

XUAN Yingying, YANG Yutian, SUN Yuehong, CAI Nan, TANG Hanqin, LI Liang, CHEN Keming. Antagonistic Effects of Resveratrol on Reproductive Injury in Hind-limp Unloading Male Rats (in Chinese). *Chinese Journal of Space Science*, 2024, 44(1): 133–141. DOI:10.11728/cjss2024.01.2023–0063

白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠生殖损伤的对抗作用*

轩莹莹^{1,2} 杨玉田^{1,2} 孙月红^{1,2} 蔡楠^{1,2}
唐汉琴² 李亮² 陈克明²

1(兰州大学药学院 兰州 730000)

2(联勤保障部队第940医院基础医学实验室 兰州 730050)

摘要 为研究白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠生殖损伤的对抗作用,将30只实验雄性大鼠随机分为安慰剂组(placebo control, PC)、后肢去负荷+安慰剂组(hind-limp unloading + placebo control, HU+PC)、后肢去负荷+白藜芦醇给药组(hind-limp unloading + Resveratrol, HU+Res)。HU+Res组按隔天30 mg·kg⁻¹的剂量腹腔注射,PC组和HU+Res组腹腔注射等体积生理盐水。28 d后处死所有雄性大鼠,取睾丸和附睾,用于组织病理学检测、组织生化指标检测、组织蛋白表达分析。与PC组相比,HU+PC组雄性大鼠睾丸和附睾重量均显著下降,白藜芦醇可以显著改善这些指标;组织病理学结果显示,HU+PC组雄性大鼠睾丸组织生精上皮层数显著减少,细胞间质面积显著增大,出现明显的水肿,精原细胞数目明显减少,经白藜芦醇处理后,睾丸组织形态有部分恢复;氧化应激与炎症因子水平检测结果显示,与PC组相比,HU+PC组雄性大鼠睾丸组织氧化应激水平失衡,炎症因子水平明显升高,经白藜芦醇处理后,可以明显逆转这一有害情况;Western blot结果显示,白藜芦醇能显著降低HU+PC组大鼠睾丸组织Bax表达水平,提高Bcl-2, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT表达水平,表明30 mg·kg⁻¹的白藜芦醇可能通过激活PI3K/AKT信号通路发挥对后肢去负荷雄性大鼠生殖损伤的对抗作用。

关键词 白藜芦醇, 雄性大鼠, 生殖, 后肢去负荷

中图分类号 V524, R852.22

Antagonistic Effects of Resveratrol on Reproductive Injury in Hind-limp Unloading Male Rats

XUAN Yingying^{1,2} YANG Yutian^{1,2} SUN Yuehong^{1,2} CAI Nan^{1,2}
TANG Hanqin² LI Liang² CHEN Keming²

1(School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

2(Basic Medical Laboratory of the 940 Hospital of Joint Logistic Support Hospital, Lanzhou 730050)

* 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院实验室培育项目(2021yxky081), 全军动物实验专项(SYDW〔2018〕12号、SYDW〔2020〕27号)和甘肃省自然科学基金项目(22JR11RA013)共同资助

2023-06-05 收到原稿, 2023-09-08 收到修定稿

©The Author(s) 2024. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Abstract To research the antagonistic effect of resveratrol on reproductive injury in hind-limp unloading male rats. The 30 experimental rats were randomly divided into placebo control group, hind-limp unloading group, and HU+Res group. The HU+Res group was given resveratrol at the dose of 30 mg·kg⁻¹ respectively every two days, and the placebo control group and hind-limp unloading groups were given equal volume of physiological saline. After 28 days, all rats were executed, and testes and epididymis were taken for histopathology detection, tissue biochemical index detection, and protein expression analysis of testicular tissue. Compared with the placebo control group, the weight of testes and epididymis in the hind-limp unloading group was significantly reduced, and resveratrol could significantly improve these indicators. The results of histopathology showed that the number of seminiferous epithelium layers and the area of intercellular substance in the hind-limp unloading group were significantly reduced, with obvious edema, and the number of spermatogonium was significantly reduced. After treatment with resveratrol, the morphology of testicular tissue was partially restored. The detection results of oxidative stress and inflammatory factor levels showed that compared with the placebo control group, the hind-limp unloading group showed an imbalance in oxidative stress levels in the testicular tissue of rats, with a significant increase in inflammatory factor levels. After treatment with resveratrol, this harmful situation could be significantly reversed. Western blot results showed that resveratrol significantly reduced the expression levels of Bax in the testicular tissue of hind-limp unloading male rats, and increased the expression levels of Bcl-2, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT. Conclusions resveratrol of 30 mg·kg⁻¹ may exert a antagonistic effect on reproductive damage in hind-limp unloading male rats by activating the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words Resveratrol, Male rat, Reproduction, Tail suspension

0 引言

随着中国空间站进入常态化运营阶段, 中国的载人航天事业呈现显著的发展态势, 这引发了对空间飞行环境对生物体生理影响的广泛关注. 在这一背景下, 航天领域的研究日益关注空间飞行环境对生物体的生理影响, 在进化过程中, 所有生命有机体都适应了地球的重力, 如果不能适应重力的变化, 可能会导致各种病理情况^[1]. 过去关于失重状态对生理状态的影响研究多集中在骨质流失、神经功能紊乱、免疫功能退化和肌肉萎缩等^[2-5], 随着空间任务时间的延长, 航天员的生殖健康也越来越受到重视, 并且已有研究证实, 在航天飞行过程中女性和男性的生殖系统均会受到一定的损伤^[6].

由于当前航天技术水平以及成本资源的限制, 研究开发了一系列模拟微重力效应的装置和实验方法, 探究太空失重状态对机体器官系统的影响, 应用于猕猴和人头低位卧床模型以及啮齿动物的尾部悬吊模型均为国际公认用于研究模拟失重的地面模型, 其中后肢去负荷模型由于其操作简单和经济实用的特点, 在实验中最为常用^[7]. 早在 2006 年, Zhou 等^[8]已利用

大鼠尾部悬吊模型探究模拟失重对大鼠生殖系统的影响, 结果显示模拟失重条件可引起大鼠睾丸重量与质量的显著下降, 同时发生精子数量、精子活动率下降, 精子畸形率显著上升等一系列明显生殖系统损害. 随后, 研究发现白术多糖^[9]、维生素 E^[10] 等对模拟失重大鼠的生殖损伤均有一定保护作用, 但是具体保护机制仍需做进一步研究, 寻找最佳生殖损伤保护药物也迫在眉睫.

白藜芦醇是一种非黄酮类多酚, 主要存在于葡萄、虎杖、花生、蓝莓、桑葚、决明子、何首乌等植物中, 是植物受到外界刺激时产生的抗毒素, 也被称为植物抗菌素^[11]. 自 1924 年白藜芦醇首次被发现以来, 已被证明在体内外具有多种药理作用, 包括抗氧化、抗炎、抗癌、抗肿瘤、抗衰老、抗菌、免疫调节等多种药理活性^[12]. 已有研究证明, 白藜芦醇能够通过调节雄性体内激素水平、保护睾丸损伤和促进精子发生等一系列作用, 发挥对雄性生殖系统的保护作用^[13], 体内给白藜芦醇已成为治疗不孕症的一种方法^[14], 但是目前关于白藜芦醇对模拟失重大鼠生殖系统的作用及机制却鲜有报道.

本研究旨在探究白藜芦醇对后肢去负荷雄性大

鼠生殖损伤的保护作用, 并对其抗氧化、抗凋亡、抗炎以及可能的分子调节机制进行探索, 为将来中长期星际探索任务中人体可能面临的生殖系统损伤提供新的思路与方向.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 8 周龄, 体质量 180 ± 20 g, 许可证编号 SYXK(军)2017-0046, 伦理审核编号 2022 KYLL045, 饲养于联勤保障部队第 940 医院 SPF 级动物实验中心, 所有动物在实验开始前在实验室环境适应性饲养 1 周.

1.1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 产品批号: F2121341), 4% 多聚甲醛固定液(武汉塞维尔科技有限公司), 精子形态学快速染色液(上海索莱宝生物科技有公司), 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), 白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 13(IL-13)和白细胞介素 1β (IL- 1β)(泉州睿信生物科技有限公司). 一抗: Bax, AKT, PI3 K(英国 Abcam 公司), p-AKT, p-PI3 K(美国 Affinity 公司), Bcl-2(北京博奥森生物技术有限公司); 二抗: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)(南京巴傲得生物科技有限公司), 电泳仪和电转仪(美国 Bio-Rad 公司), Epoch 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司).

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模与给药处理

30 只 SD 实验雄性大鼠按体重区间随机分为三组, 即 PC 组、HU+PC 组、HU+Res 组. 每组 10 只, 组间体重无显著性差异. 造模采用美国国家航空航天局(NASA)认可的文献[7]中的方法. HU+PC 组与 HU+Res 组雄性大鼠后肢离地, 身体与地面成 30° 左右夹角, 前肢着地并能自由活动, 每日定量给予食物, 雄性大鼠进食与饮水不受限. HU+PC 组与 HU+Res 组每天后肢去负荷 24 h, 共 28 d. 经查阅文献, 确定给药剂量为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, HU+Res 组腹腔注射白藜芦

醇 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, PC 组与 HU+PC 组腹腔注射等体积生理盐水. 隔天给药, 持续给药 28 d, 给药共 14 次. 每周称取雄性大鼠体质量并记录.

1.2.2 组织取材

雄性大鼠处理 28 d 后统一集中取材, PBS 洗净后立即称取睾丸和附睾质量并进行拍照, 将左侧睾丸放于 4% 中性多聚甲醛固定液中, 右侧睾丸过液氮后放于 -80°C 冰箱中待用.

1.2.3 睾丸组织病理学检测

取出固定于 4% 中性多聚甲醛溶液中的左侧睾丸, 按以下步骤进行处理. (1) 脱水: 梯度乙醇脱水处理. (2) 透明: 无水乙醇、二甲苯依次处理. (3) 包埋: 睾丸组织放置到石蜡膜具中, 在石蜡包埋机的冷台上冷却. (4) 切片: 将蜡块放在切片机上切成 $4 \sim 6 \mu\text{m}$ 的薄片并展开在载玻片上. (5) 染色: 脱蜡、乙醇洗脱依次处理, 苏木精-伊红染色, 最后使用中性树脂进行封片.

1.2.4 精子数量与畸形率指标检测

用眼科剪将新鲜取出的双侧附睾剪碎置于 37°C 预热的生理盐水中, 待精子充分释放后制成精子悬液, 取精子悬液利用血细胞计数板进行计数, 利用红细胞计数法, 按标准换算成每毫升精子悬液里所含的精子数量. 取适量精子悬液滴于载玻片上进行涂片, 采用 Diff-quick 染色, 显微镜下计数 200 个精子, 观察发生畸形(头部畸形、尾部畸形以及其他异常形态)的精子并进行计数.

1.2.5 睾丸组织氧化应激指标检测

取右侧睾丸组织, 按照睾丸组织质量(100 mg): 裂解液体积(mL)1:9 的比例加入预冷的裂解液机械匀浆, 4°C 裂解 30 min 后, 在 4°C 温度下以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 30 min, 取上清, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测其蛋白浓度. 取适量上清液进行 SOD, CAT, GSH-PX, H_2O_2 , LDH 和 MDA 的水平检测, 具体操作步骤按相应说明书进行. 除 H_2O_2 外, 蛋白成分的结果单位以 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示.

1.2.6 睾丸组织炎症因子指标检测

取右侧睾丸组织, 按照睾丸组织重量(100 mg): 裂解液体积(mL)=1:9 的比例加入预冷的裂解液机械匀浆, 4°C 裂解 30 min 后, 在 4°C 温度下 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测其蛋白浓度, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)进行 IL-

6, IL-13, IL-1 β 的水平检测, 具体操作步骤按照相应的试剂盒说明书进行。

1.2.7 Western blot 检测

取右侧睾丸组织, 按照睾丸组织重量 (100 mg): 裂解液体积 (mL)=1:9 的比例加入预冷的裂解液机械匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 温度下 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min. 取上清, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测其蛋白浓度, 定量后, 沸水浴中变性 25 min, 随后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存. 待测蛋白样品检测前, 沸水浴中变性 15 min, 电泳条件设置为先 70 V 电泳 30 min, 再以 110 V 电泳 60 min, 电转条件为 110 V 电泳 60 min, 于 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 60 min, 分别置于放有一抗 Bax, Bcl-2, p-AKT, AKT, p-PI3 K, PI3 K 和 GAPDH 的自封袋中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗孵育 2 h, 曝光检测各蛋白表达量。

1.2.8 统计学方法

实验数据的统计学分析利用 SPASS 26.0 软件. 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 的形式表示, 多组别分析采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠睾丸形态、大小、睾丸及附睾指数的影响

与 PC 组相比, HU+PC 组的睾丸形态发生了极显著的变化, 如图 1(a) 所示; 睾丸长径与横径分别减少 43.36% ($P<0.01$) 和 42.87% ($P<0.01$), 如图 1(b) (c) 所示; 睾丸系数与附睾系数分别降低了 70.7% ($P<0.01$) 和 70.3% ($P<0.01$), 如图 1(d)(e) 所示; 睾丸表面颜色苍白且血管变密, 白藜芦醇处理后的后肢去负荷雄性大鼠, 与 HU+PC 组雄性大鼠相比, 睾丸体积得到了一定的恢复, 睾丸长径与横径分别增加了 9.56% ($P<0.05$) 和 16.46% ($P<0.05$), 如图 1(b) (c) 所示; 睾丸系数与附睾系数分别增加了 34.48% ($P<0.05$) 和 154.55% ($P<0.01$), 如图 1(d)(e) 所示。

2.2 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠睾丸病理变化的影响

如图 2 所示, 对睾丸组织切片进行 HE 染色后观察发现, PC 组雄性大鼠睾丸生精小管排列紧密, 形状规则, 细胞间隙明显, 生精上皮细胞较厚, 生精小管管

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with PC group # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with HU+PC group

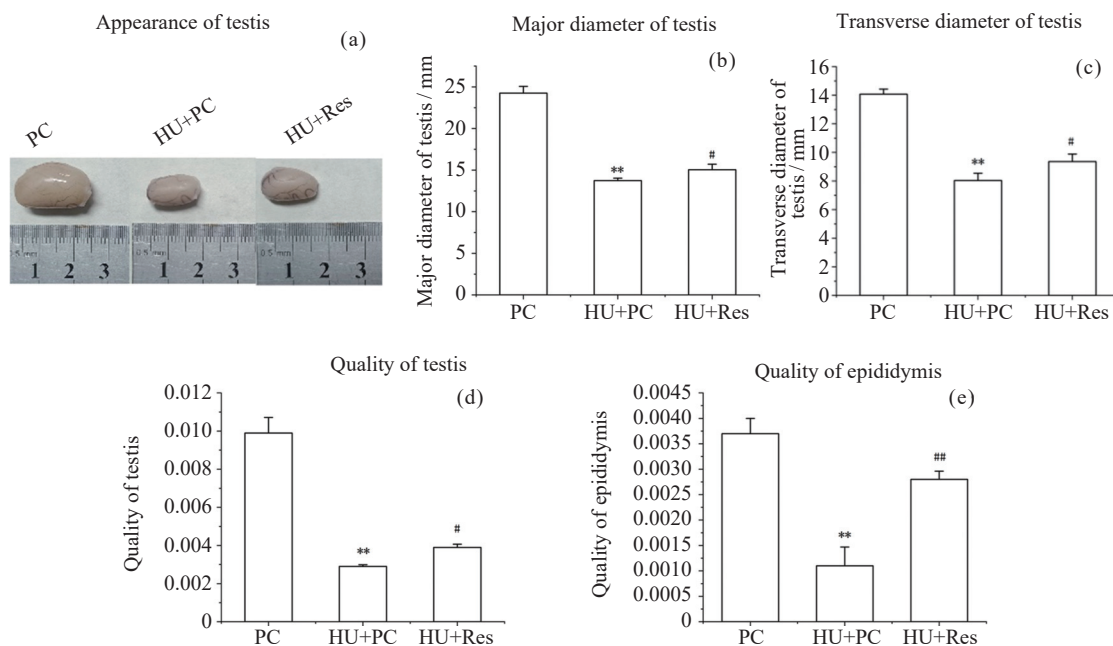


图 1 各组大鼠睾丸形态、睾丸系数和附睾系数. (a) 睾丸外观, (b) 睾丸直径, (c) 睾丸横径, (d) 睾丸系数, (e) 附睾系数

Fig. 1 Appearance of testis and the quality of testis and epididymis in each group. (a) Appearance of testis, (b) major diameter of testis, (c) transverse diameter of testis, (d) quality of testis, (e) quality of epididymis

腔内有大量精子存在. 经 28 d 后肢去负荷处理后, 生精上皮层数显著减少, 细胞间质面积显著增大, 出现明显的水肿, 精原细胞数目明显减少. 与 HU+PC 组相比, 白藜芦醇处理后的大鼠睾丸精原数目增多, 细胞间质面积缩小, 水肿程度降低, 曲细精管形状也由不规则恢复成椭圆形, 且排列也更为紧密有规则.

2.3 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠附睾

精子质量的影响

与 PC 组相比, HU+PC 组的雄性大鼠附睾精子数量显著下降了 99.42% ($P < 0.01$), 如图 3(a) 所示; 精子畸形率显著上升了 248.23% ($P < 0.01$), 如图 3(b). 白藜芦醇处理后, 后肢去负荷雄性大鼠精子数量、精子畸形率虽有微小变化, 但与 HU+PC 组之间并没有显著性差异 ($P > 0.05$).

2.4 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织

氧化应激水平的影响

如图 4(a)(c) 所示, 与 PC 组相比, HU+PC 组的

雄性大鼠睾丸组织 SOD 和 GSH-PX 活力水平分别显著下降了 19.48% 和 44.47% ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 如图 4(b)(d)(e)(f) 所示, CAT, H_2O_2 , LDH 和 MDA 活力水平或含量分别显著上升了 147.15%, 1647.17%, 393.40% 和 373.26% ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$); 经白藜芦醇处理后, 与 HU+PC 组相比, 雄性大鼠睾丸组织 SOD 和 GSH-PX 活力水平明显上升了 10.59% 和 40.13% ($P < 0.05$, $P < 0.05$), CAT, H_2O_2 , LDH 和 MDA 活力水平或含量分别显著下降了 37.29%, 71.39%, 90.67% 和 60.93% ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 如图 4(b)(d)(e)(f) 所示. 以上结果说明, 白藜芦醇能明显缓解后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织的氧化损伤.

2.5 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织

炎症因子水平的影响

Elisa 结果显示 (见 图 5), HU+PC 组睾丸组织 IL-6, IL-13, IL-1 β 含量显著高于 PC 组, 分别增加了

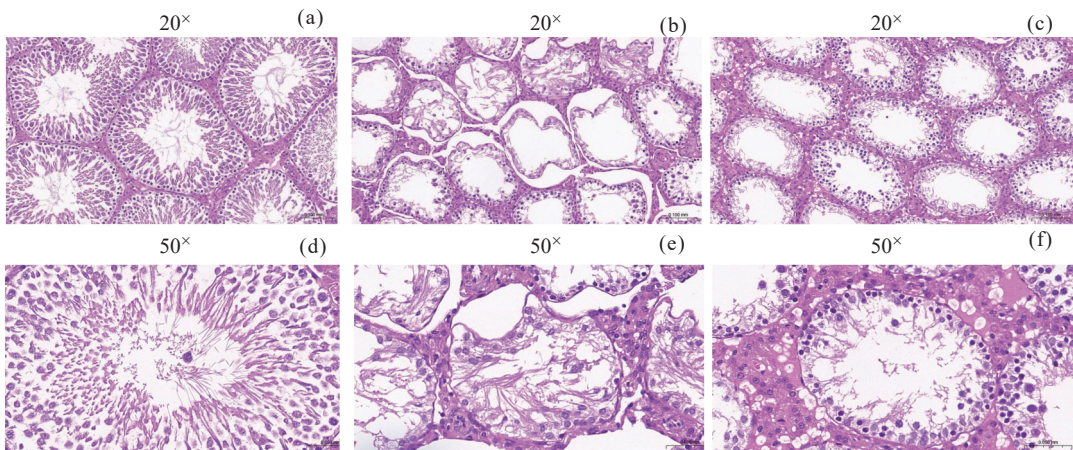


图 2 各组大鼠睾丸病理学结果

Fig. 2 Morphology of testis of rat in each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with PC group # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with HU+PC group

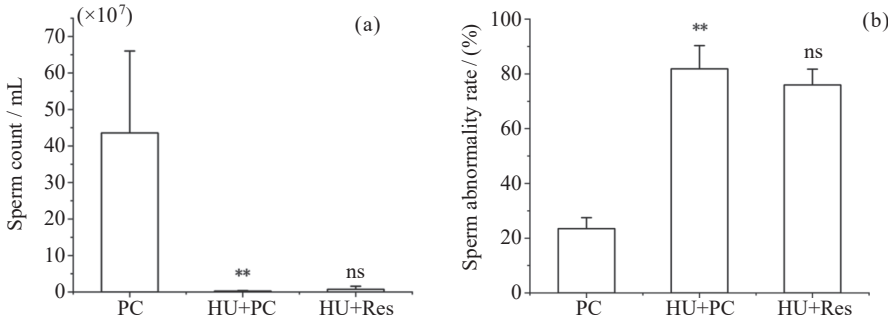


图 3 各组大鼠附睾精子数量 (a) 和精子畸形率 (b)

Fig. 3 Sperm count (a) and sperm abnormality rate (b) in each group

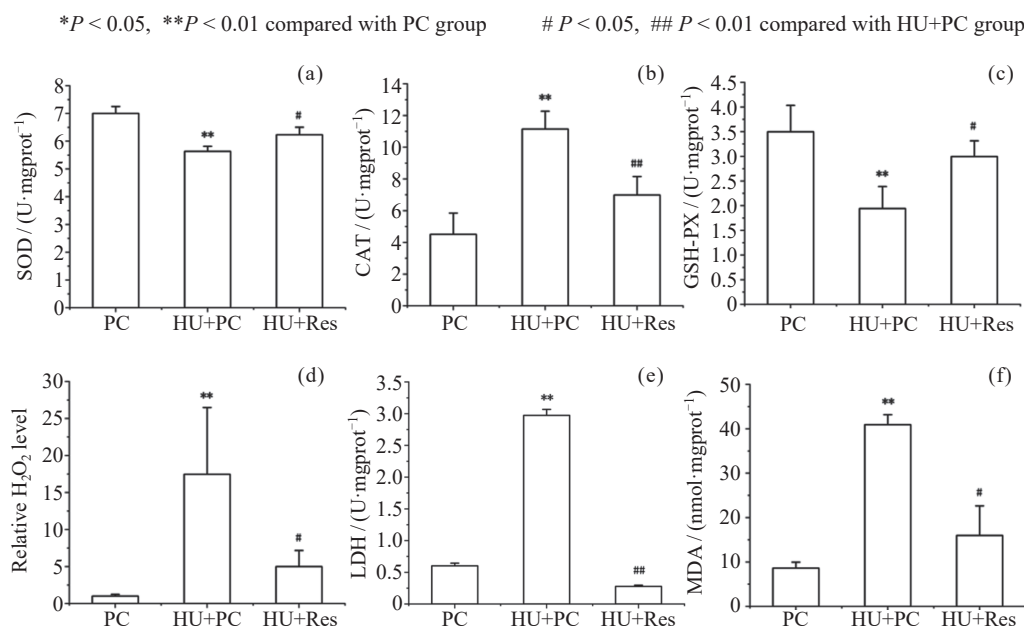


图4 每组大鼠睾丸组织中 SOD(a), CAT(b), GSH-PX(c), H₂O₂(d), LDH(e) 和 MDA(f) 的含量/酶活力水平
Fig. 4 Content or activity of SOD (a), CAT (b), GSH-PX (c), H₂O₂ (d), LDH (e) and MDA (f) in each group

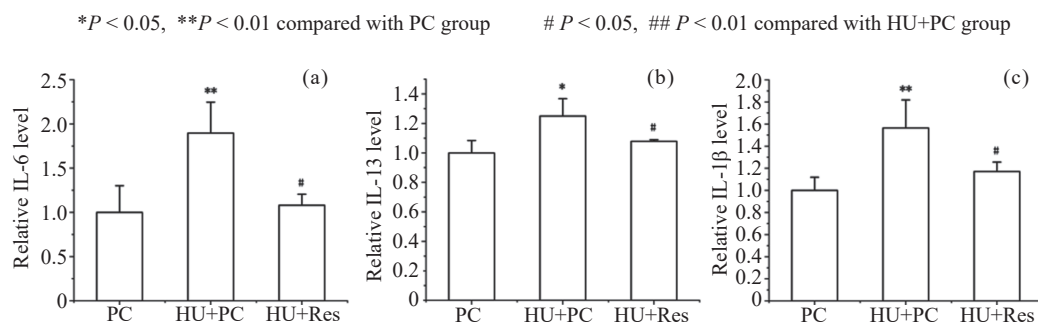


图5 各组大鼠睾丸组织炎症因子 IL-6(a), IL-13(b) 和 IL-1β(c) 水平
Fig. 5 Content of IL-6 (a), IL-13 (b) and IL-1β (c) in each group

89.62%, 25.01% 和 56.47% ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), 如图 5(a)~(c) 所示; HU+Res 组睾丸组织 IL-6, IL-13, IL-1β 含量明显低于 HU+PC 组, 分别降低了 43.02%, 13.69%, 25.17% ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), 如图 5(a)~(c) 所示. 说明白藜芦醇能有效降低后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织的炎症因子水平.

2.6 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织凋亡蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与 PC 组相比, 后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织中 Bax 促凋亡蛋白表达明显上升 42.59% ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 抗凋亡蛋白表达明显下降 39.68% ($P < 0.05$); 与 HU+PC 组相比, HU+Res 组

雄性大鼠睾丸组织中促凋亡蛋白 Bax 表达明显下降 22.74% ($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显上升 74.65% ($P < 0.05$). 这说明白藜芦醇能够一定程度上抑制后肢去负荷所导致的雄性大鼠睾丸组织凋亡, 但是具体通过哪种凋亡途径以及哪些细胞发生了凋亡则需要做进一步研究.

2.7 白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织 PI3 K / AKT 信号通路蛋白的表达影响

如图 7 所示, 与 PC 组相比, HU+PC 组雄性大鼠睾丸组织 p-AKT/AKT 和 p-PI3 K/PI3 K 蛋白表达分别显著下降了 59.55% 和 60.83% ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 与 HU+PC 组相比, HU+Res 组雄性大鼠睾丸组织 p-AKT/AKT 和 p-PI3 K/PI3 K 显著上升

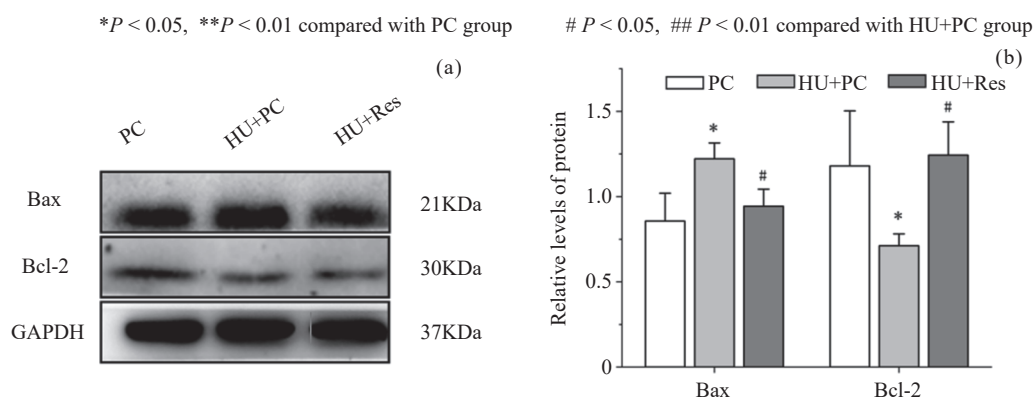


图 6 各组大鼠睾丸组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

Fig. 6 Protein levels of Bax and Bcl-2 in each group

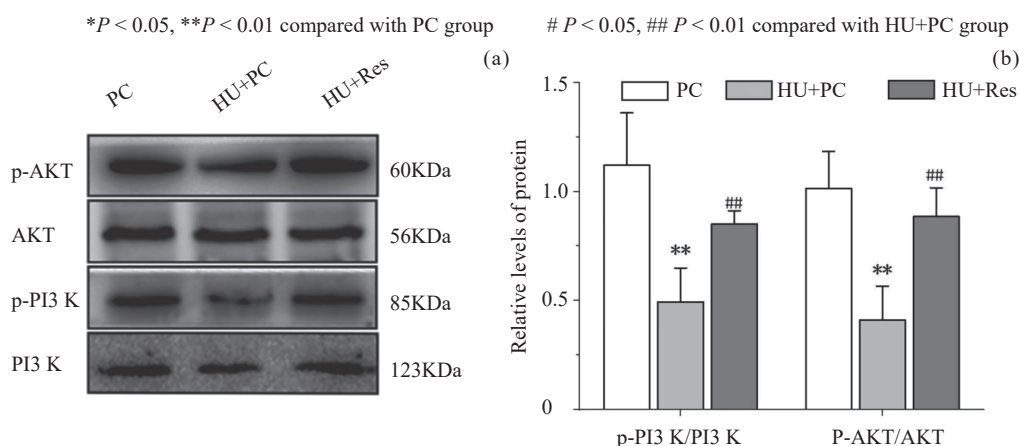


图 7 各组大鼠睾丸组织 p-AKT, AKT, p-PI3 K 和 PI3 K 蛋白表达

Fig. 7 Protein levels of p-AKT, AKT, p-PI3 K and PI3 K in each group

115.87% 和 100.33% ($P < 0.01$, $P < 0.01$). 以上结果提示白藜芦醇可能通过激活 PI3 K/AKT 信号通路, 调节后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织的氧化应激和凋亡水平.

3 讨论与结论

随着载人航天和深空探索技术的快速发展, 深空行星际探索已成为人类航天的新目标, 为实现这一目标首先需要解决的是人类在太空中的繁衍问题. 然而已有大量的研究证明, 无论是地基模拟微重力还是真实的空间飞行, 重力的缺失均会导致一系列生殖问题, 包括精子数量减少、睾丸质量和外观的急剧变化以及血清睾酮在飞行后显著下降等^[6].

本实验采用后肢去负荷模型研究模拟失重对雄性大鼠生殖系统的影响. 结果显示, SD 雄性大鼠后肢

去负荷 28 d 后, 精子数量、精子质量、睾丸以及附睾质量和体积与 PC 组相比均发生了显著下降, 这些结果与 Zheng 等^[15]的研究结果一致, 然而经白藜芦醇处理后, 睾丸与附睾质量和体积虽有一定的恢复, 精子数量和质量与 HU+PC 组相比并没有显著提高. 其可能原因是, 实验过程中雄性大鼠尾部一直受到外部刺激, 机体处于高度应激状态; 悬吊时雄性大鼠体位的改变引起雄性大鼠睾丸组织内的血液供应相对减少, 而精子发生的早期阶段容易受到睾丸血液供应降低的影响^[16].

研究表明, 失重同时会导致睾丸产生细胞凋亡等一系列细胞层面的变化, 例如 Zhou 等发现模拟失重雄性大鼠睾丸组织细胞中的凋亡指数显著增加^[8]. 作为精子发生与发育的重要场所, 睾丸组织的凋亡增加可能是失重状态下生殖功能损伤的重要原因, 如何抑

制睾丸组织细胞的异常凋亡则可能成为防治生殖损伤的切入点. Western blot 检测结果提示, 模拟失重条件下雄性大鼠睾丸组织中的促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著升高而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平显著下降, 经白藜芦醇处理后, 这一异常凋亡现象出现一定的缓解, 而具体哪些细胞发生了凋亡以及白藜芦醇通过哪条凋亡途径来发挥作用则需要做进一步的研究.

氧化应激、炎症反应均是凋亡的直接诱因, 同时这二者也是相互关联的病理过程, 其中任何一个的发生都会诱发另一个^[17]. 实际上, 炎症反应被认为是生殖能力下降以及不孕症的重要因素, 例如约 30% 的不孕患者病例中睾丸活检显示存在无症状的局灶性炎症病变^[18]. 细胞防御氧化应激的关键调节因子, 如 GSH-PX, CAT, SOD 等, 对于正常的精子发生和精子功能至关重要^[19]. 机体内抗氧化基因 SOD, CAT 和 GSH-PX 的功能多态性也与男性不育有关^[20]. 因此, 本文主要从这两个方面进行分析.

对睾丸组织进行氧化应激水平检测, 结果显示后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织中的抗氧化指标 GSH-PX 和 SOD 酶活力水平明显下降, 氧化指标 H_2O_2 , LDH, MDA 则明显上升, 经白藜芦醇处理后, 睾丸组织的抗氧化酶活力或含量明显增高, 细胞损伤标志因子明显降低. 然而作为组织内抗氧化能力标志之一的 CAT 酶活力却在失重状态下异常升高, 经白藜芦醇处理后又降低至正常水平, 推测是由于失重状态下抗氧化酶活性下降, 机体启动保护性机制使得过氧化氢酶的代偿性升高, 这一结果与先前 Jiang 的研究结果一致^[10]. 除此之外, 白藜芦醇也能够明显降低后肢去负荷状态下雄性大鼠睾丸组织中促炎因子 IL-6, IL-13, IL-1 β 的水平, 具有较强的抗炎作用.

PI3 K / AKT 信号传导途径作为重要的细胞存活和抗凋亡信号传导途径, 参与精子发生、增殖和分化等雄性生殖的各个方面^[21]. 为进一步探究白藜芦醇对后肢去负荷雄性大鼠生殖损伤保护作用的分子机制, 选择了 PI3 K/AKT 信号通路进行探究. 在本实验中, 后肢去负荷雄性大鼠睾丸组织中 PI3 K 和 AKT 磷酸化水平显著降低, 而白藜芦醇显著升高了 PI3 K 和 AKT 的磷酸化水平, 提示白藜芦醇可能通过激活 PI3 K/AKT 信号途径对模拟失重状态下雄性大鼠睾丸的凋亡、氧化应激、炎症水平进行调节, 从而发挥对睾丸的保护作用.

综上所述, 在后肢去负荷状态下给予白藜芦醇对雄性大鼠生殖损伤具有一定的对抗作用, 这可能与白藜芦醇激活 PI3 K/AKT 信号通路有关. 但是白藜芦醇对失重状态下睾酮合成过程关键蛋白 (如 StAR, P450 scc, P450 C17) 有何调控作用, 在细胞水平上白藜芦醇对睾丸细胞经过微重力处理后的凋亡情况是否同样有所改善, 白藜芦醇与其他已报道的药物相比有何优势, 解除悬吊、恢复正常重力对雄性生殖损伤是否具有恢复作用, 以及在此过程白藜芦醇起何作用, 这些问题都需要做进一步的研究.

参考文献

- [1] SHI Hongzhi, GUO Liguang, XU Dong, *et al.* Diseases and injuries in spaceflight[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2019, **32**(6): 551-557 (石宏志, 郭立国, 许东, 等. 航天飞行中的病症和损伤 [J]. 航天医学与医学工程, 2019, **32**(6): 551-557)
- [2] BAQAI F P, GRIDLEY D S, SLATER J M, *et al.* Effects of spaceflight on Innate immune function and Antioxidant gene expression[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2009, **106**(6): 1935-1942
- [3] CAPPELLESSO R, NICOLE L, GUIDO A, *et al.* Space-flight osteoporosis: current state and future perspective[J]. *Endocrine Regulations*, 2015, **49**(4): 231-239
- [4] MANN V, SUNDARESAN A, CHAGANTI M. Cellular changes in the nervous system when exposed to gravitational variation[J]. *Neurology India*, 2019, **67**(3): 684-691
- [5] NARICI M V, DE BOER M D. Disuse of the musculoskeletal system in space and on earth[J]. *European Journal of Applied Physiology*, 2011, **111**(3): 403-420
- [6] MISHRA B, LUDERER U. Reproductive hazards of Space travel in women and men[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, **15**(12): 713-730
- [7] WRONSKI T J, MOREY-HOLTON E R. Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques[J]. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 1987, **58**(1): 63-68
- [8] ZHOU Dangxia, QIU Shudong, WANG Zhiyong, *et al.* Effect of tail-suspension on the reproduction of adult male rats[J]. *National Journal of Andrology*, 2006, **12**(4): 326-329 (周党侠, 邱曙东, 王志勇, 等. 尾悬吊状态对性成熟期雄性大鼠生殖功能的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2006, **12**(4): 326-329)
- [9] ZHOU Dangxia, QIU Shudong, WANG Zhiyong, *et al.* Protective effects of vitamin e on injury to male reproductive function in tail-suspended rats[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2006, **19**(5): 337-339 (周党侠, 邱曙东, 王志勇, 等. 维生素 E 对尾部悬吊大鼠雄性生殖损伤的防护作用 [J]. 航天医学与医学工程, 2006, **19**(5): 337-339)

- [10] JIANG Siyu. Protective Effect of Atractylodes Macrocephala Polysaccharide on Reproductive Injury in Simulated Weightlessness Rats[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021 (姜思羽. 白术多糖对模拟失重大鼠生殖损伤的防护作用 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021)
- [11] ZHANG Xiaotong, FU Huimin, ZHOU Liting, *et al.* Research progress of pharmacological actions of resveratrol[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2021, **50**(23): 58-60 (张晓桐, 付慧敏, 周丽婷, 等. 白藜芦醇化学成分及药理作用的研究进展 [J]. *山东化工*, 2021, **50**(23): 58-60)
- [12] CHEN Xiaolin, ZHANG Zilong, GAO Tianhui, *et al.* Research progress on pharmacological action and mechanism of resveratrol[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2022, **41**(12): 67-76 (陈小林, 张子龙, 高天慧, 等. 白藜芦醇药理作用及机制研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2022, **41**(12): 67-76)
- [13] SHAO Mingguang, CHEN Jukun, WANG Tianyang, *et al.* Mammalian male reproductive system beneficial effects research progress of resveratrol[J]. *China Feed*, 2022(24): 4-11 (邵明广, 陈举昆, 王天阳, 等. 白藜芦醇对哺乳动物雄性生殖系统有益作用的研究进展 [J]. *中国饲料*, 2022(24): 4-11)
- [14] PASQUARIELLO R, VERDILE N, BREVINI T A L, *et al.* The role of resveratrol in mammalian reproduction[J]. *Molecules*, 2020, **25**(19): 4554
- [15] ZHENG X, ZHANG X P, WAN Y M, *et al.* Effects of simulated weightlessness on reproduction in male rats[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2003, **16**(5): 379-381
- [16] TANG Jin, SHE Ruiping, WANG Desheng, *et al.* Effects of simulated weightlessness on tissue structure and AR and HSP70 expressions in testicle of rat[J]. *Science & Technology Review*, 2008, **26**(19): 59-68 (汤金, 余锐萍, 汪德生, 等. 模拟失重对大鼠睾丸组织结构及 AR 和 HSP70 表达的影响 [J]. *科技导报*, 2008, **26**(19): 59-68)
- [17] DUTTA S, SENGUPTA P, SLAMA P, *et al.* Oxidative stress, testicular inflammatory pathways, and male reproduction[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(18): 10043
- [18] SCHUPPE H C, MEINHARDT A, ALLAM J P, *et al.* Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility?[J]. *Andrologia*, 2008, **40**(2): 84-91
- [19] KEMAL DURU N, MORSHEDI M, OEHNINGER S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa[J]. *Fertility and Sterility*, 2000, **74**(6): 1200-1207
- [20] YU B L, HUANG Z F. Variations in antioxidant genes and male infertility[J]. *BioMed Research International*, 2015, **2015**: 513196
- [21] DENG C Y, LV M, LUO B H, *et al.* The role of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in male reproduction[J]. *Current Molecular Medicine*, 2021, **21**(7): 539-548

作者简介



轩莹莹 女, 1998 年 12 月出生于河南省周口市, 现为兰州大学药学院硕士在读研究生, 主要研究方向为空间骨流失机制与防治措施。

E-mail: xuanyingy@163.com



陈克明 (通信作者) 男, 1968 年 8 月生, 毕业于兰州大学生命科学学院, 现为联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室主任, 甘肃省第一层次领军人才。主要研究方向为骨质疏松症的预防与治疗、骨代谢调控的信号转导机制等。

E-mail: chenkm@lut.cn