

异菌脲对小鼠精母细胞 GC-2 铁死亡的影响

胡晓雪, 艾霄文, 杨安娜, 张永兰

(重庆理工大学药学与生物工程学院制药工程系, 重庆 400054)

[摘要] **目的:** 探讨异菌脲 (Ipr) 对小鼠精母细胞 GC-2 铁死亡的影响, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测 0、0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 和 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 处理 24 h 后 GC-2 细胞活性。另取 GC-2 细胞, 分为空白对照组、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组、2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 (分别加入终浓度为 0、1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ipr 溶液处理 24 h)。采用荧光显微镜观察细胞中活性氧 (ROS) 生成和线粒体膜电位; 采用试剂盒检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平及还原型谷胱甘肽 (GSH) /氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 比值, Western blotting 法检测 Ipr 暴露后各组 GC-2 细胞中铁死亡相关蛋白表达水平, 免疫荧光法检测各组 GC-2 细胞中血红素加氧酶 1 (HO-1) 蛋白荧光强度。**结果:** MTT 法, 与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组比较, 1.000、10.000 和 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞活性明显降低 ($P<0.01$), 后续实验选择 1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 作用 GC-2 细胞。荧光检测法, 与空白对照组比较, 2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 处理 GC-2 细胞可促进 ROS 生成并降低线粒体膜电位; 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中 MDA 水平和 SOD 活性及 GSH/GSSG 比值均无明显变化, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中 MDA 水平明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), SOD 活性和 GSH/GSSG 比值明显降低 ($P<0.01$)。Western blotting 法, 与空白对照组比较, 作用 24 h 后 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和铁蛋白重链 1 (FTH1) 蛋白表达水平均无明显变化, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 作用 24 h 后 2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中 GPX4 和 FTH1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 作用 24 h 后 1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中 HO-1 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.01$)。免疫荧光法, 与空白对照组比较, 1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中 HO-1 蛋白荧光强度明显增强。**结论:** Ipr 导致小鼠精母细胞 GC-2 铁死亡, 其机制可能与上调 HO-1 蛋白表达以及下调 GPX4 和 FTH1 蛋白表达有关。

[关键词] 铁死亡; 小鼠精母细胞 GC-2; 异菌脲; 谷胱甘肽过氧化物酶 4; 铁蛋白重链 1; 血红素加氧酶 1

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A

Effect of iprodione on ferroptosis in spermatocytes GC-2 of mice

HU Xiaoxue, AI Xiaowen, YANG Anna, ZHANG Yonglan

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

[收稿日期] 2025-01-17 **[录用日期]** 2025-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81803800); 重庆市科技局自然科学基金项目 (cstc2018jcyjAX0529, CSTB2023NSCQ-MSX0469)

[作者简介] 胡晓雪 (2000—), 女, 四川省达州市人, 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] 张永兰, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: lanzy2015@cqut.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of iprodione (Ipr) on ferroptosis in mouse spermatocyte GC-2 cells, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** The MTT method was used to detect the viability of GC-2 cells after treatment with 0, 0.001, 0.010, 0.100, 1.000, 10.000, and 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr for 24 h. Additional GC-2 cells were taken and divided into blank control group, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group, 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group, and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group (treated with Ipr solutions at final concentrations of 0, 1.0, 2.5, and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, for 24 h). Fluorescence microscope was used to observe the intracellular reactive oxygen species (ROS) generation and mitochondrial membrane potential changes; Kit methods were used to detect the superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) level, and the reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio in the GC-2 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of ferroptosis-related proteins in the GC-2 cells in various groups after Ipr exposure; immunofluorescence method was used to detect the fluorescence intensity of heme oxygenase-1 (HO-1) protein in the GC-2 cells in various groups. **Results:** The MTT assay results showed that compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group, the viabilities of the GC-2 cells in 1.000, 10.000, and 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr groups were significantly decreased ($P<0.01$); thus, 1.0, 2.5, and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr were selected for subsequent experiments on GC-2 cells. The fluorescence analysis results showed that compared with blank control group, the ROS generation in the GC-2 cells in 2.5 and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr groups was increased and the mitochondrial membrane potentials were decreased; there were no significant changes in the MDA level, SOD activity, and GSH/GSSG ratio in the GC-2 cells in 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group ($P>0.05$); compared with blank control group, the MDA levels in the GC-2 cells in 2.5 and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr groups were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the SOD activities and GSH/GSSG ratios were significantly decreased ($P<0.01$). The Western blotting results showed that compared with blank control group, after 24 h of treatment, the expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferritin heavy chain 1 (FTH1) proteins in the GC-2 cells in 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group showed no significant changes ($P>0.05$); compared with blank control group, after 24 h of treatment, the expression levels of GPX4 and FTH1 proteins in the GC-2 cells in 2.5 and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr groups were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with blank control group, after 24 h of treatment, the expression levels of HO-1 protein in the GC-2 cells in 1.0, 2.5, and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr groups were significantly increased ($P<0.01$). The immunofluorescence results showed that compared with blank control group, the fluorescence intensities of HO-1 protein in the GC-2 cells in 1.0, 2.5, and 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr groups were significantly enhanced. **Conclusion:** Ipr induces ferroptosis in mouse spermatocyte GC-2 cells, and its mechanism may be related to the up-regulation of HO-1 protein expression and the down-regulation of GPX4 and FTH1 protein expressions.

KEYWORDS Ferroptosis; Mouse spermatocyte GC-2; Iprodione; Glutathione peroxidase 4; Ferritin heavy chain 1; Heme oxygenase-1

男性不育约占不育病例的40%，现已成为全球日益严重的社会问题。生殖毒理学研究^[1]表明：环境污染物对男性生育能力和胚胎发育存在不利影响。研究^[2]表明：暴露于内分泌干扰化学物质（endocrine disrupting chemicals, EDCs）被认为是导致男性精子数量和质量降低及生殖疾病发病率升高的主要原因之一。铁死亡作为一种新型的程序性细胞死亡方式，近年来在男性生殖领域受到广泛关注^[3]。一些环境污染物，包括镉^[4]、丙烯醛^[5]和邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯^[6]通过影响氧化

应激及抗氧化系统等诱导细胞铁死亡，进而对男性生殖系统产生毒性作用^[7]。氧化应激和脂质过氧化会破坏精子的质膜及DNA的完整性，影响精子的质量和受精能力^[8]。在众多环境污染物中，异菌脲（iprodione, Ipr）作为一种特殊的EDCs对动物机体存在潜在性和长期性的破坏作用，与神经毒性、生殖障碍和内分泌紊乱等不良反应的发生有关^[9]。研究^[10-11]显示：Ipr暴露后大鼠睾丸组织发生氧化应激，谷胱甘肽（glutathione, GSH）代谢紊乱和活性氧（reactive oxygen species, ROS）水平升

高。但Ipr导致男性生殖损伤的作用机制尚不明确。因此本研究探讨Ipr对小鼠精母细胞GC-2铁死亡的影响,阐明男性不育的发病机制,旨在为制定有效的预防和治疗措施提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 小鼠精母细胞GC-2购自美国ATCC细胞库。胎牛血清购自上海VivaCell公司,高糖培养基购自上海源培生物科技股份有限公司,辣根过氧化物酶标记二抗(山羊抗兔、山羊抗小鼠)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,Ipr购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体购自成都正能生物技术有限公司,铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)购自武汉ABclonal公司,血红素加氧酶1(hemeoxygenase-1, HO-1)和 β -微管蛋白(β -tubulin)抗体购自美国Proteintech公司,ROS检测试剂盒、还原型GSH/氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒和总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)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)检测试剂盒购自安徽Biosharp公司,噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)购自美国MCE公司,山羊抗兔绿色荧光二抗购自美国Jackso公司。 CO_2 细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司,SYNERGY H1型多功能酶标仪购自美国Bio Tek公司,5804 R型高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司,AI600型化学发光凝胶成像仪购自美国General Electric公司,NISElements型激光共聚焦显微镜购自日本Nikon公司。

1.2 GC-2细胞培养和实验分组 GC-2细胞培养采用含有10%胎牛血清和1%青-链霉素的高糖培养基,于5% CO_2 、37℃细胞培养箱内培养,待细胞生长至80%~90%时,进行细胞传代和实验接板。GC-2细胞随机分为空白对照组(不进行处理),以及根据“1.3”MTT实验结果选取的 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组、 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组和 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组。

1.3 MTT法检测不同剂量Ipr处理后GC-2细胞活性 处于取对数生长期的GC-2细胞,以每毫升 4×10^4 个细胞的密度接种于24孔细胞培养板中,每孔加入500 μL 培养基过夜贴壁培养。分别使用终浓

度为0、0.001、0.010、0.100、1.000、10.000和100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ipr溶液处理细胞24 h,每孔加入50 μL 浓度为 $5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MTT溶液,十字法混匀放回培养箱继续孵育4 h,去除培养基,每孔加入600 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液,置于摇床上避光振荡15 min。使用酶标仪测定波长570 nm处的吸光度(A)值,参考波长为630 nm,计算Ipr处理后GC-2细胞活性。细胞活性=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。该实验结果用于确定后续研究的药物处理剂量。

1.4 试剂盒法检测各组GC-2细胞中SOD活性

选取处于对数生长期的GC-2细胞,以每毫升 4×10^5 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中,每孔加入2 mL完全培养基,过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理24 h,吸弃原培养基,用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞3次。每孔加入150 μL 预冷的SOD样品制备液,冰上裂解30 min,充分裂解细胞,取适量细胞裂解液,按照BCA蛋白浓度试剂盒测定样品的蛋白浓度。SOD酶活性测定:在96孔细胞培养板中,每孔加入20 μL 充分裂解的样品和160 μL 水溶性四唑盐-8(water-soluble tetrazolium salt-8, WST-8)/酶工作液,最后每孔快速加入20 μL 反应启动液,37℃孵育30 min。利用酶标仪在波长420 nm处测定各孔A值,根据试剂盒说明书计算各组样品中SOD抑制百分率和酶活性。抑制百分率=(空白对照1 A值-样本A值)/(空白对照1 A值-空白对照2 A值) $\times 100\%$; SOD活性($\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)=抑制百分率/(1-抑制百分率) $\times (\text{C}_{\text{prot}}\times \text{V})$ 。 C_{prot} :蛋白浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), V:上样体积(μL)。

1.5 试剂盒法检测各组GC-2细胞中MDA水平

选取处于对数生长期的GC-2细胞,以每毫升 4×10^5 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中,每孔加入2 mL完全培养基,过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理24 h,吸弃培养基, PBS缓冲液洗涤细胞,每孔加入200 μL 预冷的细胞裂解液,冰上振荡裂解30 min,4℃、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min后取上清,取适量细胞裂解液上清,按照BCA试剂盒测定各组样品蛋白浓度;向100 μL 待测样品上清液中加入200 μL MDA检测工作液,吹打混匀。将混合液置于100℃沸水浴中反应

15 min, 流水冷却至室温。将处理后的样品于 1 000 g 离心 10 min, 取 100 μL 上清在酶标仪于波长 532 nm 处测定各组 A 值。根据标准曲线, 计算出各组样品中 MDA 水平。

1.6 试剂盒法检测各组 GC-2 细胞中 GSH/GSSG 比值 选取处于对数生长期的 GC-2 细胞, 以每毫升 4×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理 24 h, 吸弃原培养基, PBS 缓冲液洗涤细胞, 用细胞刮刀收集细胞, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。加入 3 倍体积的蛋白去除剂 M, 冰浴超声破碎, 反复冻融 3 次; 冰上静置 5 min 后, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清。取适量细胞裂解液上清, 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组样品的蛋白浓度。总 GSH 测定: 取适量样品, 加入总 GSH 检测工作液, 混匀, 室温孵育 5 min。加入 50 μL 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 溶液, 混匀, 25 min 后在 412 nm 波长处测定 A 值; GSSG 检测: 吸取适量样品, 加入 GSH 清除工作液和 GSH 清除缓冲液, 震荡混匀, 室温放置 1 h 后。按照总 GSH 测定步骤操作。根据总 GSH 和 GSSG 标准曲线计算样品中 GSH+GSSG 和 GSSG 的含量。GSH ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) = [(GSH+GSSG) - GSSG] \times 2 / 蛋白浓度。GSH 水平 ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) = $C_1 - C_2 \times 2 / C_{\text{prot}}$; C_1 : 总 GSH 样本浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); C_2 : GSSG 样品浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); C_{prot} : 蛋白浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.7 荧光显微镜观察各组 GC-2 细胞中 ROS 生成

取处于对数生长期的 GC-2 细胞, 以每毫升 2×10^5 个细胞的密度接种至带有细胞爬片的 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理 24 h, 吸弃原培养基, 用预热的 PBS 缓冲液轻轻洗涤细胞 2 次后, 加入 1 mL 用无血清培养基稀释的终浓度为 $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酯 (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 工作液, 将孔板放回细胞培养箱中避光孵育 20 min; 去除 DCFH-DA 工作液, 用基础培养基轻轻洗涤 3 次。最后在荧光显微镜下观察荧光染色情况并采集图像信息。

1.8 荧光显微镜观察各组 GC-2 细胞中线粒体膜电位 取处于对数生长期的 GC-2 细胞, 以每毫升

2×10^5 个细胞的密度接种至带有细胞爬片的 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理 24 h, 吸弃原培养基, 用预热的 PBS 缓冲液轻轻洗涤细胞 2 次后, 向每孔中加入培养基和 JC-1 ($1 \times$) 染色工作液各 1 mL, 轻轻混匀, 将孔板放回细胞培养箱中, 在避光条件下孵育 20 min, 吸弃 JC-1 染色工作液, 用 JC-1 ($1 \times$) 染色缓冲液轻轻洗涤细胞 3 次。最后, 在荧光显微镜下观察染色情况并采集图像信息。

1.9 Western blotting 法检测各组 GC-2 细胞中 HO-1、GPX4 和 FTH1 的蛋白表达水平 取处于对数生长期的 GC-2 细胞, 以每毫升 4×10^5 个细胞的密度接种至带有细胞爬片的 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理 24 h, 用预冷的 PBS 缓冲液漂洗细胞 2 次, 提取总蛋白并测定蛋白浓度后, 进行蛋白凝胶电泳。分离蛋白后以恒压转置聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜后, 丽春红染色观察转膜蛋白条带, 5% 脱脂奶粉常温下封闭 1 h, 然后分别与 HO-1(1:3 000)、GPX4(1:1 000)、FTH1 (1:1 000) 和 β -tubulin (1:10 000) 抗体 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。回收一抗, 含吐温-20 的 Tris 缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline with Tween[®] 20, TBST) 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min, 室温孵育辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗 1 h。TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min。增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 法曝光条带; 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -tubulin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

1.10 免疫荧光法观察各组 GC-2 细胞中 HO-1 蛋白荧光强度 取处于对数生长期的 GC-2 细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于带有细胞爬片的 6 孔细胞培养板中, 过夜贴壁培养。按照“1.2”中方法分组及给药处理 24 h, 吸弃培养液, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛于室温固定 30 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次; 0.25% Triton X-100 通透 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 将爬片取出放置在载玻片上, 组化笔圈出染色区域, 免疫荧光封闭液室温封闭 1.5 h; 加入由封闭液稀释的免疫荧光一抗 HO-1 (1:100) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜孵育, PBS 缓冲液洗涤

3次,对应的免疫荧光二抗(1:1 000)室温避光孵育1 h, PBS缓冲液洗涤3次,在室温条件下加入由PBS缓冲液稀释的4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(1:800)染细胞核20 min, PBS缓冲液洗涤3次,每次10 min,避光条件下适当晾干,在染色区域滴加抗荧光淬灭剂后封片。在激光共聚焦显微镜下观察染色效果并采集图像信息。以绿色荧光代表HO-1蛋白表达情况,绿色荧光越强,HO-1表达越强;绿色荧光越弱,HO-1表达越弱。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。各组GC-2细胞的细胞活性和GC-2细胞中SOD活性、MDA水平及GSH/GSSG比值以及HO-1、GPX4和FTH1蛋白表达水平均符合正态分布,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LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量Ipr处理后GC-2细胞活性 与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组比较,0.001、0.010和0.100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞活性无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$);1.000、10.000和

100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞活性明显降低($P<0.01$),见表1。因此,本研究中使用1.0、2.5和5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr进一步处理GC-2细胞。

表1 不同剂量Ipr处理后各组GC-2细胞活性

Tab. 1 Cell activities of GC-2 cells in various groups after treated with different doses of Ipr ($n=3, \bar{x}\pm s, \eta/\%$)

Concentration of Ipr ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cell activity
0	100.00 \pm 2.75
0.001	99.29 \pm 4.43
0.010	99.04 \pm 3.13
0.100	97.49 \pm 4.41
1.000	85.64 \pm 3.00*
10.000	67.70 \pm 3.82*
100.000	31.08 \pm 4.68*

* $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group.

2.2 各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平及GSH/GSSG比值 与空白对照组比较,处理24 h后,1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平以及GSH/GSSG比值均无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$);2.5和5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞中SOD活性和GSH/GSSG比值明显降低($P<0.01$),MDA水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表2。

表2 各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平及GSH/GSSG比值

Tab. 2 Activities of SOD, levels of MDA and ratios of GSH/GSSG in GC-2 cells in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	SOD activity [$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$]	MDA level [$\lambda_B/(\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$]	Ratio of GSH/GSSG
Blank control	74.6 \pm 2.8	5.82 \pm 0.55	1.35 \pm 0.44
1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr	71.8 \pm 5.2	7.07 \pm 1.24	1.10 \pm 0.02
2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr	56.9 \pm 3.8**	9.73 \pm 1.31*	0.45 \pm 0.05**
5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr	46.3 \pm 1.2**	12.91 \pm 2.79**	0.09 \pm 0.05**

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

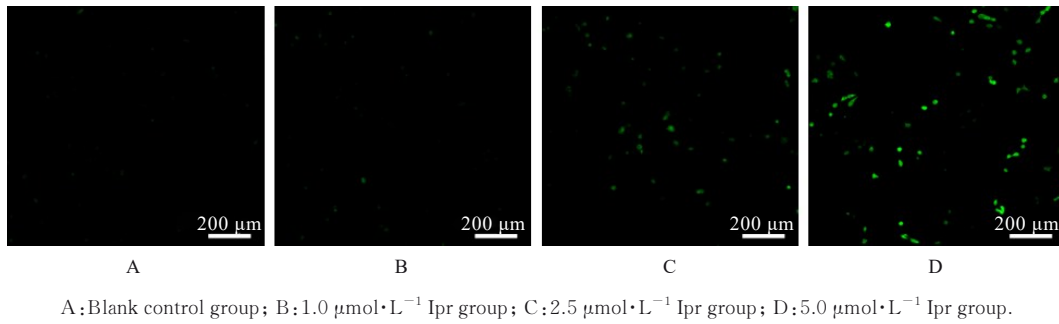
2.3 各组GC-2细胞中ROS生成和线粒体膜电位

与空白对照组比较,随着Ipr浓度的升高,GC-2细胞中ROS的生成增加,表现为代表ROS的绿色荧光强度明显增强;5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr处理24 h后,GC-2细胞中ROS荧光信号覆盖的区域明显扩大,见图1。线粒体膜电位检测结果显示:与空白对照组比较,1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组细胞的红色和绿色荧光信号分布和线粒体膜电位未见明显变化;2.5和5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞中红色荧光信号减少,绿色荧光信号增加,表明Ipr剂量依赖性

地诱发了GC-2细胞线粒体膜电位的下降。见图2。

2.4 各组GC-2细胞中GPX4、FTH1和HO-1蛋白表达水平

Western blotting法检测结果显示:与空白对照组比较,1.0、2.5和5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平明显升高($P<0.01$);1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞中GPX4和FTH1蛋白表达水平无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$),2.5和5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr组GC-2细胞中GPX4和FTH1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图3和表3。免疫荧光法



A: Blank control group; B: $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group; C: $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group; D: $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group.

图1 各组 GC-2 细胞中 ROS 水平的荧光显微图像

Fig. 1 Fluorescence microscope images of intracellular ROS levels in GC-2 cells in various groups

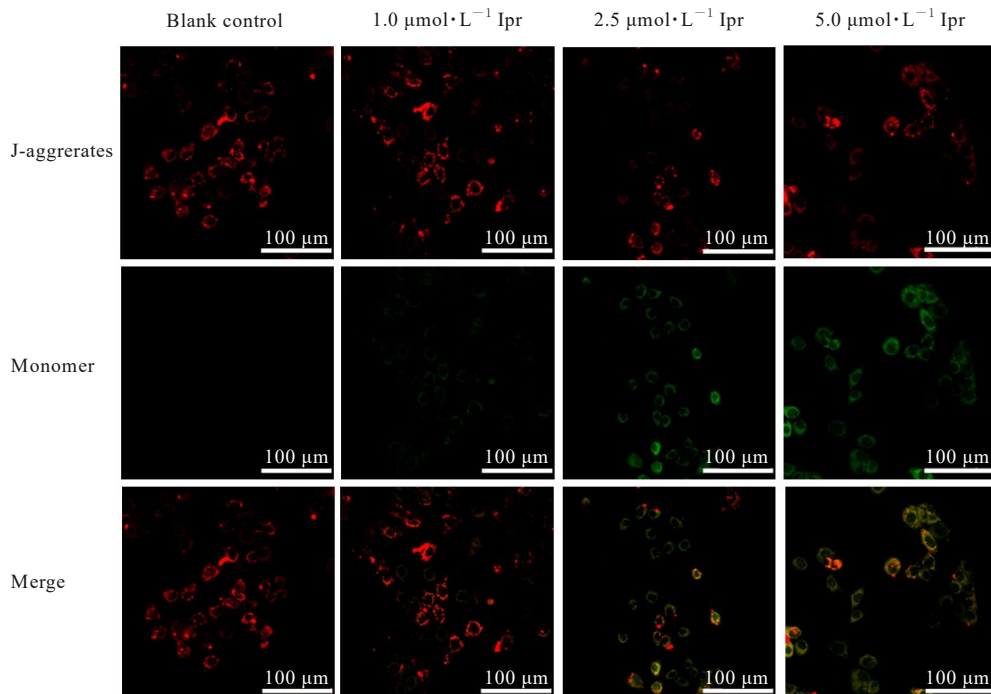


图2 各组 GC-2 细胞中线粒体膜电位的荧光显微图像

Fig. 2 Fluorescence microscope images of mitochondrial membrane potential in GC-2 cells in various groups

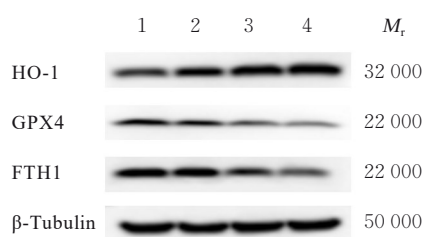
检测结果显示: 与空白对照组比较, 1.0 、 2.5 和 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr 组 GC-2 细胞中 HO-1 蛋白荧光强度增加, 并呈剂量依赖性。见图 4。

3 讨论

在现代社会, 男性不育已成为一项严峻的医疗挑战, 其致病因素包括遗传、免疫和环境导致的内分泌失调、精液质量异常以及精子生成阻碍等。精母细胞在生殖过程中发挥重要作用, 主要功能是产生精子, 参与生殖过程, 其损伤可能导致精子生成减少或完全停止。研究^[12]表明: 环境污染物通过不同机制对精母细胞造成损伤, 暴露于农药的大鼠精子数量减少, 导致精子发生受到抑制。本研究结果显示: 随着 Ipr 剂量的增加, GC-2 细胞活性明显

降低, 并呈剂量依赖性, 表明 Ipr 对小鼠精母细胞 GC-2 造成了损伤。

铁死亡是与脂质代谢相关的新型细胞死亡形式, 与男性不育的发生发展有关。铁死亡主要表现为细胞内 ROS 积累、MDA 水平升高和 GSH 耗竭。脂质过氧化物水平对维持精子运动能力、形态完整性、DNA 结构稳定性和线粒体正常结构及功能起着关键作用, ROS 累积导致的氧化应激被认为是特发性男性不育症的关键因素之一^[13-15]。GSH 是一种强效的还原剂, GPX4 可催化 GSH 参与氧化还原反应, 将脂质过氧化物还原为对应的醇, 保护细胞免受脂质过氧化损伤, 抑制细胞铁死亡的发生^[16]。研究^[17-18]显示: 大鼠和小鼠的睾丸中存在



Lane 1: Blank control group; Lane 2: $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group; Lane 3: $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group; Lane 4: $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr group.

图3 各组GC-2细胞中HO-1、GPX4和FTH1蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of HO-1, GPX4, and FTH1 proteins in GC-2 cells in various groups

高水平的GSH, GSH可改善糖尿病小鼠的精子质量和睾丸组织形态异常。线粒体功能障碍会导致GSH的大量消耗, 加剧铁死亡的发生; 其作用机制是促进磷脂多不饱和脂肪酸的过氧化反应, 生成大量脂质过氧化物和ROS, 诱导细胞铁死亡^[19-20],

表3 各组GC-2细胞中HO-1、GPX4和FTH1蛋白表达水平
Tab. 3 Expression levels of HO-1, GPX4, and FTH1 proteins in GC-2 cells in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	HO-1	GPX4	FTH1
Blank control	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
$1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr	$1.22\pm 0.04^{**}$	0.83 ± 0.21	0.98 ± 0.12
$2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr	$1.37\pm 0.06^{**}$	$0.62\pm 0.07^{**}$	$0.71\pm 0.22^*$
$5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ipr	$1.53\pm 0.12^{**}$	$0.55\pm 0.07^{**}$	$0.49\pm 0.07^{**}$

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

进而出现线粒体萎缩、膜密度增加和线粒体膜电位变化等现象^[21]。研究^[22-23]表明: 线粒体ROS的大量产生会损伤精子膜, 导致精子DNA碎片化和能量代谢失衡, 最终影响生殖能力。本研究结果显示: 经Ipr处理的GC-2细胞中MDA和ROS水平升高、SOD活性和GSH/GSSG比值降低以及线粒体膜电位降低。上述变化与铁死亡的特征一致, 提示Ipr可能会引起GC-2细胞铁死亡。

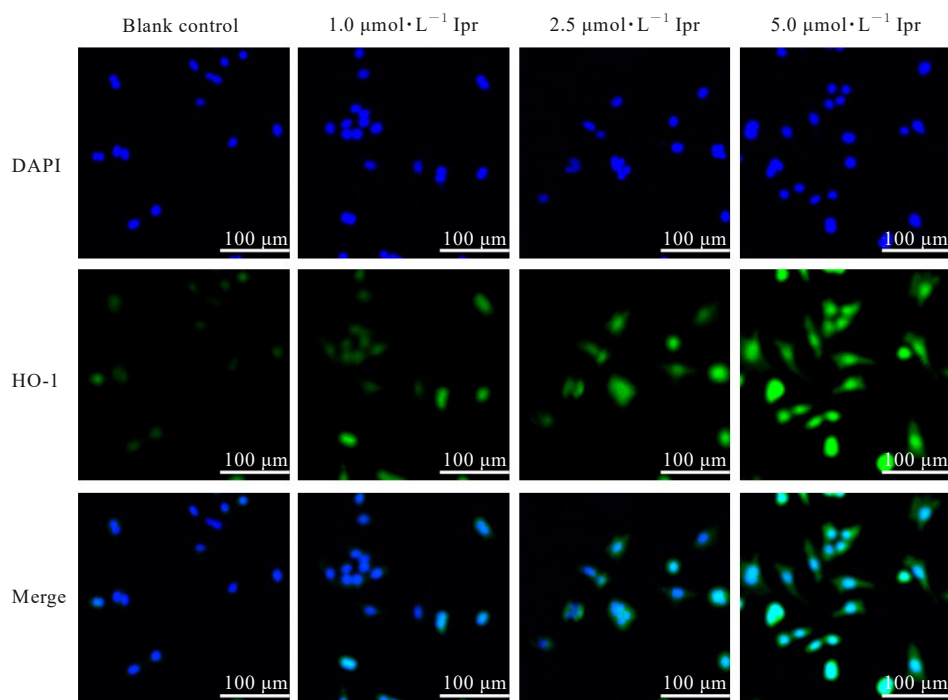


图4 免疫荧光法观察各组GC-2细胞中HO-1蛋白荧光强度

Fig. 4 Fluorescence intensities of HO-1 protein in GC-2 cells in various groups detected of immunofluorescence method

GSH/GPX4途径被认为是调节铁死亡的经典信号通路。GSH大量耗竭、GPX4酶活力不足以及抗过氧化能力降低, 导致脂质过氧化物大量累积, 最后导致细胞发生铁死亡^[24]。GPX4水平对于维持

精子发生过程发挥至关重要的作用。研究^[25]显示: 精母细胞中GPX4的耗竭会导致小鼠精子数量和活力下降。HO-1作为一种重要的抗氧化酶, 主要催化血红素分解代谢成亚铁离子、一氧化碳和胆绿

素。HO-1的抗氧化作用可通过生成胆绿素及其还原型胆绿素来清除ROS, 减少脂质过氧化和细胞损伤, 从而抑制铁死亡^[26]。研究^[27]显示: 小鼠睾丸暴露于邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯可通过HIF-1 α /HO-1信号通路引发铁死亡, 导致生殖损伤。铁代谢也被认为是铁死亡的关键调控机制。生物体内的铁元素除结合在血红蛋白中的铁离子外, 大部分储存于铁蛋白中。铁蛋白是一种胞质铁储存蛋白, 由FTH1和铁蛋白轻链2(ferritin light chain 2, FTL2) 2种亚基组成。FTH1具有亚铁氧化物酶活性, 可将Fe³⁺转化为Fe²⁺并储存在FTL2中, 防止亚铁离子与产生ROS的底物接触^[28-29]。研究^[30]显示: 暴露于金属铬(chromium, Cr)会使小鼠支持细胞中总铁含量增加和FTH1水平降低, 导致细胞内铁积累和细胞铁死亡。由此可知, FTH1在维持细胞内铁稳态中发挥重要作用。本研究结果显示: 暴露于Ipr能够抑制GC-2细胞中GPX4和FTH1蛋白表达, 同时促进HO-1蛋白表达, 表明Ipr能够诱导GC-2细胞铁死亡。

综上所述, Ipr暴露可导致GC-2细胞中脂质过氧化物积累, 诱导细胞发生铁死亡, 其机制可能与上调HO-1蛋白表达和下调GPX4和FTH1蛋白表达有关。

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:

胡晓雪参与研究选题、实验操作、数据收集、整理和统计学分析及论文撰写, 艾霄文和杨安娜参与实验操作及统计学分析, 张永兰参与研究选题、数据收集和整理以及论文撰写及审校。

[参考文献]

- [1] JENARDHANAN P, PANNEERSELVAM M, MATHUR P P. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 126-140.
- [2] CORPUZ-HILSABECK M, CULTY M. Impact of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals on sertoli cell development and functions [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1095894.
- [3] TVRDA E, PEER R, SIKKA S C, et al. Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(1): 3-16.
- [4] XIONG L, BIN Z, YOUNG J L, et al. Exposure to low-dose cadmium induces testicular ferroptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 234: 113373.
- [5] ZHANG X H, JIANG L P, CHEN H B, et al. Resveratrol protected acrolein-induced ferroptosis and insulin secretion dysfunction via ER-stress-related PERK pathway in MIN6 cells[J]. *Toxicology*, 2022, 465: 153048.
- [6] YANG L, JIANG L P, SUN X C, et al. DEHP induces ferroptosis in testes via p38 α -lipid ROS circulation and destroys the BTB integrity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 164: 113046.
- [7] SU Y J, LIU Z L, XIE K Y, et al. Ferroptosis: a novel type of cell death in male reproduction[J]. *Genes*, 2022, 14(1): 43.
- [8] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [9] WANG R K, DENG L G, WANG Y H, et al. Synergistic effects of combined lead and iprodione exposure on P53 signaling-mediated hepatotoxicity, enterotoxicity and transgenerational toxicity in zebrafish[J]. *Sci Total Environ*, 2025, 958: 178127.
- [10] HASSAN M A, BOHY K M E L, SHARKAWY N I E L, et al. Iprodione and chlorpyrifos induce testicular damage, oxidative stress, apoptosis and suppression of steroidogenic- and spermatogenic-related genes in immature male albino rats[J]. *Andrologia*, 2021, 53(4): e13978.
- [11] ABD-ELHAKIM Y M, SHARKAWY N I E L, BOHY K M E L, et al. Iprodione and/or chlorpyrifos exposure induced testicular toxicity in adult rats by suppression of steroidogenic genes and SIRT1/TERT/PGC-1 α pathway[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(40): 56491-56506.
- [12] SHARMA P, HUQ A U, SINGH R. Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol[J]. *J Hum Reprod Sci*, 2014, 7(2): 99-106.
- [13] ARTINI P G, CASAROSA E, CARLETTI E, et al. In vitro effect of myo-inositol on sperm motility in normal and oligoasthenospermia patients undergoing *in vitro* fertilization[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2017, 33(2): 109-112.
- [14] ARMSTRONG J S, RAJASEKARAN M, CHAMULITRAT W, et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(7/8): 869-880.

- [15] LIU T, HOU B L, WANG Z P, et al. Polystyrene microplastics induce mitochondrial damage in mouse GC-2 cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 237: 113520.
- [16] MAIORINO M, CONRAD M, URSINI F. GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(1): 61-74.
- [17] GROSSHANS K, CALVIN H I. Estimation of glutathione in purified populations of mouse testis germ cells[J]. *Biol Reprod*, 1985, 33(5): 1197-1205.
- [18] ABDULLAH F, KHAN NOR-ASHIKIN M N, AGARWAL R, et al. Glutathione (GSH) improves sperm quality and testicular morphology in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Asian J Androl*, 2021, 23(3): 281-287.
- [19] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [20] DIXON S J, OLZMANN J A. The cell biology of ferroptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(6): 424-442.
- [21] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [22] WANG X L, YIN L S, WEN Y J, et al. Mitochondrial regulation during male germ cell development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2): 91.
- [23] DAVIES R, MINHAS S, JAYASENA C N. The role of seminal reactive oxygen species assessment in the setting of infertility and early pregnancy loss[J]. *World J Urol*, 2023, 41(11): 3257-3265.
- [24] LIU J, KANG R, TANG D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis [J]. *FEBS J*, 2022, 289(22): 7038-7050.
- [25] ZHAO X, LIU Z H, GAO J, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates busulfan-induced oligospermia in mice[J]. *Toxicology*, 2020, 440: 152489.
- [26] ADEDOYIN O, BODDU R, TRAYLOR A, et al. Heme oxygenase-1 mitigates ferroptosis in renal proximal tubule cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 314(5): F702-F714.
- [27] WU Y H, WANG J K, ZHAO T X, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure leads to ferroptosis via the HIF-1 α /HO-1 signaling pathway in mouse testes [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 426: 127807.
- [28] TORTI F M, TORTI S V. Regulation of ferritin genes and protein [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3505-3516.
- [29] SAMMARCO M C, DITCH S, BANERJEE A, et al. Ferritin L and H subunits are differentially regulated on a post-transcriptional level [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4578-4587.
- [30] ZHUGE R, ZHANG L, XUE Q, et al. Ferritinophagy is involved in hexavalent chromium-induced ferroptosis in Sertoli cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 492: 117139.