

ARECOLINE HYDROBROMIDE PROMOTES THE APOPTOSIS OF MALE GERM CELLS

J. SUN¹, S. XU², M. YE², C. WANG², L. LIU¹, B. DING¹, X. LI¹, X. WANG¹, F. ZHANG¹, M. LIANG^{2,*}

¹ First Affiliated Hospital, Bengbu Medical College, 233030 Bengbu, China

² School of Life Science, Bengbu Medical College, 233030 Bengbu, China

* E-mail: lmhk@mail.ustc.edu.cn

Arecoline hydrobromide has been demonstrated to regulate cellular survival and male reproduction. However, the specific roles and regulated genes of arecoline hydrobromide in spermatogenesis are poorly understood. This study aimed to investigate the effects of arecoline hydrobromide on spermatogenesis and associated transcriptome changes. The spermatogenic cell line GC-1 cells were treated with arecoline hydrobromide to determine the effects of proliferation and apoptosis for arecoline hydrobromide in vitro. The ICR mice were treated with arecoline hydrobromide by intragastric administration. The testes and epididymis were used for sperm count, HE staining, apoptosis detection and transcriptome analysis. Cellular morphology was significantly altered and the number of apoptotic cells increased with increasing concentration and duration of arecoline hydrobromide treatment, and cell proliferation was inhibited. Animal experiments showed that the spermatozoa in the experimental groups were significantly reduced compared with that in the control group. Transcriptome sequencing was executed for testes of four-week arecoline hydrobromide treated mice, which identified 181 significant up-regulated genes and 159 significant down-regulated genes which were then analyzed with gene ontology (GO) and revealed some testicular development and hormone-related pathways. The results verified that arecoline hydrobromide inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of GC-1 cells, and caused a decrease in the number of spermatozoa and an increase in level of testosterone in mice.

Key words: Arecoline hydrobromide; GC-1 cells; Apoptosis; Spermatogenesis.

ГІДРОБРОМИСТИЙ АРЕКОЛІН СПРИЯЄ АПОПТОЗУ ЧОЛОВІЧИХ СТАТЕВИХ КЛІТИН

Було продемонстровано, що гідробромистий ареколін регулює виживання та репродукцію чоловічих статевих клітин. Однак, бракує повного розуміння специфічних ролей і регульованих генів гідро-

бромистого ареколіну в процесі сперматогенезу. Метою цього дослідження було вивчити вплив гідробромистого ареколіну на сперматогенез і асоційовані зміни транскриптому. Сперматогенні клітини лінії GC-1 обробили гідробромистим ареколіном, щоб визначити вплив проліферації та апоптозу in vitro. Мишам з Інституту вивчення злоякісних пухлин вводили гідробромистий ареколін внутрішньошлунково. Яєчка і придатки яєчок використовували для підрахунку сперматозоїдів, забарвлення гематоксиліном-еозином, виявлення апоптозу та аналізу транскриптому. Морфологія клітин суттєво змінилась, і кількість апоптичних клітин збільшилась із підвищенням концентрації і тривалості обробки за допомогою гідробромистого ареколіну. Також було зафіксовано інгібування проліферації клітин. Експерименти за участі тварин продемонстрували, що сперматозоїди в експериментальних групах були значно зменшеними порівняно з контрольною групою. Секвенування транскриптому було проведено за використанням яєчок мишей, яким вводили гідробромистий ареколін впродовж чотирьох тижнів. Результати секвенування показали 181 суттєвий ген із позитивною регуляцією і 159 суттєвих генів із негативною регуляцією, які згодом проаналізували за допомогою онтології гену (GO) і виявили деякі шляхи й процеси розвитку в яєчках, пов'язані з гормоном. Результати підтвердили, що гідробромистий ареколін інгібує проліферацію і сприяє апоптозу клітин GC-1, а також спричиняє зменшення кількості сперматозоїдів і підвищення рівня тестостерону в мишей.

Ключові слова: гідробромистий ареколін, клітини GC-1, апоптоз, сперматогенез.

REFERENCES

- Abbas G, Kashif M, Mudassar et al (2018) Cytotoxic, embryotoxic, insecticidal and anti-microbial activities of standardized Areca catechu nut. Pak J Pharm Sci 31(2):385–392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29618425>
- Asadi A, Ghahremani R, Abdolmaleki A et al (2021) Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review. Int J Reprod Biomed 19(6):493–504. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i6.9371>
- Chang BE, Liao MH, Kuo MY et al (2004) Developmental toxicity of arecoline, the major alkaloid in betel nuts, in zebrafish embryos. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 70(1):28–36. <https://doi.org/10.1002/bdra.10136>
- Chen X, He Y, Deng Y (2021) Chemical Composition, Pharmacological, and Toxicological Effects of Betel Nut. Evid Based Complement Alternat Med 2021:1808081. <https://doi.org/10.1155/2021/1808081>

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2024

- Di Guardo F, Vloeberghs V, Bardhi E et al (2020) Low Testosterone and Semen Parameters in Male Partners of Infertile Couples Undergoing IVF with a Total Sperm Count Greater than 5 Million. *J Clin Med* 9(12):3824. <https://doi.org/10.3390/jcm9123824>
- Ezzatabadipour M, Azizollahi S, Sarvazad A et al (2012) Effects of concurrent chronic administration of alcohol and nicotine on rat sperm parameters. *Andrologia* 44(5):330–336. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2012.01284.x>
- Fainberg J, Kashanian JA (2019) Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res* 8:1–8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Hu K, He C, Ren H et al (2019) LncRNA Gm2044 promotes 17beta-estradiol synthesis in mpGCs by acting as miR-138-5p sponge. *Mol Rep Dev* 86(8):1023–1032. <https://doi.org/10.1002/mrd.23179>
- Jenardhanan P, Panneerselvam M, Mathur PP (2016) Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 59:126–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.024>
- Keskin MZ, Budak S, Zeyrek T et al (2015) The relationship between serum hormone levels (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, total testosterone) and semen parameters. *Arch Ital Urol Androl* 87(3):194–197. <https://doi.org/10.4081/aiua.2015.3.194>
- Kumar S (2013) Tobacco and areca nut chewing – reproductive impairments: an overview. *Reprod Toxicol* 36:12–17. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.11.007>
- Li WQ, Wang F, Liu ZM et al (2013) Gold nanoparticles elevate plasma testosterone levels in male mice without affecting fertility. *Smal* 9(9–10):1708–1714. <https://doi.org/10.1002/smll.201201079>
- Liu YJ, Peng W, Hu MB et al (2016) The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: a review. *Pharm Biol* 54(11):2753–2760. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1160251>
- Miyaso H, Ogawa Y, Itoh M (2022) Microenvironment for spermatogenesis and sperm maturation. *Histochem Cell Biol* 157(3):273–285. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02071-z>
- Neto FT, Bach PV, Najari BB et al (2016) Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 59:10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009>
- Oliveira PF, Sousa M, Silva BM et al (2017) Obesity, energy balance and spermatogenesis. *Reproduction* 153(6):173–185. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0018>
- Peng W, Liu YJ, Wu N et al (2015) Areca catechu L. (Arecaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J Ethnopharmacol* 164:340–356. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.010>
- Ramaswamy S, Weinbauer GF (2015) Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4(2):e996025. <https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>
- Saha I, Chatterjee A, Mondal A et al (2011) Arecoline augments cellular proliferation in the prostate gland of male Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 255(2):160–168. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.010>
- Shih YT, Chen PS, Wu CH et al (2010) Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective system. *Free Radic Biol Med* 49(10):1471–1479. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.017>
- Volgin AD, Bashirzade A, Amstislavskaya TG et al (2019) DARK Classics in Chemical Neuroscience: Arecoline. *ACS Chem Neurosci* 10(5):2176–2185. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00711>
- Wang K, Gao Y, Wang C et al (2022) Is Parthanatos Involved in Varicocele?, *DNA Cell Biol* 41(10):861–870. <https://doi.org/10.1089/dna.2022.0289>

Received August 28, 2023
 Received November 07, 2023
 Accepted September 18, 2024