

烟草烟雾通过激活 ROS/NLRP3 信号通路加重 Sertoli-生精细胞损伤研究

王硕敏,胡一凡,周炳贤,范世恒,吴祺晟,范雅妍,卢春芸,于德娥,张静

摘要 目的 基于 ROS/NLRP3 信号通路探讨烟草烟雾暴露所致 Sertoli-生精细胞损伤的作用机制。方法 体外培养大鼠 Sertoli-生精细胞,分为对照组(A组)、烟草烟雾提取物(CSE)处理组(B组)和 CSE + NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 组(C组)。CCK-8 法检测细胞存活率,乳酸脱氢酶(LDH)判断细胞膜受损情况,活性氧(ROS)判断氧化应激水平,Hoechst/PI 双染检测细胞焦亡水平,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)测定 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关微粒蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)、消皮素 D(GSDMD)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-18(IL-18)mRNA 表达水平,Western blot 检测细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平。结果 CSE 组 Sertoli-生精细胞存活率显著下降($P < 0.001$),LDH 漏出率显著增加($P < 0.001$),ROS 生成显著增加($P < 0.001$);与 CSE 组比较,CSE + MCC950 组 Sertoli-生精细胞存活率升高($P < 0.001$),LDH 漏出率降低($P < 0.01$),ROS 生成显著降低($P < 0.001$)。对照组 Sertoli-生精细胞仅见少量 PI 染色细胞,CSE 组 PI 染色细胞明显增多,CSE + MCC950 组 PI 染色细胞数量低于 CSE 组。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,CSE 组 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 和蛋白质表达水平均显著升高($P < 0.001$),CSE + MCC950 组表达水平均显著降低($P < 0.01$)。结论 烟草烟雾暴露可导致 Sertoli-生精细胞氧化应激和损伤,其机制可能与 ROS/NLRP3 信号通路激活有关。

关键词 烟草烟雾;NLRP3;ROS;焦亡;Sertoli-生精细胞

中图分类号 R 114

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1557-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.020

烟草中含有 4 000 多种化学物质,其中许多物质可以改变男性性激素水平,使睾丸组织中活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)水平升高,产生氧

化应激反应,影响精子生成、精液参数及精子 DNA 完整性,导致精液质量下降^[1]。氧化应激产生的 ROS 可激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体产生炎症反应^[2]。适度的 NLRP3 炎症小体激活有助于快速而有效地清除病原体,但持续过度地激活将对机体产生损伤,甚至导致细胞焦亡^[3,4]。细胞焦亡(pyroptosis),又称细胞炎性坏死,是一种由炎症小体引发的程序性死亡方式。烟草烟雾暴露可能导致 Sertoli-生精细胞产生氧化应激从而激活 NLRP3 炎症小体,导致半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(cysteinyl aspartate specific protease-1, Caspase-1)活化^[5,6],Caspase-1 通过对消皮素(Gasdermin D,GSDMD)的切割是驱动细胞焦亡发生的关键因素。活化的 Caspase-1 可使无活性的促炎因子前体裂解为有活性的白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)和白细胞介素-18(interleukin-18,IL-18),使机体产生一系列的反应。因此,通过减少烟草烟雾暴露,调控氧化应激途径而减少细胞损伤可能是防治 Sertoli-生精细胞损伤的重要途径。但目前对烟草烟雾可能通过 ROS/NLRP3 信号通路激活 NLRP3 炎症小体诱导细胞焦亡造成 Sertoli-生精细胞损伤的研究较少。拟通过体外染毒和干预实验,检测烟草烟雾暴露对 Sertoli-生精细胞的影响,探究 ROS/NLRP3 信号通路在 Sertoli-生精细胞损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂和仪器

1.1.1 实验动物 湖北省实验动物研究中心购入 SPF 级 4 周龄雄性 SD 大鼠,动物合格证号:SCXK(鄂)2020-0018。本实验已取得海南医学院伦理委员会审批(批号:HYLL-2021-104)。

试剂:DMEM/F-12 培养基(货号:SH30023;厂家:上海 HyClone);CCK-8 检测试剂盒(批号:C0038,上海碧云天生物技术有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(批号:A020-2,南京建成);活

2023-08-19 接收

基金项目:2021 年海南省自然科学基金项目(编号:821RC564)

作者单位:海南医学院公共卫生与全健康国际学院,海口 571199

作者简介:王硕敏,女,硕士研究生;

于德娥,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:yudee@hainmc.edu.cn;

张静,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhangjing@hainmc.edu.cn

性氧(ROS)检测试剂盒(批号:S0033,上海 Beyotime);Hoechst33342(批号:B8040,北京 Solarbio);PI(批号 ST511,上海碧云天);抗荧光淬灭封片剂(DABCO)(批号:V900155-25G,美国 Sigma);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号:AS1012,武汉 ASPEN);BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(批号:AS1086,武汉 ASPEN);ECL 化学发光检测试剂盒(批号:AS1059,武汉 ASPEN);蛋白 Marker(批号:26616,美国 Thermo);NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)兔单克隆抗体(批号:DF7438,美国 Affinity);凋亡相关微粒蛋白(ASC)兔单克隆抗体(批号:DF6304,美国 Affinity);胱冬肽酶-1(anti-caspase-1 antibody)兔单克隆抗体(批号:AF5418,美国 Affinity);白细胞介素-1 β (IL-1 β)兔单克隆抗体(批号:bs-20449R,北京 BIOSS);白细胞介素-18(IL-18)兔单克隆抗体(批号:ab191860,英国 abcam);GAPDH 兔单克隆抗体(批号:ab181602,英国 abcam);山羊抗兔二抗(批号:AS1107,武汉 ASPEN);山羊抗小鼠二抗(批号:AS1106,武汉 ASPEN);兔抗山羊二抗(批号:AS1108,武汉 ASPEN);山羊抗大鼠二抗(批号:AS1093,武汉 ASPEN);兔抗绵羊二抗(批号:AS1245,武汉 ASPEN)。

1.1.2 仪器 CO₂ 恒温培养箱(型号 DR-200Bs,无锡 Diatek);酶标仪(型号 DR-200Bs,无锡 Diatek);倒置显微镜(型号 IX51,日本 OLYMPUS);流式细胞仪(型号 FACSAriaII,美国 BD);正置荧光拍照显微镜(型号 Eclipse Ci-L,日本 Nikon);成像系统(型号 MicroPublisher,加拿大 Q-IMAGING);PCR 仪(型号基因扩增仪 TC-XP,杭州博日科技);荧光定量 PCR 仪(型号 StepOne™ Real-Time PCR,美国 Life technologies);电泳仪(型号 DYY-6C,北京市六一仪器厂)。

1.2 Sertoli-生精细胞原代共培养体系制备 主要参考徐蕾蕊^[1]博士的方法,采用两步酶解法制备 Sertoli-生精细胞原代共培养体系。选择出生后 4 周龄的雄性 SD 大鼠,采用两步酶消化法制备 Sertoli-生精细胞原代共培养体系。4 周龄健康 SD 雄性大鼠颈椎脱臼法处死,用 75% 乙醇消毒皮肤,于超净台内无菌取出大鼠双侧睾丸,分别加入消化酶 I、消化酶 II,以小片段消化为在灯光下透亮的圆形单个细胞为准。加入 10% FBS 消化终止液,终止酶反应,200 目细胞筛过滤,除去不能消化的组织碎片。加入 10% 除菌液,制成单细胞悬液,加入 DMEM-F12 完全培养液制成单细胞悬液,10% 台盼蓝工作

液染色,计数细胞密度并计算细胞活力,只有细胞活力 > 95% 时,方可进行后续试验,调整细胞悬液的细胞密度为 10⁶ 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板(10⁵ 个/孔)和 6 孔细胞培养板(2 × 10⁶ 个/孔),37 °C,5% CO₂,95% 湿度的恒温培养箱内培养,每 24 h 换液一次。

1.3 细胞分组 取对数生长期细胞用于实验,将细胞分为 A、B、C 三组。A 组:空白对照组;B 组:烟草烟雾提取物(Cigarette smoke extract,CSE)处理组;C 组:CSE + NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950(5 μmol/L)干预组。

1.4 烟草烟雾提取物(CSE)制备 按照 Yunchao et al^[2]的方法并加以改良,一支去过滤嘴燃烧的某品牌烟草(烟气烟碱量 1.2 mg,焦油量 10mg,烟气一氧化碳量 12 mg)由负压吸引器连续抽吸,吸入的烟雾经出口通入 20ml PBS 液中形成悬液,悬液用 1mmol/L 的 NaOH 调至 pH7.4,经 0.22 μm 微孔过滤膜过滤形成 CSE 原液,配置好的 CSE 于 1 h 内用于实验。CSE 原液用无血清培养液稀释成所需浓度,公式为:CSE 浓度 = CSE 原液体积/总体积 × 100%。配制成 10% 的 CSE 用于实验。

1.5 CCK-8 法检测细胞存活率 将浓度为 2 × 10⁴ 个/ml 的细胞悬液按 100 μl/孔接种于 96 孔板中,置于 CO₂(5%)培养箱中 37 °C 下培养 24 h 以贴壁。细胞分组同上。继续培养 24 h 分别更换为 100 μl 细胞样品各自对应的含有一定浓度药物的培养基,对照组更换为含溶剂的培养基后,所有孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,孵育 4 h 后,使用酶标仪测定 450nm 光吸收值(A_{450 nm})。细胞存活率(%) = (实验组 A_{450 nm} - 空白组 A_{450 nm}) / (细胞对照组 A_{450 nm} - 空白组 A_{450 nm}) × 100%。实验重复 5 次。

1.6 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)判断细胞膜受损情况 将原代细胞以 10⁵ 个/孔的密度接种到 24 孔板中,置于 34 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养,以 0.1% DMSO 作为对照组,水样皆用 DMEM 培养基稀释至含量为 0.1%,以 500 μl/孔的量对细胞染毒。37 °C,5% CO₂ 饱和湿度下分别培养 6、12 和 18 h,离心后收集上清液,进行细胞外 LDH 测定。剩余细胞中加入混有 tritonX-100 的培养液,置于 34 °C,5% CO₂ 培养箱继续孵育后,收集各管培养液上清测定细胞内 LDH,进而计算细胞外液中 LDH 活力。根据 LDH 检测试剂盒说明书操作流程,用酶标仪在 450 nm 波长下分别检测培养液和细胞匀浆的吸光度值(A_{450 nm})。LDH 漏出率

(%) = 培养液 A450 nm / (培养液 A450nm + 细胞匀浆 A450nm) × 100%。实验重复 3 次。

1.7 采用 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 胰酶消化收集细胞,离心去上清,用 0.5 ml 的无血清细胞培养液重悬细胞于 EP 管中。加入 0.5 μl 的 DCFH-DA 染色液,颠倒混匀数次。细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min,每隔 5 min 颠倒混匀一次。37 °C 孵育结束后,300g 4 °C 离心 3 ~ 4 min,沉淀细胞,弃上清。无血清培养基洗涤细胞 3 次:1780 r/min 4 °C 离心 3 ~ 4 min,沉淀细胞,弃上清。重悬细胞后上流式细胞仪分析,488 nm 激发,525 nm 发射。实验重复 3 次。

1.8 Hoechst/PI 双染检测细胞焦亡水平 将 Sertoli-生精细胞处理成密度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液,培养在 24 孔板(500 μl/孔)中,孔板中预先放入已无菌化处理细胞玻璃爬片,静置贴壁培养 24 h 后,弃去原培养基,按照实验计划分组进行处理。完成处理后,弃原培养基,PBS 轻柔清洗一遍。以下操作均在避光条件下进行:配置 Hoechst33342/PI 双染染料,37 °C 孵育 20 min,取出弃染液,PBS 轻柔清洗两遍,滴加 DAPI 染液(2.5 μg/ml)复染,室温下孵育 10 min,弃液,PBS 轻柔清洗两遍,甘油封片液封片,正置荧光显微镜镜下观察。实验重复 3 次。

1.9 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 测定 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 mRNA 表达水平 收集各组细胞,加入 1 ml TRIpure 溶液提取细胞 RNA,使用反转录试剂盒合成 cDNA。每个样品均作 3 个复孔,RT-qPCR 检测基因表达量。反应体系如下:2 × Master Mix 5.0 μl,引物工作液 1.0 μl,Template 1.0 μl,ddH₂O 2.0 μl,Rox1.0 μl。反应程序:95 °C,1 min 预变性;95 °C,15 s,58 °C,20 s,72 °C,45 s,共设置 40 个循环;循环结束后,60 °C 升温至 95 °C,每 20 s 升温 1 °C 获得溶解曲线。以磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因 mRNA 表达水平。实验重复 3 次。引物序列见表 1。

1.10 Western blot 法检测细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 蛋白表达水平 用 PBS 缓冲液润洗贴壁细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。保证每个样品总蛋白上样量均为 40 μg。将蛋白样品煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳

分离,转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。除去封闭液,加入稀释好的一抗 4 °C 过夜,然后加入稀释好的二抗,室温孵育 30 min。TBST 清洗后,滴加 ECL 混合溶液,暗室曝光,ImageJ 软件处理系统分析目标带的光密度值。以 GAPDH 作为内参,分别以目的蛋白与内参蛋白产物条带灰度值之比作为各蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR Sertoli-生精细胞中相关基因引物序列表

基因名称	引物序列(5'-3')
NLRP3	F:GGTGACCTTGTGTCTGCTTG R:ATGTCCTGAGCCATGGAAGC
ASC	F:GGACTCGTATGGCTTGGAGC R:CGTCCACTTCTGTGACCCTG
Caspase-1	F:TTATCAGGGTTGACCCCTTGG R:TTGCCCTCAGATCTTGTCCAG
GSDMD	F:TTGAGTGTCTGGTCTGCGAC R:ATGGGGTCTCTGTTCCAAG
IL-1β	F:GGTCAAGGCATAACAGGCTC R:TCTGGACAGCCCAAGTCAAG
IL-18	F:ACCTGTGGACTCTCAGACAAC R:AGCAGGCAGCTAGATTACC
GAPDH	F:AGTGCCAGCCTCGTCTCATA R:ATGAAGGGTCTGTGATGGC

1.11 统计学处理 使用 GraphPad Prism 7.00 和 Adobe Illustrator 2021 软件作图,SPSS 25.0 对数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对所有数据进行正态性和方差齐性检验,各组计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 烟草烟雾暴露对 Sertoli-生精细胞存活率的影响 Sertoli-生精细胞经 CSE 处理后,细胞存活率显著下降($P < 0.001$);与 B 组比较,NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 可使 Sertoli-生精细胞存活率升高($P < 0.001$)。见图 1 和表 2。

表 2 各组细胞存活率比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	样本量	细胞存活率
对照组	5	0.858 ± 0.012
烟草烟雾暴露组	5	0.413 ± 0.027***
烟草烟雾提取物 + MCC950 组	5	0.594 ± 0.020***###

与对照组比较:*** $P < 0.001$;与烟草烟雾暴露组比较:### $P < 0.001$

2.2 烟草烟雾暴露对 Sertoli-生精细胞 LDH 漏出

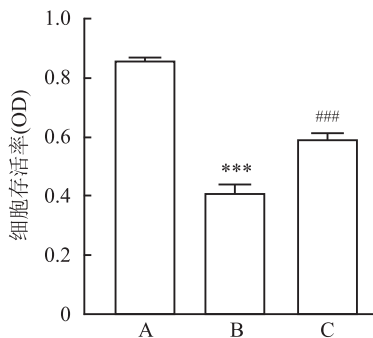


图1 各组细胞存活率比较 (n=5)

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与烟草烟雾暴露组比较:### $P < 0.001$

率的影响 经CSE处理12h和18h后,Sertoli-生精细胞LDH漏出率显著增加($P < 0.001$);与B组比较,NLRP3炎症小体抑制剂MCC950可使Sertoli-生精细胞LDH漏出率降低($P < 0.01$)。见图2和表3。

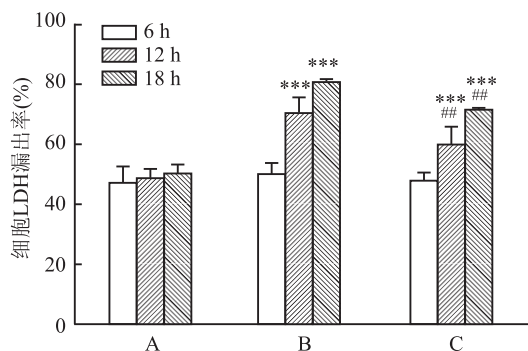


图2 各组细胞LDH漏出率比较 (n=3)

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与烟草烟雾暴露组比较:## $P < 0.01$

表3 各组细胞LDH漏出率比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

分组	样本量	LDH漏出率(%)		
		6 h	12 h	18 h
A	3	47.574 ± 4.205	48.983 ± 2.263	50.364 ± 2.307
B	3	50.285 ± 2.856	70.687 ± 4.118 (***)	80.918 ± 0.708 (***)
C	3	48.083 ± 1.982	60.321 ± 4.679 (***)	71.838 ± 0.333 (***)

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与烟草烟雾暴露组比较:## $P < 0.05$,### $P < 0.01$

2.3 烟草烟雾暴露对Sertoli-生精细胞ROS生成的影响 经烟草烟雾提取物处理后,Sertoli-生精细胞ROS生成显著增加($P < 0.001$);与烟草烟雾暴露组比较,NLRP3炎症小体抑制剂MCC950可使Sertoli-生精细胞ROS生成降低($P < 0.001$)。见

图3。

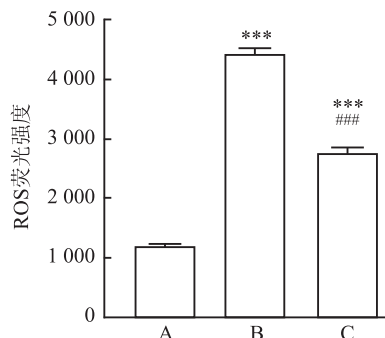


图3 各组细胞荧光强度比较 (n=3)

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与烟草烟雾暴露组比较:### $P < 0.001$

2.4 Hoechst/PI荧光染色检测细胞焦亡 A组Sertoli-生精细胞仅见少量PI染色细胞,B组PI染色细胞明显增多,C组PI染色细胞数量低于烟草烟雾暴露组。见图4。

2.5 实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 测定NLRP3、ASC、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18 mRNA水平 与A组比较,B组($F = 653.812, P < 0.001$; $F = 271.392, P < 0.001$; $F = 589.684, P < 0.001$; $F = 112.473, P < 0.001$; $F = 148.472, P < 0.001$; $F = 236.880, P < 0.001$)和C组($F = 184.991, P < 0.001$; $F = 136.000, P < 0.001$; $F = 203.798, P < 0.001$; $F = 78.421, P < 0.001$; $F = 135.623, P < 0.001$; $F = 111.167, P < 0.001$)Sertoli-生精细胞中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18 mRNA表达水平显著升高;与B组相比较,NLRP3炎症小体抑制剂MCC950可使Sertoli-生精细胞中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18 mRNA表达水平显著降低($F = 83.592, P < 0.001$; $F = 46.804, P < 0.001$; $F = 48.632, P < 0.001$; $F = 26.690, P < 0.001$; $F = 39.079, P < 0.001$; $F = 28.050, P < 0.001$)。见图5和表4。

2.6 Western blot法检测细胞NLRP3、ASC、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18蛋白表达水平 与A组相比较,B组Sertoli-生精细胞中NLRP3、ASC、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18表达水平显著升高($F = 121.160, P < 0.001$; $F = 56.503, P < 0.001$; $F = 127.051, P < 0.001$; $F = 139.953, P < 0.001$; $F = 53.395, P < 0.001$; $F = 62.246, P < 0.001$),C组Sertoli-

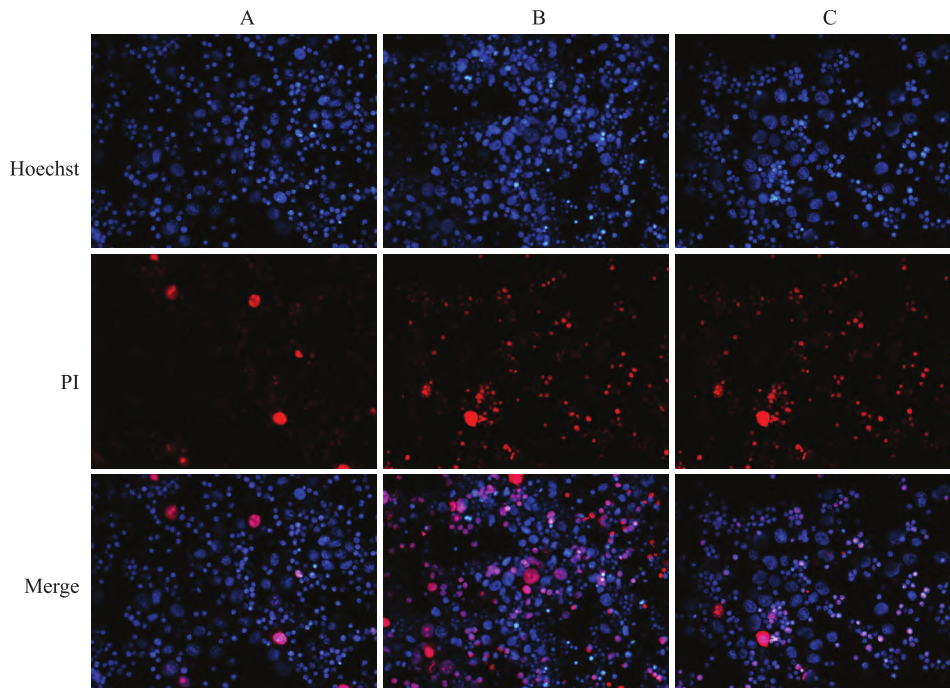


图4 Sertoli-生精细胞的免疫荧光 ×400

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950 组

表4 各组细胞 mRNA 表达水平比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

分组	mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)					
	NLRP3	ASC	GSDMD	Caspase-1	IL-1 β	IL-18
A	0.95 ± 0.04	0.94 ± 0.08	1.02 ± 0.03	1.04 ± 0.21	1.15 ± 0.13	1.05 ± 0.11
B	2.75 ± 0.11 ***	3.1 ± 0.21 ***	3.21 ± 0.16 ***	4.06 ± 0.45 ***	3.53 ± 0.31 ***	2.8 ± 0.16 ***
C	1.9 ± 0.12 ***###	2.07 ± 0.15 ***###	2.33 ± 0.15 ***###	2.58 ± 0.22 ***###	2.33 ± 0.12 ***###	2.13 ± 0.15 ***###

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950 组;与对照组比较:*** P < 0.001;与烟草烟雾暴露组比较:### P < 0.001

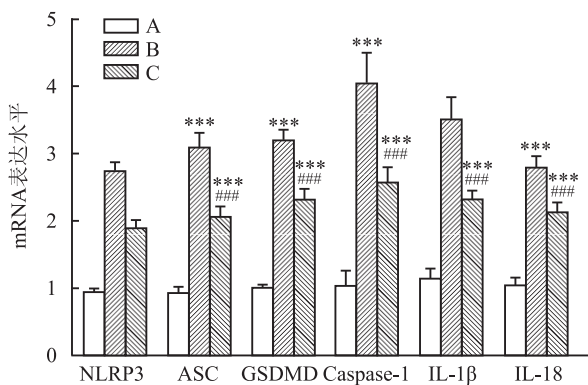


图5 各组细胞 mRNA 表达水平比较 (n=3)

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950 组;与对照组比较:*** P < 0.001;与烟草烟雾暴露组比较:### P < 0.001

生精细胞中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 表达水平显著升高 ($F = 38.370, P < 0.01; F = 70.922, P < 0.001; F = 13.687, P < 0.01; F = 7.760,$

$P < 0.05; F = 16.712, P < 0.05$);与 B 组相比较,C 组 Sertoli-生精细胞中 NLRP3、ASC、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 表达水平显著降低 ($F = 23.058, P < 0.001; F = 13.213, P < 0.01; F = 25.756, P < 0.001; F = 18.109, P < 0.01; F = 30.595, P < 0.01; F = 16.956, P < 0.01$)。见图 6 和表 5。

3 讨论

据报道^[7],尼古丁可通过介导 ROS 激活内皮细胞内 NLRP3 炎症小体产生活化的 Caspase-1,增加 IL-1 β 释放,促进内皮细胞焦亡。烟草烟雾成分可使线粒体功能失调释放 ROS,从而激活 NLRP3 炎症小体^[8]。男性生殖道的慢性炎症状态可能直接损害精子发生,甚至与男性生育能力低下有关^[9]。通过睾丸注射脂多糖建立的小鼠睾丸炎模型研究中发现睾丸炎可能与 NLRP3 炎症小体的激活有关^[10]。

表5 各组 Sertoli-生精细胞相关蛋白表达水平比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	Protein levels					
	NLRP3	ASC	GSDMD	Caspase-1	IL-1 β	IL-18
A	0.11 \pm 0.03	0.22 \pm 0.05	0.12 \pm 0.04	0.09 \pm 0.04	0.22 \pm 0.10	0.07 \pm 0.01
B	0.59 \pm 0.07 ***	0.75 \pm 0.11 ***	0.69 \pm 0.08 ***	0.75 \pm 0.09 ***	0.84 \pm 0.11 ***	0.49 \pm 0.09 ***
C	0.33 \pm 0.06 ***###	0.41 \pm 0.12##	0.42 \pm 0.05 ***###	0.38 \pm 0.13 ***##	0.42 \pm 0.08 ***##	0.22 \pm 0.06 ***##

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950 组;与对照组比较:***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05;与烟草烟雾暴露组比较:###P<0.001, ##P<0.01, #P<0.05

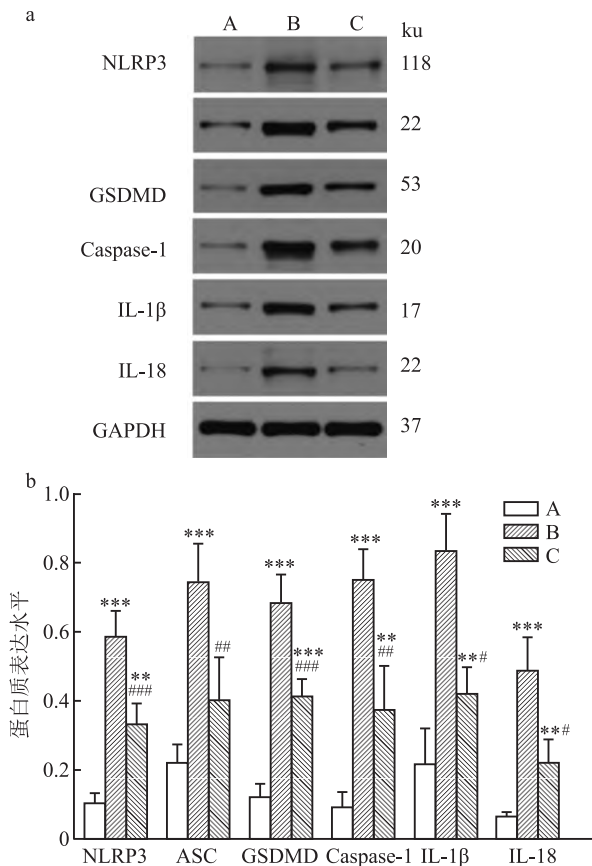


图6 各组 Sertoli-生精细胞相关蛋白表达水平 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

A:对照组;B:烟草烟雾暴露组;C:烟草烟雾提取物 + MCC950 组;与对照组比较:***P<0.001, **P<0.01;与烟草烟雾暴露组比较:###P<0.001, ##P<0.01, #P<0.05

IL-1 β 和 IL-18 是经典细胞焦亡途径产生的促炎细胞因子,也是目前研究最广泛的细胞因子^[11]。在机体的慢性炎症阶段,NLRP3 炎症小体不断处于过度激活状态,持续活化的 Caspase-1 促使巨噬细胞和树突状细胞释放 IL-1 β 和 IL-18,而大量的促炎介质如 IL-1 β 又可导致并维持细胞炎症的发生和发展^[12]。该研究表明,NLRP3 和 Caspase-1 在烟草烟雾暴露组中上调,抑制 NLRP3 和 Caspase-1 的表达具有保护生精细胞的作用。与此同时,NLRP3 上调会导致促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 表达增加^[13],表明 NLRP3 炎症小体及其下游的炎症因子在烟草

烟雾所致的 Sertoli-生精细胞损伤中起到关键作用。该研究发现,烟草烟雾暴露组的 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 和蛋白质表达水平均高于对照组,CSE + MCC950 组的 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 和蛋白质表达水平均低于烟草烟雾暴露组,说明烟草烟雾暴露可使 Sertoli-生精细胞发生炎症损伤,有效的抑制 NLRP3 炎症小体激活可能避免 Sertoli-生精细胞的损伤。

机体氧化损伤产生的 ROS 是重要的炎症介质,参与细胞损伤和细胞焦亡。据报道^[14],男性睾丸组织中 ROS 水平上调,促炎介质生成增加,加重精子的损伤。本次研究发现,烟草烟雾暴露可使 Sertoli-生精细胞的 ROS 生成增加,因此可通过降低 Sertoli-生精细胞 ROS 的生成来减轻细胞损伤。据报道^[15],NLRP3 的表达受 ROS 的调控,抑制 ROS 可降低 NLRP3 及其下游炎症因子的生成。本次研究发现,烟草烟雾暴露组的 ROS 生成均高于对照组,CSE + MCC950 组的 ROS 生成均低于烟草烟雾暴露组,说明有效的抑制 ROS 可避免 Sertoli-生精细胞的氧化应激水平。

细胞膜损伤是细胞焦亡的基本特征,LDH 是糖酵解过程中一种重要的酶,任何原因引起的细胞膜损伤均可导致 LDH 的溢出,因此可以利用细胞外 LDH 含量来判断细胞膜受损状况。本次研究发现,烟草烟雾可使 Sertoli-生精细胞的细胞膜受损。烟草烟雾暴露 12h 和 18h 后,LDH 漏出率明显升高,抑制剂组的 LDH 漏出率明显降低。

Hoechst33342 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,PI 染料是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,可穿过破损的细胞膜对细胞核进行染色。Hoechst33342/PI 双染可区别三类细胞群,即正常细胞低蓝色/低红色 (Hoechst33342 + /PI +)、凋亡细胞高蓝色/低红色 (Hoechst33342 + + /PI +)、坏死细胞 (Hoechst33342 + /PI + +)。Hoechst/PI 荧光图显示对照组 Sertoli-生精细胞仅见少量 PI 染色细胞,

烟草烟雾暴露组 PI 染色细胞明显增多, NLRP3 抑制剂 MCC950 处理组 PI 染色细胞低于烟草烟雾暴露组。说明烟草烟雾暴露可使 Sertoli-生精细胞发生焦亡。

该研究结果显示, 在烟草烟雾处理的 Sertoli-生精细胞中, ROS、NLRP3、ASC、Caspase-1 以及 IL-1 β 和 IL-18 的表达均显著升高; 而加入 NLRP3 抑制剂 MCC950 后, Sertoli-生精细胞中 ROS、NLRP3、ASC、Caspase-1 以及 IL-1 β 和 IL-18 的表达均显著降低。这些结果表明, 烟草烟雾暴露可以激活 ROS/NLRP3 信号通路, 导致 Sertoli-生精细胞炎症损伤和细胞焦亡。综上所述, 烟草烟雾暴露可以导致 Sertoli-生精细胞的损伤, 其机制可能与 Sertoli-生精细胞氧化应激并激活 NLRP3 炎症小体有关, 可通过减少或避免烟草烟雾暴露, 减少 Sertoli-生精细胞的氧化应激, 有效的预防及保护 Sertoli-生精细胞的损伤, 减少男性不育的发生。

参考文献:

- [1] Parameswari R, Sridharan T B. Cigarette smoking and its toxicological overview on human male fertility—a prospective review [J]. *Toxin Reviews*, 2019, 40(2): 145–61.
- [2] Shen S, He F, Cheng C, et al. Uric acid aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury via ROS/NLRP3 pyroptosis pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110990.
- [3] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [4] Ding J, Shao F. Growing a gasdermin pore in membranes of pyroptotic cells [J]. *Embo J*, 2018, 37(15): e100067.
- [5] 徐蕾蕊. 氟络草酮睾丸毒性及其机制研究 [D]. 复旦大学, 2014.

- [6] Su Y, Han W, Giraldo C, et al. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(5): 819–25.
- [7] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 171.
- [8] Wang Y, Shi P, Chen Q, et al. Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(12): 1069–82.
- [9] Fan W, Xu Y, Liu Y, et al. Obesity or overweight, a chronic inflammatory status in male reproductive system, leads to mice and human subfertility [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 1117.
- [10] Cao Y, Xie H S, Yu W J, et al. Testicular injection of lipopolysaccharide: An effective method for establishing the mouse model of orchitis [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2019, 25(8): 675–80.
- [11] 胡纯, 吴小燕. 糖尿病肾病炎症发生机制及治疗研究进展 [J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46(5): 618–24.
- [12] 陈杰, 毛弈友, 陈卓, 等. II 型炎症在慢性鼻窦炎伴鼻息肉中的作用机制和治疗进展 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2020, 55(10): 993–7.
- [13] Cristina de Brito Toscano E, Leandro Marciano Vieira É, Boni Rocha Dias B, et al. NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are up-regulated in patients with mesial temporal lobe epilepsy and may contribute to overexpression of caspase-1 and IL- β in sclerotic hippocampi [J]. *Brain Res*, 2021, 1752: 147230.
- [14] Tavalae M, Rahmani M, Drevet J R, et al. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation in spermatogenesis and male infertility; a systematic review [J]. *Basic Clin Androl*, 2022, 32(1): 8.
- [15] Gong C, Yang L, Liu K, et al. Effects of antibiotic treatment and probiotics on the gut microbiome of 40 infants delivered before term by cesarean section analysed by using 16S rRNA quantitative polymerase chain reaction sequencing [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e928467.

Cigarette smoke aggravates sertoli/spermatogenic cells damage by activating the ROS/NLRP3 signaling pathway

Wang Shuomin, Hu Yifan, Zhou Bingxian, Fan Shiheng, Wu Qisheng, Fan Yayan, Lu Chunyun, Yu Dee, Zhang Jing
(*International School of Public Health and One Health, Hainan Medical University, Haikou 571199*)

Abstract Objective To investigate the mechanism of sertoli/spermatogenic injury induced by cigarette smoke extract (CSE) based on ROS/NLRP3 signaling pathway. **Methods** The sertoli/spermatogenic of rat were cultured in vitro, and they were divided into control group, cigarette Smoke extract (CSE) group and CSE + NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 group. Cell viability was detected by CCK-8 assay; Lactate dehydrogenase (LDH) was used to detect cell membrane damage; reactive oxygen species (ROS) production was used to detect oxidative stress level; Hoechst/PI fluorescent staining was used to detect cell pyroptosis. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to determine the mRNA level of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18. Western

LncRNA SNHG16 通过调控 miR-195-5p/MYB 促进胃癌细胞增殖及迁移

康娟¹, 贺娇², 任伟宏²

摘要 **目的** 探讨 LncRNA SNHG16(SNHG16)对胃癌细胞增殖、迁移的影响及其分子调控机制。**方法** 基于在线数据库检索 SNHG16 在胃癌组织中的表达情况并筛选 SNHG16 的下游靶基因。通过生物信息学方法分析、双荧光素酶报告基因实验验证 SNHG16 与 miR-195-5p 间相互作用关系。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SNHG16、miR-195-5p 和 MYB 在胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)中的表达情况;敲低 SNHG16 检测 miR-195-5p 或 MYB 表达;过表达 miR-195-5p 检测 MYB 表达;蛋白质印迹分析(Western blot)检测各组中 MYB 的蛋白表达水平。敲低 SNHG16 或过表达 miR-195-5p,通过细胞增殖及划痕实验分别检测胃癌细胞(HGC-27、MKN-28)增殖及迁移能力。**结果** LncRNA SNHG16 在胃癌组织及胃癌细胞(HGC-27、MKN-28、MKN-45、NCI-N87)中表达升高。双荧光素酶报告基因实验结果显示,将 psi-CHECK2-SNHG16-WT 和 miR-195-5p mimic 同时转染进 HGC-27 中,显著抑制了 HGC-27 细胞的荧光素酶活性。qRT-PCR 及 WB 实验结果显示:敲低 HGC-27、MKN-28 细胞中 SNHG16 可上调 miR-195-5p 并抑制 MYB 在转录及翻译水平的表达;过表达 HGC-27、MKN-28 细胞中 miR-195-5p 可抑

制 MYB 表达。CCK8 增殖实验及细胞划痕实验结果表明:敲低 SNHG16 或过表达 miR-195-5p 均可抑制 HGC-27、MKN-28 细胞的增殖和迁移。**结论** LncRNA SNHG16 可通过 miR-195-5p 调节 MYB 在胃癌细胞中的表达,SNHG16 高表达可促进胃癌细胞增殖和迁移。

关键词 LncRNA SNHG16; miR-195-5p/MYB; 胃癌细胞; 增殖; 迁移

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1564-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.021

胃癌(7.7%)位居全球恶性肿瘤致死率排名第四位^[1],早期诊断和治疗是有效防治胃癌的关键,因此,寻找灵敏度、特异度高的分子标记物对胃癌早期诊断及筛选潜在治疗靶点具有积极影响^[2]。长非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本长度大于 200 核苷酸(nt),无法编码蛋白的单链 RNA,在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[3]。小核内 RNA 宿主基因(SNHG16)是位于 17q25.1 上的促癌 lncRNA,2009 年初次报道,SNHG16 在侵袭性神经母细胞瘤中高度表达,并与患者的生存预后相关^[4]。近期研究表明,SNHG16 在多种人类恶性肿瘤中异常表达且参与肿瘤发生发展,其中,SNHG16 在胃癌组织及胃癌患者血浆中的表达升高,其高表达与肿瘤体积,远处转移及 TNM 分期等显著相关,这说明 SNHG16 可能是胃癌的一

2023-08-02 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82174146);河南省科技攻关项目(编号:212102310639)

作者单位:¹ 河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450046;

² 河南中医药大学第一附属医院检验科,郑州 450000

作者简介:康娟,女,硕士研究生;

任伟宏,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:ren_wei hong@163.com

blot was used to determine the protein level of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18. **Results** CCK-8 assay showed that cell viability decreased in CSE group ($P < 0.001$), LDH leakage rate ($P < 0.001$) and ROS ($P < 0.001$) production increased. Compared to the CSE group, cell viability increased ($P < 0.001$), LDH leakage rate ($P < 0.01$) and ROS ($P < 0.001$) production decreased in CSE + MCC950 group. The number of PI staining cells in CSE group was more than that in control group and CSE + MCC950 group, but staining cells in CSE + MCC950 group was less than that in CSE group. RT-qPCR and Western blot results showed that the expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 increased in CSE group but decreased in CSE + MCC950 group. **Conclusion** The oxidative stress and inflammation of sertoli/spermatogenic induced by cigarette smoke may be related to the activation of ROS/NLRP3 signaling pathway.

Key words cigarette smoke; NLRP3; ROS; pyroptosis; sertoli/spermatogenic cells