

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.23.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20231107.1322.006\(2023-11-08\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20231107.1322.006(2023-11-08))

自噬调控对小鼠精原细胞缺氧/复氧损伤的影响研究*

胡 志,付 桥,张 炜[△],孙 伟,徐 律,陈一衍,褚 浩
(武汉市第三医院泌尿外科,武汉 430000)

[摘要] **目的** 研究自噬调控对小鼠精原细胞缺氧/复氧损伤(H/RI)的影响,探讨自噬对小鼠睾丸组织缺血再灌注损伤(IRI)的影响。**方法** 以小鼠精原细胞系 GC1 spg 为研究对象构建 H/RI 模型,雷帕霉素(RA-PA)和 3-甲基腺嘌呤(3-MA)分别作为自噬激动剂和抑制剂,设置对照组、模型组(H/RI)、自噬激动剂干预组(H/RI+自噬激动剂)、自噬抑制剂干预组(H/RI+自噬抑制剂)。用噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖能力,流式细胞术检测各组细胞活性氧(ROS)释放水平和凋亡水平,实时荧光定量 PCR(qPCR)检测各组细胞自噬相关基因 Beclin1 和凋亡相关基因 Bcl-2、Bax mRNA 的表达水平,Western blot 检测各组细胞自噬相关蛋白 LC3-I、LC3-II、Beclin1、p62 和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-3 的表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组增殖能力、Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降($P<0.01$),p62 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显下降($P<0.01$),ROS 水平、细胞凋亡率、Bax mRNA 相对表达水平明显上升($P<0.01$),Beclin1、Bax、caspase-3 蛋白表达水平和 LC3-II/LC3-I 蛋白比值明显上升($P<0.01$)。与模型组比较,自噬激动剂干预组细胞增殖能力、Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显上升($P<0.01$),Beclin1、Bcl-2 蛋白表达水平和 LC3-II/LC3-I 蛋白比值均明显上升($P<0.01$),ROS 水平、细胞凋亡率、Bax mRNA 表达水平明显下降($P<0.01$),p62、Bax、caspase-3 蛋白表达水平明显下降($P<0.01$)。与模型组比较,自噬抑制剂干预组细胞增殖能力、Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降($P<0.01$),Beclin1、Bcl-2 蛋白表达水平和 LC3-II/LC3-I 蛋白比值明显下降(均 $P<0.01$),ROS 水平、细胞凋亡率、Bax mRNA 表达水平明显上升($P<0.01$),p62、Bax、caspase-3 蛋白表达水平明显上升($P<0.01$)。**结论** 增强自噬能抑制小鼠精原细胞凋亡,修复 H/RI,为治疗睾丸组织 IRI 提供了理论基础。

[关键词] 自噬;缺氧/复氧损伤;缺血再灌注损伤;细胞凋亡
[中图分类号] R697.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)23-3527-06

Effect of autophagy regulation on hypoxia/reoxygenation injury of mouse spermatogonia*

HU Zhi,FU Qiao,ZHANG Wei[△],SUN Wei,XU Lyu,CHEN Yiyan,CHU Hao
(Department of Urology,Wuhan Third Hospital,Wuhan,Hubei 430000,China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of autophagy regulation on hypoxia/reoxygenation injury (H/RI) in mouse spermatogonia,and to explore the effect of autophagy on ischemia-reperfusion injury (IRI) in mouse testicular tissue. **Methods** The mouse spermatogonial cell line GC1 spg was used as the research object to construct the H/RI model. Rapamycin (RAPA) and 3-methyladenine (3-MA) were used as autophagy agonists and inhibitors. The control group,the model group,the autophagy agonist intervention group (H/RI+autophagy agonist intervention),and the autophagy inhibitor intervention group (H/RI+autophagy inhibitor intervention) were set up. The cells proliferation ability of each group was detected by methyl thiazol tetrazolium (MTT) method. The release level of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis level of each group were detected by flow cytometry. The expression levels of autophagy-related gene Beclin1 and apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax mRNA in each group were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). The expression levels of autophagy-related proteins LC3-I,LC3-II,Beclin1,p62 and apoptosis-related proteins Bcl-2,Bax,caspase-3 in each group were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group,the proliferation ability,the expression levels of Beclin1 and Bcl-2 mRNA in the model group were

* 基金项目:湖北省武汉市卫生健康委员会面上项目重点项目(WX20A16)。 作者简介:胡志(1980—),主治医师,硕士,主要从事泌尿生殖系肿瘤及男性功能障碍研究。 [△] 通信作者,E-mail:vonbasten@163.com。

significantly decreased ($P<0.01$), the relative expression levels of p62 and Bcl-2 proteins were significantly decreased ($P<0.01$). The ROS level, apoptosis rate and the mRNA expression level of Bax were significantly increased ($P<0.01$), and the protein expression levels of Beclin1, Bax, caspase-3 and the protein ratio of LC3-II/LC3-I were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the cell proliferation ability, the expression levels of Beclin1 and Bcl-2 mRNA in the autophagy agonist intervention group were the protein ratio of significantly increased ($P<0.01$), the protein expression levels of Beclin1 and Bcl-2 and the protein ratio of LC3-II/LC3-I were significantly increased ($P<0.01$). The ROS level, apoptosis rate and the expression level of Bax mRNA were significantly decreased ($P<0.01$), and the protein expression levels of p62, Bax, caspase-3 and the protein ratio of LC3-II/LC3-I were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the cell proliferation ability, the mRNA expression levels of Beclin1 and Bcl-2 in the autophagy inhibitor intervention group were significantly decreased ($P<0.01$), the protein expression levels of Beclin1 and Bcl-2 protein were significantly decreased ($P<0.01$). The ROS level, apoptosis rate and the mRNA expression level of Bax were significantly increased ($P<0.01$), and the protein expression levels of p62, Bax, caspase-3 and the protein ratio of LC3-II/LC3-I were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** Enhanced autophagy can inhibit apoptosis of spermatogonia and repair H/RI in mice, which provides a theoretical basis for the treatment of testicular tissue IRI.

[Key words] autophagy; hypoxia/reoxygenation injury; ischemia-reperfusion injury; cell apoptosis

睾丸缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)被认为是睾丸扭转和退扭的潜在机制,睾丸缺血因为代谢受损会导致炎症细胞因子的产生和细胞死亡,睾丸再灌注后由于活性氧(ROS)的产生和局部毛细血管功能障碍,组织进一步损伤,诱导DNA损伤,使精子发生永久性损伤^[1-2]。但目前临床上还没有缓解睾丸 IRI 的有效药物。

研究发现,自噬在多种组织器官的 IRI 过程中具有保护作用,自噬受损会增加再灌注期间细胞的损伤^[3]。自噬是溶酶体分解代谢过程,能消除老化的细胞器和大分子蛋白,为细胞器更新和细胞修复提供原料和营养^[4]。自噬受缺氧、渗透性和活性氧等因素影响,在维持细胞稳态中起关键作用^[5]。自噬是 IRI 的关键调节因子,不仅可用于抑制大鼠肾小管凋亡和减轻肾 IRI 期间的肾功能损害,还具有神经保护作用,能够减轻心肌 IRI^[6-7]。在适度范围内增强自噬活性也许能补偿线粒体损伤,并有助于 IRI 中的蛋白平衡,恢复受损的自噬通量可能是缓解 IRI 的有效途径^[8]。因此,为了探究自噬在睾丸组织的 IRI 过程中扮演的角色,本研究构建小鼠精原细胞缺氧/复氧损伤(hypoxia reoxygenation injury, H/RI)模型,模拟睾丸组织的 IRI 阶段,从多方面观察自噬对大鼠睾丸组织 IRI 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠精原细胞 GC-1 spg 购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、dNTP Mix 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,自噬激动剂 RAPA 和自噬抑制剂 3-MA 购自美国 MCE 公司,活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,硫氰酸荧光素标记的钙离子依赖磷

脂结合蛋白/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司,兔抗 LC3-I、LC3-II、Beclin1、p62、Bcl-2、Bax 和 GAPDH 购自武汉贝茵莱生物科技,兔抗 caspase-3 购自德国 CST 公司。

1.2 仪器

311 型 CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司, DMIL LED 倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司, Forma-8000 三气培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, AMR-100 酶标仪、Nano-300 超微量分光光度计购自杭州奥盛仪器有限公司, NovoCyte 流式细胞仪购自美国 Acea 公司, Tanon-5200 全自动化学发光分析仪购自上海天能生命科学有限公司, GE48527 型 PCR 仪购自杭州柏恒科技有限公司, CFX-Connect 96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与传代

将融化后的细胞悬液 400×g 离心 3 min,弃上清液后重悬,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养。倒置显微镜下观察细胞形态。打开 T25 培养瓶,瓶口过火,丢弃培养瓶内的培养液,用 PBS 洗去残留。培养瓶加入 0.25% 胰酶,37℃ 消化,用倒置显微镜进行观察,细胞收回突起变圆时立即翻转培养瓶,倒掉与细胞脱离的胰酶,加入培养基润洗,使细胞脱壁并分散,制成细胞悬液,分装。

1.3.2 细胞模型构建

将完成传代的细胞分为 4 组:对照组、模型组、自噬激动剂干预组和自噬抑制剂干预组。收集细胞,调整细胞悬液浓度为 5×10⁵/孔。对照组细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中正常培养 24 h。模型组细胞按照文献^[9],用预先缺氧的无血清培养基在 5% CO₂、1% O₂ 和 94% N₂ 的三气培养箱培养 24 h,构建 H/

RI 模型。自噬激动剂干预组在模型构建成功后,将细胞移至常氧培养箱复氧 2 h 后,添加 50 nmol/L 的自噬激动剂 RAPA 常规孵育 12 h。自噬抑制剂干预组在细胞复氧 2 h 后,添加 5 mmol/L 的自噬抑制剂 3-MA 常规孵育 12 h。

1.3.3 MTT 检测各组细胞增殖活力

调整细胞悬液浓度为 3×10^3 /孔,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜,使细胞贴壁。按照 1.3.2 不同分组处理细胞,培养 24 h 后加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL),继续培养 4 h。然后弃去上清液,加入二甲亚砜(DMSO)溶解液充分溶解结晶物。用分光光度计测量各孔的吸光度(A)值。

1.3.4 流式细胞术检测各组细胞 ROS 水平

收集各组细胞悬浮于 10 μmol/L 的活性氧荧光探针(DCFH-DA)中,浓度为 1×10^6 /mL,37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱内孵育 20 min。DCFH-DA 和细胞充分接触后,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用 PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测 ROS。

1.3.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平

收集各组细胞,重悬使细胞浓度为 1×10^6 /孔,400×g 离心 5 min,弃上清液,重悬于 200 μL PBS。加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,4 ℃避光孵育 30 min;加入 300 μL PBS,进行流式检测。

1.3.6 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测细胞中自噬和凋亡相关基因表达水平

取细胞约 1×10^6 个,加 1 mL TRIzol 提取总 RNA。逆转录合成 cDNA。将合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 5 s,56 ℃退火 10 s,72 ℃延伸 25 s,共 40 个循环。其中 GAPDH 作为内参进行样品间的校正,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因 mRNA 表达水平,各目标基因引物见表 1。

表 1 引物序列

基因	方向	引物序列 (5'-3')	引物大小 (bp)
Beclin1	正向	GAG AGA CCC AGG AGG AAG A	116
	反向	GGG ACT GAG GAA TAG TAA GCA	116
Bcl-2	正向	GAG AGC GTC AAC AGG GAG	166
	反向	GCC AGG AGA AAT CAA ACA	166
Bax	正向	GTC CAC CAA GAA GCT GAG	184
	反向	GTA GAA GAG GGC AAC CAC	184
GAPDH	正向	CCT TCC GTG TTC CTA C	152
	反向	GAC AAC CTG GTC CTC A	152

1.3.7 Western blot 法检测自噬和凋亡相关蛋白表达水平

取各组细胞加入细胞裂解液,用蛋白提取试剂盒提取总蛋白,并用 BCA 法检测蛋白浓度。取 20 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。4 ℃

封闭过夜,分别加入兔抗 Beclin1、Bax、caspase-3、LC3-II、LC3-I、p62、Bcl-2 和 GAPDH 单克隆抗体 (1 : 1 000),室温孵育 1 h。加入二抗,室温孵育 1 h。洗膜后加入化学发光试剂显色,读取条带灰度值。

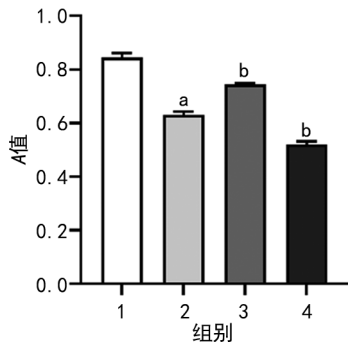
1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计分析,实验均进行 3 次重复,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测各组细胞增殖能力

与对照组比较,模型组小鼠精原细胞增殖能力明显下降($P < 0.01$),自噬激动剂干预组小鼠精原细胞增殖能力较模型组明显提高($P < 0.01$),自噬抑制剂干预组小鼠精原细胞增殖能力较模型组明显降低($P < 0.01$),见图 1。



1:对照组;2:模型组;3:自噬激动剂干预组;4:自噬抑制剂干预组;^a: $P < 0.01$,与对照组比较;^b: $P < 0.01$,与模型组比较。

图 1 各组细胞增殖能力变化

2.2 流式细胞术检测各组细胞 ROS 水平

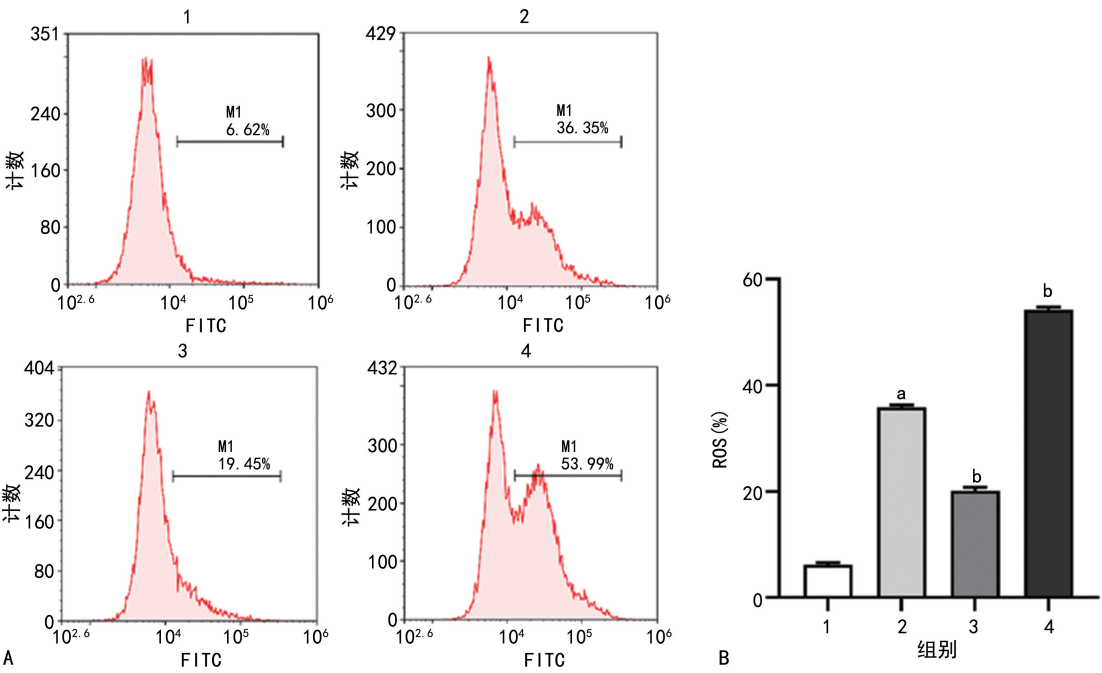
与对照组比较,模型组小鼠精原细胞 ROS 水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,自噬激动剂干预组小鼠精原细胞 ROS 水平明显降低($P < 0.01$),自噬抑制剂干预组小鼠精原细胞 ROS 水平明显升高($P < 0.01$),见图 2。

2.3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

与对照组比较,H/RI 模型组细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,自噬激动剂干预组的细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$),而自噬抑制剂干预组细胞凋亡率则明显升高($P < 0.01$),见图 3。

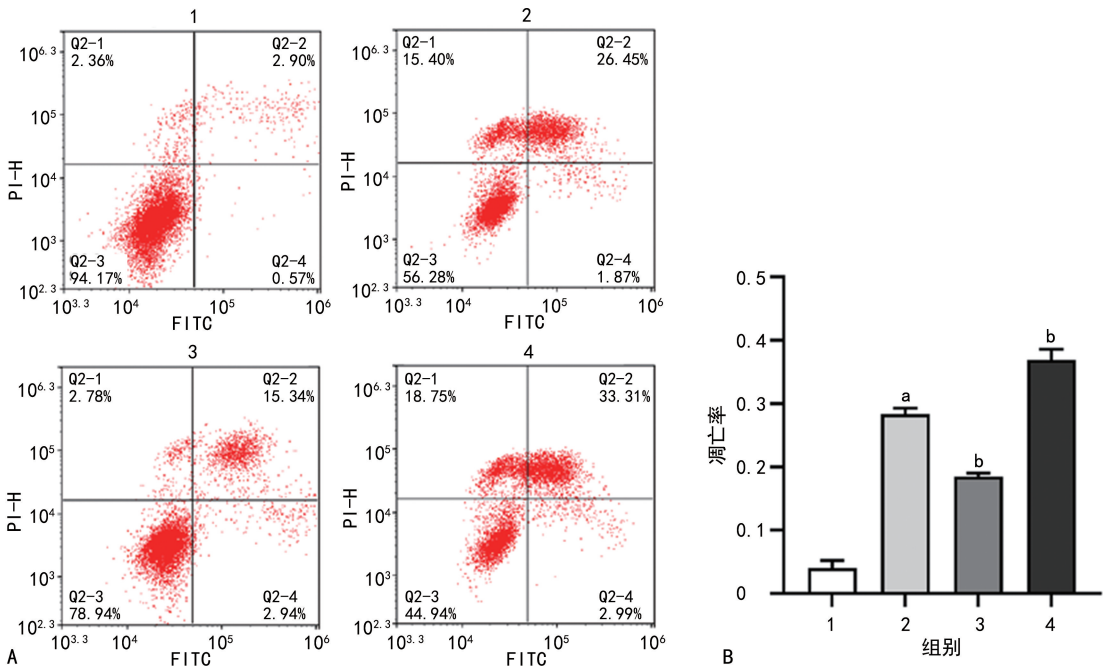
2.4 qPCR 检测各组细胞中 Beclin1、Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达水平

与对照组比较,模型组小鼠精原细胞中 Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降,Bax mRNA 表达水平明显上升(均 $P < 0.01$);与模型组比较,自噬激动剂干预组小鼠精原细胞中 Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显上升($P < 0.01$),Bax mRNA 表达水平明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,自噬抑制剂干预组小鼠精原细胞中 Beclin1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降($P < 0.01$),Bax mRNA 表达水平明显升高($P < 0.01$),见图 4。



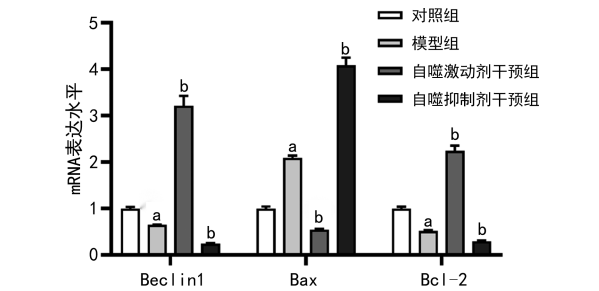
A: 流式细胞图; B: 定量分析图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 自噬激动剂干预组; 4: 自噬抑制剂干预组; ^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 2 流式细胞术检测各组细胞 ROS 水平



A: 流式细胞图; B: 定量分析图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 自噬激动剂干预组; 4: 自噬抑制剂干预组; ^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较。

图 3 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平



^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较。

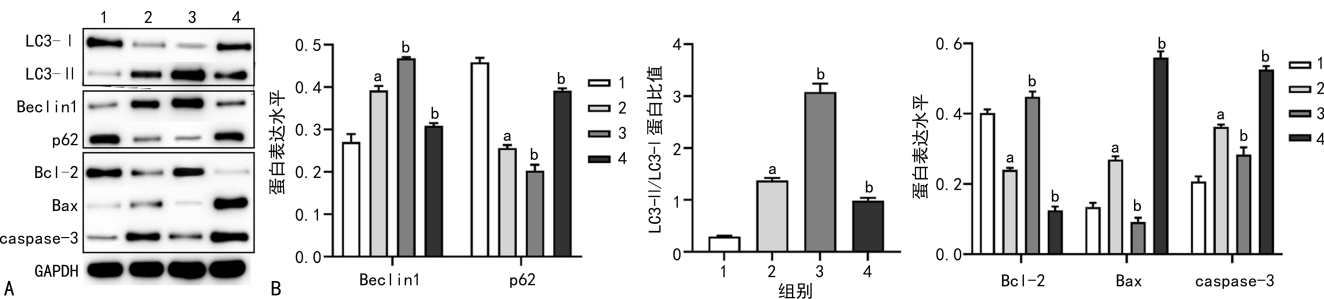
图 4 RT-qPCR 检测各组细胞中相关 mRNA 表达水平

2.5 Western blot 检测各组细胞自噬相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达水平

与对照组比较,模型组小鼠精原细胞 Beclin1、Bax、caspase-3 表达水平和 LC3-II/LC3-I 蛋白比值水平明显上升($P < 0.01$),p62 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,自噬激动剂干预组小鼠精原细胞 Beclin1、Bcl-2 蛋白表达水平和 LC3-II/LC3-I 蛋白比值均明显上升($P < 0.01$),p62、Bax 和 caspase-3 蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$);与模

型组比较,自噬抑制剂干预组 Beclin1、Bcl-2 蛋白表达水平和 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白比值均明显下降($P <$

0.01),p62、Bax、caspase-3 蛋白表达水平明显上升(均 $P <$ 0.01),见图 5。



A: Western blot 图; B: 定量分析图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 自噬激动剂干预组; 4: 自噬抑制剂干预组; ^a: $P <$ 0.01, 与对照组比较; ^b: $P <$ 0.01, 与模型组比较。

图 5 各组细胞自噬相关蛋白和凋亡相关蛋白的相对表达水平

3 讨 论

自噬是细胞存活的重要机制,在细胞分化、发育、稳态、细胞存活和死亡中发挥着重要作用^[10]。自噬在哺乳动物组织中发挥着多种生理和病理作用^[11]。在生理条件下,自噬维持在基础水平,但当细胞受到营养缺乏、缺氧 DNA 损伤、细胞毒性剂等刺激时,细胞自噬会上调以减轻应激引起的损伤,帮助细胞生存^[8]。而本研究中模型组细胞自噬在一定程度上被激活,进一步为自噬减轻缺氧造成的损伤提供了理论支持。因此,本文利用公认的自噬激动剂 RAPA^[12]和抑制剂 3-MA^[13],对自噬与睾丸组织 IRI 之间的关系进行了深入研究。RAPA 能够抑制雷帕霉素靶蛋白的表达,激活自噬^[14]。3-MA 通过阻断自噬体形成和阻止成核阶段来抑制自噬^[15]。本研究中 H/RI 模型组细胞自噬过程被激活时,细胞增殖能力较模型组明显上升,而自噬被抑制时,增殖能力较模型组下降,说明调节细胞自噬能够影响 H/RI 模型细胞增殖,这与之前的研究一致^[16]。

研究表明,自噬的激活能改善年轻大鼠的肾功能,减少肾小管上皮细胞的凋亡和肾组织的损伤评分,对肾 IRI 损伤发挥保护作用^[17]。本研究中,自噬在 RAPA 的激活下,细胞内 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白比值、Beclin1 蛋白水平较模型组升高,p62 水平较模型组下降。LC3 是自噬小体成熟标志蛋白,LC3-Ⅰ 向 LC3-Ⅱ 转变,促进自噬体的形成^[18]。Beclin1 作为自噬调控基因,其表达水平增加能够诱导自噬的发生。p62 作为自噬降解的特异性受体,可作为自噬标志物^[19]。而自噬在 3-MA 的抑制下,Beclin1 蛋白水平、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白比值较模型组下降,进而抑制自噬体的形成。且当自噬被抑制时,p62 会不断累积,与 LC3 结合形成复合物,负性调节自噬活性^[20]。

本研究中,在 RAPA 干预下,自噬被激活,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平较模型组明显上升,caspase-3 和促凋亡蛋白 Bax 表达水平较模型组下降。这减少了因为缺血导致 Bax 向线粒体外膜易位,抑制了线粒体

外膜通透性增加触发的内源性凋亡途径,从而抑制了 caspase-3 级联反应,使细胞凋亡率明显下降^[21]。该结果证明了增强自噬可以避免因 ROS 过度释放导致的细胞凋亡^[22],修复精原细胞组织 H/RI 损伤。

此外,激活自噬可清除过量 ROS,减轻睾丸组织 H/RI^[23]。IRI 后 ROS 的大量积累会导致氧化应激,阻碍线粒体功能,破坏细胞稳态环境,损害自噬小体的清除^[24-25]。本研究中,RAPA 干预时,细胞 ROS 水平较模型组明显降低,细胞凋亡率较模型组明显下降;而 3-MA 干预时,ROS 在细胞内大量积累,细胞凋亡率较模型组明显上升。

综上所述,本研究验证了增强自噬可以一定程度上修复小鼠精原细胞 H/RI,抑制细胞凋亡,为治疗睾丸组织 IRI 提供理论基础。

参考文献

[1] KHASHAB F, AL-SALEH F, AL-KANDARI N, et al. JAK inhibition prevents DNA damage and apoptosis in testicular ischemia-reperfusion injury via modulation of the ATM/ATR/Chk pathway[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (24): 13390.

[2] HO C, ZEE R S, OMIDI N, et al. Varenicline limits ischemia reperfusion injury following testicular torsion in mice[J]. J Pediatr Urol, 2021, 17(5): 631.

[3] HAN Y F, ZHAO Y B, LI J, et al. Stat3-Atg5 signal axis inducing autophagy to alleviate hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(4): 3440-3450.

[4] HOU J, RAO M, ZHENG W, et al. Advances on cell autophagy and its potential regulatory factors in renal ischemia-reperfusion injury[J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(9): 895-904.

- [5] CUI W,HAO Y,WANG M,et al. Inhibition of autophagy facilitates XY03-EA-mediated neuroprotection against the cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Oxid Med cellular longevity*,2022,2022:7013299.
- [6] TSENG W C,LEE P Y, TSAI M T,et al. Hypoxic mesenchymal stem cells ameliorate acute kidney ischemia-reperfusion injury via enhancing renal tubular autophagy[J]. *Stem Cell Res Ther*,2021,12(1):1-22.
- [7] 周智华,杜琼颖,鄧青. β -石竹烯激活自噬减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及机制[J]. *中国循证心血管医学杂志*,2021,13(11):1379-1382,1389.
- [8] ZHAO H,YANG Y,SI X,et al. The role of pyroptosis and autophagy in ischemia reperfusion injury[J]. *Biomolecules*,2022,12(7):1010.
- [9] 倪海强,欧志宇,夏仁飞,等. XBP1 调控 TXNIP-NLRP3 通路对小鼠肾小管上皮细胞缺氧复氧模型的影响及其作用机制[J]. *中华医学杂志*,2020,100(48):3863-3869.
- [10] FENG Z,LIANG C,MANTHARI R K,et al. Effects of fluoride on autophagy in mouse sertoli cells[J]. *Biological Trace Element Res*,2019,187(2):499-505.
- [11] 刘红红,徐积兄. 间充质干细胞调控细胞自噬的作用及机制[J]. *中国老年学杂志*,2022,42(15):3848-3853.
- [12] 赵恒光,罗福玲. 雷帕霉素激活自噬流逆转脂多糖所致的急性肺损伤[J]. *中国药科大学学报*,2015,46(5):605-609.
- [13] ZHANG J,MAO W,LIU Y,et al. 3-MA enhanced chemosensitivity in cisplatin resistant hypopharyngeal squamous carcinoma cells via inhibiting Beclin- I mediated autophagy[J]. *Curr Pharm Des*,2021,27(7):996-1005.
- [14] 丁瑞,张月,余丹霞,等. 雷帕霉素通过调节 mTOR-ULK1 信号通路减轻高糖诱导的足细胞损伤[J/CD]. *中华肾病研究电子杂志*,2020,9(5):207-210.
- [15] SHI Y,TAO M,MA X,et al. Delayed treatment with an autophagy inhibitor 3-MA alleviates the progression of hyperuricemic nephropathy[J]. *Cell Death Dis*,2020,11(6):1-16.
- [16] LIU S,GAO X,FAN Z,et al. SIRT2 affects cell proliferation and apoptosis by suppressing the level of autophagy in renal podocytes[J]. *Dis Markers*,2022,2022:4586198.
- [17] DIAO C,WANG L,LIU H,et al. Aged kidneys are refractory to autophagy activation in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Clin Interv Aging*,2019,14:525-534.
- [18] 董丽娜,赵晔,于磊,等. Klotho 蛋白对缺血再灌注急性肾损伤中 Bax、Bcl-2、p62 及 LC3 蛋白表达的影响[J]. *疑难病杂志*,2019,18(11):1154-1157,1189.
- [19] 满如,于永铎,陈萌,等. 化癥通便汤调节 STC 大鼠结肠 Cajal 间质细胞自噬相关蛋白表达的实验研究[J]. *辽宁中医药大学学报*,2022,24(6):23-28.
- [20] 李佳军,李晓丽. 自噬相关蛋白 Beclin1、p62 在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. *胃肠病学和肝病杂志*,2022,31(4):463-466.
- [21] LIU T,SONG F,LU D Y,et al. Anti-oxidation and anti-apoptosis mechanism of Xinsh formula on cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *China J Chen Materia Medica*,2018,43(17):3519-3524.
- [22] 刘子勤,李文文,吴敬珍,等. Liguzinediol 调控心肌细胞线粒体动力学和自噬改善心肌梗死后大鼠心功能的机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2022,42(6):768-779.
- [23] ZHANG D,HE Y,YE X,et al. Activation of autophagy inhibits nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome activation and attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats[J]. *J Diabet Invest*,2020,11(5):1126-1136.
- [24] 张小赏,童随阳,操传斌. 紫苏醛对大鼠心肌缺血/再灌注损伤诱导的自噬的影响[J]. *湖北医药学院学报*,2022,41(3):224-228.
- [25] SEKER U,NERGIZ Y,AKTAS A,et al. Trolox is more successful than allopurinol to reduce degenerative effects of testicular ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *J Pediatr Urol*,2020,16(4):465.

(收稿日期:2023-06-18 修回日期:2023-10-22)

(编辑:姚雪)