

## 缺氧条件下 GC-1 细胞凋亡的作用机制研究

宋 诚<sup>1</sup>, 王纪田<sup>2,3</sup>, 石拴霞<sup>2</sup>, 何毅刚<sup>4</sup>, 程耀萍<sup>1</sup>, 王 甜<sup>3</sup>, 王 玲<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院 生殖中心, 中国甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学 第一临床医学院, 中国甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 中国甘肃 兰州 730050; 4. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院, 中国甘肃 兰州 730050)

**摘要:** 以小鼠精原细胞系 GC-1 细胞为研究对象, 探讨缺氧条件下 GC-1 细胞凋亡潜在的分子机制。首先, 采用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 法检测不同缺氧时间处理下的细胞活力, 以确定细胞缺氧损伤的时间; 然后, 通过化学荧光法检测 GC-1 细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的含量, 采用 JC-1 法检测线粒体的膜电位, 采用比色法检测 ATP 的含量, 采用线粒体荧光探针法检测线粒体的数量与分布, 并采用透射电镜观察细胞的超微结构; 最后, 利用实时荧光定量 PCR 检测线粒体信号通路相关基因胱天蛋白酶(caspase)-3、caspase-9、细胞色素 c (cytochrome c, Cyt-c)、Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达水平。结果显示, 缺氧 36 h 后, 细胞活力为 (60.36±5.40)%, 符合后续实验需求; 在缺氧条件下, GC-1 细胞中的 ROS 含量显著增加, ATP 含量显著下降, 线粒体膜电位下降、数量减少, 同时细胞中促凋亡相关基因的表达水平上调, 抗凋亡因子 Bcl-2 的基因表达水平下调。实验结果初步表明, 缺氧可导致 GC-1 细胞线粒体功能障碍, ROS/线粒体信号通路是缺氧导致 GC-1 细胞凋亡可能的分子机制。

**关键词:** 缺氧; GC-1 细胞; 氧化应激(OS); 活性氧(ROS); 线粒体通路

中图分类号: Q256, R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)06-0544-07

## Study on Mechanism of GC-1 Apoptosis Under Hypoxic Conditions

SONG Cheng<sup>1</sup>, WANG Jitian<sup>2,3</sup>, SHI Shuanxia<sup>2</sup>, HE Yigang<sup>4</sup>, CHENG Yaoping<sup>1</sup>,  
WANG Tian<sup>3</sup>, WANG Ling<sup>1,2\*</sup>

(1. Reproductive Medicine Center, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, Gansu, China; 2. First School of Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China; 3. Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drugs of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu, China; 4. The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, Gansu, China)

**Abstract:** The potential molecular mechanism of apoptosis of mouse spermatogonial GC-1 cells under hypoxia was investigated. First, the cell viability under hypoxia for different time periods was measured using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) to determine the time of cell damage induced by hypoxia. Then, the content of reactive oxygen species (ROS) in GC-1 cells was detected by chemical fluorescence method, the membrane potential of mitochondria was detected by JC-1 assay, and the content of ATP was detected by colorimetry. Meanwhile, the number and distribution of mitochondria were detected using fluorescent probe method, and the ultrastructure of the cells was observed by transmission electron microscopy. Finally, mRNA expression levels of mitochondrial signaling pathway related genes caspase-3, caspase-9, cytochrome c (Cyt-c), Bax and Bcl-2 were analysed using real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that, after 36 h of hypoxia, the cell viability was (60.36±5.40)%, which met the requirement of subsequent experiments. Under

收稿日期: 2023-03-27; 修回日期: 2023-05-24; 网络首发日期: 2023-07-27

基金项目: 军队后勤卫生计生专项科研项目(20JSZ09); 甘肃省青年科技基金计划项目(21JR11RA013)

作者简介: 宋诚(1995—), 男, 甘肃陇西人, 硕士研究生; 宋诚和王纪田对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; \*通信作者: 王玲(1974—), 女, 甘肃兰州人, 博士, 主任医师, 主要从事生殖医学基础与临床研究, E-mail: szyxz2020@163.com。

hypoxia conditions, the ROS content in GC-1 cells increased significantly, and the ATP content decreased significantly. The membrane potential and number of mitochondria were reduced. At the same time, the expression levels of pro-apoptosis-related genes were up-regulated, and the gene expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2 was down-regulated. The results showed that hypoxia can lead to mitochondrial dysfunction in GC-1 cells, and ROS/mitochondrial signaling pathway may be the molecular mechanism of hypoxia-induced apoptosis of GC-1 cells.

**Key words:** hypoxia; GC-1 cell; oxidative stress (OS); reactive oxygen species (ROS); mitochondrial pathway (*Life Science Research*, 2023, 27(6): 544-550)

男性不育是指在未避孕情况下经 12 个月规律性生活(至少每周两次)仍未使女方获得妊娠的男科疾病<sup>[1]</sup>。据文献报道,全球有 15%的夫妇受到不孕不育的困扰,男方因素占 30%<sup>[2]</sup>,其中,少弱精子症在不育男性中占主要因素,目前少弱精子症的病因尚不明确<sup>[3]</sup>。董静等<sup>[4]</sup>和余佳宜等<sup>[5]</sup>发现,高原环境与男性少弱精子症有相关性,高原环境居住人群中的少弱精子症患者比例相较于平原地区显著升高,但未阐明具体的发病机制。目前研究发现,与低海拔地区相比,在高海拔缺氧环境中雄性动物的生育力明显下降;精子数量减少,畸形率增加,前向运动和活力下降;睾丸组织中氧化应激水平增加,包括氧化产物水平的升高和抗氧化酶活力的下降,同时组织结构发生改变,如生精小管基膜萎缩、细胞数量减少、精原细胞排列紊乱及极性消失、管腔空泡化等,此外,生殖细胞凋亡增加,这些凋亡细胞以精原细胞和精母细胞为主<sup>[6-9]</sup>。为研究缺氧环境中雄性生殖细胞凋亡的机制,本研究以小鼠精原细胞系 GC-1 spg 为研究对象,检测缺氧条件下细胞活力、氧化应激相关指标、细胞线粒体数量与分布、凋亡相关基因的表达,研究结果可为临床诊治男性少弱精子症提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

小鼠 GC-1 spg 精原细胞(以下简称 GC-1 细胞)(上海语纯生物科技有限公司); DMEM 培养液(上海源叶生物科技有限公司); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(AusGeneX 公司, 澳大利亚); CCK-8 (Cell Counting Kit-8)试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)、ATP 检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司); 细胞裂解液、青链霉素混合液(100×)、0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司); 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(南京

建成生物工程研究所); 电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司); SPI-Pon™ 812 环氧树脂包埋试剂盒(SPI Supplies 公司, 美国); MitoTracker® Green 试剂盒(Cell Signaling Technology 公司, 美国); TRIzol 试剂(总 RNA 抽提试剂)、SweScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Remover)、2× SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX)、引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

### 1.2 主要仪器

细胞超净工作台(苏州净化设备有限公司); CO<sub>2</sub> 恒温培养箱、三气培养箱、超微量分光光度计(ThermoFisher Scientific 公司, 美国); Infinite® 200 PRO 全波长多功能微孔板分析系统(Tecan 公司, 瑞士); 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司, 美国); 超薄切片机(Leica 公司, 德国); 透射电子显微镜(Hitachi 公司, 日本); 荧光显微镜(Olympus 公司, 日本)。

### 1.3 细胞培养和分选

在无菌条件下,用含 10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基复苏 GC-1 细胞,然后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,待细胞传代稳定后进行实验。

设置常氧组(normoxia group)和缺氧组(hypoxia group; 3% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、92% N<sub>2</sub>)。常氧组培养于 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱,缺氧组培养于三气培养箱,干预既定的时间。所有实验独立重复 3 次。

### 1.4 GC-1 细胞活力检测

将对数生长期 GC-1 细胞以每孔 5×10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板中。分别缺氧处理 24 h、30 h、36 h、48 h 后,弃去原培养基,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 2 遍,随后每孔加入 100 μL DMEM 完全培养基,再加入 10 μL CCK-8 溶液,充分摇匀后 37 °C 孵育 1.5 h,于 450 nm 波长处检测每孔吸光度(A)。采用如下公式计算细胞活力(R):  $R=(A_2-A_0)/(A_1-A_0) \times 100\%$ 。式中, A<sub>0</sub> 表示只

有培养基和 CCK-8 溶液而无细胞的培养孔的吸光度,  $A_1$  表示含有培养基、细胞和 CCK-8 溶液的培养孔在常氧条件下的吸光度,  $A_2$  表示含有培养基、细胞和 CCK-8 溶液的培养孔在缺氧条件下的吸光度。

### 1.5 ROS 检测

细胞处理结束后, 用预冷的 PBS 清洗 3 次, 加入 ROS 检测试剂盒中的 2',7'-二氯荧光素双乙酸酯(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 探针, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育 30 min。PBS 清洗 3 次后, 加入无血清培养基, 在荧光显微镜下观察并拍照。用 Image J 软件测量荧光强度, 单位用任意单位(arbitrary unit, AU)表示。

### 1.6 线粒体膜电位检测

根据线粒体膜电位检测试剂盒说明书进行相关试剂配制。待缺氧干预结束后, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 清洗 3 次, 加入配制好的 JC-1 染色工作液(1×), 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育 30 min。孵育结束后, 吸去上清液, 用 JC-1 缓冲液(1×)洗涤 3 次。操作结束后立即在荧光显微镜下进行观察并拍照。荧光强度测量过程同 1.5。

### 1.7 ATP 含量测定

缺氧干预结束后, 收集细胞, 加入裂解液, 冰上裂解 40 min; 用细胞刮刀将其刮下, 4 °C 12 000g 离心 5 min, 取上清备用。将配制好的 ATP 检测工作液按照组别分别加入 96 孔板(为保证实验结果的准确性, 最好采用黑色避光 96 孔板), 室温等待 3~5 min 后, 每孔加入 20 μL 样本, 每组 3 个复孔, 采用全波长多功能微孔板分析系统中的 lumi-nometer 功能对其进行测定。

### 1.8 线粒体数量与分布的检测

按照 MitoTracker® Green 试剂盒说明书将线

粒体探针稀释至合适的浓度。将稀释后的线粒体探针置于 37 °C 恒温培养箱中预热 20 min, 同时取适量的 DMEM 培养基和 PBS 进行预热, 备用。缺氧干预后弃去旧培养基, 用预热的 PBS 清洗 3 次, 加入线粒体探针, 37 °C 孵育 30 min; 用预热的 PBS 清洗 3 次, 加入无酚红 DMEM 培养基, 在荧光显微镜下观察并拍照。通过 Image J 软件测量图片的荧光强度。

### 1.9 实时荧光定量 PCR

缺氧干预结束后使用 TRIzol 试剂提取细胞 RNA, 并检测 RNA 浓度。使用反转录和荧光定量试剂盒进行 RNA 反转录以及 DNA 扩增。反转录体系为 20 μL, 反转录条件为: 37 °C、15 min; 85 °C、5 s。荧光定量体系为 25 μL, 扩增条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 40 个循环; 65 °C→95 °C, 每升温 0.5 °C 采集一次荧光信号。通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析各组间基因表达的差异, 以 β-actin 为内参。定量 PCR 引物序列见表 1。

### 1.10 细胞超微结构观察

缺氧干预结束后, 在室温下 1 000g 离心 5 min 收集细胞。用电镜固定液固定细胞(4 °C 保存), 琼脂糖包裹后 PBS 漂洗 3 次; 用 1% 的锇酸室温固定, PBS 漂洗 3 次; 用不同浓度的乙醇和丙酮脱水处理; 加入丙酮与包埋剂渗透, 过夜; 60 °C 烤箱聚合 48 h 后切片, 进行铀铅双染色(2% 醋酸铀饱和乙醇溶液、枸橼酸铅各染色 15 min)。在透射电子显微镜下观察, 采集图像并进行分析。

### 1.11 统计分析

采用 SPSS 25.0 对数据进行统计分析, 所有计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 *t* 检验, 相关性分析采用斯皮尔曼(Spearman)双变

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR

Primer	Sequence
Caspase-3	Forward: 5'ACCGATGTCGATGCAGCTAA3' Reverse: 5'GGTGGCGGTAGAGTAAGCATA3'
Cyt-c	Forward: 5'CCAACAAGAACAAGGCATCAC3' Reverse: 5'CTGCCCTTTCTCCCTTCTTCTTA3'
Caspase-9	Forward: 5'GACCAATGGGACTCACAGCAA3' Reverse: 5'GTTACATTGTTGATGATGAGGCA3'
Bcl-2	Forward: 5'GAGGATGTGGCCTTCTTTG3' Reverse: 5'GTTCCACAAAGGCATCCCAG3'
Bax	Forward: 5'CAAGAAGCTGAGCGAGTGTCT3' Reverse: 5'ATCCTCTGCAGCTCCATGTT3'
β-Actin	Forward: 5'GTGACGTTGACATCCGTAAGA3' Reverse: 5'GTAACAGTCCGCTAGAAAGCAC3'

量相关性分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 缺氧对 GC-1 细胞活力的影响

将 GC-1 细胞置于缺氧环境下分别培养 24 h、30 h、36 h、48 h,采用 CCK-8 法检测细胞活力。结果显示:与常氧组相比,缺氧 24 h 时细胞活力无明显改变( $P > 0.05$ ),缺氧 30 h 后细胞活力随着缺氧时间的延长逐渐下降;缺氧 36 h 的细胞活力为  $(60.36 \pm 5.40)\%$ ,此时细胞活力满足后续实验要求(图 1)。进一步对缺氧时间与细胞活力的关系进行斯皮尔曼相关性分析,结果显示:细胞活力与缺氧时间呈显著负相关( $r = -0.857$ ,  $P < 0.001$ )。根据上述结果,后续实验的缺氧干预时间均采用 36 h。

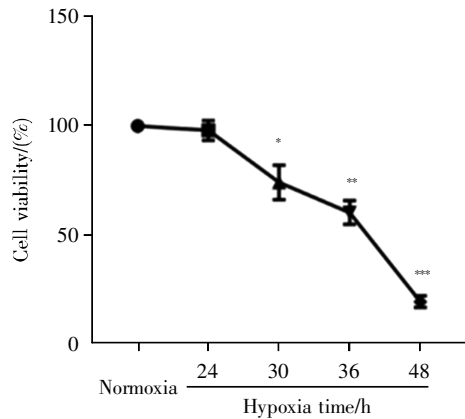


图 1 缺氧处理不同时间对 GC-1 细胞活力的影响

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. 常氧组。

Fig.1 Effect of hypoxia duration on the viability of GC-1 cells

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. the normoxia group.

### 2.2 缺氧时 GC-1 细胞中 ROS 含量的变化

DCFH-DA 是一种可以穿透细胞膜的无荧光染料,进入细胞后在酶的作用下分解为 2',7'-二氯二

氢荧光素(2',7'-dichlorodihydrofluorescein, DCFH),而 ROS 可使 DCFH 氧化为发绿色荧光的 2',7'-二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein, DCF),因此检测 DCF 的荧光强度就可以评价细胞内 ROS 的水平。从图 2 可知,常氧组细胞的荧光强度较弱,表明 ROS 含量少;而缺氧组细胞的绿色荧光强度明显增加,说明缺氧干预后 GC-1 细胞内的 ROS 含量升高,细胞产生氧化应激反应。

### 2.3 缺氧对 GC-1 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 是一种荧光探针,在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质(matrix)中,形成聚合物(J-aggregate),产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体(monomer),产生绿色荧光,因此可以通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件,通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到线粒体膜电位的下降,同时也可以利用 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的一个检测指标。图 3 的结果显示:常氧组的红色荧光强度较强,绿色荧光强度较弱,二者合并后呈橘色,表明线粒体膜电位基本正常;缺氧组的绿色荧光强度较强,红色荧光强度较弱,表明在缺氧干预后 GC-1 细胞的线粒体功能受损,膜电位下降,细胞发生早期凋亡。

### 2.4 缺氧 GC-1 细胞中 ATP 含量的变化

ATP 检测试剂盒通过检测荧光素酶催化荧光素所产生的荧光强度评价 ATP 含量。通常,细胞在凋亡、坏死或处于一些毒性状态下时,ATP 水平会下降,ATP 水平的下降表明线粒体的功能受损或下降,在细胞凋亡时 ATP 水平的下降通常和线粒体的膜电位下降同时发生。图 4 的结果显示:与

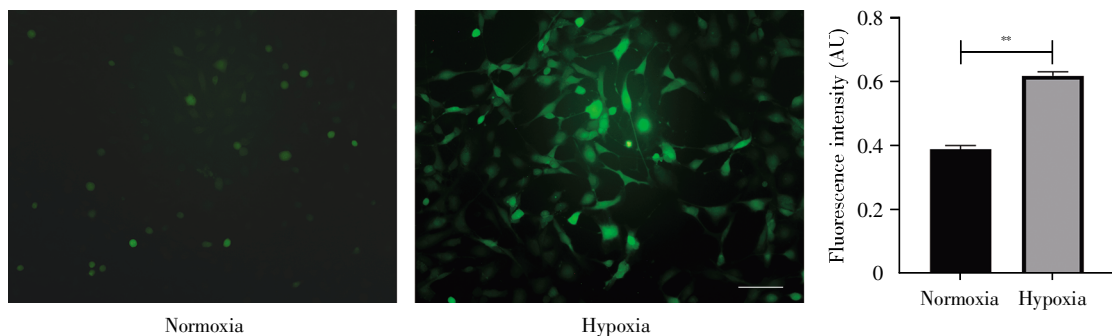


图 2 缺氧对 GC-1 细胞中 ROS 含量的影响(标尺: 100  $\mu\text{m}$ ; \*\*:  $P < 0.01$ )

Fig.2 Effect of hypoxia on the ROS content in GC-1 cells (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ; \*\*:  $P < 0.01$ )

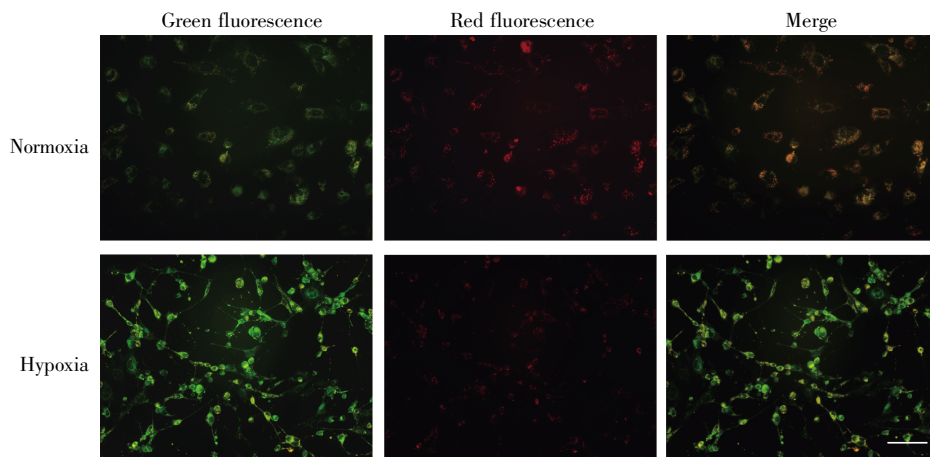


图3 缺氧对 GC-1 细胞线粒体膜电位的影响(JC-1 法, 标尺: 50  $\mu\text{m}$ )

Fig.3 Effect of hypoxia on mitochondrial membrane potential in GC-1 cells (using JC-1 assay; scale bar: 50  $\mu\text{m}$ )

常氧组相比, 缺氧组的 ATP 含量显著下降( $P<0.001$ ), 表明缺氧可以损伤 GC-1 细胞线粒体, 破坏线粒体功能, 降低细胞 ATP 含量, 导致细胞代谢障碍, 从而加剧细胞凋亡过程。

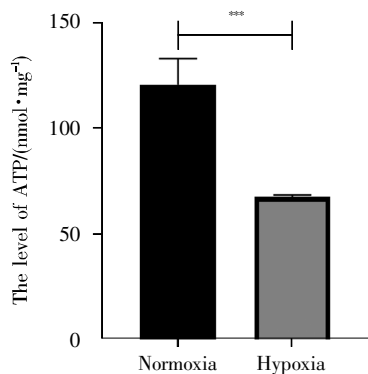


图4 缺氧对 GC-1 细胞中 ATP 含量的影响(\*\*\*:  $P<0.001$ )

Fig.4 Effect of hypoxia on the ATP content in GC-1 cells (\*\*\*:  $P<0.001$ )

## 2.5 缺氧对 GC-1 细胞线粒体数量及分布的影响

MitoTracker 染料是一种能渗透细胞的探针, 包含与硫醇温和反应的氯甲基团, 用于线粒体标

记。本实验发现, 常氧组的线粒体均匀分布于细胞核周围, 荧光强度高, 而在缺氧组细胞中, 线粒体分布减少, 荧光强度显著变弱( $P<0.05$ ) (图 5), 表明缺氧影响了 GC-1 细胞线粒体的分布和数量。

## 2.6 缺氧对 GC-1 细胞线粒体通路相关基因表达的影响

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 与常氧组相比, 缺氧组中细胞色素 *c* (cytochrome *c*, *Cyt-c*)、胱天蛋白酶(*caspase*)-3、*caspase*-9、*Bax* 的 mRNA 表达水平显著升高( $P<0.001$ ), *Bcl-2* 的 mRNA 表达水平显著下降( $P<0.01$ ) (表 2)。这表明缺氧可以激活 GC-1 细胞中线粒体相关基因, 促进细胞凋亡。

## 2.7 缺氧对 GC-1 细胞超微结构的影响

透射电镜的观察结果(图 6)显示: 常氧组细胞近似椭圆形, 胞内细胞器丰富, 基质电子密度均匀, 细胞膜完整、连续, 膜周围可见丰富伪足及突起; 细胞核(N)形状不规则, 异染色质略微增加, 核仁(Nu)边移; 线粒体(M)形态正常, 膜完整, 基质局部溶解。缺氧组细胞膜完整、光滑, 但伪足与突起退化, 局部基质稀疏, 细胞器固缩、变少; 细胞核(N)

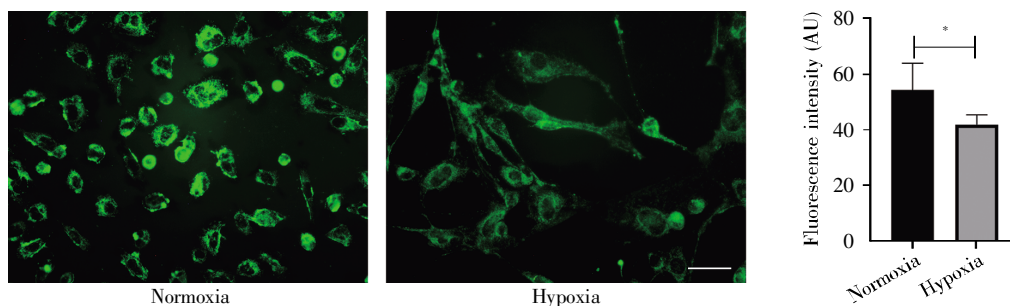


图5 缺氧对 GC-1 细胞内线粒体分布和数量的影响(标尺: 50  $\mu\text{m}$ ; \*:  $P<0.05$ )

Fig.5 Effect of hypoxia on the distribution and number of mitochondria in GC-1 cells (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ; \*:  $P<0.05$ )

表 2 缺氧条件下线粒体通路相关基因的相对表达水平  
Table 2 Relative expression levels of mitochondrial pathway-related genes under hypoxic conditions

Gene	$(\bar{x} \pm s, n=3)$	
	Normoxia	Hypoxia
<i>Caspase-3</i>	1.311±0.011	1.442±0.010***
<i>Cyt-c</i>	1.076±0.008	1.222±0.003***
<i>Caspase-9</i>	1.602±0.020	1.759±0.008***
<i>Bax</i>	0.197±0.025	0.464±0.040***
<i>Bcl-2</i>	0.710±0.193	0.045±0.002**

注: \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. 常氧组。

Notes: \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. the normoxia group.

呈不规则形, 异染色质边集, 核膜完整; 线粒体(M)散在分布, 大多数线粒体皱缩并伴有膜密度增加, 膜内电子密度高。

### 3 讨论

少弱精子症是男性不育最常见的病因之一, 缺氧环境是导致其发生的关键因素<sup>[10]</sup>。缺氧是指所吸入空气中氧气的分压降低, 导致动脉血中的氧气供应不足; 它是高海拔环境下的一种状态。暴露于高海拔缺氧环境会使包括人类在内的所有生物产生一系列生理反应。董静等<sup>[9]</sup>发现, 对于在高原缺氧环境中居住的男性, 其精液主要表现为精子数量减少, 精子活动力减弱。另有研究表明, 在缺氧时雄性动物的生育力显著下降<sup>[11-12]</sup>。此外, Bai 等<sup>[13]</sup>发现, 缺氧时大鼠精子数量减少, 睾丸组

织结构破坏明显, 生精细胞以精原细胞和精母细胞数量减少为主, 但具体发病机制不详。本研究结果显示, 缺氧时间与细胞活力呈高度负相关, 即缺氧时间越长, 细胞活力越低、损伤越严重, 凋亡细胞数量越多(图 1), 这与前人的研究结果相同, 同时说明缺氧条件下精原细胞凋亡确实是导致雄性少弱精子症的机制之一。

线粒体是一种拥有独立基因组和转录系统的双层膜结构细胞器<sup>[14]</sup>。它通过氧化磷酸化产生 ATP, 满足细胞的各种生理活动需求, 并且发挥着调节细胞内稳态的重要作用, 如调节 ROS 含量和细胞凋亡<sup>[15]</sup>等。当线粒体受到损伤时, 它将无法正常进行氧化磷酸化, 合成 ATP 的过程便会出现障碍<sup>[16]</sup>。这将导致细胞内无法进行正常的生理活动, 最终可能引发细胞凋亡<sup>[17]</sup>。线粒体信号通路是细胞凋亡的经典途径之一<sup>[18]</sup>。研究发现, 在缺氧时细胞内 ROS 含量升高, 高水平的 ROS 通过破坏细胞膜、DNA 双链结构及蛋白质空间结构, 使其发生脂质过氧化, 产生氧化应激产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)<sup>[19]</sup>, MDA 的产生标志着膜脂损伤。同时, 缺氧状态下细胞内稳态失衡, 线粒体膜电位下降; 为维持细胞的能量供应, Cyt-c 通过开放的线粒体膜通道孔径游离到细胞质中, 产生更多的氧气, 保证细胞的各种生理活动<sup>[20]</sup>。Cyt-c 的游离过程伴随着部分电子的逃逸, 这些电子与 O<sub>2</sub>

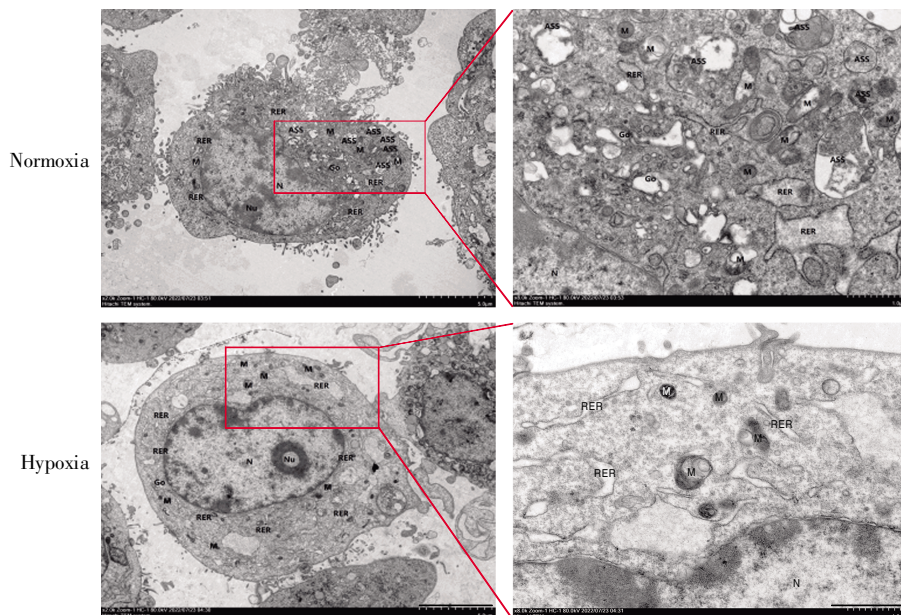


图 6 缺氧对 GC-1 细胞超微结构的影响(标尺: 左 5  $\mu\text{m}$ , 右 1  $\mu\text{m}$ )

ASS: 自噬溶酶体; Go: 高尔基体; M: 线粒体; N: 细胞核; Nu: 核仁; RER: 粗面内质网。

Fig.6 Effect of hypoxia on ultrastructure of GC-1 cells (scale bar: 5  $\mu\text{m}$  on the left side, and 1  $\mu\text{m}$  on the right side)

ASS: Autolysosome; Go: Golgi apparatus; M: Mitochondrion; N: Nucleus; Nu: Nucleolus; RER: Rough endoplasmic reticulum.

结合后形成  $H_2O_2$  及其他形式的 ROS, 进一步加剧细胞损伤<sup>[21]</sup>。而且, 在细胞质中 Cyt-c 与凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, APAF-1) 结合形成的聚合物会激活 caspase-9, 后者通过激活 caspase 级联反应促进细胞凋亡; caspase-3 是该通路下游的关键蛋白质, 其可以导致细胞 DNA 修复障碍, 引起细胞凋亡<sup>[22]</sup>。另有研究发现, 在缺氧时抗凋亡因子 Bcl-2 被抑制, 而促凋亡的 Bax 表达水平升高<sup>[23]</sup>。本研究显示, 与常氧组相比, 缺氧组 ROS 含量显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 2), 细胞线粒体膜电位下降 (图 3), ATP 被严重消耗 (图 4), 线粒体呈现数量减少、分布不均匀 (图 5~6) 的表型, 同时 Cyt-c 基因的表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ) (表 2)。此外, 本研究还显示, 当线粒体功能降低后, 凋亡相关基因 caspase-3 的表达水平以及 Bax/Bcl-2 的比值均显著升高 ( $P < 0.001$ ) (表 2), 凋亡细胞数量也明显增多, 这与 Li 等<sup>[24]</sup>的研究结果是一致的。这表明缺氧可以抑制 GC-1 细胞线粒体功能, 并通过激活线粒体信号通路引发细胞凋亡。因此我们推测, ROS/线粒体信号通路是缺氧导致少弱精子症可能的分子机制。

综上所述, 在缺氧条件下, 细胞活力显著下降, 胞内 ROS 水平显著升高, 同时线粒体膜电位显著下降。通过对线粒体进行染色和电镜观察可发现, 线粒体数量减少, 分布出现异常。此外, 能量代谢相关的 ATP 含量也有所下降。这些皆表示线粒体的功能受到严重影响。进一步的基因表达分析表明, 促凋亡相关基因的表达水平上调, 而抗凋亡基因的表达却下调, 这提示细胞凋亡可能增加。总的来讲, 本研究证实缺氧条件下 GC-1 细胞发生了活力下降、线粒体功能损伤及凋亡增加等一系列变化, 为研究缺氧环境对线粒体信号通路的影响提供了理论依据, 同时表明线粒体信号通路可能是缺氧环境中雄性生殖细胞凋亡的机制之一。

### 参考文献(References):

[1] SHARMA A, MINHAS S, DHILLO W S, *et al.* Male infertility due to testicular disorders[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2021, 106(2): e442-e459.

[2] RAMA N, LESCAY H, RAHEEM O. Male factor infertility: what every OB/GYN should know[J]. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2023, 50(4): 763-777.

[3] COLPI G M, FRANCAVILLA S, HAIDL G, *et al.* European Academy of Andrology guideline management of oligo-asthenoteratozoospermia[J]. *Andrology*, 2018, 6(4): 513-524.

[4] 董静, 徐少强, 胡海翔, 等. 高原环境对男性官兵精液质量的影响及与弱精子症发生的相关性研究[J]. *空军医学杂志*(DONG

Jing, XU Shaoqiang, HU Haixiang, *et al.* Influence of the plateau environment on semen quality of male servicemen and correlations with asthenozoospermia[J]. *Medical Journal of Air Force*, 2021, 37(5): 403-405.

[5] 余佳宜, 亢亚兰, 蒲英格, 等. 高原环境对精子质量影响的 meta 分析[J]. *人民军医*(YU Jiayi, KANG Yalan, PU Yingge, *et al.* A meta-analysis of effects of plateau environment on sperm quality[J]. *People's Military Surgeon*), 2021, 64(8): 746-750.

[6] YIN J, NI B, LIAO W G, *et al.* Hypoxia-induced apoptosis of mouse spermatocytes is mediated by HIF-1 $\alpha$  through a death receptor pathway and a mitochondrial pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(2): 1146-1155.

[7] REYES J G, FARIAS J G, HENRÍQUEZ-OLAVARRIETA S, *et al.* The hypoxic testis: physiology and pathophysiology[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012: 929285.

[8] LIAO W G, CAI M C, CHEN J, *et al.* Hypobaric hypoxia causes deleterious effects on spermatogenesis in rats[J]. *Reproduction*, 2010, 139(6): 1031-1038.

[9] 常德辉, 孔飞燕, 姜卫, 等. 高原低压低氧雄性 Wistar 大鼠生殖系统损伤模型的建立[J]. *中华男科学杂志*(CHANG Dehui, KONG Feiyan, JIANG Wei, *et al.* Establishment of a model of reproductive system injury in male Wistar rats in high-altitude hypoxia environment[J]. *National Journal of Andrology*), 2020, 26(12): 1068-1073.

[10] YAN F Q, DOU X L, ZHU G F, *et al.* Cistanoside of *Cistanche Herba* ameliorates hypoxia-induced male reproductive damage via suppression of oxidative stress[J]. *American Journal of Translational Research*, 2021, 13(5): 4342-4359.

[11] JANKOVIC VELICKOVIC L, STEFANOVIĆ V. Hypoxia and spermatogenesis[J]. *International Urology and Nephrology*, 2014, 46(5): 887-894.

[12] LI S, YANG Q E. Hypobaric hypoxia exposure alters transcriptome in mouse testis and impairs spermatogenesis in offspring[J]. *Gene*, 2022, 823: 146390.

[13] BAI G, YANG B, TONG W M, *et al.* Hypobaric hypoxia causes impairment of spermatogenesis in developing rats at pre-puberty[J]. *Andrologia*, 2018, 50(4): e13000.

[14] SARASTE M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*[J]. *Science*, 1999, 283(5407): 1488-1493.

[15] KOTIADIS V N, DUCHEN M R, OSELLAME L D. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(4): 1254-1265.

[16] JIN Q H, LI R B, HU N, *et al.* DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways[J]. *Redox Biology*, 2018, 14: 576-587.

[17] ZHU H, JIN Q H, LI Y, *et al.* Melatonin protected cardiac microvascular endothelial cells against oxidative stress injury via suppression of IP3R-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>/VDAC-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> axis by activation of MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2018, 23(1): 101-113.

[18] DADSENA S, ZOLLO C, GARCÍA-SÁEZ A J. Mechanisms of mitochondrial cell death[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(2): 663-674.

[19] ZANDALINAS S I, MITTLER R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2018, 122: 21-27.

[20] HAMANAKA R B, WEINBERG S E, RECZEK C R, *et al.* The mitochondrial respiratory chain is required for organismal adaptation to hypoxia[J]. *Cell Reports*, 2016, 15(3): 451-459.

学生认为混合式教学可拓宽知识面,提高团队协作能力,培养解决问题能力,增加课堂互动性;84.55%的学生认为混合式教学可提高自主学习能力;69.09%的学生认为混合式教学可调动学习兴趣。该结果说明大部分学生对本课程的教学模式是认可的。

## 6 讨论

基于雨课堂的细胞生物学混合式教学充分发挥了线上和线下教学两种方式各自的优势,在保证大部分学生掌握基础知识的前提下,提高了课程的深度和广度,并将课程学习延伸至课前和课后,有效提高了学生的自主学习能力。虽然存在一些问题,比如部分学生学习兴趣不高,但大部分学生对这种教学模式的认可度较高。后续将更加注重根据学情及时调整教学策略和内容,引导学生增强对细胞生物学课程的学习兴趣,比如:去掉随机点名环节,以减少学生的紧张畏难情绪;降低习题难度,减少测验数量,将预习课件中的名词解释和思维导图改为客观题,适当删减艰深内容;用更加通俗的语言讲解;课前帮助修改学生的展示内容;等等。

### 参考文献(References):

- [1] 王双双. 细胞生物学课程教学改革探索[J]. 课程教育研究 (WANG Shuangshuang. Exploration of teaching reform in cell biology course[J]. Course Education Research), 2017(36): 25-26.
- [2] 范建丽, 方辉平. 后 MOOC 时期我国高校课程教学改革的思考[J]. 长春大学学报(FAN Jianli, FANG Huiping. Reflections on curriculum teaching reform of universities in China during post-MOOC period[J]. Journal of Changchun University), 2015, 25(12): 88-92.
- [3] 余胜泉, 路秋丽, 陈声健. 网络环境下的混合式教学: 一种新的教学模式[J]. 中国大学教学(YU Shengquan, LU Qiuli, CHEN Shengjian. Blended teaching in the network environment: a new teaching mode[J]. China University Teaching), 2005(10): 50-56.
- [4] 鞠吉雨, 刘琳琳, 杜鸿斌, 等. 雨课堂混合式教学模式在形成性评价中的应用: 以细胞生物学课程为例[J]. 中国高等医学教育(JU Jiyu, LIU Linlin, DU Hongbin, *et al.* The application of the Rain Classroom blended teaching model in formative assessment: taking the course of cell biology as an example[J]. China Higher Medical Education), 2022(5): 45-46.
- [5] 包鹃, 林江, 王超, 等. 基于“雨课堂”和“腾讯会议”的医学生物化学线上线下混合教学模式改革研究[J]. 中国多媒体与网络教学学报(上旬刊) (BAO Juan, LIN Jiang, WANG Chao, *et al.* Application of “Rain Classroom” combined with “Tencent Conference” in biochemistry theory course of traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Multimedia & Network Teaching), 2022(11): 41-44.
- [6] 尹苗, 李逢庆. 细胞生物学课程混合式教学的设计与实践[J]. 中国细胞生物学学报(YIN Miao, LI Fengqing. The design and practice of blended teaching in the course of cell biology[J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2018, 40(2): 260-268.
- [7] 郭海英, 王志, 星懿展, 等. 基于移动终端的“三段式”导学在细胞生物学教学中的应用效果评价[J]. 中国细胞生物学学报(GUO Haiying, WANG Zhi, XING Yizhan, *et al.* Application effect evaluation of “three-stage” guiding learning based on mobile terminal in cell biology teaching[J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2022, 44(6): 1103-1108.
- [8] 邱小燕, 肖雄. 细胞生物学“智慧课堂”教学模式的实践与探索[J]. 中国细胞生物学学报(QIU Xiaoyan, XIAO Xiong. Practice and exploration of intelligent teaching in cell biology[J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2021, 43(12): 2377-2381.
- [21] NICKEL A, KOHLHAAS M, MAACK C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014, 73: 26-33.
- [22] LIU X, BIAN H, DOU Q L, *et al.* Ginkgetin alleviates inflammation, oxidative stress, and apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation in H9C2 cells via caspase-3 dependent pathway[J]. BioMed Research International, 2020: 1928410.
- [23] LÜ J, LIANG Y B, TU Y B, *et al.* Hypoxic preconditioning reduces propofol-induced neuroapoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and downregulation of activated caspase-3 in the hippocampus of neonatal rats[J]. Neurological Research, 2018, 40(9): 767-773.
- [24] LI H L, LV B, KONG L, *et al.* Noval mediates resistance of rat pheochromocytoma cells to hypoxia-induced apoptosis via the Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 40(4): 1125-1133.

(上接第 550 页)