

张丰泉,董恩恒,薛玉雪. PM<sub>2.5</sub>短期暴露对大鼠子宫组织的损伤及其作用机制[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 740-746.  
Zhang FQ, Dong EH, Xue YX. Effect and mechanism of short-term exposure to PM<sub>2.5</sub> on the rat uterine injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 740-746.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.008

# PM<sub>2.5</sub>短期暴露对大鼠子宫组织的损伤及其作用机制

张丰泉,董恩恒\*,薛玉雪

(新乡医学院 公共卫生学院 新乡市大气污染健康效应与干预重点实验室,河南 新乡 453000)

**【摘要】** 目的 为研究PM<sub>2.5</sub>(空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物)短期暴露对大鼠子宫的损伤作用及可能的分子机制。方法 30只雌性SD大鼠随机分为生理盐水对照组、1.5 mg/(kg·bw)PM<sub>2.5</sub>低剂量暴露组和6 mg/(kg·bw)PM<sub>2.5</sub>高剂量暴露组,连续暴露30 d。HE染色病理学检查观察PM<sub>2.5</sub>暴露后子宫组织损伤情况。采用TUNEL法和检测cleaved caspase-3蛋白表达量的方法观察各组大鼠子宫组织细胞凋亡情况。荧光定量PCR法检测子宫中葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、蛋白激酶样内质网激酶(PERK)、真核翻译起始因子2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )和C/EBP同源蛋白(CHOP)mRNA表达水平。Western blot检测子宫内质网应激相关蛋白表达水平。结果 PM<sub>2.5</sub>短期暴露后,子宫内膜上皮细胞萎缩,细胞间隙增大,且细胞出现空泡化;同时腺体也出现萎缩。TUNEL检测结果显示,对照组大鼠子宫组织细胞的凋亡率为(9.93 $\pm$ 1.66)%,低剂量和高剂量暴露组子宫组织细胞凋亡率分别为(29.40 $\pm$ 6.96)%和(43.58 $\pm$ 8.23)%,暴露组细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组相比,暴露组子宫中GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$ 和CHOP基因和蛋白表达水平均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。暴露组子宫cleaved caspase-3蛋白表达量明显高于对照组( $P < 0.05$ )。结论 PM<sub>2.5</sub>短期暴露可损伤大鼠子宫组织形态,其作用机制可能与PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP信号通路介导子宫组织发生内质网应激反应,进而诱导子宫组织细胞凋亡有关。

**【关键词】** PM<sub>2.5</sub>;内质网应激;TUNEL;凋亡

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)06-0740-07

## Effect and mechanism of short-term exposure to PM<sub>2.5</sub> on the rat uterine injury

ZHANG Fengquan, DONG Enheng\*, XUE Yuxue

(Key Laboratory for Air Pollution Health Effects and Intervention of Xinxiang, School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Corresponding author: DONG Enheng. E-mail: dongphmu@163.com

**【Abstract】 Objective** This study was designed to evaluate the effect of short-term exposure to the particulate matter with diameters that are generally 2.5  $\mu\text{m}$  and smaller (PM<sub>2.5</sub>) on the rat uterine injury, and to determine its mechanism. **Methods** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into: a control group, a 1.5 mg/kg body-weight (bw) low-dose PM<sub>2.5</sub> exposure group and a 6 mg/(kg·bw) high-dose PM<sub>2.5</sub> exposure group, all of which were followed for 30 days. The pathological uterine changes were observed with hematoxylin-eosin staining (HE staining). Uterine apoptosis was evaluated with the TUNEL method, and the expression levels of cleaved caspase-3 were measured. In addition, the mRNA expression levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78), PER-like ER kinase (PERK), eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) and C/EBP homologous protein (CHOP) were measured with quantitative real-time PCR, and the protein levels involved in the PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP signal pathway were tested using western blot assay. **Results** After

**【基金项目】** 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN017)。

Funded by Support Program for Henan University Scientific and Technological Innovation Team (14IRTSTHN017).

**【作者简介】** 张丰泉(1985—),男,硕士,研究方向:颗粒物对健康的影响。Email: zhangfengquan29@126.com

**【通信作者】** 董恩恒(1978—),男,博士,研究方向:空气污染物生物效应、机制及干预措施。Email: dongphmu@163.com

short-term exposure,  $PM_{2.5}$  resulted in atrophy and vacuolization of endometrial epithelial cells and glands. The apoptosis rates were  $(9.93 \pm 1.66)\%$ ,  $(29.40 \pm 6.96)\%$  and  $(43.58 \pm 8.23)\%$  in the uteruses in the control, low-dose exposure and high-dose exposure groups, respectively. Furthermore, the apoptosis rate was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the two exposure groups than in the control group. At the same time, the cleaved caspase-3 protein expression levels in the two exposure groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The results of qPCR and western blot showed that the mRNA and protein levels of GRP78, PERK, eIF2 $\alpha$  and CHOP in the two exposure groups were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** After short-term exposure to  $PM_{2.5}$ , the uterine structure of the rats is damaged, possibly as a consequence of  $PM_{2.5}$  inducing uterine cell apoptosis via ERs, mediated by the PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP pathway.

**【Keywords】**  $PM_{2.5}$ ; endoplasmic reticulum stress; TUNEL; apoptosis

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

颗粒物 (particulate matter, PM) 是空气污染物的重要组成成分,按粒径分为总悬浮颗粒物 (TSP)、可吸入颗粒物 ( $PM_{10}$ )、细颗粒物 ( $PM_{2.5}$ ) 和超细颗粒物 ( $PM_{0.1}$ )。研究证实  $PM_{2.5}$  是多种疾病的重要危险因素,可诱发呼吸系统、心血管系统和代谢性疾病。流行病学调查结果显示,  $PM_{2.5}$  能够抑制胎儿发育,导致不良妊娠结局<sup>[1-2]</sup>,因而  $PM_{2.5}$  被认为是生殖系统的危害因素之一。我们前期实验结果证实,  $PM_{2.5}$  急性暴露能影响妊娠结局,使雌鼠的不良妊娠率明显升高<sup>[3]</sup>。但目前  $PM_{2.5}$  生殖损伤的研究主要集中于流行病学调查方面,而其生殖损伤致病机理的研究还非常有限。

内质网不仅是细胞内蛋白质、脂类和糖类合成的基地,而且是细胞内重要的物质传输和信号传导通路。已有研究证实内质网应激与多种疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病、糖尿病等)的发生、发展相关<sup>[4]</sup>。另有研究发现,内质网应激在  $PM_{2.5}$  诱发肺、肝损伤中被激活,是  $PM_{2.5}$  致肺脏和肝脏损伤的重要作用机制<sup>[5]</sup>。最新的研究发现,内质网应激同样在  $PM_{2.5}$  的斑马鱼胚胎发育损伤中起重要作用<sup>[6]</sup>。内质网应激能够激活促凋亡基因 caspase-3 进而诱发细胞凋亡。已有研究证实凋亡是子宫细胞死亡的重要方式,对子宫起重要调节作用<sup>[7-8]</sup>。本研究中将雌鼠暴露  $PM_{2.5}$  后,检测子宫组织内质网应激信号通路相关蛋白及其下游凋亡调控蛋白 caspase-3 的表达情况,进而阐述内质网应激在  $PM_{2.5}$  生殖毒性中的作用和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只 8 周龄清洁级雌性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司

**【SCXK(京)2012-0001】**,饲养于新乡医学院屏障动物房**【SYXK(豫)2014-0005】**,室温 22 ~ 24℃,12 h/12 h 昼夜交替,相对湿度 50% ~ 60%,适应性喂养 1 周。所有操作均符合实验动物福利和伦理委员会的要求(XXMU-2015-0021)。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 96, Roche, 瑞士),蛋白垂直电泳系统 (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, 美国),凝胶成像分析系统 (FluorChem R, ProteinSimple, 美国),显微镜 (AE2000, 麦克奥迪, 中国),TUNEL 原位染色试剂盒 (TACS·XL DAB Kit, Trevigen, 美国),TRIzol 和荧光定量 PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司,GRP78、PERK、CHOP、eIF2 $\alpha$  和 cleaved caspase-3 一抗购于 Abcam 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 实验动物分组

参考已有研究设计本次实验  $PM_{2.5}$  暴露剂量。将 30 只雌鼠随机分为生理盐水对照组 (Con)、1.5 mg/(kg·bw)  $PM_{2.5}$  低剂量暴露组 (L-Exp) 和 6 mg/(kg·bw)  $PM_{2.5}$  高剂量暴露组 (H-Exp)<sup>[9]</sup>,每组 10 只。

### 1.2.2 $PM_{2.5}$ 染毒

将收集的  $PM_{2.5}$  配置成 3 mg/mL 低浓度和 12 mg/mL 高浓度悬液,配置方法参照我们前期的实验<sup>[3]</sup>。将制备的  $PM_{2.5}$  悬液复温重悬后,参照晋乐飞等<sup>[10]</sup>吸入式气管暴露法进行  $PM_{2.5}$  染毒。大鼠麻醉后,用棉线绳挂住大鼠上切牙将大鼠垂直悬挂,镊子拉出大鼠舌头,吸取 50  $\mu$ L/100 (g·bw)  $PM_{2.5}$  悬液注入大鼠舌根部,并快速捏紧大鼠鼻腔,迫使大鼠经口腔将  $PM_{2.5}$  液吸入肺内,当听到肺部湿罗音表示吸入成功。染毒后,大鼠自由活动,连续染毒 30 d。对照组采用同样的方法吸入 50  $\mu$ L/100 (g·bw) 的生理盐水。

### 1.2.3 子宫组织病理学观察

取新鲜组织用生理盐水漂洗,4%多聚甲醛固定,酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切成 5~6  $\mu\text{m}$  厚的切片,常规 HE 染色,显微镜下观察子宫组织病理学变化。

### 1.2.4 子宫组织细胞凋亡检测

采用 TUNEL 原位染色法检测子宫组织细胞凋亡情况。常规方法将子宫组织石蜡切片脱蜡、复水处理,然后严格按照试剂盒说明进行组织切片标记染色。滴加 2%蛋白酶 K(V/V),室温孵育 15 min,去离子水漂洗 2 次(每次 5 min)。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ (V/V) 浸润 5 min 以灭活组织中的过氧化氢酶,去离子水漂洗 1 min。滴加 50  $\mu\text{L}$  混合标记试剂,湿盒中 37 $^\circ\text{C}$  孵育 1 h,然后加入 100  $\mu\text{L}$  反应终止液,PBS 漂洗 2 次,每次 2 min。切片上滴加 50  $\mu\text{L}$  抗体液,湿盒中 37 $^\circ\text{C}$  孵育 30 min,PBS 漂洗 2 次。滴加 50  $\mu\text{L}$

Strep-HRP 液,湿盒中室温孵育 10 min,PBS 漂洗 2 次,然后加入 100  $\mu\text{L}$  DAB 液显色 3 min,去离子水漂洗 2 次,每次 2 min。1%甲基绿复染 30 s,然后梯度酒精脱水、二甲苯浸润透明、封片,显微镜下观察计数凋亡细胞。在 $\times 200$  镜下每张切片随机选择 5 个视野,计数细胞总数和凋亡细胞数,计算细胞的凋亡率,每组计数 6 个样本。

### 1.2.5 子宫组织中内质网应激相关基因和 caspase-3 mRNA 表达检测

TRIzol 试剂盒提取子宫组织总 RNA,反转录合成 cDNA。荧光定量 PCR 法检测 GRP78、PERK、CHOP 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 表达水平。目的基因引物序列见表 1。扩增反应条件:95 $^\circ\text{C}$  5 min,95 $^\circ\text{C}$  30 s,60 $^\circ\text{C}$  20 s,45 个循环。用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  值计算目的基因的相对表达量。每组检测 6 个样本。

表 1 荧光定量 PCR 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes for Real-Time PCR

基因 Gene	上游引物 Forward	下游引物 Reverse
GRP78	CCTGTTGCTGGACTCTGTGA	GAATACACCGACGCAGGAAT
PERK	AGGAACATCGTAGGGGCTTT	GAGTTGCAGACCCGAGCTAC
CHOP	GAGAAGGAGCAGGAGAAC	GACAGACAGGAGGTGATG
eIF2 $\alpha$	TTTAAGGGAGTGGCTTGATTT	AGGTTGGGATTGTTGGTGTCT
$\beta$ -actin	GATCTGGCACCACCTTCT	GGGGTGTGAAGTCTCAA

### 1.2.6 子宫组织中内质网应激相关蛋白和 cleaved caspase-3 蛋白表达检测

提取子宫组织中的总蛋白,并用 BCA 试剂盒测定样品蛋白含量。取 25  $\mu\text{g}$  蛋白样品,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,将目的蛋白分别转膜至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 1.5 h,加入 GRP78 一抗(1:200)、PERK 一抗(1:500)、eIF2 $\alpha$  一抗(1:500)、CHOP 一抗(1:300)、cleaved caspase-3 一抗(1:500)、 $\beta$ -actin 一抗(1:3000),4 $^\circ\text{C}$  孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5000)室温孵育 90 min,ECL 发光,凝胶成像系统成像并分析。每组检测 6 个样本。

### 1.3 统计学分析

SPSS 19.0 进行统计学分析,实验数据以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较时,方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Tamhane's T2 法,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 子宫组织病理学改变

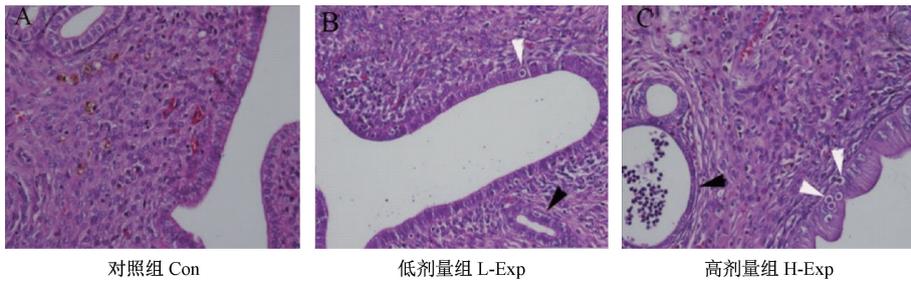
不同剂量  $\text{PM}_{2.5}$  暴露后,雌鼠子宫组织的病理

学改变见图 1。对照组可观察到正常的子宫内膜单层柱状上皮细胞,且排列比较紧密和结构完整的腺体;同时固有层中含有丰富的基质细胞(图 1A)。低剂量暴露组子宫内膜上皮细胞发生不同程度的萎缩,细胞间隙增大,且少数细胞出现空泡化;腺体细胞同样发生萎缩变薄(图 1B)。高剂量组子宫内膜上皮进一步萎缩,空泡化细胞增多;腺体细胞萎缩更严重(图 1C)。

### 2.2 子宫组织细胞凋亡检测结果

镜下观察组织细胞如发生凋亡会被 TUNEL 染成深褐色(见图 2)。对照组大鼠子宫组织细胞的凋亡率为(9.93 $\pm$ 1.66)%,低剂量暴露组子宫组织细胞凋亡率为(29.40 $\pm$ 6.96)%。与对照组相比,低剂量暴露组细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。高剂量暴露组细胞凋亡率为(43.58 $\pm$ 8.23)%,其凋亡率明显高于对照组( $P < 0.01$ )和低剂量组( $P < 0.05$ )。

### 2.3 $\text{PM}_{2.5}$ 对子宫组织 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$ 、CHOP mRNA 表达水平的影响

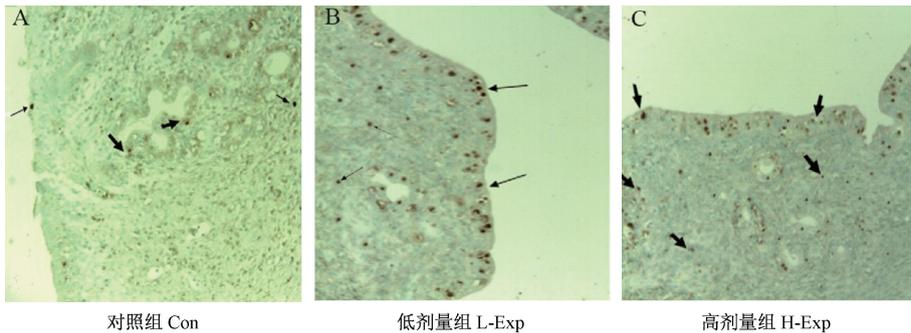


注:白色箭头:空泡化的上皮细胞;黑色箭头:萎缩的腺体。

图 1 子宫组织病理学改变( $\times 400$ )

Note. White arrow, vacuolated epithelial cells. Black arrow, atrophic glands.

Figure 1 Pathological changes in the uterine tissues( $\times 400$ )



注:黑色箭头:凋亡细胞。

图 2 TUNEL 凋亡检测结果( $\times 200$ )

Note. Black arrows, apoptotic cells.

Figure 2 Detection of apoptosis in the uterine tissues(TUNEL staining, $\times 200$ )

子宫内质网应激相关基因 mRNA 相对表达量见图 3。与对照相比,低剂量和高剂量  $PM_{2.5}$  暴露组大鼠子宫 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$ 、CHOP mRNA 表达量均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

与低剂量暴露组相比,高剂量暴露组中 GRP78、PERK mRNA 的相对表达量明显升高( $P < 0.05$ );CHOP 和 eIF2 $\alpha$  表达量虽高于低剂量暴露组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

#### 2.4 $PM_{2.5}$ 对子宫组织内质网应激相关蛋白和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平的影响

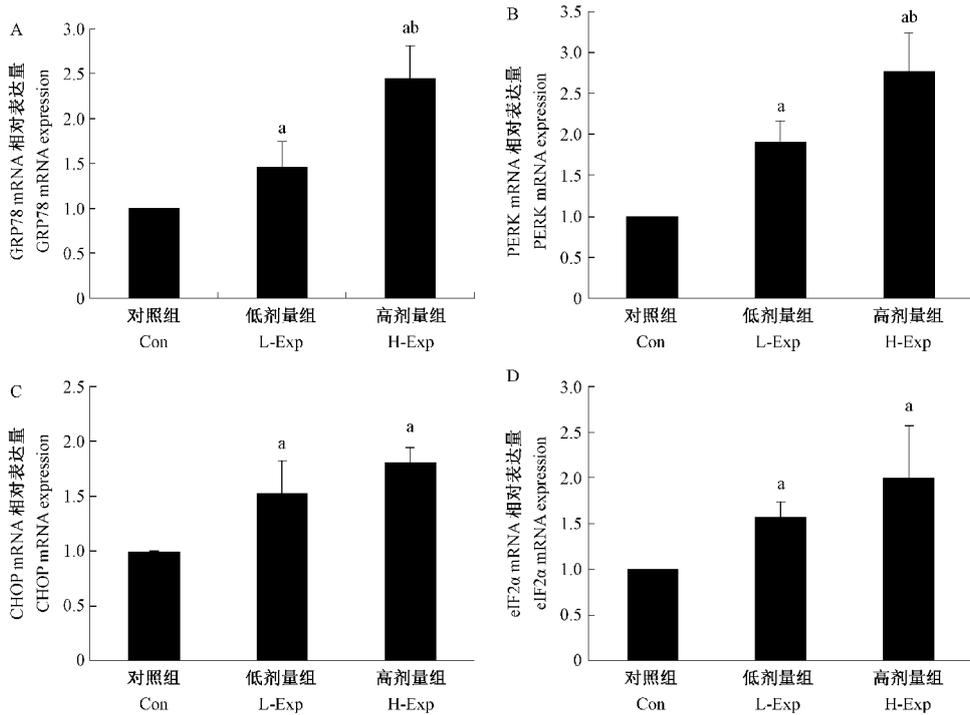
短期  $PM_{2.5}$  暴露后,低剂量和高剂量暴露组大鼠子宫中内质网应激相关蛋白 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$ 、CHOP 的蛋白表达量均明显高于对照组( $P < 0.05$ )(图 4A-D)。与低剂量暴露组相比,高剂量暴露组中 GRP78、PERK 和 eIF2 $\alpha$  蛋白表达量明显升高( $P < 0.05$ );CHOP 表达量虽高于低剂量暴露组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

与对照组相比,低剂量和高剂量暴露组子宫中 cleaved caspase-3 蛋白的表达量均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 4E)。

### 3 讨论

研究指出,随着空气污染的持续,空气污染相关疾病的发病率和死亡率将不断升高,到 2050 年时每年将有 660 万人死于空气污染相关疾病<sup>[11]</sup>。越来越多的研究显示,孕期暴露  $PM_{2.5}$  对胎儿的发育和分娩产生不良的影响<sup>[1-2,12-13]</sup>。Son 等<sup>[14]</sup>的研究指出, $PM_{2.5}$  暴露可使新生儿死亡率升高 2.66 倍。另有研究结果显示,妊娠期暴露  $PM_{2.5}$  仅对新生儿出生体重有明显影响,但对妊娠周期没有影响,不会造成新生儿早产(OR = 0.86)<sup>[15]</sup>。但也有研究结果却显示  $PM_{2.5}$  对妊娠结局没有影响<sup>[16]</sup> 或影响非常有限<sup>[17]</sup>。目前  $PM_{2.5}$  的生殖毒性以及其对妊娠结局影响的研究结果存在差异性和不一致性的原因可能与调查对象所处妊娠时期、暴露  $PM_{2.5}$  浓度和时长以及不同地区  $PM_{2.5}$  所含化学成分不同等有关。虽然我们早期的实验证实, $PM_{2.5}$  暴露对妊娠结局有不良影响<sup>[3]</sup>,但目前  $PM_{2.5}$  生殖毒性的作用机制还不太清楚。

目前关于空气中  $PM_{2.5}$  对机体损伤效应的实验大多是急性毒性实验,为了研究更长时间  $PM_{2.5}$  暴

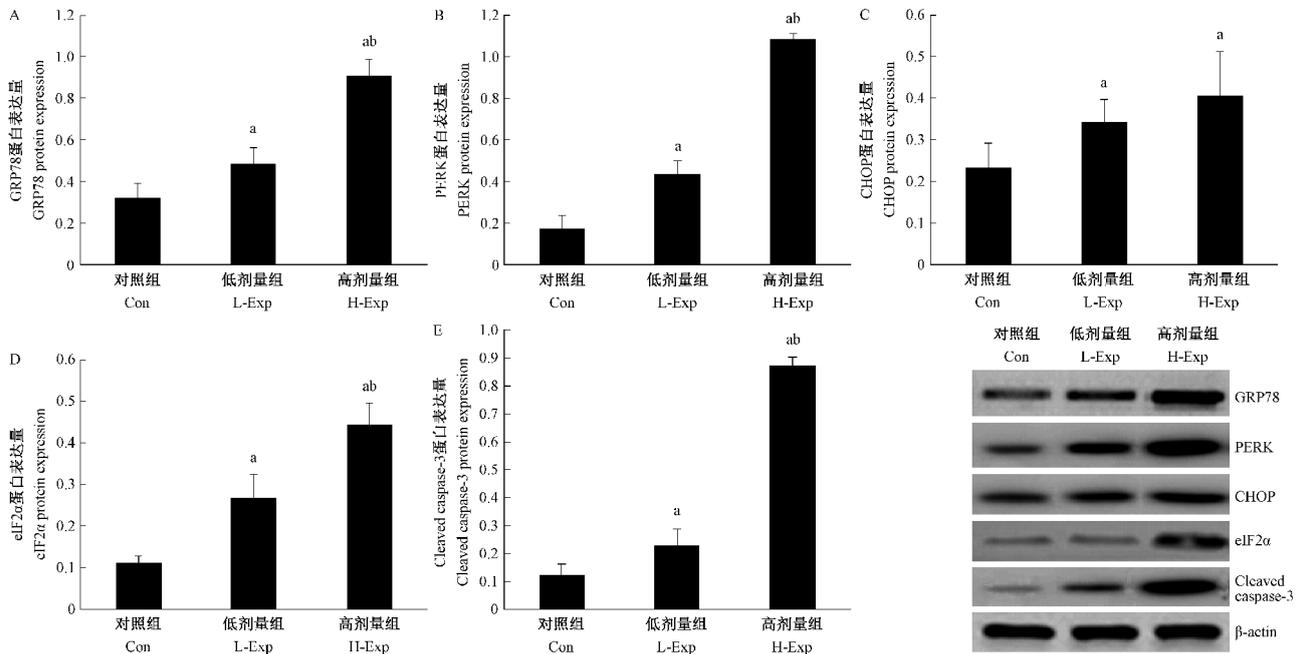


注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与低剂量暴露组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 PM<sub>2.5</sub>对 GRP78、PERK、CHOP 和 eIF2α mRNA 表达的影响

Note. Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with the L-Exp group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

Figure 3 Effects of PM<sub>2.5</sub> on the mRNA expressions of GRP78, PERK, CHOP and eIF2α



注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与低剂量暴露组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 PM<sub>2.5</sub>对子宫内质网应激相关蛋白和 cleaved caspase-3 蛋白表达的影响

Note. Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with the L-Exp group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

Figure 4 Effects of PM<sub>2.5</sub> on the expression of protein of endoplasmic reticulum stress and cleaved caspase-3

露的毒性作用,本次实验将 SD 雌鼠的暴露时间延长为 30 d 的短期暴露,从而观察 PM<sub>2.5</sub> 对雌鼠子宫损伤效应。PM<sub>2.5</sub> 短期暴露后,雌鼠子宫组织结构发生了明显的病理损伤变化,造成子宫内膜上皮细胞萎缩,细胞间隙增大,且细胞出现空泡化;同时腺体也出现萎缩现象(见图 1),由此结果可见空气中 PM<sub>2.5</sub> 短期暴露对子宫组织结构有损伤,PM<sub>2.5</sub> 具有生殖毒性。

已有研究证实 PM<sub>2.5</sub> 可通过活化 T-细胞免疫蛋白和 TIM 蛋白,进而诱发肺组织凋亡<sup>[18]</sup>。Yang 等<sup>[19]</sup>的研究发现,心肌细胞暴露 PM<sub>2.5</sub> 后,细胞中的氧化应激水平升高,触发 bcl-2-bax-caspase-3 凋亡信号,进而诱发心肌细胞凋亡。由此可见 PM<sub>2.5</sub> 可通过多途径诱导组织细胞发生凋亡。本次研究中我们采用 TUNEL 法检测雌鼠短期暴露 PM<sub>2.5</sub> 后子宫组织细胞凋亡情况。实验结果表明,低剂量和高剂量 PM<sub>2.5</sub> 暴露组细胞凋亡率均明显高于对照组。caspase-3 是 caspase 家族中具有重用凋亡调控重用的蛋白,也是内质网应激信号通路下游重要的凋亡调节蛋白,而 cleaved caspase-3 蛋白是反映凋亡的标志蛋白。本实验中为了验证子宫细胞凋亡的发生,我们同时检测了子宫 cleaved caspase-3 蛋白表达水平。实验结果表明,低剂量和高剂量 PM<sub>2.5</sub> 暴露组子宫 cleaved caspase-3 蛋白表达量明显高于对照组(结果见图 4E),与 TUNEL 检测结果相一致。由以上结果可知短期暴露 PM<sub>2.5</sub> 可诱导子宫细胞发生凋亡,进而推测 PM<sub>2.5</sub> 生殖损伤作用可能与其诱发的细胞凋亡有关。

内质网不仅是合成和分泌蛋白的场所,同时还可介导细胞的凋亡信号通路<sup>[20]</sup>。内质网功能混乱会使未折叠或错误折叠的蛋白堆积于细胞内,并诱发内质网应激反应。过强的内质网应激导致细胞发生未折叠蛋白质应答反应(UPR),进而触发细胞内的凋亡信号传导通路,诱发细胞凋亡。UPR 主要受到跨膜蛋白如 PERK、肌醇酶 1(IRE1)和活化转录因子 6(ATF6)调控。这些跨膜蛋白通常是以与 GRP78 结合的复合形态存在于内质网膜上。当未折叠蛋白过度堆积时,GRP78 会与跨膜蛋白分离后与未折叠蛋白结合,进而导致内质网应激和 UPR<sup>[21]</sup>。PERK 是内质网膜上的一种感受蛋白,在 UPR 初期可以调控蛋白的合成减轻内质网应激。在内质网应激过程中,PERK 与 GRP78 分离后,进而增加促凋亡蛋白 CHOP 的表达,最终活化

caspase-3 从而激活细胞凋亡信号通路,促使细胞发生凋亡<sup>[22]</sup>。PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路是重要的内质网应激反应通路。Laing 等<sup>[5]</sup>研究发现 PM<sub>2.5</sub> 通过 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路介导的内质网应激诱发肺和肝脏组织细胞凋亡。为了探究内质网应激在 PM<sub>2.5</sub> 诱导子宫组织凋亡中的作用,本实验中我们检测了 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路中的关键蛋白的表达情况。雌鼠暴露 PM<sub>2.5</sub> 后,子宫中 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$  和 CHOP 在 mRNA 和蛋白水平的表达水平均明显升高(结果见图 2 和 3),由此实验结果可知短期暴露 PM<sub>2.5</sub> 可使内质网应激信号通路中 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$  和 CHOP 蛋白表达水平升高,激活 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路。

综合本次实验结果,我们推测短期暴露 PM<sub>2.5</sub> 对子宫的损伤作用可能与 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路介导子宫组织发生内质网应激反应,并诱导子宫组织细胞发生凋亡有关。但本次实验中未对内质网应激中其他信号通路中的关键蛋白进行检测,不能确定短期暴露 PM<sub>2.5</sub> 是否会通过其他信号通路诱发内质网应激,因而在之后的实验中还需进一步验证。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Zhu X, Liu Y, Chen YY, et al. Maternal exposure to fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and pregnancy outcomes: a meta-analysis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22 (5): 3383-3396.
- [2] Malley CS, Kuylenstierna JC, Vallack HW, et al. Preterm birth associated with maternal fine particulate matter exposure: A global, regional and national assessment [J]. *Environ Int*, 2017, 101: 173-182.
- [3] 张丰泉,董恩恒,王茂,等. PM<sub>2.5</sub> 对雌鼠生殖内分泌水平和妊娠结局的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25 (4): 455-460.  
Zhang FQ, Dong EH, Wang M, et al. Effects of PM<sub>2.5</sub> on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in female rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(4): 455-460.
- [4] Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(10): 1389-1398.
- [5] Laing S, Wang G, Briazova T, et al. Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(4): C736-749.
- [6] Zhang Y, Li S, Li J, et al. Developmental toxicity induced by PM<sub>2.5</sub> through endoplasmic reticulum stress and autophagy pathway in zebrafish embryos [J]. *Chemosphere*. 2018, 197: 611-621.

露的毒性作用,本次实验将 SD 雌鼠的暴露时间延长为 30 d 的短期暴露,从而观察 PM<sub>2.5</sub>对雌鼠子宫损伤效应。PM<sub>2.5</sub>短期暴露后,雌鼠子宫组织结构发生了明显的病理损伤变化,造成子宫内膜上皮细胞萎缩,细胞间隙增大,且细胞出现空泡化;同时腺体也出现萎缩现象(见图 1),由此结果可见空气中 PM<sub>2.5</sub>短期暴露对子宫组织结构有损伤,PM<sub>2.5</sub>具有生殖毒性。

已有研究证实 PM<sub>2.5</sub>可通过活化 T-细胞免疫蛋白和 TIM 蛋白,进而诱发肺组织凋亡<sup>[18]</sup>。Yang 等<sup>[19]</sup>的研究发现,心肌细胞暴露 PM<sub>2.5</sub>后,细胞中的氧化应激水平升高,触发 bcl-2-bax-caspase-3 凋亡信号,进而诱发心肌细胞凋亡。由此可见 PM<sub>2.5</sub>可通过多途径诱导组织细胞发生凋亡。本次研究中我们采用 TUNEL 法检测雌鼠短期暴露 PM<sub>2.5</sub>后子宫组织细胞凋亡情况。实验结果表明,低剂量和高剂量 PM<sub>2.5</sub>暴露组细胞凋亡率均明显高于对照组。caspase-3 是 caspase 家族中具有重用凋亡调控重用的蛋白,也是内质网应激信号通路下游重要的凋亡调节蛋白,而 cleaved caspase-3 蛋白是反映凋亡的标志蛋白。本实验中为了验证子宫细胞凋亡的发生,我们同时检测了子宫 cleaved caspase-3 蛋白表达水平。实验结果表明,低剂量和高剂量 PM<sub>2.5</sub>暴露组子宫 cleaved caspase-3 蛋白表达量明显高于对照组(结果见图 4E),与 TUNEL 检测结果相一致。由以上结果可知短期暴露 PM<sub>2.5</sub>可诱导子宫细胞发生凋亡,进而推测 PM<sub>2.5</sub>生殖损伤作用可能与其诱发的细胞凋亡有关。

内质网不仅是合成和分泌蛋白的场所,同时还可介导细胞的凋亡信号通路<sup>[20]</sup>。内质网功能混乱会使未折叠或错误折叠的蛋白堆积于细胞内,并诱发内质网应激反应。过强的内质网应激导致细胞发生未折叠蛋白质应答反应(UPR),进而触发细胞内的凋亡信号传导通路,诱发细胞凋亡。UPR 主要受到跨膜蛋白如 PERK、肌醇酶 1(IRE1)和活化转录因子 6(ATF6)调控。这些跨膜蛋白通常是以与 GRP78 结合的复合形态存在于内质网膜上。当未折叠蛋白过度堆积时,GRP78 会与跨膜蛋白分离后与未折叠蛋白结合,进而导致内质网应激和 UPR<sup>[21]</sup>。PERK 是内质网膜上的一种感受蛋白,在 UPR 初期可以调控蛋白的合成减轻内质网应激。在内质网应激过程中,PERK 与 GRP78 分离后,进而增加促凋亡蛋白 CHOP 的表达,最终活化

caspase-3 从而激活细胞凋亡信号通路,促使细胞发生凋亡<sup>[22]</sup>。PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路是重要的内质网应激反应通路。Laing 等<sup>[5]</sup>研究发现 PM<sub>2.5</sub>通过 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路介导的内质网应激诱发肺和肝脏组织细胞凋亡。为了探究内质网应激在 PM<sub>2.5</sub>诱导子宫组织凋亡中的作用,本实验中我们检测了 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路中的关键蛋白的表达情况。雌鼠暴露 PM<sub>2.5</sub>后,子宫中 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$  和 CHOP 在 mRNA 和蛋白水平的表达水平均明显升高(结果见图 2 和 3),由此实验结果可知短期暴露 PM<sub>2.5</sub>可使内质网应激信号通路中 GRP78、PERK、eIF2 $\alpha$  和 CHOP 蛋白表达水平升高,激活 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路。

综合本次实验结果,我们推测短期暴露 PM<sub>2.5</sub>对子宫的损伤作用可能与 PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP 信号通路介导子宫组织发生内质网应激反应,并诱导子宫组织细胞发生凋亡有关。但本次实验中未对内质网应激中其他信号通路中的关键蛋白进行检测,不能确定短期暴露 PM<sub>2.5</sub>是否会通过其他信号通路诱发内质网应激,因而在之后的实验中还需进一步验证。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Zhu X, Liu Y, Chen YY, et al. Maternal exposure to fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and pregnancy outcomes: a meta-analysis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22 (5): 3383-3396.
- [2] Malley CS, Kuylenstierna JC, Vallack HW, et al. Preterm birth associated with maternal fine particulate matter exposure: A global, regional and national assessment [J]. *Environ Int*, 2017, 101: 173-182.
- [3] 张丰泉,董恩恒,王茂,等. PM<sub>2.5</sub>对雌鼠生殖内分泌水平和妊娠结局的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25 (4): 455-460.  
Zhang FQ, Dong EH, Wang M, et al. Effects of PM<sub>2.5</sub> on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in female rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(4): 455-460.
- [4] Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(10): 1389-1398.
- [5] Laing S, Wang G, Briazova T, et al. Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(4): C736-749.
- [6] Zhang Y, Li S, Li J, et al. Developmental toxicity induced by PM<sub>2.5</sub> through endoplasmic reticulum stress and autophagy pathway in zebrafish embryos [J]. *Chemosphere*. 2018, 197: 611-621.

- [ 7 ] Burroughs KD, FuchsYoung R, Davis B, et al. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(5):1322-1330.
- [ 8 ] Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez Md Mde L, et al. Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(4): 445-452.
- [ 9 ] Li R, Kou X, Geng H, et al. Effect of ambient PM<sub>2.5</sub> on lung mitochondrial damage and fusion/fission gene expression in rats [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(3):408-418.
- [ 10 ] 晋乐飞, 吴卫东, 张巧, 等. 吸入式气管滴注法的建立 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2015, 50(1):75-78.  
Jin Y, Wu W, Zhang Q, et al. Establishment of an inhalable intratracheal instillation [J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2015, 50(1): 75-78.
- [ 11 ] Lelieveld J, Evans JS, Fnais M, et al. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale [J]. *Nature*, 2015, 525 (7569): 367-371.
- [ 12 ] Stillerman KP, Mattison DR, Giudice LC, et al. Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: a review of the science [J]. *Reprod Sci*, 2008, 15(7): 631-650.
- [ 13 ] Goyal N, Canning D. Exposure to ambient fine particulate air pollution in utero as a risk factor for child stunting in Bangladesh [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 15(1): 22.
- [ 14 ] Son JY, Lee HJ, Koutrakis P, et al. Pregnancy and lifetime exposure to fine particulate matter and infant mortality in Massachusetts, 2001-2007 [J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 186(11):1268-1276.
- [ 15 ] Kingsley SL, Eliot MN, Glazer K, et al. Maternal ambient air pollution, preterm birth and markers of fetal growth in Rhode Island; results of a hospital-based linkage study [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2017, 71(12):1131-1136.
- [ 16 ] Maisonet M, Correa A, Misra D, et al. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth [J]. *Environ Res*, 2004, 95(1): 106-115.
- [ 17 ] Gehring U, Wijga AH, Fischer P, et al. Traffic-related air pollution, preterm birth and term birth weight in the PIAMA birth cohort study [J]. *Environ Res*, 2011, 111(1):125-135.
- [ 18 ] Zhao YX, Zhang HR, Yang XN, et al. Fine particulate matter-induced exacerbation of allergic asthma via activation of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(20): 2461-2473.
- [ 19 ] Yang X, Feng L, Zhang Y, et al. Cytotoxicity induced by fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) via mitochondria-mediated apoptosis pathway in human cardiomyocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 161: 198-207.
- [ 20 ] Hawes C, Kiviniemi P, Kriechbaumer V. The endoplasmic reticulum: a dynamic and well-connected organelle [J]. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57(1): 50-62.
- [ 21 ] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.
- [ 22 ] Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1071-1082.

[ 收稿日期 ] 2019-05-06