DOI:10.16016/j.2097-0927.202212007

聚苯乙烯微塑料对睾丸间质细胞凋亡的影响

卢春升[1,2],梁月辉[2],韩 飞[2],刘晋祎[2],曹 佳[2],张爱华[1] 550025 贵阳,贵州医科大学公共卫生与健康学院卫生毒理学系教研室[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** 探讨聚苯乙烯微塑料(polystyrene microplastics,PS-MPs)对睾丸间质细胞凋亡的影响及可能机制。**方法** 通过比较毒理基因组学数据库(CTD)检索 Polystyrene 导致男性泌尿生殖系统疾病的相关基因,采用 GO 和 KEGG 富集分析涉及的功能及信号通路。使用小鼠睾丸间质细胞(TM3 细胞)作为研究模型,采用粒径为 5 μm 和 80 nm 的 PS-MPs(0、10、20、40 μg/mL)处理 TM3 细胞 48 h,观察细胞形态,利用 CCK-8 法检测细胞活性,流式细胞术检测细胞凋亡,RT-qPCR 和 Western blot 检测富集的信号通路中关键分子 mRNA 和蛋白水平表达变化。**结果** 对 CTD 数据库筛选的基因进行 GO 和 KEGG 富集分析发现,PS-MP 暴露相关变化基因明显富集到细胞凋亡功能和 p53 信号通路($P<0.05$)。5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 后均能明显抑制细胞生长,诱导细胞凋亡显著增加($P<0.05$);5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露可上调 p53 信号通路中 p53、Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平($P<0.05$),上调下游靶基因 Caspase3 和 Caspase9 表达($P<0.05$),抑制抗凋亡分子 Bcl2 表达($P<0.05$)。**结论** PS-MPs 暴露可能通过 p53 信号通路诱导睾丸间质 TM3 细胞的凋亡。

[关键词] 微塑料;聚苯乙烯;TM3 细胞;细胞凋亡;p53 信号通路
[中图法分类号] R321.1; R363.21; R994.6 [文献标志码] A

Effect of polystyrene microplastics on apoptosis of male germ cells

LU Chunsheng[1,2], LIANG Yuehui[2], HAN Fei[2], LIU Jinyi[2], CAO Jia[2], ZHANG Aihua[1] [1]Department of Toxicology, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550025; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of polystyrene microplastic (PS-MPs) on the apoptosis of male germ cells. **Methods** Genes related to male urogenital disorders caused by polystyrene were searched in the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis were used to analyze the involved functions and signaling pathways. A cell model was established based on mouse mesenchymal cells (TM3 cells), and then 0, 10, 20 and 40 μg/mL PS-MPs with a particle size of 5 μm and 80 nm respectively were used to treat TM3 cells respectively for 48 h. Cell morphology was observed, cell viability was detected with CCK-8 assay, apoptosis by flow cytometry, and mRNA and protein expression levels of key molecules in the p53 signaling pathway were detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** GO and KEGG enrichment analyses showed that the genes screened from CTD database were found to be significantly enriched in cell apoptosis and p53 signaling pathway ($P<0.05$). PS-MPs of 5 μm and 80 nm in size treatment for 48 h resulted in significant inhibition of cell growth while enhancement in cell apoptosis ($P<0.05$), up-regulated the mRNA and protein levels of p53 and Bax in the p53 signaling pathway ($P<0.05$), enhanced downstream molecules Caspase3 and Caspase9 ($P<0.05$), and inhibited Bcl2 at mRNA and protein levels in TM3 cells ($P<0.05$). **Conclusion** PS-MPs exposure may

[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(2022YFC2702902)
[通信作者] 张爱华,E-mail: aihuagzykd@163.com
曹 佳,E-mail: caojia1962@126.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

induce apoptosis of testicular mesenchymal TM3 cells *via* the p53 signaling pathway.

[**Key words**] microplastics; polystyrene; TM3 cells; apoptosis; p53 signaling pathway

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82130097) and the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2702902). Corresponding author: ZHANG Aihua, E-mail: aihuagzykd@163.com; CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

微塑料(microplastics,MPs)是指直径小于 5 mm 的塑料颗粒[1],微塑料的来源主要分为两类,分别为初级微塑料,来源于生产过程中以微米大小的颗粒排放到环境中的塑料,如化妆品、牙刷中的微珠[2];另一类为次级微塑料,是塑料制品在环境中经过紫外辐射、高温、磨损和化学裂解[3],以及低程度微生物降解[4]形成的塑料颗粒。聚苯乙烯(polystyrene,PS)占塑料工业生产份额的主体。研究证明,聚苯乙烯微塑料(polystyrene microplastics,PS-MPs)在多种环境介质中存在,如海洋[5]、河流[6]、土壤[7]、空气[8]。在食品如饮用水[9]、食盐[10]、糖[11]中都检出了 PS-MPs。已有研究报道 PS-MPs 可以经食物链富集、空气吸入、皮肤接触等途径进入人体[2]。PS-MPs 在生物体内发挥多种毒性作用,包括影响生长发育、代谢紊乱、氧化应激、免疫毒性、神经毒性和生殖毒性等方面[12-13]。

由于生殖系统较为敏感,PS-MPs 可能会对生殖系统构成更大风险。微塑料对生殖系统毒效应的研究显示,PS-MPs 暴露导致雄性小鼠精子数量和活力下降,精子畸形率增加[14];PS-MPs 可通过 Nrf2/HO-1/NF-κB 通路诱导睾丸炎症[15],通过激活 MAPK-Nrf2 途径破坏血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)完整性[16],下调 LH 介导的 LHR/cAMP/PKA/StAR 途径诱导睾酮水平降低[17]。然而,PS-MPs 对雄性生殖损伤的具体功能和机制仍不十分清楚。

本研究以小鼠睾丸间质细胞 TM3 细胞株作为研究模型,探讨不同粒径大小(5 μm 和 80 nm)的 PS-MPs 对小鼠睾丸重要组成细胞增殖和凋亡的影响以及可能涉及的毒性机制,为预防 PS-MPs 潜在雄性生殖损伤风险提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 5 μm 和 80 nm 的 PS-MPs 购自天津基线技术研究中心;DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Cell Counting Kit-8 (CCK-8)购自重庆葆光生物技术有限公司;Annexin V FITC Apop Dtec Kit I 100Tst 购自美国 BD 公司;ABScript Ⅲ RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover 逆转录试剂盒、2× Universal SYBR Green Fast qPCR Mix、Total RNA Extraction Reagent (TRIzol)均购自美国 Abclonal 公司;无菌去离子水 PCR 级购自中国北京索莱宝科技有限公司;p53、Bax 和 Bcl2 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;RIPA 蛋白裂解物、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、PMSF、QuickBlock Western 一抗稀释液、QuickBlock Western 二抗稀释液、β-actin Rabbit Monoclonal Antibody 和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)均购自中国上海碧云天公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自中国北京庄盟国际生物基因科技有限公司;PageRuler™ 预染蛋白分子量标准购自美国 ThermoFisher 公司;p53、Bcl2、Bax、Caspase3 和 Caspase9 抗体购自美国 Abcam 公司。

1.1.2 细胞株 小鼠睾丸间质 TM3 细胞株购自美国 ATCC 细胞库。将 TM3 细胞培养于含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,培养箱条件:37 ℃恒温,湿度 70%,5%的 CO_2 浓度,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 方法

1.2.1 CTD 数据库基因筛选与富集 利用 CTD 数据库分析,种属包括 Mus musculus(小鼠)、Homo sapiens(人类)和 Danio rerio(斑马鱼),暴露方式为细胞株 PS 染毒、动物静态染毒和胚胎注射染毒。“Keyword Search”中选择“chemical”,输入 Polystyrene(聚苯乙烯,PS)。在“Disease”选项中检索相关疾病为“Urogenital disease (male)”(男性泌尿生殖系统疾病)的有关基因。将筛选的基因使用“DAVID Bioinformatics Resources”数据库进行 GO 生物学过程和 KEGG 通路富集分析 PS-MPs 诱导男性泌尿生殖系统疾病中相关基因的生物学意义,再使用“联川生物云平台(https://www.omicstudio.cn/tool)”进行可视化分析。

1.2.2 细胞活力检测 将 TM3 细胞按照 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,待 12 h 细胞贴壁后,分别使用 5 μm 和 80 nm 两种粒径的 PS-MPs,加入超纯水配制成浓度为 0、10、20、40 μg/mL 处理 TM3 细胞。在处理 48 h 后,观察细胞形态并按照 10 μL/孔加入 CCK-8 试剂,于培养箱中避光孵育 60 min 后,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度值。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 TM3 细胞以 6×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,将细胞染毒 48 h 后,使用离心管收集细胞培养液及胰酶消化的细胞,低速离心机 1 000 r/min 离心 5 min,弃掉上清并使用 PBS 重悬。细胞计数取 5×10^4 个细胞,再次 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。使用 1×结合缓冲液重悬细胞,分别加入 5 μL 的 FITC Annexin V 和 5 μL 的 PI,室温避光孵

育 15 min,在 1 h 内上 BD 流式细胞仪检测细胞凋亡,使用 flowjo10.6.2 软件作图。

1.2.4 总 RNA 的提取 TM3 细胞在 6 孔板染毒 48 h 后,弃掉培养基,使用 PBS 清洗 2 遍。加入 500 μL/孔 TRIzol,冰上静置 5 min,吹打细胞移至无酶的 1.5 mL EP 管。每个 EP 管中加入 100 μL 氯仿(三氯甲烷),上下摇晃 15 s,静置 10 min 至分层。使用预冷的离心机,在 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,离心之后小心吸取上层 RNA 移至无酶的 1.5 mL EP 管中,加入等体积 4 ℃预冷的异丙醇,充分混匀,静置 10 min。使用离心机 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,离心后弃掉上清,风干至液体完全蒸发,沉淀为 RNA。每管加入 1 mL 75% 乙醇,上下轻轻颠倒洗涤。离心机 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,弃掉上清,室温静置至乙醇完全蒸发,根据沉淀大小加入 DEPC 水(10~20 μL)溶解 RNA。采用 Nanodrop 软件检测 RNA 浓度,-80 ℃低温保存。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析 将提取的总 RNA 每管浓度定量至 100 ng/μL,使用 ABScript Ⅲ RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。将逆转录的 cDNA 用无菌去离子水 PCR 级稀释 20 倍,使用荧光定量试剂盒 2× Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 进行 RT-qPCR 实验,每个样品的反应一式三份进行,预变性:95 ℃,3 min; 循环次数:1 次;循环反应:95 ℃,5 s、60 ℃,30~34 s,循环次数:40~45 次;溶解曲线:机器自行设置。结果数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列与产物长度

基因	序列(5′→3′)	产物长度/bp
p53	正向:CTCCTCCCCCCAGCATCTTG	187
	反向:ATAGGTCGGCGGTTCAT	52
Bax	正向:GACCATCTTTGTGGCTGGA	143
	反向:ATGCCTTTCCCCCCTTCCC	58
Bcl2	正向:AAACCCTCCATCCTGTCC	150
	反向:TCCTAAACCCTGCTTCCC	55
β-actin	正向:GTCCCTCACCCTCCCAAAAG	122
	反向:GCTGCCTCAACACCTCAACCC	150

1.2.6 蛋白提取及 Western blot 检测 TM3 细胞处理 48 h 后,使用预冷的 PBS 洗涤 2 次,向每个孔中加入蛋白裂解液 RIPA(1 mL RIPA 中含有 10 μL PMSF),置于冰盒上裂解 30 min。使用干净的刮板刮下细胞,转移至 1.5 mL 的 EP 管中,超声破碎细胞裂解悬液,12 000 r/min,4 ℃离心 20 min,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度并定量。根据体积配置含有 5×loading buffer 的混合液,100 ℃变性后-20 ℃保存。配制 12% SDS-PAGE 胶进行电泳,转膜至 PVDF 膜上,3% BSA 室温封闭 1 h;4 ℃过夜孵育 p53(1∶1 000)、Bax(1∶5 000)、Bcl2(1∶1 000)、Caspase3(1∶1 000)、Caspase9(1∶1 000)等抗体,以抗体 β-actin(1∶1 000)作为内参,1×TBST 洗涤 3 次,室温孵育山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(1∶1 000),1×TBST 洗涤 3 次;最后配制曝光液曝光,使用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析与作图。每次实验至少重复 3 次,数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

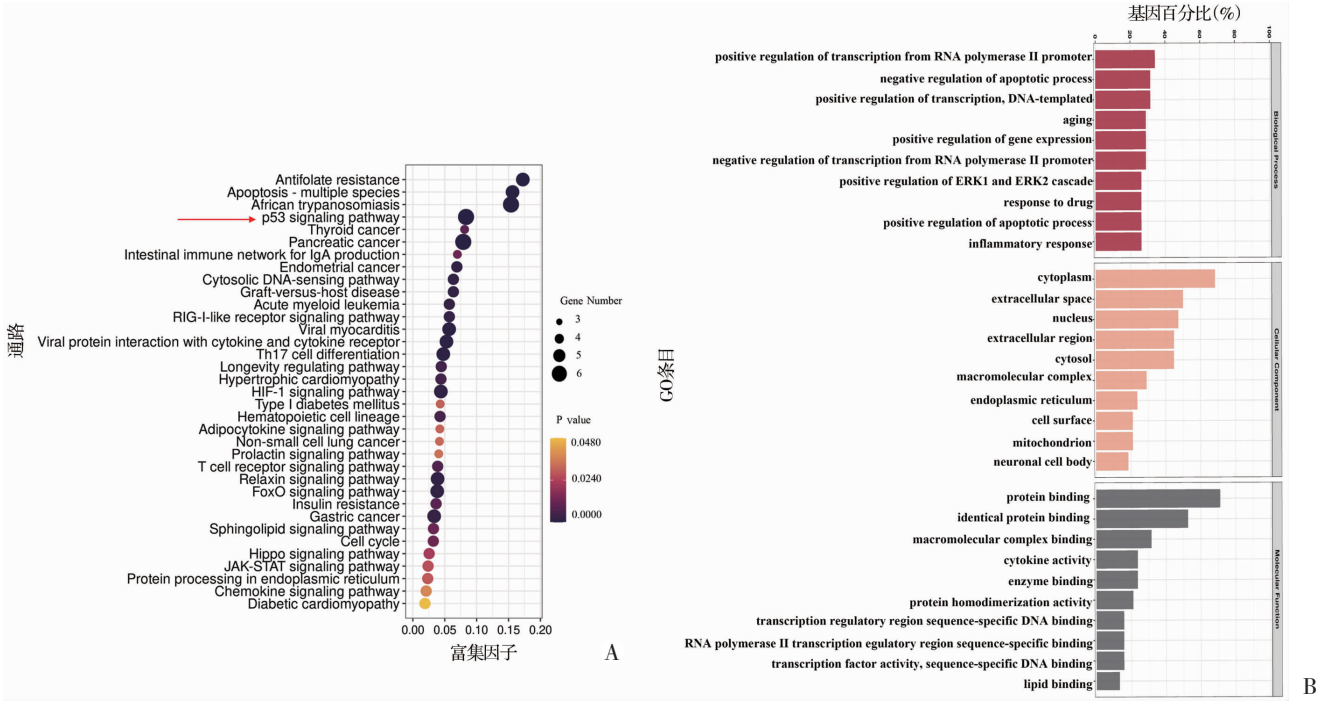
2 结果

2.1 PS 暴露相关男性生殖系统疾病中变化基因的富集分析

经 CTD 数据库筛选($P_{adjust}<0.05$)后共有 141 个基因与 PS 暴露的男性生殖系统疾病有关,出现次数排名前 10 的基因分别为:IL6(12 次),TGFB1(12 次),EDN1(9 次),TNF(9 次),CCL2(8 次),TP53(7 次),GSTP1(6 次),RELA(6 次),CAT(5 次)和 SOD1(5 次)。其中 TGFB1 和 TP53 参与细胞增殖与凋亡,提示 PS 暴露可能影响细胞增殖和凋亡。为进一步探究筛选基因在 PS 暴露中参与的主要功能和信号通路,对这些变化基因进行 KEGG 和 GO 富集分析(图 1),在 KEGG 富集通路中,p53 信号通路富集明显($P<0.01$)。GO 富集分析得到 GO 条目 314 个($P<0.05$),其中生物过程(biological processes, BP)有 258 个,细胞组分(cellular components, CC)有 24 个,分子功能(molecular function,MF)有 32 个,前 10 的生物学过程主要参与基因转录、细胞凋亡、细胞衰老等。这些富集分析提示细胞凋亡可能在 PS-MPs 暴露造成的生殖损伤中有重要作用。

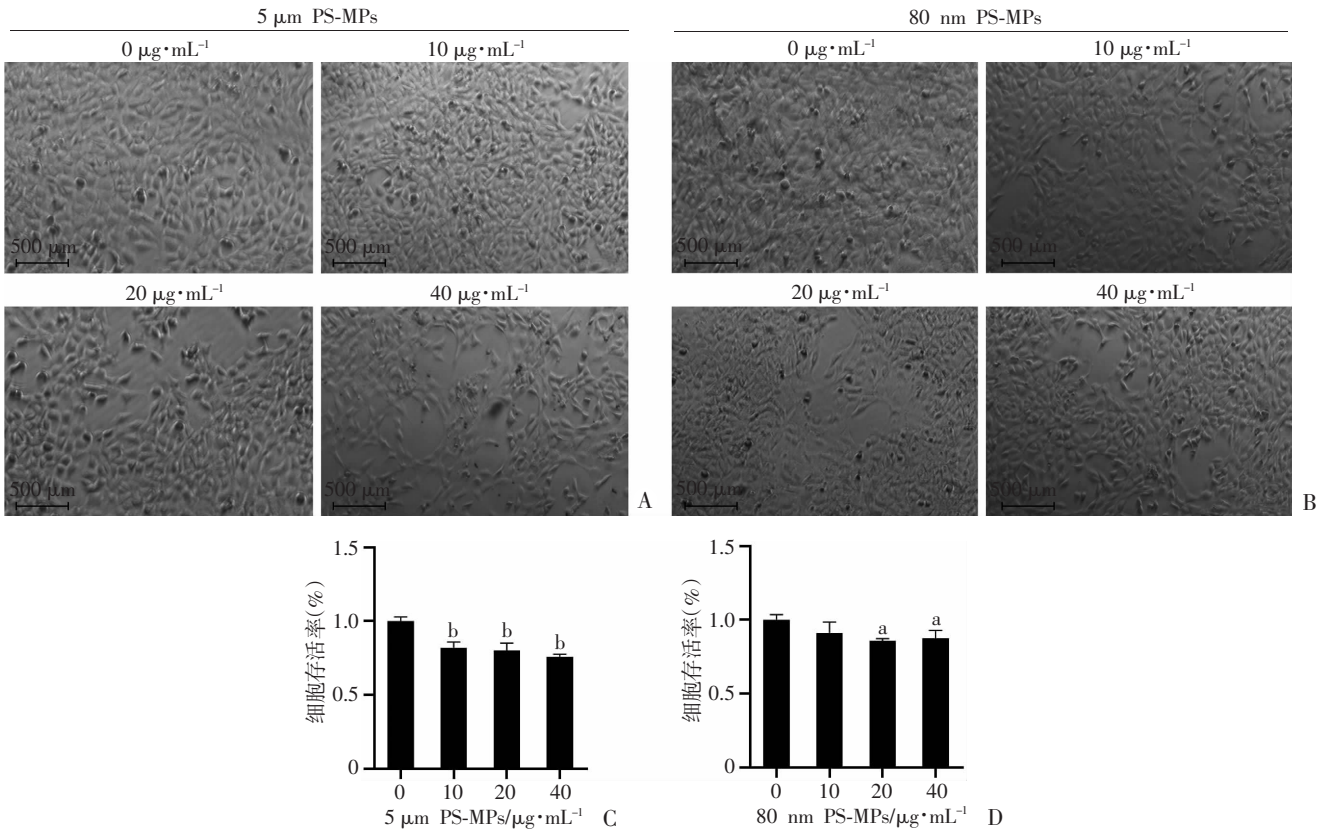
2.2 PS-MPs 暴露显著抑制 TM3 细胞增殖

使用 5 μm 和 80 nm 的 PS-MPs 染毒 TM3 细胞模型,浓度分别为 0、10、20、40 μg/mL。显微镜下观察 5 μm PS-MPs 处理后的细胞形态,结果显示,对照组细胞较为致密,细胞形态未见明显变化;在 10 μg/mL 组细胞数量开始减少;20 μg/mL 组细胞数量明显减少;40 μg/mL 组细胞数量减少最明显($P<0.01$,图 2A)。在 80 nm PS-MPs 处理组细胞生长也受到明显的抑制,细胞数量同样在高剂量组改变最明显($P<0.05$,图 2B)。而且 5 μm PS-MPs 组和 80 nm PS-MPs 组中细胞活力降低均具有剂量-效应关系(图 2C、D)。



A:显著性前 35 的 KEGG 富集结果; B:显著性前 10 的 GO 富集结果

图 1 PS-MPs 暴露的男性生殖系统疾病中变化基因 KEGG 和 GO 富集分析



A:5 μm PS-MPs 暴露 48 h 细胞形态;B:80 nm PS-MPs 暴露 48 h 细胞形态; C:5 μm PS-MPs 暴露 48 h 细胞存活率;D:80 nm PS-MPs 暴露 48 h 细胞存活率;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

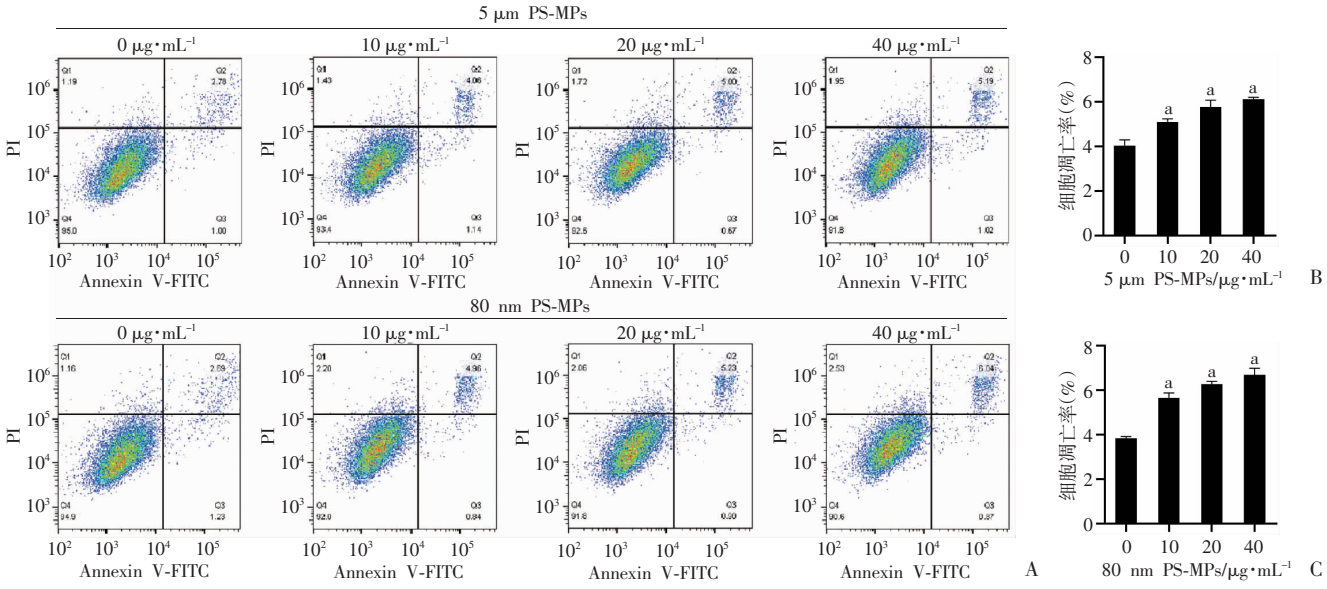
图 2 5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 细胞形态和增殖情况

2.3　PS-MPs 暴露明显诱导 TM3 细胞凋亡

为进一步探究 PS-MPs 抑制 TM3 细胞增殖的原因,采用流式细胞术检测 TM3 细胞凋亡情况。结果显示,TM3 细胞 PS-MPs 暴露 48 h 后,5 μm PS-MPs 组和 80 nm PS-MPs 组随着暴露浓度升高细胞凋亡也增加($P<0.05$),呈现出良好的剂量-效应关系(图 3)。结果表明 5 μm 和 80 nm PS-MPs 均能显著诱导 TM3 细胞凋亡。

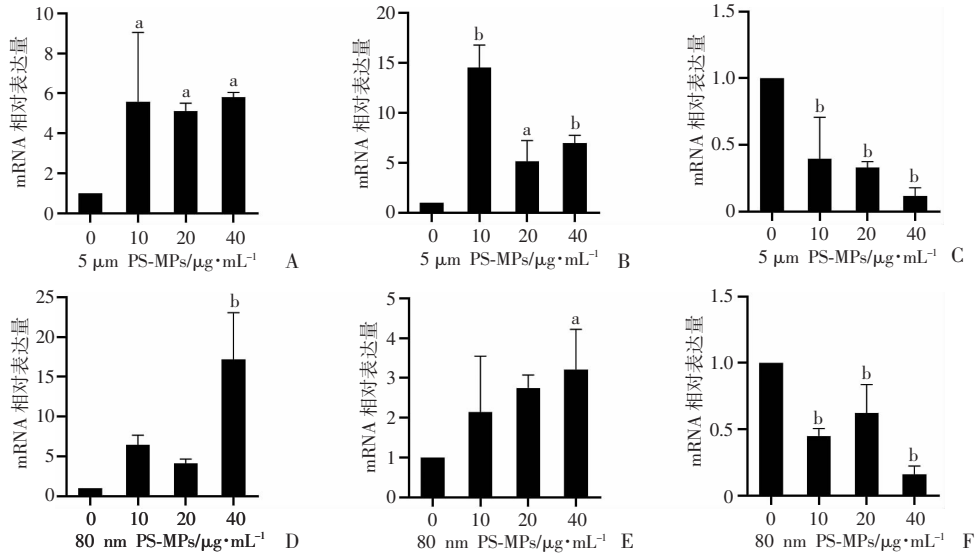
2.4　PS-MPs 对凋亡分子 p53、Bax 和 Bcl2 mRNA 表达的影响

前面通路的富集结果暗示 p53 信号通路可能参与了 PS-MPs 导致的 TM3 细胞凋亡的发生过程。为进一步验证该假设,采用 RT-qPCR 检测 p53 信号通路中促凋亡基因 p53、Bax 以及抑凋亡基因 Bcl2 的 mRNA 水平表达。如图 4 所示,与对照组相比,5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露 48 h 后促凋亡基因 p53、Bax 的 mRNA 水平显著升高($P<0.05$),抑凋亡基因 Bcl2 的 mRNA 水平明显降低($P<0.05$)。结果表明 PS-MPs 可能通过 p53 信号通路诱导 TM3 细胞凋亡。



A:5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 流式细胞结果;B:5 μm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 细胞凋亡定量分析;C:80 nm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 细胞凋亡定量分析; a: $P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 3　5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 后细胞凋亡



A~C:5 μm PS-MPs 组 p53、Bax、Bcl2 mRNA 相对表达量;D~F:80 nm PS-MPs 组 p53、Bax、Bcl2 mRNA 相对表达量;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 4　5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露后 p53 信号通路中关键基因的 mRNA 表达变化

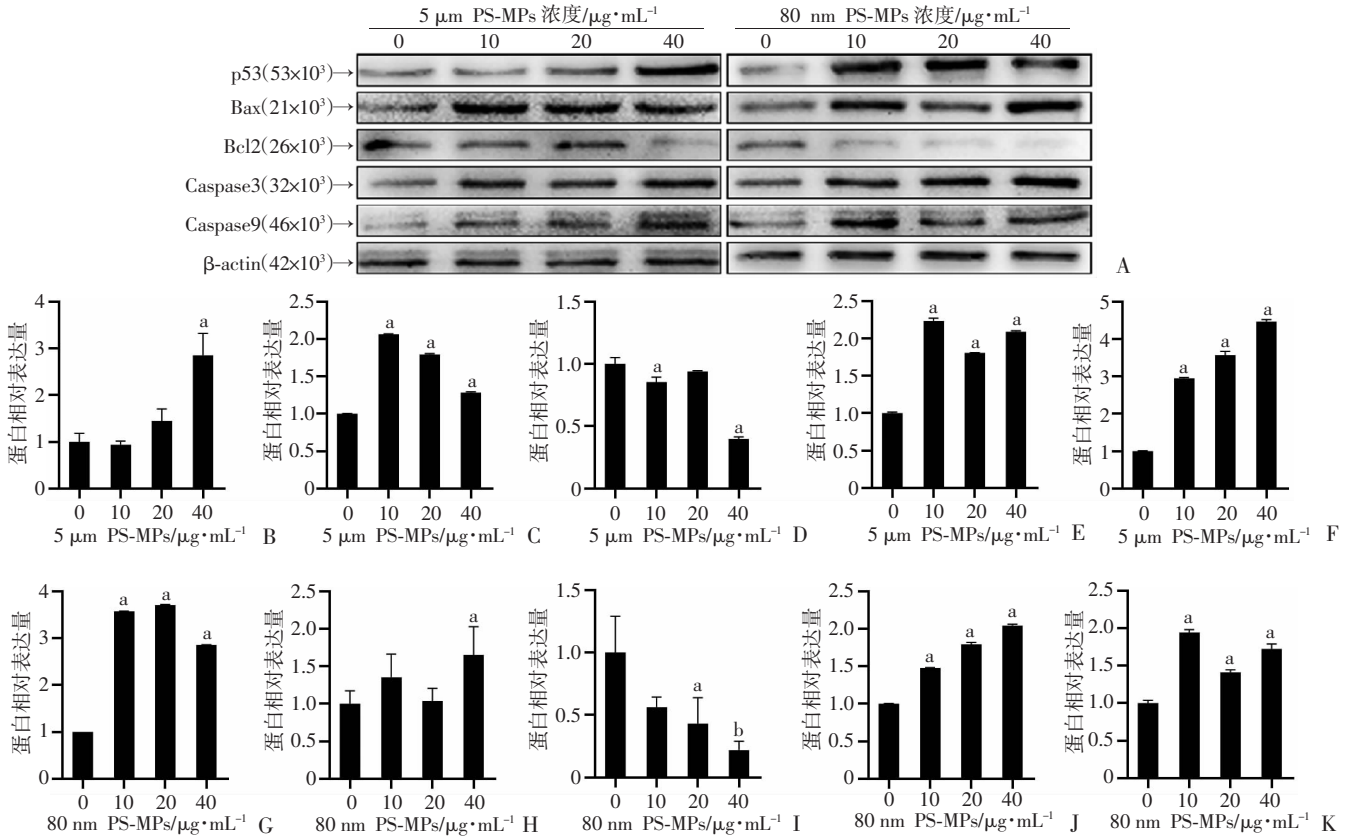
2.5 PS-MPs 对 p53 信号通路关键蛋白表达的影响

PS-MPs 暴露 TM3 细胞后,Western blot 检测 p53 信号通路中 p53、Bax、Bcl2、Caspase3 和 Caspase9 蛋白的表达,结果显示,与对照组比较,PS-MPs 暴露显著上调促凋亡蛋白 p53、Bax、Caspase3 和 Caspase9 的表达($P<0.05$),显著下调抑凋亡蛋白 Bcl2 的表达($P<0.05$,图 5)。进一步提示 PS-MPs 可能通过 p53 信号通路诱导 TM3 细胞的凋亡。

3 讨论

近年来,由于 MPs 向环境中释放量增加,人类对 MPs 的接触和蓄积会随着时间的推移而增加[18]。微塑料在体内各组织器官中长期蓄积可能导致颗粒毒性影响多个器官和系统[19]。近期研究显示,微塑料(MPs)能够对男性生育能力造成威胁,在哺乳动物模型中 PS-MPs 能够降低精子数量和活力[14]、改变睾丸形态[15]、降低睾酮水平[17]和破坏 BTB 的完整性[16]。微塑料作为分布较为广泛的新兴污染物,可能是导致雄性生殖能力下降的重要因素之一,值得对其作用和机制开展深入研究。

睾丸间质细胞主要负责睾酮的合成,在精子发生、雄性第二性征、睾丸功能的维持等方面具有重要作用。我们前期的动物体内实验也表明,PS-MPs 暴露后睾酮合成显著降低,提示睾丸间质细胞受到损伤。为了揭示其潜在的损伤机制,本研究使用 CTD 数据库筛选 PS 与男性生殖系统疾病相关的基因,并使用 KEGG 和 GO 对这些相关基因进行富集分析。KEGG 明显富集到 p53 信号通路和细胞凋亡等关键通路,GO 富集分析显示 PS 的生物学过程与细胞凋亡有关,在 BP 分析中,pol Ⅱ启动子的转录和细胞凋亡两项都同时涉及了正向和负向调控。为了探讨 PS-MPs 与生殖细胞凋亡之间的关系,使用 5 μm 和 80 nm 两种粒径的 PS-MPs 处理 TM3 细胞发现,PS-MPs 暴露 48 h 后细胞活力随剂量增加而降低,流式细胞术提示细胞凋亡率逐渐上升,且具有剂量-效应关系。这些结果进一步证实 PS-MPs 暴露能够导致睾丸间质细胞凋亡,最终影响睾酮合成和水平。p53 具有控制细胞周期、调节细胞衰老和启动细胞凋亡的能力[20],也能够激活促凋亡因子



A:5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露 TM3 细胞 48 h 后 Western blot 检测相关蛋白表达;B~F:5 μm PS-MPs 组 p53、Bax、Bcl2、Caspase3、Caspase9 蛋白半定量分析;G~K:80 nm PS-MPs 组 p53、Bax、Bcl2、Caspase3、Caspase9 蛋白半定量分析;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 5 5 μm 和 80 nm PS-MPs 暴露后 p53 信号通路关键基因的蛋白表达变化

(如 Bax)抑制抗凋亡因子(如 Bcl2)的表达[21]。同时,p53 可激活线粒体和死亡受体诱导凋亡通路进一步诱导 Caspase9/3 活化,从而导致细胞凋亡。在本研究中,对 p53 基因及其直接调控的靶基因 Bax、Bcl2 进行表达检测,分析结果显示,PS-MPs 暴露后 p53、Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,下游蛋白 Caspase3 和 Caspase9 表达显著上调,而 Bcl2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低。这些数据表明,p53 信号通路在 PS-MPs 导致 TM3 细胞凋亡的过程中可能起到非常重要的作用,属于正向调控凋亡过程。

研究显示,微米级和纳米级的 PS-MPs 导致细胞凋亡的器官和效应强度不同。在微米级的 PS-MPs 中,0.5 μm PS-MPs 通过氧化应激和激活 NLRP3/Caspase-1 通路引起卵巢颗粒细胞凋亡[22-23],0.5 μm PS-MPs 通过激活 Wnt/β-Catenin 信号通路诱导心脏纤维化和氧化应激导致心肌细胞凋亡[24],5 μm PS-MPs 通过 ROS 驱动钙过载诱导肝细胞凋亡[25],0.2、2、10 μm PS-MPs 被小胶质细胞内化后引起细胞免疫改变和细胞凋亡[26]。在纳米级的 PS-MPs 中,60 nm PS-MPs 能够蓄积在神经细胞质中,导致神经细胞凋亡[27],GES-1 细胞通过内化纳米级 PS-MPs 激活 RhoA/F-actin 信号通路导致细胞凋亡[28],50、500 nm 和 5 μm PS-MPs 暴露后引起氧化应激,促进 MOAP-1 表达诱导 RBL-2H3 细胞凋亡[29],其中 50 nm PS-MPs 导致的细胞凋亡最为严重。微米级和纳米级 PS-MPs 联合暴露导致肠道功能障碍,通过 ROS 介导肠道上皮细胞凋亡[30],比单独颗粒 PS-MPs 暴露时损伤更严重。

本研究显示,无论是微米级的 PS-MPs 还是纳米级的 PS-MPs,它们对睾丸间质 TM3 细胞的影响具有高度的相似性,提示不同径粒 PS-MPs 对雄性生殖系统可能具有类似的毒性。PS-NPs 通过 ERK1/2 MAPK 和 AKT 信号通路激活 mTOR/4E-BP1 诱导 HIF-1 表达,下调 StAR 表达导致小鼠睾酮水平降低[31];PS-MPs 暴露 Nrf2 /HO-1/NF-κB 途径引起的 ICR 小鼠精子质量异常[15];微塑料对生殖细胞凋亡之外的还可能存在其他机制,还需要后续更为深入的机制研究。

综上,本研究结果显示 PS-MPs 能够诱导 TM3 细胞凋亡,伴随着 p53 信号通路关键基因的激活,提示 p53 信号通路可能在 PS-MPs 诱导的细胞凋亡中发挥着关键作用,这为进一步研究 PS-MPs 诱导细胞凋亡及相关通路提供了前期资料。

参考文献:

[1] THOMPSON R C, OLSEN Y, MITCHELL R P, *et al*. Lost at sea: where is all the plastic? [J]. Science, 2004, 304(5672): 838. DOI: 10.1126/science.1094559.

[2] COLE M, LINDEQUE P, HALSBAND C, *et al*. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review[J]. Mar Pollut Bull, 2011,62(12):2588-2597.

[3] NAPPER I E, BAKIR A, ROWLAND S J, *et al*. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics[J]. Mar Pollut Bull, 2015, 99(1/2): 178-185. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.029.

[4] WANG J D, TAN Z, PENG J P, *et al*. The behaviors of microplastics in the marine environment[J]. Mar Environ Res, 2016, 113: 7-17. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.10.014.

[5] ZARUS G M, MUIANGA C, HUNTER C M, *et al*. A review of data for quantifying human exposures to micro and nanoplastics and potential health risks[J]. Sci Total Environ, 2021, 756: 144010. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144010.

[6] ERIKSEN M, MASON S, WILSON S, *et al*. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes[J]. Mar Pollut Bull, 2013, 77(1/2): 177-182. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.10.007.

[7] WANG W F, GE J, YU X Y, *et al*. Environmental fate and impacts of microplastics in soil ecosystems: progress and perspective[J]. Sci Total Environ, 2020, 708: 134841. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134841.

[8] XIANG Y J, JIANG L, ZHOU Y Y, *et al*. Microplastics and environmental pollutants: key interaction and toxicology in aquatic and soil environments[J]. J Hazard Mater, 2022, 422: 126843. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126843.

[9] LIEBEZEIT G, LIEBEZEIT E. Synthetic particles as contaminants in German beers[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2014, 31(9): 1574-1578. DOI: 10.1080/19440049.2014.945099.

[10] KOSUTH M, MASON S A, WATTENBERG E V. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0194970. DOI: 10.1371/journal.pone.0194970.

[11] LIEBEZEIT G, LIEBEZEIT E. Non-pollen particulates in honey and sugar[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013, 30(12): 2136-2140. DOI: 10.1080/19440049.2013.843025.

[12] PRATA J C, DA COSTA J P, LOPES I, *et al*. Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects[J]. Sci Total Environ, 2020, 702: 134455. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.

[13] ZHANG Q, HE Y, CHENG R J, *et al*. Recent advances in

toxicological research and potential health impact of microplastics and nanoplastics *in vivo*[J]. Environ Sci Pollut Res, 2022, 29(27): 40415-40448. DOI: 10.1007/s11356-022-19745-3.

[14] JIN H B, MA T, SHA X X, *et al*. Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice[J]. J Hazard Mater, 2021, 401: 123430. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123430.

[15] HOU B L, WANG F Y, LIU T, *et al*. Reproductive toxicity of polystyrene microplastics: *in vivo* experimental study on testicular toxicity in mice[J]. J Hazard Mater, 2021, 405: 124028. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124028.

[16] LI S D, WANG Q M, YU H, *et al*. Polystyrene microplastics induce blood-testis barrier disruption regulated by the MAPK-Nrf2 signaling pathway in rats[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(35): 47921-47931. DOI: 10.1007/s11356-021-13911-9.

[17] JIN H B, YAN M H, PAN C, *et al*. Chronic exposure to polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity and decreased testosterone levels *via* the LH-mediated LHR/cAMP/PKA/StAR pathway[J]. Part Fibre Toxicol, 2022, 19(1): 13. DOI: 10.1186/s12989-022-00453-2.

[18] YONG C Q Y, VALIYAVEETTIL S, TANG B L. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(5): 1509. DOI: 10.3390/ijerph17051509.

[19] GONZÁLEZ-ACEDO A, GARCÍA-RECIO E, ILLESCAS-MONTES R, *et al*. Evidence from *in vitro* and *in vivo* studies on the potential health repercussions of micro- and nanoplastics[J]. Chemosphere, 2021, 280: 130826. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130826.

[20] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20180992. DOI: 10.1042/BSR20180992.

[21] MIYASHITA T, HARIGAI M, HANADA M, *et al*. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene[J]. Cancer Res, 1994, 54(12): 3131-3135.

[22] AN R, WANG X F, YANG L, *et al*. Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary through oxidative stress in rats[J]. Toxicology, 2021, 449: 152665. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152665.

[23] LI Z K, ZHU S X, LIU Q, *et al*. Polystyrene microplastics cause cardiac fibrosis by activating Wnt/β-catenin signaling pathway and promoting cardiomyocyte apoptosis in rats[J]. Environ Pollut, 2020, 265: 115025. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115025.

[24] HOU J Y, LEI Z M, CUI L L, *et al*. Polystyrene microplastics lead to pyroptosis and apoptosis of ovarian granulosa cells *via* NLRP3/Caspase-1 signaling pathway in rats[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 212: 112012. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112012.

[25] LI S W, MA Y, YE S Z, *et al*. Polystyrene microplastics trigger hepatocyte apoptosis and abnormal glycolytic flux *via* ROS-driven calcium overload[J]. J Hazard Mater, 2021, 417: 126025. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126025.

[26] KWON W, KIM D, KIM H Y, *et al*. Microglial phagocytosis of polystyrene microplastics results in immune alteration and apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. Sci Total Environ, 2022, 807: 150817. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150817.

[27] NIE J H, SHEN Y, ROSHDY M, *et al*. Polystyrene nanoplastics exposure caused defective neural tube morphogenesis through caveolae-mediated endocytosis and faulty apoptosis[J]. Nanotoxicology, 2021, 15(7): 885-904. DOI: 10.1080/17435390.2021.1930228.

[28] DING Y F, ZHANG R Q, LI B Q, *et al*. Tissue distribution of polystyrene nanoplastics in mice and their entry, transport, and cytotoxicity to GES-1cells[J]. Environ Pollut, 2021, 280: 116974. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116974.

[29] LIU L, LIU B Y, ZHANG B W, *et al*. Polystyrene micro(nano)plastics damage the organelles of RBL-2H3 cells and promote MOAP-1 to induce apoptosis[J]. J Hazard Mater, 2022, 438: 129550. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129550.

[30] LIANG B X, ZHONG Y Z, HUANG Y J, *et al*. Underestimated health risks: polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis[J]. Part Fibre Toxicol, 2021, 18(1): 20. DOI: 10.1186/s12989-021-00414-1.

[31] WEN S Y, CHEN Y B, TANG Y Z, *et al*. Male reproductive toxicity of polystyrene microplastics: study on the endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 172: 113577. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113577.

(收稿:2022-12-01;修回:2023-02-28)

(编辑 张 维)