

网络出版时间: 2017-5-20 11:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170520.1113.015.html>

◇预防医学研究◇

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对小鼠精母细胞 JAZF1 mRNA 及孤核受体 TR4 蛋白表达的影响

赵晶¹, 郭星², 吴佳姿¹, 黄松莲¹, 袁野¹, 成神洲¹, 付国庆¹, 石玉琴¹

摘要 目的 研究邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)对小鼠精母(GC-2 spd)细胞 JAZF1 mRNA 及 TR4 蛋白表达的影响。方法 将 GC-2 spd 细胞置于含终浓度为 0(溶剂对照)、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 的培养液培养 24 h。采用 Real-time PCR 方法检测细胞 JAZF1 mRNA 的相对表达水平,采用 Western blot 检测 TR4 蛋白表达水平。结果 与对照组比较,50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 染毒组 GC-2 spd 细胞的 JAZF1 mRNA 表达升高,而 200 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 染毒组 GC-2 spd 细胞的 TR4 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 DEHP 对生精细胞具有生殖毒性作用,可能通过 JAZF1 调控孤核受体 TR4 的表达从而影响雄性生殖功能。

关键词 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯; 小鼠精母细胞; JAZF1; 孤核受体 TR4

中图分类号 R 1; R 12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0847-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.015

邻苯二甲酸酯类(phthalate esters, PAEs)亦称钛酸酯,属于邻苯二甲酸所形成的酯。PAEs 在使用的过程中,不但能够不断地迁移到外界环境中,从而污染大气、水域和土壤等,而且还可以通过食物链在生物体内富集^[1]。PAEs 容易从产品中释放进入到周围环境中,造成了空气、土壤、水甚至是食物的污染,被认为是一种全球性污染物^[2]。有研究报道^[3], PAEs 可能是作为生产原料中的杂质或生产过程中的污染物而进入化妆品中增加了人群接触 PAEs 机会,引起了相关部门的注意。而邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-2-ethylhexylphthalate, DEHP)是 PAEs 中最常用的一种增塑剂,每年利用率约占 PAEs 生

产总量的 50%^[4]。有研究^[5]表明,DEHP 可以导致男性睾丸发育不良、精子质量和数量的下降等,也可引起睾丸癌和前列腺癌,进一步表明其具有明显的抗雄激素活性。通过动物实验^[6]已经表明,DEHP 能够严重影响精子的发生过程以及睾丸生精上皮细胞的形成,并且还可引起雄性仔鼠睾丸和附睾发生不同程度的萎缩。锌是睾丸维持正常生理作用必需的阳离子,对维持男/雄性生殖功能起着非常重要的作用。锌指蛋白 JAZF1(Juxtaposed with another zinc finger protein 1, 又称 TIP27 或 ZNF802)可调控孤核受体 TR4(Testicular orphan receptor 4, 又称 TAK1 或 NR2C2)的转录活性,而 TR4 可以影响男/雄性生殖功能。该研究以小鼠精母细胞(GC-2 spd 细胞)为研究对象,研究 GC-2 spd 细胞在 DEHP 的暴露下对其 JAZF1 mRNA 和 TR4 蛋白表达的影响,进行 DEHP 对男/雄性生殖功能影响的作用机制的初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司); XDS-48 倒置显微镜(重庆水电仪器总公司); SW-CJ-4FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); MCO-45AC CO₂ 恒温培养箱(日本 SANYO 公司); 台式高速冷冻离心机 Neofuge 15R(北京 Heal Force 公司)。

1.2 主要试剂 DEHP 母液(浓度 $\geq 99.0\%$)、胰蛋白酶(美国 Amresco 公司); RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司); 引物(武汉酷基因有限公司); PCR 试剂盒(美国 Thermo scientific 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

配制 DEHP 溶液: 用天平称取 DEHP 后,用 DMSO 溶解,配成终浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEHP 溶液。

1.3 细胞培养与染毒 GC-2 spd 细胞由南京医科大学馈赠。取出已经冻存好的细胞进行复苏后置于

2017-02-20 接收

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究计划重点项目(编号: D20161101)

作者单位:¹ 武汉科技大学医学院公共卫生学院, 武汉 430065² 洛阳市妇女儿童医疗保健中心, 洛阳 471000

作者简介: 赵晶, 女, 硕士研究生;

石玉琴, 男, 副教授, 责任作者, E-mail: shiyuqin@wust.edu.cn

37 ℃、5%的 CO₂ 培养箱内培养,观察细胞形态,待细胞处于对数生长期时方可传代;用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将传代细胞调整密度至 1 × 10⁵/ml 后接种于 6 孔培养板中,继续进行细胞培养。当细胞形态良好时,进行细胞染毒。将 6 孔培养板中的细胞拿出,将培养液换成不同浓度的 DEHP 培养液,每个浓度设置 3 个平行,然后继续在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内进行培养。

1.4 用 Real-time PCR 法检测细胞 JAZF1 mRNA 的表达

1.4.1 总 RNA 提取 细胞染毒终止后,拿出细胞并弃培养液后用 PBS 洗脱细胞瓶壁,去除多余细胞,用 TRIzol 来提取细胞总 RNA。首先测定吸光度 (absorbance, A) 值,筛选 A 值较好的 RNA (A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.6 ~ 2.0) 用来进行下一步的逆转录过程。

1.4.2 逆转录 使用美国 Thermo Fermentas 公司的 ReverAid 合成试剂盒进行逆转录。以 Oligo (dT)₁₅ 为引物,取总 RNA 样品 2 μg,用 M-MuLV 逆转录酶,振荡后离心,最后在 PCR 仪上进行逆转录,最终得到 cDNA。

1.4.3 引物的设计与合成 目的基因的引物由武汉酷基因有限公司合成 JAZF1 mRNA 扩增引物 (171 bp) 序列:上游:5'-ACGCCGAGAACAGGAATC-3',下游:5'-GTGCTGCTGCGGAATGAA-3'; β-actin mRNA 扩增引物 (287 bp) 序列:上游:5'-GTGACGT-TGACATCCGTAAAGA-3',下游:5'-GTAACAGTC-CGCCTAGAAGCAC-3'。

1.4.4 PCR 扩增 在 PCR 板中加入相应反应体系的试剂:反转录产物 2.5 μl,Green PCR Mix 12.5 μl,各 2.0 μl 的上、下游引物 (7.5 μmol/L),纯水 8.0 μl,总反应体积 25 μl。以上操作均在冰上操作。反应条件的设置:95 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 45 s 程序扩增循环 40 次。

1.5 Western blot 测定 TR4 蛋白的表达 用 0.25% 的胰蛋白酶消化并收集细胞,然后离心 (1 000 r/min 5 min 23 ℃) 吸除上清液,用 PBS 液清洗细胞 2 次。加入 80 μl IP 细胞裂解液、100 mmol/L 的 PMSF 溶液 20 μl 后振荡混匀,置于冰上 1 h;最后离心,收集上清液。用 BCA 测定蛋白浓度。PAGE 时,采用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 Western blot 法检测。电泳条件:分离胶 120 V,浓缩胶 75 V,在 300 mA 恒流下转膜 30 min。加入适量浓度为 5% 的脱脂牛奶封闭液。再加入一抗

(1 : 1 000 稀释) 4 ℃ 孵育过夜。次日取出滤膜,用 TBST 漂洗 3 次后加入二抗 (1 : 3 000 稀释) 孵育 1 h;最后将发光工作液加入到硝酸纤维素膜上使之与膜反应 5 min,拿到暗室中曝光。待曝光完成后进行扫描拍照,用凝胶图像处理系统分析目标条带的光密度值。

1.6 统计学处理 实验数据均采用 SPSS 22.0 软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。用方差齐性检验和单因素分析 (One Way ANOVA) 方法进行多组间比较。当进行组间两两比较时,若方差齐,则采用 SNK-q 检验方法;若方差不齐时,则采用 Games-Howell 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEHP 体外染毒对 GC-2 spd 细胞 JAZF1 mRNA 表达水平的影响 对照组以及 50、100、200 μmol/L DEHP 染毒组细胞 JAZF1 mRNA 表达水平分别为 (1.00 ± 0.00)、(3.13 ± 0.52)、(4.23 ± 0.72) 和 (5.84 ± 1.99),呈剂量 - 反应关系。DEHP 各染毒组与对照组比较, JAZF1 mRNA 表达水平组间差异有统计学意义 ($F = 10.48, P = 0.004$)。

2.2 DEHP 体外染毒导致 GC-2 spd 细胞 TR4 蛋白表达水平的影响 对照组以及 50、100、200 μmol/L DEHP 染毒组细胞 TR4 蛋白表达水平分别为 (0.44 ± 0.07)、(0.42 ± 0.03)、(0.33 ± 0.77) 和 (0.28 ± 0.08)。与对照组比较,仅 200 μmol/L DEHP 染毒组细胞 TR4 蛋白表达水平显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

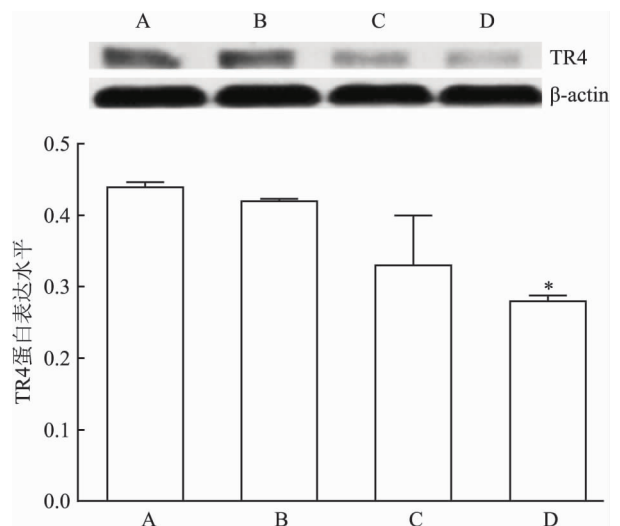


图 1 DEHP 对 GC-2 spd 细胞 TR4 蛋白表达水平的影响 A:对照组;B:50 μmol/L DEHP 染毒组;C:100 μmol/L DEHP 染毒组;D:200 μmol/L DEHP 染毒组;与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

DEHP 会造成雄性生殖系统不同阶段不同程度的损伤,严重影响精子的发生过程以及睾丸生精上皮细胞的形成^[6]。

锌是睾丸维持正常生理作用必需的阳离子,对维持男/雄性生殖功能起着非常重要的作用。缺锌会使性激素分泌减少,进而导致性功能不全、睾丸缩小、精子数目减少和精子活力下降等生殖功能障碍。从断乳期到性成熟期用 DEHP 染毒大鼠,睾丸中锌的含量明显比对照组低^[7]。孕期大鼠染毒 DEHP,胚胎中锌的含量显著下降^[8]。锌主要以锌指蛋白的方式调控着机体的生命活动。在没有锌或有螯合剂形成时,锌指序列不能正常形成。其还影响着锌指蛋白的转录和表达,如锌缺乏可以导致锌指蛋白 p561ck mRNA 和蛋白表达明显升高。JAZF1 是一个具有 3 个 C₂H₂ 型锌指结构的锌指核蛋白,其功能主要是作为一种转录阻碍物。在小鼠体内,几乎所有组织均表达 JAZF1,但主要在脂肪组织和睾丸中高表达。本研究中,GC-2 spd 细胞 JAZF1 mRNA 表达升高,说明 DEHP 可能通过影响 GC-2 spd 细胞中锌的代谢从而调节锌指蛋白 JAZF1 mRNA 的表达。

激光共聚焦显示,细胞中 JAZF1 和 TR4 共定位 (Colocalize) 于细胞核。哺乳动物酵母双杂交实验^[9]结果表明,JAZF1 特异性与孤核受体 TR4 相互作用。作为 TR4 选择性的辅阻遏物,在调节 TR4 下游的基因转录中起着非常重要的作用。

孤核受体 TR4 是一类没有配体或者尚未发现配体的核受体,主要表达于脑、脾、睾丸和造血细胞中。由于其高表达于初级精母细胞的粗线期,低表达于圆形精子细胞中,所以在精子发生的减数分裂前期和分裂期均扮演着重要角色^[10]。TR4^{-/-}小鼠生育能力和精子数量的明显下降而且有些初级精母细胞的退化和曲细精管的坏死最终导致了精子减数分裂前期和分裂期的延长和阻断以及一些异常生精细胞的出现。在 TR4^{-/-}小鼠减数分裂前期,sperm1 和 cyclin A1 表达明显下降^[11],表明 TR4 通过诱导 sperm 1 和 cyclin A1 的表达而在精子发生中发挥重要作用。sperm 1 是一个 DNA 结合蛋白,由 POU 结构域基因家族编码,瞬间表达于生精细胞第一次减数分裂前期,参与生精细胞的分化。sperm 1^(-/-)小鼠与野生型和杂合型小鼠比较,生育能力明显下降^[12]。cyclin A1 主要在睾丸和一些白血病细胞中表达,调节细胞周期的 S 和 G₂ 期,参与减数分裂和

早期的胚胎发育,是普遍存在于真核细胞中的细胞周期蛋白,其与细胞周期蛋白依赖性激酶结合后调节了酶活性,最后帮助推动并协调细胞周期的进行。cyclin A1 仅在第一次减数分裂前的精原细胞和正处于第一次减数分裂的精母细胞中表达。围产期母鼠暴露于 DEHP 可影响仔代雄鼠睾丸中 cyclin A1 和雄激素受体等表达^[13]。本实验 GC-2 spd 细胞 TR4 蛋白表达降低,说明 DEHP 可能诱导小鼠生精细胞锌代谢紊乱,从而调节锌指蛋白 JAZF1 的表达,JAZF1 通过调控 TR4 的转录活性影响 sperm 1 和 cyclin A1 等表达,最终影响男/雄性生殖功能,但具体机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Singh S, Li S S. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8):10143-53.
- [2] Chao K P, Huang C S, Wei C Y. Health risk assessments of DEHP released from chemical protective gloves [J]. *J Hazard Mater*, 2015, 283:53-9.
- [3] 王力强,李荔群,吴岷,等.化妆品中酞酸酯物质测定及女性人群暴露评估[J].*中国公共卫生*,2014,30(4):478-81.
- [4] 王立鑫,杨旭.邻苯二甲酸酯毒性及健康效应研究进展[J].*环境与健康杂志*,2010,27(3):276-81.
- [5] Li Y F, Pan C, Hu J X, et al. Effects of cypermethrin on male reproductive system in adult rats [J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(3):201-8.
- [6] 张学红,张瑞,李兰英,等.邻苯二甲酸酯对雄性生殖系统的影响[J].*癌变·畸变·突变*,2013,25(4):324-6.
- [7] Tomonari Y, Kurata Y, David R M, et al. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on genital organs from juvenile common marmosets: I. Morphological and biochemical investigation in 65-week toxicity study [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2006, 69(17):1651-72.
- [8] Peters J M, Taubeneck M W, Keen C L, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha [J]. *Teratology*, 1997, 56(5):311-6.
- [9] Jang W Y, Bae K B, Kim S H, et al. Overexpression of Jazf1 reduces body weight gain and regulates lipid metabolism in high fat diet [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(3):296-301.
- [10] 晏丕军,张志红,徐勇,等.孤儿核受体 TAK1 的研究进展[J].*辽宁医学杂志*,2014,(5):269-72.
- [11] Mu X, Lee Y F, Liu N C, et al. Targeted inactivation of testicular nuclear orphan receptor 4 delays and disrupts late meiotic prophase and subsequent meiotic divisions of spermatogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(13):5887-99.

(下转第 854 页)

ISSR analysis on genetic diversity of *Oxalis*

Wu Linjing^{1,2}, Feng Hua³, Du Qiang⁴, et al

(¹The High Educational Key Laboratory of Natural Medicinal Pharmacology and Drugability Guizhou

Medical University, Guiyang 550025; ²Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002;

³Zunyi Institute for Drug Control, Zunyi 563000; ⁴GuiZhou Institute of Aquaculture Science, Guiyang 550025)

Abstract Objective To study the genetic diversity of germplasm resources of *Oxalis corniculata*, and to provide molecular basis for reference of *Oxalis corniculata* by assessing genetic differentiation and selecting of excellent germplasm resources. **Methods** The genetic diversity with 36 samples of 18 populations of *Oxalis corniculata* and 4 samples of 2 populations of *Oxalis corymbosa* was analyzed by ISSR molecular marker technique. **Results** 10 primers were selected from 59 ISSR primers which amplified 89 DNA bands, and 78 bands among them were polymorphic which the percentage of polymorphic bands was 87.64%, the average DNA bands amplified by each primer were 8.9 bands. The average number of effective allele was 1.388 8 of 40 samples, the Nei's gene diversity and Shannon's information index were 0.349 3 and 0.225 2 by POPGENE1.32 and NTSYS-pc software. These 40 samples were clustered into 4 groups at the genetic similarity coefficient 0.655 8 by UPGMA. **Conclusion** The genetic diversity in 40 samples of *Oxalis corniculata* collected in this paper is rich and there were significant differences in genetic diversity of ISSR between *Oxalis corniculata* and *Oxalis corymbosa*.

Key words *Oxalis corniculata* L.; ISSR; genetic diversity

(上接第 849 页)

[12] Pearse R V 2nd, Drolet D W, Kalla K A, et al. Reduced fertility in mice deficient for the POU protein spermi-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7555-60.

[13] Xi W, Wan H T, Zhao Y G, et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di-(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2011, 19(7): 2515-27.

Effect of DEHP on the expression of JAZF1 mRNA and TR4 protein in mouse spermatocyte (GC-2spd) cells

Zhao Jing¹, Guo Xing², Wu Jiazi¹, et al

(¹School of Public Health, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065;

²Women and Children Health Care Center of Luoyang, Luoyang 471000)

Abstract Objective To study the effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the expression of JAZF1 mRNA and TR4 protein in GC-2spd cells. **Methods** GC-2spd cells were exposed to the DEHP medium with the final concentrations of 0, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$, respectively and then cultured for 24 h. Real-time PCR was used to measure mRNA expression and Western blot was used to detect protein expression. **Results** Compared with the control group, the mRNA expression levels of JAZF1 in 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ DEHP groups were increased and the protein expression of TR4 in 200 $\mu\text{mol/L}$ DEHP group was decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** DEHP has reproductive toxic effects on spermatogenic cells, which may regulate the expression of TR4 by the JAZF1 and thus affect the male reproductive function.

Key words di-2-ethylhexyl phthalate; GC-2 spd cells; JAZF1; testicular orphan receptor 4