

MBP、MEHP 诱导小鼠睾丸间质细胞自噬过程中 PTEN 的相关研究

伊梦楠, 李玲, 德小明, 李丽萍, 张亚娟, 张鹏举, 员朋娟

宁夏医科大学公共卫生与管理学院劳动卫生与环境卫生学系, 生育力保持教育部重点实验室, 宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室, 宁夏 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18852

摘要:

[目的] 目前对于邻苯二甲酸酯的研究多集中于其原型, 但有学者认为, 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二乙基己基酯的毒性作用可能是其在体内的代谢产物邻苯二甲酸单丁酯 (MBP) 和邻苯二甲酸单乙基己基酯 (MEHP) 所致。本研究拟探讨 MBP 和 MEHP 对小鼠睾丸间质细胞 (TM-3) 自噬的影响以及与第 10 号染色体缺失的同源性磷酸酶-张力蛋白 (PTEN) 的相关研究。

[方法] 体外培养 TM-3 并取其对数生长期, 预实验设置毒物浓度梯度为 0 (对照组)、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$, 染毒 24 h 后, 利用改良寇氏法计算 MBP、MEHP 的半数致死浓度 (IC_{50}) 后, 确定实验染毒浓度为 0 (对照组)、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 。分别采取 CCK-8 法检测不同毒物剂量和不同染毒时间对细胞存活率的影响; 透射电镜观察 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 MBP、MEHP 诱导 24 h 后具有双层膜状结构的自噬小体; 单丹黄酰尸胺 (MDC) 免疫荧光法检测细胞自噬囊泡的荧光信号强度; 采用 Western blot 技术检测自噬标志蛋白 LC3、p62 和自噬调节相关蛋白 PTEN 的表达水平。

[结果] CCK-8 结果显示: 与对照组相比, 随着 MBP、MEHP 染毒剂量增高, 细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。透射电镜结果显示: 400 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒 24 h 后细胞内可见具有双层膜状结构的自噬小体。MDC 法检测结果显示: 与对照组相比, 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒组荧光信号强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组荧光信号强度分别增加了 9.0、16.8 倍; 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒组荧光信号强度增加了 16.3、26.4 倍, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示: 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒组 LC3II/LC3I、PTEN 表达水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组 LC3II/LC3I 蛋白表达水平分别增加了 7.5、13.6 倍, PTEN 表达水平增加了 4.8、15.4 倍; 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒组 LC3II/LC3I 蛋白表达水平增加了 4.5、9.8 倍, PTEN 表达水平增加了 5.7、14.4 倍 ($P < 0.05$); 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组 p62 表达水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组 p62 蛋白表达水平分别降低了 43%、72%; 200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒组 p62 蛋白表达水平也分别降低了 55%、80%、88% ($P < 0.01$)。

[结论] 一定剂量的 MBP、MEHP 可提高 TM-3 细胞自噬水平, 并且 PTEN 表达水平与细胞自噬水平呈正相关趋势。

关键词: 邻苯二甲酸单丁酯; 邻苯二甲酸单 (2-乙基己基) 酯; 小鼠睾丸间质细胞; PTEN; 自噬

Study on PTEN in autophagy induced by MBP and MEHP in mouse testicular mesenchymal cells

YI Meng-nan, LI Ling, DE Xiao-ming, LI Li-ping, ZHANG Ya-juan, ZHANG Peng-ju, YUN Peng-juan (Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health and Management, Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ministry of Education, Key Laboratory of Reproduction and Genetics in Ningxia Hui Autonomous Region, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Objective] Much research related to phthalates has focused on parent chemicals; however, dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate may exert their toxicities via metabolites monobutyl phthalate (MBP) and mono-ethylhexyl phthalate (MEHP). This study aims to investigate the effects of MBP and MEHP on the autophagy of mouse testicular mesenchymal cells (TM-3) and

基金项目

宁夏自然科学基金项目资助 (2018AAC03070)

作者简介

伊梦楠 (1995—), 男, 研究生;
E-mail: yimn1995@163.com

通信作者

李玲, E-mail: 13995307525@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-12-25

录用日期 2019-02-14

文章编号 2095-9982(2019)04-0333-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

伊梦楠, 李玲, 德小明, 等. MBP、MEHP 诱导小鼠睾丸间质细胞自噬过程中 PTEN 的相关研究 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (4): 333-338.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18852

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LI Ling, E-mail: 13995307525@163.com

Competing interests None declared

Received 2018-12-25

Accepted 2019-02-14

To cite

YI Meng-nan, LI Ling, DE Xiao-ming, et al. Study on PTEN in autophagy induced by MBP and MEHP in mouse testicular mesenchymal cells [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(4): 333-338.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18852

phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN).

[Methods] *In vitro* cultured TM-3 cells in logarithmic growth phase were treated with either MBP or MEHP at concentration gradients of 0 (control group), 50, 100, 200, 400, and 800 $\mu\text{mol/L}$; after 24 h of treatment, respective median lethal concentrations (IC_{50}) were calculated by improved Karber's method, and a set of concentrations of 0 (control group), 200, 400, and 800 $\mu\text{mol/L}$ were determined appropriate for subsequent experiment. The effects of MBP or MEHP exposure at designed concentrations for different time on cell survival rate were assessed by CCK-8 method; autophagosomes with double membranes induced by 400 $\mu\text{mol/L}$ MBP or MEHP for 24 h were observed under transmission electron microscope; the fluorescence signal intensity of autophagic vesicles was detected by monodansyl cadaverine (MDC) immunofluorescence staining; the expression levels of autophagy marker proteins (LC3 and p62) and autophagy regulation protein (PTEN) were assessed by Western blot.

[Results] The CCK-8 results showed that compared with the control group, the cell survival rate decreased as the dose of MBP or MEHP increased ($P < 0.05$). Under transmission electron microscopy, the autophagosomes with double membranes were observed in the cells infected with 400 $\mu\text{mol/L}$ MBP or MEHP for 24 h. The MDC staining results showed that compared with the control group, the fluorescence intensities of the 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP group and the 200 $\mu\text{mol/L}$ MEHP group had no statistical difference ($P > 0.05$), but the fluorescence signal intensities of the 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ MBP groups increased by 9.0 times and 16.8 times respectively, and those of the 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP groups increased by 16.3 times and 26.4 times, respectively ($P < 0.01$). The Western blot results showed that the 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP and MEHP treatments did not change the LC3II/LC3I and PTEN protein expression levels compared with the control group ($P > 0.05$); the protein expression levels of LC3II/LC3I in the 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ MBP groups increased by 7.5 times and 13.6 times respectively, and the PTEN expression levels increased by 4.8 times and 15.4 times respectively; the protein expression levels of LC3II/LC3I in the 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP groups increased by 4.5 times and 9.8 times respectively, and the PTEN expression levels increased by 5.7 times and 14.4 times respectively ($P < 0.05$); except the 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP group ($P > 0.05$), the expression levels of p62 protein in the 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ MBP groups decreased by 43% and 72% respectively; the expression levels of p62 protein in the 200, 400, and 800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP groups reduced by 55%, 80%, and 88%, respectively ($P < 0.01$).

[Conclusion] A certain dose of MBP or MEHP can increase the autophagy of TM-3 cells, and the expression level of PTEN is positively correlated with the autophagy level.

Keywords: mono-butyl phthalate; mono-ethylhexyl phthalate; mouse testicular mesenchymal cell; PTEN; autophagy

目前全球范围内已被公认的内分泌干扰物质约有 70 余种, 邻苯二甲酸酯 (phthalic acid esters, PAEs) 是环境内分泌干扰物中主要的一类^[1], 可以作为添加剂增强聚合物的可塑性, 利用这一特性可以改善聚合物的性能, 在满足不同工业材料的使用需求同时可以降低生产成本并且提高生产效率^[2], 被广泛应用于合成医疗器械、橡胶、黏合剂、涂料等领域^[3]。以邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, DBP)、邻苯二甲酸二乙基己基酯 (diethylhexyl phthalate, DEHP) 为代表的增塑剂类物质在聚合物分子中并非以共价键结合, 而是以范德华力结合, 因此容易发生解离逸散到相应的容器以及包装中, 人体易通过食品包装等各种生活用品摄入体内, 并通过尿液或粪便排出体外^[4]。自噬是真核生物中高度保守的一类生物学途径^[5], 通过溶酶体降解双层膜状结构中被隔离的细胞质元素, 这一过程在机体内必不可少。当细胞内部和外部生存条件发生变化时, 如应激、代谢失衡、缺氧、营养不良等, 自噬程序会作出适当的反应^[6]。自噬的靶点可以是特定的蛋白质、非特异性蛋白质聚集体或整个细胞器, 经由溶酶体中的水解酶降解, 产生氨基酸和单糖等分解产物, 供细胞再次利用^[7], 维持细胞自身平衡并帮助细胞在应激情况下生存^[8]。

目前认为 DBP、DEHP 的毒性作用可能是其在体内的代谢产物邻苯二甲酸单丁酯 (mono-butyl phthalate, MBP) 和邻苯二甲酸单乙基己基酯 (mono-ethylhexyl phthalate, MEHP) 所致^[9], 而对于 PAEs 的毒性研究大多仍集中于其原型。因此本实验拟通过研究 MBP、MEHP 对小鼠睾丸间质细胞 (TM-3) 自噬水平的影响, 为进一步研究 MBP、MEHP 的生殖毒性提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

HF90 CO₂ 培养箱 (中国上海力申科学仪器有限公司), SW-CJ-1CU 超净工作台 (中国苏州安泰空气技术有限公司), CKX41 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), Neofuge15R 高速冷冻离心机 (中国上海力申科学仪器有限公司), I510 全波长酶标仪 (芬兰赛默飞世尔公司), LDZM-40KCS-II 立式压力蒸汽灭菌器 (中国上海申安医疗器械厂), 成像系统 (美国 azure biosystems 公司)。

小鼠睾丸间质细胞 (TM-3, 美国 ATCC 细胞研究中心), MBP、MEHP 标准品 (纯度为 99%, 美国 Sigma 公司), DMEM 培养基、青链霉素混合液、胰酶、胎牛血清、DMSO 等 (美国 Gibco 公司), CCK-8 法细胞增

值检测试剂盒(中国江苏凯基生物有限公司),单丹黄酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC, 美国Sigma公司),微管相关蛋白1轻链3(light chain 3, LC3)、泛素结合蛋白p62、第10号染色体缺失的同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)抗体(美国Cell Signal Technology公司),聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量检测试剂盒、化学发光显影液(中国江苏凯基生物有限公司), β -actin抗体(美国proteintech公司),其他试剂均为国产分析纯。

MBP、MEHP染毒液配置:准确称取适量的MBP、MEHP固体溶于1 mL无菌的DMSO中制成浓度为450、359.27 mmol/L母液,使用前用无菌的培养液配制成功0、50、100、200、400、800 μ mol/L的染毒液备用。

1.2 TM-3 细胞培养

复苏TM-3,离心弃掉冻存液,加入新配制的完全培养基,培养24 h后换液;待细胞增殖至对数生长期,吸弃旧培养液,加入3 mL PBS清洗,加入1 mL胰酶并在光镜下观察;待细胞突起回缩,细胞间隙开始变大后,弃掉胰酶,加入新鲜配制的完全培养基4 mL,制成单个细胞混悬液,平均分置两个新培养瓶;新培养瓶中加入完全培养液,定容至4 mL,混匀,于37°C、5%CO₂、100%相对湿度培养箱中培养。

1.3 CCK-8 法检测细胞存活率

在处于对数生长期的TM-3中加入胰酶制成细胞悬液,96孔板中加入100 μ L/孔(约6000~8000个细胞/孔),置于37°C、5%CO₂细胞培养箱中培养数小时。待细胞贴壁后弃去培养液并加入适当浓度的受试物后,将96孔板放置于37°C、5%CO₂空气及100%湿度的细胞培养箱中孵育适当时间。向各孔中加入10 μ L的CCK-8检测液,37°C孵育1~4 h后,酶标仪450 nm波长下检测各孔光密度(D)并计算细胞存活率。

1.4 电镜观察自噬小体

取TM-3悬液,调整细胞密度后接种于细胞培养瓶中,待细胞贴壁后,加入适量的MBP、MEHP(400 μ mol/L)染毒液,染毒24 h后,弃培养液,胰酶消化收集细胞样品于1.5 mL离心管中,以1000 r/min离心(离心半径5 cm)5 min。前固定:加入2%戊二醛固定液1 mL,固定1 h后,加入0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液清洗3次,间隔1 h换一次;后固定:加入1%锇酸浸泡1 h后,加入0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液清洗

2次,每次15 min。经30%、50%、70%、80%、90%、100%乙醇脱水、包埋后,于透射电镜下观察并拍照。

1.5 MDC 染色观察荧光强度

取对数生长期TM-3接种于24孔板中并做细胞玻片,至细胞密度达到合适密度,加入适量的终浓度为0、200、400、800 μ mol/L的MBP、MEHP染液染毒24 h。弃掉上清,用4°C PBS洗2次后,加入适量的胰酶消化细胞,完全培养基终止消化。调节各组细胞量保证一致后,加入适量的MDC染液(50 μ mol/L),室温孵育30 min,用4°C PBS洗涤2~3次,避光依次在荧光显微镜下观察。相同荧光显微镜观察条件下各组随机选取5个视野进行拍照,记录并用软件计算各组平均单个视野下的荧光强度。

1.6 Western blot 检测蛋白表达水平

TM-3经过处理后,弃去培养液,用冷的PBS洗2次,用刮刀刮下细胞并转移至1.5 mL的离心管中,每管加入适量的细胞裂解液裂解细胞,涡旋振荡器上剧烈震荡30 s,冰上放置4 min,并重复5次。离心机12 000 \times g、4°C离心5 min后取上清为全蛋白提取物,用BCA法检测蛋白浓度。加入适量的裂解缓冲液和5 \times 上样缓冲液配置蛋白上样体系,100°C变性5 min后,利用SDS-PAGE凝胶电泳并转膜至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉封闭1.5 h后,加入适当稀释比的一抗4°C封闭过夜。用TBST洗膜3次后,加入适当稀释比的二抗室温孵育1 h, TBST洗膜3次后经化学发光法曝光观察结果。实验中以 β -actin为内参照。Western blot的结果采用image pro plus软件进行灰度分析。

1.7 统计学分析

计量数据采用均数 \pm 标准差表示,采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。多组间的比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,再以LSD-t检验分析相应两组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MBP、MEHP对TM-3细胞活性的影响

预实验设置毒物浓度梯度为0、50、100、200、400、800 μ mol/L,染毒24 h后与对照组相比,随着染毒剂量的增高,细胞活性呈降低趋势(表1)。运用改良寇氏法计算MBP的IC₅₀为500 μ mol/L,MEHP的IC₅₀为450 μ mol/L,因此选取MBP、MEHP终浓度为200、400、800 μ mol/L为后续实验的染毒浓度,并进一步检测MBP、MEHP对TM-3细胞活性的影响。与对照组相

比, 各剂量组和各时间组的细胞活性均降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.2 MBP、MEHP 对 TM-3 中自噬小体形成的影响

透射电镜检测结果显示: 对照组胞质均匀且可见正常的线粒体, 核膜平滑, 染色质均匀; 而 400 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒 24 h 后, 细胞内可见核膜固缩, 染色质呈现出边集化, 胞质内可见大量空泡以及膜状结构, 并且可见有双层膜状结构的自噬小体 (如图箭头所示), 说明该剂量的 MBP、MEHP 可诱导细胞产生自噬小体 (图 1)。

表 1 CCK-8 法检测不同浓度 MBP、MEHP 对 TM-3 细胞存活率的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Effects of MBP or MEHP exposure at selected concentrations on survival rate of TM-3 cells by CCK-8

| 浓度 (Concentration, $\mu\text{mol/L}$) | MBP | MEHP |
|--|--------------------|---------------------|
| 0 | 100.00 \pm 0.00 | 100.00 \pm 0.00 |
| 50 | 107.16 \pm 11.02 | 76.55 \pm 2.41* |
| 100 | 97.45 \pm 5.24 | 74.70 \pm 7.39* |
| 200 | 88.15 \pm 5.00** | 60.99 \pm 14.77** |
| 400 | 57.31 \pm 7.87** | 53.40 \pm 9.69** |
| 800 | 29.28 \pm 6.99** | 21.35 \pm 3.58** |

[注] 与 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照) 组比较, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

[Note] Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) group, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

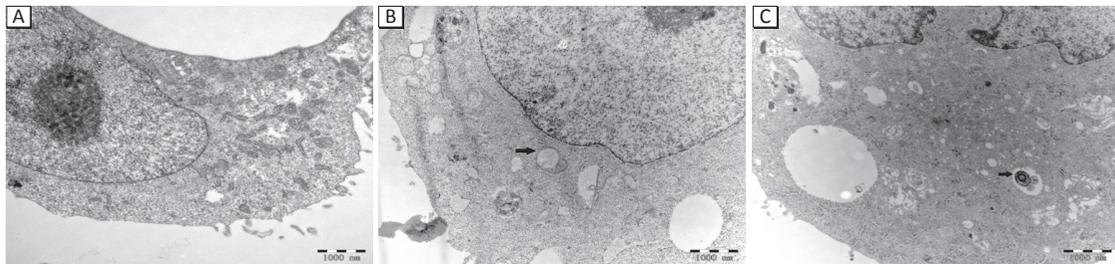
表 2 CCK-8 法检测不同浓度和时间 MBP、MEHP 染毒对 TM-3 细胞活性的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of MBP or MEHP exposure at different concentrations against different time on survival rate of TM-3 cells by CCK-8

| 染毒浓度 (Concentration, $\mu\text{mol/L}$) | 24h | | 36h | | 48h | | |
|--|-----|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| | D | 存活率 (Survival rate, %) | D | 存活率 (Survival rate, %) | D | 存活率 (Survival rate, %) | |
| MBP | 0 | 1.10 \pm 0.12 | 100.00 \pm 0.000 | 1.13 \pm 0.25 | 100.00 \pm 0.000 | 1.15 \pm 0.02 | 100.00 \pm 0.000 |
| | 200 | 0.99 \pm 0.04 | 79.13 \pm 3.98 | 0.90 \pm 0.05** | 76.12 \pm 4.95** | 0.65 \pm 0.01** | 66.62 \pm 1.04** |
| | 400 | 0.75 \pm 0.04** | 55.55 \pm 4.33** | 0.65 \pm 0.01** | 50.19 \pm 1.15** | 0.52 \pm 0.04** | 53.28 \pm 4.12** |
| | 800 | 0.61 \pm 0.06** | 41.43 \pm 5.96** | 0.52 \pm 0.04** | 37.46 \pm 4.46** | 0.39 \pm 0.01** | 39.90 \pm 1.30** |
| MEHP | 0 | 1.30 \pm 0.14 | 100.00 \pm 0.00 | 1.39 \pm 0.12 | 100.00 \pm 0.00 | 1.18 \pm 0.01 | 100.00 \pm 0.00 |
| | 200 | 1.10 \pm 0.11* | 81.26 \pm 9.78* | 1.10 \pm 0.06** | 75.28 \pm 5.13** | 0.78 \pm 0.05** | 60.32 \pm 4.51** |
| | 400 | 0.79 \pm 0.05** | 52.89 \pm 4.90** | 0.82 \pm 0.12** | 50.30 \pm 5.60** | 0.61 \pm 0.05** | 44.35 \pm 4.69** |
| | 800 | 0.53 \pm 0.06** | 29.82 \pm 5.87** | 0.68 \pm 0.03** | 38.31 \pm 2.39** | 0.49 \pm 0.04** | 32.68 \pm 3.67** |

[注] 与 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照) 组比较, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

[Note] Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) group, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。



[注] →所指为自噬小体。[Note] Indicates autophagosome.

图 1 电镜观察 24 h 后对照组 (A)、400 $\mu\text{mol/L}$ MBP (B)、400 $\mu\text{mol/L}$ MEHP (C) 诱导 TM-3 细胞自噬小体的情况
Figure 1 Autophagosomes in TM-3 cells induced by control (A), 400 $\mu\text{mol/L}$ MBP (B), and 400 $\mu\text{mol/L}$ MEHP (C) after 24 h under transmission electron microscope

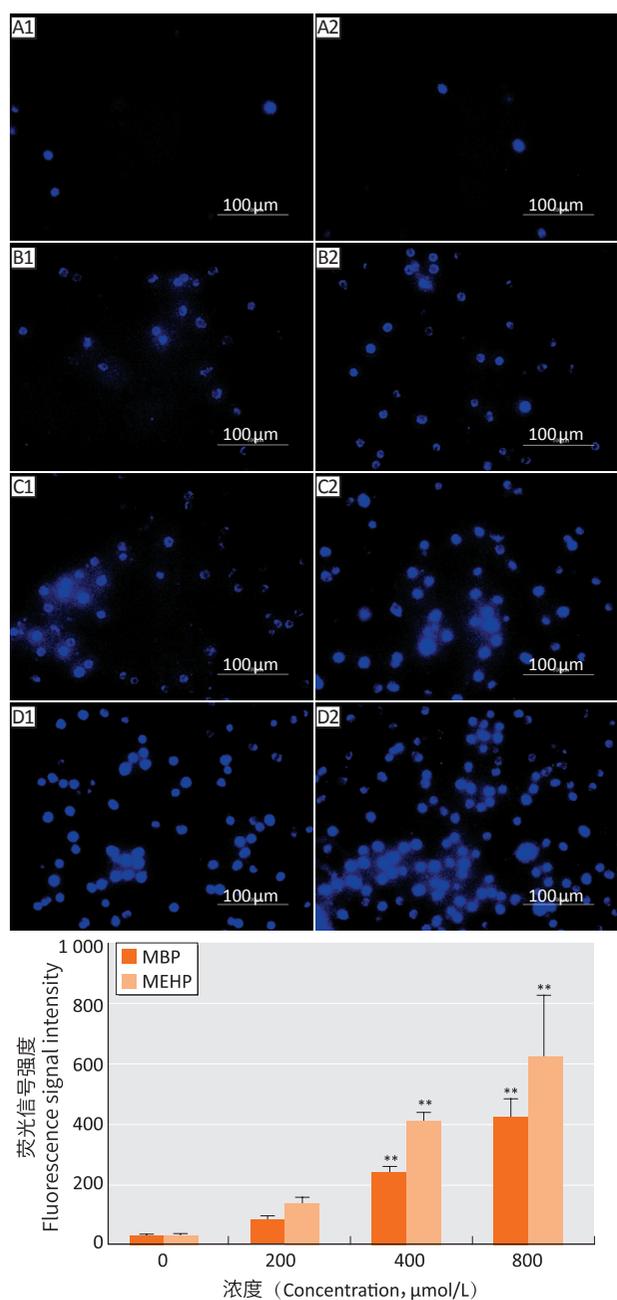
2.3 MBP、MEHP 对 TM-3 自噬囊泡生成的影响

MDC 染色结果显示: 与对照组相比, 染毒 24 h 后 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒组荧光信号强度无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组荧光信号强度分别增加了 9.0、16.8 倍; 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒组荧光信号强度增加了 16.3、26.4 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 2)。

2.4 MBP、MEHP 对 TM-3 中自噬相关蛋白表达的影响

Western blot 结果及半定量分析显示: 与对照组相比, 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒组自噬相关蛋白 LC3II/LC3I 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 400、

800 $\mu\text{mol/L}$ 染毒组 LC3II/LC3I 表达水平增高 (MBP 染毒分别增加 7.5、13.6 倍, MEHP 染毒分别增加 4.5、9.8 倍, 均 $P < 0.01$)。200 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组自噬相关蛋白 p62 表达量与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 和 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组 p62 的表达水平降低 (相应分别降低了 55%、80%、88% 和 43%、72%, $P < 0.01$)。与对照组相比, 200 $\mu\text{mol/L}$ MBP、MEHP 染毒组 PTEN 表达量与对照组相比无差异 ($P > 0.05$), 400 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒组 PTEN 表达量增高了 5.7 倍 ($P < 0.05$), 800 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 和 400、800 $\mu\text{mol/L}$ MBP 染毒组 PTEN 蛋白表达量增高 (分别较对照组增加了 14.4 倍和 4.8、15.4 倍, $P < 0.01$) (图 3)。



[注] A : 0 μmol/L ; B : 200 μmol/L ; C : 400 μmol/L ; D : 800 μmol/L。1 : MBP ; 2 : MEHP。图中蓝色荧光表示自噬囊泡。** : 与 0 μmol/L (对照) 组比较, $P < 0.01$ 。

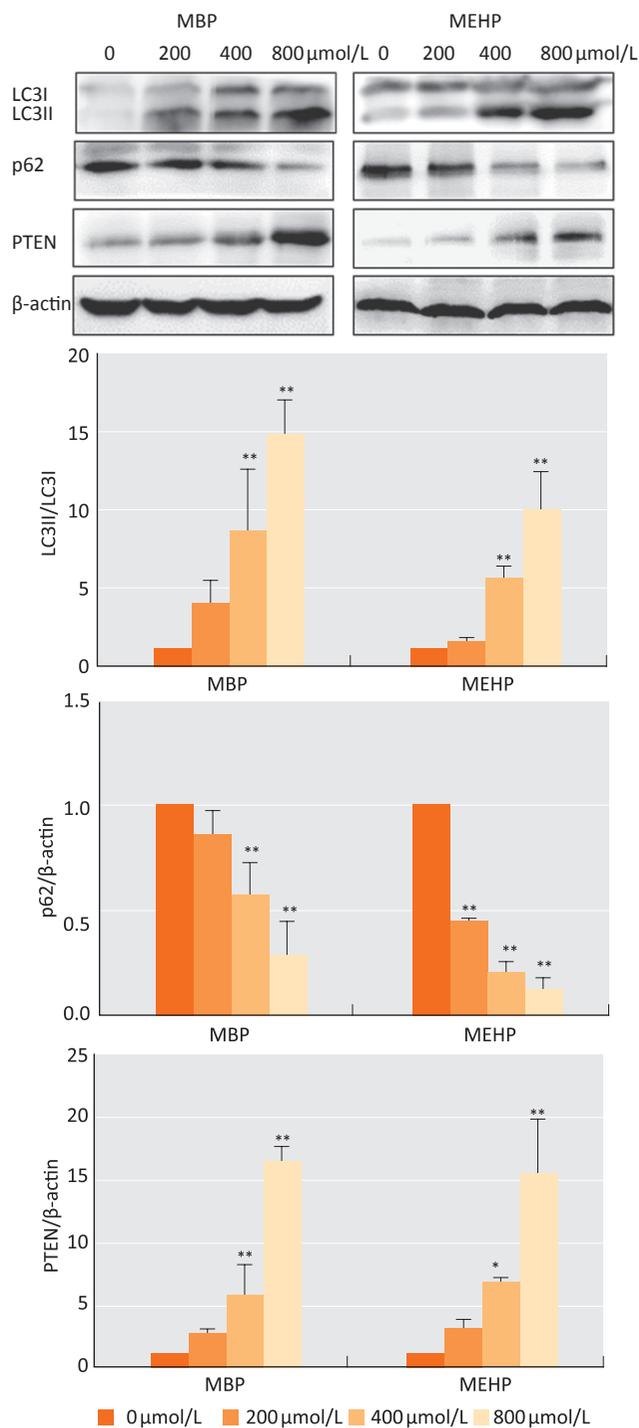
[Note] A : 0 μmol/L ; B : 200 μmol/L ; C : 400 μmol/L ; D : 800 μmol/L。1 : MBP ; 2 : MEHP。In the figure, blue fluorescence indicates autophagic vesicles. ** : Compared with the 0 μmol/L (control) group, $P < 0.01$ 。

图2 24h后不同浓度MBP、MEHP对TM-3自噬囊泡的诱导情况(MDC染色, $n=5$, $\times 400$)

Figure 2 Autophagic vesicles in TM-3 cells induced by MBP or MEHP at different concentrations after 24 h

3 讨论

透射电镜检测自噬小体作为验证自噬结构的金标准,可观察到双层膜结构的自噬小体内含各种成分,如:损伤的细胞器、包浆成分等。MDC作为一种溶酶体复合物,可用于通过荧光显微镜鉴定自噬囊泡,并且可通过MDC标记的液泡的积累来评估自



[注] 与 0 μmol/L (对照) 组比较, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

[Note] Compared with the 0 μmol/L (control) group, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

图3 不同浓度MBP、MEHP对相关蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of MBP or MEHP at different concentrations on protein expression levels

噬诱导^[10]。研究发现:PTEN最重要的底物是磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸[phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate, PIP3]^[11],PTEN能通过PIP3脱磷酸来维持PIP3的低水平,从而下调3-磷酸肌醇激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)通路,上调细胞的自噬水平^[12]。在自噬的调

节过程中PTEN起到重要的作用：抑制PTEN的表达，会使AKT的磷酸化水平上调，进而下调细胞自噬水平^[13]。而对于PAEs诱导TM-3细胞自噬中PTEN的调节机制鲜有报道。在自噬囊泡形成前，LC3合成后会以LC3前体的形式存在，LC3前体被自噬相关蛋白4加工暴露出羧基末端的甘氨酸残基，形成胞浆型LC3I，自噬发生时LC3I在复合物的帮助下连接一个磷脂酰乙醇胺分子形成膜型LC3II，LC3II具有膜结合能力，最终会定位于自噬膜和自噬体^[14]；p62在自噬过程中发挥着重要作用，作为特定蛋白的载体，用于将蛋白泛素化与自噬机制联系起来^[15]，使其在自噬体和溶酶体融合形成自噬溶酶体的晚期过程中被降解^[16]。因此LC3和p62均能够作为自噬的标志蛋白。

本实验通过CCK-8法测定毒物半数致死剂量并确定后续染毒剂量后，利用透射电镜法测得在400 μ mol/L MBP、MEHP剂量下能够诱导TM-3细胞产生具有双层膜结构的自噬小体，MDC法提示产生自噬囊泡的阳性TM-3细胞数增加，并且呈现出剂量依赖性趋势。研究发现：低剂量（200 μ mol/L）MBP、MEHP染毒24h后，与对照组相比，LC3、PTEN蛋白表达水平未发生明显的变化，而MEHP染毒组的p62表达水平降低；随着染毒剂量的增高，LC3I向LC3II的转化、PTEN蛋白表达水平增加，并且进一步促进了p62的降解，说明一定剂量的MBP、MEHP可以诱导TM-3细胞的自噬水平增加，且PTEN与细胞自噬水平呈正相关趋势。研究发现当染毒剂量达到200 μ mol/L时，CCK-8法结果显示细胞的存活率降低，而MDC染色以及自噬标志蛋白LC3结果显示差异无统计学意义，说明细胞在应激条件下不仅仅只通过细胞自噬一条途径来调节细胞的活性。PTEN是具有蛋白磷酸酶活性的抑癌基因，作为一种能够调节自噬关键通路的关键蛋白^[12]，PTEN通过调节PI3K/AKT信号通路，参与细胞自噬、细胞凋亡、细胞周期、细胞迁移与侵袭等多种途径^[11]。在MBP、MEHP致TM-3细胞自噬过程中PTEN的表达结果与Tao等^[13]结果一致，为进一步明确其机制，后续还需加入相应的干预剂进行研究。基于本实验研究发现：MBP、MEHP的染毒剂量与TM-3细胞自噬水平呈正相关趋势，为后续进一步检测MBP、MEHP联合染毒的交互作用以及进一步研究自噬相关机制提供了理论依据。

参考文献

[1] 杨先海, 刘会会, 刘济宁, 等. 国外环境内分泌干扰物管控现状及我国的对策[J]. 生态与农村环境学报, 2018,

34 (2) : 104-113.

- [2] ZHU Y, HUA R, ZHOU Y, et al. Chronic exposure to mono-(2-ethylhexyl)-phthalate causes endocrine disruption and reproductive dysfunction in zebrafish [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2016, 35 (8) : 2117-2124.
- [3] 雷春萍, 钟慧云, 代兴碧. 邻苯二甲酸酯使用情况及在环境与人体中的浓度研究[J]. *科学咨询(科技·管理)*, 2017 (6) : 48.
- [4] WANG YC, CHEN HS, LONG CY, et al. Possible mechanism of phthalates-induced tumorigenesis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2012, 28 (S7) : S22-S27.
- [5] 李隽雨. 自噬的分子机制及其与中医的联系[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2017, 27 (5) : 447-449.
- [6] SIMON HU, FRIIS R, TAIT SW, et al. Retrograde signaling from autophagy modulates stress responses [J]. *Sci Signal*, 2017, 10 (468) : eaag2791.
- [7] 付婉, 董笛, 赵颖. 自噬的相关分子机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33 (5) : 448-455.
- [8] GREEN DR, LEVINE B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate [J]. *Cell*, 2014, 157 (1) : 65-75.
- [9] ALBERT O, JÉGOU B. A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20 (2) : 231-249.
- [10] VÁZQUEZ CL, COLOMBO MI. Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA [J]. *Methods Enzymol*, 2009, 452 : 85-95.
- [11] 陈培, 张钦宪. PTEN-PI3K/AKT细胞信号转导通路与肿瘤[J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 22 (6) : 484-487.
- [12] WOEBY CA, DIXON JE. Pten [J]. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83 : 641-669.
- [13] TAO Z, FENG C, MAO C, et al. MiR-4465 directly targets PTEN to inhibit AKT/mTOR pathway-mediated autophagy [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2019, 24 (1) : 105-113.
- [14] HURLEY JH, SCHULMAN BA. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion [J]. *Cell*, 2014, 157 (2) : 300-311.
- [15] BJØRKØY G, LAMARK T, PANKIV S, et al. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1 [J]. *Methods Enzymol*, 2009, 452 : 181-197.
- [16] GORUPPI S, JO SH, LASZLO C, et al. Autophagy controls CSL/RBPJK stability through a p62/SQSTM1-dependent mechanism [J]. *Cell Rep*, 2018, 24 (12) : 3108-3144.e4.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 邱丹萍; 校对: 丁瑾瑜)