DOI:10.16016/j.2097-0927.202210115

1-硝基芘通过线粒体损伤致卵巢颗粒细胞功能障碍

崔浩楠[1],何世军[1],王立宏[1],杨 望[1],杨彬伟[1],凌 曦[1],邹 鹏[1],张国伟[2],敖 琳[1],曹 佳[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[1],环境卫生学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 探讨1-硝基芘(1-nitropyrene,1-NP)通过诱导线粒体损伤对人卵巢颗粒细胞KGN的增殖、周期进展及性激素合成的影响。**方法** 采用不同浓度(0.625、1.25、2.5、5、10 μmol/L)1-NP染毒KGN细胞48 h,EdU掺入法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期,ELISA检测细胞培养上清中雌二醇及孕烯醇酮浓度,DCFH-DA探针检测细胞活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平,MitoSOX探针检测线粒体超氧化物(mitochondrial superoxides,MitoSOX)水平,JC-1探针检测线粒体膜电位,ATP试剂盒检测细胞内ATP含量,Western blot检测细胞增殖、周期进展、DNA损伤反应以及性激素合成相关蛋白的表达。采用线粒体抗氧化剂IDE、1-NP单独和联合处理细胞,再次检测上述指标。**结果** 不同浓度1-NP染毒后KGN细胞增殖显著降低($P<0.05$)。2.5、5、10 μmol/L的1-NP处理细胞后,细胞增殖标志物PCNA蛋白表达显著降低,5、10 μmol/L的1-NP处理后G_2/M期细胞比例显著升高($P<0.05$)。1-NP(10 μmol/L)处理3 h即可诱导γ-H2AX表达增加($P<0.01$);不同浓度1-NP处理后,DNA损伤反应通路蛋白p-ATM、p53和$p21^{cip1}$表达明显升高($P<0.05$),G_2/M期阻滞相关蛋白CDK-1和CyclinB1表达明显降低($P<0.05$)。此外,1-NP处理后KGN细胞的雌二醇、孕烯醇酮浓度显著下降($P<0.05$),性激素合成相关蛋白CYP19、CYP11A1的表达也受到抑制($P<0.05$)。线粒体及氧化应激相关指标检测结果显示,1-NP导致KGN细胞中ROS、MitoSOX水平显著升高,线粒体膜电位和ATP水平呈剂量依赖性下降。与10 μmol/L 1-NP单独染毒组相比,IDE与1-NP联合处理组G_2/M期细胞比例显著下降,雌二醇、孕烯醇酮水平出现一定程度升高,DNA损伤反应、细胞周期进展以及性激素合成相关蛋白的表达也出现明显恢复。同时,IDE与1-NP联合处理显著改善1-NP诱导的线粒体损伤,包括降低细胞ROS和MitoSOX水平,提高线粒体膜电位和ATP水平。**结论** 1-NP可诱导线粒体损伤,造成卵巢颗粒细胞KGN的增殖抑制、周期阻滞、性激素合成障碍,而提高线粒体功能则能部分缓解1-NP诱导的KGN细胞功能障碍。

[**关键词**] 1-硝基芘;人卵巢颗粒细胞系;周期阻滞;性激素;线粒体
[**中图法分类号**] R322.65; R363.21;R994.6 [**文献标志码**] A

1-nitropyrene induces ovarian granulosa cell dysfunction through mitochondrial damage

CUI Haonan[1], HE Shijun[1], WANG Lihong[1], YANG Wang[1], YANG Binwei[1], LING Xi[1], ZOU Peng[1], ZHANG Guowei[2], AO Lin[1], CAO Jia[1] [1]Institute of Toxicology, [2]Department of Environmental Hygiene, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of 1-nitropyrene (1-NP) on the proliferation, cycle progression and sex hormone synthesis of human ovarian granulosa cell line KGN *via* inducing mitochondrial damage. **Methods** After KGN cells were treated with 1-NP at different concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 μmol/L) for 48 h, cell proliferation, cell cycle, and contents of estradiol and pregnenolone in the

[**基金项目**] 国家重点研发计划(2017YFC1002002);国家自然科学基金面上项目(82073590)
[**通信作者**] 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/)

supernatant were detected by EdU assay, flow cytometry and ELISA, respectively. And the levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial superoxide (MitoSOX) and mitochondrial membrane potential were examined with specific fluorescent probes including DCFH-DA probe, MitoSOX probe and JC-1 probe, respectively. In addition, ATP kit was adopted to measure the cellular ATP level, and Western blotting was also conducted to determine the expression of proteins related with the cell proliferation, cycle progression, DNA damage response and synthesis of sex hormones. Finally, the mitochondrial antioxidant idebenone (IDE, 1 μmol/L) and 1-NP (10 μmol/L) were combined to treat the cells for 48 h, and then the above indicators were determined correspondingly again. **Result** As compared with the control cells, 1-NP (0.625 ~ 10 μmol/L) treatment significantly inhibited cell proliferation ($P<0.05$). The expression of PCNA, a marker of cell proliferation, was reduced after treatment with 1-NP (2.5, 5 or 10 μmol/L), and the percentage of cells at G_2/M phase was elevated at 5 and 10 μmol/L of 1-NP ($P<0.05$). Western blotting showed that the expression of γ-H2AX began to rise after 1-NP treatment (10 μmol/L) for 3 h ($P<0.01$), and the levels of DNA damage pathway proteins, p-ATM, p53 and $p21^{cip1}$ were also obviously increased ($P<0.05$), while those of G_2/M phase block-related proteins, CDK-1 and CyclinB1, were notably decreased at different doses of 1-NP ($P<0.05$). In addition, the contents of estradiol and pregnenolone in the supernatant of KGN cells were remarkably diminished after 1-NP treatment ($P<0.05$), and the expression levels of sex hormone synthesis-related proteins CYP19 and CYP11A1 were inhibited as well ($P<0.05$). The detection of mitochondrial and oxidative stress-related indicators indicated that the levels of ROS and MitoSOX in KGN cells were greatly up-regulated due to 1-NP treatment, while the mitochondrial membrane potential and ATP level were decreased in a dose-dependent manner. However, the combination of 1-NP and IDE significantly declined the percentage of G_2/M-phase cells, elevated the contents of estradiol and pregnenolone, and restored the expression levels of proteins related to DNA damage, cell cycle as well as sex hormone synthesis when compared with the cells treated with 10 μmol/L 1-NP. Moreover, the combination treatment also ameliorated the mitochondrial damage induced by 1-NP, including lowering ROS and MitoSOX levels and improving the mitochondrial membrane potential and ATP level. **Conclusion** 1-NP can cause mitochondrial damage, which leads to proliferation inhibition, cycle arrest and disorder of sex hormone synthesis, improve mitochondrial function, and thus partially alleviate 1-NP-induced dysfunction in KGN cells.

[**Key words**] 1-nitropyrene; human ovarian granulosa cell line; cycle arrest; sex hormone; mitochondria

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1002002) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (82073590). Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

硝基多环芳烃(nitropolycyclic aromatic hydrocarbons,nPAHs)是一类含有硝基官能团的多环芳烃衍生物[1],是重要的环境污染物。近年由于化石能源的大量使用,使 nPAHs 广泛分布于各种环境介质中,在人体中也能检测到其代谢物的存在,nPAHs 的毒性效应及对人体健康的影响引起了高度关注。1-硝基芘(1-nitropyrene,1-NP)是 nPAHs 的代表物,1-NP 具有明确的致突变性和致癌性[2]。研究也发现 1-NP 的孕期暴露会导致胎盘生长抑制及子代宫内生长受限[3],同时 1-NP 染毒的雄性小鼠出现睾酮水平的显著下降[4],这些均提示 1-NP 可能具有环境内分泌干扰效应。机体健康尤其生殖系统的正常功能受到激素的精细调控,而环境污染物 1-NP 是否对雌性生殖系统的功能以及性激素水平造成干扰,目前尚不清楚。

卵巢颗粒细胞在卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone,FSH)和黄体生成素(luteotropic hormone,LH)的作用下,能够合成甾体激素雌激素和孕酮,在卵泡发育中发挥重要作用,颗粒细胞功能受损不仅影响性激素生成,还能进一步造成卵泡的发育障碍。KGN 细胞为人源性的卵巢颗粒细胞瘤,具有卵巢颗粒细胞的大部分生理活性[5],成为研究环境污染物雌性生殖损伤的理想细胞模型,在双酚 A 等物质的内分泌干扰效应研究中已有应用[6-7]。已有研究显示,1-NP 暴露导致多种细胞的活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成,氧化应激是导致颗粒细胞损伤的重要原因,ROS 的过量生成也与线粒体功能障碍互为因果[8-9]。为进

一步明确 1-NP 是否通过诱导线粒体损伤而造成卵巢颗粒细胞的功能障碍,并影响细胞的甾体激素生成,本研究以 KGN 细胞为研究对象,观察 1-NP 对细胞的毒性效应,并采用线粒体保护剂处理细胞,以探讨线粒体损伤在 1-NP 所致颗粒细胞功能障碍中的作用,为阐明 1-NP 致雌性生殖损伤的分子机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人卵巢颗粒细胞系 KGN 购自北纳创联生物科技有限公司;1-NP、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)和 DMEM 培养基购自日本 Sigma 公司;二丁酰环腺苷酸(Dibutyryl cAMP,DBcAMP)和艾地苯醌(Idebenone,IDE)购自美国 Med Chem Express 公司;雄烯二酮购自上海阿拉丁公司;胎牛血清购自浙江四季青公司;雌二醇、孕烯醇酮检测 ELISA 试剂盒购自上海酶免公司;PCNA、ATM、p-ATM、p53、$p21^{cip1}$、CyclinB1、β-actin 抗体购自美国 CST 公司,CYP19、CDK-1 抗体购自北京博奥森公司;CYP11A1 抗体购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化酶标记的抗兔、抗鼠二抗购自美国 CST 公司;细胞周期与凋亡试剂盒购自上海碧云天公司;MitoSOX™ 线粒体超氧化物检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位试剂盒分别购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ECL 发光液购自英国 Invigentech™ 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 KGN 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清),其中添加 0.1 mmol/L DBcAMP 或 10 μmol/L 雄烯二酮。培养条件为 37 ℃,5% CO_2。1-NP 染毒组采用终浓度为 0.625、1.25、2.5、5、10 μmol/L 的 1-NP 溶解于 DMSO,处理细胞;以仅加入 DMSO 的未染毒细胞作为对照组。为观察线粒体功能在 1-NP 损伤效应中的作用,实验分为 4 组:对照组、1-NP 单独染毒组、IDE 处理组及 IDE+1-NP 联合处理组。对照组仅加入 DMSO,1-NP 单独染毒组加入 10 μmol/L 1-NP,IDE 处理组加入 1 μmol/L 线粒体保护剂 IDE,IDE+1-NP 联合组加入对应剂量 IDE 和 1-NP 共同处理细胞 48 h。

1.2.2 EdU 细胞增殖检测 细胞接种于 6 孔板中,不同浓度 1-NP 处理 48 h 后,弃去培养基,按照试剂盒说明书进行操作。PBS 洗涤细胞后,加入 37 ℃预热的 2X EdU,37 ℃孵育 2 h,PBS 洗涤、固定以及细胞膜通透后,采用 Hoechst 33342 染液进行细胞核染色,荧光显微镜观察。

1.2.3 细胞周期检测 不同浓度 1-NP 处理细胞 48 h 后,PBS 清洗后收集细胞,乙醇 4 ℃固定过夜。检测前采用 PBS 洗涤细胞,加入含有 RNA 酶 A 的 PI 染色液,37 ℃孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期,FlowJo 软件分析。

1.2.4 Western blot 检测相关蛋白表达 收集细胞,采用 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,4 ℃、12 000×g 离心 20 min,收集上清备用。采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,每个样本取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电转至 PDVF 膜后,5% BSA 封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜。洗膜后,加入相应二抗孵育 1 h。洗膜后,采用 ECL 发光液显色发光,Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.2.5 ELISA 检测性激素水平 采用 ELISA 方法检测细胞培养基中雌二醇、孕烯醇酮的浓度。1-NP 处理 KGN 细胞 48 h 后,收集培养基上清,2 000×g 离心 20 min 后,按照人雌二醇、孕烯醇酮 ELISA 试剂盒检测方法,在波长为 450 nm 的酶标仪上检测光密度值[D(450)],根据标准曲线计算相应的激素水平,以培养基激素水平/细胞蛋白总量衡量每个样本的激素相对水平。

1.2.6 细胞活性氧检测 收集细胞,无血清培养基洗涤。按照活性氧检测试剂盒说明,细胞中加入含荧光探针 DCFH-DA(1∶1 000 稀释)的无血清培养基,37 ℃孵育 20 min 后,400×g 离心 5 min,无血清培养基洗涤细胞,重悬细胞后,流式细胞仪检测,FlowJo 软件分析。

1.2.7 线粒体超氧化物检测 收集细胞,无血清培养基洗涤。按照线粒体超氧化物 MitoSOX™ Red 检测试剂盒说明,细胞中加入含荧光染料 MitoSOX™(1∶1 000 稀释)的无血清培养基,37 ℃孵育 10 min 后,无血清培养基洗涤细胞,重悬细胞后,流式细胞仪检测,FlowJo 软件分析。

1.2.8 线粒体膜电位检测 收集细胞,PBS 洗涤。按照 JC-1 检测试剂盒说明,采用 PBS 按 1∶1 000 稀释荧光染料 JC-1,加入细胞中使其终浓度为 2 μmol/L,37 ℃,5% CO_2孵育 15 min 后,PBS 洗涤细胞,流式细胞仪检测,FlowJo 软件分析。

1.2.9 细胞 ATP 水平检测 收集细胞,按照 ATP 检测试剂盒说明检测细胞 ATP 水平。细胞裂解液裂解细胞后,12 000×g 离心 20 min,取上清液至干净离心管。检测样品蛋白浓度后,加入含有荧光素和荧光素酶的 ATP 检测试剂,采用酶标仪进行检测,根据标准曲线计算细胞内 ATP 水平,并除以相应的蛋白浓度计算得到每个样本的细胞内 ATP 相对含量。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间差异比较采用单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

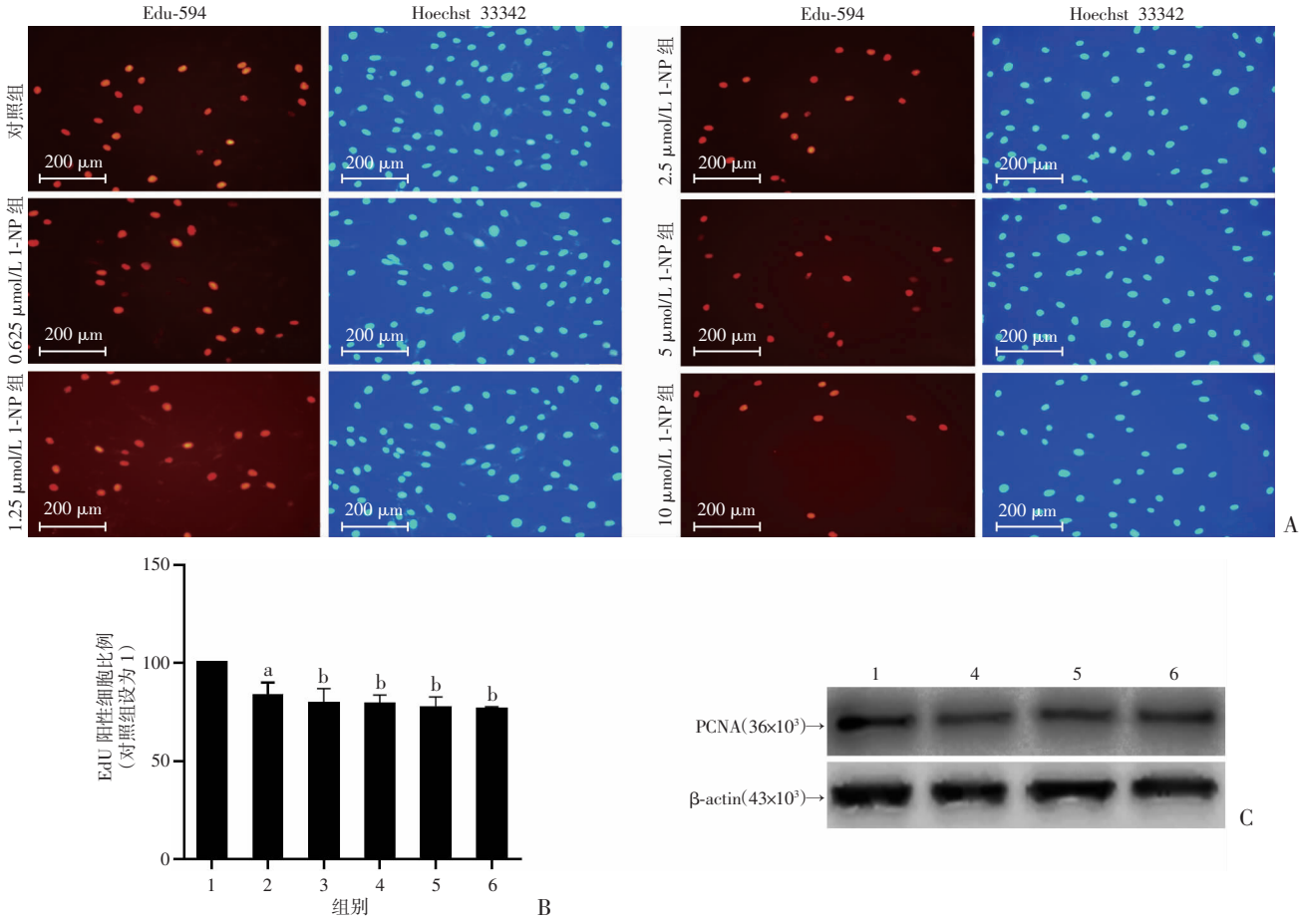
2 结果

2.1 1-NP对KGN细胞的增殖抑制作用

以不同浓度的1-NP(0、0.625、1.25、2.5、5、10 μmol/L)染毒KGN细胞48 h后,采用EdU掺入实验检测细胞增殖情况,结果显示:与对照组(0 μmol/L 1-NP)相比,各个剂量1-NP染毒组中EdU阳性细胞的数目出现明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),但各染毒组的细胞增殖抑制率均小于20%(图1A、B)。因此,后续实验选用对细胞存活影响较小的剂量,即2.5、5、10 μmol/L的1-NP进行染毒处理。此外,Western blot检测结果显示:与对照组相比,各剂量的1-NP处理导致细胞增殖标志蛋白PCNA的表达减少(图1C)。表明1-NP可引起人卵巢颗粒细胞KGN的增殖抑制。

2.2 1-NP可引起KGN细胞周期进展阻滞并诱导DNA损伤反应通路的激活

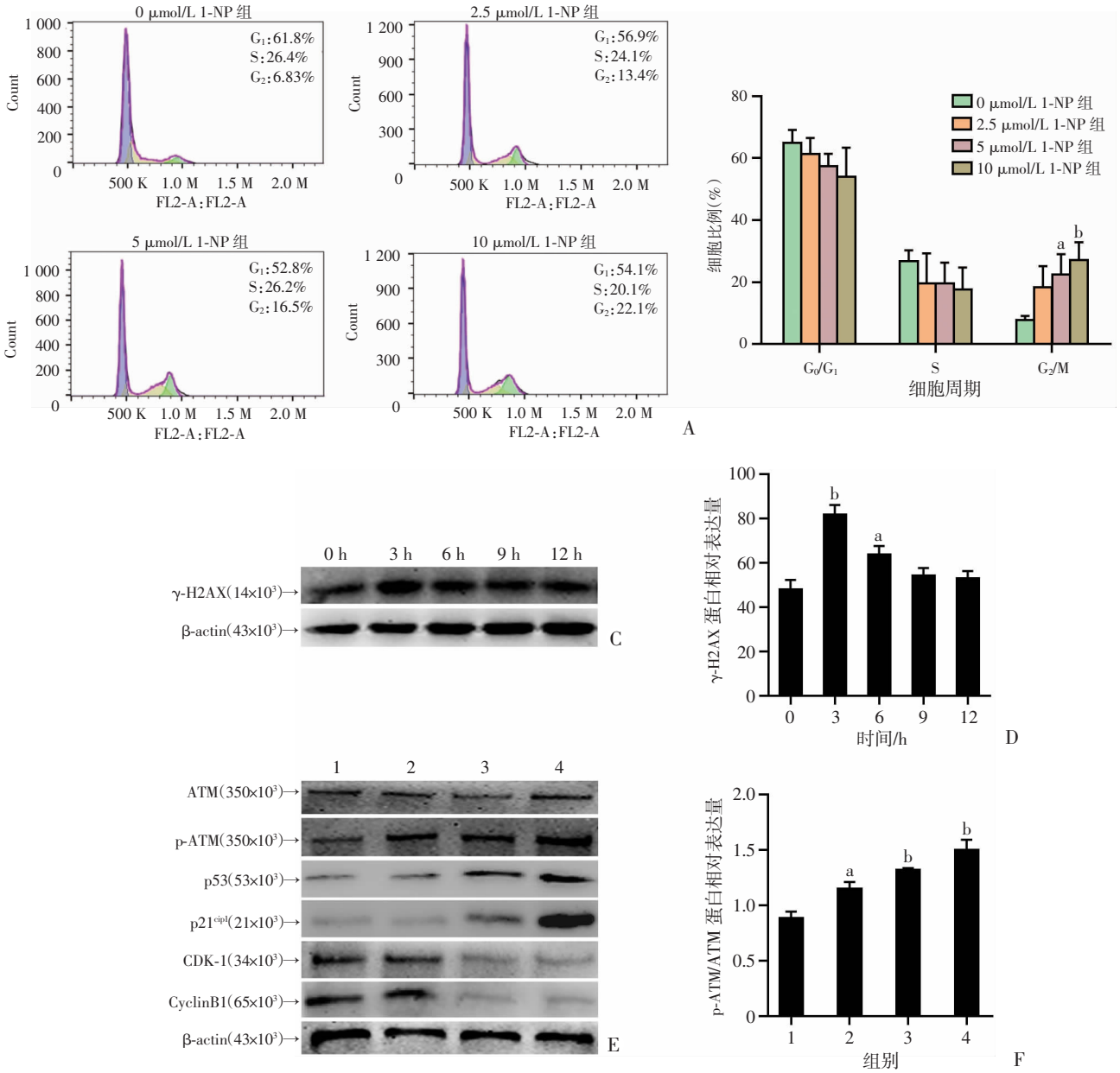
采用流式细胞仪检测细胞周期的变化,结果显示:与对照组相比,5 μmol/L和10 μmol/L的1-NP处理引起G_2/M期细胞比例的显著增加($P<0.05$,$P<0.01$,图2A、B)。γ-H2AX是反映DNA断裂损伤和修复的标志物,Western blot检测显示10 μmol/L 1-NP处理后3 h,γ-H2AX蛋白表达即开始出现显著升高($P<0.01$,图2C、D),表明1-NP染毒导致KGN细胞的DNA损伤。因此,进一步检测DNA损伤反应通路及细胞周期阻滞相关蛋白的表达。结果显示:KGN细胞染毒48 h后,磷酸化ATM(p-ATM)及p-ATM/ATM的比值明显升高($P<0.05$,图2E、F)。此外,p53及其下游靶分子$p21^{cip1}$蛋白的表达也显著增加(图2E),与细胞G_2/M期阻滞相关的蛋白,包括CDK-1和CyclinB1的表达显著降低(图2E)。结果提示1-NP可能通过激活DNA损伤反应通路导致细胞G_2/M期阻滞。



1:对照组;2:0.625 μmol/L 1-NP组;3:1.25 μmol/L 1-NP组;4:2.5 μmol/L 1-NP组;5:5 μmol/L 1-NP组;6:10 μmol/L 1-NP组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:EdU掺入实验检测细胞增殖;B:EdU阳性细胞比例分析;C:Western blot检测细胞增殖相关蛋白PCNA的表达

图1 1-NP对KGN细胞增殖的影响



1:对照组;2:2.5 μmol/L 1-NP 组;3:5 μmol/L 1-NP 组;4:10 μmol/L 1-NP 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:流式细胞仪检测细胞周期的变化;B:各个周期细胞比例分析;C: Western blot 检测细胞 γ-H2AX 蛋白的表达;D:蛋白条带灰度分析;E:Western blot 检测细胞 DNA 损伤反应及周期进展相关蛋白的表达;F:蛋白条带灰度分析

图 2 1-NP 对 KGN 细胞周期及 DNA 损伤修复通路和周期进展相关蛋白表达的影响

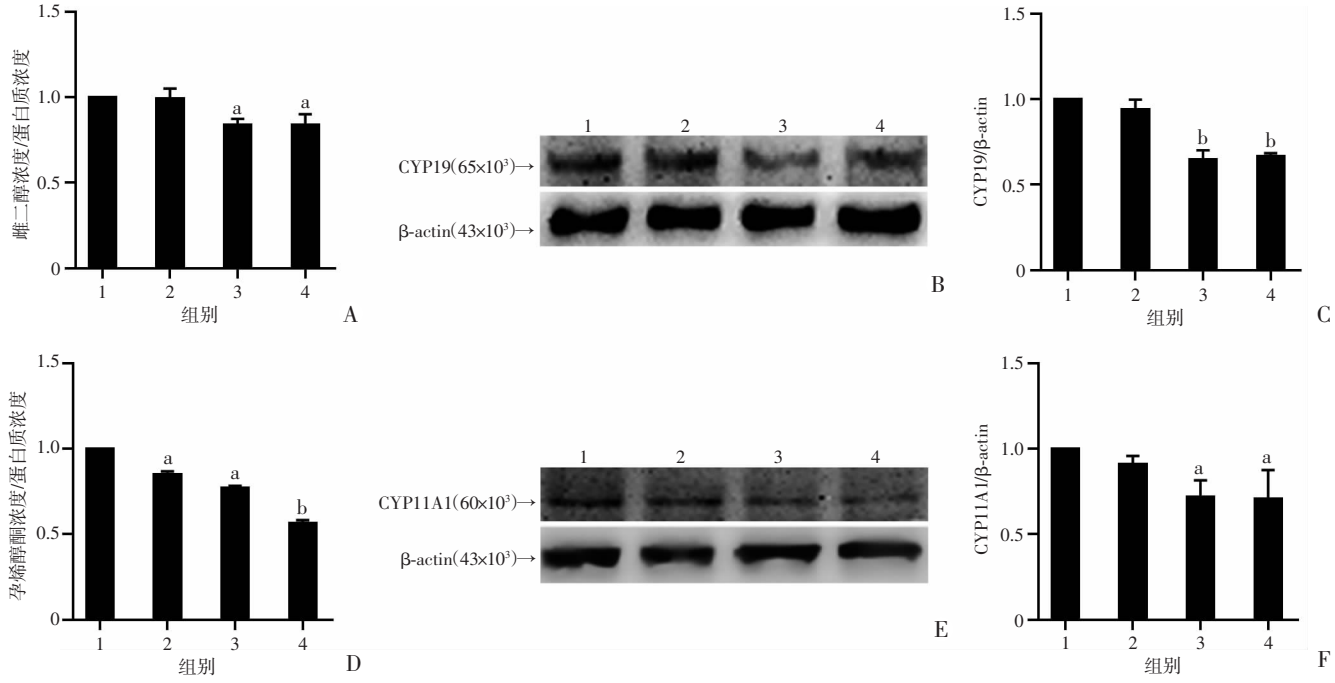
2.3 1-NP 对 KGN 细胞雌二醇及孕烯醇酮生成的影响

采用 ELISA 和 Western blot 检测雌二醇、孕烯醇酮的水平以及合成相关蛋白的表达,结果显示:1-NP 染毒 KGN 细胞 48 h 后,与对照组相比,5 μmol/L 和 10 μmol/L 染毒组细胞培养基中的雌二醇水平显著下降($P<0.05$,图 3A),雌激素合成的限速酶 CYP19 蛋白表达也出现明显下降($P<0.01$,图 3B、C);同时,各个染毒剂量组的孕烯醇酮水平及合成相关蛋白 CYP11A1 的表达也出现显著降低($P<0.05$,$P<0.01$,图 3D~F)。以上结果表明,1-NP 影响 KGN 细胞的性激素生成功能,造成雌二醇、孕烯醇酮水平及合成相关蛋白表达的降低。

2.4 1-NP 诱导 KGN 细胞的线粒体损伤

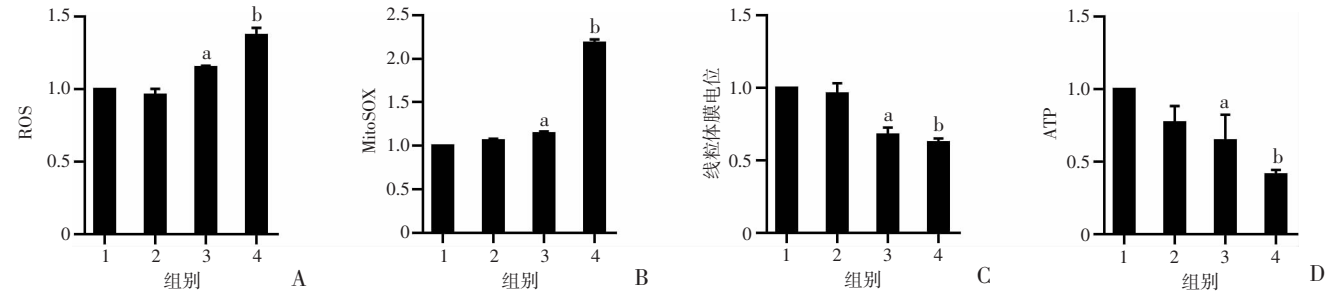
为明确线粒体是否受到 1-NP 染毒的影响,分别

观察细胞 ROS、线粒体过氧化产物、线粒体膜电位水平以及细胞内 ATP 含量的变化。检测结果显示:1-NP 染毒 KGN 细胞 48 h 后,与对照组相比,5 μmol/L 和 10 μmol/L 1-NP 染毒组细胞的 ROS 水平显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,图 4A),反映线粒体活性氧生成的线粒体过氧化物水平(MitoSOX)也显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,图 4B)。同时,染毒组细胞的线粒体膜电位和 ATP 水平也出现明显降低($P<0.05$,$P<0.01$,图 4C、D)。这些结果表明 1-NP 处理造成 KGN 细胞的氧化应激及线粒体损伤。



1:对照组;2:2.5 μmol/L 1-NP 组;3:5 μmol/L 1-NP 组;4:10 μmol/L 1-NP 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较
A:ELISA 检测各个样本培养基的雌二醇水平;B、C:Western blot 检测 CYP19 蛋白的表达及灰度分析;D:ELISA 检测各个样本培养基的孕烯醇酮水平;E、F:Western blot 检测 CYP11A1 蛋白的表达及灰度分析

图 3 1-NP 对 KGN 细胞雌二醇和孕烯醇酮水平及合成相关蛋白表达的影响



1:对照组;2:2.5 μmol/L 1-NP 组;3:5 μmol/L 1-NP 组;4:10 μmol/L 1-NP 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较
A:DCFH-DA 探针结合流式细胞仪检测分析细胞 ROS 水平;B:MitoSOX™ Red 探针结合流式细胞仪检测分析细胞线粒体超氧化物水平(MitoSOX);C:JC-1 探针结合流式细胞仪检测分析细胞线粒体膜电位;D:ATP 检测试剂结合酶标仪检测分析细胞 ATP 水平

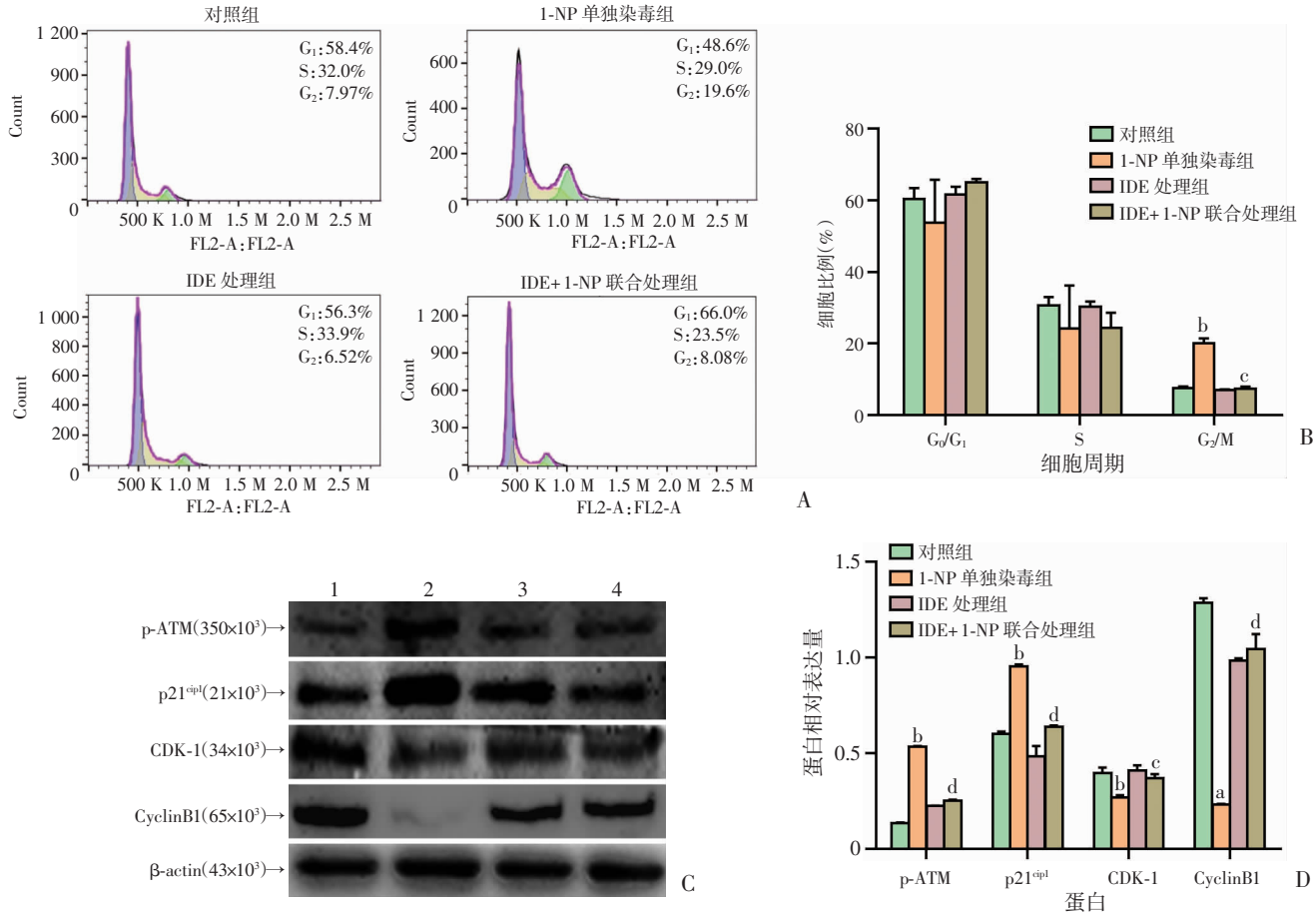
图 4 1-NP 对 KGN 细胞的 ROS、MitoSOX、线粒体膜电位和细胞 ATP 水平的影响

2.5　线粒体保护剂处理对 1-NP 诱导的 KGN 细胞功能障碍的影响

使用 IDE(1 μmol/L)联合 1-NP(10 μmol/L)共同处理细胞,观察线粒体损伤在 1-NP 所致的卵巢颗粒细胞功能障碍中的作用。流式细胞仪检测结果显示:与 1-NP 单独染毒组相比,IDE+1-NP 联合处理组的 G_2/M 期细胞比例明显减少(P<0.05,图 5A、B)。同时,1-NP 诱导的 DNA 损伤反应相关蛋白 p-ATM 和 $p21^{cip1}$ 表达升高,在联合 IDE 处理后出现下降;而 1-NP 所致的周期阻滞相关蛋白 CDK-1、CyclinB1 表达下降,而在联合 IDE 处理后出现升高(P<0.05,图 5C、D)。与 1-NP 单独染毒组相比,IDE+1-NP 联合处理组细胞性激素合成相关蛋白 CYP19 和 CYP11A1 的表达明显升高(P<0.01),且雌二醇的生成也明显增加(P<0.05),孕烯醇酮水平有一定升高但不显著,见图 6。同时 1-NP 造成的氧化应激和线粒体损伤,包括线粒体超氧化物水平的升高、线粒体膜电位和 ATP 水平的降低,均在 IDE 联合处理下出现明显的恢复(图 7)。结果提示线粒体损伤可能参与介导 1-NP 诱导的 KGN 功能障碍,包括引起细胞周期阻滞和激素生成抑制。

3　讨论

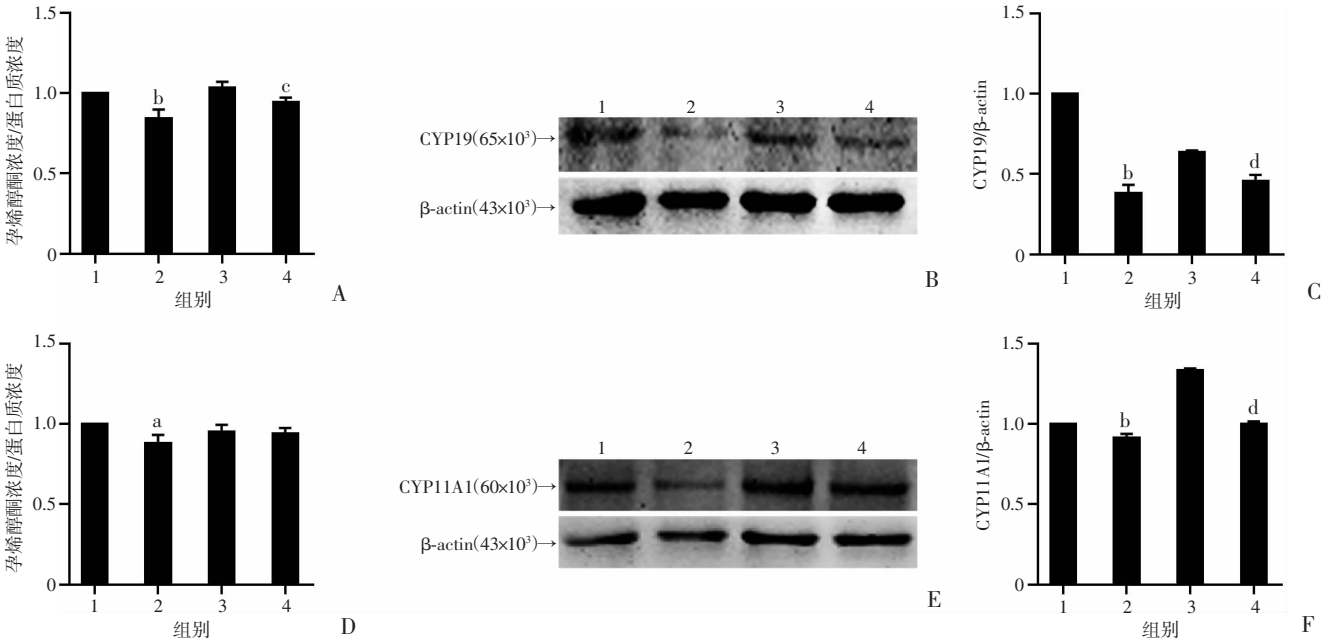
不孕不育正在成为损害人类生殖健康的重要原因,越来越多的流行病学和实验研究表明,人类生殖能力的下降与各种环境污染物密切相关。内分泌干扰物在环境中广泛存在,许多环境内分泌干扰物可能通过影响激素受体、性激素合成、代谢等方式造成生殖损害甚至不育[10]。多环芳烃化学物(polycyclic aromatic hydrocarbons,PAHs)对男、女性生殖和内分泌系统都具有明确的毒性效应[11]。PAHs 在多种环境介质尤其是大气环境中普遍存在,且易于与空气中的自由基发生反应,所形成的 nAPHs 等衍生物成为近年研究的重点。已有的毒理学资料表明大多数 nPAHs 具有致癌性和致突变性,一些nPAHs成员的毒性甚至远高于其



1:对照组; 2:1-NP 单独染毒组;3:IDE 处理组; 4:IDE+1-NP 联合处理组;a:P<0.05,b:P<0.01,与对照组比较;c:P<0.05,d:P <0.01,与 1-NP 单独染毒组比较

A:流式细胞仪检测细胞周期的变化;B:各个周期细胞比例分析;C:Western blot 检测细胞 DNA 损伤反应及周期进展相关蛋白的表达;D:蛋白条带灰度分析

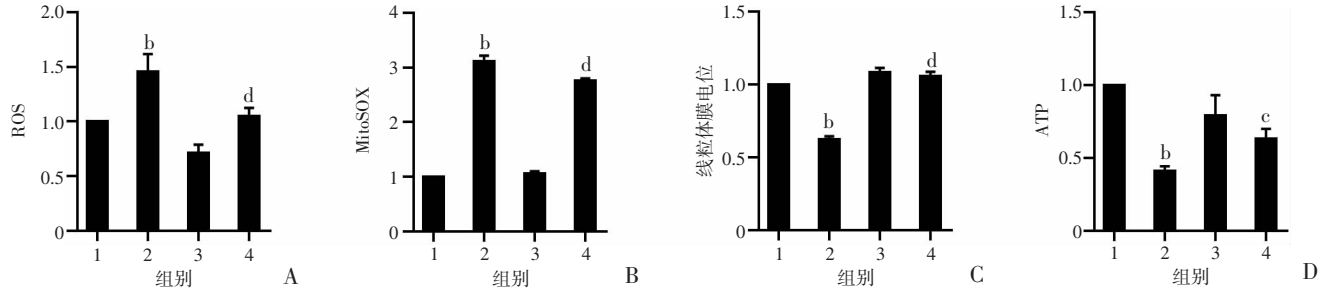
图 5　线粒体保护剂 IDE 对 1-NP 诱导的 KGN 细胞周期阻滞及相关蛋白表达的影响



1:对照组; 2:1-NP 单独染毒组;3:IDE 处理组; 4:IDE+1-NP 联合处理组; a: $P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较; c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 1-NP 单独染毒组比较

A:ELISA 检测各个样本培养基的雌二醇水平;B、C:Western blot 检测 CYP19 蛋白的表达及灰度分析;D:ELISA 检测各个样本培养基的孕烯醇酮水平;E、F:Western blot 检测 CYP11A1 蛋白的表达及灰度分析

图 6 线粒体保护剂 IDE 对 1-NP 所致的 KGN 细胞性激素合成抑制的影响



1:对照组; 2:1-NP 单独染毒组; 3:IDE 处理组; 4:IDE+1-NP 联合处理组; b:$P<0.01$, 与对照组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与 1-NP 单独染毒组比较

A:DCFH-DA 探针结合流式细胞仪检测分析细胞 ROS 水平;B:MitoSOX™ Red 探针结合流式细胞仪检测分析细胞线粒体超氧化物水平(MitoSOX);C:JC-1 探针结合流式细胞仪检测分析细胞线粒体膜电位;D:ATP 检测试剂结合酶标仪检测细胞 ATP 水平

图 7 线粒体保护剂 IDE 对 1-NP 所致氧化应激和线粒体损伤的影响

相应的母体化学物[12],因此阐明 nPAHs 的毒性效应及其作用机制对于其健康风险的评价和防护具有重要意义。1-NP 是 nPAHs 化学物中反映机动车尾气暴露的标志,可黏附于大气细颗粒物中,是其中的重要毒性成分之一[13]。1-NP 对机体重要器官、系统的毒性效应开始得到关注。作为潜在的内分泌干扰物,1-NP 对女(雌)性生殖内分泌的影响还不明确,本研究利用具有正常人类卵巢颗粒细胞生理活性的 KGN 细胞株,观察 1-NP 对颗粒细胞增殖、周期进展以及性激素生成的影响,并进一步分析可能的作用机制,发现 1-NP 引起 KGN 细胞增殖抑制和 G_2/M 期进展阻滞,雌二醇和孕烯醇酮合成受到抑制。此外,细胞出现氧化应激和线粒体损伤,而采用线粒体特异性的保护剂处理则能减轻 1-NP 导致的细胞功能损伤。上述结果充分表明 1-NP 具有显著的内分泌干扰效应,对雌性生殖功能可能造成毒性效应。

卵巢是负责产生卵子及雌性激素的复杂的内分泌器官,成年个体在促性腺激素释放激素的作用下,由卵

巢合成并分泌的性激素通过自分泌或旁分泌的方式在卵泡生成中发挥重要作用,也以内分泌的形式维持正常的生理周期和第二性征的发育[14]。这些复杂的生殖过程对内分泌干扰物的暴露高度敏感,而了解环境有害因素影响卵巢类固醇激素生成的分子、细胞机制需要在体外细胞模型中开展深入的研究。卵巢组织中,颗粒细胞是主要的卵巢功能细胞,负责将雄激素转化为雌激素,并参与孕激素的合成,颗粒细胞增殖抑制将损害雌激素及孕激素的正常合成,并导致卵泡发育异常[15-16]。卵巢颗粒细胞参与性激素合成的主要过程涉及:芳香化酶 CYP19 可以将卵巢膜细胞合成的雄烯二酮转化为雌激素[17]。此外,细胞线粒体中的类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)将胆固醇传递给 CYP11A1,并通过剪切、加碳等多步骤反应合成孕烯醇酮,孕烯醇酮的减少可能是线粒体受损导致的。本研究发现,1-NP 作用下,KGN 细胞的雌二醇及孕烯醇酮分泌水平减少,并且参与合成的关键酶蛋白 CYP19 及 CYP11A1 表达也降低,这些结果充分表明 1-NP 的内分泌干扰效应与抑制颗粒细胞激素生成有关。

线粒体不仅是细胞产生能量的细胞器,也参与细胞周期的调控。线粒体通过氧化磷酸化合成丰富的 ATP,另一方面氧化磷酸化过程中会产生副产物 ROS 等。当 ROS 含量过高时就会对细胞造成损伤[18],包括细胞的 DNA 损伤,并会激活 DNA 损伤反应通路阻碍细胞的正常周期进展。DNA 双链断裂为 DNA 损伤类型之一,该现象可迅速激活组蛋白 H2AX 磷酸化修饰(histone H2AX phosphorylation, γ-H2AX)以标记 DNA 损伤位点并激活下游通路,包括 ATM、ATR 及 p53 等分子在内的通路[19-20]。p53 激活的下游靶基因 $p21^{cip1}$ 是细胞周期依赖激酶抑制分子,ZHU 等[21]研究发现在宫颈癌细胞中 $p21^{cip1}$ 基因表达升高会抑制 CyclinB1,从而引起周期期阻滞。此外,完整的细胞周期是由细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases,CDKs)相关的特定周期蛋白在分子水平上高度协调完成的[22]。其中,CDK-1 与细胞周期蛋白 B1(CyclinB1)表达减少会阻止细胞由 G_2 期进入 M 期而导致细胞增殖抑制[23]。同样,本研究发现 1-NP 可致 γ-H2AX 短期内一过性增加,且 p-ATM/p53/$p21^{cip1}$ 通路也被激活,CDK-1 及 CyclinB1 表达出现下调,继而发生细胞 G_2/M 期阻滞以及细胞增殖抑制。细胞内 ROS 水平升高时,线粒体是最易损伤的细胞器,因此我们检测了反映线粒体受损的经典指标:线粒体膜电位及细胞内 ATP 水平,发现两者均显著降低。在颗粒细胞合成雌二醇及孕烯醇酮的过程中,需要磷甘酸化酶将 ATP 转化成环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP),cAMP 刺激相应的代谢酶发挥作用[24]。我们猜测 1-NP 通过损伤线粒体而导致细胞周期阻滞及激素合成障碍。研究表明具有生物活性的线粒体营养素是增强线粒体抗氧化能力和恢复正常能量产生的重要物质,包括白藜芦醇、辅酶 Q10 和 α-硫辛酸等[25-26]。为了明确线粒体损伤在 1-NP 诱导的 KGN 细胞周期阻滞及性激素合成障碍中的作用,本研究使用辅酶 Q10 类似物 IDE 作为线粒体保护剂来增强线粒体氧化呼吸链及能量生成功能。IDE 与 1-NP 联合处理 KGN 细胞后,与单独染毒组相比,细胞氧化应激水平、线粒体损伤、周期阻滞及激素合成障碍均有所改善,进一步表明在 1-NP 诱导 KGN 细胞功能障碍中,线粒体可能为敏感的靶细胞器,这一发现为 nPAHs 生殖损伤的防治提供了一定的理论依据。

综上所述,本研究发现 1-NP 诱导卵巢颗粒细胞 KGN 的增殖抑制、周期阻滞及激素合成障碍,其原因可能与 1-NP 造成线粒体功能损伤及细胞氧化应激水平升高有关。虽然本研究在体外颗粒细胞中观察到 1-NP 显著的雌性内分泌干扰效应,今后还需要利用动物体内实验模型以及人群流行病学研究来进一步证实这一内分泌干扰作用。此外,采用高通量的组学研究技术将有助于分析暴露于硝基多环芳烃后特异的分子通路及代谢特征,为阐明硝基多环芳烃的内分泌干扰效应分子机制提供深入的研究线索。

参考文献:

[1] 占洁, 杨颜, 柳杜鹃, 等. 大气中硝基多环芳烃的研究进展[J]. 中国科学: 地球科学, 2012, 42(1): 1-9.
ZHAN J, YANG Y, LIU D J, *et al*. Research progress of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere[J]. Sci Sin Terrae, 2012, 42(1): 1-9.

[2] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans[J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2014, 105: 9-699.

[3] LI R, WANG X L, WANG B, *et al*. Gestational 1-nitropyrene exposure causes fetal growth restriction through disturbing placental vascularity and proliferation [J]. Chemosphere, 2018, 213: 252-258. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.059.

[4] LI J, GAO L, ZHU B B, *et al*. Long-term 1-nitropyrene exposure induces endoplasmic reticulum stress and inhibits steroidogenesis in mice testes[J]. Chemosphere, 2020, 251: 126336. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126336.

[5] SOLAK K A, WIJNOLTS F M J, NIJMEIJER S M, *et al*. Excessive levels of diverse phytoestrogens can modulate steroidogenesis and cell migration of KGN human granulosa-derived tumor cells[J]. Toxicol Rep, 2014, 1: 360-372. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.06.006.

[6] QI J F, LIU L D, YANG J, *et al*. Bisphenol A decreases progesterone synthesis in human ovarian granulosa cells[J]. Birth Defects Res, 2020, 112(20): 1843-1849. DOI: 10.1002/bdr2.1817.

[7] HUANG M Q, HUANG M Z, LI X J, *et al*. Bisphenol A induces apoptosis through GPER-dependent activation of the ROS/Ca^{2+}-ASK1-JNK pathway in human granulosa cell line KGN[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 208: 111429. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111429.

[8] YADAV A K, YADAV P K, CHAUDHARY G R, *et al*. Autophagy in hypoxic ovary[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(17): 3311-3322. DOI: 10.1007/s00018-019-03122-4.

[9] KIM Y D, KO Y J, KAWAMOTO T, *et al*. The effects of 1-nitropyrene on oxidative DNA damage and expression of DNA repair enzymes[J]. J Occup Health, 2005, 47(3): 261-266. DOI: 10.1539/joh.47.261.

[10] SANDERSON J T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals[J]. Toxicol Sci, 2006, 94(1): 3-21. DOI: 10.1093/toxsci/kfl051.

[11] PLUNK E C, RICHARDS S M. Endocrine-disrupting air pollutants and their effects on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9191. DOI: 10.3390/ijms21239191.

[12] BANDOWE B A M, MEUSEL H. Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) in the environment—A review[J]. Sci Total Environ, 2017, 581/582: 237-257. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.12.115.

[13] ZHANG L L, YANG L, BI J R, *et al*. Characteristics and unique sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM2.5 at a highland background site in northwestern China [J]. Environ Pollut, 2021, 274: 116527. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116527.

[14] LEW R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2019, 55: 2-13. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005.

[15] HUANG B X, DING C Y, ZOU Q Y, *et al*. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells improve ovarian function during physiological aging by resisting DNA damage [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 272. DOI: 10.3389/fphar.2020.00272.

[16] JOZKOWIAK M, HUTCHINGS G, JANKOWSKI M, *et al*. The stemness of human ovarian granulosa cells and the role of resveratrol in the differentiation of MSCs-A review based on cellular and molecular knowledge[J]. Cells, 2020, 9(6): 1418. DOI: 10.3390/cells9061418.

[17] HAVELOCK J C, RAINEY W E, CARR B R. Ovarian granulosa cell lines[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 228(1/2): 67-78. DOI: 10.1016/j.mce.2004.04.018.

[18] PERKINS G A, FREY T G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy[J]. Micron, 2000, 31(1): 97-111. DOI: 10.1016/S0968-4328(99)00065-7.

[19] KOBAYASHI J, TAUCHI H, CHEN B, *et al*. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS_1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(4): 752-757. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.109.

[20] STUART S A, WANG J Y J. Ionizing radiation induces ATM-independent degradation of $p21^{Cip1}$ in transformed cells [J]. J Biol Chem, 2009, 284(22): 15061-15070. DOI: 10.1074/jbc.M808810200.

[21] ZHU B Q, ZHANG Q L, WU Y Q, *et al*. SNAP23 suppresses cervical cancer progression *via* modulating the cell cycle[J]. Gene, 2018, 673: 217-224. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.028.

[22] INGHAM M, SCHWARTZ G K. Cell-cycle therapeutics come of age[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(25): 2949-2959. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.0032.

[23] LI Q Q, HSU I, SANFORD T, *et al*. Protein kinase D inhibitor CRT0066101 suppresses bladder cancer growth *in vitro* and xenografts *via* blockade of the cell cycle at G_2/M [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(5): 939-963. DOI: 10.1007/s00018-017-2681-z.

[24] KISHIKAWA J I, INOUE Y, FUJIKAWA M, *et al*. General anesthetics cause mitochondrial dysfunction and reduction of intracellular ATP levels[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0190213. DOI: 10.1371/journal.pone.0190213.

[25] BENTOV Y, YAVORSKA T, ESFANDIARI N, *et al*. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging [J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(9): 773-783. DOI: 10.1007/s10815-011-9588-7.

[26] CECCHINO G N, SELI E, ALVES DA MOTTA E L, *et al*. The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights[J]. Reproductive Biomed Online, 2018, 36(6): 686-697. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.02.007.

(收稿:2022-10-14;修回:2023-02-27)

(编辑 邓强庭)