

淫羊藿苷激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤研究

尤 旭, 赵海霞, 杨思琪, 马琼艳, 张 艳, 杨 圆, 叶 勇, 袁 丁, 张长城*

三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

摘要: **目的** 探究淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤的保护作用及其分子机制。**方法** 将 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组, 分别为青年对照组 (2 月龄)、衰老模型组 (16 月龄) 和淫羊藿苷低、高剂量组 (2、6 mg/kg, 16 月龄), 每组 8 只, 给予普通或含药饲料饲养 4 个月, 禁食 12 h 后处死大鼠。HE 染色法观察睾丸组织形态变化; 黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法检测睾丸组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和丙二醛 (MDA) 水平; 免疫荧光法检测睾丸组织中核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 及 DNA 损伤相关蛋白 γ -H2AX 的表达和定位; Western blotting 法检测睾丸组织中 Nrf2 及其下游相关蛋白血红素氧合酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NQO1)、 γ -H2AX 和 DNA 损伤修复相关蛋白 p-p53 和 p21 表达水平。**结果** HE 染色结果表明, 淫羊藿苷能明显改善自然衰老大鼠睾丸组织形态学变化, 显著提高衰老大鼠睾丸组织 SOD 活力, 降低 MDA 水平; 免疫荧光结果显示, 淫羊藿苷能明显上调衰老大鼠睾丸组织中各级生精细胞内 Nrf2 蛋白表达水平, 明显下调初级精母细胞和精原细胞中 γ -H2AX 蛋白表达水平; Western blotting 结果显示, 淫羊藿苷能显著上调衰老大鼠睾丸组织中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平, 下调 γ -H2AX、p-p53 和 p21 蛋白表达水平。**结论** 淫羊藿苷可减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤, 其机制与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

关键词: 淫羊藿苷; Nrf2/HO-1 通路; 衰老; 睾丸; DNA 损伤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2915-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.025

Icariin attenuates DNA damage in testicular germ cells of natural aging rats by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway

YOU Xu, ZHAO Hai-xia, YANG Si-qi, MA Qiong-yan, ZHANG Yan, YANG Yuan, YE Yong, YUAN Ding, ZHANG Chang-cheng

Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: **Objective** To study the protective effects of icariin on DNA damage of testicular germ cells in natural aging rats and explore the possible mechanism. **Methods** In the study, the SD rats were separated into four groups at random, with eight rats in each group: adult control group (2 months old), aging model group (16 months old), low and high doses of icariin-treated groups (2 mg/kg and 6 mg/kg, 16 months old). The adult control group and the aging model group were fed with normal diet for four months. Icariin-treated groups were given medicated feed for four months. After fasting for 12 h, all the rats were put to death. The testicular morphology was observed using HE staining. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in testicular tissue were detected by xanthine oxidase method and thiobarbituric acid method, respectively. The protein expression of Nrf2 and γ -H2AX were detected by immunofluorescence. The relative protein expression levels of Nrf2, HO-1, NQO1, γ -H2AX, p-p53, and p21 were detected by Western blotting. **Results** HE staining results showed that icariin significantly improved the structure of testicular tissue of natural aging rats. Compared with the aging model group, icariin significantly increased the SOD activity and decreased the MDA content in testis. In addition, immunofluorescence results showed that icariin significantly decreased the expression of DNA damage response protein γ -H2AX and increased the protein expression of Nrf2 in testicular germ cells of aging rats.

收稿日期: 2019-01-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873077); 国家自然科学基金资助项目 (81573931); 国家自然科学基金资助项目 (81774316); 国家自然科学基金资助项目 (81503334)

作者简介: 尤 旭, 在读硕士研究生, 研究方向为药物有效性与安全性评价。Tel: 18272263608 E-mail: 552039347@qq.com

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

Moreover, Western blotting results showed that icariin significantly increased the relative protein expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO1 in testis, when compared with aging model group. In parallel, the relative protein expression levels of γ -H2AX, p-p53, and p21 were significantly decreased. **Conclusion** Icariin attenuates DNA damage in testicular germ cells of natural aging rats, which may be associated with the activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: icariin; Nrf2/HO-1 signaling pathway; aging; testis; DNA damage

由于社会、经济及工作压力等多种因素影响, 男性生育子代的年龄越来越晚^[1]。然而, 随着男性年龄的增加, 睾丸组织形态发生退行性改变, 雄性激素水平和精液质量(精子数量、活力)下降, 同时伴随着男性不育症和子代发生缺陷的比例明显上升^[2]。研究显示, 衰老过程中睾丸组织抗氧化能力下降^[3]和 DNA 损伤增多^[4]是导致睾丸生精功能障碍的重要因素, 而氧化应激又是导致睾丸生殖细胞 DNA 损伤的主要原因^[5]。因此, 增强睾丸组织抗氧化能力, 减轻生殖细胞 DNA 损伤可能是防治衰老相关睾丸生殖功能障碍的有效措施。

淫羊藿是我国补肾壮阳、强阳起痿方剂的常用中药。现代药理学研究显示, 淫羊藿具有延缓衰老和增强雄性生殖功能等作用, 其主要活性成分为淫羊藿苷^[6]。研究报道, 淫羊藿苷对链脲佐菌素、环磷酰胺等多种因素致大鼠睾丸病理损伤模型均有明显的改善作用^[7-8]。淫羊藿苷可提高 D-半乳糖致亚急性衰老大鼠睾丸组织抗氧化能力, 进而减轻睾丸组织损伤^[9]。此外, 淫羊藿苷可减轻小鼠心、肝、肺、肾等组织随增龄而发生的 DNA 损伤累积, 延长其平均寿命^[10]。淫羊藿苷还可减轻老年小鼠应对射线照射情况下脾脏 DNA 损伤累积, 延缓其衰老^[11]。但淫羊藿苷能否改善自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤尚未见报道。因此, 本实验探讨淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤的保护作用及其作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠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, 饲养于三峡大学实验动物中心, 室温(23±3)℃, 湿度(60±5)%, 12 h 阴暗交替。其中 2 月龄大鼠 8 只, 体质量(191.90±6.27)g; 16 月龄大鼠 24 只, 体质量(727.83±35.72)g。

1.2 药品

淫羊藿苷(批号 160920, 质量分数 98.61%)购于四川成都植标化纯生物技术有限公司。

1.3 仪器与试剂

LEICA TP 1020 全自动脱水机和 ULTRACUT R 超薄切片机购于德国 Leica 公司; CT15RT 高速冷冻离心机购于上海天美生化仪器设备工程有限公司; BX53 显微镜购于日本 Olympus 公司; A1R⁺激光共聚焦显微镜购于日本 Nikon 公司; PK-600S 水浴锅购于上海精宏实验设备有限公司; PowerPacTM Basic 电泳仪和 Mini PROTEAN3 Cell 电泳槽购于美国 Bio-Rad 公司; Bioshine ChemiQ4800 mini 化学发光凝胶成像显影设备购于上海欧翔科学仪器有限公司。

β -actin 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; γ -H2AX、p21、p-p53、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)和血红素氧合酶-1(HO-1)抗体购自 Santa Cruz 公司; 醌氧化还原酶-1(NQO1)抗体购自 Abcam 公司; 羊抗鼠、羊抗兔和兔抗羊二抗及牛血清白蛋白(BSA)购自武汉科瑞有限公司; Alexa Fluor 488 驴抗兔 IgG(H+L)抗体购自 Jackson Immuno Research 公司; DAPI 购自 Life Technologies 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司; BeyoECL Plus 超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术研究; 高蛋白脱脂高钙奶粉购自内蒙古伊利实业集团股份有限公司; 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 分组及给药

SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只, 即青年对照组(2 月龄)、衰老模型组(16 月龄)和淫羊藿苷低、高剂量(2、6 mg/kg, 16 月龄)组。其中青年对照组和衰老模型组给予普通饲料喂养, 淫羊藿苷各剂量组给予相应的含药饲料喂养, 持续 4 个月。在实验期间, 为了保证淫羊藿苷的准确剂量, 首先对衰老模型组每只大鼠的平均日摄食量进行监测, 每周监测所有大鼠体质量, 然后每个月制做相同质量含不同剂量淫羊藿苷的含药饲料。实时监测大鼠的进食量并及时作出调整。至青年对照组大鼠 6 月龄, 其他组 20 月龄时, 处死大鼠, 处死前

12 h 禁食不禁水。

2.2 大鼠睾丸组织病理学检查

将睾丸取出，室温固定于 4% 多聚甲醛溶液中，常规梯度乙醇脱水、二甲苯处理、石蜡包埋、切片，按标准操作进行苏木精和伊红染色，光学显微镜观察睾丸形态和结构变化，每张切片随机观察 5 个视野，并拍照取图。

2.3 大鼠睾丸组织 SOD 活力和 MDA 水平测定

取新鲜睾丸组织，按照 1:9 加入低温生理盐水后机械匀浆，4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min，取上清，按照试剂盒说明书测定 SOD 活力和 MDA 水平。

2.4 免疫荧光法检测大鼠睾丸组织 Nrf2 和 γ -H2AX 蛋白表达及定位

取睾丸石蜡切片置于 60 ℃ 烘箱烤片至蜡熔，后经二甲苯与梯度乙醇脱蜡，用柠檬酸修复液高压修复抗原 10~15 min。待冷却至室温后，5% BSA 封闭 1 h，孵育一抗，4 ℃ 过夜。二抗 37 ℃ 孵育 1 h 后，DAPI 染色 10 min，最后抗荧光淬灭剂封片，4 ℃ 避光保存。在激光共聚焦显微镜下进行观察，每张切片随机观察 5 个视野并拍照取图。各组实验各重复 3 次。

2.5 Western blotting 法检测大鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、NQO1、 γ -H2AX、p-p53 和 p21 蛋白表达

取 30~40 mg 新鲜睾丸组织，加入含磷酸化蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，匀浆。于冰上裂解 1 h 后，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。取上清，采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定，按照 4:1 加入上样缓冲液，95 ℃ 加热 10 min 灭活。每孔等量蛋白上样，聚丙烯酰胺凝胶电泳并恒流转

PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后，加入一抗 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗 3 次，每次 5 min。随后，加入二抗室温孵育 1 h，最后 ECL 化学发光法显影。各组实验各重复 3 次。

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对 Western blotting 条带进行灰度扫描，采用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析。各组均数之间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织形态学的影响

与青年对照组比较，衰老模型组大鼠睾丸生精小管发生显著变化，部分生精小管出现严重萎缩，基膜不完整，各级生精细胞不同程度脱落，层数减少。淫羊藿苷干预后，衰老睾丸生精小管形态结构得到明显改善，生精细胞数目显著增加，排列整齐紧密，结果见图 1。

3.2 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织 SOD 活力和 MDA 水平的影响

结果如图 2 所示，与青年对照组比较，衰老模型组大鼠睾丸组织 SOD 活力显著降低，而 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与衰老模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量均可不同程度提高衰老大鼠睾丸组织 SOD 活力，同时降低其 MDA 水平 ($P < 0.05, 0.01$)，提示淫羊藿苷可显著提高衰老睾丸抗氧化能力。

3.3 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达的影响

免疫荧光和 Western blotting 结果显示(图 3、4)，

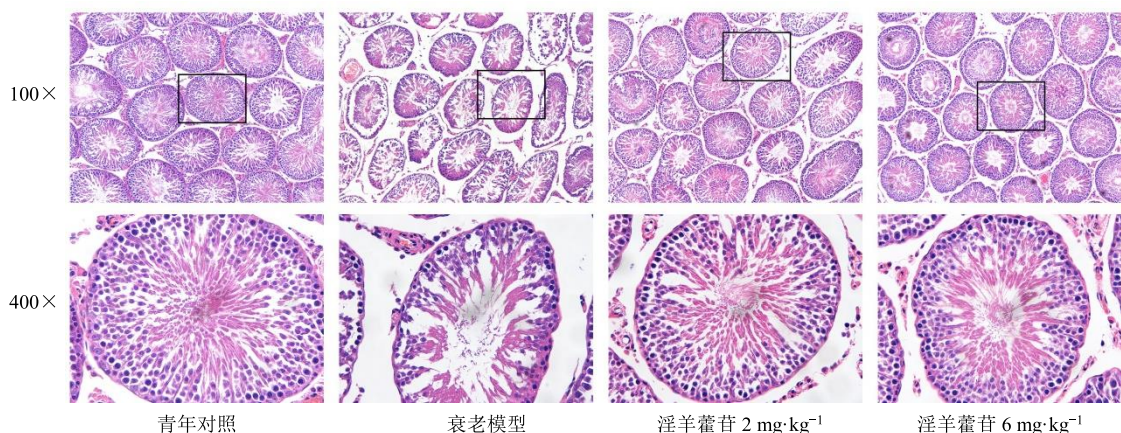
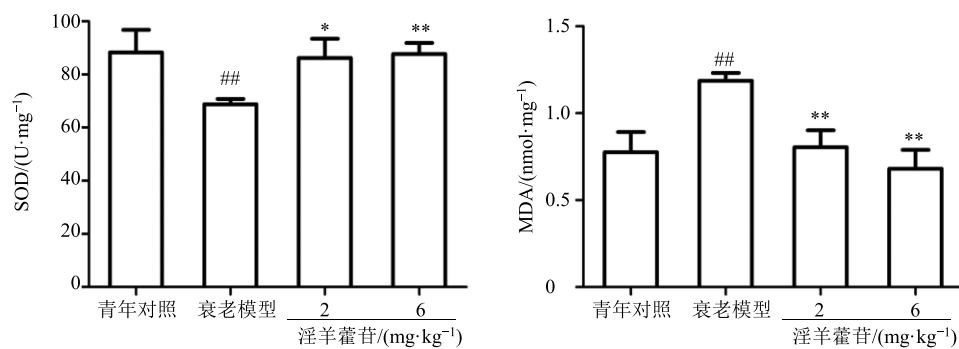


图 1 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织形态学的影响

Fig. 1 Effect of icariin on testicular morphology of natural aging rats



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 adult control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs aging model group

图2 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织 SOD 活力和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of icariin on SOD activity and MDA content in testicular tissue of natural aging rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

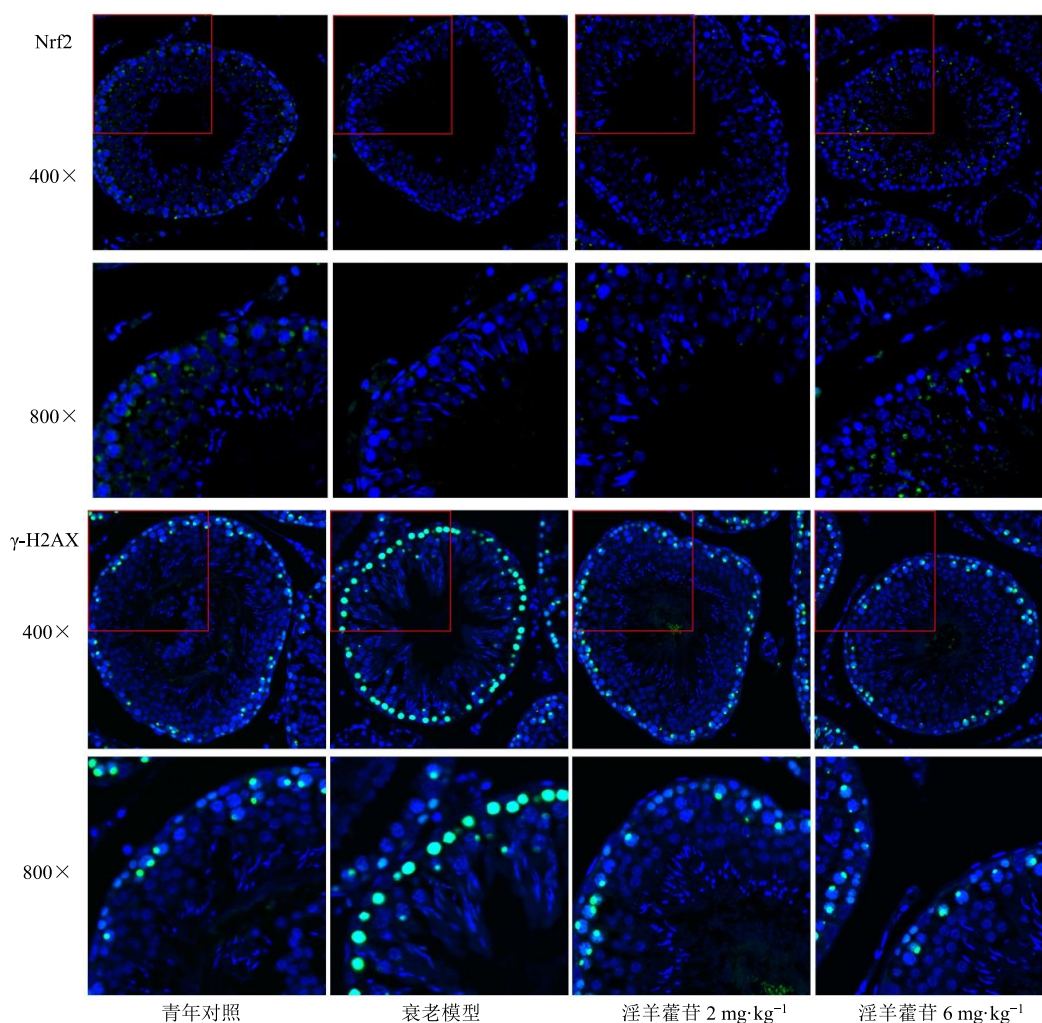


图3 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织 Nrf2、 γ -H2AX 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of icariin on protein expression of Nrf2 and γ -H2AX in testicular tissue of natural aging rats

与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸组织中 Nrf2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), 且主要表达于各级生精细胞。此外, Western blotting 结果显示, 衰老模型组大鼠睾丸组织中 Nrf2 下游相关分子

HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平亦显著降低 ($P < 0.001$)。淫羊藿苷干预后则可显著提高自然衰老大鼠睾丸中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

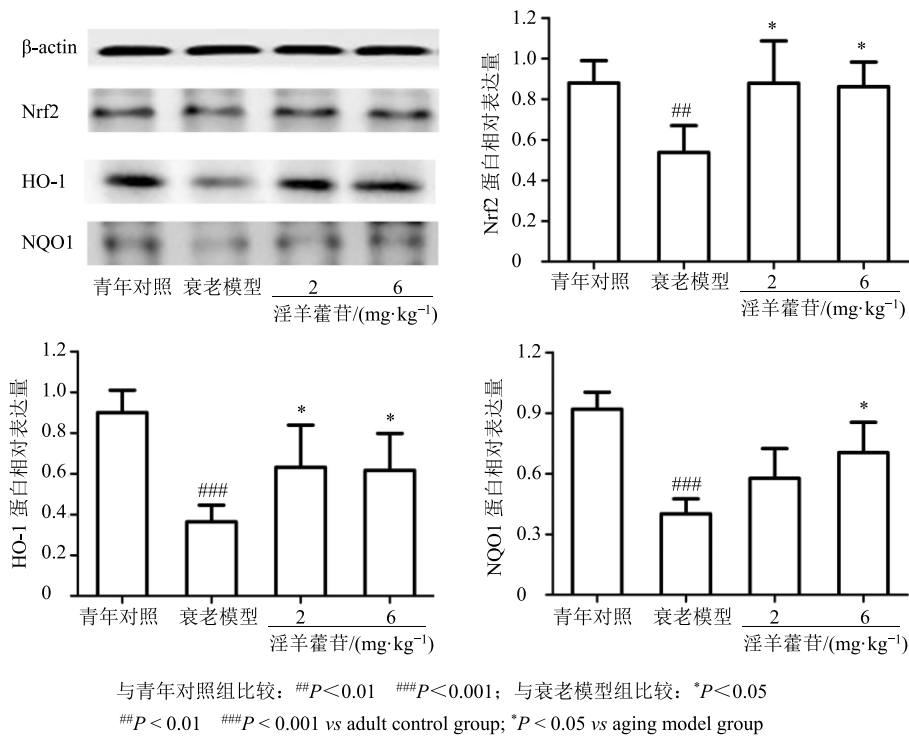


图 4 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of icariin on protein expression levels of Nrf2, HO-1, and NQO1 in testicular tissue of natural aging rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX、p-p53 和 p21 蛋白表达的影响

免疫荧光和 Western blotting 结果显示, 与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸中 γ -H2AX 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 且主要表达于初级精母细胞和精原细胞。给予淫羊藿苷干预后, 衰老

大鼠睾丸组织中 γ -H2AX 蛋白表达水平降低, 其中高剂量组差异显著 ($P < 0.001$)。结果见图 3、5。

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 p-p53 和 p21 蛋白表达水平呈显著上升趋势。淫羊藿苷干预后, 衰老大鼠睾丸中 p-p53 和 p21 蛋白表达水平显著下调, 见图 5。

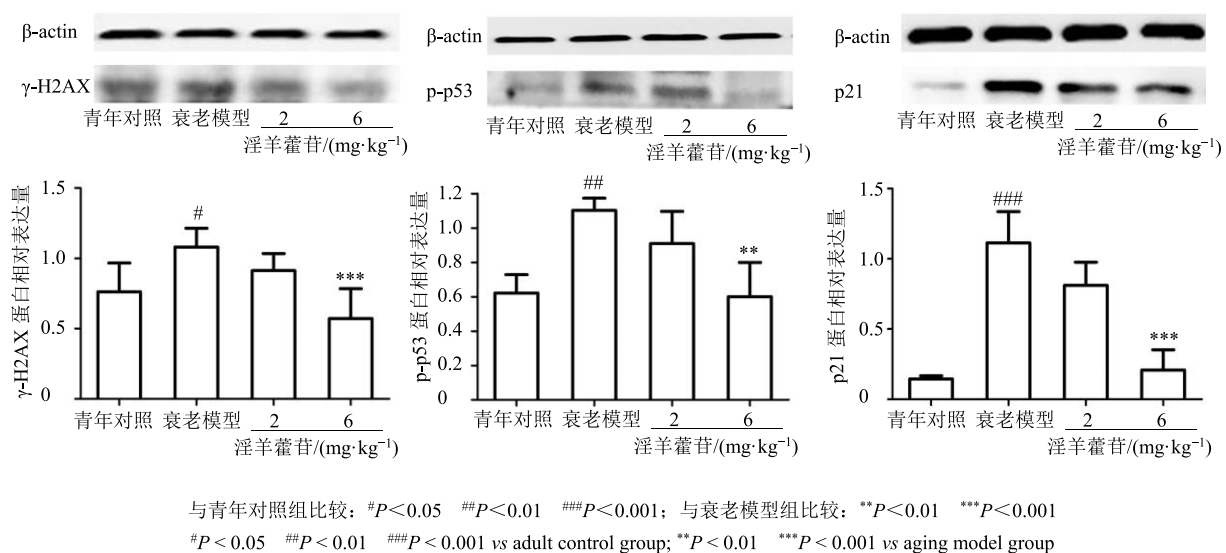


图 5 淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸组织中 γ -H2AX、p-p53 和 p21 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of icariin on protein expression levels of γ -H2AX, p-p53, and p21 in testicular tissue of natural aging rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

衰老是器官功能和个体机能随时间推移而发生退化的过程。衰老在生物界中普遍存在,其特征之一为性腺功能的退化。睾丸是男性生殖系统的重要器官,具有合成、分泌雄激素和产生精子的能力。大量研究显示,衰老睾丸生精小管形态结构发生明显改变,如出现萎缩、生精细胞层数明显减少和各级细胞排列疏松等^[12]。本研究发现,淫羊藿苷干预后,自然衰老大鼠睾丸生精小管形态结构得到明显改善,提示淫羊藿苷对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞具有一定的保护作用。

近期研究显示,在导致机体衰老的内外因素中,氧化应激是引起机体衰老相关生理功能下降的主要原因^[13]。SOD 是体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,其活性的高低可反映组织抗氧化能力的高低。而 MDA 作为体内脂质过氧化反应的终产物,是评价衰老的重要指标之一,也可反映组织氧化程度。本课题组前期研究结果显示,自然衰老大鼠睾丸组织中 SOD 活力显著下降,MDA 水平显著增加^[13]。本研究发现,淫羊藿苷干预后,可显著提高自然衰老大鼠睾丸中 SOD 活力,降低其 MDA 水平。该实验结果初步表明淫羊藿苷能够提高自然衰老大鼠睾丸组织的抗氧化能力。

已知 Nrf2/HO-1 通路是机体内最重要的是抗氧化系统之一^[14-15]。研究表明,Nrf2 信号途径被激活后,Nrf2 转移到细胞核并诱导其靶基因 NQO1、HO-1 等多种保护性基因的转录,进而减轻氧化应激损伤^[16-17]。多项研究显示,衰老过程中 Nrf2 及其靶基因的表达均呈下降趋势,而 Nrf2/HO-1 通路的激活可以上调许多抗氧化基因的表达,减轻组织氧化损伤^[18-19]。本课题组前期研究发现,自然衰老大鼠睾丸中 Nrf2/HO-1 信号通路呈下调趋势。本研究发现,淫羊藿苷干预后可显著提高自然衰老大鼠睾丸中 Nrf2 及其下游靶分子 HO-1 和 NQO1 的蛋白表达水平,提示淫羊藿苷可激活衰老睾丸组织中 Nrf2/HO-1 信号通路发挥抗氧化损伤的作用。

最新研究显示,氧化应激反应可加重精子 DNA 损伤,是引起男性不育症的重要原因^[20]。 γ -H2AX 是 DNA 双链损伤的起始感应蛋白,可应答于各种因素诱导的 DNA 损伤磷酸化位点,并迅速聚集于细胞核损伤部位,是定量检测 DNA 双链断裂损伤程度的重要标志蛋白^[21-23]。有文献报道,衰老过程中睾丸生殖细胞 γ -H2AX 蛋白表达水平增加,表明

DNA 损伤增加^[24]。为应对 DNA 损伤,机体形成了一系列的细胞应激反应,包括 p53/p21 途径的激活等^[25]。p53 是哺乳动物细胞 DNA 损伤修复反应途径中最主要的转录因子^[26],其可与 γ -H2AX 协同修复 DNA 损伤或诱导细胞死亡^[27]。当 DNA 损伤时,p53 发生磷酸化而被激活,活化的 p53 又能上调其下游靶基因 p21 的表达,引起细胞周期 G₁ 期的有效阻滞,从而减少受损 DNA 的累积和复制^[25,28-29]。本课题组前期研究显示,衰老大鼠睾丸组织中 γ -H2AX、p-p53 和 p21 蛋白表达显著升高^[23]。本研究发现淫羊藿苷能显著降低自然衰老大鼠睾丸中 γ -H2AX、p-p53 和 p21 蛋白表达水平。以上结果提示,淫羊藿苷可减轻衰老所致大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤。

综上所述,淫羊藿苷可减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤,改善衰老所致生殖功能衰退,其机制与激活 Nrf2/HO-1 信号通路增强睾丸组织抗氧化能力有关。本实验为淫羊藿苷治疗衰老相关男性生殖功能障碍提供新的思路。但淫羊藿苷改善衰老睾丸生殖细胞 DNA 损伤的详细分子机制有待进一步研究,后续本课题组将进行更深入的探讨。

参考文献

- [1] 张欣宗,韩富强,吴颖. 高龄男性生育子代健康风险[J]. 中国计划生育和妇产科,2014,6(7): 20-23.
- [2] Sartorius G A, Nieschlag E. Paternal age and reproduction[J]. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(1): 65-79.
- [3] 樊华,李文. 雄性生殖氧化应激损伤的研究进展[J]. 中国临床医学,2016,23(2): 242-246.
- [4] Paul C, Nagano M, Robaire B. Aging results in molecular changes in an enriched population of undifferentiated rat spermatogonia [J]. *Biol Reprod*, 2013, doi: 10.1095/biolreprod.113.112995.
- [5] 秦欣然,薛春然,彭麒桦,等. 氧化应激对男性(雄性)生殖系统的影响[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2018,37(6): 492-497.
- [6] 王焕珍,柴艺汇,陈云志,等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2016,12(7): 63-65.
- [7] 李丹,魏莎莉,谢怡,等. 淫羊藿苷对糖尿病大鼠睾丸中亚硝基谷胱甘肽还原酶及 Bcl-2 的影响[J]. 解剖学杂志,2013,36(1): 25-28.
- [8] 高学勇,林珊,韩咪莎. 淫羊藿苷调节雄性大鼠生殖功能[J]. 解剖学杂志,2013,36(4): 740-742.
- [9] 谢高宇,陈凯,刘浩然,等. 淫羊藿苷对 D-半乳糖致衰老大鼠睾丸组织 MMP-2 及 MMP-9 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(16): 3458-3460.

- [10] Zhang S Q, Cai W J, Huang J H, *et al.* Icariin, a natural flavonol glycoside, extends healthspan in mice [J]. *Exp Gerontol*, 2015, doi: 10.1016/j.exger.2015.06.020.
- [11] 陈晓亮, 张素琴. 淫羊藿苷延缓衰老过程中对 ATM-Chk2-p53 通路的调节作用 [J]. 老年医学与保健, 2016, 22(6): 341-344.
- [12] Miranda E P, Lorenzini F, Neves B, *et al.* Stereological and morphological analysis of the effects of aging on spermatogenesis in rat testis 1 [J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33(10): 904-913.
- [13] 马娜, 赵海霞, 陈茜, 等. 五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 氧化损伤的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2985-2990.
- [14] Khodir A E, Said E, Atif H, *et al.* Targeting Nrf2/HO-1 signaling by crocin: Role in attenuation of AA-induced ulcerative colitis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.133.
- [15] Song Y, Huang L, Yu J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.11.001.
- [16] Li Z, Feng H, Wang Y, *et al.* Rosmarinic acid protects mice from lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by inhibiting MAPKs/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 465-472.
- [17] Li L, Dong H, Song E, *et al.* Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, doi: 10.1016/j.cbi.2013.12.005.
- [18] Liu X, Lin X, Zhang S, *et al.* Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Aging*, 2018, 10(8): 2016-2036.
- [19] Zhang H, Davies K J A, Forman H J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036.
- [20] 刘建, 陈朝晖, 李文杰, 等. 氧化应激反应与不育症患者精子 DNA 损伤的相关性研究 [J]. 临床医学工程, 2018, 25(6): 791-792.
- [21] Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: A marker for DNA damage [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-998-3_40.
- [22] An J, Huang Y C, Xu Q Z, *et al.* DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, doi: 10.1186/1471-2199-11-18.
- [23] 马娜, 赵海霞, 陈茜, 等. 基于 P53/P21 和碱基切除修复通路的五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤的保护作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1379-1384.
- [24] Selvaratnam J S, Robaire B. Effects of aging and oxidative stress on spermatozoa of superoxide-dismutase 1-and catalase-null mice [J]. *Biol Reprod*, 2016, doi: 10.1095/biolreprod.116.141671.
- [25] Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(4): 501-517.
- [26] Talukder K A, Azmi I J, Ahmed K A, *et al.* Activation of p53/ATM-dependent DNA damage signaling pathway by shiga toxin in mammalian cells [J]. *Microb Pathog*, 2012, 52(6): 311-317.
- [27] Kawase T, Kamiya M, Hayama K, *et al.* X-ray and ultraviolet C irradiation-induced γ -H2AX and p53 formation in normal human periosteal cells *in vitro*: Markers for quality control in cell therapy [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1): 112-123.
- [28] Dolan D W P, Zupanic A, Nelson G, *et al.* Integrated stochastic model of DNA damage repair by non-homologous end joining and p53/p21-mediated early senescence signalling [J]. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11(5): e1004246.
- [29] Zilfou J T, Lowe S W. Tumor suppressive functions of p53 [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a001883.