DOI:10.16016/j.1000-5404.202009210

双酚 A 致雄性生殖损害毒性通路的富集分析及关键凋亡信号通路的实验研究

袁文博[1],刘文斌[2],陈洪强[2],柴子力[2],张光辉[1],曹 佳[2] 453001 河南 新乡,新乡医学院公共卫生学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所[2]

[摘要] **目的** 探讨低剂量双酚 A(bisphenol A,BPA)暴露导致的雄性生殖损伤中可能涉及的关键毒性通路。**方法** 利用比较毒理基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)筛选 BPA 毒性相关基因,对其进行功能富集,探索可能的作用通路,确认相关通路中的关键基因。采用终浓度为 0(DMSO 对照组)、20、40、80 μmol/L BPA 处理小鼠精原细胞株 GC-2 细胞 72 h,观察细胞形态并检测凋亡发生率,采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测关键基因 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 通过对 CTD 数据库中 BPA 相关的疾病进行筛选,得到 1 460 个相关基因,GO 富集分析发现这些基因在生殖系统发育、生殖结构发育等分子生物过程中有明显富集,KEGG 富集分析发现其在 HIF-1 和 PI3K-Akt 等信号通路中有明显富集($P<0.01$)。可视化分析后得到通路上的关键基因分别为 HIF-1α、PKC、P300/CBP 以及 PI3K、JAK、P53、BCL-2。BPA 染毒 GC-2 细胞,发现凋亡率上升,且存在剂量-效应关系($P<0.05$)。与对照组相比,染毒组 PI3K 和 JAK 的 mRNA 表达下调,P53 和 BCL-2 上调($P<0.05$);PI3K 和 BCL-2 的蛋白水平下调,P53 则上调($P<0.05$)。**结论** PI3K-Akt 信号通路在低剂量 BPA 暴露致 GC-2 细胞凋亡过程中可能发挥重要作用。

[关键词] 双酚 A;比较毒理基因组学数据库;GC-2 细胞;细胞凋亡;PI3K-Akt 信号通路;男性泌尿生殖系统疾病

[中图法分类号] R394.1; R698; R994.6 [文献标志码] A

Enrichment analysis and experimental study of BPA-induced male reproductive damage toxicity pathways and key apoptosis signaling pathways

YUAN Wenbo[1], LIU Wenbin[2], CHEN Hongqiang[2], CHAI Zili[2], ZHANG Guanghui[1], CAO Jia[2] [1]School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan Province, 453001; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the possible key pathways in the male reproductive toxicity induced by exposure to low-dose bisphenol A (BPA). **Methods** BPA-related genes were screened based on Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Functional enrichment analysis was used for these genes to explore the possible pathways and identify the key genes in related pathways. Mouse spermatogonia cell line GC-2 cells were treated with BPA at a final concentration of 0 (DMSO control group), 20, 40 and 80 μmol/L for 72 h. Then the changes of cell morphology and apoptotic rate were observed. The mRNA and protein expression levels of the obtained key genes were detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** A total of 1 460 BPA-related genes were screened out from the CTD database. Gene Ontology (GO) enrichment analysis showed that these genes were significantly enriched in molecular biological processes, such as reproductive system development and reproductive structure development, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis found that they were significantly enriched in HIF-1 and PI3K-Akt signaling pathways ($P<0.01$). Visual analysis showed that the key genes in the pathway were HIF-1α, PKC and P300/CBP, and PI3K, JAK, P53 and BCL-2. The apoptotic rate of GC-2 cells exposed to

[基金项目] 国家重点研发计划(2017YFC1002001);国家自然科学基金重点项目(81630087)

[通信作者] 曹 佳,E-mail: caojia1962@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

BPA was significantly increased in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the control cells, the mRNA expression levels of PI3K and JAK were significantly down-regulated, while those of P53 and BCL-2 were up-regulated ($P<0.05$). The protein levels of PI3K and BCL-2 were obviously down-regulated, while that of P53 up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** The PI3K-Akt signaling pathway may play an important role in the process of GC-2 cell apoptosis induced by low-dose BPA exposure.

[**Key words**] bisphenol A; CTD database; GC-2 cells; apoptosis; PI3K-Akt signaling pathway; male urogenital disease

Supported by the National Key R&D Program of China (2017YFC1002001) and the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81630087).
Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

双酚 A(bisphenol A,BPA)是一种广泛使用的工业增塑剂,被用作生产塑料的添加剂、食品和化妆品中的抗氧化剂等[1]。环境是人类接触双酚 A 的来源之一,但饮食摄入被认为是人类接触的主要途径[2]。作为重要的内分泌干扰物之一,BPA 可通过类激素作用破坏正常的内分泌功能[3-4]。已有研究报道双酚 A 可通过多种细胞信号通路对生物体产生生殖毒性作用[5-6]。流行病学调查数据和实验室研究发现 BPA 暴露与男性精液质量下降、精子数量减少、生殖器官发育异常、性激素生成紊乱等呈显著正相关[7]。动物研究的大量数据表明:即使在非常低的剂量下,双酚 A 对雄性生殖系统也有明显的影响[8]。因此,环境中低水平 BPA 暴露对生殖健康的威胁应引起人们的重视。

比较毒理基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)是一个强大的、公开可用的精选数据库。它描述了化学物-基因/蛋白质相互作用、化学物-疾病和基因-疾病之间的关系,旨在促进人们对环境化学品影响人类健康的了解[9-12]。本研究通过 CTD 数据库筛选与 BPA 暴露相关的男性泌尿生殖系统疾病及其相关基因,将基因数据与功能和通路数据相结合,采用功能富集的方法探索环境中低剂量 BPA 影响男性泌尿生殖系统疾病可能涉及的信号通路及潜在机制,并进一步采用不同浓度的 BPA 处理小鼠精母细胞株 GC-2,检测相关通路关键基因的表达水平。本研究将为 BPA 暴露的实验室研究提供新的思路,并对 BPA 暴露相关的男性泌尿生殖系统的诊断与治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 高糖培养基 DMEM 购于美国 Gibco 公司;血清为低内毒素胎牛血清;双酚 A、二甲基亚砜购于美国 Sigma 公司;逆转录试剂盒以及 2× Go*Taq*® qPCR GreenMaster Mix 购于美国 Promega 公司;蛋白裂解液、蛋白浓度测定试剂盒以及 SDS-PAGE 配胶试剂盒购于上海的碧云天公司;抗体 PI3K、P53、BCL-2、ACTIN 均购于美国 Santa Cruz 公司。

1.1.2 细胞株 小鼠的精母细胞系 GC-2 购于美国 ATCC 细胞库。GC-2 细胞采用含有 5%~10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,细胞培养箱的培养条件:5%CO_2,95%空气,37 ℃恒温,湿度为 70%~80%。

1.2 方法

1.2.1 CTD 数据库筛选基因 以“Chemials”为关键词在 CTD 数据库搜索化学物“BPA”,检索与 BPA 相关的“Diseases”,共有 5 734 条记录。在“Disease category”中选择“Urogenital disease(male)”进行筛选,共筛选出男性泌尿生殖系统疾病记录 368 条,将这些疾病涉及的 1 460 个基因组成 BPA 相关基因集。

1.2.2 基因集生物功能及通路分析 将上述基因集用 R 语言进行 GO 生物学过程的富集分析以及 KEGG 代谢途径的富集分析,研究基因集中的基因参与的生物学过程以及信号通路。由于 GO 和 KEGG 富集分析的柱状图和气泡图只能显示最显著的富集术语,为了考虑 1 个基因可能属于多个注释类别的潜在生物学复杂性,用 R 语言行可视化分析(Enrichment Map、Cnetplot、Pathview 等)。Enrichment Map 将富集的术语组织成 1 个网络,其边缘连接重叠的基因集。相互重叠的基因集倾向于聚集在一起,从而易于识别其功能。点越大代表上述基因集中和该生物学过程相关的基因越多。Cnetplot 属于 Gene-Concept Network,其将基因和生物学途径之间的联系描述为 1 个网络,可以直观地观察到这些条目涉及的基因以及条目之间的交互基因。Pathview 是用于基于通路的数据集成和可视化的工具集,它在相关的通路图上绘制和呈现各种各样的生物数据。使用 Pathview 将 KEGG 通路可视化。

1.2.3 细胞染毒 将 GC-2 细胞按 2×10^5/皿接种于 10 cm^2 培养皿中,生长 24 h 后,进行 BPA 染毒。BPA 粉剂使用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成浓度为 0、20、40、80 mmol/L 的储备液,染毒时用含 6%~10%胎牛血清的 DMEM 培养基稀释,使其终浓度为 0

(DMSO 对照组)、20、40、80 μmol/L。染毒 72 h 后显微镜下观察细胞生长情况并拍照。

1.2.4 提取 RNA GC-2 细胞染毒 72 h 后,弃去培养基,每个皿中加入 1 mL TRIzol 吹打至细胞全部脱落,用无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管收集并做好标记,涡旋振荡 1 min,冰上静置 10 min 后,各 EP 管分别加入 400 μL 三氯甲烷,上下振荡混匀并于冰上静置 10 min 后,12 000 r/min,4 ℃离心 20 min。离心完成后,小心将上清转移到新的 1.5 mL EP 管中,加入同上清相等体积的 4 ℃预冷的异丙醇,混匀后-20 ℃放置 1~2 h,12 000 r/min,4 ℃离心 20 min,弃去上清可观察到沉淀即为 RNA。每管加入 75%乙醇(现用现配)1.0 mL,上下轻轻颠倒几次后,12 000 r/min,4 ℃离心 20 min。小心弃掉上清,室温倒扣放置 10 min 左右至乙醇晾干,加入适量超纯水溶解混匀后,测 RNA 浓度,-80 ℃冰箱低温保存。

1.2.5 RNA 逆转录以及实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 取上述 RNA 2 μg 用 Promega 公司的 GoScript™ 逆转录试剂盒的两步法逆转录合成 cDNA,具体步骤参考内置说明书;将逆转录的 cDNA 稀释后,使用该公司的 qPCR Mix 进行 RT-qPCR 实验(引物序列见表 1)。采用三步法进行扩增,第 1 步(预变性):95 ℃,40 s;第 2 步(变性-退火-延伸):95 ℃,40 s 进行变性;60 ℃,40 s 进行退火;72 ℃,50 s 开始延伸;共 45 个循环;第 3 步(绘制熔解曲线):72 ℃,5 min。每个样品 3 个复孔,内参为 β-actin,PCR 结果使用公式 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 进行量化分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	序列(5′→3′)	产物长度/bp
BCL-2	正向:GACTGAGTACCTGAACCGGC 反向:AGTTCCACAAAGGCATCCCAG	72
HIF-1α	正向:CGCCTCTGGACTTGTCTCTT 反向:CGACGTTCAGAACTCATCCTATTTT	164
JAK	正向:CGTGTCGCCGGCCAAT 反向:AGGTTGCCTCCATTTCTGTCA	78
P300/CBP	正向:GGAAAGCCTGCCAAGTTGC 反向:ACAGTCATGTCGTGTGCAGT	80
P53	正向:ATTCAGGCCCTCATCCTCCT 反向:CCATGGCAGTCATCCAGTCT	70
PI3K	正向:CCATTACAAAGAAAGCCGGACTC 反向:GGGGGCAGTGCTGGTG	180
PKC	正向:CCCCTTGGAATTGTATGAGAGAGT 反向:AGTCAGAGATATGCAGGCGT	131
β-actin	正向:ACTATTGGCAACGAGCGGTT 反向:GCCACAGGATTCCATACCCAA	75

1.2.6 Western blot 检测 GC-2 细胞染毒 72 h 后,弃去培养基,用预冷的 PBS 洗大皿 2 次后,加入适量蛋白裂解液裂解细胞,用刮子将细胞刮下并吸入 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min,4 ℃离心 0.5 h,上清即为细胞蛋白。使用碧云天蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度,蛋白变性后于-20 ℃保存。配好胶后,每个样本各取 20 μL 进行电泳,PVDF 膜封闭后,分别加入稀释比为 1∶1 000 的鼠来源 β-catenin 抗体、鼠来源 PI3K 抗体、兔来源 P53 抗体、兔来源 BCL-2 抗体,4 ℃孵育 10~12 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10~15 min,室温孵育二抗 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10~15 min,最后曝光显影分析各条带。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件。数据为至少 3 次实验的平均值,采用 *t* 检验分析两组 GC-2 细胞凋亡率以及各基因在两组间的表达差异。检验水准:$\alpha = 0.05$。

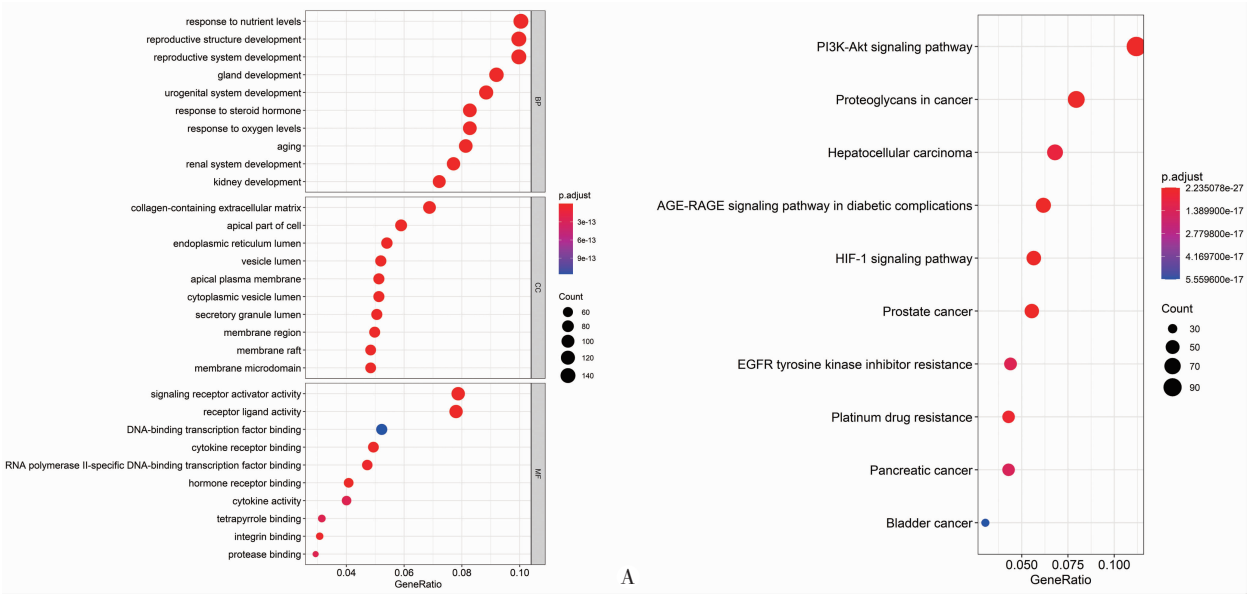
2 结果

2.1 与 BPA 有关的男性泌尿生殖系统疾病的基因

在 CTD 数据库中共筛选出与 BPA 有关的男性泌尿生殖系统疾病相关基因共 2 224 个,出现次数≥10 次的基因分别是 ALB(15 次)、POMC(14 次)、AGT(14 次)、TGFB1(13 次)、SOD2(12 次)、TP53(10 次)、REN(10 次)、PTGS2(10 次)、NOS3(10 次)、EDN1(10 次)、ACE(10 次)。ALB、AGT、TGFB1、SOD2 参与细胞的凋亡,提示暴露 BPA 可能会导致 GC-2 的凋亡。PTGS2、EDN1 与细胞增殖有关,提示这些基因表达的改变可能和 GC-2 细胞增殖有关。因此,在 BPA 暴露诱导泌尿生殖系统相关疾病中,上述基因表达的改变可能是关键事件。最后从 2 224 个基因中筛选出无重复的基因 1 460 个,组成 1 个基因集进行下一步的研究。

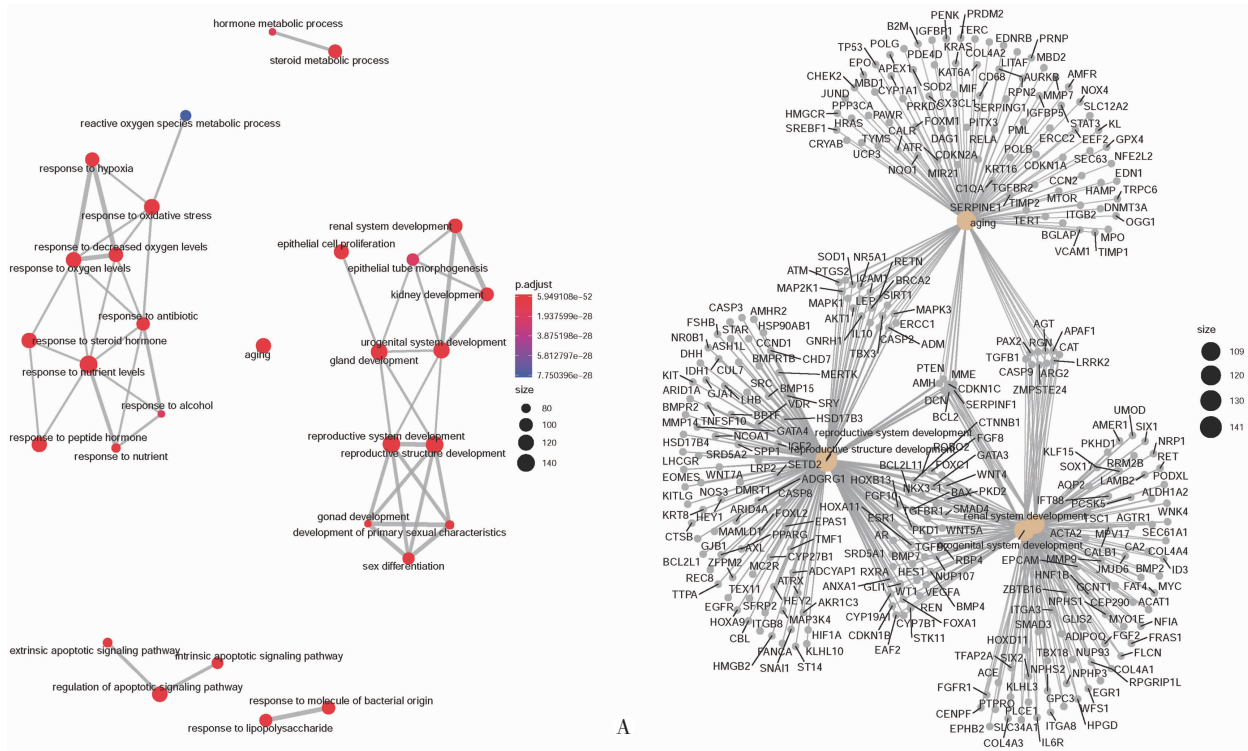
2.2 BPA 相关基因的 GO 和 KEGG 分析

利用 R 语言对上述基因集进行 GO 和 KEGG 富集分析。从生物学途径(biological processes, BP)、细胞组分(cellular components, CC)、分子功能(molecular function, MF)3 个角度对基因的功能进行分析,得到 GO 条目 3 801 个($P<0.05$),其中相关的 BP 有 3 391 个,CC 有 159 个,MF 有 251 个,其中 GO_BP 主要和泌尿生殖系统、生殖结构发育、生殖系统发育生物学过程等有关(图 1A)。图 1B 列举了 KEGG 分析中显著性最高的 10 条通路,包括 PI3K-Akt 信号通路($P<0.001$)、HIF-1 信号通路($P<0.001$)等,提示 BPA 暴露可能通过上述生物学进程和通路作用于男性泌尿生殖系统。



A:显著性前 10 的 GO 富集结果;B:显著性前 10 的 KEGG 富集结果

图 1　BPA 相关基因 GO、KEGG 富集分析气泡图



A:Enrichment Map　显示 GO 条目显著性前 30 的 BP 之间的关联;B:Cnetplot　显示 GO 条目显著性前 5 的 BP 之间的交互基因

图 2　BPA 相关基因互作网络分析图

2.3　BPA 相关基因互作网络分析

图 2A 显示了不同 BP 之间的关联度大小,与其他 BP 关联度较高的几个 BP 分别是对营养水平的应答、对氧气水平的应答、生殖结构发育、生殖系统发育、泌尿生殖系统发育,进一步提示上述生物学进程在 BPA 暴露作用于男性泌尿生殖系统中可能发挥重要作用。

Cnetplot 分析可以直观地观察到各 GO_BP 之间的交互基因,见图 2B 中交叉部分。从图中可见这 5 个 BP 之间有很多交互基因,如 BCL-2、PTEN、AMH、DCN、MME、CDKN1C、SERPINF1 等,提示这些交互基因可能是 BPA 作用的关键靶点,并在生殖系统发生、发展中发挥更大的作用。

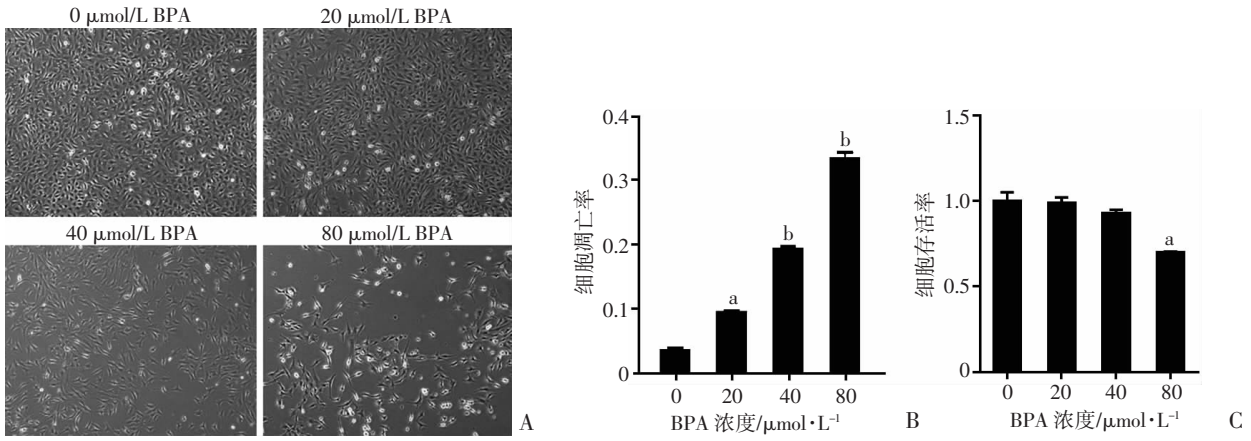
将图 1B 富集分析出来的两条信号通路(HIF-1、PI3K-Akt)使用路径视图可视化选择映射在通路中较为关键的基因。HIF-1 信号通路的关键基因为 HIF-1α、P300/CBP、PKC,PI3K-Akt 信号通路的关键基因为 PI3K、JAK、P53、BCL-2。

2.4 BPA 染毒 72 h 各组 GC-2 细胞镜下形态学观察以及细胞凋亡率

建立低剂量 BPA 染毒 GC-2 细胞模型:使用终浓度为 0、20、40、80 μmol/L BPA 处理 GC-2 细胞 72 h。镜下观察结果显示:对照组和低剂量组(20 μmol/L)GC-2 细胞形态、大小正常,数量较多,空泡细胞较少(图 3A)。随着 BPA 剂量的增大,GC-2 细胞数量明显减少,出现较多的空泡细胞,高剂量(80 μmol/L)组尤为明显。从图 3B、C 可以明显看出各个剂量组细胞的凋亡情况以及细胞存活率,与 DMSO 对照组相比,凋亡率均明显上升,细胞存活率下降($P<0.05$)。

2.5 BPA 染毒 72 h 各组 GC-2 细胞中 PI3K-Akt、HIF-1 信号通路关键基因 mRNA 的表达

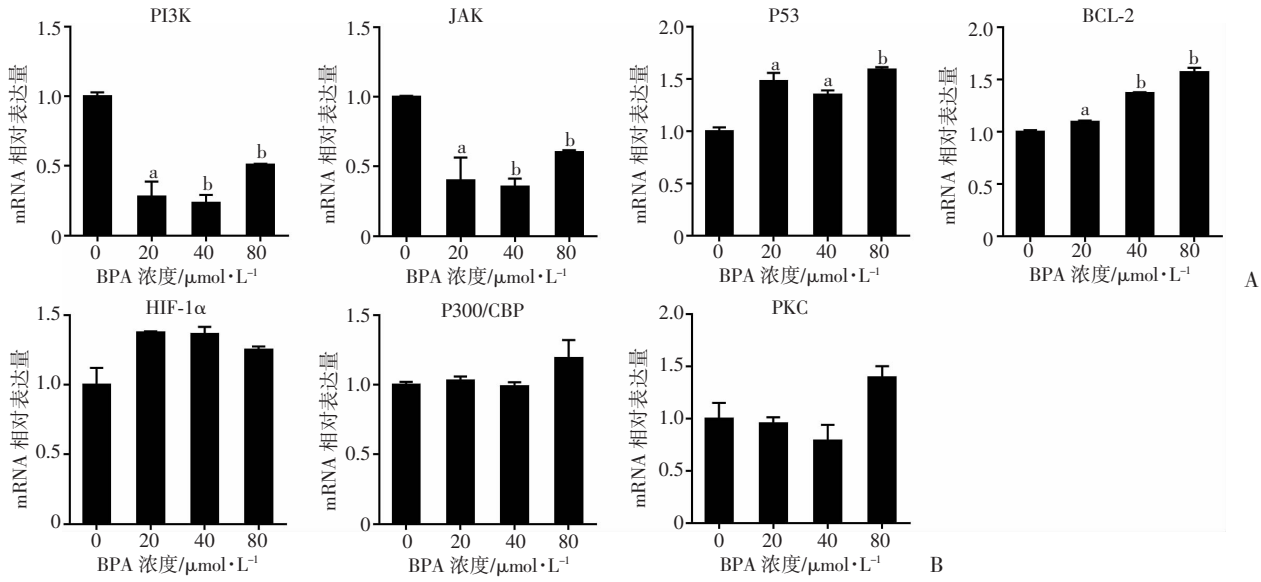
采用 RT-qPCR 对 PI3K-Akt 信号通路的关键基因 PI3K、JAK、P53、BCL-2 和 HIF-1 信号通路的关键基因 HIF-1α、PKC、CBP 在 BPA 染毒 GC-2 细胞 72 h 的 mRNA 表达进行检测,结果发现:PI3K-Akt 信号通路的关键基因 PI3K 和 JAK 下调,P53、BCL-2 上调($P<0.01$,图 4A)。HIF-1 信号通路的关键基因 HIF-1α、PKC、CBP 并无明显变化(图 4B)。提示 BPA 可能通过 PI3K-Akt 信号通路调控 GC-2 细胞的凋亡。



a:$P<0.05$,b:$P<0.001$,与 0 μmol/L(DMSO 对照组)比较

A:细胞形态(光学显微镜×100);B:细胞凋亡率;C:细胞存活率

图 3 不同浓度 BPA 染毒 72 h GC-2 细胞凋亡情况

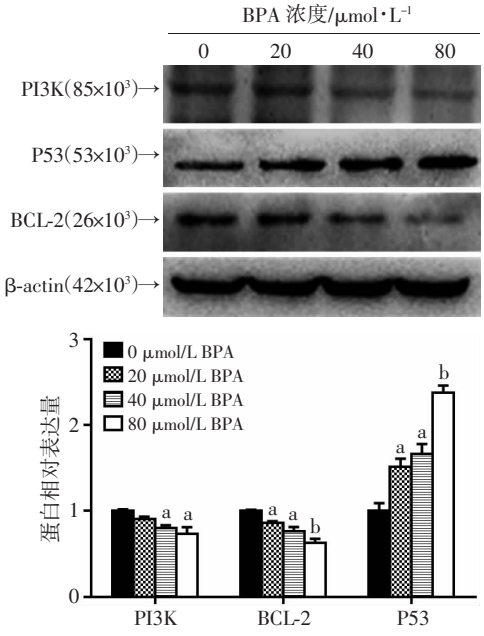


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L(DMSO 对照组)比较

图 4 RT-qPCR 检测不同浓度 BPA 染毒 72 h GC-2 细胞中 PI3K-Akt(A)和 HIF-1(B)信号通路关键基因的 mRNA 表达

2.6　BPA 染毒 72 h 各组 GC-2 细胞中 PI3K-Akt 信号通路关键基因的蛋白表达

Western blot 检测结果(图 5)显示:BPA 染毒 GC-2 细胞 72 h 后,PI3K 和 BCL-2 的蛋白水平下调($P<0.05$),P53 蛋白水平上调($P<0.05$),进一步提示 BPA 可能通过 PI3K-Akt 信号通路调控 GC-2 细胞的凋亡。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L(DMSO 对照组)比较

图 5　Western blot 检测不同浓度 BPA 染毒 72 h GC-2 细胞中 PI3K-Akt 信号通路关键基因的蛋白表达

3　讨论

BPA 是人类接触范围最广的化学污染物,涉及到近 90%的人群。作为一种常见的内分泌干扰物,BPA 对生殖功能的干扰引起了极大的关注[13]。在小鼠中,高剂量 BPA 暴露会增加流产的概率,而低剂量 BPA 暴露会对性别分化、大脑发育、免疫系统和行为造成长期的干扰[8]。在人类中,暴露于双酚 A 会导致糖尿病、心血管疾病、肥胖、精子质量下降,并增加生殖损失的风险[14]。

本研究在传统毒理学的基础上,通过 CTD 数据库中的"大数据"筛选出和 BPA 暴露相关的男性泌尿生殖系统疾病以及相关基因。通过 GO 和 KEGG 的富集分析,找到两条可能相关的信号通路:HIF-1 信号通路及 PI3K-Akt 信号通路。通过查阅相关研究[15-17]以及可视化分析后分别找到两条通路的关键基因,HIF-1 信号通路的关键基因为 HIF-1α、CBP、PKC,PI3K-Akt 信号通路的关键基因为 PI3K、JAK、P53、BCL-2。后续通过实验研究发现 BPA 染毒 GC-2 细胞 72 h 后,细胞数量明显减少,凋亡率随着染毒剂量的增大而上升,并且存在剂量-效应关系。在进一步的实验中,对数据库筛选出的 HIF-1 以及 PI3K-Akt 这两条通路进行相关实验验证。

HIF-1 信号通路中的关键基因 HIF-1α 是低氧诱导因子,HIF-1α 可通过激活许多编码基因的转录,进而参与如红细胞生成,血管形成,糖、氨基酸、核苷酸的能量代谢,细胞存活、凋亡、分化等生物学效应,使内环境在缺氧条件下维持稳定,以适应缺氧。同时,HIF-1 在很多种病理情况下发挥着重要的作用,诱导正常细胞分化为肿瘤细胞。有研究表明将患有精索静脉曲张的大鼠睾丸 HIF-1α 基因敲除后,生精细胞凋亡明显减少,睾丸生精功能明显改善。HIF-1α 可能在精索静脉曲张导致的男性不育的生精过程中起重要作用[15]。但本研究并未发现 BPA 染毒 GC-2 细胞 72 h 后 HIF-1 信号中关键分子 mRNA 表达有改变,可能是因为该信号通路主要在缺氧环境下发挥生理作用,而本研究的对象主要是 BPA 染毒的 GC-2 细胞而并非缺氧环境。

PI3K-Akt 信号通路受多种机制的高度调节,通常与其他信号通路共同发挥作用。PI3K 被上游信号通路激活后与 Akt 和 PDK1 结合导致 Akt 的活化。Akt 信号传导途径在许多细胞存活途径中起着重要的调节作用,主要是作为细胞凋亡的抑制剂。活化的 Akt 通过形成磷酸化来改变下游靶分子的活性,进而调节细胞迁移、细胞凋亡、细胞增殖、细胞分化、细胞周期、葡萄糖代谢、蛋白质的合成等。此外,Akt 在心脏生长、血管生成、生理性心脏肥大以及病理性心肌肥大等生理病理过程中起着重要作用,是心血管疾病的关键参与者。JAK 是一种非受体型的酪氨酸蛋白激酶。JAK-STAT 信号通路是由细胞因子刺激的信号转导通路,参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程。本研究中 PI3K 和 JAK 表达的下调与细胞凋亡呈正相关关系,PI3K 和 JAK 的激活会抑制细胞凋亡[16-17],这与文献[5-6]报道的结果一致。P53 和 BCL-2 都是凋亡相关蛋白,不同的是 P53 是促凋亡蛋白,而 BCL-2 是抑凋亡蛋白[18]。本研究结果显示:P53 作为促凋亡蛋白,mRNA 和蛋白表达均显著上调;而 BCL-2 作为一个抑凋亡蛋白,mRNA 水平升高,蛋白水平降低,表明 BCL-2 在 BPA 致 GC-2 细胞凋亡过程中在蛋白水平发挥抑凋亡蛋白作用。

本研究采用生物信息学分析与实验研究相结合的方式,利用 CTD 数据库筛选与 BPA 毒性相关的基因,辅以实验验证,弥补了以往单一生物信息学分析或传

统实验研究方法的局限性。本研究结果提示 PI3K-Akt 信号通路可能是低剂量 BPA 诱导 GC-2 细胞凋亡的重要通路,后续我们将从细胞、动物、人群 3 个方面对低剂量 BPA 暴露如何通过调控 PI3K-Akt 信号通路的关键靶分子导致小鼠精母细胞凋亡的机制进行更深入的探索。

参考文献:

[1] MURATA M, KANG J H. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(1): 311-327. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.002.

[2] DE TONI L, DE ROCCO PONCE M, PETRE G C, *et al*. Bisphenols and male reproductive health: from toxicological models to therapeutic hypotheses[J]. Front Endocrinol, 2020, 11: 301. DOI:10.3389/fendo.2020.00301.

[3] RYU D Y, RAHMAN M, PANG M G. Determination of highly sensitive biological cell model systems to screen BPA-related health hazards using pathway studio[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 1909. DOI:10.3390/ijms18091909.

[4] RAHMAN M S, PANG M G. Understanding the molecular mechanisms of bisphenol A action in spermatozoa[J]. Clin Exp Reprod Med, 2019, 46(3): 99-106. DOI:10.5653/cerm.2019.00276.

[5] 陈威. 双酚 A 暴露引起青春前期大鼠睾丸中精子发生障碍及 PI_3K/Akt/FOXO1 信号通路介导的凋亡[D]. 武汉:华中科技大学, 2017.
CHEN W. Bisphenol A exposure induces spermatogenesis disorder and apoptosis mediated by PI3K/Akt/FOXO1 signaling pathway in prepubertal rats[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2017.

[6] 梁书秋,陶亚楠,李丹,等. 双酚 A 对小鼠睾丸间质细胞毒性及 miR-203-3p 和 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路的影响[J]. 实用药物与临床, 2020, 23(7): 584-588. DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.202007002.
LIANG S Q, TAO Y N, LI D, *et al*. Effects of bisphenol A on mouse Leydig cell toxicity and mir-203-3p and PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway[J]. Pract Med Clin, 2020, 23(7): 584-588. DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.202007002.

[7] PERETZ J, VROOMAN L, RICKE W A, *et al*. Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013[J]. Environ Heal Perspect, 2014, 122(8): 775-786. DOI:10.1289/ehp.1307728.

[8] KOIKE E, YANAGISAWA R, WIN-SHWE T T, *et al*. Exposure to low-dose bisphenol A during the juvenile period of development disrupts the immune system and aggravates allergic airway inflammation in mice[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32: 2058738418774897. DOI:10.1177/2058738418774897.

[9] KOSNIK M B, PLANCHART A, MARVEL S W, *et al*. Integration of curated and high-throughput screening data to elucidate environmental influences on disease pathways[J]. Comput Toxicol, 2019, 12: 100094. DOI: 10.1016/j.comtox.2019.100094.

[10] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, *et al*. The comparative toxicogenomics database: update 2017[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(d1): D972-D978. DOI:10.1093/nar/gkw838.

[11] DAVIS A P, WIEGERS T C, WIEGERS J, *et al*. Chemical-induced phenotypes at CTD help inform the predisease state and construct adverse outcome pathways[J]. Toxicol Sci, 2018, 165(1): 145-156. DOI: 10.1093/toxsci/kfy131.

[12] GRONDIN C J, DAVIS A P, WIEGERS T C, *et al*. Accessing an expanded exposure science module at the comparative toxicogenomics database[J]. Environ Health Perspect, 2018, 126(1): 014501. DOI: 10.1289/ehp2873.

[13] XIE M N, BU P L, LI F J, *et al*. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 10606-10615. DOI:10.18632/oncotarget.7218.

[14] EFIMOVA O A, KOLTSOVA A S, KRAPIVIN M I, *et al*. Environmental epigenetics and genome flexibility: focus on 5-hydroxymethylcytosine[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3223. DOI:10.3390/ijms21093223.

[15] ZHAO W, LIU J, WANG D, *et al*. Effect of silencing HIF-1alpha gene on testicle spermatogenesis function in varicocele rats[J]. Cell Tissue Res, 2019, 378(3): 543-554. DOI: 10.1007/s00441-019-03064-0.

[16] HU X, MA J J, VIKASH V, *et al*. Thymoquinone augments cisplatin-induced apoptosis on esophageal carcinoma through mitigating the activation of JAK2/STAT3 pathway[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(1): 126-134. DOI:10.1007/s10620-017-4856-8.

[17] ZHAO X B, QIN Y, NIU Y L, *et al*. Matrine inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiac microvascular endothelial cells in rats *via* the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 117-124. DOI:10.1016/j.biopha.2018.06.003.

[18] ZHENG C, LIU T, LIU H, *et al*. Role of BCL-2 family proteins in apoptosis and its regulation[J]. Curr Protein Pept Sci, 2020, 21(8): 799-806. DOI: 10.2174/1389203721666191227122252.

(**收稿**:2020-09-24;**修回**:2020-10-27)

(编辑 张 维)