

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1217-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240504

硫唑嘌呤对RSL3诱导小鼠精母细胞铁死亡的影响

叶严珏¹, 汤子怡¹, 谭钰培¹, 阳诗盈¹, 刘永², 尹俐¹

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院生物制药系, 重庆 400054; 2. 陆军军医大学新桥医院肾内科, 重庆 400037)

[摘要] **目的:** 探讨硫唑嘌呤(AZA)对还原型谷胱甘肽(GSH)过氧化物酶4抑制剂RSL3诱导的小鼠精母细胞铁死亡的影响, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 小鼠精母GC-2细胞随机分为对照组(不进行处理)、RSL3组(给予10 nmol·L⁻¹ RSL3处理24 h)、RSL3+铁死亡抑制剂(Fer-1)组(给予10 nmol·L⁻¹ RSL3处理24 h+2 μmol·L⁻¹ Fer-1处理12 h)、RSL3+低剂量AZA组(给予10 nmol·L⁻¹ RSL3处理24 h+5 μmol·L⁻¹ AZA处理12 h)、RSL3+中剂量AZA组(给予10 nmol·L⁻¹ RSL3处理24 h+10 μmol·L⁻¹ AZA处理12 h)和RSL3+高剂量AZA组(给予10 nmol·L⁻¹ RSL3处理24 h+20 μmol·L⁻¹ AZA处理12 h)。MTT法检测不同浓度AZA和不同浓度RSL3作用后GC-2细胞活性, 采用GSH和氧化型谷胱甘肽(GSSG)检测试剂盒检测GC-2细胞中GSH和GSSG水平, 采用丙二醛(MDA)试剂盒检测各组GC-2细胞中MDA水平, 采用Western blotting法检测各组GC-2细胞中长链脂酰CoA合成酶4(ACSL4)、血红素氧合酶1(HO-1)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白表达水平, 采用免疫荧光法检测各组GC-2细胞中ACSL4蛋白表达情况。**结果:** 与对照组比较, 5、10和20 μmol·L⁻¹ AZA组GC-2细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$), 30和40 μmol·L⁻¹ AZA组GC-2细胞活性明显降低($P<0.01$), 因此AZA作用浓度选择为20 μmol·L⁻¹以内。与对照组比较, 1、5和10 nmol·L⁻¹ RSL3组GC-2细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$), 50、100、500和1 000 nmol·L⁻¹ RSL3组GC-2细胞活性明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 因此将RSL3作用浓度定为10 nmol·L⁻¹以内。GSH和MDA试剂盒检测, 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中GSSG和MDA水平明显升高($P<0.05$), GSH水平明显降低($P<0.05$); 与RSL3组比较, RSL3+Fer-1组和RSL3+AZA组GC-2细胞中GSSG和MDA水平明显降低($P<0.01$), GSH水平明显升高($P<0.01$)。Western blotting法检测, 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中ACSL4和HO-1蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), GPX4蛋白表达水平明显降低($P<0.01$); 与RSL3组比较, RSL3+Fer-1组和RSL3+AZA组GC-2细胞中GPX4蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), ACSL4和HO-1蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。免疫荧光检测, 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中ACSL4蛋白表达量明显增多; 与RSL3组比较, RSL3+Fer-1组和RSL3+AZA组ACSL4蛋白表达量明显降低。**结论:** AZA可以减轻RSL3诱导的小鼠精母细胞铁死亡。

[关键词] 硫唑嘌呤; 铁死亡; 精母细胞; 谷胱甘肽过氧化物酶4; 酯酰辅酶A合成酶长链家族成员4

[中图分类号] R332; R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-08-07

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81402655); 重庆市科技局自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0427)

[作者简介] 叶严珏(1998—), 女, 重庆市人, 在读硕士研究生, 主要从事分子药理学方面的研究。

[通信作者] 尹俐, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: yinli@cqut.edu.cn)

Effect of azathioprine on ferroptosis in spermatocytes of mice induced by RSL3

YE Yanjue¹, TANG Ziyi¹, TAN Yupei¹, YANG Shiyong¹, LIU Yong², YIN Li¹

(1. Department of Biopharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China; 2. Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400037, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of azathioprine (AZA) on ferroptosis in spermatocytes of the mice induced by reduced glutathione (GSH) peroxidase 4 inhibitor RSL3, and to clarify the potential mechanism. **Methods:** The spermatogonia GC-2 cells of the mice were randomly divided into control group (no treatment), RSL3 group (treated with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 for 24 h), RSL3+ferroptosis inhibitor (Ferrostatin-1, Fer-1) group (treated with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 for 24 h + $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fer-1 for 12 h), RSL3+low dose of AZA group (treated with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 for 24 h + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZA for 12 h), RSL3+medium dose of AZA group (treated with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 for 24 h + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZA for 12 h), and RSL3+high dose of AZA group (treated with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 for 24 h + $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZA for 12 h). The MTT method was used to detect the activities of the GC-2 cells in various groups after treated with different concentrations of AZA and RSL3; the GSH and GSSG levels in the GC-2 cells were detected by GSH and oxidized glutathione (GSSG) detection kits; the malondialdehyde (MDA) levels in the GC-2 cells in various groups were detected by MDA detection kit; Western blotting method was used to detect the expression levels of long-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4), heme oxygenase-1 (HO-1), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) proteins in the cells in various groups; immunofluorescence staining was used to detect the expressions of ACSL4 protein in the cells in various groups. **Results:** Compared with control group, the differences in activities of the GC-2 cells in 5, 10, and $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZA groups had no significant differences ($P > 0.05$), while the activities of the GC-2 cells in 30 and $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZA groups were significantly decreased ($P < 0.01$); therefore, the AZA concentration was selected to be within $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with control group, the differences of the activities of the GC-2 cells in 1, 5, and $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 groups had no significant differences ($P > 0.05$), while the activities of the GC-2 cells in 50, 100, 500, and $1\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSL3 groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); therefore, the RSL3 concentration was set to be within $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The GSH and MDA detection kits results showed that compared with control group, the levels of GSSG and MDA in the GC-2 cells in RSL3 group were significantly increased ($P < 0.05$), while the GSH levels were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with RSL3 group, the levels of GSSG and MDA in the GC-2 cells in RSL3+Fer-1 group and RSL3+AZA group were significantly decreased ($P < 0.01$), while the GSH levels were significantly increased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of ACSL4 and HO-1 proteins in the GC-2 cells in RSL3 group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression level of GPX4 protein was significantly decreased ($P < 0.01$); compared with RSL3 group, the expression levels of GPX4 protein in the GC-2 cells in RSL3+Fer-1 group and RSL3+AZA group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of ACSL4 and HO-1 proteins were significantly decreased ($P < 0.01$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the expression amount of ACSL4 protein in the GC-2 cells in RSL3 group was significantly increased, and compared with RSL3 group, the expression amounts of ACSL4 protein in the cells in RSL3+Fer-1 group and RSL3+AZA group were significantly decreased. **Conclusion:** AZA can alleviate the ferroptosis-induced by RSL3 in

spermatocytes of the mice.

KEYWORDS Azathioprine; Ferroptosis; Spermatocyte cells; Glutathione peroxidase 4 inhibitor; Acyl CoA synthetase long-chain family member 4

男性不育是现代社会的重大医疗挑战, 其病因繁多, 包括但不限于精液质量异常、精子生成过程障碍和精子与卵子结合障碍等。质量良好的精子对于生殖成功至关重要^[1-2]。研究^[3-5]显示: 精子在遭受氧化应激损伤时, 其动力学特性受到负面影响, 表现为活力下降和畸形率升高, 上述变化往往导致男性不育。铁死亡是一种由氧化应激引起的细胞死亡模式, 其特征是还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 枯竭和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 活性降低, 导致身体无法有效清除脂质过氧自由基, 从而触发含铁生物分子氧化, 终致细胞死亡^[6-7]。GPX4 抑制剂 RSL3 可诱导细胞铁死亡, 在许多研究^[8]中用作铁死亡诱导剂。硫唑嘌呤 (azathioprine, AZA) 是临床上广泛应用的免疫抑制药物, 在体内代谢成巯嘌呤发挥免疫抑制效果, 能缓解炎症反应和减轻氧化应激^[9-10]。目前 AZA 是否具有调节细胞铁死亡的潜力, 尤其在改善男性不育方面的作用尚不明确。本研究旨在探讨 AZA 能否减轻 RSL3 诱导的精母细胞的铁死亡效应, 阐明 AZA 治疗男性不育的潜在作用机制, 为寻找治疗男性不育的新策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 小鼠精母 GC-2 细胞购自美国典型培养物收藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, GPX4、酯酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)、血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和 β 微管蛋白 (β -tubulin) 均购自美国 Proteintech 公司, GSH 和氧化型谷胱甘肽 (glutathione oxidized, GSSG) 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒购自兰杰柯科技有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 抗荧光淬灭剂购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 山羊抗兔红色荧光二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司, 4', 6-二脒基-2-苯

基吡啶 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自上海碧云天生物技术有限公司。Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司, Fluor Chem HD2 化学发光凝胶成像系统购自美国 Protein Simple 公司, Synergy H1 多功能酶荧光标仪购自美国 BioTek 公司, NIS-Elements 激光共聚焦显微镜购自日本尼康株式会社。

1.2 小鼠精母 GC-2 细胞分组和培养方法 小鼠 GC-2 细胞采用含 10% 胎牛血清和青-链霉素的达尔伯克改良伊格培培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞孵箱中培养, 取对数生长期的 GC-2 细胞接种至 6 孔细胞培养板中, 24 h 后观察细胞形态表现, 随机分为对照组 (不进行处理)、RSL3 组 (给予 10 nmol·L⁻¹ RSL3 处理 24 h)、RSL3+铁死亡抑制剂 (Ferrostatin-1, Fer-1) 组 (给予 10 nmol·L⁻¹ RSL3 处理 24 h + 2 μ mol·L⁻¹ Fer-1 处理 12 h)、RSL3+低剂量 AZA 组 (给予 10 nmol·L⁻¹ RSL3 处理 24 h + 5 μ mol·L⁻¹ AZA 处理 12 h)、RSL3+中剂量 AZA 组 (给予 10 nmol·L⁻¹ RSL3 处理 24 h + 10 μ mol·L⁻¹ AZA 处理 12 h) 和 RSL3+高剂量 AZA 组 (给予 10 nmol·L⁻¹ RSL3 处理 24 h + 20 μ mol·L⁻¹ AZA 处理 12 h)。

1.3 MTT 法检测不同浓度 AZA 作用后各组 GC-2 细胞活性 取对数生长期 GC-2 细胞, 以每孔 5×10^4 个的密度接种至 24 孔细胞培养板, 每孔加入 500 μ L DMEM, 置于恒温孵箱培育 24 h。细胞分为对照组和不同浓度 AZA 组, 吸弃细胞上清, 加入含不同浓度 AZA 的培养基, 使 AZA 终浓度达到 0、5、10、20、30 和 40 μ mol·L⁻¹。12 h 后向 24 孔细胞培养板每孔中加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 50 μ L, 置于恒温孵箱中孵育 4 h, 轻轻吸弃细胞培养上清, 每孔加入 400 μ L 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液, 将 24 孔细胞培养板置于摇床避光振荡 10 min, 采用酶标仪检测各孔在 570 和 630 nm 波长处的吸光度 (A) 值。细胞活性 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.4 MTT 法检测不同浓度 RSL3 作用后 GC-2 细胞活性 取对数生长期 GC-2 细胞, 以每孔 $5 \times$

10^4 个的密度接种至 24 孔细胞培养板, 每孔加入 500 μL DMEM, 置于恒温孵箱培育 24 h。细胞对对照组和不同浓度 RSL3 组, 吸弃培养上清后, 向各组细胞中分别加入含不同浓度 RSL3 (0、1、5、10、500 和 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 DMEM。MTT 法检测见“1.3”。

1.5 各组 GC-2 细胞中蛋白含量检测 取对数生长期 GC-2 细胞, 以每孔 4×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 按照“1.2”中方法分为对照组、RSL3 组、RSL3+Fer-1 组和 RSL3+AZA 组。采用 1 mL 预冷的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞 3 次, 离心 5 min 后收集细胞沉淀。加入 50 μL 蛋白去除剂, 振荡重悬细胞, 将重悬的细胞在超低温液氮和 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下反复冻融 3 次。置于冰上 5 min 后, 离心 10 min, 取样品上清用于 GSH 和 GSSG 含量检测。另取部分上清加入 1 \times GSH 清除缓冲液和 1 \times GSH 清除工作液震荡混匀, 用于 GSSG 含量检测。样品加入总谷胱甘肽检测工作液混匀, 室温孵育 5 min, 加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (triphosphopyridine nucleotide, NADPH) 溶液 50 μL 混匀, 25 min 后采用酶标仪检测 412 nm 波长处 A 值。采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测各组细胞中目的蛋白含量, 根据标准曲线计算总谷胱甘肽 (即 GSH+GSSG) 和 GSSG 含量。GSH 含量 = (总谷胱甘肽含量 - GSSG 含量) \times 2。

1.6 各组 GC-2 细胞中 MDA 水平检测 取对数生长期 GC-2 细胞, 以每孔 4×10^5 个的密度接种于 6 孔细胞培养板, 按照“1.2”中方法分为对照组、RSL3 组、RSL3+Fer-1 组和 RSL3+AZA 组。吸弃培养上清, 采用预冷的 PBS 缓冲液轻轻洗涤细胞 3 次, 吸弃 PBS 缓冲液, 每孔加入 200 μL 裂解液, 将样品置于冰上摇床振荡裂解 30 min, 采用 BCA 试剂盒检测样品的蛋白浓度; 取 100 μL 充分裂解的样品加入 200 μL MDA 检测工作液后充分振荡混匀。将混合均匀的样品置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴中加热 15 min, 水浴冷却至室温后, 离心 10 min 取上清液, 采用酶标仪在 532 nm 波长处测定各孔 A 值, 根据标准曲线计算各组 GC-2 细胞中 MDA 水平。

1.7 Western blotting 法检测各组 GC-2 细胞中 GPX4、ACLS4 和 HO-1 蛋白表达水平 取对数生长期 GC-2 细胞, 以每孔 4×10^5 个的密度接种于 6 孔

细胞培养板中, 按照“1.2”中方法分为对照组、RSL3 组、RSL3+Fer-1 组和 RSL3+AZA 组, 每孔加入 200 μL 裂解液, 将样品置于冰上充分裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 15 min, 取样本上清, 采用 BCA 法测定蛋白表达水平。采用 12.5% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳分离蛋白, 于冰水中转至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 室温孵育 ACSL4、GPX4、HO-1 和 β -微管蛋白抗体 2 h。Western blotting 洗脱缓冲液 (Tris-buffered saline and Tween 20, TBST) 洗膜 3 次后加入相应二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 采用化学发光底物 (electrochemiluminescence, ECL) 显影液显影。采用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值。目的蛋白表达水平 = 目标蛋白条带灰度值/ β -tubulin 蛋白条带灰度值。

1.8 免疫荧光法检测各组 GC-2 细胞中 ACSL4 蛋白表达量 取对数生长期 GC-2 细胞, 以每孔 1×10^5 个的密度接种于提前放置爬片的 6 孔细胞培养板中培养过夜, 按照“1.2”中方法分为对照组、RSL3 组、RSL3+Fer-1 组和 RSL3+AZA 组。吸弃上清, 每孔采用 1 mL 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次。吸弃 PBS 缓冲液, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 mL, 固定 30 min 后采用真空吸液泵吸弃多聚甲醛。采用 0.5% Triton-X 100 通透 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。在爬片上滴加免疫封闭液, 室温封闭 1 h, 吸弃封闭液, 将配置好的 ACSL4 一抗工作液滴加至染色区域, 置于湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日回收一抗, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。避光加入相应荧光二抗, 置于湿盒中室温孵育 1 h。吸弃二抗, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 DAPI 孵育 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次。加入抗荧光淬灭剂封片, 在荧光显微镜下观察荧光强度, 定性检测细胞中 ACSL4 蛋白表达量。

1.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 统计软件进行统计学分析。各组 GC-2 细胞活性, 各组 GC-2 细胞中 GSH、GSSG 和 MDA 水平, 各组 GC-2 细胞中 GPX4、ACSL4、HO-1 和 ACSL4 蛋白表达水平以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用

SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 AZA 处理后各组 GC-2 细胞活性

与对照组比较, 5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AZA 组 GC-2 细胞活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 30 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AZA 组 GC-2 细胞活性明显降低 ($P < 0.01$)。见表 1。因此, 本研究中 AZA 作用浓度选择为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内。

表1 不同浓度 AZA 作用后各组 GC-2 细胞活性

Tab. 1 Activities of GC-2 cells in various groups after treated with different concentrations of AZA ($n=4, \bar{x}\pm s$)

Group	Activity of GC-2 cells
Control	1.00±0.03
AZA($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
5	0.94±0.04
10	0.92±0.06
20	0.89±0.04
30	0.73±0.15*
40	0.72±0.13*

* $P < 0.01$ vs control group.

2.2 不同浓度 RSL3 处理后各组 GC-2 细胞活性

与对照组比较, 1、5 和 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ RSL3 组细胞活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 50、100、500 和 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ RSL3 组细胞活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。因此, 本研究将 RSL3 作用浓度定为 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内。

2.3 各组 GC-2 细胞中 GSH 和 GSSG 水平 与对照组比较, RSL3 组 GC-2 细胞中 GSH 水平降低 ($P < 0.05$), GSSG 水平升高 ($P < 0.05$), GSH/GSSG 比值降低 ($P < 0.05$); 与 RSL3 组比较,

表2 不同浓度 RSL3 作用后各组 GC-2 细胞活性

Tab. 2 Activities of GC-2 cells in various groups after treated with different concentrations of RSL3 ($n=4, \bar{x}\pm s$)

Group	Activity of GC-2 cells
Control	1.00±0.05
RSL3($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
1	0.96±0.03
5	0.97±0.05
10	0.91±0.01
50	0.74±0.08*
100	0.60±0.00*
500	0.15±0.01**
1 000	0.14±0.00**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

RSL3+AZA 组 GC-2 细胞中 GSH 水平升高 ($P < 0.01$), GSSG 水平降低 ($P < 0.01$), GSH/GSSG 比值升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 各组 GC-2 细胞中 MDA 水平 与对照组比较, RSL3 组 GC-2 细胞中 MDA 水平升高 ($P < 0.05$); 与 RSL3 组比较, RSL3+Fer-1 组和 RSL3+不同浓度 AZA 组 GC-2 细胞中 MDA 水平降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

2.5 各组 GC-2 细胞中 GPX4、ACLS4 和 HO-1 蛋白表达水平

与对照组比较, RSL3 组 GC-2 细胞中 ACSL4 和 HO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), GPX4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 RSL3 组比较, RSL3+Fer-1 组和 RSL3+不同浓度 AZA 组 GC-2 细胞中 ACSL4 和 HO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), GPX4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 5。

表3 各组 GC-2 细胞中 GSH 和 GSSG 水平

Tab. 3 Levels of GSH and GSSG in GC-2 cells in various groups

($n=3, \bar{x}\pm s$)

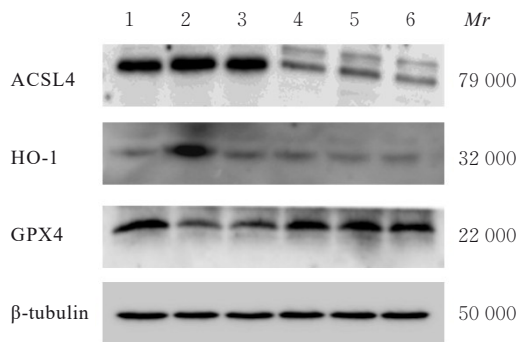
Group	GSH[$m_B/(\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1})$]	GSSG[$m_B/(\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1})$]	GSH/GSSG
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
RSL3	0.56±0.26*	1.28±0.08*	0.59±0.25*
RSL3+Fer-1	0.84±0.21	0.97±0.03 Δ	0.84±0.25
RSL3+low dose of AZA	1.29±0.21 $\Delta\Delta$	0.73±0.14 Δ	1.43±0.45 $\Delta\Delta$
RSL3+medium dose of AZA	1.21±0.08 $\Delta\Delta$	0.72±0.09 $\Delta\Delta$	1.24±0.20 Δ
RSL3+high dose of AZA	1.12±0.12 $\Delta\Delta$	0.68±0.15 $\Delta\Delta$	1.24±0.16 Δ

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs RSL3 group.

表4 各组GC-2细胞中MDA水平

Tab. 4 Levels of MDA in GC-2 cells in various groups
[$n=3, \bar{x} \pm s, c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	Level of MDA
Control	13.75±1.06
RSL3	16.64±0.76*
RSL3+Fer-1	12.72±1.41 [△]
RSL3+low dose of AZA	12.83±0.96 [△]
RSL3+medium dose of AZA	12.89±1.01 [△]
RSL3+high dose of AZA	13.14±1.03 [△]

* $P<0.05$ vs control group; [△] $P<0.01$ vs RSL3 group.

Lane 1: Control group; Lane 2: RSL3 group; Lane 3: RSL3+Fer-1 group; Lane 4: RSL3+low dose of AZA group; Lane 5: RSL3+medium dose of AZA group; Lane 6: RSL3+high dose of AZA group.

图1 各组GC-2细胞中ACSL4、HO-1和GPX4蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of expressions of ACSL4, HO-1, and GPX4 proteins in GC-2 cells in various groups

2.6 各组GC-2细胞中ACSL4蛋白表达量 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中ACSL4蛋白表达量增多; 与RSL3组比较, RSL3+Fer-1组和RSL3+AZA组GC-2细胞中ACSL4蛋白表达量明

显降低。见图2。

3 讨论

男性不育问题在全球范围内逐年加剧, 对个人和家庭健康构成了严峻挑战。不育症的成因多样, 包括遗传、环境和生活习惯等^[11-13]。在临床上, 精子的数量、活动力和形态是评估男性不育的关键生物学指标^[11-13]。精子的生成和成熟是一个复杂的过程: 精原细胞的增殖并分化为精母细胞, 精母细胞经过2次减数分裂形成精子细胞, 最后经过细胞变态的过程形成成熟的精子。该过程需要细胞内的稳态和精确的分子调控, 任何对上述过程的干扰都可能导致精子质量下降, 进而影响男性的生育能力^[14-15]。研究^[16]显示: 精母细胞异常, 包括染色体异常、染色体非整倍体、DNA损伤、基因突变、细胞增殖和细胞凋亡的异常等都可能影响精子发育过程受损。因此, 本研究采用GC-2细胞作为模型, 探讨精母细胞异常对于男性不育防治的意义。

铁死亡是细胞死亡的一种新形式, 与男性不育有密切关联^[17-18]。铁死亡是由脂质过氧化引发的细胞死亡途径, 在精子形成中起重要调控作用。异常铁死亡过程可能导致睾丸组织和精子的氧化应激, 进而影响精子的形成和成熟^[19]。研究^[20]显示: PM2.5等导致的男性生殖系统损伤与精母细胞铁死亡有密切关联。铁死亡诱导剂包括以下几类: 抑制Xc系统活性, 如erastin和柳氮磺吡啶; 抑制或降解GPX4, 如RSL3和FIN56; 消耗辅酶Q10, 如他汀类药物; 通过铁过载或多不饱和脂肪酸过载诱导脂质过氧化, 如血红素及FINO2^[21]。本研究中, 铁死亡诱导剂RSL3作用GC-2细胞24 h后, 细胞中GSH水平降低, MDA水平升高, 铁死亡标志分子GPX4表达水平降低, ACSL4和HO-1蛋白

表5 各组GC-2细胞中ACSL4、HO-1和GPX4蛋白表达水平

Tab. 5 Expression levels of ACSL4, HO-1, and GPX4 proteins in GC-2 cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	ACSL4	HO-1	GPX4
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
RSL3	1.22±0.13*	1.57±0.06**	0.49±0.04*
RSL3+FER1	1.03±0.13	0.80±0.18 ^{△△}	0.84±0.13 [△]
RSL3+low dose of AZA	0.75±0.21 [△]	0.73±0.09 ^{△△}	1.01±0.23 [△]
RSL3+medium dose of AZA	0.65±0.15 ^{△△}	0.85±0.07 ^{△△}	1.11±0.33 [△]
RSL3+high dose of AZA	0.69±0.28 [△]	0.74±0.07 ^{△△}	1.12±0.28 [△]

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs RSL3 group.

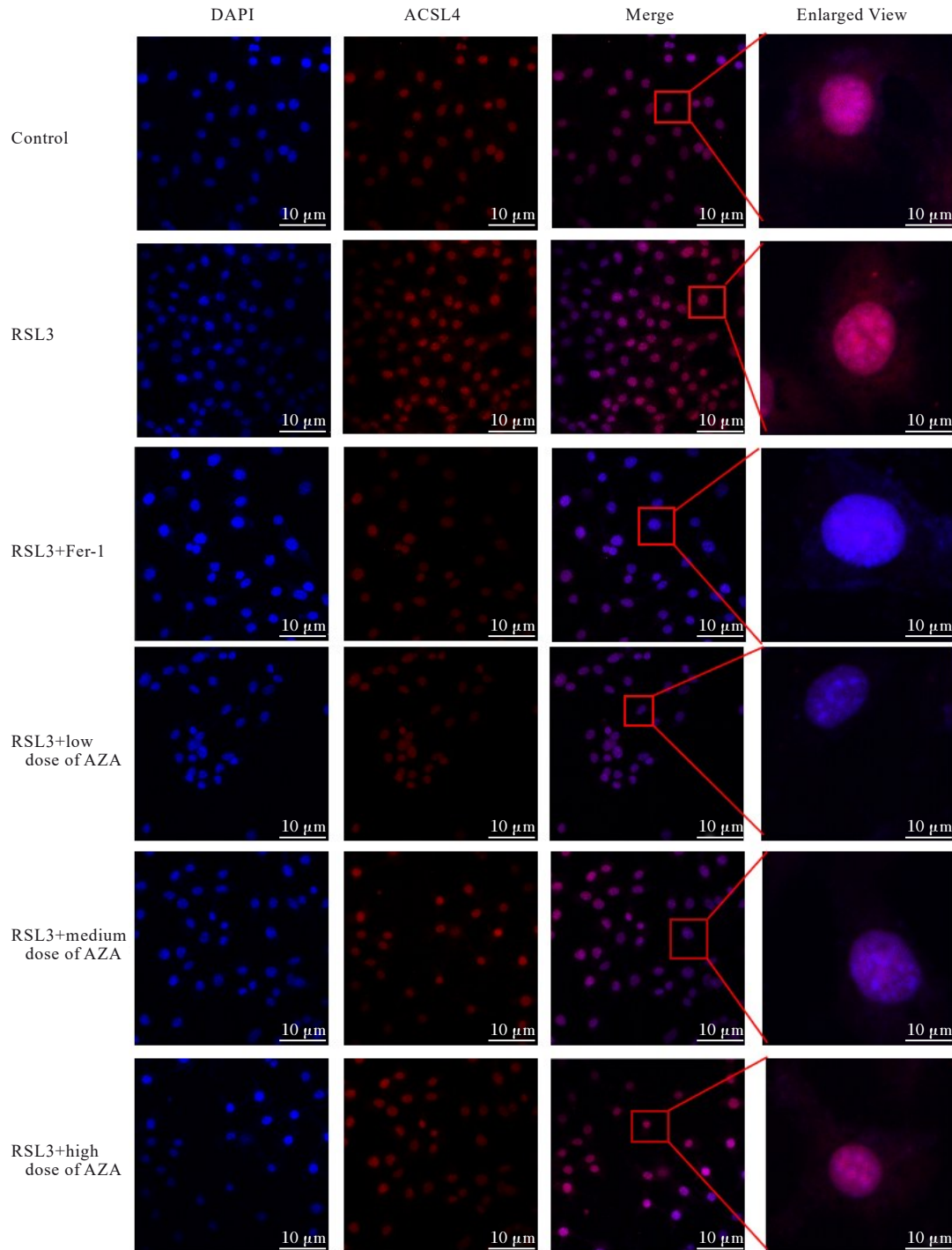


图2 免疫荧光法检测各组GC-2细胞中ACSL4蛋白表达情况

Fig. 2 Expressions of ACSL4 protein in GC-2 cells in various groups detected by immunofluorescence

表达水平升高, 表明RSL3可以诱导GC-2细胞发生铁死亡。GC-2细胞经铁死亡抑制剂Fer-1处理后, 细胞中GSH水平有所升高, MDA水平得到恢复, 进一步证实铁死亡与精母细胞损伤有密切关联。因此, 铁死亡诱导剂RSL3作用的GC-2细胞可作为细胞模型进一步探讨防治精母细胞铁死亡的

药物。

铁死亡过程中, GPX4能有效清除脂质过氧化物, 保护精子免受氧化损伤^[22-23]。GPX4是一种硒蛋白, 可作为GSH依赖的过氧化物酶清除脂质过氧化物而保护细胞免受脂质过氧化, 当GSH合成受阻或者GSH依赖性的GPX4在体内被抑制时,

便会触发铁死亡。在生殖系统中, GPX4在生殖器官和精子中大量表达, 30%不育男性精子中GPX4表达水平降低^[24]。GPX4活性丧失或低表达已被证实与精子畸形率增高和生育能力下降有关^[25-26]。ACSL4是一种将CoA酯化为特定多不饱和脂肪酸(花生四烯酸和肾上腺酸)的酶^[27]。ACSL4和GPX4分别正向和负向调节铁死亡^[28]。HO-1可以通过释放血红素中的铁来升高细胞中铁离子浓度, 铁离子过量可能会促进泛素化脂质过氧化物酶的形成, 破坏细胞膜完整性, 最终引发铁死亡。在雄性生殖系统, HO-1有助于抑制精子和睾丸组织中活性氧的过量积累, 从而保护精子的功能和完整性^[26, 29-31]。上述研究提示: 铁死亡标志分子GPX4、ACSL4和HO-1与雄性生殖损有伤密切相关。本研究结果显示: 10 nmol·L⁻¹铁死亡诱导剂RSL3处理的GC-2细胞中GPX-4表达水平降低, HO-1和ACSL4表达水平升高, 而10 nmol·L⁻¹RSL3并未对细胞活性产生明显影响, 提示铁死亡标志分子GPX4、ACSL4和HO-1表达水平的变化较细胞活性变化更为敏感, 可作为精母细胞损伤敏感标志分子。

AZA作用机制包括其在体内转变为巯嘌呤, 从而抑制细胞增殖, 主要用于治疗各种炎症性和自身免疫性疾病^[32-33]。此外, AZA也展现了抗氧化应激的潜力, 可能通过影响抗氧化酶的表达和调节细胞中GSH水平来保护细胞免受自由基的伤害^[34-35]。铁死亡发生时, 细胞中铁离子释放到细胞外, 与细胞膜上的不饱和脂肪酸发生反应, 导致细胞膜的通透性和完整性受损^[36]。因此, 铁死亡与氧化应激有密切关联。本研究结果显示: AZA能降低RSL3诱导的精母细胞氧化相关分子MDA水平, 提升抗氧化分子GSH水平, 证实AZA抗氧化应激的能力; 同时AZA还可以升高铁死亡标志分子GPX4表达水平且降低ACSL4和HO-1表达水平, 提示AZA可作为铁死亡相关的潜在治疗剂, 在防治精母细胞铁死亡方面发挥作用, 该结果为研究和治疗男性不育提供了新的思路。

综上所述, AZA通过对铁死亡标志分子和MDA及GSH等氧化抗氧化相关分子的调节, 能够有效减缓精母细胞铁死亡进程, 从而发挥对雄性不育的防治作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

叶严珏参与选题、实验操作过程、数据收集整理和论文撰写, 汤子怡、阳诗盈和谭钰培参与论文中数据的统计学分析, 刘永和尹俐参与指导论文撰写。

[参考文献]

- [1] ZIAMAJIDI N, KHAJVAND-ABEDINI M, DAEI S, et al. Ameliorative effects of vitamins A, C, and E on sperm parameters, testis histopathology, and oxidative stress status in zinc oxide nanoparticle-treated rats [J]. *Biomed Res Int*, 2023, 2023: 4371611.
- [2] XU J M, YANG Q L, CHEN W H, et al. Comparing the clinical and singleton neonatal outcomes in male infertility patients with Oligoasthenospermia, OA, or NOA following fresh ICSI-ET using different sources of sperm [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1186257.
- [3] ROTIMI D E, ELEBIYO T C, OJO O A. Therapeutic potential of rutin in male infertility: a mini review [J]. *J Integr Med*, 2023, 21(2): 130-135.
- [4] MAZINI F, ABDOLLAHIFAR M A, NIKNEJAD H, et al. Retinoic acid loaded with chitosan nanoparticles improves spermatogenesis in scrotal hyperthermia in mice [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2023, 50(4): 230-243.
- [5] 李嫣晓, 陈红霞, 程梦蝶, 等. 铁死亡与心肌纤维化相关信号通路的研究进展 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2024, 59(2): 195-201.
- [6] LI J, JIA B W, CHENG Y, et al. Targeting molecular mediators of ferroptosis and oxidative stress for neurological disorders [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3999083.
- [7] CHEN G H, SONG C C, PANTOPOULOS K, et al. Mitochondrial oxidative stress mediated Fe-induced ferroptosis via the NRF2-ARE pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 95-107.
- [8] SUN X F, ZHANG Q, LIN X H, et al. Imatinib induces ferroptosis in gastrointestinal stromal tumors by promoting STUB1-mediated GPX4 ubiquitination [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(12): 839.
- [9] BAHADIR S, ONAL M B, NARIN F, et al. Azathioprine as a neuroprotective agent in experimental traumatic spinal cord injury [J]. *Turk Neurosurg*, 2021, 31(2): 211-216.
- [10] PAPADA E, FORBES A, AMERIKANOU C, et al. Antioxidative efficacy of a *Pistacia lentiscus* supplement and its effect on the plasma amino acid profile in inflammatory bowel disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1779.

- [11] LANCET DIABETES ENDOCRINOLOGY THE. Homing in on the causes of male infertility [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(3): 149.
- [12] SALEHI Z, PASHA H, HOSSEINI S R, et al. The impact of social support, physical and psychological performance on sleep outcomes in Iranian older adults: a case-control study[J]. *BMC Geriatr*, 2023, 23(1): 791.
- [13] DOMAR A D, JASULAITIS L, MATEVOSSIAN K, et al. The impact of the FertiStrong mobile application on anxiety and depression in men: a randomised control pilot study[J]. *J Hum Reprod Sci*, 2023, 16(3): 195-203.
- [14] MIYAOKA R, OROSZ J E, ACHERMANN A P, et al. Methods of surgical sperm extraction and implications for assisted reproductive technology success[J]. *Panminerva Med*, 2019, 61(2): 164-177.
- [15] 刘巧斌, 程玲, 叶圆圆, 等. 男性不育患者精液质量及其影响因素分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(2): 470-477.
- [16] BHARTIYA D, KAUSHIK A. Testicular stem cell dysfunction due to environmental insults could be responsible for deteriorating reproductive health of men[J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(3): 649-658.
- [17] LI L P, PEI Z J, WU R T, et al. FDX1 regulates leydig cell ferroptosis mediates PM_{2.5}-induced testicular dysfunction of mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 263: 115309.
- [18] LIU Y, CAO X H, HE C, et al. Effects of ferroptosis on male reproduction[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7139.
- [19] JIAO D L, MA B Z, ZHAO C, et al. Mechanism of ferroptosis in regulating testicular spermatogenic dysfunction: Progress in research [J]. *Natl J Androl*, 2022, 28(11): 1044-1048.
- [20] WANG J K, ZHANG Z H, SHI F Q, et al. PM_{2.5} caused ferroptosis in spermatocyte *via* overloading iron and disrupting redox homeostasis[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 872: 162089.
- [21] BELAVGENI A, MAREMONTI F, TONNUS W, et al. vPIF-1 is an insulin-like anti-ferroptotic viral peptide[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(21): e2300320120.
- [22] HAN P, WANG X, ZHOU T Q, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates oligospermia in male Nrf2 knockout mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 1): 421-429.
- [23] KADER M A A B D E L, GABR M M, KHATER S M, et al. Impact of insulin producing cells derived from adipose tissue mesenchymal stem cells on testicular dysfunction of diabetic rats[J]. *Heliyon*, 2021, 7(11): e08316.
- [24] HAO X L, WANG H, CUI F, et al. Reduction of SLC7A11 and GPX4 contributing to ferroptosis in sperm from asthenozoospermia individuals [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(1): 247-257.
- [25] ZHOU J C, ZHENG S J, MO J L, et al. Dietary selenium deficiency or excess reduces sperm quality and testicular mRNA abundance of nuclear glutathione peroxidase 4 in rats[J]. 2017, 147(10): 1947-1953.
- [26] HAN S T, LIN F Y, QI Y C, et al. HO-1 contributes to luteolin-triggered ferroptosis in clear cell renal cell carcinoma *via* increasing the labile iron pool and promoting lipid peroxidation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3846217.
- [27] CHENG J, FAN Y Q, LIU B H, et al. ACSL4 suppresses glioma cells proliferation *via* activating ferroptosis[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(1): 147-158.
- [28] DAI Y, CHEN Y T, MO D, et al. Inhibition of ACSL4 ameliorates tubular ferroptotic cell death and protects against fibrotic kidney disease [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 907.
- [29] LI G S, ZHANG P H, YOU Y D, et al. Qiangjing tablets regulate apoptosis and oxidative stress *via* Keap1/Nrf2 pathway to improve the reproductive function in asthenospermia rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 714892.
- [30] XU Z J, QIN Y, LV B B, et al. Effects of moderate-intensity continuous training and high-intensity interval training on testicular oxidative stress, apoptosis and m6A methylation in obese male mice [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(10): 1874.
- [31] COLLODEL G, SIGNORINI C, NERUCCI F, et al. Semen biochemical components in varicocele, leukocytospermia, and idiopathic infertility [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(1): 91-101.
- [32] SINGH S, KIRTSCHIG G, ANCHAN V N, et al. Interventions for bullous pemphigoid [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023, 8(8): CD002292.
- [33] ZHONG Z, SU G, YANG P. Risk factors, clinical features and treatment of Behcet's disease uveitis [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2023, 97: 101216.
- [34] SCHAALAN M F, RAMADAN B K, A H A E. Ameliorative effect of taurine-chloramine in azathioprine-induced testicular damage; a deeper insight into the mechanism of protection [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 255.

-
- [35] ABDUL-HAMID M, ABDEL-REHEIM E S, HEGAZY W, et al. Impact of gervital against histopathological, ultrastructural, and biochemical alterations caused by methotrexate or azathioprine in albino rat testis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(8): 21914-21926.
- [36] TAN S L W, TAN H M, ISRAELI E, et al. Up-regulation of SLC7A11/xCT creates a vulnerability to selenocystine-induced cytotoxicity [J]. *Biochem J*, 2023, 480(24): 2045-2058.