

双酚 A 对小鼠睾丸间质细胞毒性及 *miR-203-3p* 表达的影响

马林, 李丹, 李昀谦, 罗家权, 张玉敏, 裴秀丛, 段志文, 马明月

沈阳医学院公共卫生学院毒理学教研室, 沈阳 辽宁 110034

摘要:

[背景] 双酚 A (BPA) 作为一种重要的增塑剂原料被广泛应用, 其对机体健康产生的损伤作用越来越被人们所重视; 而生殖毒性是损伤作用中的重要一方面, 研究 BPA 所导致的生殖损伤及其机制已成时下热点。微小 RNA (miRNA) 的生物学作用及早期损伤标志的意义也被人们所重视。

[目的] 研究 BPA 对小鼠睾丸间质细胞毒性及 *miR-203-3p* 表达的影响。

[方法] 通过不同浓度的 BPA (0、1、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$) 处理小鼠睾丸间质细胞 (TM3) 24 h 后, 运用 CCK-8 法检测细胞活力情况, 采用流式细胞术检测细胞凋亡指标; 应用 real-time PCR 对 *miR-203-3p* 的表达水平进行检测。然后通过 TargetScan 数据库及 miRDB 数据库对 *miR-203-3p* 的靶基因进行预测, 并通过 DAVID 数据库对靶基因情况进行 GO 分析及 Pathway 分析。

[结果] 随着染毒浓度增加, 各组的 TM3 细胞活力出现不同程度的下降趋势, 但仅 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组与对照组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞总凋亡率 $[(31.33 \pm 7.12)\%]$ 升高 ($P < 0.05$); miRNA 的检测结果显示, 与对照组相比, *miR-203-3p* 在 1、100 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度组出现升高 (均 $P < 0.05$); 而当浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 该 miRNA 表达水平出现了下降 ($P < 0.05$)。通过两个数据库生物信息学预测的其可能调控靶基因为 278 个; 通过 David 数据库进行 GO 分析的富集结果显示, 排在第一位的生物过程、分子功能和细胞组分分别是转录 DNA 模板、蛋白结合和核; Pathway 分析富集的信号通路排在首位的是 FoxO 信号通路。

[结论] 不同浓度的 BPA 可以导致小鼠睾丸间质细胞出现不同程度的损伤现象, 这种损伤现象可能与 *miR-203-3p* 的改变有关, 且该 miRNA 可能成为重要的早期损伤检测指标。

关键词: 双酚 A; 小鼠睾丸间质细胞; 细胞损伤; 微小 RNA; 生物信息学

Effects of bisphenol A on mouse Leydig cells and *miR-203-3p* expression MA Lin, LI Dan, LI Yun-qian, LUO Jia-quan, ZHANG Yu-min, PEI Xiu-cong, DUAN Zhi-wen, MA Ming-yue (Department of Toxicology, School of Public Health, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110034, China)

Abstract:

[Background] Bisphenol A (BPA) is widely used as an important plasticizer raw material, and its adverse health effects have raised concerns. BPA induced reproductive toxicity and related mechanism of action are research hotspots. The biological effects of microRNAs (miRNA) and their significance as potential early damage markers have attracted much attention.

[Objective] This study is conducted to investigate the cytotoxicity of BPA on mouse Leydig cells and the expression of *miR-203-3p*.

[Methods] Mouse Leydig cells (TM3) were treated with BPA at different concentrations (0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, and detected for cell viability by CCK-8, apoptosis by flow cytometry, and the expression levels of *miR-203-3p* by real-time PCR. The target genes of *miR-203-3p* were predicted by TargetScan database and miRDB database, and the GO analysis and Pathway analysis of the target genes were conducted using DAVID database.

[Results] With higher exposure concentrations, the viability of TM3 cells in each group showed

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18660

基金项目

辽宁省自然科学基金项目 (2015020397); 沈阳医学院硕士研究生科技创新基金 (20180511)

作者简介

马林 (1992—), 男, 硕士生;
E-mail: 515988008@qq.com

通信作者

马明月, E-mail: mymacmu@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-10-08

录用日期 2019-03-12

文章编号 2095-9982(2019)05-0484-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

马林, 李丹, 李昀谦, 等. 双酚 A 对小鼠睾丸间质细胞毒性及 *miR-203-3p* 表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (5): 484-489.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18660

Funding

This study was funded.

Correspondence to

MA Ming-yue, E-mail: mymacmu@163.com

Competing interests None declared

Received 2018-10-08

Accepted 2019-03-12

To cite

MA Lin, LI Dan, LI Yun-qian, et al. Effects of bisphenol A on mouse Leydig cells and *miR-203-3p* expression[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(5): 484-489.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18660

decreasing trends, but only the viability change in the 1000 $\mu\text{mol/L}$ group had a significant reduction compared with that in the control group ($P < 0.05$). The apoptosis rate in the 1000 $\mu\text{mol/L}$ group [(31.33 $\pm$ 7.12)%] was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The results of miRNA detection showed that compared with the control group, *miR-203-3p* expression increased at 1 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ BPA ($P < 0.05$), but decreased at 1000 $\mu\text{mol/L}$ BPA ($P < 0.05$). There were 278 possible regulatory target genes predicted by TargetScan database and miRDB database. According to the results of GO enrichment analysis using David database, transcriptional DNA template ranked first in biological process, protein binding ranked first in molecular function, and nucleus ranked first in cell components. According to the results of Pathway analysis, FoxO was the most abundant pathway.

[Conclusion] Different concentrations of BPA could cause varied degrees of damage to mouse Leydig cells, which may be related to the changes of *miR-203-3p* expression. Moreover, this miRNA may be an important early damage marker.

Keywords: bisphenol A; mouse Leydig cells; cellular damage; microRNA; bioinformatics

双酚 A (bisphenol A, BPA) 属于酚类环境雌激素, 是一类重要的环境内分泌干扰物, 被广泛应用于各种塑料制品、医疗器械及食物包装的内表面。作为世界上产量最高的化学品之一, BPA 每年的产量约为 390 万 t^[1]。近年来, 由于人们逐渐增加聚碳酸酯塑料的应用, 导致 BPA 的接触频率逐渐增加, 并且由于其化学结构与雌激素类似, 因此其对生殖系统的损害作用更加受到人们的重视。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为表观遗传学机制中非编码 RNA (non-coding RNA) 的一种, 其长度约为 22 个核苷酸, 能通过与靶基因不完全互补配对的方式调控靶基因的表达^[2]。目前, 有研究表明 miRNA 在雄性生殖系统的调节中起着重要作用, 可能参与到精子发生及激素生成的各个阶段^[3]。本课题组在前期体内研究中发现 BPA 暴露能够导致 *miR-203-3p* 的表达水平发生改变, *miR-203-3p* 是 Lagos-Quintana 等^[4] 在 2003 年小鼠和人类中首次发现并命名的, 之后 Ahn 等^[5] 通过二代测序仪筛选发现 *miR-203-3p* 优先在性腺中表达, 并且可能在卵巢发育、卵泡形成及雌性生殖中扮演重要角色。2018 年 3 月, Zierau 等^[6] 通过基因芯片的方式筛选出作用于雌激素受体对雌二醇表达有重要意义的 miRNA, 发现 *miR-203-3p* 是其中重要的一种; 后续通过建立基因敲除模型及进行 *miR-203-3p* 转染后发现, *miR-203-3p* 在对雌二醇基因的表达及某些生理过程包括细胞的增殖和迁移以及子宫的发育和子宫内膜癌的形成中都有着重要的作用。而小鼠睾丸间质 (mice Leydig, TM3) 细胞是睾丸三类重要生殖细胞之一, 其主要功能包括合成和分泌雄激素^[7]。本研究通过 BPA 对 TM3 细胞的细胞活力及凋亡的影响并检测 *miR-203-3p* 的表达情况及其可能产生的作用机制进行探讨, 为阐明 BPA 对雄性生殖系统的损伤机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠 TM3 细胞购自中国科学院细胞库。

1.1.2 仪器和试剂 CO₂ 培养箱 (INFORS, 瑞士), 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造公司, 中国), 倒置显微镜 (北京新惠泽奥科技有限公司, 中国), Nano Drop 核酸分析仪、台式离心机 (Thermo, 美国), 酶标仪 (Molecular Device, 美国), 智能触控细胞分析仪 (Muse, 德国), Vi-cell 细胞活力计数仪 (Beckman, 美国), 7500 FAST PCR (ABI, 美国), BPA (东京化成株式会社, 质量分数 >99%, 日本), CCK-8 细胞活力检测试剂盒 (同仁, 日本), Annexin V-FITC 凋亡试剂盒 (南京建成, 中国), Trizol (生工生物, 中国), miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA kit、miRcute Plus miRNA qPCR kit (天根, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 TM3 细胞培养及处理 TM3 细胞培养于 10% 胎牛血清、1% 双抗 (100 U/mL 青霉素-100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素) 的 DMEM-F12 培养基中, 于 37°C、5%CO₂ (体积分数) 的培养箱中培养, 待细胞铺满瓶底 80% 左右进行传代, 传至 3 代后分别用不同浓度的 BPA (0、1、10、100、1000 $\mu\text{mol/L}$) 处理 TM3 细胞 24 h^[5], 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 用含 0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 为溶剂对照。

1.2.2 TM3 细胞活力检测 用 Vi-cell 进行细胞计数, 将细胞密度稀释为 2×10^4 个/mL, 以 100 μL /孔种于 96 孔板中。正常培养液培养 24 h 后吸去培养液, 换成无血清培养基进行同步化处理 12 h, 加入含不同浓度 BPA (0、1、10、100、1000 $\mu\text{mol/L}$) 的血清培养液孵育 24 h^[8], 每个剂量设 3 个复孔, 以 CCK-8 法检测细胞活力。每孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂溶液, 混匀后在 37°C、5%CO₂ 培养箱内继续培养 1.5 h, 之后于酶标仪 450 nm 波长处测光密度 *D* 值, 计算细胞的存活率。细胞的存活

率 = $(D_{\text{实验组}} / D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 TM3 细胞凋亡检测 用 Vi-cell 进行细胞计数, 将细胞密度稀释为 2×10^5 个/mL, 以 1 mL/孔种于 12 孔板后, 处理方式同上。显微镜下观察受试物处理后的 TM3 细胞形态, 细胞凋亡按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒说明书进行操作并进行 3 次重复实验。

1.2.4 miRNA 表达检测 应用 Trizol 法对处理后的细胞进行总 RNA 的提取后, 应用核酸浓度检测仪进行 RNA 质量检测, 用 miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit 进行反转录成 cDNA。应用 miRcute Plus miRNA qPCR kit 于 7500 FAST PCR 进行 real-time PCR, 检测 *miR-203-3p* 表达水平。引物由生工生物进行合成提供, *U6* 为内参基因, 引物序列为 5'-CATGGCCCTGCGCAAGGATGACA-3'; *miR-203-3p* 的引物序列为 5'-ACGCGCGGTGAATGTTTAGGACCACTAG-3'。

1.2.5 miRNA 的靶基因预测 通过 miRDB 及 TargetScan 两个数据库对 *miR-203-3p* 的靶基因进行预测, 并通过韦恩图 (Draw Venn) 网站对两个数据库预测结果进行交集的选取, 为后续生物信息学预测提供靶基因情况。

1.2.6 基因本体 (Gene Ontology, GO) 及信号通路 (Pathway) 分析 通过 DAVID 数据库对 *miR-203-3p* 的靶基因进行 GO 及 Pathway 的分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 服从正态分布且满足方差齐性时采用单因素方差分析和 LSD 法进行统计学处理, 不符合则采用非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BPA 对 TM3 细胞活力的影响

与对照组相比, 各染毒浓度组虽出现细胞存活率不同程度的下降趋势, 但仅在 1000 $\mu\text{mol/L}$ 组的降低具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 1A)。

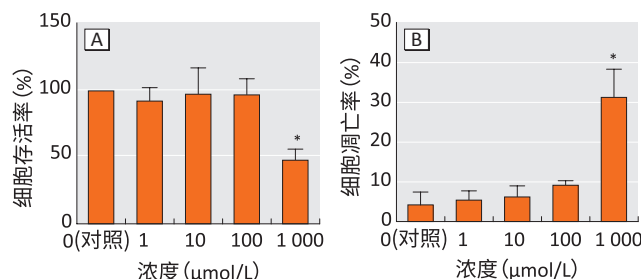
2.2 BPA 对 TM3 细胞凋亡的影响

在细胞总凋亡率的水平上, 与对照组相比, 各染毒浓度组总凋亡率出现了随染毒浓度增高而增高的趋势, 但只有浓度为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时总凋亡率的增高具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 1B)。

2.3 BPA 对 *miR-203-3p* 表达的影响

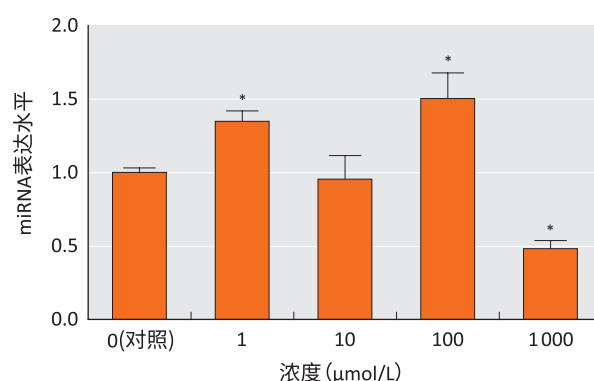
与对照组相比, *miR-203-3p* 的表达水平在 1、100 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度组中出现了表达水平增高的现象 ($P<0.05$); 而当浓度为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时 *miR-203-3p*

的表达水平出现了下降 ($P<0.05$) (图 2)。



[注]: 与对照组相比, $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度 BPA 对 TM3 细胞染毒 24 h 后细胞存活率和总凋亡率



[注]: 与对照组相比, $P<0.05$ 。

图 2 不同浓度 BPA 染毒 24 h 后 TM3 细胞 *miR-203-3p* 的表达水平

2.4 *miR-203-3p* 的靶基因预测结果情况

取 miRDB 及 TargetScan 两个权威 miRNA 预测数据库进行 *miR-203-3p* 靶基因情况预测, 其预测的结果分别是 566 个靶基因和 841 个靶基因, 其后通过 Draw Venn 进行两数据库结果取相同部分, 其结果为 278 个靶基因 (表 1)。

2.5 *miR-203-3p* 的靶基因 GO 分析结果

通过 David 数据库中的 GO 数据库对 *miR-203-3p* 的靶基因进行功能富集分析, 并依据 P 值的大小选取最有价值的前十位结果; 富集结果显示, 排在第一位的生物过程 (BP)、分子功能、细胞组分分别是转录 DNA 模板、蛋白质结合和核 (图 3)。

2.6 *miR-203-3p* 的靶基因 Pathway 分析结果

通过 David 数据库中的 KEGG 数据库对 *miR-203-3p* 的靶基因所在信号通路进行分析, 预测出 BPA 引起 TM3 出现细胞损伤的可能信号通路情况; 根据 P 值大小进行排列, 选取其中前十位通路, 排在前三位的信号通路为 FoxO 信号通路、GABA 突触和 GnRH 信号通路 (图 4)。

表 1 miRDB 与 TargetScan 数据库相同部分的靶基因名称

miRNA	靶基因 (n=278)
miR-203-3p	B3GNT5、GSKIP、LPP、RNF38、HERPUD2、SEC24D、NUFIP2、MBNL2、RAP1A、CLUH、TFDP2、CHD9、TIAL1、RAPH1、SOCS6、PRKC1、PRPF19、SEMA3A、YWHAQ、MAP3K13、HNRNPR、SKP2、CDH10、GPR180、OSBP18、HOOK3、TBK1、4933426M11RIK、KRT1、A1CF、CTDSPL2、RERG、SYT2、YTHDF3、MAFK、IL24、ATP1B4、PXDN、NKRF、TOX3、PRPS2、CAMK2D、VSNL1、TCF12、NFIL3、DCUN1D3、CCRN4L、KIF2A、SLC7A14、ZFP608、KCNQ5、MED14、ZFP654、TCF4、MAPK9、ZFP292、SLC12A2、PTGFR、AHR、PHOX2B、FAM126B、FAM171A1、ACO2、VAPA、HNRNPUL2、ACVR2A、ADAM1B、SCN1A、CAR5B、ZFP704、PDAP1、ARHGAP42、EYA1、SIM1、AKIRIN1、SLC4A5、CTSS、MORF4L2、PXN、RAPGEF1、AFF4、TMEM248、PLEKHG3、NAA50、GDAP1、ARHGEF3、GABRB2、SLC39A9、TSHZ1、SLC38A2、EBF3、DGKB、ZFP148、TNKS、GABARAPL1、DPY19L3、GRHL3、PDE4D、PHF12、UBE2D2A、SLC24A2、CREBZF、PPM1E、ITPR2、PRKAG2、KAT6A、ELMOD2、TADA1、MAP3K1、ARID2、LIX1、DIS3、SP4、LASP1、PLAA、EGR3、KCTD9、ZNRB2、MAN1A2、A930018P22RIK、IGFBP5、PSME4、ADAMTS6、SEMA6A、FOXK1、GAPT、BBX、ICK、CUL1、GLCCI1、COP57B、B3GALT2、UBR1、PRKAA2、IVNS1ABP、VEZF1、ARHGAP32、FOXP2、EIF4E、LATS2、GPATCH1、PLD2、FAM184B、TLN2、AFAP1L2、WDFY3、DPM1、POSTN、API5、TNRC6A、PRKG1、EPC2、SLC17A6、MBD6、CAPRIN1、NLK、COL4A4、GUCY1A2、THSD7A、RPGRIPI1、KLHL15、NBEA、CYBSB、ADAMTS15、TNPO1、S1PR1、MBNL1、ATP5G3、SMAD1、HOMER1、LRRTM2、NAP1L5、ZNRF3、CLSTN3、CCNG1、DDX6、ATF2、D10BWG1379E、GLTSCR1L、ATP5J、GIF、ACSL1、PTPRG、EBF2、SP2、PLAGL2、ADK、DNAJC21、LRRCC1、DCP2、ZFP644、PPAP2B、KCMF1、FBXL17、TARDBP、FGFR1OP、HADHB、DR1、CAB39、STXBPA、LNX2、SRC、ZBED4、SELT、MBNL3、NAA30、PHEX、SLITRK2、MBLAC2、COL17A1、FAM84A、GABRB3、MPDZ、ATF6、ZMYM4、GPR85、VCAN、SLC39A8、GLS、CREBRF、GLRB、UNC80、C530008M17RIK、CRK、FAM168A、IMPA1、FAT1、MGAT3、ZMIZ1、TET1、NOVA1、DPY19L4、DLG5、KRT35、PTP4A1、PCBP2、ABLIM3、SEMA5A、ZMPSTE24、CSN2、MKX、RAB10、ELL2、DNM1L、SPARC、SERPINB9C、UPF2、CNIH3、STX16、KHDRBS1、MORF4L1、D6WSU163E、RFX7、TPR、CSRNP2、MEX3C、TRPS1、EOGT、RGS7BP、SNAI2、HNRNPL、CCDC178、SESTD1、BMP5、SLC4A4、CASK、TADA2B、APPL1、VAV3、SIK1、FUNDCl、ATG14、ARL8B、PPM1D、KAT6B、A1837181、ACTR2、MEF2C

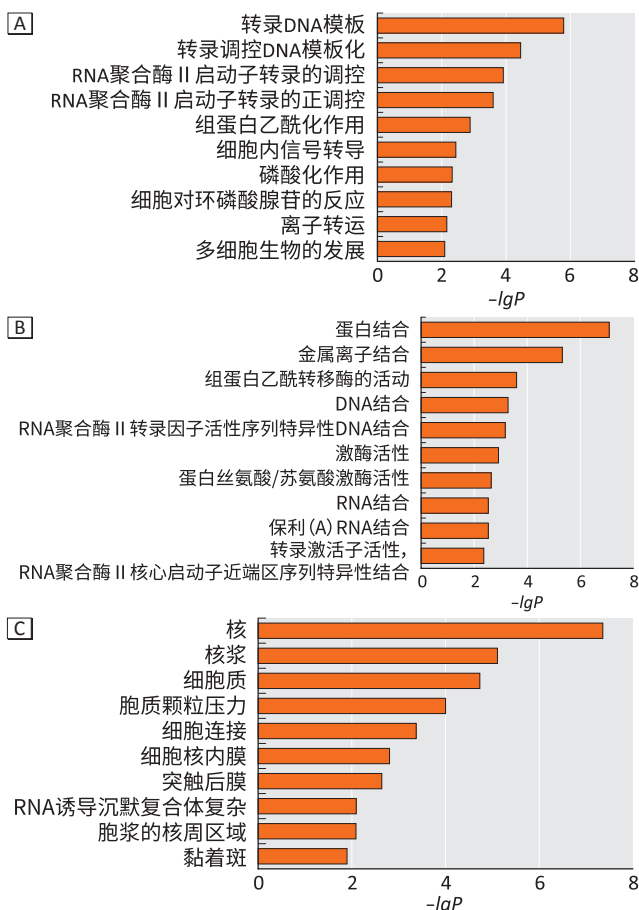


图 3 靶基因 GO 分析中前十位生物过程 (A)、分子功能 (B)、细胞组分 (C) 序列 (根据 P 值大小选取)

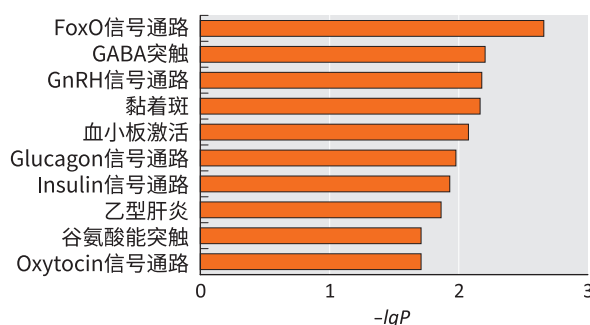


图 4 靶基因 Pathway 分析前十位序列 (根据 P 值大小选取)

3 讨论

BPA 作为环境雌激素的一种, 其化学结构特性使其具有干扰体内激素分泌合成从而可造成生殖系统的损伤^[9]。目前研究较多的损伤机制包括下丘脑-垂体-性腺轴途径、雌激素受体途径等^[10-12], 但其具体毒作用机制仍不明确。目前研究人员更关注于如何早期发现损伤从而降低对机体造成的危害。随着表观遗传学的发展, 人们逐渐认识到机体损伤可能并不仅发生在基因水平, 许多损伤在 DNA 没有发生改变的前提下基因的表达却发生了改变, 并且这种非 DNA 改变能够稳定地遗传给下一代^[13]。其作用形式主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰及非编码 RNA^[14]。

本次研究选取的 miRNA 是表观遗传机制非编码 RNA 中的一种, 主要通过不完全互补配对的方式来影响基因表达^[2], 因此其改变往往发生在损伤出现的早期阶段。正因如此, 其改变从某种意义上来说可以作为早期损伤的判断标志。本研究选取的 *miR-203-3p* 是本课题组前期通过 BPA 暴露的体内实验芯片结果中选取并进行验证的, 因此本研究以该 miRNA 为目标基因进行验证。从本次结果来看, 尽管 BPA 对 TM3 细胞活力及细胞凋亡仅在 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度上出现了具有统计学差异的改变 ($P < 0.05$), 但其余浓度组的损伤情况均出现随着染毒浓度的增高损伤逐渐严重的趋势。这一结果也同其他课题组的研究结果相类似^[5, 15-16], 表明 BPA 可以产生一定程度的细胞毒性作用, 但仅当浓度达到一定程度后该种损伤才出现明显的改变。因此, 在下一步的研究中, 我们将通过检测 miRNA 水平来观察不同损伤程度的 TM3 细胞所导致 *miR-203-3p* 的表达情况。

本研究结果显示, 与对照组比较, 各染毒组的 *miR-203-3p* 均出现不同程度的改变, 当浓度为 1、100 $\mu\text{mol/L}$ 时出现表达水平增高的现象 ($P < 0.05$), 且与出现凋亡的趋势相同, 虽然存在一定的趋势性, 但

在低浓度时细胞活力及凋亡情况并未发生明显改变,这种现象主要与 miRNA 的调控机制相关。如之前阐述,miRNA 能通过与靶基因的不完全互补配对方式调控靶基因的表达^[2];而 miRNA 调控靶基因进而影响相关蛋白的表达存在一定的作用时间,因此低浓度时 miRNA 会呈现早于明显损伤出现的现象。因此,其作为早期损伤标志的意义才更加明显。但当浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,其表达却出现了下降且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这一有趣的现象在国内外也曾有报道,有研究显示,BPA 所产生的毒作用效果并不一定遵从传统的剂量-反应关系,而会出现一种非单调性剂量-反应关系的现象^[17-19]。本研究的结果中也显示低浓度与高浓度在 miRNA 的表达上存在明显不同,这一结果可能由于 BPA 浓度较低时机体自身的保护机制发挥调控作用,而当浓度升高至一定程度后该机制被破坏而失效甚至导致机体损伤加重。李玉秋等^[20]在 BPA 对小鼠胚胎干细胞的研究中发现,当浓度达到 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, RNA 可能被破坏而检测不到相关基因,这也可能是这种现象产生的原因之一,但其所调控的机制尚不清楚。因此我们通过生物信息学的方法对 *miR-203-3p* 所发挥作用的靶基因进行预测,并通过基因本体分析 (GO) 和信号通路分析 (Pathway) 为下一步的具体调控机制的研究提供理论依据。

从本研究 Pathway 分析的结果来看,根据 P 值大小排在前三位的信号通路分别是 FoxO 信号通路, GABA 信号通路和 GnRH 信号通路。本次研究最关注的为 FoxO 信号通路。目前有研究已经证实, *miR-203-3p* 参与 FoxO 信号通路的调控^[21],这一结果同本研究的预测结果相同。Kim 等^[22]发现 FoxO1 可以通过调节 Aven 表达来阻止细胞凋亡。Aven 是一种广泛表达于各种哺乳动物体内的抗凋亡基因,可与 BCL-XL 和 APAF-1 结合,灭活 Caspase-9,防止细胞凋亡^[23]。FoxOs 还可以调节细胞周期阻滞、氧化应激反应、细胞分化,其在生殖系统构建中是不可或缺的^[24]。因此本研究通过 BPA 染毒的 TM3 细胞模型了解 *miR-203-3p* 在染毒后的改变情况,为下一步的机制验证提供研究依据。未来可进一步通过 *miR-203-3p* 过表达组和/或抑制剂组的设置加强其相关性的验证,了解其是否能够导致损伤的逆转或损伤程度的减轻,为其作为生物标志的意义提供基础数据。

综上所述,不同浓度的 BPA 可以导致小鼠睾丸间质细胞出现不同程度损伤现象,这种损伤现象可能与

miR-203-3p 的改变有关,且该 miRNA 可能成为出现早期损伤的重要检测指标,但其具体的调控机制仍然需要进一步的验证。

参考文献

- [1] VANDENBERG LN, CHAHOUD I, HEINDEL JJ, et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118 (8): 1055-1070.
- [2] AMBROS V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431 (7006): 350-355.
- [3] HAYASHI K, CHUVA DE SOUSA LOPES SM, KANEDA M, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis [J]. PLoS One, 2008, 3 (3): e1738.
- [4] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, MEYER J, et al. New microRNAs from mouse and human [J]. RNA, 2003, 9 (2): 175-179.
- [5] AHN HW, MORIN RD, ZHAO H, et al. MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing [J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16 (7): 463-471.
- [6] ZIERAU O, HELLE J, SCHADYEW S, et al. Role of miR-203 in estrogen receptor-mediated signaling in the rat uterus and endometrial carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (7): 5359-5372.
- [7] 喻道军, 段志文, 宋曼铜, 等. 邻苯二甲酸酯和双酚 A 联合暴露对大鼠睾丸间质细胞活性的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2015, 32 (3): 211-213.
- [8] 马林, 罗家权, 李丹, 等. 实时无标记细胞分析系统与台盼蓝染色法分析双酚 A 对小鼠睾丸间质细胞毒性作用的比较 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21 (9): 978-980.
- [9] 李玉华, 周小羽, 段斐, 等. 环境剂量的双酚 A 暴露对雄性小鼠生殖功能的影响 [J]. 生殖与避孕, 2015, 35 (2): 80-85.
- [10] XI W, LEE CK, YEUNG WS, et al. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice [J]. Reprod Toxicol, 2011, 31 (4): 409-417.
- [11] LIU X, MIAO M, ZHOU Z, et al. Exposure to bisphenol-A and reproductive hormones among male adults [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 39 (2): 934-941.
- [12] ZHANG Q, WU S, LIU L, et al. Effects of bisphenol A on gap junctions in HaCaT cells as mediated by the estrogen receptor pathway [J]. J Appl Toxicol, 2019, 39 (2): 271-281.

- [13] BIRD A. Perceptions of epigenetics [J]. *Nature*, 2007, 447 (7143): 396-398.
- [14] 王心如. 毒理学基础 [M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 206-212.
- [15] IIDA H, MAEHARA K, DOIGUCHI M, et al. Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells [J]. *Reprod Toxicol*, 2003, 17 (4): 457-464.
- [16] 邓茂先, 吴德生, 陈祥贵, 等. 双酚A雄性生殖毒性的体内实验研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 2004, 38 (6): 383-387.
- [17] SANTANGELI S, MARADONNA F, GIOACCHINI G, et al. BPA-induced deregulation of epigenetic patterns: effects on female zebrafish reproduction [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21982.
- [18] VANDENBERG LN, COLBORN T, HAYES TB, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses [J]. *Endocr Rev*, 2012, 33 (3): 378-455.
- [19] LAGARDE F, BEAUSOLEIL C, BELCHER SM, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment [J]. *Environ Health*, 2015, 14: 13.
- [20] 李玉秋, 马林, 王天昱, 等. 邻苯二甲酸单乙基己基酯对小鼠胚胎干细胞多能性相关转录因子表达的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2018, 35 (3): 228-233.
- [21] LEE BP, BURIĆ I, GEORGE-PANDETH A, et al. MicroRNAs *miR-203-3p*, *miR-664-3p* and *miR-708-5p* are associated with median strain lifespan in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44620.
- [22] KIM M, ALLEN B, KORHONEN EA, et al. Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126 (9): 3511-3525.
- [23] SHEVACH EM. Biological functions of regulatory T cells [J]. *Adv Immunol*, 2011, 112: 137-176.
- [24] CHRISTIAN M, LAM EW, WILSON MS, et al. FOXO transcription factors and their role in disorders of the female reproductive tract [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12 (9): 1291-1302.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)

(上接第 483 页)

- 32 (1): 109-133.
- [15] The World Bank. Understanding and measuring social capital: a synthesis of findings and recommendations from the social capital initiative [EB/OL]. [2018-12-17]. <http://siteresources.worldbank.org/INTSOCIALCAPITAL/Resources/Social-Capital-Initiative-Working-Paper-Series/SCI-WPS-24.pdf>.
- [16] PENNING S JM, LEE K. Social capital of organization: Conceptualization, level of analysis, and performance implications [M] //LEENDERS R T A J, GABBAY S M. *Corporate Social Capital and Liability*. Boston, MA: Springer, 1999: 43-67.
- [17] WELSH JA, BERRY HL. Social capital and mental health and well-being [C] //The Biennial HILDA Survey Research Conference. Melbourne: Melbourne University, 2009.
- [18] 黄源协, 刘素珍, 庄俐昕, 等. 社区社会资本与社区发展关联性之研究 [J]. *公共行政学报*, 2010 (34): 29-75.
- [19] FANG J, WANG JW, LI J, et al. The correlates of social capital and adherence to healthy lifestyle in patients with coronary heart disease [J]. *Patient Prefer Adherence*, 2017, 11: 1701-1707.
- [20] 李英华, 毛群安, 石琦, 等. 2012年中国居民健康素养监测结果 [J]. *中国健康教育*, 2015, 31 (2): 99-103.
- [21] 覃世龙, 徐静东, 李玲. 湖北省居民慢性病健康素养现状及影响因素分析 [J]. *中国慢性疾病与控制*, 2015, 23 (5): 381-383.
- [22] 徐倩倩, 朱莹莹, 冯宏伟, 等. 宁波市居民健康素养水平及影响因素分析 [J]. *预防医学*, 2018, 30 (2): 113-116, 120.
- [23] 张娜, 邵永强, 张沛琦, 等. 温州市区成年居民超重和肥胖流行现状调查 [J]. *浙江预防医学*, 2015, 27 (9): 893-896.
- [24] 李莉, 李英华, 聂雪琼, 等. 2012年中国居民健康素养影响因素分析 [J]. *中国健康教育*, 2015, 31 (2): 104-107.
- [25] YANG HH, KUO SC, YANG HJ, et al. Social capital and health literacy in Taiwan [J]. *Health*, 2013, 5 (5): 898-902.
- [26] LEE SY, AROZULLAH AM, CHO YI. Health literacy, social support, and health: a research agenda [J]. *Soc Sci Med*, 2004, 58 (7): 1309-1321.
- [27] 雷望安, 何静, 姚荷英. 社会支持与急诊护士离职意愿的相关性研究 [J]. *中国护理管理*, 2013, 13 (7): 45-48.
- [28] WAVERIJN G, HEIJMANS M, SPREEUWENBERG P, et al. Associations between neighborhood social capital, health literacy, and self-rated health among people with chronic illness [J]. *J Health Commun*, 2016, 21 (sup2): 36-44.
- [29] KIM YC, LIM JY, PARK K. Effects of health literacy and social capital on health information behavior [J]. *J Health Commun*, 2015, 20 (9): 1084-1094.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 童玲)