

MBP 和 MEHP 联合染毒致小鼠睾丸间质细胞的凋亡作用及其可能机制

李玲, 员朋娟, 德小明, 李丽萍, 张亚娟, 李娅辉, 伊梦楠, 张鹏举, 刘贺荣

宁夏医科大学公共卫生与管理学院劳动卫生与环境卫生系, 生育力保持教育部重点实验室,
宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室, 宁夏 银川 750004

摘要:

[目的] 探讨邻苯二甲酸单丁酯 (MBP) 和邻苯二甲酸单乙基己酯 (MEHP) 染毒致小鼠睾丸间质细胞的凋亡作用及葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、活化转录因子 4 (ATF4) 与 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 参与的可能机制。

[方法] 培养小鼠睾丸间质细胞 (TM-3 细胞) 并且测出细胞生长曲线; 用 CCK-8 法检测细胞在染毒浓度 400 $\mu\text{mol/L}$ 状况下的细胞活性变化; 用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡情况; 应用免疫印迹法检测 GRP78、ATF4 和 CHOP 含量的变化。单因素方差分析法分析染毒组与对照组之间的关系, 2×2 析因设计法判断联合染毒的交互作用, 当 $|(MBP+MEHP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})| < |(MBP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})| + |(MEHP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})|$, 可判定交互作用类型为拮抗作用。

[结果] 细胞在 24~60 h 时间段内处于对数生长期, 且细胞正常状态下的凋亡数量比较稳定。细胞活性检测结果显示 MEHP 染毒对细胞的抑制率比 MBP 的大, 并且 MBP+MEHP 联合染毒且具有交互作用, 其作用方式为拮抗作用 [24h: $|(53.21 \pm 7.68) \%| < |(42.99 \pm 8.23) \%| + |(65.46 \pm 8.29) \%|$; 36h: $|(79.87 \pm 3.76) \%| < |(53.12 \pm 4.33) \%| + |(74.80 \pm 4.96) \%|$; 48h: $|(85.97 \pm 6.07) \%| < |(38.98 \pm 9.59) \%| + |(80.73 \pm 4.99) \%|$], 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞凋亡比例也呈现出 MEHP 组 [早期凋亡: $(17.44 \pm 0.82) \%$, 总凋亡: $(44.24 \pm 0.89) \%$] 大于 MBP 染毒组 [早期凋亡: $(14.58 \pm 0.97) \%$, 总凋亡: $(29.46 \pm 0.58) \%$], 同时出现 MEHP+MBP 联合染毒组 [早期凋亡: $(8.58 \pm 0.35) \%$, 总凋亡: $(32.28 \pm 0.41) \%$] 的凋亡比例小于各单独染毒组之和, 呈现出拮抗作用; ATF4 和 GRP78 在 MEHP 染毒组的表达量高于 MBP 染毒组, MEHP+MBP 联合染毒组表达量低于 MEHP 染毒组但高于 MBP 染毒组, 并且表现出拮抗作用。CHOP 的表达量与对照组相比也有变化, MEHP 染毒组表达量较 MBP 染毒组表达量高, 在 MEHP+MBP 联合染毒组表达量低于单独染毒组, 并且表现出拮抗作用, 但 MBP 染毒组没有主效应。

[结论] MBP、MEHP 染毒致 TM-3 细胞凋亡具有主效应, MBP 和 MEHP 联合染毒致 TM-3 细胞凋亡具有交互作用, 呈现拮抗作用。GRP78-ATF4-CHOP 通路可能参与 MBP、MEHP 染毒致 TM-3 细胞的凋亡过程。

关键词: 邻苯二甲酸单酯; 睾丸间质细胞; 凋亡; 联合染毒; GRP78-ATF4-CHOP

Leydig cell apoptosis in mice induced by combined administration of monoethyl hexyl phthalate and monobutyl phthalate and potential mechanism LI Ling, YUN Peng-juan, DE Xiao-ming, LI Li-ping, ZHANG Ya-juan, LI Ya-hui, YI Meng-nan, ZHANG Peng-jü, LIU He-rong (Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health and Management, Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ministry of Education, Key Laboratory of Reproduction and Genetics in Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Objective] To investigate the apoptosis induced by monobutyl phthalate (MBP) and monoethyl hexyl phthalate (MEHP) in mouse leydig cells and the possible mechanism of GRP78, ATF4 and CHOP proteins.

[Methods] Mouse leydig cells (TM-3 cells) were cultured and the cell growth curve was drawn. Cell viability was measured by CCK-8 assay at 400 $\mu\text{mol/L}$. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining. The changes of GRP78, ATF4, and CHOP were detected by Western blot. One-way ANOVA was used to analyze the relationship between the

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18553

基金项目

宁夏自然科学基金项目 (2018AAC03070)

作者简介

李玲 (1971—), 女, 硕士, 教授;
E-mail: zhuoran1126@163.com

通信作者

李玲, E-mail: zhuoran1126@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-08-30

录用日期 2018-11-27

文章编号 2095-9982(2019)02-0175-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

李玲, 员朋娟, 德小明, 等. MBP 和 MEHP 联合染毒致小鼠睾丸间质细胞的凋亡作用及其可能机制 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (2): 175-180.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18553

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LI Ling, E-mail: zhuoran1126@163.com

Competing interests None declared

Received 2018-08-30

Accepted 2018-11-27

►To cite

LI Ling, YUN Peng-juan, DE Xiao-ming, et al. Leydig cell apoptosis in mice induced by combined administration of monoethyl hexyl phthalate and monobutyl phthalate and potential mechanism [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(2): 175-180.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18553

exposed group and the control group, and the 2×2 factorial design method was used to judge the interaction of the combined exposure. When $|(\text{MBP}+\text{MEHP group}-\text{control group value})| < |(\text{MBP group value}-\text{control group value})| + |(\text{MEHP group value}-\text{control group value})|$, it can be determined that the type of interaction is antagonism.

[Results] The cells were in logarithmic growth phase from 24 to 60 h after designed treatment and the number of apoptotic cells in normal state cells was stable. The results of cell viability assay showed that the inhibition rate induced by MEHP was higher than that by MBP, and the MBP+MEHP combined exposure showed an antagonism effect on cell viability [24 h: $|(\text{MBP}+\text{MEHP group}-\text{control group value})| < |(\text{MBP group value}-\text{control group value})| + |(\text{MEHP group value}-\text{control group value})|$; 36 h: $|(\text{MBP}+\text{MEHP group}-\text{control group value})| < |(\text{MBP group value}-\text{control group value})| + |(\text{MEHP group value}-\text{control group value})|$; 48 h: $|(\text{MBP}+\text{MEHP group}-\text{control group value})| < |(\text{MBP group value}-\text{control group value})| + |(\text{MEHP group value}-\text{control group value})|$], which was statistically significant ($P < 0.05$). The apoptosis rate was higher in the MEHP group [early apoptosis: $(17.44 \pm 0.82)\%$, total apoptosis: $(44.24 \pm 0.89)\%$] than in the MBP group [early apoptosis: $(14.58 \pm 0.97)\%$, total apoptosis: $(29.46 \pm 0.58)\%$], and the apoptosis rate in the MEHP+MBP combined exposure group [early apoptosis: $(8.58 \pm 0.35)\%$, total apoptosis: $(32.28 \pm 0.41)\%$] was lower than the sum of individual exposure groups, also indicating an antagonism effect. The expression levels of ATF4 and GRP78 in the MEHP group were higher than those in the MBP group, and the expression level in the MEHP+MBP combined exposure group was lower than that in the MEHP group and higher than that in the MBP group, showing an antagonistic effect. The expression level of CHOP also changed after the designed exposure as compared with the control group. The expression level of CHOP in the MEHP group was higher than that in the MBP group, and the expression level in the MEHP+MBP combined exposure group was lower than that in the individual exposure group, showing an antagonistic effect, but the MBP group had no main effect.

[Conclusion] MBP and MEHP has the main effect on the apoptosis of TM-3 cells, the combination of MBP and MEHP has an antagonistic effect. Moreover, the GRP78-ATF4-CHOP pathway may be involved in the apoptosis of TM-3 cells induced by MBP and MEHP.

Keywords: phthalate monoester; leydig cell; apoptosis; combined exposure; GRP78-ATF4-CHOP

内质网应激作为介导细胞凋亡的三种途径之一^[1], 已引起学者广泛关注, 其中以对葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)-活化转录因子 4 (ATF4)-C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 通路的研究较多, 该通路被证实参与多种细胞凋亡, 如肝细胞脂毒性凋亡^[2]等过程。邻苯二甲酸丁酯 (DBP) 和邻苯二甲酸 2-乙基己酯 (DEHP) 被大量应用于塑料制品中, 进入人体后代谢为单体邻苯二甲酸单丁酯 (MBP) 和邻苯二甲酸单乙基己酯 (MEHP), 在体内蓄积并发挥主要毒性作用, 其与雄性生殖毒性方面的相关性已被证实^[3-4], 但其具体影响机制尚不清楚。睾丸间质细胞的数量和质量直接影响睾酮的合成, 睾酮是维持雄性生殖力的重要激素^[5]。本实验拟探讨 MEHP、MBP 及其联合染毒致小鼠睾丸间质细胞 (TM-3 细胞) 的凋亡作用及凋亡过程中 GRP78-ATF4-CHOP 通路的可能作用, 为研究 MEHP、MBP 雄性生殖毒性可能机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器: HF90 CO₂ 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司, 中国), SW-CJ-1CU 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司, 中国), CKX41 倒置相差显微镜 (Olympus 公司, 日本), Neofuge15R 高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器有限公司, 中国), FACSCalibur 流式细胞仪 (BD 公司, 美国), I510 全波长酶标仪 (赛默飞世尔公司, 美国), LDZM-40KCS-II 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂, 中国), Count star 自动

细胞计数仪、Countstar 细胞计数板 (上海睿钰生物科技有限公司, 中国), azure c200 凝胶成像系统 (Azure Biosystems, 美国)。

主要试剂: TM-3 细胞株 (ATCC 细胞研究中心, 美国), CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒、全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒 (江苏凯基生物技术有限公司, 中国), Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (上海贝博生物, 中国), GRP78 抗体 (Abcam, 美国), ATF4 抗体、CHOP 抗体 (Cell Signaling Technology, 美国), 内参 β -actin 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国), ECL 超敏发光液 (江苏凯基生物技术有限公司, 中国), 辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记山羊抗鼠 (中杉金桥, 中国), MEHP、MBP 标准品 (Sigma, 纯度为 99%, 美国), DMEM 培养基、青链霉素混合液、胰酶、胎牛血清、DMSO 等 (Gibco, 美国)。

MEHP、MBP 染毒溶液的配制: 准确称取适量的 MEHP、MBP 标准品至 1.5 mL 离心管中, 放置在超净工作台上紫外灯照射 30 min 消毒后, 加入 1 mL 无菌的 DMSO 充分震荡溶解得到标准品母液, 使用前用培养基稀释成浓度为 $1\ 600\ \mu\text{mol/L}$ 的高浓度染毒液, 然后倍比稀释至所需浓度, 现用现配, -4°C 保存。

1.2 TM-3 细胞培养并测细胞生长曲线

复苏 TM-3 细胞株, 离心弃去冻存液, 加入新鲜血清浓度为 10% 的完全培养基, 培养 24 h 换液, 待细胞长至铺满培养瓶底 80% 左右弃去旧培养基, 加入 2 mL PBS 缓冲液清洗, 吸弃洗液, 加入 1 mL 胰酶显微镜下观察到细胞变圆, 间隙变大后弃掉胰酶, 加入新鲜配制的

完全培养基 4 mL, 轻柔将细胞吹下制成单细胞悬液, 吸取一半的悬液置于另外一个已经标记好的新培养瓶内。分别在两个培养瓶中各加入 2 mL 完全培养液定容至 4 mL, 混匀, 75% 酒精消毒培养瓶表面后, 将其置于 100% 相对湿度、5%CO₂ 培养箱中培养。按照上述操作将细胞传代三次后消化制成单细胞悬液, 以初始浓度 6.69×10^4 个/mL 传入 10 个培养瓶内, 每隔 12 h 消化, 在 Countstar 细胞计数仪上测量 3 次细胞量, 包括细胞总量、活细胞量、死细胞量, 最后取平均值。持续测量至细胞总量不再增长, 死亡细胞数量开始上升时止。以上实验重复 3 次。

1.3 CCK-8 法检测睾丸间质细胞染毒后的细胞活性

取 TM-3 悬液, 调整浓度为 1.0×10^5 个/mL 的细胞悬液, 加细胞悬液 100 μ L 到 96 孔板, 边缘用 PBS 填充, 第二列为空白对照, 加 100 μ L 培养基。置 37°C, 5%CO₂ 细胞培养箱培养至细胞贴壁并显微镜下观察, 首先从第三列开始分别加入浓度为 0、50、100、200、400、800 μ mol/L 的 MBP、MEHP 和 MBP+MEHP (比例为 1:1), 放入细胞培养箱中 24 h, 取出测量其光密度值 (*D*)。然后按照改良寇氏法计算其半数致死剂量 (*IC*₅₀), 经计算得 MBP 的 *IC*₅₀=390 μ mol/L, MEHP 的 *IC*₅₀=368 μ mol/L, MBP+MEHP 的 *IC*₅₀=497 μ mol/L, 所以后续联合作用实验选取 400 μ mol/L 浓度。另取 96 孔板, 细胞培养同上, 细胞贴壁后于第三列开始加入浓度为 0、MBP (400 μ mol/L), MEHP (400 μ mol/L), MBP (400 μ mol/L) +MEHP (400 μ mol/L) 分别培养至 24、36、48 h 后严格按照 CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒说明书检测细胞 *D*, 按照公式计算染毒物对细胞活性的抑制率。抑制率 = $[(D_{\text{对照组}} - D_{\text{加药组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测睾丸间质细胞凋亡

将状态良好的贴壁 TM-3 细胞制备成浓度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液, 取出无菌的六孔板每孔内先加入 1 mL 培养基克服边缘效应, 再将制备好的细胞悬液混匀每孔内加入 1 mL, 混匀。放入 37°C、5%CO₂ 细胞培养箱培养过夜, 待细胞密度长至 60%~70% 用浓度为 400 μ mol/L 的 MBP、MEHP 和 MBP+MEHP 染毒, 继续放入培养箱培养 24 h 后取出, 镜下观察形态及密度变化情况, 收集细胞悬液, 用不含 EDTA 和酚红的胰酶将细胞收集, 用 PBS 洗涤细胞, 然后严格按照凋亡试剂盒说明书操作, 完成所有染毒组的凋亡检测。

1.5 免疫印迹法检测 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白变化

取细胞悬液调整至 1×10^6 个/mL, 取出半径为 100 mm 的无菌培养皿每皿内加入 8 mL 培养基铺满皿底, 避免边缘效应, 再将提前制备好的适当浓度的细胞悬液 2 mL 接种于每个皿内, 混匀。放入 37°C、5%CO₂ 细胞培养箱培养, 待细胞长至密度 70%~80% 时, 用浓度为 400 μ mol/L 的 MEHP、MBP、MEHP+MBP 染毒, 于培养箱中继续培养 24 h, 严格按照全蛋白提取试剂盒说明书操作, 用 BCA 法检测蛋白浓度, 再按照所测蛋白浓度来配置上样体系, 变性。通过免疫印迹法 (制胶, 上样, 跑胶, 转膜, 剪膜, 封闭, 一抗孵育, 洗膜, 二抗孵育, 洗膜) 检测 GRP78、ATF4 和 CHOP 蛋白的表达量, 并且在 azure biosystems 凝胶成像仪下查看目的蛋白条带, 并应用 Image-Pro plus 软件计算其灰度值。

1.6 统计学方法

每项实验结果稳定后再重复 3 次, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析比较各组差异; 2 $\times$ 2 析因方差分析检验交互作用。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。联合染毒的交互作用分为协同作用和拮抗作用两种, 当 $|(MBP+MEHP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})| > |(MBP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})| + |(MEHP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})|$ 时, 可判定交互作用类型为协同作用; 当 $|(MBP+MEHP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})| < |(MBP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})| + |(MEHP \text{ 组指标} - \text{对照组指标})|$ 可判定交互作用类型为拮抗作用。

2 结果

2.1 小鼠 TM-3 细胞正常状态下生长曲线

从图 1 可知细胞在 24 h 内生长缓慢, 处于贴壁状态, 在 24~48 h 细胞生长进入对数增长期并且死亡细

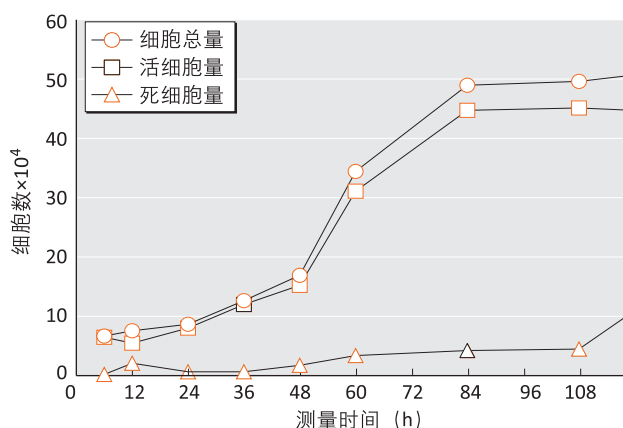


图1 正常小鼠睾丸间质细胞在培养不同时间下细胞生长曲线图

胞量很少,显微镜下观察细胞铺满瓶底 70%~80%,边界清晰,胞质透明,细胞状态处于最佳实验操作阶段,在 48~84 h 内细胞数处于大量增长阶段,死细胞数量也在增加,84~108 h 细胞数量稳定维持,但是死亡细胞数量开始增加,处于接触抑制阶段,显微镜下观察细胞间隙消失,细胞形态模糊,细胞碎片和死亡细胞漂浮数量明显增加,消化所需时间明显延长,已不适合做后续实验。综上所述确定以下实验操作皆在 24~48 h 内完成,保证细胞状态最合适。

2.2 细胞增殖活性

由表 1 可见,与对照组相比,MBP、MEHP 和 MBP+MEHP 组在 400 μmol/L 染毒剂量下细胞活性抑制率均增加,且具有统计学意义 ($P<0.05$),并且 MEHP 染毒组细胞活性抑制率高于 MBP 染毒组。由表 2 可见,经 2×2 析因方差分析,主效应具有统计学意义 ($P<0.05$),交互作用也具有统计学意义 ($P<0.05$),表现为拮抗作用。综合细胞生长曲线最佳实验操作阶段,所以后续实验采取染毒 24 h。

表 1 400 μmol/L MBP 和 MEHP 染毒不同时间对小鼠睾丸间质细胞活性的影响 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h		36 h		48 h	
	光密度 (D)	抑制率 (%)	光密度 (D)	抑制率 (%)	光密度 (D)	抑制率 (%)
对照组	0.96±0.01	0.00±0.00	1.42±0.06	0.00±0.00	0.94±0.05	0.00±0.00
MBP 染毒组	0.55±0.08 ^a	42.99±8.23 ^a	0.66±0.06 ^a	53.12±4.33 ^a	0.57±0.08 ^a	38.98±9.59 ^a
MEHP 染毒组	0.33±0.07 ^a	65.46±8.29 ^a	0.35±0.08 ^a	74.80±4.96 ^a	0.18±0.05 ^a	80.73±4.99 ^a
MEHP+MBP 组	0.45±0.07 ^a	53.21±7.68 ^a	0.29±0.05 ^a	79.87±3.76 ^a	0.13±0.05 ^a	85.97±6.07 ^a

[注] 经单因素方差分析, a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

表 2 MBP 和 MEHP 染毒在不同时间段对细胞抑制率交互作用的方差分析表

染毒物	24 h 光密度 (D)		24 h 抑制率		36 h 光密度 (D)		36 h 抑制率		48 h 光密度 (D)		48 h 抑制率	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
MBP	32.36	<0.01	32.84	<0.01	165.67	<0.01	240.72	<0.01	46.03	<0.01	44.43	<0.01
MEHP	195.75	<0.01	199.00	<0.01	714.02	<0.01	1075.41	<0.01	655.93	<0.01	636.82	<0.01
MBP+MEHP	103.49	<0.01	106.03	<0.01	245.01	<0.01	353.02	<0.01	79.50	<0.01	76.34	<0.01

[注] 经 2×2 析因方差分析。

2.3 细胞凋亡

染毒 24 h 后,与对照组相比,MBP、MEHP 单独染毒组和 MBP+MEHP 联合染毒组小鼠 TM-3 细胞早期凋亡比例和总凋亡比例均增加,差异具有统计学意义;经 2×2 析因方差分析,主效应具有统计学意义 ($P<0.05$),且交互作用具有统计学意义 ($P<0.05$),表现为拮抗作用。见表 3、4。

2.4 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白变化

染毒 24 h 后,经单因素方差分析,与对照组相比,MBP、MEHP 单独染毒组和 MBP+MEHP 联合染毒组均致 ATF4、CHOP、GRP78 蛋白表达量增加,差异有统计学意义 ($P<0.05$);经 2×2 析因设计方差分析,MBP 和 MEHP 染毒在 ATF4、GRP78 蛋白量变化中存在主效应 ($P<0.05$),MBP 在 CHOP 蛋白变化中没有主效应 ($P>0.05$),但 MEHP 存在主效应 ($P<0.05$),在所检测蛋白表达实验结果中均显示 MBP 与 MEHP 的交互作用有统计学意义 ($P<0.05$),表现为拮抗作用。见图 2、3 和

表 5。

表 3 MBP 和 MEHP 染毒 24 h 后致小鼠睾丸间质细胞早期凋亡和总凋亡比例 (n=3, $\bar{x}\pm s$, %)

组别	细胞早期凋亡	细胞总凋亡
对照组	2.65±0.00	10.70±0.60
MBP 染毒组	14.58±0.97 ^a	29.46±0.58 ^a
MEHP 染毒组	17.44±0.82 ^a	44.24±0.89 ^a
MEHP+MBP 组	8.58±0.35 ^a	32.28±0.41 ^a

[注] 经单因素方差分析, a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

表 4 MBP 和 MEHP 染毒 24 h 后小鼠睾丸间质细胞早期凋亡和总凋亡交互作用的方差分析表

染毒物	早期凋亡		总凋亡	
	F	P	F	P
MBP	16.27	<0.01	83.48	<0.01
MEHP	134.01	<0.01	2387.93	<0.01
MBP+MEHP	747.73	<0.01	1705.89	<0.01

[注] 经 2×2 析因方差分析。

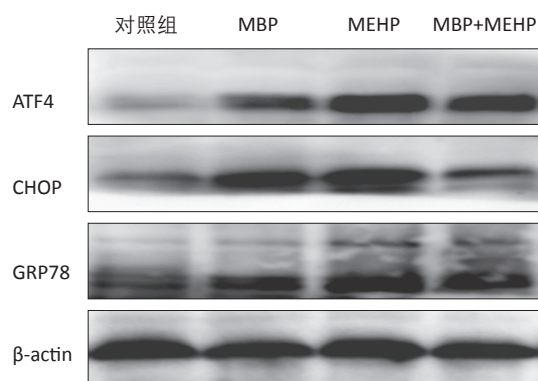


图2 免疫印迹法测出 GRP78、CHOP、ATF4 蛋白变化趋势

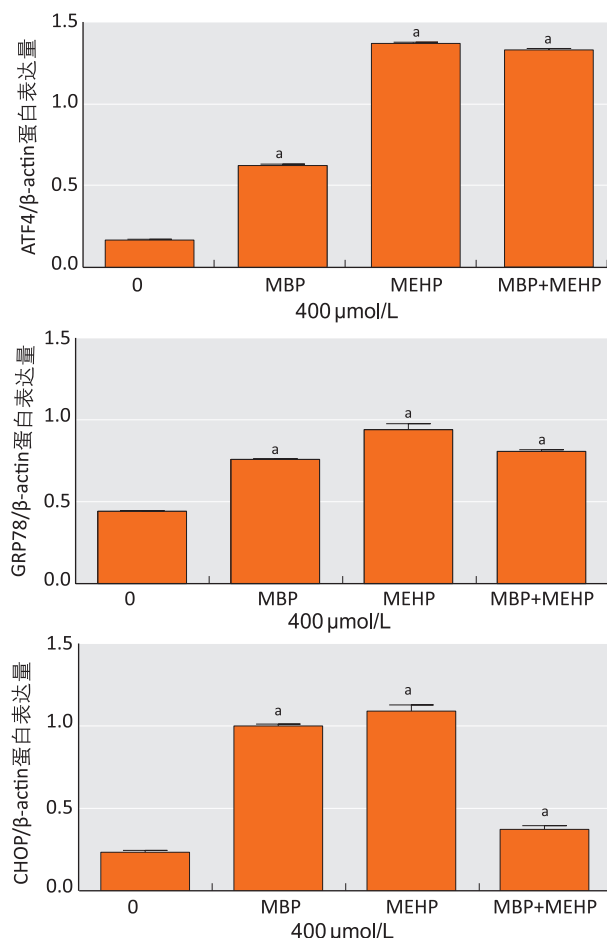
[注] 经单因素方差分析, a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图3 ATF4、CHOP、GRP78 蛋白变化统计图

表5 染毒 24 h 后小鼠睾丸细胞裂解液中 ATF4、GRP78 和 CHOP 蛋白变化趋势的交互作用

染毒物	ATF4/β-actin		GRP78/β-actin		CHOP/β-actin	
	F	P	F	P	F	P
MBP	3 391.88	<0.01	74.20	<0.01	3.32	0.11
MEHP	73 968.79	<0.01	647.80	<0.01	70.99	<0.01
MBP+MEHP	5 078.19	<0.01	436.82	<0.01	3 015.16	<0.01

[注] 经 2×2 析因方差分析。

3 讨论

邻苯二甲酸酯类物质作为塑化剂大量应用于工

业、农业、日化用品的生产中,通过消化道、皮肤接触和注射等方式进入体内,其中经口膳食和饮水是该类物质进入人体的主要方式^[6-8]。在体内对生殖能力的主要影响之一是通过干扰生殖相关激素的合成^[9-10],睾丸是邻苯二甲酸酯类物质侵犯的主要器官^[11-12]。睾酮是维持正常雄性生殖能力的重要激素之一,本课题组前期研究证实 MBP、MEHP 单独染毒或者联合染毒均能引起睾酮合成的减少,并且存在交互作用,表现为拮抗作用。睾丸间质细胞是产生睾酮的主要细胞,间质细胞的活力和数量是影响生殖力的主要因素。细胞活力的变化可反映 MBP、MEHP 的毒性效应,细胞的凋亡可直接导致细胞数量的变化。本研究结果显示,MBP、MEHP 单独染毒及两者联合染毒均可抑制细胞活性,并且存在交互作用 ($P < 0.05$),表现为拮抗作用,这个结果与本课题组前期所检测的相关生殖激素表达结果相同^[13]。

进一步深入研究 MBP、MEHP 对小鼠睾丸间质细胞凋亡的影响,研究结果表明,MBP、MEHP 单独染毒及两者联合染毒均可引起细胞凋亡,且在相同染毒浓度下,MEHP 染毒组致细胞凋亡比例较 MBP 染毒组致细胞凋亡比例大,这个结果与上述两种物质在其相关凋亡通路基因和蛋白表达方面的影响相似^[14]。两者联合染毒具有交互作用,表现为拮抗作用。

GRP78 蛋白作为内质网应激标志蛋白,当其表达含量增加时,表明引起内质网应激 (endoplasmic stress, ERS) 事件^[15]。ERS 发生后,内质网 I 型跨膜蛋白 PERK 发生磷酸化,进而特异性诱导翻译起始因子 2 的 α (eif2 α) 亚基第 51 位丝氨酸的磷酸化, p-eif2 α 可上调 ATF4 的表达,ATF4 在内质网应激体系中诱导 CHOP 的表达,CHOP 活化后激活下游促凋亡蛋白 BCL-2 类蛋白,上述一系列反应即可促使细胞凋亡^[16-17]。上述结果表明,内质网应激介导的细胞凋亡途径参与了在环境内分泌干扰物致雄性生殖细胞的凋亡过程。

本研究结果显示,MBP、MEHP 单独染毒及两者联合染毒均可引起 GRP78、ATF4 和 CHOP 蛋白的表达量增加,表明睾丸间质细胞的凋亡有 GRP78-ATF4-CHOP 通路的参与。MBP、MEHP 联合染毒对 GRP78、ATF4、CHOP 含量的影响表现为拮抗作用,所以这与邻苯二甲酸酯类物质联合染毒致细胞凋亡相关基因方面的研究结果一致^[18-19]。该拮抗作用可能是由于其两种物质属于同系物,具有大小不同的侧链基团,所以侧链基团较大的在竞争性进入细胞内是不占优势的^[20],对细胞

的最终毒作用主要是进入的有效剂量发挥作用, 导致两种毒物联合作用反而没有其单一染毒的毒作用大^[21-22]。

本实验不足之处在于毒理实验证实两种毒物的联合作用过程中没有设置浓度梯度, 只有一个剂量, 且只有一个染毒时间段, 毒理实验毒作用效果比较复杂, 多数呈现低剂量促进作用、高剂量抑制作用的结果, 本次实验剂量设置在半数致死剂量, 属于高浓度范围, 后期我们会进一步设置浓度梯度和时间梯度研究其具体机制。在MBP和MEHP染毒致TM-3细胞凋亡过程中, 研究GRP78-ATF4-CHOP通路的作用时没有进行上下游蛋白基因的控制等深入研究, 也没有加入阻断剂或其他类似辅助实验, 所以后续实验应该补充相关实验内容。

参考文献

- [1] 张叶, 蒋旭超, 钱海, 等. 内质网应激与金属毒作用机制关系的研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(10): 922-925.
- [2] 丁文斌, 戴佳敏, 张峰, 等. 内质网应激在肝脏相关疾病中的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(2): 260-264.
- [3] 吴德生, 秦道云, 谭琴, 等. 邻苯二甲酸酯类化合物的生殖毒性及其环境内分泌干扰效应[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(4): 316-318, 322.
- [4] 袁建辉, 徐新云. 邻苯二甲酸酯类塑化剂的毒理学研究进展[C]//毒理学史研究文集第十七集-毒物历史文化与博物馆研讨会. 陕西: 西北大学生态毒理研究所, 2018: 39-44.
- [5] 张阳海, 李永, 曹迪, 等. 睾酮对动物生殖和生长发育影响的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2018, 39(1): 1-7.
- [6] 曹龙, 张朝升, 陈秋丽, 等. 邻苯二甲酸酯的环境污染和生态行为及毒理效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 34-46.
- [7] 黄旭峰, 谢忠罗, 黄正国, 等. 环境内分泌干扰物与儿童性发育异常的相关性研究[J]. 中国性科学, 2014, 23(11): 14-17.
- [8] 葛建, 胡华军, 林芳, 等. PAEs类化合物对雄性小鼠的联合致毒作用[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(5): 753-757.
- [9] 高海涛, 李瑞仙, 邱倩南, 等. 我国人群邻苯二甲酸酯类的暴露水平及风险[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(6): 471-475.
- [10] 王晓南, 张瑜, 王婉华, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)污染及其毒性研究进展[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3): 135-150.
- [11] 张开创, 李娉, 崔璐璐. DEHP及DES对大鼠睾酮合成关键酶基因表达影响和隐睾机制的探究[J]. 中国生育健康杂志, 2015, 26(1): 33-37.
- [12] 李恩惠, 魏海彬, 黄邦高, 等. 邻苯二甲酸二丁酯导致雄性大鼠尿道下裂畸形及其机制研究[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(12): 1063-1068.
- [13] 李娅辉, 李玲, 李丽萍, 等. 邻苯二甲酸单丁酯和邻苯二甲酸单乙基己酯联合染毒对小鼠睾丸间质细胞睾酮合成的影响[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(1): 14-16.
- [14] ZHU Y D, GAO H, HUANG K, et al. Prenatal phthalate exposure and placental size and shape at birth: A birth cohort study[J]. Environ Res, 2018, 160: 239-246.
- [15] 张国伟. DBP致男(雄)性生殖毒性中内质网应激及线粒体损伤的作用机制研究[D]. 昆明: 第三军医大学, 2016.
- [16] 张国伟, 刘晋祚, 曹佳, 等. 内质网应激介导的细胞自噬在DBP诱导小鼠生精细胞凋亡中的作用研究[C]//全国卫生毒理学术研讨会论文集. 北京: 中华预防医学会卫生毒理专业委员会, 2014: 160-161.
- [17] 陈媛, 谢春, 张华, 等. 持续氟铝联合暴露对子代大鼠骨组织蛋白激酶R样内质网激酶-酸化真核细胞起始因子2 α -激活转录因子4信号通路的影响[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(4): 301-304.
- [18] PANT N, KUMAR G, UPADHYAY A D, et al. Reproductive toxicity of lead, cadmium, and phthalate exposure in men[J]. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21(18): 11066-11074.
- [19] FIANDANESE N, BORROMEO V, BERRINI A, et al. Maternal exposure to a mixture of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and polychlorinated biphenyls (PCBs) causes reproductive dysfunction in adult male mouse offspring[J]. Reproduct Toxicol, 2016, 65: 123-132.
- [20] DING K, LU L, WANG J, et al. In vitro and in silico investigations of the binary-mixture toxicity of phthalate esters and cadmium (II) to *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67[J]. Sci Total Environ, 2017, 580: 1078-1084.
- [21] DING K, KONG X, WANG J, et al. Side chains of parabens modulate antiandrogenic activity: in vitro and molecular docking studies[J]. Environ Sci Technol, 2017, 51(11): 6452-6460.
- [22] LONG X, WANG D, LIN Z, et al. The mixture toxicity of environmental contaminants containing sulfonamides and other antibiotics in *Escherichia coli*: differences in both the special target proteins of individual chemicals and their effective combined concentration[J]. Chemosphere, 2016, 158: 193-203.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 邱丹萍; 校对: 王晓宇)