

分类号：

单位代码：10140

密 级：公开

学 号：4032032340

遼寧大學

# 硕 士 学 位 论 文

中文题目：EGCG 对丙烯酰胺诱导大鼠睾丸损伤的抑制机制研究

英文题目：Inhibitory mechanism of EGCG on acrylamide-induced  
testicular injury in rats

论文作者：谢 言 真

指导教师：曹 向 宇 教授

专 业：食 品 科 学

完成时间：二〇二三年五月

申请辽宁大学硕士学位论文

EGCG 对丙烯酰胺诱导大鼠睾丸损伤的抑制  
机制研究

Inhibitory mechanism of EGCG on acrylamide-induced  
testicular injury in rats

作者： 谢言真

指导教师： 曹向宇教授

专业： 食品科学

答辩日期： 2023年5月12日

二〇二三年五月

## 摘要

丙烯酰胺 (Acrylamide, ACR) 是美拉德反应的产物之一, 广泛存在于富含碳水化合物的油炸或烘焙食品中。在科研与工业生产方面, ACR 常作为实验室试剂与工业原料, 造成人们职业暴露与环境暴露。此外, ACR 也存在于香烟烟雾中。已有研究表明, ACR 在生殖、神经、遗传等方面具有明确的毒性作用。广泛暴露于人群的 ACR 严重威胁着人体健康。因此, 探究如何抑制 ACR 的毒性作用意义重大。研究表明, ACR 具有生殖毒性, 能够造成睾丸组织损伤。表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 是绿茶的主要生物活性成分之一, 具有抗氧化等生物活性。有文献表明, EGCG 能抑制 ACR 的神经毒性, 但 EGCG 对 ACR 的睾丸毒性是否有抑制作用及其作用机制尚不明确。

本研究首先以 SD 大鼠为研究对象, 建立 ACR 损伤模型, 探究 EGCG 对 ACR 诱导大鼠睾丸损伤的抑制作用。记录大鼠体重及睾丸脏器指数变化以探究 EGCG 对 ACR 睾丸毒性的影响; 通过对睾丸组织进行 HE 染色和 TUNEL 染色, 分析 EGCG 对 ACR 诱导大鼠睾丸组织病理学改变和细胞凋亡的影响; 利用免疫组织化学技术检测 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸 FSH、LH 及 PCNA 的表达水平的影响。之后, 运用生物信息学方法分析 NCBI 数据库中 ACR 诱导睾丸组织损伤的相关数据集, 并根据  $P_{adj} < 0.05$  且  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$  的条件筛选差异表达基因; 基于 STRING 数据库对差异表达基因进行蛋白互作网络构建, 并使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件得出重要功能模块, 以得到关键基因; 对关键基因进行 GO 和 KEGG 富集分析得到 ACR 诱导睾丸损伤的关键基因富集信号通路, 预测 ACR 睾丸毒性的机制。在此基础上, 利用 qPCR 技术及 Western Blot 技术验证关键基因, 并检测核糖体蛋白 S9 (Ribosomal protein S9, RpS9) 及其参与的 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白, 核糖体蛋白 L5 (Ribosomal protein L5, RpL5) 及其参与的核糖体蛋白-MDM2-p53 信号通路、细胞周期和 DNA 损伤应答等信号通路相关蛋白, 以及细胞色素 C 氧化酶 6c (Cytochrome C Oxidase Subunit VIc, Cox6c) 和细胞色素 C 氧化酶 7a2 (Cytochrome C Oxidase Subunit VIIa-L, Cox7a2) 及其影响的线粒体途径凋亡和 MAPK 信号通路相关蛋白的表达, 在核糖体损伤和线粒体损伤的角度分析 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制机制。

结果显示, EGCG 能抑制 ACR 造成的大鼠体重及睾丸脏器指数显著下降、

## 摘 要

睾丸组织形态受损、凋亡细胞数显著上升以及 FSH、LH 和 PCNA 表达水平显著降低,表明 EGCG 能够明显缓解 ACR 诱导的睾丸损伤。基于生物信息学分析发现, ACR 诱导睾丸损伤的关键基因主要参与核糖体生物发生等生物学过程,影响线粒体蛋白复合物和核糖体亚基等细胞组分,具有组成核糖体结构成分等分子功能,在核糖体等信号通路上富集,这表明 ACR 损伤睾丸的毒性机制可能与核糖体损伤和线粒体损伤有关。ACR 处理后,大鼠睾丸中 RpS9 和 RpL5 的 mRNA 表达量及蛋白表达水平与 Control 组相比均出现显著下降。与 ACR 组相比,EGCG 显著上调了以上基因的表达及睾丸中 SENP1、MDM2 和 p53 蛋白表达水平,抑制了 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,显著下调了 Cyclin B1、p-Chk2/Chk2、p-Chk1/Chk1、p21 等细胞周期调控蛋白及 $\gamma$ H2AX/H2AX 等 DNA 损伤应答相关蛋白的表达水平,说明 EGCG 可能通过调节 RpS9 和 RpL5 的表达影响细胞增殖、炎症、细胞周期调控及 DNA 损伤应答,抑制 ACR 睾丸毒性。ACR 损伤大鼠睾丸中 Cox6c 和 Cox7a2 的 mRNA 表达量及蛋白表达水平与 Control 组相比均出现显著下降。与 ACR 组相比,EGCG 显著上调了以上基因的表达,显著抑制了 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、CytC 等线粒体途径凋亡相关蛋白的表达水平,显著降低了 MAPK 信号通路相关蛋白磷酸化水平,说明 EGCG 可能通过影响 Cox6c 和 Cox7a2 的表达,调控线粒体途径凋亡和 MAPK 信号通路等发挥对 ACR 睾丸毒性的抑制作用。以上结果表明,EGCG 能有效改善 ACR 诱导的大鼠睾丸组织损伤,其作用机制可能与抑制核糖体和线粒体损伤有关。

本研究在动物水平上证明了 EGCG 能有效抑制 ACR 的睾丸毒性,并探究了 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制机理,为降低 ACR 对人类健康的潜在危害提供理论基础及相关实验依据,同时也为更深入全面地探索 EGCG 的活性功能提供支持。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯, 丙烯酰胺, 睾丸毒性, 核糖体损伤, 线粒体损伤

## ABSTRACT

Acrylamide (ACR) is one of the products of the Maillard reaction and widely found in carbohydrate-rich fried or baked foods. In scientific research and industrial production, ACR is often used as a laboratory reagent and industrial raw material, causing occupational and environmental exposure to humans. In addition, ACR is also found in cigarette smoke. Studies have shown that ACR has clear toxic effects in reproduction, neurology, and genetics. The widespread exposure of ACR to the population poses a serious threat to human health, therefore, exploring how to inhibit the toxic effects of ACR is significant. Studies have shown that ACR has reproductive toxicity and can cause testis tissue damage. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is one of the main bioactive components of green tea, which has many biological activities such as antioxidant capacity. It has been shown that EGCG can inhibit the neurotoxicity of ACR, but whether EGCG has an inhibitory effect on the testicular toxicity of ACR and its mechanism are unclear.

In this study, SD rats were used to establish the ACR injury model to investigate the inhibitory effect of EGCG on ACR-induced testicular injury. The effect of EGCG on ACR-induced testicular toxicity was investigated by recording the body weight and testis index of the rats. The effects of EGCG on ACR-induced pathological changes and cell apoptosis in rat testis tissue were detected by HE staining and TUNEL staining. The effects of EGCG on the expression levels of FSH, LH and PCNA in rat testis were examined by immunohistochemistry. Then, bioinformatics method was used to analyze the data set related to ACR-induced testis tissue damage in the NCBI database, and the differentially expressed genes were screened according to the conditions of  $\text{adj. } P < 0.05$  and  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ . The protein-protein interaction network was constructed based on the STRING database for the differentially expressed genes, and the MCODE plugin of Cytoscape software were used to derive important functional modules to obtain the key genes. GO and KEGG enrichment analysis of the key genes were conducted to obtain the key genes enrichment signaling pathways of ACR-induced testicular injury and predicted the

testicular toxicity mechanism of ACR. On this basis, qPCR and Western Blot techniques were used to validate the key genes and detect the expression of ribosomal protein S9 (RpS9) and its involved in NF- $\kappa$ B signaling pathway-related proteins, ribosomal protein L5 (RpL5) and its involved in ribosomal protein-MDM2-p53 signaling pathway, cell cycle and DNA damage response signaling pathway-related proteins, cytochrome C oxidase 6c (Cox6c) and cytochrome C oxidase 7a2 (Cox7a2) and their impact on mitochondrial pathway apoptosis and MAPK signaling pathway-related proteins, to analyze the inhibitory mechanism of EGCG on ACR-induced testicular injury from the perspective of ribosomal injury and mitochondrial injury.

The results showed that EGCG could inhibit the significant decrease in body weight and testis index, testis tissue morphology damage, the significant increase in the number of apoptotic cells and the significant decrease in FSH, LH and PCNA expression levels caused by ACR, indicating that EGCG could significantly alleviate the testicular damage induced by ACR. Based on bioinformatics analysis, it was found that the key genes of ACR-induced testis injury mainly involved in biological processes such as ribosome biogenesis, affected cellular components such as mitochondrial protein complexes and ribosomal subunits, and had molecular functions such as composing structural components of ribosomes, and were enriched in signaling pathways such as ribosomes-related signaling pathways, these results suggested that the toxic mechanism of testicular damage caused by ACR may be related to ribosomal damage and mitochondrial damage. The mRNA expression and protein expression levels of RpS9 and RpL5 in rat testis after ACR treatment were significantly decreased compared to the Control group. Compared with the ACR group, EGCG significantly upregulated the expression of the above genes and the expression of SENP1, MDM2 and p53 proteins in testis, and significantly inhibited the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway and significantly downregulated the expression of cell cycle regulatory proteins such as Cyclin B1, p-Chk2/Chk2, p-Chk1/Chk1, p21 and DNA damage response-related proteins such as  $\gamma$ H2AX/H2AX, suggesting that EGCG may affect cell proliferation, inflammation, cell cycle regulation and DNA damage response to inhibit ACR testicular toxicity through regulating the expression of RpS9 and RpL5. The mRNA expression and

protein expression levels of Cox6c and Cox7a2 in the testis of ACR-injured rats showed a significant decrease compared with the Control group. Compared with the ACR group, EGCG significantly upregulated the expression of the above genes, significantly inhibited the expression levels of mitochondrial apoptosis pathways-related proteins such as Bax/Bcl-2, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3 and CytC, and significantly decreased the phosphorylation levels of proteins related to MAPK signaling pathway, indicating that EGCG may regulate mitochondrial pathway apoptosis and MAPK signaling pathway by affecting the expression of Cox6c and Cox7a2, in order to exert an inhibitory effect on the testicular toxicity of ACR. The above results suggested that EGCG can effectively improve ACR-induced testis tissue damage in rats, and its mechanism may be related to the inhibition of ribosomal damage and mitochondrial damage.

This study demonstrated that EGCG can effectively inhibit the testicular toxicity of ACR, and investigated the inhibition mechanism of EGCG on ACR-induced testicular damage at the animal level, which provides a theoretical basis and relevant experimental basis for reducing the potential hazard of ACR to human health, and also provides support for a more in-depth and comprehensive exploration of the active function of EGCG.

**Key words:** Epigallocatechin-3-gallate, Acrylamide, Testicular toxicity, Ribosomal damage, Mitochondrial damage

# 目 录

引言.....	1
0.1 丙烯酰胺的研究进展.....	1
0.1.1 丙烯酰胺概述.....	1
0.1.2 丙烯酰胺的来源.....	1
0.1.3 丙烯酰胺的睾丸毒性.....	3
0.2 EGCG 的研究进展.....	4
0.2.1 EGCG 概述.....	4
0.2.2 EGCG 的生物活性作用.....	4
0.3 研究内容及意义.....	5
0.3.1 研究内容.....	5
0.3.2 技术路线.....	6
0.3.3 研究意义.....	7
第 1 章 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制作用.....	8
1.1 实验材料.....	9
1.1.1 实验试剂.....	9
1.1.2 实验耗材.....	9
1.1.3 仪器设备.....	9
1.2 实验方法.....	10
1.2.1 动物模型的建立.....	10
1.2.2 样本取材.....	10
1.2.3 脏器指数测定.....	11
1.2.4 组织病理学观察.....	11
1.2.5 TUNEL 染色.....	11
1.2.6 免疫组织化学.....	12
1.2.7 统计分析.....	12
1.3 实验结果.....	13
1.3.1 EGCG 对 ACR 损伤大鼠的体重及脏器指数的影响.....	13
1.3.2 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸的组织形态结构的影响.....	13
1.3.3 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞凋亡的影响.....	14
1.3.4 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 FSH、LH、PCNA 蛋白表达水平的影响.....	15
1.4 讨论.....	17
1.5 小结.....	19
第 2 章 基于生物信息学分析 ACR 诱导睾丸组织损伤的毒性机制.....	20



2.1 方法.....	21
2.1.1 数据集检索.....	21
2.1.2 数据集评价.....	21
2.1.3 差异表达基因筛选.....	21
2.1.4 关键基因筛选.....	21
2.1.5 关键基因 GO、KEGG 分析.....	21
2.2 结果.....	22
2.2.1 数据集 GSE47574 数据预处理.....	22
2.2.2 ACR 处理导致的差异表达基因.....	23
2.2.3 ACR 处理导致的差异表达基因的蛋白互作网络.....	24
2.2.4 GO 分析 ACR 处理导致差异表达的关键基因的富集通路 ..	25
2.2.5 KEGG 分析 ACR 处理导致差异表达的关键基因的富集通 路 .....	26
2.3 讨论.....	27
2.4 小结.....	29
第 3 章 EGCG 对 ACR 诱导睾丸核糖体损伤的抑制机制.....	30
3.1 实验材料.....	31
3.1.1 实验试剂.....	31
3.1.2 实验耗材.....	32
3.1.3 仪器设备.....	32
3.2 实验方法.....	33
3.2.1 实时荧光定量检测.....	33
3.2.2 Western Blot.....	35
3.2.3 数据处理.....	37
3.3 实验结果.....	38
3.3.1 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9 和 RpL5 mRNA 表达 水平的影响 .....	38
3.3.2 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9、SENP1、RpL5、 MDM2 和 p53 蛋白表 达 水 平 的 影 响 .....	39
3.3.3 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达 水平的影响 .....	41
3.3.4 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞周期相关蛋白表达水 平的影响 .....	43
3.3.5 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 DNA 损伤应答相关蛋白的 影响 .....	45
3.4 讨论.....	47
3.5 小结.....	49

第4章 EGCG 对 ACR 诱导睾丸线粒体损伤的抑制机制.....	50
4.1 实验材料.....	51
4.2 实验方法.....	51
4.2.1 实时荧光定量检测.....	51
4.2.2 Western Blot.....	51
4.2.3 数据处理.....	51
4.3 实验结果.....	52
4.3.1 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 mRNA 表 达水平的影响.....	52
4.3.2 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 蛋白表达 水平的影响.....	53
4.3.3 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织线粒体途径凋亡相关蛋 白表达水平的影响.....	54
4.3.4 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 MAPK 信号通路相关 蛋白表达水平的影响.....	56
4.4 讨论.....	58
4.5 小结.....	60
第5章 结论与展望.....	61
5.1 结论.....	61
5.2 展望.....	61
参考文献.....	62

## 图表目录

### 图目录

图 0-1 技术路线图 .....	7
图 1-1 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠的体重及睾丸脏器指数的影响 .....	13
图 1-2 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸的组织形态结构的影响 .....	14
图 1-3 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞凋亡的影响 .....	15
图 1-4 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 FSH 蛋白表达水平的影响 ..	16
图 1-5 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 LH 蛋白表达水平的影响 ...	16
图 1-6 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 PCNA 蛋白表达水平的影响 .	17
图 2-1 样本归一化箱式图 .....	22
图 2-2 主成分分析图 .....	23
图 2-3 两组样本数据 UMAP 图 .....	23
图 2-4 差异表达基因火山图 .....	24
图 2-5 差异表达基因热图 .....	24
图 2-6 差异表达基因的蛋白互作网络图及功能模块 .....	25
图 2-7 关键基因 GO 富集分析 .....	26
图 2-8 关键基因 KEGG 富集分析 .....	27
图 3-1 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9 和 RpL5 mRNA 表达水平的 影响 .....	38
图 3-2 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9 和 SENP1 蛋白表达水平的 影响 .....	40
图 3-3 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpL5、MDM2 和 p53 蛋白表达 水平的影响 .....	41
图 3-4 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水 平的影响 .....	42
图 3-5 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞周期相关蛋白表达水平的影 响 .....	44
图 3-6 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 DNA 损伤应答相关蛋白表达水 平的影响 .....	46

## 图表目录

图 4-1 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 mRNA 表达水平的影响 .....	52
图 4-2 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 蛋白表达水平的影响 .....	53
图 4-3 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织线粒体途径凋亡相关蛋白表达水平的影响 .....	55
图 4-4 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平的影响 .....	57

## 表目录

表 1.1 主要试剂及生产公司 .....	9
表 1.2 主要耗材及生产公司 .....	9
表 1.3 主要仪器及生产公司 .....	10
表 3.1 主要试剂及生产公司 .....	31
表 3.2 主要耗材及生产公司 .....	32
表 3.3 主要仪器及生产公司 .....	32
表 3.4 去除 DNA 反应体系 .....	34
表 3.5 RNA 逆转录反应条件 .....	34
表 3.6 目的基因引物序列 .....	34
表 3.7 qPCR 反应体系 .....	35
表 3.8 qPCR 反应条件 .....	35
表 3.9 不同浓度分离胶的配置比例 .....	36
表 3.10 5%浓缩胶的配置比例 .....	36
表 4.1 主要试剂及生产公司 .....	51

## 缩略语表

缩写	英文全称	中文全称
ACR	Acrylamide	丙烯酰胺
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate	表没食子儿茶素没食子酸酯
EGC	Epigallocatechin	表没食子儿茶素
EC	Epicatechin	表儿茶素
ECG	Epicatechin-3-gallate	儿茶素没食子酸
HE	Hematoxylin-Eosin Staining	苏木精-伊红染色
TUNEL	Transferase-Mediated d UTP-biotin Nick End Labeling Assay	末端脱氧核苷酸转移酶介导 的 dTUP 缺口末端标记
FSH	Follicle-Stimulating Hormone	卵泡刺激素
LH	Luteinizing Hormone	黄体生成素
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	增殖细胞核抗原
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction	定量聚合酶链式反应
BCA	Bicinchoninic Acid	二辛可宁酸
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PVDF	Polyvinylidene-Fluoride	氟化聚偏二乙烯滤膜
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20	三羟甲基氨基甲烷缓冲液
ECL	Enhanced Chemiluminescence	加强型化学发光液
GO	Gene Ontology	基因本体论
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶

缩略语表

MMP	Mitochondrial Membrane Potential	线粒体膜电位
RpS9	Ribosomal Protein S9	核糖体蛋白 S9
RpL5	Ribosomal Protein L5	核糖体蛋白 L5
Cox6c	Cytochrome C Oxidase Subunit VIc	细胞色素 C 氧化酶 6c
Cox7a2	Cytochrome C Oxidase Subunit VIIa-L	细胞色素 C 氧化酶 7a2
SENP1	SUMO-Specific Proteases 1	SUMO 特异性蛋白酶 1
NF- $\kappa$ B	Nuclear Transcription Factor $\kappa$ B	核转录因子 $\kappa$ B
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha	核转录因子 $\kappa$ B 抑制蛋白 $\alpha$
MDM2	Mouse Double Minute 2	双微体同源基因 2
Chk2	Checkpoint Kinase 2	细胞周期检查点激酶 2
Chk1	Checkpoint Kinase 1	细胞周期检查点激酶 1
Cyclin B1	G2 Mitotic Specific Cyclin B1	G2 有丝分裂期特异性周期蛋白 B1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Protein	共济失调毛细血管扩张突变蛋白
ATR	Recombinant Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein	共济失调毛细血管扩张突变基因 Rad3 相关激酶
H2AX	H2A Histone Family Member X	H2A 组蛋白家族成员 X
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
GSH-Px	Glutathioneperoxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
Bax	Bcl-2 Associated X Protein	Bcl-2 相关 X 蛋白
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 蛋白
CytC	Cytochrome C	细胞色素 C
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原活化蛋白激酶
p38 MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase	p38 丝裂原活化蛋白激酶

缩略语表

---

JNK	C-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
ERK	Extracellular Regulated Protein Kinases	细胞外调节蛋白激酶
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore	线粒体通透性转换孔

---

## 引 言

### 0.1 丙烯酰胺的研究进展

#### 0.1.1 丙烯酰胺概述

丙烯酰胺 (Acrylamide, ACR) 是一种有机化合物, 化学式为  $C_3H_5NO$ , 相对分子质量为 71.078, 呈白色结晶状, 易溶于水及部分有机溶剂, 如乙醇、乙醚等, 而在乙酸乙酯和氯仿中溶解性较小<sup>[1]</sup>。ACR 是重要的化工原料之一, 广泛应用于化妆品制造业、印刷工业、造纸工业、纺织工业或废水处理等领域<sup>[2]</sup>。同时, 在生物学研究中, ACR 作为研究人员通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 完成 Western Blot 实验所必需的试剂也得到了大量应用<sup>[3]</sup>。随着 ACR 的广泛应用, 人类及动物接触 ACR 的可能性大大增加, 而其对人体的危害也引起了毒理学家的广泛关注。研究发现, ACR 是以氨基酸 (以天冬酰胺为主) 和还原糖 (如葡萄糖和果糖) 为底物进行美拉德反应的产物之一, 广泛存在于富含碳水化合物的油炸或烘焙食品中, 如炸薯条、薯片、面包及饼干等<sup>[4]</sup>。由于 ACR 分子结构中含有亲电基团, 因此能够与大分子的亲核残基相互作用以引发毒性<sup>[5]</sup>。另外, ACR 还具有较强的渗透性, 进入人体后能够迅速到达机体各个部位, 可对身体健康造成严重影响。因此, 由于 ACR 来源广泛、毒性较大且极易发生暴露。近年来, 如何抑制 ACR 的各种毒性作用引起了社会各界人士的广泛关注。

#### 0.1.2 丙烯酰胺的来源

ACR 的主要暴露途径包括: 食品热加工过程中产生的过量 ACR 和香烟烟雾中释放的大量 ACR 导致的生活暴露、工业生产过程中各种化学反应引起的 ACR 职业暴露以及处理不彻底的工业生产废弃物和废水进入环境中导致的环境暴露<sup>[6]</sup>。

在人们的日常生活中, 通过油炸、烘焙等热加工方式处理的食品广受人们欢迎, 但往往伴随加工进程会生成一些有害物质, ACR 就是产生于食品热加工过



程中的一种典型的食品加工内源性污染物<sup>[7]</sup>。前体（天冬酰胺及还原糖）含量、加工时间（ACR 含量与之呈正相关）、加工温度（与 ACR 含量成正比）及食品含水量等因素都会影响食品中的 ACR 含量。研究表明，提高食品原料中前体含量、降低水分、提高加工温度、延长加工时间等因素均可导致加工食品中的 ACR 含量上升<sup>[8-10]</sup>。2015 年，欧洲食品安全局发布了食品中 ACR 含量风险评估结果，强调 ACR 在通过油炸方式烹饪的马铃薯、谷类食物等淀粉类食品中含量较高<sup>[8]</sup>。世界卫生组织指出 ACR 是无阈值化学毒物，即便低剂量暴露也会存在一定的健康危害。目前对于非职业人群，饮食摄入是其接触 ACR 的主要方式。既往研究表明，ACR 具有较强的毒性作用<sup>[2]</sup>。因此，ACR 长期饮食暴露所带来的健康问题仍然不可忽视。

ACR 可在香烟燃烧过程产生，是香烟烟雾中的重要有害物质之一。对吸烟人群和被动吸烟人群来说，烟草烟雾是其暴露于 ACR 的重要非食源性来源之一<sup>[11]</sup>。研究数据证实，每根香烟所产生的烟雾中 ACR 的平均含量为 0.497~4.170  $\mu\text{g}$ <sup>[12]</sup>，并且吸烟人群体内 ACR 代谢量明显大于不吸烟人群<sup>[13]</sup>，表明烟草烟雾中大量的 ACR 会通过主动或被动吸烟进入人体，造成机体损伤。2015 年，ACR 在我国被纳入化妆品禁用物质的目录，并在《化妆品安全技术规范》中明确了 ACR 在化妆品生产时的最大残留量。但经调查后发现仍有在售产品中的 ACR 残留量超标，这些残留的 ACR 在一定程度上威胁着人们的健康。

ACR 可作为单体用于制备交联剂，作为高分子絮凝剂用于造纸等工业生产，在 ACR 相关工业生产过程中以及后续运输、储存、使用和处置含有 ACR 的过程中均会存在 ACR 残留，这会导致 ACR 通过皮肤接触、黏膜接触及呼吸道吸入等途径进入作业工人体内，引发中毒现象<sup>[14]</sup>，进而对其神经、遗传、生殖等系统造成损伤<sup>[15]</sup>。随着 ACR 生产规模和应用范围的不断扩大，发生 ACR 职业暴露中毒的风险也会不断增加。因此，如何有效抑制 ACR 的毒性已经成为当前研究的重点方向。

环境中 ACR 的来源主要包括由于生产加工过程操作不当导致 ACR 暴露于水体、土壤及空气等环境介质，以及未经处理就排放到周围环境中的工业废弃物、废水等物质。由于 ACR 具有极强的水溶性，存在于空气和土壤中的 ACR 可通过沉降、雨水冲刷及渗漏作用进入环境水体。因此，环境中 ACR 含量最高的介质是水体，通过环境水体这一介质接触 ACR 是 ACR 环境暴露危害人体健康的主要途径<sup>[16]</sup>。

ACR 进入人体的主要途径包括皮肤接触和饮食摄入等，能够引起机体多种

毒性反应。无处不在的 ACR 严重威胁着人们的身体健康。因此，深入研究如何抑制 ACR 暴露引起的毒性作用刻不容缓。

### 0.1.3 丙烯酰胺的睾丸毒性

随着接触 ACR 风险的增加，ACR 的蓄积促使人们更加关注它的毒性作用。ACR 作为常见的毒性物质之一，具有多种毒性作用，包括生殖毒性、神经毒性、遗传毒性和胚胎发育毒性等<sup>[17-20]</sup>。既往研究已通过大量动物试验，利用小鼠、大鼠和斑马鱼等多种动物模型，阐明了 ACR 的毒性作用<sup>[21]</sup>。ACR 显著的毒性作用及其对机体健康造成的危害使得探寻有效抑制 ACR 毒性的研究具有重要意义。

已有研究表明，ACR 生殖毒性的主要表现为损伤雄性生育能力方面<sup>[22]</sup>。ACR 能够导致大鼠生精小管内出现可见多核巨细胞、产生空泡化现象并引起大量细胞凋亡，导致细胞生长和细胞周期等方面相关基因的异常表达<sup>[23]</sup>。用含一定剂量 ACR 的饮用水饲喂大鼠，可导致大鼠体重及睾丸附睾重量下降，出现输精管管状内皮增厚、层数增多、生精小管组织结构紊乱等组织病变<sup>[23-25]</sup>，使精子运动出现异常，血液中睾酮含量升高<sup>[26]</sup>。ACR 进入体内后可在相关酶催化下形成环氧化物，二者共同作用，会促使生殖细胞变性，引起 DNA 损伤<sup>[28]</sup>。ACR 通过对活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）生成的促进作用，加剧了细胞氧化应激，进而促进了细胞凋亡，对睾丸间质细胞和支持细胞造成了损伤<sup>[29]</sup>。ACR 处理会引起小鼠体重减轻，导致睾丸空泡化等结构损伤，同时，小鼠睾丸间质细胞的细胞凋亡率和 ROS 水平升高，细胞周期发生延迟，附睾精子数量减少，血清睾酮水平降低，睾丸类固醇生成基因和相关酶的表达水平下降，并且细胞外信号调节激酶（Extracellular Regulated Protein Kinases, ERK）的磷酸化水平显著提高<sup>[30, 31]</sup>。有研究评估了暴露于不同浓度 ACR（0、5、10、20 和 40 mg/kg bw/d）对雄性小鼠精子发生的影响，结果表明，ACR 暴露增加了生精小管中生殖细胞的凋亡，降低了精子浓度，并导致小鼠精子缺陷。进一步分析表明，ACR 暴露可能会通过破坏雄性小鼠减数分裂前期 I 的进展影响精子发生<sup>[29]</sup>。此外，ACR 还会以剂量依赖性方式引起睾酮和催乳素浓度的降低<sup>[32]</sup>。

ACR 及其代谢物已被证实会对生物体造成多种负面影响<sup>[21]</sup>，而一些生物活性成分（包括多酚、醌、生物碱、萜类化合物）能够抑制 ACR 的毒性作用，其抑制作用涉及对肠道微生物群紊乱、生化代谢、自噬、细胞凋亡、炎症及氧化应激等的调控<sup>[33]</sup>。

## 0.2 EGCG 的研究进展

### 0.2.1 EGCG 概述

绿茶是将茶树的新叶或芽，经杀青、整形、烘干等工艺制作而成的，茶汤清亮，香味浓郁，口感醇厚，作为不发酵茶保留了许多天然活性物质，已被证明有利于多种疾病的预防及康复<sup>[34]</sup>。绿茶作为一款营养丰富、口味独特的饮品，其产量约占全球茶叶总产量的 20%，是中国主产茶之一，在中国及世界范围内广受欢迎<sup>[35]</sup>。绿茶中含有丰富的对身体健康有益的生物活性成分，如茶多酚、咖啡碱等，其中儿茶素是绿茶中含量最丰富的活性成分，占绿茶干重的 30%，有文献表明，每 100 mL 绿茶中的总儿茶素含量为  $67 \pm 11 \text{ mg}$ <sup>[36]</sup>。儿茶素是由杂环吡喃或吡喃（具有双键）环连接的双苯环所构成的类黄酮<sup>[37]</sup>，可分为表没食子儿茶素没食子酸酯（Epigallocatechin-3-gallate, EGCG）、表没食子儿茶素（Epigallocatechin, EGC）、表儿茶素（Epicatechin, EC）以及儿茶素没食子酸（Epicatechin-3-gallate, ECG），其中 EGCG 被认为是绿茶中最具有生物活性的儿茶素组分，约占总儿茶素含量的 65%，是儿茶素中占比最大的组分<sup>[38-40]</sup>，其次分别是 EGC、ECG 和 EC。黄烷醇与没食子酸基团可通过酯化反应生成没食子酸结合物 EGCG、ECG、EGC 和 EC<sup>[41]</sup>。儿茶素经水提、萃取、色谱柱纯化后广泛应用于化妆品生产、保健品制备等方面，其中 EGCG 是所有儿茶素中研究最广泛的<sup>[34]</sup>。

### 0.2.2 EGCG 的生物活性作用

绿茶中含有包括儿茶素、生物碱及微量元素等多种生物活性成分，在抗氧化、抗炎症、抗病毒、降血糖、神经保护等方面发挥着重要作用<sup>[42]</sup>。儿茶素是一类成分复杂的多酚类化合物及其衍生物的混合物，主要由绿茶次生代谢物产生，是发挥绿茶生物活性的主要成分之一。作为潜力巨大的生物活性物质，儿茶素正逐渐被应用于日常饮食中。研究表明，儿茶素能够有效抑制细胞的氧化损伤，减轻细胞 DNA 损伤，破坏微生物的生长并清除烷基过氧自由基<sup>[43]</sup>，发挥抗氧化、抗肿瘤、抗炎、神经保护等作用<sup>[42]</sup>。EGCG 作为含量最高的儿茶素，具有最强的抗氧化活性，可与多种分子结合，且具有微量高效的特点，在微摩尔和纳摩尔浓度下即可对各信号转导途径发挥调控作用，抑制或促进相关酶的活性<sup>[44]</sup>。EGCG 结构中富含羟基（-OH），因此能够以电子供体的形式清除自由基；一方面增强超氧

化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathioneperoxidase，GSH-Px）等抗氧化酶的活性，另一方面抑制一氧化氮合酶的活性，从而在抑制氧化应激方面发挥重要作用<sup>[45]</sup>。炎症方面，EGCG 能够抑制多种促炎细胞因子的生成及释放，在炎症相关疾病的各个阶段中发挥着重要作用<sup>[46-48]</sup>。另外，EGCG 在稳定葡萄糖平衡、缓解胰岛素抵抗、调节线粒体功能等方面也具有显著作用，它能够在一定程度上对一些糖尿病病症起到缓解作用<sup>[49, 50]</sup>。EGCG 的神经保护作用体现在 EGCG 能够通过抑制细胞色素 C（Cytochrome C，CytC）进入胞质，抑制线粒体途径的内源性细胞凋亡，改善线粒体功能障碍引起的神经退行性疾病，对神经系统起到保护作用<sup>[51-55]</sup>。

研究表明，在日常饮食中摄入适当的茶多酚类物质，尤其是 EGCG，能够使精子畸形率显著降低，这对男性生殖系统具有积极的保护作用<sup>[56]</sup>。有研究证实 EGCG 能够抑制精子氧化应激，恢复砷诱导的附睾精子浓度下降，并保持其结构膜及功能性膜完整性和线粒体膜电位<sup>[57]</sup>。据报道，EGCG 可显著减轻睾丸病变、精子畸形和生精细胞凋亡<sup>[58]</sup>。此外，还有研究表明 EGCG 有利于精子的存活和代谢，它可以通过抑制生殖细胞凋亡和炎症来保护睾丸生精小管免受缺血再灌注的损伤<sup>[59]</sup>。

## 0.3 研究内容及意义

### 0.3.1 研究内容

本研究以雄性 Sprague Dawley（SD）大鼠的睾丸为研究对象，结合免疫组织化学技术、定量聚合酶链式反应（Quantitative Polymerase Chain Reaction，qPCR）、Western Blot 等实验技术，探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制作用及机制，为后续深入研究 EGCG 活性及相关功能食品的开发应用提供实验依据和理论支持。本研究的内容主要包括以下三个方面：

首先是 EGCG 对 ACR 诱导大鼠睾丸组织损伤的抑制作用研究：建立大鼠 ACR 损伤模型，通过苏木精-伊红染色（Hematoxylin-Eosin Staining，HE）技术进行组织病理学分析，在动物水平上观察 ACR 处理后大鼠睾丸组织的损伤状态及 EGCG 对损伤组织的缓解作用。通过检测大鼠睾丸组织中的凋亡细胞数、检测大鼠睾丸组织中卵泡刺激素（Follicle-Stimulating Hormone，FSH）、黄体生成

素（Luteinizing Hormone, LH）及增殖细胞核抗原（Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA）的表达水平，探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制作用。

其次是利用生物信息学技术分析预测 ACR 诱导睾丸组织损伤的毒性机制：下载 ACR 致睾丸损伤的数据集，筛选出 ACR 处理后的差异表达基因；基于 STRING 数据库对差异表达基因进行蛋白互作网络的构建，并使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件分析出重要的功能模块，以得到关键基因；将所得关键基因进行基因本体论（Gene Ontology, GO）、京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）富集分析，得到关键基因富集的生物学过程、细胞组分、分子功能及信号通路。通过对数据集的分析，发现关键基因主要富集在与核糖体和线粒体的结构及功能相关的机制上。据此，后续研究将主要从核糖体及线粒体两个方面探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制机理。

最后是 EGCG 对 ACR 诱导睾丸核糖体及线粒体损伤的抑制机制研究：通过 qPCR 对数据集分析得到的关键基因进行验证，并利用 Western Blot 技术检测核转录因子  $\kappa$ B（Nuclear Transcription Factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B）信号通路、细胞周期、DNA 损伤应答、线粒体途径凋亡信号通路及丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK）信号通路相关蛋白的表达水平，探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸核糖体及线粒体损伤的抑制机制。

### 0.3.2 技术路线

本研究遵循图 0-1 所示的技术路线图

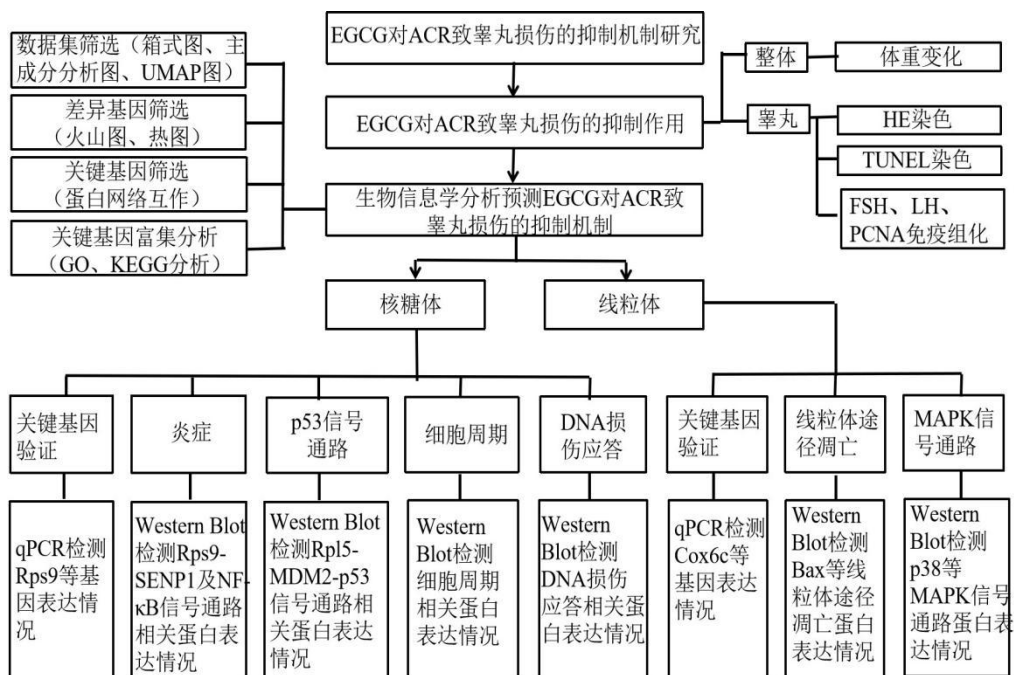


图 0-1 技术路线图

Fig.0-1 Technology Roadmap

### 0.3.3 研究意义

ACR 具有生殖毒性，能够造成睾丸组织损伤。人们在日常生活中不可避免会通过职业暴露、饮食摄入等多种途径接触 ACR。因此，探究如何抑制 ACR 导致的睾丸损伤意义重大。目前，关于天然产物对 ACR 生殖毒性抑制作用的探究备受关注。维生素 E、沙棘果汁、葡萄籽油等天然产物已被证实能够对 ACR 诱导的睾丸损伤起到保护作用<sup>[60-62]</sup>。与其它天然产物相比，EGCG 具有提取工艺成熟、产品纯度较高、生产成本低等优势。研究表明，EGCG 对 ACR 的神经毒性具有抑制作用<sup>[55]</sup>，但 EGCG 能否抑制 ACR 的生殖毒性及相关机制尚未见报道。本研究拟通过生物信息学分析 ACR 诱导睾丸组织损伤的作用靶点，在动物水平上验证并探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制机理，为证明 EGCG 能抑制 ACR 的生殖毒性提供实验依据和理论基础，促进有效抑制 ACR 毒性作用的天然活性物质的深入研究与开发，有效降低 ACR 对人类健康造成的潜在危害，同时也为更深入全面地探索 EGCG 活性和功能提供支持。

## 第 1 章 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制作用

ACR 无色无味，易溶于水，广泛应用于纺织品加工、纸张生产、饮用水处理、化妆品制造和土壤改良剂生产等各个领域，存在于科研实验所用的凝胶电泳、烟草及部分热加工食品中<sup>[63]</sup>，人们在工作和生活中均会不可避免地接触到 ACR<sup>[64]</sup>。

研究表明，ACR 具有神经毒性、遗传毒性、生殖毒性等多种毒性<sup>[17-19]</sup>。在神经毒性方面，ACR 可通过诱导线粒体 ROS 积累诱导脑部氧化应激，抑制神经递质水平，损伤神经<sup>[65-67]</sup>；在遗传毒性方面，ACR 能够诱导细胞发生染色体畸变等各种有丝分裂障碍<sup>[68]</sup>。此外，在生殖毒性方面，ACR 已被证明能造成雄性大鼠体重及睾丸脏器指数下降，睾丸出现生精小管受损等严重的组织病理学损伤<sup>[69, 70]</sup>。分子水平上的研究表明，ACR 会造成雄鼠生殖细胞出现大量凋亡，导致精子形态发生变化，显著降低附睾尾中的精子储备，并且使大鼠中与性激素传递和精子发生相关的基因表达下调，雄性激素水平显著降低<sup>[17, 71, 72]</sup>。

天然产物种类繁多，不仅结构新颖而且生物活性多样，是宝贵的药物资源。目前已有多种天然产物被证实能够抑制 ACR 的生殖毒性，维生素 E 处理能够显著改善 ACR 造成的总精子数量减少及生精小管萎缩<sup>[60]</sup>；水飞蓟素能够缓解 ACR 诱导的精子数量和精子活力下降，上调睾丸中 GSH-Px、过氧化氢酶（Catalase, CAT）和 SOD 的活性，抑制丙二醛（Malondialdehyde, MDA）的表达，通过抑制氧化应激有效缓解 ACR 的毒性作用<sup>[73]</sup>；葡萄籽油能够使 ACR 引起的睾丸变性、未成熟精细胞附睾内容物异常、多核巨细胞出现、精囊囊性扩张、分泌物减少、上皮坏死等现象得到显著缓解<sup>[62]</sup>；柚皮苷能够调节大鼠血清 FSH、LH 和睾酮水平，使 ACR 在氧化应激、炎症、生殖相关酶的表达和细胞凋亡等方面造成的影响显著降低<sup>[74]</sup>。

EGCG 能否抑制 ACR 的生殖毒性及相关机制尚未见报道，因此本章研究拟通过 HE 染色、TUNEL（Transferase-Mediated d UTP-biotin Nick End Labeling Assay, TUNEL）染色、免疫组化等方法对 ACR 和 EGCG 处理后的大鼠的体重、睾丸脏器指数、睾丸组织病理学变化、睾丸细胞凋亡情况及 FSH、LH、PCNA 表达水平进行检测，以探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制作用。

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 实验试剂

表 1.1 主要试剂及生产公司

Table 1.1 Main Reagents and production companies

试剂名称	生产公司
ACR (纯度 > 99%)	美国 Genview 公司
EGCG (纯度 ≥ 98%)	美国 Sigma 公司
无水乙醇	中国医药集团有限公司
苏木精	北京索莱宝科技有限公司
曙红 Y, 醇溶	上海生工生物工程股份有限公司
二甲苯	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
TUNEL 检测试剂盒 (红光)	沈阳万类生物科技有限公司
Triton X-100	上海碧云天生物技术有限公司
DAPI	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
抗荧光猝灭剂	北京索莱宝科技有限公司
BSA 粉末	上海生工生物工程股份有限公司
DAB 显色液	福州迈新生物技术开发有限公司
过氧化氢	中国医药集团有限公司
Anti-FSH antibody	武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司
Anti-LH antibody	美国 Affinity 公司
Anti-PCNA antibody	沈阳万类生物科技有限公司
HRP 标记山羊抗兔 IgG	美国 Thermo Fisher 公司

### 1.1.2 实验耗材

表 1.2 主要耗材及生产公司

Table 1.2 Main consumables and production companies

耗材名称	生产公司
EP 管	北京鼎国有限公司
移液枪	苏州 BIOHIT 百得实验室仪器有限公司
枪头	北京鼎国有限公司
培养皿	北京鼎国有限公司
载玻片、盖玻片	北京鼎国有限公司

### 1.1.3 仪器设备



表 1.3 主要仪器及生产公司

Table 1.3 Main instruments and production companies

所用仪器	仪器型号	生产公司
石蜡切片机	RM2235	德国 Leica 公司
电热恒温鼓风干燥箱	QH01-9030A	上海精宏实验仪器设备有限 公司
电热恒温培养箱	DH36001B	天津泰斯特仪器有限公司
超纯水系统	NW10LVF	上海力新仪器有限公司
显微镜	BX53	日本奥林巴斯株式会社
显微镜拍照系统	DP73	日本奥林巴斯株式会社

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物模型的建立

选择 45 只体重 200-250 g 的 SD 雄性大鼠，正常喂养 7 d 以适应新环境，然后将其随机分为 5 组 (n=9)：

- (1) Control 组：正常喂养 18 d；
- (2) ACR 组：正常喂养 4 d 后，50 mg/kg bw/d ACR 灌胃 14 d (1 次/d)；
- (3) EGCG 低剂量组：10 mg/kg bw/d EGCG 灌胃 4 d (1 次/d)；之后，50 mg/kg bw/d ACR 及 10 mg/kg bw/d EGCG 灌胃 14 d (1 次/d)，两者时间间隔 1 h；
- (4) EGCG 高剂量组：40 mg/kg bw/d EGCG 灌胃 4 d (1 次/d)；之后，50 mg/kg bw/d ACR 及 40 mg/kg bw/d EGCG 灌胃 14 d (1 次/d)，两者时间间隔 1 h；
- (5) EGCG 组：40 mg/kg bw/d EGCG 灌胃 18 d (1 次/d)。

在饲养全程中，仔细观察并认真记录各组大鼠的状态，并测量大鼠体重。

### 1.2.2 样本取材

在第 18 d 将大鼠处死，快速分离其双侧睾丸组织，用 0.9% 的氯化钠溶液清洗干净，测量睾丸重量后将所取睾丸组织分成两部分：一部分包埋于石蜡，为后续免疫组化检测及组织病理学分析做样本准备；余下的组织为了防止核酸及蛋白降解速冻于液氮，存放于 -80°C 冰箱保存，用于后续分子生物学指标的检测。

### 1.2.3 脏器指数测定

将大鼠处死后取出其睾丸组织进行称重,根据以下计算公式计算大鼠睾丸脏器指数:

$$\text{睾丸脏器指数} = \frac{\text{睾丸重量}}{\text{大鼠体重}} \times 100\% \quad (1-1)$$

### 1.2.4 组织病理学观察

对各组大鼠睾丸组织切片进行 HE 染色,分析染色结果。主要步骤如下:

(1) 切片:薄切标本蜡块成片,展开于载玻片上,放置在 60℃温箱中烘干 2 h;

(2) 脱蜡至水:切片烘干后放入二甲苯中进行两次 15 min 脱蜡,无水乙醇浸泡两次 5 min,分别在各级(95%、85%、75%)乙醇溶液中停留 2 min,然后用蒸馏水浸泡;

(3) 染色:甩净残液,苏木素(由苏木精配制)染色 5 min,缓水流冲洗 3 s,1%盐酸乙醇中分化 2 s,缓水流冲洗 10 min,dd H<sub>2</sub>O 洗 2 min,伊红(由醇溶性曙红配制)染色 3 min,dd H<sub>2</sub>O 洗 2 min;

(4) 脱水透明:各级(75%、85%、95%)乙醇处理 5 min,无水乙醇浸泡 5 min(重复 2 次),二甲苯 I 及 II 浸泡 5 min,干后封于中性树脂胶;

(5) 镜检:显微镜(×200)下观察,拍照记录。

### 1.2.5 TUNEL 染色

利用 TUNEL 染色技术对各组大鼠睾丸组织进行染色处理,观察、分析并统计出各组大鼠睾丸组织的凋亡细胞数。主要步骤如下:

(1) 切片:详见 1.2.4 (1);

(2) 脱蜡至水:详见 1.2.4 (2);

(3) 透化:放入 PBS 中浸泡 5 min,滴加 50 μL 0.1% Triton X-100,室温放置 8-10 min;

(4) 标记:PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,将切片干燥处理,滴加 50 μL 现配的 TUNEL 反应液,37℃条件下避光反应 1 h;

(5) DAPI 复染:PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,取出切片,滴加 DAPI 至完

全覆盖组织，避光复染 5 min；

(6) 封片：PBS 漂洗 3 次，每次 5 min，滴加荧光淬灭剂封片；

(7) 镜检：显微镜 ( $\times 400$ ) 下观察，拍照记录，统计凋亡细胞数。

### 1.2.6 免疫组织化学

(1) 切片：详见 1.2.4 (1)；

(2) 脱蜡至水：详见 1.2.4 (2)，水中取出切片架后浸于 PBS 中 5 min；

(3) 抗原修复：微波加热抗原修复液至沸腾，将切片架放入后持续低火加热 10 min，于室温下自然冷却，PBS 浸泡 3 次，每次 5 min；

(4)  $H_2O_2$  孵育：擦净切片残液，用免疫组化笔在组织周围画圈，防止滴加液体时溢出。通过在 3%  $H_2O_2$  中室温孵育 15 min 消除内源性过氧化物酶活性，之后浸没于 PBS 中 5 min；

(5) 封闭：滴加 1% BSA，置于室温下封闭 15 min，除去血清，勿洗；

(6) 一抗孵育：滴加按 1:50 的比例用 PBS 稀释后的一抗至完全覆盖组织，置于 4℃ 湿盒过夜，取出后用 PBS 浸泡 5 min，重复 3 次；

(7) 二抗孵育：将 HRP 标记二抗用 PBS 稀释 500 倍，滴至完全覆盖组织，置于 37℃ 湿盒反应 1 h，PBS 浸泡 5 min，重复 3 次；

(8) DAB 显色：取 0.85 mL 蒸馏水于管中，再依次加入试剂 A、B、C 各 50  $\mu$ L，混匀即得 DAB 显色液。擦干切片水分，滴加 100  $\mu$ L 显色液，在颜色刚变深时迅速置于水中以终止反应；

(9) 苏木素复染：苏木素浸泡切片 3 min，缓水流冲洗 2 min，沥干后浸入 1% 盐酸乙醇中分化 3 s，立即浸入自来水中，流水返蓝 20 min；

(10) 脱水、透明、封片：详情见 1.2.4 (4)；

(11) 镜检：显微镜 ( $\times 400$ ) 下观察，拍照记录，分析平均光密度值。

### 1.2.7 统计分析

用 SPSS 16.0 软件对数据进行单因素方差分析，数据均以至少三次独立实验的平均值  $\pm$  标准差表示。两组数据之间的比较使用最小显著差数法 (Least Significant Difference, LSD)， $P < 0.05$  则差异显著， $P < 0.01$  则差异极显著。

## 1.3 实验结果

### 1.3.1 EGCG 对 ACR 损伤大鼠的体重及脏器指数的影响

本研究中各组大鼠体重变化及睾丸脏器指数变化如图 1-1 所示。ACR 组大鼠的体重极显著地低于 Control 组 ( $P < 0.01$ )，EGCG 高剂量组大鼠体重显著地高于 ACR 组 ( $P < 0.05$ )。与 Control 组相比，ACR 组大鼠的睾丸脏器指数出现了极显著的下降 ( $P < 0.01$ )，而与 ACR 组相比，EGCG 高剂量组大鼠的睾丸脏器指数极显著上升 ( $P < 0.01$ )；与 Control 组相比，单独 40 mg/kg bw/d EGCG 处理后的大鼠睾丸脏器指数不具有显著差异。以上结果表明，ACR 能对大鼠睾丸造成损伤，EGCG 能够缓解 ACR 引起的睾丸损伤。

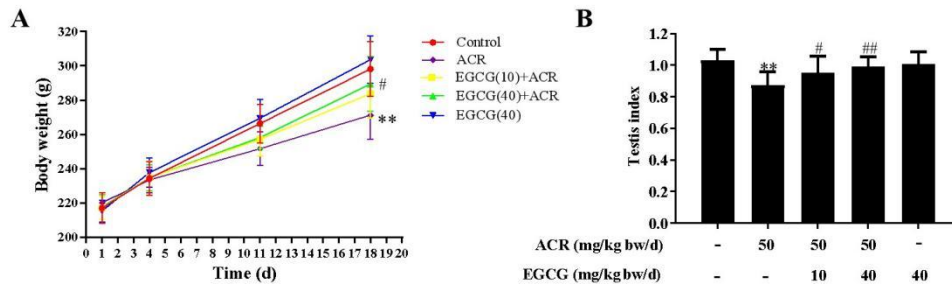


图 1-1 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠的体重及睾丸脏器指数的影响

A: EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠体重的影响；B: EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸脏器指数的影响

与 Control 组相比，\*\* $P < 0.01$ ；与 ACR 组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

Fig.1-1 Effect of EGCG pretreatment on body weight and testis index in ACR-injured rats

A: Effect of EGCG pretreatment on body weight in ACR-injured rats. B: Effect of EGCG pretreatment on testis index in ACR-injured rats

Compared with Control group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with ACR group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

### 1.3.2 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸的组织形态结构的影响

大鼠睾丸的组织形态结构变化如图 1-2 所示，HE 染色结果显示，Control 组大鼠睾丸组织具有完整的生精小管结构，管腔内各级生精细胞发育正常，排列有序，生精细胞从外到内正常分布，依次是精原细胞、初级和次级精母细胞、精子。生精小管之间簇状分布的间质细胞排列紧密，曲细精管结构完整，层次清晰分明，无水肿现象；与 Control 组相比，ACR 组大鼠睾丸组织生精细胞受损萎缩，曲细

精管排列紊乱疏松，层数明显减少，管腔中精子数量及生精细胞数量明显下降，并出现空泡化现象，表明 ACR 对大鼠睾丸组织造成了损伤；预处理不同浓度 EGCG（10 和 40 mg/kg bw/d），ACR 组大鼠睾丸组织的损伤程度明显改善，且改善水平随着 EGCG 浓度的增加而上升，空泡数量明显下降，间质开始恢复，曲细精管和精母细胞逐渐变得层次清晰，排列有序；单独 40 mg/kg bw/d EGCG 处理后，大鼠睾丸组织的状态和 Control 组相比无明显改变，表明 EGCG 本身在 40 mg/kg bw/d 浓度下并未对大鼠睾丸造成影响。综合比较大鼠睾丸组织病理学观察结果，能够得出以下结论：ACR 能够引起大鼠睾丸组织损伤，10 mg/kg bw/d 和 40 mg/kg bw/d EGCG 均能对 ACR 诱导的睾丸损伤发挥保护作用。

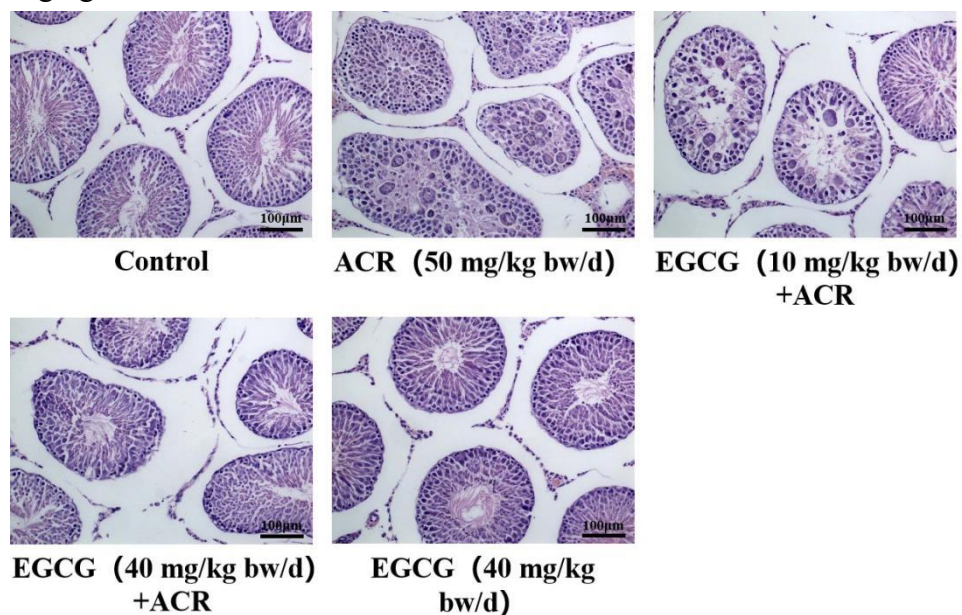


图 1-2 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸的组织形态结构的影响

Fig.1-2 Effect of EGCG pretreatment on the morphological structure of ACR-injured rat testis tissue

### 1.3.3 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞凋亡的影响

TUNEL 染色可通过检测细胞在凋亡过程中细胞核 DNA 的断裂情况，准确地检测凋亡细胞。DAPI 染色后正常细胞核为蓝色，而阳性凋亡细胞的细胞核为红色<sup>[75]</sup>。对大鼠睾丸进行 TUNEL 染色的结果如图 1-3 所示，Control 组大鼠睾丸组织中 TUNEL 阳性细胞的数量极少，而在 ACR 组中可观察到较多的 TUNEL 染色阳性细胞，其数量极显著高于 Control 组（ $P < 0.01$ ），表明 ACR 能引起大鼠睾丸细胞凋亡，造成睾丸组织严重损伤；EGCG 低剂量组和 EGCG 高剂量组

也出现了一定数量的 TUNEL 染色阳性细胞,但阳性细胞数量均极显著低于 ACR 组 ( $P < 0.01$ ); 单独 40 mg/kg bw/d EGCG 处理后, 睾丸组织 TUNEL 阳性细胞数与 Control 组相比无显著变化, 表明 EGCG 本身在 40 mg/kg bw/d 浓度下不会诱导大鼠睾丸组织细胞凋亡。

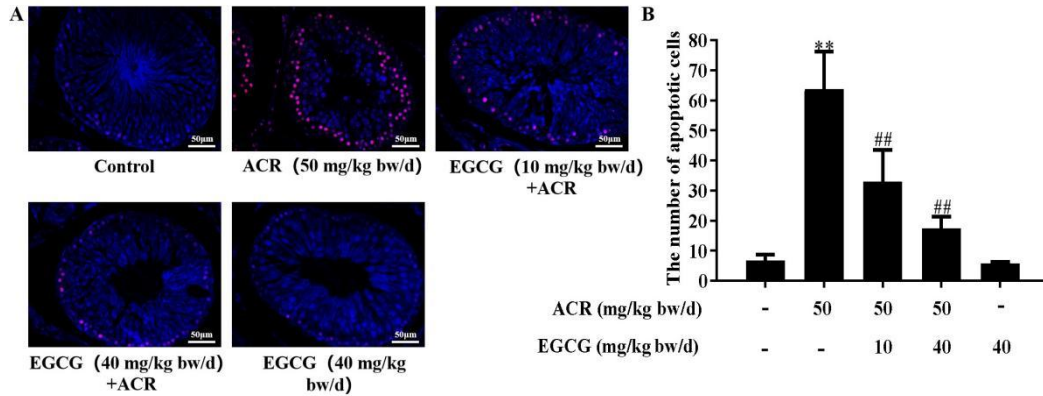


图 1-3 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞凋亡的影响

A: 大鼠睾丸切片 TUNEL 染色; B: 不同处理组大鼠睾丸凋亡细胞数统计图  
与 Control 组相比,  $**P < 0.01$ ; 与 ACR 组相比,  $##P < 0.01$

Fig.1-3 Effect of EGCG pretreatment on apoptosis in testis tissue of ACR-injured rats

A: TUNEL staining of rat testis sections. B: Statistical graph of the number of apoptotic cells in rat testis in different treatment groups

Compared with Control group,  $**P < 0.01$ . Compared with ACR group,  $##P < 0.01$

### 1.3.4 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 FSH、LH、PCNA 蛋白表达水平的影响

利用免疫组织化学技术检测 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 FSH、LH、PCNA 表达水平的影响, 结果如图 1-4、1-5、1-6 所示。与 Control 组相比, ACR 处理后大鼠睾丸组织中的 FSH 表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), LH 和 PCNA 表达量极显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 ACR 组相比, EGCG 高剂量组中 FSH 和 PCNA 的表达量均显著增加 ( $P < 0.05$ ), EGCG 高剂量组中 LH 的表达水平极显著上升 ( $P < 0.01$ ); 单独 40 mg/kg bw/d EGCG 处理后, 睾丸组织中 FSH、LH 和 PCNA 的表达水平与 Control 组相比差异不显著, 说明 EGCG 本身在 40 mg/kg bw/d 浓度下不影响睾丸 FSH、LH 和 PCNA 表达。以上结果表明, ACR 抑制了大鼠睾丸中 FSH、LH 和 PCNA 的表达, 而 EGCG 的加入遏制了这种抑制作用, 对大鼠睾丸起到了一定的保护作用。

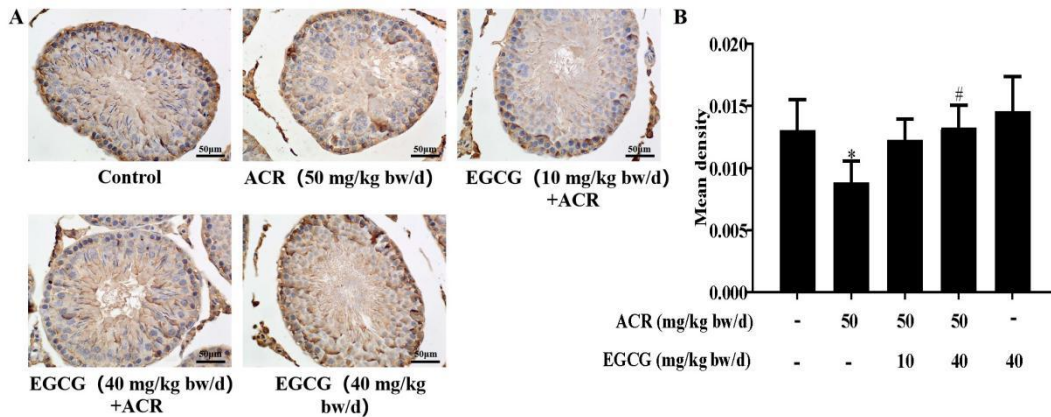


图 1-4 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 FSH 蛋白表达水平的影响

A: 大鼠睾丸 FSH 蛋白免疫组织化学染色; B: 不同处理组大鼠睾丸 FSH 蛋白免疫组化平均光密度统计图

与 Control 组相比, \*P < 0.05; 与 ACR 组相比, #P < 0.05

Fig.1-4 Effect of EGCG pretreatment on the expression level of FSH protein in testis tissue of ACR-injured rats

A: Immunohistochemical staining of FSH protein in rat testis. B: Immunohistochemical mean density of FSH protein in rat testis in different treatment groups

Compared with Control group, \*P < 0.05. Compared with ACR group, #P < 0.05

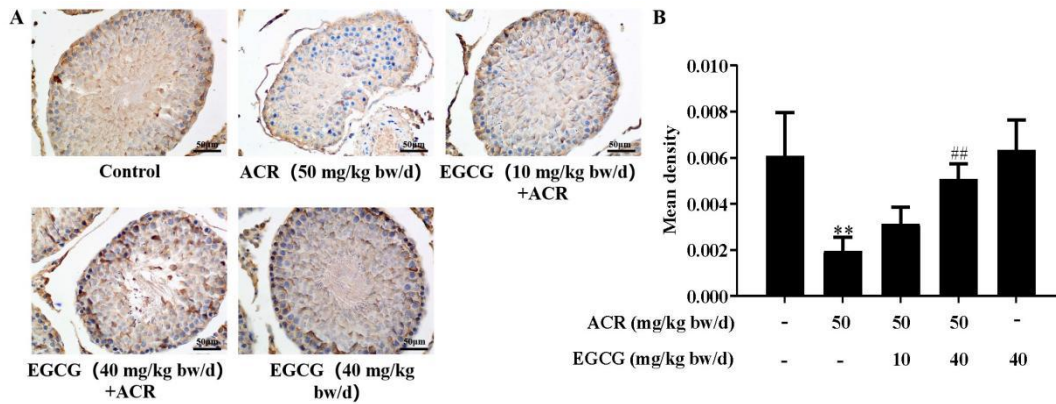


图 1-5 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 LH 蛋白表达水平的影响

A: 大鼠睾丸 LH 蛋白免疫组织化学染色; B: 不同处理组大鼠睾丸 LH 蛋白免疫组化平均光密度统计图

与 Control 组相比, \*\*P < 0.01; 与 ACR 组相比, ##P < 0.01

Fig.1-5 Effect of EGCG pretreatment on the expression level of LH protein in testis tissue of ACR-injured rats

A: Immunohistochemical staining of LH protein in rat testis. B: Immunohistochemical mean density of LH protein in rat testis in different treatment groups

Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, ##P < 0.01

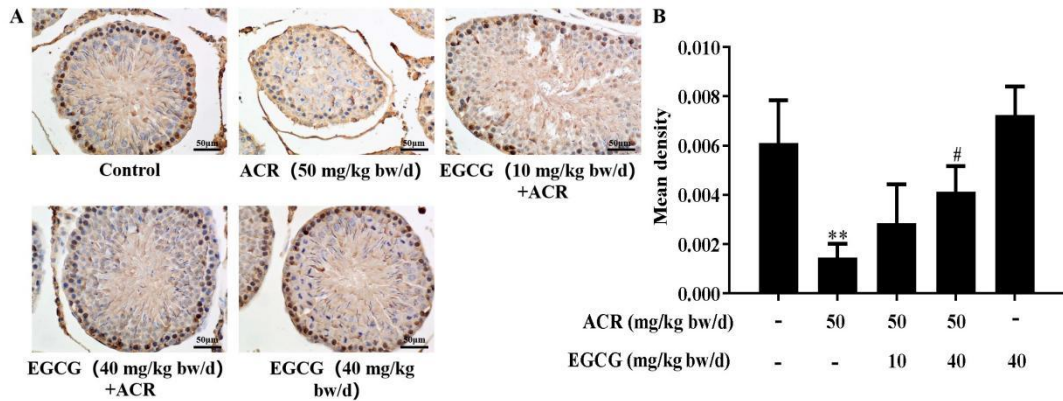


图 1-6 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 PCNA 蛋白表达水平的影响

A: 大鼠睾丸 PCNA 蛋白免疫组织化学染色; B: 不同处理组大鼠睾丸 PCNA 蛋白免疫组化平均光密度统计图

与 Control 组相比, \*\*P < 0.01; 与 ACR 组相比, #P < 0.05

Fig.1-6 Effect of EGCG pretreatment on the expression level of PCNA protein in testis tissue of ACR-injured rats

A: Immunohistochemical staining of PCNA protein in rat testis. B: Immunohistochemical mean density of PCNA protein in rat testis in different treatment groups

Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, #P < 0.05

## 1.4 讨论

ACR 存在于食品热加工美拉德反应及香烟烟雾中, 其具有多种毒性作用, 严重威胁着人们的身体健康。既往研究显示, ACR 处理会使大鼠体重及各个生殖器官的脏器指数下降, 导致大鼠睾丸生精小管空泡化、曲细精管排列杂乱、精母细胞碎片化、出现多核巨细胞等明显的组织病理学改变<sup>[26, 72]</sup>。在本章的研究中, ACR 处理后的大鼠体重及睾丸脏器指数均出现下降。睾丸组织的 HE 染色结果显示, 暴露在 ACR 下使得大鼠的睾丸结构受到破坏, 组织损伤增加, 具体表现为生精细胞受损萎缩, 出现空泡化, 曲细精管排列紊乱疏松, 生精小管管腔中精子数量及生精上皮精原细胞明显下降, 间质细胞数目减少; 加入 EGCG 后, 大鼠睾丸空泡数量明显减少, 间质开始恢复, 曲细精管和精母细胞层次逐渐清晰, 排列逐渐有序, 大鼠体重和睾丸脏器指数均有显著升高, 这表明 EGCG 改善了 ACR 导致的睾丸组织损伤。TUNEL 染色结果表明不同浓度的 EGCG 预处理使 ACR 诱导的大鼠睾丸细胞凋亡现象有了明显改善。有研究发现, 睾丸间质细胞暴露于 ACR 后发生了氧化应激, 细胞 ROS 增加, MAPK 信号通路被激活, 出现大量凋亡, 2.5 μM 姜黄素处理显著抑制了 ACR 引起的间质细胞凋亡, 减轻了



ACR 造成的有害影响<sup>[76]</sup>；ACR 处理增加了睾丸间质细胞的 ROS 水平，降低了线粒体膜电位，诱导了间质细胞凋亡，矢车菊素-3-O-葡萄糖苷在 10-50  $\mu\text{M}$  的剂量范围内有效抑制了 ROS 生成及线粒体膜去极化，上调 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (B-Cell Lymphoma-2, Bcl-2) 并下调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 Associated X Protein, Bax) 的表达，显著抑制了 ACR 引起的细胞凋亡<sup>[77]</sup>；葡萄籽油能够显著缓解 ACR 引起的睾丸变性、多核巨细胞出现、精囊囊性扩张、上皮坏死等现象<sup>[62]</sup>。以上结果表明，部分天然产物可有效缓解 ACR 诱导的大鼠睾丸结构损伤，抑制 ACR 引起的细胞凋亡。

FSH 是一种垂体糖蛋白，在生殖方面的作用包括促进曲细精管上皮细胞发育、加快精母细胞发育成精子细胞和成熟精子的进程等<sup>[78]</sup>。FSH 的重要功能还包括维持曲细精管内丰富的睾酮水平等<sup>[79]</sup>。研究表明，FSH 主要在睾丸支持细胞上发挥作用，通过这一方式间接地促进精子的产生和雄性激素结合蛋白的合成，以保证雄激素具有较高浓度<sup>[78]</sup>。有文献表明，ACR 会导致雄性 F344 大鼠 FSH 的表达水平显著降低<sup>[80]</sup>。本章利用免疫组化技术对睾丸组织 FSH 表达水平进行了检测，结果显示，ACR 处理显著抑制了 FSH 的表达；与 ACR 组相比，不同浓度 EGCG 预处理显著增加了 FSH 的表达量，这表明 EGCG 对 ACR 损伤睾丸的抑制作用能够通过上调 FSH 表达进行。

LH 的主要作用包括促进睾丸间质细胞发育，与睾丸间隙细胞上特殊受体结合，对类固醇激素的生成具有促进作用<sup>[79]</sup>。并且 LH 能够通过与 FSH 协同作用，在促进精子成熟方面发挥重要作用<sup>[78]</sup>。研究表明，ACR 会对大鼠睾丸中 FSH 和 LH 的表达造成不利影响，藏红花素处理会促进睾丸中 FSH 和 LH 的表达，上调睾丸中 SOD、CAT、GSH 水平，改善睾丸病理学损伤，对 ACR 引起的睾丸损伤发挥保护潜力<sup>[81]</sup>。本章的研究结果显示，ACR 抑制了 LH 的表达，加入 EGCG 进行预处理使 FSH 和 LH 水平下降趋势得到遏制。EGCG 处理与藏红花素处理得到了相似结果，其保护机制同样都是通过刺激 FSH 和 LH 表达，改善 ACR 诱导的睾丸损伤。

PCNA 是一种分子量为 36 kDa 的核蛋白，其含量随着增殖细胞的周期性变化而变化<sup>[82]</sup>，通过参与 DNA 的合成对细胞的分裂增殖进行调控，因此常被用作评价细胞增殖的指标<sup>[83]</sup>。研究表明，ACR 处理 (20 mg/kg) 导致大鼠出现 PCNA 表达降低等现象，辣木叶提取物处理 (10 mg/kg) 显著改善了 ACR 诱导的睾丸损伤，增加了睾丸组织中 PCNA 的表达<sup>[84]</sup>。本章对大鼠睾丸中 PCNA 表达水平的免疫组化检测结果表明，ACR 处理使 PCNA 的表达水平显著下降，而 EGCG

预处理能够显著抑制这种下降趋势，使 PCNA 表达水平上升。以上结果表明，EGCG 能够通过促进 PCNA 的表达对 ACR 诱导的睾丸组织损伤起到显著的抑制作用。

## 1.5 小结

本章研究证实 EGCG 能够对 ACR 诱导的睾丸损伤起到抑制作用。EGCG 预处理抑制了 ACR 引起的大鼠体重及睾丸脏器指数下降，抑制了 ACR 诱导的细胞凋亡，显著促进了睾丸组织中 FSH、LH、PCNA 的表达水平，有效改善了 ACR 造成的睾丸组织损伤。

## 第2章 基于生物信息学分析 ACR 诱导睾丸组织损伤的毒性机制

NCBI 数据库是生物信息学分析常用的数据集检索数据库。GO 资源包括了绝大部分生物的基因信息，是基因及其产物功能记录最全面的数据库之一，研究人员已发表的研究成果是其基因信息的最主要来源<sup>[85]</sup>。KEGG 是存储基因组、生物途径、疾病以及各种化学物质数据的数据库<sup>[89]</sup>。GO 和 KEGG 是应用最广的探究关键基因富集通路的数据库<sup>[87-89]</sup>。各种蛋白质之间的相互作用构成了蛋白质互作网络，在信号传递、基因表达、能量及物质代谢以及细胞周期调控等生物学过程中不可或缺，蛋白质互作网络分析有助于阐明不同蛋白质在生命体中发挥的作用及功能联系，在生物受到疾病等刺激后的信号传导和能量物质代谢机制的探究中发挥着重要作用<sup>[90]</sup>。

生物信息学分析在 ACR 毒性作用及抑制 ACR 毒性方面已有诸多应用<sup>[91, 93]</sup>。利用差异蛋白分析、功能注释和富集分析等多种生物信息学分析方法，发现靶蛋白 LARP7 能够通过 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 ACR 诱导的小胶质细胞炎症反应<sup>[91]</sup>。通过转录组学方法对长期以低剂量 ACR 处理的大鼠甲状腺基因表达变化进行分析，发现 ACR 对大鼠甲状腺的损伤作用可能来自氧化应激、检查点激活等几种不同的机制<sup>[92]</sup>。KEGG 富集分析显示，EGCG 能够通过糖脂代谢和能量代谢改善 ACR 诱导的代谢紊乱，这表明儿茶素作为天然多酚抗氧化剂在抑制 ACR 心脏代谢毒性方面发挥了重要作用<sup>[93]</sup>。通过对样本基因转录表达的生物信息学分析，发现三七皂苷 R1 能够上调 PC12 细胞和小鼠中的硫氧还蛋白-1，通过自噬途径抑制 ACR 诱导的神经毒性<sup>[94]</sup>。对 ACR 处理大鼠的海马体蛋白进行组学分析及 GO 富集分析，结果表明 ACR 暴露后上调蛋白富集在烟酰胺核苷酸代谢、辅酶生物合成、丙酮酸代谢及碳水化合物代谢等过程<sup>[95]</sup>。

上一章研究已经证明 EGCG 能够显著改善 ACR 诱导的睾丸损伤。为了进一步探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤发挥抑制作用的确切机制，本章研究采用生物信息学分析方法，通过对 ACR 处理前后睾丸组织中差异表达基因的筛选及对差异表达基因进行蛋白网络互作分析，找到关键基因后进行 GO 和 KEGG 富集分析，在生物信息学水平上对 ACR 诱导睾丸组织损伤的机制进行了分析预测，

为后续深入探究 EGCG 对 ACR 睾丸毒性的抑制机制奠定了基础。

## 2.1 方法

### 2.1.1 数据集检索

在 NCBI-GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 数据库中搜索数据集, 得到由 Nixon BJ 等提供的基于 GPL6885 Illumina MouseRef-8 v2.0 expression beadchip 平台的数据集 GSE47574, 整理数据集中的原始数据用于分析。

### 2.1.2 数据集评价

通过样本归一化、主成分分析及均匀流形逼近与投影 (Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP) 方法对数据集进行可用性评价。样本归一化箱式图展示了数据经过归一化处理后, 样本的基因表达值范围, 主成分分析图及 UMAP 图反应了两组样本之间的差异, 即区分度。

### 2.1.3 差异表达基因筛选

利用 R 语言软件的 limma 软件包, 根据  $P_{adj} < 0.05$  且  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$  的条件筛选出差异基因。

### 2.1.4 关键基因筛选

首先, 利用 STRING 在线工具 (<http://string-db.org>) 识别差异基因编码的蛋白质间相互作用, 构建蛋白质相互作用关系网络, 然后使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件分析出网络中重要的功能模块, 得到在生物学进程调节方面至关重要的关键基因及核心蛋白质。

### 2.1.5 关键基因 GO、KEGG 分析

GO 即基因本体论, 为基因本体联合会创建并提出的数据库, 旨在限定或描述基因及蛋白的功能。GO 具体分为生物学过程、细胞组分和分子功能三个部分; KEGG 即京都基因和基因组百科全书, 能够计算机化生物学过程, 并对基因功能

进行系统化及标准化分析。仙桃学术 (<https://www.xiantao.love/>) 是具有基因注释提供基因生物学意义的功能的在线分析工具之一。为了预测差异基因涉及到的生物学功能及信号通路, 通过在线平台仙桃学术对差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并在该平台对富集结果进行可视化<sup>[96]</sup>。

## 2.2 结果

### 2.2.1 数据集 GSE47574 数据预处理

数据样本归一化分析结果如图 2-1 所示, 各组样本中位数基本在一个水平线上, 这表明样本在处理之后, 表达值接近同一水平, 数据均一性较好; 主成分分析结果如图 2-2 所示, 在主成分分析图中, 可以看到两组数据之间没有重叠交叉, 间隔比较大, 这表明两组样本间有差异而且区分度比较好; 从图 2-3 所示的 UMAP 图中, 可以看到两组数据区分度较大, 表明数据具有良好的分散性, 后续分析得到有意义结果的可能性较大。

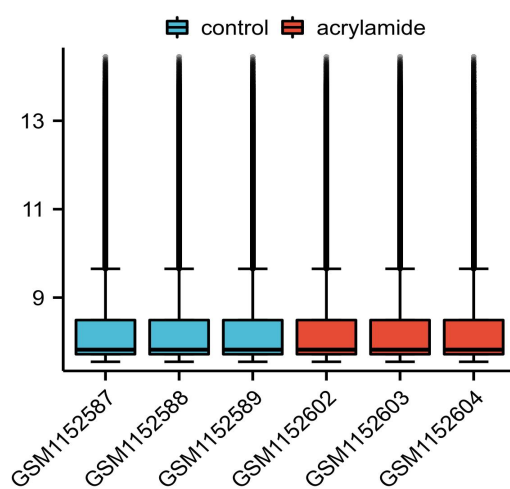


图 2-1 样本归一化箱式图

Fig.2-1 Box plot of the normalized samples

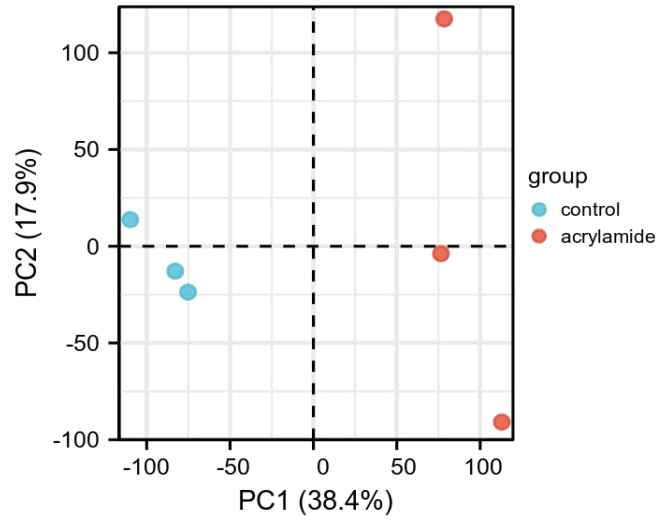


图 2-2 主成分分析图

Fig.2-2 Principal component analysis plot

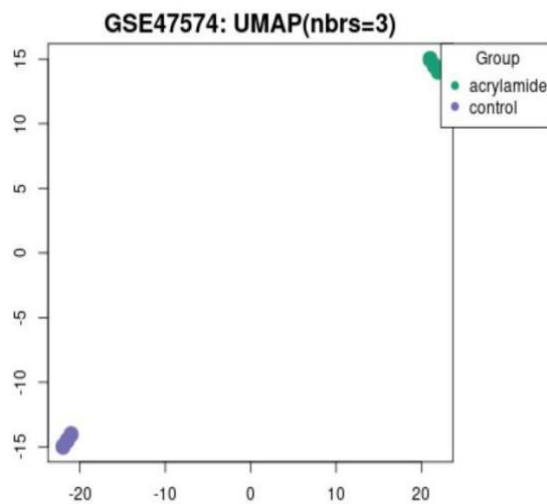


图 2-3 两组样本数据 UMAP 图

Fig.2-3 UMAP plot of two sets of sample data

### 2.2.2 ACR 处理导致的差异表达基因

通过 R 语言软件的 limma 软件包,根据  $P_{adj} < 0.05$  且  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$  的条件共筛选出 176 个差异表达基因,其中 3 个表达上调、173 个表达下调。图 2-4、图 2-5 以火山图和热图的形式将差异表达基因可视化。

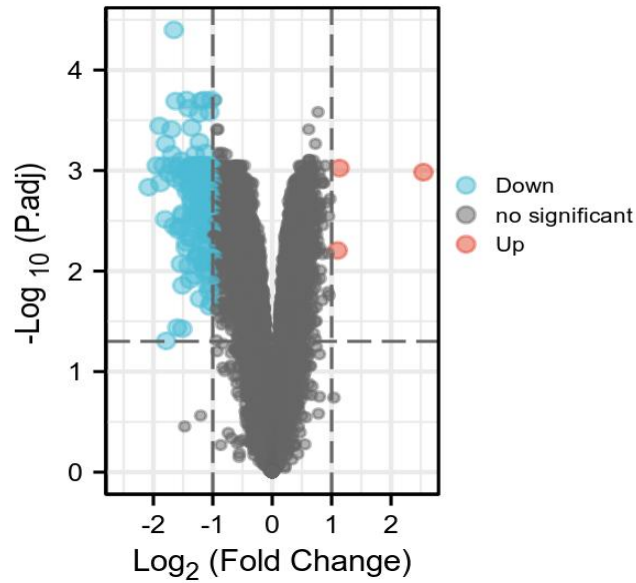


图 2-4 差异表达基因火山图

Fig.2-4 Volcano map of differentially expressed genes

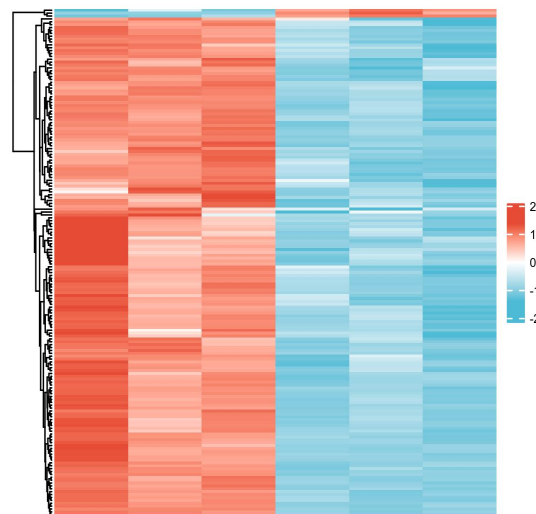


图 2-5 差异表达基因热图

Fig.2-5 Heat map of differentially expressed genes

### 2.2.3 ACR 处理导致的差异表达基因的蛋白互作网络

利用 STRING 在线工具及 Cytoscape 软件构建蛋白质相互作用关系网络，结果如图 2-6 A 所示。然后使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件分析出重要的功能模块，得到了两个功能模块（图 2-6 B），模块中包括 17 个关键基因，即 Mrpl16、Polr1c、RpS9、RpL5、Eef1b2、RpS3a1、RpS2、RpL35a、Naca、Pa2g4、Pmpcb、

细胞色素 C 氧化酶 6c (Cytochrome C Oxidase Subunit VIc, Cox6c)、Ndufb5、Ndufb10、细胞色素 C 氧化酶 7a2(Cytochrome C Oxidase Subunit VIIa-L, Cox7a2)、Slirp、Uqcrb, 这些关键基因很可能在 ACR 的睾丸毒性中发挥重要的生理调节功能。

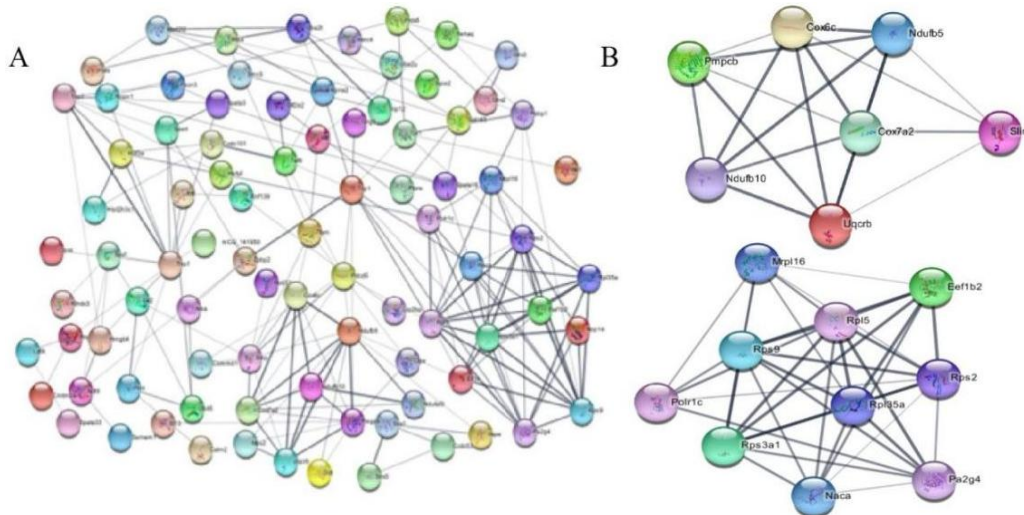


图 2-6 差异表达基因的蛋白互作网络图及功能模块

A: 蛋白互作网络图; B: 功能模块

Fig.2-6 Protein-protein interactions network diagram and functional modules of differentially expressed genes

A: Protein-protein interactions network diagram. B: Functional modules

### 2.2.4 GO 分析 ACR 处理导致差异表达的关键基因的富集通路

对通过蛋白互作网络分析得到的关键基因进行 GO 富集分析, 发现差异表达基因介导的生物过程主要富集于核糖核蛋白复合物生物发生、翻译调控、核糖体生物发生、rRNA 代谢过程、线粒体呼吸链复合体 I 组件、NADH 脱氢酶复合体、核糖体组装、线粒体呼吸链复合体、氧化磷酸化、有氧呼吸等; 在细胞组成方面, 差异表达基因主要富集于含线粒体蛋白复合物、呼吸链复合体、线粒体呼吸、核糖体亚基、核糖体、线粒体内膜蛋白复合物、胞质核糖体大亚基、NADH 脱氢酶复合体、线粒体呼吸链复合体 IV、氧化还原酶复合物、细胞色素复合体等; 在分子功能方面, 差异表达基因主要富集于电子转移活性、氧化还原驱动的活性跨膜转运蛋白活性、核糖体的结构成分、细胞色素 C 氧化酶活性、氧化还原酶活性、翻译调节活性、翻译延伸因子等。



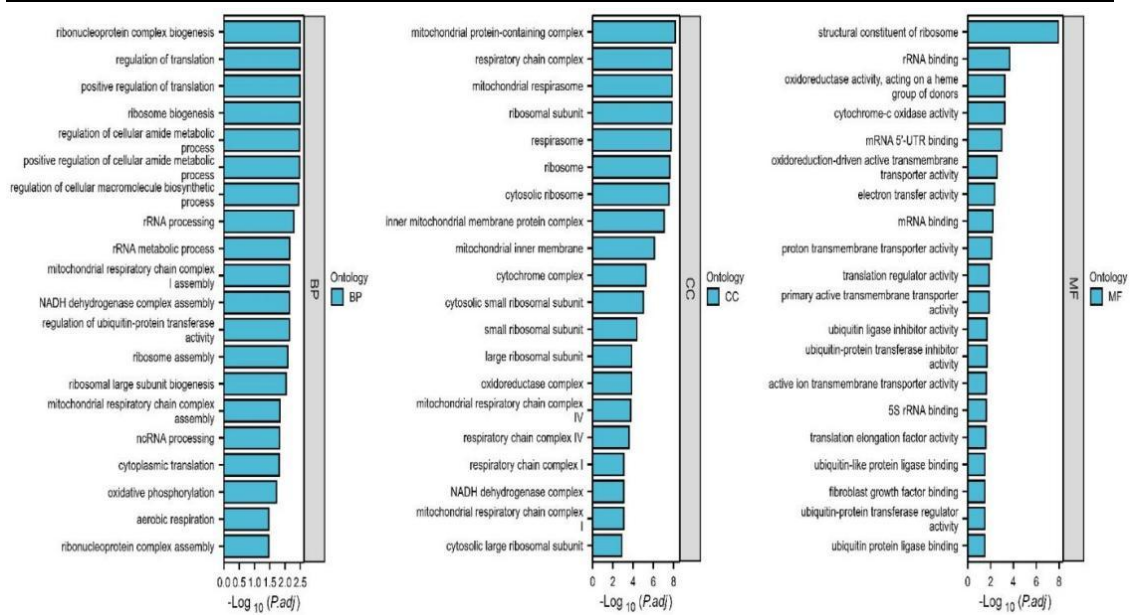


图 2-7 关键基因 GO 富集分析

Fig.2-7 The GO enrichment analysis of the hub genes

BP: 生物学过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能

BP: Biological Process. CC: Cellular Component. MF: Molecular Function

### 2.2.5 KEGG 分析 ACR 处理导致差异表达的关键基因的富集通路

将蛋白互作网络分析所得关键基因进行 KEGG 富集分析, 分析结果如图 2-8 所示。关键基因主要涉及核糖体、氧化磷酸化、非酒精性脂肪肝、糖尿病心肌病、化学致癌-活性氧、产热作用、冠状病毒病-新冠肺炎、帕金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病、心肌收缩、神经变性途径-多种疾病等信号通路。综合 GO 及 KEGG 富集分析的结果表明, 蛋白互作网络分析得到的关键基因主要富集在核糖体和线粒体的结构和功能方面, 因此, 后续研究主要从核糖体损伤和线粒体损伤的角度探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制机制。

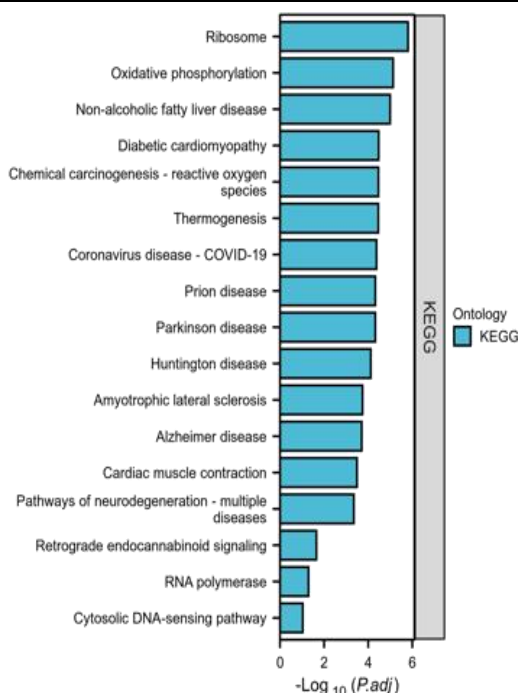


图 2-8 关键基因 KEGG 富集分析

Fig.2-8 The KEGG enrichment analysis of the hub genes

## 2.3 讨论

本章通过对关键基因进行富集分析后发现 ACR 诱导睾丸组织损伤的关键基因富集在核糖体、核糖体亚基、核糖体生物发生、NADH 脱氢酶复合体、线粒体呼吸链复合体、氧化磷酸化、细胞色素 C 氧化酶活性等与核糖体和线粒体结构和功能相关的生物学过程、细胞组分、信号通路上。

蛋白质互作网络通过蛋白间的相互作用将不同蛋白连接起来，在细胞周期调控、信号传递、基因表达、能量和物质代谢等机制研究中发挥重要作用。对机体进行蛋白质互作网络分析，有助于充分了解各蛋白之间的功能联系<sup>[97]</sup>。STRING 数据库是目前已知的分析预测蛋白质之间相互作用的涵盖物种最多、最常用的数据库，在差异表达基因中关键的核心调控基因筛选方面具有广泛应用<sup>[98]</sup>。基于 STRING 数据库进行蛋白网络互作分析，发现荨麻疹小鼠中差异表达的关键基因主要富集在 NF- $\kappa$ B 及 MAPK 信号通路<sup>[99]</sup>。利用 STRING 数据库构建蛋白质互作网络并进行富集分析后，发现黄芪能够通过 MAPK3、MMP9 等关键靶点及 MAPK、Rap1 和 Ras 等信号通路干预血管性认知障碍<sup>[100]</sup>。

对酿酒酵母细胞暴露于 ACR 后的变化进行多组学检测并进行生物信息学分

析, 结果表明, ACR 对酵母细胞中氧化还原平衡、能量代谢、脂质代谢、核苷酸代谢和核糖体功能造成了损害<sup>[101]</sup>。同时, ACR 处理能通过下调星形胶质细胞中线粒体生物发生和动力学相关基因的表达, 抑制线粒体呼吸链复合物的表达, 触发线粒体 ROS 积累, 破坏线粒体结构, 最终导致细胞凋亡<sup>[67]</sup>。本章对从数据集获得的关键基因进行 GO 和 KEGG 富集分析后发现, 关键基因主要富集在核糖体、核糖体亚基、核糖体生物发生、翻译调控、NADH 脱氢酶复合体、线粒体呼吸链复合体、氧化磷酸化、线粒体内膜蛋白复合物、氧化还原酶活性、细胞色素 C 氧化酶活性、电子转移活性等与核糖体、线粒体的结构和功能相关的生物学过程、细胞组分、信号通路上。以上结果表明, ACR 的毒性作用可能与其诱导核糖体损伤和线粒体损伤有关。

核糖体是普遍存在于生物体内的由 RNA 与蛋白质组成的核糖核蛋白复合物, 主要负责将遗传密码翻译为蛋白质。核糖体的亚基具有不同的功能, 小亚基的主要作用是调控 mRNA 的相关生物学过程, 而大亚基在结合 tRNA 和介导肽基转移方面具有重要作用<sup>[102]</sup>。核糖体中的 RNA 和蛋白质影响着多个生物学过程, 核糖体 RNA 具有肽基转移酶的功能, 这是核糖体被称为核酶的原因。核糖体蛋白能够推动 rRNA 正确折叠, 稳定核糖体大小亚基结构, 对核糖体生物合成及蛋白质翻译过程具有一定的调控作用<sup>[103]</sup>。除了调控蛋白质翻译和合成等核糖体相关功能之外, 核糖体蛋白还具有很多非核糖体功能, 能够在细胞 DNA 修复、细胞凋亡、细胞生长和增殖、细胞周期和耐药性等方面发挥作用<sup>[104-108]</sup>。研究表明, 任何一种核糖体蛋白出现缺失或下调都有可能对某个或某类蛋白质的合成造成影响<sup>[109, 110]</sup>。氯化镉处理孕哺期大鼠会导致仔鼠海马体及大脑皮层中 RpS6 的表达水平降低<sup>[111]</sup>; RpS3A1 能够通过 Bcl-2 相互作用阻止细胞凋亡<sup>[112]</sup>; 敲低 RpL34 后, JAK/STAT3 信号通路失活, 胶质瘤细胞的增殖和迁移受到抑制<sup>[113]</sup>; 预知子种子提取物干预后, HepG2 细胞中 RpS26 核糖体蛋白表达下调, 细胞增殖受到抑制<sup>[114]</sup>。在本研究中, ACR 处理后的睾丸中 RpS9、RpL5、RpS3A1、RpS2、RpL35A 的表达均出现了显著变化, 证明 ACR 可能通过调节 RpS9 等核糖体蛋白的表达, 对核糖体造成损伤。

线粒体作为细胞进行有氧呼吸的主要细胞器, 能够生成大量的 ATP 为细胞供能<sup>[115]</sup>。一些关键的细胞信号通路也交汇在线粒体, 如 ROS 生成、细胞凋亡、能量代谢等通路<sup>[116]</sup>。已有研究表明, 内源性 ROS 的主要来源是线粒体<sup>[117]</sup>。线粒体呼吸链受抑制能增加线粒体 ROS 的生成<sup>[118]</sup>。据报道, ROS 的累积和线粒体去极化能上调 Bax 的表达并且下调 Bcl-2 的表达, 进而导致细胞凋亡<sup>[119]</sup>。本研

研究发现睾丸中与线粒体相关的基因 Cox6c、Cox7a2、Ndufb5、Ndufb10 在 ACR 处理后出现显著变化。研究表明,无形体易位底物 1 在 HEK293T 细胞内表达后,靶向易位到线粒体,上调 Ndufb5, Ndufb3, Ndufs7 及 Cox6c 的表达,从而促进细胞能量产生并抑制细胞凋亡,在线粒体呼吸调节中发挥作用<sup>[120]</sup>。将 Ndufa4 敲低后发现 Cox6c 和 Cox5b 表达下调,线粒体复合物 IV 的活性和蛋白表达水平被抑制,这表明细胞氧化磷酸化受到抑制<sup>[121]</sup>。构建 Cox7a2-pEYFP-N1 荧光蛋白载体并转染到 TM3 小鼠间质细胞中,检测 Cox7a2 对类固醇急性调节蛋白表达的影响,发现 Cox7a2 通过下调类固醇急性调节蛋白的表达来抑制睾酮生成<sup>[122]</sup>。综上所述,ACR 可能通过改变 Cox6c 等线粒体相关基因的表达损伤线粒体。

## 2.4 小结

本章利用生物信息学方法分析预测了 ACR 诱导睾丸损伤的作用机制,在对差异表达基因进行蛋白网络互作分析后得到了关键基因,对关键基因进行 GO、KEGG 富集分析后发现关键基因主要富集在核糖体和线粒体的结构及功能方面。因此,后续研究将从核糖体损伤和线粒体损伤方面对 EGCG 抑制 ACR 诱导的睾丸损伤的机制进行探究。

### 第3章 EGCG对ACR诱导睾丸核糖体损伤的抑制机制

核糖体蛋白包括分布在小亚基上的蛋白和分布在大亚基上的蛋白两种。核糖体蛋白通过在合成蛋白质的过程中对rRNA进行折叠,促进rRNA三维结构生成,这具有一定的功能性;核糖体蛋白作为支架蛋白,在稳定核糖体的结构方面至关重要;除此之外,核糖体蛋白还能调整核糖体的空间构象<sup>[123]</sup>,结合RNA参与合成蛋白质<sup>[124]</sup>。

许多研究表明,核糖体蛋白还具有一些不同于核糖体传统功能的其他功能,即核糖体外功能,核糖体蛋白对各生命进程具有调节作用,这是与多种非核糖体组分的相互作用带来的<sup>[125]</sup>,包括基因表达、细胞生长、增殖及凋亡以及DNA修复等<sup>[126]</sup>。例如RpS3能够通过NF- $\kappa$ B信号通路影响细胞凋亡<sup>[127]</sup>,RpS9含量的增加,能够对细胞增殖起到重要作用<sup>[128]</sup>,RpS14能够影响细胞周期<sup>[129]</sup>。在生物体内,即使核糖体蛋白变化很细微,也会导致广泛的病理变化<sup>[130]</sup>。电离辐射降低了小鼠体内RpL23a表达水平,导致RpL23a-RpL11相互作用减弱,p53被激活,最终导致精子细胞凋亡<sup>[131]</sup>。12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13处理后,小鼠促炎因子表达增多,细胞载体PEP-1-RpS3通过NF- $\kappa$ B和MAPK信号通路发挥了对小鼠炎症反应的抑制作用<sup>[132]</sup>。木犀草素和槲皮素被证实能够阻断Akt/mTOR/c-Myc信号通路,抑制RpS19激活的上皮-间质转化信号传导,从而抑制人表皮癌细胞的转移<sup>[133]</sup>。对核糖体蛋白表达的研究,有利于更全面地分析凋亡的抑制机制。

之前的研究已通过生物信息学方法筛选到关键基因,并通过富集分析得到关键基因主要富集在核糖体和线粒体结构功能方面。RpS9能够通过SUMO特异性蛋白酶1(SUMO-Specific Proteases 1, SENP1)影响NF- $\kappa$ B信号通路<sup>[138]</sup>,RpL5是核糖体蛋白-双微体同源基因2(Mouse Double Minute 2, MDM2)-p53信号通路激活方面重要的启动因素<sup>[159]</sup>。因此,本章研究首先利用qPCR技术对关键基因RpS9、RpL5的表达进行检测,并通过Western Blot实验检测其在蛋白水平上的表达,并比较NF- $\kappa$ B、核转录因子 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (Inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha, I $\kappa$ B $\alpha$ )、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p53、共济失调毛细血管扩张突变蛋白(Ataxia-Telangiectasia Mutated Proteins, ATM)、p-ATM、共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶(ATM and Rad3 related, ATR)、p-ATR、H2A组蛋白家族成员X(H2A Histone Family

Member X, H2AX)、 $\gamma$ H2AX、p21、细胞周期检查点激酶 2 (Checkpoint Kinase 2, Chk2)、p-Chk2、细胞周期检查点激酶 1 (Checkpoint Kinase 1, Chk1)、p-Chk1、G2 有丝分裂期特异性周期蛋白 B1 (G2 Mitotic Specific Cyclin B1, Cyclin B1) 蛋白的表达水平变化, 在细胞炎症、细胞周期以及 DNA 损伤应答等方面探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸核糖体损伤的抑制机制。

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 实验试剂

表 3.1 主要试剂及生产公司

Table 3.1 Main reagents and production companies

试剂名称	生产公司
RIPA 裂解液	大连美仑生物技术有限公司
PMSF 蛋白酶抑制剂	北京索莱宝科技有限公司
磷酸酶抑制剂	北京索莱宝科技有限公司
BCA 蛋白浓度试剂盒	大连美仑生物技术有限公司
5×SDS 蛋白上样缓冲液	大连美仑生物技术有限公司
ECL 化学发光液	大连美仑生物技术有限公司
脱脂奶粉	伊利股份有限公司
Trizol 试剂	武汉赛维尔生物科技有限公司
ddH <sub>2</sub> O	大连美仑生物技术有限公司
三氯甲烷	中国医药集团有限公司
异丙醇	中国医药集团有限公司
乙醇	中国医药集团有限公司
Anti- $\beta$ -actin antibody	Cell Signaling Technology
Anti-I $\kappa$ B $\alpha$ antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ antibody	Cell Signaling Technology
Anti-NF- $\kappa$ B antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Histone H3 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Rps9 antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-SENP1 antibody	美国 Santa 公司
Anti-RpL5 antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-MDM2 antibody	美国 Santa 公司
Anti-p53 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-Chk2 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Chk2 antibody	Cell Signaling Technology

### 第3章 EGCG对ACR诱导睾丸核糖体损伤的抑制机制

Anti-Phospho-Chk1 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Chk1 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-p21 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Cyclin B1 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-ATM antibody	Cell Signaling Technology
Anti-ATR antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-ATM antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-ATR antibody	Cell Signaling Technology
Anti-H2AX antibody	Cell Signaling Technology
Anti-γH2AX antibody	Cell Signaling Technology
Goat Anti-Rabbit IgG, HRP Conjugated	Cell Signaling Technology
Goat Anti-Mouse IgG, HRP Conjugated	Cell Signaling Technology

### 3.1.2 实验耗材

表 3.2 主要耗材及生产公司

Table 3.2 Main consumables and production companies

耗材名称	生产公司
EP 管	北京鼎国有限公司
移液枪	苏州 BIOHIT 百得实验室仪器有限公司
96 孔板	武汉赛维尔生物科技有限公司
枪头	北京鼎国有限公司
转膜海绵	美国 BIO-RAD 公司
转膜滤纸	美国 BIO-RAD 公司
抗体孵育盒	北京鼎国有限公司
PVDF 膜	美国 BIO-RAD 公司
PCR-8 联管	武汉赛维尔生物科技有限公司

### 3.1.3 仪器设备

表 3.3 主要仪器及生产公司

Table 3.3 Main instruments and production companies

所用仪器	生产公司
THERMO FISHER Multiskan FC 酶标仪	上海赛默飞世尔仪器有限公司
BSA224S-WC 电子天平	上海赛多利斯贸易有限公司
L-500 离心机	长沙湘仪离心机仪器有限公司
SCR 20 BC 高速冷冻离心机	日本日立有限公司
TL-80 金属浴	西安天隆科技有限公司
1658800 电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
1653323 转膜仪	美国 BIO-RAD 公司

---

TS-100 脱色摇床	其林贝尔仪器制造有限公司
7500 Fast Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪	美国应用生物系统公司
MicroChemi4.2 化学发光成像仪	以色列 DNR 公司

---

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 实时荧光定量检测

#### (1) 提取组织总 RNA

使用 Trizol 进行组织总 RNA 的提取<sup>[134]</sup>, 具体过程按照 Trizol 试剂使用说明书进行。主要步骤如下: 研钵在液氮中预冷, 充分研磨睾丸组织, 过程中加入液氮以使低温稳定; 向研磨好的组织匀浆液中加入 1 mL Trizol, 涡旋, 通过剧烈震荡使组织匀浆与 Trizol 试剂充分混匀, 然后静置于室温 5 min; 将上一步反应液在 4°C, 12000 rpm 条件下离心 10 min, 收集上清液; 向上清液中进一步加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷, 进行组织中核酸和蛋白质的分离。混合液震荡混匀后室温下静置 10 min, 之后在 4°C, 12000 rpm 条件下离心 10 min, 得到上层无色水样层; 将上层水相小心缓慢地吸取到干净离心管中, 避免吸到含有蛋白质的中间溶液层以污染产物。加入和吸取的水相溶液等量的异丙醇使核酸沉淀, 混匀后置于室温使二者充分融合。之后用离心机以 4°C, 12000 rpm 的条件离心混合液 15 min, 离心后可看到白色胶状沉淀; 弃去上清, 并向沉淀中加入 1 mL 75%乙醇, 充分震荡以洗涤 RNA 沉淀中的可溶性有机杂质, 后在 4°C、12000 rpm 条件下离心 10 min, 弃去上清, 可重复清洗使产物纯度更高。将底部有 RNA 沉淀的离心管在阴凉通风处敞口放置, 待沉淀中的乙醇挥发之后即可得到透明胶状 RNA。

#### (2) RNA 浓度及纯度测定

加入 20  $\mu$ L DEPC 水将透明胶状 RNA 溶解, 用移液枪吹打均匀, 制备成均匀溶液备用。

①仪器校准: 将 1  $\mu$ L DEPC 水小心点入微量紫外分光光度计的上样孔, 不要有气泡产生;

②检测: 测试前使用擦镜纸以避免出现残留物。待测样品每次点入 1  $\mu$ L 于上样孔中检测;

③分析: RNA 的最大吸收峰在 260 nm 处, 蛋白质最大吸收峰在 280 nm 处,



其他盐和小分子在230 nm处。RNA样品浓度 (ng/μL) = OD<sub>260</sub> × 稀释倍数 × 40, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值在1.8-2.0时, 所提RNA纯度合格, 小于1.8则表明样本RNA中含有较多蛋白质杂质, 大于2.2则表明RNA发生了降解。

(3) cDNA合成

①去除RNA中混入的DNA组分

在RNase-free离心管中加入表3.4所示试剂, 移液枪吹匀后在42°C条件下反应2 min。

表3.4 去除DNA反应体系  
Table 3.4 DNA removal reaction system

试剂	用量
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	16 μL
4×gDNA wiper Mix	4 μL
模板RNA工作液	Total RNA: 1 μL

②逆转录

反应完成后, 向第1步的反应管中加入4 μL 5×HiScript III qRT SuperMix, 并用移液枪吹打均匀, 并在表3.5所示反应条件下进行逆转录反应。

表3.5 RNA逆转录反应条件  
Table 3.5 RNA reverse transcription reaction condition

反应温度	反应时间
37°C	15 min
85°C	5 sec

cDNA合成实验的试剂来自南京诺唯赞生物科技有限公司, 实验过程中的所有耗材均为RNase-free处理过的产品。

(4) 引物设计

所检测基因的cDNA序列是在NCBI数据库里找到的, 利用软件依照引物设计原则设计序列, 并通过NCBI数据库中BLAST功能选出特异性好的引物序列。

表3.6 目的基因引物序列  
Table 3.6 Primers used for quantitative real-time PCR analysis

Gene	Primer (5'-3')	
	Forward	Reverse
GAPDH	GCAAGTTCAACGGCACAG	CTCGCTCCTGGAAGATGG
RpS9	GGATGAGGGCAAGATGAA	CGAACAATGAAAGATGGAAT

RpL5	GTGGAGGTGAATGGAGAC	CTTTATTGCCAGTTGTAGTT
Cox6c	TTGCCGAAACCACAGATG	CAGCCACGCCAAACTTAT
Cox7a2	ATCAGCACCACCTTCACGA	CTGTAAAGGAGGGCATCA

### (5) qPCR

按照表 3.7 所示顺序和剂量, 将试剂依次加入预先放好的八连排 PCR 管中, 将八连管瞬离, 使管中试剂全部沉降到管底, 确保没有气泡后按照表 3.8 的反应条件进行 qPCR 实验。

表 3.7 qPCR 反应体系  
Table 3.7 qPCR reaction system

试剂	用量
2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	5 $\mu$ L
Primer 1 (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
Primer 2 (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
Template cDNA	0.8 $\mu$ L
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	3.8 $\mu$ L

表 3.8 qPCR 反应条件  
Table 3.8 qPCR reaction condition

步骤	循环数	温度	时间
预变性	1	95°C	30 sec
循环反应	40	95°C	10 sec
		60°C	30 sec
融解曲线	1	95°C	15 sec
		60°C	60 sec
		95°C	15 sec

### (6) 数据处理

本实验采用 qPCR 中的相对定量法, 记录每个孔反应过程中扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值时的所对应的扩增循环数 (Ct 值), 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-Phosphate, GAPDH) 为内参基因<sup>[135]</sup>, 每个实验重复三次, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算各目的基因的相对表达量, 然后进行统计分析。

## 3.2.2 Western Blot

### (1) 提取组织总蛋白

参考朱见<sup>[136]</sup>提取动物组织蛋白的方法对本研究所用大鼠睾丸组织蛋白进行提取, 步骤如下: 将-80°C冰箱中的大鼠睾丸组织取出, 用组织剪剪取 0.04 g,

冰上研磨至无可见组织块后移至离心管中，以 100:1 的比例将 RIPA 裂解液和 PMSF 混匀，然后将 300  $\mu$ L 配好的裂解液放入，裂解 40 min，过程中每 10 min 涡旋震荡一次；将混合液在 4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 条件下离心 15 min，上清即为蛋白溶液。向蛋白溶液中加入 5 $\times$  Loading Buffer，比例为 4:1，混匀后在 95 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10 min 使蛋白变性，降至室温后可将蛋白进行分装，以防止反复冻融影响蛋白质量，每次实验仅取一小份使用，其余蛋白保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

### (2) 蛋白浓度测定

利用二辛可宁酸 (Bicinchoninic Acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒对组织总蛋白浓度定量，实验重复 3 次以保证准确性。每孔加入 2  $\mu$ L 样本溶液、8  $\mu$ L 蒸馏水及 200  $\mu$ L BCA 工作液，37 $^{\circ}$ C 环境下反应 30 min，用酶标仪测定反应液在 570 nm 处的 OD 值，代入标准曲线即可得到样本蛋白浓度。

### (3) SDS-PAGE 凝胶电泳

① 组装仪器并按比例配制胶液：玻璃板洗净晾干后组装到制胶架上，根据表 3.9 和表 3.10 所示比例配制不同浓度的分离胶和浓缩胶，待胶板制好后安装到电泳芯上，置于电泳槽中。

表 3.9 不同浓度分离胶的配置比例

Table 3.9 Configuration ratio of different concentration separation gel

	5%	10%	12%
H <sub>2</sub> O	2.7 mL	4.0 mL	3.4 mL
30%聚丙烯酰胺	0.67 mL	3.3 mL	4.0 mL
Tris-HCl (pH 8.8)	0.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10%SDS	0.04 mL	0.1 mL	0.1 mL
10%过硫酸铵	0.04 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.004 mL	0.01 mL

表 3.10 5%浓缩胶的配置比例

Table 3.10 Configuration of 5% concentrated gel

	4 mL	6 mL	10 mL
H <sub>2</sub> O	2.7 mL	4.1 mL	3.4 mL
30%聚丙烯酰胺	0.67 mL	1.0 mL	4.0 mL
Tris-HCl (pH 6.8)	0.5 mL	0.75 mL	2.5 mL
10%SDS	0.04 mL	0.06 mL	0.1 mL
10%过硫酸铵	0.04 mL	0.06 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.006 mL	0.01 mL

② 样本蛋白准备：将样本蛋白溶液放于预热好的 40 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 5 min

备用。

③加样与电泳：将电泳液倒入电泳槽中，使电泳液没过梳子，缓慢拔出梳子以免凝胶受损，将样本蛋白及三色预染 Marker 加至泳道孔，各组蛋白上样量一致。

④SDS-PAGE 电泳：蛋白和 Marker 在浓缩胶中电泳时，电压为 80 V，当蛋白跑到分离胶时，将电压调整至 100 V。

#### (4) 转膜

电泳结束后，将预先浸泡于转膜液中的滤纸、海绵垫等转膜材料放在转膜夹上，顺序从负极到正极依次为：海绵片、滤纸、蛋白胶、氟化聚偏二乙烯滤膜（Polyvinylidene-Fluoride, PVDF）、滤纸、海绵片，用玻璃棒将蛋白胶和 PVDF 膜之间的气泡赶出。将转膜夹固定于转膜槽中，检查正负极后在冰浴条件下恒压 90 V 转膜 2 h。

#### (5) 封闭

三羟甲基氨基甲烷缓冲液（Tris Buffered Saline with Tween 20, TBST）洗 3 次膜，浸没在 5%脱脂奶粉中封闭 1 h。

#### (6) 抗体孵育

根据抗体说明书稀释待用抗体，使对应的一抗没过封闭好的膜，4℃抗体孵育盒中过夜，TBST 洗 3 次，二抗结合 1 h，最后 TBST 洗 3 次。

#### (7) 显影

用加强型化学发光液（Enhanced Chemiluminescence, ECL）显影条带。将 ECL 的 A、B 液等比例混匀即为 ECL 工作液，现配现用，用移液枪混匀后加在 PVDF 膜上，静置后进行曝光。

#### (8) 灰度分析

使用 Image J 软件对所得蛋白条带进行灰度值分析。

### 3.2.3 数据处理

以上所得数据由平均数±标准差表示，通过 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析，两组数据之间的比较使用 LSD 法， $P < 0.05$  则差异显著， $P < 0.01$  则差异极显著。每个实验重复三次。

### 3.3 实验结果

#### 3.3.1 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9 和 RpL5 mRNA 表达水平的影响

通过 qPCR 方法对 Control 组、ACR 组、EGCG 低剂量组、EGCG 高剂量组和单独 EGCG 组中关键基因 RpS9 mRNA 和 RpL5 mRNA 的相对表达量进行了检测。结果如图 3-1 所示，与 Control 组相比，ACR 处理后大鼠睾丸组织中 RpS9 和 RpL5 mRNA 的相对表达量均出现极显著下调 ( $P < 0.01$ )；与 ACR 组相比，10 mg/kg bw/d EGCG 预处理后，睾丸组织中 RpS9 mRNA 出现极显著上调 ( $P < 0.01$ )，40 mg/kg bw/d EGCG 预处理后，睾丸组织中 RpS9 mRNA 的相对表达量极显著升高 ( $P < 0.01$ )，RpL5 mRNA 的相对表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。以上结果表明，EGCG 能够抑制 ACR 引起的睾丸 RpS9 和 RpL5 mRNA 表达水平下降。

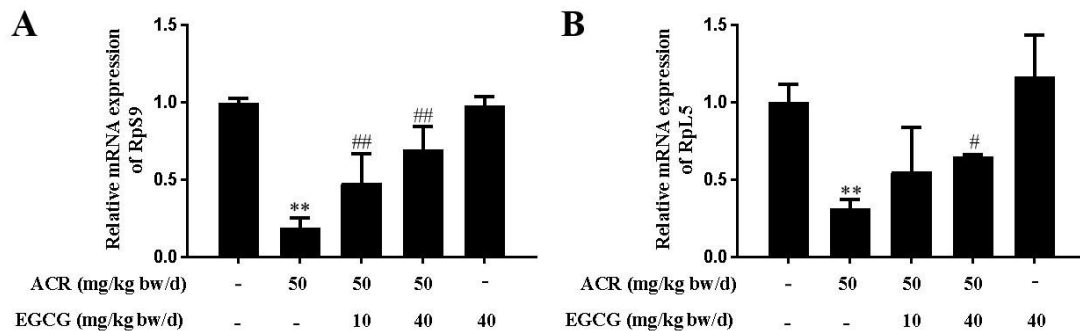


图 3-1 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9 和 RpL5 mRNA 表达水平的影响  
A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpS9 mRNA 表达的统计结果；B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpL5 mRNA 表达的统计结果

与 Control 组相比，\*\* $P < 0.01$ ；与 ACR 组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

Fig.3-1 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of RpS9 and RpL5 mRNA in ACR-injured rat testis tissue

A: Statistical results of RpS9 mRNA expression in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of RpL5 mRNA expression in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with ACR group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

### 3.3.2 EGCG对ACR损伤大鼠睾丸组织RpS9、SENP1、RpL5、MDM2和p53蛋白表达水平的影响

图3-2所示的是关键基因RpS9在蛋白水平上的表达情况及SENP1蛋白的表达情况。与Control组相比,大鼠暴露于ACR后,其睾丸组织中RpS9及SENP1蛋白表达水平极显著降低( $P < 0.01$ ),表明ACR能够抑制RpS9及SENP1蛋白的表达;经不同浓度EGCG处理后,RpS9及SENP1蛋白的表达水平与ACR组相比有了极显著上升( $P < 0.01$ ),这表明EGCG能够促进RpS9及SENP1的蛋白表达;与Control组相比,单独40 mg/kg bw/d EGCG处理后,睾丸组织中RpS9及SENP1蛋白的表达水平并没有显著变化,这表明EGCG本身在40 mg/kg bw/d浓度下不影响睾丸组织中RpS9及SENP1的蛋白表达。

对关键基因RpL5在蛋白水平上的表达情况及MDM2、p53的表达情况进行检测,结果如图3-3所示,与Control组相比,ACR处理后大鼠睾丸组织中RpL5及MDM2蛋白表达水平极显著降低( $P < 0.01$ ),而p53蛋白的表达水平极显著升高( $P < 0.01$ ),这表明ACR能够抑制RpL5及MDM2蛋白的表达,促进p53蛋白的表达;与ACR组相比,EGCG预处理后大鼠睾丸中RpL5及MDM2蛋白的表达水平均有极显著上升( $P < 0.01$ ),而EGCG低剂量组和EGCG高剂量组中的p53蛋白则呈极显著下降趋势( $P < 0.01$ ),这表明EGCG对RpL5及MDM2蛋白表达的促进作用及对p53蛋白表达的抑制作用;单独40 mg/kg bw/d EGCG处理后,睾丸组织中RpL5、MDM2及p53蛋白的表达水平与Control组相比并没有显著变化,这表明EGCG本身在40 mg/kg bw/d浓度下不影响睾丸组织中RpL5、MDM2及p53的蛋白表达。

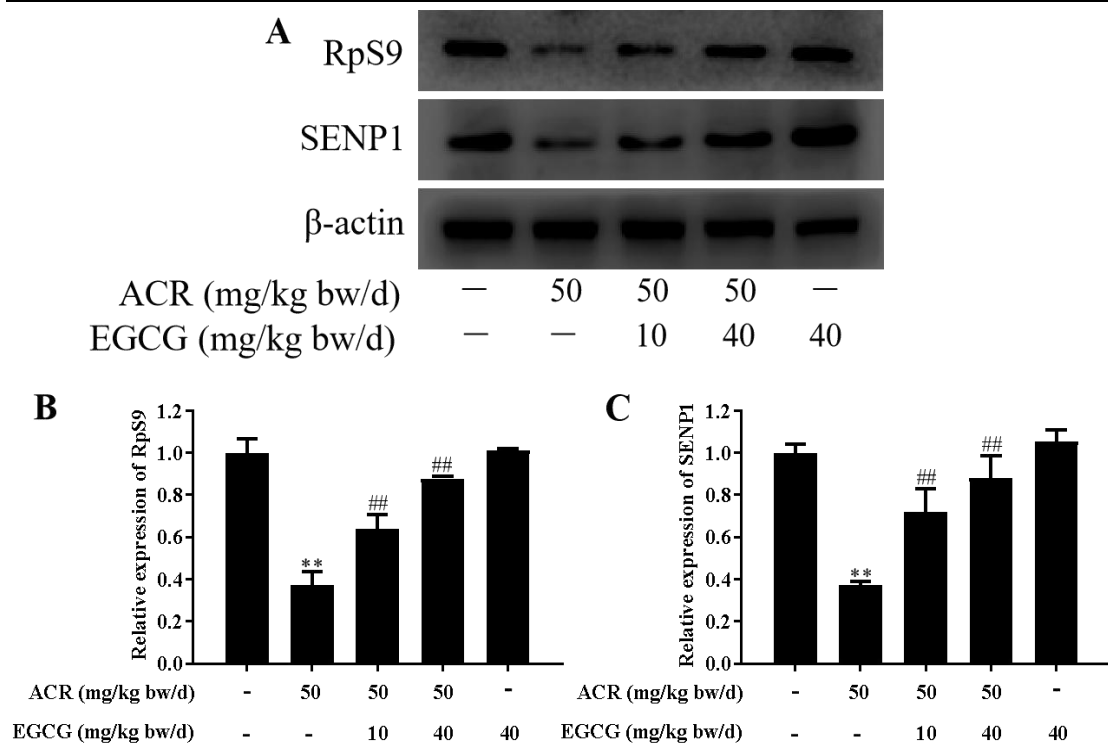


图 3-2 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpsS9 和 SENP1 蛋白表达水平的影响  
 A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpsS9 和 SENP1 的蛋白表达检测; B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpsS9 的蛋白表达统计结果; C: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 SENP1 的蛋白表达统计结果

与 Control 组相比, \*\*P < 0.01; 与 ACR 组相比, ##P < 0.01

Fig.3-2 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of RpsS9 and SENP1 proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of RpsS9 and SENP1 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of RpsS9 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of protein expression of SENP1 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, ##P < 0.01

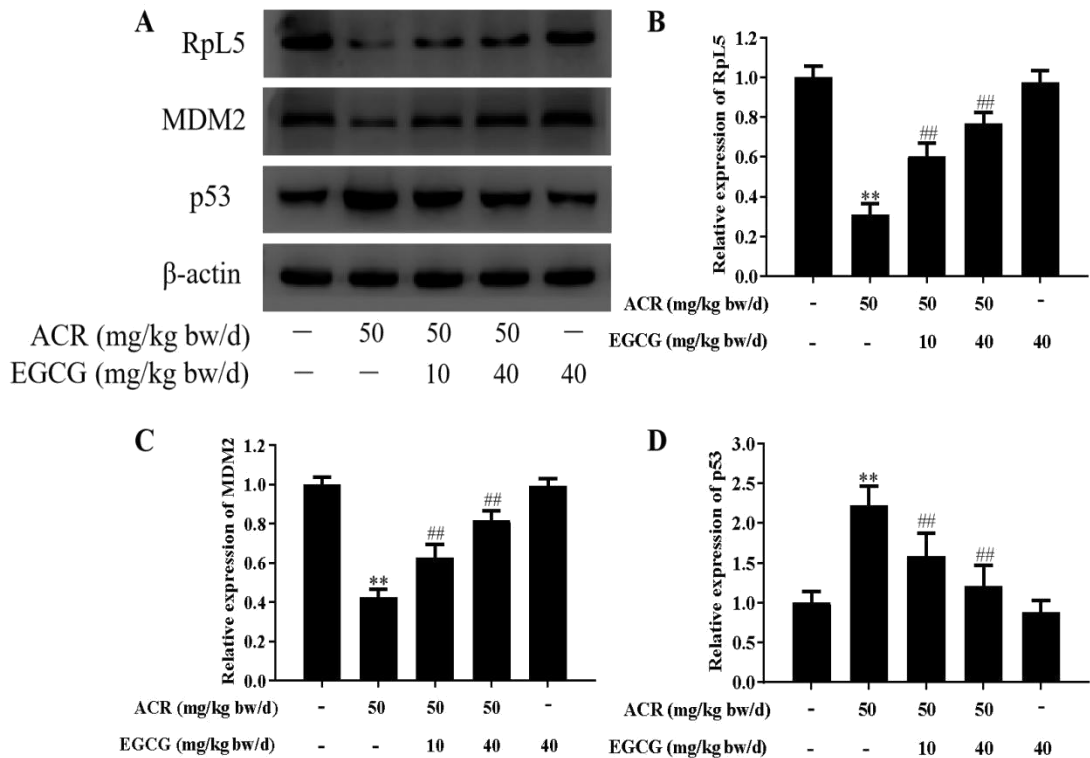


图 3-3 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpL5、MDM2 和 p53 蛋白表达水平的影响  
 A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpL5、MDM2 和 p53 的蛋白表达检测; B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 RpL5 的蛋白表达统计结果; C: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 MDM2 的蛋白表达统计结果; D: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p53 的蛋白表达统计结果

与 Control 组相比, \*\*P < 0.01; 与 ACR 组相比, ##P < 0.01

Fig.3-3 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of RpL5, MDM2 and p53 proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of RpL5, MDM2 and p53 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of RpL5 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of protein expression of MDM2 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. D: Statistical results of protein expression of p53 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment  
 Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, ##P < 0.01

### 3.3.3 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 NF-κB 通路相关蛋白表达水平的影响

对 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达水平的检测结果如图 3-4 所示, 与 Control 组相比, ACR 处理后核 NF-κB p65/总 NF-κB p65 蛋白表达比值极显著升高 (P <



0.01), 这表明 ACR 处理导致组织细胞中的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白发生了入核现象; 与 ACR 组相比, EGCG 低剂量组和 EGCG 高剂量组中核 NF- $\kappa$ B p65/总 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达比值均出现极显著下降 ( $P < 0.01$ ), 这表明 EGCG 对 ACR 引起的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白入核现象有抑制作用。ACR 组与 Control 组相比 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达比值极显著上升 ( $P < 0.01$ ), 表明 ACR 诱导了 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的磷酸化; 与 ACR 组相比, EGCG 低剂量组和 EGCG 高剂量组中 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达比值极显著下降 ( $P < 0.01$ ), 这表明 EGCG 对 ACR 诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白磷酸化起到了抑制作用。与 Control 组相比, 以上蛋白的相对表达水平在单独 40 mg/kg bw/d EGCG 处理后的睾丸组织中均没有显著变化, 表明 EGCG 本身在 40 mg/kg bw/d 浓度下不影响大鼠睾丸 NF- $\kappa$ B 信号通路。

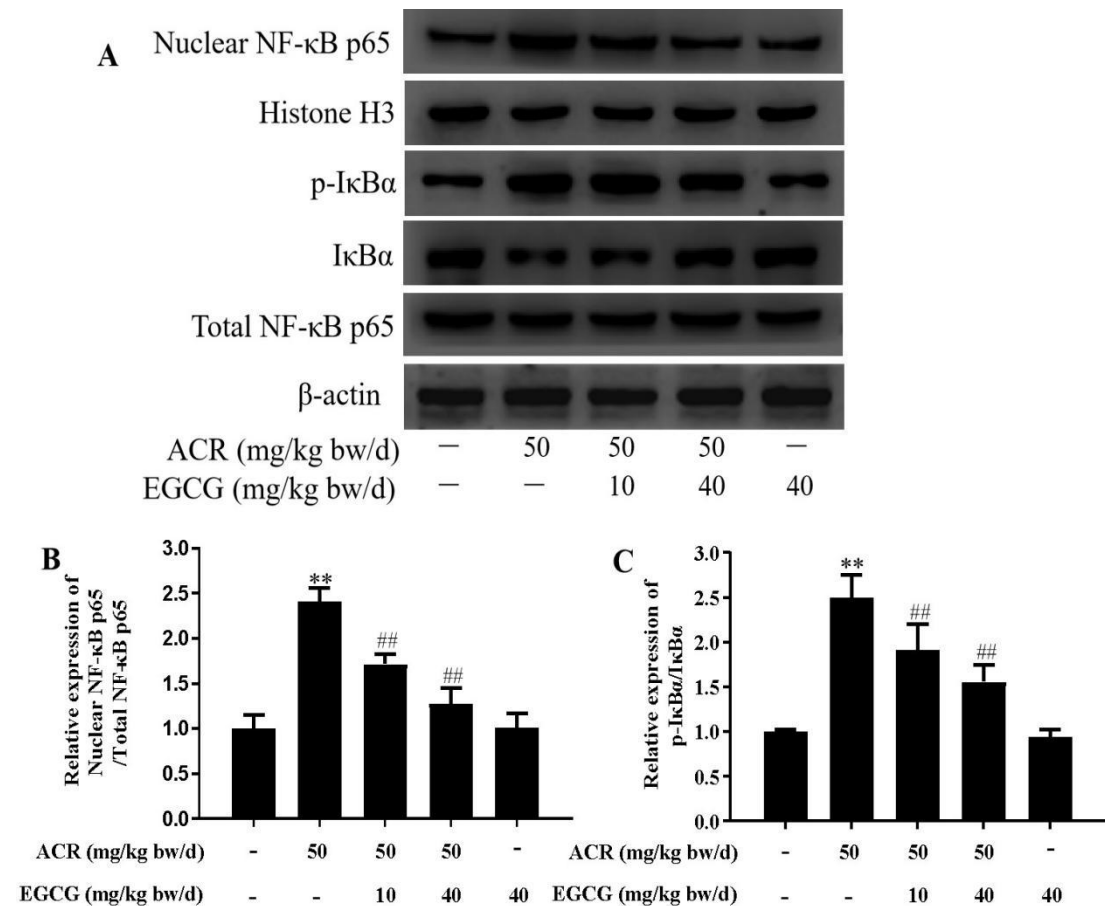


图 3-4 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水平的影响  
A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的蛋白表达检测; B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织核 NF- $\kappa$ B p65/总 NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达统计结果; C: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达统计结果  
与 Control 组相比,  $**P < 0.01$ ; 与 ACR 组相比,  $##P < 0.01$

Fig.3-4 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of NF- $\kappa$ B signaling pathway-related

proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of NF- $\kappa$ B signaling pathway-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of nuclear NF- $\kappa$ B p65/total NF- $\kappa$ B p65 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of protein expression of p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, ##P < 0.01

### 3.3.4 EGCG对ACR损伤大鼠睾丸组织细胞周期相关蛋白表达水平的影响

图 3-5 所示为细胞周期相关蛋白 p-Chk2、Chk2、p-Chk1、Chk1、p21、Cyclin B1 的表达水平的检测结果。与 Control 组相比，ACR 处理极显著地增加了 p21 蛋白的表达量(P < 0.01)，Chk2 和 Chk1 蛋白的磷酸化水平极显著增高(P < 0.01)，而 Cyclin B1 蛋白的表达水平则受到抑制，出现了极显著地减少(P < 0.01)；与 ACR 组相比，EGCG 低剂量组和 EGCG 高剂量组中 Chk2 和 Chk1 蛋白的磷酸化水平及 p21 蛋白的表达水平极显著下降(P < 0.01)，而 Cyclin B1 蛋白在 EGCG 预处理后的睾丸组织中均出现极显著升高(P < 0.01)；单独 EGCG 处理后，睾丸组织中 Chk2 和 Chk1 蛋白的磷酸化水平以及 p21、Cyclin B1 蛋白的表达水平与 Control 组相比没有显著变化，表明 EGCG 本身在 40 mg/kg bw/d 浓度下可能不影响大鼠睾丸细胞周期。以上结果表明，EGCG 能够抑制 ACR 对细胞周期相关蛋白的上调或下调作用。

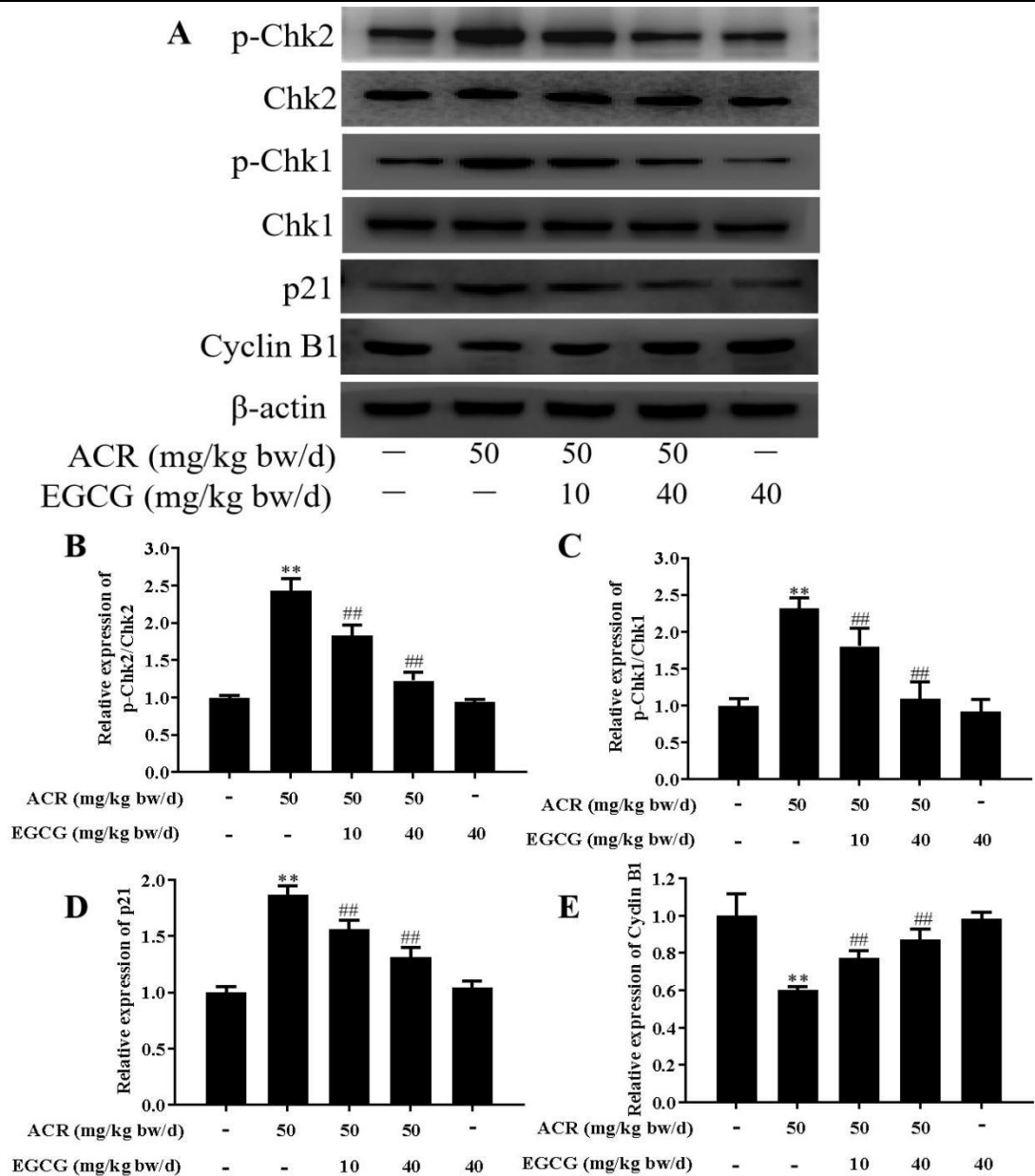


图 3-5 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞周期相关蛋白表达水平的影响  
 A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织细胞周期相关蛋白的蛋白表达检测; B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-Chk2/Chk2 的蛋白表达统计结果; C: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-Chk1/Chk1 的蛋白表达统计结果; D: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p21 的蛋白表达统计结果; E: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cyclin B1 的蛋白表达统计结果

与 Control 组相比, \*\*P < 0.01; 与 ACR 组相比, ##P < 0.01

Fig.3-5 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of cell cycle-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of cell cycle-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of p-Chk2/Chk2 in testis

tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of protein expression of p-Chk1/Chk1 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. D: Statistical results of protein expression of p21 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. E: Statistical results of protein expression of Cyclin B1 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with ACR group, ## $P < 0.01$

### 3.3.5 EGCG对ACR损伤大鼠睾丸组织DNA损伤应答相关蛋白的影响

对DNA损伤应答相关蛋白ATM、p-ATM、ATR、p-ATR、 $\gamma$ H2AX、H2AX的表达水平的检测结果如图3-6所示。与Control组相比，ACR处理极显著地促进了ATM、ATR、H2AX蛋白的磷酸化( $P < 0.01$ )；与ACR组相比，EGCG低剂量组和高剂量组中ATM、ATR、H2AX蛋白的磷酸化受到了极显著地抑制，即p-ATM/ATM、p-ATR/ATR、 $\gamma$ H2AX/H2AX蛋白表达比值极显著降低( $P < 0.01$ )；单独40 mg/kg bw/d EGCG处理后，睾丸组织中ATM、ATR、H2AX蛋白磷酸化水平与Control组相比没有显著变化。以上结果表明，EGCG能够抑制ACR对细胞DNA损伤应答相关蛋白的影响。

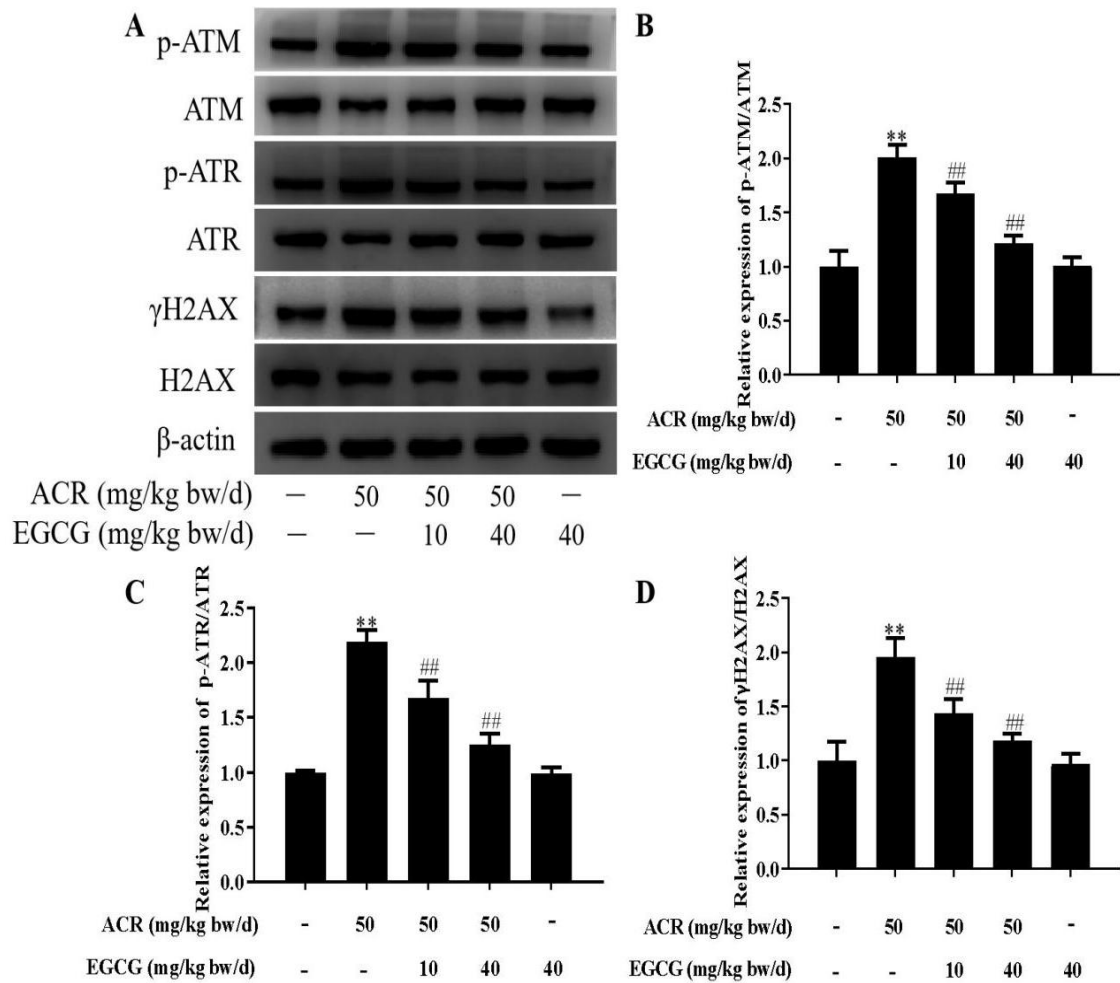


图 3-6 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 DNA 损伤应答相关蛋白表达水平的影响  
A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 DNA 损伤应答相关蛋白的蛋白表达检测; B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-ATM/ATM 的蛋白表达统计结果; C: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-ATR/ATR 的蛋白表达统计结果; D: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织γH2AX/H2AX 的蛋白表达统计结果  
与 Control 组相比, \*\*P < 0.01; 与 ACR 组相比, ##P < 0.01

Fig.3-6 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of DNA damage response-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of DNA damage response-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of p-ATM/ATM in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of protein expression of p-ATR/ATR in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. D: Statistical results of protein expression of γH2AX/H2AX in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, ##P < 0.01

### 3.4 讨论

RpS9 是一种能与 B23 相互作用的蛋白,属于核糖体蛋白 S4P 家族<sup>[137]</sup>,与类泛素蛋白修饰分子 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路密切相关<sup>[138]</sup>。NF- $\kappa$ B 是 SUMO 的作用靶点之一<sup>[139, 140]</sup>,是一种重要的调节多个炎症基因的转录因子,能够生成具有转录活性的二聚体<sup>[141, 142]</sup>,正常情况下 I $\kappa$ B $\alpha$ 与 NF- $\kappa$ B 结合, NF- $\kappa$ B 在细胞质中停留,外界刺激细胞后, I $\kappa$ B $\alpha$ 发生磷酸化被降解<sup>[143]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路是炎症级联反应中的重要启动因子,并且在细胞凋亡中也发挥着关键作用<sup>[144, 145]</sup>。在 NF- $\kappa$ B 信号通路中, I $\kappa$ B $\alpha$ 被磷酸化降解的过程中可结合泛素分子, SUMO 分子在这个进程中竞争性结合泛素分子<sup>[146]</sup>, SENP1 活性降低显著上调 SUMO 结合的蛋白<sup>[147]</sup>。SUMO 修饰可参与许多生物学过程的调控,如信号传导、细胞周期、DNA 损伤修复等<sup>[148-150]</sup>。

卵清蛋白刺激后, C57BL/6 小鼠的先天免疫应答被激活, RpS9 等核心基因在小鼠免疫应答及局部过敏性炎症反应中发挥着重要作用<sup>[151]</sup>。溶酶体相关蛋白跨膜 4 $\beta$ 在体外和体内促进白血病的进展,与 RpS9 相互作用,并正向调节 RpS9 蛋白稳定性,通过激活 STAT3 增强白血病细胞进展<sup>[152]</sup>。过多的乳酸通过在 SENP1 活性位点与锌形成复合物来结合并抑制 SENP1,使细胞周期后期促进复合物上两个残基的 SUMO 化,导致细胞周期蛋白降解,影响细胞增殖<sup>[153]</sup>。在本研究中, ACR 处理导致 RpS9 基因在蛋白水平上的表达量显著下调,进一步验证了生物信息学分析的结果; SENP1 表达水平下调,这可能与 ACR 诱导 RpS9 表达下降有关; I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化水平和核 NF- $\kappa$ B p65/总 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达比值的显著上升,表明 ACR 激活了 NF- $\kappa$ B 信号通路。不同浓度 EGCG 预处理后, ACR 引起的 RpS9 和 SENP1 表达下调、NF- $\kappa$ B 信号通路激活等均有明显改善,表明 EGCG 能够通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 ACR 的睾丸毒性。综上, ACR 能够引起 RpS9 表达的下调,并可能通过 SENP1 对 NF- $\kappa$ B 信号通路进行调控, EGCG 能够抑制 ACR 诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路激活。

RpL5 基因编码的核糖体蛋白是 60S 亚基的组成部分,是典型的编码核糖体蛋白基因<sup>[154]</sup>, RpL5 基因的信息已有许多报道<sup>[155]</sup>。研究发现,核糖体蛋白异常以及刺激性的药物处理等均会破坏核糖体的生物合成过程<sup>[156]</sup>。核糖体受到损伤后会出现核仁形态及活性发生改变、p53 依赖或非依赖性信号通路被激活、rRNA 转录加工受到影响等现象<sup>[157]</sup>。此时核糖体蛋白的表达发生变化,功能开始紊乱,核糖体蛋白通过与泛素连接酶 MDM2 相互作用将应激信号传递给 p53 蛋白,与

核仁蛋白结合的MDM2无法将p53蛋白降解,导致p53蛋白表达上调,p53信号通路被激活,进而引起细胞p53依赖性细胞周期阻滞与凋亡。这一信号传递过程也被称为核糖体蛋白-MDM2-p53信号通路,在调节细胞增殖方面发挥着重要作用<sup>[158]</sup>。许多核糖体蛋白已被证实能够与MDM2结合<sup>[107]</sup>,从而使p53蛋白激活,其中RpL5是核糖体蛋白-MDM2-p53信号通路激活方面重要的启动因素<sup>[159]</sup>。研究表明,含WD重复序列的蛋白质74能够通过调节RpL5蛋白水平,调节MDM2并抑制MDM2对p53的泛素化降解,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡<sup>[160]</sup>。麦冬皂苷通过RpL5或RpL11激活p53表达,抑制c-Myc表达,调节细胞周期蛋白D1和CDK4,诱导结肠癌细胞凋亡<sup>[161]</sup>。通过生物信息学方法,发现RpL5、MDM2、RpS14是霉酚酸酯通过细胞凋亡、p53信号通路、坏死性凋亡等途径诱导小耳畸形的核心基因<sup>[162]</sup>。本研究中ACR处理后RpL5基因在蛋白水平上的表达量显著下调,这进一步验证了生物信息学分析的结果,表明ACR抑制RpL5的表达;研究结果显示,ACR处理后MDM2蛋白表达下调,p53蛋白表达增多,这表明核糖体蛋白-MDM2-p53信号通路被激活,可能影响细胞周期及造成DNA损伤应答。

DNA损伤应答是细胞发生DNA损伤后,细胞进行损伤类型识别并激活相应的修复通路,或者导致细胞凋亡或自噬的过程<sup>[163]</sup>。DNA损伤应答是ATM和ATR被激活引起的,在真核生物中普遍存在<sup>[164]</sup>,其主要激活途径包括ATM-Chk2和ATR-Chk1等<sup>[165]</sup>。被DNA损伤激活的ATM和ATR已被证实能够促进p53蛋白表达,并活化下游细胞周期检查点激酶Chk2和Chk1<sup>[166]</sup>。研究表明,甘油三酯过度积累会诱导单核细胞DNA损伤并激活ATM-Chk2和ATR-Chk1通路,导致细胞死亡<sup>[166]</sup>。本研究结果显示,ACR损伤大鼠睾丸组织ATM蛋白、ATR蛋白、Chk2蛋白和Chk1蛋白的磷酸化水平均出现显著上调,不同浓度EGCG预处理显著抑制了上述蛋白的磷酸化,这表明EGCG能够抑制ACR诱导的DNA损伤,通过影响细胞周期发挥对ACR毒性的抑制作用。

有文献指出, $\gamma$ H2AX蛋白是DNA损伤的重要标志物<sup>[167]</sup>,活化的ATM能够促进下游底物组蛋白H2AX的磷酸化,导致 $\gamma$ H2AX蛋白表达上调。细胞周期蛋白Cyclin B1在细胞分裂增殖过程中可与周期蛋白依赖性蛋白激酶cdc2形成细胞有丝分裂促进因子,是推动细胞有丝分裂的重要分子<sup>[168]</sup>。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21是细胞周期关键调控蛋白,其表达能够被p53蛋白激活<sup>[169]</sup>。六价铬处理使BEAS-2B细胞 $\gamma$ H2AX表达量增多,诱导细胞产生DNA损伤<sup>[170]</sup>。夏枯草和柴胡联合处理可显著改变细胞形态,抑制细胞迁移和侵袭,上调Bax蛋

白的表达,抑制 CyclinA1、Cyclin B1 和 CDK1 蛋白的表达,诱导甲状腺状癌细胞凋亡<sup>[171]</sup>。紫菜素能够通过上调 p21 蛋白的表达水平诱导人胃腺癌细胞周期停滞<sup>[172]</sup>。本研究结果显示,ACR 显著上调了 p21 和 $\gamma$ H2AX/H2AX 的蛋白表达水平,并且抑制了周期蛋白 Cyclin B1 的表达,EGCG 预处理后 p21 和 $\gamma$ H2AX/H2AX 的蛋白表达水平降低,周期蛋白 Cyclin B1 的表达水平升高,这表明 EGCG 能够有效缓解 ACR 诱导的 DNA 损伤,可能通过促进细胞有丝分裂抑制 ACR 的毒性作用。综上所述,不同浓度 EGCG 预处理显著缓解了 ACR 对 RpL5 和 MDM2 蛋白表达下调、p53 信号通路激活、细胞周期、DNA 损伤的影响,这表明 EGCG 能够通过 RpL5-MDM2-p53 信号通路影响细胞周期调控,缓解 DNA 损伤,抑制核糖体蛋白表达失调,进而对 ACR 引起的睾丸损伤起到抑制作用。

### 3.5 小结

本章通过 qPCR 及 Western Blot 方法验证了关键基因 RpS9 和 RpL5 的表达,并对其相关的 NF- $\kappa$ B 信号通路、细胞周期和 DNA 损伤应答相关蛋白的表达水平进行了检测。结果表明,EGCG 能够有效缓解 ACR 引起的睾丸核糖体损伤,在细胞炎症、细胞周期调节以及 DNA 损伤应答等方面对 ACR 诱导的睾丸损伤起到抑制作用。



## 第4章 EGCG对ACR诱导睾丸线粒体损伤的抑制机制

线粒体不仅是有氧细胞呼吸和能量产生的细胞器,也是自由基产生的主要部位,过量的ROS可能会抑制线粒体呼吸链复合物,并导致ROS产生增加<sup>[173]</sup>。CytC和caspase家族的激活将触发细胞线粒体途径凋亡<sup>[174]</sup>。有研究指出,线粒体呼吸链蛋白表达水平变化一定程度上影响着线粒体功能,呼吸链亚基的相对丰度正在成为细胞器和细胞整体功能的潜在影响因素<sup>[175]</sup>。已有研究证实,线粒体呼吸链复合物与精子活力、睾酮生成、细胞凋亡密切相关<sup>[176]</sup>。

研究发现,甲氨蝶呤处理会引起细胞ROS增加以及线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, MMP)降低,这表明甲氨蝶呤能够通过抑制线粒体电子传递链复合物扰乱MMP,使线粒体发生基质肿胀,诱导过量的ROS产生,对细胞造成损伤<sup>[177]</sup>。砷暴露会损伤小鼠睾丸及附睾,使ROS过量生成,改变MMP并造成线粒体生物发生及线粒体动力学相关蛋白表达失调,导致生殖细胞凋亡<sup>[178]</sup>。氯化镉处理人肾上皮细胞后,细胞中MMP下降,线粒体呼吸链复合物III、V活性受到抑制,复合物III的电子传递过程和复合物V的ATP生成过程受到干扰,线粒体介导的细胞凋亡途径被激活,最终发生线粒体损伤和细胞凋亡<sup>[179]</sup>。

研究表明,黄芩苷能够提高甲氨蝶呤处理大鼠的睾丸中SOD、GSH-Px等酶的活性,抑制甲氨蝶呤导致的MMP降低,对甲氨蝶呤诱导的大鼠睾丸组织线粒体损伤具有显著的保护作用<sup>[180]</sup>。转录组学和网络药理学联合分析发现,黄酮类化合物主要在线粒体电子传递链和三羧酸循环方面对糖尿病小鼠产生影响<sup>[181]</sup>。冬虫夏草提取物能够有效提高线粒体复合物活性,恢复MMP,同时抑制线粒体凋亡途径中细胞凋亡相关mRNA的表达,通过抑制线粒体凋亡通路,改善线粒体功能,缓解脑缺血损伤<sup>[182]</sup>。

此前的生物信息学分析结果表明,ACR处理睾丸差异表达基因中的关键基因主要富集在核糖体和线粒体结构和功能方面,Cox6c和Cox7a2是位于线粒体内膜的细胞色素C氧化酶的亚基,具有多种重要功能<sup>[189,191]</sup>。因此,本章研究首先通过qPCR技术对线粒体相关基因Cox6c、Cox7a2的表达进行检测,通过Western Blot技术检测其在蛋白水平上的表达,并检测不同处理下睾丸组织Bax、Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、CytC、p38、p-p38、c-Jun 氨基末

端激酶（C-Jun N-terminal kinase, JNK）、p-JNK、ERK、p-ERK 蛋白的表达水平，在线粒体途径细胞凋亡和 MAPK 信号通路的角度探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸线粒体损伤的抑制机制。

## 4.1 实验材料

表 4.1 主要试剂及生产公司  
Table 4.1 Main reagents and production companies

试剂名称	生产公司
Anti-Cox6c antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-Cox7a2 antibody	北京博奥龙免疫技术有限公司
Anti-Bax antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Bcl-2 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-cleaved caspase-9 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-cleaved caspase-3 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-CytC antibody	Cell Signaling Technology
Anti-p38 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-p38 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-JNK antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-JNK antibody	Cell Signaling Technology
Anti-ERK antibody	Cell Signaling Technology
Anti-Phospho-ERK antibody	Cell Signaling Technology

其余实验材料详见 3.1。

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 实时荧光定量检测

具体步骤详见 3.2.1。

### 4.2.2 Western Blot

具体步骤详见 3.2.2。

### 4.2.3 数据处理

详见 3.2.3。

### 4.3 实验结果

#### 4.3.1 EGCG对ACR损伤大鼠睾丸组织Cox6c和Cox7a2 mRNA表达水平的影响

本研究通过qPCR方法对不同处理组睾丸关键基因Cox6c mRNA和Cox7a2 mRNA的相对表达量进行了检测,结果如图4-1所示。与Control组相比,ACR组大鼠睾丸组织中Cox6c和Cox7a2 mRNA的相对表达量均出现极显著下调( $P < 0.01$ );与ACR组相比,10 mg/kg bw/d EGCG预处理后,睾丸组织中Cox7a2 mRNA的相对表达量出现极显著上调( $P < 0.01$ ),40 mg/kg bw/d EGCG预处理后,睾丸组织中Cox6c mRNA和Cox7a2 mRNA的相对表达量均出现极显著上调( $P < 0.01$ )。以上结果表明,EGCG能够抑制ACR引起的睾丸Cox6c和Cox7a2 mRNA表达水平下降。

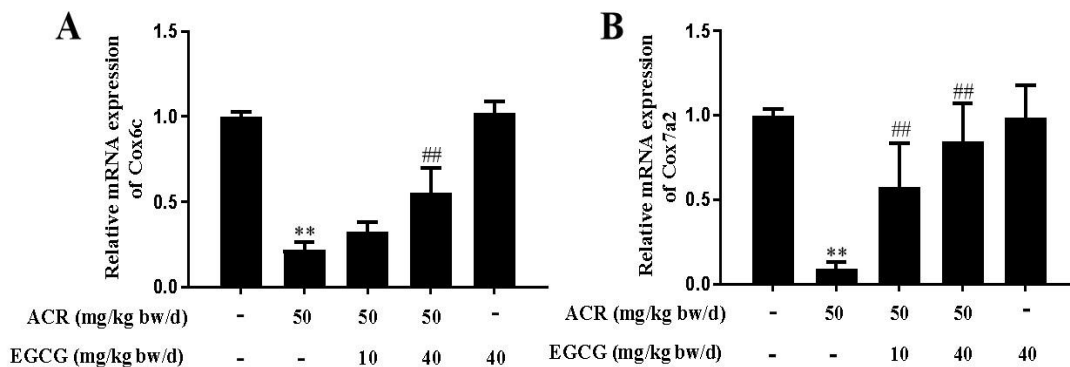


图4-1 EGCG预处理对ACR损伤大鼠睾丸组织Cox6c和Cox7a2 mRNA表达水平的影响  
A: EGCG预处理后ACR损伤大鼠睾丸组织Cox6c mRNA表达的统计结果; B: EGCG预处理后ACR损伤大鼠睾丸组织Cox7a2 mRNA表达的统计结果

与Control组相比,  $**P < 0.01$ ; 与ACR组相比,  $##P < 0.01$

Fig.4-1 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of Cox6c and Cox7a2 mRNA in testis tissue of ACR-injured rats

A: Statistical results of Cox6c mRNA expression in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of Cox7a2 mRNA expression in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group,  $**P < 0.01$ . Compared with ACR group,  $##P < 0.01$

### 4.3.2 EGCG 对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 蛋白表达水平的影响

本研究对关键基因 Cox6c、Cox7a2 的蛋白表达水平进行了检测，结果如图 4-2 所示。与 Control 组相比，ACR 处理后大鼠睾丸组织中 Cox6c 和 Cox7a2 的蛋白表达水平极显著降低 ( $P < 0.01$ )，这表明 ACR 能够抑制 Cox6c 与 Cox7a2 在蛋白水平上的表达；不同浓度 EGCG 预处理后，Cox6c 及 Cox7a2 蛋白的表达水平与 ACR 组相比有了极显著上升 ( $P < 0.01$ )，这表明 EGCG 能够促进 Cox6c 及 Cox7a2 的蛋白表达；与 Control 组相比，单独 40 mg/kg bw/d EGCG 处理后，睾丸组织中 Cox6c 和 Cox7a2 蛋白的表达水平并没有显著变化，这表明 EGCG 本身在 40 mg/kg bw/d 浓度下不影响睾丸组织中 Cox6c 和 Cox7a2 蛋白的表达。

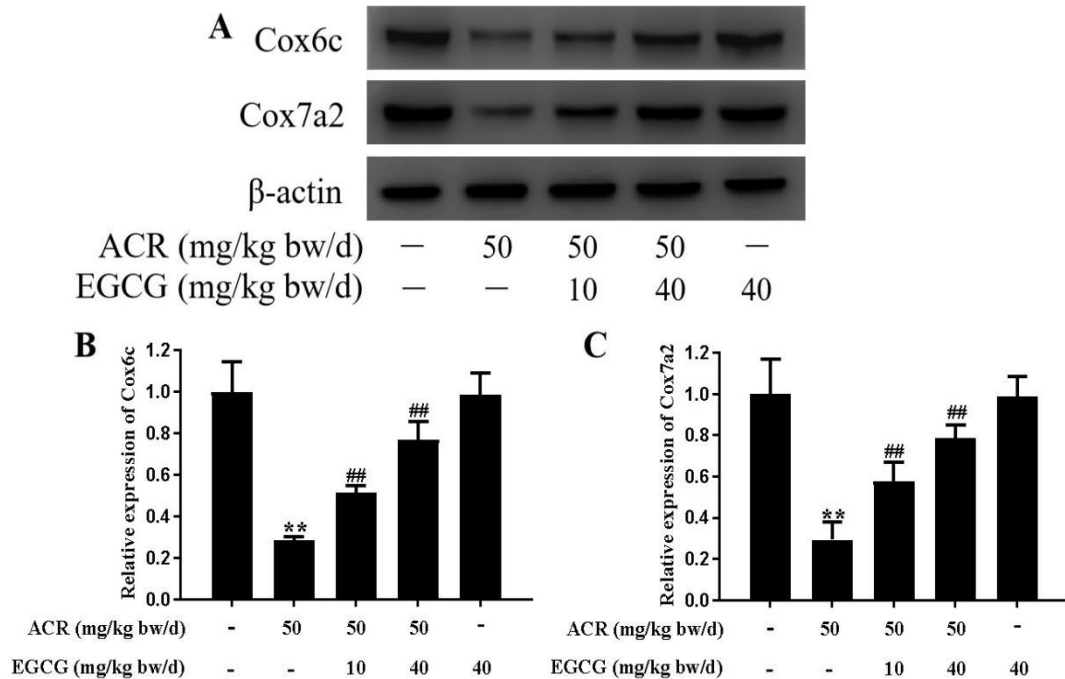


图 4-2 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 蛋白表达水平的影响  
A: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 和 Cox7a2 的蛋白表达检测；B: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox6c 的蛋白表达统计结果；C: EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Cox7a2 的蛋白表达统计结果

与 Control 组相比，\*\* $P < 0.01$ ；与 ACR 组相比，## $P < 0.01$

Fig.4-2 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of Cox6c and Cox7a2 proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of Cox6c and Cox7a2 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of Cox6c in testis tissue of

ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of protein expression of Cox7a2 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with ACR group, ## $P < 0.01$

### 4.3.3 EGCG对ACR损伤大鼠睾丸组织线粒体途径凋亡相关蛋白表达水平的影响

为了探究ACR和EGCG对大鼠睾丸细胞线粒体途径凋亡作用的影响,本研究对线粒体途径凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3以及CytC的表达水平进行了检测。结果如图4-3所示,ACR处理后,大鼠睾丸组织中Bax/Bcl-2的蛋白表达比值以及cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、CytC蛋白的表达水平与Control组相比均呈极显著上升( $P < 0.01$ );与ACR组相比,EGCG低剂量组和EGCG高剂量组Bax/Bcl-2的蛋白表达比值以及cleaved caspase-9和CytC蛋白的表达水平均有极显著下降( $P < 0.01$ );与ACR组相比,cleaved caspase-3蛋白的表达水平在EGCG低剂量组中显著下降( $P < 0.05$ ),在EGCG高剂量组中极显著下降( $P < 0.01$ );与Control组相比,单独40 mg/kg bw/d EGCG处理后的睾丸中Bax/Bcl-2以及cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、CytC蛋白的表达水平均没有显著变化,表明EGCG本身在40 mg/kg bw/d浓度下不影响睾丸细胞线粒体途径凋亡。以上结果表明,EGCG能抑制ACR对Bax、Bcl-2等线粒体途径凋亡相关蛋白表达的影响。

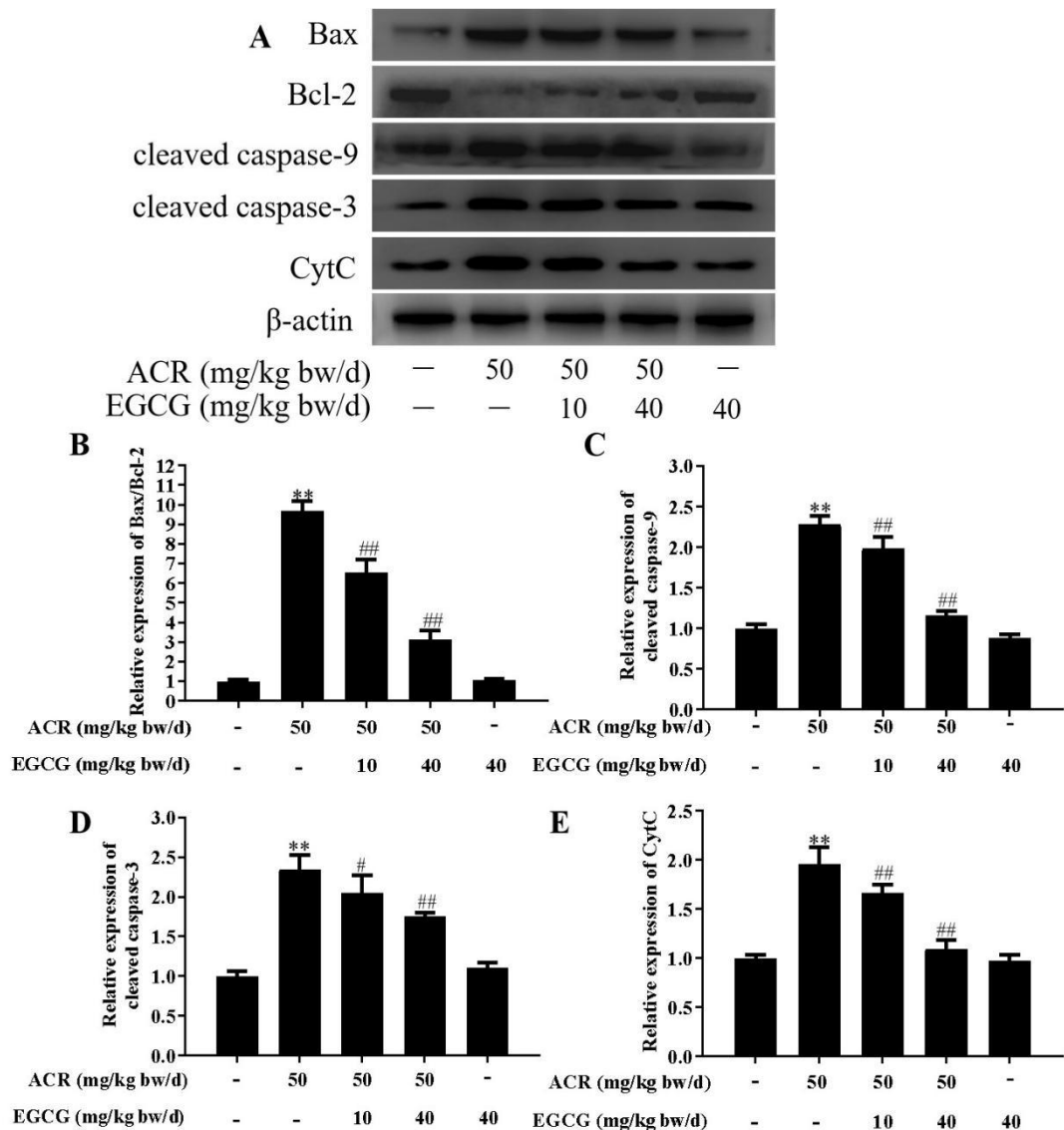


图 4-3 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织线粒体途径凋亡相关蛋白表达水平的影响  
 A: EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织线粒体途径凋亡相关蛋白的蛋白表达检测; B:  
 EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 Bax/Bcl-2 的蛋白表达统计结果; C: EGCG 预处理  
 后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 cleaved caspase-9 的蛋白表达统计结果; D: EGCG 预处理后 ACR  
 损伤大鼠睾丸组织 cleaved caspase-3 的蛋白表达统计结果; E: EGCG 预处理后 ACR 损伤大  
 鼠睾丸组织 CytC 的蛋白表达统计结果

与 Control 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 ACR 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

Fig.4-3 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of mitochondrial pathway  
 apoptosis-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats

A: Protein expression detection of mitochondrial pathway apoptosis-associated proteins in testis  
 tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. B: Statistical results of protein expression of  
 Bax/Bcl-2 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. C: Statistical results of  
 protein expression of cleaved caspase-9 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG

pretreatment. D: Statistical results of protein expression of cleaved caspase-3 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. E: Statistical results of protein expression of CytC in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\*P < 0.01. Compared with ACR group, #P < 0.05, ##P < 0.01

#### 4.3.4 EGCG对ACR损伤大鼠睾丸组织MAPK信号通路相关蛋白表达水平的影响

为了探究ACR和EGCG对大鼠睾丸细胞MAPK信号通路的影响,本研究对MAPK信号通路相关蛋白p-p38、p38、p-JNK、JNK、p-ERK、ERK的表达水平进行了检测。结果如图4-4所示,与Control组相比,ACR组大鼠睾丸组织中p38、JNK和ERK蛋白的磷酸化水平均呈极显著上升趋势,即p-p38/p38、p-JNK/JNK和p-ERK/ERK蛋白表达比值极显著升高(P < 0.01);与ACR组相比,EGCG低剂量组和EGCG高剂量组p38、JNK和ERK蛋白磷酸化水平均有极显著下降(P < 0.01);与Control组相比,单独40 mg/kg bw/d EGCG处理后的睾丸组织中p38、JNK和ERK蛋白的磷酸化水平均没有显著变化,表明EGCG本身在40 mg/kg bw/d浓度下对大鼠睾丸细胞MAPK信号通路没有显著影响。以上结果表明,EGCG能够抑制ACR对睾丸细胞MAPK信号通路的激活。

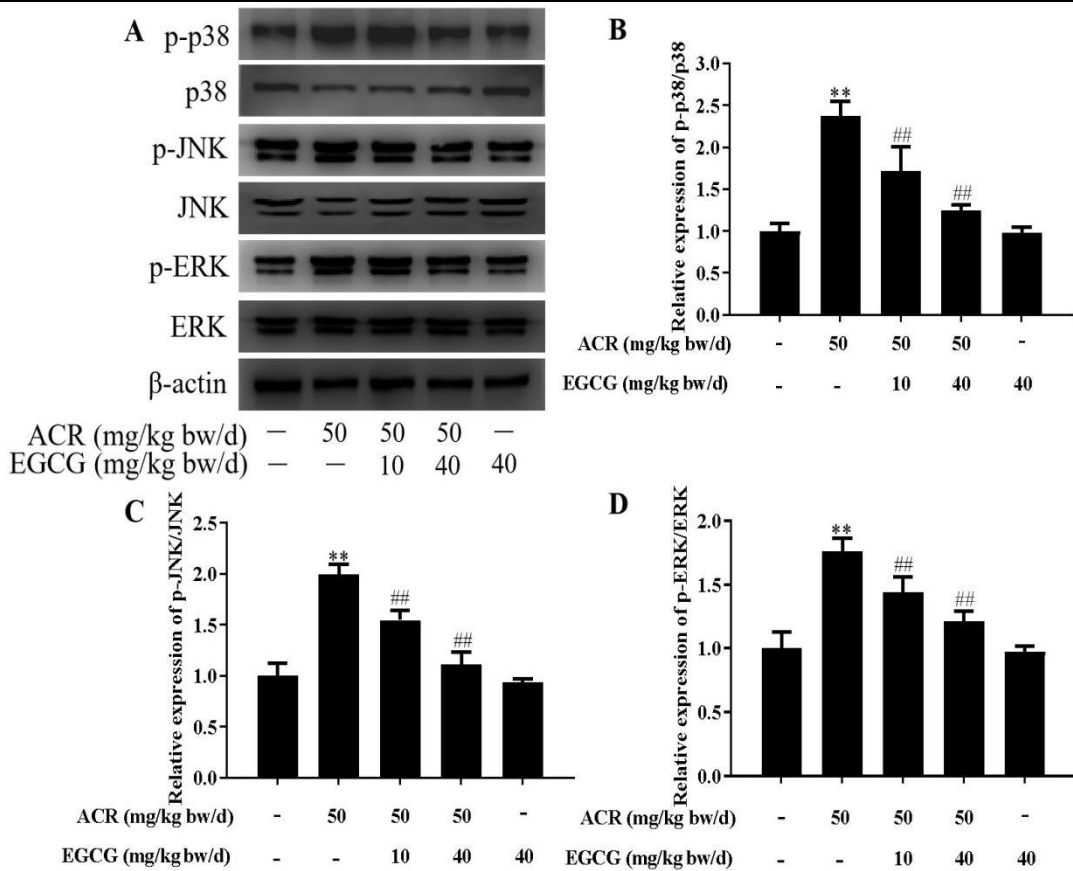


图 4-4 EGCG 预处理对 ACR 损伤大鼠睾丸组织 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平的影响  
**A:** EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 MAPK 信号通路相关蛋白的蛋白表达检测；**B:** EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-p38/p38 的蛋白表达统计结果；**C:** EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-JNK/JNK 的蛋白表达统计结果；**D:** EGCG 预处理后 ACR 损伤大鼠睾丸组织 p-ERK/ERK 的蛋白表达统计结果  
 与 Control 组相比, \*\* $P < 0.01$ ；与 ACR 组相比, ## $P < 0.01$

Fig.4-4 Effect of EGCG pretreatment on the expression levels of MAPK signaling pathway-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats

**A:** Protein expression detection of MAPK signaling pathway-related proteins in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. **B:** Statistical results of protein expression of p-p38/p38 in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. **C:** Statistical results of protein expression of p-JNK/JNK in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment. **D:** Statistical results of protein expression of p-ERK/ERK in testis tissue of ACR-injured rats after EGCG pretreatment

Compared with Control group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with ACR group, ## $P < 0.01$



## 4.4 讨论

线粒体作为真核生物的主要供能细胞器，能够通过呼吸链等途径产生 ATP，保证能量代谢的正常运行，为机体的平稳运行提供了足够的能量<sup>[183]</sup>。氧化磷酸化是在线粒体内进行的重要的能量代谢途径，其各环节主要以复合体形式存在于线粒体内膜上，组成电子传递链以确保 ATP 的生成<sup>[184]</sup>。这一过程包括有 ATP 合成酶、细胞色素 C 氧化酶、细胞色素还原酶、线粒体内膜上的 NADH-Q 还原酶等关键酶<sup>[185]</sup>。线粒体呼吸链的损伤会导致细胞内 ATP 的生成不能正常进行，甚至会导致 ROS 过度生成，进而引起细胞氧化应激，加重线粒体及其他细胞器的损伤，最终引起细胞死亡<sup>[186]</sup>。细胞色素 C 氧化酶是线粒体内膜呼吸链的末端酶，研究表明，它不仅能够催化电子从还原的细胞色素 C 到分子氧的转移，还可将质子转移到线粒体膜上<sup>[187]</sup>。Cox6c 是细胞色素 C 氧化酶的 6C 亚基，其表达下调会导致细胞不能进行正常的能量转移，使睾丸中的能量代谢受影响<sup>[188]</sup>。既往研究表明 Cox6c 参与多种包括肿瘤在内的疾病调控<sup>[189]</sup>，在调节氧化磷酸化方面起着重要作用<sup>[190]</sup>。Cox7a2 是细胞氧化呼吸传递链上第四个复合体（细胞色素 C 氧化酶复合体）的亚基，具有传递电子等功能<sup>[191]</sup>。Cox7a2 等核编码亚基是细胞色素 C 氧化酶正常工作必需的，Cox7a2 下调会导致细胞色素 C 氧化酶复合体活性显著变小，表明核编码亚基在细胞色素 C 氧化酶复合体活性方面具有重要作用<sup>[192]</sup>。

Cox6c 是流感病毒宿主细胞激活凋亡信号通路及减少病毒拷贝数所需的重要蛋白。数据显示，Cox6c 的表达变化影响着 caspase-9 的表达<sup>[193]</sup>。有研究发现，除草剂利谷隆会导致怀孕大鼠雄性后代组织中 Cox7a2 等睾酮合成相关基因及凋亡蛋白酶活化因子 1 等其他涉及细胞增殖和凋亡的基因的表达出现显著变化<sup>[194]</sup>。在本研究中，Cox6c、Cox7a2 的基因水平和蛋白水平表达均出现下调，这也进一步验证了生物信息学分析的结果。Cox6c 和 Cox7a2 表达水平的下降表明线粒体受到损伤，导致 ROS 过量生成，而无法被机体及时清除的 ROS 会损伤线粒体膜，破坏膜的通透性和完整性<sup>[195]</sup>，进而导致线粒体通透性转换孔（Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP）开启<sup>[196, 197]</sup>，包括 CytC 在内的大量促凋亡因子被释出<sup>[198]</sup>，CytC 进入胞质后启动 caspase 级联反应，通过线粒体途径促进细胞内源性凋亡<sup>[199]</sup>。已有研究表明，氧化石墨烯能够诱导大鼠生成过量的 ROS，激活 p53-亲环素 D-MPTP 途径，使 MPTP 异常开放，导致 CytC 从线粒体释放到细胞质中，激活 caspase 级联反应，最终导致大鼠肠道组织细胞凋亡<sup>[200]</sup>。在本研

究中, EGCG 预处理上调了 Cox6c 和 Cox7a2 的基因表达和蛋白表达, 这表明 EGCG 对 ACR 引起的线粒体呼吸链损伤具有抑制作用。

细胞凋亡是一种细胞程序性死亡, 受多种因素调控, 能够帮助维持生物体稳态<sup>[201]</sup>。线粒体途径凋亡是细胞凋亡中的内源性凋亡, Bcl-2 和 Bax 分别是线粒体途径凋亡中的抗凋亡和促凋亡基因<sup>[202]</sup>。研究表明, 细胞内源性凋亡始于线粒体发生去极化, 在受到过量 ROS 等凋亡信号刺激后会上调 Bax 并下调 Bcl-2<sup>[203]</sup>, 使 CytC 自线粒体膜间间隙进入胞质当中, 激活 caspases 依赖的细胞凋亡<sup>[204]</sup>。氟氯胺酮处理导致小鼠睾丸支持细胞中 ROS 增加, MMP 降低, CytC 从线粒体释放到细胞质, 激活 caspase 级联反应, 诱导细胞凋亡<sup>[205]</sup>。二氧化硅纳米颗粒能够损伤人神经母细胞瘤细胞的细胞膜, 降低细胞 MMP, 损伤线粒体, 进而导致 CytC 释放到细胞质中, 上调的 CytC 通过激活 caspase-9 和 caspase-3 进一步触发细胞线粒体途径凋亡<sup>[206]</sup>。邻苯二甲酸二-2-乙基己酯等物质联合处理使大鼠睾丸 p53 蛋白的表达水平上升, 促凋亡相关蛋白 Bax 表达上升, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降, 表明这种处理激活了大鼠睾丸线粒体途径凋亡通路, 最终导致睾丸细胞凋亡<sup>[207]</sup>。在本研究中, ACR 损伤大鼠睾丸组织线粒体途径凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、CytC 蛋白表达上调, 不同浓度 EGCG 预处理显著下调了 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、CytC 的蛋白表达。以上结果表明, EGCG 对 ACR 诱导的细胞线粒体途径凋亡具有显著的抑制作用。

MAPK 信号通路是哺乳动物中调控细胞凋亡的关键通路<sup>[208, 209]</sup>。线粒体呼吸链损伤会累积过量 ROS, 导致氧化应激, 进而激活 ERK、JNK 及 p38 通路<sup>[210]</sup>。p38 MAPK 通路信号传导调控炎症到 DNA 损伤检查点信号传导的应激反应<sup>[211]</sup>。JNK 激酶是调节氧化应激反应的重要物质<sup>[212]</sup>, 被激活后在细胞凋亡和自噬等多个细胞过程中发挥作用<sup>[213]</sup>。ERK 参与细胞的增殖、凋亡等过程<sup>[214]</sup>。本研究结果显示, ACR 处理显著促进了睾丸组织 p38 蛋白的磷酸化, EGCG 预处理后 p-p38/p38 蛋白表达比值显著降低。研究表明, 一氧化氮致神经元细胞死亡实验中, p38 MAPK 活化后通过促进 Bax 转位, 促进线粒体途径凋亡, 进而影响细胞存活<sup>[215]</sup>。以上结果表明, EGCG 可能通过抑制 p38 蛋白的磷酸化, 抑制 ACR 诱导的睾丸细胞凋亡。有文献报道, 丙帕他莫会激活 JNK, 通过对 Bcl-2/Bcl-xL 蛋白磷酸化的调控, 使 CytC 进入胞浆, 触发 caspase 级联反应, 导致线粒体依赖性细胞凋亡<sup>[216]</sup>。在本研究中, ACR 损伤大鼠睾丸组织 JNK 蛋白的磷酸化水平显著上升, EGCG 预处理显著抑制了 JNK 蛋白的磷酸化, 结果表明, EGCG 对 ACR

诱导的睾丸细胞凋亡的抑制作用可能与抑制 JNK 蛋白磷酸化有关。研究发现，白桦酸能够抑制环磷酰胺处理后的小鼠肾脏中 ERK 蛋白的磷酸化，通过线粒体凋亡途径减少环磷酰胺引起的炎症和氧化应激，改善环磷酰胺诱导的肾损伤<sup>[217]</sup>。在本研究中，ACR 处理显著上调了大鼠睾丸组织 p-ERK/ERK 的蛋白表达比值，EGCG 预处理后 ERK 蛋白的磷酸化水平显著下降，以上结果表明，EGCG 可能通过抑制 ERK 蛋白的磷酸化，抑制 ACR 诱导的睾丸细胞凋亡。

#### 4.5 小结

本章通过 qPCR 及 Western Blot 方法验证了关键基因 Cox6c 和 Cox7a2 的表达，并对其相关的线粒体途径凋亡信号通路和 MAPK 信号通路相关蛋白的表达水平进行了检测。结果表明，EGCG 能够通过调控线粒体途径凋亡信号通路和 MAPK 信号通路对 ACR 诱导的睾丸损伤起到抑制作用。

## 第 5 章 结论与展望

### 5.1 结论

本研究采用免疫组织化学技术、生物信息学分析方法、qPCR 技术和 Western Blot 技术等手段，探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制作用及相关机制，得到如下结论：

(1) EGCG 能够抑制 ACR 诱导的睾丸损伤。EGCG 在睾丸脏器指数、睾丸组织形态结构及细胞凋亡方面显著改善了 ACR 引起的睾丸损伤，显著提高了睾丸组织中 FSH、LH、PCNA 的表达水平。

(2) ACR 的睾丸毒性可能与其诱导核糖体损伤和线粒体损伤有关。生物信息学分析表明，ACR 处理导致的差异表达基因中的关键基因主要富集在核糖体和线粒体的结构及功能方面。

(3) EGCG 能够有效缓解 ACR 引起的睾丸核糖体损伤。EGCG 能够通过调节 RpS9 和 RpL5 及其参与的细胞炎症、细胞周期以及 DNA 损伤应答等抑制 ACR 的睾丸毒性。

(4) EGCG 能够有效缓解 ACR 引起的睾丸线粒体损伤。EGCG 能够通过调节 Cox6c 和 Cox7a2 及其参与的线粒体途径凋亡信号通路和 MAPK 信号通路对 ACR 的睾丸毒性起到抑制作用。

### 5.2 展望

在本研究的基础上，后续可在细胞水平上对 RpS9 等关键基因进行敲除和过表达处理，进一步探究关键基因在 ACR 损伤睾丸及 EGCG 对 ACR 睾丸毒性的抑制机制方面的作用；本研究对信号通路的探讨仅是检测通路相关蛋白的表达情况，后续可利用信号通路抑制剂在细胞水平上更深入地探究 EGCG 对 ACR 诱导睾丸损伤的抑制机制。

## 参考文献

- [1] He F, Chu S, Sun N, et al. Binding interactions of acrylamide with lysozyme and Its underlying mechanisms based on multi-spectra, isothermal titration microcalorimetry and docking simulation[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 337:116460.
- [2] FERNÁNDEZ S F, PARDO O, COSCOLLÀ C, et al. Exposure assessment of Spanish lactating mothers to acrylamide via human biomonitoring[J]. *Environmental Research*, 2022, 203:111832.
- [3] Kopańska M, Muchacka R, Czech J, et al. Acrylamide toxicity and cholinergic nervous system[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2019, 69(6):1-12.
- [4] Stadler R H, Blank I, Varga N, et al. Acrylamide from Maillard reaction products[J]. *Nature*, 2002, 419(6906):449-450.
- [5] Agnieszka K, Adriana N, Ireneusz N, et al. Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60(10):1677-1692.
- [6] 解瑞丽, 周启星. 丙烯酰胺的环境暴露、生态行为与毒理效应研究进展[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(5):1347-1354.
- [7] Wilson Roberto B C, Sandra Milena V M, Hector S M, et al. Consumption study and margin of exposure of acrylamide in food consumed by the Bogota' population in Colombia[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, 100(1):103934.
- [8] Benford D, Ceccatelli S, Cottrill B, et al. Scientific opinion on acrylamide in food[J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(6):4104.
- [9] Halford N G, Curtis T Y, Muttucumar N, et al. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(8):2841-2851.
- [10] Fiselier K, Bazzocco D, Gama-Baumgartner F, et al. Influence of the frying temperature on acrylamide formation in French fries[J]. *European Food Research and Technology*, 2005, 222(3-4):414-419.
- [11] Harahap Y, Elysia C, Starlin Z, et al. Analysis of acrylamide in dried blood spots of lung cancer patients by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 2020:2015264.
- [12] European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on acrylamide in food[J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(6):4104.

- [13] Rubinstein M L, Delucchi K, Benowitz N L, et al. Adolescent exposure to toxic volatile organic chemicals from e-cigarettes[J]. *Pediatrics*, 2018, 141(4):e20173557.
- [14] 柳秋芹, 蒋晓红, 张峻. 职业性丙烯酰胺中毒 10 例调查分析[J]. *江苏卫生保健*, 2009, 11(1):20-21.
- [15] Xu W J, Fu Q, Tan L J, et al. Advances in the research on the detection methods and health hazard of acrylamide in the environment[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(6):57-68.
- [16] Tepe Y, Çebi A. Acrylamide in environmental water: a review on sources, exposure, and public health risks[J]. *Exposure and Health*, 2017, 11(1):3-12.
- [17] Wang H, Huang P, Lie T, et al. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats[J]. *Reproductive Toxicology*, 2010; 29(2):225-230.
- [18] Bin-Jumah M, Abdel-Fattah A M, Saied E M, et al. Acrylamide-induced peripheral neuropathy: manifestations, mechanisms, and potential treatment modalities[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(11):13031-13046.
- [19] Huang M, Wei Y, Wang J, et al. Support vector regression-guided unravelling: antioxidant capacity and quantitative structure-activity relationship predict reduction and promotion effects of flavonoids on acrylamide formation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):32368.
- [20] Park J S, Samanta P, Lee S, et al. Developmental and neurotoxicity of acrylamide to zebrafish[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7):3518.
- [21] Kumar J, Das S, Teoh S L. Dietary acrylamide and the risks of developing cancer: Facts to ponder[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2018, 5:14.
- [22] Zhao M, Wang P, Li D, et al. Protection against neo-formed contaminants (NFCs)-induced toxicity by phytochemicals[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 108:392-406.
- [23] Yang H, Lee S, Jin Y, et al. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2005, 6(2):103-109.
- [24] Edemli Z, Erdemli M E, Turkoz Y, et al. The effects of acrylamide and Vitamin E administration during pregnancy on adult rats testis[J]. *Andrologia*, 2019, 51(7):e13292.
- [25] Kaçar S, Şahintürk V, Can B, et al. L-Cysteine partially protects against acrylamide-induced testicular toxicity[J]. *Balkan Medical Journal*, 2018, 35(4):311-319.
- [26] Ma Y, Shi J, Zheng M, et al. Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2011, 27(7):617-627.
- [27] Kirman C R, Gargas M L, Deskin R, et al. A physiologically based

- pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health-part A-Current Issues*, 2003, 66(3):253-274.
- [28] Liu Z, Song G, Zou C, et al. Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 84:42-53.
- [29] Gao J G, Jiang Y, Zheng J T, et al. Pubertal exposure to acrylamide disrupts spermatogenesis by interfering with meiotic progression in male mice[J]. *Toxicology Letters*, 2022, 358:80-87.
- [30] Junqiang Z, Xiaoqian Z, Wenjuan X, et al. Exposure to acrylamide inhibits testosterone production in mice testes and Leydig cells by activating ERK1/2 phosphorylation[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2023, 172:113576.
- [31] Exon J H. A review of the toxicology of acrylamide[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health-part B Critical Reviews*, 2006, 9(5):397-412.
- [32] Fatehyab Ali S, Hong J S, Wilson W E, et al. Effect of acrylamide on neurotransmitter metabolism and neuropeptide levels in several brain regions and upon circulating hormones[J]. *Archives of Toxicology*, 1983, 52(1):35-43.
- [33] Fangfang Y, Li W, Li Z, et al. Acrylamide in food: Occurrence, metabolism, molecular toxicity mechanism and detoxification by phytochemicals[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2023, 175:113696.
- [34] Miyoshi N, Tanabe H, Suzuki T, et al. Applications of a standardized green tea catechin preparation for viral warts and human papilloma virus-related and unrelated cancers[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(11):2588.
- [35] Reygaert W C. Green tea catechins: their use in treating and preventing infectious diseases[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018:9105261.
- [36] Pervin M, Unno K, Takagaki A, et al. Function of green tea catechins in the brain: epigallocatechin gallate and its metabolites[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3630.
- [37] Roy M K, Koide M, Rao T P, et al. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: relationship between total polyphenol and individual catechin content[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2010, 61(2):109-124.
- [38] Khalatbary A R, Khademi E. The green tea polyphenolic catechin epigallocatechin gallate and neuroprotection[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2020, 23(4):281-294.
- [39] Filippini T, Malavolti M, Borrelli F, et al. Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020, 3(3):CD005004.
- [40] Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of green tea catechins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5):1744.

- [41] Bernatoniene J, Kopustinskiene D M. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018, 23(4):965.
- [42] Lei L. Research progress on pharmacological activities of green tea[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2007, 19(6):15-17.
- [43] Shruthi P A, Pushpadass H A, Magdaline Eljeeva Emerald F, et al. Formulation and characterization of catechin-loaded proniosomes for food fortification[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(6):2439-2448.
- [44] Hibi M, Takase H, Iwasaki M, et al. Efficacy of tea catechin-rich beverages to reduce abdominal adiposity and metabolic syndrome risks in obese and overweight subjects: a pooled analysis of 6 human trials[J]. *Nutrition research (New York, NY)*, 2018, 55:1-10.
- [45] Lee M J, Maliakal P, Chen L, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2002, 11(10 Pt 1):1025-1032.
- [46] Eng Q Y, Thanikachalam P V, Ramamurthy S. Molecular understanding of epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 210:296-310.
- [47] 丁晶真, 张蔚. 绿茶成分心血管保护机制研究进展[J]. *药物流行病学杂志*, 2006, 6:340-343.
- [48] Ohishi T, Goto S, Monira P, et al. Anti-inflammatory action of green tea[J]. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2016, 15(2):74-90.
- [49] Li X, Li S, Chen M, et al. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits starch digestion and improves glucose homeostasis through direct or indirect activation of PXR/CAR-mediated phase II metabolism in diabetic mice[J]. *Food Function*, 2018, 9(9):4651-4663.
- [50] Huang Y W, Zhu Q Q, Yang X Y, et al. Wound healing can be improved by (-)-epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Faseb Journal*, 2019, 33(1):953-964.
- [51] Zhang Q, Yuan H, Zhang C, et al. Epigallocatechin gallate improves insulin resistance in HepG2 cells through alleviating inflammation and lipotoxicity[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2018, 142:363-373.
- [52] Mi Y, Liu X, Tian H, et al. EGCG stimulates the recruitment of brite adipocytes, suppresses adipogenesis and counteracts TNF- $\alpha$ -triggered insulin resistance in adipocytes[J]. *Food Function*, 2018, 9(6):3374-3386.
- [53] Chen Y, Chen J, Sun X, et al. Evaluation of the neuroprotective effect of EGCG: a potential mechanism of mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics after subarachnoid hemorrhage[J]. *Food Function*, 2018, 9(12):6349-6359.
- [54] Olanow C W, Perl D P, Demartino G N, et al. Lewy-body formation is an



- aggresome-related process: a hypothesis[J]. *Lancet Neurology*, 2004, 3(8):496-503.
- [55] He Y, Tan D, Mi Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates cerebral cortex damage and promotes brain regeneration in acrylamide-treated rats[J]. *Food Function*, 2017, 8(6):2275-2282.
- [56] Houshang N, Kamal S, Farhad S, et al. Using Resveratrol and Epigallocatechin-3-Gallate to Improve Cryopreservation of Stallion Spermatozoa With Low Quality[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2018, 70:18-25.
- [57] Guvvala P R, Ravindra J P, Rajani C V, et al. Protective role of epigallocatechin-3-gallate on arsenic induced testicular toxicity in Swiss albino mice[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2017, 96:685-694.
- [58] Ge J, Han B, Hu H, et al. Epigallocatechin-3-O-Gallate Protects Against Hepatic Damage and Testicular Toxicity in Male Mice Exposed to Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2015, 18(7):753-761.
- [59] Amicis F D, Santoro M, Guido C, et al. Epigallocatechin gallate affects survival and metabolism of human sperm[J]. *Molecular Nutrition Food Research*, 2012, 56(11):1655-1664.
- [60] Rahangadale S, Jangir B L, Patil M, et al. Evaluation of protective effect of vitamin E on acrylamide induced testicular toxicity in wister rats[J]. *Toxicology International*, 2012, 19(2):158-161.
- [61] Zhao S, Sun H, Liu Q, et al. Protective effect of seabuckthorn berry juice against acrylamide-induced oxidative damage in rats: SBJ relieves acrylamide toxicity...[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(7):2245-2254.
- [62] Hasseeb M M, Alhizab F A, Hamouda M, et al. Impacts of Grape Seed Oil Supplementation against the Acrylamide Induced Lesions in Male Genital Organs of Rats[J]. *Pakistan Veterinary Journal*, 2013, 33(3):282-286.
- [63] Parzefall W. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide[J]. *Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2008, 46(4):1360-1364.
- [64] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(17):4998-5006.
- [65] Murray S M, Waddell B M, Wu C W. Neuron-specific toxicity of chronic acrylamide exposure in *C. elegans*[J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2019, 77(C):106848.
- [66] Edres H A, Taha N M, Lebda M A, et al. The potential neuroprotective effect of allicin and melatonin in acrylamide-induced brain damage in rats[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(41):58768-58780.
- [67] Yang L, Dong L, Zhang L, et al. Acrylamide induces abnormal mtDNA expression by causing mitochondrial ROS accumulation, biogenesis, and

- dynamics disorders[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(27):7765-7776.
- [68] Program N T. Toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide (CASRN 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies)[J]. *National Toxicology Program Technical Report Series*, 2012, 575:1-234.
- [69] 王皓, 葛津瑶, 周振琪, 等. 口服丙烯酰胺对雄性大鼠生长发育及生殖机能的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2007, 6:492-497.
- [70] Ma Y. Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2011, 27(7):617-627.
- [71] Tyl R W, Friedman M A. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance[J]. *Reproductive Toxicology*, 2003, 17(1):1-13.
- [72] Yang H J, Lee S H, Choi J H, et al. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile[J]. *Reproductive Toxicology*, 2005, 19(4):527-534.
- [73] Alturki H A, Elsayy H A, Famurewa A C. Silymarin abrogates acrylamide-induced oxidative stress-mediated testicular toxicity via modulation of antioxidant mechanism, DNA damage, endocrine deficit and sperm quality in rats[J]. *Andrologia*, 2022, 54(9):e14491.
- [74] Sengul E, Gelen V, Yildirim S, et al. Effects of naringin on oxidative stress, inflammation, some reproductive parameters, and apoptosis in acrylamide-induced testis toxicity in rat[J]. *Environmental Toxicology*, 2023, 38(4):798-808.
- [75] 何玉婷, 杨雯, 王改琴, 等. 细胞凋亡主要检测方法及其应用[J]. *医学综述*, 2019, 25(4):774-778+783.
- [76] Yildizbayrak N, Erkan M. Therapeutic effect of curcumin on acrylamide-induced apoptosis mediated by MAPK signaling pathway in Leydig cells[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2019, 33(7):e22326.
- [77] Sun J, Li M, Zou F, et al. Protection of cyanidin-3-O-glucoside against acrylamide- and glycidamide-induced reproductive toxicity in leydig cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 119:268-274.
- [78] 李江源. 精子发生的内分泌激素调节[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(9):697-702.
- [79] Daniele S, Pascale C, Eric R, et al. Follicle stimulating hormone (FSH) action on spermatogenesis: a focus on physiological and therapeutic roles[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(4):1014.
- [80] L Camacho, J R Latendresse, L Muskhelishvili, et al. Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats[J]. *Toxicology Letters*, 2012, 211(2):135-143.
- [81] Gül M, Kayhan Kuştepe E, Erdemli Mehmet E, et al. Protective effects of crocin on acrylamide-induced testis damage[J]. *Andrologia*, 2021, 53(9):e14176.

- [82] Hu L, Li H L, Li W F, et al. Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(20):3721-3729.
- [83] 赵冬雨, 郭永刚, 沈宏, 等. 微小染色体维持蛋白 6(MCM6)在结肠癌组织中的表达及其与增殖细胞核抗原(PCNA)的相关性[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2022, 45(1):41-46.
- [84] MostafaHedeab G, Behairy A, Abdelhakim Yasmina M, et al. Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Using Moringa olifera Ethanolic Extract Lessens Acrylamide-Induced Testicular Damage, Apoptosis, and Steroidogenesis-Related Gene Dysregulation in Adult Rats[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2):361.
- [85] The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(1):325-334.
- [86] Kanehisa M, Goto S, Sato Y, et al. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42:199-205.
- [87] 许仕林, 陈聪, 张兵, 等. 龙胆治疗非酒精性脂肪肝的潜在机制探讨: 基于网络药理学[J]. *亚太传统医药*, 2023, 19(2):159-166.
- [88] 蒋峻, 覃芳, 郑军. 利用生物信息学分析筛选并验证结肠直肠癌的差异表达基因[J]. *巴楚医学*, 2022, 5(4):78-82.
- [89] Roberts J, Mehta R, Curran I, et al. Dietary acrylamide exposure in F344 rats and colon tumor-bearing nude nu/nu mice: Dataset of gene expression of cancer pathway targets and methylation status of tumor suppressor genes in colon mucosae and tumors[J]. *Data in Brief*, 27(C):104763.
- [90] 张科. 基于网络药理学方法探究天麻素抗阿尔兹海默症的作用机制[J]. *云南中医中药杂志*, 2022, 43(9):39-46.
- [91] Guo J, Xue H, Zhong H, et al. Involvement of LARP7 in Activation of SIRT1 to Inhibit NF- $\kappa$ B Signaling Protects Microglia from Acrylamide-Induced Neuroinflammation[J]. *Neurotoxicity Research*, 2022, 40(6):2016-2026.
- [92] Collí-Dulá R C, Friedman M A, Hansen B, et al. Transcriptomics analysis and hormonal changes of male and female neonatal rats treated chronically with a low dose of acrylamide in their drinking water[J]. *Toxicology Reports*, 2016, 3:414-426.
- [93] Wan X, Wei J, Qiao W, et al. Metabolomics strategy comprehensively unveils the effect of catechins intervention on the biomarkers of exposure to acrylamide and biomarkers of cardiometabolic risk[J]. *Environment International*, 2022, 169:107517.
- [94] Wang W, Huang L, Thomas E R, et al. Notoginsenoside R1 Protects Against the Acrylamide-Induced Neurotoxicity via Upregulating Trx-1-Mediated ITGAV Expression: Involvement of Autophagy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11:559046.
- [95] Nagashima D, Zhang L, Kitamura Y, et al. Proteomic analysis of hippocampal

- proteins in acrylamide-exposed Wistar rats[J]. Archives of Toxicology, 2019, 93(7):1993-2006.
- [96] 赵小乐, 钱波, 邵泉. 肝癌中铜死亡相关基因的表达及其预后价值[J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(2):140-145.
- [97] Cong S, Feng Y, Tang H. Network pharmacology and molecular docking to explore the potential mechanism of urolithin A in combined allergic rhinitis and asthma syndrome[J]. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2023.
- [98] Ahmad S, Sharma S, Afjal M A, et al. mRNA expression and protein-protein interaction (PPI) network analysis of adrenal steroidogenesis in response to exposure to phthalates in rats[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2022, 89:103780.
- [99] Feng Q, Sun C H, Li S R, et al. Anti-inflammatory mechanism of active ingredients in Jingfang Mixture based on network pharmacology and experimental verification[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2022, 47(20):5481-5487.
- [100] Lin L, Chen W, Yao C, et al. Exploring the target and molecular mechanism of Astragalus membranaceus in the treatment of vascular cognitive impairment based on network pharmacology and molecular docking[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(12):e33063.
- [101] Lin Z, Luo P, Huang D, et al. Multi-omics based strategy for toxicity analysis of acrylamide in *Saccharomyces cerevisiae* model[J]. Chemico-Biological Interactions, 2021, 349:109682.
- [102] Chen M, Zeng J, Yang Y, et al. Diagnostic biomarker candidates for pulpitis revealed by bioinformatics analysis of merged microarray gene expression datasets[J]. BioMed Central Oral Health, 2020, 20(1):279.
- [103] Baßler J, Hurt E. Eukaryotic ribosome assembly[J]. Annual Review of Biochemistry, 2019, 88(1):281-306.
- [104] Johnson A G, Flynn R A, Lapointe C P, et al. A memory of ES25 loss drives resistance phenotypes[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(13):7279-7297.
- [105] Li Y Y, Zhang J T, Sun H L, et al. Lnc Rps4l encoded peptide RPS4XL regulates RPS6 phosphorylation and inhibits the proliferation of PSMCs caused by hypoxia[J]. Molecular Therapy, 2021, 29(4):1411-1424.
- [106] Wang H, Chao L N, Li K Z, et al. Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2006, 6(1):91.
- [107] Jung J H, Lee H, Kim J H, et al. p53 dependent apoptotic effect of puromycin via binding of ribosomal protein L5 and L11 to MDM2 and its combination effect with RITA or doxorubicin[J]. Cancers, 2019, 11(4):582.
- [108] Ebright R Y, Lee S, Wittner B S, et al. Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis[J]. Science, 2020, 367(6485):1468-1473.

## 参考文献

- [109]Cruz Jesus D L, Gomez-Herreros F, Rodríguez-Galán O, et al. Feedback regulation of ribosome assembly[J]. *Current Genetics*, 2018, 64(2):393-404.
- [110]Ramu V S, Dawane A, Lee S, et al. Ribosomal protein QM/RPL10 positively regulates defence and protein translation mechanisms during nonhost disease resistance[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(11):1481-1494.
- [111]洪云婷. 孕哺期氯化镧暴露对子代大鼠海马与大脑皮质核糖体蛋白 S6 及其上游信号通路表达的影响[D]. 中国医科大学, 2019, 000486.
- [112]Lecomte F, Szpirer J, Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF-alpha-induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells[J]. *Gene*, 1997, 186(2):271-277.
- [113]Ji P, Wang L, Liu J, et al. Knockdown of RPL34 inhibits the proliferation and migration of glioma cells through the inactivation of JAK/STAT3 signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(3):3259-3267.
- [114]王泉宇, 卢涛, 梁超, 等. 预知子种子提取物对核糖体蛋白抑制 HepG2 肝癌细胞增殖调控作用研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(16):1156-1162.
- [115]Park Y J, Kim S H, Kim T S, et al. Ribosomal protein S3 associates with the TFIIF complex and positively regulates nucleotide excision repair[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(7):3591-3606.
- [116]Suresh K V, Venkata Naga S G, Raj K. Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2016, 1863(5):1098-1105.
- [117]Pinti Mark V, Fink Garrett K, Hathaway Quincy A, et al. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis[J]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2019, 316(2):268-285.
- [118]Antioxidants; Studies from Fudan University Describe New Findings in Antioxidants (SIRT5 promotes IDH2 desuccinylation and G6PD deglutarylation to enhance cellular antioxidant defense)[J]. *Chemicals Chemistry*, 2016, 1797.
- [119]Wong C, Bansal G, Pavlickova L, et al. Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension[J]. *Antioxidants Redox Signaling*, 2013, 18(14):1789-1796.
- [120]Li R, Ma Z, Zheng W, et al. Multiomics analyses reveals Anaplasma phagocytophilum Ats-1 induces anti-apoptosis and energy metabolism by upregulating the respiratory chain-mPTP axis in eukaryotic mitochondria[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1):271.
- [121]Zhang Y, Ge M, Chen Y, et al. NDUFA4 promotes cell proliferation by enhancing oxidative phosphorylation in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2022, 54(5-6):283-291.
- [122]Chen L, Jia J M, Zhong W, et al. P70S6K is involved in the inhibition of testosterone production in TM3 mouse Leydig cells overexpressing Cox7a2[J]. *Zhonghua nan ke xue = National Journal of Andrology*, 2011, 17(4):291-295.

- [123]Amunts A, Brown A, Toots J, et al. Ribosome.The structure of the human mitochondrial ribosome[J]. Science, 2015, 348(6230):95-98.
- [124]De Zaeytijd J, Rougé P, Smaghe G, et al. Structure and Activity of a Cytosolic Ribosome-Inactivating Protein from Rice[J]. Toxins (Basel), 2019, 11(6):325.
- [125]Liu Z, Li R, Dong Q, et al. Characterization of the non-sexual flocculation of fission yeast cells that results from the deletion of ribosomal protein L32[J]. Yeast (Chichester, England), 2015, 32(5):439-449.
- [126]Mirabello L, Macari Elizabeth R, Jessop L, et al. Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families[J]. Blood, 2014, 124(1):24-32.
- [127]Wier E M, Fu K, Hodgson A, et al. Caspase-3 cleaved p65 fragment dampens NF-kappa B-mediated anti-apoptotic transcription by interfering with the p65/RPS3 interaction[J]. FEBS Letters, 2015, 589(23):3581-3587.
- [128]Cheng D D. Down-regulation of RPS9 Inhibits Osteosarcoma Cell Growth through Inactivation of MAPK Signaling Pathway[J]. Journal of Cancer, 2017, 8(14):2720-2728.
- [129]Lessard F, Brakier-Gingras L, Ferbeyre G. Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress[J]. BioEssays, 2019, 41(3):e1800183.
- [130]袁飞, 王树斌. 核糖体蛋白与恶性肿瘤治疗研究进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2019, 6(1):116-119.
- [131]He Y X, Guo Y X, Zhang Y, et al. Ionizing Radiation-Induced RPL23a Reduction Regulates Apoptosis via RPL11-MDM2-p53 Pathway in Mouse Spermatogonia[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2021, 34(10):789-802.
- [132]Ahn E H, Kim D W, Kang H W, et al. Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice[J]. Toxicology, 2010, 276(3):192-197.
- [133]Chen K C, Hsu W H, Ho J Y, et al. Flavonoids Luteolin and Quercetin Inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(3):1180-1191.
- [134]都丽. 氧化前胡素对小鼠急性肺损伤的抗炎抗氧化作用及分子机制研究[D]. 吉林大学, 2022.
- [135]Han H, Liu L, Chen M, et al. The optimal compound reference genes for qRT-PCR analysis in the developing rat long bones under physiological conditions and prenatal dexamethasone exposure model[J]. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.), 2020, 98:242-251.
- [136]朱见. 青蒿琥酯调控 E2F1 抑制甲状腺癌增殖和侵袭的机制研究[D]. 山东中医药大学, 2022.
- [137]Lindstr m M S, Nistér M. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53

- activation[J]. PLoS One, 2010, 5(3):e9578.
- [138]宋鹄鹏, 舒鹏, 马炬雷, 等. 核糖体蛋白 S9 在多发性骨髓瘤中的表达及其细胞生物学功能的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(2):175-182.
- [139]Desterro Joana M P, Rodriguez M S, Hay R T. SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation[J]. Molecular Cell. 1998, 2(2):233-239.
- [140]Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Egaña I, et al. Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and NF- $\kappa$ B activity[J]. PLoS One, 2012, 7:e51672.
- [141]Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system[J]. Annual Review of Immunology, 1994, 12:141-179.
- [142]Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- $\kappa$ B Family of transcription factors and its regulation[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009, 1(4):a000034.
- [143]Ma D, Zhao Y, She J, et al. NLRX1 alleviates lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammation in chondrocytes by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B signaling[J]. International Immunopharmacology, 2019, 71:7-13.
- [144]Zhang L, Lv H, Li Y, et al. Sodium houttuynonate enhances the intestinal barrier and attenuates inflammation induced by Salmonella typhimurium through the NF- $\kappa$ B pathway in mice[J]. International Immunopharmacology, 2020, 89(Pt A):107058.
- [145]Bai X, Zhang Y L, Liu L N. Inhibition of TRIM8 restrains ischaemia-reperfusion-mediated cerebral injury by regulation of NF- $\kappa$ B activation associated inflammation and apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 2020, 388(2):111818.
- [146]Mc Farland C D, Yaglom J A, Wojtkowiak J W, et al. The damaging effect of passenger mutations on cancer progression[J]. Cancer Research, 2017, 77(18):4763-4772.
- [147]Tsai CY, Li F, Chy W, et al. Sumoylation of I $\kappa$ B attenuates NF- $\kappa$ B-induced nitrosative stress at rostral ventrolateral medulla and cardiovascular depression in experimental brain death[J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23(1):65.
- [148]Wang T S, Cao Y, Zheng Q, et al. SENP1 Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism[J]. Molecular Cell, 2019, 75(4):823-834.
- [149]Peng Y, Wang Z X, Wang Z Q, et al. SUMOylation down-regulates rDNA transcription by repressing expression of upstream-binding factor and proto-oncogene c-Myc[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(50):19155-19166.
- [150]Schneeweis C, Hassan Z, Schick M, et al. The SUMO pathway in pancreatic cancer: insights and inhibition[J]. British Journal of Cancer, 2021, 124(3):531-538.
- [151]Zhang Q, Zhu W, Zou Z, et al. A Preliminary Study in Immune Response of BALB/c and C57BL/6 Mice with a Locally Allergic Rhinitis Model[J]. American Journal of Rhinology Allergy, 2023, 16:19458924231157619.

- [152]Huang Y, Peng M, Qin H, et al. LAPTM4B promotes AML progression through regulating RPS9/STAT3 axis[J]. Cellular Signalling, 2023, 106:110623.
- [153]Liu W, Wang Y, Fischer P, et al. Lactate regulates cell cycle by remodeling the anaphase promoting complex[J]. Nature, 2023.
- [154]Rosorius O, Fries B, Stauber R H, et al. Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(16):12061-12068.
- [155]Pfister A S. Emerging role of the nucleolar stress response in autophagy[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2019, 13:156-174.
- [156]颀鸿笙, 曹源, 乐昌昊, 等. 肾缺血再灌注损伤与核仁应激的相关性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7):1243-1247.
- [157]Bailly A, Perrin A, Bou Malhab L J, et al. The NEDD8 inhibitor MLN4924 increases the size of the nucleolus and activates p53 through the ribosomal-Mdm2 pathway[J]. Oncogene, 2016, 35(4):415-426.
- [158]Liu Y, Deisenroth C, Zhang Y P. RP-MDM2-p53 pathway: linking ribosomal biogenesis and tumor surveillance[J]. Trends in Cancer, 2016, 2(4):191-204.
- [159]Miliani de Marval Paula L, Zhang Y. The RP-Mdm2-p53 pathway and tumorigenesis[J]. Oncotarget, 2011, 2(3):234-238.
- [160]Li Y, Zhou Y, Li B, et al. WDR74 modulates melanoma tumorigenesis and metastasis through the RPL5-MDM2-p53 pathway[J]. Oncogene, 2020, 39(13):2741-2755.
- [161]Ko H M, Jee W, Lee D, et al. Ophiopogonin D increase apoptosis by activating p53 via ribosomal protein L5 and L11 and inhibiting the expression of c-Myc via CNOT2[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13:974468.
- [162]Lin Y, Breugem C C, Maas S M, et al. The important role of RPS14, RPL5 and MDM2 in TP53-associated ribosome stress in mycophenolic acid-induced microtia[J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2021, 151:110916.
- [163]Liu Q, Gao J, Zhao C, et al. To control or to be controlled? Dual roles of CDK2 in DNA damage and DNA damage response[J]. DNA repairing, 2020, 85:102702.
- [164]Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity[J]. Nature reviews Cancer, 2003, 3(3):155-168.
- [165]Matsuoka S, Ballif B A, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage[J]. Science, 2007, 316(5828):1160-1166.
- [166]Jung B C, Kim H K, Kim S H, et al. Triglyceride induces DNA damage leading to monocyte death by activating caspase-2 and caspase-8[J]. BMB Reports, 2023, 3:5816.
- [167]González-Quiroz M, Blondel A, Sagredo A, et al. When Endoplasmic Reticulum Proteostasis Meets the DNA Damage Response[J]. Trends in Cell Biology, 2020,



- 30(11):881-891.
- [168]Lewis C W, Golsteyn R M. Cancercells that survive check point adaptation contain micronuclei that harbor damage DNA[J]. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)*, 2016, 15(22):3131-3145.
- [169]Dai L, Lin J, Said A B, et al. Pellino1 specifically binds to phospho-Thr18 of p53 and is recruited to sites of DNA damage[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2019, 513(3):714-720.
- [170]Zhang Q, Feng H, Hu G, et al. Hexavalent chromium induces  $\gamma$ H2AX and RAD51 involved in DNA damage repair in BEAS-2B cells by modulating LNC-DHFR-4:1[J]. *Environment International*, 2023, 21, 174:107895.
- [171]Huang S, Cui M, Wang R, et al. Combined treatment with *Prunella vulgaris* and *Radix bupleuri* activated the Bax/Bcl-2 and Caspase-3 signal pathways in papillary thyroid carcinoma cells[J]. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2023, 16:1-12.
- [172]Kim S J, Kim J M, Shim S H, et al. Shikonin induces cell cycle arrest in human gastric cancer (AGS) by early growth response 1 (Egr1)-mediated p21 gene expression[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151(3):1064-1071.
- [173]Hawkins K E, Duchen M. Modelling mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease using human induced pluripotent stem cells[J]. *World Journal of Stem Cells*, 2019, 11(5):236-253.
- [174]Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(3):175-193.
- [175]Trumpff C, Owusu-Ansah E, Hans-Ulrich K, et al. Mitochondrial respiratory chain protein co-regulation in the human brain[J]. *Heliyon*, 2022, 8(5):e09353.
- [176]Gao S, Zhao B, Long C, et al. Natural Astaxanthin Improves Testosterone Synthesis and Sperm Mitochondrial Function in Aging Roosters[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9):1684.
- [177]Al Maruf A, O'Brien Peter J, Naserzadeh P, et al. Methotrexate induced mitochondrial injury and cytochrome c release in rat liver hepatocytes[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2018, 41(1):51-61.
- [178]Ye F, Wu L, Li H, et al. SIRT1/PGC-1 $\alpha$  is involved in arsenic-induced male reproductive damage through mitochondrial dysfunction, which is blocked by the antioxidative effect of zinc[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 320:121084.
- [179]Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494.
- [180]Ijaz M U, Shahzadi S, Ashraf A, et al. Protective effect of baicalin on methotrexate-induced mitochondrial damage in testicular tissues of rats[J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2022, 34(8):102343.
- [181]Pei M, Fan Y, Yi Z, et al. Protective effects of flavonoids in *Coreopsis tinctoria*

- Nutt in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 307:116214.
- [182]Xue B, Tan T, Li Y, et al. The protective effect of cordyceps sinensis extract on cerebral ischemic injury via modulating the mitochondrial respiratory chain and inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2020, 124:109834.
- [183]Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes[J]. *BMC Biology*, 2015, 13(1):89.
- [184]Rao S, Mondragón L, Pranjic B, et al. AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development[J]. *Cell Research*, 2019, 29(7):579-591.
- [185]Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 748:145-169.
- [186]Xu T, Li H, Lu S S, et al. Progress in mitochondrial electron transport respiratory chain and its biological significance[J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2015, 42(2):250-261.
- [187]Sazanov LA. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(6):375-388.
- [188]罗芳芳, 李敏, 易辉燕, 等. 电离辐照损伤对小鼠睾丸组织氧化磷酸化信号通路的影响[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4):483-488.
- [189]Wang C, Lv J, Xue C, et al. Novel role of COX6c in the regulation of oxidative phosphorylation and diseases[J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8(1):336.
- [190]Zhang Q, Xiao X, Li M, et al. Gene expression profiling in glomeruli of diabetic nephropathy rat[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2012, 237(8):903-911.
- [191]Lobo-Jarne T, Nývltová E, Pérez-Pérez R, et al. Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics[J]. *Cell Reports*, 2018, 25(7):1786-1799.
- [192]Hadife N, Nemos C, Frippiat J P, et al. Interleukin-24 mediates apoptosis in human B-cells through early activation of cell cycle arrest followed by late induction of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54(3):587-597.
- [193]Sreekumar O, John D N, Donald H B. Lung epithelial cells resist influenza A infection by inducing the expression of cytochrome c oxidase VIc which is modulated by miRNA 4276[J]. *Virology*, 2014, 468-470:256-264.
- [194]Bai J, Han H, Wang F, et al. Maternal linuron exposure alters testicular development in male offspring rats at the whole genome level[J]. *Toxicology*, 2017, 389(15):13-20.
- [195]Liu C, Li L, Ha M, et al. The PI3K/Akt and ERK pathways elevate thyroid hormone receptor  $\beta 1$  and TRH receptor to decrease thyroid hormones after

- exposure to PCB153 and p,p'-DDE[J]. *Chemosphere*, 2015, 118:229-238.
- [196]陈红, 吴俊杰, 薛强, 等. 以线粒体为靶点抗缺血性脑卒中中药有效成分研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(11):1236-1240.
- [197]王佳莹, 张文丽, 元小冬, 等. 线粒体在细胞凋亡中的作用[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(6):143-146.
- [198]Changlian Z, Xiaoyang W, Johanna D, et al. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(8):1741-1748.
- [199]Rao V K, Carlson E A, Yan S S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration[J]. *BBA-Molecular Basis of Disease*, 2014, 1842(8):1267-1272.
- [200]Feng W, Wang J, Li B, et al. Graphene oxide leads to mitochondrial-dependent apoptosis by activating ROS-p53-mPTP pathway in intestinal cells[J]. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 2022, 146:106206.
- [201]Li C, Tian J, Li G, et al. Asperosaponin VI protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt and CREB pathways[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 649(1-3):100-107.
- [202]Ren X, Wang S, Zhang C, et al. Selenium ameliorates cadmium-induced mouse leydig TM3 cell apoptosis via inhibiting the ROS/JNK/c-jun signaling pathway[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020, 192(C):110266.
- [203]Siddiqui Waseem A, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. *Archives of toxicology*, 2015, 89(3):289-317.
- [204]Rosa L S, Jordão N A, da Costa Pereira Soares N, et al. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Phenolic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cells Using In Vitro and In Silico Approaches[J]. *Molecules*, 2018, 23(10):2569.
- [205]Sun W, Ni Z, Li R, et al. Flurochloridone induces Sertoli cell apoptosis through ROS-dependent mitochondrial pathway[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 216(1):112183.
- [206]Yang Y, Yu Y, Wang J, et al. Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via CytC/Apaf-1 pathway[J]. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 2017, 52:161-169.
- [207]XueXia Liu, YaNan Liu, Zi Teng, et al. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) exposure induces sperm quality and functional defects in mice[J]. *Chemosphere*, 2022, 312(1):137216.
- [208]Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, et al. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation[J]. *BBA-Molecular Cell Research*, 2011, 1813(9):1619-1633.
- [209]Shen T, Miao Y, Ding C, et al. Activation of the p38/MAPK pathway regulates autophagy in response to the CYPOR-dependent oxidative stress induced by

- zearalenone in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 131:110527.
- [210]Li W, Li Y, Jiang X, et al. Compound Ammonium Glycyrrhizin Protects Hepatocytes from Injury Induced by Lipopolysaccharide/Florfenicol through a Mitochondrial Pathway[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2019, 225(C):108585.
- [211]Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases[J]. *BBA-Molecular Cell Research*, 2007, 1773(8):1358-1375.
- [212]Cui J, Zhang M, Zhang Y Q, et al. JNK pathway: diseases and therapeutic potential[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, 28(5):601-608.
- [213]Yan F, Chen L, Chen W, et al. Protective effect of procyanidin A-type dimers against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in prostate DU145 cells through the MAPKs signaling pathway[J]. *Life Sciences*, 2021, 266(5):118908.
- [214]Peng S, Zhang Y, Zhang J, et al. ERK in learning and memory: are view of recent research[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(1):222-232.
- [215]Li L L, Ginet V, Liu X, et al. The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOSIAP during neuronal death[J]. *The Journal of neuroscience*, 2013, 33(19):8185-8201.
- [216]Tsai M S, Wang YH, Lai YY, et al. Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice[J]. *Toxicology Letters*, 2018, 290:97-109.
- [217]Zhu L, Luo C, Ma C, et al. Inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway and ERK-mediated mitochondrial apoptotic pathway takes part in the mitigative effect of betulinic acid on inflammation and oxidative stress in cyclophosphamide-triggered renal damage of mice[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 246:114150.