doi:10.11659/jjssx.09E017027

·基础研究·

# 草甘膦致生殖细胞毒性效应及机制的初步研究

张文龙,姜 晓,尹 俐,张 宁,陈洪强,马帮靖,曹 佳,刘晋祎 (第三军医大学军事预防医学系毒理学研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究草甘膦对小鼠精母细胞(GC-2)毒性效应及机制。**方法** 倒置显微镜和透射电镜观察草甘膦处理后GC-2细胞形态和超微结构;流式细胞仪检测草甘膦处理对GC-2细胞凋亡及细胞周期的影响;Western blot法检测凋亡及周期相关蛋白的表达水平。**结果** 草甘膦能显著抑制GC-2细胞增殖,并导致细胞内质网和线粒体结构损伤;草甘膦对细胞增殖抑制主要与G1期周期阻滞和诱导GC-2细胞凋亡有关。蛋白质表达分析表明,cleaved-caspase3蛋白表达水平明显升高,提示草甘膦通过激活caspase3诱导GC-2细胞凋亡;同时,细胞周期负调控因子p21蛋白的表达上调,正调控因子CyclinD1以及CyclinE表达受到抑制,提示相关蛋白参与了细胞G1期阻滞。**结论** 草甘膦对生殖细胞具有明显的毒性效应并与细胞周期和细胞凋亡调控相关。

[关键词] 草甘膦;细胞凋亡;细胞周期;生殖细胞
[中图分类号] R114 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-09-10

## Preliminary study on adverse effects and mechanism of germ cells induced by Glyphosate

ZHANG Wen-long, JIANG Xiao, YIN Li, ZHANG Ning, CHEN Hong-qiang, MA Bang-jing, CAO Jia, LIU Jin-yi (Institute of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To study the effects and mechanism of Glyphosate induced cell cycle arrest and apoptosis in mouse spermatogenic cells(GC-2). **Methods** Morphology of the GC-2 cells was observed by optical microscope and Transmission Electron Microscopy. Flow cytometry were used to detect cell cycle arrest and apoptosis. Cell cycle arrest and apoptosis related proteins were detected by Western blot. **Results** Glyphosate could inhibit cell proliferation and impair endoplasmic reticulum and mitochondria significantly, which was associated with G1 phase arrest and apoptosis in GC-2 cells. Glyphosate lead to cell cycle arrest and apoptosis by regulating the expressions of G1/S phase checkpoint regulatory factor proteins such as p21, CyclinD1, CyclinE and activating caspase3. **Conclusion** Glyphosate has adverse effects on male germ cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis.

**Keywords**: Glyphosate; apoptosis; cell cycle; germ cells

草甘膦(Glyphosate,Gly),又称膦甘酸,商品名为镇草宁、农达,是一类叶面喷施非选择性内吸传导型灭生性除草剂。由于转基因抗草甘膦作物如大豆、玉米、棉花等农作物的大面积推广种植,现代农业对除草剂草甘膦类农药的使用更加广泛,每年以大约20%的速度递增。草甘膦类农药已经成为世界上产量和用量最大的农药品种,也是我国产量最高、使用面积最广、出口量最大的农药品种[1-3]。由于大面积甚至无节制的使用,对水体、土壤及生物等造成了很大的污染,可能会通过食物链对人体造成威胁[4]。目前国内外有关草甘膦致雄性生殖毒性的报道多以低等生物为研究对象,对哺乳动物的生殖毒性及机制研究不足。本研究以小鼠精母细胞GC-2为研究对象,分析了草甘膦对GC-2细胞的毒性作用,并初步探讨了草甘膦毒性作用的机制。

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81502836)
[通信作者] 刘晋祎,E-mail:jinyiliutmmu@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 药品及试剂

41%草甘膦异丙胺盐(商品名农达)购自美国孟山都公司;CCK8试剂盒(Dojindo,Japan);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(BD PharmingenTM,USA);细胞周期试剂盒(碧云天);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天);BeyoECL Star超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天);Cleaved-caspase3一抗(Cell Signaling Technology,USA);β-Actin(碧云天);p21一抗(Abcam,UK);CyclinE一抗(Abcam,UK);CyclinD1一抗(Abcam,UK)。

### 1.2 细胞培养

GC-2细胞(永生化的小鼠精母细胞株)购自ATCC,用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(Gibco,USA)于5% $CO_2$、37 ℃饱和湿度条件下传代培养。

### 1.3 实验仪器

倒置生物显微镜(DP73,Olympus,Japan);酶标仪

(SpectraMax M2,Molecular Devices,USA);流式细胞仪(BD Accuri C6,USA);Western blot 自动曝光仪(FUSION FX Spectra,VILBER,France);透射电镜(JEM-1400 Plus,JEOL,Japan)。

1.4 透射电镜观察 GC-2 细胞超微结构

0.25%胰酶消化处理后收集草甘膦处理组及对照组 GC-2 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入预冷的2.5%戊二醛,4 ℃固定过夜保存。按常规方法环氧树脂包埋、超薄切片(50 nm),醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察 GC-2 细胞的超微结构。

1.5 细胞增殖检测(CCK8 法)

以每孔 $1\times10^3$ 的密度将 GC-2 细胞接种于 96 孔板中,12 h 后换成无血清的培养基,同步过夜后加入不同浓度的药物(分别含 0、3.125、6.25、12.5、25 mg/L 草甘膦),每个浓度设 3 个复孔。于药物处理 48 h 后,在倒置显微镜下观察对照组及各给药组细胞的形态及生长情况。采用 CCK8 法检测草甘膦处理对 GC-2 细胞增殖的影响。按试剂盒说明书进行操作:每孔加入 100 μL CCK8 试剂,37 ℃孵育 1 h 后,以 540 nm 波长检测各孔的吸光度(OD 值),实验独立重复 3 次。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

分别收集对照组和草甘膦处理组 GC-2 细胞,PBS 洗 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,加入 1 mL 预冷的 70%乙醇,轻轻吹打均匀,4 ℃过夜固定后离心去除乙醇,PBS 重悬,再次离心后每管样品加入 80 μL 50 μg/mL RNA 酶,37 ℃孵育 30 min。接着每个样本加入100 μL 50 μg/mL PI 染液,混匀后室温孵育 15 min。100 μm 滤网过滤后,每孔再加入 200 μL PBS 稀释。流式细胞仪在激发波长 488 nm 波长处检测红色荧光,采用 FlowJo 7.6 软件进行细胞周期分析。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 GC-2 细胞以每孔 $5\times10^4$ 的密度接种于 6 孔板中,12 h 后换成无血清的培养基,同步过夜后加入不同浓度的药物(分别含 0、6.25、12.5、25 mg/L 草甘膦)处理 48 h。胰酶消化收集细胞后用预冷的 PBS 洗 1 次,按照凋亡试剂盒说明书每个样本分别加入 100 μL 1×Binding buffer,2 μL FITC-annexinV 及 2 μL 碘化丙啶(PI)染液,轻轻吹打混匀后室温避光孵育 15 min,Accuri C6 流式细胞仪检测细胞凋亡情况并采用 FlowJo 7.6 软件进行数据分析。

1.8 Western blot 法检测凋亡及周期相关蛋白

草甘膦处理 24 h 及 48 h 后,收集对照组及给药组细胞,按照蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,100 ℃变性 10 min,60 μg 蛋白样品电泳后转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 ℃过夜孵育,二抗室温孵育 1.5 h,TBST 洗膜后化学发光法检测目的条带。

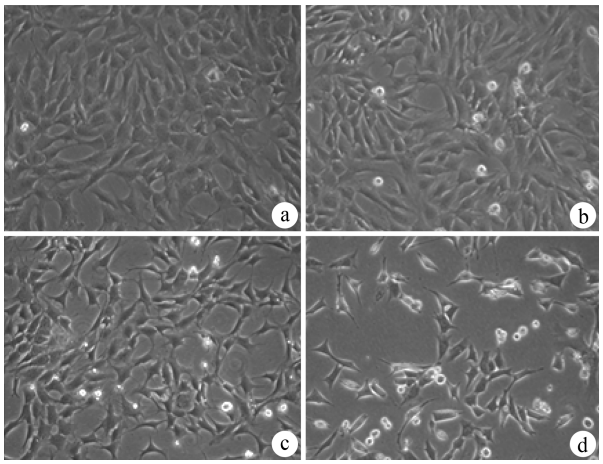
1.9 统计学分析

采用 SPSS 14.0 软件对实验数据进行统计分析,试验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 $F$ 检验,两两比较用 $q$ 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 草甘膦对 GC-2 细胞形态结构的影响

细胞正常形态的维持是其发挥正常功能的基础,草甘膦处理后细胞形态学和生长分析发现:对照组 GC-2 细胞呈梭形或多角形,贴壁良好,细胞轮廓清晰,随着培养时间的延长细胞数量逐渐增多。草甘膦处理后镜下可见 GC-2 细胞体积变小,形态变圆,细胞间隙增大,细胞数目减少,死亡细胞增多,部分细胞贴壁不牢呈漂浮状态,细胞碎片增多。细胞形态学的异常改变与给药剂量呈明显的剂量-效应关系见图 1。

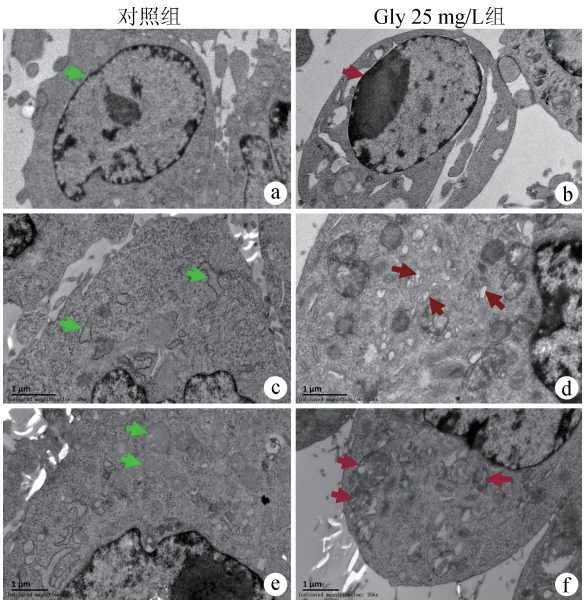



a:对照组;b:Gly 6.25 mg/L 组;c:Gly 12.5 mg/L 组;d:Gly 25 mg/L 组

**图 1 草甘膦对 GC-2 细胞生长和细胞形态的影响(×200)**

2.2 草甘膦处理对 GC-2 细胞超微结构的影响

我们进一步在透射电镜下对 GC-2 细胞的超微结构进行了观察(图 2)。对照组 GC-2 细胞细胞核染色质分布均匀,核膜清晰完整,核仁明显,各类细胞器清晰可见,无明显异常。草甘膦(25 mg/L)处理 48 h 后许多细胞表现出典型的凋亡特征,如体积变小,胞质着色深,细胞核中异染色质明显边移并凝聚在周边呈新月形(图 2a)。另外,草甘膦处理后,GC-2 细胞内质网可见不同程度的扩张及空泡肿胀(图 2b),线粒体体积虽然无明显变化,但基质电子密度增深,可见嵴内间歇肿胀,外膜与内膜之间局部扩张形成泡状(图 2c)。这些结果提示草甘膦在体外可以导致小鼠精母细胞线粒体及内质网损伤并诱导细胞凋亡。




a:绿色箭头示对照组正常细胞核(×15 k);b:红色箭头示呈典型凋亡特征的细胞核(×15 k);c:绿色箭头示正常内质网(×30 k);d:红色箭头示内质网空泡肿胀(×30 k);e:绿色箭头示正常线粒体(×25 k);f:红色箭头示线粒体外室肿胀(×25 k)

**图2 透射电镜观察草甘膦处理后GC-2细胞的超微结构**

## 2.3 草甘膦对GC-2细胞增殖的影响

不同剂量草甘膦处理24 h和48 h后,检测草甘膦对GC-2细胞的生长抑制作用并根据CCK8结果绘制细胞生长曲线。结果表明:浓度为3.125 mg/L时,草甘膦对GC-2细胞增殖的影响不明显。在6.25~25 mg/L浓度范围内草甘膦可以显著抑制小鼠精母细胞的增殖,并呈时间和剂量依赖性,因此后续的实验中我们采取了6.25~25 mg/L浓度处理细胞(图3)。

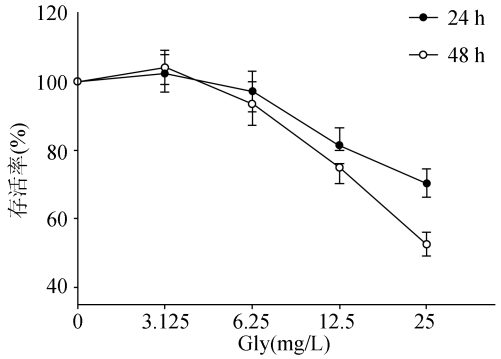
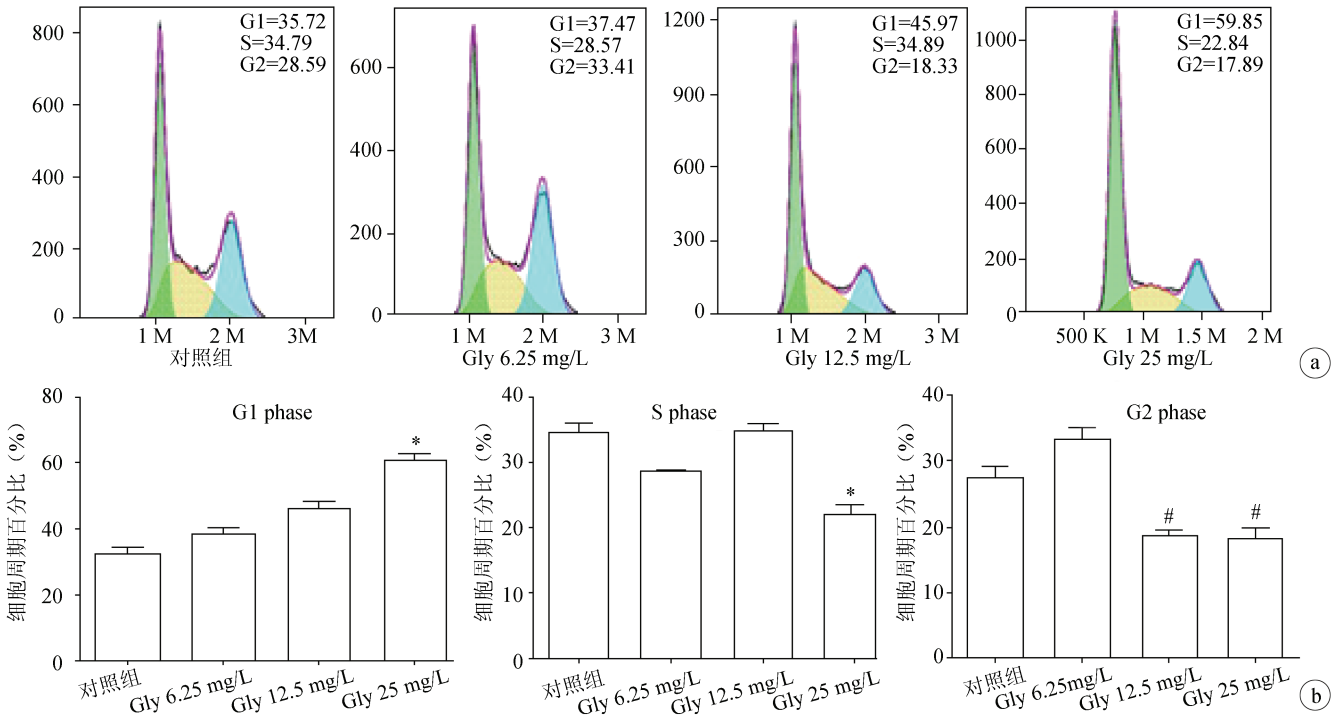



**图3 CCK8法检测草甘膦对GC2细胞增殖的影响**

## 2.4 草甘膦对GC-2细胞周期分布的影响

细胞增殖的改变通常可由细胞周期或者细胞凋亡等原因引起。为此,我们首先对草甘膦是否影响细胞周期进行了分析,结果表明:随着草甘膦染毒剂量的增加,G1期细胞分布百分比呈现增高趋势,且呈剂量依赖性关系,但在6.25~12.5 mg/L浓度范围内差异无统计学意义($P>0.05$);25 mg/L染毒组GC-2细胞G1期明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。12.5 mg/L和25 mg/L染毒组G2/M期细胞比例显著下降,与对照组和6.25 mg/L组比较具有统计学差异($P<0.05$)。这些结果提示草甘膦可将GC-2细胞周期阻滞在G1期(图4)。

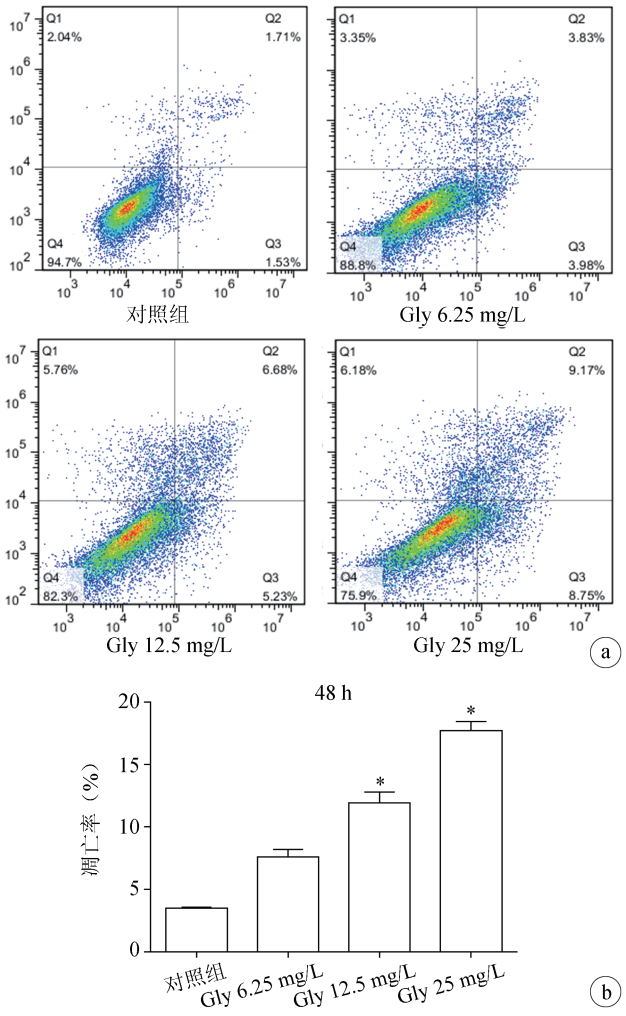



a:小鼠精母细胞染毒组流式细胞仪检测结果代表图;b:小鼠精母细胞分裂间期凋亡率柱状图 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组和6.25 mg/L组比较,$P<0.05$

**图4 草甘膦诱导GC-2细胞G1期细胞周期阻滞**

### 2.5 草甘膦对 GC-2 细胞凋亡的影响

我们同时利用流式细胞仪检测了草甘膦诱导 GC-2 细胞凋亡的发生情况,结果如图 5 所示,浓度为 0、6.25、12.5 以及 25 mg/L 草甘膦处理 48 h 后,GC-2 细胞凋亡的比例随着给药浓度的增加逐渐上升,分别为 3.2%、7.8%、11.9% 以及 18%,说明草甘膦在体外实验中可以明显诱导小鼠生精细胞凋亡,与之前细胞形态学观察结果一致。其中 12.5 mg/L 及 25 mg/L 剂量组凋亡率与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),尤其是 25 mg/L 剂量组($P<0.01$)。因此,我们主要采用 25 mg/L 这个浓度用于后续的蛋白质表达分析。




a:流式细胞仪检测结果;b:凋亡率柱状图 *:与对照组比较,$P<0.05$

**图 5 草甘膦诱导 GC-2 细胞凋亡**

### 2.6 草甘膦处理对细胞周期及凋亡相关蛋白表达的影响

为了确证草甘膦诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞效应,我们采用 Western blot 法对周期调控蛋白及凋亡相关蛋白的表达进行了检测。首先,我们检测了 25 mg/L草甘膦分别处理 24 h 和 48 h 后 G1 期关卡调控因子的表达。如图 6 所示,草甘膦可促进 G1/S 期关卡负向调控因子 p21 蛋白的表达,降低正向调控因子 CyclinD1 以及 CyclinE 蛋白的表达,这与流式细胞周期检测结果提示的 G1 期阻滞进程相一致。同时,我们对细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶 caspase3 的蛋白表达水平进行了检测,发现草甘膦处理后 cleaved-caspase3 蛋白表达水平明显升高,提示草甘膦可以通过激活 caspase3 诱导 GC-2 细胞凋亡。

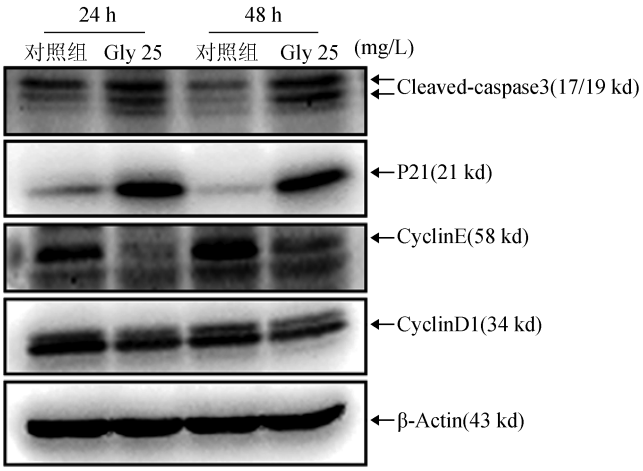



**图 6 草甘膦对 GC-2 细胞凋亡及周期相关蛋白表达的影响**

## 3 讨论

草甘膦为氨基酸生物合成抑制剂,主要的靶目标是通过抑制 5-烯醇丙酮莽草酸-3-膦酸盐(EPSP)合成酶的活性,抑制芳香氨基酸的生物合成(莽草酸途径),使蛋白质合成受阻,进而导致植物死亡。由于 EPSP 合成酶仅为植物与微生物体内特有的合成芳香氨基酸的关键酶,故有学者认为草甘膦对人类或者其他哺乳动物无毒[5]。另有学者认为在人类的肠道细菌中却实际存在着莽草酸途径,通过与人类宿主之间生物学关系,可以破坏生物动态平衡,抑制细胞色素 P450 酶类,破坏肠道细菌群芳族氨基酸的生物合成,造成与饮食相关联的疾病与症状。因此,关于草甘膦对其他生物是否会产生毒性作用仍存在一定争议[6]。

近年来,国内外有关草甘膦致生殖发育毒性的报道逐渐增多,但多以低等生物为研究对象。对哺乳动物和人类的生殖发育毒性研究报道不多,尤其是缺乏人群流行病学调查资料。已有的研究发现,草甘膦能抑制蝌蚪、海胆胚胎发育,对蜘蛛的生育能力及子代发育时间上有负面影响,可降低斑马鱼精子运动能力及线粒体功能,破坏精子 DNA 的完整性[7-8]。Dallegrave 等[9]研究发现,大鼠怀孕期及哺乳期内暴露于草甘膦,其雄性后代生殖系统受到损害,子鼠附睾精子数目减少,成年期每天产生的精子数目、异常精子数增加,

成年期精子退化[9]。另有一些研究发现,草甘膦暴露可以扰乱大/小鼠 StAR 蛋白及芳香酶的表达和活性,影响正常的睾酮的合成并导致血清睾酮和雌二醇水平等改变,提示草甘膦在体内是一种强效内分泌干扰物[10-13]。上述研究表明草甘膦可能具有明显的雄性生殖毒性,但其具体作用和机制尚不清楚。

本研究以小鼠精母细胞 GC-2 为研究对象,发现草甘膦处理可以导致 GC-2 细胞形态、数量异常,并能明显抑制小鼠精母细胞的生长,且呈时间和剂量依赖关系。进一步研究发现草甘膦可以通过诱导 G1/S 期关卡负向调控因子 p21 蛋白的表达并降低正向调控因子 cyclinE、cyclinD1 蛋白的表达,使 GC-2 细胞阻滞于 G1 期。这一现象提示草甘膦诱导的 G1 期细胞周期阻滞作用与 G1/S 期关卡调控事件有关。GC-2 细胞为 P53 突变的细胞,草甘膦可以在 p53 突变的情况下诱导 GC-2 细胞 p21 的表达,阻滞精母细胞于 G1 期。这些结果提示草甘膦对小鼠精母细胞的周期阻滞作用可能是通过 p53 非依赖的 G1/S 关卡通路进行的。

在 DNA 损伤相关事件中,DNA 损伤检查点被激活,引起细胞周期阻滞,为细胞提供充足的时间对损伤的 DNA 进行修复,当 DNA 损伤超过细胞耐受的极限时,可引起细胞凋亡[14-15]。本研究发现草甘膦可以通过激活 caspase3 促进 GC-2 细胞凋亡。我们通过透射电镜对草甘膦处理后的 GC-2 细胞超微结构进行了观察,发现 GC-2 细胞细胞核异染色质边移,呈新月形凝聚于核周边,为典型的凋亡细胞形态特征,与流式细胞仪及 Western blot 的结果一致。进一步观察发现草甘膦处理组细胞内质网扩张、空泡肿胀,线粒体外室肿胀,提示草甘膦可以导致小鼠精母细胞线粒体及内质网损伤。内质网受到损伤后内质网稳态被打乱,可通过 3 条信号转导通路启动内质网应激。如果内质网损伤太严重或者在一定时间内稳态未恢复,就会引起细胞凋亡的发生[16-17]。在细胞毒药物诱导细胞凋亡的信号转导途径中,线粒体在促凋亡信号和 caspases 激活之间起着不可替代的作用。最新的研究表明,内质网和线粒体在凋亡调控中存在直接的相互串话和相互作用。本研究结果提示草甘膦可能通过内质网和线粒体介导的信号通路诱导 GC-2 细胞凋亡,相关的分子机制需要进一步研究。

## [参考文献]


[1] Brookes G, Barfoot P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996 - 2014: Impacts on pesticide use and carbon emissions[J]. GM Crops Food, 2016, 7(2): 84 - 116. doi: 10.1080/21645698.2016.1192754.

[2] Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally[J]. Environ Sci Eur, 2016, 28(1): 3. doi: 10.1186/s12302 - 016 - 0070 - 0.

[3] Bonny S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact[J]. Environ Manage, 2016, 57(1): 31 - 48. doi: 10.1007/s00267 - 015 - 0589 - 7.

[4] Bai SH, Ogbourne SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2016, 23(19): 18988 - 19001. doi: 10.1007/s11356 - 016 - 7425 - 3.

[5] Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview[J]. J Exp Bot, 2014, 65(17): 4691 - 4703. doi: 10.1093/jxb/eru269.

[6] Tarazona JV, Court-Marques D, Tiramani M, et al. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC[J]. Arch Toxicol, 2017, 91(8): 2723 - 2743. doi: 10.1007/s00204 - 017 - 1962 - 5.

[7] de Brito Rodrigues L, de Oliveira R, Abe FR, et al. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms[J]. Environ Toxicol Chem, 2017, 36(7): 1755 - 1763. doi: 10.1002/etc.3580.

[8] Lopes FM, Varela Junior AS, Corcini CD, et al. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish Danio rerio[J]. Aquat Toxicol, 2014, 155: 322 - 326. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.07.006.

[9] Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, et al. Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats[J]. Arch Toxicol, 2007, 81(9): 665 - 673. doi: 10.1007/s00204 - 006 - 0170 - 5.

[10] Romano RM, Romano MA, Bernardi MM, et al. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology[J]. Arch Toxicol, 2010, 84(4): 309 - 317. doi: 10.1007/s00204 - 009 - 0494 - z.

[11] 何姗姗,雷荣辉,唐国慧,等. 农达染毒对 30d 龄雄性大鼠睾丸及附睾某些指标的影响[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(4)289 - 291. doi: 10.16421/j.cnki.1002 - 3127.2016.04.010.

[12] Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini Gé, et al. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm-nuclear quality[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38(1): 131 - 140. doi: 10.1016/j.etap.2014.05.007.

[13] Romano MA, Romano RM, Santos LD, et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression [J]. Arch Toxicol, 2012, 86(4): 663 - 673. doi: 10.1007/s00204 - 011 - 0788 - 9.

[14] Hall JR, Bereman MS, Nepomuceno AI, et al. C/EBPα regulates CRL4 (Cdt2)-mediated degradation of p21 in response to UVB-induced DNA damage to control the G1/S checkpoint[J]. Cell Cycle, 2014, 13(22): 3602 - 3610. doi: 10.4161/15384101.2014.962957.

[15] Iyer DR, Rhind N. The Intra-S checkpoint responses to DNA damage[J]. Genes (Basel), 2017, 8(2). pii: E74. doi: 10.3390/genes8020074.

[16] Foufelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity[J]. Pharmacol Res Perspect, 2016, 4(1): e0021. doi: 10.1002/prp2.211.

[17] Cao Y, Long J, Liu L, et al. A review of endoplasmic reticulum (ER) stress and nanoparticle (NP) exposure[J]. Life Sci, 2017, 186: 33 - 42. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.003.


(编辑:左艳芳)