DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000881

自噬相关蛋白 Atg5 及 P62 在 DEHP 引起新生鼠卵泡发育异常过程中的作用

汪玉姮，穆欣艺，苏　燕，谢　翼，王应雄，何俊琳，刘学庆，陈雪梅，高茹菲
（重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨自噬相关蛋白 Atg5 及 P62 在邻苯二甲酸二乙基己酯（diethylhexyl phthalate，DEHP）引起新生鼠卵巢卵泡发育异常这一过程中的作用。**方法**：将健康 6~8 周龄清洁级成年雌性昆明鼠随机分为对照组（玉米油）和 DEHP 组，每组 30 只，均不做任何处理。成年雌鼠生产后的新生鼠分为对照组（玉米油）和 DEHP 组，采用腹腔注射方式，DEHP 组按 0.62 mg/kg 浓度对新生鼠进行注射，对照组注射相同体积玉米油，从新生鼠出生第 1 天开始注射，每天 1 次，连续 5 d，注射结束后收集新生鼠卵巢组织，HE 染色观察卵巢各级卵泡的发育情况，qRT-PCR 及 Western blot 检测卵泡发育标志分子 GDF9 及自噬相关蛋白 Atg5、P62 的表达情况。**结果**：与对照组比较，HE 染色结果显示 DEHP 组原始卵泡数量明显减少（P=0.005），而初级卵泡数量无明显改变（P=0.555）；qRT-PCR 结果显示 DEHP 组新生鼠卵巢组织中卵泡发育标志分子 GDF9 mRNA 表达明显降低（P=0.034），而自噬标志分子 Atg5、P62 mRNA 表达明显增加（P 值分别为 0.001、0.024）。Western blot 结果显示 DEHP 组新生鼠卵巢中自噬相关蛋白 Atg5 及 P62 均明显增加，差异有统计学意义（P 值分别为 0.008、0.001）。**结论**：在 DEHP 暴露引起新生鼠卵巢卵泡发育异常这一过程中，自噬标记蛋白 Atg5 及 P62 可能发挥着重要作用。

【关键词】邻苯二甲酸二乙基己酯；自噬；卵泡发育；Atg5；P62
【中图分类号】R714.13　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-30

Regulation of Atg5 and P62 during the follicular dysplasia process of newborn mice induced by DEHP

Wang Yuheng, Mu Xinyi, Su Yan, Xie Yi, Wang Yingxiong, He Junlin, Liu Xueqing, Chen Xuemei, Gao Rufei
(*Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effects of autophagy related protein Atg5 and P62 on the process of newborn mice follicular dysplasia caused by DEHP. ***Methods***: Adult female Kun Ming mice of six to eight weeks at clean and healthy level were randomly divided into the control groups(corn oil) and the DEHP groups(30 in each group) without any treatment. The newborns were divided into the control groups(corn oil) and the DEHP groups. By intraperitoneal injection, the newborns of the DEHP groups were injected with DEHP at the concentration of 0.62 mg/kg, and the ones of the control groups were injected with the same volume of corn oil. The newborn mice were injected once a day from born to 5 days postpartum. Ovarian tissues of the newborn mice from two groups were collected. HE staining was used to observe the development of ovarian follicles at all levels. Real-time PCR and Western blot were employed to detect the expression of follicular developmental marker GDF9 and autophagy related proteins Atg5 and P62. ***Results***: Compared with that of control groups, the number of primordial follicles of newborn mice from the DEHP groups decreased significantly, and there was no significant difference in the primary follicles number of the newborn mice between the two groups. The results of Real-time PCR showed the levels of follicular developmental marker GDF9 decreased significantly, butautophagy related gene Atg5 and P62 mRNA in the newborn mice ovarian tissues from the DEHP group increased significantly. Western blot showed the expression of autophagy related proteins Atg5 and P62 in the newborn mice ovarian tissues were significantly increased following DEHP treatment. ***Conclusion***: Atg5 and P62 might play an important role during the follicular dysplasia process of newborn mice induced by DEHP.

【Key words】diethylhexyl phthalate; autophagy; follicular development; Atg5; P62

作者介绍：汪玉姮，Email:cqwangyuheng@163.com，研究方向：胚胎着床及其发育的分子机制研究；环境与出生缺陷。
通信作者：高茹菲，Email：gao_ru_fei@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81300486）；重庆市教育委员会科学技术研究资助项目（编号：KJ1500226）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160318.0917.002.html（2016-03-18）

邻苯二甲酸二乙基己酯(diethylhexyl phthalate, DEHP)属于邻苯二甲酸酯类化合物中重要一员，作为一种增塑剂，被广泛应用于食品包装、建筑材料、玩具、医疗器材等大量塑料制品中，DEHP 可随着水、食物、空气细颗粒物、护肤品进入人体[1]。近年来，化学物质对未成年哺乳动物的雌性性腺毒性作用成为研究热点[2]。研究发现，DEHP 对雌鼠有生殖毒性影响[3]。课题组前期实验发现 DEHP 可以影响新生鼠卵巢卵泡的发育，但其具体机制如何，尚不明确，有待于进一步研究。

自噬是真核细胞中普遍存在的生命现象，是将细胞内变形、衰老或损伤的蛋白质和细胞器转运到溶酶体腔中消化降解的一种代谢过程，是不同于细胞凋亡的另一种程序性细胞死亡，在维持细胞存活、更新、物质再利用和内环境稳定中起着重要作用。根据物质进入溶酶体的方式不同，自噬可分为三种类型：巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬[4]。自噬受到一系列相关蛋白的调控，研究表明，自噬相关蛋白 Atg5 在自噬形成过程中具有重要作用。Atg5 活性增强可促进自噬的发生，反之，则抑制自噬的发生[5]。另有研究表明，P62 是一种由应激诱导产生的细胞内多功能蛋白，并在自噬过程中起必不可少的作用。李卫东等人发现在慢性缺氧引起自噬增强的小鼠大脑组织中，P62 蛋白水平明显增加[6]。但自噬是否参与了 DEHP 所引起的新生鼠卵泡发育异常过程，尚不清楚。本研究利用 DEHP 腹腔注射的新生鼠模型，探讨自噬相关蛋白 Atg5 及 P62 是否参与了 DEHP 所引起的新生鼠卵泡发育异常这一过程，初步阐释 DEHP 导致新生鼠卵泡发育异常的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

重庆医科大学动物中心健康成年清洁级昆明雌性小鼠 60 只(6~8 周龄，25~30 g)，雄性小鼠 10 只(6~8 周龄，30~40 g)，动物许可证号【SCXK(渝)20070001】。饲养环境为 SPF 级动物寄养室，饲养温度为(22±2) ℃，相对湿度(55±10)%，12 h 光照，自由饮水进食。

1.2 主要试剂与仪器

DEHP(40 mg/ml)及玉米油购于上海阿拉丁化学试剂有限公司；β-actin 鼠单抗 IgG(ab8226)购于英国 Abcam 公司；Atg5 兔多抗 IgG(bs-4005R)、P62 兔多抗 IgG(bs-2951R)购于北京博奥森生物技术有限公司；EDTA 抗原修复液(pH=8.0)、HRP 标记山羊抗兔抗体、HRP 标记山羊抗小鼠抗体、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司；H&E 染液购于南京建成科技有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)购于上海碧云天生物技术有限公司；RNA 提取试剂 Trizol 购于 invintrogen 公司；PrimeScript RT reagent kit 及 SYBR Premix Ex Taq TM Ⅱ均为日本 Takara 产品。

1.3 实验动物分组及处理

将昆明小鼠按雌性与雄性的比例为 3:1 或 4:1 进行合笼，以第 2 天早上查见阴栓作为受孕成功的标志，继续常规喂养至孕鼠生产。将 60 只孕鼠随机分为 DEHP 处理组及对照组，每组 30 只。DEHP 组孕鼠生产当天即按照 DEHP 0.62 mg/kg × 质量(g)剂量对新生鼠进行腹腔注射；对照组新生鼠注射相同体积的玉米油。注射用 DEHP 浓度为 0.1 mg/ml。从新生鼠出生当天开始，于每天早上 7:00~12:00 之间对新生鼠进行注射，每天 1 次，连续 5 d，第 6 天(即新生第 5 天)早上于体式显微镜下取出新生鼠的卵巢组织。

1.4 卵巢组织的形态学分析及卵泡计数

将体式显微镜下取出的新生鼠卵巢组织放入装有 4%多聚甲醛溶液的 EP 管中固定，后放置于冰箱中过夜，将组织进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸腊、包埋和切片后，按照试剂盒说明书进行常规 HE 染色，光学显微镜下观察卵巢组织的细胞形态。分别随机选取来源于 3 只不同孕鼠的新生鼠的卵巢组织进行包埋、切片、HE 染色之后，光学显微镜下计数原始卵泡和初级卵泡的数目。

1.5 Western blot 免疫印迹法检测自噬相关蛋白表达

在 EP 管中分别将来源于 DEHP 组和对照组 10 只不同新生鼠，共 20 个卵巢组织，80 μl 裂解液，3 μl PMSF 于冰上一起研磨 30 min，后静置 30 min，放入 4 ℃低温离心机内 12 000 r/min 离心 15 min，BCA 法测蛋白浓度。以此作为 1 个独立蛋白样本，共提取 3 个样本。确定上样蛋白约 50 μg，以 β-actin 为内参蛋白，配制 10%SDS-PAGE 分离胶进行电泳，湿转至 PVDF 膜上，用 5%脱脂牛奶于 37 ℃烤箱中封闭 1 h，孵育抗 Atg5 抗体及抗 P62 抗体(1:500)、抗 β-actin 抗体(1:1 000)4 ℃过夜。次日将膜取出，用 TBST 洗膜(3 次 × 15 min)后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)孵育 1 h，再次用 TBST 洗膜(3 次 × 15 min)后加入发光液，凝胶成像分析系统成像后进行分析，运用 Fusion 软件进行条带灰度值分析。

1.6 qRT-PCR 检测卵巢组织中自噬相关蛋白 Atg5、P62 及 GDF9 mRNA 的表达

1.6.1 总 RNA 的提取 在 EP 管中分别将来源于 DEHP 组和对照组 5 只不同新生鼠，共 10 个新生鼠卵巢组织放入含有 1 ml 提前预冷的 Trizol 提取液中充分研磨至无肉眼可见

沉淀，经氯仿抽提、异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤后，测量 RNA 的浓度（$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 在 1.8~2.0 之间）。以此作为 1 个独立 RNA 样本，共提取 3 个样本。

1.6.2 逆转录成 cDNA 以 1 000 ng 的标准计算每个样本的 RNA 原液上样量，加入 4 μl 5×Prime Sript RT Master Mix，再加 DEPC 水至 20 μl 体系进行逆转录，逆转录反应条件：37 ℃，15 min；85 ℃，5 s。

1.6.3 引物设计与合成 引物参照 GenBank 中的序列，由上海生工合成，各基因引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primers sequence for qRT-PCR

基因	引物序列
Atg5	正义链：5'-AGCCAGGTGATGATTCACGG-3'
	反义链：5'-GGCTGGGGGACAATGCTAA-3'
P62	正义链：5'-CCTCTGAGTCTCGGGAATTTCA-3'
	反义链：5'-GACTTACTGCACGTTTGGGC-3'
GDF9	正义链：5'-TCTTAGTAGCCTTAGCTCTCAGG-3'
	反义链：5'-TGTCAGTCCCATCTACAGGCA-3'
β-actin	正义链：5'-ATATCGCTGCGCTGGTCGTC-3'
	反义链：5'-AGGATGGCGTGAGGGAGAGC-3'

1.6.4 qRT-PCR 反应 反应总体系为 15 μl：SYBR 7.5 μl、正反引物各 0.6 μl、DEPC 处理水 5.1 μl、cDNA 1.2 μl。反应条件：95 ℃ 30 s 预变性；95 ℃ 5 s，61 ℃ 30 s，共 40 个循环。每个样本设立 3 个复孔，以 β-actin 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 计算方法对目的基因的表达量进行数据分析。

1.7 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。数据采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，对照组与DEHP组之间的数据采用两独立样本 t 检验。检验水准 α=0.05。

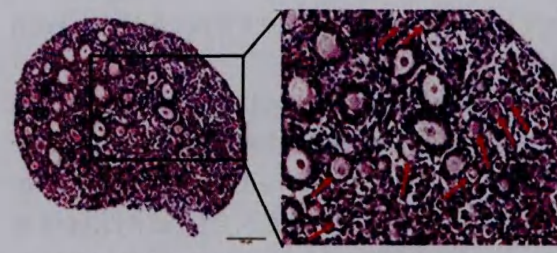
2 结 果

2.1 DEHP 对新生鼠卵巢组织的形态学影响

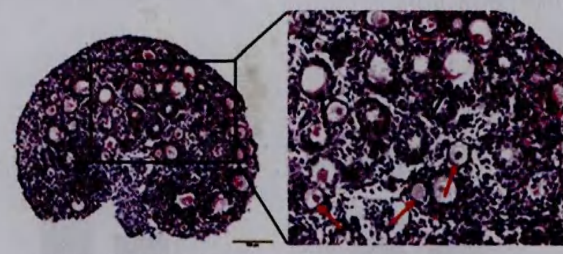
采用 HE 染色方法对新生鼠卵巢组织的形态学进行观察。镜下发现，与对照组相比，DEHP 组的卵巢组织细胞形态无明显变化（图 1A~D），但其原始卵泡数量明显减少[(51.667±6.506)，(75.333±3.512)，P=0.005，图 1E]，而初级卵泡数量并无明显改变[(17.333±7.095)，(20.667±5.508)，P=0.555，图 1F]。

2.2 DEHP 对新生鼠卵巢组织中生长分化因子（GDF9）mRNA 表达的影响

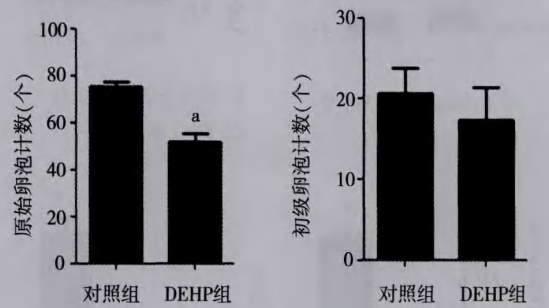
采用 qRT-PCR 方法对新生鼠卵巢组织中的 GDF9 mRNA 的表达进行检测。结果发现，与对照组相比，DEHP 组的 GDF9 mRNA 的表达明显降低[(0.969 8±0.108 4)，(1.684 9±0.374 1)；P=0.034，图 2]。



A. 对照组 HE 染色（20×） B. 对照组 HE 染色（40×）



C. DEHP 组 HE 染色（20×） D. DEHP 组 HE 染色（40×）



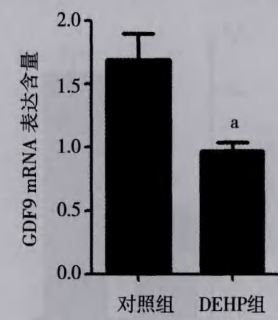
E. 对照组与 DEHP 组的原始卵泡计数 F. 对照组与 DEHP 组的初级卵泡计数

红色箭头代表原始卵泡；黑色箭头代表初级卵泡；

a，与对照组相比，P<0.05

图 1 HE 染色观察 DEHP 对新生鼠卵巢组织的形态结构影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.1 Effects of DEHP on the morphological structure of the newborn mice ovarian tissue by HE staining（$\bar{x}\pm s$，n=3）



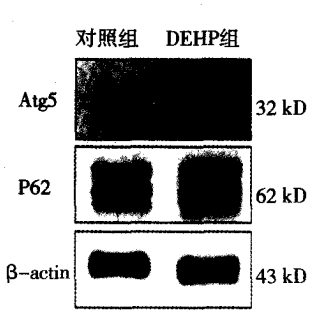
a，与对照组相比，P<0.05，n=3

图 2 分别用玉米油和 DEHP 对新生鼠进行腹腔注射之后，qRT-PCR 检测新生鼠卵巢组织中 GDF9 的 mRNA 的变化情况（$\bar{x}\pm s$）

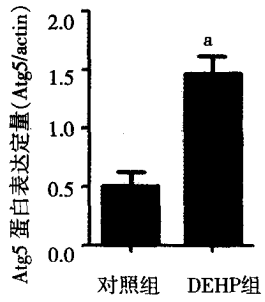
Fig.2 Changes of GDF9 mRNA in the newborn mice ovarian tissuesdetected by qRT-PCR after injecting corn oil or DEHP intraperitoneally（$\bar{x}\pm s$）

2.3 DEHP 对新生鼠卵巢组织中自噬标记蛋白 Atg5 表达的影响

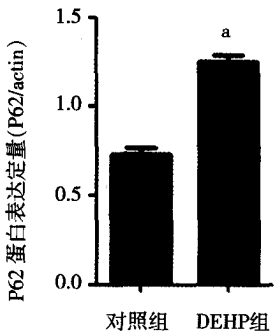
采用 qRT-PCR 方法对新生鼠卵巢组织中的 Atg5 mRNA 的表达进行检测。结果发现，与对照组相比，DEHP 组的 Atg5 mRNA 的表达明显增加[(2.054 ± 0.226)，(0.927 ± 0.063)，P=0.001]。Western blot 结果同样显示，与对照组相比，DEHP 组 Atg5 蛋白表达明显增加 [(1.463 ± 0.261)，(0.507 ± 0.215)，P=0.008，图 3A、B、D]。



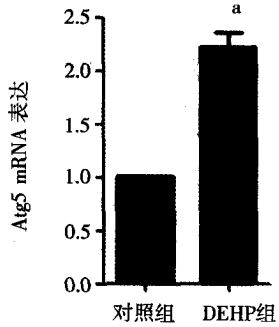
A. Western blot 检测结果



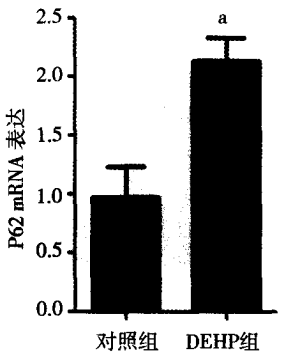
B. 对 A 图中 Atg5 蛋白进行半定量分析



C. 对 A 图中 P62 蛋白进行半定量分析



D. Atg5 qRT- PCR 检测结果



E. P62 qRT-PCR 检测结果

a：与对照组相比，P<0.05

图 3 DEHP 对自噬标记蛋白 Atg5 及 P62 的表达影响($\bar{x} \pm s$，n=3)

Fig.3 Effects of DEHP on the expression of autophagy marker proteinsAtg5 and P62 ($\bar{x} \pm s$，n=3)

2.4 DEHP 对新生鼠卵巢组织中自噬标记蛋白 P62 表达的影响

采用 qRT-PCR 方法对新生鼠卵巢组织中的 P62 mRNA 的表达进行检测。结果发现，与对照组相比，DEHP 组的 P62 mRNA 的表达明显增加[(2.131 ± 0.343)，(0.969 ± 0.453)，P=0.024]。Western blot 结果同样显示，与对照组相比，DEHP 组 P62 蛋白表达明显增加[(1.247 ± 0.064)，(0.730 ± 0.075)，P=0.001](图 3A、C、E)。

3 讨 论

DEHP 是一种常见的环境污染物，它已对人们的生活环境造成了严重的污染，在许多地方的大气、水体、土壤以及动物体内都可以检测到 DEHP[7]。DEHP 已成为世界范围内影响人类健康的一大公害。DEHP 可通过日常生活的接触、医疗活动和职业暴露进入人体。作为一种类雌激素，DEHP 可引起雌性生殖系统的损害。已有动物实验显示，DEHP 可使正常排卵的雌鼠动情周期延长，并且出现不排卵现象，发情前期体内雌二醇水平下降，镜下可见雌鼠卵泡发育迟缓，卵泡体积减小，颗粒细胞体积变小，出现多囊卵巢综合症[8-9]。美国 FDA 发表了关于 DEHP 医疗器 械安全性评价的研究报告指出，胎儿、新生儿和青春发育期的人类属于高危人群，更易于受到 DEHP 的感染，且在儿童体内，DEHP 转化成 MEHP 更多，而 MEHP 的排泄较少，儿童在药物动力学上比成人对 DEHP 的不良反应更敏感[10]。我课题组前期实验发现 DEHP 可以影响新生鼠卵巢的发育，但其机制如何，尚不明确。本研究采用 DEHP 连续 5 d 按照 0.62 mg/kg 浓度对新生鼠进行腹腔注射之后，HE 染色观察发现新生鼠卵巢组织中原始卵泡数量减少，而初级卵泡数量无明显变化。GDF9 是由卵母细胞通过旁分泌方式分泌的一种生长因子，可作用于颗粒细胞，并促进其增殖[11]、分化、代谢及凋亡[12]，对早期卵泡的生长分化起至关重要的作用[13-14]。检测发现在 DEHP 的作用下 GDF9 mRNA表达明显降低。

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象，贯穿于正常细胞的生长发育和生理病理过程，维持着细胞内的稳定状态。自噬存在于饥饿状态、缺血、损伤、恶性肿瘤以及在激素、化疗药物作用等应激条件下。细胞自噬的过程包括 3 个阶段：双层膜结构

的自噬泡延伸、闭合形成自噬体，自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体以及自噬体的降解[15]。本研究发现在 DEHP 的作用下，新生鼠卵巢组织中与自噬发生过程中关系密切的 Atg5 和 P62 mRNA 及蛋白表达均明显增加，提示自噬可能参与了 DEHP 所引起的新生鼠卵泡发育异常。本实验在前期发现DEHP可损伤新生鼠卵胞囊降解和原始卵泡的聚集[16]的基础上，进一步检测与自噬发生相关的蛋白 Atg5 和 P62，发现 DEHP 可以通过自噬而影响卵巢的发育。因自噬普遍存在于真核细胞中，对真核细胞生物生命活动的影响十分广泛，与细胞增殖、分化、凋亡等过程均有密切联系。因此自噬对雌性生殖系统的影响的具体机制还有待进一步的研究与探索。

参 考 文 献

[1] Kappenstein O, Vieth B, Luch A, et al. Toxicologically relevant phthalates in food[J]. EXS, 2012(101):87-106.

[2] Afshari A, Gunnarsen L, Clausen PA, et al. Emiaaion of phthalates from PVC and other materials[J]. Indoor Air,2004,14(2): 120-128.

[3] 沈霞红, 李冬梅, 韩晓冬. 邻苯二甲酸酯类胚胎生殖毒性研究进展[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(9): 1215-1216.

[4] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature,2008,451(7182):1069-1075.

[5] Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation[J]. EMBO J, 2012, 31(22): 4304-4317.

[6] Liu H, Qiu H, Xiao Q, et al. Chronic Hypoxia-Induced Autophagy Aggravates the Neuropathology of Alzheimer's Disease through AMPK-mTOR Signaling in the APP Swe/PS1dE9 Mouse Model[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2015, 48(4): 1019-1032.

[7] Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure[J]. Int J Hyg Enviro Health, 2007, 210(5): 623-634.

[8] Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 128(2): 216-223.

[9] Ma M, Zhang Y, Pei X, et al. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure on reproductive development and PPARs in prepubertal female rats[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2011, 40(6): 688-692, 697.

[10] Fischer CJ, Bickle GrazM, MuehlethalerV, et al. Phthalates in the NICU: is it safe?[J]. Journal of Paediatrics and Child Health, 2013, 49(9): 413-419.

[11] Gilchrist RB, Morrissey MP, Ritter LJ, et al. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-beta in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 201(1-2): 87-95.

[12] Hussein TS, Froiland DA, Amato F, et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins[J]. J Cell Sci, 2005, 118(22): 5257-5268.

[13] Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep[J]. Biol Reprod, 2002, 67(6): 1777-1789.

[14] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(2): 159-177.

[15] Janku F, McConkey OJ, Hong DS, et al. Autophagy as a target for anticancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(9): 528-539.

[16] Mu X, Liao X, Chen X, et al. DEHP exposure impairs mouse oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly through estrogen receptor-dependent and independent mechanisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015(298): 232-240.

（责任编辑：张辉洁）