DOI:10.16016/j.2097-0927.202111016

RNA 去甲基化酶 FTO 在双酚 S 诱导 GC-2 细胞凋亡中的作用及机制研究

李景芝[1,2],刘文斌[2,3],周诗梦[4],陈洪强[2,3],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],军队环境卫生学教研室[3];110122 沈阳,中国医科大学公共卫生学院[4]

[摘要] **目的** 探讨 RNA 去甲基化酶 FTO 在双酚 S(bisphenol S,BPS)诱导小鼠精母细胞 GC-2 凋亡中的作用及机制。**方法** 采用终浓度为 0(DMSO 对照组)、20、40、80、160、320 μmol/L 的 BPS 处理小鼠精母细胞株 GC-2 细胞 72 h,镜下观察细胞形态变化;采用 CCK-8 法检测细胞活力,通过流式细胞术检测细胞凋亡和周期改变;采用比色法检测 RNA 甲基化的总体水平;通过 Western blot 检测 RNA 甲基转移酶 METTL3、RNA 去甲基化酶 FTO、RNA 甲基化识别蛋白 YTHDF1 和细胞凋亡相关分子 P53、P21、BCL2、Caspase-9、Caspase-3、BAX 以及细胞周期相关分子 CyclinD1、CDK4、CDK2 的蛋白表达水平。建立 FTO 基因干扰细胞模型,采用 CCK-8 法检测细胞活力,采用流式细胞术检测细胞凋亡改变,通过 Western blot 检测 FTO 和细胞凋亡相关分子 P53、BCL2、BAX 的蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比,BPS 染毒组 GC-2 细胞数量明显减少,出现较多的空泡细胞;细胞存活率呈下降趋势,尤其在 160、320 μmol/L BPS 染毒剂量下降显著($P<0.05$);细胞凋亡率显著升高,凋亡相关分子 P53、P21、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白水平显著增加,BCL2 的蛋白水平显著下调($P<0.05$);BPS 浓度在 80、160、320 μmol/L 时细胞周期阻滞在 G_1/S 期,细胞周期 G_1/S 期相关分子 CyclinD1、CDK4、CDK2 的蛋白水平显著下调($P<0.05$);在 80~320 μmol/L BPS 染毒剂量组下,RNA 甲基化的总体水平显著升高($P<0.01$);RNA 甲基转移酶 METTL3 和 RNA 甲基化识别蛋白 YTHDF1 的蛋白水平无明显变化,而 RNA 去甲基化酶 FTO 的蛋白水平显著下降($P<0.05$)。与对照组相比,干扰 FTO 表达后 GC-2 细胞数量明显减少,出现较多的空泡细胞,细胞活力显著降低($P<0.01$);细胞凋亡率显著升高,P53 的蛋白水平显著上调,BCL2 的蛋白水平显著下调($P<0.05$)。**结论** RNA 去甲基化酶 FTO 可能通过调控 P53-P21 和 BCL2 线粒体途径在 BPS 诱导的 GC-2 细胞凋亡过程中发挥重要作用。

[关键词] 双酚 S;小鼠精母细胞;RNA 去甲基化酶 FTO;细胞凋亡

[中图法分类号] R321.1;R329.25;R994.6 [文献标志码] A

Role and mechanism of RNA demethylase FTO in apoptosis of GC-2 cells induced by bisphenol S

LI Jingzhi[1,2], LIU Wenbin[2,3], ZHOU Shimeng[4], CHEN Hongqiang[2,3], CAO Jia[2] [1]School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan Province, 453001; [2]Institute of Toxicology, [3]Department of Environmental Health, College of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [4]School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning Province, 110122, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of RNA demethylase FTO in the apoptosis of mouse spermatocyte GC-2 cells induced by bisphenol S (BPS). **Methods** GC-2 cells were treated with

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82130097);国家重点研发计划项目(2017YFC1002001)

[通信作者] 曹 佳,E-mail:caojia1962@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

BPS at a final concentration of 0 (DMSO control group), 20, 40, 80, 160, and 320 μmol/L for 72 h. The cell morphology changes were observed with microscopy. CCK-8 assay was utilized to detect cell viability, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cycle changes. Colorimetric assay was adopted to measure the global level of m6A RNA methylation. Western blotting was employed to detect the protein levels of RNA methyltransferase METTL3, RNA demethylase FTO, RNA binding protein, YTHDF1, apoptosis-related molecules P53, P21, BCL2, Caspase9, Caspase3, BAX and cell cycle-related molecules CyclinD1, CDK4, CDK2. After FTO gene interference cell model was established, CCK-8 assay was used to measure cell survival and flow cytometry to detect cell apoptosis. The protein levels of FTO, P53, BCL2 and BAX were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the number of GC-2 cells was significantly reduced and more vacuole cells appeared in the BPS exposure group. The cell survival rate was significantly decreased and the apoptotic rate was markedly increased at 160 and 320 μmol/L of BPS ($P<0.05$). The protein levels of apoptosis-related molecules P53, P21, Caspase9 and Caspase3 were increased significantly, and that of BCL2 was decreased significantly ($P<0.05$). When the BPS concentration was 80, 160 and 320 μmol/L, cell cycle was arrested at G_1/S phase ($P<0.05$). The protein levels of G_1/S phase related molecules CyclinD1, CDK4, and CDK2 were significantly down-regulated ($P<0.05$). When the dose of BPS increased to 80~320 μmol/L, the global RNA methylation level was relatively increased ($P<0.01$). The protein levels of RNA methyltransferase METTL3 and RNA binding protein YTHDF1 did not change obviously, while that of RNA demethylase FTO decreased sharply ($P<0.05$). Compared with the control group, after interference with FTO expression, the number and viability of GC-2 cells were significantly reduced, and the apoptotic rate was notably increased ($P<0.05$). The protein level of P53 was remarkably up-regulated, and that of BCL2 down-regulated when FTO expression was knocked down ($P<0.05$). **Conclusion** RNA demethylase FTO may play an important role in BPS-induced apoptosis of GC-2 cells through regulating P53-P21 and BCL2 mitochondrial pathway.

[**Key words**] bisphenol S; mouse spermatocytes; RNA demethylase FTO; apoptosis

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82130097) and the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1002001). Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

双酚A(bisphenol A,BPA)在环境中广泛存在并对人体健康产生诸多不利影响。因此,它正逐步被双酚S(bisphenol S,BPS)类似物取代。目前,BPS应用于许多产品,包括标有“不含有BPA”的产品中[1]。在许多化妆品、卫生用品、纸制品和食品包装袋中,都可以检测到BPS[2]。由于BPS的使用没有被限制,其生产和应用的数量一直在快速增加,因此,对人类健康具有安全隐患[3]。研究表明,在职业暴露人群的尿液样本中检测到较高浓度的BPS(平均浓度为12.3 ng/mL),可影响睾酮分泌,甚至比BPA的损伤效应更加显著[4]。研究表明,BPS暴露能够诱导雄性成年斑马鱼性腺中miRNA及其靶基因的表达发生明显改变,进而造成生殖缺陷[5]。因此,BPS作为一种新兴双酚污染物,其生殖毒性正逐渐受到广泛关注。

研究表明,环境毒物会影响N6-甲基腺苷酸RNA甲基化的总体水平,并改变RNA甲基化调控基因的表达[6]。6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m6A)是RNA转录后修饰的最常见形式,占所有RNA修饰的80%以上[7]。随着研究的不断深入,m6A修饰已经成为一个热门的研究领域[8]。m6A的修饰是由RNA甲基转移酶、RNA去甲基化酶和RNA识别蛋白3种分子共同作用的结果。最新研究表明,m6A对于男性生殖系统的发育是必不可少的[9]。精子发生是一个高度动态的发育过程,涉及基因表达的复杂调控。FTO作为烷基化(alkylation, AlkB)核酸脱甲基酶家族中的一种酶,催化m6A在mRNA上的氧化去甲基化,可调节RNA剪接、稳定性或翻译,从而对细胞的各种生理过程产生影响[10]。FTO在睾丸中高度表达,并且定位于核散斑[11]。FTO通过降低m6A水平并抑制促凋亡因子Caspase-3、Caspase-9的表达来抑制细胞凋亡[12]。然而,FTO在BPS诱导生殖细胞凋亡中的作用及调控机制尚未阐明。因此,本研究主要探讨RNA去甲基化酶FTO在BPS诱导的小鼠精母细胞GC-2凋亡中的作用,明确表观调控与BPS诱导的细胞凋亡之间的关

系,为筛选和鉴定新兴双酚污染物生殖毒性的表观遗传标志物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠的精母细胞系 GC-2 购于美国的 ATCC 细胞库;高糖培养基 DMEM 购于美国 Gibco 公司;血清为低内毒素胎牛血清,购于中国杭州四季青公司;双酚 S、二甲基亚砜购于美国 Sigma 公司;Lipofectamine™ 3000(lipo3000)转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司)、细胞增殖 CCK-8 试剂盒购于 Solarbio 公司;siRNA 试剂购于上海吉凯基因医学科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒以及 SDS-PAGE 配胶试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司;EpiQuik™ m6A RNA 甲基化定量试剂盒(P-9005)购于美国艾美捷科技有限公司;兔来源 FTO、METTL3、YTHDF1、P53、BCL2、Caspase-9、Caspase-3、BAX 抗体和鼠来源 CDK4 抗体均购于美国 Santa Cruz 公司;鼠来源 P21、GAPDH 抗体和兔来源 CyclinD1、CDK2 抗体均购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 GC-2 细胞系,使用 DMEM 高糖培养基(含 8%胎牛血清),置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,定期换液,细胞长至 80%~90%时进行细胞传代。

1.2.2 细胞染毒 将对数生长期 GC-2 细胞按 2 000 个/孔和 4×10^4 个/孔,分别接种于 96 孔板中和 6 孔培养板中培养,24 h 后观察细胞贴壁情况,并进行 BPS 染毒。BPS 粉剂使用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成浓度为 0、20、40、80、160、320 mmol/L 的储备液,染毒时用含 8%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、160、320 μmol/L。处理 72 h 后显微镜下观察细胞生长情况并拍照。

1.2.3 siRNA 转染 取对数生长期细胞分别接种到 96 孔板中和 6 孔培养板中并培养,置于 37 ℃培养箱中孵育,待细胞生长至密度为 70%~80%时,按照实验对照组(NC 组)和干扰组(FTO-siRNA 组、FTO-siRNA2 组)进行转染。在转染前,将 96 孔板中和 6 孔培养板中的培养基换成无血清培养基,按照每个孔所需 siRNA 浓度,将 siRNA 加入到预先装好 OPTI-MEM 的 EP 管中,37 ℃孵育 5 min,取 Lipo3000 加入到预先装好 OPTI-MEM 的 EP 管中,37 ℃孵育 5 min 后将 Lipo3000 与 siRNA 混合,使用移液器轻柔混匀,静置 15 min。将复合物加入 96 孔板中和 6 孔培养板中,转染 6 h 后,将混合培养基替换为含胎牛血清的 DMEM 培养基。处理 72 h 后显微镜下观察细胞生长情况并拍照。

1.2.4 细胞活力测定 取对数生长期的细胞接种于 96 孔板,在每个孔中加入 100 μL 的胎牛血清培养基,待细胞生长至密度为 70%~80%时进行 siRNA 转染,按照需求分别在转染 24、48、72 h 时,弃掉原培养基,避光条件下在无菌操作台上每孔加入培养基与 CCK-8 试剂比例为 9∶1的混合液 100 μL,于细胞培养箱中孵育 2 h,酶标仪测定波长为 450 nm 处的光密度值 $D(450)$。按公式计算细胞的存活率,细胞存活率=$[D(450)_{实验组}-D(450)_{空白组}]/[D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}]\times100\%$。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 使用离心管收集细胞培养液及胰酶消化后的细胞,1 000×g 离心 5 min,弃上清用 PBS 重悬细胞并计数。取 5×10^4~1×10^5 重悬的细胞,1 000×g 离心 5 min,弃上清,加入 195 μL AnnexinV-FITC(反映早期凋亡),轻轻混匀。加入 10 μL 碘化丙啶染色液 PI(反映晚期凋亡),轻轻混匀。室温避光孵育 10 min,在振荡器上低速混合均匀后,上流式细胞仪检测。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,在接种 24 h 内进行 BPS 染毒,染毒 72 h 后,使用胰酶进行消化和收集细胞,并调整细胞数至 1×10^6 细胞/mL。然后用 PBS 润洗 1 次,1 200 r/min 离心 5 min,收集沉淀,再使用 70%乙醇重悬细胞,于 4 ℃条件下固定 4 h,并用 PBS 洗去固定液,加入提前配制好的 PI/RNase A 染色工作液,37 ℃水浴 30 min,然后上机检测。

1.2.7 m6A RNA 甲基化水平测定 通过 EpiQuik m6A RNA 甲基化试剂盒(比色法)测量总体 RNA m6A 水平。根据参考说明书进行操作:从 GC-2 细胞中分离出总 RNA,并将 200 ng 的总 RNA 和结合溶液加入每个孔中,并在 37 ℃下孵育 90 min,然后将捕获抗体、检测抗体、增强剂溶液、显色剂溶液和终止溶液依次加入每个孔中并避光反应 1~10 min。最后,通过酶标仪(Molecular Devices,USA)检测 450 nm 处的光密度值 $D(450)$,根据标准品光密度值 $D(450)$ 计算待测 RNA 的 m6A 相对含量(m6A%),计算公式为:m6A=$\{[D(450)_{待测样本}-D(450)_{阴性对照}]/S\}/\{[D(450)_{阳性对照}-D(450)_{阴性对照}]/P\}\times100\%$,其中 S 指待测样本 RNA 样本质量(ng),P 指阳性对照 RNA 样本质量(ng)。

1.2.8 Western blot 弃去培养基,用预冷的 PBS 洗涤 2 次后加入适量蛋白裂解液 RIPA 和蛋白酶抑制

剂 PMSF 裂解细胞,冰上静置 30 min,将细胞刮下并吸入 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min、4 ℃离心 30 min,上清即为细胞蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,取等量的总蛋白与 5×SDS 上样缓冲液混合,100 ℃变性 10 min 后于-20 ℃保存。配好 SDS-PAGE 蛋白凝胶后每个样本各取 20 μL 进行电泳,PVDF 膜封闭后分别加入稀释比为 1∶1 000 的兔来源 P53 抗体、鼠来源 P21 抗体、兔来源 BCL2、Caspase-9、Caspase-3、BAX、CyclinD1 抗体、鼠来源 CDK4 抗体、兔来源 CDK2、FTO、METTL3 和 YTHDF1 抗体,每个样本加入稀释比为 1∶1 000 的鼠来源 GAPDH 抗体,4 ℃孵育过夜,使用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,室温孵育二抗 2 h,TBST 洗膜 3 次,最后使用 ECL 化学发光液进行显影分析。

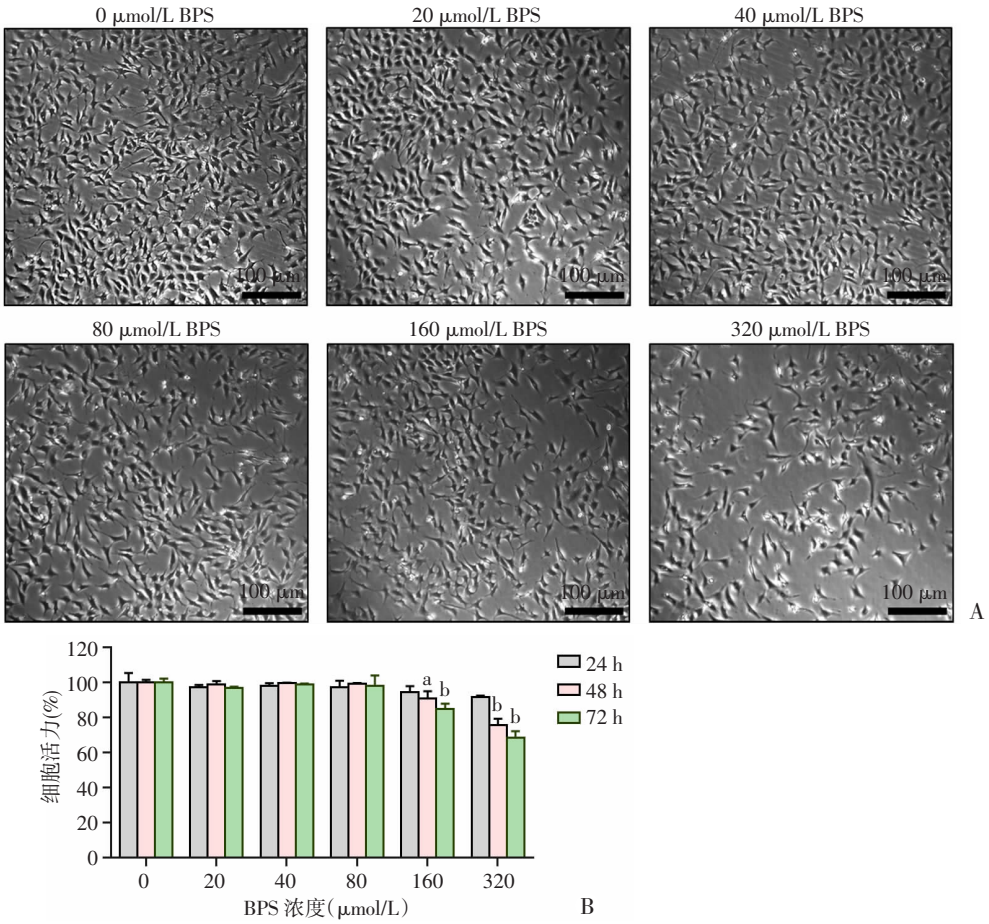
1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件对实验结果进行分析。数据至少是 3 次实验数据的平均值,采用 *t* 检验进行组间比较,分析各组间差异。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 镜下形态学观察以及细胞活力检测

建立低剂量 BPS 染毒 GC-2 细胞模型:使用终浓度为 0、20、40、80、160、320 μmol/L 的 BPS 处理 GC-2 细胞 72 h。镜下结果显示,对照组和低剂量组的 GC-2 细胞形态、大小正常,数量较多,空泡细胞较少。随着 BPS 染毒剂量的增大,GC-2 细胞数量明显减少,出现较多的空泡细胞,高剂量组尤为明显(图 1A)。通过 CCK-8 法测定不同浓度的 BPS 染毒精母细胞 24、48、72 h 后的细胞活力,从图 1B 可以明显看出,与对照组相比,20、40、80 μmol/L BPS 染毒组细胞活性无明显变化,而随着 BPS 浓度的增加,160、320 μmol/L BPS 染毒组细胞活力显著下降($P<0.05$),呈现一定的时间和剂量依赖效应。

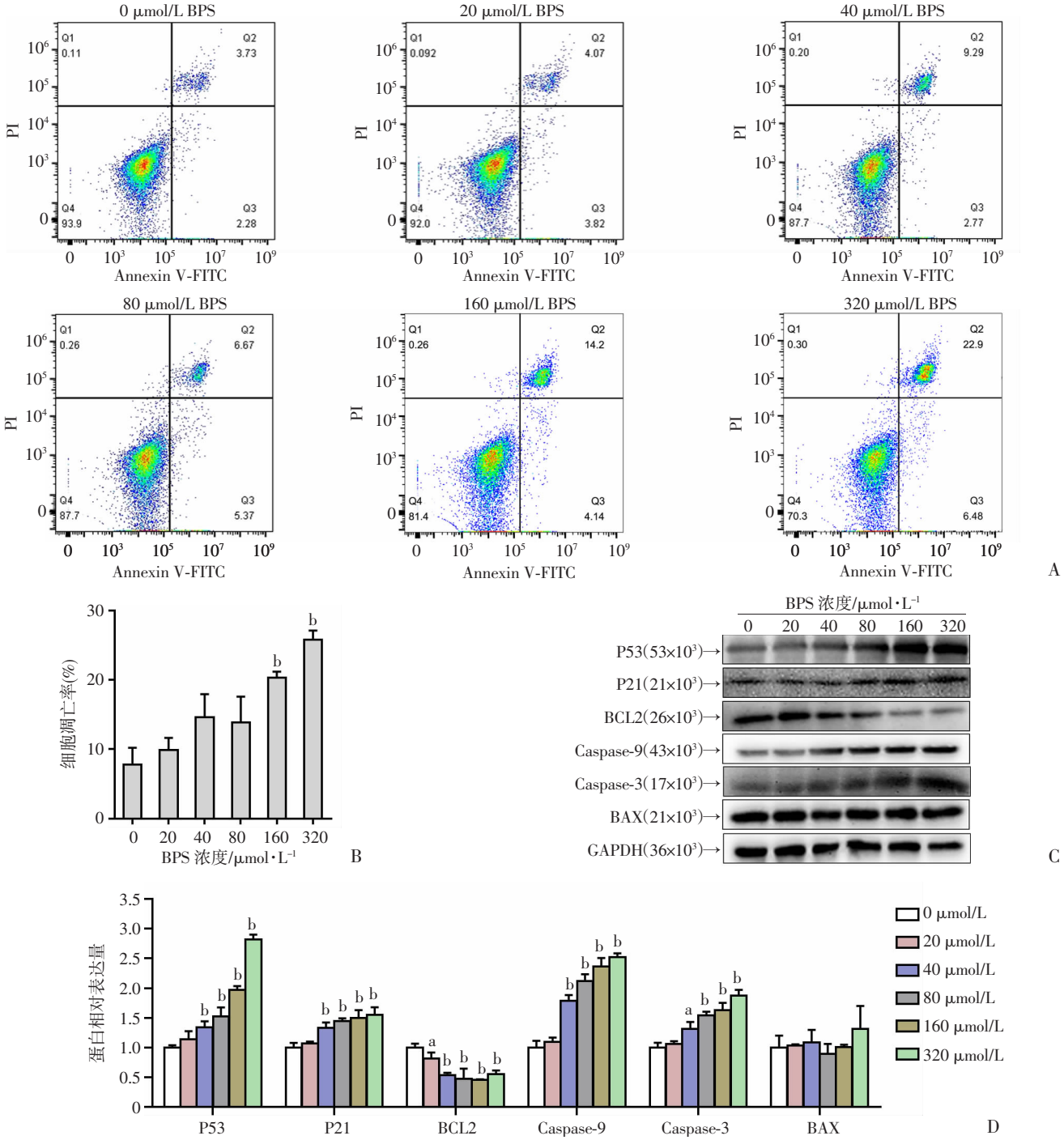


A:不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 以内的细胞形态;B:不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 以内的细胞活力
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 DMSO 对照组(0 μmol/L BPS)比较

图 1 不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 以内的细胞生长变化

2.2　BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 细胞凋亡变化和相关分子蛋白表达水平

流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,与对照组相比,GC-2 细胞凋亡率在 160、320 μmol/L BPS 染毒组明显增加($P<0.05$,图 2A、B)。BPS 以剂量依赖的方式诱导 GC-2 细胞发生凋亡。Western blot 检测结果显示,BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 后,P53、P21、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白水平显著上调,BCL2 的蛋白水平显著下调($P<0.05$,图 2C、D),BAX 的蛋白水平无明显变化。以上结果提示 BPS 可能通过 P53-P21 和 BCL2 线粒体途径诱导 GC-2 细胞凋亡。

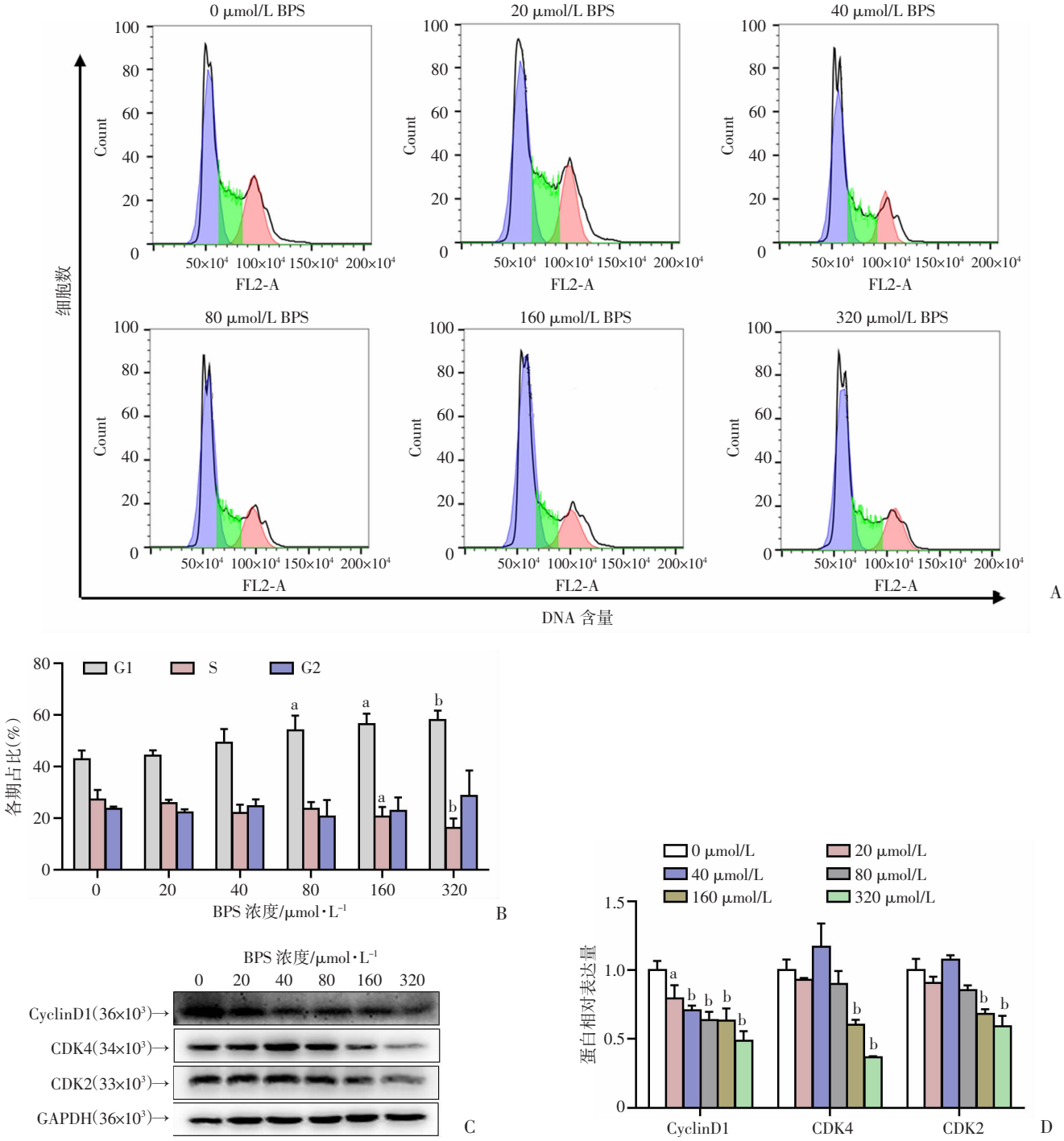


A:流式细胞术检测不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 后细胞凋亡;B:不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 的细胞凋亡率统计分析;C:Western blot 检测;D:半定量分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 DMSO 对照组(0 μmol/L BPS)比较

图 2　不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 的细胞凋亡和相关分子蛋白表达水平变化

2.3 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 细胞周期变化

流式细胞术检测细胞周期结果显示,与对照组相比,BPS 浓度为 80、160、320 μmol/L 时细胞周期阻滞在 G_1/S 期($P<0.05$,图 3A、B)。Western blot 检测结果显示,细胞周期 G_1/S 期相关分子 CyclinD1、CDK4、CDK2 的蛋白水平显著下调($P<0.05$,图 3C、D),以上结果提示,BPS 可能诱导 GC-2 细胞发生 G_1/S 期细胞周期阻滞。



A:流式细胞术检测不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 的细胞周期各期分布;B:不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 的细胞周期各期占比;C:Western blot 检测;D:半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 DMSO 对照组(0 μmol/L BPS)比较

图 3 不同浓度 BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 的细胞周期和相关分子蛋白表达水平变化

2.4　BPS 暴露后 GC-2 细胞中 RNA 甲基化的总体水平和 RNA 甲基化关键酶的蛋白表达水平

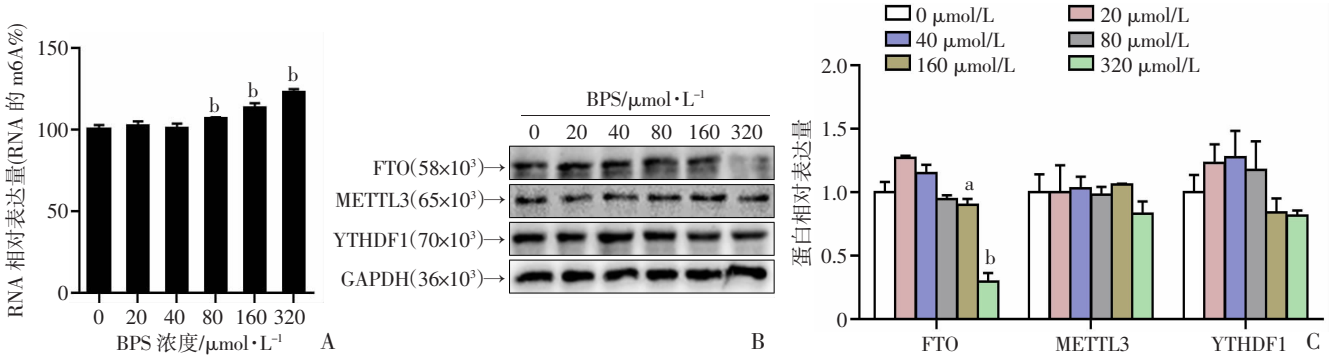
比色法结果显示,与对照组相比,BPS 染毒组(80~320 μmol/L)RNA 甲基化总体水平显著升高($P<0.01$,图 4A)。Western blot 检测结果显示,BPS 染毒 GC-2 细胞 72 h 后,RNA 甲基转移酶 METTL3 以及 RNA 识别蛋白 YTHDF1 的蛋白水平无明显变化,而 RNA 去甲基化酶 FTO 的蛋白水平在 320 μmol/L BPS 染毒组时显著下调($P<0.05$,图 4B、C),提示 RNA 去甲基化酶 FTO 可能参与调控 BPS 诱导 GC-2 细胞损伤。

2.5　干扰 RNA 去甲基化酶 FTO 表达后 GC-2 细胞存活率

建立 FTO 基因干扰细胞模型,镜下结果显示,对照组 GC-2 细胞形态、大小正常,数量较多,空泡细胞较少。而干扰 FTO 表达后的 GC-2 细胞数量明显减少,出现较多的空泡细胞(图 5A)。通过 CCK-8 法测定干扰 FTO 表达的生精细胞 24、48、72 h 后的细胞活力。结果显示,在 48、72 h 时细胞活力显著下降($P<0.05$,图 5B)。以上结果提示 RNA 去甲基化酶 FTO 可能参与调控 GC-2 细胞的凋亡。

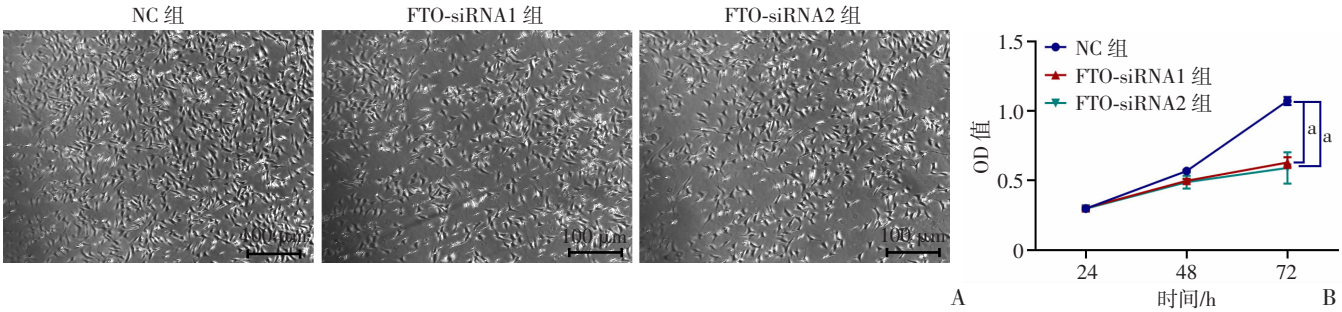
2.6　干扰 FTO 表达后 GC-2 细胞凋亡变化和 RNA 去甲基化酶 FTO 以及细胞凋亡相关分子的蛋白表达水平

流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,与对照组相比,干扰 FTO 表达后的 GC-2 细胞凋亡率明显增加($P<0.05$,图 6A、B)。Western blot 检测结果显示,在干扰 FTO 表达后的 GC-2 细胞中,RNA 去甲基化酶 FTO 的蛋白水平显著下调($P<0.05$,图 6C、D);P53 的蛋白水平显著上调,BCL2 的蛋白水平显著下调($P<0.05$),BAX 的蛋白水平无明显变化。进一步说明 FTO 参与 GC-2 细胞凋亡过程。提示 RNA 去甲基化酶 FTO 可能通过调控 P53 和 BCL2 的表达在 BPS 诱导的 GC-2 细胞凋亡中发挥重要作用。



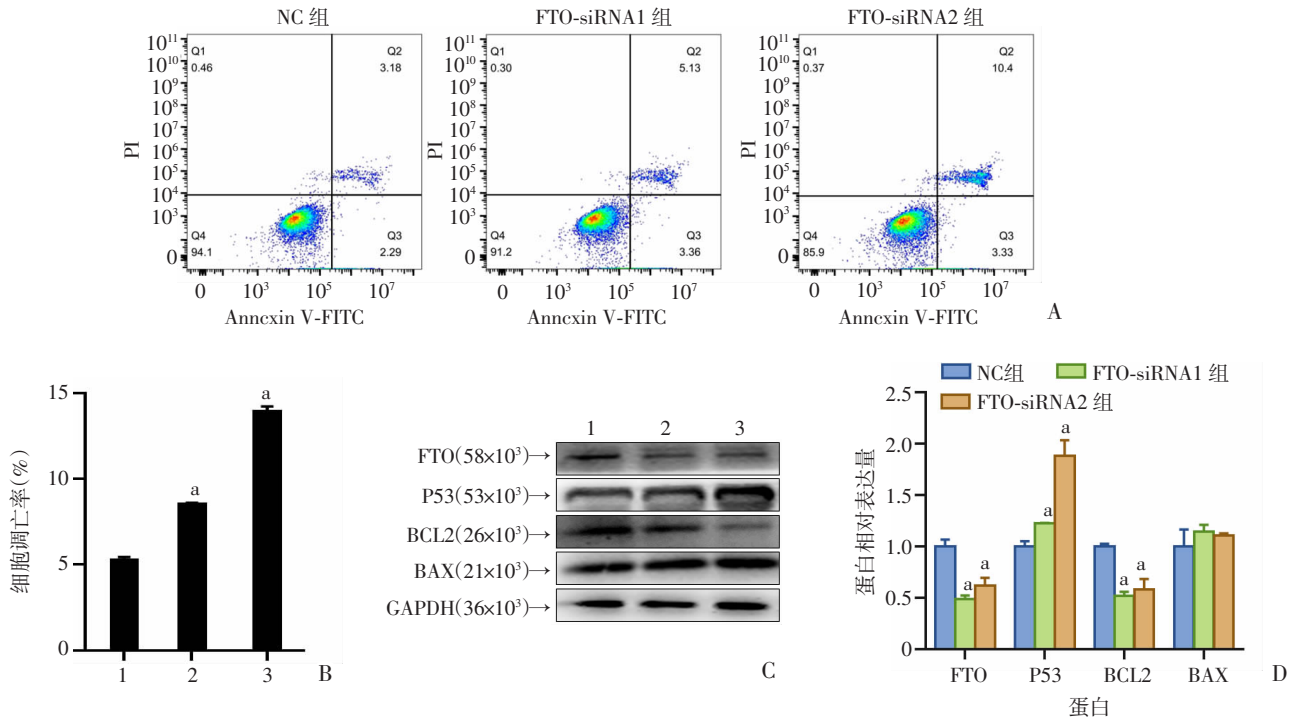
A:总 RNA 中 m6A 的相对含量;B:Western blot 检测;C:半定量分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 DMSO 对照组(0 μmol/L BPS)比较

图 4　BPS 暴露后 GC-2 细胞中 RNA 甲基化总体水平和 RNA 甲基化关键酶的蛋白表达水平



A:CCK-8 法测定干扰 FTO 表达后 GC-2 细胞的细胞形态;B:干扰 FTO 表达后 GC-2 细胞的细胞活力统计分析　a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 5　干扰 RNA 去甲基化酶 FTO 表达后的 GC-2 细胞存活变化



A:流式细胞术检测干扰去甲基化酶 FTO 表达后 GC-2 细胞凋亡各期分布;B:干扰去甲基化酶 FTO 表达后 GC-2 细胞凋亡率统计结果;C:Western blot 检测 1:NC 组;2:FTO-siRNA1 组;3:FTO-siRNA2 组;D:半定量分析 a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 6 干扰 FTO 表达后 GC-2 细胞凋亡变化和 RNA 去甲基化酶 FTO 以及细胞凋亡相关分子的蛋白表达水平

3 讨论

近年来,随着对 BPA 毒性研究的不断深入,导致其被多个替代品取代。大多数 BPA 替代品与其结构类似,如 BPS、BPF、BPAF 等,其中 BPS 的应用最为广泛[13]。由于以上替代物不受管制,导致在环境中的暴露量越来越多,在人群中的暴露水平及检出率也逐步升高。研究发现,BPS 可通过影响小鼠精子蛋白的翻译后修饰干扰雄性生殖功能或对雄性生殖产生负面影响[14]。最新研究表明,BPS 与核和膜 ERS 结合具有与 BPA 相同数量级的损伤潜能[15]。以上研究提示,新兴双酚类污染物 BPS 能够对男性生殖系统产生不良影响。

本课题组前期研究发现,低剂量 BPA 暴露可以导致 GC-2 细胞凋亡[16]。由于 BPS 与 BPA 的结构类似性,有必要对由 BPS 引起的细胞毒性效应及机制进行深入研究。本研究发现,GC-2 细胞经 BPS 处理后细胞活力下降,细胞凋亡数明显增加,细胞凋亡相关分子蛋白表达水平发生一定的改变。P53 是一种肿瘤抑制蛋白,BCL2 是一种抑凋亡蛋白,二者共同调节细胞周期阻滞和细胞凋亡。最新研究表明,尿石素 A 通过抑制 BCL-2 和促进 P53-P21 蛋白来诱导结直肠癌细胞凋亡[17]。动物研究表明,BPS 显著上调 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9,并显著下调 BCL-2/BAX 比率,从而诱导精母细胞凋亡[18]。以上文献报道与本研究发现一致,表明 BPS 可能通过 P53-P21 和 BCL2 线粒体途径共同诱导 GC-2 细胞发生细胞凋亡。CDK2、CDK4 作为 G_1/S 期细胞周期关键因子,高水平状态表明处于增殖的不同时期,水平降低对于 DNA 复制和诱发细胞分裂均受影响[19]。桑根白皮素显著增加了细胞 G_1 期阻滞,降低了 CyclinD1、CDK2、CDK4 的表达[20]。以上文献报道与本研究发现一致,提示 BPS 可能通过调控 CyclinD1、CDK4、CDK2 诱导 GC-2 细胞发生 G_1/S 期阻滞。

目前,双酚类物质对男性生殖毒性的研究主要集中在性腺发育或性激素的分泌上,很少从表观遗传调控的角度进行探讨。有研究表明,暴露于环境毒物可导致 m6A 修饰水平的变化[21]。本研究发现,BPS 暴露增加了 GC-2 细胞中 RNA 甲基化的水平。最新研究表明,m6A 是哺乳动物中最丰富的 RNA 修饰之一,参与了精子发生的整个过程,包括有丝分裂、减数分裂和精子发生[22]。人类精子中 m6A RNA 水平的增加与弱精子症的风险增加相关,弱精子症是不孕症的常见原因[23]。因此,本研究推测 m6A 修饰的增加可能与 BPS 诱导的男性生殖损伤有关。本实验结果显示,GC-2 细胞暴露于 BPS 后 RNA 甲基转移酶 METTL3 和

RNA 识别蛋白表达水平没有明显变化,而 RNA 去甲基化酶 FTO 的蛋白表达水平显著降低。最新研究表明,FTO 基因中发现的两个突变与精液质量下降有关,FTO 功能障碍可能会降低男性生育力[24]。因此,我们推测 RNA 去甲基酶 FTO 的异常变化与 BPS 染毒诱导的 GC-2 细胞损伤密切相关。

研究表明,FTO 介导的 m6A 水平降低可能参与环境内分泌干扰物 MEHP 诱导的间质细胞凋亡[25]。FTO 敲除导致小鼠 GC-1 细胞的染色体不稳定和细胞周期阻滞[26],提示 FTO 通过 m6A 脱甲基酶活性调节细胞发育。本研究发现,干扰 GC-2 细胞中 FTO 的表达后细胞凋亡相关分子 P53 和 BCL2 的蛋白表达水平发生显著变化。研究表明,双酚 A 类似物双酚 S 暴露改变雌性生殖道和胚泡衍生细胞的凋亡和氧化基因表达[27]。此外,细胞凋亡和 m6A 修饰之间的关系已有报道,顺铂处理降低了 FTO 表达并增加了肾脏中的 m6A 水平,从而导致 P53 的上调[28],这与本研究结果一致。结合上述报道和本研究的结果,推测 P53 和 BCL2 可能是 FTO 介导 BPS 致 GC-2 细胞凋亡过程中的关键下游调控分子,但具体机制有待后续研究进一步明确。

综上所述,本研究探讨了 RNA 去甲基化酶 FTO 在 BPS 暴露诱导的 GC-2 细胞凋亡中的作用和机制。研究工作为转录后调控和表观遗传学介导内分泌干扰物的生殖毒性提供了一个新的视角。后续本课题组将通过动物实验进一步验证上述结果,并深入探讨新兴双酚污染物 BPS 生殖毒性的表观遗传调控机制。

参考文献:

[1] ROSENMAI A K, DYBDAHL M, PEDERSEN M, *et al*. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? [J]. Toxicol Sci, 2014, 139(1): 35-47. DOI: 10.1093/toxsci/kfu030.

[2] XUE J C, KANNAN P, KUMOSANI T A, *et al*. Resin-based dental sealants as a source of human exposure to bisphenol analogues, bisphenol A diglycidyl ether, and its derivatives [J]. Environ Res, 2018, 162: 35-40. DOI: 10.1016/j.envres.2017.12.011.

[3] WU L H, ZHANG X M, WANG F, *et al*. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review[J]. Sci Total Environ, 2018, 615: 87-98. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.194.

[4] ELADAK S, GRISIN T, MOISON D, *et al*. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound[J]. Fertil Steril, 2015, 103(1): 11-21. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.11.005.

[5] LEE J Y, KHO Y, KIM P G, *et al*. Exposure to bisphenol S alters the expression of microRNA in male zebrafish[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 338: 191-196. DOI: 10.1016/j.taap.2017.11.019.

[6] CAYIR A, BARROW T M, GUO L Q, *et al*. Exposure to environmental toxicants reduces global N6-methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes[J]. Environ Res, 2019, 175: 228-234. DOI: 10.1016/j.envres.2019.05.011.

[7] NIU Y M, ZHAO X, WU Y S, *et al*. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2013, 11(1): 8-17. DOI: 10.1016/j.gpb.2012.12.002.

[8] DOMINISSINI D, MOSHITCH-MOSHKOVITZ S, SCHWARTZ S, *et al*. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq[J]. Nature, 2012, 485(7397): 201-206. DOI: 10.1038/nature11112.

[9] XU K, YANG Y, FENG G H, *et al*. Mettl3-mediated m 6 A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation [J]. Cell Res, 2017, 27(9): 1100-1114. DOI: 10.1038/cr.2017.100.

[10] LI L P, ZANG L Q, ZHANG F R, *et al*. Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(13): 2398-2411. DOI: 10.1093/hmg/ddx128.

[11] ZHENG G Q, DAHL J A, NIU Y M, *et al*. Sprouts of RNA epigenetics: the discovery of mammalian RNA demethylases [J]. RNA Biol, 2013, 10(6): 915-918. DOI: 10.4161/rna.24711.

[12] SHEN Z T, LIU P, SUN Q, *et al*. FTO inhibits UPR mt-induced apoptosis by activating JAK2/STAT3 pathway and reducing m6A level in adipocytes[J]. Apoptosis, 2021, 26(7/8): 474-487. DOI: 10.1007/s10495-021-01683-z.

[13] QIU W H, SHAO H Y, LEI P H, *et al*. Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during zebrafish early development[J]. Chemosphere, 2018, 194: 1-8. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.125.

[14] ŘIMNÁČOVÁ H, ŠTIAVNICKÁ M, MORAVEC J, *et al*. Low doses of Bisphenol S affect post-translational modifications of sperm proteins in male mice[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2020, 18(1): 56. DOI: 10.1186/s12958-020-00596-x.

[15] ROCHESTER J R, BOLDEN A L. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes [J]. Environ Health Perspect, 2015, 123(7): 643-650. DOI: 10.1289/ehp.1408989.

[16] 袁文博, 刘文斌, 陈洪强, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(1): 38-44. DOI:

10.16016/j.1000-5404.202009210.
YUAN W B, LIU W B, CHEN H Q, *et al*. Enrichment analysis and experimental study of BPA-induced male reproductive damage toxicity pathways and key apoptosis signaling pathways[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(1): 38-44. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202009210.

[17] EL-WETIDY M S, AHMAD R, RADY I, *et al*. Urolithin A induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting Bcl-2, increasing p53-p21 proteins and reactive oxygen species production in colorectal cancer cells[J]. Cell Stress Chaperones, 2021, 26(3): 473-493. DOI: 10.1007/s12192-020-01189-8.

[18] DAI W, HE Q Z, ZHU B Q, *et al*. Oxidative stress-mediated apoptosis is involved in bisphenol S-induced reproductive toxicity in male C57BL/6 mice[J]. J Appl Toxicol, 2021, 41(11): 1839-1851. DOI: 10.1002/jat.4170.

[19] YANG K, CHEN G, WANG X X. Promotion of G1/S transition and inhibition of inflammatory cytokine production by hydroxypyridinone-coumarin in osteoarthritis rats[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e920784. DOI: 10.12659/MSM.920784.

[20] CHO A R, PARK W Y, LEE H J, *et al*. Antitumor effect of morusin via G1 arrest and antiglycolysis by AMPK activation in hepatocellular cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10619. DOI: 10.3390/ijms221910619.

[21] ZHAO T X, WANG J K, SHEN L J, *et al*. Increased m6A RNA modification is related to the inhibition of the Nrf2-mediated antioxidant response in di-(-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury[J]. Environ Pollut, 2020, 259: 113911. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.113911.

[22] GUI Y Q, YUAN S Q. Epigenetic regulations in mammalian spermatogenesis: rna-m 6 A modification and beyond[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(11): 4893-4905. DOI: 10.1007/s00018-021-03823-9.

[23] YANG Y, HUANG W, HUANG J T, *et al*. Increased N6-methyladenosine in human sperm RNA as a risk factor for asthenozoospermia[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24345. DOI: 10.1038/srep24345.

[24] LANDFORS M, NAKKEN S, FUSSER M, *et al*. Sequencing of FTO and $ALKBH_5$ in men undergoing infertility work-up identifies an infertility-associated variant and two missense mutations[J]. Fertil Steril, 2016, 105(5): 1170-1179.e5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.002.

[25] ZHAO T X, WANG J K, WU Y H, *et al*. Increased m6A modification of RNA methylation related to the inhibition of demethylase FTO contributes to MEHP-induced Leydig cell injury[J]. Environ Pollut, 2021, 268(Pt A): 115627. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115627.

[26] HUANG T, GAO Q, FENG T Y, *et al*. FTO knockout causes chromosome instability and G2/M arrest in mouse GC-1 cells[J]. Front Genet, 2019, 9: 732. DOI: 10.3389/fgene.2018.00732.

[27] NOURIAN A, SOLEIMANZADEH A, SHALIZAR JALALI A, *et al*. Bisphenol-A analogue (bisphenol-S) exposure alters female reproductive tract and apoptosis/oxidative gene expression in blastocyst-derived cells[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020, 23(5): 576-585. DOI: 10.22038/IJBMS.2020.40893.9664.

[28] ZHANG Q, RIDDLE R C, YANG Q, *et al*. The RNA demethylase FTO is required for maintenance of bone mass and functions to protect osteoblasts from genotoxic damage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(36): 17980-17989. DOI: 10.1073/pnas.1905489116.

(收稿:2021-11-02;修回:2022-01-07)
(编辑 王 红)