

铁死亡在实验性左侧精索静脉曲张大鼠睾丸中的初步探讨*

王浩浩¹ 李海松¹ 王继升¹ 赵琦¹ 徐洪胜¹ 韩亮²

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学房山医院, 北京 102400)

【摘要】 目的 探讨实验性左侧精索静脉曲张(ELV)大鼠睾丸中是否存在铁死亡的细胞死亡方式。方法 24 只 SPF 级 SD 大鼠, 参照 Turner 法构建大鼠 ELV 模型, 按随机数字表法分成假手术 A 组、假手术 B 组、手术 A 组和手术 B 组, 每组 6 只。假手术 A 组和手术 A 组于造模 2 周后进行取材, 假手术 B 组和手术 B 组于造模 4 周后进行取材, 分别评估各组左侧精索静脉曲张情况, 同时取出各组左侧睾丸, HE 染色观察形态学变化, ELISA 法测定活性氧(ROS)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)浓度, 分光光度法测定还原型谷胱甘肽(GSH)活性, 比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性, Western Blot 检测左侧睾丸组织中核转录相关因子 2(Nrf2)蛋白的表达。结果 手术 A 组和手术 B 组大鼠左侧精索静脉曲张均较术前曲张 2 倍以上, ELV 大鼠模型成功建立。手术 A 组和手术 B 组大鼠左侧睾丸组织内发生明显病理损伤, 生精小管基膜损伤, 各级生精细胞排列紊乱, 细胞结构部分破坏, 管腔生精细胞脱落, 精子数量减少, 管腔间隙增大, 支持细胞形态欠佳。与相对应的假手术 A 组、假手术 B 组相比, 手术 A 组和手术 B 组大鼠左侧睾丸组织中 ROS 浓度均明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但 GSH、GSH-PX 活性与 GPX4 浓度均变化不明显, 差异无统计学意义($P > 0.05$), Nrf2 蛋白相对表达量也无明显变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 目前暂不能得出精索静脉曲张睾丸中存在铁死亡的细胞死亡方式, 但是也不能否认其存在的可能。

【关键词】 精索静脉曲张; 铁死亡; 睾丸; 活性氧; Nrf2 信号通路

【中图分类号】 R697⁺.24 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 11. 003

A preliminary study of ferroptosis in the testis of rats with experimental left varicocele

WANG Haohao¹, LI Haisong¹, WANG Jisheng¹, ZHAO Qi¹, XU Hongsheng¹, HAN Liang²

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Fangshan Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate whether there is a ferroptosis cell death method in the testis of experimental rats with left varicocele. **Methods** Twenty-four SD rats were divided into operation group (ELV) and sham operation group (SOG) according to the random number table method. The rat model of varicocele was established by Turner method, and the rats in the operation group and the sham operation group were killed 2 weeks and 4 weeks after the completion of the model. The model of varicocele was evaluated, and the left testes were taken out to observe the morphological changes. The concentrations of ROS and GPX4 were determined by ELISA method, the activity of GSH was determined by spectrophotometry, the activity of GSH-PX was determined by colorimetry, and the expression of Nrf2 protein in left testicular tissue was detected by Western blot method. **Results** At 2 and 4 weeks, the left spermatic vein of ELV dilated more than 2 times as much as before operation, and the rat model of varicocele was established successfully. Obvious pathological damage occurred in the left testicular tissue in ELV at 2 and 4 weeks, including damage to the basement membrane of seminiferous tubules, disordered arrangement of spermatogenic cells at all levels,

基金项目:北京市优秀人才项目(2018000077606G483)

通信作者:韩亮, E-mail: han1234liang5678@126.com

引用本文:王浩浩,李海松,王继升,等.铁死亡在实验性左侧精索静脉曲张大鼠睾丸中的初步探讨[J].西部医学,2022,34(11):1571-1575. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 11. 003

partial destruction of cell structure, exfoliation of spermatogenic cells in the lumen, decrease of sperm count, enlargement of lumen space and poor morphology of Sertoli cells. Compared with the SOG group at 2 weeks and 4 weeks, the concentration of ROS in the testis tissue of rats in the ELV group at 2 weeks and 4 weeks was significantly higher than that in the ELV group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, the activity of GSH, GSH-PX and the concentration of GPX4 did not change significantly, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$), the relative amount of Nrf2 protein expression did not change significantly, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** At present, it cannot be concluded that there is a cell death method of ferroptosis in the testis of varicocele, but the possibility of its existence cannot be denied.

【Key words】 Varicocele; Ferroptosis; Testis; ROS; Nrf 2 pathways

铁死亡(Ferroptosis)是一种铁依赖性的程序性细胞死亡形式,该死亡方式依赖于细胞内铁和活性氧(Reactive oxygen species, ROS),以脂质过氧化为特征^[1]。铁死亡与多种疾病密切相关,很多领域都已经证实了细胞的铁死亡形式,如神经系统疾病、心血管系统疾病、消化系统疾病以及肿瘤等^[2],但是在生殖系统相关疾病的研究仍较为缺乏。精索静脉曲张(Varicocele, VC)是男科临床中的常见病、多发病,能够影响到睾丸的生精功能,导致精液质量下降,引起男性不育^[3]。目前 VC 导致男性生精功能下降的发病机制尚不清楚。Gholirad 等^[4]研究表明,由于血流减少和睾丸温度升高,VC 大鼠的睾丸中 ROS 含量升高,并沉积了过量的铁。基于这一观察结果,本研究推测 VC 可能引起大鼠睾丸中生精细胞铁死亡的增加从而导致了生精功能障碍。为了验证推测,本研究建立了实验性左侧精索静脉曲张(Experimental left varicocele, ELV)大鼠模型,通过检测铁死亡相关指标含量和相关调控蛋白的表达水平,探讨细胞铁死亡方式是否参与 ELV 睾丸损伤的病理过程。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 24 只 8 周 SD 大鼠(购于北京华阜康生物科技股份有限公司),SPF 级,体重 240~260 g,使用随机数字表法进行随机分组,手术 A 组和手术 B 组各 6 只,设假手术 A 组和假手术 B 组各 6 只作为对照。所有动物饲养在同样的标准环境中,自由进食、进水。本实验大鼠处理符合动物伦理要求,并经医院伦理委员会审核同意。

1.2 主要仪器与试剂 游标卡尺(日本三量);正置光学显微镜(日本尼康)、成像系统(日本尼康)。ROS 测定试剂盒(北京雅安达)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione peroxidase, GPX4)检测试剂盒(南京建成)、还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione, GSH)测定试剂盒(南京建成)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-PX)测定试剂盒(南京建成)。兔抗大鼠核转录相关因子 2(Nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)抗体(Cell Signaling Technology 公司)、

RIPA 裂解液(索莱宝)、30% 丙烯酰胺(索莱宝)、预染蛋白 marker(Thermo 公司)、PVDF 膜(Millipore 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 建立模型 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥(45 mL/kg)麻醉,腹部正中纵向切口,手术 A 组和手术 B 组参照 Turner^[5]经典造模方法,分离近下腔静脉的左肾静脉段,于左精索静脉和肾上腺静脉内侧、下腔静脉外侧置一直径约 0.8 mm 的改良后的金属杆,用 4-0 丝线将金属杆与左肾静脉一并结扎后拔出此杆,造成左肾静脉部分狭窄,同时将其余可见到的左侧睾丸静脉侧枝回流分离后完全结扎;假手术 A 组和假手术 B 组仅行左肾静脉分离但不结扎。术后动物连续 7 d 腹腔注射 20 万单位青霉素钠预防感染。

1.3.2 标本采集 假手术 A 组和手术 A 组于造模 2 周后进行取材,假手术 B 组和手术 B 组于造模 4 周后进行取材。取材时首先对大鼠进行腹腔麻醉,然后剖腹观察,使用游标卡尺测量左侧精索静脉直径,以左精索静脉比术前曲张 2 倍以上,且双侧肾脏无明显病变为选取标准,分别取出各组左侧睾丸。

1.3.3 HE 染色 取所有大鼠左侧睾丸组织,生理盐水冲洗,投入 10% 福尔马林液固定,石蜡包埋,制成切片。石蜡切片脱蜡至水,苏木素染色 3~5 min,盐酸水溶液分化,氨水水溶液返蓝,水洗;切片依次入 85%、95% 的梯度酒精脱水,入伊红染液中染色 5 min;伊红染色至橘红色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,在显微镜下观察各组大鼠左侧睾丸组织结构的病理改变。

1.3.4 睾丸组织 ROS、GSH、GSH-PX、GPX4 检测 将组织加入适量生理盐水捣碎。3000 转离心 10 min 取上清,制备组织匀浆。采用 ELISA 法测定 ROS、GPX4 浓度,分光光度法测定 GSH 活性,比色法测定 GSH-PX 活性,均严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.5 Western Blot 检测睾丸组织中 Nrf2 蛋白表达 把组织剪切成细小的碎片,裂解液充分裂解,用玻璃匀浆器抽提总蛋白;制备 SDS-PAGE 胶,电泳分离

目的蛋白,转膜后封闭 1 h,加入兔抗大鼠 Nrf2 抗体,4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤,加入辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤,最后以 ECL 显色,凝胶成像系统下扫描拍照,以 β -actin 为对照,运用 Image J 软件测定每个样本蛋白条带灰度值,并计算其与 β -actin 条带灰度值之比,以其比值作为 Nrf2 蛋白表达水平。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 ELV 情况比较 手术 A 组和手术 B 组共 12 只 SD 大鼠经深度麻醉处死后,均见左侧精索静脉扩张且左肾无萎缩,测量两组精索静脉直径与相对应的假手术 A 组和假手术 B 组对比均具有统计学意义($P < 0.05$),提示建模成功。假手术 A 组和假手术 B 组则均未见左侧精索静脉扩张,左肾亦未见萎缩。见表 1。

表 1 各组大鼠左侧精索静脉直径比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Diameter of left spermatic vein of each group of rats

组别	<i>n</i>	精索静脉直径(mm)
假手术 A 组	6	0.17 \pm 0.05
手术 A 组	6	0.89 \pm 0.07 ^①
假手术 B 组	6	0.18 \pm 0.04
手术 B 组	6	1.12 \pm 0.11 ^②

注:与假手术 A 组相比,① $P < 0.05$;与假手术 B 组相比,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠左侧睾丸形态学变化比较 假手术 A 组和假手术 B 组大鼠左侧睾丸生精小管形态正常,各级生精细胞排列整齐,层次分明,结构清晰,管腔完整,精子释放好,管腔内见大量精子,支持细胞形态良好,间隙较紧密。手术 A 组大鼠左侧睾丸生精小管基膜损伤、变薄,各级生精细胞排列紊乱,管腔有脱落的生精细胞,管腔间隙增大,管腔内精子数量减少,支持细胞形态欠佳。手术 B 组大鼠左侧睾丸生精小管界膜增厚、褶皱,基膜变薄,生精细胞排列紊乱,各级生精细胞和支持细胞广泛脱落,精子细胞发育不良,精子生产低下,管腔内精子少见,支持细胞形态萎缩。见图 1。

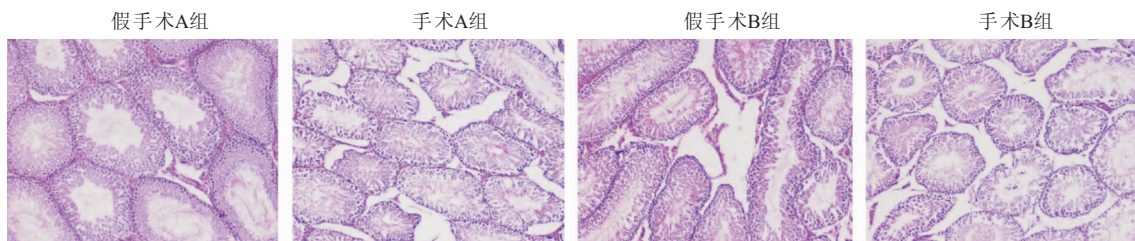


图 1 大鼠左侧睾丸组织形态学改变比较(HE 100 \times)

Figure 1 Comparison of histomorphological changes of left testis in rats

2.3 各组大鼠左侧睾丸组织中 ROS、GSH-PX、GPX4 检测结果比较 与相对应的假手术 A 组和假手术 B 组相比,手术 A 组和手术 B 组大鼠左侧睾丸组

织中 ROS 浓度均明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但 GSH、GSH-PX 活性与 GPX4 浓度均变化不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

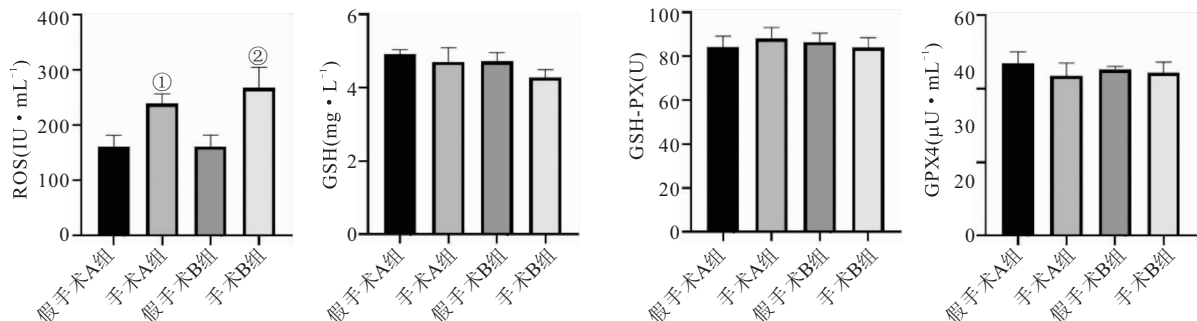


图 2 大鼠左侧睾丸组织中 ROS、GSH、GSH-PX、GPX4 检测结果比较

Figure 2 Comparison of detection results of ROS, GSH, GSH-Px and GPx4 in left testicular tissue of rats

注:与假手术 A 组相比,① $P < 0.05$;与假手术 B 组相比,② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠左侧睾丸组织中 Nrf2 蛋白表达比较 与相对应的假手术 A 组和假手术 B 组相比,手术 A

组和手术 B 组大鼠左侧睾丸组织中 Nrf2 蛋白变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

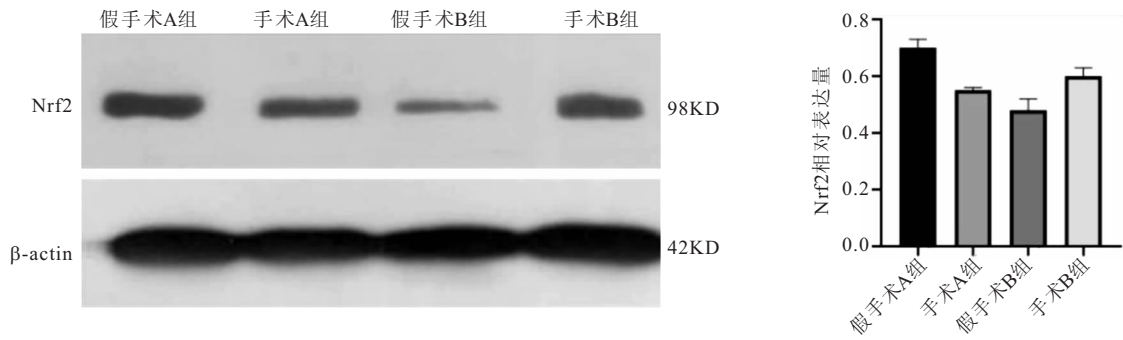


图 3 大鼠左侧睾丸组织中 Nrf2 蛋白表达情况
Figure 3 Nrf2 protein expression in left testis of rats

3 讨论

世界卫生组织将 VC 列为男性不育的首要原因，目前研究发现 VC 的睾丸中广泛存在氧化应激现象^[6]。氧化应激是指 ROS 和抗氧化剂水平失衡。ROS 是一类具有高度活性的含氧基团，是细胞代谢过程中产生的副产物，包括过氧化氢、超氧化物、羟基、一氧化氮和二氧化氮等。生理条件下机体可产生一定程度的受控的 ROS，这些 ROS 不仅对维持细胞代谢正常的环境非常重要，而且在精子成熟过程中起重要作用，如精子的获能和顶体反应，同时精浆内还存在着超氧化歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽氧化还原酶等对抗活性氧的酶清除系统，在生理情况下 ROS 的产生与对抗活性氧的酶清除系统处于一种动态平衡，维持着正常的生精过程^[7]。如果这种平衡被破坏，则会导致氧化应激，过量的 ROS 可通过直接氧化损伤精子的质膜，导致生精细胞或精子 DNA 单链或双链破坏、断裂，DNA 完整性受损，生精细胞也受到损伤，引起不育或发生胚胎缺陷^[8]。多位学者研究^[9-10]均发现 VC 时睾丸中的 ROS 明显升高，且与其严重程度呈正比。本实验结果也证实了这一点，与相对应的假手术 A 组和假手术 B 组相比，手术 A 组和手术 B 组 ROS 含量均明显升高，说明 VC 形成后精索静脉曲张大鼠睾丸内氧化与抗氧化系统失衡，氧化应激可能被激活。

氧化应激可以启动不同的细胞死亡途径，如凋亡、坏死以及铁死亡^[11]。铁死亡是细胞死亡的一种独特的调节机制，和其他形式的细胞死亡形式不同，它的典型特征是铁依赖的脂质活性氧增加^[12]。谷氨酸-胱氨酸转运体(System Xc⁻)/GSH/GPX4 轴是哺乳动物体内主要的抗氧化系统之一，被认为在防止脂质过氧化介导的铁死亡中起着重要作用^[13]。System Xc⁻能够高度特异性摄取胱氨酸，然后被 GSH 或硫氧还蛋白还原酶 1 还原为半胱氨酸，半胱氨酸反过来能够合成 GSH^[14]。GSH 是重要的抗氧化剂，它可清除超

氧根离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、过氧化物(LOOH)。GSH-PX 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶，它能够特异的催化 GSH 对过氧化氢的还原反应^[15]。GSH 是 GPX4 蛋白的辅助因子和合成底物，是 GPX4 蛋白发挥脂质修复功能所必需的^[16]。GPX4 是铁死亡的关键调节因子，它是一种脂质修复酶，在产生脂质信使分子通路中发挥重要作用，主要负责降解脂质过氧化物，移除有毒性的中间产物，通过将脂质过氧化物转化为无毒脂质来抵抗铁和氧依赖性的脂质过氧化^[17]。GPX4 的表达受 Nrf2 的调节，Nrf2 是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子，具有抗炎、抗癌、维持细胞氧化还原平衡等功能^[18]。本研究结果显示，与相对应的假手术 A 组和假手术 B 组相比，手术 A 组和手术 B 组 Nrf2 蛋白表达、GSH 和 GSH-PX 活性以及 GPX4 浓度均无统计学意义，在两手术组中均没有发现和铁死亡相关的 System Xc⁻/GSH/GPX4 轴抗氧化系统的明显变化，说明暂时不能确定 VC 睾丸中生精细胞存在铁死亡的形式，氧化应激引起的生精功能障碍可能和细胞其他的死亡方式有关。

综上所述，虽然本研究实验结果为阴性，无法得出 VC 睾丸中生精细胞存在铁死亡的形式，但是仍然不能确切的否认其存在的可能。首先铁死亡过程不仅受 System Xc⁻/GSH/GPX4 轴影响，还受铁代谢途径、p53/SAT1/ALOX15 通路、转录激活因子 4(ATF4)等调控^[19-22]，而本实验研究中检测调控铁死亡相关途径的敏感基因有限，除了 Nrf2、GSH、GSH-PX、GPX4 外，铁死亡抑制蛋白 1(FSP1)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)等^[23]其他相关的调控基因都没有得到检测，而且仅测了 Nrf2 的蛋白表达，其他指标的蛋白表达也没有检测。其次可能和 VC 形成的时间有一定的关系，在 VC 形成过程中睾丸并不均匀地受到应激反应的影响，虽然一些睾丸区域受到严重影响，导致生精小管破坏、精子生成停滞，但睾丸的其他

部分可能受到的损害较小,仍然能够支持精子生成^[24],在这种情况下,睾丸损伤区域的分子变化有可能被轻度损伤区域所弥补,可能会掩盖铁死亡经典分子标志物的检测。这也解释了为什么临床中只一部分 VC 患者可以生育,而有的患者却不能生育。未来在实验条件允许的情况下,希望能够进一步完善铁死亡相关蛋白的检测,深入探讨睾丸生精细胞铁死亡的形式。

4 结论

精索静脉曲张睾丸中活性氧含量增加,氧化应激可能被激活,但是否启动了铁死亡的细胞死亡方式目前仍不能确定,尚需进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 赵玉萍,沈俊,余静梅,等.铁自噬与铁死亡在中枢神经系统疾病中的研究进展[J].西部医学,2021,33(5):776-780.
- [2] CHEN J, YANG X, FANG X, *et al.* The role of ferroptosis in chronic diseases[J]. Journal of Zhejiang University(Medical Sciences), 2020, 49(1): 44-57.
- [3] 邓春华,商学军.精索静脉曲张诊断与治疗中国专家共识[J].中华男科学杂志,2015,21(11):1035-1042.
- [4] GHOLIRAD S, RAZI M, HASSANI BAFRANI H. Tracing of zinc and iron in experimentally induced varicocele: correlation with oxidative, nitrosative and carbonyl stress[J]. Andrologia, 2017, 49(6): 1-11.
- [5] TURNER T T. The study of varicocele through the use of animal models[J]. Hum Reprod Update, 2001, 7(1): 78-84.
- [6] 陈渝龙,梁培禾.精索静脉曲张与男性不育的研究进展[J].世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2020, 20(60):41-43,49.
- [7] 朱少明,程帆.精索静脉曲张致男性不育的研究进展[J].疑难病杂志,2017,16(6):634-639.
- [8] AGARWAL A, MAKKER K, SHARMA R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update[J]. AM J Reprod Immunol, 2008, 59(1): 2-11.
- [9] 刘冰,杜宝昕,郑军状,等.通精灵对精索静脉曲张合并肝气郁结证大鼠生精细胞活性氧含量及线粒体功能的影响[J].中华男科学杂志,2018,24(11):1021-1028.
- [10] 符浩,宋汶珂,凌晓辉,等.精索静脉曲张不育患者氧化应激水平和精子 DNA 完整性及精液参数的相关性分析[J].中华男科学杂志,2016,22(6):530-533.
- [11] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [12] 钟桂玲,李文祥,王贺,等.普罗布考经 NRF2/Gpx4 途径抑制铁死亡保护 H9C2 心肌细胞[J].广西医科大学学报,2021,38(3): 462-467.
- [13] SEIBT T M, PRONRTH B, CONRAD M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 144-152.
- [14] MANDAL P K, SEILER A, PERISIC T, *et al.* System x(c)- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency[J]. J Biol Chem, 2010, 285(29): 22244-22253.
- [15] 吕广明,王艳杰,刘瑞,等.纳米氧化铈的抗氧化生物应用[J].中国科学:化学,2013,43(10):1309-1321.
- [16] VUCKOVIĆ A M, VENERANDO R, TIBALDI E, *et al.* Aerobic pyruvate metabolism sensitizes cells to ferroptosis primed by GSH depletion[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 167: 45-53.
- [17] SEILER A, SCHNEIDER M, FÖRSTER H, *et al.* Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death[J]. Cell Metab, 2008, 8(3): 237-248.
- [18] 蒋越,蒙帅杰,王权胜,等.基于 Nrf2/HO-1 通路的加味大黄虫庶虫颗粒对精索静脉曲张模型大鼠附睾生精细胞凋亡的影响[J].中华男科学杂志,2021,27(3):240-248.
- [19] 马苗,柴克霞.GPx4 在铁死亡中的作用及其与疾病相关性的研究进展[J].中国临床研究,2021,34(5):681-684.
- [20] 黄成丽,林芳荣,李根,等.青蒿素衍生物 DHA/ARTS 诱导肾癌细胞系 786-0 发生铁死亡的机制[J].西部医学,2022,34(2): 178-184.
- [21] SEHM T, RAUH M, WIENDIECK K, *et al.* Temozolomide toxicity operates in a xCT/SLC7a11dependent manner and is fostered by ferroptosis [J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 74630-74647.
- [22] CHEN D, FAN Z, RRUH M, *et al.* ATF4 promotes angiogenesis and neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner[J]. Oncogene, 2017, 36(40): 5593-5608.
- [23] 吴昊霖,徐怡倩,方星悦,等.调节性铁死亡敏感相关基因研究进展[J].海南医学院学报:1-16[2021-06-17].
- [24] AGARWAL A, SHARMA R K, DESAI N R, *et al.* Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility[J]. Urology, 2009, 73(3): 461-469.

(收稿日期:2022-01-18;修回日期:2022-09-14;编辑:刘灵敏)