粒体基质中, 表现为 JC-1 单体(绿色荧光)、红/绿荧光比值降低, 提示线粒体膜电位明显降低,

标志着 Gc-1 spg 细胞发生早期凋亡, 经 RES 预处理后线粒体膜电位部分恢复, 红/绿荧光比值升高, 与 H₂O₂ + RES 组比较, AMPK 抑制剂组细胞线粒体膜电位降低。这与上述结果一致, 说明 RES 通过该信号通路保护 Gc-1 spg 细胞线粒体损伤。见图 3。



A - 不同组细胞 JC-1 染色结果(10×); B - 不同组细胞红/绿荧光强度比率; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与 H₂O₂ + RES 组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

A - JC-1 staining results of different groups of cells; B - red/green fluorescence intensity ratio of different groups of cells; ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ group; ³⁾ $P < 0.05$, compared with the H₂O₂ + RES group.

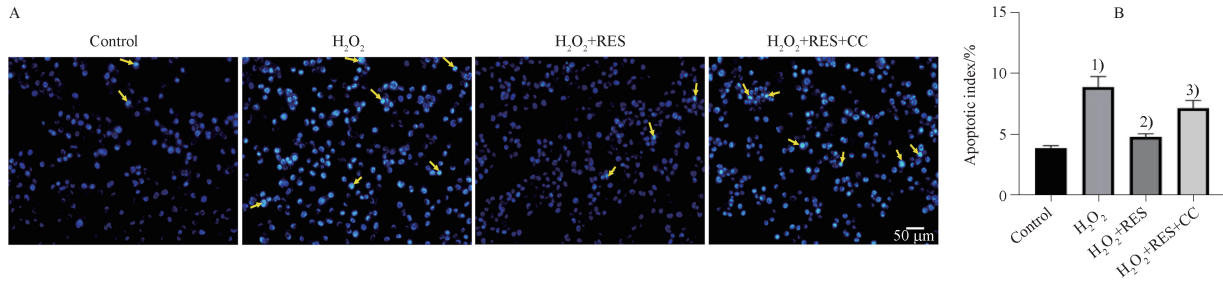
图 3 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞线粒体膜电位损伤中的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 The influence of AMPK inhibitors on effect of RES on mitochondrion injure of Gc-1 spg cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞凋亡中的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组大量细胞核皱缩、碎裂, 染色程度明显增强(图 4 中黄色箭头处), 表明

细胞凋亡严重, 经 RES 预处理后, 细胞凋亡指数降低, 与 H₂O₂ + RES 组比较, AMPK 抑制剂组细胞凋亡指数增加, 这说明 RES 通过该信号通路缓解 Gc-1 spg 细胞凋亡(图 4)。



A - 不同组细胞 Hoechst 33342 染色结果(10×); B - 不同组细胞凋亡率; 与空白对照组比较, ¹⁾P < 0.05; 与 H₂O₂ 组比较, ²⁾P < 0.05; 与 H₂O₂ + RES 组比较, ³⁾P < 0.05。

A - Hoechst 33342 staining results of different groups of cells; B - apoptosis rate of different groups of cells; ¹⁾P < 0.05, compared with the control group; ²⁾P < 0.05, compared with the H₂O₂ group; ³⁾P < 0.05, compared with the H₂O₂ + RES group.

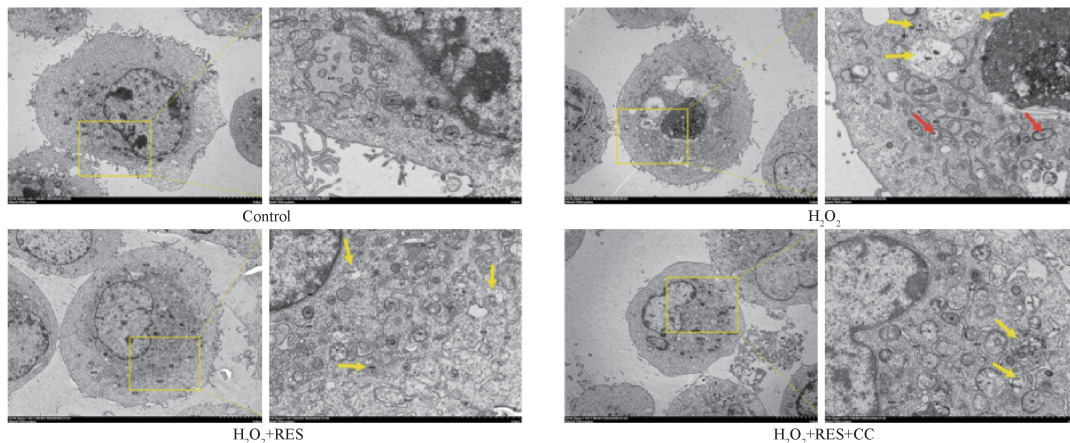
图 4 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞凋亡中的影响. n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 The influence of AMPK inhibitors on effect of RES on apoptosis of Gc-1 spg cells. n = 3, $\bar{x} \pm s$

2.6 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞超微结构损伤中的影响

各组细胞电镜下超微结构变化比较, Control 组细胞整体损伤轻微, 细胞膜完整, 细胞核呈不规则形, 线粒体轻度肿胀, 膜完整, 嵴平行排列, 自噬溶酶体少量存在; H₂O₂ 组细胞损伤严重, 存在凋亡征象, 未见凋亡小体, 膜较完整, 核固缩、崩解, 核膜大面积消失, 线粒体大部分明显肿胀、变圆, 膜内基质溶解,

嵴减少、消失, 自噬溶酶体大量存在, 可见自噬小体; RES 组细胞轻度水肿, 膜完整, 核呈不规则形, 核膜完整, 线粒体轻度肿胀, 膜完整, 膜内基质局部变淡, 嵴减少, 自噬溶酶体大量存在; AMPK 抑制剂组细胞中度水肿, 膜较完整, 表面微绒毛明显肿胀、变圆, 核呈不规则形, 线粒体大部分明显肿胀、变圆, 膜内基质溶解, 嵴减少、消失, 自噬溶酶体少量存在。见图 5。



黄色箭头 - 自噬溶酶体; 红色箭头 - 自噬小体; 左 2 000×; 右 7 000×。

Yellow arrow - autophagy lysosome; Red arrow - autophagosome; Left 2 000×; Right 7 000×.

图 5 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞超微结构损伤中的影响

Fig. 5 The influence of AMPK inhibitors on effect of RES on ultrastructural damage of Gc-1 spg cells.

2.7 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞凋亡蛋白表达中的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组凋亡蛋白 Bax 和

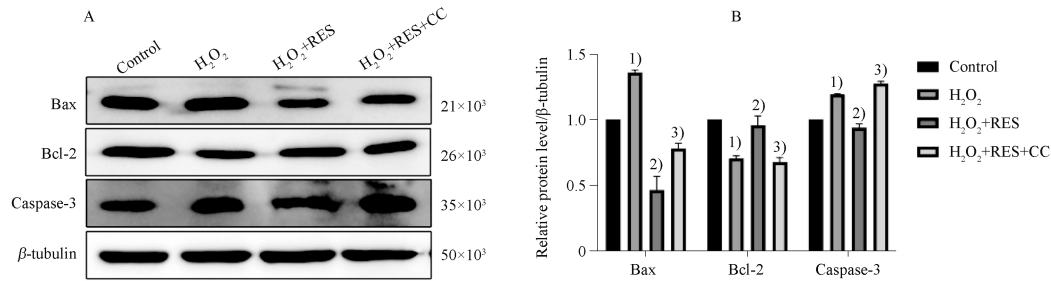
Caspase-3 相对表达量均增加, Bcl-2 相对表达量减少, 经 RES 预处理后, Bax 和 Caspase-3 相对表达量降低, Bcl-2 相对表达量增加, 与 H₂O₂ + RES 组比

较,AMPK 抑制剂能逆转凋亡蛋白表达量。这与凋亡染色结果一致,进一步说明 RES 通过该信号通路缓解 Gc-1 spg 细胞凋亡。见图 6。

2.8 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞自噬蛋白及相关通路蛋白表达中的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组 LC3 II/LC3 I 和 p-AMPK/AMPK 表达量增高, P62 和 p-mTOR/mTOR 表达量增高, P62 和 p-mTOR/mTOR

表达量下降,经 RES 预处理后, LC3 II/LC3 I 和 p-AMPK/AMPK 表达量进一步增高, P62 和 p-mTOR/mTOR 表达量进一步下降,与 H₂O₂ + RES 组比较, AMPK 抑制剂能降低 LC3 II/LC3 I 和 p-AMPK/AMPK 的表达,并提高 P62 和 p-mTOR/mTOR 表达,说明 RES 通过该信号通路促进 Gc-1 spg 细胞线粒体自噬并缓解其氧化应激损伤和凋亡。见图 7。

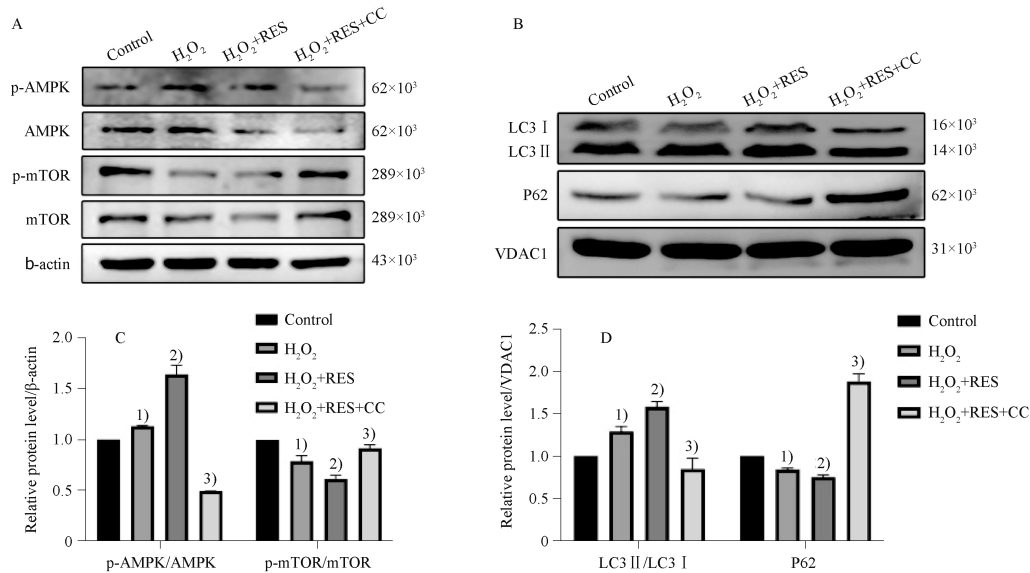


A - 不同组细胞凋亡蛋白表达; B - 不同组细胞蛋白带光密度; 与空白对照组比较, ¹⁾P < 0.05; 与 H₂O₂组比较, ²⁾P < 0.05; 与 H₂O₂ + RES 组比较, ³⁾P < 0.05。

A - apoptosis proteins expression of different groups of cells; B - the optical densities of protein bands in different groups of cells; ¹⁾P < 0.05, compared with the control group; ²⁾P < 0.05, compared with the H₂O₂ group; ³⁾P < 0.05, compared with the H₂O₂ + RES group.

图 6 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 细胞凋亡蛋白中的影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 6 The influence of AMPK inhibitors on effect of RES on apoptosis proteins of Gc-1 spg cells. n = 3, $\bar{x} \pm s$



A - 不同组细胞通路蛋白表达; B - 不同组细胞自噬蛋白表达; C - 不同组细胞通路蛋白带光密度; D - 不同组细胞自噬蛋白带光密度; 与空白对照组比较, ¹⁾P < 0.05; 与 H₂O₂组比较, ²⁾P < 0.05; 与 H₂O₂ + RES 组比较, ³⁾P < 0.05。

A - expression of pathway proteins of different groups of cells; B - expression of autophagy proteins of different groups of cells; C - the optical densities of pathway protein bands in different groups of cells; D - the optical densities of autophagy protein bands in different groups of cells; ¹⁾P < 0.05, compared with the control group; ²⁾P < 0.05, compared with the H₂O₂ group; ³⁾P < 0.05, compared with the H₂O₂ + RES group.

图 7 AMPK 抑制剂对 RES 在 Gc-1 spg 自噬及相关通路蛋白表达中的影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 7 The influence of AMPK inhibitors on effects of RES on Gc-1 spg autophagy and related pathway protein expression. n = 3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究用 H₂O₂ 诱导 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤和凋亡,探讨 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤和线粒体自噬的关

系以及 RES 在 Gc-1 spg 细胞线粒体自噬中的作用,进一步研究 RES 是否通过 AMPK/mTOR 信号通路调控线粒体自噬缓解 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤。

OS 损伤是过量 ROS 堆积的结果,会对机体多种细胞和组织产生毒害作用。其中,男性生殖细胞—精子就对 ROS 极为敏感,过多的 ROS 可引起精子结构与功能改变,影响精子活力^[11-12],是造成男性不育的重要病因之一。线粒体作为生殖细胞中一种重要的细胞器,在细胞生理活动中起着非常重要的作用,它不仅是细胞内氧化磷酸化、形成 ATP 为细胞生命活动提供能量的主要场所,还是细胞内产生 ROS 的重要部位,容易受到 ROS 攻击导致细胞线粒体损伤及凋亡^[13]。RES 是一种广泛存在于葡萄、花生、虎杖等植物中的活性物质,具有抗氧化、抗炎、抗自由基及改善微循环等药理作用。近年研究表明,RES 能改善生殖功能损伤并提高生育率。Wu 等^[14-15]研究证实,RES 通过抗氧化改善 H₂O₂ 诱导的精子损伤,并通过增加 SIRT1 表达改善环磷酰胺诱导的人颗粒细胞损伤;Xing 等^[16]研究也表明 50 μmol·L⁻¹浓度 RES 通过增加 SIRT1 活性,增强卵泡颗粒细胞抗氧化及抗凋亡能力,改善卵泡颗粒细胞功能。本研究结果显示,RES 预处理对 H₂O₂ 诱导的 Gc-1 spg 细胞 OS 及线粒体损伤、凋亡均有明显的保护作用,RES 能提高细胞活力以及 SOD 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 和 LDH 水平,缓解细胞线粒体损伤及凋亡、提高细胞中 ATP 产生及线粒体膜电位,降低凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达,提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,AMPK 抑制剂能显著逆转上述 RES 的保护作用,这也进一步证实了既往的研究结果,并拓展了 RES 在生殖细胞 OS 损伤中的作用,提示 RES 可能通过 AMPK 信号通路发挥其保护作用。也有研究表明,肠细胞内较高的 ATP 浓度可以抑制 AMPK 信号转导^[17],但本研究结果显示,Gc-1 spg 细胞内较高 ATP 浓度并没有抑制 AMPK 的激活,且相反,考虑是 RES 介导 AMPK 信号通路的激活并非细胞内较高的 ATP 浓度,这有待更多的研究证实。

当细胞内 ROS 积累、线粒体总数过度、衰老及存在缺陷时,主要通过细胞自噬的方式清除线粒体,线粒体自噬可作为一种调控细胞线粒体质量的机制,在维持生殖细胞内线粒体正常功能和基因组稳定性上起着重要作用。LC3 是自噬过程中的标志蛋白,外源物质刺激细胞自噬启动时,胞浆型的 LC3 I 分解掉一小段多肽,转化为 LC3 II,参与自噬体膜形成,因此 LC3 II/LC3 I 值的大小可估计自噬水平的高低,P62 也是重要的自噬标记蛋白,其与 LC3 结合诱导自噬体形成,从而吞噬并清除受损线粒体,P62 水平与自噬通量成反比^[18]。有研究表明,镉通过增

加线粒体分裂蛋白(DRP1 和 FIS1)的表达,减少线粒体融合蛋白(OPA1 和 MFN1)的表达,并阻碍自噬体和溶酶体的融合,诱导过度线粒体分裂和抑制线粒体自噬导致小鼠睾丸间质细胞凋亡^[19]。也有研究表明,自噬缺陷导致成肌细胞凋亡并损害肌管形成,自噬和线粒体自噬是调节成肌细胞分化过程中线粒体网络相关信号、线粒体氧化应激和线粒体相关细胞死亡的重要机制^[20]。本研究结果显示,RES 组自噬蛋白 LC3 II/LC3 I 表达水平增加,P62 蛋白表达水平降低,且电镜结果显示自噬溶酶体大量存在,重要的是 Gc-1 spg 细胞 OS、线粒体损伤及凋亡率均降低,这与既往研究结果一致,说明线粒体自噬可能是缓解线粒体损伤和凋亡的关键。

AMPK 是一种真核细胞内关键的能量和代谢感受器,也是细胞和机体能量平衡的主要调节因子,其活化促进能量分解代谢并抑制能量消耗合成代谢,平衡能量的供应和需求,最终调节细胞和器官的生长^[21]。当细胞缺乏葡萄糖时,细胞会启动依赖 AMPK 的自噬过程^[22]。mTOR 作为 PI3K/Akt 通路下游效应分子和氨基酸、ATP 和激素感受器,其活性是形成成熟自噬体的关键^[23]。研究表明,RES 不仅能直接抑制 mTOR 的活性,启动肿瘤细胞 MCF-7 自噬,还可通过减少缺氧/复氧 H9c2 心肌细胞内 Akt 的表达,进而抑制 mTORC1 活性,激活细胞自噬^[24-25];另有研究表明,RES 可抑制 AMPK 对 mTORC1 成员 PRAS40 的磷酸化,而 PRAS40 磷酸化受阻将妨碍 PRAS40 从 mTORC1 上解离,进而抑制 14-3-3 蛋白的活性,使得 MCF-7 细胞自噬活性降低^[26]。此外,RES 可通过 AMPK-mTOR 信号通路调控自噬阻止棕榈酸诱导的人主动脉内皮细胞内 OS 损伤^[27]。本研究结果显示,H₂O₂ 能增加 LC3 II/LC3 I 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达量,降低 P62 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达量,激活 AMPK 信号通路,抑制 mTOR 信号通路促进 Gc-1 spg 细胞线粒体自噬,这可能是因为 OS 导致细胞损伤,细胞内 ATP 水平不足,激活能量感受器 AMPK,启动线粒体自噬清除胞内坏死物质并恢复细胞稳态;RES 能进一步激活该信号通路加强 Gc-1 spg 细胞线粒体自噬缓解 OS 损伤,AMPK 抑制剂组 LC3 II/LC3 I 和 p-AMPK/AMPK 蛋白表达量降低,P62 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达量增加,线粒体自噬水平降低,这与 Liu 等^[28]的研究结果一致。说明 RES 可通过 AMPK/mTOR 信号通路调控 Gc-1 spg 细胞线粒体自噬缓解 OS 损伤。研究表明,溶酶体功能在自噬过程中发挥

重要的作用,能够维持早、晚期自噬的正常进行,以完全清除细胞内坏死物质^[29]。本研究结果表明,OS损伤和RES均能激活线粒体自噬,我们推测OS导致的线粒体自噬是损伤引起的细胞早期代偿性保护作用,当具有一定功能的溶酶体被完全利用,就会导致细胞内自噬体的堆积且无法将坏死物质清除,而RES诱导的线粒体自噬可能是保留了较多有功能的溶酶体使自噬过程正常进行,清除更多的坏死物质,在接下来的实验中,我们将进一步研究RES对线粒体自噬中溶酶体功能的影响。

REFERENCES

- [1] VANDER B M, WYNS C. Fertility and infertility: definition and epidemiology[J]. *Clin Biochem*, 2018,62:2-10.
- [2] ZHANG T Y, YUE L X, ZHANG X L, *et al.* Retinoic acid signal and spermatogenesis[J]. *J Agric Biotechnol*(农业生物技术学报), 2023,31(1):172-184.
- [3] LI X, LONG X Y, XIE Y J, *et al.* The roles of retinoic acid in the differentiation of spermatogonia and spermatogenic disorders[J]. *Clin Chim Acta*, 2019,497:54-60.
- [4] NICOLAS-AVILA J A, LECHUGA-VIECO A V, ESTEBAN-MARTINEZ L, *et al.* A network of macrophages supports mitochondrial homeostasis in the heart[J]. *Cell*, 2020,183(1):94-109.
- [5] XU C, XU J, JI G, *et al.* Deficiency of X-ray repair cross-complementing group 1 in primordial germ cells contributes to male infertility[J]. *FASEB J*, 2019,33(6):7427-7436.
- [6] GAL R, DERES L, TOTH K, *et al.* The effect of resveratrol on the cardiovascular system from molecular mechanisms to clinical results[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(18):10152. DOI: 10.3390/ijms221810152.
- [7] BHARATH L P, AGRAWAL M, MCCAMBRIDGE G, *et al.* Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation[J]. *Cell Metab*, 2020,32(1):44-55.
- [8] WU B, LIU R, HUANG H, *et al.* Resveratrol regulates mitochondrial autophagy in diabetic myocardium through AMPK-P53 pathway[J]. *J Lanzhou Univ (Med Sci)* (兰州大学学报医学版), 2020,46(1):67-71.
- [9] GUAN P, SUN Z M, WANG N, *et al.* Resveratrol prevents chronic intermittent hypoxia-induced cardiac hypertrophy by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Life Sci*, 2019,233:116748. DOI:10.1016/j.lfs.2019.116748.
- [10] SHI S X, YAN Y X, SONG C, *et al.* Study on the effect of resveratrol on oxidative stress injury of Gc-1 spg cells[J]. *China J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2023,33(19):46-54.
- [11] XU J X, ZHANG J X. Research progress on antioxidant protection mechanism of epididymal sperm[J]. *China Anim Husb Vet Med* (中国畜牧兽医), 2022,49(1):91-97.
- [12] WU P Y, SCARLATA E, O'FLAHERTY C. Long-term adverse effects of oxidative stress on rat epididymis and spermatozoa[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020,9(2):170. DOI: 10.3390/antiox9020170.
- [13] ZHANG Y, ZHOU S, CAI W, *et al.* Hypoxia/reoxygenation activates the JNK pathway and accelerates synovial senescence[J]. *Mol Med Rep*, 2020,22(1):265-276.
- [14] WU H F, LI M, LI Y J, *et al.* Resveratrol improves sperm motility and DNA damage induced by hydrogen peroxide by reducing oxidative stress[J]. *Chin J Andro* (中国男科学杂志), 2021,35(6):24-28.
- [15] WU H F, JIA J L, LI Q, *et al.* Resveratrol ameliorates oxidative stress injury of human granulosa cells induced by cyclophosphamide by regulating SIRT1[J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 2022,43(7):832-838.
- [16] XING P. Study on the antagonistic effect of resveratrol on oxidative stress of follicular granulosa cells[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2020.
- [17] ZHANG H, LIU X, FAN Y, *et al.* L-Arginine alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in ovine intestinal epithelial cells by regulating apoptosis, mitochondrial function, and autophagy[J]. *J Nutr*, 2021,151(4):1038-1046.
- [18] EREKAT N S. Programmed cell death in diabetic nephropathy: a review of apoptosis, autophagy, and necroptosis[J]. *Med Sci Monit*, 2022,28:e937766. DOI: 10.12659/MSM.937766.
- [19] YI L, SHANG X J, LV L, *et al.* Cadmium-induced apoptosis of Leydig cells is mediated by excessive mitochondrial fission and inhibition of mitophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(11):928. DOI: 10.1038/s41419-022-05364-w.
- [20] BAECHLER B L, BLOEMBERG D, QUADRILATERO J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation[J]. *Autophagy*, 2019,15(9):1606-1619.
- [21] BREMER K, KOCHA K M, SNIDER T, *et al.* Sensing and responding to energetic stress: the role of the AMPK-PGC1alpha-NRF1 axis in control of mitochondrial biogenesis in fish[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2016,199:4-12.
- [22] HARDIE D G. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015,33:1-7.
- [23] SHI S X, YAN Y X, WANG J T, *et al.* Research progress of AMPK/mTOR signaling pathway in mitochondrial autophagy[J]. *Hainan Med J*(海南医学), 2023,34(5):736-740.
- [24] FENG Y, JU Y, YAN Z, *et al.* Resveratrol attenuates autophagy and inflammation after traumatic brain injury by activation of PI3K/Akt/mTOR pathway in rats[J]. *Folia Neuropathol*, 2022,60(2):153-164.
- [25] WANG J, LI J, CAO N, *et al.* Resveratrol, an activator of SIRT1, induces protective autophagy in non-small-cell lung cancer via inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK[J]. *Oncotargets Ther*, 2018,11:7777-7786.
- [26] LI J, FAN Y, ZHANG Y, *et al.* Resveratrol induces autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells by activating the NGFR-AMPK-mTOR pathway[J]. *Nutrients*, 2022,14(12):2413.
- [27] SONG J, HUANG Y, ZHENG W, *et al.* Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway[J]. *Front Med*, 2018,12(6):697-706.
- [28] LIU S, SUN Y, LI Z. Resveratrol protects Leydig cells from nicotine-induced oxidative damage through enhanced autophagy[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018,45(6):573-580.
- [29] YANG Y, WANG Q, SONG D, *et al.* Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020,39(1):197. DOI: 10.1186/s13046-020-01701-z.

(收稿日期:2023-09-28)