

【实验研究】

雷公藤甲素对小鼠睾丸支持细胞人白细胞分化抗原36蛋白表达及脂质代谢水平的影响

罗立¹, 卢树宏¹, 张嘉慧¹, 郑锦芬¹, 沈飞海^{1, 2*}, 黄芝瑛^{1*}

1. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学 药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究雷公藤甲素影响睾丸支持细胞的人白细胞分化抗原36 (CD36) 蛋白表达及脂质代谢的作用与分子机制。方法 体外培养小鼠睾丸支持细胞系TM4细胞, CCK-8法检测雷公藤甲素(40、80、160、320、640 nmol·L⁻¹)作用24 h细胞存活率; 流式细胞术测定雷公藤甲素(80、160、320 nmol·L⁻¹)作用24 h细胞凋亡率; 氟硼二吡咯化合物(BODIPY)染色和油红O染色检测雷公藤甲素(80、160、320 nmol·L⁻¹)作用24 h细胞内脂滴聚积情况; 试剂盒法检测雷公藤甲素(80、160、320 nmol·L⁻¹)作用24 h细胞内三酰甘油(TG)水平; TM4细胞经0.1 mmol·L⁻¹三磷酸腺苷(ATP)预处理3 h后, 再与160 nmol·L⁻¹雷公藤甲素共处理24 h, 用CCK-8法检测TM4细胞的存活率; Western blotting法检测雷公藤甲素(40、80、160、320 nmol·L⁻¹)作用24 h、或160 nmol·L⁻¹雷公藤甲素作用6、12、24、36、48 h后TM4细胞中CD36蛋白表达量; Western blotting法检测雷公藤甲素(40、80、160、320 nmol·L⁻¹)作用24 h蛋白激酶1(PKD1)及其磷酸化蛋白、组蛋白去乙酰化酶7(HDAC7)和叉头框蛋白O1(FOXO1)的蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 雷公藤甲素80、160、320、640 nmol·L⁻¹浓度组TM4细胞存活率显著下降($P < 0.05$ 、 0.01), 半数抑制浓度(IC₅₀)为214.1 nmol·L⁻¹; 80、160、320 nmol·L⁻¹雷公藤甲素的细胞凋亡率分别为11.89%、23.17%、32.12%, 与对照组比较差异显著($P < 0.05$ 、 0.01)。BODIPY染色结果显示, 与对照组比较, 雷公藤甲素组细胞内的红色荧光强度显著下降($P < 0.01$), 油红O染色也显示, 雷公藤甲素160 nmol·L⁻¹组细胞内脂滴数量明显低于对照组; 与对照组比较, 雷公藤甲素组TM4细胞内TG水平显著下降($P < 0.01$)。与雷公藤甲素组比较, 使用ATP协同给药显著减轻了雷公藤甲素对TM4细胞存活率的抑制($P < 0.01$)。与对照组比较, 80、160、320 nmol·L⁻¹的雷公藤甲素作用24 h后, TM4细胞的CD36蛋白表达量显著上升($P < 0.01$), 160 nmol·L⁻¹雷公藤甲素作用于TM4细胞6、12、24、36、48 h, CD36的表达水平随时间的延长先升高后降低, 在24 h达到峰值($P < 0.05$)。与对照组比较, 雷公藤甲素组TM4细胞中PKD1及其丝氨酸744-748位点磷酸化水平、HDAC7和FOXO1的蛋白表达均受到显著抑制($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 雷公藤甲素对睾丸支持细胞具有明显的损伤作用, 损伤机制与其诱导的脂质代谢紊乱和ATP缺乏相关。CD36在损伤过程中表达量先升高后降低, 其初期代偿性上升可能是一种细胞的应激性保护机制, PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路的抑制介导了CD36表达的调控。

关键词: 雷公藤甲素; 睾丸支持细胞; 脂代谢紊乱; 人白细胞分化抗原36 (CD36); 三磷酸腺苷; 蛋白激酶1; 组蛋白去乙酰化酶7; 叉头框蛋白O1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 07-1266-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.008

Effects of triptolide on protein expression of cluster of differentiation 36 and lipid metabolism in mouse testis Sertoli cell

LUO Li¹, LU Shuhong¹, ZHANG Jiahui¹, ZHENG Jinfen¹, SHEN Feihai^{1, 2}, HUANG Zhiying¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the effect and molecular mechanism of triptolide on cluster of differentiation 36 (CD36) protein expression and lipid metabolism of testicular Sertoli cells. **Methods** Mouse testis Sertoli cell line TM4 cells were cultured *in vitro*.

收稿日期: 2022-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773992)

第一作者: 罗立(1996—), 博士研究生, 研究方向为药物毒理学。E-mail: luoli26@mail2.sysu.edu.cn

*共同通信作者: 黄芝瑛, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物毒理学。Tel: (020)39943092 Fax: (020)39943000 E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn
沈飞海, 博士, 研究方向为药物毒理学。E-mail: tobyshum12@163.com

The survival rate of TM4 cells treated with triptolide (40, 80, 160, 320, 640 nmol·L⁻¹) for 24 h was determined by CCK-8 method. The apoptosis rate of triptolide treated with 80, 160, 320 nmol·L⁻¹ for 24 h was determined by flow cytometry. The accumulation of intracellular lipid droplets was detected by BODIPY staining and oil-red O staining after treated with triptolide (80, 160, 320 nmol·L⁻¹) for 24 h. The level of triacylglycerol (TG) in cells treated with triptolide (80, 160, 320 nmol·L⁻¹) for 24 h was detected by kit method. TM4 cells were pretreated with 0.1 mmol·L⁻¹ adenosine triphosphate (ATP) for 3 h, and then treated with 160 nmol·L⁻¹ triptolide for 24 h. The survival rate of TM4 cells was determined by CCK-8 method. Western blotting was used to detect the expression of CD36 protein in TM4 cells treated with triptolide (40, 80, 160, 320 nmol·L⁻¹) for 24 h or 160 nmol·L⁻¹ for 6, 12, 24, 36, 48 h. Western blotting was used to detect the protein expression levels of protein kinase 1 (PKD1) and its phosphorylated protein, histone deacetylase 7 (HDAC7) and forkhead box protein O1 (FOXO1) treated by triptolide (40, 80, 160, 320 nmol·L⁻¹) for 24 h. **Results** Compared with control group, TM4 cell survival rate was significantly decreased in triptolide 80, 160, 320 and 640 nmol·L⁻¹ groups ($P < 0.05, 0.01$), and IC₅₀ was 214.1 nmol·L⁻¹. The apoptosis rates of triptolide at 80, 160 and 320 nmol·L⁻¹ were 11.89%, 23.17% and 32.12%, respectively, significantly different compared with control group ($P < 0.05, 0.01$). BODIPY staining showed that the intracellular red fluorescence intensity in triptolide group was significantly decreased compared with control group ($P < 0.01$). Oil red O staining also showed that the number of intracellular lipid droplets in triptolide 160 nmol·L⁻¹ group was significantly lower than control group. Compared with control group, TG level in TM4 cells in triptolide group was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with triptolide group, ATP synergistic administration significantly reduced the inhibitory effect of triptolide on TM4 cell survival rate ($P < 0.01$). Compared with control group, the expression of CD36 protein in TM4 cells increased significantly after treated with triptolide at 80, 160 and 320 nmol·L⁻¹ for 24 h ($P < 0.01$). The expression of CD36 protein in TM4 cells treated with triptolide at 160 nmol·L⁻¹ for 6, 12, 24, 36 and 48 h. The expression level of CD36 first increased and then decreased with time, and reached the peak at 24 h ($P < 0.05$). Compared with control group, the levels of PKD1 and Ser 744-748 phosphorylation PKD1, protein expressions of HDAC7 and FOXO1 were significantly inhibited in TM4 cells in triptolide group ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Triptolide had obvious damage to testicular Sertoli cells. The mechanism of damage was related to the disturbance of lipid metabolism and ATP deficiency. The expression level of CD36 first increased and then decreased during injury, and the initial compensatory increase may be a stress protective mechanism of cells. Inhibition of PKD1/HDAC7/FOXO1 signaling pathway mediates the regulation of CD36 expression.

Key words: triptolide; testis Sertoli cells; lipid metabolism disorder; cluster of differentiation 36 (CD36); adenosine triphosphate; protein kinase 1; histone deacetylase 7; forkhead box protein O1

雷公藤甲素是传统中药材雷公藤的主要活性成分^[1],具有抗肿瘤^[2-3]、抗炎^[4]、免疫抑制^[5]等多种药理活性,临床上被用于治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病^[6]。同时,雷公藤甲素也是雷公藤的主要毒性成分,有明显的生殖^[7]、心脏^[8]、肝^[1]和肾^[9]等多器官毒性,在一定程度上限制了其临床应用。其中,雷公藤甲素对雄性生殖有明确毒性作用,可以诱导睾丸支持细胞氧化应激和凋亡,导致小鼠生精小管内径显著减小,生精细胞从生精上皮严重脱落^[10]。也有报道显示^[11],经120 μg·kg⁻¹·d⁻¹雷公藤甲素处理2周后的雄性小鼠出现精子数量减少、血睾屏障受损、睾丸萎缩等现象,提示雷公藤甲素诱导生精功能障碍,具有显著的生殖毒性。

精子形成是发生在生精小管中的一个复杂的生理过程,依赖于睾丸的结构及其提供的能量。睾丸支持细胞是为精细胞提供能量和结构支持的重要组织细胞^[12],参与血睾屏障的形成^[13]。支持细胞的能量代谢具有非典型特征,通过葡萄糖转运蛋白摄取细胞外的葡萄糖并转化为乳酸,生成的乳酸经单羧酸转运体(monocarboxylate transporter, MCT)转移至细胞

外,为精细胞提供能量^[14],通过脂肪酸氧化为自身提供三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)^[15]。因此,维持支持细胞正常的脂代谢过程是保障其发挥生理功能和精子形成的前提条件。研究发现^[16],小鼠睾丸支持细胞TM4的胞内ATP含量随雷公藤甲素孵育浓度上升而下降,表明雷公藤甲素导致TM4细胞能量缺乏,葡萄糖消耗率和乳酸生成率也相应呈浓度相关性下降,而脂肪酸的消耗率呈浓度梯度增加。这些结果提示,雷公藤甲素能抑制支持细胞的糖酵解过程导致能量不足,促进脂肪酸氧化代偿性增强。

人白细胞分化抗原36(cluster of differentiation 36, CD36)是一种跨膜糖蛋白,又称脂肪酸转位酶(fatty acid translocase, FAT),属于B族清道夫受体家族^[17]。CD36蛋白包括2个跨膜结构域、1个相对较大的胞外结构域以及位于细胞质中较短的氨基和羧基末端^[18]。CD36的胞外结构域有多个结合位点,能识别多种内源性和外源性的配体,如长链脂肪酸、病原体相关分子、血小板反应蛋白1等,参与多种生物学过程^[19]。CD36与长链脂肪酸结合,是负责

脂肪酸转运的主要蛋白质。有研究报道,CD36基因敲除的小鼠分离出的心肌细胞、体内心脏、骨骼肌和脂肪细胞的脂肪酸摄取率明显低于野生型小鼠^[20]。雷公藤甲素诱导睾丸支持细胞脂肪酸氧化代谢增强,CD36作为细胞膜上负责转运脂肪酸的主要蛋白质,可能在雷公藤甲素导致支持细胞能量代谢紊乱中发挥作用。基于此,本研究考察雷公藤甲素对支持细胞CD36蛋白表达和脂质代谢水平的影响,并探究CD36在雷公藤甲素致支持细胞毒性中的作用和相关机制,为深入理解雷公藤甲素生殖毒性的机制提供新的思路。

1 材料

1.1 细胞

小鼠睾丸支持细胞系 TM4 细胞购自国家生物医学实验细胞资源库。

1.2 主要试剂

雷公藤甲素(美国 MedChemExpress 公司,货号 HY-32735,规格 10 mg,质量分数 99.78%);胎牛血清、马血清、DMEM/F12 培养基(以色列 Biological Industries 公司);青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);磷酸缓冲液(PBS,武汉 Boster 公司);细胞计数试剂(CCK-8,美国 Bimake 公司);ATP(上海尚宝生物科技有限公司);细胞凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术研究);三酰甘油(TG)试剂盒(南京建成生物研究所);多聚甲醛(广州艾斯金生物科技有限公司);油红O(美国 Sigma 公司);氟硼二吡咯化合物(BODIPY)染色液(美国 Invitrogen 公司);CD36 抗体(美国 Proteintech 公司);蛋白激酶 1(PKD1)抗体、p-PKD1 抗体(美国 CST 公司);组蛋白去乙酰化酶 7(HDAC7)抗体、叉头框蛋白 O1(FOXO1)抗体(美国 Proteintech 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 主要仪器

SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州安泰 Airtech 公司);3111 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo 公司);AB104-S 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);EPICS XL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific);细胞成像系统 EVOS FL Auto(美国 Life Technologies 公司);Mini-PROTEAN3 电泳系统、Mini-Trans-Blot 转移系统、ChemiDoc 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞株及细胞培养

TM4 细胞置于含 2.5% 胎牛血清(FBS)、5% 马血

清(HS)和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养。

2.2 CCK-8 法检测细胞存活率

2.2.1 雷公藤甲素对 TM4 细胞存活率的影响 取对数生长期的 TM4 细胞,以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ (每孔 100 μL) 接种于 96 孔板中。细胞贴壁后更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,更换含雷公藤甲素(40、80、160、320、640 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的完全培养基,对照组不加药,同时设调零组(不接种细胞),每组 3 个复孔。药物作用 24 h 后,向各孔加入 10 μL CCK-8 液,置于培养箱中孵育 60 min 后,用酶标仪测定 450 nm 的吸光度(A)值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.2.2 ATP 与雷公藤甲素联合给药对 TM4 细胞存活率的影响 细胞接种操作同“2.2.1”项,细胞贴壁后更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,细胞分为对照组、ATP(0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)组、雷公藤甲素(160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)组、ATP(0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 雷公藤甲素(160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,ATP + 雷公藤甲素组细胞用 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 预处理 3 h 后,与 160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤甲素共处理 24 h,ATP 组、雷公藤甲素组同时分别仅给予 ATP、雷公藤甲素,对照组不加药,设调零组,每组 3 个复孔。ATP 与雷公藤甲素共同孵育 24 h 后,向各孔加入 10 μL CCK-8 液,置于培养箱中孵育 60 min 后,用酶标仪测定 450 nm 的 A 值,并计算细胞存活率。

2.3 流式细胞术测定细胞凋亡率

取对数生长期的 TM4 细胞,以 $4 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ (每孔 2 mL) 接种于 6 孔板中。细胞贴壁后,更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,更换含不同浓度雷公藤甲素(80、160、320 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的完全培养基,对照组不加药。药物作用 24 h 后,收集各组 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 细胞。向细胞沉淀中加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液,轻轻重悬细胞;再向悬液中加入 10 μL PI 染色液和 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温避光条件下孵育 10~20 min,随后置于冰浴中,立即使用流式细胞仪上机检测。

2.4 TG 检测

取对数生长期的 TM4 细胞,以 $4 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ (每皿 10 mL) 接种于 100 mm 细胞培养皿中。细胞贴壁后,更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,更换含不同浓度(80、160、320 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)雷公藤甲素的完全培养基,对照组不加药。药物作用 24 h 后,1 000 rmin^{-1} 离心 10 min 收集细胞沉淀,加入

0.3 mL PBS 缓冲液作为匀浆介质,冰水浴的条件下进行超声破碎(功率 300 W, 3~5 s 1 次,中间间隔 30 s,重复 3~5 次)。取样进行蛋白浓度测定,按照试剂盒说明书测定并计算 TG 含量。

2.5 BODIPY 染色

取对数生长期的 TM4 细胞,以 $2 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ (每孔 2 mL) 接种于 6 孔板中。细胞贴壁后,更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,更换含不同浓度 (80、160、320 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 雷公藤甲素的完全培养基,对照组不加药。药物作用 24 h 后,用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BODIPY 染色液避光染色 30 min,再用 DAPI 避光染核 5 min,用细胞成像系统荧光拍照,使用 Image J 软件进行荧光强度分析,并用 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行作图。

2.6 油红 O 染色

细胞接种操作同“2.2.1”项,细胞贴壁后,更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,更换含不同浓度 (80、160、320 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 雷公藤甲素的完全培养基,对照组不加药。药物作用 24 h 后,用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,加入滤纸过滤的油红 O 染色液避光染色 30 min,再用 75% 乙醇脱色处理,置于倒置显微镜下观察拍照。

2.7 Western blotting 检测细胞中蛋白的表达水平

细胞接种操作同“2.3”项,细胞贴壁后,更换不含血清的 DMEM/F12 培养基同步化处理 12 h,更换含不同浓度雷公藤甲素 (40、80、160、320 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的完全培养基培养至 24 h,或 160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤甲素处理 6、12、24、36、48 h。将各组细胞用 PBS 清洗 3 次,加入细胞裂解液冰上裂解并离心以提取细胞总蛋白,并用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,制备每孔 30 μg 蛋白样品,10% SDS-PAGE 凝胶电泳。将电泳条带进行电转转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min,加入相应蛋白一抗中置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,洗膜后曝光,采用凝胶成像分析系统拍照,使用 Image J 软件对结果进行分析处理。

2.8 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行作图和统计分析,显著性差异比较采用 *t* 检验法进行。

3 结果

3.1 雷公藤甲素对 TM4 细胞存活率的影响

如图 1 所示,随着雷公藤甲素给药浓度的增加,细胞存活率逐渐下降,呈现浓度相关性,与对照

组比较,80、160、320、640 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01),半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 214.1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明,雷公藤甲素可致 TM4 细胞出现毒性并降低其存活率。

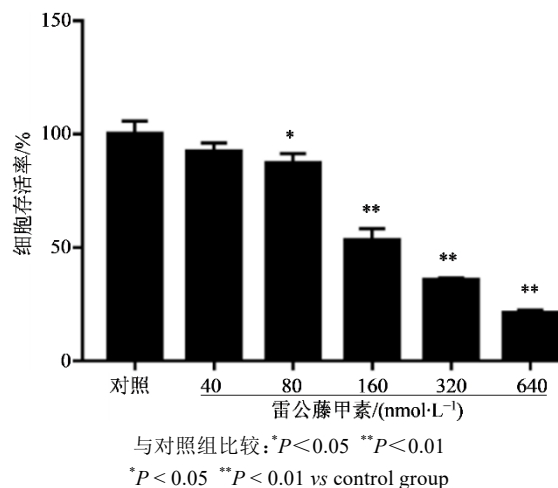


图1 雷公藤甲素对 TM4 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effects of triptolide on cell viability of TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 雷公藤甲素对 TM4 细胞凋亡率的影响

如图 2 所示,80、160、320 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤甲素的细胞凋亡率分别为 11.89%、23.17%、32.12%,呈现浓度相关性,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果表明,雷公藤甲素导致 TM4 细胞毒性,并增加细胞凋亡率。

3.3 雷公藤甲素对 TM4 细胞脂滴和 TG 水平的影响

TG 是脂质的组成成分,是甘油和 3 个分子长链脂肪酸所形成的脂肪分子,通常以脂滴的形式储存在细胞内。BODIPY 染色结果显示,与对照组比较,雷公藤甲素处理组细胞内的红色荧光强度显著下降 ($P < 0.01$),呈浓度相关性(图 3-A、B)。油红 O 染色也显示,雷公藤甲素 160 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞内脂滴数量明显低于对照组(图 3-C),提示雷公藤甲素引起支持细胞的脂肪酸积聚减少。与对照组比较,雷公藤甲素组 TM4 细胞内 TG 水平显著下降 ($P < 0.01$),且呈浓度相关性(图 3-D)。结果表明,雷公藤甲素抑制 TM4 细胞脂滴的聚积和 TG 的水平。

3.4 ATP 减轻雷公藤甲素诱导的睾丸 TM4 细胞毒性

本课题组前期研究发现^[15],雷公藤甲素作用于 TM4 细胞后,细胞内 ATP 水平呈浓度相关性下降。为了探究雷公藤甲素导致的 ATP 缺乏与睾丸支持

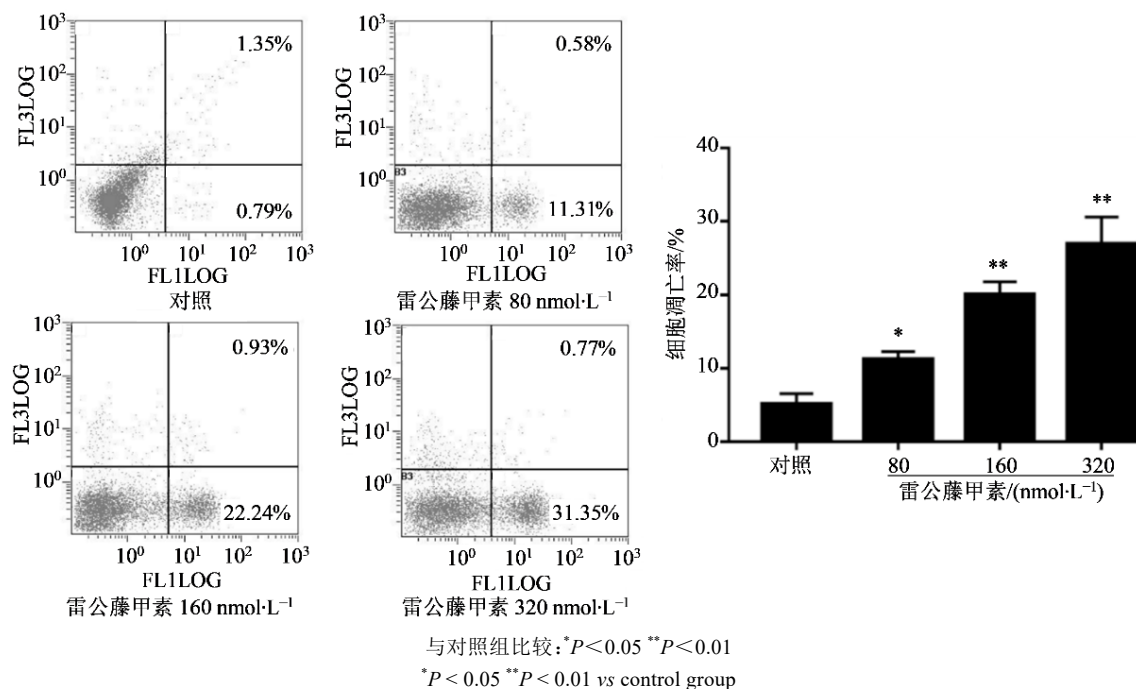
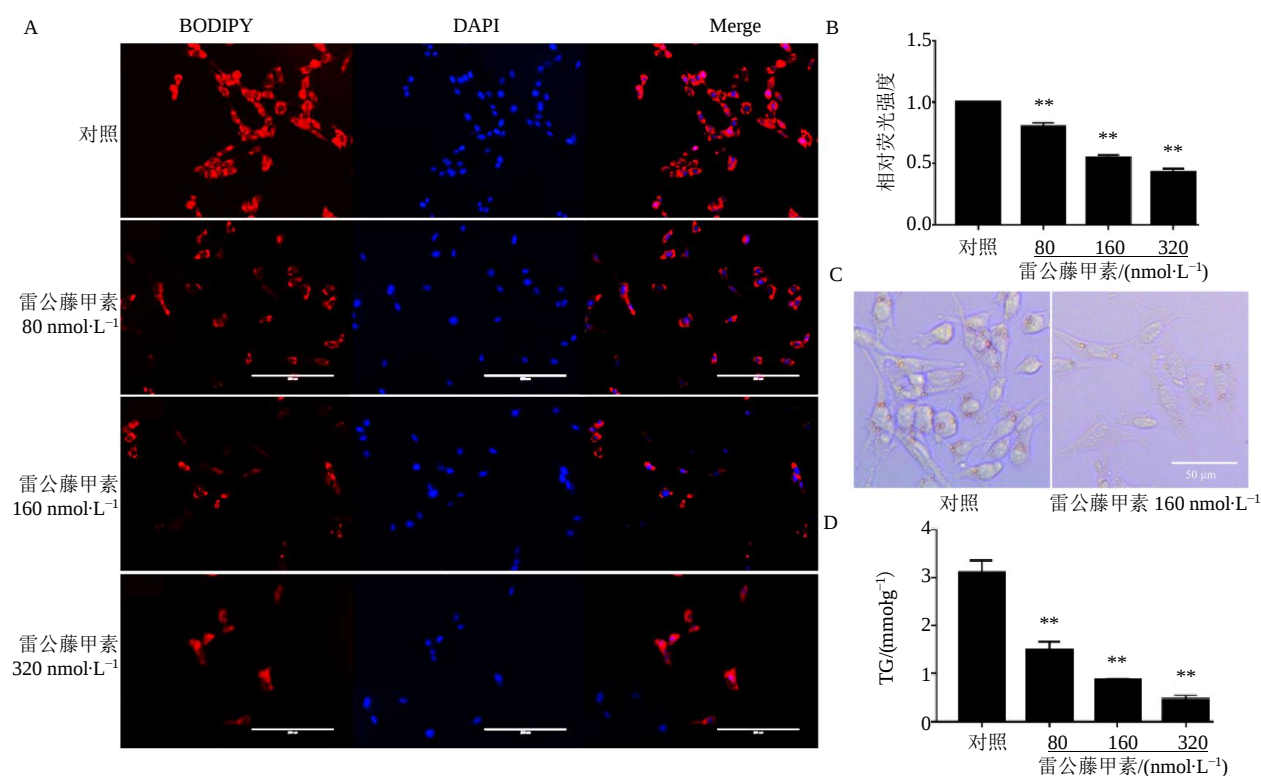


图2 雷公藤甲素对TM4细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of triptolide on cell apoptosis ratio of TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-BODIPY 染色结果; B-BODIPY 荧光强度统计图; C-油红 O 染色结果; D-TG 水平; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

A- BODIPY staining results; B- BODIPY fluorescence intensity; C-Oil red O staining; D-TG levels; ** $P < 0.01$ vs control group

图3 雷公藤甲素对TM4细胞脂滴和TG水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of triptolide on lipid droplets and TG level in TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞毒性的关系,本研究将TM4细胞经0.1 mmol·L⁻¹ ATP预处理3 h后,再与160 nmol·L⁻¹ 雷公藤甲素共处理24 h,用CCK-8法检测TM4细胞的存活率。结

果如图4所示,与对照组比较,雷公藤甲素对TM4细胞的存活率有显著的抑制作用($P < 0.01$);而与雷公藤甲素组比较,使用ATP协同给药显著减轻了雷

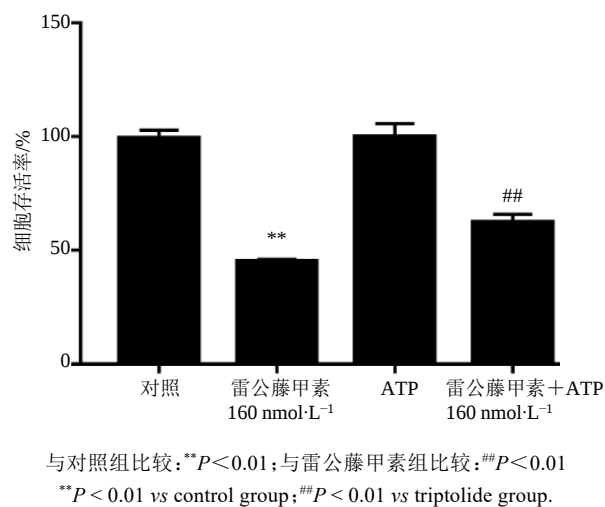


图4 ATP对雷公藤甲素诱导的TM4细胞损伤的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effects of ATP on triptolide-induced TM4 cell damage ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

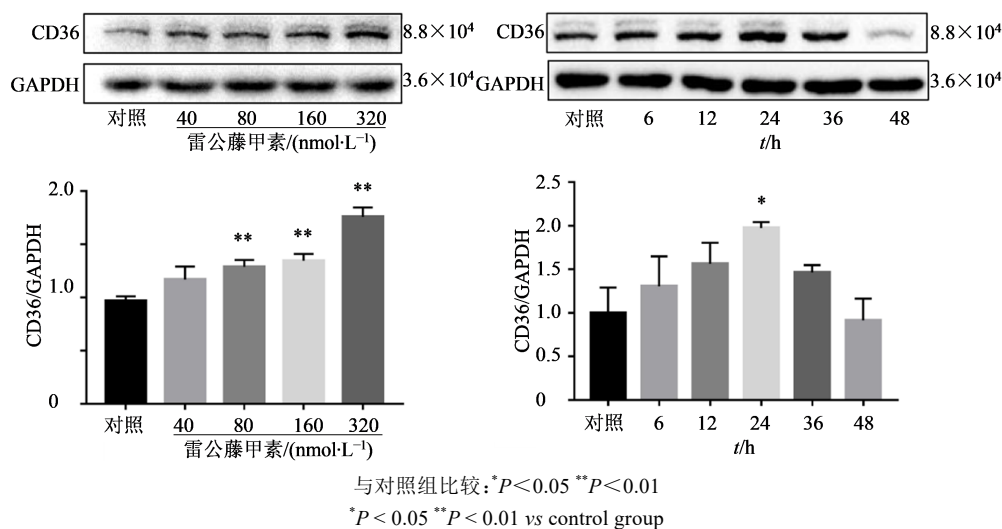


图5 雷公藤甲素对TM4细胞CD36表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of triptolide on expression CD36 in TM4 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

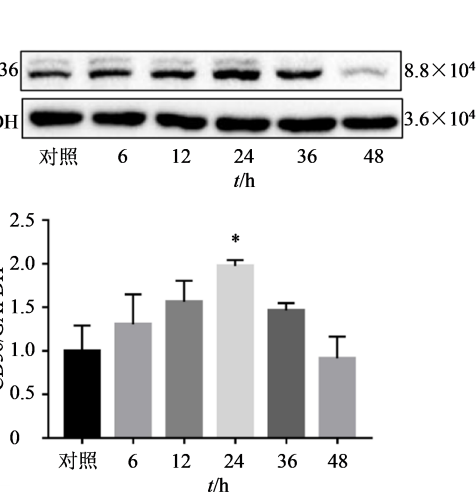
3.6 雷公藤甲素对TM4细胞PKD1/HDAC7/FOXO1通路蛋白表达水平的影响

上述研究结果表明,CD36在雷公藤甲素诱导的支持细胞脂质代谢紊乱中扮演着重要的作用。为了探究雷公藤甲素对CD36上游蛋白表达量的影响,本研究检测了PKD1及其磷酸化蛋白、HDAC7和FOXO1的蛋白表达水平。结果如图6所示,与对照组比较,不同浓度的雷公藤甲素(40、80、160、320 nmol·L⁻¹)作用24 h后,TM4细胞中PKD1及其丝氨酸744-748位点磷酸化水平、HDAC7和FOXO1

的蛋白表达均受到显著抑制($P < 0.05, 0.01$),且呈浓度相关性。结果提示,雷公藤甲素可能通过抑制PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路调控CD36,进而影响支持细胞的脂质代谢过程。

3.5 雷公藤甲素对TM4细胞CD36蛋白表达水平的影响

为了探究CD36在雷公藤甲素导致的TM4细胞脂质代谢紊乱中的作用,本研究检测了雷公藤甲素不同浓度和不同时间处理下CD36的蛋白表达水平。结果如图5所示,与对照组比较,80、160、320 nmol·L⁻¹的雷公藤甲素作用24 h后,TM4细胞的CD36蛋白表达量显著上升($P < 0.01$),呈浓度相关性。160 nmol·L⁻¹雷公藤甲素作用于TM4细胞6、12、24、36、48 h,CD36的表达水平随时间的延长先升高后降低,在24 h达到峰值,与对照组比较差异显著($P < 0.05$)。结果提示,雷公藤甲素在短时间内可以提高CD36的表达水平,作用长时间后上调的CD36水平显著回降。



的蛋白表达均受到显著抑制($P < 0.05, 0.01$),且呈浓度相关性。结果提示,雷公藤甲素可能通过抑制PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路调控CD36,进而影响支持细胞的脂质代谢过程。

4 讨论

近年来,关于雷公藤甲素多器官毒性的报道受到越来越多的关注,尤其是生殖毒性。为探究雷公藤甲素的生殖毒性和相关机制,本研究以小鼠睾丸支持细胞TM4为研究对象,检测了雷公藤甲素对TM4细胞存活率和凋亡率的影响。结果显示,雷公

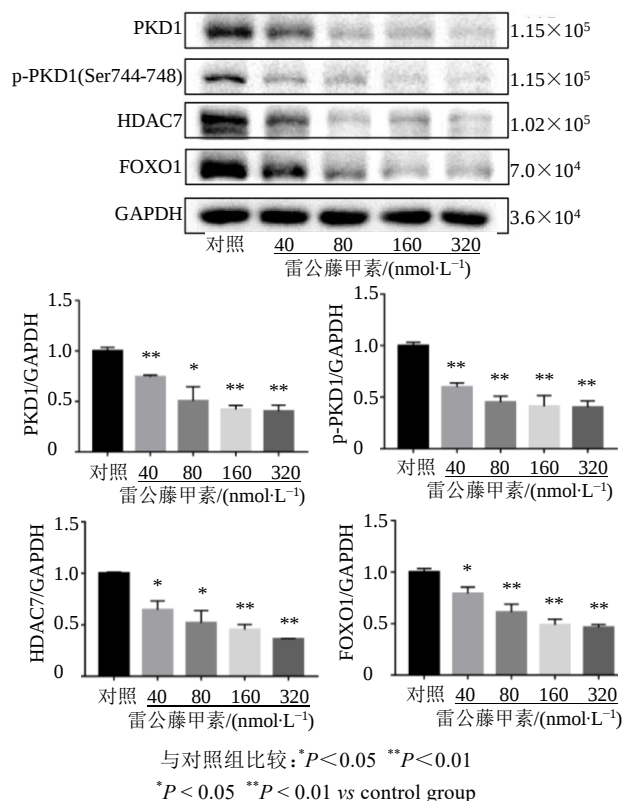


图6 雷公藤甲素对TM4细胞PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Effects of triptolide on PKD1/HDAC7/FOXO1 signaling pathway in TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

雷公藤甲素可以剂量相关性地抑制TM4细胞增殖,诱导TM4细胞凋亡,且24 h的IC₅₀为214.1 $\mu\text{mol/L}$,确证了雷公藤甲素对支持细胞具有明显的毒性作用。

支持细胞是体内最复杂的细胞之一,不仅是因为它的三维结构,更是因为它为精细胞的发育发展提供了一个独特的环境。支持细胞在精子发生过程中起着以下5个方面的重要作用:形成血睾屏障;对发育中的生精细胞提供营养和结构支持;清除损伤的生殖细胞;调节生精小管精液的产生;创造免疫豁免的微环境^[21]。其中,支持细胞自身的能量代谢过程及其对精细胞的能量供应在精子的发生过程中发挥着重要作用。支持细胞是睾丸中产生乳酸的主要细胞,通过糖酵解产生的乳酸为生精细胞提供主要的能量来源;然而,支持细胞维持自身生理功能的能量主要来源于脂肪酸的 β -氧化过程,而非糖酵解^[22]。可见,维持支持细胞正常的脂代谢过程对于整个生精过程有着重要意义。本实验室前期研究发现,雷公藤甲素可以抑制支持细胞的糖酵解和ATP产生量,造成支持细胞的能量缺乏而细胞脂肪酸氧化代谢增强^[16,23]。根据此结果,本研究检测了雷公藤甲素作用下TM4细胞的脂滴蓄积水平

和TG含量,结果显示雷公藤甲素可以显著降低支持细胞的脂滴积聚和TG水平,这与前期实验观察到的脂肪酸氧化代谢增强相吻合。通过ATP与雷公藤甲素联合孵育TM4细胞,发现ATP能使雷公藤甲素降低的细胞存活率得到回升,表明ATP缺乏是雷公藤甲素引起支持细胞损伤的重要原因之一。

CD36是促进体内多种细胞中脂肪酸转运的主要膜蛋白,介导脂肪酸通过细胞膜的转运过程。前期研究发现,雷公藤甲素通过抑制糖酵解,降低细胞的ATP含量,导致支持细胞能量缺乏;但同时细胞的脂肪酸氧化过程增强。为了探究CD36是否参与了支持细胞的脂肪酸转运过程,本研究检测了不同剂量和不同时间雷公藤甲素处理后TM4细胞的CD36蛋白表达量。结果显示,雷公藤甲素作用24 h时,TM4细胞的CD36蛋白表达量呈现浓度相关性上升;160 nmol/L 雷公藤甲素孵育不同时间,TM4细胞的CD36表达水平随时间的延长先升高后降低,在24 h达到峰值。这些提示了,雷公藤甲素作用初期,能抑制糖酵解,减少细胞的ATP生成;而CD36表达代偿性上调以促进脂肪酸的转运,从而促进脂肪酸的利用,以应对雷公藤甲素导致的能量不足。随着雷公藤甲素作用时间的延长,CD36表达下调,细胞进入失代偿阶段。

PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路被报道在CD36的表达调控中起着重要作用。PKD1是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可通过促进HDAC7与转录因子FOXO1结合并向 $cd36$ 启动子募集,从而抑制 $cd36$ 的转录^[24]。为了探究支持细胞中雷公藤甲素诱导的CD36表达上调是否与PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路相关,本研究检测了该信号通路的相关蛋白表达。结果显示,雷公藤甲素作用24 h时,TM4细胞中PKD1及其丝氨酸744-748位点磷酸化水平、HDAC7、FOXO1蛋白表达量显著降低,且呈现剂量相关性。结果提示,雷公藤甲素诱导支持细胞的CD36表达上调可能与其对PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路的抑制相关。

雷公藤甲素对睾丸支持细胞具有明显的损伤作用,损伤机制与其诱导的脂质代谢紊乱和ATP缺乏相关。CD36在雷公藤甲素对睾丸支持细胞的损伤过程中有表达量先升高后降低的作用,雷公藤甲素孵育24 h前的表达上调可能在损伤过程中发挥着细胞保护作用,PKD1/HDAC7/FOXO1信号通路的抑制介导了CD36表达的调控。本研究为进一步理解雷公藤甲素的生殖毒性机制提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hasnat M, Yuan Z Q, Naveed M, et al. Drp1-associated mitochondrial dysfunction and mitochondrial autophagy: A novel mechanism in triptolide-induced hepatotoxicity [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35(3): 267-280.
- [2] He J X, Peng T H, Peng Y B, et al. Molecularly engineering triptolide with aptamers for high specificity and cytotoxicity for triple-negative breast cancer [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(6): 2699-2703.
- [3] 王秀, 朱娜, 李见春, 等. 雷公藤甲素对鼻咽癌细胞P-gp表达与功能的影响 [J]. *药理学学报*, 2018, 53(7): 1107-1112.
- Wang X, Zhu N, Li J C, et al. Effect of triptolide on the expression and function of P-gp in nasopharyngeal cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin*, 2018, 53(7): 1107-1112.
- [4] Li Y, Yu C, Zhu W M, et al. Triptolide ameliorates IL-10-deficient mice colitis by mechanisms involving suppression of IL-6/STAT3 signaling pathway and down-regulation of IL-17 [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(15): 2467-2474.
- [5] Zhang G T, Liu Y, Guo H Q, et al. Triptolide promotes generation of FoxP3⁺ T regulatory cells in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(1): 41-46.
- [6] Yuan K, Li X H, Lu Q Y, et al. Application and mechanisms of triptolide in the treatment of inflammatory diseases-A review [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1469.
- [7] Ma B, Qi H H, Li J, et al. Triptolide disrupts fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) levels in male mice testes followed by testicular injury: A GC-MS based metabolomics study [J]. *Toxicology*, 2015, 336: 84-95.
- [8] Xi Y, Wang W W, Wang L, et al. Triptolide induces p53-dependent cardiotoxicity through mitochondrial membrane permeabilization in cardiomyocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 355: 269-285.
- [9] Sun L X, Li H, Huang X, et al. Triptolide alters barrier function in renal proximal tubular cells in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 223(1): 96-102.
- [10] Ma B, Zhang J, Zhu Z M, et al. Luteolin ameliorates testis injury and blood-testis barrier disruption through the Nrf2 signaling pathway and by upregulating Cx43 [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(10): e1800843.
- [11] Ma B, Zhang J, Zhu Z M, et al. Aucubin, a natural iridoid glucoside, attenuates oxidative stress-induced testis injury by inhibiting JNK and CHOP activation via Nrf2 up-regulation [J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153057.
- [12] Ni F D, Hao S L, Yang W X. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: Recent findings in spermatogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 541.
- [13] Mok K W, Mruk D D, Cheng C Y. rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics through Akt-mediated effects on MMP-9 [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 22): 4870-4882.
- [14] Rato L, Alves M G, Socorro S, et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis [J]. *Nat Rev Urol*, 2012, 9(6): 330-338.
- [15] Gorga A, Rindone G M, Regueira M, et al. PPAR γ activation regulates lipid droplet formation and lactate production in rat Sertoli cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 369(3): 611-624.
- [16] Cheng Y S, Chen G J, Wang L, et al. Triptolide-induced mitochondrial damage dysregulates fatty acid metabolism in mouse Sertoli cells [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 292: 136-150.
- [17] Glatz J F C, Luiken J J F P. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(7): 1084-1093.
- [18] Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, et al. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36 [J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 172-176.
- [19] Tian K M, Xu Y, Sahebkar A, et al. CD36 in atherosclerosis: Pathophysiological mechanisms and therapeutic implications [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2020, 22(10): 59.
- [20] Habets D D, Coumans W A, Voshol P J, et al. AMPK-mediated increase in myocardial long-chain fatty acid uptake critically depends on sarcolemmal CD36 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(1): 204-210.
- [21] Bernardino R L, Marinelli R A, Maggio A, et al. Hepatocyte and Sertoli cell aquaporins, recent advances and research trends [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): E1096.
- [22] Rato L, Meneses M J, Silva B M, et al. New insights on hormones and factors that modulate Sertoli cell metabolism [J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(5): 499-513.
- [23] Zhang Y H, Tang Y R, Luo Y P, et al. Triptolide impairs glycolysis by suppressing GATA4/Sp1/PFKF signaling axis in mouse Sertoli cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 425: 115606.
- [24] Ren B, Best B, Ramakrishnan D P, et al. LPA/PKD-1-FoxO1 signaling axis mediates endothelial cell CD36 transcriptional repression and proangiogenic and proarteriogenic reprogramming [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(6): 1197-1208.

[责任编辑 兰新新]