

视黄酸信号通路在腐霉利致青春期小鼠睾丸损伤中的表达特征

辛冰艳，李锐，王晴，左而今，付虎，阎政礼，朱勇飞

湖南师范大学医学院预防医学系，湖南 长沙 410013

摘要：

[背景] 腐霉利(PCM)暴露可致雄性小鼠生殖器官损伤,但其是否与视黄酸(RA)信号通路有关尚不明确。

[目的] 探讨 RA 信号通路在 PCM 致青春期小鼠睾丸损伤中的表达特征。

[方法] 取 64 只健康雄性 ICR 小鼠(3 周龄)适应性饲养 1 周后,随机均分为对照和低、中、高剂量染毒组,每组 16 只,连续 21 d 经口灌胃,给予 PCM 剂量分别为 0、50、100、200 mg·kg⁻¹。停止给药 1 周后处死小鼠,取其血清和双侧睾丸,检测血清中睾酮含量,观察睾丸切片中的组织学变化,用实时荧光定量 PCR 法、Western blotting 法分别测定小鼠睾丸组织中 RA 信号通路相关基因及凋亡基因 *Casp9*、*Casp12* mRNA 的表达丰度及 CYP26A1、ALDH2、CASP9 蛋白水平。

[结果] 与对照组相比,各剂量染毒组小鼠的整体外观、睾丸外观均无明显改变。病理切片观察:低剂量染毒组小鼠睾丸生精小管出现轻微萎缩,精子生成减少,中、高剂量染毒组小鼠睾丸出现明显的病理损伤(如生精小管管腔扩张,生精上皮受损,精原细胞数量下降,支持细胞部分缺如);随着 PCM 剂量增加,小鼠生精上皮损伤程度逐渐加重,生精小管中精子数量降低。4 组小鼠肛门和生殖器距离、睾丸质量、睾丸容积、睾丸脏器系数的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。低、中、高剂量染毒组小鼠体重分别为(34.91±1.89)、(34.88±1.75)、(32.94±1.37) g,其中高剂量染毒组低于对照组的(35.93±1.99) g; 血清睾酮质量浓度分别为(313.77±5.32)、(305.31±3.47)、(304.80±5.28) pg·mL⁻¹, 均低于对照组的(319.05±1.92) pg·mL⁻¹(均 $P < 0.05$); 随着 PCM 剂量增加,小鼠体重和血清睾酮质量浓度均有下降趋势。高剂量染毒组小鼠 *Rbp1*、*Stra6* mRNA 表达丰度均高于对照组(均 $P < 0.05$); 中、高剂量染毒组小鼠 *Aldh2*、*Aldh1a1*、*Aldh1a3*、RA 核受体相关基因(*Rar* 和 *Rxr*) mRNA 表达丰度高于对照组(均 $P < 0.05$); 中、高剂量染毒组小鼠 *Cyp26a1*、*Cyp26b1* mRNA 表达丰度均低于对照组(均 $P < 0.05$); 中、高剂量染毒组小鼠凋亡基因 *Casp9*、*Casp12* mRNA 表达丰度均高于对照组(均 $P < 0.05$)。各剂量染毒组小鼠 CYP26A1 蛋白表达量均低于对照组(均 $P < 0.05$),其表达量随 PCM 浓度增加有下降趋势; 中、高剂量染毒组小鼠 ALDH2 蛋白表达量和各剂量染毒组小鼠 CASP9 蛋白表达量均高于对照组(均 $P < 0.05$),其表达量随 PCM 浓度增加有升高趋势。

[结论] PCM 可损伤青春期小鼠睾丸组织,其 RA 信号通路、*Casp9* 基因、*Casp12* 基因和 CASP9 蛋白被激活。

关键词：腐霉利；青春期；睾丸；视黄酸信号通路；睾酮

Expression of retinoic acid signaling pathway in mouse damaged testes induced by procymidone during adolescence XIN Bingyan, LI Rui, WANG Qing, ZUO Erjin, FU Hu, YAN Zhengli, ZHU Yongfei (Department of Preventive Medicine, Medical School, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract:

[Background] Procymidone (PCM) exposure can cause damage to reproductive organs of male mice, but whether its mechanism is related to the retinoic acid (RA) signaling pathway is unclear.

[Objective] To explore the possible mechanism of PCM-induced testes damage in adolescent mice.

[Methods] Three-week-old ICR mice ($n=64$) were randomly divided into a control group and



DOI 10.11836/JEOM21319

基金项目

湖南省自然科学基金(2019JJ40194)

作者简介

辛冰艳(1994—),女,硕士生;

E-mail: 534463694@qq.com

通信作者

朱勇飞, E-mail: njzhu70@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-07-17

录用日期

2021-10-19

文章编号 2095-9982(2022)02-0186-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

▶ 引用

辛冰艳, 李锐, 王晴, 等. 视黄酸信号通路在腐霉利致青春期小鼠睾丸损伤中的表达特征[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(2): 186-192.

▶ 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21319

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHU Yongfei, E-mail: njzhu70@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-07-17

Accepted

2021-10-19

▶ To cite

XIN Bingyan, LI Rui, WANG Qing, et al. Expression of retinoic acid signaling pathway in mouse damaged testes induced by procymidone during adolescence[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(2): 186-192.

▶ Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21319

three dose groups (low, medium, and high), with 16 mice in each group. PCM was administered orally at 0, 50, 100, and 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 21 consecutive days. Serum and bilateral testes in each mouse were collected to detect content of testosterone in serum and to observe histological changes in testis section after the mice were sacrificed one week after cessation of drug administration. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blotting were used to detect the mRNA expression abundances of genes related to the RA signaling pathway and apoptosis genes *Casp9* and *Casp12*, and the protein expression levels of CYP26A1, ALDH2, and CASP9 respectively.

[Results] Compared with the control group, there was no significant change in the overall appearance and testicular appearance of mice in each dose group after the PCM exposure. According to pathological section observation, the testicular seminiferous tubules of mice in the low-dose group showed slight atrophy and reduced sperm production; the testes of mice in the medium- and the high-dose groups showed obvious pathological damage (e.g. dilated lumen of seminiferous tubules, damaged spermatogenic epithelium, decreased number of spermatogonia, and partial absence of Sertoli cells); as the concentration of PCM increased, the degree of spermatogenic epithelial damage in mice gradually increased and the number of spermatozoa in the seminiferous tubules decreased. There were no significant differences in the distance between the anus and the genitals, testicular mass, testicular volume, and testicular organ coefficient among the four groups of mice ($P > 0.05$). The body weights of the mice in the low-, medium-, and high-dose groups were (34.91±1.89), (34.88±1.75), and (32.94±1.37) g respectively, and that in the high-dose group was lower than that in the control group, (35.93±1.99) g, ($P < 0.05$); the serum testosterone concentrations were (313.77±5.32), (305.31±3.47), and (304.80±5.28) pg·mL⁻¹ respectively, which were lower than that in the control group, (319.05±1.92) pg·mL⁻¹ ($P < 0.05$); as the dose of PCM increased, the body weight and serum testosterone concentration showed decreasing trends. The mRNA expression levels of *Stra6* and *Rbp1* in the high-dose group were higher than those in the control group ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of *Aldh2*, *Aldh1a1*, *Aldh1a3*, *Rara*, *Rarβ*, *Rxra* and *Rxrβ* in the medium-and the high-dose groups were higher than those in the control group ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of *Cyp26a1* and *Cyp26b1* in the medium- and high-dose groups were lower than those in the control group ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of apoptosis genes *Casp9* and *Casp12* in the medium-and the high-dose groups were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The protein expression level of CYP26A1 in each exposure group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), and the expression level decreased with increasing concentration of PCM; the expression level of ALDH2 protein in the medium- and the high-dose groups and the protein expression level of CASP9 in each exposure group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), and the levels increased with increasing concentration of PCM.

[Conclusion] PCM can damage the testis tissues of adolescent mice, where RA signaling pathway, *Casp9* and *Casp12* genes, and CASP9 protein are activated.

Keywords: procymidone; adolescence; testis; retinoic acid signaling pathway; testosterone

低毒性杀菌剂腐霉利(procymidone, PCM)常用于防治蔬果及农作物的菌核病、灰霉病及黑斑病^[1]。PCM在使用过程中可大量残留在土壤和农作物中，并可通过食物链危害动物及人体健康，甚至导致癌症发生，因此美国、日本、加拿大等主要发达国家均对农产品中PCM的最大残留制定限量要求^[2]。人类主要通过食物、饮水、皮肤接触等途径暴露于PCM。欧洲食品安全局研究表明，部分地区居民PCM的膳食摄入量长期超过每日可接受摄入量^[3]。PCM作为一种环境内分泌干扰物，在体内和体外都表现出抗雄激素特性，可阻止雄激素与相应受体结合，进而抑制雄激素调控基因的表达，最终造成生殖器官异常发育^[4-5]。视黄酸(retinoic acid, RA)信号通路是生物发育的经典信号通路之一，该信号通路由视黄醇类物质、视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein, RBP)、RA核受体——视黄酸受体(retinoic acid receptors, RARs)和视黄醛X受体(retinoid X receptors, RXRs)、RA反应元件(RAR reaction element, RARE)等组成，通过在细胞质和细胞核内发挥作用来调控细胞分化及胚胎发育等^[6]，其参与多种

器官的发育过程，如眼、后脑基底神经节、肾脏等^[7]。在生殖方面，有研究指出胚胎暴露于RA环境会导致人类、啮齿类、禽类等后代出现泌尿生殖系统的严重畸形^[8]。同时也有研究表明，低剂量RA受体拮抗剂具有避孕功效，可引起RA通路异常，影响精子的正常发生，继而导致男性不育^[9]。PCM暴露可致雄性小鼠生殖器官损伤^[10]，但其与RA信号通路是否有关尚不清楚。青春期是哺乳动物生殖器官发育的关键时期，本研究旨在检测RA信号通路相关基因在PCM致青春期小鼠睾丸损伤中的表达特征，初步探索该信号通路与雄性生殖损伤的关系。

1 对象与方法

1.1 实验动物

取64只清洁级健康雄性ICR小鼠(3周龄，体重14.5~15.3 g)进行成组设计实验研究，实验小鼠均为同品系、同窝别(编号SYXK湘2020-0012)，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。于室温20~25 °C、相对湿度40%~60%、循环光照为12 h/12 h的无特定病原

体(SPF)级饲养间中检疫7 d后进行实验。

1.2 仪器和试剂

主要仪器：显微镜及电子图像采集和成像系统(DM2000,德国Leica),台式高速冷冻离心机(KH20R,中国Kaida),多功能酶标仪(SYNERGY2型,德国BioTek),实时荧光定量PCR仪(7300型,美国Thermo Fisher),蛋白电泳仪及电转仪(PowerPoc Basic,美国BIO-RAD),化学发光成像系统(5500型,中国Tanon)。

主要试剂：PCM(美国Sigma),放射免疫沉淀法裂解缓冲液(RIPA裂解液)、二辛可宁酸(BCA)试剂盒(中国碧云天),TRIzol总RNA提取试剂盒(美国Invitrogen),逆转录试剂盒(美国Promega),SYBR Green荧光定量检测试剂盒、荧光定量PCR(qPCR)引物、电化学发光(ECL)试剂盒(美国Thermo Fisher),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、ALDH2抗体、CYP26A1抗体和CASP9抗体(英国Abcam),其余实验用试剂均为国产分析纯。

1.3 动物分组及处理

用随机数字表将64只小鼠分为4组,每组16只。根据联合国粮农组织和世界卫生组织农药残留联席会议报告中人体未观察到不良反应的PCM剂量($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[11],同等标准换算为小鼠染毒剂量^[12]。参照Ostby等^[13]的方法,将PCM悬浮于纯大豆油中获得PCM溶液,临用现配,灌胃体积根据小鼠体重变化而调整,1次·d⁻¹,连续灌胃21 d。4组PCM剂量如下:对照组为0 mg·kg⁻¹·d⁻¹(纯大豆油),低、中、高剂量染毒组分别为50、100、200 mg·kg⁻¹·d⁻¹。实验期间,每日观察各组小鼠摄食情况及精神状况。动物操作及处理均遵循湖南师范大学和国家有关动物实验的相关规定,本实验方案通过湖南师范大学医学院伦理委员会审查并备案(编号:2021292)。

1.4 血液标本及睾丸组织的采集

干预结束后继续饲养7 d,乙醚麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠。观察动物整体外观,称其体重并用游标卡尺测量肛门和生殖器距离(测量3次,取平均值),而后迅速从腹主动脉取血液标本备用,每只小鼠取1份血液标本(约1 mL),每组16份,共64份。再立即剖取睾丸称其质量并测量其容积,迅速将一侧睾丸放入-80 °C冰箱冻存,用于后续检测相关基因和蛋白表达;另一侧则置于4%多聚甲醛固定液中,用于制作病理切片。

1.5 指标检测方法

1.5.1 睾丸组织脏器系数的计算 计算睾丸组织脏器

系数,计算公式为:睾丸脏器系数=[睾丸质量(湿重)/体重]×100%。

1.5.2 睾丸容积的计算采用椭球体体积的计算方法,用游标卡尺测量睾丸x、y和z轴的半径a、b和c,计算公式为:睾丸容积=4πabc/3。

1.5.3 血清睾酮水平的检测将上述血液标本离心后(转速3000 r·min⁻¹,离心半径160 mm,离心时间10 min),取上清液置于1.5 mL离心管中,参照雄激素酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书定量检测血清睾酮水平。

1.5.4 组织病理学检测参照相关文献[14],将上述每组8只小鼠固定后的睾丸组织,经取材修块,常规脱水,石蜡包埋,而后制成厚度为4~5 μm切片,将其HE染色后封片,采用光学显微镜观察各组小鼠睾丸组织的病理特征,并用电子图像采集系统、成像系统拍摄并处理切片图。

1.5.5 总RNA提取及定量PCR检测随机将每组冻存于-80 °C的睾丸组织取出8个,于冰上迅速剪碎,置于含1 mL TRIzol的离心管中,4 °C下进行匀浆,按试剂盒说明书提取样品总RNA。将组织中提取的RNA溶于无RNA酶水中,取1 μg经逆转录后合成cDNA,反应体系及条件具体参照说明书操作。获得cDNA后即进行扩增反应,反应体系具体如下:SYBR Green,2.5 μL;cDNA,0.5 μL;正向引物,0.3 μL;反向引物,0.3 μL;无RNA酶水,6.4 μL。反应条件设定依次如下:95 °C反应10 min,95 °C反应15 s,60 °C反应1 min,循环40次。引物序列详见表1。目的基因相对于内参基因含量计算公式为: $Y=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ^[15]。

表1 引物序列表

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Rbp1	GCCTGTAAATGGCCCTTCCT	AGTTGAAAACCGCTCTCCT
Stra6	TTCGGCAGGGCACCAA	CAAAGTGGCCCAAGATAACA
Aldh2	GCCATCGCATCCCATGA	CCTCCGGAGCCTGTGA
Aldh1a1	CCGTATGACCAGGTGCTT	CAACTAGTCCTCTCACAAATGAG
Aldh1a3	ACCGGAGAGTGCAGAACCA	CCGGCTGTCCGTTTCC
Rara	TACTGCCGCTGCAGAAAT	CGTTTCGCACCGACTCCTT
Rarβ	AGCATCAGCGCAGAGGT	CATTGATCCAGGAATTCCATT
Rxra	GCCGGCCTCTGACTGTGA	GCACCACAATGTCCCAGTG
Rxrβ	CAAGTGTCTGGAGCACCTGTT	CCATGAGGAAGGTGCAATGG
Cyp26a1	CTCCACCTGCACGATTCT	CGGCTGAAGGCCTGCAT
Cyp26b1	GATGGAACCCCTGGAGTTGATCTT	TTGCATGATCAAGGATGTGCTT
Casp9	TGCCCTCCCTGTCTTAAA	AAGCAAAGAGTAGAGGAAACCAAGAAA
Casp12	GCCAGGAGGACACATGAAAGA	CATGTCCTTGCCAAACCTT
Gapdh	TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAC	GGGATAGGGCCTCTTGCT

1.5.6 Western blotting检测关键蛋白表达差异 将剩

余的每组 8 个睾丸分别置于 RIPA 裂解液, 4 °C 下匀浆取上清液(总蛋白液), 采用 BCA 法进行蛋白定量^[16], 最后加入 0.1% 苯甲基磺酰氟(PMSF)并冻存。随后在蛋白质中加入上样缓冲液进行变性反应, 变性电泳分离采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶(10%), 上样量均为 10 μg·孔⁻¹。电泳参数: 浓缩胶 80 V, 30 min; 分离胶 100 V, 90 min; 转聚偏氟乙烯(PVDF)膜 100 V, 120 min。转膜成功后浸入脱脂牛奶(5%)中持续封闭 120 min, PVDF 膜分别用 ALDH2、CYP26A1、CASP9、GAPDH 一抗 4 °C 过夜孵育(一抗稀释比分别为 anti-ALDH2 单克隆抗体 1:3000、anti-CYP26A1 多克隆抗体 1:3000、anti-CASP9 单克隆抗体 1:2000、GAPDH 单克隆抗体 1:1000); 1×含 0.05% Tween20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)洗涤 3 次, 时长均为 10 min。加入被 TBST 稀释的二抗(1:8000), 二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记, 室温下用摇床继续孵育 60 min; 1×TBST 洗涤 3 次, 每次时长 10 min。

表 2 PCM 染毒后各组雄鼠体重、睾丸表型、血清睾酮的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of body weight, testicular phenotype, and serum testosterone of male mice in each group after PCM exposure ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 (0 mg·kg ⁻¹)	低剂量染毒组 (50 mg·kg ⁻¹)	中剂量染毒组 (100 mg·kg ⁻¹)	高剂量染毒组 (200 mg·kg ⁻¹)	F	P
体重/g	35.93±1.99	34.91±1.89	34.88±1.75	32.94±1.37 [*]	8.62	0.000
肛门和生殖器距离/mm	9.50±1.08	9.63±0.76	10.13±0.36	9.75±0.48	2.24	0.092
睾丸质量/g	0.28±0.08	0.27±0.04	0.26±0.04	0.24±0.04	1.67	0.184
睾丸脏器系数/ $\times 10^{-3}$	7.88±0.76	7.84±0.74	7.79±0.56	7.78±0.68	0.07	0.974
睾丸容积/mm ³	219.30±34.89	212.05±20.59	211.91±41.16	198.97±26.91	1.13	0.345
血清睾酮质量浓度/(pg·mL ⁻¹)	319.05±1.92	313.77±5.32 [*]	305.31±3.47 [*]	304.80±5.28 [*]	21.22	0.000

[注] 体重、肛门和生殖器距离、睾丸质量和睾丸脏器系数n=16, 血清睾酮含量n=8。*: 与对照组相比, P < 0.05。

2.2 睾丸组织的变化

光镜下每组分别观察 8 只小鼠的睾丸切片, 对照组的病理异常率为 0%, 低、中、高剂量染毒组小鼠的病理异常率依次为 87.5%、100.0%、100.0%。对照组镜下可见: 生精小管呈椭圆形或圆形, 发育良好; 生精细胞致密, 管腔内可见大量排列紧密的精子; 低剂量染毒组小鼠曲细精管出现轻微萎缩, 精子生成减少; 中、高剂量染毒组小鼠生精小管管腔扩张, 管壁变薄, 生精上皮受到损伤, 呈自溶性改变, 精原细胞数量有所下降, 部分细胞有疑似核皱缩等现象, 支持细胞出现部分缺如; 随着 PCM 染毒剂量的增加, 各剂量染毒组小鼠生精上皮损伤程度逐渐加重, 曲细精管中精子数量明显降低。见图 1。

2.3 RA 信号通路相关基因及凋亡基因表达丰度差异

高剂量染毒组小鼠 *Rbp1*、*Stra6* mRNA 表达丰度

待处理完毕滴加 ECL 化学发光液, 化学发光凝胶成像系统采集图像。

1.6 统计学分析

用 GraphPad Prism 8.0.2 和 SPSS 20.0 软件对数据进行整理、分析, 经检验总体方差齐, 多组计量资料比较用单因素 F 分析, 各剂量染毒组与对照组两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

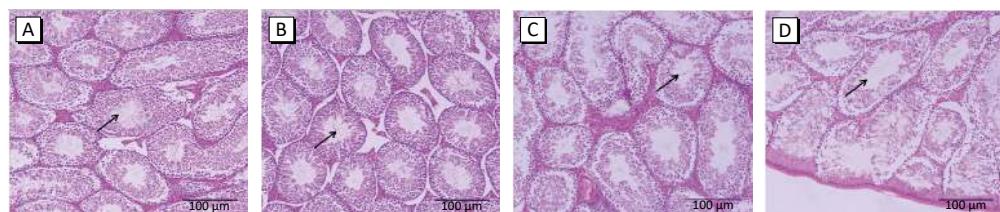
2.1 体重、睾丸表型、血清睾酮含量的变化

PCM 干预后, 对照组和各剂量染毒组小鼠的整体外观、睾丸外观均无明显改变。各组小鼠肛门和生殖器距离、睾丸质量、睾丸脏器系数、睾丸容积的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。高剂量染毒组小鼠体重、各剂量染毒组小鼠血清睾酮质量浓度低于对照组($P < 0.05$)。随着 PCM 剂量增加, 各剂量染毒组小鼠血清睾酮质量浓度有下降趋势, 见表 2。

均高于对照组(均 $P < 0.05$)、中、高剂量染毒组 *Aldh2*、*Aldh1a1*、*Aldh1a3*、RA 核受体相关基因(*Rar* 和 *Rxr*) mRNA 表达丰度高于对照组(均 $P < 0.05$), 且均随 PCM 剂量增加有上升趋势。中、高剂量染毒组小鼠 *Cyp26a1*、*Cyp26b1* mRNA 表达丰度均低于对照组(均 $P < 0.05$), 且均随 PCM 剂量增加有下降趋势。中、高剂量染毒组小鼠凋亡基因 *Casp9*、*Casp12* mRNA 表达丰度均高于对照组(均 $P < 0.05$), 且均随 PCM 剂量增加有上升趋势。见图 2。

2.4 CYP26 A1、ALDH2、CASP9 蛋白表达差异

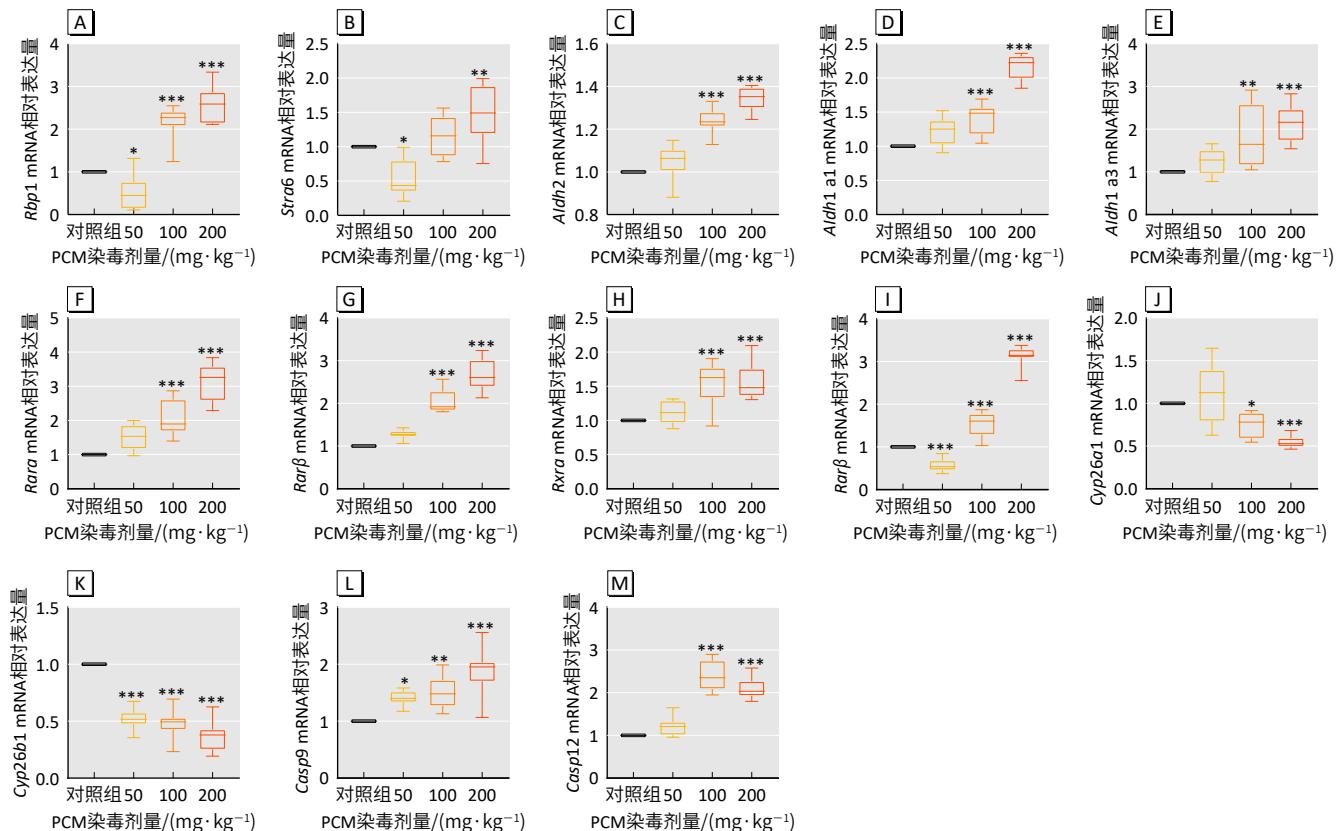
各剂量染毒组小鼠 CYP26A1 蛋白表达量均低于对照组($P < 0.05$), 且均随 PCM 剂量增加有下降趋势。中、高剂量染毒组小鼠 ALDH2 蛋白表达量和各剂量染毒组小鼠 CASP9 蛋白表达量均高于对照组($P < 0.05$), 且均随 PCM 剂量增加有上升趋势。见图 3。



[注] A: 对照组($0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)；B: 低剂量染毒组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)；C: 中剂量染毒组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)；D: 高剂量染毒组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。↗表示生精小管管腔中的精子，随着PCM染毒剂量的增加，曲细精管中精子数量明显降低。

图 1 PCM 染毒后各组雄鼠睾丸组织形态的病理改变 (HE 染色)

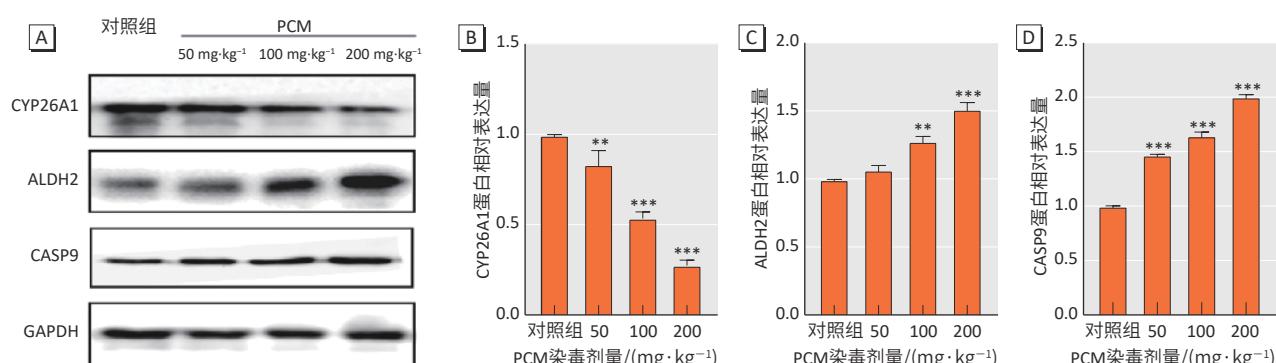
Figure 1 The effect of procymidone on morphological and pathological changes of mouse testis (HE staining)



[注] 与对照组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。A: *Rbp1*; B: *Stra6*; C: *Aldh2*; D: *Aldh1a1*; E: *Aldh1a3*; F: *Rara*; G: *Rarβ*; H: *Rxrα*; I: *Rxrβ*; J: *Cyp26a1*; K: *Cyp26b1*; L: *Casp9*; M: *Casp12*。

图 2 PCM 染毒后各组雄鼠睾丸组织 RA 信号通路相关基因及凋亡基因表达丰度的变化 ($n=8$)

Figure 2 Changes in expression abundance of genes related to the retinoic acid signaling pathway and apoptosis genes in male mice after PCM exposure ($n=8$)



[注] A 为电泳条带图, B、C、D 依次为 CYP26 A1、ALDH2、CASP9 蛋白相对灰度值统计图。与对照组相比, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

图 3 PCM 染毒后各组雄鼠睾丸组织 CYP26 A1、ALDH2、CASP9 蛋白表达差异 ($n=8$)

Figure 3 Differences in expression of CYP26 A1, ALDH2, and CASP9 protein in male mice after PCM exposure ($n=8$)

3 讨论

有研究发现,母鼠在妊娠期或哺乳期早期暴露于 PCM 可引起雄性子代生殖发育的改变,典型表现为肛门和生殖器距离缩短、永久性乳头,或部分雄激素依赖组织质量明显降低/畸形^[13]。青春期是雄性睾丸发育的关键时期,该时期睾丸对外源化学物的敏感性很高。本研究发现,PCM 各剂量染毒组小鼠血清中睾酮质量浓度下降,其原因可能是:一定浓度的 PCM 可与雄激素受体结合(*androgen receptor, AR*),并通过阻止 AR-DNA 结合来抑制雄激素依赖基因的转录,从而导致睾酮表达水平降低^[9, 13]; PCM 可能抑制睾酮合成关键酶的活性或表达^[16]。本研究结果表明,PCM 各剂量染毒组小鼠睾丸的生精小管、生精上皮、精原细胞均有特征性改变,随 PCM 染毒剂量增加,其损伤程度逐渐加重,生精小管中精子数量明显降低,与本课题组前期研究氟他胺(PCM 类似物)结果基本一致^[17]。但本研究尚未对支持细胞和睾丸间质细胞进行计数,其损伤程度与 PCM 的定量关系仍有待进一步研究。

细胞内视黄醇转变为 RA 的过程可简单归纳为两步氧化反应:维生素 A(视黄醇)在 RBP 和 STRA6 的帮助下由细胞外转运至细胞内,视黄醇首先被乙醇脱氢酶或视黄醇脱氢酶初步氧化成中间产物视黄醛,然后在视黄醛脱氢酶(*retinal dehydrogenase, ALDH*) 1A1—A3 的再次氧化作用下生成 RA。合成的 RA 当即被转运至细胞核,并通过与 RAR/RXR 二聚体中的 RARE 结合来调控下游靶基因的转录过程,而 RA 的分解代谢则由 CYP26A1—C1 参与完成。由此可知,RA 信号通路中 RBP、STRA6、ALDH 家族、RAR/RXR、CYP26A1—C1 均是影响其作用机制发挥的关键成员^[5]。本研究发现,高剂量染毒组小鼠 *Rbp1*、*Stra6* mRNA 的表达均高于对照组,中、高剂量染毒组小鼠 *Aldh2*、*Aldh1a1*、*Aldh1a3* mRNA 表达丰度呈升高趋势,中、高剂量 RA 核受体相关基因(*Rar* 和 *Rxr*)的表达也有明显升高,而 *Cyp26a1* 和 *Cyp26b1* mRNA 表达水平降低。Western blotting 结果显示,各剂量染毒组小鼠 CYP26A1 蛋白表达量均低于对照组,各剂量染毒组小鼠 CASP9 蛋白表达量和中、高剂量染毒组小鼠 ALDH2 蛋白表达量均高于对照组,其表达特征总体与基因表达一致。提示在 PCM 的作用下,可能睾丸中有 RA 合成,同时 RA 的代谢受到抑制。此外由于 RA 受体表达也增加,表明在 PCM 的作用下,RA 信号通路被激活,RA 核受体与 RA 结合后形成二聚体,该二聚体通过与靶基因 RARE 结合,以此调节基因的转录表达。RA 合成增加后可能调控了中、高

剂量 PCM 染毒组凋亡基因 *Casp9*、*Casp12* 的表达升高,从而导致睾丸损伤明显。

综上,睾丸组织在 PCM 影响下可能有 RA 合成和代谢抑制现象,PCM 可损伤青春期小鼠睾丸组织,其 RA 信号通路、凋亡基因 *Casp9*、*Casp12* 和 CASP9 蛋白被激活。本研究还存在以下不足:研究动物限定为青春期小鼠,其他时期(成年期、中老年期等)小鼠是否会产类似实验效应,尚无法得知;本研究仅探索了 RA 信号通路在 PCM 致青春期小鼠睾丸损伤中的表达,后续将进行 RA 通路中关键基因的敲除或敲低,以明确其在睾丸损伤过程中的作用机制。

参考文献

- [1] TARUI H, TOMIGAHARA Y, NAGAHORI H, et al. Species differences in the developmental toxicity of procymidone-Placental transfer of procymidone in pregnant rats, rabbits, and monkeys[J]. *J Pestic Sci*, 2018, 43(2): 79-87.
- [2] 黄一. 分子印迹荧光传感器的设计合成及其对腐霉利的检测[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [3] HUANG Y. Design and synthesis of molecularly imprinted fluorescence sensors and detection of procymidone[D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [4] EFSA (European Food Safety Authority). Reasoned opinion of EFSA MRLs of concern for the active substance procymidone, taking into account revised toxicological reference values Prepared by the Pesticides Unit (PRAPeR)[J]. *EFSA Sci Rep*, 2009, 227: 1-26.
- [5] PIERSMA AH, HESSEL EV, STAAL YC. Retinoic acid in developmental toxicology: teratogen, morphogen and biomarker[J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 72: 53-61.
- [6] YANG Y, WANG H, MA Z, et al. Understanding the role of mammalian sterile 20-like kinase 1 (MST1) in cardiovascular disorders[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 141-149.
- [7] GHYSELINCK NB. Retinoic acid signaling pathways[J]. *Development*, 2019, 146(13): dev167502.
- [8] DORKO F, SPAKOVSKÁ T, LOVASOVÁ K, et al. NADPH-d activity in rat thymus after the application of retinoid acid[J]. *Eur J Histochem*, 2012, 56(1): e7.
- [9] VANDERSEA MW, FLEMING P, MCCARTHY RA, et al. Fin duplications and deletions induced by disruption of retinoic acid signaling[J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 208(2): 61-68.
- [10] KEMPPAINEN JA, LANE MV, SAR M, et al. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and anti-hormones[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(2): 968-974.
- [11] SCHOLZE M, TAXVIG C, KORTENKAMP A, et al. Quantitative *in Vitro* to *in Vivo* extrapolation (QIVIVE) for predicting reduced anogenital distance produced by anti-androgenic pesticides in a rodent model for male reproductive disorders[J]. *Environ Health Perspect*, 2020, 128(11): 117005.
- [12] World Health Organization, FAO. Pesticide Residues in Food 2007[R]. Geneva: WHO, 2007.
- [13] WANG Y, JIN C, WANG D, et al. Effects of chlorothalonil, prochloraz and the combination on intestinal barrier function and glucolipid metabolism

- in the liver of mice [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 410: 124639.
- [13] OSTBY J, KELCE W R, LAMBRIGHT C, et al. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Ind Health*, 1999, 15(1/2): 80-93.
- [14] SINGH AK, NASKAR S, SAIKIA B, et al. Effect of testicular tissue lysate on developmental competence of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro* [J]. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(2): 183-188.
- [15] DI RENZO L, CIOCCOLONI G, BERNARDINI S, et al. A hazelnut-enriched diet modulates oxidative stress and inflammation gene expression without weight gain [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4683723.
- [16] HOSOKAWA S, MURAKAMI M, INEYAMA M, et al. The affinity of procymidone to androgen receptor in rats and mice [J]. *J Toxicol Sci*, 1993, 18(2): 83-93.
- [17] 文可欣, 周小青, 杨谨如, 等. 孕期氟他胺暴露对雄性子代小鼠生殖器官发育和氧化应激反应的影响 [J]. 卫生研究, 2018, 47(6): 974-978.
- WEN XK, ZHOU XQ, YANG JR, et al. Effect of flutamide exposed during pregnancy on reproductive organs development and oxidative stress response in male mice offspring [J]. *J Hyg Res*, 2018, 47(6): 974-978.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)

· 告知栏 ·

喜讯:《环境与职业医学》被 EBSCO 数据库收录

2021 年 7 月 20 日,《环境与职业医学》编辑部接到美国 EBSCO 信息服务部通知,本刊已正式被 EBSCO 数据库收录。

EBSCO 数据库是目前世界上最大的多学科学术期刊数据库和综合性商业资源全文数据库,已经被多个科研机构和高校图书馆订购使用,全球 83.3% 的高校图书馆均将 EBSCOhost 列为首选的电子文献检索。现已开发 400 多个在线文献数据库,满足各类型机构的信息需求已达 70 余年,收录全球各种期刊逾 26 万种,全球 11 万 5 千多家机构选用 EBSCO 的产品与服务,每天在 EBSCO 平台上进行的检索达一亿七千五百万次。

《环境与职业医学》由上海市疾病预防控制中心主办,主要着眼于发表环境因素(自然、社会)、职业因素与人群健康的流行病学、毒理学内容的重要研究,以刊登中文文献为主(含英文摘要),月刊。所有被录用的稿件均经过同行专家评议。目前保持 CSCD(核心库)、北大核心、科技核心全收录。杂志主页: www.jeom.org。

作为中文期刊,《环境与职业医学》提供 700 字左右英文长摘要。被 EBSCO 文献数据库收录,意味着本刊在论文编写格式和数据处理的标准化和规范化要求与国际文献接轨,促进了本刊发表论文的国际化传播力度,可进一步提高作者及其工作单位在国内外的学术地位。

特别感谢支持《环境与职业医学》的各位专家、作者及读者,我们将不忘初心、砥砺前行!

《环境与职业医学》编辑部

2022 年 2 月 25 日