

B(a)P暴露干扰细胞周期调控蛋白影响孕早期小鼠卵巢黄体功能

李南燕 徐翰婷 杨节 穆欣艺 高茹菲 李方方 王应雄 陈雪梅*

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室,
重庆医科大学生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

摘要 该研究旨在探讨苯并(a)芘[Benzo(a)pyrene, B(a)P]对孕早期小鼠卵巢黄体功能的影响及机制。体内模型: 将昆明小鼠每晚按雌雄3:1的比例合笼, 次晨查得阴栓记为孕第1天(d1); 将其随机分为对照组和B(a)P处理组, 每日早晨称重后以0.1 mL/10 g动物体质量灌胃给予0.2 mg/(kg·d)的B(a)P, 对照组灌胃等体积的玉米油, 收取d4、d7小鼠卵巢组织。体外模型: 培养小鼠卵巢颗粒细胞KK-1, 将其分为对照组(0.1% DMSO)、HCG组(1.0 IU/mL HCG)、HCG+BPDE(1.0 IU/mL HCG和0.5 μmol/L BPDE)联合处理组, 处理细胞24 h后进行后续检测。ELISA检测小鼠血清雌激素(E2)、孕激素(P4)水平; qRT-PCR检测体内外卵巢雌、孕激素合成限速酶 β -HSD、 17β -HSD和P450SCC的mRNA水平; 免疫组化检测卵巢组织切片中Ki67、PCNA的表达, CCK-8检测KK-1细胞增殖情况; Western blot、免疫组化和免疫荧光检测周期相关蛋白CyclinA1、CDK2、CDK4、CyclinB1以及GAS1的表达情况。透射电镜和Mitotracker探针观察线粒体形态。与对照组相比, B(a)P暴露导致孕早期小鼠血清中E2、P4水平明显降低; 同时, 卵巢雌、孕激素合成限速酶 β -HSD、 17β -HSD和P450SCC mRNA水平下调; CCK-8结果显示, BPDE暴露导致细胞活力下降; 体内B(a)P暴露导致卵巢黄体中Ki67、PCNA表达下调; Western blot、免疫组化和免疫荧光结果显示, B(a)P或BPDE暴露下调细胞周期相关因子CyclinA1、CDK2、CDK4、CyclinB1及GAS1水平; 电镜和免疫荧光结果显示, BPDE暴露导致线粒体形态异常。B(a)P及其代谢物BPDE干扰细胞周期调控, 影响线粒体功能, 进而导致孕早期小鼠卵巢黄体功能异常。

关键词 苯并(a)芘; 卵巢; 细胞周期; 线粒体; GAS1

Exposure to Benzo(a)pyrene in Early Pregnant Mice Impairs Ovarian Corpus Luteum Function by Interfering with Cell Cycle Regulation Proteins

LI Nanyan, XU Hanting, YANG Jie, MU Xinyi, GAO Rufe, LI Fangfang, WANG Yingxiong, CHEN Xuemei*

(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study was aimed to explore the effects and mechanism of B(a)P [Benzo(a)Pyrene] on the function of ovarian corpus luteum during the early pregnancy of mice. For *in vivo* model, the female and male Kunming mice were mated to produce pregnancy at a ratio of 3:1 every night. At the next morning, the

收稿日期: 2020-10-29 接受日期: 2021-01-03

国家自然科学基金(批准号: 81573175)、重庆市科委自然科学基金(批准号: cstc2018jcyjAX0315)和重庆市教委研究生创新项目(批准号: CYS19209)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: chenxuemei@cqmu.edu.cn

Received: October 29, 2020 Accepted: January 3, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81573175), the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.cstc2018jcyjAX0315) and the Graduate Student Innovation Project of Chongqing (Grant No.CYS19209)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: chenxuemei@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5479>

female mice with vaginal copulation plugs were recorded as “pregnant day 1 (d1)”. The pregnant mice were randomly divided into control group and B(a)P-treated group. The B(a)P-treated group received 0.2 mg/(kg·d) B(a)P daily by oral gavage at 0.1 mL/10 g of body weight from d1, and the control group received corn oil. The pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation on d4 and d7, and the ovaries were collected immediately. *In vitro* model, the cultured mouse ovarian granule KK-1 cells were divided into three groups and treated with vehicle alone (control group, 0.1% DMSO), 1.0 IU/mL HCG (HCG group) and 1.0 IU/mL HCG plus 0.5 μ mol/L BPDE (HCG+BPDE group) simultaneously for 24 h. ELISA was used to detect the levels of serum estrogen and progesterone. The mRNA levels of *3 β -HSD*, *17 β -HSD* and *P450SCC* were determined by qRT-PCR. Immunohistochemistry was used to detect Ki67 and PCNA expression in ovarian tissue sections, and CCK-8 was used to detect the proliferation of KK-1 cells. Western blot, immunohistochemistry and immunofluorescence were used to measure the expression levels of CyclinA1, CDK2, CDK4, CyclinB1 and GAS1. The morphology of mitochondria was observed by transmission electron microscope and Mitotracker probe. B(a)P decreased the levels of serum estrogen and progesterone compared with the control group. The mRNA levels of *3 β -HSD*, *17 β -HSD* and *P450SCC* were down-regulated by B(a)P. The cell activity was weakened after BPDE exposure *in vitro*. B(a)P exposure resulted in the down-regulation of Ki67 and PCNA expression. B(a)P or BPDE exposure decreased the expression of CyclinA1, CDK2, CDK4, CyclinB1 and GAS1. Electron microscopy and immunofluorescence results revealed that BPDE exposure could lead to abnormal mitochondria morphology. B(a)P exposure might disturb the cell cycle and affect mitochondrial function, which led to luteal dysfunction in early pregnancy mice.

Keywords Benzo(a)pyrene; ovary; cell cycle; mitochondria; GAS1

苯并(a)芘 [Benzo(a)pyrene, B(a)P] 是多环芳烃中最具代表性的一种, 研究证实其具有致癌、致畸、致突变性和生殖毒性^[1]。孕期 B(a)P 暴露会导致女性生殖功能异常, 进而影响胎儿存活率^[2]。课题组前期研究证实, 孕早期 B(a)P 暴露会影响小鼠子宫内膜容受性的建立, 降低小鼠胚胎着床位点数目^[3], 干扰胚胎着床后的子宫内膜蜕膜化过程, 影响胚胎的发育^[4]。而孕早期卵巢雌、孕激素的合成与分泌对胚胎植入及子宫内膜基质细胞蜕膜化等过程的正常进行具有重要作用。众所周知, 卵巢是体内合成和分泌雌、孕激素的主要器官, 排卵后卵泡壁塌陷, 卵泡膜的结缔组织、毛细血管等伸入到颗粒层, 在黄体生成素作用下形成黄体 (corpus luteum), 其中黄体颗粒细胞是最主要的分泌细胞。黄体颗粒细胞的黄体化状态的维持是妊娠期卵巢持续分泌雌、孕激素的关键所在, 对于维持妊娠的正常进行至关重要^[5-6]。孕期卵巢黄体功能异常必然影响胚胎植入。已有的关于 B(a)P 的卵巢毒性方面的研究多集中于其对卵泡发育的影响^[7-8], 而对孕期卵巢黄体功能的影响鲜有报道。因此, B(a)P 通过何种途径影响孕早期卵巢黄体功能值得关注。

卵巢的颗粒细胞在卵泡发生、排卵和黄体化过

程中经历细胞周期进程的动态调节^[9-10]。黄体化过程最重要的事件就是细胞周期进程的变化, 黄体的形成、维持及退化均受到细胞周期严格调控。在黄体化开始阶段, 黄体生成素激增触发颗粒细胞退出细胞周期, 开始向黄体细胞分化, 在整个功能性黄体的维持阶段保持一个非增殖状态^[11]。在诱导黄体退化后, 类固醇生成细胞又重新进入细胞周期^[12]。细胞周期分为 DNA 合成前期 (G₁期)、DNA 合成期 (S期)、蛋白质合成 (G₂期)、分裂期 (M期), 这一过程主要受到周期因子的调控。细胞周期的 2 个主要检测点是: G₁/S、G₂/M。有研究报道, B(a)P 与细胞周期调节密切相关^[13-14]。而 B(a)P 暴露导致小鼠卵巢黄体功能异常是否与细胞周期调控因子紊乱有关尚不清楚。因此, 本研究旨在从细胞周期调控蛋白的角度探讨 B(a)P 对小鼠卵巢颗粒细胞黄体功能的影响及可能的机制。本研究结果将为深入探讨 B(a)P 影响胚胎着床的机制及更加全面地了解 B(a)P 的雌性生殖毒性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

B(a)P、玉米油、BPDE、 β -actin 抗体、CyclinA1

抗体均购自Sigma-Aldrich公司;人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)购自Millipore公司;DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自天津康源生物技术有限公司;青霉素、链霉素、CCK-8(cell counting kit-8)、CDK1抗体、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;CyclinB1、CDK2、CDK4、PCNA、Ki67、磷酸化组蛋白H3(phospho-histone H3, pHH3)等抗体均购自CST公司;生长抑制特异性蛋白1(growth arrest specific 1, GAS1)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;HRP标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;雌激素、孕酮ELISA检测试剂盒均购自上海研辉生物科技有限公司;3 β -HSD、17 β -HSD、P450SCC、GAS1引物均购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 动物实验与材料收集 本实验选用SPF级雌雄昆明小鼠(6~8周龄, 25~30 g), 购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可号:SCXK(渝)2007-0002, 实验动物使用许可号:SCXK(渝)2007-0001]。小鼠饲养于(22 \pm 2) °C、(55 \pm 10)%相对湿度, 自由饮水和进食。所有动物实验均获得重庆医科大学伦理委员会审查批准。

取昆明小鼠, 每日17:00按照雌雄3:1的比例将小鼠合笼交配, 第2天早晨8:00查得阴栓记为妊娠第1天(d1), 计算妊娠天数。将孕鼠随机分为对照组和B(a)P组, 每组共收取25只小鼠。从d1起, 每日称重小鼠体质量, 根据小鼠体质量0.1 mL/10 g灌胃给予0.2 mg/(kg·d)浓度的B(a)P, 对照组给予玉米油。孕鼠分别于d4、d7脱颈处死并分离卵巢, 用于后续相关实验。

1.2.2 细胞培养 小鼠卵巢颗粒细胞(KK-1)由夏国良教授(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室)赠送。细胞培养用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素、10 U/mL两性霉素B的DMEM培养基在37 °C、5% CO₂条件下培养, 细胞贴壁生长。为了模拟体内孕早期卵巢黄体化的过程, 用HCG来诱导KK-1细胞黄体化。二羟环氧苯并芘(benzo(a)pyren-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, BPDE)为B(a)P的体内代谢物, 用于进行体外实验。设立对照组、HCG组、HCG+BPDE联合处理组。用HCG(1.0 IU/mL)、BPDE(0.5 μ mol/L)处理细胞24 h进行体外实验。

1.2.3 血清激素水平分析 用乙醚麻醉小鼠, 摘除

眼眶采血后立即处死。于室温条件静置60 min后, 1 000 r/min离心10 min, 取上层血清。用ELISA检测试剂盒检测血清中雌、孕激素水平。分别将样品血清和标准品按照90 μ L/孔加入反应孔中, 再加入10 μ L/孔配制好的辣根过氧化物酶标记雌二醇或孕酮, 混匀后用封板膜封住反应孔, 室温避光孵育2 h。用洗涤液清洗3次后置于吸水纸上拍干。加入显色剂TMB溶液100 μ L/孔, 用封板膜封住反应孔, 室温避光孵育20 min。按50 μ L/孔加入终止液, 混匀后立即测量吸光度 D_{450} 值, 根据标曲计算样品相应浓度。

1.2.4 qRT-PCR法检测mRNA表达水平 取适量组织加入Trizol, 在冰上用组织匀浆器研磨至无肉眼可见组织, 细胞直接加入Trizol不用研磨, 再加入氯仿混匀后冰上静置30 min, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 加入异丙醇后于冰上静置10 min, 4 °C、12 000 r/min离心10 min, 弃上清, 用75%乙醇(无水乙醇:DEPC水=3:1)清洗沉淀后再次离心, 将沉淀RNA溶于适量DEPC水中, 测RNA的浓度和纯度并记录, 利用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。qRT-PCR反应条件: 95 °C初始变性10 s; 95 °C变性15 s, 60 °C退火和伸长30 s, 随后进行39次循环。每个样本设立3个复孔, 以 β -actin为内参, 用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算基因相对表达量。

1.2.5 免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 取小鼠卵巢进行石蜡包埋, 用石蜡切片机切卵巢组织, 切片烤干后进行免疫组化。用二甲苯脱蜡后于酒精中进行梯度脱水, 用枸橼酸盐进行抗原修复。滴加3% H₂O₂消除内源干扰, 滴加山羊血清于37 °C封闭30 min, 孵一抗: CyclinA1(1:200)、CDK2(1:200)、CDK4(1:200)、Ki67(1:300)、PCNA(1:300)、pHH3(1:300)于4 °C过夜。次日, 滴加二抗于37 °C孵育30 min, 再滴加辣根过氧化物酶孵育, 用DAB进行显色至棕色无法加深后终止, 浸入酒精梯度脱水后转入二甲苯, 用中性树胶封片, 于显微镜下观察。具体方法参照课题组之前的实验步骤^[15]。

1.2.6 CCK-8法检测细胞增殖能力 取对数生长期的KK-1细胞, 将细胞浓度调整为1 \times 10⁸个/L, 接种于96孔板中, 每孔加入100 μ L的细胞悬液。实验分3组, 每组3个复孔。空白对照组: 不含细胞和药物处理, 仅含DMEM完全培养基; 对照组: 含细胞、DMEM完全培养基, 但不含药物处理; 实验组: 含细胞、DMEM完全培养基和药物处理(HCG组和

HCG+BPDE组)。加药培养24 h后,所有组都换成完全培养基,每孔加入10 μ L CCK-8工作液,继续于37 $^{\circ}$ C孵育2 h,在450 nm处检测其吸光度(D)值。计算细胞活力,细胞存活率=(D实验组-D空白对照组)/(D对照组-D空白对照组) \times 100%。

1.2.7 免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达 取适量组织加入裂解液,用组织匀浆器研磨至无肉眼可见组织,冰上裂解30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min,取中间层蛋白质溶液。用细胞裂解缓冲液刮取KK-1细胞蛋白。用BCA试剂盒测定蛋白含量,用酶标仪检测样品的吸光度值,计算样品浓度。将蛋白加入SDS上样缓冲液煮15 min后于-80 $^{\circ}$ C保存。配制12%分离胶、5%浓缩胶进行上样电泳,湿转将凝胶上蛋白转印至PDVF膜上,用5%脱脂奶粉(溶于PBST)于37 $^{\circ}$ C封闭60 min,孵育抗GAS1抗体(1:1 000)、抗CyclinA1抗体(1:1 000)、抗CDK2抗体(1:1 000)、抗CyclinB1抗体(1:1 000)、抗CDK4抗体(1:1 000)和抗 β -actin抗体(1:3 000)于4 $^{\circ}$ C过夜。次日,用PBST洗膜(4次,每次10 min)后,加入二抗(1:3 000)于37 $^{\circ}$ C孵育1 h;用PBST洗膜(4次,每次10 min)后,使用ECL系统显色。以 β -actin为内参,运用Quantity One软件测量显色条带灰度值。

1.2.8 免疫荧光(immunofluorescence, IF) 将KK-1细胞传代接种于24孔板爬片上,加药处理24 h后弃去培养基,用4%多聚甲醛于4 $^{\circ}$ C固定30 min,用PBS洗3次,每次5 min,再用5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)于37 $^{\circ}$ C水浴封闭1 h,抗GAS1(1:200)、CyclinB1(1:150)、CDK1(1:150)、COX4(1:200)一抗于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,取出并于室温复温30 min, PBS洗3次,每次5 min,于37 $^{\circ}$ C水浴避光孵育荧光二抗(1:100) 1 h, PBS洗3次,每次5 min,滴加含DAPI的抗荧光猝灭剂于载玻片上,抠取爬片倒置于载玻片上避光4 $^{\circ}$ C保存,并在共聚焦显微镜下观察。

1.2.9 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM) 胰酶消化并收集培养的KK-1细胞,800 r/min离心5 min后,底部形成细胞团块,吸去上清,沿管壁加入固定液戊二醛于4 $^{\circ}$ C保存。后续样品切片制备及拍照工作于重庆医科大学电镜室完成。观察细胞中线粒体和脂滴等亚细胞结构。

1.3 统计学方法

运用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析,每

个实验至少重复3次。所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,分别使用 t 检验和单因素方差分析对两组和多组数据进行统计分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 B(a)P影响妊娠小鼠卵巢功能

由于卵巢是体内合成和分泌雌、孕激素的主要器官,而孕早期雌、孕激素的合成与分泌对胚胎植入有重要作用。为了探究B(a)P是否会影响卵巢功能,采用ELISA检测了孕d4、d7小鼠中雌、孕激素水平,发现B(a)P处理组E2、P4水平均下调,进一步用qRT-PCR检测雌、孕激素合成相关酶类的mRNA水平,发现与对照组相比,B(a)P处理组 3β -HSD、 17β -HSD和P450SCC水平均下调。体外结果与体内一致,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图1)。

2.2 B(a)P抑制妊娠小鼠卵巢细胞增殖

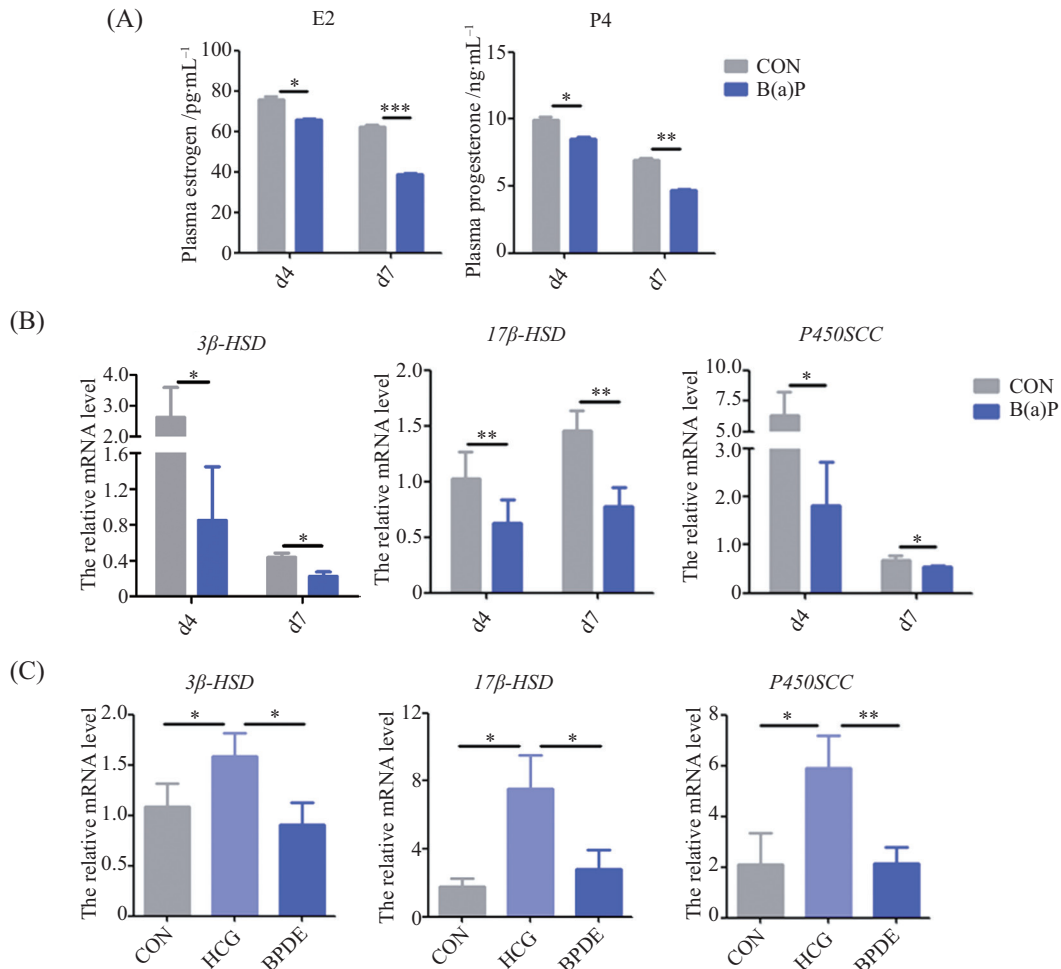
卵巢颗粒细胞的增殖分化异常会影响卵巢功能。IHC检测d4小鼠卵巢石蜡切片细胞增殖指标Ki67、PCNA、pHH3的表达,发现在B(a)P处理组中Ki67、PCNA和pHH3在卵巢黄体细胞核内的表达下调;用CCK-8检测KK-1细胞活力,与HCG组相比,BPDE暴露后细胞活力下调,差异有统计学意义($P<0.05$),提示B(a)P能抑制卵巢颗粒细胞增殖(图2)。

2.3 B(a)P抑制细胞周期G₁/S期的转化

细胞周期的正常进行是完成增殖的必要条件,这一过程受到一系列细胞周期调控蛋白的调节。且细胞周期与黄体化进程相关,黄体生成素激增触发颗粒细胞退出细胞周期,并向黄体细胞分化。因此,我们进一步检测了B(a)P对细胞周期调控因子的影响。Western blot和IHC结果显示,调控G₁/S期的标志分子CyclinA1、CDK2、CDK4在B(a)P处理后下调,Western blot结果显示,调控G₂/M期的CyclinB1在B(a)P处理后也下调。体外Western blot结果与体内趋势一致,差异有统计学意义($P<0.05$),提示B(a)P能够将卵巢颗粒细胞阻滞在G₁期(图3)。

2.4 B(a)P影响妊娠小鼠卵巢线粒体功能

细胞增殖过程需要能量的供给,而线粒体是细胞内能量供应及激素合成的首要和主要场所。线粒体的形态变化与细胞周期停滞密切相关。本研究中的电镜结果显示,与HCG组相比,BPDE组内出现脂滴的蓄积,存在明显的线粒体肿胀和线粒体数量减



A: 血清雌、孕激素水平; B: 卵巢组织雌、孕激素合成限速酶的mRNA水平; C: KK-1细胞雌、孕激素合成限速酶的mRNA水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: estrogen and progesterone levels in serum; B: the mRNA levels of steroid hormone synthesis-associated genes in ovarian tissues; C: the mRNA levels of steroid hormone synthesis-associated genes in KK-1 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 B(a)P对卵巢中雌、孕激素水平的影响

Fig.1 Effects of B(a)P on the levels of estrogen and progesterone in ovarian tissues

少。Mitotracker探针标记线粒体结果显示, BPDE暴露导致卵巢颗粒细胞中的线粒体网络解体、分支减少, 呈明显管状形态。有研究表明, 细胞周期蛋白CyclinB1/CDK1的线粒体流入量增加与细胞周期G₂/M过渡有关^[16]。IF检测CyclinB1与COX4、CDK1与COX4共染, 与HCG组相比, BPDE暴露后, CyclinB1与COX4、CDK1与COX4的共定位均下降(图4), 提示CyclinB1/CDK1的线粒体流入量下降。

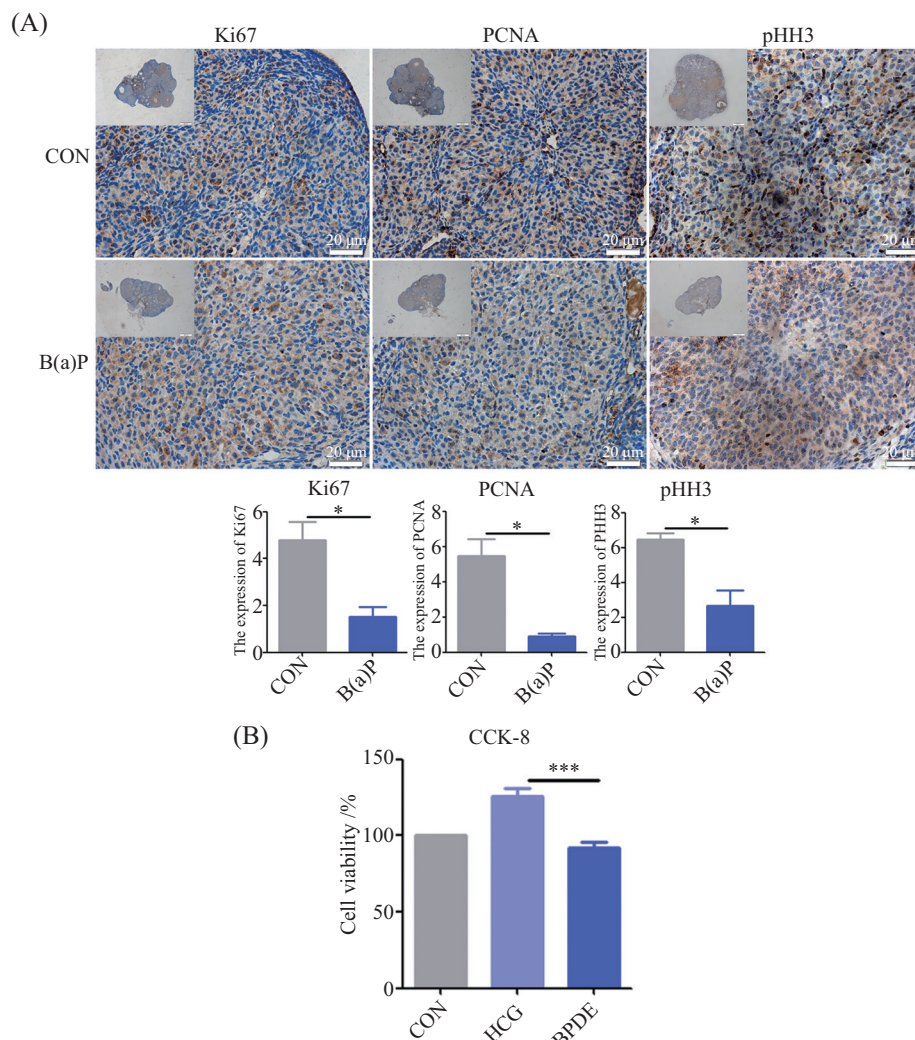
2.5 B(a)P抑制妊娠小鼠卵巢GAS1的表达

有研究报道, GAS1参与细胞周期的调控, 并且与排卵和卵泡黄体化有关, 此外, GAS1的下调也会影响卵巢黄体功能^[17-18]。本研究通过IF、Western blot、PCR检测发现, 体内B(a)P及体外BPDE暴露均抑制了GAS1表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图

5)。以上结果说明, GAS1也可能是B(a)P暴露干扰卵巢黄体功能的潜在靶点。

3 讨论

B(a)P是一种环境内分泌干扰物, 可通过多种途径被人体吸收。我们的前期研究发现, B(a)P影响孕早期小鼠胚胎植入及蜕膜化过程^[4]。在小鼠体内胚胎植入前即孕d4, 卵巢出现一个雌激素分泌的高峰, 调节小鼠子宫进入容受性状态, 利于胚胎植入。胚胎植入后, 黄体细胞分泌的孕酮调节子宫内膜的蜕膜化, 维持妊娠。有研究报道, B(a)P具有卵巢毒性^[9]。卵巢黄体作为一个短暂的内分泌器官, 对妊娠母体孕酮水平及妊娠胎儿发育的调控起着不可或缺的作用, 但目前关于孕早期B(a)P暴露影响卵巢黄体功能



A: IHC检测卵巢黄体Ki67、PCNA、pHH3的表达; B: CCK-8检测KK-1细胞活力。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: the expression of Ki67, PCNA and pHH3 in corpus luteum was detected by IHC; B: the cell viability of KK-1 cell was detected by CCK-8. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

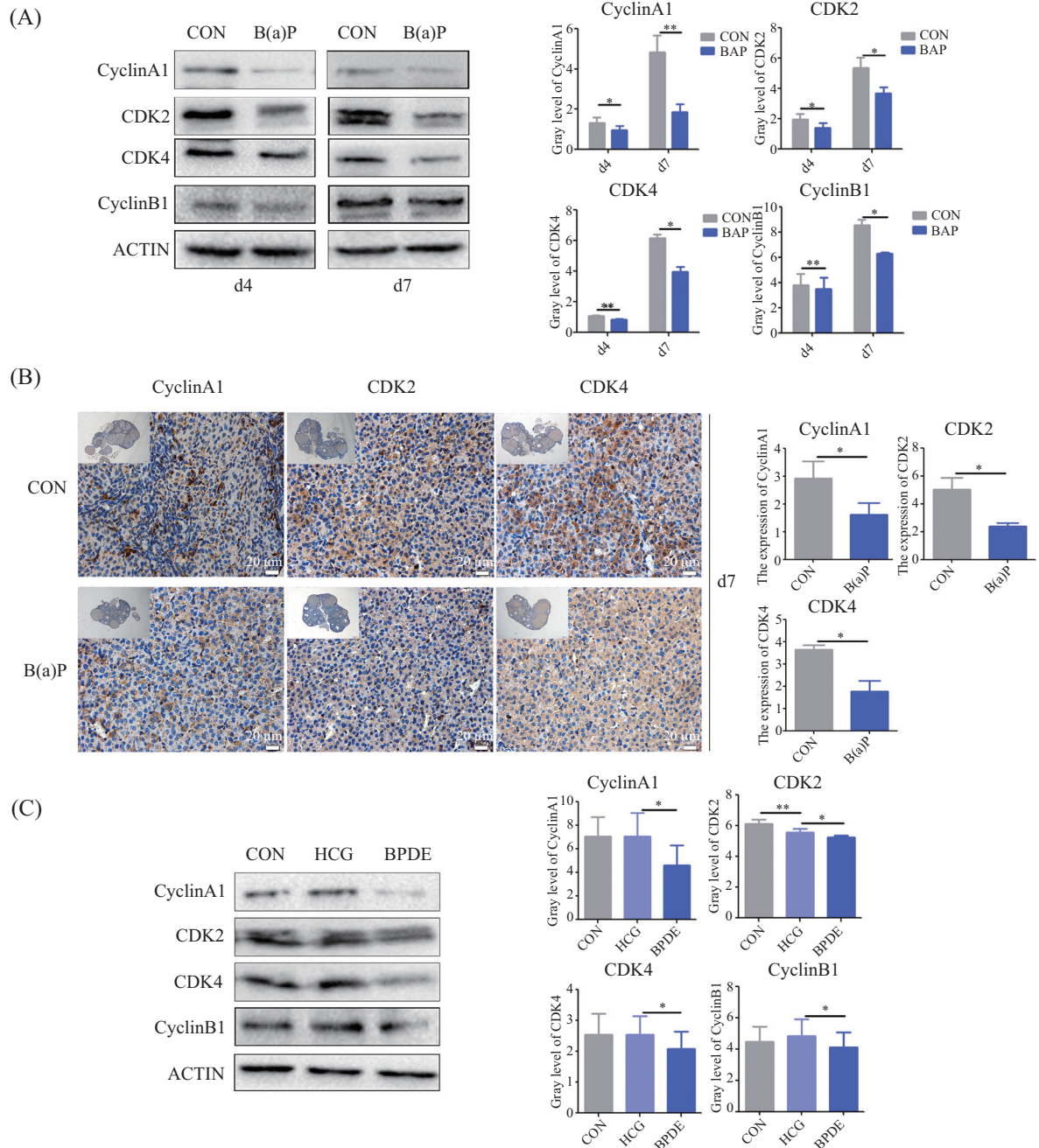
图2 B(a)P对卵巢颗粒细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of B(a)P on ovarian granular cell proliferation

的研究并不深入。在本研究中, B(a)P暴露导致在孕d4、d7体内雌激素(E2)、孕激素(P4)水平显著下降, 体内外类固醇激素合成相关酶 3β -HSD、 17β -HSD、 $P450SCC$ 的mRNA水平均下调, 提示B(a)P暴露导致孕早期小鼠卵巢黄体功能受损。

黄体形成过程包括细胞周期停滞、组织重塑和血管化。进行黄体化的细胞不增殖, 黄体生成素刺激触发颗粒细胞退出细胞周期, 并开始向黄体细胞分化。因此, 黄体化与细胞周期密切相关。细胞增殖过程受到细胞周期的调控, 细胞增殖受到抑制会导致卵巢功能异常引发相关疾病^[20]。Ki67存在于G₀期以外的增殖周期中, PCNA主要存在于DNA合成期(S期), 而pHH3标志细胞进入有丝分裂期(M期), 三

者都是细胞增殖的常见指标^[21]。本研究通过免疫组化检测Ki67、PCNA、pHH3在卵巢黄体组织中的表达, 并用CCK-8实验检测体外细胞活力, 探究B(a)P对卵巢颗粒细胞增殖的影响。结果表明, B(a)P对卵巢颗粒细胞的增殖有显著的抑制作用。在细胞分裂增殖的过程中, 细胞周期蛋白Cyclins和细胞周期蛋白依赖性激酶CDK起着重要的调控作用^[22-23], 其中CyclinA与CDK2结合, CyclinD与CDK4结合, 均促进细胞G₁/S期的转换。CyclinB与CDK1结合形成M期促进因子, 引发G₂/M期的转变。当DNA受损时, p21能够与CyclinA/CDK2复合物结合从而抑制其活性, 使细胞周期阻滞在G₁期。本研究中Western blot结果显示, 孕早期B(a)P暴露会抑制细胞周期相关蛋白



A: Western blot检测卵巢组织中细胞周期调控蛋白的表达水平; B: IHC检测卵巢黄体中细胞周期调控蛋白的表达; C: Western blot检测KK-1细胞中周期调控蛋白表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the expression of cell cycle-related proteins in ovaries was detected by Western blot; B: the expression of cycle-related proteins in corpus luteum was detected by IHC; C: the expression of cell cycle-related proteins in KK-1 cells was detected by Western blot. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

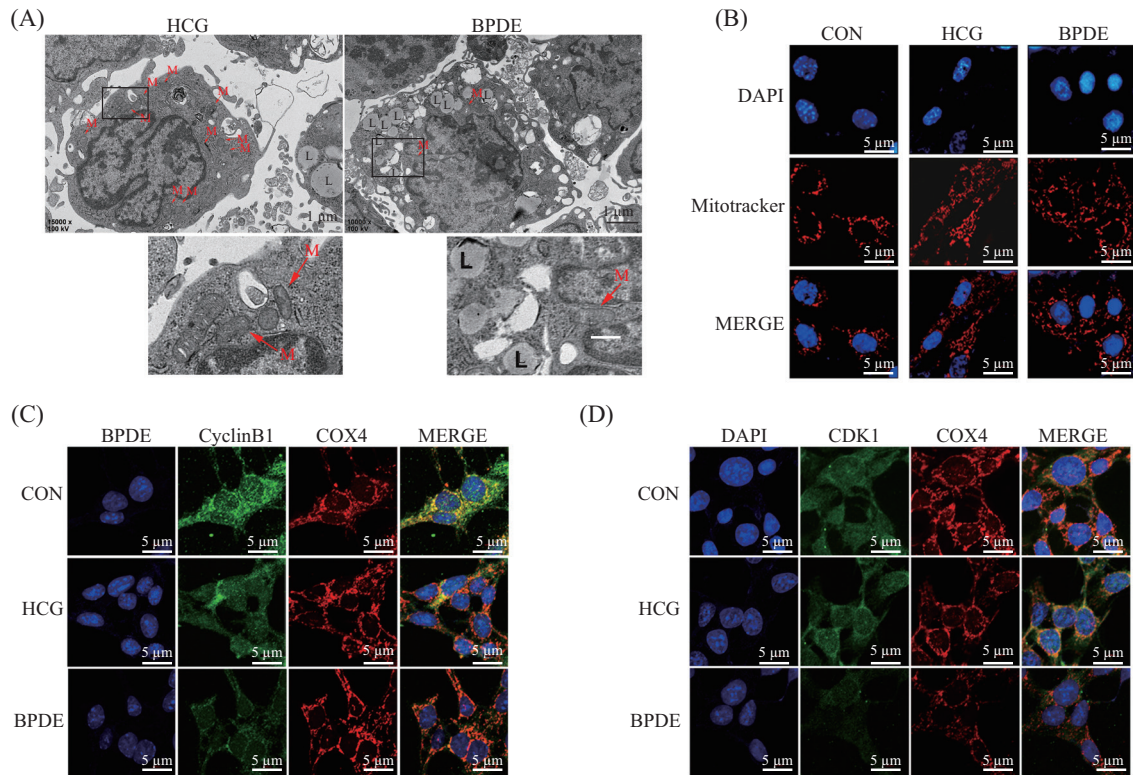
图3 B(a)P对卵巢颗粒细胞周期的影响

Fig.3 Effect of B(a)P on ovarian granular cell cycle

CyclinA1、CDK2、CDK4、CyclinB1的表达,这可能与B(a)P抑制卵巢颗粒细胞G₁/S期的转化有关。

细胞增殖过程需要能量的供给,而线粒体是细胞内能量供应激素合成的首要和主要场所。线粒体的形态变化与细胞周期停滞密切相关^[24]。在细胞周期停滞时,线粒体网络从互相连接转变为碎片化^[25]。

线粒体是CDK调控细胞周期中的关键细胞器,CDK4上调线粒体抗氧化剂锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)^[26], CyclinD1抑制B细胞线粒体活性^[27]。CyclinB1/CDK1调控线粒体在细胞周期进展和增殖中的活性^[28]。有文献报道,CyclinB1/CDK1的线粒体流入量增加与细胞周期G₂/M过渡有



A: KK-1细胞的代表性TEM图像(红色箭头: 线粒体; L: 脂滴; 黑色方框: 局部放大区域); B: Mitotracker探针标记线粒体; C: IF检测CyclinB1与COX4共定位; D: IF检测CDK1与COX4共定位。

A: TEM images of KK-1 cells (red arrow: mitochondria; L: lipid droplet; black box: locally enlarged area); B: Mitotracker probe marked mitochondria; C: the co-location of CyclinB1 and COX4 was detected by IF; D: the co-location of CDK1 and COX4 was detected by IF.

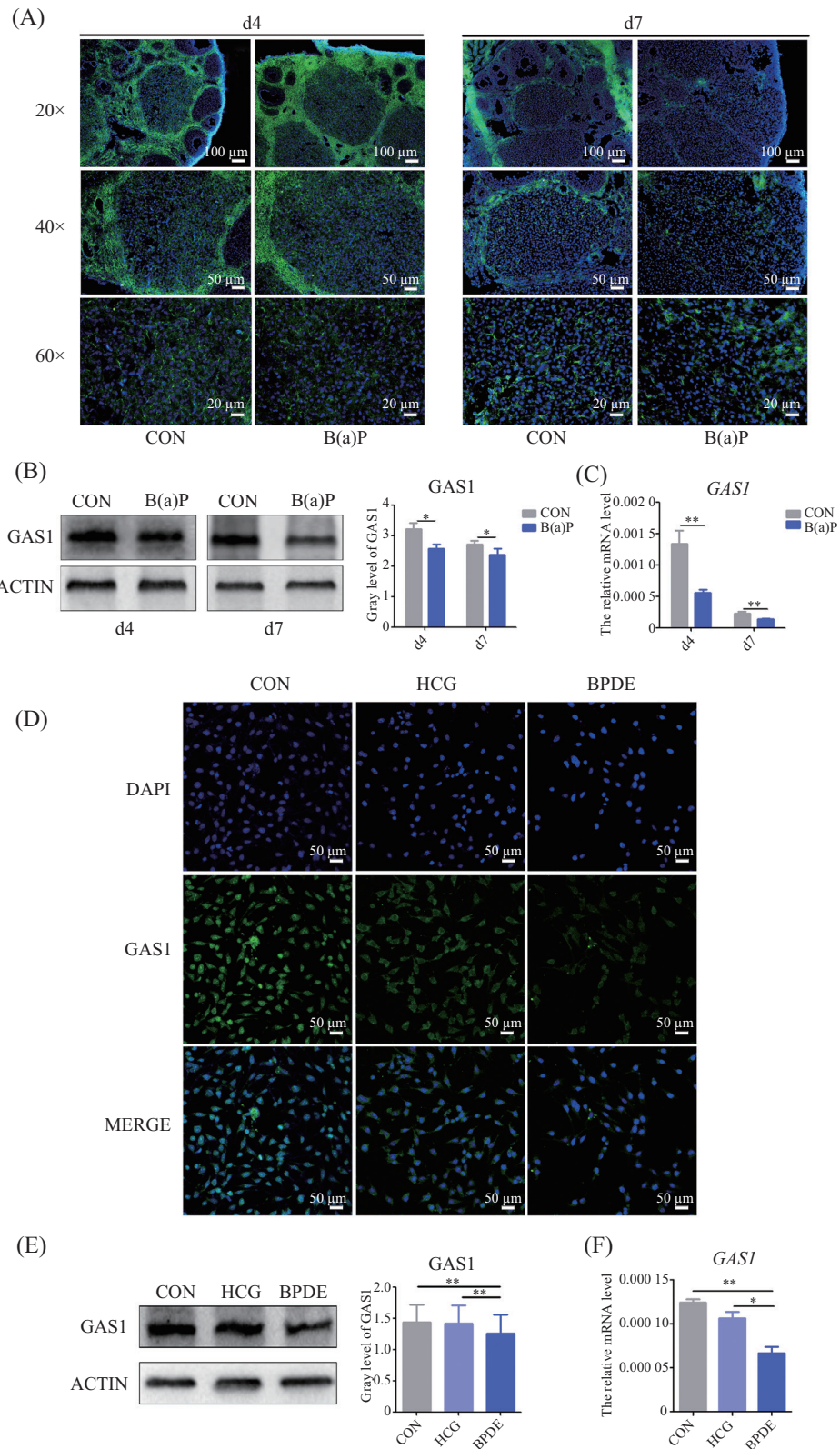
图4 BPDE暴露对卵巢颗粒细胞线粒体的影响

Fig.4 Effect of BPDE exposure on the mitochondria in ovarian granular cell

关, 细胞可以通过 CyclinB1/CDK1介导的线粒体呼吸链复合物I(respiratory complexes I, CI)亚基激活和线粒体ATP生成, 来应对G₂/M转化过程中细胞燃料需求的增加, 这代表线粒体活性与G₂/M转化之间具有一定的同步性, 为细胞周期进程提供了充足的能量供应^[16]。在本研究中, 体内外Western blot结果显示, 孕早期B(a)P暴露导致CyclinB1下调; 免疫荧光结果显示, 相较于对照组, HCG组CyclinB1/CDK1与线粒体共定位下降, 说明HCG诱导颗粒细胞黄体化进程中出现细胞周期G₂/M阻滞。而相比于HCG组, BPDE暴露后, CyclinB1与COX4、CDK1与COX4的共定位进一步下降, 提示CyclinB1/CDK1的线粒体流入量减少, 会影响线粒体ATP的生成, 导致G₂/M转化过程中的能量供给下降, 从而影响G₂/M转换, 细胞周期被过度阻滞。虽然细胞周期阻滞有利于黄体化, 但这种阻滞也是处于一定的平衡状态, 过度抑制细胞周期相关蛋白会诱导细胞凋亡的发生^[29-30]。课题组前期研究也证实, B(a)P暴露诱导了卵巢颗粒细胞凋亡^[31]。此外, Mitotracker探针标记线

粒体显示, BPDE暴露导致卵巢颗粒细胞中的线粒体网络解体、分支减少, 呈明显管状形态; 电镜结果显示, BPDE组存在明显的线粒体肿胀且线粒体数量减少, 同时还观察到脂滴的蓄积。在卵巢中脂滴是合成各种激素的底物, 其作为动态储存脂肪的细胞器, 与能量动力车间线粒体有密切联系。线粒体的形态学改变与线粒体功能障碍有关^[32]。胆固醇向线粒体外膜的转移受到类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute-regulatory protein, StAR)的调控, 这也是类固醇激素生物合成的起始和限速步骤。此后, 细胞色素P450SCC会在线粒体内膜将胆固醇转化为孕烯醇酮来启动类固醇生成^[33]。线粒体作为类固醇激素生物合成的中心部位, 孕早期B(a)P暴露导致线粒体功能异常将会影响孕期卵巢黄体功能。虽然周期调控因子的下调抑制细胞增殖, 有利于黄体化, 但是其对线粒体能量供应的影响也会抑制线粒体的功能, 从而影响黄体激素的合成。

GAS1是一种糖基磷脂酰肌醇连接的膜蛋白,



A: IF检测卵巢黄体组织GAS1表达; B: Western blot检测卵巢组织GAS1的蛋白水平; C: PCR检测卵巢组织GAS1的mRNA水平; D: IF检测KK-1细胞中GAS1表达; E: Western blot检测KK-1细胞GAS1的蛋白水平; F: PCR检测KK-1细胞GAS1的mRNA水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the expression of GAS1 in corpus luteum was detected by IF; B: the expression of GAS1 protein in ovaries was detected by Western blot; C: the mRNA level of *GAS1* in ovaries was detected by PCR; D: the expression of GAS1 in KK-1 cells was detected by IF; E: the expression of GAS1 protein in KK-1 cells was detected by Western blot; F: the mRNA level of *GAS1* in KK-1 cells was detected by PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 B(a)P对卵巢组织和KK-1细胞中GAS1的影响

Fig.5 Effect of B(a)P on the GAS1 expression in ovarian tissues and KK-1 cells

在调控细胞的增殖和存活中发挥重要作用。GAS1参与细胞周期的调控,其过表达会导致细胞停滞在G₀/G₁细胞周期阶段^[34]。内皮细胞中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通过激活PI3K诱导GAS1的表达,抑制细胞凋亡,而沉默GAS1则增加了内皮细胞的细胞凋亡^[35]。尽管有数据证明,GAS1的2个主要功能是引起细胞周期阻滞和细胞凋亡^[36-37],但GAS1可能会根据细胞分化和特定细胞内介体的存在而发挥不同的作用。有研究表明,GAS1在颗粒细胞中作为黄体生成素激增的关键转录因子C/EBP的靶基因被诱导,并与排卵和黄体化有关;在颗粒细胞特异性敲除GAS1不会影响颗粒细胞周期阻滞,也不会阻止它们在促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和HCG的作用下向黄体细胞分化,但会导致多个黄体化相关基因的mRNA水平下降^[38],提示GAS1的下调会影响黄体细胞功能。在本研究中,体内外结果显示,孕早期B(a)P暴露会抑制GAS1的表达,提示B(a)P也可以通过细胞周期阻滞以外的机制影响颗粒细胞的黄体功能。

综上所述,孕早期B(a)P暴露会抑制雌、孕激素及合成相关酶的产生,扰乱妊娠早期卵巢的正常功能,其作用机制可能是通过影响细胞周期调控蛋白,干扰细胞周期进程,损伤线粒体功能进而抑制雌、孕激素的合成。本研究首次从细胞周期调控蛋白的角度探讨了B(a)P导致孕早期卵巢黄体功能异常的机制,研究结果为更加全面深入地了解B(a)P影响胚胎着床的机制提供新的方向和线索。

参考文献 (References)

- [1] YIN X, LIU Y, ZEB R, et al. The intergenerational toxic effects on offspring of medaka fish *oryzias melastigma* from parental benzo[a]pyrene exposure via interference of the circadian rhythm [J]. *Environ Pollut*, 2020, 267: 115437.
- [2] PATEL S, ZHOU C, RATTAN S, et al. Effects of endocrine-disrupting chemicals on the ovary [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(1): 20.
- [3] ZHAO Y, CHEN X, LIU X, et al. Exposure of mice to benzo(a)pyrene impairs endometrial receptivity and reduces the number of implantation sites during early pregnancy [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 69: 244-51.
- [4] LI X Y, SHEN C, LIU X, et al. Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy [J]. *Environ Pollut*, 2017, 222: 523-31.
- [5] PRASAD S, TIWARI M, PANDEY AN, et al. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome [J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 36.
- [6] DEVOTO L, HENRIQUEZ S, KOHEN P, et al. The significance of estradiol metabolites in human corpus luteum physiology [J]. *Steroids*, 2017, 123: 50-4.
- [7] NEAL M S, ZHU J, HOLLOWAY A C, et al. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(4): 961-7.
- [8] LUDERER U, MEIER M J, LAWSON G W, et al. In utero exposure to Benzo[a]pyrene induces ovarian mutations at doses that deplete ovarian follicles in mice [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2019, 60(5): 410-20.
- [9] RAO M C, MIDGLEY A R JR, RICHARDS J S. Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation [J]. *Cell*, 1978, 14(1): 71-8.
- [10] HIRSHFIELD A N. Development of follicles in the mammalian ovary [J]. *Int Rev Cytol*, 1991, 124: 43-101.
- [11] HE C, MA T, SHI J, et al. Melatonin and its receptor MT1 are involved in the downstream reaction to luteinizing hormone and participate in the regulation of luteinization in different species [J]. *J Pineal Res*, 2016, 61(3): 279-90.
- [12] QUIRK S M, COWAN R G, HARMAN R M. Role of the cell cycle in regression of the corpus luteum [J]. *Reproduction*, 2013, 145(2): 161-75.
- [13] 王智琴, 齐以涛, 罗红焯, 等. 苯并芘对不同p53基因型细胞的周期影响[J]. 毒理学杂志(WANG Z Q, QI Y T, LUO H Y, et al. Effects of benzopyrene on the cell cycle of different P53 genotypes [J]. *Journal of Toxicology*), 2009, 23(3): 205-8.
- [14] KIM S M, LEE H M, HWANG K A, et al. Benzo(a)pyrene induced cell cycle arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cancer cells through reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum-stress pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 107(Pt A): 339-48.
- [15] 徐翰婷, 何俊琳, 刘学庆, 等. 褪黑素参与苯并(a)芘诱导的孕早期卵巢功能异常[J]. 中国细胞生物学学报(XU H T, HE J L, LIU X Q, et al. Melatonin are involved in Benzo(a)pyrene-induced ovarian dysfunction during early pregnancy [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(5): 658-64.
- [16] WANG Z, FAN M, CANDAS D, et al. Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression [J]. *Dev Cell*, 2014, 29(2): 217-32.
- [17] VAN B C, RODERMOND H M, TEN C R, et al. G₀ cell cycle arrest alone is insufficient for enabling the repair of ionizing radiation-induced potentially lethal damage [J]. *Radiat Res*, 2008, 170(2): 184-91.
- [18] SCHNEIDER C, KING R M, PHILIPSON L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells [J]. *Cell*, 1988, 54(6): 787-93.
- [19] REKHADEVI P V, DIGGS D L, HUDERSON A C, et al. Metabolism of the environmental toxicant benzo(a)pyrene by subcellular fractions of human ovary [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(2): 196-202.
- [20] SUN X, SU S, ZHANG G, et al. MiR-204 suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian granulosa cells via targeting TPT1 in polycystic ovary syndrome [J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(5): 554-62.
- [22] JURIKOVA M, DANIHEL L, POLAK S, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer [J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(5): 544-52.

- [22] MALUMBRES M. Cyclin-dependent kinases [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(6): 122.
- [23] SHERR C J, ROBERTS J M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(22): 2699-711.
- [24] KITAMURA S, YANAGI T, IMAFUKU K, et al. Drp1 regulates mitochondrial morphology and cell proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 88(3): 298-307.
- [25] HORBAY R, BILYY R. Mitochondrial dynamics during cell cycling [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(12): 1327-35.
- [26] JIN C, QIN L, SHI Y, et al. CDK4-mediated MnSOD activation and mitochondrial homeostasis in radioadaptive protection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 81: 77-87.
- [27] TCHAKARSKA G, ROUSSEL M, TROUSSARD X, et al. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1690-9.
- [28] XIE B, WANG S, JIANG N, et al. Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance [J]. *Cancer Lett*, 2019, 443: 56-66.
- [29] ZHANG R, SHI H, REN F, et al. The aberrant upstream pathway regulations of CDK1 protein were implicated in the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 60.
- [30] LV S, NING H, LI Y, et al. Inhibition of cyclinB1 suppressed the proliferation, invasion, and epithelial mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells and enhanced the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1119-28.
- [31] XU H, MU X, DING Y, et al. Melatonin alleviates benzo(a)pyrene-induced ovarian corpus luteum dysfunction by suppressing excessive oxidative stress and apoptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 207: 111561.
- [32] MANDEMAKERS W, MORAIS V A, DE S B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120: 1707-16.
- [33] SREERANGARAJA U D B, WU W H, KOMRSKOVA K, et al. Mitochondrial function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3592.
- [34] DONG C, WANG X, LI N, et al. MicroRNA-mediated GAS1 downregulation promotes the proliferation of synovial fibroblasts by PI3K-Akt signaling in osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4273-86.
- [35] SPAGNUOLO R, CORADA M, ORSENIGO F, et al. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis [J]. *Blood*, 2004, 103(8): 3005-12.
- [36] PEREZ S G, JIMENEZ A, QUEZADA R M A, et al. Annexin A1, Annexin A2, and Dyrk 1B are upregulated during GAS1-induced cell cycle arrest [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4166-82.
- [37] SUN X L, CHEN B Y, ZHAO H K, et al. Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 180.
- [38] REN Y A, LIU Z, MULLANY L K, et al. Growth arrest specific-1 (GAS1) is a C/EBP target gene that functions in ovulation and corpus luteum formation in mice [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(2): 44.