

BaP通过ROS介导的线粒体自噬通路诱导骨细胞MLO-Y4死亡

金雨昕^{1#} 张涛^{2#} 郑羽茜¹ 洪书玉¹ 刘嘉诚¹ 徐宁晟¹ 倪嘉璇¹ 张云^{1*}

(¹绍兴大学医学院生理学教研室, 绍兴 312000; ²蚌埠医科大学研究生院, 蚌埠 233030)

摘要 该文旨在探究苯并芘(benzo[a]pyrene, BaP)对骨细胞MLO-Y4线粒体自噬的作用及其分子机制。采用MTT法检测不同浓度BaP对MLO-Y4细胞活力的影响, 通过化学比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)释放量。应用Hoechst 33342/PI双荧光染色观察细胞死亡情况; JC-1染色检测线粒体膜电位; Mito-tracker染色观察线粒体形态变化; DCFH-DA与MitoSOX染色分别检测细胞总活性氧(ROS)及线粒体ROS(mtROS)水平; 化学比色法、荧光素酶法分别测定细胞中丙二醛(MDA)与ATP含量; Western blot检测动力相关蛋白1(Drp-1)、线粒体外膜转位酶20(TOM20)、线粒体融合素1(MFN1)、微管相关蛋白轻链3(LC3)、p62、PTEN诱导假定激酶1(PINK1)、E3泛素连接酶Parkin、核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)及NAD(P)H醌氧化还原酶1(NQO1)的蛋白表达水平; 免疫荧光染色观察LC3B与线粒体的共定位及聚集情况。结果显示, 与Control组相比, BaP(50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理组MLO-Y4细胞活力、线粒体膜电位、ATP含量以及MFN1、p62、Nrf2和HO-1蛋白表达水平均显著降低, 而细胞LDH释放量、细胞ROS与mtROS及MDA含量显著上升, Drp-1、PINK1、Parkin、NQO1蛋白表达水平与LC3-II/LC3-I值明显升高, 且LC3B与线粒体的共定位及其在线粒体中的聚集程度显著增强。与BaP(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比, Baf A1干预可明显增加细胞内LC-3II与p62蛋白累积, 3-MA能显著恢复细胞活力, 降低细胞死亡率; 线粒体分裂抑制剂1(Mdivi-1)与N-乙酰半胱氨酸(NAC)干预可显著下调PINK1、Parkin的蛋白表达, 降低LC3-II/LC3-I值, 同时上调p62蛋白水平, 有效提升细胞活力并抑制细胞死亡。综上, BaP可通过ROS介导的线粒体自噬通路诱导MLO-Y4细胞死亡。

关键词 苯并芘; 骨细胞MLO-Y4; 活性氧; 线粒体损伤; 线粒体自噬

Benzo[a]pyrene Induces Cell Death in MLO-Y4 Osteocytes via a ROS-Dependent Mitophagy Signaling Pathway

JIN Yuxin^{1#}, ZHANG Tao^{2#}, ZHENG Yuxi¹, HONG Shuyu¹, LIU Jiacheng¹, XU Ningsheng¹, NI Jiaxuan¹, ZHANG Yun^{1*}

(¹Department of Physiology, College of Medicine, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China;

²School of Graduate, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China)

Abstract This study aimed to investigate the effect of BaP (benzo[a]pyrene) on mitophagy in MLO-Y4 osteocytes and to explore its underlying molecular mechanism. MTT assay and colorimetric analysis were performed to evaluate the effects of different concentrations of BaP on cell viability and LDH (lactate dehydrogenase) release. Hoechst 33342/PI double staining was used to observe cell death. JC-1 staining was applied to detect mitochondrial

收稿日期: 2026-04-13

接受日期: 2026-06-12

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 13957580685, E-mail: bme_yz@usx.edu.cn

Received: April 13, 2026

Accepted: June 12, 2026

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13957580685, E-mail: bme_yz@usx.edu.cn

membrane potential, and Mito-tracker staining was performed to observe mitochondrial morphological changes. The probes of DCFH-DA and MitoSOX were used to determine the levels of ROS (reactive oxygen species) and mtROS (mitochondrial ROS), respectively. Intracellular MDA (malondialdehyde) and ATP contents were quantified using a colorimetric assay and luciferase luminescence assay, respectively. Western blot was used to detect the protein expressions of Drp-1 (dynamin-related protein 1), TOM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20), MFN1 (mitofusin 1), LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), p62, PINK1 (PTEN induced putative kinase 1), E3 ubiquitin-protein ligase Parkin, Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), HO-1 (heme oxygenase-1) and NQO1 [NAD(P)H quinone dehydrogenase 1]. Immunofluorescence staining was conducted to visualize the colocalization and aggregation of LC3B with mitochondria. Results showed that compared with control group, cell viability, mitochondrial membrane potential, ATP content, and protein levels of TOM20, MFN1, p62, Nrf2, and HO-1 were significantly decreased in the BaP-treated group; whereas, LDH release, intracellular levels of ROS, mtROS and MDA, protein levels of Drp-1, PINK1, Parkin, and NQO1, as well as the LC3-II/LC3-I ratio were markedly increased; meanwhile, the colocalization and aggregation of LC3B with mitochondria were obviously enhanced. Compared with BaP (100 $\mu\text{mol/L}$) group, Baf A1 treatment remarkably promoted the accumulation of LC3-II and p62; 3-MA effectively restored cell viability and reduced cell death. In addition, Mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor 1) and NAC (*N*-acetylcysteine) significantly downregulated the expression of PINK1 and Parkin, decreased the LC3-II/LC3-I ratio and upregulated p62 expression, as well as improving cell viability and suppressed cell death. Collectively, BaP induces cell death in MLO-Y4 cells via a ROS-dependent mitophagy signaling pathway.

Keywords benzo[a]pyrene; MLO-Y4 osteocytes; ROS; mitochondrial impairment; mitophagy

苯并芘 (benzo[a]pyrene, BaP) 是一类广泛存在于工业污染物与烟草中的典型环境污染物^[1]。BaP 可通过呼吸道吸入、消化道摄入及皮肤接触等途径进入机体, 具有致癌毒性同时可损伤神经、生殖发育及心脏等多个系统^[2-5]。已有研究证实, BaP 可干扰骨代谢与骨骼发育过程, 诱发骨量丢失, 并显著增加骨质疏松及骨折的发生风险^[6-8]。BaP 可明显抑制成骨细胞的增殖、分化及矿化过程, 同时促进破骨细胞生成、增强骨吸收活性。然而, 占骨组织细胞总数 95% 的骨细胞在 BaP 所致骨代谢紊乱中的调控作用及分子机制尚不明确。

骨细胞是骨组织含量最为丰富的细胞类型, 广泛分布于矿化骨基质内, 并通过大量伪足相互连接形成复杂的细胞网络, 以维持骨组织稳态及自身正常生理功能。骨细胞可合成并分泌牙本质基质蛋白-1 (dentin matrix protein-1, DMP-1)、骨硬化蛋白 (sclerostin, SOST) 等关键调控分子, 通过调节成骨细胞和破骨细胞活性, 参与骨重建进程^[9-10]。有研究证实, 衰老、雌激素缺乏可诱导骨细胞发生多种程序性死亡, 抑制成骨细胞增殖和分化并促进骨吸收, 诱发骨质疏松症、骨关节炎等骨骼疾病^[11-12]。本课题

组前期研究亦发现, 双酚 A、氟化物及 BaP 等环境污染物均可诱导骨细胞 MLO-Y4 发生死亡, 该过程可能与活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量生成密切相关^[13-15], 提示骨细胞是环境污染物所致骨代谢紊乱的重要靶细胞。但是, BaP 诱导骨细胞损伤的具体分子机制仍不清楚, 线粒体自噬通路是否参与调控该病理过程还有待深入探究。为此, 本研究以 MLO-Y4 细胞为研究对象, 构建 BaP 诱导 MLO-Y4 细胞损伤模型, 探讨 BaP 诱导 MLO-Y4 细胞氧化应激、线粒体损伤、线粒体自噬及细胞死亡情况, 并深入解析其潜在分子机制, 旨在为揭示环境污染物诱发骨质疏松的病理机制提供新的实验依据, 也为相关骨骼疾病的防治与临床干预提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 细胞系和试剂

小鼠骨细胞 MLO-Y4 细胞系由美国密苏里大学口腔学院 Bonewald 教授惠赠。苯并芘 (BaP, 纯度 >98%) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。 α -MEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和小牛血清 (calf serum, CS) 购于美国 Gibco 公司。MTT、乳酸

脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、Hoechst 3342、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、线粒体荧光探针 Mito-tracker Green、线粒体膜电位荧光探针 JC-1、活性氧荧光探针 DCFH-DA 及 RIPA 裂解缓冲液购于上海碧云天生物技术有限公司。线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)荧光探针 MitoSOX 购于美国 Molecular Probes 公司。线粒体动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, Drp-1)抗体、线粒体外膜转位酶 20(translocate of outer mitochondrial membrane 20, TOM20)抗体、线粒体融合素 1(mitofusin 1, MFN1)抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体、LC3B 抗体、p62 抗体、PTEN 诱导假定激酶 1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)抗体、E3 泛素蛋白连接酶 Parkin 抗体、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)抗体、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1[NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1]抗体和 β -actin 抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。自噬晚期抑制剂 Baf A1(bafilomycin A1)、自噬早期抑制剂 3-MA、线粒体分裂抑制剂 1(mitochondrial division inhibitor 1, Mdivi-1)、ROS 清除剂 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)购于美国 MCE 公司。超敏增强型 ECL 化学发光液购于杭州多思科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MLO-Y4 细胞的培养 第 39 代 MLO-Y4 细胞复苏后,接种于含 2.5% FBS 和 2.5% CS 的 α -MEM 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养;24 h 后换新鲜培养基。待细胞长到铺满瓶底时,采用 0.125% 胰蛋白酶/0.010% EDTA 在 37 °C 条件下消化传代,选取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力 取对数生长期 MLO-Y4 细胞接种于 96 孔培养板,常规培养 24 h。BaP 处理组分别加入 BaP(1、10、50、100、200 μ mol/L),Control 组加入等量培养基,每组设 6 个复孔。BaP 处理 48 h 后,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL)溶液,37 °C 孵育 4 h 后;弃上清液,每孔加入 DMSO,避光振荡 10 min,应用 iMark 酶标仪测定 490 nm 处吸光度(D_{490})值。基于 MTT 检测结果计算 BaP 作用 MLO-Y4 细胞 48 h 的 IC₅₀。结合现有文献报道的体外染毒剂量及重度污染环境中 BaP 的极

端暴露水平,筛选并确定本研究 BaP 的处理浓度。

1.2.3 化学比色法检测细胞上清液中 LDH 释放水平及细胞内 MDA 含量 收集各组细胞培养上清液,严格按照 LDH 检测试剂盒说明书进行检测:每孔取 120 μ L 上清液加入 96 孔培养板对应孔中,再向各孔补充 60 μ L LDH 检测工作液,充分混匀后于室温避光孵育 30 min,采用酶标仪(Bio-Rad, 美国)于 490 nm 波长处检测各孔吸光度(D_{490})值,并据此计算 LDH 的相对释放量。

参照 MDA 试剂盒说明书操作:分别取 MDA 标准品与各组细胞蛋白提取液,加入 MDA 检测工作液并充分混匀,100 °C 沸水浴加热 15 min;待反应体系自然冷却至室温后,4 °C、12 000 $\times$ g 离心 10 min;吸取 200 μ L 上清转移至 96 孔培养板,酶标仪于 532 nm 波长处测定各孔吸光度(D_{532})值。结合标准曲线换算各组细胞内 MDA 含量,结果单位以 nmol/mg prot 表示。

1.2.4 Hoechst 33342/PI 染色观察细胞死亡情况 按照 1.2.2 方法处理细胞 48 h 后,弃去上清液,经 PBS 清洗后,各组细胞分别与 Hoechst 33342(1 μ g/mL)和 PI(5 μ g/mL)室温避光孵育 10 min。PBS 清洗后将细胞置于 LSM900 激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)下观察细胞核的形态变化,采用 ImageJ 软件定量分析细胞死亡率。

1.2.5 细胞分组与处理 将细胞随机分为正常培养液(Control)组、BaP(50 μ mol/L)组、BaP(100 μ mol/L)组、自噬晚期抑制剂 Baf A1(100 nmol/L Baf A1)组、Baf A1+BaP(100 nmol/L Baf A1+100 μ mol/L BaP)组、自噬早期抑制剂 3-MA+BaP(2 mmol/L 3-MA+100 μ mol/L BaP)组、线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1+BaP(10 μ mol/L Mdivi-1+100 μ mol/L BaP)组及 ROS 清除剂 NAC+BaP(1 mmol/L NAC+100 μ mol/L BaP)组。

1.2.6 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位水平 按照 1.2.5 方法处理细胞 48 h,弃上清液后用 PBS 清洗 2 次;各组细胞加入 JC-1(10 μ mol/L)荧光探针,室温避光孵育 30 min。PBS 清洗 2 次后,应用 Nikon 300 荧光显微镜(Wetzlar, 德国)观察荧光强度变化及分布,并通过流式细胞仪定量检测各组细胞线粒体膜电位水平。

1.2.7 Mito-tracker Green 染色观察线粒体形态 按照 1.2.5 方法处理细胞 48 h,弃上清液并用 PBS 清洗 2 次;各组细胞与 Mito-tracker Green(1 μ mol/L)室温避光孵育 30 min。PBS 清洗 2 次后,应用 Nikon 300 荧光显微镜(Wetzlar, 德国)观察各组细胞的线粒体形态变化。

1.2.8 腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate,

ATP)含量检测 按照1.2.5方法处理细胞48 h, 收集各组细胞, 参照ATP检测试剂盒说明书操作, 测定细胞内ATP含量变化。

1.2.9 DCFH-DA染色和MitoSOX染色分别检测细胞内ROS和线粒体活性氧(mtROS)水平 按照1.2.5方法处理细胞48 h, 弃上清液后用PBS清洗2次; 各组细胞分别与DCFH-DA(10 $\mu\text{mol/L}$)或MitoSOX(5 $\mu\text{mol/L}$)荧光探针室温避光孵育30 min。PBS清洗2次后, 通过流式细胞仪(Wetzlar, 德国)定量检测细胞内ROS和mtROS水平。

1.2.10 Western blot检测蛋白表达水平 按照1.2.5方法处理细胞48 h, 收集各组细胞, 每孔加80 μL RIPA裂解液, 冰上裂解30 min; 于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心15 min, 收集上清液, 采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经煮沸变性后, 每孔上样20 μg , 行10% SDS-PAGE凝胶电泳分离。随后将蛋白样品转移至PVDF膜, 用10%脱脂牛奶室温封闭2 h; 将膜分别与一抗(Drp-1、TOM20、MFN1、LC3、p62、PINK1、Parkin、Nrf2、HO-1、NQO1稀释比例均为1:1 000, 内参 β -actin为1:2 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用TBST洗膜3次, 加入HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h; 再次用TBST洗膜3次后, 滴加ECL显色液, 经凝胶成像系统显色成像, 采用Quantity One软件分析蛋白表达水平。

1.2.11 免疫荧光染色观察LC3B蛋白在线粒体的表达及共定位情况 按1.2.5法处理细胞48 h, 弃上清液。PBS清洗后, 依次进行4%多聚甲醛室温固定细胞30 min、0.1% Triton X-100透膜5 min; 再经5% BSA室温封闭2 h。随后加入LC3B抗体(1:300)和TOM20抗体(1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 次日PBS清洗后加入FITC或Cy3标记的二抗(1:500), 室温避光孵育2 h; 再次PBS清洗后置于LSM900激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)下观察LC3B蛋白在线粒体中的表达及其与线粒体标志物TOM20的共定位情况^[16]。

1.3 统计学分析

所有实验数据均采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 计量实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。实验数据首先进行正态性检验与方差齐性检验, 根据检验结果选择相应的统计分析方法: 符合正态分布且方差齐的资料, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行多组间比较, 组间两两比较采用SNK-*q*检验; 不符合上述条件的资料, 则采用非参数检验。

$P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BaP可诱导MLO-Y4细胞死亡

与Control组相比, 采用BaP(1~10 $\mu\text{mol/L}$)处理MLO-Y4细胞48 h后, 细胞活力、上清液LDH释放量均无明显统计学差异; 而BaP(50~200 $\mu\text{mol/L}$)处理可显著抑制细胞活力, 并增加LDH释放量。Hoechst 33342/PI双荧光染色结果显示, Control组细胞形态结构完整, 细胞核呈均匀淡蓝色荧光, 几乎无PI红色荧光信号; 而BaP(50~200 $\mu\text{mol/L}$)处理组细胞则呈现典型的凋亡形态学特征, 表现为细胞核染色质浓缩, 蓝色荧光强度增强, 凋亡小体形成, 同时可见PI染色阳性的晚期凋亡或坏死细胞。细胞死亡率定量统计结果显示, 与Control组相比, BaP(50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理组细胞死亡率明显升高, 结果见图1。

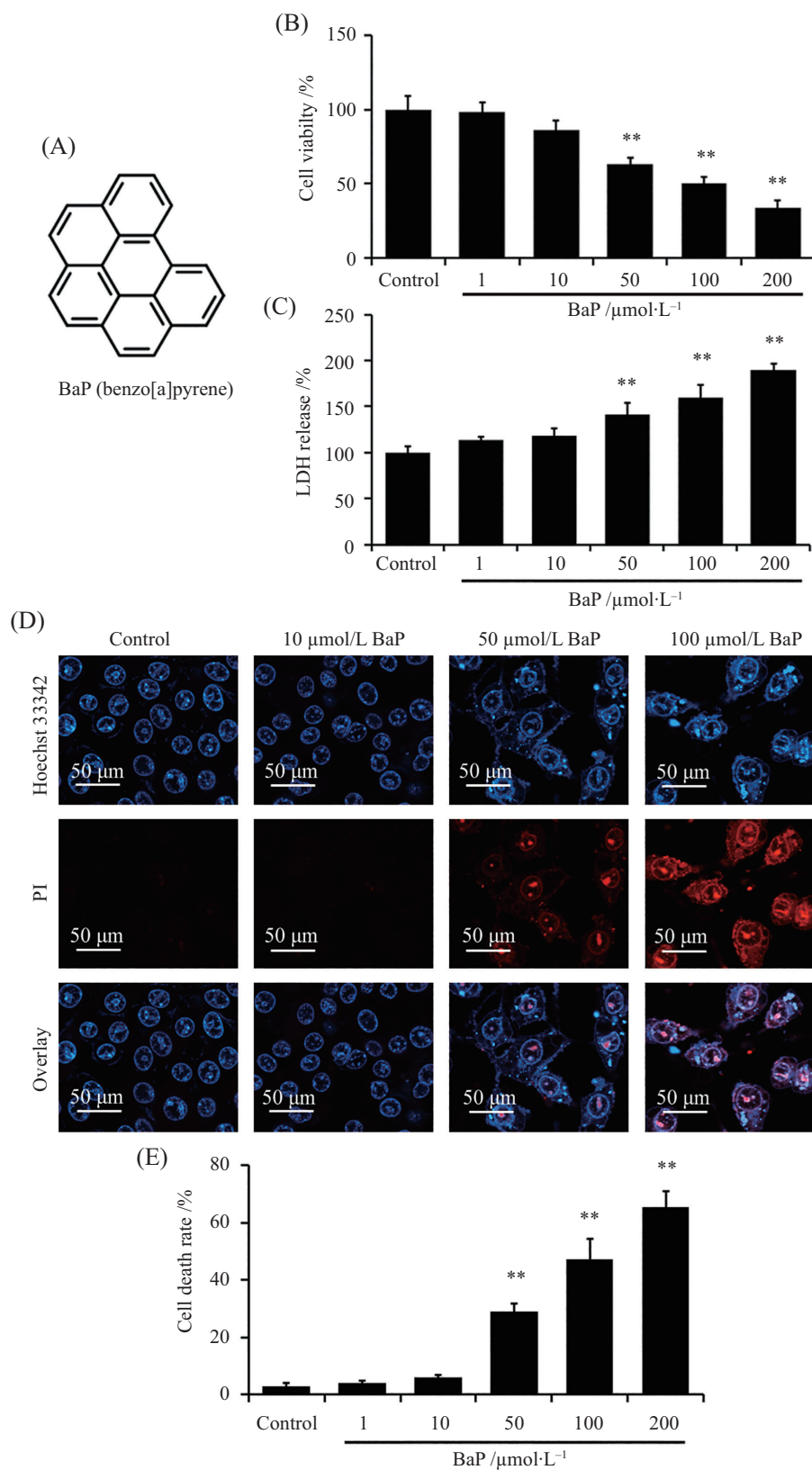
基于MTT检测结果, 经GraphPad Prism软件拟合分析得出, BaP作用MLO-Y4细胞48 h的 IC_{50} 值为101.67 $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 本研究选用50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的干预浓度。

2.2 BaP通过激活完整自噬流介导MLO-Y4细胞死亡

与Control组相比, BaP(50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理组MLO-Y4细胞中LC3-II蛋白水平显著上调, LC3-I向LC3-II的转换效率显著提升, LC3-II/LC3-I值也随之上升, 同时p62表达水平明显下调, 提示BaP可激活MLO-Y4细胞自噬。使用自噬晚期抑制剂Baf A1阻断自噬溶酶体降解后, BaP处理组细胞出现LC3-II大量蓄积、p62表达水平同步回升, 进一步证实BaP能够提升自噬通量, 维持自噬流完整性。采用自噬早期抑制剂3-MA开展干预实验, 结果显示, 与BaP组相比, 3-MA处理组细胞活力明显恢复、死亡率显著降低。综上, BaP通过激活完整自噬流介导MLO-Y4细胞死亡, 见图2。

2.3 BaP可诱导MLO-Y4细胞线粒体结构和功能损伤

与Control组相比, BaP(50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理组MLO-Y4细胞线粒体膜电位呈剂量依赖性降低, JC-1染色可见红色荧光强度减弱, 绿色荧光强度增强; 线粒体形态由连续网状结构碎裂为短棒状或颗粒状, 胞内ATP含量显著降低, 线粒体标记蛋白TOM20、融合蛋白MFN1表达显著下调, 分裂相关蛋白Drp-1

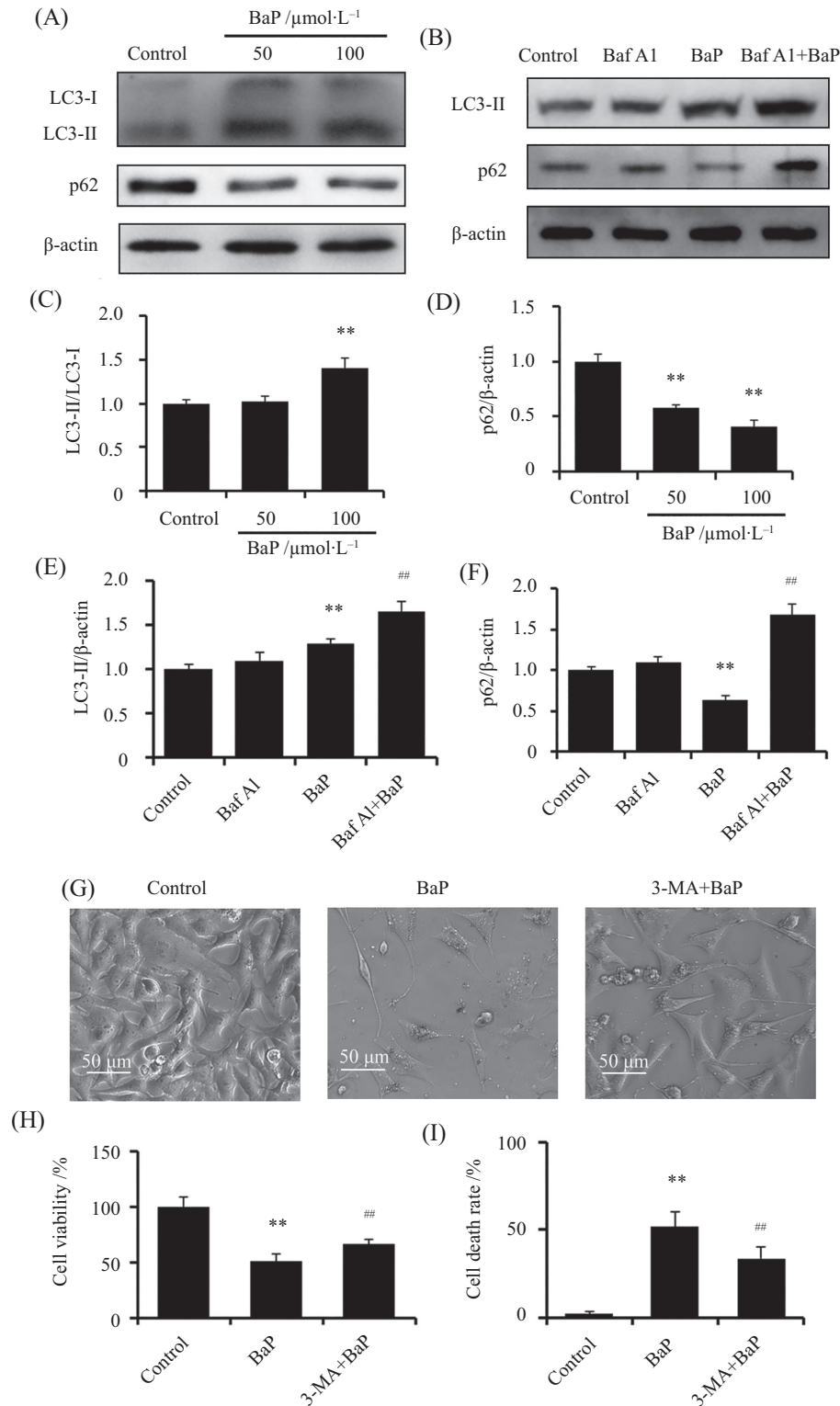


A: BaP的化学结构式; B: 细胞活力测定; C: LDH释放水平检测; D: Hoechst 33342/PI双染; E: 采用ImageJ软件定量分析细胞死亡率。 $\bar{x}\pm s$, $n=5$; ** $P<0.01$, 与Control组相比。

A: chemical structure of BaP; B: cell viability assay; C: LDH release assay; D: Hoechst 33342/PI double staining; E: cell death rate were quantitatively analyzed using ImageJ software. $\bar{x}\pm s$, $n=5$; ** $P<0.01$ compared with Control group.

图1 BaP可诱导MLO-Y4细胞死亡

Fig.1 BaP induced cell death in MLO-Y4 cells



A、B: Western blot检测LC3-I、LC3-II和p62蛋白表达水平; C: LC3-II/LC3-I值; D: 不同浓度BaP处理组p62蛋白相对表达量; E: LC3-II蛋白相对表达量; F: 自噬晚期抑制剂Baf A1组p62蛋白相对表达量; G: 细胞形态观察; H: 细胞活性检测; I: 细胞死亡率。 $\bar{x}\pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$, 与Control组相比; ## $P<0.01$, 与BaP(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比。

A,B: Western blot detection of LC3-I, LC3-II and p62 protein levels; C: the ratio of LC3-II and LC3-I; D: relative protein level of p62 in groups treated with different concentrations of BaP; E: relative protein level of LC3-II; F: relative protein level of p62 in groups treated with Baf A1; G: cell morphological observation; H: cell viability assay; I: cell death rate. $\bar{x}\pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ compared with Control group; ## $P<0.01$ compared with BaP (100 $\mu\text{mol/L}$)-treated group.

图2 BaP通过激活完整自噬流介导MLO-Y4细胞死亡

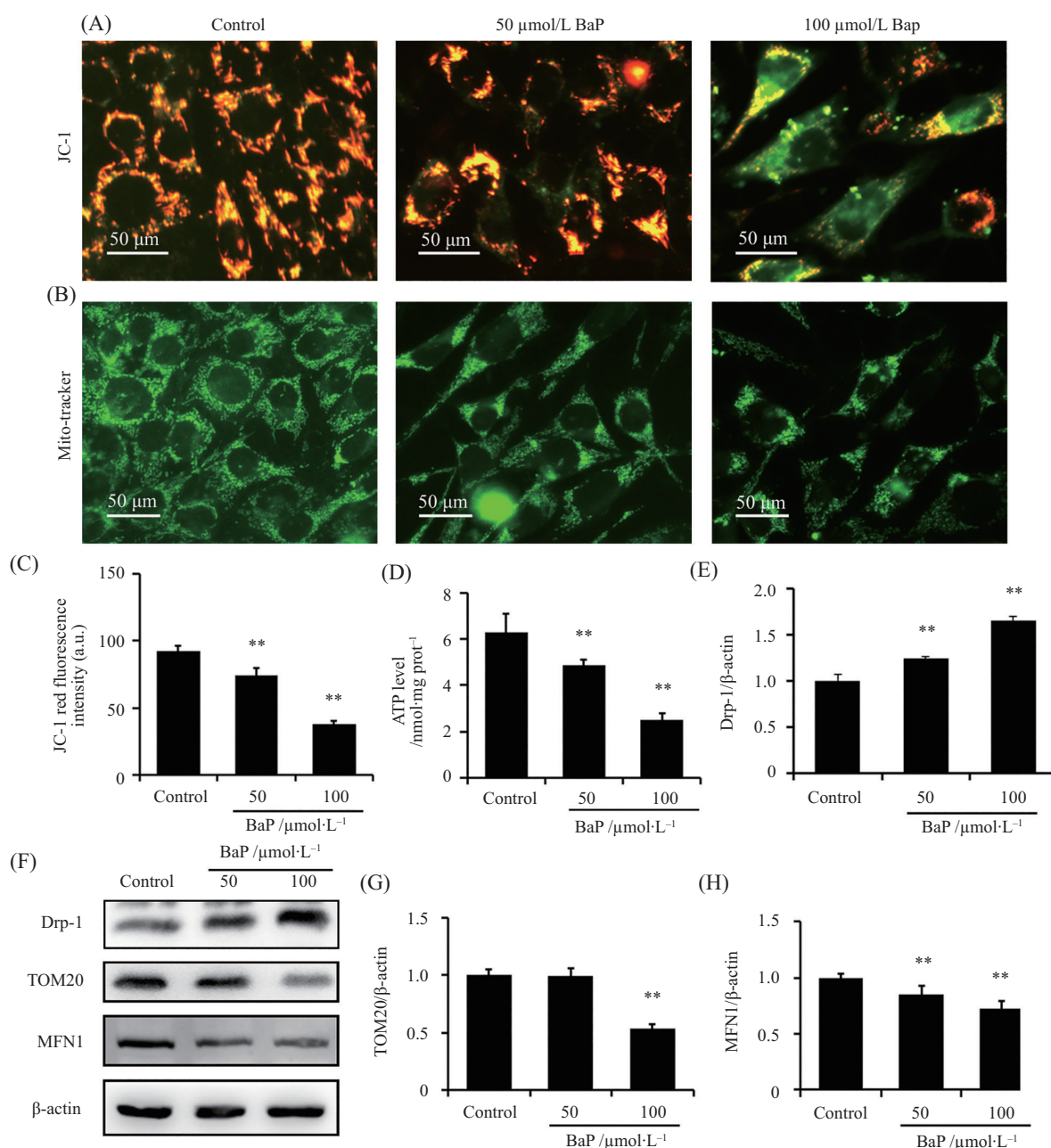
Fig.2 BaP triggered MLO-Y4 cell death via activating intact autophagic flux

表达明显上调。以上结果表明, BaP可诱导MLO-Y4细胞线粒体结构与功能损伤, 见图3。

2.4 BaP可诱导MLO-Y4细胞线粒体自噬并激活PINK1/Parkin信号通路

与Control组相比, BaP(50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理组

MLO-Y4细胞中线粒体自噬关键调控蛋白PINK1、Parkin表达水平显著上调, 细胞内LC3B绿色荧光与线粒体标志物TOM20红色荧光共定位水平明显升高, 黄色共定位斑点数量增多, 大量LC3B聚集于线粒体外膜。以上结果提示, BaP可诱导MLO-Y4细胞



A: 线粒体膜电位水平检测; B: 线粒体形态观察; C: 流式细胞仪检测线粒体膜电位水平; D: 细胞内ATP含量检测; E: Drp-1蛋白相对表达量; F: Western blot检测Drp-1、TOM20和MFN1等蛋白表达水平; G: TOM20蛋白相对表达量; H: MFN1蛋白相对表达量。 $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P<0.01$, 与Control组相比。

A: mitochondrial membrane potential determination; B: mitochondrial morphology observation; C: flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential; D: intracellular ATP assay; E: relative protein level of Drp-1; F: Western blot detection of Drp-1, TOM20 and MFN1 protein levels; G: relative protein level of TOM20; H: relative protein level of MFN1. $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P<0.01$ compared with Control group.

图3 BaP可诱导MLO-Y4细胞线粒体结构和功能损伤

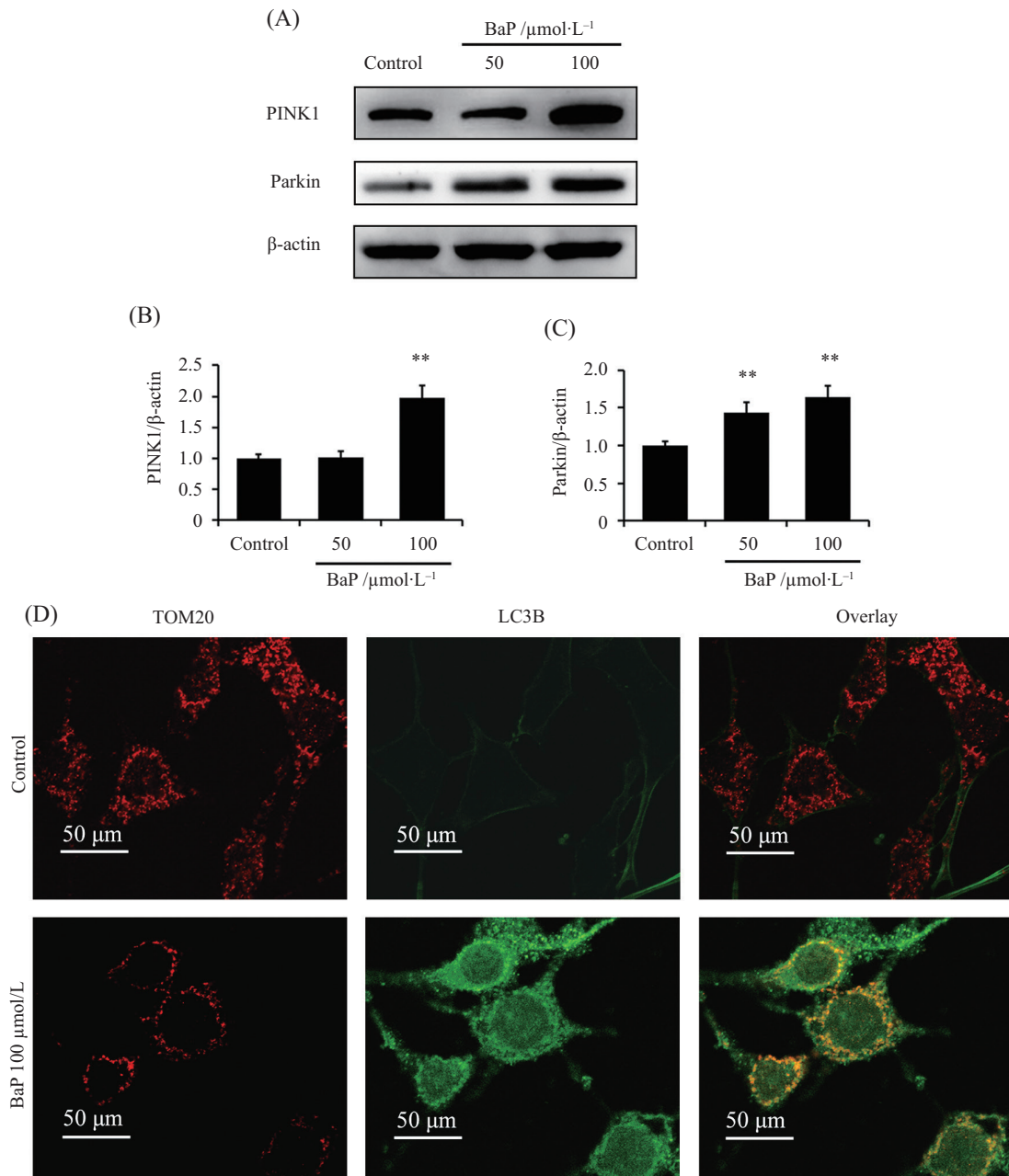
Fig.3 BaP caused structural and functional impairment of mitochondria in MLO-Y4 cells

发生线粒体自噬,同时伴随PINK1/Parkin通路的活化,见图4。

2.5 线粒体分裂的抑制剂Mdivi-1可逆转BaP诱导的MLO-Y4细胞线粒体自噬

Mdivi-1可特异性靶向抑制线粒体分裂关键蛋白Drp-1,进而阻断线粒体分裂进程。为阐明线粒体分裂在BaP诱导MLO-Y4细胞线粒体自噬中的调

控作用,本研究采用线粒体分裂抑制剂Mdivi-1进行干预。结果如图5所示,与BaP(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比,Mdivi-1(10 $\mu\text{mol/L}$)干预组MLO-Y4细胞中LC3-II、PINK1及Parkin等蛋白表达显著下调,LC3-II/LC3-I值亦明显降低,p62蛋白表达则明显上调;此外,Mdivi-1干预后MLO-Y4细胞活力显著恢复,细胞死亡率明显下降。结合本研究前期Baf A1干预证实的完整



A: Western blot检测PINK1和Parkin蛋白表达水平; B: PINK1蛋白相对表达量; C: Parkin蛋白相对表达量; D: 免疫荧光染色观察LC3B与线粒体标志蛋白TOM20的共定位及聚集情况。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$, 与Control组相比。

A: Western blot detection of PINK1 and Parkin protein levels; B: relative protein level of PINK1; C: relative protein level of Parkin; D: immunofluorescence staining for the colocalization and aggregation of LC3B with the mitochondrial marker protein TOM20. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ compared with Control group.

图4 BaP可诱导MLO-Y4细胞线粒体自噬并激活PINK1/Parkin信号通路

Fig.4 BaP triggered mitophagy and activated the PINK1/Parkin pathway in MLO-Y4 cells

自噬流特征, 以及3-MA抑制自噬可显著逆转BaP所致的MLO-Y4细胞死亡的实验结果, 证实BaP可通过激活线粒体分裂介导的线粒体自噬通路, 最终诱导MLO-Y4细胞死亡。

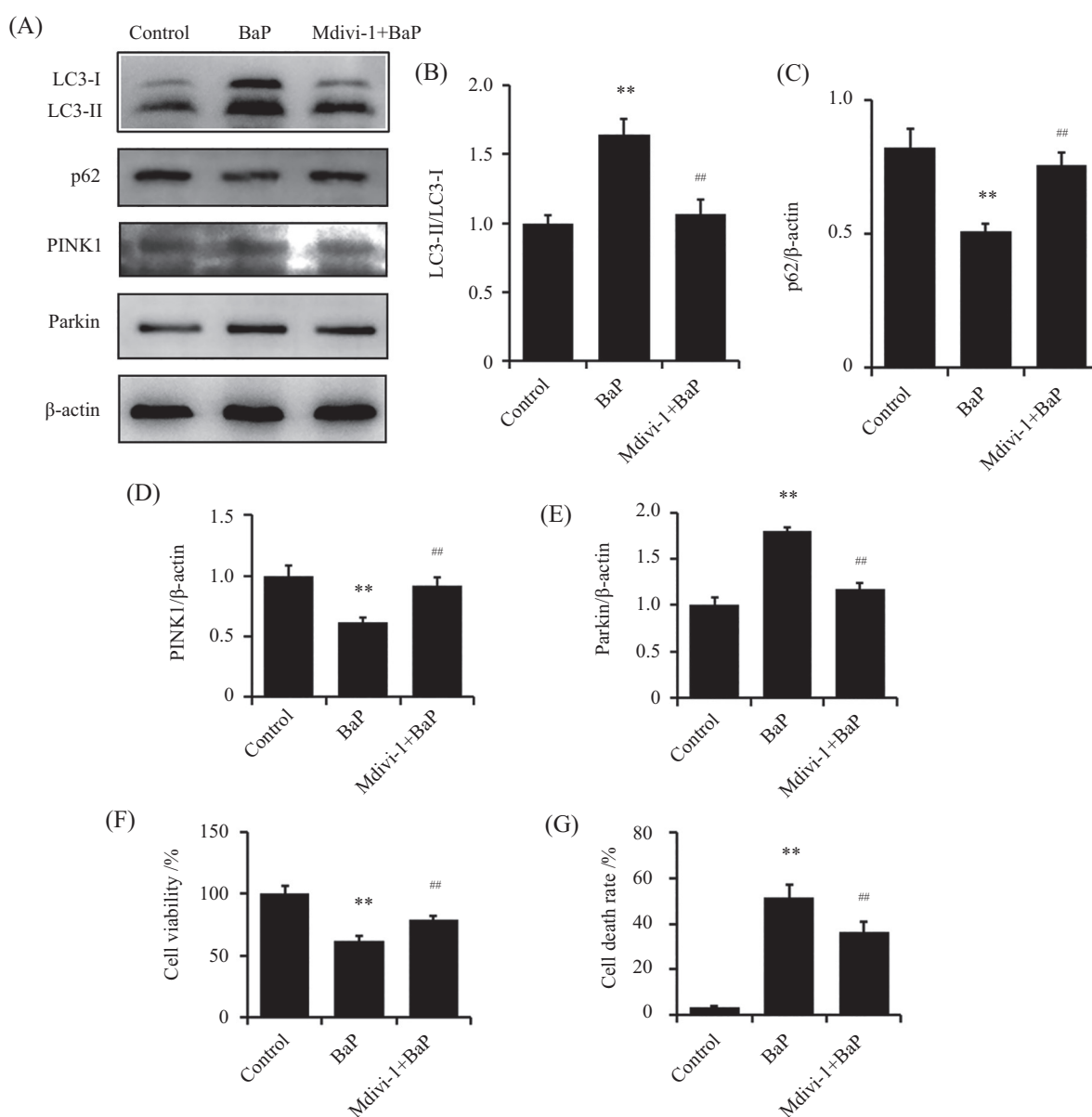
2.6 BaP可诱导ROS和mtROS过量累积, 触发MLO-Y4细胞氧化应激

与Control组相比, BaP处理组MLO-Y4细胞中DCFH-DA与MitoSOX荧光强度显著增强, 胞内

ROS、mtROS水平及MDA含量均明显升高; Nrf2、HO-1表达显著下调, 而NQO1蛋白表达则显著上调。上述结果表明, BaP可诱导ROS与mtROS过量累积, 触发MLO-Y4细胞氧化应激, 见图6。

2.7 ROS清除剂NAC显著抑制BaP诱导的MLO-Y4细胞线粒体自噬

与BaP(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比, NAC(1 mmol/L)干预组MLO-Y4细胞中PINK1和Parkin表达水平及

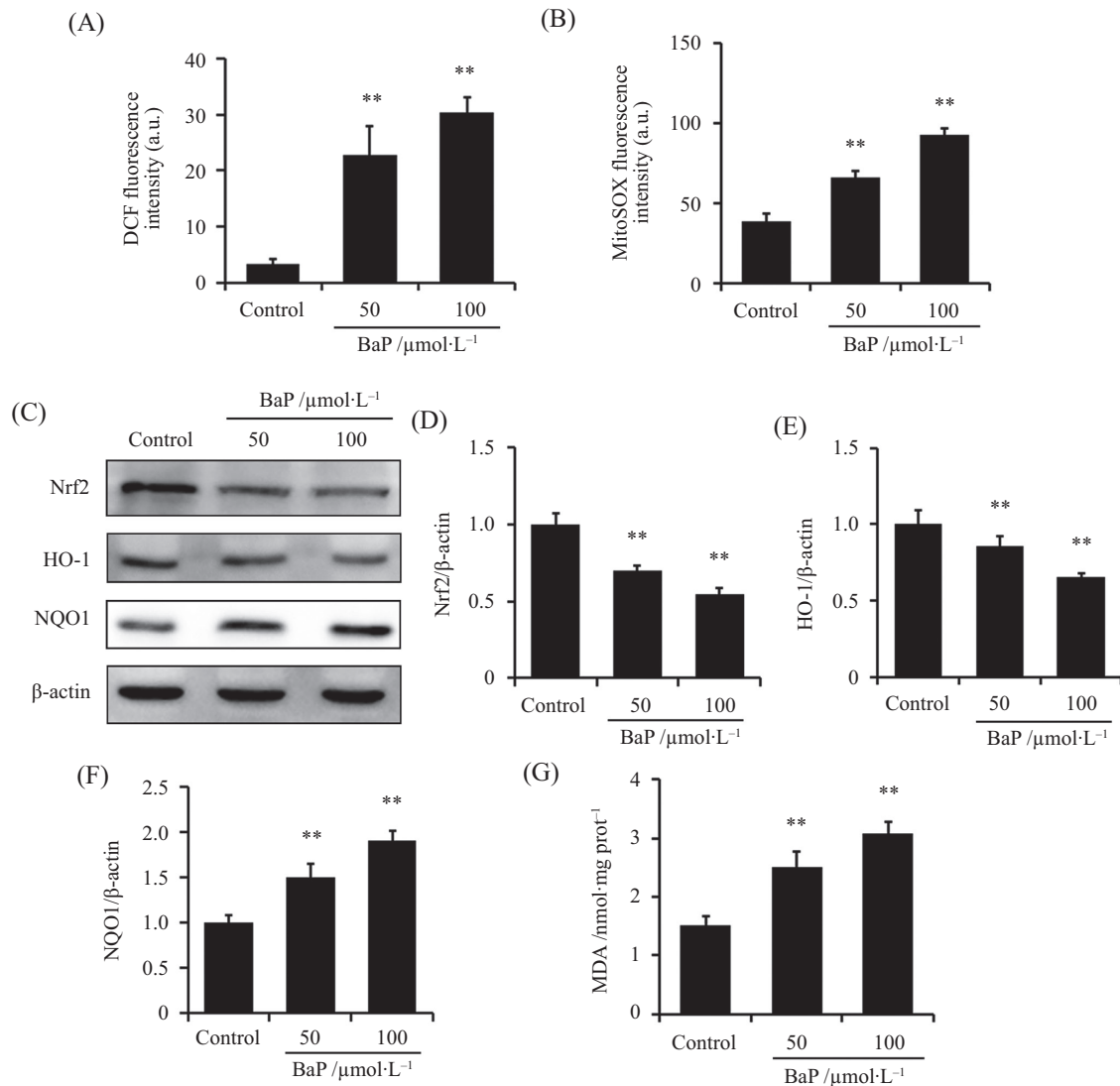


A: Western blot检测LC3、p62、PINK1和Parkin的表达情况; B: LC3-II/LC3-I值; C: p62蛋白相对表达量; D: PINK1蛋白相对表达量; E: Parkin蛋白相对表达量; F: 细胞活性测; G: 细胞死亡率。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$, 与Control组相比; ## $P<0.01$, 与BaP(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比。

A: Western blot detection of LC3, p62, PINK1 and Parkin expression levels; B: the ratio of LC3-II and LC3-I; C: relative protein level of p62; D: relative protein level of PINK1; E: relative protein level of Parkin; F: cell viability assay; G: cell death rate. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ compared with Control group; ## $P<0.01$ compared with BaP (100 $\mu\text{mol/L}$)-treated group.

图5 线粒体分裂抑制剂Mdivi-1可逆转BaP诱导的MLO-Y4细胞线粒体自噬

Fig.5 The mitochondrial fission inhibitor Mdivi-1 reversed BaP-induced mitophagy in MLO-Y4 cells



A: 细胞内ROS水平; B: 细胞内mtROS水平; C: Western blot检测Nrf2、HO-1和NQO1等蛋白表达水平; D: Nrf2蛋白相对表达量; E: HO-1蛋白相对表达量; F: NQO1蛋白相对表达量; G: 细胞中MDA含量; $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P < 0.01$, 与Control组相比。

A: intracellular ROS levels; B: intracellular mtROS levels; C: Western blot detection of Nrf2、HO-1 and NQO1 protein levels; D: relative protein level of Nrf2; E: relative protein level of HO-1; F: relative protein level of NQO1; G: MDA content. $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P < 0.01$ compared with Control group.

图6 BaP可诱导ROS和mtROS过量累积, 触发MLO-Y4细胞氧化应激

Fig.6 BaP promoted overproduction of ROS and mtROS (mitochondrial ROS), thereby initiating oxidative stress in MLO-Y4 cells

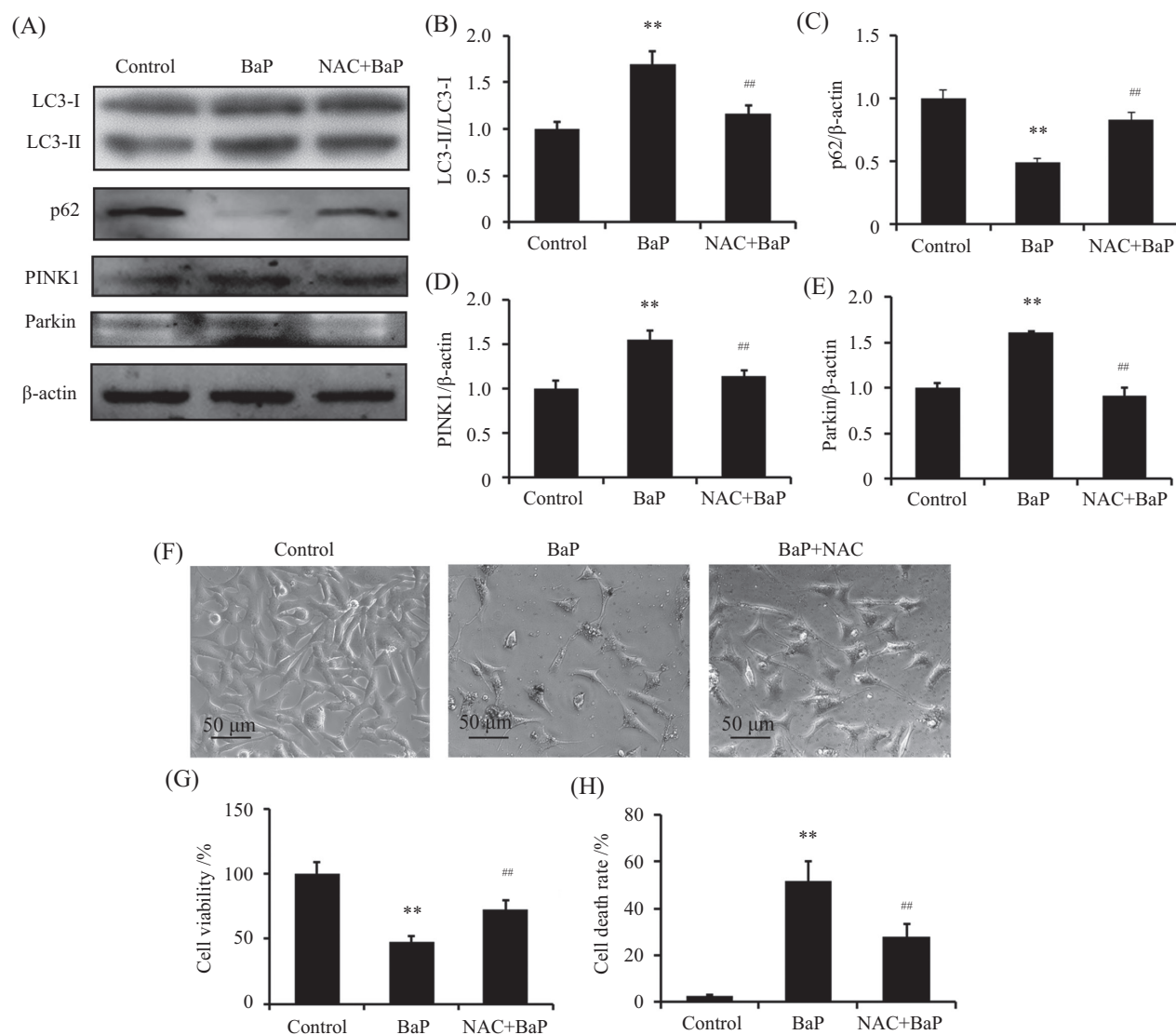
LC3-II/LC3-I值均显著下降, 而p62蛋白表达则明显上调; 同时, NAC处理可明显减轻BaP所致的MLO-Y4细胞形态损伤, 显著提升细胞活力, 降低细胞死亡率。上述结果表明, NAC通过抑制线粒体自噬逆转BaP诱导的MLO-Y4细胞损伤与死亡, 见图7。

3 讨论

环境污染物BaP可抑制骨形成、促进骨吸收, 干扰骨骼正常发育并加重骨关节损伤, 是诱发骨代谢紊乱的重要危险因素^[6-8]。目前BaP调控骨代谢的研究多聚焦于成骨细胞与破骨细胞, 而对骨组织中

数量最为丰富的骨细胞关注较少、相关机制研究也较为匮乏。本课题组前期研究证实, BaP可通过抑制骨细胞活性、诱导骨细胞坏死性凋亡, 进而介导骨代谢异常^[15]。然而, BaP能否通过其他类型死亡介导骨细胞损伤与功能异常, 仍有待进一步深入探究。

骨细胞可调控骨形成与骨吸收的动态过程, 是维持机体骨代谢稳态的关键因素^[9-10]; 其数量异常或功能紊乱, 将直接破坏骨重建的动态平衡, 进而影响骨骼结构与功能稳定。有研究表明, 衰老或糖皮质激素可抑制骨细胞活性并诱导细胞死亡, 进而加剧局部骨吸收^[11-12, 17-19]。Tiede-Lewis等^[17]发现, 衰老能造成



A: Western blot检测LC3、p62、PINK1和Parkin等蛋白表达水平; B: LC3-II/LC3-I值; C: p62蛋白相对表达量; D: PINK1蛋白相对表达量; E: Parkin蛋白相对表达量; F: 细胞形态观察; G: 细胞活性检测; H: 细胞死亡率。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$, 与Control组相比; ## $P<0.01$, 与BaP(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比。

A: Western blot detection of LC3, p62, PINK1 and Parkin protein levels; B: the ratio of LC3-II and LC3-I; C: relative protein level of p62; D: relative protein level of PINK1; E: relative protein level of Parkin; F: cell morphological observation; G: cell viability assay; H: cell death rate. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ compared with Control group; ## $P<0.01$ compared with BaP (100 $\mu\text{mol/L}$)-treated group.

图7 ROS清除剂NAC显著抑制BaP诱导的MLO-Y4细胞线粒体自噬

Fig.7 The ROS scavenger NAC markedly inhibited BaP-induced mitophagy in MLO-Y4 cells

C57BL/6小鼠股骨骨量下降、皮质骨变薄,并伴随骨细胞活力降低。另有研究显示,地塞米松(21 mg/kg/d)可诱导SD大鼠股骨皮质骨细胞凋亡,使凋亡率升高约40%^[19]。本研究结果与本课题组既往研究结论相一致: BaP可显著抑制MLO-Y4细胞活力,促进LDH释放,破坏细胞膜完整性,并提高PI阳性细胞比例,证实BaP能诱导MLO-Y4细胞死亡。本研究选取50、100 $\mu\text{mol/L}$ BaP作为体外染毒浓度,该剂量参考重度污染环境BaP极端暴露水平设定,能够在细胞模型

上模拟高暴露状态下BaP诱发的骨毒性损伤。对比已有文献,该染毒浓度略高于可致牙周膜细胞、骨骼肌C2C12细胞损伤的给药剂量^[20-21],提示MLO-Y4骨细胞对BaP的毒性耐受性更强。需要说明的是,本研究重点探讨BaP诱导MLO-Y4细胞活力下降及细胞死亡效应,未对凋亡、坏死等具体死亡类型进行界定;后续将开展多通路死亡分型实验,进一步精准区分细胞死亡类型。

线粒体自噬是一类高度保守的选择性自噬,可

特异性清除细胞内受损线粒体,是维持细胞稳态的重要调控机制。PINK1/Parkin通路是调控线粒体自噬的经典核心通路,该通路异常活化与骨细胞损伤、骨代谢紊乱等病理改变密切相关^[14,22-24]。Yuan团队^[23]与Hu团队^[24]先后于2022年、2025年研究发现,糖皮质激素可通过激活PINK1依赖的线粒体自噬通路,上调组织蛋白酶K的表达与分泌,进而加剧骨丢失;敲低PINK1则明显抑制糖皮质激素诱发的骨吸收^[23]。然而,线粒体自噬在BaP介导MLO-Y4细胞损伤与死亡中的作用目前尚不明确。本研究首先检测了经典自噬标志物的表达情况,结果显示,BaP可上调LC3-II蛋白表达,促进LC3-I向LC3-II转化并下调自噬底物p62表达,提示BaP能激活MLO-Y4细胞自噬。为验证自噬流的完整性,本研究采用自噬晚期抑制剂Baf A1进行干预,证实BaP可显著提升MLO-Y4细胞自噬通量,排除了自噬降解受阻引发的蛋白异常蓄积假象。结合自噬起始抑制剂3-MA的干预结果进一步证实,BaP诱导的MLO-Y4细胞线粒体自噬属于致死性自噬。在明确MLO-Y4细胞自噬被激活的基础上,本研究开展特异性线粒体自噬相关研究。结果表明,BaP可造成线粒体损伤,显著上调线粒体自噬关键调控蛋白PINK1、Parkin的表达;同时增强LC3B与线粒体的共定位,促使LC3B在线粒体膜上聚集,这说明BaP可活化PINK1/Parkin通路,诱导MLO-Y4细胞线粒体自噬。本研究引入线粒体分裂特异性抑制剂Mdivi-1进行干预实验,发现抑制线粒体分裂后,BaP介导的线粒体自噬及细胞损伤均被显著逆转,证明线粒体分裂是调控线粒体自噬的上游关键环节。本研究结论与既往BaP诱导心肌细胞线粒体自噬依赖性死亡报道相符^[25-26],提示线粒体自噬介导的细胞死亡是BaP发挥细胞毒性的重要共性机制。本研究仅初步证实BaP诱导的线粒体自噬与PINK1/Parkin通路活化存在同步改变的特征,至于该通路是否在BaP介导的线粒体自噬中发挥核心调控作用,其内在分子调控机制与因果关联,仍有待后续通过基因敲低、过表达等功能干预实验进一步深入验证。

已有研究表明,线粒体自噬异常激活与ROS蓄积所致氧化应激密切相关^[22-23]。据报道,BaP进入机体后可经细胞色素P450代谢生成高毒性中间产物二羟环氧苯并芘(benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, BPDE),进而诱导ROS大量蓄积并触发氧化

应激损伤^[27]。本研究同样证实,BaP可升高细胞内ROS和mtROS水平,下调Nrf2、HO-1等核心抗氧化分子表达,并促进脂质过氧化产物MDA异常累积,最终造成MLO-Y4细胞氧化损伤。Nrf2核转位是维持细胞氧化还原稳态的核心环节,生理状态下Nrf2主要分布于细胞质,核转位入核后激活下游抗氧化靶基因转录,进而调控细胞抗氧化功能。结合本研究实验结果,我们推测:BaP可通过抑制Nrf2核转位,减少细胞核内Nrf2的富集,进而阻滞HO-1等抗氧化基因的转录表达,直接削弱细胞抗氧化能力。在此基础上,BaP持续刺激造成MLO-Y4细胞内ROS和mtROS过载,进一步加剧抗氧化系统功能耗竭,诱导线粒体结构损伤与碎片化,并通过氧化修饰Parkin关键半胱氨酸残基解除其自抑制构象,激活E3泛素连接酶活性,活化PINK1/Parkin通路并介导线粒体自噬,最终引发MLO-Y4细胞损伤^[28]。为进一步阐明ROS及氧化应激在BaP诱导的MLO-Y4细胞线粒体自噬过程中的调控作用,本研究采用ROS清除剂NAC进行干预实验,结果显示,NAC可显著逆转BaP诱导的线粒体自噬关键蛋白(LC3、p62、PINK1及Parkin)表达紊乱,有效阻断线粒体自噬激活,显著恢复细胞活力并降低细胞死亡率。据此,我们推测BaP可通过ROS介导的线粒体自噬通路诱导MLO-Y4细胞死亡。

本研究仍存在一定局限性。本研究仅通过体外细胞实验阐释了BaP的骨毒性机制,尚未在动物体内验证其对骨细胞的调控效应与作用规律。后续研究将构建BaP暴露小鼠骨损伤模型,结合体内外实验结果进一步完善“BaP通过诱导骨细胞线粒体自噬依赖性死亡引发骨组织损伤”的分子调控网络。该研究体系有望丰富BaP致骨骼损伤的相关理论,为同类环境污染物骨毒性研究以及骨代谢损伤疾病的靶向防治提供理论依据与实验参考。

4 结论

BaP促使ROS异常蓄积,诱导线粒体过度分裂,进而激活PINK1/Parkin信号通路,触发线粒体自噬,最终通过线粒体自噬途径介导MLO-Y4骨细胞死亡。

参考文献 (References)

- [1] Kim K H, Jahan S A, Kabir E, et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects [J]. Environment International, 2013, 60: 71-80.
- [2] Jang H J, Min H Y, Kang Y P, et al. Tobacco-induced hypergly-

- cemia promotes lung cancer progression via cancer cell-macrophage interaction through paracrine IGF2/IR/NPM1-driven PD-L1 expression [J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4909.
- [3] Li X, Zhou S, Zhou X L, et al. EphA/EphrinA5 signaling pathway involved in the abnormal synaptic remodeling and neurotoxicity caused by benzo[a]pyrene [J]. *Neurotoxicology*, 2025, 111: 103319.
- [4] Zhang R R, Zhang C Q, Jia Y X, et al. Mitochondrial targeting of GSDMD-N and p-MLKL drives PANoptosis in benzo[a]pyrene-induced hepatotoxicity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2026, 74(10): 8758-8770.
- [5] Huang K Y, Liu S, Yu Y W, et al. 3, 4-benzopyrene aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury-induced pyroptosis through inhibition of autophagy-dependent NLRP3 degradation [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 254: 114701.
- [6] 何明杰. 烟草烟雾成分BaP和Cd对骨骼肌毒性的分子及细胞机制研究[M]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [7] An L Q, Shi Q, Fan M T, et al. Benzo[a]pyrene injures BMP2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through AhR reducing BMPRII [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 203: 110930.
- [8] Zheng J F, Li S, Yao W X. Elucidating the mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbons-induced osteoporosis through network toxicology and molecular docking approaches: BaP as a model compound [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2026, 310: 119739.
- [9] Lecka-Czernik B, Khan M P, Letson J, et al. Regulatory effect of osteocytes on extramedullary and bone marrow adipose tissue development and function [J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2024, 22(3): 301-307.
- [10] 刘少强, 邱雪, 李锐冬, 等. 骨细胞铁超载通过INSL3通路抑制成骨细胞成骨功能对绝经后骨质疏松症的影响的研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(11): 2879-2892.
- Liu S Q, Qiu X, Li R D, et al. The impact of osteocytic iron overload on postmenopausal osteoporosis through inhibiting the osteoblast osteogenesis via INSL3 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2025, 47(11): 2879-2892.
- [11] Farr J N, Kaur J, Doolittle M L, et al. Osteocyte cellular senescence [J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2020, 18(5): 559-567.
- [12] Ekeuku S O, Zarir S Z, Razali A N, et al. Palm tocotrienol preserves trabecular osteocyte indices and modulates the expression of osteocyte markers in ovariectomized rats [J]. *Biomedicines*, 2025, 13(5): 1220.
- [13] Zhang Y, Yan M, Shan W Y, Bisphenol A induces pyroptotic cell death via ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway in osteocytes MLO-Y4 [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 159: 112772.
- [14] 王子晗, 莘裕辰, 张云, 等. 青蒿琥酯对氟化钠所致骨细胞MLO-Y4凋亡和线粒体自噬的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2024, 38(3): 183-193.
- Wang Z H, Shen Y C, Zhang Y, et al. Effect of artesunate on NaF-induced apoptosis and mitophagy in osteocytes MLO-Y4 [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2024, 38(3): 183-193.
- [15] Zhang T, Shen Y C, Zhu R R, et al. Benzo[a]pyrene exposure promotes RIP1-mediated necroptotic death of osteocytes and the JNK/IL-18 pathway activation via generation of reactive oxygen species [J]. *Toxicology*, 2022, 476: 153244.
- [16] 吴玉, 罗智, 胡春华, 等. 木香桉内酯通过抑制线粒体凋亡和自噬来减轻阿霉素诱导的心肌细胞损伤[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(11): 2855-2866.
- Wu Y, Luo Z, Hu C H, et al. Costunolide reduces doxorubicin-induced cardiomyocyte injury by inhibiting mitochondrial apoptosis and autophagy [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2025, 47(11): 2855-2866.
- [17] Tiede-Lewis L M, Dallas S L. Changes in the osteocyte lacuno-canalicular network with aging [J]. *Bone*, 2019, 122: 101-113.
- [18] Wang Z X, Zhang X F, Cheng X, et al. Inflammation produced by senescent osteocytes mediates age-related bone loss [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1114006.
- [19] Zhang X L, Yang Z H, Xu Q, et al. Dexamethasone induced osteocyte apoptosis in steroid-induced femoral head osteonecrosis through ROS-mediated oxidative stress [J]. *Orthopaedic Surgery*, 2024, 16(3): 733-744.
- [20] Monnouchi S, Maeda H, Yuda A, et al. Benzo[a]pyrene/aryl hydrocarbon receptor signaling inhibits osteoblastic differentiation and collagen synthesis of human periodontal ligament cells [J]. *Journal of Periodontal Research*, 2016, 51(6): 779-788.
- [21] Wu S E, Hsu J C, Chang Y L, et al. Benzo[a]pyrene exposure in muscle triggers sarcopenia through aryl hydrocarbon receptor-mediated reactive oxygen species production [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 239: 113599.
- [22] Yang P, Xu B B, Zhu R R, et al. ROS-mediated mitophagy and necroptosis regulate osteocytes death caused by TCP particles in MLO-Y4 cells [J]. *Toxicology*, 2023, 496: 153627.
- [23] Yuan J, Gao Y S, Liu D L, et al. PINK1-mediated mitophagy contributes to glucocorticoid-induced cathepsin K production in osteocytes [J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2022, 38: 229-240.
- [24] Hu Y H, Lu H D, Fang H J, et al. Targeting SIRT3 to regulate mitophagy-dependent ferroptosis for preventing glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *International Journal of Surgery*, 2025, 111(10): 6647-6662.
- [25] 吴博森. 苯并芘通过调控细胞焦亡及线粒体自噬加重心肌梗死损伤[M]. 温州: 温州医科大学, 2023.
- [26] Wu B S, Xiang H Q, Yu Y W, et al. 3, 4-benzo[a]pyrene aggravates myocardial infarction injury by activating NLRP3-related pyroptosis through PINK1/Parkin-mitophagy-mPTP opening axis [J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 122: 110481.
- [27] Bukowska B, Mokra K, Michalowicz J. Benzo[a]pyrene-environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(11): 6348.
- [28] Han M Q, Zhao M Y, Bai F R, et al. Reactive oxygen species (ROS) drive osteocyte dysfunction in diabetic osteoporosis by impairing autophagy and triggering apoptosis [J]. *Antioxidants*, 2025, 14(11): 1306.