

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.10.1225

· 论 著 ·

自噬在电离辐射诱导的小鼠精母细胞 GC-2 凋亡过程中的作用

杨文军^{1,2}, 黄金凤^{1,2}, 刘岩^{1,2}, 朱怡卿^{1,2}, 王芳^{1,2*}, 孙树汉^{1,2*}

1. 第二军医大学长海医院临床遗传科, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨自噬在电离辐射诱导小鼠精母细胞 GC-2 凋亡过程中的作用。**方法** 将小鼠精母细胞 GC-2 分为空白对照组和不同剂量(2、4 和 8 Gy) ⁶⁰Co 辐射处理组。采用原位末端转移酶标记法(TUNEL 法)和流式细胞术检测细胞凋亡情况,通过蛋白质印迹实验观察自噬相关蛋白 LC3(LC3-I、LC3-II) 和 Beclin1 表达水平的改变,使用荧光显微镜观察 GC-2 细胞内自噬小体的变化。用 5 mmol/L 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)处理 GC-2 细胞 2 h 再给予⁶⁰Co 辐射处理,观察自噬抑制剂联合电离辐射对细胞凋亡率的影响以及自噬相关蛋白表达水平的改变。**结果** 与空白对照组相比,GC-2 细胞经⁶⁰Co 辐射处理后细胞凋亡率升高($P<0.05$),荧光显微镜下可见细胞自噬体明显增多,自噬相关蛋白 LC3-II 以及 Beclin1 蛋白表达水平增加($P<0.05$)。预先用 5 mmol/L 3-MA 处理 GC-2 细胞 2 h 再给予⁶⁰Co 辐射处理,自噬相关蛋白 LC3-II 以及 Beclin1 蛋白表达水平与未经 3-MA 处理组相比降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$)。**结论** 电离辐射可以诱导精母细胞发生自噬,抑制细胞自噬后可增强电离辐射对精母细胞的杀伤作用。

[关键词] 电离辐射;精母细胞;自噬;细胞凋亡**[中图分类号]** R 818.87 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)10-1225-06

Role of autophagy in apoptosis of mouse GC-2 spermatocytes induced by ionizing radiation

YANG Wen-jun^{1,2}, HUANG Jin-feng^{1,2}, LIU Yan^{1,2}, ZHU Yi-qing^{1,2}, WANG Fang^{1,2*}, SUN Shu-han^{1,2*}

1. Department of Clinical Genetics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of autophagy in the apoptosis of GC-2 spermatocytes in mouse induced by ionizing radiation. **Methods** The mouse spermatocytes GC-2 cells were divided into control group and 2, 4 and 8 Gy ⁶⁰Co irradiation treatment groups. The cell apoptosis was detected by *in situ* terminal transferase labeling (TUNEL) method and flow cytometry, the changes of autophagosome in GC-2 cells was observed by fluorescence microscope, and the expressions of autophagy-related proteins LC3 (LC3-I and LC3-II) and Beclin1 in GC-2 cells were determined by Western blotting analysis. After treatment with autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) 2 h before ionizing radiation treatment, the effect of autophagy inhibitor combined with ionizing radiation on cell viability and the changes of autophagy-related protein expressions in GC-2 cells were observed. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate and the expression of LC3-II and Beclin1 protein of GC-2 cells in the irradiation treatment group were significantly increased ($P<0.05$). Fluorescence microscopy showed that the cell autophagosome was increased. The expression of Beclin1 and LC3-II protein in GC-2 cells treated with 5 mmol/L 3-MA was significantly lower than that in the 3-MA-untreated group ($P<0.05$), and the apoptotic rate was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Ionizing radiation can induce autophagy of spermatocytes, and the inhibition of autophagy can enhance the killing effect of ionizing radiation on spermatocytes.

[Key words] ionizing radiation; spermatocytes; autophagy; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(10): 1225-1230]

[收稿日期] 2017-05-02 **[接受日期]** 2017-09-22**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2015CB554004), 国家自然科学基金(81372240, 81672775, 81330037), 上海市自然科学基金(14JC1407800, 15XD1504500)。Supported by National Program on Key Basic Research (“973” Project, 2015CB554004), National Natural Science Foundation of China (81372240, 81672775, 81330037), and Natural Science Foundation of Shanghai (14JC1407800, 15XD1504500).**[作者简介]** 杨文军, 硕士生。E-mail: wjyang822@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81871057, E-mail: wfsjz@163.com; Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

随着社会的发展,电离辐射的应用已经渗透到我们生活中的各个角落。放射性检查或治疗使用的医疗设备、安检使用的 X 射线机等,都是我们生活中常见的辐射源。过多地接触电离辐射会影响自身健康。放射工作人员随着累计接触剂量、工龄的增加,会出现皮肤损伤、眼晶状体混浊、外周血细胞和中性粒细胞减少等症状^[1]。男性生殖系统作为容易受电离辐射影响的系统之一,与后代健康水平密切相关^[2]。已有文献报道,长期暴露于电离辐射的人群,其精液质量会出现不同程度的下降,包括精液浓度降低、精子形态异常等^[3-4]。自噬是广泛存在于真核生物内的一种现象,通过降解包裹自噬溶酶体内受损的蛋白质及细胞器,实现细胞本身的代谢需要及某些细胞器更新,是细胞重要的修复途径^[5-6]。近期有研究发现自噬可通过多种途径在化学毒物诱导的生精细胞凋亡过程中发挥保护作用^[7-8],但自噬是否在电离辐射诱导的生精细胞凋亡过程中具有保护作用还未见报道。本实验主要通过研究细胞自噬在电离辐射诱导的小鼠精母细胞 GC-2 凋亡过程中的作用,探讨电离辐射诱导的细胞自噬与其诱导的细胞凋亡之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠精母细胞 GC-2 购自 ATCC 公司(ATCC Number: CRL-2196),细胞培养液 DMEM 和 10% 胎牛血清(FBS)购自美国 Invitrogen 公司,1% 青霉素、1% 链霉素、蛋白电泳所需试剂购自上海博光生物科技有限公司。自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)购自美国 Gene Operation 公司。自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3)小鼠单克隆抗体(Cat No. 48394)、 β -actin 小鼠单克隆抗体(Cat No. 8226)、自噬检测试剂盒购自英国 Abcam 公司,自噬相关蛋白 Beclin1 小鼠单克隆抗体(Cat No. 3495)购自美国 CST 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒及原位末端转移酶标记(TUNEL)法检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所。

1.2 细胞培养及处理 取 GC-2 细胞用含 10% FBS、1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,每 2 d 更换 1 次培养液,取对数生长期细胞用于实验。细胞分组:空白对照组,2、4、8 Gy ⁶⁰Co 辐射处理组,自噬抑制剂 3-MA 单独处理组,2、4、8 Gy ⁶⁰Co 辐射+3-MA 处理组。根据分组情况,先用 5 mmol/L 3-MA 预处理细胞 2 h,更换培养液后,再用相应剂量电离辐射处理细胞,继续在孵箱内培养 24 h 后进行下一步实验。

1.3 蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin1 表达 培养皿里加入蛋白提取液 RIPA 和蛋

白酶抑制剂 PMSF,在冰上放置 30 min,4 °C、1 700×g 离心 10 min。BCA 法测定蛋白浓度,取等量总蛋白与 5×SDS 上样缓冲液混合,100 °C 变性 10 min。行 5% SDS-PAGE、转膜,5% 脱脂奶粉溶液室温下封闭 2 h,PBST 洗膜 3 次,在 4 °C 摇床上孵育一抗过夜。TBST 洗膜 3 次,室温孵育二抗 2 h,用 Odessey 红外荧光扫描成像系统检测蛋白荧光强度。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡情况 PBS 洗涤细胞涂片 1 次,4% 多聚甲醛溶液固定细胞 60 min,PBS 洗涤后加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 并冰浴 2 min。PBS 洗涤 2 次,加入 50 μ L TUNEL 检测液,37 °C 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 2 次,加入 100 μ L 打孔液,室温避光孵育 10 min。加入 100 μ L DAPI,室温避光孵育 10 min,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,用抗荧光淬灭封片液封片后置于荧光显微镜下观察。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 使用离心管收集细胞培养液及胰酶消化后的细胞,2 000×g 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬细胞并计数。取 5×10⁴~1×10⁵ 重悬的细胞,1 000×g 离心 5 min,弃上清,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀。加入 10 μ L 碘化丙啶染色液,轻轻混匀。室温避光孵育 10 min,上流式细胞仪检测。

1.6 细胞自噬检测 采用一种特殊的可以穿过细胞双分子层的荧光示踪剂对自噬小泡进行特异性标记。用 1×检测缓冲液洗涤细胞涂片 2 次;100 μ L 显微双检测试剂覆盖细胞涂片,37 °C 避光孵育 30 min,1×检测缓冲液洗涤细胞涂片 1 次;4% 多聚甲醛溶液固定 20 min,1×检测缓冲液洗涤 3 次,用抗荧光淬灭封片液封片后置于荧光显微镜下观察。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 电离辐射诱导精母细胞 GC-2 发生凋亡 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡情况,结果显示 4 Gy 辐射剂量处理组 GC-2 细胞的荧光强度明显强于对照组(图 1),表明经过电离辐射处理后 GC-2 细胞的凋亡数量多于对照组,电离辐射可以诱导精母细胞发生凋亡。流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,与对照组相比,GC-2 细胞经电离辐射处理后凋亡率明显增加,且随着辐射剂量的增加 GC-2 细胞凋亡率上升($P < 0.05$,图 2),说明电离辐射可以以一种剂量相关的方式诱导 GC-2 细胞发生凋亡。

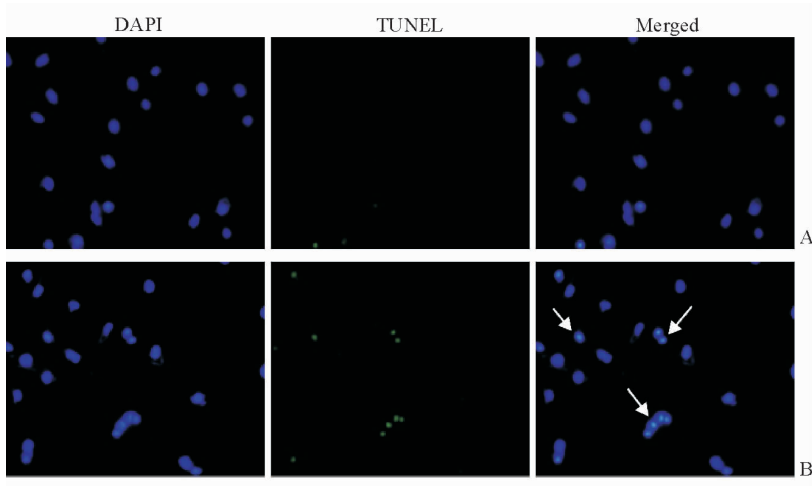


图 1 TUNEL 法检测精母细胞 GC-2 的凋亡情况

Fig 1 Apoptosis of spermatocytes GC-2 detected by TUNEL method

A: Control group; B: 4 Gy irradiation group. TUNEL: *In situ* terminal transferase labeling. The arrows indicate apoptosis cells. Original magnification: $\times 200$

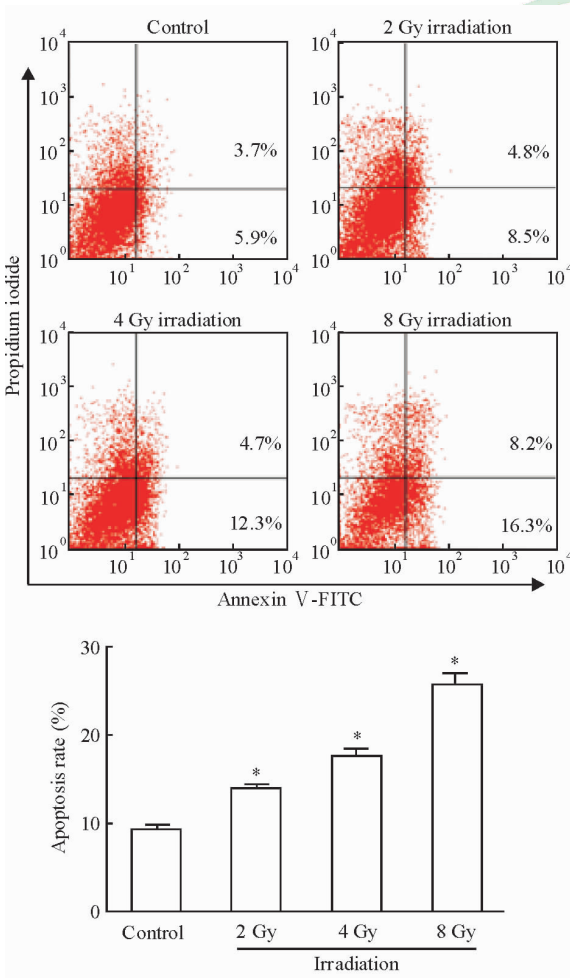


图 2 流式细胞术检测精母细胞 GC-2 的凋亡情况

Fig 2 Apoptosis of spermatocytes GC-2 detected by flow cytometry

* $P < 0.05$ vs control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 电离辐射增强精母细胞 GC-2 自噬水平 蛋白质印迹法检测结果如图 3 所示, 经过不同剂量辐射处

理后, GC-2 细胞自噬相关蛋白 LC3-II 与 Beclin1 的表达水平与对照组相比均升高 ($P < 0.05$), 提示电离辐射可以诱导 GC-2 细胞内自噬水平的增加。荧光显微镜下可见, 4 Gy 辐射剂量处理组 GC-2 细胞的荧光强度强于未辐射对照组 (图 4), 证明经过电离辐射处理后的 GC-2 细胞的自噬体数量多于对照组, 提示电离辐射可以增强细胞内的自噬水平。

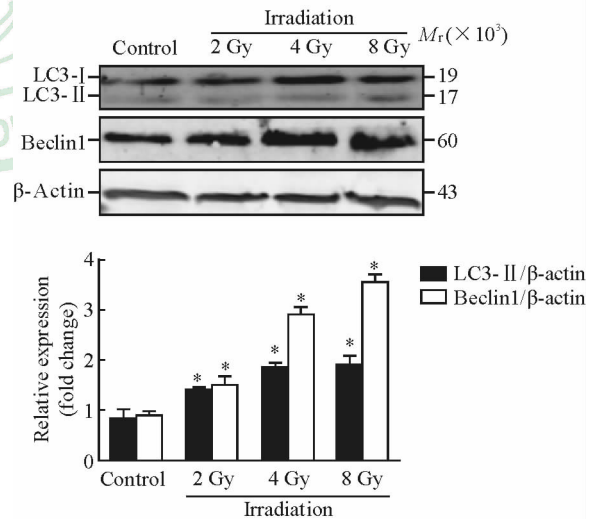


图 3 电离辐射处理精母细胞 GC-2 后自噬相关蛋白的表达

Fig 3 Expression of autophagy-related proteins in spermatocytes GC-2 treated with ionizing radiation

LC3: Microtubule-associated protein light chain 3. * $P < 0.05$ vs control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 抑制自噬可以增强电离辐射对精母细胞 GC-2 的杀伤作用 GC-2 细胞经 5 mmol/L 自噬抑制剂 3-MA 处理后再给予 4 Gy 辐射, 与单纯 4 Gy 辐射处理组相比, 自噬相关蛋白 LC3-II 和 Beclin1 的表达

水平降低($P < 0.05$,图5),证明电离辐射所诱导的GC-2细胞自噬能被3-MA抑制。流式细胞术检测结果(图6)显示,5 mmol/L 3-MA不会引起细胞凋亡增加($P > 0.05$)。用5 mmol/L 3-MA处理GC-2

细胞后再给予4 Gy辐射,细胞凋亡率较单纯4 Gy辐射组升高($P < 0.05$),提示抑制GC-2细胞自噬后可增强电离辐射诱导的细胞凋亡。

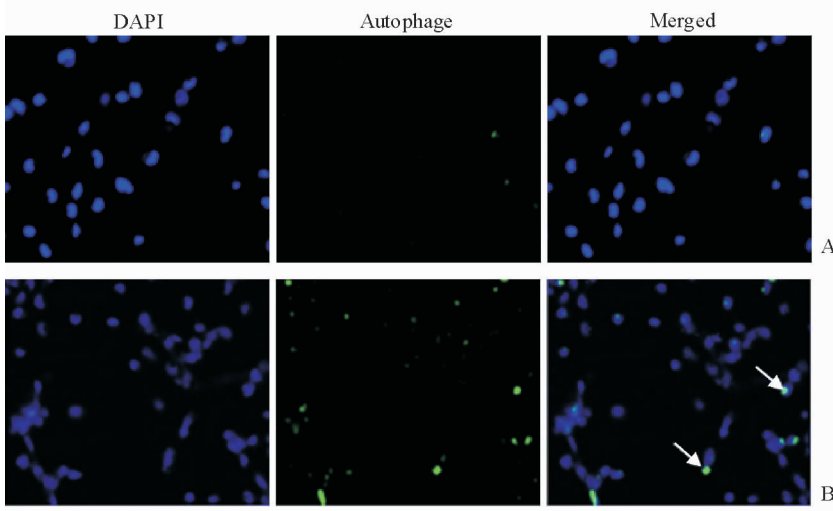


图4 荧光显微镜下观察自噬小体的形成

Fig 4 Formation of autophagosome under fluorescence microscope

A; Control group; B; 4 Gy irradiation group. The arrows indicate autophagosomes. Original magnification: $\times 200$

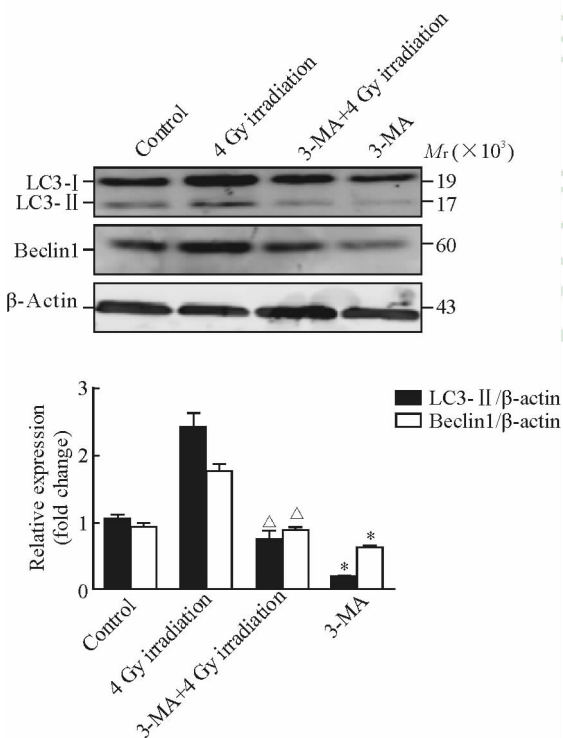


图5 抑制自噬加电离辐射处理后精母细胞GC-2自噬相关蛋白的表达

Fig 5 Expression of autophagy-related proteins in spermatocytes GC-2 treated with autophagy inhibitor and ionizing radiation

LC3: Microtubule-associated protein light chain 3; 3-MA: 3-Methyladenine. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 4 Gy irradiation group. $n=3, \bar{x} \pm s$

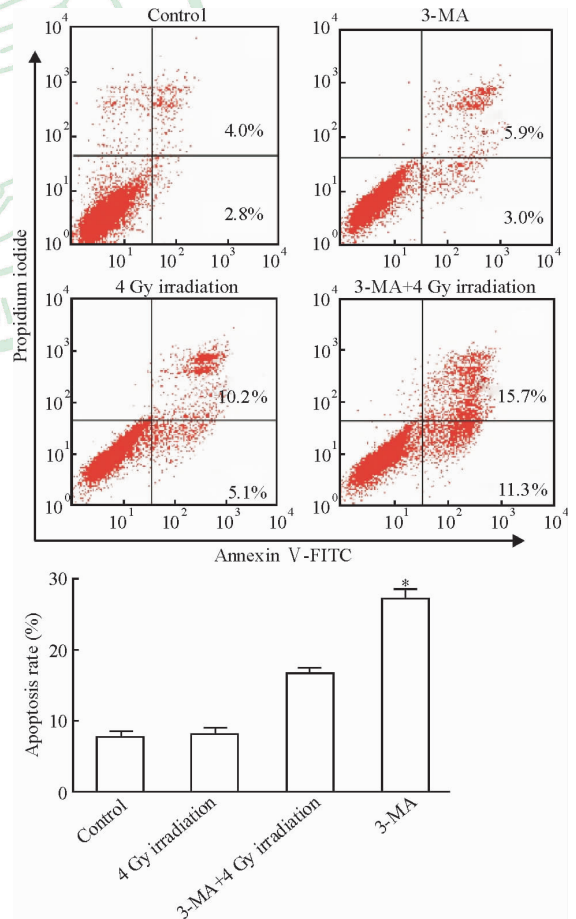


图6 流式细胞术检测抑制自噬加电离辐射处理后精母细胞GC-2凋亡情况

Fig 6 Apoptosis of spermatocytes GC-2 treated with autophagy inhibitor and ionizing radiation detected by flow cytometry
3-MA: 3-Methyladenine. * $P < 0.05$ vs 4 Gy irradiation group. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

随着工业社会的不断发展, 不孕不育已日益成为一个普遍的健康问题。据统计全球大约有 15% 的夫妇遭遇过不孕不育问题的困扰^[9], 其中 30%~35% 由男性因素导致^[10]。男性生殖系统对包括电离辐射在内的外部环境刺激很敏感, 长期暴露于电离辐射的人群与非暴露人群相比, 其精液中精子会出现活动度下降、结构畸形增加、浓度下降等问题^[4]。除此之外, 电离辐射刺激还可能会增加精子 DNA 断裂的概率^[11], 而精液中 DNA 断裂的精子增多, 会使得女性妊娠成功率降低, 即使通过辅助生殖技术受孕, 也会增加胎儿流产的风险^[12]。这些研究表明, 电离辐射可能会影响男性生殖健康水平。

男性生精细胞包括精原细胞、精母细胞、精子细胞和精子。本实验从小鼠精母细胞着手, 研究电离辐射作用与小鼠精母细胞凋亡之间的关系。研究结果显示, 电离辐射作用于细胞后可以增加细胞的凋亡, 且随着辐射剂量的增加, 细胞凋亡也随之增加。电离辐射与生精细胞凋亡之间的关系早已有研究报道。有研究者用 2 Gy 辐射剂量连续照射小鼠 2 个月, 发现小鼠附睾精子的数目与对照组相比下降 18%, 精子活动度减弱^[13], 无论是细胞实验还是动物实验均表明, 电离辐射可以导致生精细胞凋亡增加。介导生精细胞凋亡的通路主要有以下几条: 一是线粒体凋亡途径, 细胞色素 C 的级联激活通路在其中发挥了重要作用。研究发现注射双酚 A 的雄性小鼠生精细胞内的细胞色素 C 水平会显著增高, 进而激活 Caspase-3 和 Caspase-9, 导致生精细胞的过度凋亡, 造成雄性生殖毒性^[14]。二是 FAS/FASL 介导的凋亡。正常状况下二者的相互作用调控凋亡以促进生精细胞更新^[15]。研究者发现 FAS 系统可能介导了肥胖引起的睾丸生精细胞凋亡^[16]。三是内质网应激相关的凋亡通路。研究显示内质网应激相关的细胞参与了睾丸扭转引起的生精细胞凋亡过程^[17]。不同的刺激因素引起的生精细胞凋亡通路是不一样的, 电离辐射引起的凋亡通路还需要进一步研究。

细胞自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性的降解途径。生理性自噬在保护细胞防止代谢应激和氧化损伤, 以及维持细胞内稳态和细胞产物的合成、降解、循环再利用等方面具有重要作

用^[18-19]。自噬发生时, Beclin1、LC3-II 蛋白分别参与了自噬的起始、延长等阶段^[20]。本实验分别用蛋白质印迹法和荧光染色法观察细胞自噬水平, 证明电离辐射可以诱导精母细胞发生自噬, 且 Beclin1、LC3-II 蛋白表达水平随着辐射剂量的增加而上升; 在此基础上使用自噬抑制剂 3-MA 抑制细胞自噬能够明显增强电离辐射诱导的精母细胞凋亡。实验结果证明, 电离辐射诱导的细胞自噬会减弱其诱导的细胞凋亡。这与其他研究发现细胞自噬在精母细胞应对外部环境刺激时的作用^[21]是一致的。细胞凋亡与自噬是细胞内基因参与调控的与细胞命运息息相关的程序^[22]。二者之间联系密切, 其中一个程序抑制后即会激活另一个程序, 或者一个程序激活后即会抑制另一个程序^[23]。本实验证明给予自噬抑制剂 3-MA 后再使用 4 Gy 辐射组与单纯 4 Gy 辐射组相比, 精母细胞凋亡率上升, 与上述结论相一致。

综上所述, 本研究探讨了细胞自噬在电离辐射诱导的精母细胞 GC-2 发生凋亡的过程中所起的作用以及电离辐射诱导的细胞自噬与其诱导的细胞凋亡之间的关系, 结果发现电离辐射可以以一种剂量相关的方式诱导精母细胞凋亡, 抑制自噬可以增强电离辐射诱导的凋亡。下一步我们将通过动物实验进一步验证上述结果, 并探讨电离辐射诱导精母细胞凋亡的具体机制。

[参考文献]

- [1] 梁纪文, 何寿国, 陈水江. 茂名市不同工龄和工种辐射剂量对放射工作人员的健康效应分析[J]. 职业与健康, 2011, 27: 1475-1476.
- [2] RYAN J L. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132: 985-993.
- [3] ZHOU D D, HAO J L, GUO K M, LU C W, LIU X D. Sperm quality and DNA damage in men from Jilin Province, China, who are occupationally exposed to ionizing radiation[J/OL]. Genet Mol Res, 2016, 15 (1). gmr.15018078. doi: 10.4238/gmr.15018078.
- [4] KUMAR D, SALIAN S R, KALTHUR G, UPPANGALA S, KUMARI S, CHALLAPALLI S, et al. Semen abnormalities, sperm DNA damage and global hypermethylation in health workers occupationally exposed to ionizing radiation[J/OL]. PLoS One, 2013, 8: e69927. doi: 10.1371/journal.pone.0069927.
- [5] CODOGNO P, MEIJER A J. Autophagy and

- signaling: their role in cell survival and cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2): 1509-1518.
- [6] CHO Y Y, KIM D J, LEE H S, JEONG C H, CHO E J, KIM M O, et al. Autophagy and cellular senescence mediated by Sox2 suppress malignancy of cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e57172. doi: 10.1371/journal.pone.0057172.
- [7] ZHANG G, LIU K, LING X, WANG Z, ZOU P, WANG X, et al. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective role against apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 245: 86-98.
- [8] ZHANG G, LING X, LIU K, WANG Z, ZOU P, GAO J, et al. The p-eIF2 α /ATF4 pathway links endoplasmic reticulum stress to autophagy following the production of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells exposed to dibutyl phthalate [J]. *Free Radic Res*, 2016, 50: 698-707.
- [9] FERLIN A, ARREDI B, FORESTA C. Genetic causes of male infertility[J]. *Reprod Toxicol*, 2006, 22: 133-141.
- [10] ODISHO A Y, NANGIA A K, KATZ P P, SMITH J F. Temporal and geospatial trends in male factor infertility with assisted reproductive technology in the United States from 1999-2010[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102: 469-475.
- [11] SAKKAS D, ALVAREZ J G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93: 1027-1036.
- [12] VENKATESH S, SINGH A, SHAMSI M B, THILAGAVATHI J, KUMAR R, MITRA D K, et al. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility [J]. *Reprod Sci*, 2011, 18: 1005-1013.
- [13] VERESCHAKO G G, TSHUESHOVA N V, GOROKH G A, KOZLOV I G, NAUMOV A D. Effect of external irradiation and mobilization stress on the reproductive system of male rats[J]. *Radiats Biol Radioecol*, 2016, 56: 56-63.
- [14] WANG Q, ZHAO X F, JI Y L, WANG H, LIU P, ZHANG C, et al. Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes[J]. *Toxicol Lett*, 2010, 199: 129-135.
- [15] CELIK-OZENCI C, SAHIN Z, USTUNEL I, AKKOYUNLU G, ERDOGRU T, KORGUN E T, et al. The Fas system may have a role in male reproduction[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85: 1168-1178.
- [16] BAYRAM S, KIZILAY G, TOPCU-TARLADACALISIR Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis [J]. *Biotech Histochem*, 2016, 91: 204-211.
- [17] HUANG K H, WENG T I, HUANG H Y, HUANG K D, LIN W C, CHEN S C, et al. Honokiol attenuates torsion/detorsion-induced testicular injury in rat testis by way of suppressing endoplasmic reticulum stress-related apoptosis[J/OL]. *Urology*, 2012, 79: e5-e11. doi:10.1016/j.urology.2011.11.027.
- [18] LI X, WANG S, CHEN Y, LIU G, YANG X. miR-22 targets the 3' UTR of *HMGB1* and inhibits the *HMGB1*-associated autophagy in osteosarcoma cells during chemotherapy [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35: 6021-6028.
- [19] VAN DER VOS K E, ELIASSON P, PROIKAS-CEZANNE T, VERVOORT S J, VAN BOXTEL R, PUTKER M, et al. Modulation of glutamine metabolism by the PI₃K-PKB-FOXO network regulates autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 829-837.
- [20] ESTEBAN-MARTÍNEZ L, BOYA P. Autophagic flux determination *in vivo*, and *ex vivo* [J]. *Methods*, 2015, 75: 79-86.
- [21] LIU K, ZHANG G, WANG Z, LIU Y, DONG J, DONG X, et al. The protective effect of autophagy on mouse spermatocyte derived cells exposure to 1 800 MHz radiofrequency electromagnetic radiation [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 228: 216-224.
- [22] THORBURN A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes [J]. *Apoptosis*, 2008, 13: 1-9.
- [23] WARR M R, BINNEWIES M, FLACH J, REYNAUD D, GARG T, MALHOTRA R, et al. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2013, 494: 323-327.