

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.19.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 19-0046-09

实验研究·论著

白藜芦醇对 Gc-1 spg 细胞氧化应激损伤的作用研究*

石拴霞¹, 阎一鑫², 宋诚³, 王纪田³, 何毅刚², 王玲²

(1. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 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, 甘肃 兰州 730050; 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, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 观察白藜芦醇(RES)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的小鼠精原细胞(Gc-1 spg)氧化应激损伤的作用。**方法** H₂O₂复制Gc-1 spg细胞氧化应激损伤模型, 设置空白组、H₂O₂组(800 μmol/L)、H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组和H₂O₂+15 μmol/L RES组。检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平, CCK-8法检测细胞活力, JC-1试剂盒检测线粒体膜电位, Mito Tracker[®] Green FM试剂盒检测活细胞线粒体水平, Hoechst 33342染色检测细胞核凋亡率, Western blotting检测凋亡蛋白Bax、Bcl-2和Caspase-3表达。**结果** 浓度为800 μmol/L H₂O₂处理Gc-1 spg细胞6 h时达到实验要求($P < 0.05$)。与空白组比较, 各H₂O₂组细胞活力降低($P < 0.05$), 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组细胞活力升高($P < 0.05$)。与空白组比较, 各H₂O₂组的GSH-Px和SOD水平降低($P < 0.05$), LDH和MDA水平升高($P < 0.05$); 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组GSH-Px和SOD水平降低($P < 0.05$), LDH和MDA水平升高($P < 0.05$)。与空白组比较, H₂O₂组细胞的红/绿荧光比值降低, 提示线粒体膜电位降低($P < 0.05$); 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组JC-1红/绿荧光比值升高($P < 0.05$)。与空白组比较, H₂O₂组细胞线粒体数明显减少($P < 0.05$); 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组细胞荧光强度升高($P < 0.05$)。与空白组比较, H₂O₂组大量细胞核皱缩、碎裂, 染色程度明显增强, 细胞凋亡严重; 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。与空白组比较, H₂O₂组凋亡蛋白Bax和Caspase-3相对表达量增加($P < 0.05$), Bcl-2相对表达量减少($P < 0.05$); 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组Bax和Caspase-3相对表达量降低($P < 0.05$), Bcl-2相对表达量增加($P < 0.05$)。**结论** RES对H₂O₂诱导的Gc-1 spg细胞氧化应激损伤具有保护作用, 这种保护作用与RES浓度有关。

关键词: 白藜芦醇; 过氧化氢; Gc-1 spg细胞; 氧化应激; 线粒体损伤; 凋亡

中图分类号: R698.2

文献标识码: A

Effect of resveratrol on oxidative stress injury of Gc-1 spg cells*

Shi Shuan-xia¹, Yan Yi-xin², Song Cheng³, Wang Ji-tian³, He Yi-gang², Wang Ling²

(1. No.1 School of Clinical Medicine, Gansu University of traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Reproductive Medicine Centre, 3. Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drugs of Gansu Province, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou, Gansu 730050, China)

收稿日期: 2022-11-20

* 基金项目: 甘肃省青年科技基金计划(No. 21JR1RA188); 军队后勤科研计生专项课题(No. 20JSZ09)

[通信作者] 王玲, E-mail: szyxzx2020@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of resveratrol (RES) on oxidative stress injury of mouse spermatogonia (Gc-1 spg) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Methods** Set the blank control group, H_2O_2 group and H_2O_2 + low concentration RES group (5 $\mu\text{mol/L}$), H_2O_2 + medium concentration RES group (10 $\mu\text{mol/L}$) and H_2O_2 + high concentration RES group (15 $\mu\text{mol/L}$), the RES group was treated with RES of different concentrations for 24 h, and the rest groups were treated with H_2O_2 for 6 h except the control group. The levels of oxidative stress indicators SOD, MDA, GSH-Px and LDH were detected, and the cell viability was detected by CCK-8, detection of mitochondrial membrane potential by JC-1, Mito Tracker® Green FM was used to detect the level of mitochondria in living cells, Hoechst 33342 staining for detection of nuclear apoptosis rate and Western blotting was used to detect the expression level of apoptotic proteins Bax, Bcl-2 and Caspase-3. **Results** Concentration is 800 $\mu\text{mol/L}$ when Gc-1 spg cells were treated with H_2O_2 for 6 h, the experimental requirements were met ($P < 0.05$). Compared with the control group, H_2O_2 treatment significantly decreased cell viability ($P < 0.05$), inhibited SOD and GSH-Px activities, increased MDA and LDH levels ($P < 0.05$), significantly decreased mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), damaged mitochondria ($P < 0.05$) and destroy nucleus ($P < 0.05$), increased the expression levels of Bax and Caspase-3, and decreased the expression level of Bcl-2 ($P < 0.05$). Below 20 $\mu\text{mol/L}$ RES had no significant effect on cell viability ($P > 0.05$), partially restored cell viability ($P < 0.05$), increased SOD and GSH-Px activities, decreased MDA and LDH levels ($P < 0.05$), increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$), reduced mitochondrial damage ($P < 0.05$) and apoptosis rate, the expression of Bax and Caspase-3 was decreased and the expression of Bcl-2 was increased in a concentration dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** RES can protect Gc-1 spg cells from oxidative stress injury induced by H_2O_2 , which is related to the concentration of RES.

Keywords: resveratrol; hydrogen peroxide; Gc-1 spg cells; oxidative stress; mitochondrial damage; apoptosis

有研究表明, 男性不育可能是未来亚健康的先兆^[1]。精原细胞是精子的前体细胞, 能自我增殖和分化, 具有独特的减数分裂能力, 能将遗传物质减半, 产生单形精子, 将遗传物质传递给下一代^[2], 在男性生育中发挥重要作用。氧化应激 (oxidative stress, OS) 是过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 堆积的结果, 也是导致男性不育和生殖细胞损伤的主要病理机制^[3]。线粒体作为精子活动力的主要能量产生者, 易受到过量 ROS 攻击, 造成细胞功能障碍及凋亡, 影响精子活力, 导致不育^[4]。白藜芦醇 (Resveratrol, RES) 是一种天然非黄酮类多酚化合物, 广泛分布于葡萄、花生、虎杖、桑葚等药用植物中, 具有抗凋亡、抗癌、抗炎、抗氧化、抗衰老、调节血脂等作用^[5]。目前, 已有 RES 用于多种抗氧化损伤的研究报道, 但在男性生殖细胞中的研究较少。因此, 本研究采用过氧化氢 H_2O_2 诱导的 Gc-1 spg 细胞构建氧化损伤模型, 观察 RES 对 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

小鼠精原细胞 Gc-1 spg 细胞株、DMEM 购自上海语纯生物科技有限公司, 0.25% 胰酶、10% 胎牛血

清、1% 青链霉素购自塞维尔生物科技公司, 白藜芦醇购自陕西嘉果肽生物工程有限公司, 3% 过氧化氢 H_2O_2 购自上海信裕生物科技有限公司, CCK-8 细胞活性检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、Hoechst 细胞核凋亡染色试剂盒、RIPA 裂解液购自碧云天生物技术有限公司, Mito Tracker® Green FM 线粒体绿色荧光探针试剂盒购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司, 兔抗 Bcl-2、兔抗 Bax、兔抗 Caspase-3 多克隆抗体均购自博士德生物工程有限公司, β -tubulin 购自武汉塞维尔生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Gc-1 spg 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素溶液的高糖 DMEM 完全培养基中培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中常规培养、传代。

1.2.2 H_2O_2 构建 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤模型 取对数生长期的 Gc-1 spg 细胞, 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 5×10^3 个/L, 将细胞均匀接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 待细胞贴壁后加入含 H_2O_2 (0、50、100、200、400、600、800 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养基, 每组 5 个复孔, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% 二氧化碳培养箱继续培养 4、6、8 和 10 h 后弃旧培养基, 所有组均加入含 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。细胞活力 (%) = (实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白组) \times 100%, 空白组只加 CCK-8 的完全培养基, 0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照组, 实验组为不同浓度的 H_2O_2 。

1.2.3 不同浓度 RES 组 Gc-1 spg 细胞活力检测 按 1.2.2 中的方法接种细胞, 待细胞贴壁后加入含 RES (0、5、10、15、20 和 30 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养基, 每组 5 个复孔, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% 二氧化碳培养箱继续培养 24 h 后弃去旧培养基, 各组均加入含有 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。细胞活力 (%) = (实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白组) \times 100%, 空白组只加 CCK-8 的完全培养基, 0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照组, 实验组为不同浓度的 RES。

1.2.4 H_2O_2 + 不同浓度 RES 组 Gc-1 spg 细胞活力检测 按 1.2.2 中的方法接种细胞, 待细胞贴壁后加入含 RES (0、5、10 和 15 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养基预处理 24 h, 每组 5 个复孔, 24 h 后弃旧培养基, 除空白组外其余各组均加入含 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的新鲜培养基继续培养 6 h, 所有组均加入含有 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。细胞活力 (%) = (实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白组) \times 100%, 空白组只加 CCK-8 的完全培养基, 0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照组, 实验组为 H_2O_2 + 不同浓度的 RES。

1.2.5 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 2×10^5 , 将细胞均匀接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 待细胞贴壁后加入含 RES (0、5、10 和 15 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养基预处理 24 h 后弃去旧培养液, 除空白组外其余各组均加入含 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的新鲜培养基继续培养 6 h 后弃旧培养基, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次, 细胞刮收集细胞不少于 $10^6/\text{mL}$, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 预冷的 PBS 匀浆器匀浆, 采用试剂盒测定 SOD、MDA、LDH、GSH-Px 水平。

1.2.6 细胞线粒体膜电位测定 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 $^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻备用; 前期实验处理同 1.2.5, 后弃旧培养基, 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 \times) 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。

1.2.7 细胞线粒体测定 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 $^\circ\text{C}$ 温箱预温备用; 前期实验处理同 1.2.5, 后弃旧培养基, 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。

1.2.8 细胞核凋亡率检测 前期实验处理同 1.2.5, 后弃旧培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入 Hoechst 33342 染色液 1 mL, 细胞培养箱孵育 30 min, 结束后弃去染色液, PBS 洗涤 2 次, 荧光显微镜下观察并拍照, 手动计数, 计算细胞核凋亡率。凋亡率 = (凋亡细胞数 / 总细胞数) \times 100%。

1.2.9 Western blotting 检测凋亡蛋白表达 前期实验处理同 1.2.5, 后弃旧培养基, 冰冷 PBS 洗 2 次, 吸水纸吸干残余 PBS, 加入配好的蛋白裂解液冰上裂解 40 min, 4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min, 提取上清液, 按照 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 计算上样量, 按照样本总体积加 4 \times 蛋白上样缓冲液 (样本总体积/4), 100 $^\circ\text{C}$ 沸水煮样 15 min, -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱备用。按照目标蛋白分子量制胶, 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, 洗膜、二抗孵育, 洗膜、化学发光成像。Image J 软件分析凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Bcl-2 条带灰度值计算蛋白相对表达量, β -tubulin 为内参蛋白。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21 和 GraphPad Prism 8 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂对 Gc-1 spg 细胞活力的影响

0、50、100、200、400、600、800 和 1 000 μmol/L H₂O₂处理 Gc-1 spg 细胞 4、6、8 和 10 h 后的细胞活力比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的细胞活力有差异 ($F=100.066, P=0.000$); ②不同浓度 H₂O₂组的细胞活力有差异 ($F=539.136, P=0.000$); ③不同时间点不同浓度 H₂O₂组细胞活力的

变化趋势有差异 ($F=8.853, P=0.000$)。与 0 μmol/L H₂O₂组比较, 4、6、8 和 10 h 时, 100、200、400、600、800 和 1 000 μmol/L H₂O₂组细胞活力降低 ($P<0.05$); 8 和 10 h 时, 800 和 1 000 μmol/L H₂O₂组细胞活力明显降低, 细胞损伤较重 ($P<0.05$); 6 h 时, 800 μmol/L H₂O₂组细胞活力为 $(51.51 \pm 5.46)\%$, 细胞活力明显下降, 既达到了损伤状态, 又存在一定细胞活力, 符合细胞实验研究条件(见图 1 和表 1)。因此, 本研究采用 800 μmol/L H₂O₂处理 Gc-1 spg 细胞 6 h 构建 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤模型, 设为 H₂O₂组。

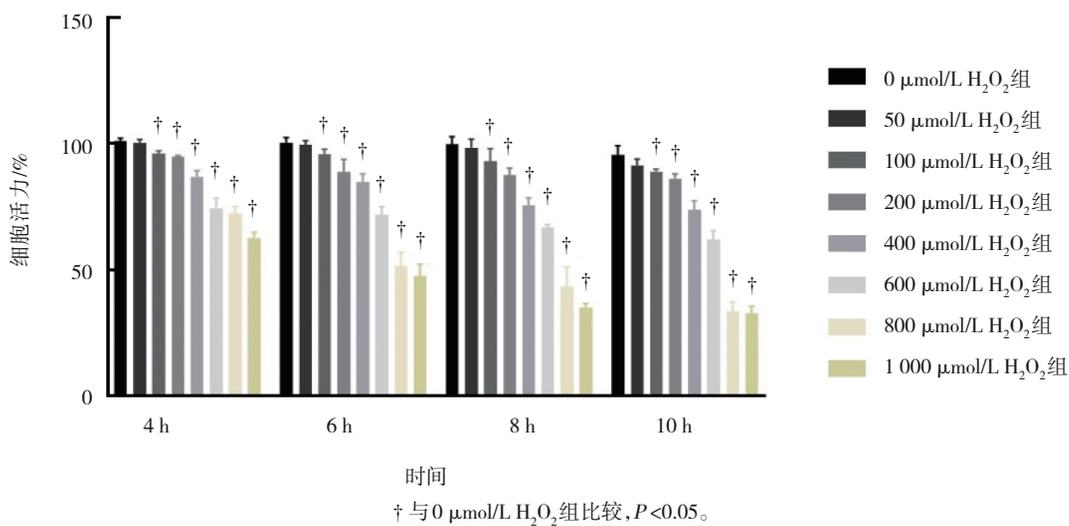


图 1 不同时间点不同浓度 H₂O₂对 Gc-1 spg 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 不同浓度 H₂O₂组细胞活力的比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	4 h	6 h	8 h	10 h
0 μmol/L H ₂ O ₂ 组	101.14 ± 1.06	100.49 ± 1.88	99.82 ± 3.02	95.59 ± 3.60
50 μmol/L H ₂ O ₂ 组	100.41 ± 1.25	99.54 ± 1.69	98.49 ± 3.26	91.39 ± 2.55
100 μmol/L H ₂ O ₂ 组	96.12 ± 1.04 [†]	95.94 ± 1.91 [†]	93.11 ± 4.90 [†]	88.97 ± 0.92 [†]
200 μmol/L H ₂ O ₂ 组	94.89 ± 0.43 [†]	88.99 ± 4.80 [†]	87.59 ± 2.77 [†]	86.19 ± 1.87 [†]
400 μmol/L H ₂ O ₂ 组	86.98 ± 2.34 [†]	84.91 ± 3.15 [†]	75.69 ± 2.90 [†]	73.91 ± 3.46 [†]
600 μmol/L H ₂ O ₂ 组	74.46 ± 3.98 [†]	71.83 ± 3.24 [†]	66.81 ± 1.10 [†]	62.04 ± 3.47 [†]
800 μmol/L H ₂ O ₂ 组	72.31 ± 2.74 [†]	51.51 ± 5.46 [†]	43.26 ± 7.81 [†]	33.56 ± 3.80 [†]
1 000 μmol/L H ₂ O ₂ 组	62.66 ± 2.29 [†]	47.54 ± 4.77 [†]	35.04 ± 1.63 [†]	32.75 ± 2.85 [†]

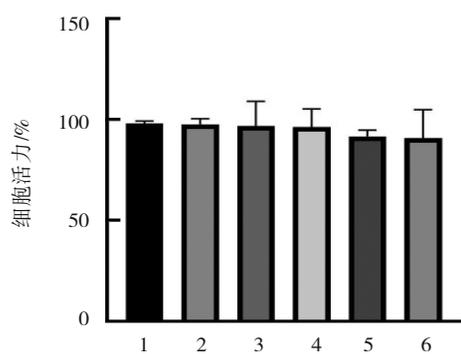
注: †与 0 μmol/L H₂O₂组比较, $P<0.05$ 。

2.2 RES对 Gc-1 spg 细胞活力的影响

0、5、10、15、20、30 μmol/L RES 处理 Gc-1 spg 细胞 24 h 后的细胞活力比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 0 μmol/L RES 组比较, 20、30 μmol/L RES 对 Gc-1 spg 细胞活力影响较大(见图 2 和表 2)。因此, 本研究采用低于 20 μmol/L 的 RES 进行后续实验。

2.3 RES对 H₂O₂处理的 Gc-1 spg 细胞的保护作用

空白组、H₂O₂组、H₂O₂+不同浓度 RES 组的细胞活力比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 进一步两两比较, 与空白组比较, 各 H₂O₂组细胞活力降低 ($P<0.05$), H₂O₂处理 Gc-1 spg 细胞 6 h 后细胞活力显著下降; 与 H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L



1: 0 μmol/L H₂O₂组; 2: 5 μmol/L H₂O₂组; 3: 10 μmol/L H₂O₂组; 4: 15 μmol/L H₂O₂组; 5: 20 μmol/L H₂O₂组; 6: 30 μmol/L H₂O₂组。

图2 不同浓度RES对Gc-1 spg细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

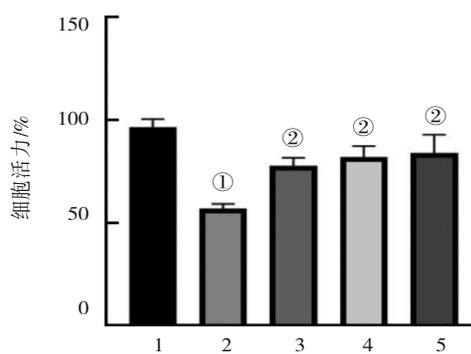
表2 不同浓度RES组细胞活力的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力
0 μmol/L RES组	98.07 ± 1.27
5 μmol/L RES组	97.74 ± 2.70
10 μmol/L RES组	96.97 ± 12.05
15 μmol/L RES组	96.33 ± 8.99
20 μmol/L RES组	90.63 ± 0.92
30 μmol/L RES组	90.91 ± 13.98
F值	0.811
P值	0.553

RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组细胞活力升高 ($P < 0.05$), RES预处理24 h后能逆转H₂O₂引起的细胞活力下降, 且与RES浓度有关。见图3和表3。

2.4 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞氧化应激指标的影响

空白组、H₂O₂组、H₂O₂+不同浓度RES组的SOD、MDA、GSH-Px、LDH水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与空白组比较, 各H₂O₂组的GSH-Px和SOD水平降低 ($P <$



1: 空白组; 2: H₂O₂组; 3: H₂O₂+ 5 μmol/L RES组; 4: H₂O₂+ 10 μmol/L RES组; 5: H₂O₂+15 μmol/L RES组。①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

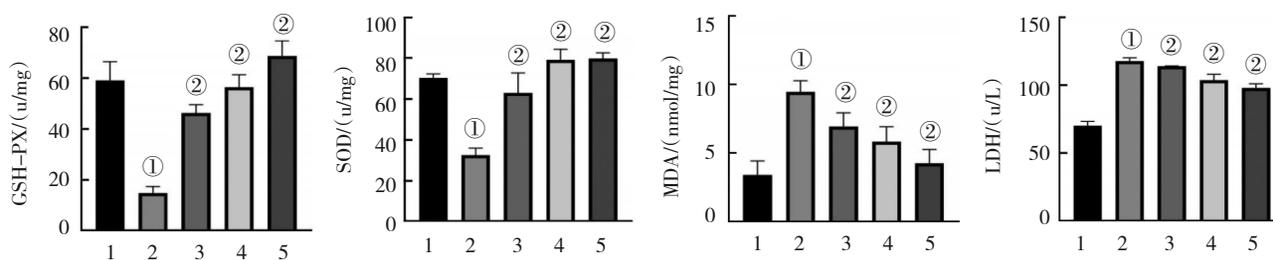
图3 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表3 各组细胞活力比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力
空白组	96.71 ± 3.90
H ₂ O ₂ 组	56.93 ± 2.40 ^①
H ₂ O ₂ +5 μmol/L RES组	77.62 ± 4.06 ^②
H ₂ O ₂ +10 μmol/L RES组	81.90 ± 5.56 ^②
H ₂ O ₂ +15 μmol/L RES组	84.03 ± 8.98 ^②
F值	28.004
P值	0.000

注: ①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

0.05), LDH和MDA水平升高 ($P < 0.05$), H₂O₂处理Gc-1 spg细胞6 h后能明显降低细胞的GSH-Px和SOD水平, 并增加细胞的LDH和MDA水平, 说明OS损伤模型复制成功; 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组GSH-Px和SOD水平降低 ($P < 0.05$), LDH和MDA水平升高 ($P < 0.05$), RES预处理能明显逆转H₂O₂引起的Gc-1 spg细胞GSH-Px和SOD下降和LDH和MDA升高, 呈浓度依赖性。见图4和表4。



1: 空白组; 2: H₂O₂组; 3: H₂O₂+5 μmol/L RES组; 4: H₂O₂+10 μmol/L RES组; 5: H₂O₂+15 μmol/L RES组。①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

图4 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表 4 各组氧化应激指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GSH-PX/(u/mg)	SOD/(u/mg)	MDA/(nmol/mg)	LDH/(u/L)
空白组	59.15 ± 7.32	70.41 ± 1.93	3.42 ± 1.00	70.35 ± 3.07
H ₂ O ₂ 组	14.85 ± 2.49 ^①	32.48 ± 3.47 ^①	9.47 ± 0.80 ^①	117.96 ± 2.40 ^①
H ₂ O ₂ +5 μmol/L RES组	46.30 ± 3.24 ^②	63.04 ± 9.86 ^②	6.94 ± 0.99 ^②	114.21 ± 0.12 ^②
H ₂ O ₂ +10 μmol/L RES组	56.51 ± 4.82 ^②	79.30 ± 5.13 ^②	5.84 ± 1.09 ^②	103.86 ± 4.37 ^②
H ₂ O ₂ +15 μmol/L RES组	68.75 ± 5.91 ^②	79.96 ± 2.77 ^②	4.26 ± 1.00 ^②	98.02 ± 3.18 ^②
F值	50.210	38.684	17.443	119.349
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞线粒体膜电位的影响

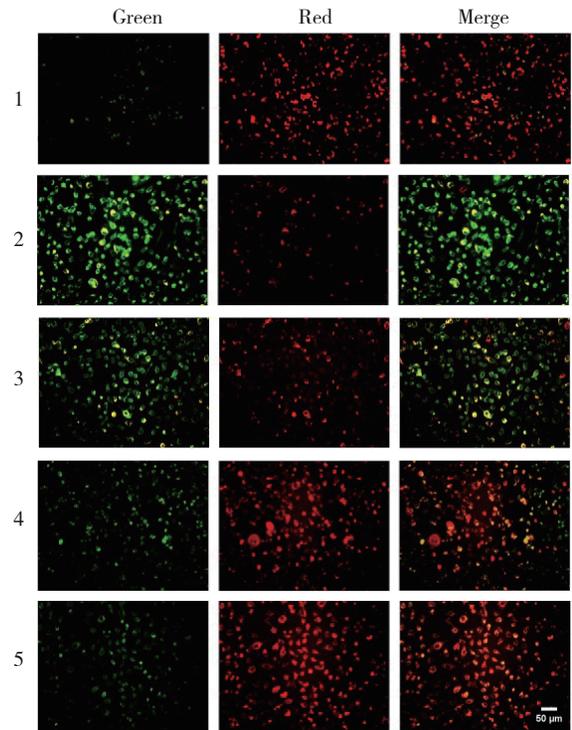
空白组、H₂O₂组、H₂O₂+不同浓度RES组的JC-1红/绿荧光比值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, 与空白组比较, H₂O₂组细胞的JC-1不能聚集在线粒体基质中, 表现为JC-1单体(绿色荧光)、红/绿荧光比值降低, 提示线粒体膜电位明显降低 ($P < 0.05$), 标志着Gc-1 spg细胞发生早期凋亡; 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组JC-1红/绿荧光比值升高 ($P < 0.05$), RES预处理后能够显著提高细胞线粒体膜电位, 说明RES对OS损伤导致的Gc-1 spg细胞线粒体膜电位具有明显保护作用, 呈浓度依赖性。见图5和表5。

2.6 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞线粒体的影响

空白组、H₂O₂组、H₂O₂+不同浓度RES组的线粒体荧光强度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白组比较, H₂O₂组细胞线粒体数明显减少 ($P < 0.05$), 这表明细胞内线粒体产生的ATP可能减少; 与H₂O₂组比较, H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组细胞荧光强度升高 ($P < 0.05$), RES预处理显著增加了细胞线粒体数, 说明RES能够降低OS损伤导致的Gc-1 spg细胞线粒体损伤程度, 呈浓度依赖性。见图6和表6。

2.7 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞凋亡的影响

空白组、H₂O₂组、H₂O₂+不同浓度RES组的细胞凋亡率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白组比较, H₂O₂组大量细胞核皱缩、碎裂, 染色程度明显增强 (见图7), 表明细胞凋亡严



1: 空白组; 2: H₂O₂组; 3: H₂O₂+5 μmol/L RES组; 4: H₂O₂+10 μmol/L RES组; 5: H₂O₂+15 μmol/L RES组。

图5 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞线粒体膜电位的影响 (线粒体膜电位JC-1染色 × 10)

表 5 各组JC-1红/绿荧光比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	红/绿荧光比值
空白组	2.48 ± 0.22
H ₂ O ₂ 组	0.85 ± 0.05 ^①
H ₂ O ₂ +5 μmol/L RES组	1.15 ± 0.06 ^②
H ₂ O ₂ +10 μmol/L RES组	1.64 ± 0.20 ^②
H ₂ O ₂ +15 μmol/L RES组	1.88 ± 0.10 ^②
F值	54.550
P值	0.000

注: ①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

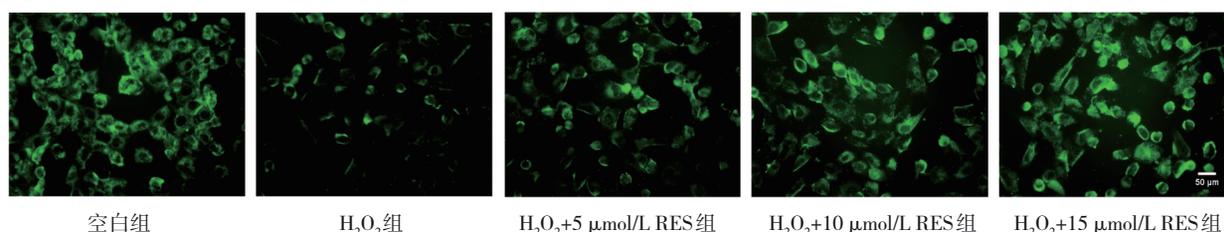


图 6 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞线粒体的影响 (Mito Tracker[®] Green FM 试剂盒配制染色×20)

表 6 各组线粒体荧光强度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度
空白组	103.95 ± 1.53
H ₂ O ₂ 组	84.64 ± 2.96 ^①
H ₂ O ₂ + 5 μmol/L RES组	105.90 ± 1.34 ^②
H ₂ O ₂ + 10 μmol/L RES组	124.70 ± 3.69 ^②
H ₂ O ₂ + 15 μmol/L RES组	145.82 ± 3.40 ^②
F值	211.077
P值	0.000

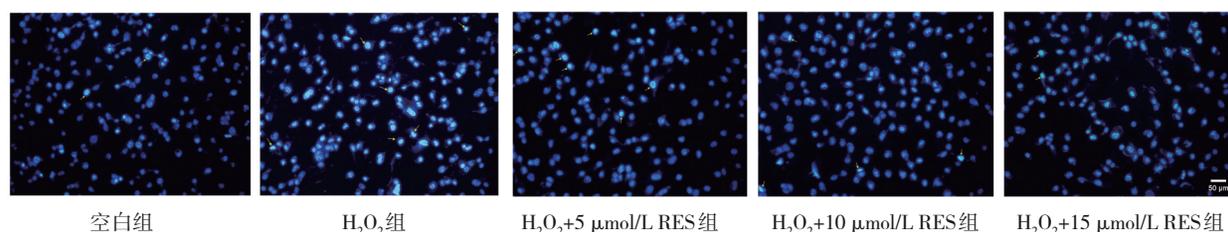
注：①与Control组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

重;与H₂O₂组比较,H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组细胞凋亡率降低($P < 0.05$),随着RES浓度增加,细胞凋亡率降低,说明RES能够降低OS损伤导致的Gc-1 spg细

胞凋亡率。见表7。

2.8 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞凋亡蛋白的影响

空白组、H₂O₂组、H₂O₂+不同浓度RES组的凋亡蛋白Bax、Caspase-3、Bcl-2相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白组比较,H₂O₂组凋亡蛋白Bax和Caspase-3相对表达量均增加($P < 0.05$),Bcl-2相对表达量减少($P < 0.05$);与H₂O₂组比较,H₂O₂+5 μmol/L RES组、H₂O₂+10 μmol/L RES组、H₂O₂+15 μmol/L RES组Bax和Caspase-3相对表达量降低($P < 0.05$),Bcl-2相对表达量增加($P < 0.05$),说明RES在Gc-1 spg细胞OS损伤中有明显的抗凋亡作用,且呈浓度依赖性。见图8和表8。



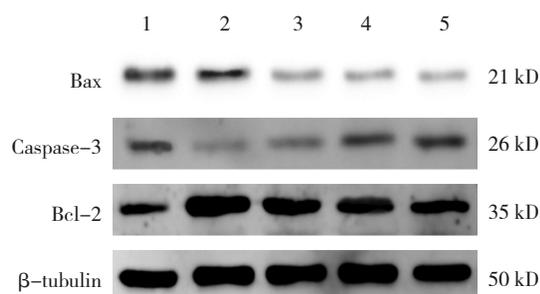
黄色箭头表示大量细胞核皱缩、碎裂,染色程度明显增强

图 7 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞凋亡的影响 (Hoechst 33342 染色×10)

表 7 各组细胞凋亡率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率
空白组	5.21 ± 0.63
H ₂ O ₂ 组	36.94 ± 0.37 ^①
H ₂ O ₂ + 5 μmol/L RES组	26.05 ± 0.26 ^②
H ₂ O ₂ + 10 μmol/L RES组	23.61 ± 0.83 ^②
H ₂ O ₂ + 15 μmol/L RES组	21.12 ± 0.59 ^②
F值	1180.810
P值	0.000

注：①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。



1: 空白组; 2: H₂O₂组; 3: H₂O₂+5 μmol/L RES组; 4: H₂O₂+10 μmol/L RES组; 5: H₂O₂+15 μmol/L RES组。

图 8 RES对H₂O₂处理的Gc-1 spg细胞凋亡蛋白的影响

表 8 各组凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Bcl-2 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Caspase-3	Bcl-2
空白组	1.02 ± 0.02	1.01 ± 0.01	1.10 ± 0.00
H ₂ O ₂ 组	2.12 ± 0.11 ^①	2.57 ± 0.03 ^①	0.25 ± 0.02 ^①
H ₂ O ₂ +5 μmol/L RES组	1.36 ± 0.04 ^②	2.14 ± 0.02 ^②	0.30 ± 0.03
H ₂ O ₂ +10 μmol/L RES组	1.30 ± 0.06 ^②	1.90 ± 0.01 ^②	0.81 ± 0.08 ^②
H ₂ O ₂ +15 μmol/L RES组	1.25 ± 0.01 ^②	1.70 ± 0.00 ^②	1.34 ± 0.01 ^②
F值	133.796	5427.006	372.422
P值	0.000	0.000	0.000

注: ①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与 H₂O₂组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

精子发生过程需要一个相对稳定的氧化环境来维持生殖细胞发育和分化,这是精子能够正常受精的前提^[6]。位于生精上皮基底层的精原细胞是精子的前体细胞,容易受到 OS 损伤,过量 ROS 及抗氧化防御水平降低会导致生殖细胞 OS 损伤和凋亡^[7],进而引发不育。H₂O₂可引起细胞 OS 损伤的情况不同。董晓蕾等^[8]用 600 μmol/L H₂O₂处理 Gc-1 spg 细胞 24 h 复制 OS 损伤细胞模型,李美和等^[9]用 300 μmol/L H₂O₂处理人胎盘滋养层细胞 3 h 复制 OS 损伤细胞模型。本研究用 800 μmol/L H₂O₂处理 Gc-1 spg 细胞 6 h 复制细胞 OS 模型,能较好地体现 RES 的保护作用,这与既往研究存在差异,可能和作用时间不同有关。SOD 和 GSH-Px 是细胞内重要的抗氧化酶,能够反映机体氧化还原平衡状态。LDH 是一种糖酵解酶,当细胞膜发生损伤时,LDH 从细胞内漏出;MDA 是细胞脂质过氧化反应的产物,可加重细胞膜损伤,两者均反应细胞膜系统的损伤程度。精子在附睾成熟过程中,暴露于大量氧化应激源,这些氧化应激源被附睾上皮积极分泌的一系列附睾抗氧化分子抵消,包括过氧化物酶、GSH-Px 和硫氧还蛋白,以及精子膜上特别是顶体、顶体后区域和鞭毛上的 SOD 等,其共同促进 ROS 产生和减少或清除之间的平衡,以允许正常受精^[10]。因此,在精子发生过程中,维持抗氧化酶活性在男性正常受精和妊娠中至关重要。

降低生殖细胞 OS 反应可有效增强生殖细胞活力。RES 是植物多酚类化合物中抗氧化能力最强的物质之一,具有清除氧自由基、抑制脂质过氧化、调节相关酶活性及基因表达等作用^[11],但不同细胞对其的耐受存在差异。有研究表明,10 μmol/L 以上浓

度 RES 会对人永生化表皮细胞活性产生影响^[12],50 μmol/L 浓度 RES 对 H₂O₂导致的精子细胞 OS 损伤保护作用最佳^[13]。本研究结果显示,当 RES 浓度大于 20 μmol/L 时对 Gc-1 spg 细胞活力产生影响,故本研究采用低于 20 μmol/L 以下浓度作为保护浓度。Gc-1 spg 细胞经不同浓度 H₂O₂处理 4、6、8、10 h 后均能不同程度地降低细胞活力,而 5、10、15 μmol/L 浓度 RES 预处理 24 h 均能够抵抗 H₂O₂导致的 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤,且呈浓度依赖性,这和既往研究结果一致^[12]。此外,H₂O₂处理能够显著降低 Gc-1 spg 细胞内 SOD 和 GSH-Px 活性并增加 MDA 和 LDH 水平,而 RES 预处理能够不同程度地逆转上述反应,并呈浓度依赖性,表明 RES 具有抗 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤的能力,提示 RES 可能在精子形成的任何一个过程中提高细胞抗氧化酶活性并发挥抗氧化作用,从而预防和治疗男性不育。

线粒体是精子细胞内重要的供能细胞器,通过氧化磷酸化产生超过 90% 的能量,在维持细胞正常的生理活动中起重要作用。OS 会损伤线粒体导致线粒体功能异常进而影响精子细胞结构和功能^[14],导致男性不育,但精子也需要线粒体产生足够量的 ROS 进行获能,并在精子发生和附睾成熟期间对精子染色质和鞭毛蛋白进行修饰^[15]。因此,防止精子细胞线粒体损伤和恢复受损线粒体是治疗男性不育的关键。线粒体膜电位能较好地反映线粒体功能,其下降是精子细胞凋亡的早期信号。研究表明,H₂O₂诱导视网膜色素上皮细胞和 TM3 睾丸间质细胞 OS 和线粒体损伤,而 RES 具有显著的保护作用^[16-17]。本研究结果显示,与对照组比较,H₂O₂组 Gc-1 spg 细胞线粒体膜电位显著下降,红/绿荧光比值显著降低,提示 H₂O₂诱导 Gc-1 spg 细胞发生早期凋亡,线粒体损伤严重,细胞能量水平显著降低。RES 预处理能明显提高 Gc-1 spg 细胞线粒体膜电位,改善线粒体损伤并可能提高细胞内能量水平,这种保护作用与 RES 浓度有关。线粒体染色也进一步证实了这一结果,这更能说明 RES 在 H₂O₂诱导的 Gc-1 spg 细胞线粒体损伤中的保护作用。

Hoechst 33342 是一种能穿透细胞膜的染料,能够进入细胞核 DNA,正常情况下呈蓝色,当细胞发生凋亡时,膜通透性增强,染色体 DNA 发生改变,染料大量进入,细胞核呈现亮蓝色。本研究结果显示,

H₂O₂处理的 Gc-1 spg 细胞出现大量的细胞核凋亡, 而 RES 低、中、高浓度组中细胞核凋亡率随药物浓度的增大逐渐减小, 表明 RES 能够改善 H₂O₂ 诱导的细胞核凋亡。Bax 和 Bcl-2 是调节线粒体功能及线粒体膜对细胞色素 C 通透性的重要分子, 前者能够形成同源二聚体并定位于线粒体膜, 增加线粒体膜对细胞色素 C 的通透性, 进入胞质的细胞色素 C 能够激活 Caspase-3 并诱导细胞凋亡, 后者能够与 Bax 形成异源二聚体并抑制 Bax 的促凋亡作用^[18]。研究表明, 50 μmol/L 浓度 RES 可增强卵泡颗粒细胞的抗氧化及抗凋亡能力, 改善卵泡颗粒细胞功能并提高妊娠率^[19]。本研究表明, H₂O₂ 处理能显著增加细胞 Bax、Caspase-3 表达并抑制 Bcl-2 表达水平, 而 RES 预处理后细胞中 Bcl-2 的表达显著增高, Bax、Caspase-3 的表达显著降低, 且该效果与 RES 浓度存在密切关联, 进一步表明 RES 能够抑制 H₂O₂ 诱导的 Gc-1 spg 细胞凋亡。

综上所述, H₂O₂ 处理能降低 Gc-1 spg 细胞活力, 并诱导细胞 OS 损伤及凋亡, 降低细胞的抗氧化能力和线粒体膜电位, 损伤线粒体增加细胞死亡率, 这将会影响精子发生过程, 损伤精子细胞并降低精子活力, 进而导致男性不育。一定浓度的 RES 能够保护 H₂O₂ 诱导的 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤, 提高生殖细胞活力, 有望成为抗生殖损伤新药。后续将进一步研究 RES 在 H₂O₂ 诱导的 Gc-1 spg 细胞 OS 损伤保护作用中的分子机制, 为临床治疗生殖细胞 OS 及线粒体损伤相关疾病提供理论依据。

参 考 文 献 :

- [1] CHOY J T, EISENBERG M L. Male infertility as a window to health[J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(5): 810-814.
- [2] 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.
- [3] AITKEN R J, SMITH T B, JOBLING M S, et al. Oxidative stress and male reproductive health[J]. *Asian J Androl*, 2014, 16(1): 31-38.
- [4] 秦欣然, 薛春然, 彭麒桦, 等. 氧化应激对男性(雄性)生殖系统的影响[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2018, 37(6): 492-497.
- [5] SAMUEL V P, GUPTA G, DAHIYA R, et al. Current update on preclinical and clinical studies of resveratrol, a naturally occurring phenolic compound[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2019, 29(6): 529-537.
- [6] BARATI E, NIKZAD H, KARIMIAN M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(1): 93-113.
- [7] NAZERI T, HEDAYATPOUR A, KAZEMZADEH S, et al. Antioxidant effect of melatonin on proliferation, apoptosis, and oxidative stress variables in frozen-thawed neonatal mice spermatogonial stem cells[J]. *Biopreserv Biobank*, 2022, 20(4): 374-383.
- [8] 董晓雷, 韩晶晶, 杨方浩, 等. 藻蓝蛋白对小鼠精原细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J]. *精准医学杂志*, 2021, 36(2): 161-164.
- [9] 李美和, 党慧敏, 刘艳巧, 等. H₂O₂ 诱导建立 HTR-8/SVneo 胎盘滋养细胞氧化应激模型[J]. *中国妇幼健康研究*, 2019, 30(5): 596-603.
- [10] O'FLAHERTY C, MATSUSHITA-FOURNIER D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa[J]. *Biol Reprod*, 2017, 97(4): 577-585.
- [11] de la LASTRA C A, VILLEGAS I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 5): 1156-1160.
- [12] 高进涛, 何荣安, 莫文飞, 等. 白藜芦醇对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2019, 16(5): 88-92.
- [13] 吴海峰, 李曼, 李玉静, 等. 白藜芦醇通过降低氧化应激改善过氧化氢诱导精子活力和 DNA 损伤[J]. *中国男科学杂志*, 2021, 35(6): 24-28.
- [14] DURAIRAJANAYAGAM D, SINGH D, AGARWAL A, et al. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction[J]. *Andrologia*, 2021, 53(1): e13666.
- [15] GIBB Z, BLANCO-PRIETO O, BUCCI D. The role of endogenous antioxidants in male animal fertility[J]. *Res Vet Sci*, 2021, 136: 495-502.
- [16] KIM M H, KIM D H, YANG S G, et al. Improved effect of a mitochondria-targeted antioxidant on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2021, 22(1): 7.
- [17] GREIFOVÁ H, JAMBOR T, TOKÁROVÁ K, et al. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in TM3 Leydig cells *in vitro*[J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2020, 55(5): 585-595.
- [18] SHAN Q Q, LI N, ZHANG F, et al. Resveratrol suppresses annulus fibrosus cell apoptosis through regulating oxidative stress reaction in an inflammatory environment[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 9100444.
- [19] 邢鹏, 张娜, 赵静云, 等. 白藜芦醇拮抗卵泡颗粒细胞氧化应激的损伤[J]. *解剖学报*, 2020, 51(2): 189-194.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 石拴霞, 阎一鑫, 宋诚, 等. 白藜芦醇对 Gc-1 spg 细胞氧化应激损伤的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(19): 46-54.

Cite this article as: SHI S X, YAN Y X, SONG C, et al. Effect of resveratrol on oxidative stress injury of Gc-1 spg cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(19): 46-54.