

基于 ATR/Chk1/P53 信号通路探讨三七总皂苷对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤的保护作用

刘 静, 赵海霞, 吴秋月, 刘珍财, 韩贵芳, 袁 丁, 张长城*

三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

摘要: 目的 基于 ATR/Chk1/P53 信号通路探讨三七总皂苷(PNS)对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤的保护作用。方法 将 SPF 级 SD 大鼠随机分为青年对照组(3 月龄), 衰老模型组(18 月龄), PNS 低、中、高剂量(10、30、60 mg/kg)组(18 月龄), 每组 10 只。PNS 低、中、高剂量组大鼠分别 ig 给予 PNS 10、30、60 mg/kg, 每周 6 d, 给药 6 个月。结束时称体质量后处死大鼠, 迅速取出睾丸组织, 称取睾丸质量, 计算睾丸指数。HE 染色法观察睾丸组织形态学变化, 免疫组化法检测 DNA 损伤相关蛋白 γ -H2AX、ATR 的表达和定位, Western blotting 检测睾丸组织中 DNA 损伤相关蛋白 γ -H2AX、Chk1、p-P53、P21 的表达水平。结果 与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸质量、睾丸指数显著降低, PNS 能不同程度地升高睾丸质量、睾丸指数; HE 结果表明, PNS 能显著改善自然衰老所致的睾丸组织形态学变化; 与青年对照组相比, 衰老模型组大鼠睾丸组织 DNA 损伤标志蛋白 γ -H2AX 表达水平和阳性灶点数明显升高, ATR 的阳性灶点数及其下游 Chk1、p-P53、P21 的蛋白表达明显升高, 而 PNS 干预后可降低上述 DNA 损伤相关反应蛋白的表达。结论 PNS 能够减轻自然衰老大鼠睾丸组织 DNA 损伤, 其机制可能与调控 ATR/Chk1/P53 信号通路有关。

关键词: 三七总皂苷; 衰老; 睾丸; DNA 损伤; ATR/Chk1/P53 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)05-0935-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.016

Protective effects of *Panax notoginseng* saponins on testicular DNA damage in natural aging rats based on ATR/Chk1/P53 signal pathway

LIU Jing, ZHAO Hai-xia, WU Qiu-yue, LIU Zhen-cai, HAN Gui-fang, YUAN Ding, ZHANG Chang-cheng
Medical College of China Three Gorge University, Yichang 443002, China

Abstract: Objective To explore the protective effects of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on testicular DNA damage in natural aging rats based on ATR/Chk1/P53 signal pathway. **Methods** SPF SD rats were randomly divided into five groups, with 10 rats in each group: young control group, aging model group, low, medium, and high dose of PNS-treated group. From 18 months, rats of PNS low, medium, and high dose groups were received PNS (10, 30, and 60 mg/kg) by stomach lavaging for 6 times per week for 6 months, respectively. The rats were weighed and euthanized by exsanguination under diethyl ether anesthesia, and testis were immediately removed, weighed, and the index of testis was calculated. The testicular tissue morphology was observed by HE staining, the expression and locations of γ -H2AX and ATR were detected by immunohistochemical analysis, and the relative expression levels of γ -H2AX, Chk1, p-P53, and P21 in testicular tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with young control group, the obvious changes of seminiferous tubule were observed in aging model group, accompanied with a reduction in weight and index of testis. However, PNS treatment in some extent improved seminiferous tubule structure, weight, and index of testis. In addition, the protein expression levels of γ -H2AX and the numbers of γ -H2AX-positive cells in testis were significantly upregulated in aging model group relative to young control group. Furthermore, the numbers of ATR-positive cells and the protein expression levels of Chk1, p-P53, and P21 were significantly upregulated in testis of rats in aging model group when compared with young control group. Conversely, PNS significantly restored these changes of aging induced DNA damage response related proteins. **Conclusion** PNS attenuates testicular DNA damage of natural aging rats, which may be associated with ATR/Chk1/P53 signaling.

Key words: *Panax notoginseng* saponins; aging; testis; DNA damage; ATR/Chk1/P53 signaling pathway

收稿日期: 2016-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573931, 81373881, 81503334); 三峡大学人才科研启动基金(KJ2014B067)

作者简介: 刘 静(1990—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 13872458180 E-mail: liujing080910@163.com

*通信作者 张长城(1973—), 男, 医学博士, 教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn

随着近年人平均生育年龄的不断增加^[1],加上国家二胎政策的全面实施,使得有生育需求的中老年男性不断增多^[2]。但研究发现,老年男性睾丸功能逐渐衰退,精子数量与质量均显著下降,并伴有生殖细胞 DNA 损伤增加及精子 DNA 完整性的改变,从而导致精子染色体异常与畸形精子数显著增多^[3-4];而精子 DNA 损伤与染色体异常可导致子女基因缺陷与遗传性疾病的发生^[5],如阿佩尔氏综合征等遗传性疾病均与父亲精子 DNA 突变直接相关^[6]。因此,延缓睾丸衰老,防治因衰老而导致的生殖细胞 DNA 损伤已成为生殖衰老研究的热点。

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为五加科人参属植物,具有延缓衰老和保护生精功能等药理作用^[7-8]。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是三七的主要活性成分,具有延缓衰老、抗氧化等多方面的药理作用^[9-11]。研究表明 PNS 能够有效清除羟自由基和超氧自由基,保护 DNA 免受自由基氧化损伤^[12]。研究发现,三七皂苷 R_{g1} 对环磷酰胺诱发的小鼠骨髓细胞微核发生和丝裂霉素诱发的小鼠睾丸细胞染色体畸变均有明显的抑制效果,表明三七皂苷 R_{g1} 对体细胞和生殖细胞的 DNA 损伤均有保护作用^[13]。但是,PNS 是否对自然衰老大鼠睾丸组织 DNA 损伤具有保护作用鲜有报道。因此,本研究以自然衰老大鼠为模型,研究 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 DNA 损伤的保护作用及其可能机制,以期为临床开发 PNS 用于防治男性生殖功能衰退提供理论依据和实验思路。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,3 月龄体质量 (250±30) g,18 月龄体质量 (550±50) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (京) 2012-0001,批号 11400700003309。动物分笼饲养于室温 (23±3) °C、湿度 (60±5) % 的 12 h 阴暗交替的三峡大学实验动物中心的 SPF 级动物房中,自由饮水摄食。

1.2 实验药物

PNS 购于成都植标化纯生物技术有限公司,质量分数>95%,批号 PCS0841。

1.3 实验试剂

β-actin (Proteintech 公司,货号 66009-1-Ig); ATR (Santa Cruz 公司,货号 sc-1887); Chk1 (Santa

Cruz 公司,货号 sc-8408); p-P53 (Cell signaling 公司,货号 #12571); γ-H2AX (Abcam 公司,货号 ab26350); P21 (Abcam 公司,货号 ab109199); 羊抗鼠、羊抗兔、兔抗羊二抗 (武汉科瑞有限公司); 二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); BeyoECL Plus 超敏 ECL 化学发光剂盒 (碧云天生物技术有限公司)。

1.4 实验仪器

LEICA EG1150C 超薄切片机 (德国 Leica 公司); BX53 显微镜 (日本 Olympus 公司); CT15RT 高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备工程有限公司); PowerPacTM Basic 电泳仪、Mini PROTEAN3 Cell 电泳槽及蛋白电泳技术平台 (美国 Bio-Rad 公司); BioshineChemiQ4800 化学发光凝胶成像自动显影仪 (上海欧翔科学仪器有限公司); PK-600S 水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法

购买 18 月龄大鼠 40 只,并将其随机分为衰老模型组,PNS 低、中、高剂量 (10、30、60 mg/kg) 组,每组 10 只。另购买 3 月龄大鼠 10 只作为青年对照组。青年对照组、衰老模型组每天 ig 生理盐水,每周给药 6 d,周日停药 1 d,连续 6 个月;PNS 低、中、高剂量组分别 ig 给予 PNS 10、30、60 mg/kg 至 24 月龄,每周给药 6 d,周日停药 1 d。实验前 12 h 禁食不禁水。

2.2 睾丸质量和指数的测定

称取大鼠体质量后,处死大鼠,迅速取出睾丸组织,称取睾丸质量,计算睾丸指数 (睾丸指数=睾丸质量/体质量)。

2.3 睾丸 HE 染色

大鼠处死后,迅速取出睾丸组织,称质量后切取部分组织置于 4%多聚甲醛中固定,常规脱水包埋、切片,按标准操作进行 HE 染色,光镜下观察睾丸组织的形态学变化。

2.4 免疫组化法检测睾丸组织 γ-H2AX、ATR 蛋白的表达和定位

取睾丸切片置于 60 °C 烘箱烘烤 4 h,二甲苯与梯度乙醇脱蜡,柠檬酸修复液进行抗原修复,3%过氧化氢消除内源性过氧化酶,5% BSA 封闭后一抗 4 °C 孵育过夜,二抗常温孵育 1 h,经显色、封片后在 Olympus BX53 型光学显微镜下随机观察 5 个视野,并在相同设置下拍照取图。

2.5 Western blotting 检测 γ -H2AX、Chk1、p-P53、P21 蛋白的表达

取 50~100 mg 睾丸组织于 EP 管中,加入 1 mL PBS 于冰上快速剪碎,离心弃上清后,加入适量蛋白裂解液-苯甲基磺酰氟(PMSF)-蛋白磷酸酶抑制剂(100:1:1),匀浆、离心后取上清,加入上样缓冲液,95 °C 煮沸灭活后,凝胶电泳并恒流转 PVDF 膜,脱脂牛奶封闭后,4 °C 孵育一抗过夜,室温孵育二抗 1 h,ECL 化学发光法显影。Image-Pro Plus 6.0 灰度扫描、GraphPad Prism 5 软件进行分析处理。

2.6 统计学分析

采 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数之间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 PNS 对自然衰老大鼠睾丸质量和睾丸指数的影响

结果显示,与青年对照组相比,衰老模型组大鼠睾丸质量、睾丸指数显著降低($P < 0.01$),PNS 能剂量依赖性增加睾丸质量及睾丸指数($P < 0.05$),见图 1。

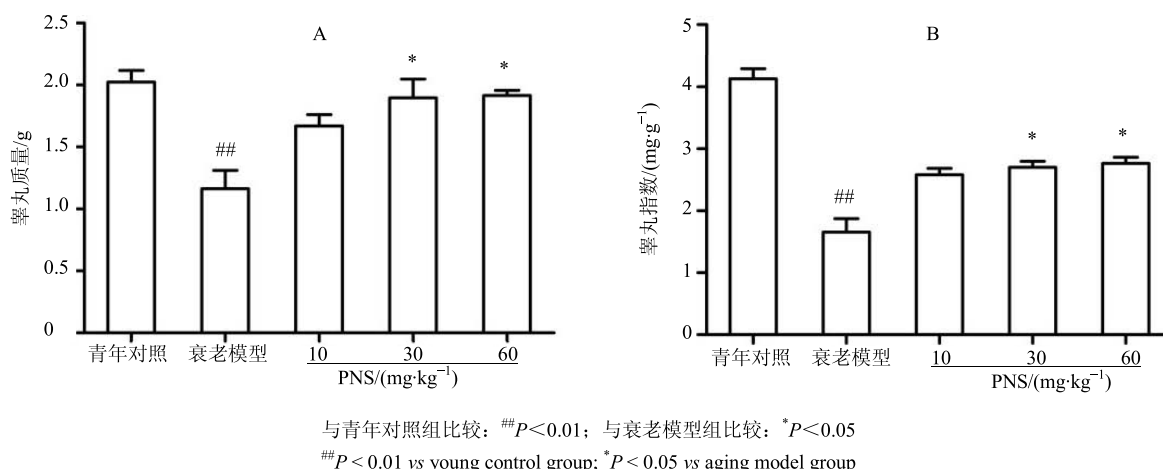


图 1 PNS 对自然衰老大鼠睾丸质量 (A) 和睾丸指数 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

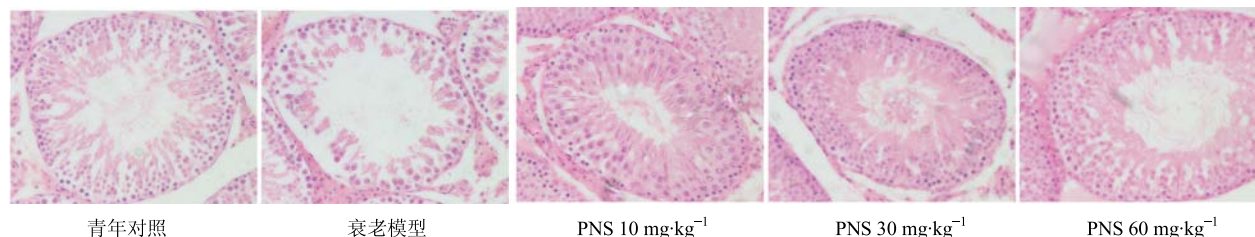
Fig. 1 Effect of PNS on testicular weight and testis index of natural aging rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织细胞形态学的影响

结果显示,与青年对照组比较,衰老模型组大鼠睾丸组织生精小管形态结构发生明显变化,生精细胞层数减少,排列紊乱,细胞疏松,各级生精细胞有不同程度脱落,生精小管基膜部分变得不完整。与衰老模型组比较,PNS 低、中、高剂量组睾丸组织生精小管形态结构明显改善,生精细胞数目显著增加,排列整齐紧密,见图 2。

3.3 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX 蛋白表达的影响

γ -H2AX 目前被认为是 DNA 损伤的生物标记物^[13]。免疫组化结果表明,与青年对照组相比,衰老模型组大鼠睾丸细胞核内 γ -H2AX 阳性灶点数显著升高;PNS 可降低衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX 阳性灶点数,见图 3。Western blotting 结果显示,与青年对照组比较,衰老模型组大鼠睾丸组织 γ -H2AX 蛋白表达显著增加($P < 0.01$),表明衰老



青年对照

衰老模型

PNS 10 mg·kg⁻¹

PNS 30 mg·kg⁻¹

PNS 60 mg·kg⁻¹

图 2 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织细胞形态学的影响

Fig. 2 Effect of PNS on testicular tissue morphology of natural aging rats

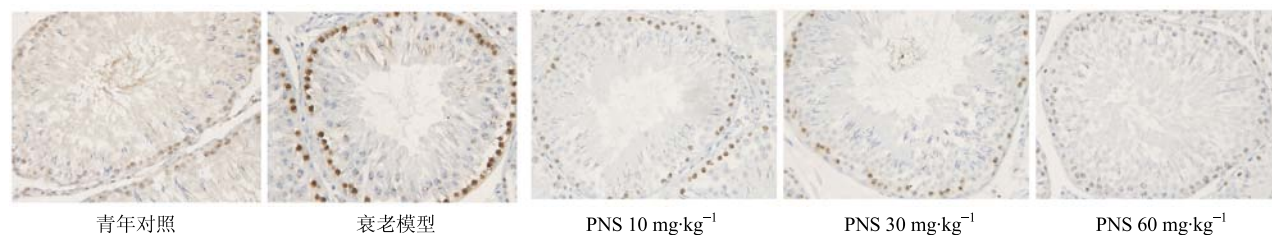


图 3 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX 蛋白表达的影响 (免疫组化染色)

Fig. 3 Effect of PNS on protein expression of γ -H2AX in testicular tissue of natural aging rats (immunohistochemical staining)

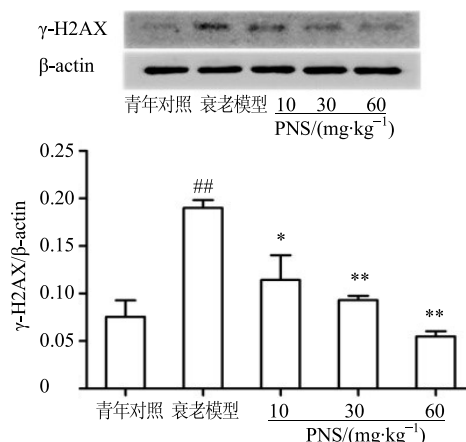
大鼠 DNA 损伤明显增加, PNS 可显著降低 γ -H2AX 蛋白的表达, 且具有剂量依赖性, 见图 4。

3.4 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 ATR 蛋白表达的影响

ATR 是 DNA 损伤反应的重要感应器, 免疫组化法检测 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 ATR 蛋白表达的变化, 结果见图 5。与青年对照组相比, 衰老模型组大鼠睾丸组织 ATR 阳性灶点数明显升高; PNS 低、中、高各剂量组均能不同程度降低衰老大鼠睾丸组织 ATR 阳性灶点数。

3.5 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 Chk1、p-P53、P21 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸组织 Chk1、p-P53、P21 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); PNS 可明显降低 Chk1、p-P53、P21 蛋白表达量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 6。



与青年对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与衰老模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs young control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs aging model group

图 4 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX 蛋白表达的影响 (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effect of PNS on protein expression of γ -H2AX in testicular tissue of natural aging rats (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

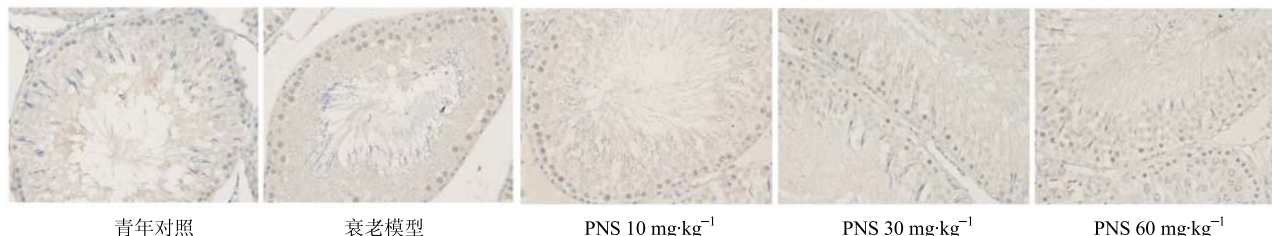
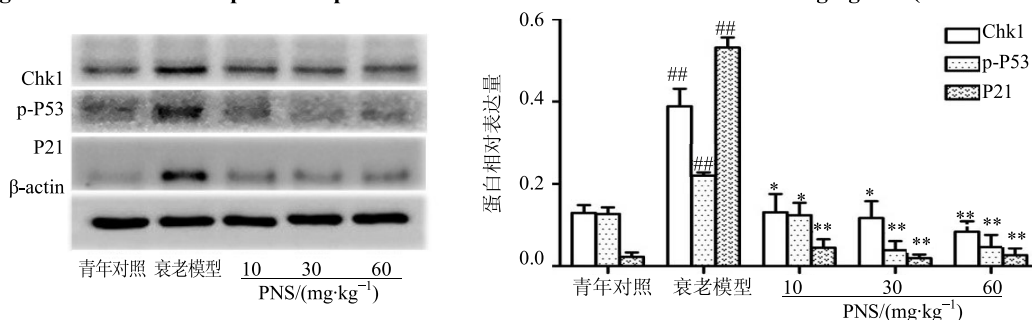


图 5 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 ATR 蛋白表达的影响 (免疫组化染色)

Fig. 5 Effect of PNS on protein expression of ATR in testicular tissue of natural aging rats (immunohistochemical staining)



与青年对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与衰老模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs young control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs aging model group

图 6 PNS 对自然衰老大鼠睾丸组织 Chk1、p-P53、P21 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Effect of PNS on protein expression of Chk1, p-P53, and P21 in testicular tissue of natural aging rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

衰老是机体各组织、器官功能随年龄增长而发生退行性变化的过程。本实验发现衰老模型组大鼠睾丸质量、睾丸指数明显降低,生精小管形态结构发生明显改变,生精细胞层数减少,给予 PNS 后,睾丸质量、睾丸指数有不同程度地增加,生精细胞数目明显增多,生精小管形态结构明显改善。提示 PNS 能够改善衰老所致大鼠睾丸功能减退。

DNA 作为生命活动中最重要的遗传物质,在衰老、氧化应激以及多种外界因素刺激下,会不可避免地发生多种类型的 DNA 损伤,例如 DNA 链断裂等。 γ -H2AX 是 DNA 双链损伤的起始感应蛋白,也是定量检测 DNA 双链断裂损伤程度的重要标志蛋白^[14]。Western blotting 显示,衰老模型组大鼠睾丸组织 γ -H2AX 蛋白表达水平明显增加。免疫组化结果进一步显示, γ -H2AX 主要表达于初级精母细胞核。主要原因是初级精母细胞处于减数分裂活跃期,由于染色质重组,容易受到内源性和外源性因素的影响,从而导致 DNA 损伤。PNS 各剂量组均能不同程度降低 γ -H2AX 的蛋白表达以及核内阳性灶点数,提示 PNS 可通过减轻睾丸 DNA 损伤程度,从而改善衰老所致生殖功能减退。

为应对 DNA 损伤,机体形成了一系列的细胞应激反应,包括 ATR-Chk1 途径的激活等^[15-17]。H2AX 是组蛋白家族中的一员,DNA 损伤发生后迅速被 DNA 损伤信号的重要感应器 ATR 等磷酸化,形成 γ -H2AX,随后 γ -H2AX 可招募 ATR 聚集于损伤部位,进而直接激活下游 P53^[18]。此外,ATR 也可通过激活 Chk1 激活下游 P53 信号通路^[19-20]。激活后的 P53 介导下游靶基因或通过蛋白之间的相互作用,从而促进细胞衰老、凋亡或 DNA 损伤修复等一系列细胞应激反应^[21]。P21 是位于 P53 下游的关键靶基因,活化的 P53 在转录水平活化 P21,从而使细胞滞留在 S 和 G₂/M 期,导致细胞衰老或 DNA 损伤的修复^[22]。因此,本实验采用免疫组织化学法检测了大鼠睾丸组织 ATR 的表达情况,发现衰老模型组大鼠睾丸组织 ATR 阳性灶点数显著升高,PNS 可明显降低 ATR 的阳性灶点数。此外,Western blotting 结果显示,衰老模型组 Chk1、p-P53、P21 蛋白表达均显著升高,PNS 各剂量组均能不同程度降低 Chk1、p-P53、P21 蛋白的表达。以上结果表明,PNS 可减轻衰老所致睾丸生殖细胞 DNA 损伤反应。

综上所述,PNS 可减轻衰老所致大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤,机制可能与通过调控 ATR 信号通路的传导及下游因子的激活有关。但是 PNS 延缓衰老,保护生殖功能的具体分子机制仍不够完善,有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Zitzmann M. Effects of age on male fertility [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol*, 2013, 27(4): 617-628.
- [2] 徐谊朝,朱伟杰,李菁,等. 有生育需求中老年男性精子参数的评价 [J]. *生殖与避孕*, 2014, 34(7): 599-602.
- [3] Jiang H, Zhu W J, Li J, et al. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2014, 46(5): 879-885.
- [4] Paul C, Robaire B. Ageing of the male germ line [J]. *Nat Rev Urol*, 2013, 10(4): 227-234.
- [5] Grégoire M C, Massonneau J, Simard O, et al. Male-driven de novo mutations in haploid germ cells [J]. *Mol Human Reprod*, 2013, 19(8): 495-499.
- [6] Goriely A, Wilkie A M. Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: Causes and consequences for human disease [J]. *Amer J Human Genet*, 2012, 90(2): 175-200.
- [7] 钟晓凤. 三七的药理作用及其临床应用研究 [J]. *中医临床研究*, 2015, 9(6): 116-117.
- [8] 崔红晶,安长新,陈东,等. 三七总苷对大鼠自身免疫性睾丸炎的拮抗作用 [J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(1): 19-21.
- [9] 李欢,苟欣. 三七总皂苷的抗凋亡作用对糖尿病性勃起功能障碍大鼠勃起功能的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(11): 1325-1330.
- [10] 江刘平,焦林如. 三七总皂苷的药用生物学活性研究进展 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2013, 35(3): 17-21.
- [11] 王莹,褚扬,李伟,等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [12] 高云涛,张文斌,杨利荣,等. 三七皂苷清除活性氧自由基及对 DNA 氧化损伤保护作用研究 [J]. *中药材*, 2008, 31(9): 1399-1402.
- [13] 黄清松,李红枝,张咏莉,等. 三七皂苷 Rg₁ 抗突变和抗肿瘤研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2006, 5(8): 1124-1125.
- [14] Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: A marker for DNA damage [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 920: 613-626.
- [15] Gutierrezmartinez P, Rossi D J, Beerman I. DNA damage

- and aging around the clock [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(8): 635-637.
- [16] Panda S, Isbatan A, Adami G R. Modification of the ATM/ATR directed DNA damage response state with aging and long after hepatocyte senescence induction *in vivo* [J]. *Mech Ageing Devel*, 2008, 129(6): 332-340.
- [17] Manic G, Obrist F, Sistigu A, *et al*. Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy [J]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2(4): e10129761-17.
- [18] Di-Siena S, Campolo F, Rossi P, *et al*. UV and genotoxic stress induce ATR relocalization in mouse spermatocytes [J]. *Int J Devel Biol*, 2013, 57(2/4): 281-287.
- [19] Shieh S Y, Ahn J, Tamai K, *et al*. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites [J]. *Genes Devel*, 2000, 14(3): 289-300.
- [20] Zhao T, Tang X, Umeshappa C S, *et al*. Simulated microgravity promotes cell apoptosis through suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF- κ B-regulated anti-apoptosis and p53/PCNA-and ATM/ATR-Chk1/2-controlled DNA-damage response pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(9): 2138-2148.
- [21] Zilfou J T, Lowe S W. Tumor suppressive functions of p53 [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(5): ab001883.
- [22] 李小曼, 徐红德, 蔺美娜, 等. DNA 损伤修复反应的双刃剑效应在肿瘤与衰老发生发展中的作用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(2): 134-140.