DOI:10.16016/j.2097-0927.202401061

人参皂苷 Rg1 减轻热应激致小鼠睾丸损伤的机制研究

黄寅虎[1,2],汪子铃[1],杜坤航[1],王 程[1],黄彩虹[1],杨 婷[1],魏 晗[1],蒋鸿慧[1],王 璐[1],张庆华[2],王亚平[1]
400016 重庆,重庆医科大学:干细胞与组织工程研究室,组织学与胚胎学教研室[1];400042 重庆,陆军特色医学中心妇产科[2]

[**摘要**] **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 减轻热应激致小鼠睾丸损伤的机制。**方法** 20 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为 4 组,每组 5 只。对照组(Control 组)和热应激组(HS 组)小鼠腹腔注射 0.9%生理盐水[10 mL/(kg·d)×14 d],热应激+人参皂苷 Rg1 组(HS+Rg1 组)和人参皂苷 Rg1 组(Rg1 组)小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1[20 mg/(kg·d)×14 d]。HS 组与 HS+Rg1 组小鼠在给药第 7 天时,将麻醉后小鼠下腹部置于 43 ℃水浴中单次热应激 30 min。小鼠精母细胞 GC-2spd(ts)分为 4 组:对照组(Control 组)细胞常规培养 48 h;热应激组(HS 组)细胞常规培养 36 h,置于 43 ℃水浴中单次热应激 30 min,继续培养 12 h;热应激+Rg1 组(HS+Rg1 组)在细胞培养体系中加入 Rg1(终浓度 50 μmol/L),热应激处理同 HS 组;Rg1 组不给予热应激处理,其余同 HS+Rg1 组。建模完成后 1 d 采集眼球血,ELISA 法检测血清睾酮水平;摘取睾丸观察形态并称量,计算睾丸指数,HE 染色观察睾丸组织病理学形态;制备睾丸组织匀浆检测过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;取附睾精子,计算机辅助精子分析(CASA)系统分析小鼠精子浓度和活力;TUNEL 染色检测 GC-2spd(ts)细胞凋亡情况;Western blot 检测 GC-2spd(ts)细胞 Nrf2、Keap1、HO-1、Bax、Bcl-2 和 Caspase3 蛋白表达量;RT-qPCR 检测 GC-2spd(ts)细胞 Nrf2 蛋白靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量。**结果** Rg1 可阻止热应激所致睾丸质量和睾丸指数下降,减轻睾丸组织结构损伤,阻止精子浓度和活力下降,拮抗热应激所致睾丸间质细胞数量减少和血清睾酮水平下降,降低睾丸组织中 MDA 累积,提高抗氧化酶 CAT 和 SOD 的活性。Rg1 还可减轻 GC-2spd(ts)细胞凋亡,下调 Bax、Caspase3 和 Keap1 蛋白表达,增强 Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达量,增强 Nrf2 蛋白靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量。**结论** Rg1 对正常小鼠睾丸结构和功能影响不显著,但可有效提高小鼠睾丸抗热应激损伤能力,其机制可能与 Rg1 激活 Nrf2 信号通路,提高抗氧化酶活性,减少生精细胞凋亡有关。

[**关键词**] 人参皂苷 Rg1;睾丸;热应激;睾酮;氧化应激损伤;机制
[**中图法分类号**] R282.71; R339.21; R339.52 [**文献标志码**] A

Mechanism of ginsenoside Rg1 alleviating testicular injury induced by heat stress in mice

HUANG Yinhu[1,2], WANG Ziling[1], DU Kunhang[1], WANG Cheng[1], HUANG Caihong[1], YANG Ting[1], WEI Han[1], JIANG Honghui[1], WANG Lu[1], ZHANG Qinghua[2], WANG Yaping[1] [1]Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Gynaecology and Obstetrics, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the mechanism of ginsenoside Rg1 in alleviating heat stress-induced testicular injury in mice. **Methods** A total of 20 C57BL/6 male mice (6~8 weeks old) were randomly divided into 4 groups ($n=5$). The mice from the control group and heat stress (HS) group were intraperitoneally injected with 10 mL/(kg·d) 0.9 % normal saline for 14 d, while those in the HS+Rg1 group and the Rg1 group were given an intraperitoneal injection of 20 mg/(kg·d) for 14 d, and then on the

[**通信作者**] 王亚平,E-mail: ypwangcq@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

7th day after administration, the mice in the HS group and the HS+Rg1 group had the lower abdomen put into a 43 ℃ water bath for 30 min as a single heat stress after being anesthetized with 4% chloral hydrate. Mouse spermatocytes GC-2spd(ts) were divided into control group (routine culture for 48 h), HS group (placed in a 43 ℃ water bath for 30 min after 36 h of conventional culture, and cultured till the end of 48 h), HS+Rg1 group (50 μmol/L Rg1 treatment followed by heat stress injury), and Rg1 group (no heat stress injury). In 1 d after modeling, the eyeball blood samples were collected to detect serum testosterone with ELISA, and the testicles were extracted to observe the morphology and weighed to calculate the testicular index. HE staining was used to observe the histopathology of testis, and corresponding reagents and kits was employed to detect the content of malondialdehyde (MDA) and activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in testis tissue. After the epididymal sperm were collected, the sperm concentration and motility were analyzed by computer-assisted sperm analysis (CASA) system. In *in vitro* experiments, cell apoptosis was detected with TUNEL staining, the protein levels of Nrf2, Keap1, HO-1, Bax, Bcl-2 and Caspase3 were detected with Western blotting, and the mRNA levels of GCLC, GCLM and NQO1 were detected by RT-qPCR. **Results** Rg1 prevented the decreases in testicular weight and testicular index caused by heat stress, reduced the damage of testicular tissue structure, prevented the decrease of sperm concentration and vitality, antagonized the decreasd number of Leydig cells and serum testosterone level, reduced the accumulation of MDA in testicular tissue, and enhanced the activities of CAT and SOD. Rg1 treatment alleviated the apoptosis of GC-2spd(ts) cells, down-regulated the expression of Bax, Caspase3 and Keap1 proteins, enhanced the expression of Bcl-2, Nrf2 and HO-1 proteins, and increased the transcriptional levels of Nrf2 target genes GCLC, GCLM and NQO1. **Conclusion** Rg1 has no significant effect on the structure and function of mouse testes, but it can effectively improve the ability of mouse testes to resist heat stress injury, which may be related to the activation of Nrf2 signaling pathway, the improvement of antioxidant enzyme activity, and the reduction of apoptosis of spermatogenic cells.

[**Key words**] ginsenoside Rg1; testis; heat stress; testosterone; oxidative stress damage; mechanism

Corresponding author: WANG Yaping, E-mail: ypwangcq@aliyun.com

热应激(heat stress,HS)是由于环境温度升高所致组织器官的应激性反应[1]。研究证明,热应激可导致睾丸萎缩、精子发生受阻、睾酮水平降低等[2],是导致男性不育的重要因素之一[3],需要寻找防治途径。据研究报道,当小鼠的睾丸暴露于热应激时,睾丸内过氧化氢含量增加,诱发睾丸细胞脂质过氧化,导致抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性降低,细胞抗氧化能力下降导致氧化应激[4]。Keap1-Nrf2 信号通路是细胞抗氧化应激损伤的重要机制之一[5-6],热应激对睾丸损伤是否与该通路有关值得深入探讨。

人参是中医临床“补气”要药,有“扶正祛邪”功效。有研究证明,人参皂苷 Rg1 是人参重要的药物活性成分之一,具有抗炎、抗氧化和抗衰老等多种药理作用[7-8]。既往研究证明,人参皂苷 Rg1 能拮抗氧化致衰剂 D-半乳糖(D-gal)对睾丸的损伤,其机制可能与其抗氧化作用有关[9-10],但人参皂苷 Rg1 能否减轻小鼠睾丸热应激损伤尚不清楚。本研究通过构建小鼠睾丸和精母细胞热应激损伤模型,探讨人参皂苷 Rg1 减轻热应激对小鼠睾丸损伤及其相关机制,旨在为防治热应激对男性生殖功能损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠(体质量 22~25 g)购自成都药康生物科技有限公司[动物许可证号 SCXK(川)2020-034]。小鼠在 SPF 级动物房中饲养,12 h 光照/黑暗循环,室温(22±2) ℃,相对湿度(60±5)%,自由饮水和摄食。

1.2 实验试剂

人参皂苷 Rg1 购于成都曼思特生物科技有限公司,纯度 99.99%;小鼠睾酮(T)检测试剂盒购于江苏酶免公司;TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;DMEM 培养基、F12 培养基购于美国 GIBCO 公司;Nrf2、Keap1 与 β-actin 抗体购于美国 CST 公司;Bax 与 Bcl-2 抗体购

于美国 Santa Cruz 公司;HO-1 购于英国 Abcam 公司;Caspase3 抗体购于中国塞维尔公司。

1.3 小鼠单次热应激模型构建与实验动物分组

20 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周,按随机数字表法分为 4 组,每组 5 只。对照组(Control 组)和热应激组(HS 组)小鼠腹腔注射 0.9% 生理盐水[10 mL/(kg·d)×14 d],热应激+人参皂苷 Rg1 组(HS+Rg1 组)和人参皂苷 Rg1 组(Rg1 组)小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1[20 mg/(kg·d)×14 d][11]。HS 组与 HS+Rg1 组小鼠在给药第 7 天时,4% 水合氯醛麻醉小鼠,将小鼠下腹部置于 43 ℃水浴中单次热应激 30 min。Control 组和 Rg1 组不进行热应激处理。模型构建完成后 1 d 采集小鼠眼球血,颈椎脱臼处死小鼠,取睾丸和附睾用于后续实验。

1.4 睾丸大体形态与睾丸指数测定

建模与给药结束后称小鼠体质量,颈椎脱臼处死小鼠,摘取睾丸,观察大体形态并称量。按公式计算睾丸指数:睾丸指数=睾丸质量(mg)/小鼠体质量(g)。

1.5 睾丸组织病理学观察

4% 多聚甲醛固定睾丸 48 h,制备石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察各组睾丸组织病理学变化,每组随机测量 30 个生精小管的直径和生精上皮的厚度,并进行统计分析。

1.6 血清睾酮测定

采集眼球血制备血清,按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测各组小鼠血清中睾酮水平,并进行数据分析。

1.7 精子浓度和活力

取附睾置于 1 mL 预热的 PBS 中,将附睾尾部剪成若干段,挤压出精子,置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中孵育 15 min,充分混匀后吸取 5 μL 滴加于精子专用计数板,计算机辅助精子分析(CASA)系统分析小鼠精子浓度和活力。

1.8 睾丸组织匀浆中氧化与抗氧化指标的检测

取各组小鼠睾丸组织制备组织匀浆,离心 10 min(4 ℃、12 000 r/min),收集上清液。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测上清液蛋白浓度,按照检测试剂盒说明书分别检测各组匀浆中 CAT、MDA、SOD 水平并进行数据分析。

1.9 精母细胞 GC-2spd(ts)热应激模型构建与凋亡检测

小鼠精母细胞株 GC-2spd(ts)购于湖南丰晖生物科技有限公司,细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基、37 ℃、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养,选取对数生长期细胞作为实验对象。细胞分组:①对照组(Control),细胞常规培养 48 h;②热应激组(HS),细胞常规培养 36 h,置于 43 ℃水浴中单次热应激 30 min,继续培养 12 h;③热应激+Rg1 组(HS+Rg1),在细胞培养体系中加入 Rg1(终浓度 50 μmol/L[12]),热应激处理同 HS 组;④Rg1 组,不给予热应激处理,其余同 HS+Rg1 组。建模结束后用 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒检测精母细胞凋亡,荧光显微镜观察拍照,用 Image J 计算平均荧光强度,评价各组细胞凋亡情况。

1.10 RT-qPCR 检测 GC-2spd(ts)细胞氧化应激相关基因表达

提取各组 GC-2spd(ts)细胞的总 RNA,检测总 RNA 的浓度、纯度和完整性,将 mRNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR 检测分析。以 β-actin 作为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

种属	基因	序列 5′→3′
鼠	*GCLC*	正向 TCAATGGGAAGGAAGGGGTAT
		反向 TCCACCTGGCAACAGTCATTAG
鼠	*GCLM*	正向 TGTGATGCCACCAGATTTGACT
		反向 CCAATCCTGGGCTTCAATGTC
鼠	*NQO*1	正向 CAGCCAATCAGCGTTCGGTA
		反向 CTGGAAATGATGGGGTTGAAGT

1.11 GC-2spd(ts)细胞氧化应激和凋亡相关蛋白表达检测

收集各组 GC-2spd(ts)细胞,RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,BCA 法检测总蛋白浓度,将各组样本调至相同浓度,100 ℃水浴 5 min 使蛋白变性,SDS-PAGE 分离胶进行电泳、转膜、封闭,孵育一抗、二抗,用 Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System 检测 GC-2spd(ts)细胞氧化应激和凋亡相关蛋白(Nrf2、Keap1、HO-1、Bax、Bcl-2、Caspase3)表达水平,用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.12 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件生成分析图,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

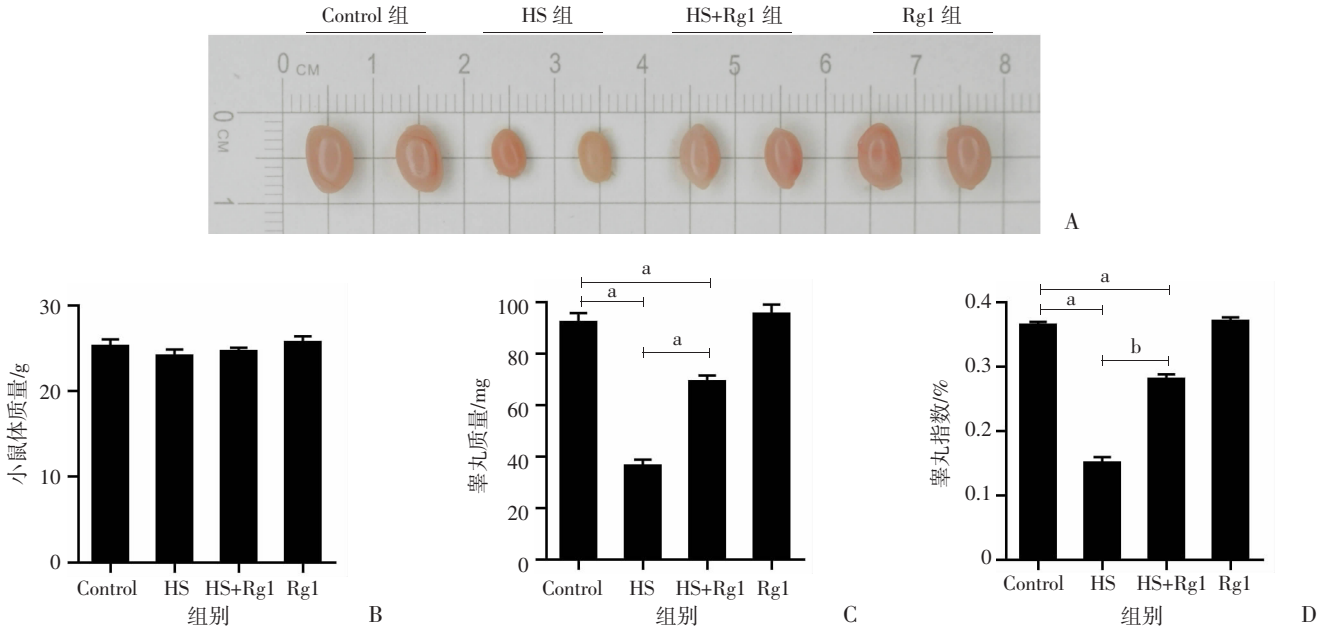
2.1 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对睾丸质量的影响

建模结束后,取各组小鼠睾丸,观察大体形态并称量,发现 HS 组小鼠睾丸质量减轻,体积明显缩小,睾丸指数显著降低。Rg1 干预热应激过程,即 HS+Rg1 组小鼠睾丸质量减轻和体积缩小明显改善,睾丸指数

也较 HS 组显著升高。Rg1 对正常小鼠睾丸质量和睾丸指数未见显著影响。各组小鼠体质量差异无统计学意义。见图 1。

2.2 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对睾丸组织结构的影响

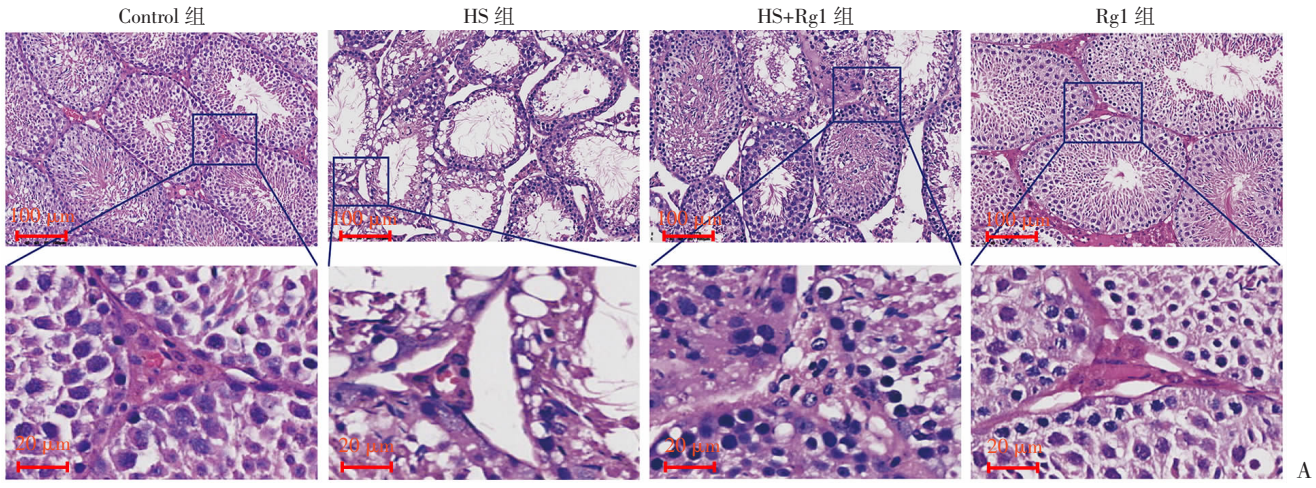
睾丸组织病理学观察结果表明,HS 组小鼠睾丸生精小管直径明显变小,生精上皮层数减少,管腔扩大,生精上皮脱落,细胞间出现空泡或坏死,失去精子发生的梯度形态,有些生精小管仅保留基底部的精原细胞;睾丸间质细胞数量明显减少,并出现退变。HS+Rg1 组小鼠生精小管损伤明显减轻,生精上皮空泡化明显减少,生精上皮层次减少不明显,未见管腔明显扩张,生精细胞形态基本正常,精子发生的梯度形态明显,管腔内可见精子;间质细胞数量减少不明显,结构基本正常。Rg1 对正常小鼠睾丸组织结构未见明显影响(图 2)。



a:$P<0.05$

A:小鼠睾丸外观;B:小鼠体质量;C:睾丸质量;D:睾丸指数

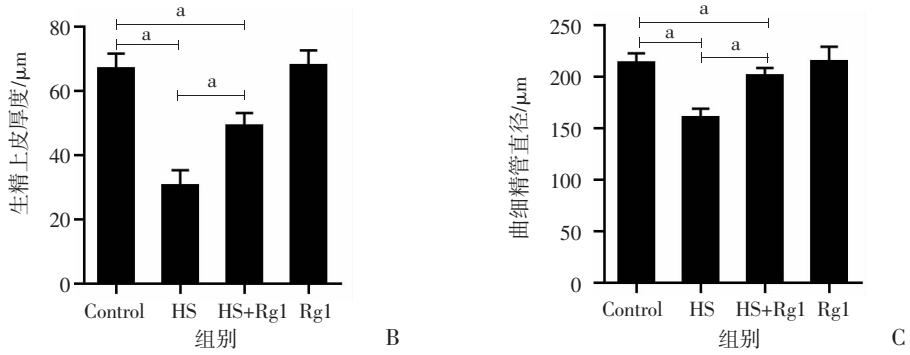
图 1 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对睾丸质量和睾丸指数的影响



A:小鼠睾丸 HE 染色观察

图 2 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对睾丸组织结构的影响

(图 2B、C 续下页)



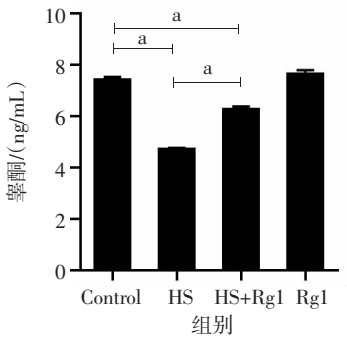
a:$P<0.05$

B:生精上皮厚度;C:曲细精管直径

续图 2 人参皂苷 Rg1 减轻睾丸热应激对睾丸组织结构的影响

2.3 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对血清睾酮的影响

血清睾酮检测结果表明,与对照组比较,HS 组血清睾酮水平显著降低($P<0.05$);经 Rg1 干预热应激过程后,HS+Rg1 组睾酮水平较 HS 组显著升高($P<0.05$);Rg1 对正常小鼠血清睾酮水平无明显影响,见图 3。



a:$P<0.05$

图 3 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对血清睾酮的影响

2.4 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对附睾精子浓度和活力的影响

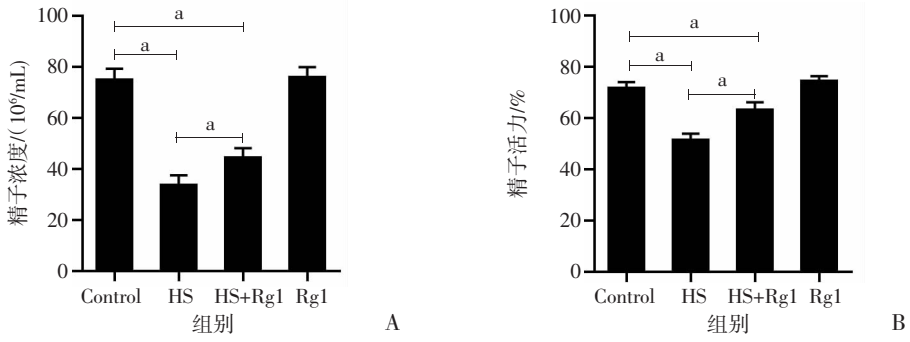
CASA 分析结果表明,HS 组附睾精子浓度和活力显著低于对照组($P<0.05$);HS+Rg1 组附睾精子浓度和活力明显高于 HS 组($P<0.05$);Rg1 对正常小鼠附睾精子浓度和活力未见明显影响,见图 4。

2.5 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对睾丸氧化应激指标的影响

氧化应激检测结果表明,与对照组比较,HS 组睾丸组织中 MDA 水平显著升高,CAT 和 SOD 活性明显降低($P<0.05$);与 HS 组比较,HS+Rg1 组睾丸组织中 MDA 水平明显降低,CAT 和 SOD 活性明显升高($P<0.05$);Rg1 对正常小鼠睾丸组织中 MDA 水平、CAT 和 SOD 活性无明显影响,见图 5。

2.6 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对 GC-2spd(ts)细胞凋亡的影响

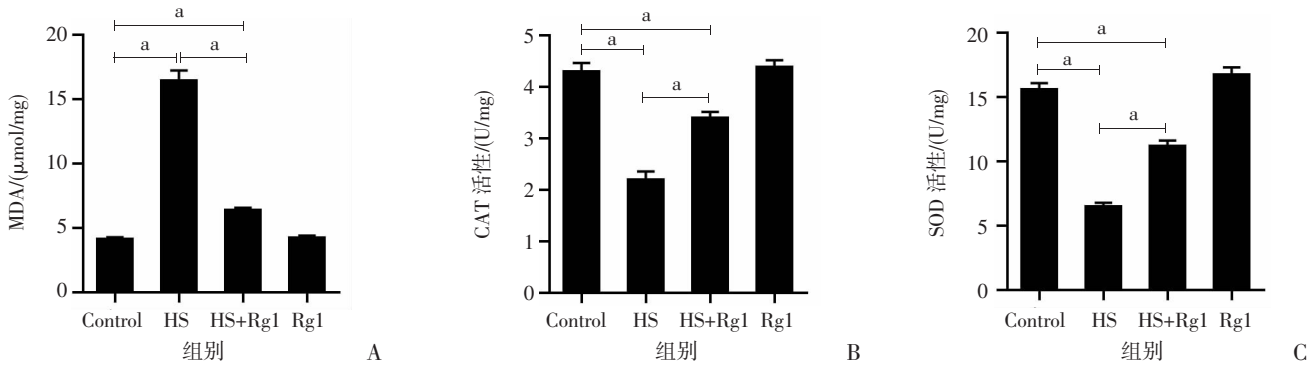
通过 TUNEL 染色检测 GC-2spd(ts)细胞凋亡,对照组和 Rg1 组未见明显凋亡;HS 组可见大量 GC-2spd(ts)细胞凋亡;与 HS 组比较,HS+Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞凋亡数量显著减少($P<0.05$, 图 6)。



a:$P<0.05$

A:精子浓度;B:精子活力

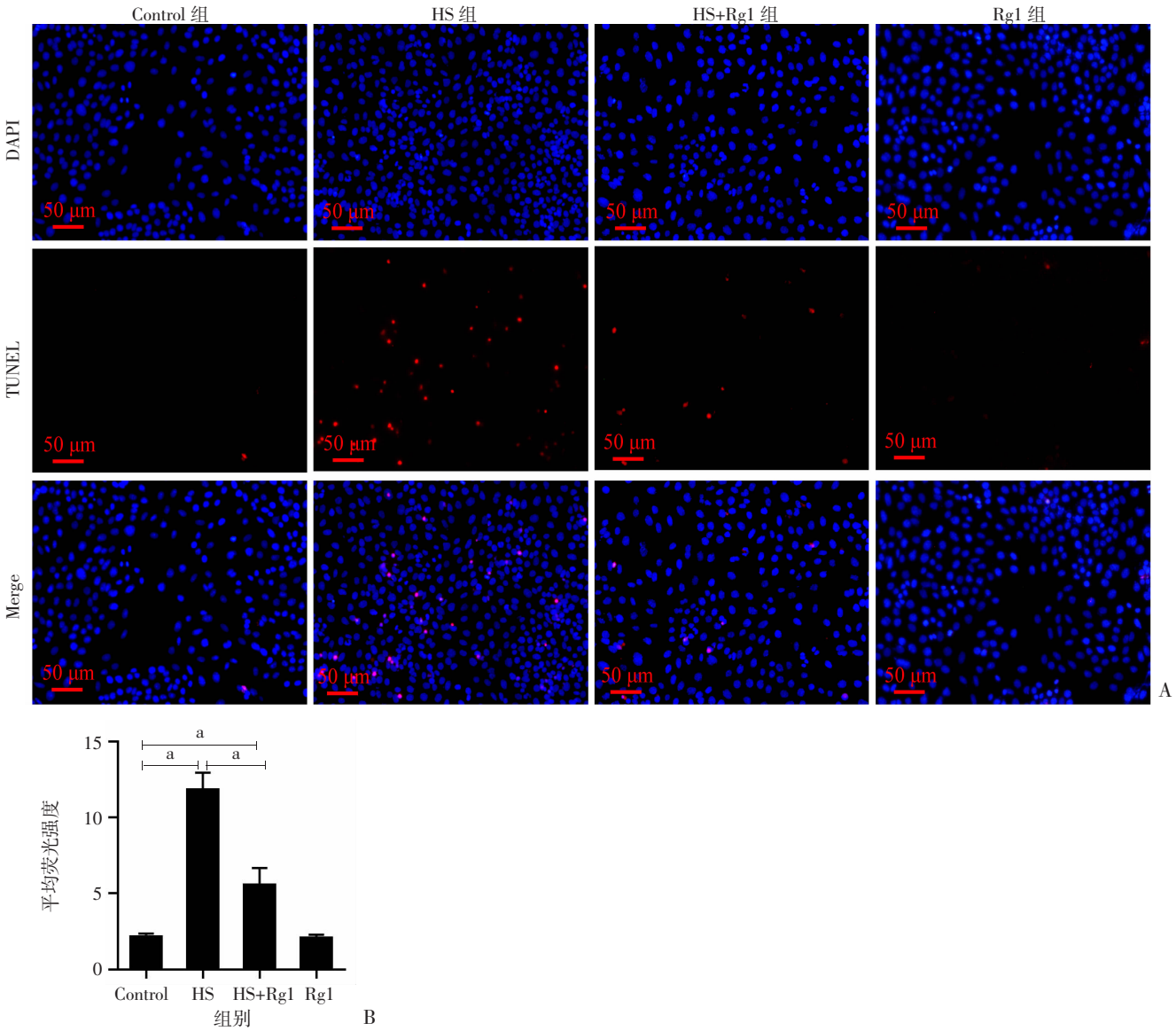
图 4 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对附睾精子浓度和活力的影响



a:$P<0.05$

A:MDA 水平;B:CAT 活性;C:SOD 活性

图 5 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对睾丸氧化应激指标的影响



a:$P<0.05$

A:小鼠 GC-2spd(ts)细胞 TUNEL 染色;B:TUNEL 染色荧光定量分析

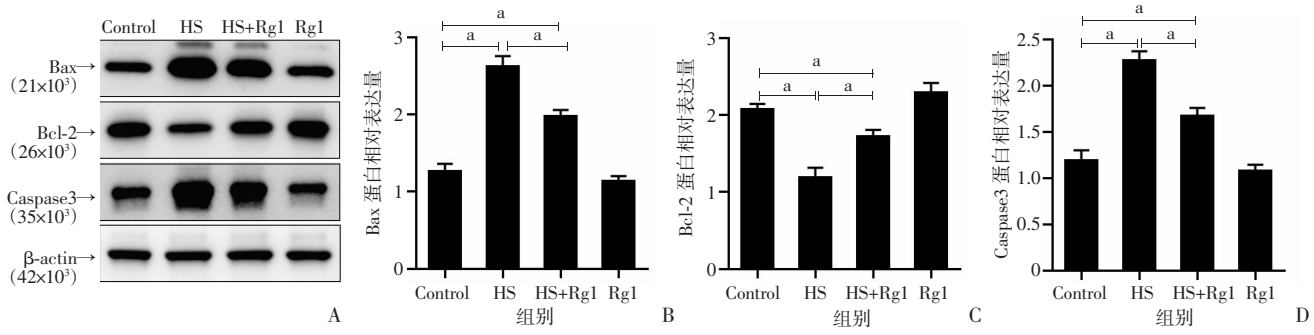
图 6 人参皂苷 Rg1 减轻热应激对 GC-2spd(ts)细胞凋亡的影响

2.7　人参皂苷 Rg1 减轻热应激对 GC-2spd(ts)细胞凋亡蛋白表达的影响

Western blot 结果表明,与对照组比较,HS 组 GC-2spd(ts)细胞凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3 表达显著增加($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低($P<0.05$);与 HS 组比较,HS+Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3 表达显著降低($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著增加($P<0.05$);与对照组比较,Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞凋亡蛋白 Bax、Caspase3 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量未见明显改变,见图 7。

2.8　人参皂苷 Rg1 减轻热应激对 GC-2spd(ts)细胞 Nrf2 通路的影响

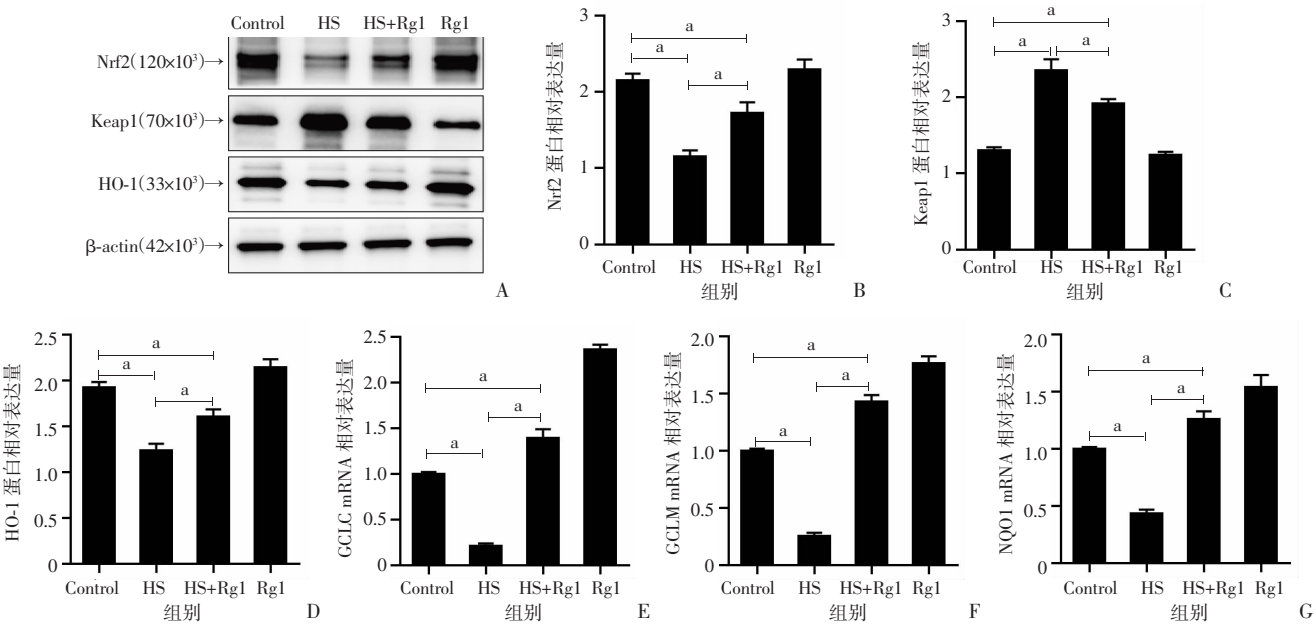
Western blot 结果表明,与对照组比较,HS 组 GC-2spd(ts)细胞内 Nrf2 及其下游蛋白 HO-1 表达显著降低($P<0.05$),Keap1 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与 HS 组比较,HS+Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞内 Nrf2 及其下游蛋白 HO-1 表达显著增加($P<0.05$),Keap1 蛋白表达显著降低($P<0.05$);与对照组比较,Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞内 Nrf2 和 Keap1 蛋白表达无明显差异,但 Nrf2 下游蛋白 HO-1 表达增加。采用 RT-qPCR 评估 Nrf2 靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 的相对表达量,结果表明,与对照组比较,HS 组 Nrf2 靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量明显降低($P<0.05$),Rg1 组 Nrf2 靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量明显增加($P<0.05$);与 HS 组比较,HS+Rg1 组明显减缓了 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量的降低($P<0.05$),见图 8。



a:$P<0.05$

A:Western blot 检测 Bax、Bcl2 和 Caspase3 蛋白表达;B:Bax 蛋白相对表达量;C:Bcl-2 蛋白相对表达量;D:Caspase3 蛋白相对表达量

图 7　人参皂苷 Rg1 减轻热应激对 GC-2spd(ts)细胞凋亡蛋白表达的影响



a:$P<0.05$

A:Western blot 检测 Nrf2、Keap1 和 HO-1 蛋白表达;B:Nrf2 蛋白相对表达量;C:Keap1 蛋白相对表达量;D:HO-1 蛋白相对表达量;E:GCLC mRNA 相对表达量;F:GCLM mRNA 相对表达量;G:NQO1 mRNA 相对表达量

图 8　人参皂苷 Rg1 减轻热应激对 GC-2spd(ts)细胞 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达及其下游靶基因表达量的影响

3 讨论

热应激是机体受到超过自身体温调节能力高温刺激时所产生的非特异性应答反应。精子发生需要相对低于体内温度的环境,所以哺乳动物的睾丸多位于阴囊内有利于散热[13]。研究表明,环境温度上升、高温作业、疾病发热等对睾丸生精功能和男性生育力有重要影响[14],因此寻找防治高温对睾丸功能的影响成为备受关注的问题。

人参是中医临床"补气"要药,有"扶正祛邪"功效,人参皂苷 Rg1 是人参中重要的药物活性成分之一,具有抗炎、抗氧化和抗衰老等多种作用[15-16]。课题组既往研究证明,人参皂苷 Rg1 能拮抗氧化致衰剂对睾丸结构与功能的损伤,提示其机制与其抗氧化作用有关[11-12]。基于前期工作基础,本研究通过构建小鼠睾丸和精母细胞热应激损伤模型,探讨人参皂苷 Rg1 减轻热应激对小鼠睾丸损伤及其相关机制,旨在为防治热应激对男性生殖功能损伤提供实验依据。

本研究证明,热应激能使睾丸萎缩、睾丸指数降低、生精小管结构损伤、睾丸间质细胞数量减少、精子浓度和活力下降,再次验证了热应激能严重影响男性生殖功能。通过腹腔注射人参皂苷 Rg1 干预睾丸热应激过程,结果显示,人参皂苷 Rg1 能明显减轻热应激对睾丸的结构损伤,抑制精子浓度和活力下降,但 Rg1 对正常小鼠睾丸组织结构、附睾精子浓度与活力并无明显影响,提示人参皂苷 Rg1 可用于热应激所致睾丸损伤的防护。

本研究通过构建精母细胞热应激损伤模型,探讨热应激对精母细胞损伤的机制。结果证明,热应激可明确诱导 GC-2spd(ts)细胞凋亡,且细胞凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3 表达显著增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低。在构建热应激细胞模型过程中加入 Rg1 干预,结果发现,人参皂苷 Rg1 能显著降低 GC-2spd(ts)细胞凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3 表达,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,但 Rg1 对正常 GC-2spd(ts)细胞的凋亡无显著影响。结果提示,人参皂苷 Rg1 可用于减轻热应激所致精母细胞凋亡且没有毒副作用。

睾酮是由睾丸间质细胞分泌的雄性激素,其对促进精子发生、调控男性性功能至关重要[17-19]。本研究表明,睾丸热应激模型小鼠的睾丸间质细胞明显减少,血清睾酮水平明显下降。在构建睾丸热应激损伤模型中采用 Rg1 干预,结果表明,人参皂苷 Rg1 可以减轻睾丸间质细胞损伤,阻止睾酮水平下降,但 Rg1 对正常小鼠睾丸间质细胞结构和睾酮水平无显著影响,对其机制还有待进一步探讨。

热应激损伤与氧化损伤密切相关。热应激时睾丸组织活性氧(ROS)过量累积,打破了细胞氧化还原系统的平衡,睾丸细胞发生脂质过氧化,同时抗氧化酶活性降低,细胞抗氧化能力下降,氧化应激产生[20-22]。同时大量 ROS 对精子发生起着抑制作用,如果能激活抗氧化应激信号通路可以减轻对生殖细胞的损伤。本研究证明,热应激可以提高睾丸组织中 MDA 水平,降低 CAT 和 SOD 活性,这说明热应激可促进细胞氧化损伤。用 Rg1 干预热应激过程可降低睾丸组织 MDA 水平,提高 CAT 和 SOD 活性,且 Rg1 对正常小鼠睾丸组织中 MDA 水平、CAT 和 SOD 活性无明显影响,这提示 Rg1 可以减轻氧化损伤,提高细胞抗氧化能力。Nrf2 信号通路是细胞抗氧化应答的核心途径,Nrf2 信号通路缺失或激活障碍会破坏细胞内正常氧化还原的平衡稳态,进而导致细胞衰老与死亡[23-24]。为探讨人参皂苷 Rg1 抗氧化损伤的机制,本研究检测了 Nrf2 及其下游蛋白 HO-1 的表达情况,Western blot 结果表明,与对照组比较,HS 组 GC-2spd(ts)细胞的 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量明显降低;与 HS 组比较,HS+Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞的 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达降低受到抑制;与对照组比较,Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞内 Nrf2 蛋白表达无明显差异,Nrf2 下游蛋白 HO-1 表达增加。RT-qPCR 结果表明,与对照组比较,HS 组 GC-2spd(ts)细胞的 Nrf2 靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量明显降低,Rg1 组 Nrf2 靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量明显增加;与 HS 组比较,HS+Rg1 组 GC-2spd(ts)细胞的 Nrf2 靶基因的表达降低受到抑制。Rg1 组 Nrf2 下游蛋白 HO-1 表达增加,Nrf2 靶基因 GCLC、GCLM 和 NQO1 相对表达量明显增加,其机制有待进一步研究。Keap1 是 Nrf2 的主要细胞内调节因子[25]。本研究结果表明,人参皂苷 Rg1 能拮抗热应激所致睾丸组织 Keap1 蛋白表达的增加,提示热应激可抑制 Keap1/Nrf2 信号通路,人参皂苷 Rg1 对睾丸热应激损伤有一定防护作用。

综上所述,人参皂苷 Rg1 对热应激致小鼠睾丸损伤有明确的防治作用,其机制可能与调控 Nrf2 抗氧化信号通路有关。

参考文献:

[1] SHAHAT A M, RIZZOTO G, KASTELIC J P. Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality[J]. Theriogenology, 2020, 158: 84-96. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.08.034.

[2] ZHANG P F, ZHENG Y, LV Y H, *et al*. Melatonin protects the mouse testis against heat-induced damage[J]. Mol Hum Reprod, 2020, 26(2): 65-79. DOI: 10.1093/molehr/gaaa002.

[3] QIN D Z, CAI H, HE C, *et al*. Melatonin relieves heat-induced spermatocyte apoptosis in mouse testes by inhibition of ATF6 and PERK signaling pathways[J]. Zool Res, 2021, 42(4): 514-524. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.041.

[4] SUI J X, FENG Y N, LI H T, *et al*. Baicalin protects mouse testis from injury induced by heat stress[J]. J Therm Biol, 2019, 82: 63-69. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2019.03.009.

[5] ZHANG J, LIU J, LIU J W, *et al*. Targeting Keap1 with Inulae Herba activated the Nrf2 receptor to alleviate LPS-mediated acute lung injury[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 3): 117358. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117358.

[6] ZHANG J Y, SUN X, CHAI X H, *et al*. Curcumin mitigates oxidative damage in broiler liver and ileum caused by aflatoxin B1-contaminated feed through Nrf2 signaling pathway[J]. Animals, 2024, 14(3): 409. DOI: 10.3390/ani14030409.

[7] ZHU A N, DUAN Z G, CHEN Y R, *et al*. Ginsenoside Rh4 delays skeletal muscle aging through SIRT1 pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 118: 154906. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154906.

[8] KIM A, PARK S M, KIM N S, *et al*. Ginsenoside Rc, an active component of *Panax ginseng*, alleviates oxidative stress-induced muscle atrophy *via* improvement of mitochondrial biogenesis[J]. Antioxidants, 2023, 12(8): 1576. DOI: 10.3390/antiox12081576.

[9] WANG Z L, WANG L, JIANG R, *et al*. Ginsenoside Rg1 prevents bone marrow mesenchymal stem cell senescence *via* NRF2 and PI3K/Akt signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 174: 182-194. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.007.

[10] HOU J Y, MA R X, ZHU S S, *et al*. Revealing the therapeutic targets and mechanism of ginsenoside Rg1 for liver damage related to anti-oxidative stress using proteomic analysis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10045. DOI: 10.3390/ijms231710045.

[11] WANG Z L, CHEN L B, QIU Z, *et al*. Ginsenoside Rg1 ameliorates testicular senescence changes in D-gal-induced aging mice *via* anti-inflammatory and antioxidative mechanisms[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6269-6276. DOI: 10.3892/mmr.2018.8659.

[12] WANG Z L, DU K H, HOU J Y, *et al*. Rg1 alleviates oxidative stress and spermatogonium apoptosis in D-gal-induced testicular toxicity by activating Akt[J]. Redox Rep, 2023, 28(1): 2206197. DOI: 10.1080/13510002.2023.2206197.

[13] HU S Q, LIU D L, LI C R, *et al*. Wuzi-Yanzong prescription alleviates spermatogenesis disorder induced by heat stress dependent on Akt, NF-κB signaling pathway[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 18824. DOI: 10.1038/s41598-021-98036-2.

[14] BAI L, ZHANG Y P, ZHENG C M, *et al*. Tanshinone IIA protects mouse testes from heat stress injury by inhibiting apoptosis and TGFβ1/Smad2/Smad3 signaling pathway[J]. Cell Stress Chaperones, 2023, 28(6): 749-759. DOI: 10.1007/s12192-023-01367-4.

[15] HE F, YAO G P. Ginsenoside Rg1 as a potential regulator of hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 4633270. DOI: 10.1155/2021/4633270.

[16] XIANG Y, WANG S H, WANG L, *et al*. Effects of ginsenoside Rg1 regulating Wnt/β-catenin signaling on neural stem cells to delay brain senescence[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 5010184. DOI: 10.1155/2019/5010184.

[17] RADMANESH F, RAZI M, SHALIZAR-JALALI A. Curcumin nano-micelle induced testicular toxicity in healthy rats; evidence for oxidative stress and failed homeostatic response by heat shock proteins 70-2a and 90[J]. Biomedecine Pharmacother, 2021, 142: 111945. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111945.

[18] JEREMY M, GURUSUBRAMANIAN G, ROY V K, *et al*. Co-treatment of testosterone and estrogen mitigates heat-induced testicular dysfunctions in a rat model[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 214: 106011. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2021.106011.

[19] CHEN Y F, YU T Z. Testosterone mediates hyperthermic response of mice to heat exposure[J]. Life Sci, 2018, 214: 34-40. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.058.

[20] GAO P, ZHUANG J M, CHEN H R, *et al*. 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron ameliorates scrotal heat stress-induced spermatogenic damage by enhancing HO-1 expression[J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(6): 4999-5011. DOI: 10.1007/s11033-023-08462-w.

[21] YU T Z, DOHL J, PARK Y M, *et al*. Protective effects of dietary curcumin and astaxanthin against heat-induced ROS production and skeletal muscle injury in male and female C57BL/6J mice[J]. Life Sci, 2022, 288: 120160. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120160.

[22] HOUSTON B J, NIXON B, MARTIN J H, *et al*. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line[J]. Biol Reprod, 2018, 98(4): 593-606. DOI: 10.1093/biolre/ioy009.

[23] SHAW P, CHATTOPADHYAY A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: mechanism of action and the regulatory mechanisms[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3119-3130. DOI: 10.1002/jcp.29219.

[24] NAKAMURA B N, LAWSON G, CHAN J Y, *et al*. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(9): 1368-1379. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.019.

[25] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, *et al*. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(5): 721-733. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

(收稿:2024-01-16;修回:2024-03-06)

(编辑 张艺霖)