

淫羊藿苷对博来霉素诱导的GC-1细胞 DNA损伤的保护作用

赵雪怡 赵海霞 杨圆 杨思琪 袁丁 张长城*

(三峡大学医学院, 宜昌 443002)

摘要 该文旨在探究淫羊藿苷(icariin, ICA)对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导的小鼠GC-1精原细胞DNA损伤的保护作用及其分子机制。将GC-1细胞分为正常对照组、BLM处理组(10 $\mu\text{g/mL}$)、BLM+不同浓度(0.5、1、2和4 $\mu\text{mol/L}$) ICA组。用不同浓度ICA预保护GC-1细胞12 h后加入BLM继续处理6 h, 收集细胞, Western blot法检测DNA损伤相关蛋白 $\gamma\text{-H2AX}$ 、DNA损伤修复相关通路蛋白(p-ATM、p-Chk1、p-P53和P21)、碱基切除修复(base excision repair, BER)相关通路蛋白(OGG1、APE1和XRCC1)的表达水平; 免疫荧光技术检测 $\gamma\text{-H2AX}$ 、8-OHdG表达与定位。结果表明, 与正常对照组相比, BLM处理组中 $\gamma\text{-H2AX}$ 、p-ATM、p-Chk1、p-P53、P21、OGG1、APE1和XRCC1的蛋白表达水平均显著上升, 而ICA可浓度依赖性地下调BLM诱导的 $\gamma\text{-H2AX}$ 、p-ATM、p-Chk1、p-P53、P21、OGG1、APE1和XRCC1蛋白表达水平。免疫荧光结果显示, 与正常对照组相比, BLM处理组中 $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞数量和8-OHdG表达量呈上升的趋势, 而不同浓度ICA均可下调上述BLM诱导的 $\gamma\text{-H2AX}$ 和8-OHdG表达水平。综上所述, ICA能够改善BLM诱导的GC-1细胞DNA损伤, 并下调ATM/Chk1通路和BER信号通路活性。

关键词 淫羊藿苷; ATM/Chk1; 碱基切除修复; 博来霉素; GC-1细胞; DNA损伤

Protective Effect of Icariin on DNA Damage Induced by Bleomycin in GC-1 Cells

ZHAO Xueyi, ZHAO Haixia, YANG Yuan, YANG Siqu, YUAN Ding, ZHANG Changcheng*

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

Abstract This study aims to explore the protective effect of ICA (icariin) on BLM (bleomycin)-induced DNA damage in GC-1 cells and its molecular mechanism. GC-1 cells were divided into control group, 10 $\mu\text{g/mL}$ BLM-treated group, BLM+ICA (0.5, 1, 2 and 4 $\mu\text{mol/L}$) groups. GC-1 cells were pretreated with ICA at different concentrations for 12 h and then added with BLM for another 6 h. Cells were then harvested, and the protein expression levels of DNA damage related proteins $\gamma\text{-H2AX}$, DNA damage repair related pathway proteins (p-ATM, p-Chk1, p-P53 and P21) and BER (base excision repair)-related pathway proteins (OGG1, APE1 and XRCC1) were detected by Western blot analysis. The expression and localization of $\gamma\text{-H2AX}$ and 8-OHdG were measured by immunofluorescence analysis. Compared with the control group, the protein expression levels of $\gamma\text{-H2AX}$, p-ATM, p-Chk1, p-P53, P21, OGG1, APE1 and XRCC1 were significantly increased in BLM-treated group. Conversely, ICA

收稿日期: 2022-03-20 接受日期: 2022-05-14

国家自然科学基金(批准号: 82074205、81873077)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18671769696, E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn

Received: March 20, 2022

Accepted: May 14, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82074205, 81873077)

*Corresponding author. Tel: +86-18671769696, E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn

diminished the expression levels of γ -H2AX, p-ATM, p-Chk1, p-P53, P21, OGG1, APE1 and XRCC1 in a concentration-dependent manner. The results of immunofluorescence further showed that the number of γ -H2AX positive cells and expression of 8-OHdG were increased in BLM-treated group relative to the control group, whereas, the expression levels of γ -H2AX and 8-OHdG were down-regulated by ICA at different concentrations. In conclusion, ICA attenuates DNA damage induced by BLM in GC-1 cells and down-regulates the ATM/Chk1 and BER signaling pathways.

Keywords icariin; ATM/Chk1; base excision repair; bleomycin; GC-1 cells; DNA damage

男性不育是男科常见的疾病之一,研究发现在全球范围内,超过10%的夫妇无法生育,其中男性因素占了一半^[1]。男性精子发生主要是从精原细胞有丝分裂、精母细胞减数分裂到最终形成精子的过程,精原细胞的减少或功能受损会破坏精子发生,导致男性生育能力低下或不育。精原细胞由于其高度的细胞分裂活性成为多种外源因素作用的靶点,而DNA损伤则是精原细胞功能受损的重要原因之一^[2]。研究发现,硫酸铜通过促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成和抑制DNA损伤修复途径来介导生殖细胞DNA损伤,进而导致精子活力下降、畸形率增加,损害雄性生殖功能^[3]。低剂量电离辐射可导致体内未分化精原细胞的DNA损伤,并以caspase-3依赖途径诱导细胞凋亡,进一步影响精子发生^[4]。因此,减轻精原细胞DNA损伤可能是防治男性生殖功能障碍的有效措施之一。

淫羊藿,别名仙灵脾,是临床常用的传统补益中药。据2020版中国药典记载,淫羊藿主要功能有温补肝肾、强健筋骨、祛风湿等。目前研究表明,淫羊藿具有清除自由基、抗氧化、抑制DNA损伤、调节雄性生殖功能的作用^[5-6],其主要活性成分为淫羊藿苷(icariin, ICA)。研究报道,ICA可以通过抵抗氧化损伤、减少生精细胞凋亡来改善由尼古丁、酒精所致的睾丸损伤^[7-8]。此外,ICA还可显著降低衰老小鼠肝、肾、肺、心脏中的 γ -H2AX表达量,从而减轻衰老相关的DNA损伤^[9]。本课题组前期亦发现,ICA可通过上调Nrf2/HO-1通路相关蛋白水平增强睾丸组织抗氧化能力,改善自然衰老大鼠睾丸生殖细胞DNA损伤,从而延缓衰老引起的睾丸生精功能衰退^[10]。以上研究表明,ICA可通过改善生殖细胞DNA损伤从而减轻睾丸生精功能障碍。

博来霉素(bleomycin, BLM)是一种化疗药物,可被用于睾丸癌、头颈部鳞癌等的治疗,同时也可诱导小鼠精原细胞DNA损伤,影响精子发生^[11-12]。然而,

ICA能否改善由化疗药物BLM所致的精原细胞DNA损伤还有待研究。本实验以BLM处理的GC-1细胞为模型,探究ICA对精原细胞DNA损伤的保护作用及其机制,从而为ICA用于临床治疗由精原细胞DNA损伤所致的生精功能障碍提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

GC-1细胞株购自上海通派生物细胞库。

1.2 试剂

ICA(纯度98.61%,批号160920)购自成都植标化纯生物技术有限公司;BLM(批号19012311)购自杭州瀚晖制药有限公司;0.25%胰蛋白酶(批号2009110407)购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;DMEM/F12(批号8121045)购自美国Gibco公司;胎牛血清(货号A0500-3011)购自德国Cegrogen Biotech公司;MTT(货号M8180)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA试剂盒(批号P1511)购自北京普利莱基因技术有限公司; β -actin、p-P53(Ser15)、p-Chk1(Ser345)、p-ATM(Ser1981)抗体(货号分别为#4970、#12571、#2348、#4526)购自美国Cell Signaling Technology公司; γ -H2AX、8-OHdG抗体(货号分别为SC-101696, SC-66036)购自美国Santa Cruz公司;P21、XRCC1抗体(货号分别为ab109199, ab1838)购自美国Abcam公司;OGG1、APE1抗体(货号分别为NB100-106、NB100-116)购自美国Novus公司;DAPI购自美国Life Technologies公司;HRP标记的羊抗鼠和羊抗兔的IgG二抗(货号分别为115035003、152203)及Alexa Fluor 594驴抗兔和驴抗鼠的IgG(H+L)二抗(货号分别为154867、153991)购自美国Jackson Immuno Research公司。

1.3 主要仪器

Forma3121型二氧化碳培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CKX41型光学倒置显微镜购自日本Olympus公司;CT15RT型高速冷冻离心机购自

上海天美生化仪器有限公司; RX50荧光显微镜购自北京舜宇光学仪器有限公司; TYPE 1500-458型全波长酶标仪购自美国Thermo Electron公司; DYY-6C型电泳仪购自北京六一仪器厂; ChemiScope 6100化学发光成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.4 细胞培养

使用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基复苏细胞,在37℃、5% CO₂培养箱中培养细胞,待细胞汇合度达到80%时,将细胞和新鲜培养基以1:4传代培养。

1.5 药物配制

50 mmol/L ICA(母液): 称取3.38 mg ICA粉末溶于100 μL细胞级DMSO中,涡旋后超声处理30 min以上再次涡旋,待ICA完全溶解即可。8.6 mg/mL BLM(母液): 将1 mL无菌PBS注入含有8.6 mg BLM的安瓿中,使之完全溶解。注意整个操作过程均需避光。

1.6 MTT法检测GC-1精原细胞活力

MTT法测定细胞活力原理: 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将外源性MTT还原为可溶于有机溶剂的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中,而死细胞则无此功能^[13-14]。将GC-1细胞制成细胞悬液,以每孔100 μL培养基、5×10³个细胞接种至96孔板中。于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养,细胞贴壁后用ICA(0、0.125、0.25、0.5、1、2、4和8 μmol/L)预处理12 h,弃去旧培养基,正常对照组中加入新鲜培养基,BLM处理组、BLM+ICA组中加入终浓度为10 μg/mL的BLM以及含有ICA(0、0.125、0.25、0.5、1、2、4和8 μmol/L)的新鲜培养基,在共处理6 h后每孔分别加入20 μL MTT(5 mg/mL),避光培养4 h后,避开底部结晶吸去上清,每孔分别加入150 μL DMSO,振荡10 min,甲瓚充分溶解后用酶联免疫检测仪于490 nm波长处测量吸光度(D)值,计算各组细胞活力,确定ICA保护浓度。

1.7 光镜下观察GC-1细胞形态和数量变化

制备GC-1细胞悬液,以每孔1 mL培养基、5×10⁴个细胞接种至6孔板中。次日按照1.6中步骤处理GC-1细胞后,光镜下观察细胞形态并拍照。弃去培养基,PBS洗涤后吸干残余液体,每孔加入150 μL胰酶,待大部分细胞脱落后,加入1 mL新鲜培养基终止消化,轻轻吹打并收集细胞悬液,吸取10 μL悬液至细胞计数板上,拍照,统计4个象限中的细胞数量并计算其均值。

1.8 Western blot法检测蛋白表达水平

制备GC-1细胞悬液,以每孔1 mL培养基、5×10⁴

个细胞接种至6孔板中。次日按照1.6中步骤处理GC-1细胞后,弃培养基,PBS洗涤并吸尽残余液体,每孔加入100 μL按比例配制的RIPA裂解液,冰上裂解30 min。用细胞刮收集细胞于1.5 mL EP管中,每隔15 min剧烈振荡30 s,重复3次,之后于4℃、12 000 r/min离心15 min即可获得上清总蛋白。经电泳、转膜、封闭后,4℃冰箱过夜孵育一抗(γ-H2AX、p-ATM、p-Chk1、p-P53、P21、OGG1、APE1、XRCC1, 1:1 000),次日洗涤后室温下孵育二抗(1:3 000),孵育结束后,洗涤PVDF膜并将其置于化学发光仪中,滴加显影液后曝光并保存图片。

1.9 免疫荧光技术检测γ-H2AX、8-OHdG蛋白表达和定位

制备GC-1细胞悬液,预先将无菌圆爬片放入24孔板中,再将细胞接种到爬片上。次日按照1.6中步骤处理GC-1细胞后,弃培养基,PBS洗涤细胞3次。最后一次吸尽残余PBS,每孔加入200 μL 4%的多聚甲醛固定细胞30 min,用PBS洗涤细胞3次,每次5 min。每孔加入200 μL 0.1%的Triton X-100常温孵育细胞15 min,PBS洗涤细胞。每孔加入5% BSA常温孵育细胞1 h,弃去溶液,加入一抗(γ-H2AX、8-OHdG, 1:200),于4℃冰箱过夜。次日各步骤均在室温下进行,复温1 h后用PBS洗涤细胞,加入Alexa Fluor 594二抗(1:200)避光孵育1 h,PBS洗涤细胞,加入DAPI(0.5 μg/mL)避光孵育5 min,PBS洗涤细胞并吸尽残余液体,取出玻片加抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察并拍照。γ-H2AX的荧光定量分析: 细胞核中超过4个焦点的细胞被认为是γ-H2AX阳性细胞,统计每组100个细胞中γ-H2AX阳性细胞的数量^[15]。8-OHdG的荧光定量分析: 每组随机取3个视野,分析每个视野中细胞的平均光密度后计算3个视野的光密度均值,以正常对照组的值归一计算每组的相对光密度^[16]。

1.10 统计学分析

所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,Western blot和免疫荧光数据采用Image J软件扫描分析,实验结果采用GraphPad Prism 5.0进行统计学分析,比较组间差异采用One-Way ANOVA, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA对GC-1细胞增殖活性的影响

MTT法检测不同浓度ICA处理GC-1细胞18 h后

的细胞活力。当ICA浓度不超过5 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对细胞活力无显著影响;而当ICA浓度为8 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,细胞活力显著下降(图1)。因此选择8 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度的ICA来研究其对BLM诱导的GC-1细胞的保护作用。

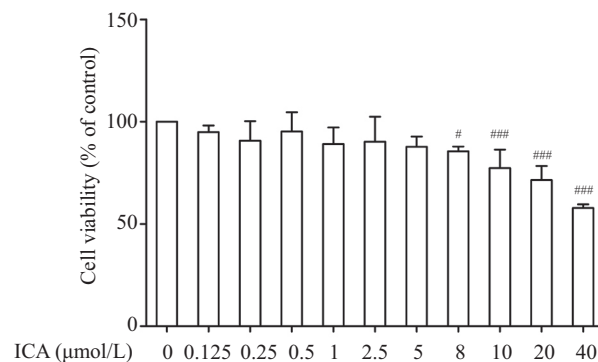
本课题组通过前期实验发现用不同浓度BLM处理GC-1细胞不同时间后,10 $\mu\text{g/mL}$ 的BLM处理组DNA损伤修复相关蛋白表达水平达到最高,因此选择10 $\mu\text{g/mL}$ BLM建立DNA损伤模型^[17]。采用8 $\mu\text{mol/L}$ 以下不同浓度的ICA预保护GC-1细胞12 h后,加入BLM共处理6 h,测定细胞活力。当ICA浓度是4 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对GC-1细胞活力有保护作用,8 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞活力有抑制作用($P<0.05$) (图2)。因此后续选择0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的ICA浓度,研究ICA对BLM诱导的GC-1细胞DNA损伤的保护作用及机制。

2.2 ICA改善BLM诱导的GC-1细胞形态变化和数量减少

光镜下发现,与正常对照组相比,BLM处理后的GC-1细胞数量减少($P<0.01$),形态变化明显,出现回缩、变圆和体积变小等改变。而不同浓度的ICA干预可以明显改善GC-1细胞形态变化和数量减少(图3)。

2.3 ICA明显下调BLM诱导的GC-1细胞 $\gamma\text{-H2AX}$ 蛋白表达量

用Western blot和免疫荧光法检测DNA损伤标志物 $\gamma\text{-H2AX}$ 的表达水平,结果如图4A所示,与正常对照组相比,BLM处理后 $\gamma\text{-H2AX}$ 的蛋白表达量明显增加($P<0.001$);而ICA可浓度依赖性地显著降低 $\gamma\text{-H2AX}$ 蛋白表达量。免疫荧光结果亦显示,随着ICA浓度增加,BLM诱导的 $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞数量逐渐减少(图4B和图4C)。

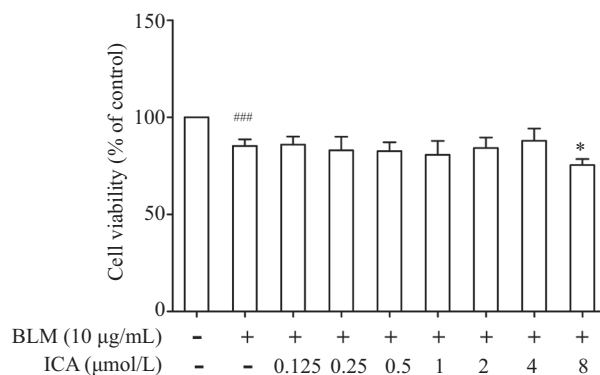


$P<0.05$, ### $P<0.001$, 与正常对照组相比。

$P<0.05$, ### $P<0.001$ compared with control group.

图1 ICA对GC-1细胞活力的影响

Fig.1 Effect of ICA on the viability of GC-1 cells

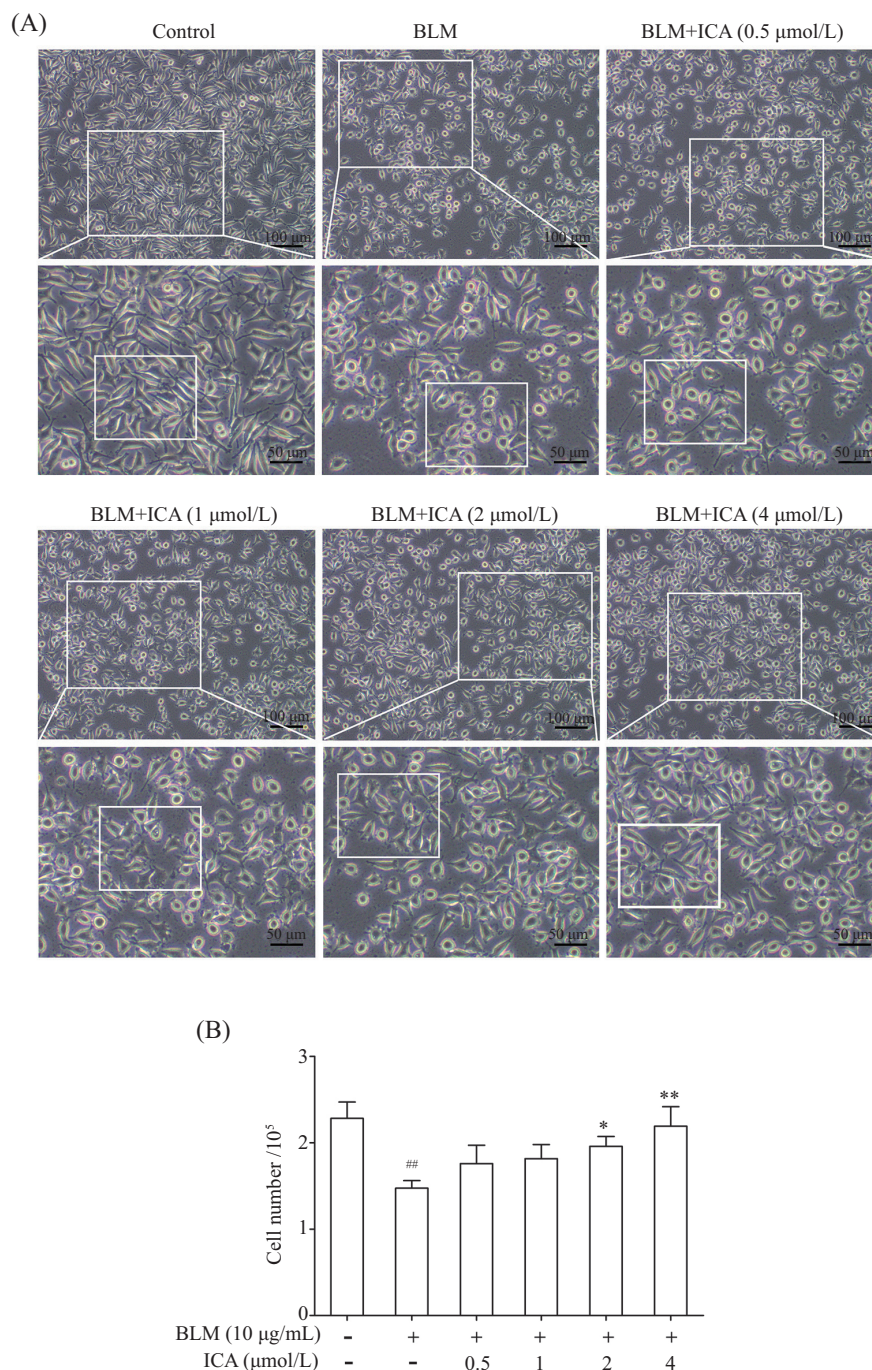


$P<0.001$, 与正常对照组相比; * $P<0.05$, 与BLM处理组相比。

$P<0.001$ compared with control group; * $P<0.05$ compared with BLM-treated group.

图2 ICA对经BLM处理的GC-1细胞活力的影响

Fig.2 Effect of ICA on the viability of BLM-treated GC-1 cells



A: GC-1细胞形态的代表性图像(上排图片为100×镜下细胞形态;下排图片对应放大的框内区域); B: GC-1细胞数量; ^{##} $P < 0.01$,与正常对照组比较; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$,与BLM处理组比较。

A: representative images of the GC-1 cell morphology (upper images demonstrate the cell morphological under 100×; lower images show the magnified regions of the boxed areas); B: the number of GC-1 cells. ^{##} $P < 0.01$ compared with control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ compared with BLM-treated group.

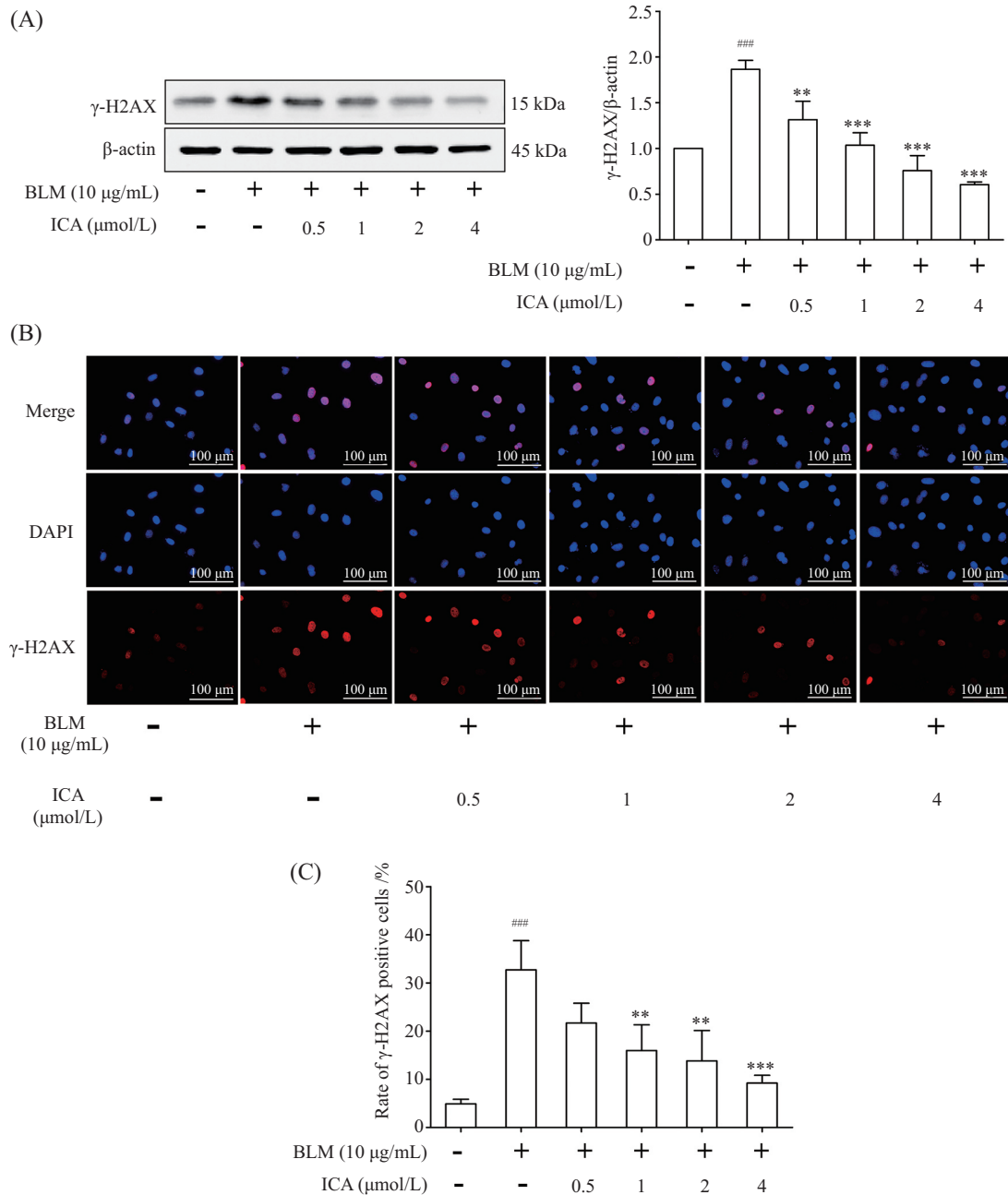
图3 ICA改善BLM诱导的GC-1细胞形态变化和数量减少

Fig.3 ICA improved the cell morphology and decreased numbers of BLM-treated GC-1 cells

2.4 ICA抑制BLM诱导的GC-1细胞p-ATM和p-Chk1蛋白表达

随后,用Western blot技术测定DNA损伤修复相关通路蛋白p-ATM、p-Chk1的表达水平。结果

如图5所示,与正常对照组比较,BLM处理组的p-ATM($P < 0.001$)和p-Chk1($P < 0.01$)蛋白表达水平显著上升;BLM+不同浓度ICA组的p-ATM、p-Chk1蛋白表达水平显著下降。以上结果表明,ICA改善BLM



A: Western blot检测 $\gamma\text{-H2AX}$ 蛋白的表达水平; B: 免疫荧光法检测 $\gamma\text{-H2AX}$ 蛋白的表达和定位; C: $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞的定量分析; ### $P<0.001$, 与正常对照组比较; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与BLM处理组比较。

A: the expression levels of $\gamma\text{-H2AX}$ was detected by Western blot; B: the expression and localization of $\gamma\text{-H2AX}$ were detected by immunofluorescence assay; C: quantitative analysis of the $\gamma\text{-H2AX}$ positive cells. ### $P<0.001$ compared with control group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with BLM-treated group.

图4 ICA明显下调BLM诱导的GC-1细胞 $\gamma\text{-H2AX}$ 蛋白表达量

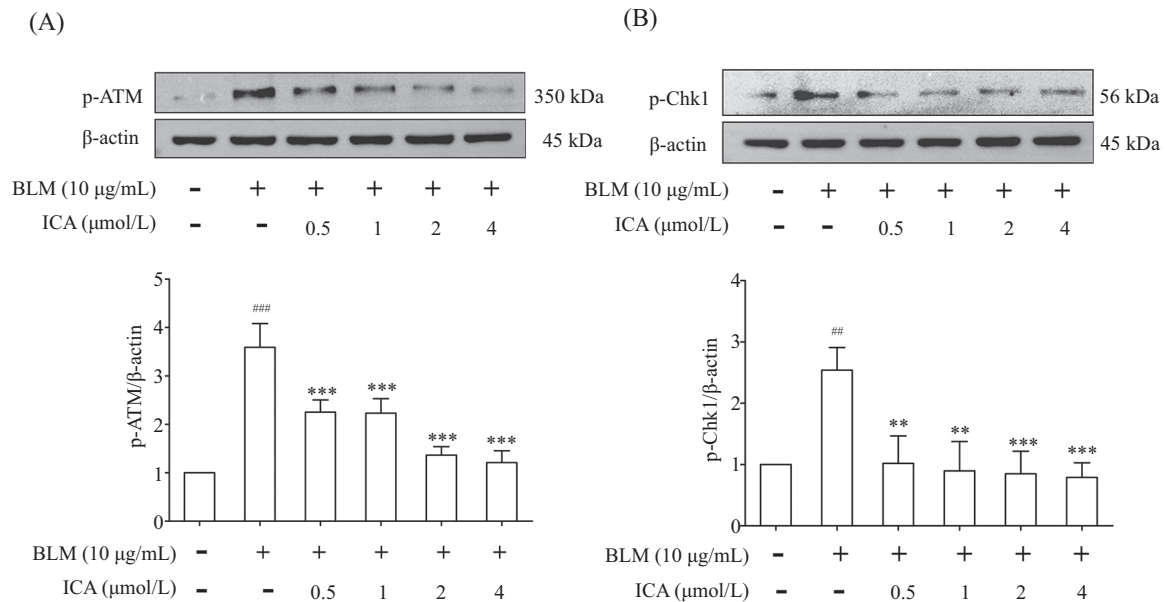
Fig.4 ICA significantly downregulated the protein expression level of $\gamma\text{-H2AX}$ in BLM-treated GC-1 cells

诱导的DNA损伤可能与调节ATM/Chk1通路相关。

2.5 ICA可下调BLM诱导的GC-1细胞p-P53和P21蛋白表达量

进一步检测ATM/Chk1通路下游相关分子P53和P21的表达水平, Western blot结果显示, 与正常对

照组比较, BLM处理组的p-P53和P21蛋白表达水平显著上升($P<0.001$)。与BLM处理组相比, BLM+不同浓度ICA组的p-P53和P21蛋白表达水平显著下调(图6)。提示ICA可能通过调节ATM/Chk1/P53通路改善经BLM处理的GC-1细胞DNA损伤。

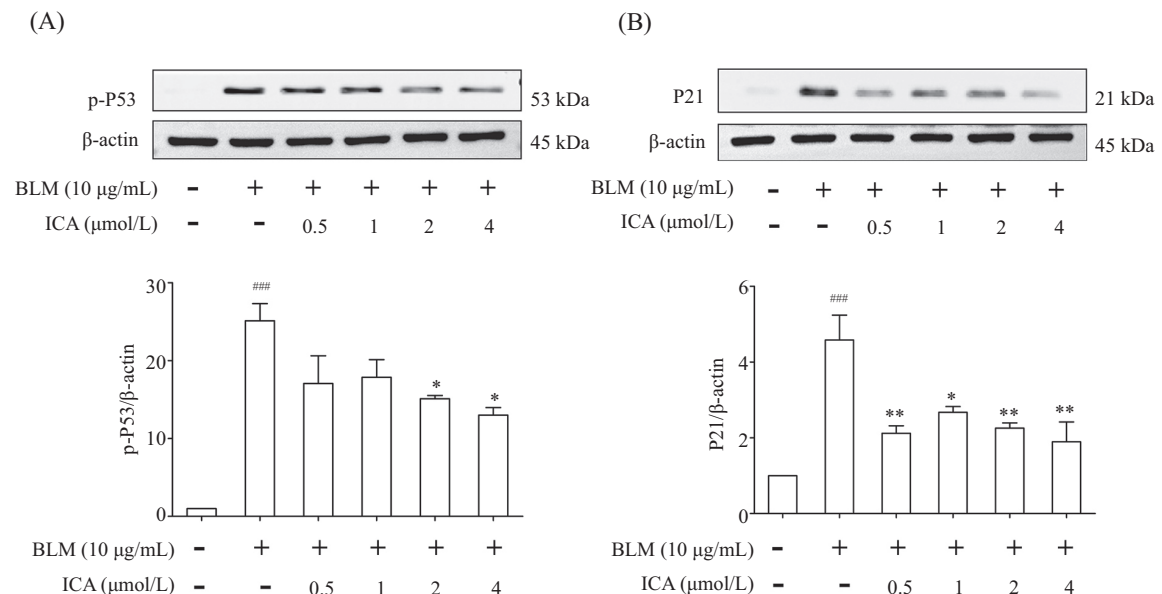


A: Western blot检测p-ATM蛋白的表达水平; B: Western blot检测p-Chk1蛋白的表达水平; ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$, 与正常对照组比较; ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$, 与BLM处理组比较。

A: the expression level of p-ATM was detected by Western blot; B: the expression level of p-Chk1 was detected by Western blot. ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$ compared with control group; ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ compared with BLM-treated group.

图5 ICA抑制BLM诱导的GC-1细胞p-ATM和p-Chk1蛋白表达

Fig.5 ICA inhibited the protein expression levels of p-ATM and p-Chk1 in BLM-treated GC-1 cells



A: Western blot检测p-P53蛋白的表达水平; B: Western blot检测P21蛋白的表达水平; ^{###} $P<0.001$, 与正常对照组比较; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 与BLM处理组比较。

A: the expression level of p-P53 was detected by Western blot; B: the expression level of P21 was detected by Western blot. ^{###} $P<0.001$ compared with control group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ compared with BLM-treated group.

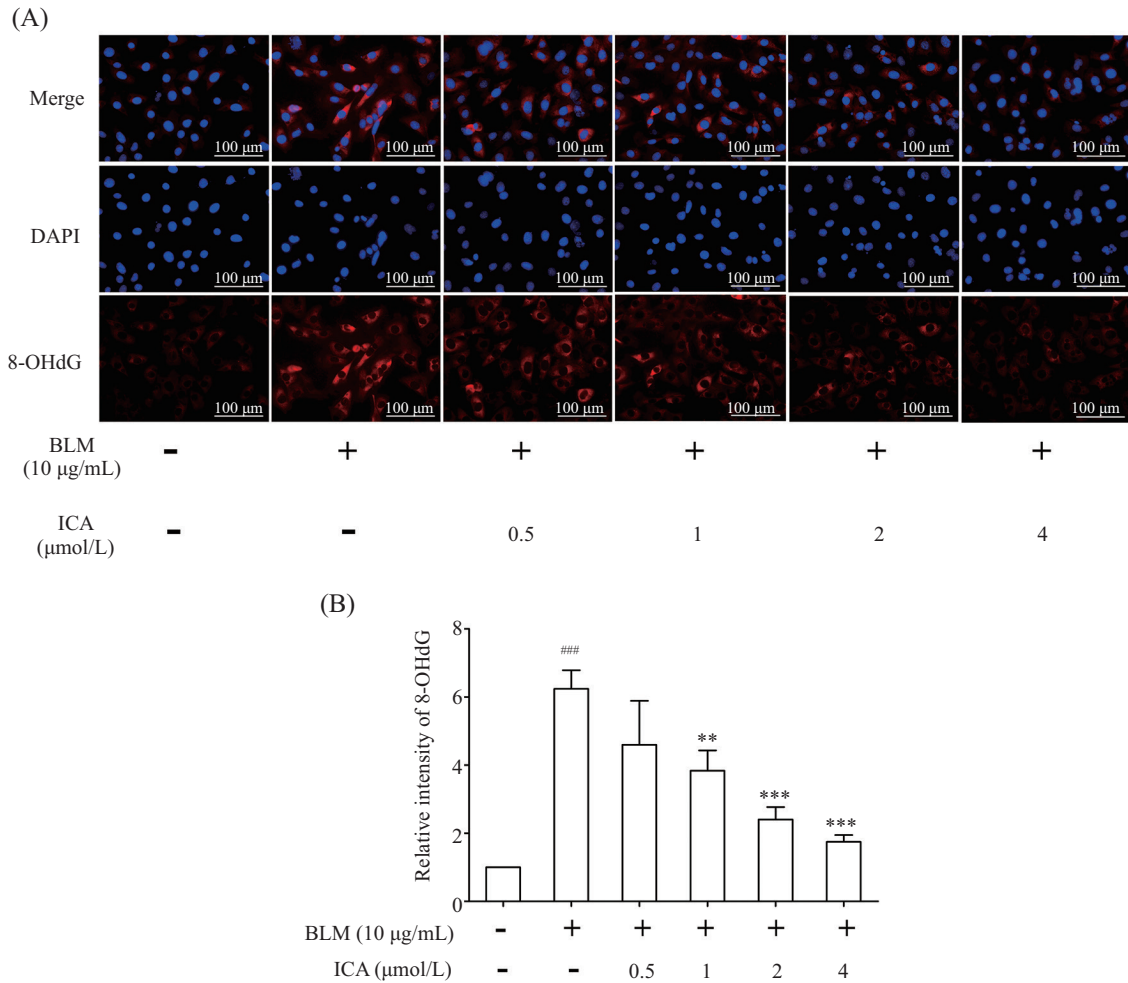
图6 ICA可下调BLM诱导的GC-1细胞p-P53和P21蛋白表达

Fig.6 ICA downregulated the protein expression levels of p-P53 and P21 in BLM-treated GC-1 cells

2.6 ICA可明显减少BLM诱导的GC-1细胞8-OHdG表达量

免疫荧光法检测DNA氧化损伤标志物8-OHdG

的表达和定位, 结果如图7所示, 与正常对照组相比, BLM处理组细胞质中8-OHdG的表达量显著增加 ($P<0.001$), 并且在细胞核中累积; 随着ICA浓度增加,



A: 免疫荧光法检测8-OHdG的表达和定位; B: 8-OHdG荧光强度的半定量分析; ### $P<0.001$, 与正常对照组比较; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与BLM处理组比较。

A: the expression and localization of 8-OHdG were detected by immunofluorescence assay; B: semi-quantitative analysis of the fluorescent intensity of 8-OHdG. ### $P<0.001$ compared with control group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with BLM-treated group.

图7 ICA可明显减少BLM诱导的GC-1细胞8-OHdG表达量

Fig.7 ICA decreased 8-OHdG expression in BLM-treated GC-1 cells

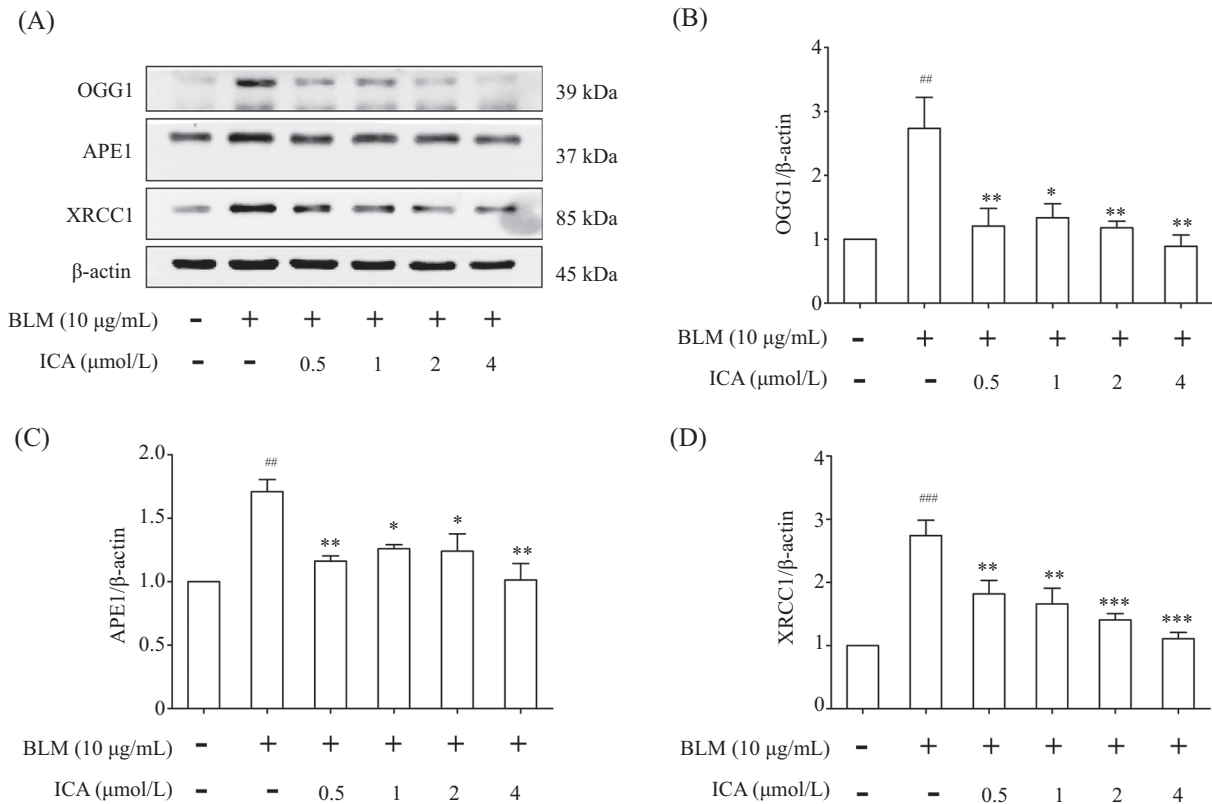
GC-1细胞的细胞核和细胞质中8-OHdG表达量显著降低。

2.7 ICA减少BLM诱导的GC-1细胞OGG1、APE1和XRCC1蛋白表达量

为了进一步探索ICA改善BLM诱导的GC-1细胞DNA氧化损伤的机制,采用Western blot法检测BER通路相关蛋白OGG1、APE1和XRCC1的表达水平。与正常对照组相比,BLM处理组中OGG1($P<0.01$)、APE1($P<0.01$)和XRCC1($P<0.001$)蛋白表达量显著上升;与BLM处理组相比,ICA不同浓度组OGG1、APE1和XRCC1蛋白表达量下调(图8)。以上结果提示,ICA可以改善经BLM处理的GC-1细胞DNA损伤,其机制可能与调节BER通路有关。

3 讨论

精子发生是二倍体精原细胞通过自我更新及减数分裂发育为单倍体精子的过程。精原细胞位于生精小管的基膜上,是所有男性生殖细胞的前体,可通过有丝分裂进行持续的自我更新以调节细胞数量,确保生殖细胞和支持细胞之间的平衡。现有研究表明,ROS、细胞凋亡等因素都可以诱导睾丸生精细胞DNA损伤,引起精子发生障碍,从而导致男性生育力降低^[2,18]。BLM作为一种糖肽类抗癌抗生素,在临床上可与其他药物联合用于治疗睾丸癌、头颈部癌等,其作用机制是进入细胞被活化后破坏DNA的G-C碱基结构,使得自由基中间体形成,促使超氧和羟自由基产生,引起DNA链断裂,进而导致



A: Western blot不同条带图; B~D: Western blot条带灰度值分析; [#] $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.001$, 与正常对照组比较; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$, 与BLM处理组比较。

A: Western blot different strip images; B-D: analysis of Western blot strip gray value. [#] $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.001$ compared with control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ compared with BLM-treated group.

图8 ICA减少BLM诱导的GC-1细胞OGG1、APE1和XRCC1蛋白表达

Fig.8 ICA downregulated the protein expression levels of OGG1, APE1 and XRCC1 in BLM-treated GC-1 cells

细胞周期阻滞、细胞凋亡和细胞死亡。其中, 诱导细胞DNA双链断裂(DNA double-strand break, DSB)是BLM抗肿瘤的重要途径^[19]。本课题组前期已成功建立BLM诱导的GC-1细胞DNA损伤模型^[17], 因此本研究选择BLM模型来探究ICA是否可以改善GC-1细胞DNA损伤。

组蛋白H2AX作为H2A家族成员之一, 在DNA受到攻击特别是DSB早期阶段, H2AX的Ser139位点可被ATM磷酸化形成 γ -H2AX并富集到断裂区; 因为 γ -H2AX形成的焦点数与DSB数量呈对应关系, 所以 γ -H2AX可作为DSB关键标志物^[20]。研究表明, H2AX磷酸化后可招募DNA修复、染色质重塑因子等到DNA断裂位点, 参与损伤修复^[21]。本文采用Western blot、免疫荧光法观察ICA对GC-1细胞 γ -H2AX蛋白表达的影响。结果显示, 与正常对照组相比, BLM组 γ -H2AX蛋白表达量和阳性细胞数量显著上升; 与BLM组相比, 不同浓度的ICA处理后

γ -H2AX蛋白表达量和阳性细胞数随浓度增加持续下调。以上结果表明, ICA可改善BLM诱导的GC-1细胞DNA损伤, 降低 γ -H2AX蛋白表达量。

由于DSB诱导H2AX的磷酸化主要通过ATM激酶介导^[20], 一些内外源性因素如衰老、分裂, 以及化学暴露、辐射的损伤等, 可诱导DSB激活DNA损伤应答(DNA damage response, DDR)反应, 募集相关修复信号分子至DNA断裂处, 使得以二聚体形式存在于细胞核中的ATM Ser1981位点自磷酸化和单体化, 激活下游的H2AX蛋白、Chk1信号分子, 最后通过作用于P53蛋白调控细胞周期、DNA修复和细胞凋亡, 以维持基因组的完整性和细胞的正常功能^[22]。研究发现, 姜黄素能将人胰腺癌细胞阻滞在G₂/M期并诱导其显著凋亡; 而ATM或Chk1被特异性干扰后, 可以使细胞免受姜黄素介导的G₂/M期阻滞及凋亡^[23]。本研究结果显示, BLM+不同浓度ICA组均可以下调p-ATM、p-Chk1蛋白表达水平, 这进一步说明ICA对BLM诱导的

DNA损伤有保护作用。而为应对DNA损伤, P53活化后可继续激活下游P21基因的表达, 从而抑制周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的活性, 阻止细胞从G₁期过渡到S期, 减少受损DNA的复制与积累; 若DNA损伤严重无法修复, P53也可直接诱导细胞凋亡^[24]。研究发现, 顺铂可诱导肾组织中P53和 γ -H2AX的磷酸化, 显著上调下游P21、PUMA、Bax蛋白和mRNA的表达量, Pyxinol可以通过抑制P53的激活减轻DNA损伤从而改善肾小管细胞凋亡^[25]。本研究发现, ICA干预BLM诱导的GC-1细胞后p-P53、P21蛋白表达水平均下降。以上结果提示, BLM可诱导GC-1细胞发生DNA损伤, 上调p-P53和P21表达量, 避免受损DNA复制积累; 而ICA可以减轻DNA损伤, 通过ATM/Chk1通路下调p-P53和P21表达量, 以恢复正常的有丝分裂。

研究显示, 细胞在外源性化学药物如BLM、依托泊苷等持续刺激下, 会产生过量ROS攻击DNA碱基, 形成多种氧化产物, 这些产物中最为常见的8-OHdG是鸟嘌呤第八位碳原子经氧化修饰形成的, 目前被认为是DNA氧化损伤的标志物之一^[26]。研究发现, 高剂量邻苯二甲酸二异壬酯暴露可诱导ROS蓄积, 致使8-OHdG形成、DNA和蛋白质交联增多, 造成睾丸组织氧化和病理损伤^[27]。本实验采用免疫荧光技术检测ICA对GC-1细胞8-OHdG表达和定位的影响, 发现ICA干预可以改善DNA氧化损伤, 明显抑制BLM诱导的8-OHdG表达量增加, 减少细胞核中8-OHdG的累积量。为纠正由氧化、甲基化等引起的DNA碱基损伤, BER作为修复碱基损伤的主要途径被激活^[28]。APE1、XRCC1、OGG1是BER途径中的关键基因, APE1可以去除受损的碱基并切割AP位点^[29]; XRCC1可募集修复蛋白到DNA损伤部位以提高BER修复效率; OGG1能够特异性识别并切除8-OHdG, 从而恢复正常的G-C配对^[30]。研究报道, 相对于正常男性, 不育男性的精液中G-C碱基对水平上升^[31]。当BER途径被阻断后, 生殖细胞DNA修复能力严重受损, DNA损伤增加, 最终引起精子发生异常和不育^[32]。体外实验发现, 淫羊藿苷可以减轻过氧化氢诱导的成纤维细胞DNA损伤, 延缓细胞复制性衰老^[33]。本研究结果显示, 与BLM处理组相比, BLM+不同浓度ICA组的OGG1、APE1和XRCC1蛋白表达量均下降。这些结果表明, ICA能够改善GC-1细胞DNA氧化损伤, 下调被BLM过度激活的

BER通路相关蛋白表达水平。

综上所述, ICA可减轻BLM诱导的小鼠GC-1精原细胞DNA损伤, 下调ATM/Chk1、BER通路活性。本实验为ICA改善生精细胞损伤, 治疗男性生殖功能障碍提供了新的思路, 为之后探讨ICA对生殖细胞DNA损伤的保护作用奠定了一定基础。然而, 由于在BLM处理前和处理时均有ICA参与, 那么, ICA对生殖细胞DNA损伤的保护作用是因为ICA的预保护减轻了BLM诱导的DNA损伤, 还是ICA增强了BLM诱导的细胞损伤后的修复, 本研究并未作进一步的研究。因此, 后期本课题组将深入探讨和比较ICA预处理和共处理的两种干预手段在改善GC-1精原细胞DNA损伤中的作用。

参考文献 (References)

- [1] MINHAS S, BETTOCCHI C, BOERI L, et al. European association of urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility [J]. *Eur Urol*, 2021, 80(5): 603-20.
- [2] GUNES S, AL-SADAAN M, AGARWAL A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility [J]. *Reprod Biomed Online*, 2015, 31(3): 309-19.
- [3] GUO H R, OUYANG Y J, WANG J Q, et al. Cu-induced spermatogenesis disease is related to oxidative stress-mediated germ cell apoptosis and DNA damage [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 416: 125903.
- [4] QI L, LI J, LE W, et al. Low-dose ionizing irradiation triggers apoptosis of undifferentiated spermatogonia *in vivo* and *in vitro* [J]. *Transl Androl Urol*, 2019, 8(6): 591-600.
- [5] HE C, WANG Z, SHI J. Pharmacological effects of icariin [J]. *Adv Pharmacol*, 2020, 87: 179-203.
- [6] 王焕珍, 柴艺汇, 陈云志, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药(WANG H Z, CHAI Y H, CHEN Y Z, et al. *Advances in chemical constituents and pharmacological action of Epimedium* [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*), 2016, 12(7): 63-5.
- [7] NI G, ZHANG X, AFEDO S Y, et al. Evaluation of the protective effects of icariin on nicotine-induced reproductive toxicity in male mouse: a pilot study [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 65.
- [8] 刘忠平, 李质馨, 田洪艳, 等. 淫羊藿苷对酒精致雄性小鼠生殖损伤的影响[J]. 中国男科学杂志(LIU Z P, LI Z X, TIAN H Y, et al. *Effects of icariin on reproductive damage in alcohol-treated male mice* [J]. *Chinese Journal of Andrology*), 2014, 28(12): 3-6.
- [9] ZHANG S Q, CAI W J, HUANG J H, et al. Icariin, a natural flavonol glycoside, extends healthspan in mice [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 69: 226-35.
- [10] 尤旭, 赵海霞, 杨思琪, 等. 淫羊藿苷激活Nrf2/HO-1信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞DNA损伤研究[J]. 中草药(YOU X, ZHAO H X, YANG S Q, et al. *Icariin attenuates DNA damage in testicular germ cells of natural aging rats by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway* [J]. *Chinese Traditional and*

- Herbal Drugs), 2019, 50(12): 2915-21.
- [11] LIU M X, HALES B F, ROBAIRE B. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(4): 72.
- [12] GHEZZI M, BERRETTA M, BOTTACIN A, et al. Impact of Bep or carboplatin chemotherapy on testicular function and sperm nucleus of subjects with testicular germ cell tumor [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 122.
- [13] 普特, 杨云海, 王凯博, 等. MTT比色法测定烟酰胺类化合物对植物病原细菌的抑菌活性[J]. 云南农业大学学报(自然科学)(PU T, YANG Y H, WANG K B, et al. Determination of the nicotinamide compounds by using MTT colorimetric assay against pathogenic bacteria [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University, Natural Science*), 2019, 34(1): 15-21.
- [14] 李上标, 裴淑艳, 蒋超, 等. MTT比色法研究应用进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版)(LI S B, PEI S Y, JIANG C, et al. Progress on application of MTT colorimetric assay [J]. *Journal of Northwest Minzu University, Natural Science Edition*), 2013, 34(3): 68-73.
- [15] NGUYEN THAI H T, NGUYEN T V, HO HUYNH T D. Sweet wormwood and tortoise Shell decoction (Thanh Hao Miet Giap Thang) induces DNA damage, S-Phase arrest, and apoptosis in MCF-7 cells via ATR-CHK1 signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2358290.
- [16] CHEN J W, MA P W, YUAN H, et al. mito-TEMPO attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in noise-induced hearing loss maintaining TFAM-mtDNA interaction and mitochondrial biogenesis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 803718.
- [17] 杨思琪, 赵海霞, 尤旭, 等. 三种GC-1细胞DNA损伤模型的建立及比较分析[J]. 中国药理学通报(YANG S Q, ZHAO H X, YOU X, et al. Establishment and comparative analysis of three DNA damage models of GC-1 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2021, 37(1): 142-8.
- [18] AITKEN R J, CURRY B J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2011, 14(3): 367-81.
- [19] MURRAY V, CHEN J K, CHUNG L H. The interaction of the metallo-glycopeptide anti-tumour drug bleomycin with DNA [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1372.
- [20] 瞿敏敏, 陈佳, 郭磊, 等. DNA损伤标志物 γ -H2AX及其在毒性测试应用中的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志(QU M M, CHEN J, GUO L, et al. Advances in DNA damage marker γ -H2AX and its toxicity testing applications [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2021, 35(6): 401-11.
- [21] 陈丽萍, 朱小年, 陈雯. DNA损伤修复过程中H2AX磷酸化的调控及其意义[J]. 癌变·畸变·突变(CHEN L P, ZHU X N, CHEN W. Regulation and significance of H2AX phosphorylation in the repair of DNA damage [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*), 2011, 23(2): 148-51.
- [22] BEKKER J S, MAILAND N. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells [J]. *DNA Repair*, 2010, 9(12): 1219-28.
- [23] SAHU R P, BATRA S, SRIVASTAVA S K. Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. *Brit J Cancer*, 2009, 100(9): 1425-33.
- [24] PITOLLI C, WANG Y, CANDI E, et al. p53-Mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms [J]. *Cancers*, 2019, 11(12): 1983.
- [25] YANG Y, ZHU X, YU G, et al. Protective effect of pyxinol, one active ingredient of on cisplatin-induced nephrotoxicity via ameliorating DNA damage response [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 735731.
- [26] 孟祥英, 乔晋娟, 赵荣兰, 等. DNA氧化损伤标志物8-OHdG检测方法及其生物学应用[J]. 中国卫生检验杂志(MENG X Y, QIAO J J, ZHAO R L, et al. Detection of DNA oxidative damage marker 8-OHdG and its biological application [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2018, 28(19): 2428-32.
- [27] 陈莹莹, 葛淑珍, 黄健, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二异壬酯对雄性小鼠生殖毒性的氧化损伤机制[J]. 生态毒理学报(CHEN Y Y, GE S Z, HUANG J, et al. The oxidative damage mechanism of plasticizer diisononyl phthalate on reproductive system in male mice [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*), 2018, 13(5): 281-7.
- [28] ABAD E, GRAIFER D, LYAKHOVICH A. DNA damage response and resistance of cancer stem cells [J]. *Cancer Lett*, 2020, 474: 106-17.
- [29] LIU T C, GUO K W, CHU J W, et al. Understanding APE1 cellular functions by the structural preference of exonuclease activities [J]. *Comput Struct Biotec*, 2021, 19: 3682-91.
- [30] 杨蕊琼, 惠玲. DNA损伤修复基因多态性与男性不育的研究进展[J]. 中华男科学杂志(YANG R Q, HUI L. Polymorphisms of DNA damage repair genes and male infertility: advances in researches [J]. *National Journal of Andrology*), 2021, 27(5): 456-60.
- [31] DANTZER F, BJORAS M, LUNA L, et al. Comparative analysis of 8-oxoG:C, 8-oxoG:A, A:C and C:C DNA repair in extracts from wild type or 8-oxoG DNA glycosylase deficient mammalian and bacterial cells [J]. *DNA Repair*, 2003, 2(6): 707-18.
- [32] GARCIA R A, CASA M D L, SERRANO M, et al. Impact of polymorphism in DNA repair genes *OGG1* and *XRCC1* on seminal parameters and human male infertility [J]. *Andrologia*, 2018, 50(10): e13115.
- [33] 张素琴, 周建华, 胡蓉. 淫羊藿苷对人胚肺二倍体成纤维细胞衰老的干预作用研究[J]. 老年医学与保健(ZHANG S Q, ZHOU J H, HU R. Study on the effect of icariin on senescence of human embryonic lung diploid fibroblasts [J]. *Geriatrics & Health Care*), 2019, 25(1): 70-4.