

氟咯草酮通过 IRE1 α -JNK 信号通路介导小鼠睾丸组织细胞及 TM4 细胞凋亡

张芬¹, 李睿², 赵淑琦¹, 王彦娜¹, 倪志晶¹, 常秀丽¹, 周志俊¹

1. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032

2. 上海市食品药品检验研究院, 上海 201203

摘要:

[背景] 氟咯草酮 (FLC) 可诱导睾丸支持细胞凋亡, 但其具体机制尚未阐明。

[目的] 通过体内动物及体外细胞系构建 FLC 染毒模型, 探究 FLC 染毒后小鼠睾丸组织中细胞凋亡以及小鼠睾丸支持细胞系 TM4 细胞凋亡和内质网应激活化情况, 并通过干预实验探究肌醇酶 1 α (IRE1 α)-c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路在 FLC 诱导 TM4 细胞凋亡过程中的作用。

[方法] 利用 C57BL/6 雄性小鼠 28 d 经口染毒 3、15、75 和 375 mg·(kg·d)⁻¹ FLC 结束后留取的睾丸标本, 通过 TUNEL 染色观察睾丸组织中细胞凋亡发生情况, 通过 Western blotting 检测睾丸组织中的凋亡蛋白 [B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相互作用介质 (Bim)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)] 表达水平。在体外细胞实验中, 使用不同浓度 (40、80 和 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 FLC 对 TM4 细胞染毒 6 h, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blotting 检测凋亡蛋白 (Bcl-2、Bim、Bax) 及内质网应激相关蛋白 [葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、磷酸化-蛋白激酶 R 样内质网激酶 (p-PERK)、活化转录因子 6 (ATF6)、磷酸化-肌醇酶 1 α (p-IRE1 α)、磷酸化-JNK (p-JNK)] 水平。随后使用 IRE1 α 磷酸化抑制剂 4 μ8C (25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、JNK 磷酸化抑制剂 SP600125 (10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理 TM4 细胞 6 h 后再使用 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 染毒 6 h, 采用 Western blotting 检测凋亡及内质网应激相关蛋白水平, 通过 CCK-8 法检测细胞活力。

[结果] 雄性 C57BL/6 小鼠经口染毒 FLC 28 d 后, 睾丸组织 TUNEL 染色结果显示生精小管间质及基底部有细胞凋亡发生。Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平在 FLC 染毒 75、375 mg·(kg·d)⁻¹ 组中较对照组下降 ($P < 0.05$); 而促凋亡蛋白 Bim 水平在 FLC 染毒 75 mg·(kg·d)⁻¹ 组中, Bax 水平在 FLC 染毒 375 mg·(kg·d)⁻¹ 组中较对照组上升 ($P < 0.05$)。0、40、80 和 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 染毒组的细胞凋亡率分别为 2.7% $\pm$ 0.2%、4.8% $\pm$ 1.3%、9.4% $\pm$ 0.3%、13.2% $\pm$ 0.2%, FLC 染毒组细胞凋亡率均明显上升 ($P < 0.05$)。TM4 细胞中 Bcl-2 蛋白水平在 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 染毒时下降 ($P < 0.05$), 而 Bim 和 Bax 蛋白水平在 80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 染毒时均上升 ($P < 0.05$), 内质网应激相关蛋白 (GRP78、p-PERK、ATF6、p-IRE1 α 和 p-JNK) 水平在 FLC 染毒后均上升 ($P < 0.05$) 或呈上升趋势。4 μ8C (25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 SP600125 (10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理后, 由 FLC 染毒引起的 GRP78、p-IRE1 α 、p-JNK 以及 Bim、Bax 蛋白表达水平上调幅度降低 ($P < 0.05$) 或呈降低的趋势; 预先使用两种抑制剂处理细胞后, FLC 对细胞活力的损伤得到明显缓解 ($P < 0.05$) 或呈缓解的趋势。

[结论] FLC 能够诱导小鼠睾丸组织发生细胞凋亡, 并且通过激活内质网应激及 IRE1 α -JNK 信号通路诱导 TM4 细胞凋亡发生。

关键词: 氟咯草酮; 睾丸组织; TM4 细胞; 凋亡; 内质网应激; 未折叠蛋白反应

Flurochloridone-induced apoptosis via IRE1 α -JNK signaling pathway in mice testicular cells and TM4 cells ZHANG Fen¹, LI Rui², ZHAO Shuqi¹, WANG Yanna¹, NI Zhijing¹, CHANG Xiuli¹, ZHOU Zhijun¹ (1. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract:

[Background] Flurochloridone (FLC) can induce apoptosis in Sertoli cells, but the specific mechanism remains unknown.



DOI 10.11836/JEOM22098

基金项目

国家自然科学基金项目 (81872643)

作者简介

张芬 (1996—), 女, 硕士生;

E-mail: 19211020032@fudan.edu.cn

通信作者

周志俊, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2022-03-18

录用日期 2022-07-16

文章编号 2095-9982(2022)09-0996-08

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

张芬, 李睿, 赵淑琦, 等. 氟咯草酮通过 IRE1 α -JNK 信号通路介导小鼠睾丸组织细胞及 TM4 细胞凋亡 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(9): 996-1003.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22098

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHOU Zhijun, E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2022-03-18

Accepted 2022-07-16

To cite

ZHANG Fen, LI Rui, ZHAO Shuqi, et al. Flurochloridone-induced apoptosis via IRE1 α -JNK signaling pathway in mice testicular cells and TM4 cells [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(9): 996-1003.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22098

[Objective] To investigate the testicular cell apoptosis in mice as well as apoptosis and activation of endoplasmic reticulum stress in TM4 cell line induced by FLC through *in vivo* and *in vitro* study designs respectively, and study the role of inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α)-c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway in the process of FLC-induced apoptosis in TM4 cells through intervention study design.

[Methods] Testicular tissues were collected from male C57BL/6 mice which were treated with 3, 15, 75, and 375 mg·(kg·d)⁻¹ FLC by oral perfusion for 28 d. Apoptosis was observed by TUNEL staining, and the levels of apoptosis-related proteins were detected by Western blotting, including B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim), and Bcl-2 associated X protein (Bax). In the *in vitro* study, TM4 cells were treated with different concentrations of FLC (40, 80, and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 6 h, then apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the levels of apoptosis-related proteins (Bcl-2, Bim, and Bax) and endoplasmic reticulum stress-related proteins [glucose regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated-protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase (p-PERK), activating transcription factor 6 (ATF6), phosphorylated-inositol-requiring enzyme 1 α (p-IRE1 α), and phosphorylated-JNK (p-JNK)] were measured by Western blotting. In the intervention study, TM4 cells were pretreated with IRE1 α phosphorylation inhibitor 4 μ8C and JNK phosphorylation inhibitor SP600125 for 6 h, then treated with 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC for 6 h. The levels of apoptosis-related proteins and endoplasmic reticulum stress-related proteins were measured by Western blotting, and cell viability was detected by cell counting kit-8.

[Results] After the male C57BL/6 mice orally exposed to FLC for 28 d, apoptosis occurred in the seminiferous tubule. The protein expression level of Bcl-2, apoptosis inhibitor, was decreased in the 75 and 375 mg·(kg·d)⁻¹ groups ($P < 0.05$), and the protein expression levels of Bim and Bax, apoptosis promoters, were increased in the 75 and 375 mg·(kg·d)⁻¹ groups respectively ($P < 0.05$). The percentages of apoptotic cells in the 0, 40, 80, and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC groups were 2.7% $\pm$ 0.2%, 4.8% $\pm$ 1.3%, 9.4% $\pm$ 0.3%, and 13.2% $\pm$ 0.2%, respectively, increased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). The protein expression level of Bcl-2 also was decreased in the 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC group ($P < 0.05$), while the levels of Bim and Bax were increased in both of the 80 and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups ($P < 0.05$). The expression levels of endoplasmic reticulum stress-related proteins (GRP78, p-PERK, ATF6, p-IRE1 α , and p-JNK) were increased ($P < 0.05$) or showed a rising trend in TM4 cells. Pre-treatment with 4 μ8C (25 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and SP600125 (10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly down-regulated the protein expression levels of GRP78, p-IRE1 α , p-JNK, and Bax induced by FLC ($P < 0.05$) or in a downward trend. Both of the inhibitors alleviated the decreased cell viability induced by FLC ($P < 0.05$) or in alleviating fashion.

[Conclusion] FLC could induce apoptosis in mice testis and TM4 cell apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress and IRE1 α -JNK signaling pathway.

Keywords: flurochloridone; testis; TM4 cell; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response

氟咯草酮(flurochloridone, FLC)作为新型除草剂,自上市以来在欧盟和北美国家中广泛应用。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)在对 FLC 危险度评估报告中指出 FLC 的靶器官为睾丸和附睾^[1]。前期研究结果显示, FLC 能够导致精子畸形率增加,支持细胞空泡化,并可诱导支持细胞凋亡或自噬发生^[2-3],损伤血睾屏障完整性^[4]。 FLC 可诱导支持细胞产生大量活性氧,损伤内质网结构,破坏内质网钙离子(Ca^{2+})稳态^[3],提示 FLC 可能会诱导支持细胞发生内质网应激,进而诱导细胞凋亡发生。

内质网在细胞内承担着重要的生命活动,主要包括蛋白质的正确折叠与合成运输、钙离子的储存与调节等^[5]。当内质网中出现未折叠及错误折叠蛋白质累积,会引起内质网应激^[6],同时启动未折叠蛋白反应^[7-8],通过降低蛋白质转录和翻译、上调内质网伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)水平、加强错误折叠蛋白降解等方式,使细胞恢复正常^[9-10]。未折叠蛋白反应的激活涉及三条信号通路的参与,分别由肌醇需酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase, PERK)和活化转录因

子 6(activating transcription factor 6, ATF6)介导^[11-12],它们与内质网伴侣蛋白 GRP78 解离并通过自身二聚体或磷酸化激活下一级信号通路,引发不同的细胞反应^[13]。

越来越多的研究证实,内质网应激与细胞凋亡之间的关系十分密切。未折叠蛋白反应的下游蛋白,如 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)^[14],可通过调节 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白,如 Bcl-2、Bcl-2 相互作用的死亡介质(Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)等的表达水平来促进细胞凋亡的发生^[15-16]。

在 FLC 诱导睾丸组织及支持细胞损伤的过程中,是否启动了内质网应激和未折叠蛋白反应,以及未折叠蛋白反应的哪些信号通路在细胞凋亡的过程发挥作用还有待进一步研究证实。本研究通过对 FLC 染毒的 C57BL/6 小鼠睾丸组织中细胞凋亡发生情况的研究,利用小鼠睾丸支持细胞系 TM4 细胞模型,围绕内质网应激及未折叠蛋白反应 IRE1 α -JNK 信号通路,观察其在不同染毒浓度下的改变情况,并且通过相应的干预实验探索其在 FLC 诱导支持细胞凋亡中的作用,为 FLC 诱导睾丸组织细胞凋亡的机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本研究利用了实验室先前完成的 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 28 d 经口染毒 FLC 的标本。FLC 染毒剂量分别为 0(0.5%羧甲基纤维素钠)、3、15、75 和 375 mg·(kg·d)⁻¹[2]。观察睾丸组织中细胞凋亡发生情况,检测睾丸组织中的凋亡蛋白表达水平。在体外实验中,使用小鼠睾丸支持细胞系 TM4 细胞进行 FLC(40、80 和 160 μmol·L⁻¹)染毒 6 h,检测细胞凋亡情况及内质网应激相关蛋白水平。干预实验中使用 IRE1α 磷酸化抑制剂 4μ8C(上海 Selleck)、JNK 磷酸化抑制剂 SP600125(上海碧云天)预处理 TM4 细胞 6 h 后再进行 160 μmol·L⁻¹ FLC 染毒 6 h,检测细胞活力、细胞凋亡情况及内质网应激相关蛋白水平。根据文献报道,选择 4μ8C 的处理浓度为 25、50 μmol·L⁻¹[17],SP600125 的处理浓度为 10、20 μmol·L⁻¹[18-19]。

1.2 TM4 细胞培养与 FLC 染毒液配制

小鼠睾丸支持细胞系 TM4 细胞(购自国家细胞资源平台,编号:1101MOU-PUMC000298)的培养条件为 5%二氧化碳、37 °C 恒温,完全培养基为含有 10% 胎牛血清(美国 Gibco)、1%青霉素-链霉素(美国 Sigma)的高糖培养基(美国 Gibco)。FLC(上海笃玛)固体粉末溶解于二甲基亚砜中制成不同浓度的染毒液用于后续实验。

1.3 TUNEL 染色检测睾丸组织凋亡水平

小鼠睾丸组织石蜡切片置于二甲苯中浸洗进行脱蜡处理,再依次置于 100%、95%、85%、75%乙醇中浸洗,根据 TUNEL 凋亡检测试剂盒(上海碧云天)的说明书配制并在切片上滴加适量 TUNEL 检测液,最后滴加抗荧光淬灭封片液[含 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)]进行封片处理,尽快在荧光显微镜下观察,每张切片随机选择 3 个独立视野进行观察。

1.4 流式细胞术检测 TM4 细胞凋亡率

将细胞接种至 6 孔板中,待细胞贴壁后进行染毒处理,处理结束后,收集培养液,每孔中加入 500 μL 胰酶消化液消化细胞,收集细胞悬液,1000×g 离心 5 min,弃上清,随后加入 195 μL 膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)结合液重悬细胞,再分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶(PI),混匀后室温避光孵育 20 min,立即上机检测。使用 FlowJo 软件(版本号 v10.0.7r2)进行凋亡细胞分析。

1.5 CCK-8 法检测 TM4 细胞活力

将细胞接种至 96 孔板中,待细胞贴壁后进行染

毒处理,处理结束后,每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,继续置于培养箱中培养 1.5 h,取出 96 孔板于酶标仪中在波长为 450 nm 处测定光密度,将处理组与对照组光密度的比值作为相对细胞活力值。

1.6 Western blotting 检测蛋白水平

采用 Western blotting 检测睾丸组织匀浆及 TM4 细胞内抗凋亡蛋白 BCL-2、促凋亡蛋白 Bim 和 Bax 的蛋白水平,进一步检测 TM4 细胞中内质网应激标记蛋白 GRP78、未折叠蛋白反应信号通路蛋白磷酸化 PERK(p-PERK)、ATF6 和磷酸化 IRE1α(p-IRE1α)以及内质网应激诱导凋亡关键蛋白 p-JNK 的表达水平。具体条件如下:蛋白电泳条件为 80 V,1 h,待蛋白样本进入分离胶后转至 100 V,1 h。转膜条件为 100 V,1.5 h。将膜置于 5%脱脂奶粉溶液中,室温封闭 2 h。随后与含 0.05% Tween20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)稀释的一抗(Bcl-2, 1:500 稀释;Bim, 1:1000 稀释;Bax, 1:500 稀释;GRP78, 1:1000 稀释;p-PERK, 1:500 稀释;ATF6, 1:1000 稀释;p-IRE1α, 1:1000 稀释;p-JNK, 1:1000 稀释)在 4 °C 孵育过夜。一抗孵育结束后,将蛋白条带与辣根过氧化物酶结合的二抗置于室温中孵育 1 h,滴加适量增强化学发光法(ECL)超敏检测化学发光液,在 ECL 化学发光检测系统(美国 Syngene)中检测目的蛋白条带的发光情况。使用 ImageJ 软件(版本号 1.52v)分析蛋白条带灰度值,以 β-actin 或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参蛋白,计算目的蛋白灰度值/内参灰度值的数值。

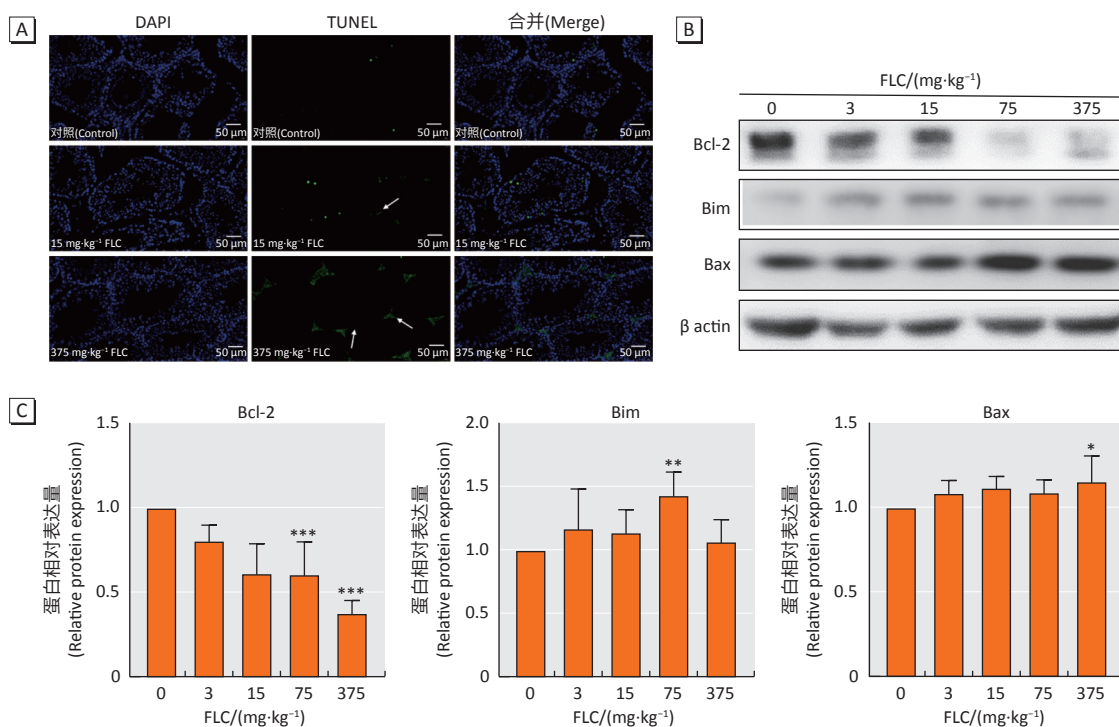
1.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件(版本号 8.3.0)进行统计分析,不同处理组数据间的统计分析采用单因素方差分析,随后使用 LSD 进行两两组间比较。Western blotting 及 CCK-8 实验每组包含 6 个平行数据,流式细胞术实验每组包含 3 个平行数据。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 FLC 诱导小鼠睾丸组织中细胞凋亡发生

雄性小鼠经口染毒 FLC 28 d 后,睾丸组织 TUNEL 染色结果(图 1A)显示,375 mg·(kg·d)⁻¹ 染毒组发生明显的细胞凋亡,主要集中在睾丸间质及生精小管基底部,提示有间质细胞及支持细胞凋亡发生。对凋亡蛋白水平的检测发现(图 1B、图 1C),Bcl-2 蛋白水平呈现随染毒剂量增加而降低的趋势,Bim 蛋白、Bax 蛋白水平分别在 75、375 mg·(kg·d)⁻¹ 组中较对照组增加(P<0.05)。



[注] A: 睾丸组织 TUNEL 染色, 蓝色荧光为细胞核, 绿色荧光为凋亡细胞, 白色箭头表示 FLC 引起的支持细胞凋亡; B: Western blotting 检测凋亡蛋白的特征性条带图; C: Western blotting 条带量化图($n=6$)。与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。

[Note] A: TUNEL staining of mice testis tissue, cell nuclei are stained blue and apoptotic cells are stained green, apoptotic cells induced by FLC are pointed by white arrows; B: The representative blots of apoptotic proteins determined by Western blotting; C: The quantitative data of Western blotting ($n=6$). Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

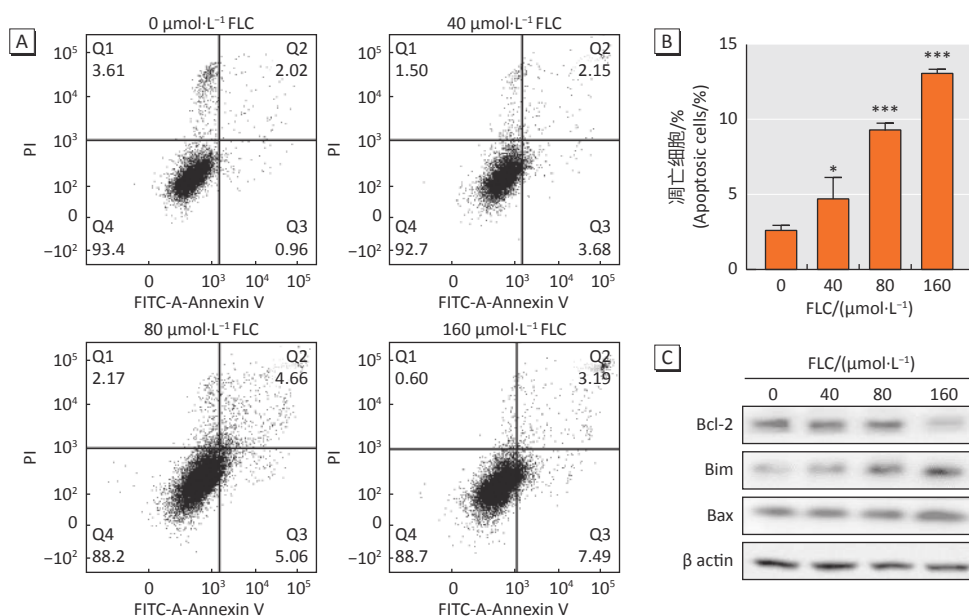
图 1 FLC 诱导小鼠睾丸组织损伤及凋亡发生

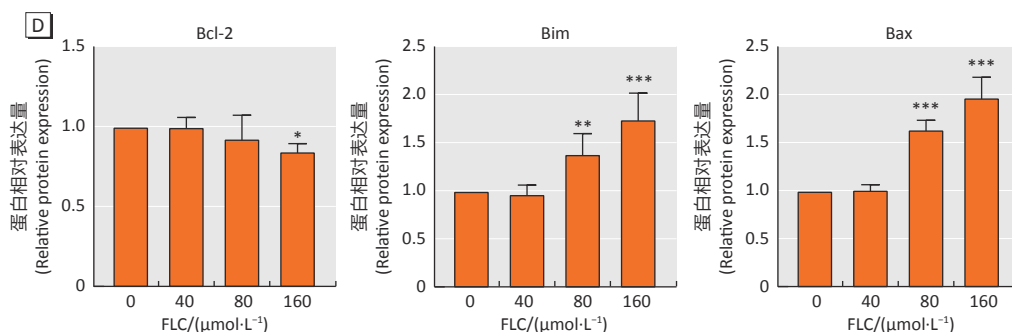
Figure 1 FLC-induced testis injury and apoptosis in mice

2.2 FLC 诱导 TM4 细胞凋亡发生

细胞凋亡检测发现(图 2A、图 2B), 40、80 和 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 染毒组的细胞凋亡率分别为 $4.8\%\pm 1.3\%$ 、 $9.4\%\pm 0.3\%$ 、 $13.2\%\pm 0.2\%$, 均高于对照组($2.7\%\pm$

0.2%)($P<0.05$)。检测 Bcl-2 家族凋亡蛋白的表达水平(图 2C、图 2D), 与对照组相比, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平在 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下降($P<0.05$), 而促凋亡蛋白 Bim 和 Bax 的水平在 80 和 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均出现上调($P<0.05$)。





[注] A: 流式细胞术检测细胞凋亡特征图; B: 细胞凋亡率($n=3$); C: Western blotting 检测凋亡蛋白水平特征性条带图; D: Western blotting 条带量化图($n=6$)。与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。

[Note] A: Apoptotic cells detected by flow cytometry; B: Apoptotic rate ($n=3$); C: The representative blots of apoptotic proteins determined by Western blotting; D: The quantitative data of Western blotting ($n=6$). Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

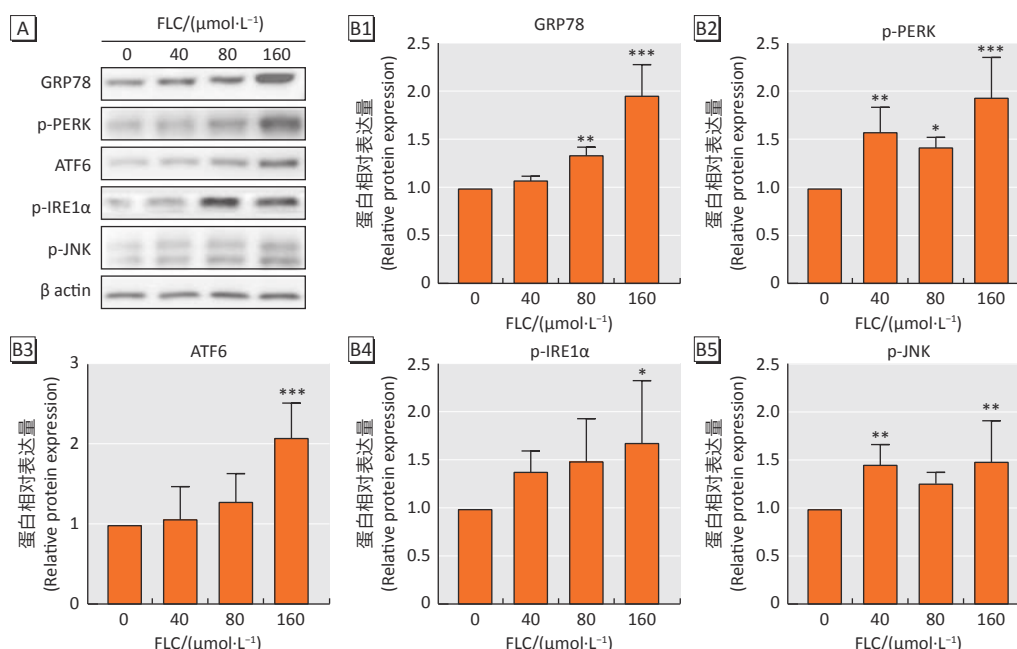
图2 FLC 诱导 TM4 凋亡发生

Figure 2 FLC-induced apoptosis in TM4 cells

2.3 FLC 诱导 TM4 细胞内质网应激及未折叠蛋白反应发生

对内质网应激相关蛋白水平的检测结果显示(图3),与对照组相比,GRP78 蛋白表达水平在 80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组中上升, p-PERK 蛋白表达水平在

40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即出现上调($P<0.05$), ATF6 和 p-IRE1 α 蛋白表达水平在 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时上升($P<0.05$)。同时, p-JNK 蛋白表达水平也在 40 和 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时上升($P<0.05$),在 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时上升不明显,呈“U 型”效应曲线。



[注] A: Western blotting 检测内质网应激及未折叠蛋白反应蛋白特征性条带图; B1~B5: Western blotting 条带量化图($n=6$)。与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。

[Note] A: The representative blots of endoplasmic reticulum stress- and unfolded protein response-related proteins determined by Western blotting; B1~B5: The quantitative data of Western blotting ($n=6$). Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

图3 FLC 诱导 TM4 细胞内质网应激及未折叠蛋白反应发生

Figure 3 FLC-activated endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in TM4 cells

2.4 IRE1α 在 FLC 诱导细胞凋亡中的作用

单纯的 4 μM 8C 能够降低 p-IRE1 α 的蛋白表达水平,同时降低 GRP78 及促凋亡蛋白 Bax 的表达水平(图4A、图4B、图4C、图4D),但是在一定程度上可抑制细胞活力(图4E)。在经过 FLC 染毒的细胞中,4 μM 8C 能够降

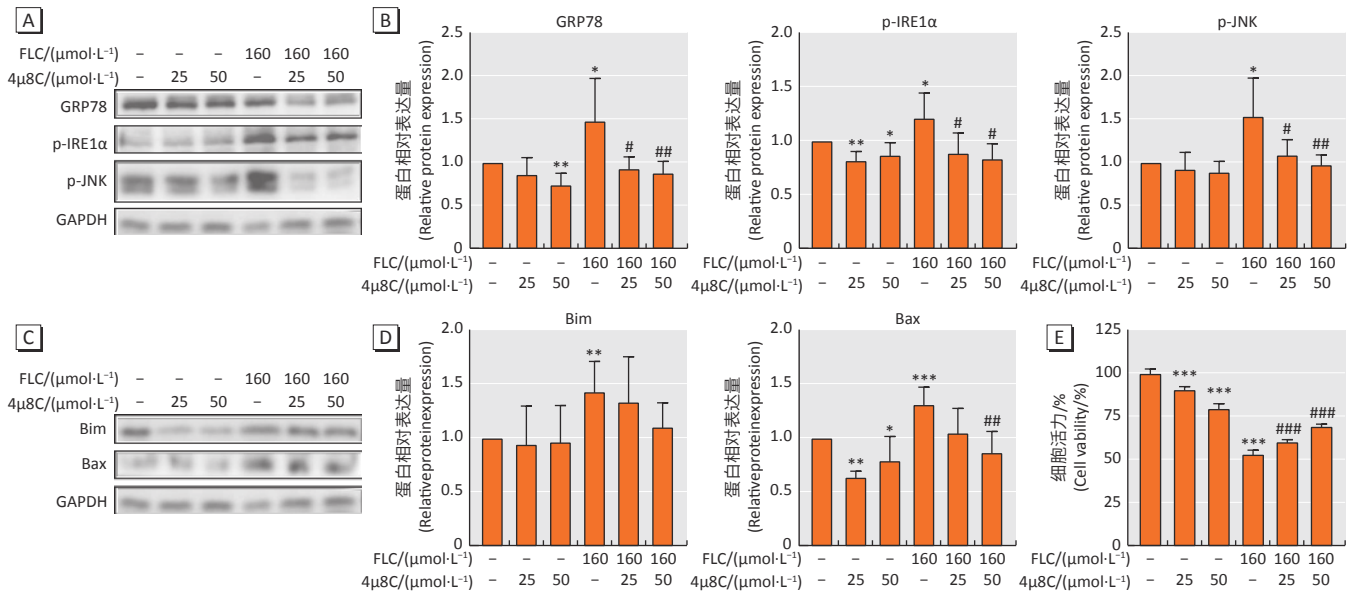
低 GRP78、p-IRE1 α 、p-JNK 以及 Bax 的表达水平,同时可以改善 FLC 诱导的细胞活力损伤。

2.5 JNK 在 FLC 诱导细胞凋亡中的作用

SP600125 预处理细胞后的内质网应激相关蛋白水平的检测结果显示,SP600125 能够降低 JNK 的磷酸

化水平,并呈浓度依赖性下调(图 5A、图 5B)。同时 SP600125 在高浓度时能够下调 p-IRE1 α 、GRP78 的蛋白

表达水平,浓度依赖性抑制 Bax 的蛋白表达水平(图 5C、图 5D),并且可以缓解 FLC 诱导的细胞活力损伤(图 5E)。

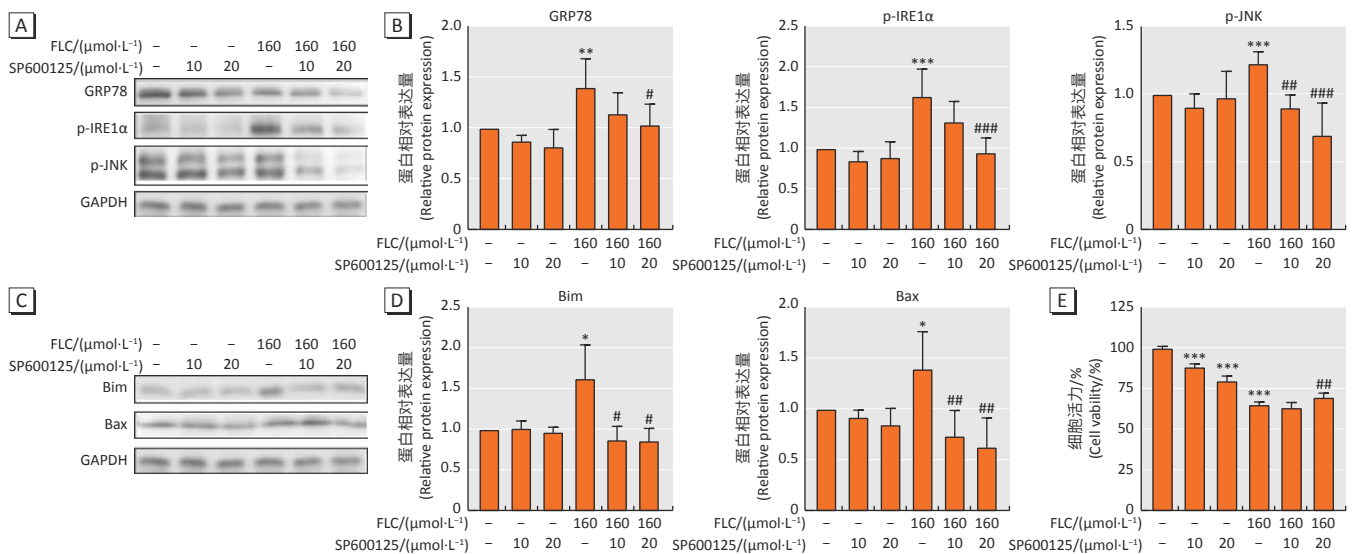


[注] A: Western blotting 检测内质网应激蛋白水平特征性条带图; B: Western blotting 条带量化图($n=6$); C: Western blotting 检测凋亡蛋白水平特征性条带图; D: Western blotting 条带量化图($n=6$); E: CCK-8 检测细胞活力($n=6$)。与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。与 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 且 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 μ 8C 组相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.001$ 。

[Note] A: The representative blots of endoplasmic reticulum stress-related proteins determined by Western blotting; B: The quantitative data of Western blotting ($n=6$); C: The representative blots of apoptotic proteins determined by Western blotting; D: The quantitative data of Western blotting ($n=6$); E: Cell viability detected by CCK-8 assay. Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. Compared with the 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC and 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 μ 8C group, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.001$.

图 4 IRE1 α 在 FLC 诱导细胞凋亡中的作用

Figure 4 The role of IRE1 α in cell apoptosis induced by FLC



[注] A: Western blotting 检测内质网应激蛋白水平特征性条带图; B: Western blotting 条带量化图($n=6$); C: Western blotting 检测凋亡蛋白水平特征性条带图; D: Western blotting 条带量化图($n=6$); E: CCK-8 检测细胞活力($n=6$)。与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。与 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC 且 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SP600125 组相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.001$ 。

[Note] A: The representative blots of endoplasmic reticulum stress-related proteins determined by Western blotting; B: The quantitative data of Western blotting ($n=6$); C: The representative blots of apoptotic proteins determined by Western blotting; D: The quantitative data of Western blotting ($n=6$); E: Cell viability detected by CCK-8 assay. Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. Compared with the 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FLC and 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SP600125 group, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.001$.

图 5 JNK 在 FLC 诱导细胞凋亡中的作用

Figure 5 The role of JNK in cell apoptosis induced by FLC

3 讨论

FLC可诱导小鼠睾丸组织中发生细胞凋亡,改变Bcl-2家族凋亡蛋白(Bcl-2、Bim、Bax)的表达水平,并且诱导TM4细胞活力损伤及细胞凋亡发生,在该过程中存在内质网应激发生,并且激活未折叠蛋白反应信号通路之一IRE1 α 通路,进一步针对IRE1 α 及其下游JNK通路进行抑制剂干预实验,证实了FLC通过激活IRE1 α -JNK信号通路介导TM4细胞凋亡发生。

关于FLC的毒性研究主要集中在其对雄性动物生殖系统的损伤,其可损伤血睾屏障完整性^[4],通过细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)信号通路导致支持细胞内质网Ca²⁺稳态失调^[3],并通过线粒体途径诱导支持细胞凋亡^[4],激活磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinases, Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路引起自噬发生^[2],还可激活促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路^[20],同时FLC还可激活内质网应激,通过PERK通路诱导细胞凋亡发生^[21]。本研究补充了内质网应激与细胞凋亡发生之间可能存在其他的信号通路,进一步完善了FLC诱导凋亡发生的机制网络。

FLC的靶细胞为支持细胞,鉴于TM4细胞系在众多研究中作为小鼠睾丸支持细胞体外模型^[22-24],本研究选择TM4细胞系进行体外实验,因此在睾丸组织中观察到凋亡发生后,进一步检测了TM4支持细胞凋亡发生情况,其凋亡率随染毒浓度增加而增加,凋亡蛋白水平也发生改变,提示FLC诱导TM4细胞凋亡发生。

细胞凋亡可由死亡受体依赖途径、线粒体途径及内质网途径介导^[25],其中线粒体途径和内质网途径均依赖Bcl-2家族蛋白介导凋亡发生^[26],通过促凋亡蛋白Bim与线粒体膜上表达的蛋白Bax结合,导致线粒体外膜通透性增加,促进半胱天冬酶和细胞色素c释放到胞浆中,引发细胞凋亡^[27]。相比于线粒体途径诱导的凋亡,内质网应激诱导的凋亡还涉及未折叠蛋白反应三条信号通路的活化,分别由PERK、ATF6和IRE1 α 介导。前期研究已经探究了FLC可通过PERK通路激活CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT enhancer binding protein homologous protein, CHOP),诱导凋亡发生^[21],而许多研究表明,IRE1 α 信号通路也可诱导细胞凋亡的发生^[28]。

过量或持续的内质网应激可激活IRE1 α 的磷酸激酶活性,使下游凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal

regulating kinase-1, ASK1)活化,激活的ASK1可增加下游蛋白JNK的表达^[29]。IRE1 α 还可与肿瘤坏死因子受体相关因子-2(tumor necrosis factor receptor associated factor-2, TRAF2)相互作用激活JNK。JNK激活后可与凋亡相关蛋白相互作用,如促进Bax的表达诱导线粒体凋亡途径^[30]。因此本研究通过抑制剂体外干预TM4细胞着重探究了IRE1 α 和JNK在FLC诱导细胞凋亡中的作用。

4 μ 8C通过抑制IRE1 α 的RNase结构域限制X盒结合蛋白1(X-box binding protein 1, XBP1)的剪切,从而阻断未折叠蛋白反应的激活^[31]。在本研究中,使用不同浓度的4 μ 8C预处理TM4细胞6 h后,可以看到4 μ 8C可降低磷酸化IRE1 α 的水平,其下游蛋白JNK的磷酸化水平也降低,并且促凋亡蛋白Bax在高浓度4 μ 8C的预处理组中发生下调,提示IRE1 α 参与了FLC诱导的内质网应激以及JNK的活化,能够通过抑制IRE1 α 的磷酸化缓解FLC诱导的细胞凋亡,证实FLC可能通过IRE1 α -JNK-Bax信号通路诱导TM4细胞凋亡发生。为了进一步验证JNK在连接IRE1 α 和凋亡之间的作用,使用了JNK磷酸化抑制剂SP600125进行干预实验^[32],SP600125能够浓度依赖性地抑制JNK的磷酸化,进而导致Bax蛋白表达水平下降,提示FLC诱导的TM4细胞凋亡受到JNK活化的影响,p-JNK参与了IRE1 α 介导细胞凋亡的过程,进一步证实了IRE1 α -JNK-Bax信号通路在FLC诱导TM4细胞凋亡中的作用。同时两种抑制剂能够显著缓解FLC诱导的细胞活力受损,进一步证实了IRE1 α /JNK通路参与了FLC诱导的TM4细胞活力受损。

本研究结果进一步证实了FLC能够诱导小鼠睾丸组织发生细胞凋亡,同时诱导TM4细胞凋亡发生,并且诱导内质网应激发生,激活未折叠蛋白反应IRE1 α 通路,通过抑制剂干预实验发现,FLC通过IRE1 α -JNK信号通路介导凋亡发生。本研究为FLC诱导凋亡发生的机制网络补充了新的信号通路,但是该通路与其他通路之间是否存在关联尚需进一步研究,如内质网应激与氧化应激之间的关系、内质网途径诱导凋亡与线粒体途径诱导凋亡之间的关系等,还需再进一步研究中进行探究。

参考文献

- [1] European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Flurochloridone (notified active substance)[J]. EFSA J, 2010, 8(12): 1869.
- [2] NI Z, SUN W, LI R, et al. Fluorochloridone induces autophagy in TM4 Sertoli

- cells: involvement of ROS-mediated AKT-mTOR signaling pathway[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 64.
- [3] LIU L, CHANG X, ZHANG Y, et al. Fluorochloridone induces primary cultured Sertoli cells apoptosis: involvement of ROS and intracellular calcium ions-mediated ERK1/2 activation[J]. *Toxicol in Vitro*, 2018, 47: 228-237.
- [4] SUN W, NI Z, LI R, et al. Flurochloridone induces Sertoli cell apoptosis through ROS-dependent mitochondrial pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 216: 112183.
- [5] MARTUCCIello S, MASULLO M, CERULLI A, et al. Natural products targeting ER stress, and the functional link to mitochondria[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1905.
- [6] DI CONZA G, HO P C. ER stress responses: an emerging modulator for innate immunity[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 695.
- [7] LIN Y, JIANG M, CHEN W, et al. Cancer and ER stress: mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109249.
- [8] ROY A, KUMAR A. ER stress and unfolded protein response in cancer cachexia[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1929.
- [9] MONCAN M, MNICH K, BLOMME A, et al. Regulation of lipid metabolism by the unfolded protein response[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1359-1370.
- [10] WALTER P, RON D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [11] GARDNER BM, PINCUS D, GOTTHARDT K, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a013169.
- [12] BURKEWITZ K, FENG G, DUTTA S, et al. *Atf-6* regulates lifespan through ER-mitochondrial calcium homeostasis[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(10): 108125.
- [13] MOTA M, BANINI BA, CAZANAVE SC, et al. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1049-1061.
- [14] SOZEN E, YAZGAN B, TOK OE, et al. Cholesterol induced autophagy via IRE1/JNK pathway promotes autophagic cell death in heart tissue[J]. *Metabolism*, 2020, 106: 154205.
- [15] CHANG CY, PAN PH, WU CC, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to gefitinib-induced apoptosis in glioma[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3934.
- [16] LI Y, JIANG W, NIU Q, et al. eIF2 α -CHOP-BCI-2/JNK and IRE1 α -XBP1/JNK signaling promote apoptosis and inflammation and support the proliferation of Newcastle disease virus[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 891.
- [17] POE C, YOUNGBLOOD C, HODGE K, et al. Treatment of established TH2 cells with 4 μ 8c, an inhibitor of IRE1 α , blocks IL-5 but not IL-4 secretion[J]. *BMC Immunol*, 2019, 20(1): 3.
- [18] ZHANG H, LIU X, ZHOU S, et al. SP600125 suppresses *Keap1* expression and results in NRF2-mediated prevention of diabetic nephropathy[J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 60(2): 145-157.
- [19] LIU W, CHAI Y, HU L, et al. Polyphyllin VI induces apoptosis and autophagy via reactive oxygen species mediated JNK and P38 activation in Glioma[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2275-2288.
- [20] ZHOU S, LI R, HOU W, et al. RNA-seq analysis of testes from flurochloridone-treated rats[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2020, 30(3): 219-227.
- [21] ZHANG F, NI Z, ZHAO S, et al. Flurochloridone induced cell apoptosis via ER stress and eIF2 α -ATF4/ATF6-CHOP-Bim/Bax signaling pathways in mouse TM4 Sertoli cells[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(8): 4564.
- [22] LI Z, WANG H, HUANG S, et al. Establishment of stable MRP1 knockdown by lentivirus-delivered shRNA in the mouse testis Sertoli TM4 cell line[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(2): 81-90.
- [23] VANLAEYS A, DUBUISSON F, SERALINI GE, et al. Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells[J]. *Toxicol in Vitro*, 2018, 52: 14-22.
- [24] ZHENG W, WANG B, SI M, et al. Zearalenone altered the cytoskeletal structure via ER stress- autophagy- oxidative stress pathway in mouse TM4 Sertoli cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3320.
- [25] SOO KY, ATKIN JD, FARG M, et al. Bim links ER stress and apoptosis in cells expressing mutant SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35413.
- [26] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(3): 175-193.
- [27] DENG J. How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers? [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1): 18-26.
- [28] GUO FJ, LIU Y, ZHOU J, et al. XBP1S protects cells from ER stress-induced apoptosis through Erk1/2 signaling pathway involving CHOP[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 138(3): 447-460.
- [29] AMIN-WETZEL N, SAUNDERS RA, KAMPHUIS MJ, et al. A J-protein Co-chaperone recruits BiP to monomerize IRE1 and repress the unfolded protein response[J]. *Cell*, 2017, 171(7): 1625-1637.e13.
- [30] DHANASEKARAN DN, REDDY EP. JNK signaling in apoptosis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245-6251.
- [31] LOGUE SE, MCGRATH EP, CLEARY P, et al. Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3267.
- [32] BENNETT BL, SASAKI DT, MURRAY BW, et al. SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): 13681-13686.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)