

哺乳期双酚A暴露致小鼠睾丸生精细胞减数分裂阻滞的机制研究

黄晓迪^a, 凌远超^a, 赵程^a, 陈建美^a, 张金枝^a, 刘雅楠^a, 解美娜^{a, b}

潍坊医学院 a. 生命科学与技术学院 b. 医学研究实验中心, 山东 潍坊 261053

摘要:

[背景] 双酚A (BPA) 作为环境内分泌干扰物的一种, 能够干扰生精细胞减数分裂进程, 进而影响睾丸发育和精子发生, 但其影响生精细胞减数分裂的机制仍不清楚。

[目的] 探讨哺乳期小鼠 BPA 暴露对睾丸内调控生精细胞减数分裂和细胞周期相关因子表达的影响。

[方法] 新生 ICR 雄性仔鼠随机分为 3 组: 对照组 (玉米油)、BPA 低剂量组 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、BPA 高剂量组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。仔鼠于出生后第 1 天 (PND1) 开始每天颈背部皮下注射药物持续到 PND21 断奶。PND22 颈椎脱臼处死小鼠后记录小鼠体重, 剥取睾丸并称重。流式细胞术 DNA 倍体分析法检测哺乳期 BPA 暴露对睾丸生精细胞 DNA 含量的影响。Western blotting 检测睾丸中细胞周期相关蛋白 Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2、CDK1 表达量的变化情况, RT-PCR 检测睾丸中细胞周期相关基因 *Cdc25A*、*Cdc25C*、*Wee1*、*CDK1* mRNA 水平的变化。

[结果] BPA 低、高剂量组小鼠体重、睾丸重量及睾丸系数与对照组的差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。流式细胞术分析结果显示: 低、高剂量组二倍体细胞所占比例分别为 $(25.05 \pm 1.62) \%$ 、 $(25.25 \pm 6.67) \%$, 较对照组 $[(49.33 \pm 6.91) \%]$ 减少 (均 $P < 0.01$); 低、高剂量组四倍体细胞所占比例分别为 $(45.89 \pm 1.95) \%$ 、 $(51.11 \pm 8.89) \%$, 较对照组 $[(24.72 \pm 6.44) \%]$ 增多 (均 $P < 0.01$); 低、高剂量组间单倍体细胞和 S 期细胞所占比例与对照组相比, 差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。Western blotting 结果显示: 与对照组相比, BPA 高、低剂量染毒组睾丸组织 Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2 蛋白表达水平均降低 (均 $P < 0.05$); CDK1 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。RT-PCR 结果显示: 与对照组相比, BPA 染毒组睾丸组织 *Cdc25A*、*Cdc25C*、*Wee1*、*CDK1* 的 mRNA 表达水平差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

[结论] 哺乳期 BPA 暴露能够改变小鼠睾丸内生精细胞的周期分布。BPA 可能通过下调细胞周期调控因子 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 的翻译水平使初级精母细胞减数分裂发生阻滞, 从而干扰了生精细胞分化进程。

关键词: 双酚A; 减数分裂; Cdc25; Wee1; p-Tyr15 Cdc2

Mechanism of meiotic arrest of spermatogenic cells in testis of mice exposed to bisphenol A during lactation HUANG Xiaodi^a, LING Yuanchao^a, ZHAO Cheng^a, CHEN Jianmei^a, ZHANG Jinzhi^a, LIU Yanan^a, XIE Meina^{a, b} (a.School of Biological Science and Technology b.Medical Research Experiment Center, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract:

[Background] Bisphenol A (BPA), one of the endocrine disrupting chemicals, can interfere with the meiosis of spermatogenic cells and affect testicular development and spermatogenesis. However, the mechanism of this effect is still unclear.

[Objective] This experiment examines the effects of exposure to BPA on the regulation of spermatogenic cell meiosis and cell cycle-related factor expression in the testis of lactating mice.

[Methods] Newborn ICR male offspring mice were randomly divided into three groups, with 10 mice in each group: a control group (corn oil), a low-dose BPA group ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a high-dose BPA group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The newborn mice were injected subcutaneously with BPA or corn oil daily from postnatal day 1 (PND1) to PND21. They were euthanized by cervical dislocation on PND22. The body weight was recorded and the testes were removed and weighed. Flow cytometry DNA ploidy analysis was used to detect the effects of lactational exposure to BPA on the DNA content of testicular spermatogenic cells. Western blotting was used to measure the

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21001

基金项目

国家自然科学基金项目 (81701512); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2017MH012); 山东省高等学校科技计划项目 (J17KA263)

作者简介

黄晓迪 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: hxd1822@163.com

通信作者

解美娜, E-mail: xiemeina@wfmec.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-01-04

录用日期 2021-05-13

文章编号 2095-9982(2021)07-0769-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

黄晓迪, 凌远超, 赵程, 等. 哺乳期双酚A暴露致小鼠睾丸生精细胞减数分裂阻滞的机制研究[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(7): 769-774.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21001

Funding

This study was funded.

Correspondence to

XIE Meina, E-mail: xiemeina@wfmec.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-01-04

Accepted 2021-05-13

►To cite

HUANG Xiaodi, LING Yuanchao, ZHAO Cheng, et al. Mechanism of meiotic arrest of spermatogenic cells in testis of mice exposed to bisphenol A during lactation[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 769-774.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21001

expressions of cell cycle-related proteins (Cdc25A, Cdc25C, Wee1, p-Tyr15 Cdc2, and CDK1) in testis. RT-PCR was used to determine the expressions of cell cycle-related genes (*Cdc25A*, *Cdc25C*, *Wee1*, and *CDK1* mRNA) in testis.

[Results] Compared with the control group, there were no significant differences in body weight, testis weight, and testis coefficient of the low-dose and high-dose BPA groups (all $P > 0.05$). The flow cytometry results showed that the proportions of diploid cells in the low- and high-dose groups were $(25.05 \pm 1.62)\%$ and $(25.25 \pm 6.67)\%$, respectively, which were less than that in the control group $[(49.33 \pm 6.91)\%]$ (both $P < 0.01$). The proportions of tetraploid cells in the low- and high-dose groups were $(45.89 \pm 1.95)\%$ and $(51.11 \pm 8.89)\%$, respectively, which were more than that in the control group $[(24.72 \pm 6.44)\%]$ ($P < 0.01$). The proportions of haploid cells and S phase cells in the low- and high-dose groups were not different from the proportions of the control group ($P > 0.05$). The Western blotting results showed that compared with the control group, the protein expression levels of Cdc25A, Cdc25C, Wee1, and p-Tyr15 Cdc2 in testicular tissues of the two BPA groups decreased ($P < 0.05$), but the expression of CDK1 protein had no significant change ($P > 0.05$). The RT-PCR results showed that compared with the control group, there were no significant differences in the expression levels of *Cdc25A*, *Cdc25C*, *Wee1*, and *CDK1* mRNA in testicular tissues of the BPA exposed mice (all $P > 0.05$).

[Conclusion] Exposure to BPA during lactation can change the cycle proportion of spermatogenic cells in the testis of mice. BPA could arrest the meiosis of primary spermatocytes by down-regulating the translation levels of cell cycle regulators Cdc25A, Cdc25C, and Wee1, thereby interfering with the differentiation process of spermatogenic cells.

Keywords: bisphenol A; meiosis; Cdc25; Wee1; p-Tyr15 Cdc2

双酚 A (bisphenol A, BPA) 又称双酚基丙烷, 其化学结构与雌激素类似, 属于环境内分泌干扰物的一种。BPA 是世界上使用最多的工业化学品之一, 被广泛用于制造餐具、塑料容器、水管、医疗器具、电子设备、玩具等消费品。BPA 进入机体后能够模拟内源性激素的作用, 干扰内分泌系统, 造成精子数量下降, 精子畸形率升高, 性功能减退以及不育率增加等各种不良影响^[1-2]。由于 BPA 暴露途径众多, 在食物、水、空气、尘埃颗粒、土壤、人体尿液和母乳中均可检测到 BPA^[3-6], 因此 BPA 对雄性生殖系统健康的影响已不容忽视。

哺乳期是睾丸发育的关键时期, 在这一过程中, 睾丸原始生精细胞在曲细精管管腔中通过有丝分裂和减数分裂经精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞最终分化为圆形精子细胞^[7]。由于哺乳期生殖系统处于发育阶段, 且尚未形成血睾屏障, 对激素样活性物质尤其敏感^[8], 因此研究哺乳期 BPA 暴露对生殖系统的影响和相关机制具有极为重要的意义。

细胞周期是生命活动中最重要的过程, 在精子发生过程中, 有丝分裂与减数分裂的准确发生都依赖有序的细胞周期调控。尽管国内外已经有大量研究证实了 BPA 的生殖毒性, 但鲜有文献报道 BPA 对精子发生过程中减数分裂阻滞的机制研究。本研究拟建立哺乳期雄性小鼠体内 BPA 染毒模型, 在断乳后检测 BPA 对小鼠睾丸细胞分化的影响, 并通过检测睾丸中细胞周期相关蛋白 Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2、CDK1 表达量的变化, 以及细胞周期相关基因 *Cdc25A*、*Cdc25C*、*Wee1*、*CDK1* mRNA 水平的变化情况, 以了解 BPA 对相关周期调控因子转录和翻译的作用, 进一步探讨 BPA 影响睾丸细胞减数分裂周期进程的分子机制。

1 对象与方法

1.1 主要仪器与试剂

超低温冰箱 (SANYO, 日本), 高速冷冻离心机 (Heraeus, 德国), 流式细胞仪 (BD, 美国), 小型垂直电泳转印装置系统 (Bio-Rad, 美国), 化学发光凝胶成像系统 (Protein Simple, 美国), PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像分析系统 (UVP, 美国)。

双酚 A、玉米油 (Sigma-Aldrich, 美国), DNA 含量检测试剂盒 (BD, 美国), RIPA 裂解液 (强) (北京康为世纪, 中国), Na_3VO_4 、NaF (上海生工, 中国), 抗 Cdc25A 一抗、抗 Cdc25C 一抗、抗 Wee1 一抗、抗 p-Tyr15 Cdc2 一抗、抗 CDK1 一抗 (Santa Cruz, 美国), 抗 β -actin 一抗、山羊抗小鼠辣根过氧化物酶二抗 (北京中杉金桥, 中国), 化学发光试剂盒 (上海碧云天, 中国), Trizol 试剂 (上海生工, 中国), RNA 逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒 (北京康为世纪, 中国)。

1.2 实验动物分组与染毒

健康的 ICR 妊娠母鼠 12 只, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号 SCXK (鲁) 20190003。实验期间饲养环境温度控制在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度 40%~50%, 自由进食繁殖期饲料, 饮清洁水。在母鼠分娩后按照随机原则将新生小鼠分为 3 组, 对照组 (玉米油)、BPA 低剂量组 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于环境相关暴露剂量) 和 BPA 高剂量组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 未观察到动物明显不良反应的最低剂量), 每组 10 只。以玉米油为溶剂配制 BPA 溶液, 对照组给予玉米油。由于新生期小鼠口服给药困难, 且有研究发现, 与 BPA 结合的酶 (UDP-葡萄糖醛糖基转移酶) 在新生儿中的表达水平很低, 口服和非口服给药的药代动力学没有差异^[9]。

因此,本研究选择皮下注射途径染毒。从小鼠出生后第1天 (postnatal day 1, PND1) 起每日对雄性仔鼠颈背部皮下注射药物 ($4\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$) 直至PND21断奶,染毒周期20d。在PND22颈椎脱臼处死小鼠,称取体重,剥取睾丸组织并对睾丸组织进行称重,流式细胞仪检测睾丸生精细胞DNA含量。用于RT-PCR和Western blotting检测的睾丸样本冻存于 -150°C 超低温冰箱。本研究已获潍坊医学院医学伦理委员会审查通过[潍医伦研2017第(016)号]。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 睾丸组织系数的计算 计算睾丸组织系数,计算公式为:睾丸系数=睾丸重量(湿重)/体重 $\times 100\%$ 。

1.3.2 睾丸生精细胞DNA含量的测定 剥离睾丸白膜后加入胶原酶和DNAase消化, $300\times g$ 离心5min收集细胞,预冷的PBS清洗两次。将细胞以 1.0×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 密度重新悬浮至1mL缓冲溶液中。吸取500 μL 细胞悬液,每样品加入250 μL 胰蛋白酶缓冲液,轻拍混匀,室温反应10min后加入200 μL 胰蛋白酶抑制剂,室温反应10min,加入冷的碘化丙啶200 μL , 4°C 避光孵育10min后,流式细胞仪进行DNA倍体分析,ModFit LT 3.1软件分析睾丸细胞分群情况。

1.3.3 睾丸内细胞周期相关蛋白相对表达量的测定 取冻存睾丸加入裂解液(含100 $\times$ 蛋白磷酸酶抑制剂、100 $\times$ PMSF、100 $\times$ 蛋白酶抑制剂混合液),冰上裂解提取蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后将PVDF膜置于5%的脱脂奶粉($100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaF}$)中 4°C 封闭1h,加入一抗Cdc25A(1:500)、Cdc25C(1:500)、Wee1(1:1000)、p-Tyr15 Cdc2(1:300)、CDK1(1:1000)、内参蛋白 β -actin(1:1000) 4°C 孵育过夜。用TBST(含 $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaF}$)漂洗3次,二抗(1:5000)室温孵育1h, TBST(含 $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaF}$)洗膜,滴加ECL化学发光液,化学发光凝胶成像系统采集图像。采用Image J 1.8.0软件对结果进行分析。

1.3.4 睾丸内细胞周期相关基因mRNA相对表达量的测定 取冻存的小鼠睾丸组织,根据Trizol试剂盒说明提取总RNA,超微量紫外分光光度计测定提取的总RNA的纯度与浓度。按照HiFiScript cDNA合成试剂盒说明书将提取的总RNA反转录成cDNA,用ddH₂O代替逆转录酶作为阴性对照。RT-PCR扩增检测mRNA水平。利用Primer 5.0软件设计引物序列,见表1,委托Sangon Biotech(上海)有限公司合成。PCR扩增体系为:1 μL

cDNA, 12.5 μL 2 $\times$ Taq Mix, 10 μL ddH₂O, 正向、反向引物各0.75 μL 。Cdc25A、Cdc25C、Wee1、CDK1、 β -actin的退火温度分别为57、59、60、55、 56°C 。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统拍照并进行灰度值分析。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
Cdc25A	正向引物: ATAGTGGCCATGAAGAAGATCAG	153
	反向引物: CAGGAACCTCAAAGATGAGATACAGC	
Cdc25C	正向引物: GCAAACCTAAGCATTCTATCG	197
	反向引物: CAGGACCTTATGAAAGGTATCCC	
Wee1	正向引物: CTATTCATGGACACAGAAAAGTCAG	196
	反向引物: GAAGATGAAACAAGACCTGCC	
CDK1	正向引物: ATAGTGGCCATGAAGAAGATCAG	165
	反向引物: CAGGAACCTCAAAGATGAGATACAGC	
β -actin	正向引物: GGGACGACATGGAGAAGATCT	177
	反向引物: CCTGGATGGCTACGTACATG	

1.4 统计学分析

每组实验独立重复3次或以上,所有实验数据采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较时采用单因素方差分析,染毒组与对照组比较采用LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠体重和睾丸系数的比较

BPA给药过程中小鼠生存状态良好,饮食和活动情况无明显变化,均存活至实验结束。与对照组相比,BPA低、高剂量组小鼠体重、睾丸重量、睾丸系数差异均无统计学意义(均 $P>0.05$,表2)。

表2 BPA对小鼠体重、睾丸重量、睾丸系数的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of BPA on body weight, testicular weight, and testicular coefficient of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

剂量组/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	体重/g	左睾重/mg	右睾重/mg	睾丸系数/%
0	16.26 $\pm$ 2.73	39.70 $\pm$ 6.07	41.40 $\pm$ 6.15	0.50 $\pm$ 0.06
0.1	15.54 $\pm$ 1.37	41.50 $\pm$ 5.93	44.30 $\pm$ 5.58	0.55 $\pm$ 0.08
5.0	15.27 $\pm$ 1.94	41.70 $\pm$ 9.55	42.80 $\pm$ 8.77	0.55 $\pm$ 0.08
F	0.59	0.45	0.43	1.45
P	0.559	0.511	0.653	0.252

2.2 睾丸生精细胞DNA含量的变化

由表3可见,与对照组相比,BPA处理组睾丸内生精细胞百分比发生了明显变化,低、高剂量组二倍体细胞(精原细胞、次级精母细胞和支持细胞)占比明显减少,四倍体细胞(初级精母细胞、G2/M期的精

原细胞)占比明显增多,差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$)。而低、高剂量组中单倍体细胞和S期细胞占比与对照组相比,差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

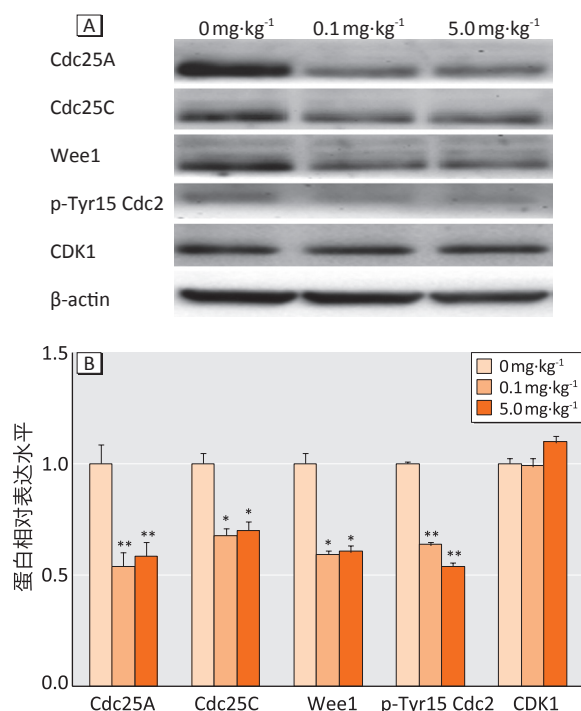
表3 BPA对小鼠睾丸生精细胞DNA含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)
Table 3 Effects of BPA on DNA content of spermatogenic cells in mice testis ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

剂量组 / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	单位 (Unit) : %			
	单倍体细胞	二倍体细胞	四倍体细胞	S期
0	11.14 $\pm$ 4.67	49.33 $\pm$ 6.91	24.72 $\pm$ 6.44	14.82 $\pm$ 5.53
0.1	14.14 $\pm$ 2.31	25.05 $\pm$ 1.62*	45.89 $\pm$ 1.95*	14.93 $\pm$ 2.27
5.0	10.29 $\pm$ 2.61	25.25 $\pm$ 6.67*	51.11 $\pm$ 8.89*	13.35 $\pm$ 4.90
F	1.20	18.15	14.30	0.08
P	0.346	0.001	0.002	0.921

[注] *: 与对照组相比, $P<0.01$ 。

2.3 睾丸组织细胞周期相关蛋白表达的变化

图1A为免疫印迹蛋白电泳图。Western blotting检测结果显示:与对照组相比,Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2蛋白表达水平在低、高剂量组中均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),CDK1表达水平无明显改变(均 $P>0.05$) (图1B)。



[注] A: 免疫印迹蛋白电泳图; B: Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2、CDK1蛋白相对表达水平。与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ 。

图1 BPA对哺乳期小鼠睾丸内Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2、CDK1蛋白相对表达水平的影响($n=10$)

Figure 1 Effects of BPA on protein relative expression levels of Cdc25A, Cdc25C, Wee1, p-Tyr15 Cdc2, and CDK1 in the testis of lactational mice ($n=10$)

2.4 睾丸组织细胞周期相关基因mRNA水平的变化

由图2可见,在BPA低剂量、高剂量组中Cdc25A、Cdc25C、Wee1、CDK1 mRNA的表达水平与对照组相比,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

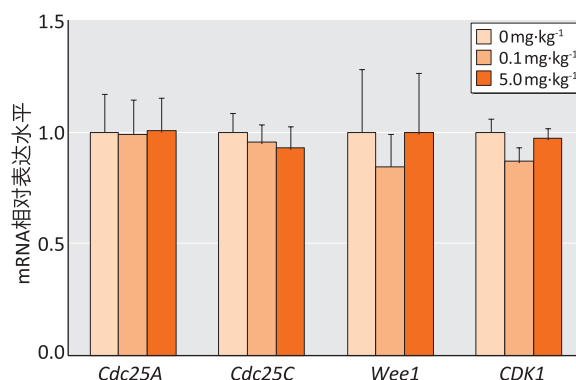


图2 BPA对哺乳期小鼠睾丸内Cdc25A、Cdc25C、Wee1、CDK1 mRNA相对表达水平的影响($n=10$)

Figure 2 Effects of BPA on mRNA relative expression levels of Cdc25A, Cdc25C, Wee1, and CDK1 in the testis of lactational mice ($n=10$)

3 讨论

在小鼠出生后第1-21天,睾丸精原细胞完成分化转变为初级精母细胞,初级精母细胞完成减数分裂形成圆形精子细胞,是研究外源生殖毒性物质对减数分裂进程影响的最佳阶段。因此本研究选择小鼠出生后第1-21天染毒BPA,探讨BPA对小鼠精子发生过程中减数分裂的影响。研究发现,BPA暴露导致小鼠睾丸生精细胞中四倍体细胞比例增加,二倍体细胞比例减少。小鼠睾丸中四倍体细胞主要包括处于细线期、偶线期、粗线期和双线期中的初级精母细胞和G2/M期的精原细胞,二倍体细胞主要包括次级精母细胞、精原细胞和支持细胞^[9-10]。22日龄小鼠睾丸中初级精母细胞比例增大,精原细胞比例减小^[7],且细胞G2/M期转换持续时间较短,这说明,BPA暴露导致小鼠睾丸中生精细胞减数分裂阻滞在初级精母细胞阶段,进入减数分裂下一阶段的初级精母细胞量减少,减数分裂进程发生紊乱。这与Ali等^[11]发现的BPA导致大鼠睾丸曲细精管部分精母细胞减数分裂阻滞的结果一致。BPA将生精细胞减数分裂阻滞在初级精母细胞阶段,必然会干扰精子发生。已经有不少研究证实BPA暴露会影响精子发生,降低精子数量和精子质量^[12-13]。

本课题组前期研究发现,BPA暴露于小鼠出生后第1-21天会导致在精母细胞内特异表达的Boule蛋

白下调^[14]。*Boule* 基因可以通过调节 Cdc25A 的翻译水平来活化成熟促进因子 (mature promoting factor, MPF), 即 CDK1/CyclinB 复合物, 启动减数分裂 G2 期向 M 期的转换^[15]。因此, 本研究检测了 BPA 是否影响细胞周期调控相关因子的转录和翻译水平, 发现 BPA 引起睾丸内 Cdc25A、Cdc25C、Wee1、p-Tyr15 Cdc2 蛋白表达下调, 未影响 CDK1 蛋白的表达。Cdc25A 与 Cdc25C 同属于 Cdc25 家族, 在细胞周期调控中能够对 MPF 的催化亚基 CDK1 (即 Cdc2) 的 Tyr15 位点去磷酸化, 进而激活 CDK1/CyclinB 复合物^[16]。Cdc25A 与 Cdc25C 可以促进细胞 G1/S、G2/M 检验点之间的转变, 有研究表明 Cdc25C 蛋白表达缺失会导致前列腺癌细胞 G2/M 期比例增多^[17]。Wee1 蛋白在细胞周期调控中发挥检查点作用, 主要功能是磷酸化 MPF 的催化亚基 CDK1 Tyr15 位点, 避免 CDK1/Cyclin B 复合物过度激活。研究发现, 使用 Wee1 抑制剂能够抑制 CDK1 在 Tyr15 处的磷酸化, 进而诱导细胞凋亡^[18]。因此推测, BPA 暴露导致小鼠睾丸生精细胞减数分裂被阻滞在初级精母细胞阶段与 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 翻译水平的下调有关。由于 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 蛋白表达水平下调, 导致 CDK1 未被及时磷酸化因而磷酸化蛋白 (p-Tyr15 Cdc2) 水平降低。通过进一步检测 BPA 是否影响 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 以及 CDK1 的转录水平, 发现 BPA 未影响以上周期调控因子的转录, 这说明 BPA 主要影响睾丸内 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 的转录后翻译。

综上所述, 哺乳期接触 BPA 能够干扰小鼠睾丸内生精细胞的分化, BPA 可能通过下调睾丸生精细胞 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 蛋白表达, 影响 CDK1 的磷酸化, 导致精母细胞减数分裂阻滞, 干扰生精细胞分化进程。但在 BPA 下调 Cdc25A、Cdc25C、Wee1 蛋白表达的过程中, 相关蛋白如何发挥作用影响减数分裂, 干扰生精细胞分化, 需要继续深入探讨。

参考文献

- [1] HART RJ. The impact of prenatal exposure to bisphenol A on male reproductive function [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11 : 320.
- [2] BONDE JP, TE VELDE E. Male factor infertility : declining sperm counts-the never-ending story [J]. Nat Rev Urol, 2017, 14 (11) : 645-646.
- [3] 顾杰, 吉贵祥, 周林军, 等. 双酚 A 及其类似物的环境分布和毒性效应研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (8) : 826-832.
- GU J, JI GX, ZHOU LJ, et al. Research progress on environmental distributions and toxic effects of bisphenol A and its analogues [J]. J Environ Occup Med, 2020, 37 (8) : 826-832.
- [4] VOM SAAL FS, WELSHONS WV. Evidence that bisphenol A (BPA) can be accurately measured without contamination in human serum and urine, and that BPA causes numerous hazards from multiple routes of exposure [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 398 (1/2) : 101-113.
- [5] KONIECZNA A, RUTKOWSKA A, RACHOŃ D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA) [J]. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 2015, 66 (1) : 5-11.
- [6] 单晓梅, 王冰霜, 陆蓓蓓, 等. 合肥市水源水与饮用水中邻苯二甲酸酯类和双酚类化合物的污染现状 [J]. 环境与职业医学, 2016, 33 (4) : 350-355.
- SHAN XM, WANG BS, LU BB, et al. Investigation of pollution of phthalate esters and bisphenols in source water and drinking water in Hefei City, China [J]. J Environ Occup Med, 2016, 33 (4) : 350-355.
- [7] 罗兰, 张彦, 杨芳, 等. 小鼠睾丸发育全过程的组织学观察 [J]. 实验动物科学, 2010, 27 (3) : 10-13.
- LUO L, ZHANG Y, YANG F, et al. The histological observation in the testis of mice at different development stage [J]. Laboratory Animal Science, 2010, 27 (3) : 10-13.
- [8] NAKAMURA D, YANAGIBA Y, DUAN Z, et al. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol [J]. Toxicol Lett, 2010, 194 (1/2) : 16-25.
- [9] NISHIMURA H, L'HERNAULT SW. Spermatogenesis [J]. Curr Biol, 2017, 27 (18) : R988-R994.
- [10] BERRUTI G. Signaling events during male germ cell differentiation : bases and perspectives [J]. Front Biosci, 1998, 3 (4) : 1097-1108.
- [11] ALI S, STEINMETZ G, MONTILLET G, et al. Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model : A physiotoxicogenomic approach [J]. PLoS One, 2014, 9 (9) : e106245.
- [12] CHIANG C, MAHALINGAM S, FLAWS JA. Environmental contaminants affecting fertility and somatic health [J]. Semin Reprod Med, 2017, 35 (3) : 241-249.

- [13] CAPOROSSI L, ALTERI A, CAMPO G, et al. Cross sectional study on exposure to BPA and phthalates and semen parameters in men attending a fertility center [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17 (2) : 489.
- [14] XIE M, BU P, LI F, et al. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (9) : 10606-10615.
- [15] 吴冰冰, 潘舵, 郑筱艳, 等. 新生期双酚A染毒对小鼠睾丸 *Boule* 基因表达的长期影响 [J]. *卫生研究*, 2017, 46 (6) : 975-980.
- WU B B, PAN D, ZHENG X Y, et al. Long-term effects of neonatal exposure to bisphenol A on testes structure and the expression of *Boule* in testes of male mice [J]. *J Hyg Res*, 2017, 46 (6) : 975-980.
- [16] BOULDIN CM, KIMELMAN D. Cdc25 and the importance of G2 control : insights from developmental biology [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13 (14) : 2165-2171.
- [17] 徐晓峰, 周秀敏, 董杰, 等. 下调 *PAR* 基因表达对前列腺癌 PC3 细胞周期及 Cdc25C 蛋白表达的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22 (1) : 1-4.
- XU X F, ZHOU X M, DONG J, et al. Cdc25C is involved in cell cycle G₂/M arrest and apoptosis induced by siRNA targeting *PAR* gene in human prostate cancer PC3 cells [J]. *China Oncol*, 2012, 22 (1) : 1-4.
- [18] DUAN Y, DONG X, NIE J, et al. Wee1 kinase inhibitor MK 1775 induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells and enhances the efficacy of doxorubicin involving downregulation of Notch pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16 (4) : 5473-5481.
- (英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 丁瑾瑜)

(上接第 757 页)

- Syndr, 2014, 6 (1) : 22.
- [25] PATEL P P, PATEL P A, ZULF M M, et al. Association of dental and skeletal fluorosis with calcium intake and serum vitamin D concentration in adolescents from a region endemic for fluorosis [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2017, 21 (1) : 190-195.
- [26] KEBEDE A, RETTA N, ABUYE C, et al. Dietary fluoride intake and associated skeletal and dental fluorosis in school age children in rural Ethiopian Rift Valley [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13 (8) : 756.
- [27] 林少凯, 张秀慧, 秦祥慧, 等. 大豆、硒、螺旋藻对氟铝联合中毒大鼠骨损伤干预效果 [J]. *现代预防医学*, 2014, 41 (14) : 2588-2590, 2600.
- LIN S K, ZHANG X H, QIN X H, et al. Intervention effect of soybean, selenium, spirulina on bone injury of rats intoxicated with fluorine and aluminum [J]. *Mod Prev Med*, 2014, 41 (14) : 2588-2590, 2600.
- [28] LIU J, YANG S, LUO M J, et al. Association of dietary carotenoids intake with skeletal fluorosis in the coal-burning fluorosis area of Guizhou province [J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31 (6) : 438-447.
- (英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 陈姣)